

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039905**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.25

(21) Номер заявки
201592042

(22) Дата подачи заявки
2012.05.21

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИ-CGRP АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/488,660

(32) 2011.05.20

(33) US

(43) 2016.03.31

(62) 201301295; 2012.05.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Х. ЛУНДБЕК А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Ковасевич Браян Роберт, Гарсия-Мартинес Леон Ф., Олсон Кейти, Дуцар Бенджамин Х., Билгрэн Дженз Дж., Лэтам Джон А., Митчел Даниэль М., МакНейл Патрисия Дайэн, Дженсон Николь М., Лумис Марайа-Кристина (US)

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б., Залесов А.В., Фомичева Т.С., Агуреев А.П., Баталин А.В., Верди А.В., Воль О.И., Воробьев В.А., Истомин С.В., Люлька Г.М., Мигачева Е.Л., Миронов О.В., Облов Ю.В., Павлюченко И.В., Перегудова Ю.Б., Пинчук Ю.В., Саломатина И.С., Силаева А.А., Стручков М.Н., Трошина Л.Ю., Чекалкин А.Ю. (RU)

(56) WO-A1-2011024113
WO-A1-2007076336
US-A1-20090220489
WO-A1-2009109911
ZELLER J. et al.: "CGRP function-blocking antibodies inhibit neurogenic vasodilatation without affecting heart rate or arterial blood pressure in the rat", British Journal of Pharmacology, vol. 155, pages 1093-1103, 08 September 2008, See the whole document

(57) Изобретение направлено на антитела и их антигенсвязывающие фрагменты против пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP) человека, а именно те, которые содержат: i) полипептид вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31 и (ii) полипептид вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 или их гуманизированные варианты. Изобретение также относится к композиции, содержащей указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и к применению антитела по изобретению, его антигенсвязывающего фрагмента или содержащей их композиции в способе лечения или профилактики заболеваний и состояний, характеризующихся повышенным CGRP. В частности, к данным заболеваниям и состояниям относится мигрень и состояния, связанные с болью.

B1

039905

039905

B1

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 61/488660 (№ патентного реестра 67858.730300), поданной 20 мая 2011 года под названием "Композиции антител против CGRP и их применение", полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Настоящая заявка содержит Список последовательностей, представленный в формате ASCII через EFS-Web и полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки. Название указанной ASCII-копии, созданной 18 мая 2012 г., -67858o730301.txt, а ее размер составляет 203815 байт.

Уровень техники

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их фрагментам (в том числе Fab-фрагментам), обладающим специфичностью связывания с пептидом, связанным с геном кальцитонина человека (Calcitonin Gene Related Peptide, в дальнейшем "CGRP"). Настоящее изобретение также относится к способам профилактики или лечения заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP, путем введения указанных антител или их фрагментов.

Описание данной области техники

Пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP) продуцируется в виде многофункционального нейропептида длиной 37 аминокислот. В организме человека существуют две формы CGRP - CGRP-альфа и CGRP-бета, обладающие аналогичной активностью. CGRP-альфа и CGRP-бета человека отличаются тремя аминокислотами и происходят из различных генов. Семейство пептидов CGRP включает амилин, адреномедуллин и кальцитонин, хотя рецепторы и биологическая активность каждого из них отличаются. Doods, H., *Curr. Op. Invest. Drugs*, 2(9): 1261-68 (2001).

CGRP высвобождается из многочисленных тканей, например тройничных нервов, которые при активации высвобождают нейропептиды в мозговые оболочки, опосредуя нейрогенное воспаление, которое характеризуется расширением сосудов, выходом жидкости из сосудов и разрушением тучных клеток. Durham, P.L., *New Eng. J. Med.*, 350 (11): 1073-75 (2004). Биологические эффекты CGRP опосредованы рецептором CGRP (CGRP-R), состоящим из компонента, семикратно проходящего через мембрану, в сочетании с рецептор-ассоциированным мембранным белком (RAMP). Для CGRP-R также требуется активность белка рецепторного компонента (RCP), необходимая для эффективного соединения с аденилатциклазой через G-белки и продукции цАМФ. Doods, H., *Curr. Op. Invest. Drugs*, 2(9): 1261-68 (2001).

Мигрень является нейро-сосудистым расстройством, поражающим приблизительно 10% взрослого населения в США, и, как правило, сопровождающимся интенсивными головными болями. Примерно 20-30% страдающих мигренью испытывают ауру, включающую очаговые неврологические явления, предшествующие и/или сопровождающие это событие. Считают, что CGRP играет заметную роль в развитии мигрени. Например, выявлено, что концентрации CGRP в плазме повышаются в крови яремной вены в течение фазы головной боли при мигрени, в отличие от других нейропептидов. Кроме того, согласно Arulmozhi et al., у лиц, страдающих мигренью, выявлены: (1) строгая корреляция между концентрацией CGRP в плазме и мигренью; (2) вливание CGRP приводит к мигрениподобной головной боли; (3) повышены исходные уровни CGRP; и (4) изменения уровней CGRP в плазме во время приступов мигрени значительно коррелируют с интенсивностью головной боли. Aralmozhi D.K., et al., *Vas. Pharma.*, 43: 176-187 (2005).

Одним из эффективных средств для лечения мигрени является введение триптанов, являющихся семейством лекарственных средств на основе триптамина, включающим суматриптан и ризатриптан. Члены указанного семейства обладают сродством к различным рецепторам серотонина, включая 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} и 5-HT_{1F}. Члены указанного семейства лекарственных средств селективно сужают сосуды головного мозга, а также оказывают сосудосуживающее действие на коронарные сосуды. Durham P.L., *New Eng. J. Med.*, 350 (11): 1073-75 (2004). Существует теоретический риск коронарного спазма у пациентов с установленным заболеванием сердца после введения, и после приема триптанов изредка могут возникать кардиологические события. Следует отметить, что они противопоказаны для больных коронарной недостаточностью.

Аналогичным образом, боль часто можно устранить путем введения некоторых наркотических средств или нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Тем не менее, введение указанных терапевтических средств может привести к определенным отрицательным последствиям. НПВП способны вызывать почечную недостаточность, желудочно-кишечное кровотечение и дисфункцию печени. Наркотики способны вызывать тошноту, рвоту, нарушения психики и привыкание. Таким образом, для избегания некоторых из этих отрицательных последствий желательно выявить альтернативные способы лечения боли.

Считается, что CGRP играет роль при многочисленных заболеваниях и нарушениях, включая, но не ограничиваясь мигренью, головными болями и болью.

Например, согласно сообщениям, CGRP может коррелировать или даже являться причиной гиперактивности мочевого пузыря. Доказательства того, что CGRP может коррелировать с гиперактивностью мочевого пузыря, включают тот факт, что CGRP присутствует в мочевыводящих путях, DRG и спинном мозге - (Wharton et al., 1986 *Neurosci* (3): 727), а также то, что афферентные C-волокна важны для проведения импульсов, участвующих в мочеиспускании, в спинной мозг (Yoshida et al., 2011 *J Pharmacol Sci*

(112): 128). Кроме того, сообщалось, что внутривезикулярное введение ботокса подавляет CGRP и значительно снижает интервал между сокращениями в модели боли в мочевом пузыре, вызванной уксусной кислотой (Chuang et al., 2004 J Urol (172): 1529; Chuang et al., 2009 J Urol (182):786).

Доказательством того, что CGRP может являться причиной указанного состояния, является недавно опубликованная патентная заявка, содержащая данные, предположительно указывающие на то, что раскрытое в ней антитело против CGRP снижало количество сокращений мочевого пузыря в модели гиперактивности мочевого пузыря, вызванной скипидаром - (Pfizer WO 2011/024113)).

В связи с предполагаемой вовлеченностью CGRP в указанные и другие расстройства, в данной области техники остается потребность в композициях и способах, используемых для профилактики или лечения заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP, при отсутствии побочных эффектов. В данной области техники остается потребность в композициях или способах, снижающих или подавляющих заболевания или расстройства, связанные с CGRP, например, мигрени, головные боли, гиперактивность мочевого пузыря и боль.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на антитела и их фрагменты, обладающие специфичностью связывания с CGRP, в частности, антитела, обладающие высоким сродством или авидностью и/или функциональными свойствами. Данные антитела содержат (i) полипептид варибельной области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 31 и (ii) полипептид варибельной области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 33, или их гуманизированные формы. Предпочтительный вариант воплощения настоящего изобретения направлен на антитела и их фрагменты, способные связываться с CGRP и/или ингибировать биологическую активность, опосредованную связыванием CGRP с рецептором CGRP ("CGRP-R").

В одном варианте воплощения, указанные антиген-связывающие фрагменты включают, но не ограничиваются, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv-фрагментами, камелизированными антителами, нанотелами и Ig-NAR.

В другом предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения рассматриваются полноразмерные антитела и их Fab-фрагменты, снижающие расширение сосудов у реципиента после введения.

Изобретение также относится к способам лечения заболевания, расстройства, состояния или симптома, ассоциированного с клетками, которые экспрессируют CGRP, где в рамках лечения предусмотрено введение антитела или его фрагмента (в том числе Fab-фрагмента) по изобретению. В частности, предлагаемые антитела и их фрагменты могут успешно применяться в рамках способов, направленных на снижение, лечение или профилактику мигреней (с аурой или без нее), рака или опухолей, ангиогенеза, связанного с раковым или опухолевым ростом, ангиогенеза, связанного с выживанием рака или опухоли, потери массы тела, боли, гемиплегических мигреней, кластерных головных болей, мигренозной невралгии, хронических головных болей, головных болей напряжения, общих головных болей, "приливов", хронической пароксизмальной гемикрании, вторичных головных болей вследствие основной структурной проблемы в области головы или шеи, черепной невралгии, синусных головных болей (например, связанных с синуситом), и головных болей или мигреней, вызванных аллергией. Антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению особенно полезны при лечении, профилактике, улучшении, контроле или снижении риска одного или более из следующих состояний или заболеваний: гиперактивности мочевого пузыря и других заболеваний мочевыделительной системы, включая инфекции, боли мочевого пузыря; хроническую боль; нейрогенное воспаление и боль при воспалении; невропатическую боль; боль в глазах; зубную боль; послеоперационную боль, боль, связанную с травмой, боль, связанную с ожогом, сахарный диабет; инсулиннезависимый сахарный диабет и другие воспалительные аутоиммунные заболевания, сосудистые расстройства; воспаление; артрит; гиперреактивность бронхов, астму; шок; сепсис; синдром отмены опиатов; устойчивость к морфину; "приливы" у мужчин и женщин; аллергический дерматит; псориаз; энцефалит; травму головного мозга; эпилепсию; нейродегенеративные заболевания; кожные заболевания, включая зуд, нейрогенное кожное покраснение, розовые угри и эритему; воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, цистит; дисменорею и другие состояния, которые потенциально можно лечить или предотвращать, или уменьшать их симптомы за счет антагонизма рецепторов CGRP. Особое значение имеет острое или профилактическое лечение головной боли, в том числе мигрени и кластерной головной боли, и других состояний, связанных с болью, а также гиперактивности мочевого пузыря.

В еще одном варианте воплощения изобретения антитело и его фрагмент по изобретению можно предпочтительно использовать в рамках способов, направленных на уменьшение, лечение или профилактику желудочно-пищеводного рефлюкса и висцеральной боли, связанной с желудочно-пищеводным рефлюксом, диспепсией, синдромом раздраженного кишечника, воспалительным заболеванием кишечника, болезнью Крона, илеитом, язвенным колитом, почечной коликой, дисменореей, циститом, менструальным периодом, родами, менопаузой, простатитом или панкреатитом.

Настоящее изобретение также рассматривает антитела против CGRP и их антигенсвязывающие связывающие фрагменты, конъюгированные с обнаруживаемой группой или функциональной группой.

Настоящее изобретение также рассматривает способ получения указанных антител против CGRP их антигенсвязывающих фрагментов. В данном способе предусмотрено получение антитела и его фрагмента из культуры стабильно трансформированных дрожжевых клеток, которая экспрессирует и секретирует в культуральную среду по меньшей мере 10-25 мг/л указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В изобретении также предлагается фармацевтическая композиция для лечения, профилактики или уменьшения интенсивности заболеваний и расстройств, связанных с CGRP, которая содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab1.

На фиг. 2 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab2.

На фиг. 3 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab3.

На фиг. 4 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab4.

На фиг. 5 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab5.

На фиг. 6 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab6.

На фиг. 7 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab7.

На фиг. 8 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab8.

На фиг. 9 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab9.

На фиг. 10 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab10.

