

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 854**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 5/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2006 E 16154418 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 3045182**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas dirigidos contra un péptido relacionado con el gen de la calcitonina para tratar cefalea en racimos**

30 Prioridad:

14.11.2005 US 736623 P

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

23.04.2018

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 2 664 854 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).

Anticuerpos antagonistas dirigidos contra un péptido relacionado con el gen de la calcitonina para tratar cefalea en racimos**Descripción**

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de anticuerpos antagonistas anti-CGRP para la prevención, mejora, o tratamiento de síntomas vasomotores, como dolores de cabeza (por ejemplo, migraña) y sofocos relacionados con el 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 diferencial. Por lo menos dos subtipos de receptores CGRP también podrían representar actividades diferenciales. 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 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.

15

20

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, Paris, Francia: SCI: 3-7 (1.992)).

25

30

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.

45

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).

55

60

Lo desconcertante de esta teoría es la observación de que el tratamiento con compuestos que inhiben

65

exclusivamente la inflamación neurogénica (por ejemplo, antagonistas del receptor NK1 de la taquiquina) 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.

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.

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.

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 ergot (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, oxycodona) 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).

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

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

La US2005/0234054 divulga antagonistas del receptor de CGRP de moléculas pequeñas para su uso en el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo cefalea en racimos. Tan y col. trata el papel de CGRP como un potente vasodilatador. Los autores muestran que la administración de un fragmento Fab anti-CGRP bloqueó la respuesta de flujo sanguíneo de la piel aumentada a estimulación antidrómica del nervio safeno en ratas. Además, Tan y col. indica que el bloqueo de la vasodilatación no se logra en la misma extensión por un anticuerpo anti-CGRP de longitud completa.

Breve resumen de la invención

La invención que se desvela en el presente documento se refiere a métodos para usar anticuerpos antagonistas anti-CGRP para tratar o prevenir cefaleas en racimos.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en la prevención o tratamiento de cefalea en racimos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en un método para tratar o prevenir cefalea en racimos en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en un método para tratar o prevenir cefalea en racimos en un individuo que comprende administrar al individuo una

cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en un método para mejorar, controlar, reducir la incidencia de, o retrasar el desarrollo o la progresión de cefalea en racimos en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP.

En una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en métodos para mejorar, controlar, reducir la incidencia de, o retrasar el desarrollo o la progresión de cefalea en racimos en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP en combinación con por lo menos un agente adicional útil para tratar cefalea. Tales agentes adicionales incluyen agonistas similares al 5-HT1 (y agonistas que actúan en otros sitios de 5-HT1), y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

Ejemplos de agonistas de 5-HT1 que pueden utilizarse en combinación con un anticuerpo anti-CGRP incluyen una clase de compuestos conocida como triptanos, tales como sumatriptano, zolmitriptano, naratriptano, eletriptano, almotriptano, y frovatriptano. También se sabe que los alcaloides de ergot y los compuestos relacionados tienen también actividad agonista de 5-HT1 y se han usado para tratar los dolores de cabeza como la migraña. Entre estos compuestos se incluyen el tartrato de ergotamina, maleato de ergonovina, y mesilatos ergoloides (por ejemplo, dihidroergocovina, dihidroergocristina, dihidroergocriptina, y mesilato de dihidroergotamina (DHE 45)).

Ejemplos de AINE que pueden usarse en combinación con un anticuerpo anti-CGRP incluyen el naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, oxaprozina, etodolac, indometacina, ketorolac, nabumetona, ácido mefenámico, y piroxicam. AINE adicionales incluyen los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Miembros de este grupo incluyen: celecoxib; rofecoxib; meloxicam; JTE-522; L-745.337; NS398; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP reconoce un CGRP humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a ambos de α -CGRP y β -CGRP humanos. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une a CGRP humano y de rata. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al 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.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones el anticuerpo antagonista anti-CGRP está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo G1 (como se describe en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende una o más CDR(s) (como una, dos, tres, cuatro, cinco, o en algunas realizaciones, las seis CDR) del anticuerpo G1 o variantes del G1 mostradas en la Tabla 6. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Figura 5 (SEC. ID 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, como una región constante que es inmunológicamente inerte (incluyendo inmunológicamente parcialmente inerte), por ejemplo, que no inicia la destrucción mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), no activa la microglía, o que tiene reducidas una o más de estas actividades. En algunas realizaciones, la 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 glucosilación unida a N. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glucosilación 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 glucosilación N en la región constante. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glucosilación unida a N. La región constante puede estar aglicosilada por glucosilación unida a N enzimática o por expresión de la glucosilación en una célula huésped 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.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo antagonista anti-CGRP de la invención para la fabricación de un medicamento para su uso en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, para tratar o prevenir el dolor de cabeza.

La invención puede usar anticuerpos antagonistas anti-CGRP derivados del anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6. El anticuerpo G1 (llamado de manera intercambiable "G1") es producido por los vectores de expresión que tienen los números de acceso 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 determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo G1 (incluyendo las CDRs Chothia y Kabat) también se muestran en la Figura 5. Se entiende que la referencia a cualquier parte de o la región completa de G1 engloba secuencias producidas por los vectores de expresión que tienen N^{os} de acceso de ATCC PTA-6866 y PTA-6867, y/o las secuencias representadas en la Figura 5. También pueden usarse las variantes de anticuerpo de G1 con las secuencias de aminoácidos representadas en la Tabla 6.

Un anticuerpo útil en la invención puede comprender un dominio de V_H que es al menos el 85%, al menos el 86%, al menos el 88%, al menos el 89%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC. ID N^o: 1.

Un anticuerpo útil en la invención puede comprender un dominio de V_L que es al menos el 85%, al menos el 86%, al menos el 87%, al menos el 88%, al menos el 89%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC. ID N^o: 2.

Un anticuerpo útil en la invención puede comprender un fragmento o una región del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo G1. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo G1. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo G1. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada mostradas en la Figura 5. En otra realización más, el fragmento contiene una o más CDR de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo G1.

La invención puede usar un anticuerpo que comprende una CDR3 de V_H como se expone en la SEC. ID N^o: 5, o una secuencia que difiere de la SEC. ID N^o: 5 por 1, 2, 3, 4, ó 5 sustituciones de aminoácidos. En una realización en particular, tales sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras.

La invención puede usar un anticuerpo que comprende una CDR3 de V_L como se expone en la SEC. ID N^o: 8, o una secuencia que se diferencia de la SEC. ID N^o: 8 por 1, 2, 3, 4, ó 5 sustituciones de aminoácidos. En una realización particular, dichas sustituciones de aminoácidos son sustituciones conservadoras.

La invención puede usar un anticuerpo que comprende uno cualquiera o más de los siguientes: a) una o más CDRs del anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6; b) CDR H3 de la cadena pesada del

anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6; c) CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6; d) tres CDRs de la cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6; e) tres CDRs de la cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6; f) tres CDRs de la cadena ligera y tres CDRs de la cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6. La invención puede usar un anticuerpo que comprende uno cualquiera o más de los siguientes: a) una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) CDR(s) derivadas del anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6; b) una CDR derivada CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo G1 y/o c) una CDR derivada de la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo G1. En algunas realizaciones, la CDR es una CDR mostrada en la Figura 5. En algunas realizaciones, la una o más CDRs derivadas del anticuerpo G1 o sus variantes mostradas en la Tabla 6 son por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 86%, por lo menos aproximadamente el 87%, por lo menos aproximadamente el 88%, por lo menos aproximadamente el 89%, por lo menos aproximadamente el 90%, por lo menos aproximadamente el 91%, por lo menos aproximadamente el 92%, por lo menos aproximadamente el 93%, por lo menos aproximadamente el 94%, por lo menos aproximadamente el 95%, por lo menos aproximadamente el 96%, por lo menos aproximadamente el 97%, por lo menos aproximadamente el 98% o por lo menos aproximadamente el 99% idénticas a por lo menos una, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, o por lo menos seis CDRs de G1 o sus variantes.

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 cualquier realización dada que contenga más de una CDR, la CDRs pueden ser cualquiera de Kabat, Chothia, y/o combinadas.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos KASKXaaVXaaTYVS, en donde Xaa en la posición 5 es R, W, G, L, o N; en donde Xaa en la posición 7 es T, A, D, G, R, S, W, o V. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de KASKXaaVXaaTYVS es la CDR1 de una cadena ligera del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos XaaXaaSNRYXaa, en donde Xaa en la posición 1 es G o A; en donde Xaa en la posición 2 es A o H; y en donde Xaa en la posición 7 es L, T, I, o S. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de XaaXaaSNRYXaa es la CDR2 de una cadena ligera del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG, en donde Xaa en la posición 5 es E, R, K, Q, o N; en donde Xaa en la posición 8 es A, G, N, E, H, S, L, R, C, F, Y, V, D, o P; en donde Xaa en la posición 9 es S, G, T, Y, C, E, L, A, P, I, N, R, V, D, o M; en donde Xaa en la posición 23 es H o F; en donde Xaa en la posición 15 es E o D. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG es la CRD2 de una cadena pesada del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID N°:1, en donde el residuo de aminoácido en la posición 99 de la SEC. ID N°:1 es L o está sustituido por A, N, S, T, V, o R; y en donde los residuos de aminoácido en la posición 100 de la SEC. ID N°:1 es A o está sustituido por L, R, S, V, Y, C, G, T, K, o P.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo (o polipéptido) está aislado. En algunas realizaciones, el anticuerpo (o polipéptido) es sustancialmente puro.

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

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

La presente invención usa anticuerpos antagonistas anti-CGRP para tratar, prevenir, mejorar, controlar, o reducir la incidencia de migraña en racimos.

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 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 CE₅₀.

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 divulgada en el presente documento proporciona métodos para tratar y/o prevenir cefalea en racimos en un individuo administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP.

También pueden usarse los anticuerpos antagonistas derivados de G1 o sus variantes mostrados en la Tabla 6.

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, 1995).

Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un objetivo, 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 que 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 determinante de la complementariedad (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 objetivo (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, glucosilación, 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, alquenal, cicloalquil, cicloalquenal o araldil. No todas las uniones en un polinucleótido 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 un objetivo 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 un primer objetivo puede o no unirse específica o preferencialmente a un segundo objetivo. 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_γRI, Fc_γRII, y subclases del Fc_γRII, incluyendo variantes alélicas y formas de empalme de estos receptores. Los receptores Fc_γRII incluyen el Fc_γRIIA (un "receptor activador") y Fc_γRIIB (un "receptor inhibidor"), que tiene secuencias de aminoácidos similares que se diferencian primariamente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1.991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel y col., 1.994, Immunomethods, 4:25-34; y de Haas y col., 1.995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG 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 un objetivo 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.

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

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

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

La “reducción de la incidencia” de un dolor de cabeza significa cualquier reducción de la gravedad (lo que 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 reducir la incidencia del dolor de cabeza en un individuo” refleja la administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP basado en unas expectativas razonables de que tal administración puede producir probablemente una reducción de la incidencia en ese individuo en particular.

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

Como se utiliza en el presente documento, “controlar el dolor de cabeza” se refiere a mantener o reducir la gravedad o la duración de uno o más síntomas del dolor de cabeza o la frecuencia de los ataques de dolor de cabeza en un individuo (cuando se compara con el nivel de antes del tratamiento). Por ejemplo, la duración o la

gravedad del dolor de cabeza, o la frecuencia de 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.

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

10 "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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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 20^a 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 condiciones relacionadas con la vasodilatación e incluye cefalea en racimos.

