

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 421**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 5/24 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2006 E 11166787 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2380592**

54 Título: **Anticuerpo antagonista dirigido contra un péptido relacionado con el gen de la calcitonina**

30 Prioridad:

14.11.2005 US 736623 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 664 421 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

Anticuerpo antagonista dirigido contra un péptido relacionado con el gen de la calcitonina**Descripción**5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos antagonistas anti-CGRP.

10 Antecedentes de la invención

El CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) es un neuropéptido de 37 aminoácidos, que pertenece a una familia de péptidos que incluye la calcitonina, adrenomedulina y amilina. En los seres humanos, existen dos formas de CGRP (α -CGRP y β -CGRP) y tienen actividades similares. Varían en tres aminoácidos y muestran una distribución diferente. Hay al menos dos subtipos de receptores CGRP que también podrían indicar diferentes funciones. El CGRP es un neurotransmisor del sistema nervioso central, y se ha demostrado que es un potente vasodilatador en la periferia, donde las neuronas que contienen CGRP están estrechamente asociadas con los vasos sanguíneos. La vasodilatación mediada por el CGRP también se asocia con inflamación neurogénica, como parte de una cascada de acontecimientos que dan como resultado la extravasación de plasma y la vasodilatación del sistema microvascular y que está presente en la migraña. Tan et al, Clinical Science, 1995, Vol. 89, páginas 565-573 divulga el inmunobloqueo de CGRP en un modelo de vasodilatación cutánea. El CGRP se ha destacado por su posible conexión con los síntomas vasomotores (Wyon y col. Scand. J. Urol. Nephrol. 35: 92-96 (2.001); Wyon y col. Menopause 7(1):25-30 (2.000)). Los síntomas vasomotores (VMS), tales como los sofocos y la sudoración nocturna, son los síntomas más comunes que se asocian con la menopausia, que se presentan en el 60% al 80% de todas las mujeres después de la menopausia natural o inducida quirúrgicamente. Los sofocos probablemente son una respuesta adaptativa del sistema nervioso central (CNS) al declive de los esteroides sexuales (Freedman Am. J. Human Biol. 13:453-464 (2.001)). Hasta la fecha, las terapias más eficaces para los sofocos son los tratamientos basados en hormonas, incluyendo los estrógenos y algunas progestinas. Los tratamientos hormonales pueden ser eficaces para aliviar los sofocos, pero no son apropiados para todas las mujeres. Los síntomas psicológicos y emocionales que se observan, tales como nerviosismo, fatiga, irritabilidad, insomnio, depresión, pérdida de memoria, dolores de cabeza, ansiedad, nerviosismo o incapacidad para concentrarse se consideran como la causa de la falta de sueño que sigue a los sofocos y la sudoración nocturna (Kramer y col., En: Murphy y col., 3.sup.rd Int'l Symposium on Recent Advances in Urological Cancer Diagnosis and Treatment-Proceedings, París, Francia: SCI: 3-7 (1.992)).

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

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

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

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

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

5 La migraña es una afección neurológica compleja común que se caracteriza por ataques episódicos graves de dolor de cabeza y características asociadas, que pueden incluir náuseas, vómitos, sensibilidad a la luz, el ruido o movimiento. En algunos pacientes, el dolor de cabeza está precedido o acompañado por un aura. El dolor de cabeza puede ser intenso y también puede ser unilateral en ciertos pacientes.

10 Los ataques de migraña perturban la rutina diaria. En EE.UU. y Europa occidental, la prevalencia total de personas que sufren migrañas es del 11% de la población general (el 6% masculina; el 15-18% femenina). Además, la frecuencia media de los ataques en un individuo es de 1,5/mes. Aunque hay varios tratamientos disponibles para aliviar o reducir los síntomas, se recomienda la terapia preventiva para aquellos pacientes que tienen más de 3-4 ataques de migraña al mes. Goadsby y col. New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2.002.

15 La variedad de intervenciones farmacológicas que han venido utilizándose para tratar la migraña y la variabilidad en la respuesta entre los pacientes son el testimonio de la naturaleza diversa de este trastorno. Por tanto, se han utilizado drogas relativamente no selectivas tales como los alcaloides del cornezuelo (por ejemplo, ergotamina, dihidroergotamina, metisergida), que muestran actividad serotoninérgica, así como adrenérgica, noradrenérgica y dopaminérgica, durante más de ochenta años para tratar la migraña. Otros tratamientos incluyen opiáceos (por ejemplo, oxiconona) y antagonistas β -adrenérgicos (por ejemplo, propanolol). Algunos pacientes, habitualmente los que tienen síntomas más suaves, son capaces de controlar sus síntomas con remedios que no necesitan prescripción tales como uno o más agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como una combinación de aspirina, paracetamol y cafeína (por ejemplo, Excedrin® Migraña).

25 Más recientemente, algunos pacientes de migraña se han tratado con topiramato, un anticonvulsivante que bloquea los canales de sodio dependientes del voltaje y ciertos receptores de glutamato (AMPA-kainato), potencia la actividad del receptor GABA-A y bloquea la anhidrasa carbónica. El éxito relativamente reciente de los receptores agonistas de la serotonina 5HT-1B/1D y/o 5HT-1a, tal como sumatriptano, en algunos pacientes ha llevado a los investigadores a proponer una etiología serotoninérgica del trastorno. Desafortunadamente, aunque algunos
30 pacientes responden bien a este tratamiento, otros son relativamente resistentes a sus efectos.

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

Breve resumen de la invención

45 La invención que se desvela en el presente documento concierne a anticuerpos antagonistas anti-CGRP.

Según la presente invención, se proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP que comprende un dominio de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y un dominio de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP reconoce un CGRP humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a ambos α -CGRP y β -CGRP humanos. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a CGRP humano y de rata. El anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al fragmento del extremo C que tiene los aminoácidos 25-37 del CGRP. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al epítipo del extremo C en los aminoácidos 25-37 del CGRP.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo G1 (como se describe en el presente documento). El anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Figura 5 (SEC. ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en la Figura 5 (SEC. ID N°: 2).

60 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, como una región constante que es inmunológicamente inerte (incluyendo parcialmente inmunológicamente inerte), por ejemplo, que no inicia la lisis mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), no activa la microglía, o que tiene reducidas una o más de estas actividades. En algunas
65 realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624; Solicitud

de Patente N° PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente del R.U N° 9809951.8. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada en IgG2 humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2 del tipo silvestre) Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada del anticuerpo es una cadena pesada de IgG1 humana con cualquiera de las siguientes mutaciones: 1) A327A330P331 a G327S330S331; 2) E233L234L235G236 a P233V234A235 con G236 borrado; 3) E233L234L235 a P233V234A235; 4) E233L234L235G236A327A330P331 a P233V234A235G327S330S331 con G236 borrado; 5) E233L234L235A327A330P331 a P233V234A235G327S330S331; y 6) N297 a A297 o cualquier otro aminoácido excepto N. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada del anticuerpo es una cadena pesada de IgG4 humana con cualquiera de las siguientes mutaciones: E233F234L235G236 a P233V234A235 con G236 borrado; E233F234L235 a P233V234A235; y S228L235 a P228E235.

En otras realizaciones más, la región constante está aglicosilada por glicosilación unida a N. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glicosilación unida a N por mutación del resto de fijación del oligosacárido (tal como Asn297) y/o los restos laterales que son parte de la secuencia de reconocimiento de la glicosilación N en la región constante. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glicosilación unida a N. La región constante puede estar aglicosilada por glicosilación unida a N enzimática o por expresión de la glicosilación en una célula hospedadora deficiente.

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista anti-CGRP (tal como al α -CGRP humano medida por resonancia de plasmones de superficie a una temperatura adecuada, tal como 25 o 37 °C) puede ser de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 nM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, o aproximadamente 2 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor que cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM.

El anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede administrar antes, durante y/o después del dolor de cabeza. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se administra antes del ataque de dolor de cabeza (por ejemplo, migraña o dolor de cabeza en racimo). La administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP puede hacerse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo: la vía oral, intravenosa, subcutánea, intraarterial, intramuscular, intracardiaca, intraespinal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, transdérmica, y/o vía inhalatoria. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, por vía intravenosa, o localizada.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede administrar en conjunción con otro agente, tal como otro agente para tratar el dolor de cabeza.

La presente invención también proporciona anticuerpos antagonistas anti-CGRP derivados del anticuerpo G1. El anticuerpo G1 (llamado de forma intercambiable "G1") es producido por vectores de expresión que tienen los números de referencia de ATCC PTA-6866 y PTA-6867. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de G1 se muestran en la Figura 5. Las partes de la región complementariamente determinante (CDR) del anticuerpo G1 (incluyendo las CDR Chothia y Kabat) también se muestran en la Figura 5. Se entiende que la referencia a cualquier parte de o la región entera del G1 engloba secuencias producidas por los vectores de expresión que tienen N°s de referencia de ATCC PTA-6866 y PTA-6867, y/o las secuencias representadas en la Figura 5. Las variantes del anticuerpo G1 con las secuencias de aminoácidos se representan en la Tabla 6.

La invención es un anticuerpo que comprende un dominio de V_H que es 100% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC ID N°:1 y un dominio de V_L que es 100% idéntica en la secuencia de aminoácidos a la SEC ID N°:2.

En una realización, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende un fragmento o una región del anticuerpo G1. El fragmento contiene las regiones variables de una cadena ligera y una cadena pesada del anticuerpo G1. El fragmento contiene las regiones variables de una cadena ligera y una cadena pesada mostradas en la Figura 5.

En algunas realizaciones, la CDR es una CDR Kabat. En otras realizaciones, la CDR es una CDR Chothia. En otras realizaciones, la CDR es una combinación de una CDR Kabat y Chothia (también denominada "CDR combinada" o "CDR extendida"). En otras palabras, para cada realización determinada que contiene más de una CDR, la CDR puede ser cualquiera, Kabat, Chothia, y/o combinadas.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP está aislado. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es sustancialmente puro.

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

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

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido (que puede estar aislado) que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo antagonista anti-CGRP de la invención. En una realización, el polinucleótido comprende un polinucleótido que codifica un fragmento o una región del anticuerpo G1. El fragmento contiene las regiones variables de una cadena ligera y una cadena pesada del anticuerpo G1.

El polinucleótido (que puede estar aislado) puede comprender un polinucleótido que codifica para el anticuerpo G1. El polinucleótido comprende cualquiera o ambos de los polinucleótidos mostrados en la SEC ID N°:9 y la SEC ID N°:10.

En otro aspecto, la invención proporciona vectores (incluyendo vectores de expresión y de clonación) y células huésped que comprenden cualquier polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-CGRP de la invención. En algunas realizaciones, el vector es pDb.CGRP.hFcGI que tiene el N° de ATCC PTA-6867. En otras realizaciones, el vector es pEb.CGRP.hKGI que tiene el N° de ATCC PTA-6866.

En otro aspecto, la invención es una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo antagonista anti-CGRP de la invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo es anticuerpo G1.

En otro aspecto, la invención es un método para generar anticuerpo G1 que comprende cultivar una célula huésped o prole de la misma bajo condiciones que permitan la producción del anticuerpo G1, en donde la célula huésped comprende un vector de expresión que codifica para un anticuerpo G1; y, en algunas realizaciones, purificar el anticuerpo G1. El vector de expresión comprende una o ambas de las secuencias de polinucleótidos mostradas en la SEC ID N°:9 y la SEC ID N°: 10. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para generar los anticuerpos antagonistas anti-CGRP de la invención expresando uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo (que pueden expresarse de manera separada como una cadena ligera o pesada individual, o ambas cadena ligera y pesada se expresan de un vector) en una célula adecuada, seguido generalmente por recuperación y/o aislando el anticuerpo de interés.

El anticuerpo antagonista anti-CGRP, y los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para tratar, prevenir, mejorar, controlar, o reducir la incidencia de enfermedades asociadas con la función anormal del CGRP, tales como el dolor de cabeza (por ejemplo, migraña, dolor de cabeza en racimo, dolor de cabeza crónico, y dolor de cabeza por tensión) y otras afecciones que se pueden tratar o prevenir antagonizando la actividad del CGRP.

En otro aspecto, la invención proporciona kits y composiciones que comprenden cualquiera de las una o más composiciones descritas en el presente documento. Estos kits, generalmente en un envase adecuado y provistos de las instrucciones apropiadas, son útiles para cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una tabla que muestra las afinidades de unión de 12 anticuerpos murinos para diferentes fragmentos de α -CGRP humano con sustitución de alanina. Las afinidades de unión se midieron a 25 °C utilizando el Biacore fluyendo Fabs a través de los CGRP sobre el chip. Los valores encasillados representan la pérdida de afinidad de los mutantes de alanina en relación al fragmento parental, 25-37 (en cursiva), excepto K35A, que se derivó a partir de un 19-37 parental. "a" indica afinidades para los fragmentos 19-37 y 25-37 son el promedio medio \pm desviación estándar de dos mediciones independientes sobre los diferentes chips sensores. "b" indica estas interacciones desviadas de un modelo de interacción bimolecular simple debido a una constante de disociación bifásica, por lo que sus afinidades se determinaron utilizando un modelo de cambio conformacional. Clave de escala de grises: blanco (1,0) indica la afinidad parental; gris claro (menos de 0,5) indica una afinidad mayor que la parental; gris oscuro (más de 2) indica menor afinidad que la parental; y el negro indica que no se detectó ninguna unión.

Las figuras 2A y 2B muestran el efecto de la administración de CGRP 8-37 (400 nmol/kg), anticuerpo 4901 (25 mg/kg), y anticuerpo 7D11 (25 mg/kg) sobre el flujo sanguíneo de la piel medido como flujo celular sanguíneo después de la estimulación por pulsos eléctricos durante 30 segundos. El CGRP 8-37 se administró intravenosamente (iv) 3-5 min antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Los anticuerpos se administraron

por vía intraperitoneal (ip) 72 horas antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Cada punto en los gráficos representa el AUC de una rata tratada bajo las condiciones indicadas. El AUC (área bajo la curva) igual el flujo A x tiempo A. "Flujo A" representa el cambio de unidades de flujo después de la estimulación por pulsos eléctricos; y "tiempo A" representa el periodo de tiempo que toma el flujo celular para volver al nivel de antes de la estimulación por pulsos eléctricos.

La figura 3 muestra el efecto de la administración de distintas dosificaciones de anticuerpo 4901 (25 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg, o 1 mg/kg) sobre el flujo sanguíneo cutáneo como el flujo celular sanguíneo después de una estimulación por pulsos eléctricos durante 30 segundos. Los anticuerpos se administraron por vía intravenosa (iv) 24 horas antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Cada punto en el gráfico representa el AUC de una rata tratada bajo las condiciones indicadas. La línea del gráfico representa el promedio de AUC de ratas tratadas bajo las condiciones indicadas.

Las figuras 4A y 4B muestran el efecto de la administración del anticuerpo 4901 (1 mg/kg o 10 mg/kg, i.v.), el anticuerpo 7E9 (10 mg/kg, i.v.), y el anticuerpo 8B6 (10 mg/kg, i.v.) sobre el flujo sanguíneo de la piel medido como el flujo celular sanguíneo después de una estimulación por pulso eléctrico durante 30 segundos. Los anticuerpos se administraron por vía intravenosa (i.v.) seguido por estimulación por pulsos eléctricos a los 30 min, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo. El eje Y representa el porcentaje de AUC cuando se compara con el nivel de AUC cuando no se administra ningún anticuerpo (tiempo 0). El eje X representa el periodo de tiempo (minutos) entre la administración de anticuerpos y la estimulación por pulsos eléctricos. "*" indica una $p < 0,05$, y "***" indica una $p < 0,01$, cuando se compara con el tiempo 0. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una dirección con un ensayo de comparación múltiple de Dunnett.

La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC. ID N°:1) y la región variable de la cadena ligera (SEC. ID N°:2) del anticuerpo G1. Las CDR Kabat están en el texto en negrita, y las CDR Chothia están subrayadas. Los restos de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera se han numerado secuencialmente.