На фиг. 11 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab11.

На фиг. 12 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab12.

На фиг. 13 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab13.

На фиг. 14 представлены полинуклеотидные и полипептидные последовательности, соответствующие полноразмерному антителу Ab14.

На фиг. 15 представлены данные твердофазного ИФА по связыванию CGRP-альфа, полученные согласно протоколу, описанному в примере 1 ниже, для антител Ab1, Ab2, Ab3 и Ab4.

На фиг. 16 представлены данные твердофазного ИФА по связыванию CGRP-альфа, полученные согласно протоколу, описанному в примере 1 ниже для антител Ab5, Ab6, Ab7 и Ab8.

На фиг. 17 представлены данные твердофазного ИФА по связыванию CGRP-альфа, полученные согласно протоколу, описанному в примере 1 ниже для антител Ab9, Ab10 и Ab14.

На фиг. 18 представлены данные твердофазного ИФА по связыванию CGRP-альфа, полученные согласно протоколу, описанному в примере 1 ниже для антител Ab11, Ab12 и Ab13.

На фиг. 19 продемонстрировано ингибирование CGRP-альфа-зависимой продукции цАМФ антителами Ab1, Ab2 и Ab4, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 20 продемонстрировано ингибирование CGRP-альфа-зависимой продукции цАМФ антителом Ab3, полученным в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 21 продемонстрировано ингибирование CGRP-альфа-зависимой продукции цАМФ антителами Ab5 и Ab6, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 22 продемонстрировано ингибирование CGRP-альфа-зависимой продукции цАМФ антителами Ab7, Ab8, Ab9 и Ab10, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 23 продемонстрировано ингибирование CGRP-альфа-зависимой продукции цАМФ антителами Ab11, Ab12 и Ab13, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 24 продемонстрировано ингибирование CGRP-альфа-зависимой продукции цАМФ антителом Ab14, полученным в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 25 продемонстрировано ингибирование CGRP-бета-зависимой продукции цАМФ антителами Ab1, Ab2 и Ab3, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 26 продемонстрировано ингибирование CGRP-бета-зависимой продукции цАМФ антителами Ab4, Ab5 и Ab6, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 27 продемонстрировано ингибирование CGRP-бета-зависимой продукции цАМФ антите-

лами Ab7 и Ab8, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 28 продемонстрировано ингибирование CGRP-бета-зависимой продукции цАМФ антителами Ab9, Ab10 и Ab14, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 29 продемонстрировано ингибирование CGRP-бета-зависимой продукции цАМФ антителами Ab11, Ab12 и Ab13, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 30 продемонстрировано ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP крысы, антителами Ab1, Ab2, Ab4 и Ab5, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 31 продемонстрировано ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP крысы, антителами Ab3 и Ab6, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 32 продемонстрировано ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP крысы, антителами Ab7 и Ab8, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 33 продемонстрировано ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP крысы, антителом Ab9, полученным в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 34 продемонстрировано ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP крысы, антителом Ab10, полученным в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 35 продемонстрировано ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP крысы, антителами Ab11 и Ab12, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 36 продемонстрировано ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP крысы, антителом Ab13, полученным в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 37 продемонстрировано ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP крысы, антителом Ab14, полученным в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 ниже.

На фиг. 38 продемонстрировано ингибирование связывания CGRP, меченого радиоактивной меткой, с CGRP-R антителами Ab1-Ab13, полученными в соответствии с протоколом, описанным в примере 6 ниже.

На фиг. 39 продемонстрировано снижение расширения сосудов при введении антител Ab3 и Ab6, полученных в соответствии с протоколом, описанным в примере 7 ниже, после введения капсаицина в модели крысы по сравнению с контрольным антителом.

На фиг. 40 продемонстрировано снижение расширения сосудов при введении антитела Ab6, полученного в соответствии с протоколом, описанным в примере 7 ниже, в различных концентрациях после введения капсаицина в модели крысы по сравнению с контрольным антителом.

На фиг. 41А-С показано положительное действие Ab3 на емкость мочевого пузыря во время вливания физиологического раствора. Животным вводили Ab3 или антитело отрицательного контроля, затем выполняли мониторинг во время вливания физиологического раствора в мочевой пузырь. IC1 (график А) увеличился, а MF (график В) снизилась, что указывало на увеличение емкости мочевого пузыря. Различия в АМ (график С) были в пределах стандартного отклонения и не являлись статистически значимыми. Звездочки указывают на статистически значимое улучшение ($p < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок, сравнение с антителом отрицательного контроля). Обозначения: закрашенные столбики: лечение Ab3 (10 мг/кг); светлые столбики: антитело отрицательного контроля (10 мг/кг). Показатели ошибки означают стандартное отклонение. Сокращения: IC1: интервал между сокращениями; MF: частота мочеиспускания; АМ: амплитуда мочеиспускания.

На фиг. 42 показано действие Ab2 в модели невропатической боли. Механическую аллодинию индуцировали посредством операции Чанга (перевязка спинномозговых нервов L5/L6) и сравнивали степень чувствительности у животных, обработанных Ab2 (заштрихованные столбики), и контрольных животных (закрашенные столбики). Более высокие значения указывают на меньшую чувствительность. Средняя чувствительность была аналогична в день 13 (до введения Ab2), но улучшилась в дни 14 и 17. Показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего.

На фиг. 43 показано обезболивающее действие Ab2 и морфина. Болевую чувствительность оценивали по времени отдергивания хвоста (ось у, секунды) для животных, которым вводили морфин (светлые квадраты), Ab2 (10 мг/кг, закрашенные треугольники), или среду-носитель (отрицательный контроль, светлые круги). Животные вырабатывали устойчивость к морфину и демонстрировали время отдергивания хвоста, аналогичное времени у контрольных животных, к 4 дню. В противоположность этому, животные, получавшие Ab2, демонстрировали устойчивое улучшение времени отдергивания хвоста в течение всего эксперимента (до дня 7). Улучшение у животных, получавших Ab2, было статистически значимым ($p < 0,05$ согласно однофакторному дисперсионному анализу с последующим тестом Даннетта, сравнение со средой-носителем, помечено звездочками). Показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего.

На фиг. 44 показано обезболивающее действие Ab2 в зависимости от дозировки. В день 0 (после первого анализа времени отдергивания хвоста), крысам вводили антитело Ab2 в дозировке 1 мг/кг (закрашенные квадраты), 3 мг/кг (закрашенные треугольники вершиной вниз) или 10 мг/кг (закрашенные треугольники вершиной вверх), или среду-носитель (светлые круги), или антитело отрицательного кон-

троля (светлые квадраты). Время отдергивания хвоста крысами в ответ на болезненный тепловой раздражитель оценивали ежедневно (более продолжительное время указывает на относительную нечувствительность к боли). Время отдергивания хвоста повышалось за счет введения Ab2 в зависимости от дозы. Звездочки указывают на статистически значимое увеличение времени отдергивания хвоста ($p < 0,05$ согласно однофакторному дисперсионному анализу с последующим тестом Даннетта, сравнение со средой-носителем). Показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего.

На фиг. 45 показано обезболивающее действие Ab2 в комбинации с морфином, и при отмене морфина после развития устойчивости к морфину. В день 0 (после первого анализа времени отдергивания хвоста), крысам вводили антитело Ab2 в дозировке 10 мг/кг (закрашенные квадраты и закрашенные треугольники) или среду-носитель (светлые круги). Затем крысам ежедневно вводили морфин в дни 1-10 (закрашенные квадраты) или только в дни 1-4 (закрашенные треугольники). Время отдергивания хвоста вначале значительно увеличилось у мышей, получавших морфин, но снизилось в последующие дни, что указывало на устойчивость к морфину. Однако у мышей, для которых отменили морфин после дня 4, время отдергивания хвоста увеличилось и оставалось повышенным в дни 5-8. Показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего.

На фиг. 46 показано действие Ab2 в модели висцеральной боли у крыс. Висцеральную боль количественно оценивали, измеряя порог растяжения толстой кишки (более высокие значения указывают на меньшую чувствительность) для животных, не получавших препаратов (светлый столбик) или животных, получавших TNBS для стимуляции хронической гиперчувствительности толстой кишки, которые получали антитело отрицательного контроля (закрашенные столбики) или Ab2 (заштрихованные столбики). Гиперчувствительность облегчалась на 27% у животных, получавших Ab2, и порог растяжения значительно улучшился за счет введения Ab2 ($p < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента по сравнению с группой, получавшей TNBS + отрицательный контроль). Показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего.

Подробное описание предпочтительных вариантов воплощения Определения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными способами, протоколами, линиями клеток, видами или родами животных и реагентами, описанными здесь, поскольку все это может изменяться. Кроме того, следует понимать, что терминология, которая используется здесь, служит лишь для целей описания конкретных вариантов воплощения и не должна рассматриваться в качестве ограничивающей объем настоящего изобретения, которые должны ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения. Как используется здесь, формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если контекст не диктует иное в явной форме. Так, например, ссылка на "клетку" включает множество таких клеток, а ссылка на "указанный белок" включает ссылку на один или более белков и их эквивалентов, известных специалистам в данной области техники, и так далее. Если иное не указано явным образом, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение.

Пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP): Как используется здесь, CGRP охватывает не только следующие аминокислотные последовательности CGRP-альфа и CGRP-бета Homo sapiens, доступные в American Peptides (Саннивейл, штат Калифорния, США) и Vachem (Торранс, штат Калифорния, США): CGRP-альфа: ACDTATCVTHRLAGLLSRSGWKNFVPTNVGSKAF-NH₂ (SEQ ID NO: 281), где N-концевой фенилаланин амидирован; CGRP-бета: ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNFVPTNVGSKAF-NH₂ (SEQ ID NO: 282), где N-концевой фенилаланин амидирован; но и любые мембраносвязанные формы этих аминокислотных последовательностей CGRP, а также мутантные формы (мутеины), сплайс-варианты, изоформы, ортологи, гомологи и варианты указанной последовательности.

Виды дрожжей, компетентные по спариванию: В настоящем изобретении предполагается широкий охват любых диплоидных или тетраплоидных дрожжей, которые можно вырастить в культуре. Такие виды дрожжей могут существовать в гаплоидной, диплоидной или другой полиплоидной форме. Клетки данной плоидности могут при соответствующих условиях размножаться в этой форме на протяжении неопределенного количества поколений. Диплоидные клетки могут также спорулироваться, образуя гаплоидные клетки. Последовательное спаривание может привести к получению тетраплоидных штаммов за счет дальнейшего спаривания или слияния клеток диплоидных штаммов. Настоящее изобретение предусматривает использование гаплоидных дрожжей, а также диплоидных или других полиплоидных клеток дрожжей, полученных, например, путем спаривания или слияния сферопластов.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения дрожжи, компетентные по спариванию, являются членом семейства Saccharomycetaceae, которое включает роды *Arxiozyma*; *Ascobotryozyma*; *Citeromyces*; *Debaryomyces*; *Dekkera*; *Eremothecium*; *Issatchenkia*; *Kazachstania*; *Kluyveromyces*; *Kodamaea*; *Lodderomyces*; *Pachysolen*; *Pichia*; *Saccharomyces*; *Saturnispora*; *Tetrapisispora*; *Torulaspora*; *Williopsis*; и *Zygosaccharomyces*. Другие типы дрожжей, потенциально применимых в настоящем изобретении, включают *Yarrowia*; *Rhodospiridium*; *Candida*; *Hansenula*; *Filobasium*; *Sporidiobolus*; *Bullera*; *Leucosporidium* и

Filobasidella.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения дрожжи, компетентные по спариванию, являются членом рода *Pichia*. В другом предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения дрожжи рода *Pichia*, компетентные по спариванию, принадлежат к одному из следующих видов: *Pichia pastoris*, *Pichia methanolic* и *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*). В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения дрожжи рода *Pichia*, компетентные по спариванию, принадлежат к виду *Pichia pastoris*.

Гаплоидная дрожжевая клетка: Клетка, содержащая одну копию каждого гена с его нормальной геномной (хромосомной) комплементарной цепью.

Полиплоидная дрожжевая клетка: Клетка, содержащая более одной копии каждого гена с его нормальной геномной (хромосомной) комплементарной цепью.

Диплоидная дрожжевая клетка: Клетка, содержащая две копии (аллеля) практически каждого гена с его нормальной геномной комплементарной цепью, обычно получаемая путем слияния (спаривания) двух гаплоидных клеток.