A. Métodos para prevenir o tratar los síntomas vasomotores

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de cefalea en racimos en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en un método para mejorar, controlar, reducir la incidencia de, o retrasar el desarrollo o progresión de cefalea en racimos en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en métodos para mejorar, controlar, reducir la incidencia de, o retrasar el desarrollo o la progresión del dolor de cefalea en racimos en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP en combinación con por lo menos un agente adicional útil para tratar el dolor de cabeza.

Tales agentes adicionales incluyen, pero no están limitados a, agonistas 5-HT y AINE. Por ejemplo, el anticuerpo y por lo menos un agente adicional pueden administrarse concomitantemente, es decir, se pueden dar en proximidad temporal lo suficiente cercana para permitir que sus efectos terapéuticos se solapen. Por ejemplo, la cantidad de agonista 5-HT o AINE administrado en combinación con un anticuerpo anti-CGRP debería ser suficiente para reducir la frecuencia de recaída del dolor de cabeza en los pacientes o producir una eficacia que dure más en comparación con la administración de cualquiera de estos agentes en ausencia del otro. Este procedimiento puede usarse para tratar dolores de cabeza que se encuentran dentro de una amplia variedad de clases incluyendo: migraña con o sin aura; migraña hemipléjica; cefaleas en racimo; neuralgia migrañosa; dolores de cabeza crónicos; dolores de cabeza por tensión; dolores de cabeza resultantes de otras afecciones médicas (como infección o presión aumentada en el cráneo debida a un tumor); hemicrania paroxística crónica; dolores de cabeza varios no asociados con una lesión estructural; dolores de cabeza asociados con un trastorno no vascular intracraneal, dolor de cabeza asociado con la administración de una sustancia o su retirada; dolor de cabeza asociado con infección no cefálica; dolor de cabeza asociado con un trastorno metabólico; dolor de cabeza asociado con un trastorno del cráneo, cuello, ojos, oídos, nariz, senos, dientes, boca u otra estructura facial o craneal; neuralgias craneales; y dolor del tronco nervioso y dolor por desaferentación.

Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las cantidades de dosificación apropiadas para los agentes particulares a ser usados en combinación con un anticuerpo anti-CGRP. Por ejemplo, el sumatriptano se puede administrar en una dosificación de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 300 mg. Cuando no se administra parenteralmente, la dosificación de sumatriptano es de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 mg prefiriéndose generalmente aproximadamente 50 mg y, cuando se administra parenteralmente, la dosificación preferida es de aproximadamente 6 mg. Sin embargo, estas dosificaciones pueden variarse de acuerdo con los métodos estándar en la técnica de manera que se optimicen para un paciente particular o para una terapia de combinación particular. Además, por ejemplo, el celecoxib puede administrarse en una cantidad de entre 50 y 500 mg.

La referencia a anticuerpos antagonistas anti-CGRP incluye también composiciones que comprenden uno o más de estos agentes. Estas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP para su uso en la presente invención pueden usarse solos o en combinación con otros métodos convencionales de tratamiento.

El anticuerpo antagonista anti-CGRP puede administrarse a un individuo por medio de cualquier vía adecuada. Debería ser aparente para un experto en la técnica que los ejemplos descritos en el presente documento no se pretende que limiten sino que ilustren las técnicas disponibles. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se administra a un individuo de acuerdo con métodos conocidos, como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía

intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, sublingualmente, intrasnovial, vía insuflación, intratecal, oral, por inhalación o por vías tópicas. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa, o localizada. Los nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas, incluyendo los nebulizadores de chorro y los nebulizadores ultrasónicos son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar tras su reconstitución. Alternativamente, el anticuerpo antagonista anti-CGRP se pueden aplicar por aerosol utilizando una formulación en fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o puede inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

En una realización, un anticuerpo antagonista anti-CGRP se administra por medio de técnicas de administración locales específicas del sitio o dirigidas. Ejemplos de técnicas de administración locales específicas del sitio o dirigidas incluyen varias fuentes de depósito implantables del anticuerpo antagonista anti-CGRP o catéteres de administración local, como catéteres de infusión, un catéter permanente, o un catéter de aguja, injertos sintéticos, vendas adventicias, derivaciones y stents u otros dispositivos implantables, vehículos específicos del sitio, inyección directa, o aplicación directa. Ver, por ejemplo, la publicación de PCT N° WO 00/53211 y la Patente de Estados Unidos N° 5.981.568.

Pueden usarse varias formulaciones de un anticuerpo antagonista anti-CGRP para la administración. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP puede administrarse puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden estar en varias formulaciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen pero no están limitados a agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, tampones, y potenciadores de la penetración en la piel. Los excipientes así como las formulaciones para la administración de fármacos parenteral y no parenteral se exponen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing (2.000).

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

Un anticuerpo anti-CGRP puede administrarse usando cualquier método adecuado, incluyendo por inyección (por ejemplo, intraperitonealmente, intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, etc.). Los anticuerpos anti-CGRP también pueden administrarse por inhalación, como se describe en el presente documento. Generalmente, para la administración de anticuerpos anti-CGRP, una dosificación candidata inicial puede ser de aproximadamente de 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, una dosificación típica diaria puede variar de aproximadamente cualquiera de 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede usarse una dosificación de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, y aproximadamente 25 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar una supresión de los síntomas deseada o hasta que se alcanzan suficientes niveles terapéuticos, por ejemplo, para reducir el dolor. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanalmente de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-CGRP, o seguida por una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de disminución farmacocinética que el médico desee alcanzar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla la dosificación de una-cuatro veces a la semana. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el antagonista(s) CGRP utilizado) puede variar con el tiempo.

Para el propósito de la presente invención, la dosificación apropiada de un anticuerpo antagonista anti-CGRP dependerá del anticuerpo antagonista anti-CGRP (o composiciones del mismo) empleado, el tipo y la severidad de la cefalea en racimos a tratar, de si el agente se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, de las terapias previas, del historial clínico del paciente y de la respuesta al agente, y la discreción del médico tratante. Típicamente, el médico administrará un anticuerpo antagonista anti-CGRP, hasta que se alcance una dosificación que consiga el resultado deseado. La dosis y/o la frecuencia pueden variar con el curso del tratamiento.

Generalmente, para la determinación de la dosificación contribuirán consideraciones empíricas, como la vida media. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano, como los anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos, pueden usarse para prolongar la vida media del anticuerpo y para prevenir que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración se puede determinar y ajustar durante el curso de la terapia, y está generalmente, pero no necesariamente, basada en el tratamiento y/o la supresión y/o la mejoría y/o el retraso del dolor de cabeza (por ejemplo, la migraña).

Alternativamente, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación sostenida continua del anticuerpo antagonista anti-CGRP. Varias formulaciones y dispositivos para conseguir una liberación sostenida, son conocidas en la técnica.

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

10 La administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP de acuerdo con el uso de la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, de si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos por los facultativos expertos. La administración de un anticuerpo antagonista anti-CGRP puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en serie de dosis espaciadas, por ejemplo, o antes, o durante, o después del desarrollo de la cefalea en racimo; antes; durante; antes y después; durante y después; antes y durante; o antes, durante, y después de desarrollar la cefalea en racimo. La administración puede ser antes, durante, y/o después de cualquier evento que probablemente de lugar a la aparición de una cefalea en racimo.

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

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

45 Los liposomas que contienen anticuerpo antagonista anti-CGRP se preparan por métodos conocidos en la técnica, como los descritos en Epstein, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 82:3688 (1.985); Hwang, y col., Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU 77: 4030 (1.980); y Patente de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Se pueden generar liposomas particularmente útiles por el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

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

60 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o

'poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etilenvinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de sacarosa acetato, y ácido poli-D(-)-3-hidroxitútrico.

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

El diagnóstico o evaluación del dolor de cabeza están bien establecidos en la técnica. La evaluación puede realizarse en base a mediciones subjetivas, como la caracterización de los síntomas del paciente. Por ejemplo, la migraña puede diagnosticarse en base a los siguientes criterios: 1) Ataques episódicos de dolor de cabeza que duran de 4 a 72 horas; 2) con dos de los siguientes síntomas: dolor unilateral, punzante, que se agrava con el movimiento, y dolor de intensidad moderada o fuerte; y 3) uno de los siguientes síntomas: náusea o vómitos, y fotofobia o fonofobia. Goadsby y col., N. Engl. J. Med. 346:257-270, 2.002.

La eficacia del tratamiento puede evaluarse por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede evaluarse el alivio del dolor. En consecuencia, en algunas realizaciones, el alivio del dolor se observa subjetivamente después de 1, 2, o una pocas horas después de la administración de un anticuerpo anti-CGRP. En algunas realizaciones, la frecuencia de los ataques de dolor de cabeza se observa subjetivamente después de la administración de un anticuerpo anti-CGRP.

B. Anticuerpos antagonistas anti-CGRP

La invención se refiere al uso de un anticuerpo antagonista anti-CGRP, que se refiere a cualquier molécula de anticuerpo que bloquea, suprime o reduce (incluyendo significativamente) la actividad biológica del CGRP, incluyendo las rutas corriente abajo mediadas por la señalización del CGRP, tales como la unión al receptor y/o la provocación de una respuesta celular al CGRP.

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

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

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden englobar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción del anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo del dominio), anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, incluyendo las variantes de glucosilación de los anticuerpos, las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos, o los anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos, o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos y humanizados).

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es humano. En algunas realizaciones el anticuerpo antagonista anti-CGRP en el anticuerpo G1 (como se describe en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende una o más CDR(s) (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o , en algunas realizaciones las seis CDR) del anticuerpo G1 o variantes del G1 que se muestran en la Tabla 6. En otras realizaciones más, el anticuerpo antagonista anti-CGRP comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en la Figura 5 (SEC. ID 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 glucosilación unida a N. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glucosilación 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 glucosilación N de la región constante. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glucosilación unida a N. La región constante puede aglicosilarse por la glucosilación unida a N enzimáticamente o por expresión en una célula huésped con glucosilación 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.

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 biotilado (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.

Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP pueden hacerse por cualquier método conocido en la técnica. La vía y el calendario de inmunización del animal huésped se mantienen generalmente con técnicas convencionales establecidas para la estimulación y la producción de anticuerpos, como se describe con más detalle en el presente documento. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón son conocidas en la técnica y se describen en el presente documento.

Se contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo seres humanos o las células que producen anticuerpos de los mismos puedan manipularse para servir de base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero, incluyendo humanas. Típicamente, el animal huésped se inocula intraperitonealmente, intramuscularmente, oralmente, subcutáneamente, intraplantarente, y/o intradérmicamente con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en el presente documento.

Los hibridomas pueden prepararse a partir de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas usando la técnica de hibridación celular somática general de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497 o la

modificada por Buck, D. W., y col., *In Vitro*, 18:377-381 (1.982). Pueden usarse en la hibridación las líneas de mieloma disponibles, incluyendo pero no limitadas a la X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE.UU. Generalmente, la técnica implica fusionar las células de mieloma y células linfoides utilizando un fusógeno como el polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de crecimiento selectivo, como el medio hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Se pueden usar cualquier medio descrito en el presente documento, suplementado con o sin suero, para cultivar hibridomas que segreguen anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden usar células B inmortalizadas EBV para producir anticuerpos monoclonales anti-CGRP de la presente invención. Los hibridomas se expanden y subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se ensayan para actividad anti-inmunógena por procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, o inmunoensayo de fluorescencia).