La figura 6 muestra la localización de epítomos del anticuerpo G1 por competición de péptidos utilizando Biacore. El α -CGRP se capturó en el chip sensor SA. El Fab del G1 (50 nM) en ausencia de un péptido competidor o pre-incubado durante una hora con 10 μ M de un péptido competidor se derramó sobre el chip. Se midió la unión del Fab G1 al α -CGRP en el chip. El eje Y representa el promedio de unión bloqueado por la presencia del péptido competidor comparado con la unión en ausencia del péptido competidor.

La figura 7 muestra el efecto de la administración del anticuerpo G1 (1 mg/kg o 10 mg/kg, i.v.) o el vehículo (PBS, Tween al 0,01%) sobre el flujo sanguíneo de la piel como el flujo celular sanguíneo después de una estimulación por pulsos eléctricos durante 30 segundos. El anticuerpo G1 o el vehículo se administró por vía intravenosa (i.v.) seguido por estimulación nerviosa por pulsos eléctricos a los 30 min, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo. El eje Y representa el porcentaje de AUC cuando se compara con el nivel del AUC cuando no se administró (tiempo 0) ni anticuerpo ni vehículo (definido como el 100%). El eje X representa el periodo de tiempo (en minutos) entre la administración de los anticuerpos y la estimulación por pulsos eléctricos. "*" indica una $p < 0,05$, y "***" indica una $p < 0,01$, cuando se compara con el vehículo. Los datos se analizaron utilizando el ANOVA de dos direcciones y los post-ensayos de Bonferroni.

La figura 8A muestra el efecto de la administración del anticuerpo G1 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg, i.v.) o el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%) sobre el flujo sanguíneo de la piel medido como el flujo celular sanguíneo después de la estimulación por pulsos eléctricos durante 30 segundos, 24 horas después de la dosificación. El anticuerpo G1 o el vehículo se administró por vía intravenosa (i.v.) 24 horas antes de la estimulación nerviosa por pulsos eléctricos. El eje Y representa el área bajo la curva total (cambio en el flujo celular sanguíneo multiplicado por el cambio en el tiempo desde la estimulación hasta que el flujo retorna a la línea base, AUC). El eje X representa la variación de dosis de anticuerpo G1. "*" indica una $p < 0,05$, y "***" indica una $p < 0,01$, cuando se compara con el vehículo. Los datos se analizaron utilizando el ANOVA de una dirección y el ensayo de comparación múltiple de Dunn.

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

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

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

vehículo. Los datos se analizaron utilizando el ANOVA de una dirección y el ensayo de comparación múltiple de Dunett.

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

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

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

Descripción detallada de la invención

La invención que se divulga en el presente documento proporciona anticuerpos antagonistas anti-CGRP que comprenden un dominio de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y un dominio de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:2. Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP pueden derivarse de G1. La invención también proporciona métodos para elaborar estos anticuerpos antagonistas anti-CGRP-

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleara, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están en la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican ampliamente en la literatura, tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1.989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1.984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1.998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1.987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1.998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1.993-1.998) J. Wiley y Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Cabs, eds., 1.987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1.987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., eds., 1.994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1.991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley y Sons, 1.999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1.997); Antibodies (P. Finch, 1.997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1.988-1.989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2.000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1.995).

Definiciones

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

Como se utiliza en el presente documento, “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden

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

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

Como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos conocidas en la técnica o desveladas en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye los anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada o al menos un polipéptido humano de cadena ligera. Un ejemplo de tales anticuerpos es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y de cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando varias técnicas que se conocen en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, en la que la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1.996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets y col., 1.998, *PNAS*, (EE.UU) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1.991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks y col., 1.991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Los anticuerpos humanos también se pueden fabricar introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Esta estrategia se describe en las Patentes de Estados Unidos N^{os} 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. De manera alternativa, el anticuerpo humano se puede preparar inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B se pueden recuperar de un individuo o se pueden inmunizar in vitro). Véase, por ejemplo, Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1.985); Boemer y col., 1.991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; y Patente de Estados Unidos N° 5.750.373.

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

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo antagonista anti-CGRP" (llamado intercambiamente "anticuerpo anti-CGRP") se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al CGRP e inhibe la actividad biológica del CGRP y/o las rutas corriente abajo mediadas por la señalización de CGRP. Un anticuerpo antagonista anti-CGRP engloba anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (incluso significativamente) la actividad biológica del CGRP, incluyendo las rutas corriente abajo mediadas por la señalización del CGRP, tales como la unión al receptor y/o la obtención de una respuesta celular al CGRP. Para los

fines de la presente invención se entenderá explícitamente que la expresión “anticuerpo antagonista anti-CGRP” engloba todos los términos, títulos, y estados funcionales y características previamente identificados por los que el CGRP en sí mismo, una actividad biológica del CGRP (incluyendo, pero sin limitarse a su capacidad para mediar cualquier aspecto del dolor de cabeza), o las consecuencias de la actividad biológica, son sustancialmente anulados, disminuidos, o neutralizados en algún grado significativo. En alguna realización, un anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al CGRP y previene la unión del CGRP al receptor CGRP. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-CGRP se une al CGRP y previene la activación del receptor CGRP. Se proporcionan en el presente documento anticuerpos antagonistas anti-CGRP.

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

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

“Polinucleótido”, o “ácido nucleico”, como se utiliza intercambiamente en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero por la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si existe, la modificación de la estructura del nucleótido se puede realizar antes o después de ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir con componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “caps”, sustitución de uno o más de los nucleótidos presentes de forma natural con un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con uniones no cargadas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos pendientes, tales como por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply- L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con uniones modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas sin modificar del polinucleótido(s). Además, se pueden reemplazar cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores de referencia, o activados para preparar uniones adicionales con nucleótidos adicionales, o puede conjugarse con soportes sólidos. El extremo OH 5' y 3' puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos orgánicos de tapado de desde 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivar de grupos protectores de referencia. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2' - O - metil -, 2'- O - alil, 2' - fluoro - o 2' - azido - ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares a-anoméricos, azúcares epiméricos tales como la arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de la piranosa, azúcares de la furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como el metil ribósido. Se pueden reemplazar una o más uniones fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos alternativos de unión, pero sin limitarse a estos, incluyen realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O) NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O) OR', CO o CH₂ (“formacetal”), en el cual cada R o R' es independientemente H o un alquil (1 - 20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente una unión éter (- O -), aril, alquenil, cicloalquil, cicloalquenil o araldil. No todas las uniones en un polinucleótidos necesitan ser idénticas. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a que se refiere el presente documento, incluyendo el ARN y el ADN.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sea sola o en combinación. Las regiones variables de cada cadena pesada y ligera consisten de cuatro regiones marco conservadas (FR) conectadas por tres regiones complementariamente determinantes (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada

cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Hay al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) una estrategia basada en la variabilidad de la secuencia cruzada entre especies (es decir, Kabat y col. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1.991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) una estrategia basada en estudios de cristalografía de los complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani y col (1.997) *J. Molec. Biol.* 273: 927- 948)). Como se utiliza en el presente documento, una CDR se puede referir a CDR definidas por cada estrategia o por una combinación de ambas estrategias.

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

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

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

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

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

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

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

Una “región funcional Fc” posee al menos una función de efector de una secuencia nativa de región Fc. Las “funciones de efector” ejemplarizadas incluyen la unión C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor Fc; la toxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); la fagocitosis; la regulación negativa de los receptores celulares de superficie (por ejemplo, el receptor de células B; BCR), etc. Tales

funciones efectoras necesitan generalmente la región Fc para combinarse con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando varios ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras del anticuerpo.

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

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

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

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

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

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

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

se compara con los que no utilizan el procedimiento. Tales comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, utilizando un número estadísticamente significativo de sujetos.

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

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

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

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

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

Como se utiliza en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite al ingrediente retener la actividad biológica y no es reactivo con el sistema inmune del sujeto. Ejemplos de esto incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos de referencia tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como la emulsión de aceite/agua, y varios tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para la vía por aerosol o la administración parenteral son solución salina tamponada con fosfato o normal (0,9%). Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co.; Easton, PA, 1.990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing, 2.000).

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

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

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

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

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

B. Anticuerpos antagonistas anti-CGRP

Un anticuerpo antagonista anti-CGRP se refiere a una molécula de anticuerpo que bloquea, suprime o reduce (incluyendo significativamente) la actividad biológica de CGRP, incluyendo las vías secuencia abajo mediadas por la señalización de CGRP, como la unión al receptor y/o la inducción de una respuesta celular a CGRP.

Un anticuerpo antagonista anti-CGRP debería mostrar una o más de las características siguientes: (a) unirse a CGRP; (b) bloquear que CGRP se una a su receptor(es); (c) bloquear o disminuir la activación del receptor de CGRP (incluyendo la activación de cAMP); (d) inhibir la actividad biológica de CGRP o las vías secuencia abajo mediadas por la función de señalización de CGRP; (e) evitar, mejorar, o tratar cualquier aspecto del dolor de cabeza (por ejemplo, migraña); aumentar la depuración de CGRP; y (g) inhibir (reducir) la síntesis de CGRP, su producción o liberación. Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Tan y col., Clin. Sci. (Lond). 89:565-73, 1.995; Sigma (Missouri, US), número de producto C7113 (clone nº4901); Plourde y col., Peptides 14:1225-1229, 1.993.

El anticuerpo antagonista anti-CGRP de la presente invención reacciona con el CGRP de una manera que inhibe al CGRP y/o la vías secuencia abajo mediadas por la función de señalización del CGRP. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP reconoce el CGRP humano. En algunas realizaciones el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a ambos α -CGRP y β -CGRP humanos. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al CGRP humano y de rata. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al fragmento del extremo C que tiene los aminoácidos 25-37 del CGRP. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al epítipo del extremo C con los aminoácidos 25-37 de CGRP.

Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP de la presente invención pueden abarcar fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), cadena sencilla (ScFv), proteínas de fusión que comprenden una porción del anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo del cominio), y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la invención, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos, y anticuerpos modificados covalentemente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo G1 (como se describe en el presente documento). El anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en la Figura 5 (SEC. ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en la Figura 5 (SEC. ID N°:2).

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

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista anti-CGRP (tal como el α -CGRP humano) puede ser de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 110 pM,

aproximadamente 5 pM, o aproximadamente 2 pM. En algunas reivindicaciones, la afinidad de unión es menor que cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM.

5

Una manera de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos al CGRP es midiendo la afinidad de unión de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener los fragmentos monofuncionales, un anticuerpo por ejemplo, una IgG) se escinde con papaína o se expresa recombinantemente. La afinidad de un fragmento Fab anti-CGRP de un anticuerpo se puede determinar por resonancia de plasmones de superficie (sistema de resonancia de plasmones de superficie Biacore3000™ (SPR), Biacore, INC, Piscataway NJ) equipado con chips sensores pre-inmovilizados con estreptavidina (SA) utilizando un tampón de realización HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005% v/v). El CGRP humano biotinilado (o cualquier otro CGRP) se puede diluir en tampón HBS-EP a una concentración de menos de 0,5 ug/ml y se inyecta a través de los canales individuales de los chips utilizando tiempos variables de contacto, para conseguir dos intervalos de densidad del antígeno, tanto de 50-200 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados, o de 800-1000 RU para ensayos de selección. Los estudios de regeneración han demostrado que la NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v elimina eficazmente la unión Fab aunque manteniendo la actividad del CGRP en el chip para más de 200 inyecciones. Típicamente, las diluciones seriadas (concentraciones que abarcan de 0,1-10x de la K_D estimada) de las muestras Fav se inyectan durante un min a 100 μ l/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan por ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE utilizando un Fab de concentración conocida (como se determina por el análisis de aminoácidos) como una referencia. Las tasas cinéticas de asociación (k_{on}) y la tasa de disociación (k_{off}) se obtienen simultáneamente ajustando los datos globalmente a un modelo de unión Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1.994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) utilizando el programa BIAevaluation. Los valores de equilibrio de la constante de disociación (K_D) se calculan como k_{off}/k_{on} . Este protocolo se usa adecuadamente para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier CGRP, incluyendo el CGRP humano, el CGRP de otro mamífero (tal como el CGRP de ratón, el CGRP de rata, el CGRP de primates), así como diferentes formas de CGRP (tal como las formas α y β). La afinidad de unión de un anticuerpo generalmente se mide a 25 °C, pero también se puede medir a 37 °C.

30

Los anticuerpos se pueden unir a varios vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen el polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble, para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica sabrán de otros vehículos adecuados para su unión a anticuerpos, o serán capaces de asegurarla, utilizando la experimentación de rutina. En algunas realizaciones, el vehículo comprende un resto que reconoce el miocardio.

35

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

La invención engloba anticuerpo G1; y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican G1.

40

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

45

En consecuencia, el antagonista anti-CGRP de la invención puede comprender cualquiera de los siguientes: (a) anticuerpo G1; (b) un fragmento o región del anticuerpo G1; (c) una cadena ligera y una cadena pesada del anticuerpo G1; (d) la región variable de una cadena ligera y una cadena pesada del anticuerpo G1.

50

Las porciones de CDR del anticuerpo G1 (incluyendo CDRs Chothia y Kabat) se representan diagramáticamente en la Figura 5. La determinación de las regiones CDR es bien conocida dentro de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDRs pueden ser una combinación de la CDR Kabat y Chothia (también denominadas "CDRs combinadas" o "CDRs extendidas"). En algunas realizaciones, las CDRs son CDRs Kabat. En otras realizaciones, las CDRs son las CDRs Chothia. En otras palabras, en realizaciones con más de una CDR, las CDRs pueden ser cualquiera de Kabat, Chothia, CDRs de combinación, o combinaciones de las mismas.

55

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista anti-CGRP y un polipéptido para el CGRP (tal como un α -CGRP humano) puede ser aproximadamente 0,06 a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 200 nM, 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 50 pM, o aproximadamente 2 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor que cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM,

60

65

aproximadamente 10 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM.

La invención también proporciona procedimientos para fabricar estos anticuerpos o polipéptidos. Los anticuerpos de esta invención se pueden fabricar por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos se pueden producir por proteolíticos u otros de degradación de los anticuerpos, por procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos únicos o de fusión) como se describió anteriormente o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se hacen convenientemente por síntesis química. Los procedimientos de síntesis química se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un anticuerpo podría producirse por un sintetizador automático de polipéptidos que emplea un procedimiento de fase sólida. Véase también Patentes de Estados Unidos N^{os} 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415.

En otra alternativa, los anticuerpos se pueden hacer recombinantemente utilizando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En una realización, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo G1 que se muestran en la SEC. ID N^o:9 y SEC. ID N^o: 10. En otra realización, el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC. ID N^o: 9 y SEC. ID N^o: 10 se clonan en uno o más vectores para su expresión o propagación. La secuencia codificante del anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede entonces expandirse y congelarse para su uso en el futuro. Los vectores (incluyendo los vectores de expresión) y las células huésped se describen además en el presente documento.

La invención también engloba fragmentos de la región variable de la cadena sencilla ("scFv") o anticuerpos antagonistas anti-CGRP de esta invención, como G1. Los fragmentos de la región variable de cadena sencilla se hacen uniendo regiones variables de la cadena ligera y/o pesada usando un péptido de unión corto. Bird et al. (1988) Science 242:423-426. Un ejemplo de un péptido de unión es (GGGGS)₃ que forma puentes aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxi de una región variable y el extremo amino de la otra región variable. Se han diseñado y usado conectores de otras secuencias. Bird et al. (1988). Los conectores pueden a su vez modificarse para funciones adicionales, como unión de fármacos o unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena sencilla pueden producirse o recombinantemente o sintéticamente. Para la producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contienen polinucleótido que codifica el scFv en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, como células de levadura, vegetal, de insecto o mamífera, o procariota, como E. coli. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden elaborarse por manipulaciones rutinarias como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas de purificación de proteínas estándar conocidas en la técnica.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo antagonista anti-CGRP puede comprender una región constante modificada, como una región constante que es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no activa la lisis mediada por el complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), o no activa microglías. Pueden usarse diferentes modificaciones de la región constante para lograr el nivel óptimo y/o combinación de funciones efectoras. Ver, por ejemplo, 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); y Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76 (1998). En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; Solicitud de PCT N^o PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente UK N^o 9809951.8. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende una región constante de IgG2 de cadena pesada humana que comprende las mutaciones siguientes: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2 del tipo salvaje). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624. En otras realizaciones más, la región constante está aglicosilada para glicosilación N-ligada. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada para glicosilación N-ligada mutante el residuo de aminoácidos glicosilado o residuos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de N-glicosilación en la región constante. Por ejemplo, el sitio de N-glicosilación N297 puede mutarse a A, Q, K, o H. Ver, Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601 (1989); y Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76 (1998). En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glicosilación N-ligada. La región constante puede estar aglicosilada por glicosilación N-ligada enzimáticamente (como eliminando carbohidratos por enzima PNGasa), o por expresión de célula huésped deficiente en glicosilación.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado como se describe en la Publicación de PCT N^o WO 99/58572, publicado el 18 de Noviembre de 1999. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a todo o parte del dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse con la molécula objetivo sin activar lisis dependiente del complemento significativa, o destrucción mediada por células del objetivo. En algunas realizaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRb y/o FcγRIIb. Estos se basan típicamente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios de C_H2 de la cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para su uso en terapia de anticuerpos

crónica, para evitar reacciones inflamatorias y otras adversas a la terapia de anticuerpos convencional.