Тетраплоидная дрожжевая клетка: Клетка, содержащая четыре копии (аллеля) практически каждого гена с его нормальной геномной комплементарной цепью, обычно получаемая путем слияния (спаривания) двух гаплоидных клеток. Тетраплоиды могут нести две, три, четыре или более различных экспрессионных кассеты. Такие тетраплоиды можно получить у *S.cerevisiae* путем селективного спаривания гомозиготных гетероталлических *a/a* и альфа/альфа-диплоидов, а у *Pichia* - путем последовательного спаривания гаплоидов с получением ауксотрофных диплоидов. Например, гаплоид [met his] можно спарить с гаплоидом [ade his], получая диплоид [his], а гаплоид [met arg] можно спарить с гаплоидом [ade arg], получая диплоид [arg]; затем скрещивание диплоид [his] x диплоид [arg] позволяет получить тетраплоидный прототроф. Специалист в данной области техники должен понимать, что сведения о преимуществах и применении диплоидных клеток также могут быть применимы к тетраплоидным клеткам.

Спаривание дрожжей: Процесс, при котором две гаплоидные дрожжевые клетки естественным образом сливаются, образуя одну диплоидную дрожжевую клетку.

Мейоз: Процесс, при котором диплоидная дрожжевая клетка подвергается редукционному делению, образуя четыре гаплоидных споры. Каждая спора затем может прорасти и образовать линию гаплоидных вегетативно растущих клеток.

Селектируемый маркер: Селектируемый маркер является геном или фрагментом гена, придающим клетке, принимающей указанный ген, например, за счет трансформации, фенотип роста (физическую характеристику роста). Селективный маркер позволяет указанной клетке выжить и развиваться в селективной ростовой среде в условиях, когда клетки, не получившие указанного селективного маркерного гена, не могут расти. Селективные маркерные гены в целом делятся на несколько типов, в том числе положительные селективные маркерные гены, например, ген, придающий клетке устойчивость к антибиотикам или другому лекарственному средству, температуре при скрещивании двух мутантов, чувствительных к температуре ("ts"-мутантов) или трансформации ts-мутанта; отрицательные селективные маркерные гены, например, ген биосинтеза, который придает клетке способность к росту в среде без определенного питательного вещества, необходимого для всех клеток, которые не содержат указанного гена биосинтеза, или мутантный ген биосинтеза, придающий клетке неспособность получать ростовое преимущество перед клетками, не имеющими гена дикого типа и т.п.

Подходящие маркеры включают, но не ограничиваются ими: ZEO; G418; LYS3; MET1; MET3a; ADE1; ADE3; URA3 и т.п.

Экспрессирующий вектор: Указанные ДНК-векторы содержат элементы, которые облегчают манипулирование экспрессией чужеродного белка в клетке-хозяине-мишени. В целях удобства манипулирование последовательностями и продукция ДНК для трансформации сначала выполняется в бактериальном хозяине, например *E. coli*, и, как правило, векторы должны содержать последовательности для облегчения таких манипуляций, включая бактериальный сайт инициации репликации и соответствующий бактериальный селективный маркер. Селективные маркеры кодируют белки, необходимые для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, выращенных в селективной культуральной среде. Клетки-хозяева, не трансформированные вектором, содержащим селективный ген, не выживут в указанной культуральной среде. Типичные селективные гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, (б) восполняют ауксотрофную недостаточность, или (с) поставляют критические питательные вещества, недоступные в сложных средах. Типичные векторы и способы трансформации дрожжей описаны, например, в Burke, D., Dawson, D., & Stearns, T. (2000). *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Экспрессирующие векторы для использования в способах по изобретению также должны включать специфические последовательности дрожжей, в том числе селективный ауксотрофный или лекарственный маркер для идентификации трансформированных штаммов дрожжей. Лекарственный маркер препарата можно в дальнейшем использовать для амплификации количества копий вектора в дрожжевой клетке-хозяине.

Интересующая исследователя последовательность, кодирующая полипептид, функционально связана с регуляторными последовательностями транскрипции и трансляции, обеспечивающими экспрессию полипептида в дрожжевых клетках. Указанные компоненты вектора могут включать один или более из: энхансерного элемента, промотора и терминатора транскрипции, но не ограничиваются ими. Кроме того, можно включать последовательности для секреции полипептида, например, сигнальную последовательность и т.п. Дрожжевой сайт инициации репликации не обязателен, поскольку векторы экспрессии часто интегрируются в геном дрожжей. В одном варианте воплощения настоящего изобретения представляющий интерес полипептид функционально связан или объединен с последовательностями, обеспечивающими оптимизированную секрецию полипептида из диплоидных клеток дрожжей.

Нуклеиновые кислоты являются "функционально связанными", если они вступают в функциональное взаимодействие с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК сигнальной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, участвующего в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию этой последовательности. В общем случае "функционально связанные" означает, что связанные последовательности ДНК непрерывны, а в случае секреторного лидера, непрерывны и в рамке считывания. Однако энхансеры не должны быть непрерывными. Связывание осуществляют лигированием в подходящих сайтах рестрикции или, в качестве альтернативы, с помощью способа ПЦР/рекомбинации, известного специалистам в данной области техники (Gateway® Technology; Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США). Если такие сайты отсутствуют, в соответствии с общепринятой практикой используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

Промоторы являются нетранслируемыми последовательностями, расположенными выше (5') стартового кодона структурного гена (обычно в пределах приблизительно от 100 до 1000 п.о.), которые контролируют транскрипцию и трансляцию определенных нуклеотидных последовательностей, с которыми они функционально связаны. Такие промоторы делятся на несколько классов: индуцибельные, конститутивные и репрессируемые промоторы (повышающие уровни транскрипции в ответ на отсутствие репрессора). Индуцибельные промоторы могут инициировать повышенные уровни транскрипции ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторые изменения условий культивирования, например, в присутствии или в отсутствие питательного вещества или при изменении температуры.

Фрагмент дрожжевого промотора может также служить в качестве сайта гомологичной рекомбинации и интеграции экспрессирующего вектора в указанный сайт генома дрожжей; в качестве альтернативы, в качестве сайта гомологичной рекомбинации используется селективный маркер. Трансформация *Pichia* описана в Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376-3385.

Примеры подходящих промоторов *Pichia* включают промотор AOX1 (Cregg et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 1316-1323); промотор ICL1 (Menendez et al. (2003) Yeast 20(13): 1097-108); промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP) (Waterham et al. (1997) Gene 186(1): 37-44) и промотор FLD1 (Shen et al. (1998) Gene 216(1): 93-102). Промотор GAP является сильным конститутивным промотором, а промоторы AOX и FLD1 являются индуцибельными.

Другие промоторы дрожжей включают ADH1, промотор алкогольдегидрогеназы II, GAL4, PHO3, PHO5, Рук и химерные промоторы, полученные из них. Кроме того, в настоящем изобретении можно применять не-дрожжевые промоторы, например, промоторы млекопитающих, насекомых, растений, рептилий, амфибий, вирусов и птиц. В наиболее типичном случае промотор включает промотор млекопитающих (потенциально эндогенный для экспрессируемых генов) или включает дрожжевой или вирусный промотор, который обеспечивает эффективную транскрипцию в дрожжевых системах.

Интересующие исследователя полипептиды можно рекомбинантно получать не только напрямую, но и в качестве гибридного полипептида с гетерологичным полипептидом, например, сигнальной последовательностью или другим полипептидом, содержащим специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. В общем случае сигнальная последовательность может являться компонентом вектора или частью кодирующей последовательности полипептида, вставленной в вектор. Предпочтительно выбираемой гетерологичной сигнальной последовательностью является последовательность, распознаваемая и подвергаемая процессингу посредством одного из стандартных путей, доступных в клетке-хозяине. Считается, что сигнальная последовательность пре-про-фактора альфа *S. cerevisiae* является эффективной при секреции различных рекомбинантных белков из *P. pastoris*. Другие дрожжевые сигнальные последовательности включают сигнальную последовательность альфа-фактора спаривания, сигнальную последовательность инвертазы и сигнальные последовательности, полученные из других секретрируемых полипептидов дрожжей. Кроме того, указанные сигнальные пептидные последовательности можно модифицировать для обеспечения повышенной секреции в диплоидных дрожжевых экспрессионных системах. Другие представляющие интерес сигнальные последовательности для секреции также включают сигнальные последовательности млекопитающих, которые могут быть гетерологичными по отношению к секретрируемому белку, или могут являться нативной последовательностью секретрируемого белка. Сигнальные последовательности включают последовательности предшественников пептидов, а в некоторых случаях могут включать последовательности пропептидов. Многие такие

сигнальные последовательности известны в данной области техники, включая сигнальные последовательности, обнаруженные в цепях иммуноглобулина, например, последовательность пре-про-токсина K28, РНА-Е, FАСЕ, МСР-1 человека, сигнальные последовательности человеческого сывороточного альбумина, тяжелую цепь Ig человека, легкую цепь Ig человека, и т.п. Например, см. Hashimoto et al. Protein Eng 11(2) 75 (1998) и Kobayashi et al. Therapeutic Apheresis 2(4) 257 (1998).

Транскрипцию можно увеличить путем инсерции последовательности активатора транскрипции в вектор. Указанные активаторы являются цис-действующими элементами ДНК, обычно длиной от приблизительно 10 до 300 п.о., которые действуют на промотор, усиливая транскрипцию с него. Эхансеры транскрипции являются сравнительно независимыми по отношению к ориентации и положению, обнаруживаясь 5'- и 3'- по отношению к единице транскрипции в пределах интрона, а также внутри самой кодирующей последовательности. Эхансер можно внедрить в экспрессирующий вектор в 5' или 3'-направлении от кодирующей последовательности, однако предпочтительно - в 5'-направлении от промотора.

Векторы для экспрессии, используемые в клетках-хозяевах эукариот, также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны в 3'-направлении от кодона терминации транскрипции в нетранслируемых областях эукариотической или вирусной ДНК или кДНК. Указанные области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК.

Для конструирования подходящих векторов, содержащих один или более из вышеперечисленных компонентов, используют стандартные техники лигирования или способы ПЦР/рекомбинации. Выделенные плазмиды или фрагменты ДНК расщепляют, оптимизируют и повторно лигируют в форме, желательной для получения требуемых плазмид, или обрабатывают с помощью способов рекомбинации. Для анализа с целью подтверждения правильности последовательностей сконструированных плазмид смеси, полученные при лигировании, используют для трансформации клеток-хозяев, и в случае необходимости выполняют отбор успешных трансформантов по устойчивости к антибиотикам (например, ампициллину или зеоцину). Плазмиды из трансформантов выделяют, анализируют с помощью гидролиза эндонуклеазой рестрикции и/или секвенируют.

В качестве альтернативы рестрикции и лигированию фрагментов, для инсерции последовательностей ДНК в вектор можно использовать способы рекомбинации, основанные на att-сайтах и ферментах рекомбинации. Такие способы описаны, например, в статье Landy (1989) Ann.Rev.Biochem. 58:913-949; и известны специалистам в данной области техники. Такие способы используют межмолекулярную рекомбинацию ДНК, опосредуемую смесью рекомбинантных белков, кодируемых фагом лямбда и *E. coli*. Рекомбинация происходит между специфическими сайтами присоединения (att) на взаимодействующих молекулах ДНК. Описание att-сайтов см. в Weisberg and Landy (1983) Site-Specific Recombination in Phage Lambda, in Lambda II, Weisberg, ed.(Cold Spring Harbor, NY:Cold Spring Harbor Press), pp. 211-250. Сегменты ДНК, фланкирующие сайты рекомбинации, меняются местами таким образом, что после рекомбинации указанные att-сайты являются гибридными последовательностями, состоящими из последовательностей, предоставленных каждым исходным вектором. Рекомбинация может происходить между ДНК любой топологии.

Att-сайты можно внедрить в интересующую исследователя последовательность путем лигирования интересующей последовательности с соответствующим вектором; получения ПЦР-продукта, содержащего сайты att В, за счет использования специфических праймеров; получения библиотеки кДНК, клонированной в соответствующем векторе, содержащем att-сайты; и т.п.

Фолдинг, как используется здесь, относится к трехмерной структуре полипептидов и белков, где взаимодействия между аминокислотными остатками стабилизируют структуру. Хотя нековалентные взаимодействия играют важную роль в определении структуры, обычно исследуемые белки содержат внутри- и/или межмолекулярные ковалентные дисульфидные связи, образованные двумя остатками цистеина. Для естественных белков и полипептидов или их производных и вариантов правильный фолдинг обычно является механизмом, приводящим к оптимальной биологической активности; его можно контролировать с помощью анализов активности, например, связывания лигандов, ферментативной активности и т.д.