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

20 Los hibridomas que producen tales anticuerpos pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo* utilizando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse del medio de cultivo o de fluidos corporales, por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales como precipitación en sulfato amónico, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía, y ultrafiltración, si se desea. Si hay una actividad no deseada, se puede eliminar, por ejemplo, pasando la preparación sobre adsorbentes hechos del inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados fuera del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un CGRP humano, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácido objetivo conjugado con una proteína que es inmunogénica en las especies a ser inmunizadas, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de la tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación mediante residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂ o R1 N=C=NR, donde R y R1 son grupos alquilo diferentes, pueden producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

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

45 Hay cuatro pasos generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estos son: (1) determinar el nucleótido y predecir la secuencia de aminoácidos de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir que región marco del anticuerpo se usará durante el proceso de humanización (3) las metodologías/técnicas actuales de humanización y (4) la transfección y la expresión del anticuerpo humanizado. Ver por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

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

5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la Publicación PCT N° WO 01/27160.

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

Como alternativa, los anticuerpos se pueden fabricar recombinantemente y expresarse utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos se pueden fabricar recombinantemente por tecnología de selección de fagos. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Winter y col., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455(1.994). Alternativamente, se puede utilizar la tecnología de selección de fagos (McCafferty y col., *Nature* 348:552-553 (1.990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de los repertorios genéticos de dominios variables (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco dentro de un gen de proteína de cubierta o mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como M13 o fd, y se seleccionan como fragmentos funcionales de anticuerpo sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. El fago seleccionado puede presentarse en una variedad de formatos; como revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1.993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos génicos-V para la selección de fagos. Clackson y col., *Nature* 352:624-628 (1.991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de los genes V de donantes humanos sin inmunizar y se pueden aislar los anticuerpos para una matriz diversa de antígenos (incluyendo los auto-antígenos) siguiendo las técnicas descritas por Mark y col., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1.991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12:725-734 (1.993). En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una alta velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una alta afinidad, y se replicarán y diferenciarán preferencialmente las células B que muestren inmunoglobulinas de superficie de alta afinidad durante el posterior desafío antigénico. Este proceso natural se puede imitar empleando la técnica conocida como "redistribución de cadena". Marks, y col., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1.992)). En este método, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por selección de fagos se pueden mejorar reemplazando secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera con repertorios de variantes de origen natural (repertorios) de genes del dominio V obtenidos de donantes sin inmunizar. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo pM-nM. Una estrategia para producir repertorios de anticuerpos por fagos muy grandes (también conocido como "la madre de todas las bibliotecas") ha sido descrita por Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1.993). La redistribución genética también se puede utilizar para derivar los anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, donde el anticuerpo humano tiene afinidades similares y especificidades para los anticuerpos de roedores de partida. De acuerdo con este método, que también se ha llamado "impronta de epítomos", los genes del dominio V de la cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenidos por la técnica de selección de fagos se reemplaza con un repertorio de genes del dominio V humano, que crean quimeras roedor-humano. La selección del antígeno da como resultando el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de unión al antígeno funcional, es decir, el epítipo que gobierna (imprenta) la elección del compañero. Cuando el proceso se repite para reemplazar el dominio V del roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase, la Publicación de PCT N° WO93/06213, publicada el 1 de abril de 1.993). A diferencia de la humanización tradicional de los anticuerpos de roedor por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos del marco o de CDR de origen roedor.

Es aparente que aunque la exposición anterior pertenece a anticuerpos humanizados, los principios generales expuestos son aplicables para personalizar anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Es aparente además que uno o más aspectos de humanizar un anticuerpo descritos en el presente documento pueden combinarse, por ejemplo, el injerto de CDR, la mutación del marco y la mutación de CDR.

Los anticuerpos pueden producirse recombinantemente aislando primero los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos de los animales huésped, obteniendo la secuencia genética, y utilizando la secuencia genética para expresar el anticuerpo recombinantemente en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro método que puede emplearse es expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han divulgado métodos para expresar anticuerpos recombinantemente en plantas o leche. Véase por ejemplo Peeters, y col. *Vaccine* 19:2756 (2.001); Lonberg, N. y D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65 (1.995); y Pollock, y col., *J Immunol Methods* 231:147(1.999). Los métodos para fabricar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc. son conocidos en la técnica.

También se pueden emplear inmunoensayos y técnicas de clasificación de citometría de flujo como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), para aislar anticuerpos que son específicos para CGRP.

Los anticuerpos se pueden unir a varios vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para su unión a anticuerpos, o serán capaces de confirmarlos, utilizando la experimentación rutinaria. En algunas realizaciones, el vehículo comprende una fracción que se dirige al miocardio.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencía fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión (como los vectores de expresión divulgados en la Publicación de PCT N° WO 87/04462), que son luego transfectados en las células huésped como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase por ejemplo la Publicación de PCT N° WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes humanos de cadena pesada y ligera en lugar de secuencias homólogas murinas, Morrison y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1.984), o por unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina en todo o en parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. De esta manera se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-CGRP del presente documento.

Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP pueden identificarse o caracterizarse utilizando métodos conocidos en la técnica, mediante los cuales se detecta y/o mide la reducción, mejoría, o neutralización de la actividad biológica de un CGRP. Por ejemplo, el anticuerpo antagonista anti-CGRP puede identificarse también incubando un agente candidato con CGRP y monitorizando una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unión a CGRP; (b) bloqueo de la unión del CGRP a su receptor(es); (c) bloqueo o disminución de la activación del receptor CGRP (incluyendo la actividad del cAMP); (d) inhibición de la actividad biológica de CGRP o las vías corriente abajo mediadas por la función de señalización del CGRP; (e) prevención, mejoría, o tratamiento de cualquier aspecto del dolor de cabeza (por ejemplo, migraña); (f) aumento de la depuración del CGRP; y (g) inhibición (reducción) de la síntesis, producción o liberación de CGR. En algunas realizaciones, se identifica un anticuerpo antagonista anti-CGRP incubando un agente candidato con CGRP y monitorizando la unión y/o la reducción o neutralización concomitantes de una actividad biológica del CGRP. El ensayo de unión se puede realizar con polipéptido(s) de CGRP purificados, o con células que expresan naturalmente, o transfectadas para que expresen, polipéptido(s) de CGRP. En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitivo, en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un antagonista anti-CGRP conocido para la unión con CGRP. El ensayo se puede realizar en varios formatos, incluyendo el formato ELISA. En otras realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-CGRP se identifica incubando un agente candidato con CGRP y monitorizando la unión y la inhibición concomitante de la activación del receptor CGRP expresado en la superficie de una célula.

Tras la identificación inicial, la actividad de un anticuerpo antagonista anti-CGRP candidato puede confirmarse y refinarse adicionalmente mediante bioensayos, conocidos para ensayar actividades biológicas dirigidas. Alternativamente, los bioensayos pueden utilizarse para seleccionar candidatos directamente. Por ejemplo, el CGRP promueve varios cambios medibles en células sensibles. Estos incluyen, pero sin limitación, estimulación del cAMP en la célula (por ejemplo, en células SK-N-MC). La actividad antagonista también puede medirse utilizando modelos animales, como la medición de la vasodilatación en la piel inducida por estimulación del nervio safeno de rata Escott y col., Br. J. Pharmacol. 110: 772-776, 1.993. Los modelos animales de dolores de cabeza (como, migraña) se pueden utilizar además para ensayar la eficacia de anticuerpos antagonistas o polipéptidos. Reuter, y col., Functional Neurology (15) Suppl.3, 2.000. Algunos de los métodos para identificar y caracterizar el anticuerpo antagonista anti-CGRP se describen en detalle en los Ejemplos.

Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP pueden caracterizarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método es identificar el epítipo al que se une, o "mapeado del epítipo". Hay muchos métodos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la localización de epítipos en las proteínas, incluyendo resolver la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos genéticos, y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1.999. En un ejemplo adicional, el mapeado del epítipo puede utilizarse para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo antagonista anti-CGRP. El mapeado de epítipos está disponible comercialmente de varias fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhartweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en un único tramo de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por la

interacción tridimensional de aminoácidos que puede no estar contenida necesariamente en un único tramo. Se pueden aislar o sintetizar (por ejemplo, recombinantemente) péptidos de longitudes variadas (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) y utilizarse para ensayos de unión con un anticuerpo antagonista anti-CGRP. En otro ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo antagonista anti-CGRP se puede determinar en un barrido sistemático utilizando péptidos que se solapan derivados de la secuencia de CGRP y determinando la unión por el anticuerpo antagonista anti-CGRP. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica el CGRP se fragmenta ya sea aleatoriamente o por construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de CGRP con el anticuerpo a ensayarse. Los fragmentos génicos pueden, por ejemplo, producirse por PCR y luego transcribirse y traducirse en la proteína in vitro, en presencia de aminoácidos radioactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos CGRP marcados con radioactividad se determina luego por inmunoprecipitación y electroforesis en gel. También pueden identificarse ciertos epítipos utilizando bibliotecas grandes de secuencias peptídicas representadas en la superficie de las partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Alternativamente, una biblioteca definida de fragmentos peptídicos que se solapan puede probarse para que unión al anticuerpo de ensayo en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, se pueden llevar a cabo mutagénesis de un dominio de unión al antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de exploración de alanina para identificar residuos requeridos, suficientes, y/o necesarios para la unión con el epítipo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominios se pueden realizar utilizando un CGRP mutante en el que varios fragmentos del polipéptido CGRP se han reemplazado (intercambiado) con secuencias de una proteína estrechamente relacionada, pero antigénicamente distinta (como otro miembro de la familia de las proteínas neurotrofinas). Evaluando la unión del anticuerpo al CGRP mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento CGRP en particular para la unión con el anticuerpo.

Otro método más que puede utilizarse para caracterizar un anticuerpo antagonista anti-CGRP es usar ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, varios fragmentos en el CGRP, para determinar si el anticuerpo antagonista anti-CGRP se une al mismo epítipo que otros anticuerpos. Los ensayos de competición son bien conocidos por los expertos en la técnica.

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

Esta invención engloba el uso de anticuerpo G1 y sus variantes mostradas en la Tabla 6.

Los anticuerpos antagonistas anti-CGRP se caracterizan por cualquiera (una o más) de las siguientes características: (a) se unen a CGRP; (b) bloquean la unión del CGRP a su receptor(es); (c) bloquean o disminuyen la activación del receptor CGRP (incluyendo la activación del cAMP); (d) inhiben la actividad biológica de CGRP o las vías corriente abajo mediadas por la función de señalización del CGRP; (e) previenen, mejoran, o tratan cualquier aspecto del dolor de cabeza (por ejemplo, migraña); (f) aumentan la depuración de CGRP; y (g) inhiben (reducen) la síntesis, producción o liberación de CGRP.

Pueden usarse en la invención cualquiera de los siguientes: (a) anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (b) un fragmento de una región del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (c) una cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (d) una cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (e) una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (f) una o más CDRs (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs) del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (g) la CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo G1; (h) la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (i) tres CDRs de la cadena ligera del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (j) tres CDRs de la cadena pesada del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; (k) tres CDRs de la cadena ligera y tres CDRs de la cadena pesada, del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6; y (l) un anticuerpo que comprende cualquiera de (b) hasta (k).

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

En algunas realizaciones, un anticuerpo útil en la invención comprende al menos una CDR, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o las seis CDRs que son sustancialmente idénticas a al menos una CDR, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o las seis CDRs de G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. Otras realizaciones incluyen anticuerpos que tienen al menos dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDRs que son sustancialmente idénticas a al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs del G1 o derivadas del G1. En algunas realizaciones, la al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs son por lo menos aproximadamente un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticas a por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs de G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. Se entiende que, para los propósitos de

esta invención, la especificidad de unión y/o la actividad total se retiene generalmente, aunque la extensión de la actividad puede variar en comparación con G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 (puede ser mayor o menor).