Las composiciones que comprenden anticuerpos que derivados de G1 pueden conjugarse (por ejemplo, unirse) a un agente que facilite el acoplamiento a un soporte sólido (como biotina o avidina). Por simplicidad, se hará referencia generalmente a G1 o anticuerpos con el conocimiento de que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a CGRP descritas en el presente documento. La conjugación generalmente se refiere a unir estos componentes como se describe en el presente documento. La unión (que generalmente fija estos componentes en asociación próxima al menos para la administración) se puede conseguir de varias maneras. Por ejemplo, una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contenga carbonilo, como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contenga un grupo saliente bueno (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Un anticuerpo antagonista anti-CGRP de esta invención puede unirse a un agente marcador (alternativamente denominado "marca") como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Los marcadores son conocidos en la técnica que proporcionan generalmente (ya sea directa o indirectamente) una señal.

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y los polipéptidos de la invención (incluyendo un anticuerpo que comprende las secuencias polipeptídicas de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera que se muestran en la Figura 5), y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido

En consecuencia, la invención proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos antagonistas anti-CGRP de la invención que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los siguientes: (a) anticuerpo G1; (b) un fragmento o una región del anticuerpo G1; (c) una cadena ligera y una cadena pesada del anticuerpo G1; (d) la región variable de una cadena ligera y una cadena pesada del anticuerpo G1. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende uno o ambos polinucleótidos que se muestran en la SEC. ID N°: 9 y SEC. ID N°: 10.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos antagonistas anti-CGRP de la invención. Los polinucleótidos se pueden elaborar por procedimientos conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos complementarios a cualquiera de tales secuencias también están englobadas por la presente divulgación. Los polinucleótidos pueden ser de cadena sencilla (codificante o antisentido) o de cadena doble, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc, o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARN^h, que contienen intrones y se corresponden con la molécula de ADN de manera uno a uno, y moléculas de ARN^m, las cuales no contienen intrones. Las secuencias adicionales codificantes o no codificantes pueden, aunque no necesariamente, estar presentes en un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede, aunque no necesariamente, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte.

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

Los vectores de expresión generalmente son constructos de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido que codifica el anticuerpo antagonista anti-CGRP de acuerdo con la invención. Esto implica que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen pero no están limitados a, plásmidos, vectores víricos, incluyendo adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, cósmidos, y vectores de expresión divulgados en la Publicación de PCT N° WO 87/04462. Los componentes de los vectores pueden incluir generalmente, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción), también se requieren habitualmente uno o más elementos de control de la traducción, como sitios de unión al ribosoma, sitios de inicio de la traducción, y codones de parada.

Los vectores que contienen los polinucleótidos que codifican el anticuerpo antagonista anti-CGRP de la invención pueden introducirse en una célula huésped por cualquiera de una variedad de medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro cálcico, cloruro rubídico, fosfato cálcico, dextrano-DEAE,

u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso como un virus vacuna). La elección de los vectores o polinucleótidos introductores dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

5 La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos que codifican el anticuerpo antagonista anti-CGRP de la invención. Cualquier célula huésped capaz de sobre-exresar ADNs heterólogos puede utilizarse con el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo de interés. Ejemplos no limitativos de células huésped de mamífero incluyen pero no están limitados a, células COS, HeLa, y CHO. Ver también la Publicación de PCT N° WO 87/04462. Células huésped no mamíferas adecuadas incluyen procariontes (como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los ADNs a un nivel aproximadamente 5 veces más alto, más preferentemente 10 veces más alto, incluso más preferentemente 20 veces más alto que el correspondiente al anticuerpo o proteína de interés endógeno, si está presente, en las células huésped. La selección de células huésped para un enlace específico a A α 1-40 se efectúa por un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobre-expresa el anticuerpo antagonista anti-CGRP de interés.

Ejemplos

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

20 Generación de anticuerpos anti-CGRP. Para generar anticuerpos anti-CGRP que tengan reactividad cruzada entre especies, para CGRP de rata y humano, se inmunizaron ratones con 25-100 μ g de α -CGRP humano o β -CGRP conjugado con KLH en adyuvante (50 μ l para las plantas de los pies, 100 μ l totales por ratón) a varios intervalos. La inmunización generalmente se llevó a cabo como se describe en Geerligts HJ y col., 1.989, J. Immunol. Methods 124: 95-102; Kenney JS y col., 1.989, J. Immunol. Methods 121:157-166; y Wicher K y col., 1.989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:128-135. Los ratones primero se inmunizaron con 50 μ g de α -CGRP o β -CGRP humanos conjugado con KLH en CFA (adyuvante completo de Freund). Después de 21 días, los ratones se inmunizaron secundariamente con 25 μ g de β -CGRP humano (por cada ratón que se había inmunizado primero con α -CGRP) o α -CGRP (para los ratones que primeros se inmunizaron con β -CGRP) conjugado con KLH en IFA (adyuvante incompleto de Freund). Veintitrés días después de la segunda inmunización, se llevó a cabo una tercera inmunización con 25 μ g de α -CGRP de rata conjugada con KLH en IFA. Diez días más tarde, se ensayaron los títulos de anticuerpo utilizando ELISA. Se llevó a cabo una cuarta inmunización con 25 μ g del péptido (α -CGRP de rata en KLH) en IFA 34 días después de la tercera inmunización. Se llevó a cabo un refuerzo con 100 μ g de péptido soluble (α -CGRP de rata) 32 días después de la cuarta inmunización.

35 Se obtuvieron los esplenocitos de los ratones inmunizados y se fusionaron con células de mieloma NSO en una relación de 10:1, con polietilenglicol 1500. Los híbridos se pusieron en placas de 96 pocillos en DMEM que contenía un 20% de suero de caballo y 2-oxaloacetato/piruvato/insulina (Sigma), y comenzó la selección en hipoxantina/aminopterina/timidina. El día 8, 100 μ l de DMEM que contenía el 20% de suero de caballo se añadieron a todos los pocillos. Los sobrenadantes de los híbridos se seleccionaron utilizando el inmunoensayo de captura de anticuerpos. La determinación de la clase del anticuerpo se hizo con un segundo anticuerpo específico de clase.

40 Se seleccionó un panel de líneas celulares productoras de anticuerpo monoclonal basándose en su unión al CGRP humano y de rata para su posterior caracterización. Estos anticuerpos y características se muestran posteriormente en las Tablas 2 y 3.

45 Purificación y preparación de fragmentos Fab. Los anticuerpos monoclonales seleccionados para su posterior caracterización se purificaron de los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma utilizando la cromatografía de afinidad a la proteína A. Los sobrenadantes se equilibraron a pH 8. Los sobrenadantes se cargaron entonces en la columna de proteína A MabSelect (Amersham Biosciences n° 17-5199-02) se equilibraron con PBS a pH 8. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de PBS, pH 8. Los anticuerpos se eluyeron con tampón citrato-fosfato 50 mM, pH 3. Los anticuerpos eluidos se neutralizaron con tampón fosfato 1 M, pH 8. Los anticuerpos purificados se dializaron entonces con PBS, pH 7,4. Las concentraciones de anticuerpo se determinaron por SDS-PAGE, utilizando una curva de referencia de anticuerpos monoclonales murinos.

55 Se prepararon los Fab por proteólisis en papaína de los anticuerpos completos utilizando el kit Inmunopure Fab (Pierce n° 44885) y se purificaron por flujo a través de cromatografía de proteína A siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones se determinaron por ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE utilizando una referencia Fab de concentración conocida (determinada por análisis de aminoácidos), y por A280 utilizando 10D=0,6 mg/ml (o el equivalente teórico basándose en la secuencia de aminoácidos).

60 Determinación de la afinidad de los Fab. Las afinidades de los anticuerpos monoclonales anti-CGRP se determinaron a 25 °C o 37 °C utilizando el sistema de resonancia de plasmones de superficie (SPR) Biacore3000™ (Biacore, INC, Piscataway NJ) con el tampón de trabajo propio del fabricante, HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM. Polisorbato P20 al 0,005% v/v). Se determinó la afinidad capturando los péptidos CGRP

biotinilados N-terminalmente (pedidos a medida en Gen-Script Corporation, New Jersey o Global Peptide Services, Colorado) por medio de estreptavidina on chip SA y midiendo las cinéticas de unión del Fab del anticuerpo titulado a lo largo de la superficie del CGRP. Se diluyó el CGRP biotinilado en HBS-EP y se inyectó en el chip a una concentración de menos de 0,001 mg/ml. Se alcanzaron dos intervalos de densidad del antígeno utilizando un flujo de tiempo variable a lo largo de los canales individuales del chip: <50 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados y aproximadamente 800 RU para estudios de concentración y selección. Se inyectaron diluciones seriadas de dos o tres veces que dan concentraciones típicamente oscilando entre 1 μ M – 0,1 mM (con un objetivo de 0,1-10x la K_D estimada) de fragmentos purificados Fab que se inyectaron durante un minuto a 100 μ l/min y se permitieron tiempos de disociación de 10 minutos. Después de cada ciclo de unión, se regeneraron las superficies con NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v, que fue tolerado unos cientos de ciclos. Se obtuvieron la constante cinética de asociación (k_{on}) y la constante de disociación (k_{off}) ajustando los datos a 1:1 modelo de unión de Langmuir (Karlsson, R. Roos, H.Fagerstam, L. Petersson, B. (1.994). Methods Enzymology 6.99-110) utilizando el programa de BIAevaluación. El equilibrio global de las constantes de disociación (K_D) o “afinidades” se calcularon de la relación $K_D = k_{off}/k_{on}$. Las afinidades de los fragmentos Fab murinos se muestran en las Tablas 2 y 3.

Localización del epítipo de los anticuerpos anti-CGRP murinos. Para determinar el epítipo al que los anticuerpos anti-CGRP se unen al α -CGRP humano, se midieron las afinidades de los fragmentos Fab a varios fragmentos CGRP como se describió anteriormente capturando los aminoácidos 19-37 y los aminoácidos 25-37 de los fragmentos CGRP biotinilados N-terminalmente sobre un chip sensor. La Figura 1 muestra sus afinidades de unión medidas a 25 °C. Como se muestra en la Figura 1, todos los anticuerpos, excepto el anticuerpo 4901, se unen a los fragmentos α -CGRP humanos 19-37 y 25-37 con afinidad similar a su afinidad de unión a la longitud total del fragmento α -CGRP humano, debido principalmente a pérdida de velocidad de disociación. Los datos indican que estos anticuerpos anti-CGRP generalmente se unen al extremo terminal C del CGRP.

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

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

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

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

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

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

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

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

| CGRP | Secuencia de aminoácidos | SEC ID N ^o |
|------------------------------|--|-----------------------|
| 1-37 (WT) | ACDTATCVTHRLAGLLSRGGVVKNNFVPTNVGSKAF | 15 |
| 8-37 | VTHRLAGLLSRGGVVKNNFVPTNVGSKAF | 16 |
| 19-37 | SGGVVKNNFVPTNVGSKAF | 17 |
| P29A (19-37) | SGGVVKNNFVATNVGSKAF | 18 |
| K35A (19-37) | SGGVVKNNFVPTNVGSAAF | 19 |
| K35E (19-37) | SGGVVKNNFVPTNVGSEAF | 20 |
| K35M (19-37) | SGGVVKNNFVPTNVGSMAF | 21 |
| K35Q (19-37) | SGGVVKNNFVPTNVGSQAF | 22 |
| F37A (19-37) | SGGVVKNNFVPTNVGSKAA | 23 |
| 25-38A | NNFVPTNVGSKAFA | 24 |
| 25-37 | NNFVPTNVGSKAF | 25 |
| F27A (25-37) | NNAVPTNVGSKAF | 26 |
| V28A (25-37) | NNFAPPTNVGSKAF | 27 |
| P29A (25-37) | NNFVATNVGSKAF | 28 |
| T30A (25-37) | NNFVPANVGSKAF | 29 |
| N31A(25-37) | NNFVPTAVGSKAF | 30 |
| V32A (25-37) | NNFVPTNAGSKAF | 31 |
| G33A (25-37) | NNFVPTNVASKAF | 32 |
| S34A (25-37) | NNFVPTNVGAKAF | 33 |
| F37A (25-37) | NNFVPTNVGSKAA | 34 |
| 26-37 | NFVPTNVGSKAF | 35 |
| 19-37-COOH | SGGVVKNNFVPTNVGSKAF | 36 |
| 19-36-COOH | SGGVVKNNFVPTNVGSKA | 37 |
| 1-36-COOH | ACDTATCVTHRLAGLLSRGGVVKNNFVPTNVGSKA | 38 |
| 1-19-COOH | ACDTATCVTHRLAGLLSRS | 39 |
| 1-13-COOH | ACDTATCVTHRLA | 40 |
| α de rata (1-37) | SCNTATCVTHRLAGLLSRGGVVKDNFVPTNVGSEAF | 41 |
| α de rata (19-37) | SGGVVKDNFVPTNVGSEAF | 42 |
| β humano (1-37) | ACNTATCVTHRLAGLLSRGGMVKSNTFVPTNVGSKAF | 43 |
| Calcitonina Humana (1-32) | CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP | 45 |
| Amilina Humana (1-37) | KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY | 46 |
| Adrenomedulina Humana (1-52) | YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY | 47 |

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

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

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

Después de la incubación, se llevó a cabo la activación del cAMP utilizando el ensayo de Complementación de Fragmentos Enzimáticos HitHunter™ (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en una enzima β -galactosidasa manipulada genéticamente que consisten en dos fragmentos denominados Aceptor enzimático (AE) y Donante enzimático (DE). Cuando los dos fragmentos están separados, la enzima está inactiva. Cuando los fragmentos están juntos se pueden recombinar espontáneamente para formar la enzima activa por un proceso llamado complementación. La plataforma para el ensayo EFC utiliza un péptido DE-cAMP conjugado en el que el cAMP se reconoce por un anti-cAMP. Este fragmento DE es capaz de reasociarse con el AE para formar la enzima activa. En el ensayo, el anticuerpo anti-cAMP está titulado óptimamente para unirse al conjugado DE-cAMP e inhibir la formación de la enzima. Los niveles de cAMP en las muestras de lisado celular compiten con el conjugado DE-cAMP para unirse al anticuerpo anti-cAMP. La cantidad de conjugado DE libre en el ensayo es proporcional a la concentración de cAMP. Por tanto, el cAMP se mide por la formación de enzima activa que se cuantifica por la renovación del sustrato luminiscente de la p-galactosidasa. El ensayo de activación del cAMP se llevó a cabo añadiendo 10 μ l de tampón de lisis y anticuerpo anti-cAMP (relación 1:1) seguido por incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadieron 10 μ l de reactivo DE-cAMP en cada pocillo y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se añadieron 20 μ l de reactivo AE y mezcla CL (que contenía el sustrato) (relación 1:1) en cada pocillo y se incubó durante 1-3 horas o toda la noche a temperatura ambiente. La placa se leyó a 1 segundo/pocillo en un instrumento PMT o a 30 segundos/placa en una cámara. Los anticuerpos que inhibían la activación de cAMP por el α -CGRP se identificaron (representados como "Si") en las Tablas 2 y 3 anteriores. Los datos en las Tablas 2 y 3 indican que los anticuerpos que demostraron actividad antagonista en el ensayo generalmente tienen alta afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos que tienen una K_D (determinada a 25 °C) de aproximadamente 80 nM o menos para el α -CGRP humano o que tienen una K_D (determinada a 37 °C) de aproximadamente 47 nM o menos para un α -CGRP de rata muestran actividad en este ensayo.