В некоторых случаях, например, если желательный продукт имеет синтетическое происхождение, анализы, основанные на биологической активности, имеют меньшее значение. Правильный фолдинг таких молекул можно определить на основе физических свойств, энергетических соображений, моделирования и т.п.

Хозяина для экспрессии можно дополнительно модифицировать путем внедрения последовательностей, кодирующих один или более ферментов, улучшающих фолдинг и образование дисульфидных связей, т.е. фолдаз, шаперонинов и т.д. Такие последовательности можно конститутивно или индуцибельно экспрессировать в дрожжевой клетке-хозяине с помощью векторов, маркеров и т.д., как известно в данной области техники. В предпочтительном случае последовательности, включая транскрипционные регуляторные элементы, достаточные для желательной картины экспрессии, стабильно интегрированы в геном дрожжей путем сайт-специфической методологии.

Например, PDI эукариот является не только эффективным катализатором окисления цистеина белка и изомеризации дисульфидных связей, но также проявляет шаперонную активность. Совместная экспрессия PDI может облегчить продукцию активных белков, содержащих множественные дисульфидные связи. Кроме того, представляет интерес экспрессия VIP (белок, связывающий тяжелые цепи иммуноглобулинов); циклофилина и т.п. В одном варианте воплощения настоящего изобретения каждый из гаплоидных родительских штаммов экспрессирует собственный фермент фолдинга, например, один штамм может экспрессировать VIP, а другой штамм может экспрессировать PDI или их комбинации.

Термины "желательный белок" или "желательное антитело" взаимозаменяемы и в целом относятся к исходному антителу, специфичному по отношению к мишени, т.е. CGRP, или химерному или гуманизованному антителу, или его связывающему фрагменту, получаемому из него, как описано здесь. Термин "антитело" предназначен для включения любой молекулярной структуры определенной формы, содержащей полипептидную цепь, которая соответствует эпитопу и распознает его, причем одно или более нековалентных связывающих взаимодействий стабилизируют комплекс между указанной молекулярной структурой и эпитопом. Молекула-прототип антитела является иммуноглобулином, и все типы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD и т.д., из всех источников, например, человека, грызунов, кролика, коровы, овцы, свиньи, собаки, других млекопитающих, кур, других птиц и т.д., считаются "антителами". Предпочтительным источником для продукции антител, пригодным в качестве исходного материала согласно изобретению, являются кролики. Описаны кодирующие последовательности различных антител; другие последовательности можно найти с помощью способов, известных в данной области техники. Их примеры включают химерные антитела, антитела человека и антитела других млекопитающих, гуманизованные антитела, одноцепочечные антитела (например, scFv), камелизированные антитела, нанотела, IgNAR (одноцепочечные антитела, полученные от акул), иммунофармацевтические средства на основе модульных белков малого размера (SMIP) и такие фрагменты антител как Fab, Fab', F(ab')₂ и т.п. См. Streltsov VA, et al., Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype, Protein Sci. 2005 Nov;14(11):2901-9. Epub 2005 Sep 30; Greenberg AS, et al., A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks, Nature. 1995 Mar 9;374 (6518): 168-73; Nuttall SD, et al., Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries, Mol Immunol. 2001 Aug;38(4):313-26; Hamers-Casterman C, et al., Naturally occurring antibodies devoid of light chains, Nature. 1993 Jun 3;363(6428):446-8; Gill DS, et al., Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds, Curr Opin Biotechnol. 2006 Dec; 17(6):653-8. Epub 2006 Oct 19.

Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно продуцировать с помощью генной инженерии. С помощью этой техники, как и при других способах, антитело-продуцирующие клетки сенсibiliзируют желательным антигеном или иммуногеном. Матричную РНК, выделенную из антитело-продуцирующих клеток, используют в качестве матрицы для получения кДНК с помощью ПЦР-амплификации. Библиотеку векторов, каждый из которых содержит один ген тяжелой цепи и один ген легкой цепи, сохраняющие первоначальную антигенную специфичность, получают путем инсерции соответствующих участков амплифицированной кДНК иммуноглобулина в экспрессирующие векторы. Комбинаторную библиотеку конструируют путем объединения библиотеки генов тяжелых цепей с библиотекой генов легких цепей. Это приводит к получению библиотеки клонов, которые совместно экспрессируют тяжелую и легкую цепи (аналогичные Fab-фрагменту или антиген-связывающему фрагменту молекулы антитела). Векторы, которые несут эти гены, совместно переносят в клетку-хозяина путем трансфекции. При индукции синтеза генов антитела в трансфицированной клетке-хозяине белки тяжелых и легких цепей подвергаются самосборке, образуя активные антитела, которые можно обнаружить путем скрининга с антигеном или иммуногеном.

Последовательности, кодирующие интересующие исследователя антитела, включают нативные последовательности, а также нуклеиновые кислоты, последовательность которых в силу вырожденности генетического кода не идентична последовательности раскрытых нуклеиновых кислот, и их варианты. Варианты полипептидов могут включать аминокислотные (АК) замены, добавления или делеции. Аминокислотные замены могут быть консервативными аминокислотными заменами или заменами для устранения несущественных аминокислот, например, для модификации сайта гликозилирования или минимизации неправильного фолдинга путем замены или делеции одного или более остатков цистеина, ненужных для функционирования. Можно сконструировать варианты, сохраняя или повышая биологическую активность определенной области белка (например, функционального домена, каталитических аминокислотных остатков и т.д.). Варианты также включают фрагменты полипептидов, раскрытые здесь, в частности, биологически активные фрагменты и/или фрагменты, соответствующие функциональным доменам. Известны техники мутагенеза клонированных генов *in vitro*. Настоящее изобретение также включает полипептиды, модифицированные с помощью обычных молекулярно-биологических техник с целью улучшения их устойчивости к протеолитической деградации или оптимизации свойств растворимости, или для их лучшего соответствия требованиям, предъявляемым к терапевтическим агентам.

Химерные антитела можно получить рекомбинантными способами путем объединения вариативных областей легких и тяжелых цепей (V_L и V_H), полученных из антитело-продуцирующих клеток одно-

го вида, с константными областями легких и тяжелых цепей из другого вида. Обычно в химерных антителах используют переменные области грызунов или кролика и константные области человека с целью получения антитела с доменами преимущественно человеческого происхождения. Продукция таких химерных антител хорошо известна в данной области техники, и ее можно осуществить с помощью стандартных средств (как описано, например, в патенте США № 5624659, полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки). Кроме того, предполагается, что константные области человека в составе химерных антител по изобретению можно выбирать из константных областей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Гуманизированные антитела сконструированы таким образом, что их иммуноглобулиновые домены более подобны доменам человека, и включают только гипервариабельные области антитела животного происхождения. Это достигается путем тщательного изучения последовательности гипервариабельных петель переменных областей моноклонального антитела и их адаптации к структуре цепей антитела человека. Хотя указанный способ на первый взгляд сложен, его просто осуществить на практике. См., например, патент США № 6187287, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки.

В дополнение к целым иммуноглобулинам (или их рекомбинантным аналогам), можно синтезировать фрагменты иммуноглобулинов, включающие сайт связывания эпитопа (например, Fab', F(ab')₂ или другие фрагменты). "Фрагмент" или минимальные иммуноглобулины можно сконструировать с использованием техник рекомбинантных иммуноглобулинов. Например, "Fv"-иммуноглобулины для использования в настоящем изобретении можно получить путем синтеза гибридной переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи. Кроме того, представляют интерес комбинации антител, например, диатела, которые содержат два Fv с различной специфичностью. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты иммуноглобулинов включают SMIP (низкомолекулярные иммунофармацевтические средства), камелизированные антитела, нанотела и IgNAR.

Иммуноглобулины и их фрагменты можно модифицировать после трансляции, например, путем добавления эффекторных групп, например, химических линкеров, обнаруживаемых молекул, например, флуоресцентных красителей, ферментов, токсинов, субстратов, биолюминесцентных материалов, радиоактивных материалов, хемилюминесцентных групп и т.п., или фрагментов, обеспечивающих специфическое связывание, например, стрептавидина, авидина или биотина и т.п., которые можно применять в способах и композициях по настоящему изобретению. Примеры дополнительных эффекторных молекул приведены ниже.

Полинуклеотидная последовательность "соответствует" полипептидной последовательности, если трансляция полинуклеотидной последовательности в соответствии с генетическим кодом приводит к получению указанной полипептидной последовательности (т.е. полинуклеотидная последовательность "кодирует" полипептидную последовательность); одна полинуклеотидная последовательность "соответствует" другой полинуклеотидной последовательности, если указанные две последовательности кодируют одну и ту же полипептидную последовательность.

"Гетерологичная" область или домен ДНК-конструкта является идентифицируемым сегментом ДНК в более крупной молекуле ДНК, не присутствующим в связи с указанной более крупной молекулой в природе. Таким образом, если гетерологичная область кодирует ген млекопитающего, указанный ген обычно фланкирован ДНК, которая не фланкирует указанную геномную ДНК млекопитающего в геноме организма-источника. Другим примером гетерологичной области является конструкт, где сама кодирующая последовательность не встречается в природе (например, кДНК, где геномная кодирующая последовательность содержит интроны или синтетические последовательности, содержащие кодоны, отличающиеся от нативного гена). Аллельные вариации или природные мутации не приводят к появлению гетерологичной области ДНК, как определено здесь.

"Кодирующая последовательность" является последовательностью кодонов в рамке считывания, которые (с учетом генетического кода) соответствуют или кодируют последовательность белка или пептида. Две кодирующие последовательности соответствуют друг другу, если указанные последовательности или комплементарные им последовательности кодируют одни и те же аминокислотные последовательности. Кодирующую последовательность в сочетании с соответствующими регуляторными последовательностями можно транскрибировать и транслировать в полипептид. Сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно расположены в 3'-направлении от кодирующей последовательности. "Промоторная последовательность" является регуляторной областью ДНК, способной связывать РНК-полимеразу в клетке и инициировать транскрипцию расположенной ниже (в 3'-направлении) кодирующей последовательности. Промоторные последовательности, как правило, содержат дополнительные сайты связывания регуляторных молекул (например, факторов транскрипции), которые влияют на транскрипцию кодирующей последовательности. Кодирующая последовательность "находится под контролем" промоторной последовательности или "функционально связана" с промотором, если РНК-полимераза связывается с промоторной последовательностью в клетке и транскрибирует кодирующую последовательность в мРНК, которая затем, в свою очередь, транслируется в белок, кодируемый кодирующей последовательностью.

Векторы используются для введения чужеродного вещества, например ДНК, РНК или белка, в ор-

ганизм или клетку-хозяина. Типичные векторы включают рекомбинантные вирусы (для полинуклеотидов) и липосомы (для полипептидов). "ДНК-вектор" является репликоном, например, плазмидой, фагом или космидой, к которому можно присоединить другой полинуклеотидный сегмент, вызывая репликацию присоединенного сегмента. "Экспрессирующий вектор" является ДНК-вектором, содержащим регуляторные последовательности, управляющие синтезом полипептида соответствующей клеткой-хозяином. Это обычно подразумевает промотор, связывающий РНК-полимеразу и иницирующий транскрипцию мРНК, а также сайты связывания рибосом и сигналы инициации для управления трансляцией мРНК в полипептид(ы). Внедрение полинуклеотидной последовательности в экспрессирующий вектор в надлежащем сайте и в правильной рамке считывания с последующей трансформацией соответствующей клетки-хозяина с помощью указанного вектора дает возможность продукции полипептида, кодируемого указанной полинуклеотидной последовательностью.

"Аmplификация" полинуклеотидных последовательностей является продукцией множественных копий определенной нуклеотидной последовательности *in vitro*. Амплифицированная последовательность обычно представлена в форме ДНК. Различные техники проведения такой амплификации описаны в обзорной статье Van Brant (1990, *Bio/Technol.*, 8(4):291-294). Полимеразная цепная реакция или ПЦР является прототипом амплификации нуклеиновых кислот, и использование ПЦР здесь следует рассматривать примером других подходящих техник амплификации.

Общая структура антител позвоночных хорошо изучена к настоящему времени (Edelman, G. M., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 190: 5 (1971)). Антитела состоят из двух одинаковых легких полипептидных цепей с молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон ("легкой цепи"), и двух одинаковых тяжелых цепей с молекулярной массой 53000-70000 ("тяжелой цепи"). Указанные четыре цепи соединены дисульфидными связями в "Y"-конфигурацию, где легкие цепи сгруппированы с тяжелыми цепями, начиная с горловины указанной "Y"-конфигурации. Фрагменты-"ветви" "Y"-конфигурации обозначают как F_{ab}-область; стеблевой фрагмент "Y"-конфигурации обозначают как F_c-область. Аминокислотная последовательность ориентирована от N-конца в верхней части "Y"-конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи. N-конец содержит вариабельную область, обладающую специфичностью к антигену, вызвавшему синтез антитела, и составляющую приблизительно 100 аминокислот в длину; существуют небольшие различия между легкими и тяжелыми цепями и от антитела к антителу.