5 Un anticuerpo útil en la invención comprende una secuencia de aminoácidos del G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 que tiene cualquiera de lo siguiente: al menos 5 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 8 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de una secuencia de G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6, en donde al menos 3 de los aminoácidos son de una región variable de G1 (Figura 5) o sus variantes que se muestran en la Tabla 6. En una realización, la región variable es de una cadena ligera del G1. En otra realización la región variable es de una cadena pesada de G1. Un polipéptido ejemplar tiene aminoácidos contiguos (longitudes descritas anteriormente) de ambas regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de G1. En otra realización, los 5 (o más) aminoácidos contiguos son de una región determinante de la complementariedad (CDR) de G1 que se muestra en la Figura 5. En algunas realizaciones, los aminoácidos contiguos son de una región variable del G1.

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

Pueden usarse en esta invención fragmentos de la región variable de cadena ligera ("scFv") de anticuerpos como G1. Los fragmentos de la región variable de cadena sencilla se hacen uniendo regiones variables de 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.

También se engloban otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena de polipéptidos, pero usan un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (Véase, por ejemplo, Holliger, P., y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Por ejemplo, los anticuerpo biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, pueden prepararse utilizando los anticuerpos divulgados en el presente documento. Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh y col., 1.986, Methods in Enzymology 121:210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos estaba basada en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, con las dos cadenas pesadas teniendo especificidades diferentes (Millstein y Cuello, 1.983, Nature 3055, 537-539).

De acuerdo con un enfoque para hacer anticuerpos biespecíficos, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que tenga la región constante de la primera cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en las realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos

óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos de las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no tienen una significación particular.

5 En un enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas. Este enfoque se describe en la Publicación de PCT N° WO 94/04690, publicado el 3 de marzo, 1.994.

10 Los anticuerpos heteroconjugados, comprenden los dos anticuerpos unidos covalentemente, están también en el ámbito de la invención. Tales anticuerpos se han usado para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (publicación de solicitud de PCT N° WO 91/00360 y WO 92/200373; EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden elaborar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes y técnicas de reticulación adecuados, son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

15 También pueden prepararse anticuerpos quiméricos o híbridos in vitro utilizando métodos conocidos de química de proteínas sintética, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas de pueden utilizando una reacción de intercambio de disulfuros o por formación de un enlace de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato.

20 El anticuerpo humanizado que comprende una o más CDRs del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6, o una o más CDRs derivadas del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 puede hacerse utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar cuatro pasos generales para humanizar un anticuerpo monoclonal.

25 También pueden usarse modificaciones del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6, incluyendo los anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades y las variantes que tienen actividad y/o afinidad aumentada o disminuida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo G1 o sus variantes que se muestran en la Tabla 6 pueden mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión a CGRP deseada. La modificación de polipéptidos es de práctica rutinaria en la técnica y no necesita describirse con detalle en el presente documento. La modificación de polipéptidos se ejemplifica en los Ejemplos. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen los polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente perjudicialmente la actividad funcional, o el uso de análogos químicos.

30 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones del extremo amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como las inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N del anticuerpo fusionado a una etiqueta de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo con una enzima o un polipéptido que aumenta la vida media en el suero del anticuerpo.

35 Las variantes por sustitución tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminada y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluye las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones conservadoras". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe con más detalle a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y seleccionarse los productos.

55

60

65

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; He
Arg (R)	Lys	Lys; Gin; Asn
Asn (N)	Gin	Gin; His; Asp, Lis; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gin (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gin
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gin; Lys; Arg
He (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	He	Norleucina; lie; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gin; Asn
Met(M)	Leu	Leu; Phe; lie
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; He; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	He; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

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

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

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

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

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

una a tres sustituciones de aminoácidos conservadoras en un dominio CDR. En otras realizaciones más, el dominio CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Las modificaciones también incluyen los polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos con toras modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo, la glucosilación con diferentes azúcares, acetilación, y fosforilación. Los anticuerpos está glucosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1.997, Chem. Immunol. 65: 111- 128; Wright y Morrison, 1.997, TibTECH 15: 26- 32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de las proteínas (Boyd y col., 1.996, Mol. Immunol. 32: 1311- 1318; Wittwe y Howard, 1.990, Biochem. 29: 4175- 4180) y la interacción intramolecular entre las porciones de la glucoproteína que puede afectar la conformación y presentar la superficie tridimensional de la glucoproteína (Hefferis y Lund, supra; Wyss y Wagner, 1.996, Current Opin. Biotech. 7: 409-416). Los oligosacáridos pueden servir también como objetivo a una glucoproteína dada para ciertas moléculas en base a estructuras de reconocimiento específicas. También se ha informado que la glucosilación de anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se ha informado que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de β -(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNac bisecada, han mejorado la actividad ADCC (Umana y col., 1.999, Mature Biotech. 17: 176-180).

La glucosilación de anticuerpos es típicamente o N-ligada o O-ligada. N-ligada se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias del tripéptido asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina, y asparagina-X-cisteína, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación O-ligada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizarla 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina r.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia del aminoácido de tal manera que contiene una o más de las secuencias tripépticas descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación N-ligada). La alteración puede hacerse también mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glucosilación O-ligados).

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

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

Otros métodos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitadas a, medios enzimáticos, sustitución y quelación oxidativa. Se pueden utilizar modificaciones, por ejemplo, para la unión de marcadores para inmunoensayos. Los polipéptidos modificados G1 se fabrican utilizando procedimientos establecidos en la técnica y pueden seleccionarse utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los Ejemplos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, como una región constante que es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no inicia la lisis mediada por el complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), o no activa la microglía; o tiene actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en una cualquiera o más de las siguientes inicio de la lisis mediada por el complemento, estimulación de la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), o activación de la microglía. Las diferentes modificaciones de la región constante se pueden utilizar para alcanzar el nivel y/o la combinación de funciones efectoras óptimos. Véase, por ejemplo, Morgan y col., Immunology 86:319-324 (1.995); Lund y col., J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969 (1.996); Idusogie y col., J. Immunology 164: 4178-4184 (2.000); Tao y col., J. Immunology 143: 2595-2601 (1.989); y

Jefferis y col., *Immunological Reviews* 163: 59-76 (1.998). En algunas realizaciones, la región constantes se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol* (1999) 29: 2613-2624; Solicitud de PCT N° PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente UK N° 9809951.8. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG2 humana de cadena pesada que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo salvaje). *Eur. J. Immunol.* (1.999) 29:2613-2624. En otras realizaciones más, la región contante está aglicosilada por glucosilación N-ligada. En algunas realizaciones, la región constante está aglicosilada por glucosilación N-ligada mutando el residuo de aminoácido glucosilado o residuos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de la N-glucosilación en la región constante. Por ejemplo, el sitio de N-glucosilación puede estar mutado a A, Q, K o H. Véase, Tao y col., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); y Jefferis y col., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1.998). En algunas realizaciones la región constante está aglicosilada por glucosilación N-ligada. La región constante puede estar aglicosilada por glucosilación N-ligada enzimáticamente (como eliminación de carbohidratospor enzima PNGasa), o por expresión en una célula huésped deficiente en glucosilación.

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

También pueden usarse realizaciones maduras por afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos madurados por afinidad pueden producirse por procedimientos conocidos en la técnica (Marks y col., 1.992, *Bio/ Technology*, 10: 779- 783; Barbas y col., 1.994, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813; Schier y col., 1.995, *Gene*, 169: 147- 155; Yelton y col., 1.995, *J. Immunol.*, 155: 1.994-2.004; Jackson y col., 1.995, *J. Immunol.*, 154 (7): 3310- 9; Hawkins y col, 1.992, *J. Mol. Biol.*, 226:889- 896; y documento WO 2.004/058184).

Los siguientes métodos pueden utilizarse para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (como mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, como un anticuerpo, se denomina "biblioteca de selección de mutagénesis". Generalmente, la biblioteca de selección de mutagénesis trabaja de la siguiente manera. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se reemplazan con dos o más (como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) aminoácidos utilizando métodos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, uno por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). Generalmente la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), de cada librería se seleccionan para la afinidad de unión con el polipéptido objetivo (u otro objetivo de unión), y se identifican los candidatos con un aumento, el mismo, un descenso, o que no se unen. Los métodos para determinar la afinidad de unión son bien conocidos en la técnica. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el análisis de resonancia de plasmones de superficie Biacore, que detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente dos veces o más. El Biacore es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida se une ya con una afinidad relativamente alta, por ejemplo una K_D de aproximadamente 10 nM o menos. La selección utilizando resonancia de plasmones de superficie Biacore se describe en los Ejemplos, en el presente documento.

La afinidad de unión se puede determinar utilizando el Biocensor Kinexa, ensayos de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), inactivación de fluorescencia, transferencia de fluorescencia, y/o presentación de levaduras. La afinidad de unión también se puede seleccionar utilizando un bioensayo adecuado.

En algunas realizaciones, cada posición de aminoácidos en una CDR se reemplaza (en algunas realizaciones, una cada vez) con los 20 aminoácidos naturales utilizando métodos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en el presente documento). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones uno por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros (si los 20 aminoácidos se sustituyen en cada posición).

En algunas realizaciones, la biblioteca a explorar comprende sustituciones en dos o más posiciones, que puede estar en la misma CDR o en dos o más CDRs. Por tanto, la biblioteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La biblioteca puede comprender la sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDR. La biblioteca puede comprender una sustitución en 3, 4, 5, o más posiciones, dichas posiciones se encuentran en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs. La sustitución se puede preparar utilizando codones de baja

redundancia. Véase por ejemplo, la Tabla 2 de Balint y col., (1.993) Gene 137 (1): 109-18).

La CDR puede ser CDRH3 y/o CDRL3. La CDR puede ser una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, y/o CDRH3. La CDR puede ser un CDR Kabat, una CDR Chothia, o una CDR extendida.

Los candidatos con unión mejorada pueden secuenciarse, y de esta manera identificar un mutante de sustitución de CDR que da como resultado una afinidad mejorada (también denominada sustitución "aumentada"). Los candidatos que se unen también pueden secuenciarse, identificando de este modo una sustitución de CDR que retiene la unión.

Se pueden realizar varias rondas de exploración. Por ejemplo, los candidatos (que comprenden cada uno una sustitución de un aminoácido en una o más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contenga al menos el aminoácido original y el aminoácido sustituido en cada posición mejorada de la CDR (es decir, la posición de aminoácidos en la CDR en la cual una mutación de sustitución muestra unión mejorada). La preparación, y la exploración o selección de esta biblioteca se trata más adelante.

La biblioteca de selección de mutagénesis también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en la medida que la frecuencia de clones con unión mejorada, la misma unión, unión disminuida o la no unión también proporcionan información relativa a la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo si una posición de la CDR retiene la unión cuando se cambian los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición que es improbable que se requiera para la unión con el antígeno. Por el contrario, si la posición de la CDR retiene la unión solamente en un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como una posición que es importante para la función de la CDR. Por tanto, los métodos de exploración de la biblioteca de mutagénesis generan información referente a las posiciones en las CDRs que pueden cambiarse con muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos), y las posiciones en las CDRs que no se pueden cambiar o las que solo pueden cambiarse en unos pocos aminoácidos.