Ensayo de unión por radioligando. El ensayo de unión se llevó a cabo para medir la CI₅₀ del anticuerpo anti-CGRP en el bloqueo del CGRP de la unión al receptor como se describió anteriormente. Zimmermann y col., Peptides 16: 421-4, 1.995; Mallee y col., J. Biol. Chem. 277: 14294- 8, 2.002. Se incubaron membranas (25 μ g) de células SK-N-MC durante 90 minutos a temperatura ambiente en un tampón de incubación (Tris-HCL 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, BSA al 0,1%) que contenía 10 pM de α -CGRP ¹²⁵I humano en un volumen total de 1 ml. Para determinar las concentraciones de inhibición (CI₅₀) los anticuerpos o el CGRP sin marcar (como un control), desde una solución 100 veces más alta que la solución madre se disolvieron a concentraciones variables en el tampón de incubación y se incubaron al mismo tiempo con las membranas y 10 pM de α -CGRP ¹²⁵I humano. Se terminó la incubación por filtración a través de un filtro de microfibras de cristal (GF/B, Vm) que había sido bloqueado con polietilimina al 0,5%. Se dibujaron las curvas de respuesta a las dosis y K; se determinaron los valores utilizando la ecuación: $K_i = CI_{50} / (1 + ([ligando] / K_D))$; donde la constante de equilibrio de disociación K_D = 8 pM para el α -CGRP para el receptor CGRP1 presente en las células SK-N-MC, y B_{máx} = 0,025 pmol/mg de proteína. El valor informado de CI₅₀ (en términos de moléculas IgG) se convirtió a los sitios de unión (multiplicándolo por 2) de forma que se pudo comparar con las afinidades (K_D) determinadas por Biacore (véase la Tabla 2).

La Tabla 2 muestra la CI₅₀ de los anticuerpos murinos 7E9, 8B6, 6H2 y 4901. Los datos indican que la afinidad de los anticuerpos generalmente se correlaciona con la CI₅₀: los anticuerpos con mayor afinidad (valores de K_D más bajos) tienen una CI₅₀ más baja en el ensayo de unión con radioligando.

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

Para ensayar la actividad antagonista de anticuerpos anti-CGRP, se ensayó el efecto de los anticuerpos sobre la vasodilatación de la piel por estimulación del nervio safeno de la rata utilizando un modelo de rata descrito anteriormente. Escott y col., Br. J. Pharmacol. 110:772-776, 1.993. En este modelo de rata, la estimulación eléctrica del nervio safeno induce la liberación de CGRP desde las terminaciones nerviosas. Dando como resultado un incremento en el flujo sanguíneo de la piel. Se midió el flujo sanguíneo en la piel del pie del macho de rata Sprague

Dwaley (170-300 g, de Charles River Hollister) después de la estimulación del nervio safeno. Las ratas se mantuvieron bajo anestesia con isofluorano al 2%. Se les dio al principio del experimento tosilato de bretilio para minimizar la vasoconstricción debida a la estimulación concomitante de las fibras simpáticas del nervio safeno. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C utilizando una sonda rectal conectada con un termostato a una manta eléctrica controlada por temperatura. Los compuestos, incluyendo los anticuerpos, los controles positivos (CGRP 8-37), y el vehículo (PBS, Tween 20 al 0,01%) se aplicaron por vía intravenosa a través de la vena femoral derecha, excepto para el experimento que se muestra en la Figura 3, en el que el compuesto de ensayo y el control se inyectaron en la vena de la cola, y para los experimentos mostrados en las Figuras 2A y 2B, los anticuerpos 4901 y 7D11 se inyectaron por vía intraperitoneal (ip). El compuesto control positivo CGRP 8-37 (antagonista de vasodilatación), debido a su corta vida media, se administró 3-5 minutos antes de la estimulación nerviosa a 400 nmol/kg (200 µl). Tan y col., Clin. Sci. 89:656-73, 1.995. Los anticuerpos se dieron en distintas dosis (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, y 25 mg/kg).

Para los experimentos mostrados en las Figuras 2 A y 2B, se administraron el anticuerpo 4901 (25 mg/ml), el anticuerpo 7D11 (25 mg/kg), o el control con el vehículo (PBS con Tween 20 al 0,01%) por vía intraperitoneal (ip) 72 horas antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Para el experimento mostrado en la Figura 3, se administraron el anticuerpo 4901 (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, y 25 mg/kg) o el vehículo control (PBS con Tween 20 al 0,01%) por vía intravenosa 24 horas antes de la estimulación por pulsos eléctricos. Después de la administración de los anticuerpos o del vehículo control, el nervio safeno de la pata derecha se expuso quirúrgicamente, se cortó proximalmente y se cubrió con una tira de plástico para prevenir la desecación. Una sonda Doppler láser se colocó en el lado medio-dorsal de la piel de la garra trasera, que es la región que inerva el nervio safeno. El flujo sanguíneo cutáneo, medido como flujo celular sanguíneo, se controló con un medidor Doppler láser. Cuando se estableció una línea base estable (menos del 5% de variación) durante al menos 5 min, se colocó el nervio sobre unos electrodos de aluminio bipolar y se estimuló eléctricamente con 60 pulsos (2 Hz, 10 V, 1ms, durante 20 seg) y luego otra vez 20 minutos más tarde. El cambio acumulativo en el flujo sanguíneo cutáneo se estimó por el área bajo la curva de flujo-tiempo (AUC, que es igual al cambio en el flujo multiplicado por el tiempo) para cada respuesta de flujo a la estimulación por pulsos eléctricos. Se tomó el promedio de la respuesta al flujo sanguíneo de dos estimulaciones. Los animales se mantuvieron bajo anestesia por un periodo de una a tres horas.

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

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

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

60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo, y por la presencia del anticuerpo 8B6 (10 mg/kg, administrado i.v.) cuando la estimulación por pulso electrónico se aplicó a los 30 min después de la administración del anticuerpo.

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

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

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

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

- 20 Preparación a pequeña escala de Fab. A partir de E. coli transformada (o bien utilizando células TG1 competentes por electroporación o bien célula Top competentes químicamente) con una biblioteca Fab, se utilizaron colonias sencillas para inocular tanto una placa maestra (agar LB + carbenicilina (50 µg/ml) + glucosa al 2%) y una
25 placa de trabajo (2 ml/pocillo, en una placa de 96 pocillos/placa) en las que cada pocillo contenía 1,5 ml de LB + carbenicilina (50 µg/ml) + glucosa al 2%. Se aplicó a la placa un sello adhesivo permeable a gases (ABgene, Surrey, R.U.). Ambas placas se incubaron a 30 °C durante 12-16 h; la placa de trabajo se agitó vigorosamente. La placa maestra se guardó a 4 °C hasta que se necesitara, mientras que las células de la placa de trabajo se aglutinaron (a
30 4000 rpm, 4 °C, 20 min) y se resuspendieron en 1,0 ml de LB + carbenicilina (50 µg/ml) + IPTG 0,5 mM para inducir la expresión de Fab por agitado vigoroso durante 5 h a 30 °C. Las células inducidas se centrifugaron a 4000 rpm, 4 °C durante 20 min y se resuspendieron en 0,6 ml de tampón HB-SEP Biacore (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 0,005% v/v). La destrucción de las células resuspendidas HB-SEP se alcanzó por congelación (-80 °C) y después se templaron a 37 °C. Los lisados celulares se centrifugaron a 4000 rpm, 4 °C durante una hora para separar los desechos de los sobrenadantes que contenían Fab, que fueron posteriormente filtrados (0,2 µm)
35 utilizando un sistema de ensayo Millipore Multiscreen de filtración de placas de 96 pocillos y un colector de distribución al vacío. El Biacore se utilizó para analizar los sobrenadantes filtrados inyectándolos a través del CGRP sobre el chip sensor. Los clones que expresaban Fab seleccionados por afinidad se rescataron de la placa maestra, que proporcionaron una matriz de ADN para PCR, secuenciación, y preparación de plásmidos.

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

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

- 60 El vector pDb.CGRP.hFcGI es un vector de expresión que comprende la cadena pesada del anticuerpo G1, y es adecuado para la expresión transitoria o estable de la cadena pesada. El vector pDb.CGRP.hFcGI tiene las secuencias de nucleótido que corresponden a las siguientes regiones: región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 7-612); un intrón sintético (nucleótidos 613-1679); la región codificante DHFR (nucleótidos 688-1253); el péptido de señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1899-1976); la región variable de cadena
65

pesada del G1 (nucleótidos 1977-2621); la región constante de la cadena pesada de la IgG2 humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con respecto a la secuencia de la IgG2 tipo silvestre; véase Eur. J. Immunol. (1.999) 29:2613-2624). El vector pDb.CGRP.hFcGI se depositó en el ATCC el 15 de julio, 2.005, y se le asignó el N° de registro ATCC PTA-6867.

El vector pEb.CGRP.hKGI es un vector de expresión que comprende la cadena ligera del anticuerpo G1, y es adecuado para la expresión transitoria de la cadena ligera. El vector pEb.CGRP.hKGI tiene secuencias de nucleótidos que corresponden a las siguientes regiones: la región promotora del citomegalovirus murino (nucleótidos 2-613); el intrón humano EF-1 (nucleótidos 614-1149); el péptido de señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1160-1237); la región variable de cadena ligera del anticuerpo G1 o variantes tituladas a través del CGRP o fragmento en el chip (nucleótidos 1238-1558); la región constante de la cadena kappa humana (nucleótidos 1559-1882). El vector pEb.CGRP.hKGI se depositó en el ATCC el 15 de julio, 2.005, y se le asignó el N° de registro ATCC PTA-6866.

Ensayo Biacore para determinación de la afinidad. Las afinidades del anticuerpo monoclonal G1 y sus variantes se determinaron a 25 °C o a 37 °C utilizando el sistema Biacore3000™ de resonancia de plasmones de superficie (SPR) (Biacor, INC, Piscataway, NJ). La afinidad se determinó capturando el CGRP biotinilado N-terminalmente o fragmentos por medio de estreptavidina pre-inmovilizada (chip sensor SA) y midiendo las cinéticas de unión de los fragmentos Fab del anticuerpo G1 o variantes tituladas a través del CGRP o fragmento en el chip. Todos los ensayos Biacore se llevaron a cabo en tampón de trabajo HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM. Polisorbato P20 al 0,005% v/v). Las superficies CGRP se prepararon por dilución de CGRP N-biotinilado a una concentración de menos de 0,001 mg/ml en tampón HBS-EP y se inyectó a través del chip sensor SA utilizando tiempos de contacto variables. Las superficies de baja capacidad, que corresponden con niveles <50 unidades de respuesta (RU) se utilizaron para estudios de cinética de alta resolución, mientras que las superficies de alta capacidad (aproximadamente 800 RU del CGRP capturado) se utilizaron para los estudios de concentración, selección, y determinaciones de afinidad de la solución. Los datos cinéticos se obtuvieron por disolución del Fab del anticuerpo G1 en serie en incrementos de dos o tres veces para concentraciones que variaban entre 1 μM-0,1 nM (apuntando a 0,1-1,0 x de la K_D estimada). Las muestras se inyectaron típicamente durante un minuto a 100 μl/min y se permitieron tiempos de disociación de al menos 10 minutos. Después de cada ciclo de unión, las superficies se regeneraron con NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v, que era tolerado unas cientos de ciclos. Una serie entera de titulación (típicamente generada por duplicado) se ajustaba globalmente a un 1:1 en el modelo de unión Langmuir utilizando el programa Biaevaluation. Este devolvía una única pareja constantes cinéticas de tasa de asociación y disociación (k_{on} y k_{off} respectivamente) para cada interacción de unión, cuya relación daba la constante de disociación de equilibrio (K_D = k_{off}/k_{on}). Las afinidades (valores de K_D) determinadas de esta manera se enumeran en las Tablas 6 y 7.

Análisis de alta resolución para las interacciones con velocidades de disociación extremadamente lentas. Para las interacciones con velocidades de disociación extremadamente lentas (en particular, del Fab del anticuerpo G1 al -CGRP humano en el chip a 25 °C), se obtuvieron las afinidades en un experimento en dos partes. El protocolo descrito anteriormente se utilizó con las siguientes modificaciones. La constante de la tasa de asociación (k_{on}) se determinó inyectando una serie de titulación de 2 veces (pro duplicado) oscilando entre 550 nM- 1 nM durante 30 seg a 100 μl/min y permitiendo solamente una fase de disociación de 30 seg. La constante de la tasa de disociación (k_{off}) se determinó inyectando tres concentraciones (alta, media y baja) de las mismas series de titulación por duplicado durante 30 seg y permitiendo una fase de disociación de 2 horas. La afinidad (K_D) de cada interacción se obtuvo combinando los valores de k_{on} and k_{off} obtenidos en ambos tipos de experimentos, como se muestra en la Tabla 5.

Determinación de la solución de afinidad por Biacore. La solución de afinidad del anticuerpo G1 para el α-CGRP de rata y F37A (19-37) α-CGRP humano se midió por Biacore a 37 °C. Se utilizó una superficie de chip con gran capacidad para CGRP (se eligió la afinidad alta para α-CGRP con fines de detección) y el tampón de trabajo HBS-EP se hizo fluir a 5 μl/min. El fragmento Fab del anticuerpo G1 a una concentración constante de 5 nM (teniendo como objetivo estar en o por debajo de la K_D esperada de la interacción basada en la solución) se preincubó con un péptido de competencia, o bien α-CGRP de rata o F37A (19-37) α-CGRP humano, a concentraciones finales que oscilaban entre 1 nM a 1 μM en diluciones seriadas de 3 veces. Las soluciones de Fab del anticuerpo G1 en ausencia o presencia del péptido de competencia basado en la solución, se inyectaron a través del CGRP en el chip y se controlaron las respuestas de depleción de unión detectadas en la superficie del chip como resultado de la solución de competición. Estas respuestas de unión se convirtieron a "concentraciones libres de Fab" utilizando una curva de calibración, que se construyó por titulación del Fab del anticuerpo G1 solo (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,325 y 0 nM) a través del CGRP del chip. Las "concentraciones libres de Fab" se dibujaron contra la concentración del péptido basado en la solución de competición utilizado para generar cada punto de dato y ajustar a un modelo de afinidad de la solución utilizando el software Biaevaluation. Las afinidades de la solución determinadas (indirectamente) de esta manera se muestran en las Tablas 5 y 7 y se utilizaron para validar las afinidades obtenidas cuando los Fab se inyectaron directamente a través de CGRP biotinilados en el chip SA. La estrecha concordancia entre las afinidades determinadas por estos dos procedimientos confirma que anclando la versión biotinilada-N del CGRP al chip, no altera su actividad de unión de su solución nativa.

La Tabla 5 a continuación, muestra las afinidades de unión del anticuerpo G1 a α -CGRP humano, β -CGRP humano, α -CGRP de rata, y β -CGRP de rata determinadas por Biacore, por flujo de fragmentos Fab a través de CGRP biotinilados-N sobre un chip SA. Para resolver mejor las afinidades de las interacciones de unión con velocidades de disociación extremadamente lentas, también se pueden determinar las afinidades en un experimento en dos partes para complementar esta orientación del ensayo, la solución de afinidad de la interacción con α -CGRP de rata también se determinó (como se describió anteriormente). La estrecha concordancia de las afinidades medidas en las orientaciones de ambos ensayos confirma que la afinidad de unión del α -CGRP de rata nativo en solución, no se altera cuando es biotinilado-N y anclado al chip SA.