Вариабельная область каждой цепи связана с константной областью, которая распространяется на оставшуюся длину цепи и в рамках определенного класса антител не меняется в зависимости от специфичности антитела (т.е. от антигена, вызвавшего синтез антитела). Существует пять известных основных классов константных областей, определяющих класс молекулы иммуноглобулина (IgG, IgM, IgA, IgD, и IgE, соответствующие константным областям тяжелой цепи γ , μ , α , δ и ϵ (гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон)). Константная область или класс определяет последующую эффекторную функцию антитела, в том числе активацию комплемента (Kabat E. A., *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*, 2nd Ed., pp. 413-436, Holt, Rinehart, Winston (1976)) и другие типы клеточного ответа (Andrews, D. W., et al., *Clinical Immunobiology*, pp 1-18, W. B. Sanders (1980); Kohl S., et al., *Immunology*, 48: 187 (1983)), в то время как вариабельная область определяет антиген, с которым взаимодействует антитело. Легкие цепи классифицируются или как κ (каппа) или как λ (лямбда). Каждый класс тяжелой цепи можно получить с легкой цепью каппа или лямбда. Легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" фрагменты двух тяжелых цепей соединены друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей, если иммуноглобулины получают с помощью или гибридом, или В-клеток.

Выражение "вариабельная область" или "VR" относится к доменам в пределах каждой пары легкой и тяжелой цепей антитела, которые вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном. Каждая тяжелая цепь несет на одном конце вариабельный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь несет на одном конце вариабельный домен (V_L), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи.

Выражения "область, определяющая комплементарность", "гипервариабельная область" или "CDR" относятся к одной или более гипервариабельных или определяющих комплементарность областей (CDR), присутствующих в вариабельных областях легких или тяжелых цепей антитела (см. Kabat, E. A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)). Указанные выражения включают гипервариабельные области, соответствующие определению Kabat et al. ("*Sequences of Proteins of Immunological Interest*," Kabat E., et al., US Dept. of Health and Human Services, 1983) или гипервариабельные петли трехмерных структур антител (Chothia and Lesk, *J Mol. Biol.* 196 901-917 (1987)). CDR каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга посредством каркасных областей и вместе с CDR другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта. В пределах CDR присутствуют избранные аминокислоты, описанные как области, определяющие селективность (SDR), которые представляют собой критические контактные остатки, используемые CDR при взаимодействии антитело-антиген (Kashmiri, S., *Methods*, 36: 25-34 (2005)).

Выражения "каркасная область" или "FR" относятся к одной или более каркасных областей, при-

существующих в переменных областях легких и тяжелых цепей антитела (см. Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)). Указанные выражения относятся к областям аминокислотной последовательности, расположенным между CDR в пределах переменных областей легких и тяжелых цепей антитела.

Антитела против CGRP и их связывающие фрагменты, обладающие связывающей активностью по отношению к CGRP

Антитело Ab1.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность переменной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQTASPVSAAVVGSTVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGV
SSRFKGSQSGTQFTLTISDLECADAAATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGTEVVVKR (SEQ ID
NO: 1).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQTASPVSAAVVGSTVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGV
SSRFKGSQSGTQFTLTISDLECADAAATYYCFGSYDCSSGDCVFVGGGTEVVVKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAFQSGNSQESVTEQDSKDDST
YLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность переменной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QSLEESGGRFVTPGTPLTLTCTVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGINDN
TYYASWAKGRFTISRASSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID
NO: 3).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGINDNTYYA
SWAKGRFTISRASSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS
VLTVFHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, соответствующие областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 1 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 2, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 4, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более CDR, последовательностей переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; и SEQ ID NO: 7, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным облас-

тям) последовательности варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 1 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 2.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гиперварибельным областям) последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 4.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 1; варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7) варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 1 и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10) варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения химерное антитело против CGRP является Ab1, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В другом особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab1, Fab-фрагмент включает последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 1 и последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 3 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab1 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab1, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных Pichia) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды Pichia включают вид Pichiapastoris, но не ограничиваются им.

Антитело Ab2.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность варибельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKR (SEQ ID
NO: 11).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS
LSSLTLLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность варибельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGI
NDNTYYASWAKGRFTISRDNKTTVYQLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTLVTVSS
(SEQ ID NO: 13).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNT

YYASWAKGRFTISRDNKTTVYLQMNLSRAEDTAVYFCARGDIWGQGLVTVSSASTK
 GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 12, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 14, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 12.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 14.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения гуманизованное антитело против CGRP является Ab2, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 14 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab2, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 13 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab2 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab2, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды

Pichia включают вид Pichiapastoris, но не ограничиваются им.

Антитело Ab3.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKR (SEQ ID
NO: 21).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGI
NDNTYYASWAKGRFTISRDNKTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTIVTSS

(SEQ ID NO: 23).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNT
YYASWAKGRFTISRDNKTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTIVTSSASTK
GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK (SEQ ID NO: 24).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответствующие областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 22, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 24, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 22.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 или последовательности тяжелой

лой цепи SEQ ID NO: 24.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 21; вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27) вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 21; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30) вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения химерное антитело против CGRP является Ab3, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В другом, особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab3, Fab-фрагмент включает последовательность вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 21 и последовательность вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 21 и/или SEQ ID NO: 23 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab3 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab3, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab4.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариательной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGPPKQLIYDASTLASGV
PSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCNDAAAYYCLGSYDCTNGDCVFGGGTEVVVKR (SEQ
ID NO: 31).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGPPKQLIYDASTLASGV
PSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCNDAAAYYCLGSYDCTNGDCVFGGGTEVVVKRTVAAP
SVFIFPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 32).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариательной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QSLEESGGRVLTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWIGVINGA
TYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID
NO: 33).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QSLEESGGRVLTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWIGVINGATYYA
SWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 31 или последовательности легкой цепи SEQ

ID NO: 32, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 34, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 32.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; и SEQ ID NO: 40, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 34.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 40) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения гуманизированное антитело против CGRP является Ab4, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 34 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В другом, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab4, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 31 и/или SEQ ID NO: 33 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab4 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab4, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab5.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```
QVLTQSPSSLASVIGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQKQPKGVPKQLIYDASTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSDYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 41).
```

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQQPGKVPKQLIYDASTLASGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTY
 LLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 42).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность варибельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWVGVIGI
 NGATYYASWAKGRFTISRDNSTKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS
 (SEQ ID NO: 43).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWVGVIGINGATY
 YASWAKGRFTISRDNSTKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гиперварибельным областям) последовательности варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 42, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гиперварибельным областям) последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 44, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 42. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гиперварибельным областям) последовательности варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 42.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гиперварибельным областям) последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 44.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41; варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47) варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; и SEQ ID NO: 50) варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения химерное антитело против CGRP является Ab5, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 42 и

SEQ ID NO: 44, и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab5, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 41 и/или SEQ ID NO: 43 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab5 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab5, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab6.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSDYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 51).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSDYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 52).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSGYYMNVWRQAPGKGLEWVGVIGI
NGATYYASWAKGRFTISRDNKTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTIVTVSS
(SEQ ID NO: 53).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSGYYMNVWRQAPGKGLEWVGVIGINGATY
YASWAKGRFTISRDNKTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTIVTVSSASTKGG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYEPPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSWTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
VVSFLTLVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSRFEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 54, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты

антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 54.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 54.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения гуманизованное антитело против CGRP является Ab6, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 54 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab6, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 51 и/или SEQ ID NO: 53 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab6 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab6, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab7.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```
QVLTQTASPVSAAVGSTVTINCQASQSVYNYNLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGV
SSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGGTEVVVKR (SEQ
ID NO: 61).
```

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```
QVLTQTASPVSAAVGSTVTINCQASQSVYNYNLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGV
SSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGGTEVVVKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVTVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 62).
```

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```
QEQLKESGGRLVTPGTSLSLTCTVSGIDLSNHMQWVRQAPGKGLEWIGVVGIN
GRTYYASWAKGRFTISRTSSTTVDLKMRLLTTEDTATYFCARGDIWGPGLVTVSS
(SEQ ID NO: 63).
```

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания

вания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```

QEQLKESGGRLVTPGTSLLTCTVSGIDLNSHYMQWVRQAPGKGLEWIGVVGINGRTY
YASWAKGRFTISRTSSTTVDLKMTRLTTEDTATYFCARGDIWGPGLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64).

```

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 62, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 64, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 61 или SEQ ID NO: 62. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 62.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 64.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения химерное антитело против CGRP является Ab7, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 64 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab7, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 61 и/или SEQ ID NO: 63 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab7 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab7, или их Fab-фрагменты можно продуци-

ровать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab8.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQSVYNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGGKTKVEIKR (SEQ ID
NO: 71).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQSVYNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGGKTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 72).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLNSHYMQWVRQAPGKGLEWVGVVGI
NGRTYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTIVTSS
(SEQ ID NO: 73).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLNSHYMQWVRQAPGKGLEWVGVVGVINGRT
YYASWAKGRFTISRDNKSTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTIVTSSASTK
GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS
LSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 74).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 72, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 74, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 74.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 72.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специ-

фичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 74.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения гуманизированное антитело против CGRP является Ab8, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 74 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В другом, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab8, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 71 и/или SEQ ID NO: 73 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab8 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab8, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab9.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCQASQNVYNNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSTLASGV
SSRFRGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTEVVVKR (SEQ
ID NO: 81).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCQASQNVYNNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSTLASGV
SSRFRGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
YLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 82).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QSLLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIGLSSYYMQWVRQSPGRGLEWIGVIGSDGK
TYYATWAKGRFTISKTSSTTVDLRMASLTEDTATYFCTRGDWGPGLTVTVSS (SEQ ID
NO: 83).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QSLLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIGLSSYYMQWVRQSPGRGLEWIGVIGSDGKTYA
TWAKGRFTISKTSSTTVDLRMASLTEDTATYFCTRGDWGPGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKRVKPCDCKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 82, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 84, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 84.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 82.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 89; и SEQ ID NO: 90, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 84.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения химерное антитело против CGRP является Ab9, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 84 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В другом, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab9, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 81 и/или SEQ ID NO: 83 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab9 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab9, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab10.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLSASVGDVRTINCASQNVYNNNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSRGDCVFGGGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 91).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQNVYNNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTY
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 92).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариательной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVGS
DGKTYATWAKGRFTISRDNKTTVYQLQMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO: 93).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVGSDGKTY
YATWAKGRFTISRDNKTTVYQLQMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 96 и SEQ ID NO: 97, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 91 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 92, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 98; SEQ ID NO: 99 и SEQ ID NO: 100, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 94, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариательной области легкой цепи и вариательной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 92. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 93 или SEQ ID NO: 94.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 96; и SEQ ID NO: 97, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 91 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 92.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 98; SEQ ID NO: 99 и SEQ ID NO: 100, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 94.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 91; вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 96 и SEQ ID NO: 97) вариательной области

ти легкой цепи SEQ ID NO: 91; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 98; SEQ ID NO: 99 и SEQ ID NO: 100) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения гуманизированное антитело против CGRP является Ab10, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 92 и SEQ ID NO: 94 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab10, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 91 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 91 и/или SEQ ID NO: 93 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab10 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab10, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab11.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```
QVLTQTASPVSPAVGSTVTINCRASQSVYYNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGV
SSRFKGGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSNGDCFVFGGGTEVVVKR (SEQ
ID NO: 101).
```

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```
QVLTQTASPVSPAVGSTVTINCRASQSVYYNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGV
SSRFKGGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSNGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 102).
```

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```
QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGVNG
KRYIASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ
ID NO: 103).
```

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

```
QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGVNGKRYIY
ASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 104).
```

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 106 и SEQ ID NO: 107, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 102, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109 и SEQ ID NO: 110, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 104, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций од-

ного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 101 или SEQ ID NO: 102. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 104.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 106 и SEQ ID NO: 107, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 102.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109 и SEQ ID NO: 110, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 104.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 106 и SEQ ID NO: 107) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109 и SEQ ID NO: 110) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения химерное антитело против CGRP является Ab11, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 104 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab11, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 101 и/или SEQ ID NO: 103 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab11 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab11, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab12.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCRAQSQSVYYNNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSNGDCVFGGGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 111).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCRAQSQSVYYNNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSNGDCVFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 112).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью

связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGV
 NPKRYASWAKGRFTISRDNKTTVYQLQMNLSRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTLTVSS
 (SEQ ID NO: 113).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGVNGKR
 YYASWAKGRFTISRDNKTTVYQLQMNLSRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTLTVSSASTK
 GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 114).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 117, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 112, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 118; SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 120, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 114, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 111 или SEQ ID NO: 112. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 113 или SEQ ID NO: 114.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 117, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 112.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 118; SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 120, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 114.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 117) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 118; SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 120) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения гуманизированное антитело против CGRP является Ab12, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 112 и SEQ ID NO: 114 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу

Ab12, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 111 и/или SEQ ID NO: 113 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab12 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab12, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab13.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

AIVMTQTPSSKSVPVGDTVTINCQASESLYNNNALAWFQQKPGQPPKRLIYDASKLASG
VPSRFSGGGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCGGYRSDSDGVAFAGGTEVVVKR (SEQ
ID NO: 121).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

AIVMTQTPSSKSVPVGDTVTINCQASESLYNNNALAWFQQKPGQPPKRLIYDASKLASG
VPSRFSGGGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCGGYRSDSDGVAFAGGTEVVVKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 122).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QSVEESGGGLVQPEGLTLTCTASGFDFSSNAMWWVRQAPGKGLEWIGIYNGD
GSTYYASWVNGRFSISKTSSTTVTLQLNSLTVADTATYYCARDL DLWGPGLTVTVSS
(SEQ ID NO: 123).