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

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

También son útiles en la invención proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos (como G1). En una realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región variable de cadena ligera que se muestra en la SEC. ID N°: 2 (Figura 5) y/o al menos 10 aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en la SEC. ID N°:1 (Figura 5). En otras realizaciones, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de cadena ligera que se muestra en la SEC. ID N°:2 (Figura 5) y/o al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de cadena pesada que se muestra en la SEC. ID N°:1 (Figura 5). En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada de G1 como se muestra en SEC. ID N°: 2 y SEC. ID N°:1 de la Figura 5. En otra realización el polipéptido de fusión comprende una o más CDR(s) de G1. En otras realizaciones más, el polipéptido de fusión comprende la CDR H3 y/o CDR L3 del anticuerpo G1. Para los propósitos de esta invención, una proteína de fusión G1 contiene uno o más anticuerpos G1 y otra secuencia de aminoácidos a la que no está unida la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Las secuencias heterólogas ejemplares incluyen pero no están limitadas a "marca" tal como una marca de señal y una marca 6His. Las marcas se conocen bien en la técnica.

Un polipéptido de fusión G1 se puede crear por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, sintética o recombinantemente. Típicamente, las proteínas de fusión G1 se fabrican preparando un polinucleótido de expresión que los codifica utilizando métodos recombinantes descritos en el presente documento, aunque también pueden prepararse por otros medios conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, síntesis química.

Ejemplos

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

Generación de anticuerpos anti-CGRP. Para generar anticuerpos anti-CGRP que tengan reactividad cruzada entre especies, para CGRP de rata y humano, se inmunizaron ratones con 25-100 μ 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 día, 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.

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.

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.

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.

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).

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 fabricantes, 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.

Mapeado 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 biotilados 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)	SGGVVKNNFVPTNVGSMFAF	21
K35Q (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSQAF	22
F37A (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSKAA	23
25-38A	NNFVPTNVGSKAFA	24
25-37	NNFVPTNVGSKAF	25
F27A (25-37)	NNAVPTNVGSKAF	26
V28A (25-37)	NNFAPTNVGSKAF	27
P29A (25-37)	NNFVATNVGSKAF	28
T30A (25-37)	NNFVPANVGSKAF	29
N31A(25-37)	NNFVPTAVGSKAF	30
V32A (25-37)	NNFVPTNAGSKAF	31
G33A (25-37)	NNFVPTNVASKAF	32
S34A (25-37)	NNFVPTNVGAKAF	33
F37A (25-37)	NNFVPTNVGSKAA	34
26-37	NFVPTNVGSKAF	35
19-37-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKAF	36
19-36-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKA	37
1-36-COOH	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)	ACNTATCVTHRLAGLLSRGGMVKSNFVPTNVGSKAF	43
Calcitonina Humana (1-32)	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHFTFPQTAIGVGAP	45
Amilina Humana (1-37)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNGAILSSSTNVGSNTY	46
Adrenomedulina Humana (1-52)	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY	47

45 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.

50 Actividad antagonista medida por el ensayo cAMP. Se dispensaron cinco microlitros de α -CGRP humano o de rata (a una concentración final de 50 nM) en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-CGRP (a una concentración final de 1 – 3000 nM), o un α -CGRP de rata o un α -CGRP humano (a una concentración final de 0,1 nM – 10 μ M; como control positivo para la activación d c-AMP) en una placa de 384 pocillos (Nunc, N^o 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.

60 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 CI_{50} del anticuerpo anti-CGRP en el bloqueo del CGRP de la unión al receptor como se describió anteriormente. Zimmermann y col., Peptides 16: 421-4, 1.995; Mallee y col., J. Biol. Chem. 277: 14294- 8, 2.002. Se incubaron membranas (25 μ g) de células SK-N-MC durante 90 minutos a temperatura ambiente en un tampón de incubación (Tris-HCL 50 mM, pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, 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 (CI_{50}) los anticuerpos o el CGRP sin marcar (como un control), desde una solución 100 veces más alta que la solución madre se disolvieron a concentraciones variables en el tampón de incubación y se incubaron al mismo tiempo con las membranas y 10 pM de α -CGRP [¹²⁵I] humano. Se terminó la incubación por filtración a través de un filtro de microfibras de cristal (GF/B, Vm) que había sido bloqueado con polietilenimina al 0,5%. Se dibujaron las curvas de respuesta a las dosis y K ; se determinaron los valores utilizando la ecuación: $Ki = CI_{50} / (1 + ([ligando]/K_D))$; 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 $B_{m\acute{a}x} = 0,025$ pmol/mg de proteína. El valor informado de CI_{50} (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 CI_{50} de los anticuerpos murinos 7E9, 8B6, 6H2 y 4901. Los datos indican que la afinidad de los anticuerpos generalmente se correlaciona con la CI_{50} : los anticuerpos con mayor afinidad (valores de K_D más bajos) tienen una CI_{50} 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 isoflurano 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 μ l). Tan y col., Clin. Sci. 89:656-73, 1.995. Los anticuerpos se dieron en distintas dosis (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, y 25 mg/kg).

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 cambio en el tiempo) para cada respuesta de flujo a la estimulación por pulsos eléctricos. Se tomó el promedio de la respuesta al flujo sanguíneo de dos estimulaciones. Los animales se mantuvieron bajo anestesia por un periodo de una a tres horas.

Como se muestra en la Figura 2 A y en la Figura 2B, el incremento de flujo sanguíneo estimulado por la aplicación de 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 cambio en el tiempo) para cada respuesta de flujo a las estimulaciones por pulsos eléctricos.

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

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

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

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

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

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

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

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

El vector pDb.CGRP.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 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 (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 μ M-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 μ l/min y se permitieron tiempos de disociación de al menos 10 minutos. Después de cada ciclo de unión, las superficies se regeneraron con NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v, que era tolerado 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 α -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 μ l/min y permitiendo solamente una fase de disociación de 30 seg. La constante de la tasa de disociación (k_{off}) se determinó inyectando tres concentraciones (alta, media y baja) de las mismas series de titulación por duplicado durante 30 seg y permitiendo una fase de disociación de 2 horas. La afinidad (K_D) de cada interacción se obtuvo combinando los valores de k_{on} and k_{off} obtenidos en ambos tipos de experimentos, como se muestra en la Tabla 5.

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 μ l/min. El fragmento Fab del anticuerpo G1 a una concentración constante de 5 nM (teniendo como objetivo estar en o por debajo de la K_D esperada de la interacción basada en la solución) se preincubó con un péptido de competencia, o bien α -CGRP de rata o F37A (19-37) α -CGRP humano, a concentraciones finales que oscilaban entre 1 nM a 1 μ M en diluciones seriadas de 3 veces. Las soluciones de Fab del anticuerpo G1 en ausencia o presencia del péptido de competencia basado en la solución, se inyectaron a través del CGRP en el chip y se controlaron las respuestas de depleción de unión detectadas en la superficie del chip como resultado de la solución de competición. Estas respuestas de unión se convirtieron a "concentraciones libres de Fab" utilizando una curva de calibración, que se construyó por titulación del Fab del anticuerpo G1 solo (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,325 y 0 nM) a través del CGRP del chip. Las "concentraciones libres de Fab" se dibujaron contra la concentración del péptido basado en la solución de competición utilizado para generar cada punto de dato y ajustar a un modelo de afinidad de la solución utilizando el software Biaevaluation. Las afinidades de la solución determinadas (indirectamente) de esta manera se muestran en 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.

ES 2 664 854 T3

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 2 664 854 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)
M21	R28W			L99S	6,95X10 ⁻⁴	15,2	1,42X10 ⁻⁴	1,23
M22	R28W			L99T	1,10X10 ⁻³	61,1	1,16X10 ⁻⁴	0,73
M23	R28G			L99T A100V	7,99X10 ⁻⁴	44,4	1,30X10 ⁻⁴	0,81
M24	R28L			L99T A100V	1,04X10 ⁻³	57,8	1,48X10 ⁻⁴	0,93
M25	R28N			L99T A100V	1,4x10 ⁻³	Z6	1,4x10 ⁻⁴	13
M26	R28N		A57G	L99T A100V	9,24X10 ⁻⁴	51,3	1,48X10 ⁻⁴	0,93
M27	R28N T30A			L99T A100V	3,41X10 ⁻³	189,4	3,57X10 ⁻⁴	2,23
M28	R28N T30D		E54R A57N	L99T A100V	1,25X10 ⁻³	69,4	9,96X10 ⁻⁵	0,62
M29	R28N T30G			L99T A100V	3,59X10 ⁻³	199,4	3,80X10 ⁻⁴	2,38
M30	R28N T30G		E54K A57E	L99T A100V	6,38x10 ⁻³	354,4	5,90x10 ⁻⁴	3,69
M31	R28N T30G		E54K A57G	L99T A100V	3,61X10 ⁻³	200,6	3,47X10 ⁻⁴	2,17
M32	R28N T30G		E54K A57H	L99T A100V	2,96X10 ⁻³	164,4	2,71 X10 ⁻⁴	1,69
M33	R28N T30G		E54K A57N S58G	L99T A100V	9,22x10 ⁻³	512,2	7,50X10 ⁻⁴	4,69
M34	R28N T30G		E54K A57N S58T	L99T A100V	2,17X10 ⁻³	120,6	6,46X10 ⁻⁴	4,04
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 2 664 854 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)
M42	R28N	G50A L56T	E54K A57N H61F	L99T A100V	7,52X10 ⁻³	417,8	4,17X10 ⁻⁴	2,61
M43	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58C	L99T A100V	4,53X10 ⁻³	251,7	2,63X10 ⁻⁴	1,64
M44	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	6,13X10 ⁻³	443	2,10X10 ⁻⁴	2,05
M45	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	5,58x10 ⁻³	259	2,11x10 ⁻⁴	1,85
			E64D					
M46	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E H61F	L99T A100V	2,94X10 ⁻³	163,3	5,39X10 ⁻⁴	3,37
M47	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58G	L99T A100V	8,23X10 ⁻³	457,2	3,32X10 ⁻⁴	2,08
M48	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58L	L99T A100V	0,0343	1905,6	8,42X10 ⁻⁴	5,26
M49	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58Y H61F	L99T A100V	0,0148	822,2	5,95X10 ⁻⁴	3,72
M50	R28N	G50A L56T	E54K A57R	L99T A100V	5,30X10 ⁻³	294,4	4,06X10 ⁻⁴	2,54
M51	R28N	L56I	E54K A57G	L99T A100V	1,18X10 ⁻³	65,6	1,31X10 ⁻⁴	0,82
M52	R28N	L56I	E54K A57N S58A	L99T A100V	2,29X10 ⁻³	127,2	2,81 X10 ⁻⁴	1,76
M53	R28N	L56I	E54K A57N S58G	L99T A100V	1,91X10 ⁻³	106,1	3,74X10 ⁻⁴	2,34
M54	R28N T30A	G50A	E54K A57N S58P	L99T A100V	2,16x10 ⁻³	120,0	1,79x10 ⁻³	11,19
M55	R28N T30A	L56S	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	5,85X10 ⁻³	325,0	4,78X10 ⁻⁴	2,99
M56	R28N T30D	L56S	E54K A57N H61F	L99T A100V	9,35X10 ⁻³	519,4	4,79X10 ⁻⁴	2,99
M57	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	0,0104	1,200	3,22 X10 ⁻⁴	3,08
M58	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58I H61F	L99T A100V	Sin unión	n.d.	1,95X10 ⁻³	12,19
M59	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58N H61F	L99T A100V	0,0123	683,3	5,24X10 ⁻⁴	3,28