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

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

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

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

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

| Clon | L1 | L2 | H2 | HC-FW3 | a-rata k _{off} (1/s) | a-rata K _D (nM) | a-humano k _{off} (1/s) | a-humano K _D (nM) |
|------|------|----|----|---------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| G1 | | | | | 3,91X10 ⁻⁴ | 2,57 | 3,63X10 ⁻⁵ | 0,063 |
| M1 | | | | A100L | 1,10X10 ⁻³ | | 1,73X10 ⁻⁴ | |
| M2 | | | | L99A A100R | 2,6X10 ⁻³ | 58 | 3,1X10 ⁻⁴ | 3 |
| M3 | | | | L99A A100S | 2,0X10 ⁻³ | 61 | 2,1x10 ⁻⁴ | 1Z |
| M4 | | | | L99A A100V | 1,52X10 ⁻³ | 84,4 | 6,95X10 ⁻⁵ | 0,43 |
| M5 | | | | L99A A100Y | 7,35X10 ⁻⁴ | 40,8 | 3,22X10 ⁻⁵ | 0,20 |
| M6 | | | | L99N | 7,84X10 ⁻⁴ | 43,6 | 1,33X10 ⁻⁴ | 0,83 |
| M7 | | | | L99N A100C | 9,18X10 ⁻⁴ | 51,0 | 2,43X10 ⁻⁴ | 1,52 |
| M8 | | | | L99N A100G | 7,45X10 ⁻⁴ | 41,4 | 9,20X10 ⁻⁵ | 0,58 |
| M9 | | | | L99N A100Y | n.d. | n.d. | 1,00X10 ⁻⁵ | 0,06 |
| M10 | | | | L99S A100S | 1,51X10 ⁻³ | 83,9 | 1,73x10 ⁻⁴ | 1,08 |
| M11 | | | | L99S A100T | 4,83X10 ⁻³ | 268,3 | 2,83x10 ⁻⁴ | 1,77 |
| M12 | | | | L99S A100V | 1,94x10 ⁻³ | 107,8 | 1,01X10 ⁻⁴ | 0,63 |
| M13 | | | | L99T A100G | 1,84x10 ⁻³ | 102,2 | 1,86X10 ⁻⁴ | 1,16 |
| M14 | | | | L99T A100K | n.d. | n.d. | 1,00X10 ⁻⁵ | 0,06 |
| M15 | | | | L99T A100P | 1,15x10 ⁻³ | 63,9 | 1,58x10 ⁻⁵ | 0,10 |
| M16 | | | | L99T A100S | 9,96X10 ⁻⁴ | 55,3 | 1,65x10 ⁻⁴ | 1,03 |
| M17 | | | | L99T A100V | 2,06X10 ⁻³ | 114,4 | 1,85X10 ⁻⁴ | 1,16 |
| M18 | | | | L99V A100G | 1,22X10 ⁻³ | 67,8 | 7,03X10 ⁻⁵ | 0,44 |
| M19 | | | | L99V A100R | n.d. | n.d. | 1,00X10 ⁻⁵ | 0,06 |
| M20 | R28W | | | L99R A100L | 1,44x10 ⁻³ | 80,0 | 1,36x10 ⁻⁴ | 0,85 |

ES 2 664 421 T3

(continua)

| | Clon | L1 | L2 | H2 | HC-FW3 | a-rata k _{off} (1/s) | a-rata K _D (nM) | a-humano k _{off} (1/s) | a-humano K _D (nM) |
|----|------|--------------|--------------|----------------------|---------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 5 | M21 | R28W | | | L99S | 6,95X10 ⁻⁴ | 15,2 | 1,42X10 ⁻⁴ | 1,23 |
| 10 | M22 | R28W | | | L99T | 1,10X10 ⁻³ | 61,1 | 1,16X10 ⁻⁴ | 0,73 |
| 15 | M23 | R28G | | | L99T A100V | 7,99X10 ⁻⁴ | 44,4 | 1,30X10 ⁻⁴ | 0,81 |
| 20 | M24 | R28L | | | L99T A100V | 1,04X10 ⁻³ | 57,8 | 1,48X10 ⁻⁴ | 0,93 |
| 25 | M25 | R28N | | | L99T A100V | 1,4x10 ⁻³ | Z6 | 1,4x10 ⁻⁴ | 13 |
| 30 | M26 | R28N | | A57G | L99T A100V | 9,24X10 ⁻⁴ | 51,3 | 1,48X10 ⁻⁴ | 0,93 |
| 35 | M27 | R28N T30A | | | L99T A100V | 3,41X10 ⁻³ | 189,4 | 3,57X10 ⁻⁴ | 2,23 |
| 40 | M28 | R28N T30D | | E54R A57N | L99T A100V | 1,25X10 ⁻³ | 69,4 | 9,96X10 ⁻⁵ | 0,62 |
| 45 | M29 | R28N T30G | | | L99T A100V | 3,59X10 ⁻³ | 199,4 | 3,80X10 ⁻⁴ | 2,38 |
| 50 | M30 | R28N T30G | | E54K A57E | L99T A100V | 6,38x10 ⁻³ | 354,4 | 5,90x10 ⁻⁴ | 3,69 |
| 55 | M31 | R28N T30G | | E54K A57G | L99T A100V | 3,61X10 ⁻³ | 200,6 | 3,47X10 ⁻⁴ | 2,17 |
| 60 | M32 | R28N T30G | | E54K A57H | L99T A100V | 2,96X10 ⁻³ | 164,4 | 2,71 X10 ⁻⁴ | 1,69 |
| 65 | M33 | R28N T30G | | E54K A57N S58G | L99T A100V | 9,22x10 ⁻³ | 512,2 | 7,50X10 ⁻⁴ | 4,69 |
| | M34 | R28N T30G | | E54K A57N S58T | L99T A100V | 2,17X10 ⁻³ | 120,6 | 6,46X10 ⁻⁴ | 4,04 |
| | M35 | R28N T30G | | E54K A57S | L99T A100V | 3,99X10 ⁻³ | 221,7 | 3,39X10 ⁻⁴ | 2,12 |
| | M36 | R28N T30R | | | L99T A100V | 4,79X10 ⁻³ | 266,1 | 2,39X10 ⁻⁴ | 1,49 |
| | M37 | R28N T30S | | A57G | L99T A100V | 1,45X10 ⁻³ | 80,6 | 2,26x10 ⁻⁴ | 1,41 |
| | M38 | R28N T30W | | | L99T A100V | 5,11X10 ⁻³ | 283,9 | 2,18X10 ⁻⁴ | 1,36 |
| | M39 | R28N | G50A L56T | A57N S58Y | L99T A100V | 9,95X10 ⁻³ | 552,8 | 4,25X10 ⁻⁴ | 2,66 |
| | M40 | R28N | G50A L56T | E54K A57L | L99T A100V | 0,36 | 20000,0 | 1,28X10 ⁻³ | 8,00 |
| | M41 | R28N | G50A L56T | E54K A57N E64D | L99T A100V | 4,53X10 ⁻³ | 251,7 | 2,10X10 ⁻⁴ | 1,31 |

ES 2 664 421 T3

(continúa)

| | Clon | L1 | L2 | H2 | HC-FW3 | a-rata k _{off} (1/s) | a-rata K _D (nM) | a-humano k _{off} (1/s) | a-humano K _D (nM) |
|----|------|--------------|--------------|------------------------------|---------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 5 | M42 | R28N | G50A L56T | E54K A57N H61F | L99T A100V | 7,52X10 ⁻³ | 417,8 | 4,17X10 ⁻⁴ | 2,61 |
| 10 | M43 | R28N | G50A L56T | E54K A57N S58C | L99T A100V | 4,53X10 ⁻³ | 251,7 | 2,63X10 ⁻⁴ | 1,64 |
| | M44 | R28N | G50A L56T | E54K A57N S58E | L99T A100V | 6,13X10 ⁻³ | 443 | 2,10X10 ⁻⁴ | 2,05 |
| 15 | M45 | R28N | G50A L56T | E54K A57N S58E | L99T A100V | 5,58x10 ⁻³ | 259 | 2,11x10 ⁻⁴ | 1,85 |
| 20 | | | | E64D | | | | | |
| | M46 | R28N | G50A L56T | E54K A57N S58E H61F | L99T A100V | 2,94X10 ⁻³ | 163,3 | 5,39X10 ⁻⁴ | 3,37 |
| 25 | M47 | R28N | G50A L56T | E54K A57N S58G | L99T A100V | 8,23X10 ⁻³ | 457,2 | 3,32X10 ⁻⁴ | 2,08 |
| 30 | M48 | R28N | G50A L56T | E54K A57N S58L | L99T A100V | 0,0343 | 1905,6 | 8,42X10 ⁻⁴ | 5,26 |
| 35 | M49 | R28N | G50A L56T | E54K A57N S58Y H61F | L99T A100V | 0,0148 | 822,2 | 5,95X10 ⁻⁴ | 3,72 |
| | M50 | R28N | G50A L56T | E54K A57R | L99T A100V | 5,30X10 ⁻³ | 294,4 | 4,06X10 ⁻⁴ | 2,54 |
| 40 | M51 | R28N | L56I | E54K A57G | L99T A100V | 1,18X10 ⁻³ | 65,6 | 1,31X10 ⁻⁴ | 0,82 |
| | M52 | R28N | L56I | E54K A57N S58A | L99T A100V | 2,29X10 ⁻³ | 127,2 | 2,81 X10 ⁻⁴ | 1,76 |
| 45 | M53 | R28N | L56I | E54K A57N S58G | L99T A100V | 1,91X10 ⁻³ | 106,1 | 3,74X10 ⁻⁴ | 2,34 |
| | M54 | R28N T30A | G50A | E54K A57N S58P | L99T A100V | 2,16x10 ⁻³ | 120,0 | 1,79x10 ⁻³ | 11,19 |
| 50 | M55 | R28N T30A | L56S | E54K A57N S58E E64D | L99T A100V | 5,85X10 ⁻³ | 325,0 | 4,78X10 ⁻⁴ | 2,99 |
| 55 | M56 | R28N T30D | L56S | E54K A57N H61F | L99T A100V | 9,35X10 ⁻³ | 519,4 | 4,79X10 ⁻⁴ | 2,99 |
| | M57 | R28N T30D | L56S | E54K A57N S58E | L99T A100V | 0,0104 | 1,200 | 3,22 X10 ⁻⁴ | 3,08 |
| 60 | M58 | R28N T30D | L56S | E54K A57N S58I H61F | L99T A100V | Sin unión | n.d. | 1,95X10 ⁻³ | 12,19 |
| 65 | M59 | R28N T30D | L56S | E54K A57N S58N H61F | L99T A100V | 0,0123 | 683,3 | 5,24X10 ⁻⁴ | 3,28 |

ES 2 664 421 T3

(continua)

| | Clon | L1 | L2 | H2 | HC-FW3 | a-rata k _{off} (1/s) | a-rata K _D (nM) | a-humano k _{off} (1/s) | a-humano K _D (nM) |
|----|------|--------------|--------------|------------------------------|---------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 5 | M60 | R28N T30D | L56S | E54K A57N S58R H61F | L99T A100V | 0,0272 | 1511,1 | 9,11X10 ⁻⁴ | 5,69 |
| 10 | M61 | R28N T30G | A51H | E54Q A57N H61F | L99T A100V | 5,21X10 ⁻³ | 289,4 | 4,59X10 ⁻⁴ | 2,87 |
| | M62 | R28N T30G | A51H L56T | E54K A57N S58E | L99T A100V | 5,75X10 ⁻³ | 242 | 5,57X10 ⁻⁴ | 5,86 |
| 15 | M63 | R28N | G50A | E54K | L99T | 2,65X10 ⁻³ | 147,2 | 1,50X10 ⁻³ | 9,38 |
| 20 | | T30G | | A57N S58T | A100V | | | | |
| | M64 | R28N T30G | G50A | E54K A57N S58V | L99T A100V | 0,0234 | 1300,0 | 1,32X10 ⁻³ | 8,25 |
| 25 | M65 | R28N T30G | G50A L56I | E54K A57C | L99T A100V | 4,07X10 ⁻³ | 226,1 | 8,03X10 ⁻⁴ | 5,02 |
| | M66 | R28N T30G | L56I | E54K A57E | L99T A100V | 5,11x10 ⁻³ | 283,9 | 5,20x10 ⁻⁴ | 3,25 |
| 30 | M67 | R28N T30G | L56I | E54K A57F | L99T A100V | 1,71X10 ⁻³ | 95,0 | 8,20X10 ⁻⁴ | 5,13 |
| | M68 | R28N T30G | L56I | E54K A57N S58D E64D | L99T A100V | 6,76X10 ⁻³ | 375,6 | 4,28X10 ⁻⁴ | 2,68 |
| 35 | M69 | R28N T30G | L56I | E54K A57N S58E | L99T A100V | 1,81X10 ⁻³ | 100,6 | 7,33X10 ⁻⁴ | 4,58 |
| 40 | M70 | R28N T30G | L56I | E54K A57S | L99T A100V | 6,07X10 ⁻³ | 337,2 | 5,59x10 ⁻⁴ | 3,49 |
| | M71 | R28N T30G | L56I | E54K A57Y | L99T A100V | 2,12X10 ⁻³ | 117,8 | 1,28X10 ⁻³ | 8,00 |
| 45 | M72 | R28N T30G | L56S | E54K | L99T A100V | 3,95X10 ⁻³ | 219,4 | 4,00X10 ⁻⁴ | 2,50 |
| | M73 | R28N T30G | L56S | E54K A57N S58Y E64D | L99T A100V | 3,00X10 ⁻³ | 166,7 | 2,55X10 ⁻⁴ | 1,59 |
| 50 | M74 | R28N T30G | L56S | E54K A57S | L99T A100V | 6,03x10 ⁻³ | 335,0 | 5,97X10 ⁻⁴ | 3,73 |
| | M75 | R28N T30G | L56S | E54K A57V | L99T A100V | 1,87X10 ⁻² | 1038,9 | 1,16X10 ⁻³ | 7,25 |
| 55 | M76 | R28N T30S | G50A L56T | A57G | L99T A100V | 1,16X10 ⁻³ | 64,4 | 3,64X10 ⁻⁴ | 2,28 |
| | M77 | R28N T30S | G50A L56T | E54K A57D | L99T A100V | 0,0143 | 794,4 | 4,77X10 ⁻⁴ | 2,98 |
| 60 | M78 | R28N T30S | G50A L56T | E54K A57N S58T | L99T A100V | 0,167 | 9277,8 | 1,31X10 ⁻³ | 8,19 |
| 65 | M79 | R28N T30S | G50A L56T | E54K A57P | L99T A100V | 0,19 | 10555,6 | 1,29X10 ⁻³ | 8,06 |

(continúa)

| Clon | L1 | L2 | H2 | HC-FW3 | a-rata k_{off} (1/s) | a-rata K_D (nM) | a-humano k_{off} (1/s) | a-humano K_D (nM) |
|------|--------------|--------------|------------------------------|---------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| 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 | Sin unión | n.d. | $9,33 \times 10^{-4}$ | 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 |

Todas las CDR incluyendo ambas CDR Kabat y Chothia. Los restos de aminoácidos se numeran secuencialmente (véase la Figura 5). Todos los clones tienen las secuencias L3+H1+H3 idénticas al G1.

$K_D = k_{off}/k_{on}$. Todos los valores de k_{off} se determinaron en modo selección excepto aquellos que están subrayados, que fueron obtenidos por análisis global de las series de concentración de Fab (el G1 se analizó en modo de alta resolución).

Subrayado
Los valores de K_D se determinaron experimentalmente de esta manera midiendo k_{on} . Otros valores de k_{on} se estimaron que eran los mismos que M25.

n.d. = no determinado

Para determinar el epítipo en el α -CGRP humano que es reconocido por el anticuerpo G1, se utilizaron los ensayos Biacore descritos anteriormente. El α -CGRP humano se consiguió como una versión N-biotinilada que capacitaba su captura de alta afinidad por medio de chips sensores SA. Se determinó la unión del fragmento Fab del G1 al α -CGRP humano en el chip en ausencia o presencia de un péptido CGRP. Típicamente, se inyectó una solución 2.000:1 mol de péptido/Fab (por ejemplo, péptido 10 μ M en Fab G1 50 nM) a través de α -CGRP humano sobre el chip. La Figura y muestra el porcentaje de unión bloqueado por el péptido competidor. Los datos mostrados en la Figura 6 muestran que los péptidos que bloquean el 100% de la unión del Fab G1 al α -CGRP humano son 1-37 (WT); 8-37,26-37,P29A (19-37), K35A (19-37), K35E (19-37), y K35M (19-37) del α -CGRP humano; 1-37 del β -CGRP (WT), 1-37 de α -CGRP de rata (WT); y 1-37 de β -CGRP de rata (WT). Todos estos péptidos están amidados en el extremo C. Los péptidos F37A (19-37) y 19-37 (el último no amidado en el extremo C) del α -CGRP humano también bloquea aproximadamente del 80% al 90% de la unión del Fab G1 al α -CGRP humano. El fragmento del péptido 19-36 (amidado en el extremo C) del α -CGRP humano; los fragmentos de péptidos 1-13 y 1-19 del α -CGRP humano (ninguno de los cuales está amidado en el extremo C); y la amilina humana, la calcitonina, y la adrenomedulina (todas amidadas en el extremo C) no compitieron por la unión del Fab G1 al α -CGRP humano en el chip. Estos datos demuestran que el G1 apunta a un epítipo del extremo C del CGRP y que tanto la identidad del resto más terminal (F37) como su amidación son importantes para la unión.