Настоящее изобретение также включает химерные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QSVEESGGGLVQPEGLTLTCTASGFDFSSNAMWWVRQAPGKGLEWIGIYNGDGSTY
YASWVNGRFSISKTSSTTVTLQLNSLTVADTATYYCARDL DLWGPGLTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 124).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 127, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 122, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 129; и SEQ ID NO: 130, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 124, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинации одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 121 или SEQ ID NO: 122. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 124.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладаю-

щие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 127, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 122.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 130, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 124.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 127) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 130) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения химерное антитело против CGRP является Ab13, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 124 и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном, варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab13, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 121 и/или SEQ ID NO: 123 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab13 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab13, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab14.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDVRTINCQASQNVYNNNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSRGDCVFVGGGKTKVEIKR (SEQ ID
NO: 131).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность легкой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

QVLTQSPSSLASVGDVRTINCQASQNVYNNNYLAWYQKPKGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSRGDCVFVGGGKTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 132).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность вариабельной области тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGS
DGKTYATWAKGRFTISRDNKSTTVYLQMNSLR AEDTAVYFCTRGDIGWGQGLTIVTSS
(SEQ ID NO: 133).

Настоящее изобретение также включает гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по отношению к CGRP, последовательность тяжелой цепи которых содержит последовательность, представленную ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGSDGKTY
 YATWAKGRFTISRDN SKTTVYLQMN SLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGT LVTVSSASTKG
 PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134).

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие одну или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 136 и SEQ ID NO: 137, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 132, и/или одной или более из полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 139 и SEQ ID NO: 140, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 134, или комбинации указанных полипептидных последовательностей. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела по изобретению или их фрагменты включают или, в качестве альтернативы, состоят из комбинаций одного или более из CDR, последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи и последовательностей тяжелой и легкой цепи, приведенных выше, включая все из них.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антитела, обладающего специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 131 или SEQ ID NO: 132. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полипептидной последовательности SEQ ID NO: 133 или SEQ ID NO: 134.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 136 и SEQ ID NO: 137, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 132.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 139 и SEQ ID NO: 140, которые соответствуют областям, определяющим комплементарность (CDR, или гипервариабельным областям) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 134.

Настоящее изобретение также рассматривает фрагменты антител, включающие один или более из фрагментов антител, описанных здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих фрагментов антител: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 136 и SEQ ID NO: 137) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131 и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 139 и SEQ ID NO: 140) вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133.

В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения гуманизованное антитело против CGRP является Ab14, включающее или, в качестве альтернативы, состоящее из SEQ ID NO: 132 и SEQ ID NO: 134, и обладающее по меньшей мере одной из биологических активностей, изложенных здесь.

В дополнительном, особенно предпочтительном варианте, воплощения настоящего изобретения фрагменты антител включают или, в качестве альтернативы, состоят из Fab-фрагментов (антигенсвязывающих фрагментов), обладающих специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab14, Fab-фрагмент включает последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131 и последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133. Указанный вариант воплощения настоящего изобретения дополнительно рассматривает добавления, делеции и варианты SEQ ID NO: 131 и/или SEQ ID NO: 133 в указанном Fab, при условии сохранения специфичности связывания с CGRP.

В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab14 (например, папаином). В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab14, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, систе-

мах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

В еще одном варианте воплощения фрагменты антител могут находиться в одной или более из следующих неограничивающих форм: Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и формы одноцепочечных Fv-антител. В предпочтительном варианте воплощения антитела против CGRP, описанные здесь, дополнительно включают последовательность константной каппа-области легкой цепи, включающую последовательность, представленную ниже:

VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
283).

В еще одном предпочтительном варианте воплощения антитела против CGRP, описанные здесь, дополнительно включают полипептидную последовательность константной гамма-1-области тяжелой цепи, включающую последовательность, представленную ниже:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKGVHPTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 284).

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение рассматривает выделенное антитело против CGRP, включающее последовательность V_H-полипептида, выбранную из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123 или 133, или ее вариант, и дополнительно включающее последовательность V_L-полипептида, выбранную из: SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121 или 131, или ее вариант, где один или более из каркасных остатков (FR-остатков) в указанном V_H- или V_L-полипептиде замещен остатком другой аминокислоты, что приводит к получению антитела против CGRP, специфически связывающего CGRP. Настоящее изобретение рассматривает гуманизированные и химерные формы указанных антител. Химерные антитела могут включать Fc, полученный из константных областей IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, IgG7, IgG8, IgG9, IgG10, IgG11, IgG12, IgG13, IgG14, IgG15, IgG16, IgG17, IgG18 или IgG19.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения, антитела или V_H- или V_L-полипептиды происходят или выбраны из одной или более популяций В-клеток кролика до начала процесса гуманизации, упомянутого здесь.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP и их фрагменты не обладают специфичностью связывания с CGRP-R. В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP и их фрагменты ингибируют связывание CGRP с CGRP-R. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP и их фрагменты ингибируют связывание CGRP с CGRP-R и/или его дополнительными белками и/или мультимерами и/или оказывают антагонистическое действие на их биологические эффекты.

Как указано здесь, антитела и их фрагменты можно модифицировать после трансляции путем добавления эффекторных групп, например химических линкеров, обнаруживаемых молекул, например, флуоресцентных красителей, ферментов, субстратов, биолюминесцентных материалов, радиоактивных материалов и хемилюминесцентных групп, или функциональных групп, например стрептавидина, авидина, биотина, цитотоксина, цитотоксического агента и радиоактивных материалов.

Антитела или их фрагменты также можно химически модифицировать с целью получения дополнительных преимуществ, например, повышенной растворимости, стабильности и времени циркуляции (период полужизни *in vivo*) полипептида, или пониженной иммуногенности (см. патент США № 4179337). Химические группы для модификации можно выбрать из водорастворимых полимеров, например, полиэтиленгликоля, сополимеров этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозы, декстрана, поливинилового спирта и т.п. Антитела и их фрагменты можно модифицировать по случайным положениям в пределах молекулы или в заданных положениях в пределах молекулы; они могут включать одну, две, три или более присоединенных химических групп.

Указанный полимер может обладать любой молекулярной массой и быть разветвленным или неразветвленным. Для полиэтиленгликоля предпочтительная молекулярная масса составляет от приблизительно 1 до приблизительно 100 кДа (термин "приблизительно" указывает, что в препаратах полиэтиленгликоля некоторые молекулы могут весить больше, некоторые - меньше установленной молекулярной массы) для простоты обращения и производства. Можно использовать другие размеры в зависимости от желательного терапевтического профиля (например, желательной продолжительности замедленного высвобождения, действия на биологическую активность, если таковое имеет место, простоты обращения, степени или отсутствия антигенности и других известных эффектов полиэтиленгликоля на терапевтический белок или его аналог). Например, полиэтиленгликоль может обладать средней молекуляр-

ной массой, приблизительно равной 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500, 13000, 13500, 14000, 14500, 15000, 15500, 16000, 16500, 17000, 17500, 18000, 18500, 19000, 19500, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000 или 100000 кДа. Разветвленные полиэтиленгликоли описаны, например, в патенте США № 5643575; Morpurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); и Caliceti et al., Bioconjug. Chem. 10:638-646 (1999), раскрытие каждого из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Существует несколько способов присоединения, доступных для специалистов в данной области техники, см., например, EP 0 401 384, включенный в настоящий документ посредством ссылки (присоединение ПЭГ к Г-КСФ), см. также Malik et al., Exp. Nematol. 20:1028-1035 (1992) (сообщение о пегилировании ГМ-КСФ с помощью трезилхлорида). Например, полиэтиленгликоль можно ковалентно связать через аминокислотные остатки с помощью реакционноспособной группы, например, свободной аминогруппы или карбоксильной группы. Реакционноспособные группы являются группами, с которыми можно связать молекулу активированного полиэтиленгликоля. Аминокислотные остатки, содержащие свободную аминогруппу, могут включать остатки лизина и остатки N-концевой аминокислоты; остатки, содержащие свободную карбоксильную группу, могут включать остатки аспарагиновой кислоты, остатки глутаминовой кислоты и остаток C-концевой аминокислоты. Кроме того, в качестве реакционноспособной группы для присоединения молекул полиэтиленгликоля можно использовать сульфгидрильные группы. Для терапевтических целей является предпочтительным присоединение к аминогруппе, например, к группе N-концевой аминокислоты или лизина.

Как указано выше, полиэтиленгликоль можно присоединить к белкам посредством связи с любым из ряда аминокислотных остатков. Например, полиэтиленгликоль можно связать с полипептидами посредством ковалентных связей с остатками лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты или цистеина. Одну или более реакционноспособных химических групп можно использовать для присоединения полиэтиленгликоля к специфическим аминокислотным остаткам (например, лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты или цистеина) или к аминокислотному остатку более чем одного типа (например, лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, цистеина и их комбинациям).

В качестве альтернативы, антитела или их фрагменты могут обладать повышенным временем полужизни *in vivo* за счет объединения с альбумином (включая, но не ограничиваясь, рекомбинантным человеческим сывороточным альбумином или его фрагментами или вариантами (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки)) или другими циркулирующими белками крови, например, трансферрином или ферритином. В предпочтительном варианте воплощения полипептиды и/или антитела по настоящему изобретению (включая их фрагменты или варианты) объединяют со зрелой формой человеческого сывороточного альбумина (т.е. аминокислотами 1-585 человеческого сывороточного альбумина, как показано на фиг. 1 и 2 патента EP 0322094), который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Полинуклеотиды, кодирующие гибридные белки по изобретению, также входят в рамки изобретения.

Что касается обнаруживаемых групп, другие типичные ферменты включают пероксидазу хрена, ацетилхолинэстеразу, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу и люциферазу, но не ограничиваются ими. Дополнительные типичные флуоресцентные материалы включают родамин, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, умбеллиферон, дихлортриазиниламин, фикоэритрин и дансилхлорид, но не ограничиваются ими. Дополнительные типичные хемилюминесцентные группы включают люминол, но не ограничиваются им. Дополнительные типичные биолюминесцентные материалы включают люциферин и экворин, но не ограничиваются ими. Дополнительные типичные радиоактивные материалы включают иод-125 (^{125}I), углерод-14 (^{14}C), серу-35 (^{35}S), тритий (^3H) и фосфор-32 (^{32}P), но не ограничиваются ими.