ES 2 664 854 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)
M60	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58R H61F	L99T A100V	0,0272	1511,1	9,11X10 ⁻⁴	5,69
M61	R28N T30G	A51H	E54Q A57N H61F	L99T A100V	5,21X10 ⁻³	289,4	4,59X10 ⁻⁴	2,87
M62	R28N T30G	A51H L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	5,75X10 ⁻³	242	5,57X10 ⁻⁴	5,86
M63	R28N	G50A	E54K	L99T	2,65X10 ⁻³	147,2	1,50X10 ⁻³	9,38
	T30G		A57N S58T	A100V				
M64	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58V	L99T A100V	0,0234	1300,0	1,32X10 ⁻³	8,25
M65	R28N T30G	G50A L56I	E54K A57C	L99T A100V	4,07X10 ⁻³	226,1	8,03X10 ⁻⁴	5,02
M66	R28N T30G	L56I	E54K A57E	L99T A100V	5,11x10 ⁻³	283,9	5,20x10 ⁻⁴	3,25
M67	R28N T30G	L56I	E54K A57F	L99T A100V	1,71X10 ⁻³	95,0	8,20X10 ⁻⁴	5,13
M68	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58D E64D	L99T A100V	6,76X10 ⁻³	375,6	4,28X10 ⁻⁴	2,68
M69	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58E	L99T A100V	1,81X10 ⁻³	100,6	7,33X10 ⁻⁴	4,58
M70	R28N T30G	L56I	E54K A57S	L99T A100V	6,07X10 ⁻³	337,2	5,59x10 ⁻⁴	3,49
M71	R28N T30G	L56I	E54K A57Y	L99T A100V	2,12X10 ⁻³	117,8	1,28X10 ⁻³	8,00
M72	R28N T30G	L56S	E54K	L99T A100V	3,95X10 ⁻³	219,4	4,00X10 ⁻⁴	2,50
M73	R28N T30G	L56S	E54K A57N S58Y E64D	L99T A100V	3,00X10 ⁻³	166,7	2,55X10 ⁻⁴	1,59
M74	R28N T30G	L56S	E54K A57S	L99T A100V	6,03x10 ⁻³	335,0	5,97X10 ⁻⁴	3,73
M75	R28N T30G	L56S	E54K A57V	L99T A100V	1,87X10 ⁻²	1038,9	1,16X10 ⁻³	7,25
M76	R28N T30S	G50A L56T	A57G	L99T A100V	1,16X10 ⁻³	64,4	3,64X10 ⁻⁴	2,28
M77	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57D	L99T A100V	0,0143	794,4	4,77X10 ⁻⁴	2,98
M78	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57N S58T	L99T A100V	0,167	9277,8	1,31X10 ⁻³	8,19
M79	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57P	L99T A100V	0,19	10555,6	1,29X10 ⁻³	8,06

(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 isoflurano. 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 dejaran reposar no menos de 45 minutos, se estimuló la duramadre eléctricamente a intervalos de 30 minutos. Las estimulaciones fueron a 2,5V, 5V, 10V, 15V, y 20V, todas a 10 Hz, pulsos con una fr 0,5 ms, durante 30 segundos.

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

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 32:1957-1966 (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.

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 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):

Material	Anticuerpo N°	N° 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

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).

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)

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 reemplazados inmediatamente a la notificación con otro igual. La disponibilidad del material depositado no constituye una licencia de práctica de la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Secuencias de anticuerpos

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYAEAVKG
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGLTVTVSS

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTDF
TLTISSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIK

10

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

GFTFSNYWIS

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

EIRSESDASATHYAEAVKG

CDR H3 de G1 (SEC ID N°: 5)

20 YFDYGLAIQNY

CDR L1 de G1 (SEC ID N°: 6)

KASKRVTTYVS

25

CDR L2 de G1 (SEC ID N°: 7)

GASNRYL

30 CDR L3 de G1 (SEC ID N°: 8)

SQSYNYPYT

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

35

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCTGCGTCTGTCCTGC
GCTGCTTCCGGTTTCACCTTCTCCAACACTGGATCTCCTGGGTTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGCTC
40 GGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAAA
GGTCGTTTCACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTG
CTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTACTGG
45 GGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCC

45

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

50

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACGTGCTACCCTGTCCTGC
AAAGCTTCCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTG
CTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCCGGTTCCGGTACCG
55 ACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTCAGTCCTAGAA
CTACCCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAAATCAAA

55

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)

60

65

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASATHYAEAVKGR
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKTKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTD
FTLTISLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
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
TGGAAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCGAATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAA
AGGTCGTTTACCATCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGT
GCTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTATCCAGAACTACTG
GGTTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCTCCGCTCCACCAAGGGCCCATCTGTCTTCCCACTGGC
CCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
AGAACCTGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGT
CCTGCAGTCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAGCAACTTCGGCAC
CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAG
AAAGTGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCTGTTC
CCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCCAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTG
CACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGC
ATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCCCCA
TCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGATTCTATCCATCCG
ACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAACAATAAGACCACCCCTCCAATGC
TGGACTCCGACGGATCCTTCTTCCCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGG
AAACGTGTTCTTGTTCCTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGCCTGTCC
CTGTCTCCAGGAAAGTAA

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

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCAGGTGAACGTGCTACCCTGTCCT
 GCAAAGCTTCCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCG
 5 TCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCCGGTTCC
 GGTACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTC
 AGTCCTACAACCTACCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAAGTGGAAATCAAACGCACTGTGGCTGC
 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-
 ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (α -CGRP humano) NH₂-ACNTATCVTHRLAGLLS-
 RSGGMVKS NFVPTNVGSKAF-CONH₂ (β -CGRP humano) NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVG-
 SEAF-CONH₂ (α -CGRP de rata) NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (β -CGRP de
 25 rata)

Realizaciones numeradas

30 1. Un anticuerpo con una afinidad de unión (K_D) con α -CGRP humano de 50 nM o menos como se mide por
 resonancia de plasmones de superficie a 37° C.

35 2. El anticuerpo de acuerdo con la realización numerada 1, que comprende un dominio de V_H que es por lo menos
 un 90% idéntica en la secuencia de aminoácidos a la SEC ID N°: 1.

40 3. El anticuerpo de acuerdo con la realización numerada 2, en donde el residuo de aminoácidos en la posición 99 de
 la SEC ID N°: 1 es L o está sustituido por A, N, S, T, V o R, y en donde el residuo de aminoácidos en la posición 100
 de la SEC ID N°: 1 es A, o está sustituido por L, R, S, V, Y, C G, T, K o P.

45 4. El anticuerpo de acuerdo con la realización numerada 1, que comprende un dominio de V_L que por lo menos un
 90% idéntica en la secuencia de aminoácidos a la SEC ID N°: 2.

50 5. El anticuerpo de acuerdo con la realización numerada 1, que comprende por lo menos una CDR selecciona del
 grupo que consiste de:

- a. CDR H1 como se expone en la SEC ID N°:3;
- b. CDR H2 como se expone en la SEC ID N°:4;
- c. CDR H3 como se expone en la SEC ID N°:5;
- d. CDR L1 como se expone en la SEC ID N°:6;
- e. CDR L2 como se expone en la SEC ID N°:7;
- f. CDR L3 como se expone en la SEC ID N°:7; y
- g. variantes de L1, L2 y H2 como se muestra en la Tabla 6.

55 6. El anticuerpo de acuerdo con la realización numerada 1, que comprende:

- a. Una V_H CDR3 como se expone en la SEC ID N°: 5, o una secuencia que difiere de la SEC ID N°:5 por 1 ó 2
 sustituciones de aminoácidos conservadoras; y
- b. Una V_L CDR3 como se expone en la SEC ID N°: 8, o una secuencia que difiere de la SEC ID N°:8 por 1 ó 2
 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

60 7. Un anticuerpo que comprende un dominio de V_H que es por lo menos un 90% idéntico en la secuencia de
 aminoácidos a la SEC ID N°: 1 y un dominio de V_L que es por lo menos un 90% idéntico en la secuencia de
 aminoácidos a la SEC ID N°:2.

65 8. El anticuerpo de la realización numerada 7, en donde el anticuerpo es una molécula de IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD,
 o está derivado de las mismas.

9. El anticuerpo de acuerdo con la realización numerada 7, que comprende una cadena pesada producida por el vector de expresión con el N° de registro ATCC PTA-6867.

5 10. El anticuerpo de acuerdo con la realización numerada 7, que comprende una cadena ligera producida por el vector de expresión con el N° de registro ATCC PTA-6866.

11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la realización numerada 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 12. Un método para prevenir o tratar por lo meno sun síntoma vasomotor en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CGRP.

15 13. El método de acuerdo con la realización numerada 12, donde dicho síntoma vasomotor es una migraña con o sin aura, migraña hemipléjica, cefalea en racimos, neuralgia migrañosa, cefalea crónica, o cefalea por tensión.

14. El método de acuerdo con la realización numerada 12, donde dicho síntoma vasomotor es sofoco.

20 15. El método de acuerdo con la realización numerada 12, donde el anticuerpo antagonista anti-CGRP es cualquiera de los anticuerpos descritos en las realizaciones numeradas 1 a 10.

16. El método de acuerdo con la realización numerada 12, donde el anticuerpo antagonista anti-CGRP es el anticuerpo producido por los vectores de expresión con N° de registro ATCC PTA-6867 y PTA-6866.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Labrys Biologics Inc.

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

30 <130> P067921EP

<140> US 60/736623

<141> 2005-11-14

35 <150> PCT/IB2006/003181

<151> 2006-11-02

<150> EP-11166787.9

40 <151> 2006-11-02

<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 2 664 854 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
 30 Tyr Cys Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr Trp
 35 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <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
 70 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995
 <210> 3

ES 2 664 854 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

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

40 <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 2 664 854 T3

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

<400> 11

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

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

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

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

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

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

25 Tyr Cys Leu Ala Tyr Phe Asp Tyr Gly Leu Ala Ile Gln Asn Tyr Trp

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 664 854 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 2 664 854 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 2 664 854 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 gcttccaacc gttacctcg tatcccagct 180
 cgtttctccg gttccgggtc cggtagcgac ttcacctga ccatctctc cctggaacct 240
 gaagacttcg ctgtttacta ctgcagtcag tctacaact accctacac cttcggctcag 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 2 664 854 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
15 <220>
<223> Fragmento, variante de alfa-CGRP humano

<400> 21

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

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

<400> 24

65

ES 2 664 854 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 2 664 854 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

<210> 32

<211> 13

35 <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 2 664 854 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 2 664 854 T3

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

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

10 Gly Ser Lys Ala
35

<210> 39
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

20 <400> 39

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

25 Ser Arg Ser

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

35 <400> 40

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

<210> 41
<211> 37
<212> PRT
<213> Rata

45 <400> 41

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

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

Gly Ser Glu Ala Phe
35

60 <210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Fragmento de alfa-CGRP de rata

ES 2 664 854 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 2 664 854 T3

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

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

10 Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 47
<211> 52
<212> PRT
15 <213> Humana

<400> 47

20 Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
1 5 10 15

25 Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
20 25 30

30 Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
35 40 45

35 Pro Gln Gly Tyr
50

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo antagonista anti-CGRP para su uso en la prevención o tratamiento de cefalea en racimos.
- 5 2. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo tiene una afinidad de unión (K_D) a α -CGRP humano de 50 nM o menos como se mide por resonancia de plasmones de superficie a 37 °C.
- 10 4. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se une a (a) el fragmento del extremo C que tiene los aminoácidos 25-37 del CGRP o (b) un epítipo del extremo C dentro de los aminoácidos 25-37 del CGRP.
- 15 5. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo tienen una región constante de la cadena pesada de IgG.
- 20 6. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo tiene una región constante de la cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 25 7. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo es: (a) un anticuerpo que tiene una CDR H1 como se expone en la SEC ID N°:3, una CDR H2 como se expone en la SEC ID N°:4; una CDR H3 como se expone en la SEC ID N°:5, una CDR L1 como se expone en la SEC ID N°:6, una CDR L2 como se expone en la SEC ID N°:7; y una CDR L3 como se expone en la SEC ID N°:8; o (b) una variante de un anticuerpo de (a) como se muestra en la Tabla 6.
- 30 8. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo comprende un dominio de V_H que es por lo menos un 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC ID N°:1 y un dominio de V_L que es por lo menos un 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la SEC ID N°:2, por ejemplo, en donde el anticuerpo comprende un dominio de V_H de la SEC ID N°:1 y un dominio de V_L de la SEC ID N°:2.
- 35 9. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera producida por el vector de expresión con el N° de registro ATCC PTA-6866 y/o una cadena pesada producida por el vector de expresión con el N° de registro ATCC N° PTA-6867.
- 40 10. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo bloquea o disminuye la activación del receptor de CGRP (incluyendo la activación de cAMP).
- 45 11. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra por inyección; por ejemplo, intraperitonealmente, intravenosamente, subcutáneamente, o intramuscularmente.
- 50 12. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra de 1 a 4 veces a la semana.
- 55 13. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra a una dosificación diaria de 3 μ g/kg a 100 mg/kg.
- 60 14. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra a aproximadamente 2 mg/kg.
- 65 15. El anticuerpo antagonista anti-CGRP para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra a un humano.
16. El uso de un anticuerpo antagonista anti-CGRP en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de cefalea en racimos.