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

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

| CGRP sobre el chip | k_{on} (1/Ms) | k_{off} (1/s) | K_D (nM) |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 1-37 (WT) | 4,68X10 ⁵ | 7,63X10 ⁻⁵ | 0,16 (alta resolución $K_D = .06$) |
| 19-37 | 4,60X10 ⁵ | 7,30X10 ⁻⁵ | 0,16 |
| 25-37 | 3,10X10 ⁵ | 8,80X10 ⁻⁵ | 0,28 |
| F27A (25-37) | 3,25X10 ⁵ | 1,24X10 ⁻⁴ | 0,38 |
| V28A (25-37) | 3,32 X10 ⁵ | 9,38X10 ⁻⁵ | 0,28 |
| P29A (25-37) | 2,26X10 ⁵ | 1,78X10 ⁻⁴ | 0,79 |
| T30A (25-37) | 1,79X10 ⁵ | 8,41X10 ⁻⁵ | 0,47 |
| N31A(25-37) | 2,17X10 ⁵ | 1,14X10 ⁻⁴ | 0,53 |
| V32A (25-37) | 2,02X10 ⁵ | 3,46X10 ⁻⁴ | 1,71 |
| G33A (25-37) | 2,07X10 ⁵ | 0,0291 | 141 |
| S34A (25-37) | 2,51X10 ⁵ | 7,64X10 ⁻⁴ | 3,04 |
| K35A (19-37) | 2,23X10 ⁵ | 2,97X10 ⁻⁴ | 1,33 |
| K35E (19-37) | 5,95X10 ⁴ | 5,79x10 ⁻⁴ | 9,73 |
| K35M (19-37) | 2,63X10 ⁵ | 1,34X10 ⁻⁴ | 0,51 |
| K35Q (19-37) | 1,95X10 ⁵ | 2,70X10 ⁻⁴ | 1.38 |
| F37A (25-37) | 8,90X10 ⁴ | 8,48X10 ⁻³ | 95 (solución $K_D = 172$ nM) |
| 38A (25-38A) | - | - | Sin unión detectada |

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

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

Para ensayar la actividad del anticuerpo anti-CGRP G1, el efecto del anticuerpo sobre la vasodilatación de la piel por estimulación del nervio safeno en la rata se ensayó utilizando el modelo de rata del Ejemplo 3. En resumen, las ratas se mantuvieron bajo anestesia con un 2% de isofluorano. Se dio tosilato de bretilio (30 mg/kg, administrado i.v.) al principio del experimento para minimizar la vasoconstricción debido a la estimulación concomitante de las fibras simpáticas del nervio safeno. La temperatura del cuerpo se mantuvo a 37 °C utilizando una sonda rectal conectada termostáticamente a una manta eléctrica de temperatura controlada. El nervio safeno de la pata derecha se expuso quirúrgicamente, se cortó proximalmente y se cubrió con papel plástico para prevenir la desecación. Se colocó una sonda doppler láser sobre el lado medio-dorsal de la piel de la garra trasera, que es la región que inerva el nervio safeno. El flujo sanguíneo de la piel, medido como flujo celular sanguíneo, se controló con un medidor de flujo doppler láser. En los experimentos para determinar los efectos del anticuerpo en las dos horas de la inyección treinta a cuarenta y cinco minutos después de la inyección de tosilato de bretilio, cuando se estableció una línea base estable de flujo (menos de un 5% de variación) durante al menos 5 minutos, el nervio se colocó sobre electrodos de platino bipolar y se estimuló eléctricamente (2 Hz, 10 V, 1 ms, durante 30 seg) y de nuevo 20 minutos más tarde. El promedio de flujo sanguíneo en respuesta a estas dos estimulaciones se utilizó para establecer la línea base de respuesta (tiempo 0) a la estimulación eléctrica. El anticuerpo G1 (1 mg/kg o 10 mg/kg) o el vehículo (PBS con Tween 20 al 0,01% a un volumen igual que el G1 a 10 mg/ml) se administraron entonces por vía intravenosa (i.v.). El nervio fue posteriormente estimulado (2 Hz, 10 V, 1 ms, durante 30 seg) a los 30 min, 60 min, 90 min, y 120 min después de la administración del anticuerpo. Los animales se mantuvieron bajo anestesia durante un periodo de aproximadamente 3 horas. El cambio acumulativo del flujo sanguíneo en la piel se estimó por el área bajo la curva flujo-tiempo (AUC, lo que es igual al cambio en el flujo multiplicado por el cambio en el tiempo) para cada respuesta del flujo a las estimulaciones por pulsos eléctricos.

Como se muestra en la Figura 7., el incremento del flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de pulsos eléctricos sobre el nervio safeno fue inhibido significativamente por la presencia del anticuerpo G1 a 1 mg/kg (administrado i.v.) cuando se compara con el vehículo, cuando el nervio safeno se estimuló eléctricamente a los 90 min después de la administración del anticuerpo. El aumento del flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de pulsos electrónicos sobre el nervio safeno se inhibió significativamente por la presencia del anticuerpo G1 a 10 mg/kg (administrado i.v.) cuando se comparó con el vehículo, cuando el nervio safeno fue estimulado eléctricamente a los 90 minutos y 120 minutos después de la administración del anticuerpo.

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

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

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

Ejemplo 6: Efecto agudo del anticuerpo antagonista anti-CGRP mu7E9 en un ensayo de arteria dural (ventana craneal cerrada)

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

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

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

El propósito de este experimento fue determinar si el anticuerpo anti-CGRP podría bloquear la dilatación de la MMA estimulada eléctricamente 7 días después de la dosificación. La preparación de las ratas fue idéntica a la descrita anteriormente del experimento agudo (Ejemplo 6) con las siguientes excepciones. Las ratas se inyectaron i.v. (10 mg/kg, 3 mg/kg o 1 mg/kg de G1) 7 días antes de crear la ventana craneal cerrada, la preparación y la estimulación. Era imposible establecer una línea base de respuesta de dilatación a la estimulación eléctrica antes de la dosificación como en el experimento agudo y por tanto los grupos de anticuerpos se compararon con la dilatación de la MMA en un vehículo (PBS, Tween 20 0,01%) dosificado al grupo control. Después de que las ratas se dejaron reposar no menos de 45 minutos, se estimuló la duramadre eléctricamente a intervalos de 30 minutos. Las estimulaciones fueron a 2,5V, 5V, 10V, 15V, y 20V, todas a 10 Hz, pulsos con una fr 0,5 ms, durante 30 segundos.

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

5 Ejemplo 8: Modelo de sofoco a la abstinencia de morfina

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

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

30 **Depósito de material Biológico**

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

| 35 | Material | Anticuerpo Nº | Nº de registro ATCC | Fecha de depósito |
|----|----------------|------------------|---------------------|--------------------|
| | pDb.CGRP.hFcGI | G1 cadena pesada | PTA-6867 | 15 de julio, 2.005 |
| | pEb.CGRP.hKGI | G1 cadena ligera | PTA-6866 | 15 de julio, 2.005 |

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

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

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

65 **Secuencias de anticuerpos**

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de G1 (SEC ID N°: 1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYAEAVKG
5 RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGTLVTVSS

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de G1 (SEC ID N°: 2)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTDF
10 TLTISSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIK

CDR H1 de G1 (CDR ampliada) (SEC ID N°: 3)

15 GFTFSNYWIS

CDR H2 de G1 (CDR ampliada) (SEC ID N°: 4)

EIRSESDASATHYAEAVKG

20 CDR H3 de G1 (SEC ID N°: 5)

YFDYGLAIQNY

CDR L1 de G1 (SEC ID N°: 6)

25 KASKRVTTYVS

CDR L2 de G1 (SEC ID N°: 7)

30 GASNRYL

CDR L3 de G1 (SEC ID N°: 8)

35 SQSYNYPYT

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada de G1 (SEC ID N°: 9)

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCTGCGTCTGTCCTGC
40 GCTGCTCCGGTTTCACCTTCTCCAACACTACTGGATCTCCTGGGTTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCT
GGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAAAA
GGTCGTTTCACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTG
45 CTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTACTGG
GGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCC

Secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera de G1 (SEC ID N°: 10)

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACGTGCTACCCTGTCCCTGC
50 AAAGCTTCCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTG
CTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCGGTTCGGTACCG
55 ACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTCAGTCCTACAA
CTACCCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAAATCAAA

60 Secuencia de aminoácidos de anticuerpo entero de cadena pesada de G1 (incluyendo IgG2 modificada como se describe en el presente documento) (SEC ID N°: 11)

65

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYAEAVKGR
 FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
 TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH
 5 KPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVHVDWLNGLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKTKGQPREPQV
 10 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de anticuerpo entero de cadena ligera de G1 (SEC ID N°: 12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTD
 FTLTISSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY
 15 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 20 NRGEC

Secuencia de nucleótidos de anticuerpo entero de cadena pesada de G1 (incluyendo IgG2 modificada como se describe en el presente documento) (SEC ID N°: 13)

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCTGCGTCTGTCCTGC
 GCTGCTTCCGGTTTCACCTTCTCCAACACTGGATCTCCTGGGTTCTGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTC
 30 TGGAAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAA
 AGGTCGTTTACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGT
 GCTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTACTG
 35 GGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCTCCGCTCCACCAAGGGCCCATCTGTCTTCCCACTGGC
 CCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCTCCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
 AGAACCTGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGT
 40 CCTGCAGTCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCAC
 CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTGACAAAGACCGTGGAGAG
 AAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCTGTTT
 45 CCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCC
 AAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCCAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTG
 50 CACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGC
 ATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCCCCA
 TCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCG
 55 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAACAATAAGACCACCCCTCCAATGC
 TGGACTCCGACGGATCCTTCTTCCCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGG
 AAACGTGTTCTTGTTCCTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGCCTGTCC
 CTGTCTCCAGGAAAGTAA

Secuencia de nucleótidos de anticuerpo entero de cadena ligera de G1 (SEC ID N°: 14)

65

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCAGGTGAACGTGCTACCCTGTCCCT
 GCAAAGCTTCCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCG
 TCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCCGGTTCC
 5 GGTACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTC
 AGTCCTACAACCTACCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAAATCAAACGCACTGTGGCTGC
 10 ACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC
 TGCTGAATAACTTCTATCCGCGCGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCG
 GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
 15 TGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
 TGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGCTAA

20 Comparación de secuencias de aminoácidos de CGRP humano y de rata (α -CGRP humano (SEC ID N°: 15); β -
 CGRP humano (SEC ID N°: 43); α -CGRP de rata (SEC ID N°: 41); y β -CGRP de rata (SEC ID N°: 44)):

NH₂-ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (α -CGRP humano)
 NH₂-ACNTATCVTHRLAGLLS-RSGGMVKSNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (β -CGRP humano)
 25 NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVG-SEAF-CONH₂ (α -CGRP de rata)
 NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (β -CGRP de rata)

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Rinat Neuroscience Corp.
 Zeller, Joerg
 Poulsen, Kristian
 Abdiche, Yasmin
 Pons, Jaume
 35 Sierra, Jones
 Rosenthal, Arnon

<120> Anticuerpos Antagonistas Dirigidos Contra un Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina y
 Métodos que Utilizan los Mismos.

40 <130> PC19499A

<160> 47

45 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado

55 <400> 1

60

65

ES 2 664 421 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 10 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 15 Ala Glu Ile Arg Ser Glu Ser Asp Ala Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 20 Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 25 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr Cys Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr Trp
 30 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado
 <400> 2
 40 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 45 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr
 50 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 55 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 <210> 3

ES 2 664 421 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> CDR H1 de anticuerpo humanizado

<400> 3

10

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

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> CDR H2 de anticuerpo humanizado

20

<400> 4

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

25

Val Lys Gly

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> CDR H3 de anticuerpo humanizado

35

<400> 5

40

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

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> CDR L1 de anticuerpo humanizado

50

<400> 6

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

55

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> CDR L2 de anticuerpo humanizado

<400> 7

65

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu
 1 5

ES 2 664 421 T3

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

5

<220>
 <223> CDR L3 de anticuerpo humanizado

10

<400> 8

Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

15

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

20

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

<400> 9

25

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gaagttcagc | tggttgaatc | cggtggtggt | ctggttcagc | caggtgggtc | cctgcgtctg | 60 |
| tcctgcgctg | cttccggttt | cacctctcc | aactactgga | tctcctgggt | tcgtcaggct | 120 |
| cctggtaaag | gtctggaatg | ggttgctgaa | atccgttccg | aatccgacgc | gtccgctacc | 180 |

30

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| cattacgctg | aagctgtaa | aggctgtttc | accatctccc | gtgacaacgc | taagaactcc | 240 |
| ctgtacctgc | agatgaactc | cctgcgtgct | gaagacaccg | ctgtttacta | ctgcctggct | 300 |
| tactttgact | acggctctggc | tatccagaac | tactgggggc | agggtaccct | ggttaccggt | 360 |
| tcctcc | | | | | | 366 |

40

<210> 10
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado

<400> 10

50

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| gaaatcgttc | tgaccagtc | cccggctacc | ctgtccctgt | ccccagggtga | acgtgctacc | 60 |
| ctgtcctgca | aagcttcaa | acgggttacc | acctacgttt | cctggtacca | gcagaaacct | 120 |
| ggtcaggctc | ctcgtctgct | gatctacggg | gcttccaacc | gttacctcgg | tatcccagct | 180 |

55

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----|
| cgtttctccg | gttccgggtc | cggtagccgac | ttcaccctga | ccatctctc | cctggaacct | 240 |
| gaagacttcg | ctgtttacta | ctgcagtcag | tcctacaact | accctacac | cttcgggtcag | 300 |
| ggtaccaaac | tggaatcaa | a | | | | 321 |