Что касается функциональных групп, типичные цитотоксические агенты включают метотрексат, аминоптерин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин; алкилирующие агенты, например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), митомицин С, ломустин (CCNU), 1-метилнитрозомочевину, циклофосфамид, хлорметин, бусульфан, дибромманнит, стрептозотозин, митомицин С, цис-дихлордиаминплатину (II) (DDP), цисплатин и карбоплатин (параплатин), антрациклины, включая даунорубицин (ранее дауномицин), доксорубицин (адриамицин), деторубицин, карминомицин, идарубицин, эпирубицин, митоксантрон и бисантрен; антибиотики, например дактиномицин (ранее актиномицин D), блеомицин, калихемицин, митрамицин и антрамицин (АМС); и антимиотические агенты, например алкалоиды барвинка, винкристин и винбластин, но не ограничиваются ими. Другие цитотоксические агенты включают паклитаксел (таксол), ризин, экзотоксин Pseudomonas, гемцитабин, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, этопозид, тенопозид, колхицин, дигидроксидантрацидион, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин, прокарабин, гидроксимочевину, аспарагиназу, кортикостероиды, митоган (O,P'-(DDD)), интерфероны и смеси указанных цитотоксических агентов.

Дополнительные цитотоксические агенты включают такие химиотерапевтические агенты как карбоплатин, цисплатин, паклитаксел, гемцитабин, калихеамицин, доксорубин, 5-фторурацил, митомицин С, актиномицин D, циклофосфамид, винкристин и блеомицин, но не ограничиваются ими. Токсичные ферменты растений и бактерий, например, рицин, дифтерийный токсин и токсин *Pseudomonas*, можно конъюгировать с гуманизированными или химерными антителами или их связывающими фрагментами с целью получения реагентов для уничтожения клеток определенного типа (Youle, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5483 (1980); Gilliland, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. JSA 77:4539 (1980); Krolick, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 5419 (1980)).

Другие цитотоксические агенты включают цитотоксические рибонуклеазы, как описано Goldenberg в патенте США № 6653104. Варианты воплощения настоящего изобретения также относятся к радиоиммуноконъюгатам, где радионуклид, излучающий альфа- или бета-частицы, стабильно присоединен к антителу или его связывающим фрагментам с использованием или без использования комплексообразователя. Такие радионуклиды включают бета-излучающие агенты, например, фосфор-32 (^{32}P), скандий-47 (^{47}Sc), медь-67 (^{67}Cu), галлий-67 (^{67}Ga), иттрий-88 (^{88}Y), иттрий-90 (^{90}Y), иод-125 (^{125}I), иод-131 (^{131}I), самарий-153 (^{153}Sm), лютеций-177 (^{177}Lu), рений-186 (^{186}Re) или рений-188 (^{188}Re), и альфа-излучающие агенты, например, астат-211 (^{211}At), свинец-212 (^{212}Pb), висмут-212 (^{212}Bi) или -213 (^{213}Bi) или актиний-225 (^{225}Ac).

В данной области техники известны способы конъюгирования антитела или его связывающего фрагмента с обнаруживаемой группой и т.п., например, способы, описанные в Hunter et al., Nature 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981) и Nygren, J., Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982).

Варианты воплощения, описанные здесь, дополнительно включают варианты и эквиваленты, практически гомологичные антителам, фрагментам антител, диатам, SMIP, камелизированным антителам, нанотелам, IgNAR, полипептидам, вариабельным областям и CDR, описанным здесь. Указанные варианты могут содержать, например, мутации консервативной замены (т.е. замены одной или более аминокислот на аналогичные аминокислоты). Например, консервативная замена относится к замене аминокислоты на другую аминокислоту, принадлежащую к тому же общему классу, например, одной кислой аминокислоты на другую кислую аминокислоту, одной основной аминокислоты на другую основную аминокислоту или одной нейтральной аминокислоты на другую нейтральную аминокислоту. Консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной области техники.

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение рассматривает полипептидные последовательности, обладающие по меньшей мере 90% или большей гомологией последовательности с любой одной или более из полипептидных последовательностей фрагментов антител, вариабельных областей и CDR, представленных здесь. Более предпочтительно, настоящее изобретение рассматривает полипептидные последовательности, обладающие по меньшей мере 95% или большей гомологией последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или большей гомологией последовательности, а еще более предпочтительно по меньшей мере 99% или большей гомологией последовательности с любой одной или более из полипептидных последовательностей фрагментов антител, вариабельных областей и CDR, представленных здесь. Способы определения гомологии между нуклеотидными и аминокислотными последовательностями хорошо известны специалистам в данной области техники.

В другом варианте воплощения настоящее изобретение дополнительно рассматривает вышеописанные полипептидные гомологи фрагментов антител, вариабельных областей и CDR, представленные здесь и дополнительно обладающие активностью против CGRP. Неограничивающие примеры активности против CGRP приведены ниже.

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение дополнительно рассматривает получение и применение антиидиотипических антител, связывающих любую из вышеуказанных последовательностей. В типичном варианте воплощения такое антиидиотипическое антитело можно ввести субъекту, получавшему антитело против CGRP, для регуляции, снижения или нейтрализации действия антитела против CGRP. Такие антиидиотипические антитела также можно применять для лечения аутоиммунного заболевания, характеризующегося наличием антител против CGRP. Другим примером применения таких антиидиотипических антител является обнаружение антител против CGRP по настоящему изобретению, например, для мониторинга уровней антител против CGRP, присутствующих в крови или других биологических жидкостях субъекта.

Настоящее изобретение также рассматривает антитела против CGRP, включающие любую из полипептидных или полинуклеотидных последовательностей, описанных здесь, замещенную на любую из других полинуклеотидных последовательностей, описанных здесь. Например, но не ограничиваясь этим, настоящее изобретение рассматривает антитела, включающие комбинацию любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, описанных здесь, и дополнительно рассматривает антитела, полученные в результате замещения любой из последовательностей CDR, описанных здесь, любой другой из последовательностей CDR, описанных здесь.

Дополнительные типичные варианты воплощения настоящего изобретения

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение рассматривает одно или более антител

против CGRP человека или фрагменты указанных антител, специфически связывающиеся с тем(и) же перекрывающимся(ися) линейным(и) или конформационным(и) эпитопом(ами) и/или конкурирующие за связывание с тем(и) же перекрывающимся(ися) линейным(и) или конформационным(и) эпитопом(ами) интактного полипептида CGRP человека или его фрагмента, что и антитело против CGRP человека, выбранное из Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12, Ab13 или Ab14. В предпочтительном варианте воплощения антитело против CGRP человека или его фрагмент специфически связывается с тем(и) же перекрывающимся(ися) линейным(и) или конформационным(и) эпитопом(ами) и/или конкурирует за связывание с тем(и) же перекрывающимся(ися) линейным(и) или конформационным(и) эпитопом(ами) интактного полипептида CGRP человека или его фрагмента, что и Ab3, Ab6, Ab13 или Ab14.

Предпочтительный вариант воплощения настоящего изобретения направлен на химерные или гуманизированные антитела и их фрагменты (в том числе Fab-фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP и ингибирующие биологическую активность, опосредованную связыванием CGRP с рецептором CGRP. В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения химерные или гуманизированные антитела против CGRP выбраны из Ab3, Ab6, Ab13 или Ab14.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения рассматривается способ снижения, лечения или профилактики заболеваний или нарушений, ассоциированных с CGRP, путем воздействия на указанную биологическую активность, опосредованную CGRP, тем самым избегая биологической активности, опосредованной связыванием CGRP с CGRP-R. В одном варианте воплощения заболевание или расстройство, ассоциированное с CGRP, является мигренью или другим расстройством, при котором CGRP вызывает боль, головную боль, рак, гиперактивность мочевого пузыря или потерю массы тела. Здесь представлен дополнительный нелимитирующий список заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP.

Еще один предпочтительный вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает применение последовательностей Fab-полипептидов для лечения мигрени и головных болей у пациента. Неограничивающие типы мигрени и головных болей, которые можно лечить с помощью последовательностей Fab-полипептидов, приведены в настоящем раскрытии.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело против CGRP человека является антителом, специфически связывающимся с теми же перекрывающимися линейными или конформационными эпитопами интактного полипептида CGRP или его фрагмента, который(е) специфически связывается(ются) с Ab3, Ab6, Ab13 или Ab14, согласно картированию эпитопов с использованием перекрывающихся линейных пептидных фрагментов, охватывающих всю длину нативного полипептида CGRP человека.

Настоящее изобретение также направлено на антитело против CGRP, связывающееся с тем же эпитопом CGRP и/или конкурирующее за связывание с CGRP с антителом против CGRP, что и антитело или фрагмент антитела, раскрытые здесь, включая антитело против CGRP, выбранное из Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12, Ab13 или Ab14, но не ограничиваясь им.

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение также направлено на выделенное антитело или фрагмент антитела против CGRP, включающее один или более из CDR, содержащихся в последовательностях V_H -полипептида, выбранных из: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123 или 133, или их варианта, и/или одного или более из CDR, содержащихся в последовательностях V_L -полипептида, выбранных из 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121 или 131, или их варианта.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело против CGRP человека, обсуждаемое в двух предыдущих абзацах, включает по меньшей мере 2 области, определяющие комплементарность (CDR) в каждой вариабельной области легкой и тяжелой цепи, идентичные областям, содержащимся в антителе против CGRP человека, выбранном из Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12, Ab13 или Ab14.

В предпочтительном варианте воплощения антитело против CGRP человека, обсуждаемое выше, включает по меньшей мере 2 области, определяющие комплементарность (CDR) в каждой вариабельной области легкой и тяжелой цепи, идентичные областям, содержащимся в Ab3 или Ab6. В еще одном варианте воплощения все CDR антитела против CGRP человека, обсуждаемого выше, идентичны CDR, содержащимся в антителе против CGRP человека, выбранном из Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12, Ab13 или Ab14. В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения все CDR антитела против CGRP человека, обсуждаемого выше, идентичны CDR, содержащимся в антителе против CGRP человека, выбранном из Ab3 или Ab6.

Настоящее изобретение также предусматривает, что одно или более из антител против CGRP человека, обсуждаемых выше, агликозилированы; что антитела содержат Fc-область, модифицированную с целью изменения эффекторной функции, времени полужизни, протеолиза и/или гликозилирования; что антитела являются антителами человека, гуманизированными, одноцепочечными или химерными; и являются гуманизированным антителом, происходящим от антитела кролика (исходного антитела) против CGRP человека.

Кроме того, изобретение рассматривает одно или более антител против CGRP человека, где каркас-

ные области (FR) в переменных областях легких и тяжелых цепей указанного антитела, соответственно, являются FR человека, немодифицированными или модифицированными путем замены одного или более остатков FR человека в переменных областях легких или тяжелых цепей соответствующими остатками FR исходного антитела кролика, и где указанные FR человека происходят от последовательностей переменных областей легких и тяжелых цепей антитела человека, выбранных из библиотеки последовательностей антител эмбрионального типа человека на основании высокого уровня их гомологии с соответствующими переменными областями легких или тяжелых цепей кролика по сравнению с другими последовательностями антител эмбрионального типа человека, содержащимися в библиотеке.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитело или фрагмент против CGRP человека специфически связывается с CGRP-экспрессирующими клетками человека и/или циркулирующими растворимыми молекулами CGRP *in vivo*, включая CGRP, экспрессированный на клетках или клетками человека у пациента при заболевании, ассоциированном с клетками, экспрессирующими CGRP.