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

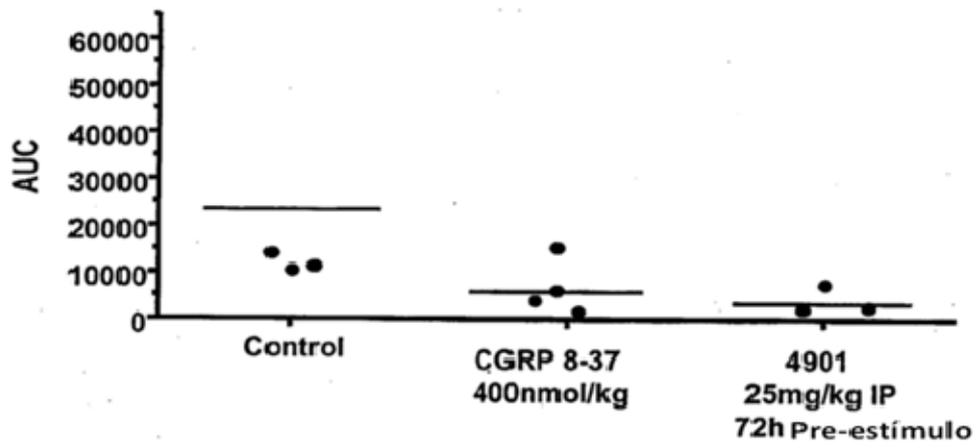


Figura 3

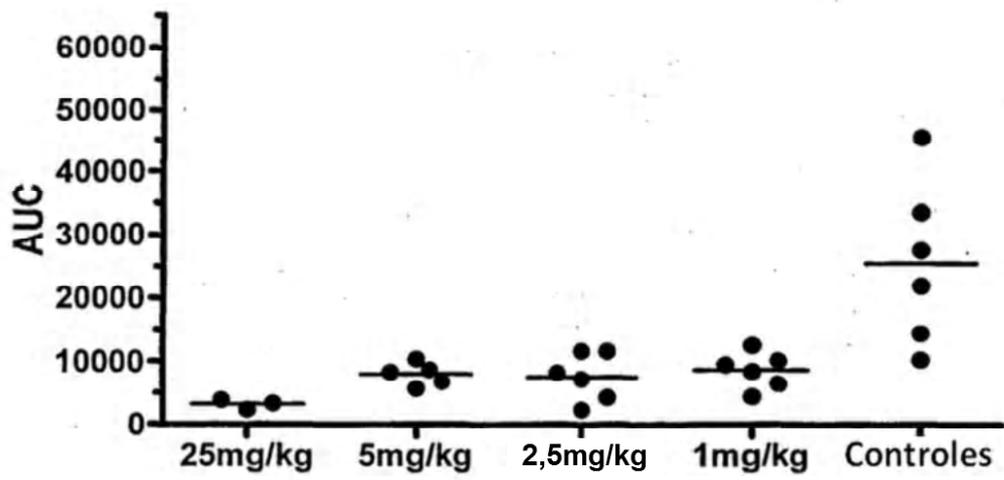


Figura 4A

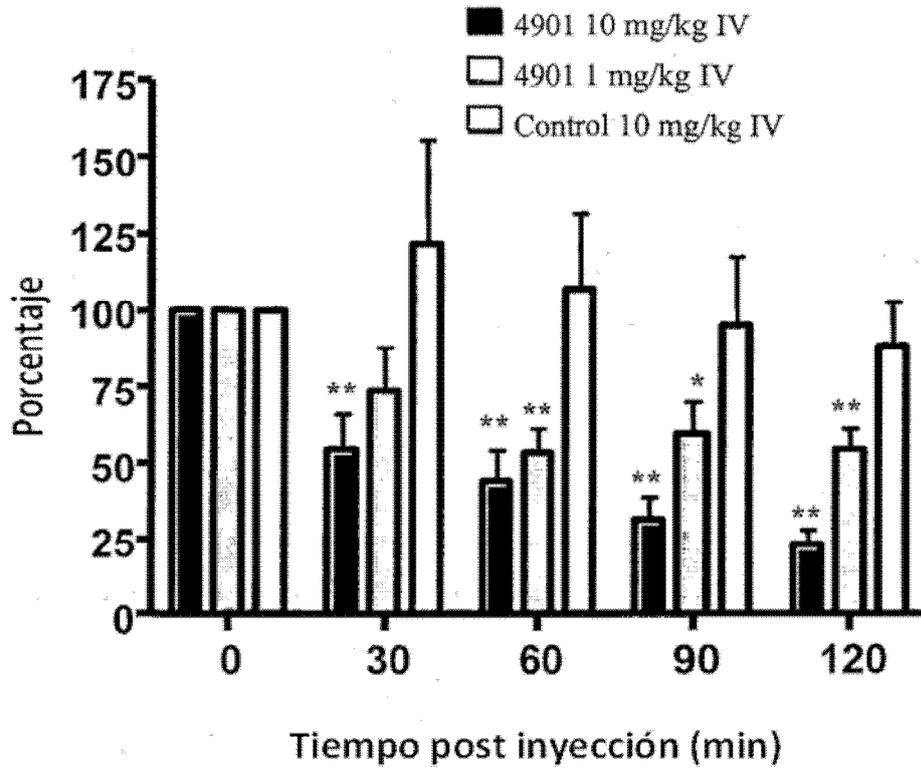


Figura 4B

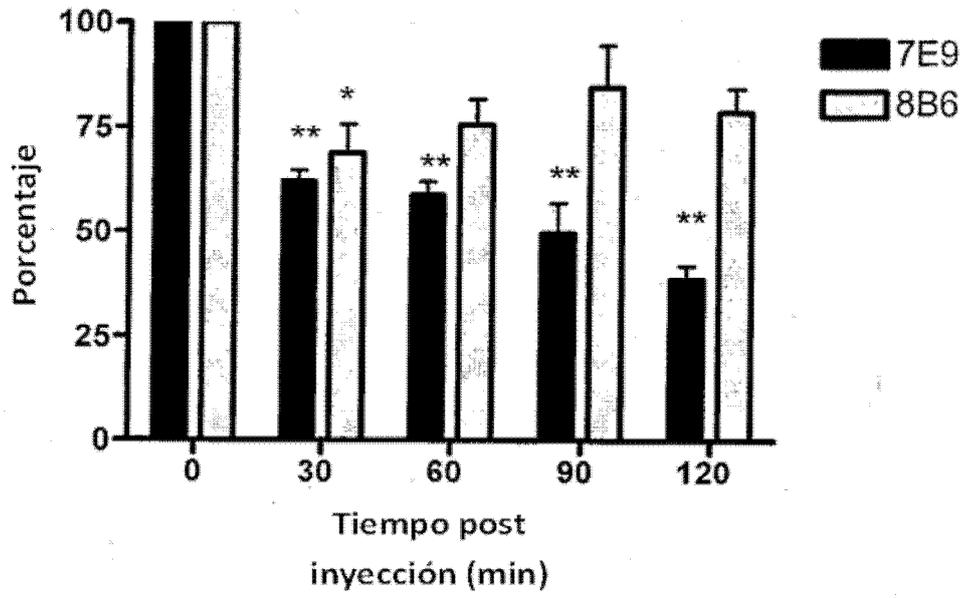


Figura 5

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
S S
    
```

Cadena ligera G1

```

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

Figura 6