60

<210> 11
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65

<220>

ES 2 664 421 T3

| | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | |
|----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 5 | Gly | Gln | Gly ₁₁₅ | Thr | Leu | Val | Thr | Val ₁₂₀ | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr ₁₂₅ | Lys | Gly | Pro |
| | Ser | Val ₁₃₀ | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro ₁₃₅ | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr ₁₄₀ | Ser | Glu | Ser | Thr |
| 10 | Ala ₁₄₅ | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu ₁₅₀ | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe ₁₅₅ | Pro | Glu | Pro | Val | Thr ₁₆₀ |
| 15 | Val | Ser | Trp | Asn ₁₆₅ | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser ₁₇₀ | Gly | Val | His | Thr | Phe ₁₇₅ | Pro |
| 20 | Ala | Val | Leu | Gln ₁₈₀ | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr ₁₈₅ | Ser | Leu | Ser | Ser | Val ₁₉₀ | Val | Thr |
| | Val | Pro | Ser ₁₉₅ | Ser | Asn | Phe | Gly | Thr ₂₀₀ | Gln | Thr | Tyr | Thr | Cys ₂₀₅ | Asn | Val | Asp |
| 25 | His | Lys ₂₁₀ | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys ₂₁₅ | Val | Asp | Lys | Thr | Val ₂₂₀ | Glu | Arg | Lys | Cys |
| 30 | Cys ₂₂₅ | Val | Glu | Cys | Pro | Pro ₂₃₀ | Cys | Pro | Ala | Pro | Pro ₂₃₅ | Val | Ala | Gly | Pro | Ser ₂₄₀ |
| | Val | Phe | Leu | Phe | Pro ₂₄₅ | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp ₂₅₀ | Thr | Leu | Met | Ile | Ser ₂₅₅ | Arg |
| 35 | Thr | Pro | Glu | Val ₂₆₀ | Thr | Cys | Val | Val | Val ₂₆₅ | Asp | Val | Ser | His | Glu ₂₇₀ | Asp | Pro |
| 40 | Glu | Val | Gln ₂₇₅ | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val ₂₈₀ | Asp | Gly | Val | Glu | Val ₂₈₅ | His | Asn | Ala |
| 45 | Lys | Thr ₂₉₀ | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu ₂₉₅ | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr ₃₀₀ | Phe | Arg | Val | Val |
| | Ser | Val | Leu | Thr | Val ₃₁₀ | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr ₃₂₀ | |
| 50 | Lys | Cys | Lys | Val | Ser ₃₂₅ | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro ₃₃₀ | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys ₃₃₅ | Thr |
| 55 | Ile | Ser | Lys | Thr ₃₄₀ | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg ₃₄₅ | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr ₃₅₀ | Thr | Leu |
| 60 | Pro | Pro | Ser ₃₅₅ | Arg | Glu | Glu | Met | Thr ₃₆₀ | Lys | Asn | Gln | Val | Ser ₃₆₅ | Leu | Thr | Cys |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 664 421 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 5 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 385 390 395 400
 10 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 15 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo humanizado
 <400> 12
 30 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 35 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Lys Arg Val Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 40 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 50 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 55 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 60 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 65 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

ES 2 664 421 T3

tccgacggat cttcttcct gtattccaag ctgaccgtgg acaagtccag atggcagcag 1260
 ggaaacgtgt tctcttgttc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta taccagaag 1320
 5 agcctgtccc tgtctccagg aaagtaa 1347

<210> 14
 <211> 645
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo humanizado

15 <400> 14

gaaatcggtc tgaccagtc cccggctacc ctgtccctgt cccaggtga acgtgctacc 60
 ctgtcctgca aagcttccaa acgggttacc acctacgttt cctggtacca gcagaaacct 120
 20 ggtcaggctc ctctctgct gatctacggt gttccaacc gttacctcg tatcccagct 180
 cgtttctccg gttccgggtc cggtagcgac ttcacctga ccatctctc cctggaacct 240
 gaagacttcg ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact accctacac cttcggtcag 300
 25 ggtaccaaac tggaaatcaa acgcaactgt gctgcacat ctgtcttcat cttccctcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 30 ccgcgcgagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgcc tccaatccgg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 35 ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

<210> 15
 <211> 37
 <212> PRT
 40 <213> Humana

<400> 15

Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30
 50 Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Humana

60 <400> 16

65

ES 2 664 421 T3

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

5 Glu Ala Phe

<210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

15 <400> 21

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

20 Met Ala Phe

25 <210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 22

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

35 Gln Ala Phe

40 <210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 23

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

50 Lys Ala Ala

55 <210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

65 <400> 24

ES 2 664 421 T3

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

5 <210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano
 <400> 25

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

20 <210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano
 <400> 26

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

35 <210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano
 <400> 27

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

50 <210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano
 <400> 28

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

65 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

ES 2 664 421 T3

<400> 29
Asn Asn Phe Val Pro Ala Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
5
<210> 30
<211> 13
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano
15 <400> 30
Asn Asn Phe Val Pro Thr Ala Val Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
20 <210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano
<400> 31
30 Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Ala Gly Ser Lys Ala Phe
1 5 10
35 <210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano
40 <400> 32
Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Ala Ser Lys Ala Phe
1 5 10
45 <210> 33
<211> 13
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano
55 <400> 33
Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ala Lys Ala Phe
1 5 10
60 <210> 34
<211> 13
<212> PRT
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 664 421 T3

<220>
 <223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 34

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

10
 <210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano

<400> 35

20
 Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser Lys Ala Phe
 1 5 10

25
 <210> 36
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano

30
 <400> 36

35
 Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser
 1 5 10 15

35
 Lys Ala Phe

40
 <210> 37
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano

<400> 37

50
 Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val Gly Ser
 1 5 10 15

50
 Lys Ala

55
 <210> 38
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano

<400> 38

65

ES 2 664 421 T3

1 Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 5 Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 10 Gly Ser Lys Ala
 <210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano
 20 <400> 39
 1 Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 25 Ser Arg Ser
 <210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP humano
 35 <400> 40
 1 Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala
 40 <210> 41
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Rata
 45 <400> 41
 1 Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 50 Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asp Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 55 Gly Ser Glu Ala Phe
 60 <210> 42
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Fragmento de alfa-CGRP de rata

ES 2 664 421 T3

<400> 42

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

<210> 43

10 <211> 37
<212> PRT
<213> Humana

<400> 43

15 Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
1 5 10 15
20 Ser Arg Ser Gly Gly Met Val Lys Ser Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
20 25 30
25 Gly Ser Lys Ala Phe
35

<210> 44

30 <211> 37
<212> PRT
<213> Rata

<400> 44

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

<210> 45

45 <211> 32
<212> PRT
<213> Humana

<400> 45

50 Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
1 5 10 15
55 Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20 25 30

<210> 46

60 <211> 37
<212> PRT
<213> Humana

<400> 46

65

ES 2 664 421 T3

1 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
5 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
10 Gly Ser Asn Thr Tyr
<210> 47
<211> 52
<212> PRT
<213> Humana
<400> 47
20 Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
25 Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
30 Pro Gln Gly Tyr
35
40
45
50
55
60
65

Reivindicaciones

- 5
1. Un anticuerpo antagonista anti-CGRP que comprende un dominio de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y un dominio de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.
- 10
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 12.
- 15
3. Un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2.
- 20
4. El polinucleótido aislado de la reivindicación 3, que comprende (i) SEC ID N°: 9 y 10 o (ii) SEC ID N°: 13 y 14.
- 25
5. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4.
- 30
6. El vector de acuerdo con la reivindicación 5 en donde el vector está depositado como ATCC N° PTA-6867 o ATCC N° PTA-6866.
- 35
7. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 o el vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.
- 40
8. Un método para generar el anticuerpo de cualquier reivindicación anterior, que comprende los pasos de expresar el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 o el vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 en una célula huésped y (b) opcionalmente recuperar y/o aislar el anticuerpo o fragmento del mismo.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1

| Fab | K _D (nM) | | K _D (nM) 25-37° | K _D (mutante/parental) | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|------|--|--|--|
| | 1-37(WT) | 19-37 ^a | | F27A | V28A | P29A | T30A | N31A | V32A | G33A | S34A | K35A | F37A | | | |
| 7E9 | 1,0 | 1,1±0,8 | 0,14±0,05 | 1,0 | 1,0 | 26 | 7 | 9 | 41 | 1256 | 69 | 4 | 3598 | | | |
| 8B6 | 1,1 | 1,5±1,2 | 0,45±0,08 | 1,0 | 1,0 | 9 | 2,2 | 3 | 5 | 496 | 26 | 3 | 2527 | | | |
| 10A8 | 2,1 | 2,4±1,4 | 1,0±0,2 | 1,0 | 1,0 | 9 | 4 | 4 | 11 | 36 | 82 | 13 | 2152 | | | |
| 7D11 | 4,4 | 10±7 | 3,4±0,4 | 1,1 | 1,0 | 7 | 4 | 5 | 5 | 86 | 18 | 1,4 | 420 | | | |
| 6H2 | 9,3 | 7,8±0,2 | 8,5±0,5 | 0,9 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 4 | 11 | 14 | 0,5 | 1,0 | | | | |
| 4901 | 60,5 | 52±12 | 296±115 | 0,8 | 0,8 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,9 | 1,3 | 0,8 | 0,3 | | | | |
| 14E10 | 79,7 | 91±3 | 117,4±0,7 | 0,8 | 0,8 | 11 | 3 | 18 | 2 | 1 | 3 | 0,4 ^b | | | | |
| 9B8 | 84,7 | 76±20 | 96±28 | 0,8 | 0,8 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 0,6 | 1,3 | 4 | 0,4 ^b | | | | |
| 13C2 | 94,4 | 86±13 | 137±5 | 0,7 | 0,7 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,9 | 1,1 | 0,4 ^b | | | | |
| 14A9 | 148,4 | 219±114 | 246±20 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | 0,5 | 0,8 | 0,7 | 1,6 | 1,3 | 6 | | | | |
| 6D5 | 209,9 | 207±26 | 378±22 | 0,8 | 0,7 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,5 | 3 | 1,1 | 5 | | | | |
| 1C5 | 296,4 | 223±51 | 430±173 | 0,8 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 1,1 | 1,1 | 5 | | | | |

Figura 2A

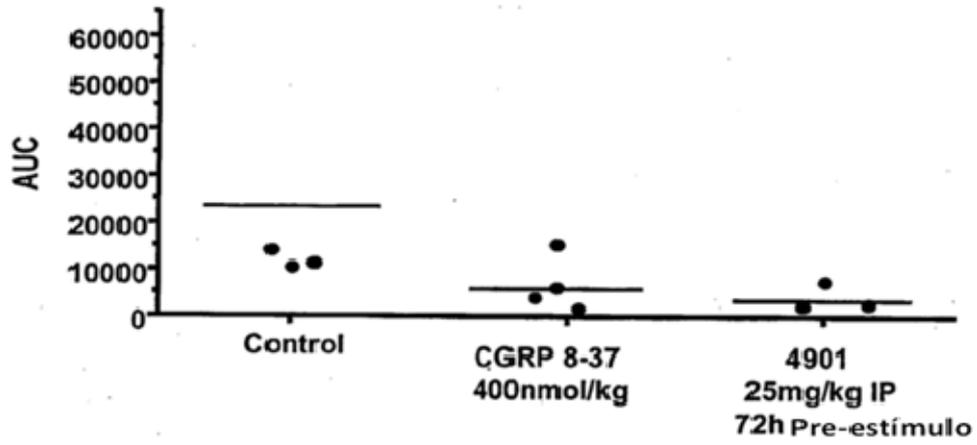


Figura 2B

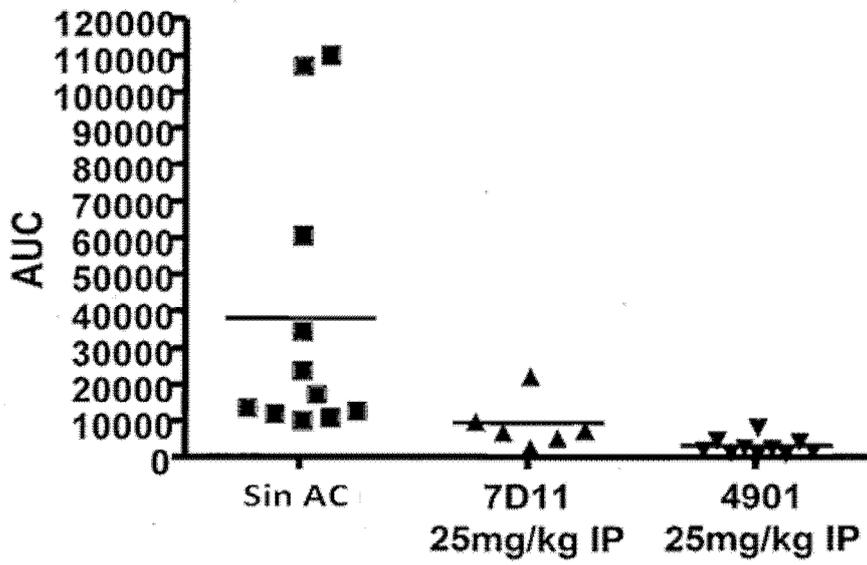


Figura 3

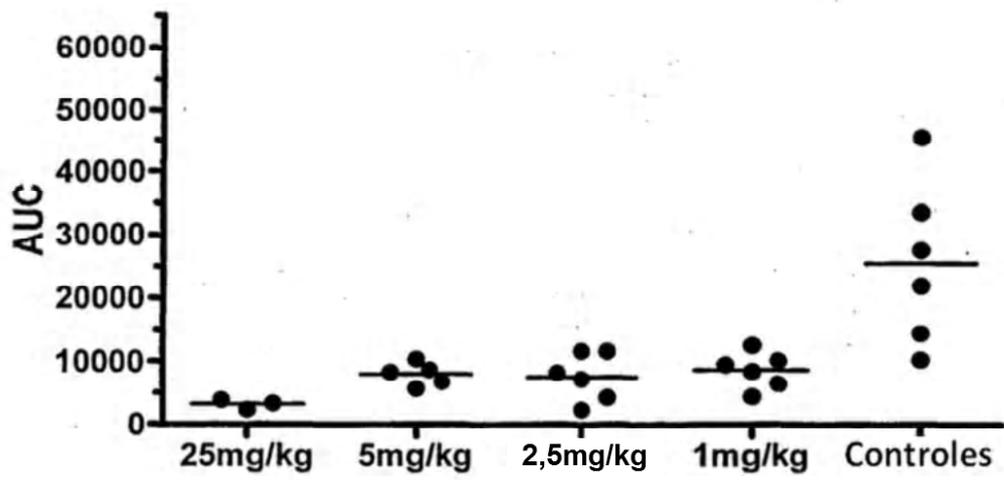


Figura 4A

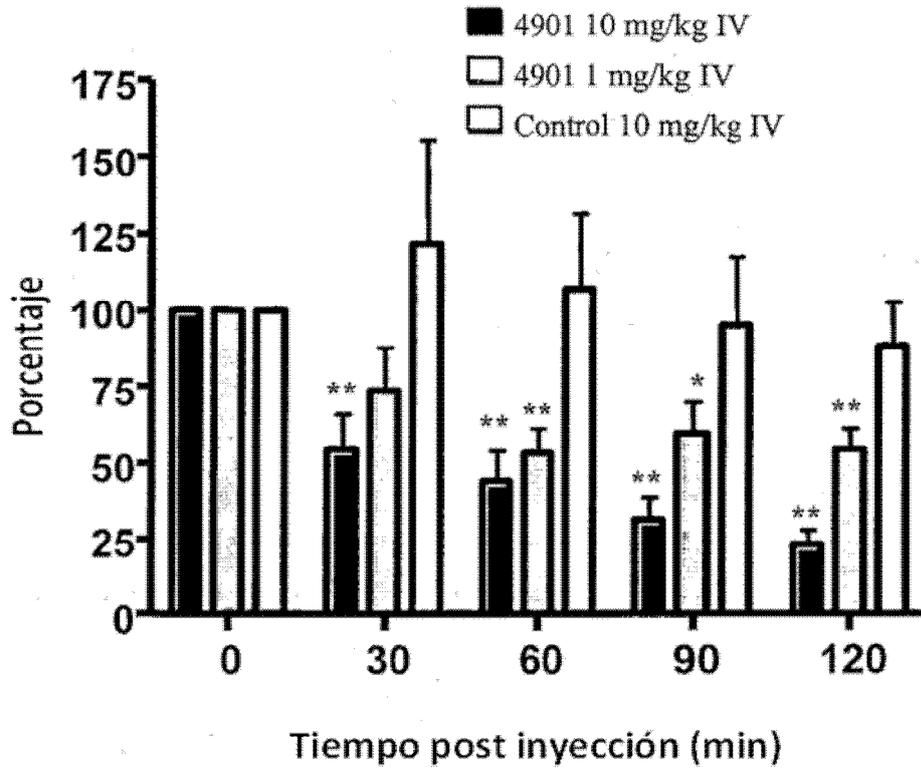


Figura 4B

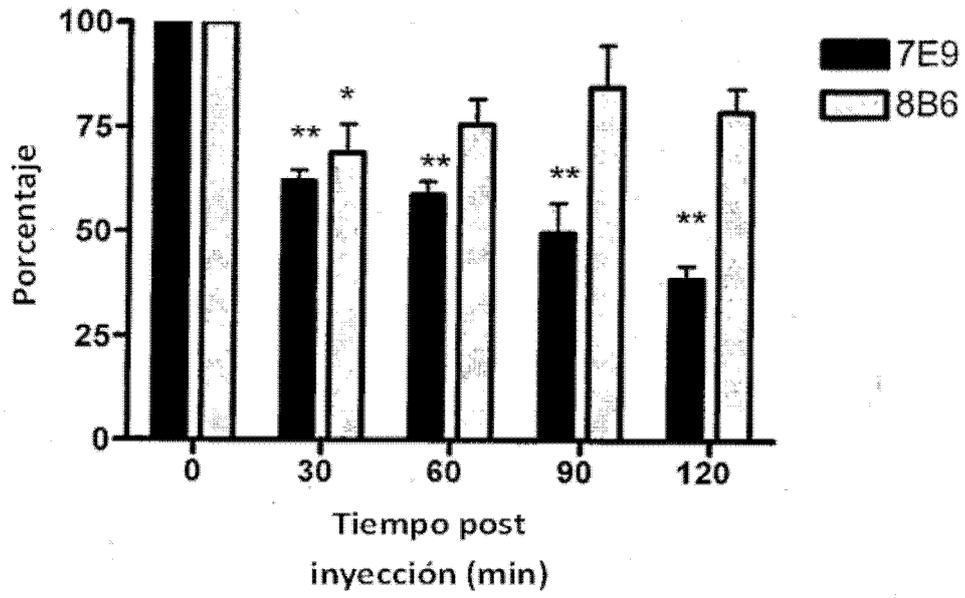


Figura 5

Negrita=CDR Kabat

Subrayado= CDR Chothia

Cadena pesada G1

```

1           5           10          15          20          25          30
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGFTFS      H1
31          35          40          45          50          55          60
NYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASAT      H2
61          65          70          75          80          85          90
HYAEAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA
91          95          100         105         110         115         120
EDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGTLVTV      H3
121 122
SS
    
```

Cadena ligera G1

```

1           5           10          15          20          25          30
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVT      L1
31          35          40          45          50          55          60
TYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPA      L2
61          65          70          75          80          85          90
RFGSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCSQ
91          95          100         105         107
SNYPYTFGQGTLEIK      L3
    
```

Figura 6

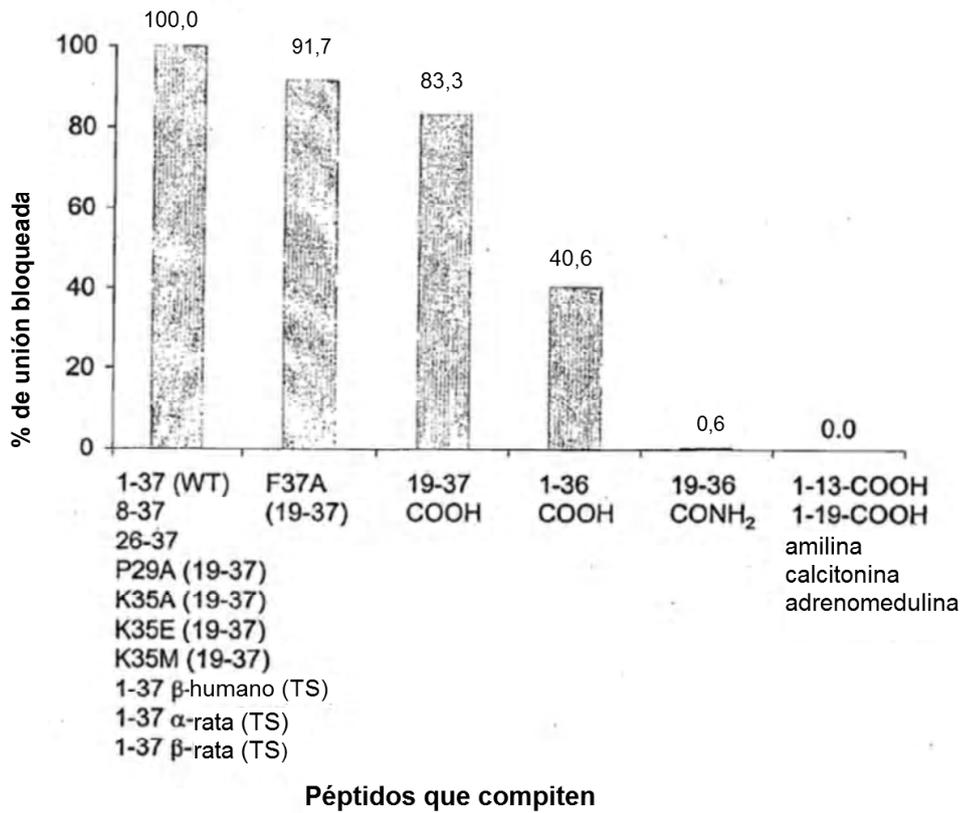


Figura 7

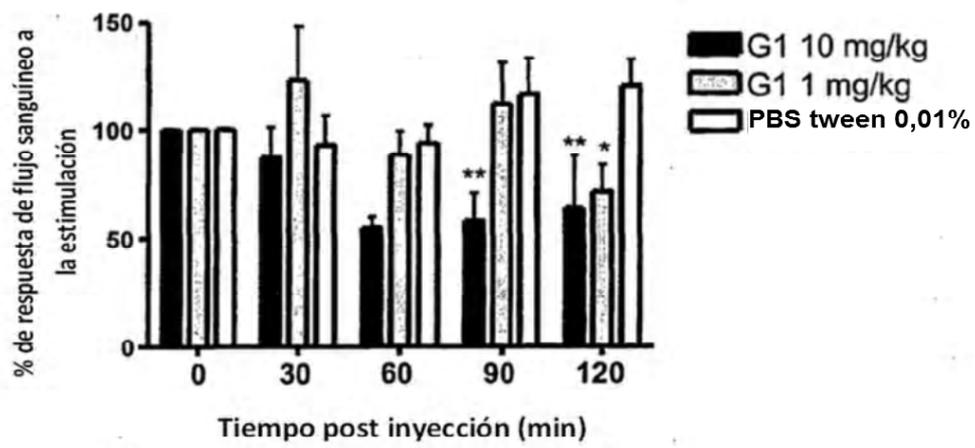


Figura 8A

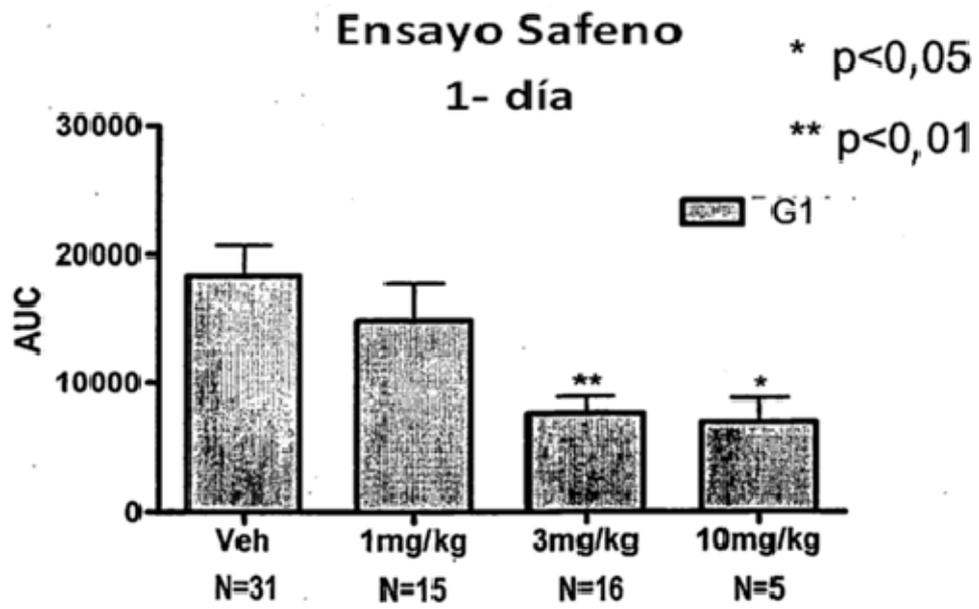


Figura 8B

Ensayo Safeno 7- días

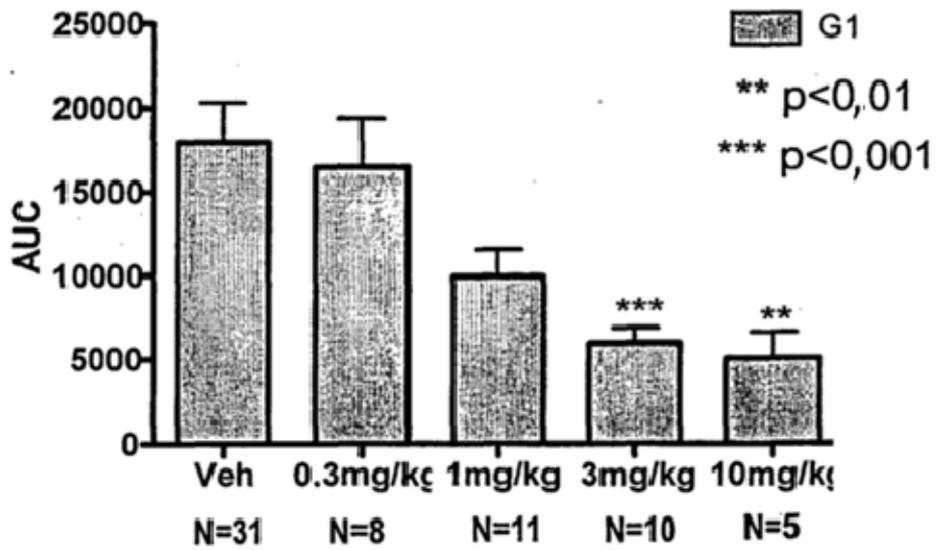


Figura 8C

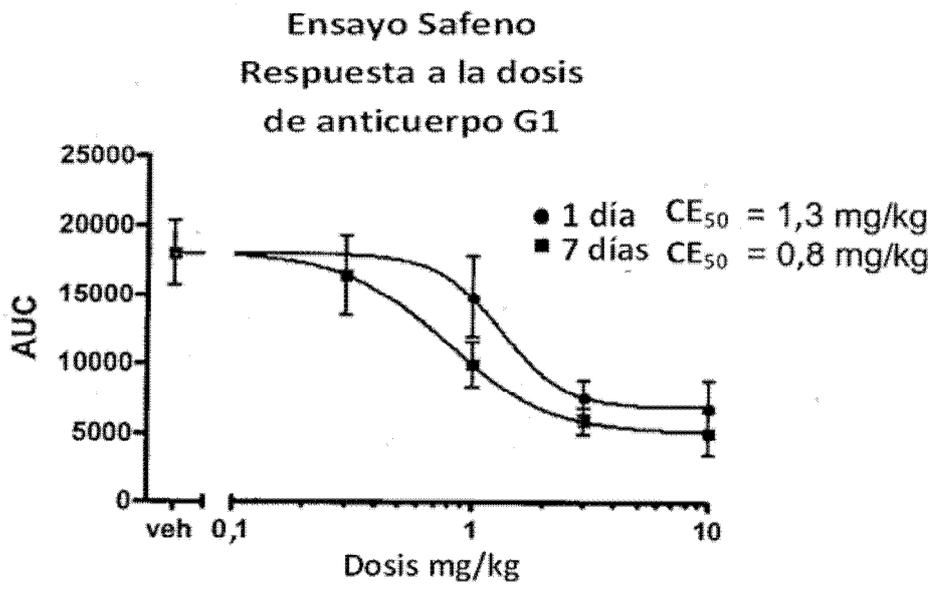


Figura 9

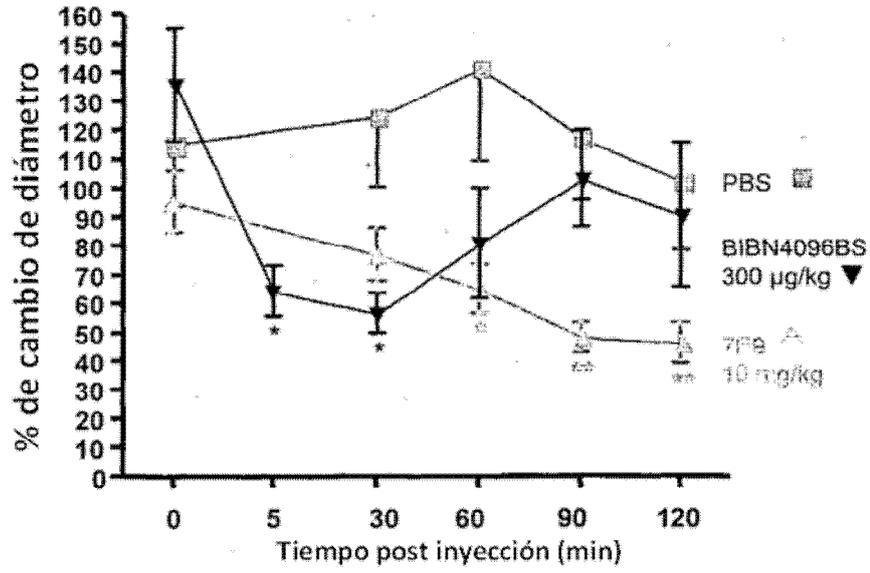


Figura 10

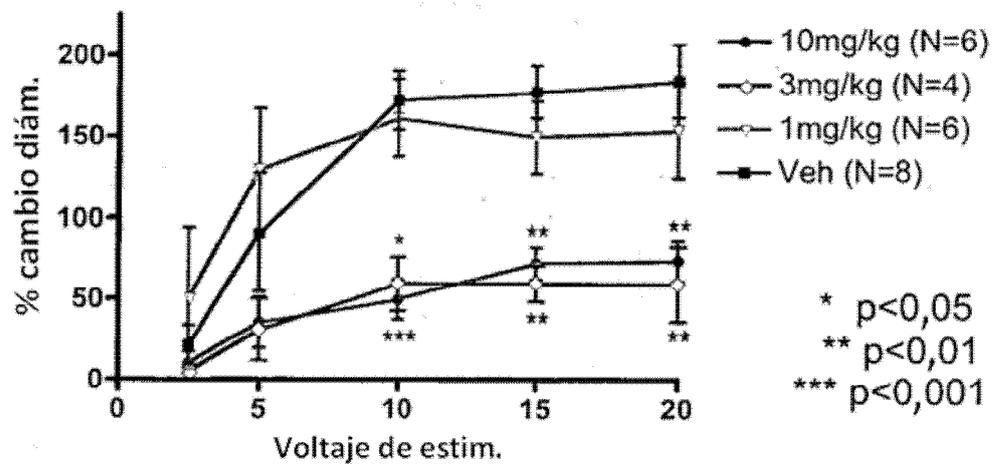


Figura 11A

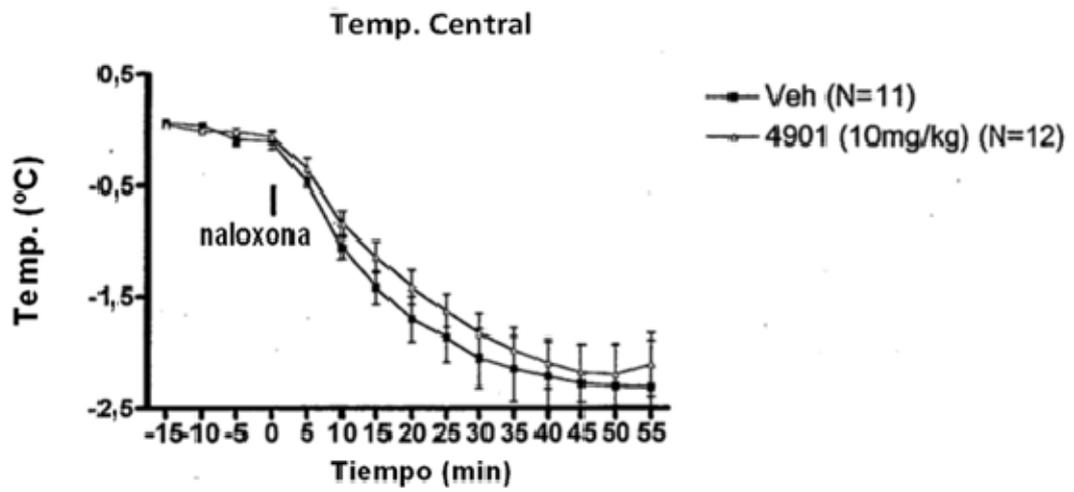


Figura 11B