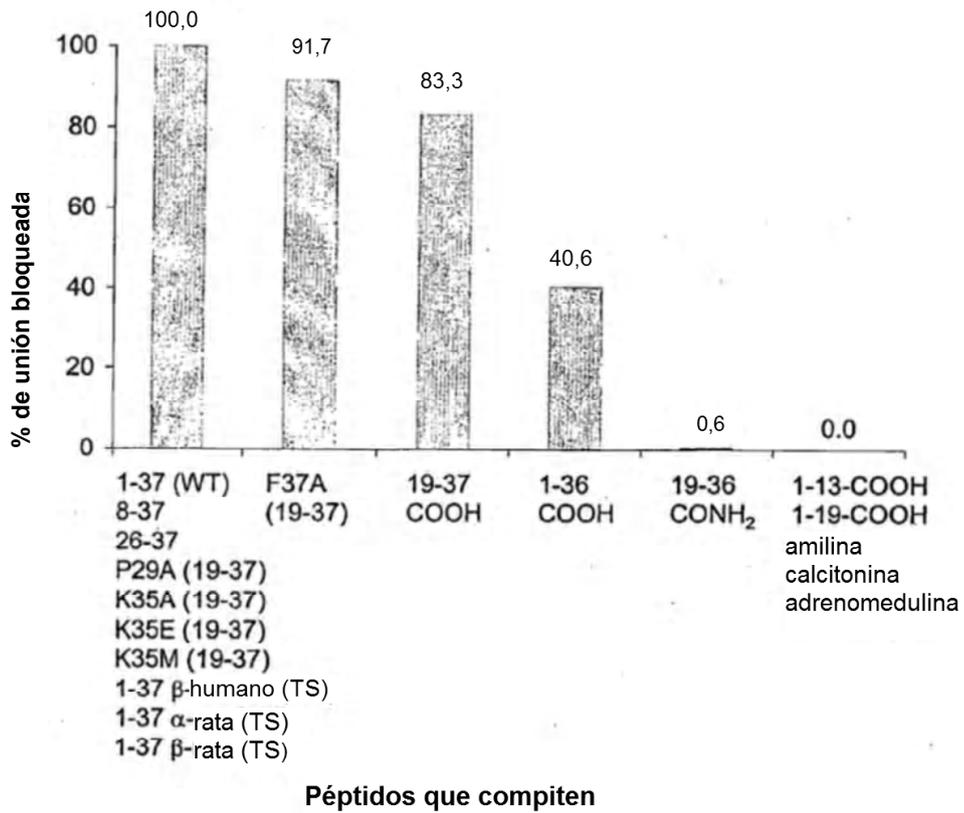


Figura 7

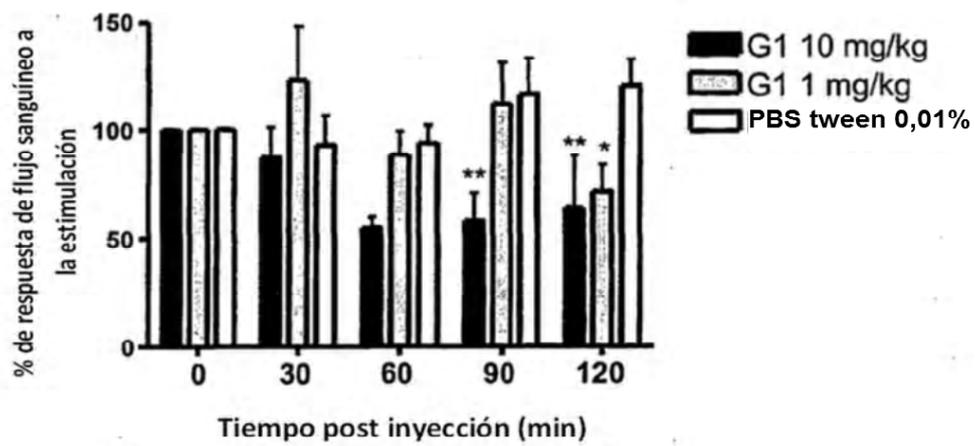


Figura 8A

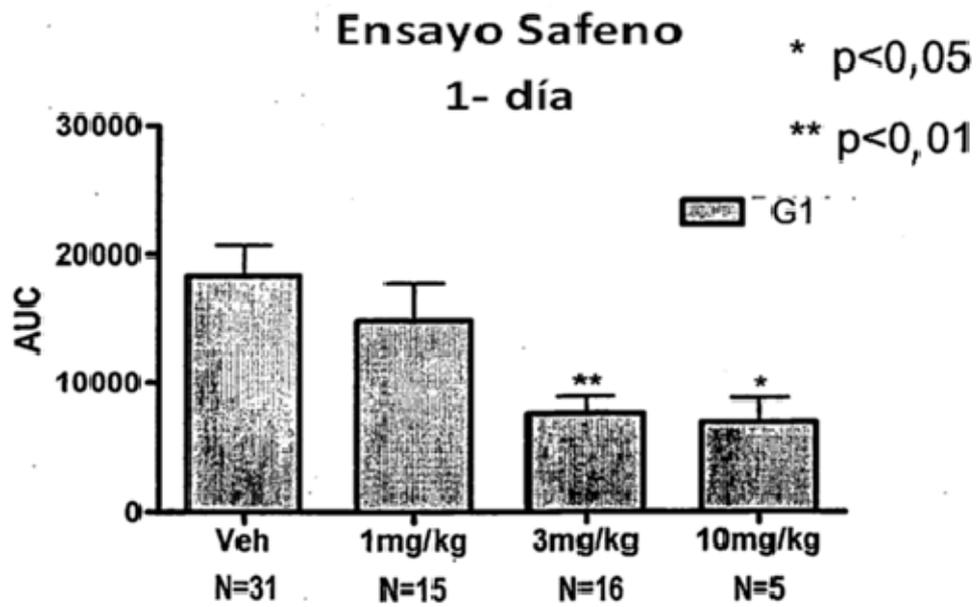


Figura 8B

Ensayo Safeno 7- días

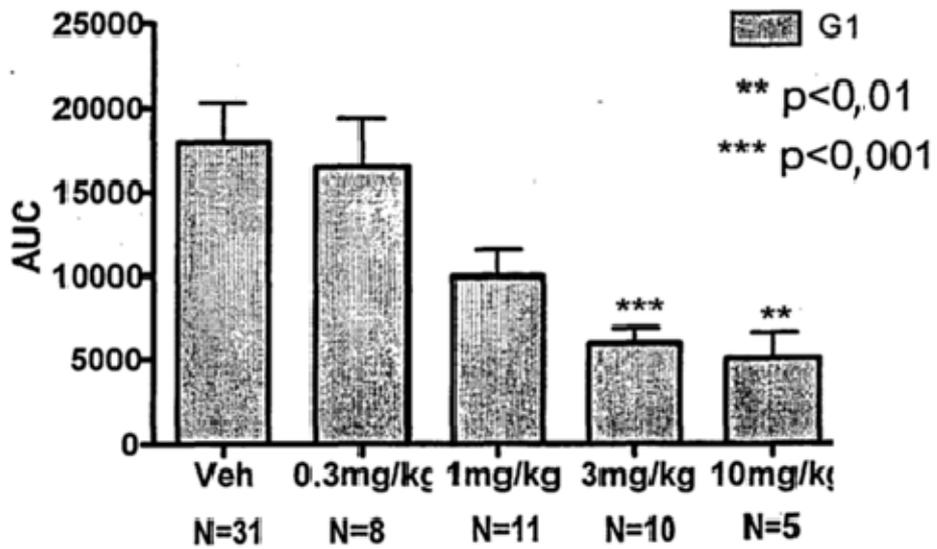


Figura 8C

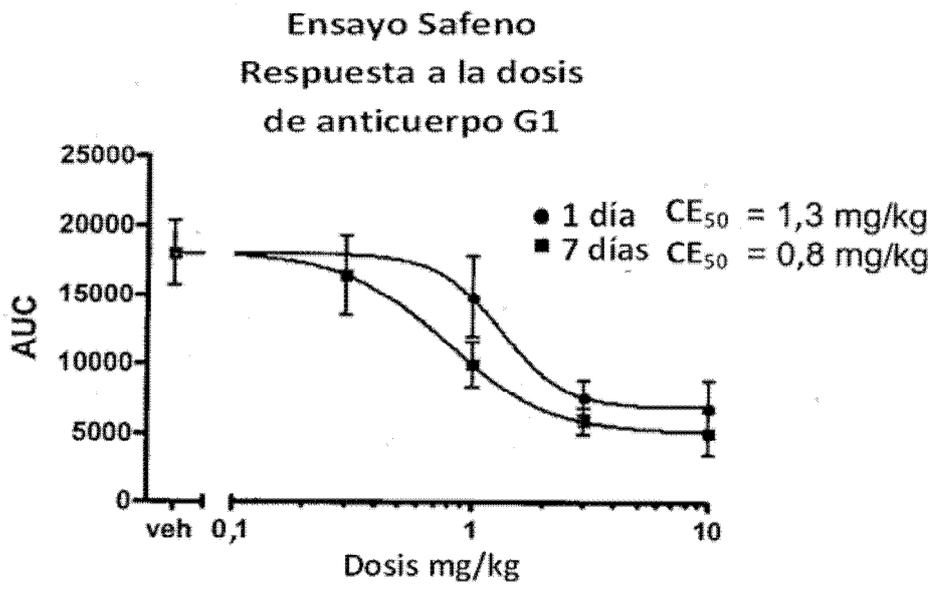


Figura 9

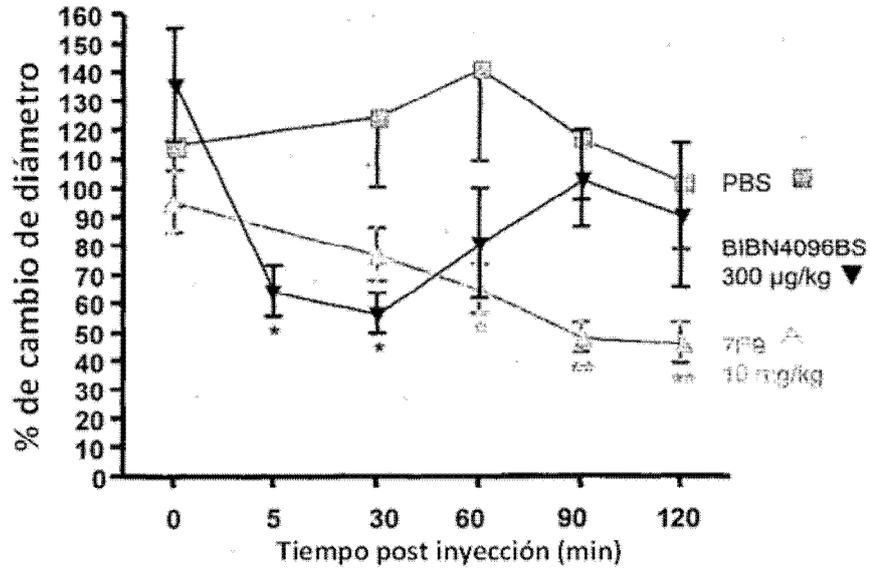


Figura 10

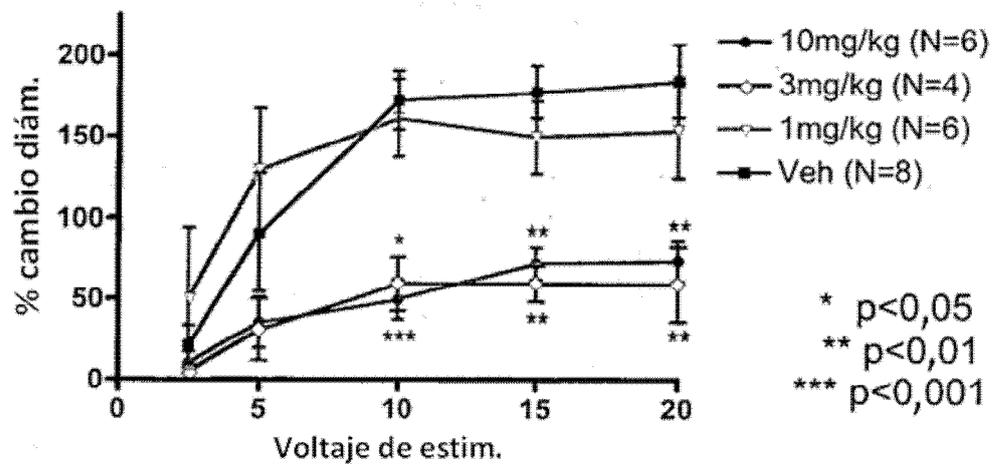


Figura 11A

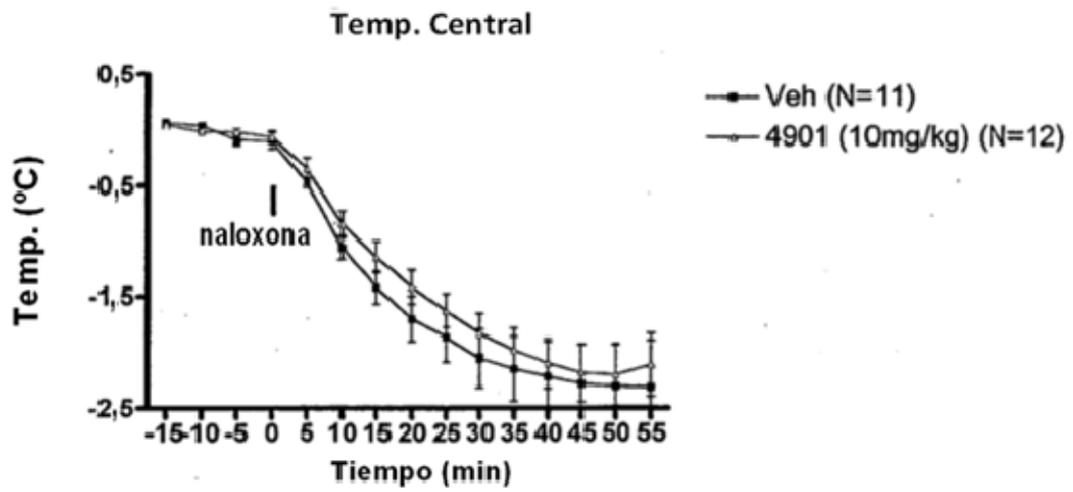


Figura 11B