В еще одном варианте воплощения указанное заболевание выбрано из мигреней (с аурой или без нее), потери массы тела, рака или опухолей, ангиогенеза, связанного с раковым или опухолевым ростом, ангиогенеза, связанного с выживанием рака или опухоли, гемиплегических мигреней, кластерных головных болей, мигренозной невралгии, хронических головных болей, головных болей напряжения, общих головных болей, "приливов", хронической пароксизмальной гемикрании, вторичных головных болей вследствие основной структурной проблемы в области головы или шеи, черепной невралгии, синусных головных болей (например, связанных с синуситом), головных болей или мигреней, вызванных аллергией, боли, воспалительной боли, боли в постоперационном разрезе, комплексного регионального болевого синдрома, раковой боли, боли при первичном или метастатическом раке костей, боли при переломе, хронической боли, боли при остеопорозном переломе, боли в результате ожога, остеопороза, подагрической боли в суставах, боли в животе, боли, связанной с кризисом серповидных клеток и другой ноцицептивной боли, а также гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, цирроза печени, нейрогенной боли, невропатической боли, ноцицептивной боли, невралгии тройничного нерва, постгерпетической невралгии, фантомной боли конечностей, фибромиалгии, менструальной боли, овариалгии, рефлекторной симпатической дистрофии, нейрогенной боли, боли при остеоартрите или ревматоидном артрите, боли в пояснице, диабетической невропатии, пояснично-крестцовом радикулите, или боли или висцеральной боли, связанной с: желудочно-пищеводным рефлюксом, диспепсией, синдромом раздраженного кишечника, раздраженной толстой кишкой, спазмами толстой кишки, слизистым колитом, воспалительным заболеванием кишечника, болезнью Крона, илеитом, язвенным колитом, почечной коликой, дисменореей, циститом, менструальным периодом, родами, менопаузой, простатитом, панкреатитом, почечной коликой, дисменореей, циститом, в том числе интерстициальным циститом (IC), операцией, связанной с кишечной непроходимостью, дивертикулитом, перитонитом, перикардитом, гепатитом, аппендицитом, колитом, холециститом, эндометриозом, хроническим и/или острым панкреатитом, инфарктом миокарда, боли в почках, плевральной боли, простатите, боли в области таза, травмы органа, хронической ноцицептивной боли, хронической невропатической боли, хронической воспалительной боли, фибромиалгии, приступа неконтролируемой боли и постоянной боли.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения указанное заболевание является раковой болью, возникающей в результате злокачественного новообразования или рака, предпочтительно выбранного из одного или более из: аденокарциномы железистой ткани, бластомы эмбриональной ткани органов, карциномы эпителиальной ткани, лейкоза в тканях, образующих клетки крови, лимфомы лимфатической ткани, миеломы костного мозга, саркомы в соединительной или опорной ткани, рака надпочечников, лимфомы, связанной со СПИДом, анемии, рака мочевого пузыря, рака костей, рака головного мозга, рака молочной железы, карциноидных опухолей, рака шейки матки, химиотерапии, рака толстой кишки, цитопении, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, рака головы, рака шеи, гепатобилиарного рака, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легких, лимфомы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, опухолей нервной системы, рака ротовой полости, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака кожи, рака желудка, рака яичка, рака щитовидной железы, рака уретры, рака костей, сарком соединительной ткани, рака костной ткани, рака кровеносных клеток, рака костного мозга, множественной миеломы, лейкоза, первичного или вторичного рака костей, опухолей, метастазирующих в кость, опухолей, прорастающих в нерв и полые органы, опухолей, расположенных возле нервных структур. Кроме того, в предпочтительном случае раковая боль включает висцеральную боль, предпочтительно висцеральную боль, возникающую в результате рака поджелудочной железы и/или метастазов в брюшную полость. Кроме того, в предпочтительном случае раковая боль включает соматическую боль, предпочтительно соматическую боль, вызванную одним или более из следующего: рака костей, метастазов в кости, послеоперационной раковой боли, сарком соединительной ткани, рака костной ткани, рака кровеносных клеток костного мозга, множественной миеломы, лейкоза, первичного или вторичного рака костей.

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает антитело или фрагменты против CGRP человека, непосредственно или косвенно присоединенные к обнаруживаемой метке или терапевтическому агенту.

Настоящее изобретение также рассматривает одну или более из нуклеотидных последовательно-

стей, приводящих к экспрессии антитела или фрагмента антитела против CGRP человека, как представлено выше, в том числе последовательностей, содержащих или, в качестве альтернативы, состоящих из предпочтительных кодонов дрожжей или человека. Настоящее изобретение также рассматривает векторы (в том числе плазмидные или рекомбинантные вирусные векторы), включающие указанную(ые) нуклеотидную(ые) последовательность(и). Настоящее изобретение также рассматривает клетки-хозяева или рекомбинантные клетки-хозяева, экспрессирующие по меньшей мере одно из антител, представленных выше, в том числе клетки млекопитающих, дрожжей, бактерий и насекомых. В предпочтительном варианте воплощения клетка-хозяин является дрожжевой клеткой. В другом предпочтительном варианте воплощения указанная дрожжевая клетка является диплоидной дрожжевой клеткой. В более предпочтительном варианте воплощения указанная дрожжевая клетка является клеткой дрожжей *Pichia*.

Настоящее изобретение также рассматривает способ лечения, включающий введение пациенту с заболеванием или состоянием, связанным с клетками, экспрессирующими CGRP, терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антитела или фрагмента против CGRP человека, описанного здесь. Настоящее изобретение также предусматривает, что указанный способ лечения может включать введение двух или более антител против CGRP или их фрагментов, раскрытых здесь. Если пациенту вводят более одного антитела, указанные множественные антитела можно вводить одновременно или согласованно, или со сдвигом по отношению друг к другу. Заболевания, которые можно лечить, представлены в неограничивающем списке, изложенном выше и в других разделах настоящего документа. В предпочтительном варианте воплощения указанное заболевание выбрано из мигрени, головной боли, потери массы тела, боли, раковой боли или невропатической боли. В еще одном варианте воплощения лечение дополнительно включает введение другого терапевтического агента или схемы лечения, выбранной из химиотерапии, лучевой терапии, введения цитокинов или генной терапии.

В неограничивающем варианте воплощения настоящего изобретения указанный другой терапевтический агент или схема лечения включает таксол (паклитаксел) или его производные, соединения платины, например, карбоплатин или цисплатин, антрациклины, например, доксорубин, алкилирующие агенты, например, циклофосфамид, антимаболиты, например 5-фторурацил, или этопозид.

Настоящее изобретение также рассматривает способ визуализации *in vivo*, обнаруживающий присутствие клеток, экспрессирующих CGRP, включающий введение диагностически эффективного количества по меньшей мере одного антитела против CGRP человека. В одном варианте воплощения указанное введение дополнительно включает введение радионуклида или флуорофора, что облегчает обнаружение антитела в очагах заболевания, экспрессирующих CGRP. В другом варианте воплощения результаты указанного способа визуализации *in vivo* используют для облегчения составления соответствующей схемы лечения, в том числе схем лечения, включающих лучевую терапию, химиотерапию или их комбинацию.

Антагонистическую по отношению к CGRP активность антител против CGRP по настоящему изобретению и их фрагментов, обладающих специфичностью связывания с CGRP, можно также описать по их силе связывания или их сродству к CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP по настоящему изобретению и их фрагменты, обладающие специфичностью связывания с CGRP, связываются с CGRP с константой диссоциации (K_D), меньшей или равной 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М или 10^{-13} М. Предпочтительно антитела против CGRP и их фрагменты связывают CGRP с константой диссоциации, меньшей или равной 10^{-11} М, 5×10^{-12} М или 10^{-12} М. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP по настоящему изобретению и их фрагменты, обладающие специфичностью связывания с CGRP, связываются с линейным или конформационным эпитопом CGRP.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антагонистическая по отношению к CGRP активность антител против CGRP по настоящему изобретению и их фрагментов, обладающих специфичностью связывания с CGRP, характеризуется связыванием с CGRP со скоростью диссоциации, меньшей или равной 10^{-4} с⁻¹, 5×10^{-5} с⁻¹, 10^{-5} с⁻¹, 5×10^{-6} с⁻¹, 10^{-6} с⁻¹, 5×10^{-7} с⁻¹ или 10^{-7} с⁻¹.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения антагонистическая по отношению к CGRP активность антител против CGRP по настоящему изобретению и их фрагментов, обладающих специфичностью связывания с CGRP, характеризуется проявлением активности против CGRP путем предотвращения, облегчения или снижения симптомов или, в качестве альтернативы, лечения заболеваний или расстройств, ассоциированных с CGRP. Здесь представлены неограничивающие примеры заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP.

Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител против CGRP

Антитело Ab1.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность вариативной области легкой цепи SEQ ID NO: 1:

CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAG
 TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAAGAGTGTATTGATAACAACCTACCTAGCCTGGT
 ATCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGG
 CATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCA
 CCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATG
 ATTGTAGTAGTGGTGATTGTTTTGTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
 GT (SEQ ID NO: 141).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2:

CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAG
 TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAAGAGTGTATTGATAACAACCTACCTAGCCTGGT
 ATCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGG
 CATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCA
 CCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATG
 ATTGTAGTAGTGGTGATTGTTTTGTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
 GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
 CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAG
 TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAACA
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
 AGCAGACTACGAGAAACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA
 GCTCGCCCGTCAAAAAGAGTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 142).

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по настоящему изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3:

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTCAACGCTGGGACACCCCTGA
 CACTCACCTGCACAGTCTCTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTATTAATGATAAC
 ACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGCCTCGTCGAC
 CACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT
 GTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGCACCCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID
 NO: 143).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 4:

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTCAACGCTGGGACACCCCTGA
 CACTCACCTGCACAGTCTCTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTATTAATGATAAC
 ACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGCCTCGTCGAC
 CACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT
 GTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGCACCCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCC
 ACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCT
 GTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGTGTCTACAGTC
 CTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC
 CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
 GAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTG
 AACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCA
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
 CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCG
 TCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
 GCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA

ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
 GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGA
 CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
 GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
 AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 144).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 146 и SEQ ID NO: 147, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 1 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 2.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 148; SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 150, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 4.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 141, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 1; полинуклеотида SEQ ID NO: 142, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2; полинуклеотида SEQ ID NO: 143, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3; полинуклеотида SEQ ID NO: 144, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 4; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 146 и SEQ ID NO: 147) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 1 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 2 и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 148; SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 150) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 4.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab1, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab1, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 142, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2, и полинуклеотида SEQ ID NO: 144, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 4.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab1 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab1, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab1 в клетках млекопитающих, например клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab2.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11:

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
 CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATTATGATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
 TCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
 ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTAAGTGTCTAGGCAGTTATGA
 TTGTAGTAGTGGTATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACG
 T (SEQ ID NO: 151).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 12:

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
 CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATTATGATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
 TCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
 ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTAAGTGTCTAGGCAGTTATGA
 TTGTAGTAGTGGTATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACG
 TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTA
 CAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCCAGGAGAGTGTACAGAGA
 GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCGTGTAGCAAA
 CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGC
 TCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 152).

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность вариативной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13:

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
 TCCGTCAAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTATCAATGAT
 AACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
 ATTTCTGTCTAGAGGGGACATCTGGGGCAAGGGACCCTCGTACCGTCTCGAGCG
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCAAAGACACCTCTG
 GGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
 GTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTTA
 CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
 CAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAG
 CACTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACA
 CCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCCGTAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCCTGTGGTCAAGCCTCT
 CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCA
 ACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 GGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGACGCCGAGAAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACT
 CCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
 AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 153).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 14:

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
 TCCGTCAAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTATCAATGAT
 AACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
 ATTTCTGTCTAGAGGGGACATCTGGGGCAAGGGACCCTCGTACCGTCTCGAGCG
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCAAAGACACCTCTG
 GGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
 GTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTTA
 CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
 CAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAG
 CACTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACA
 CCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCCGTAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCCTGTGGTCAAGCCTCT
 CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCA
 ACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 GGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGACGCCGAGAAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACT
 CCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
 AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 154).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 156 и SEQ ID NO: 157, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплемен-

тарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 12.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 159 и SEQ ID NO: 160, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 14.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 151, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11; полинуклеотида SEQ ID NO: 152, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 12; полинуклеотида SEQ ID NO: 153, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13; полинуклеотида SEQ ID NO: 154, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 14; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 156 и SEQ ID NO: 157) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 11 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 12; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 159 и SEQ ID NO: 160) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 14.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab2, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab2, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 152, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 12, и полинуклеотида SEQ ID NO: 154, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 14.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab2 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab2, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab2 в клетках млекопитающих, например клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab3.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21:

```

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTTCAGAGTGTATTATGATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
TCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAGTTATGA
TTGTAGTAGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACG
T (SEQ ID NO: 161).

```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 22:

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
 CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATGATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
 TCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
 ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTATTACTGTCTAGGCAGTTATGA
 TTGTAGTAGTGGTATTGTTTGTTCGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACG
 TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAACCTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTA
 CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA
 GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG
 CAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGC
 TCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 162).

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23:

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
 TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCCGAGTCAATGGTATCAATGAT
 AACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
 ATTTCTGTGTAGAGGGGACATCTGGGGCAAGGGACCCCTCGTACCCTCTCGAGC
 (SEQ ID NO: 163).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 24:

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
 TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCCGAGTCAATGGTATCAATGAT
 AACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
 ATTTCTGTGTAGAGGGGACATCTGGGGCAAGGGACCCCTCGTACCCTCTCGAGCG
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTG
 GGGGCACAGCGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
 GTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTA
 CAGTCCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGTGGGA
 CGCGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTCCAGCAG
 CACTGAACTCCTGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACA
 CCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCC
 AAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCA
 CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCA
 ACAAGCCCTCCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACT
 CCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
 AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 164).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 166 и SEQ ID NO: 167, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гиперварибельные области) последовательности варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 22.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 169 и SEQ ID NO: 170, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гиперварибельные области) последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 24.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 161, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21; полинуклеотида SEQ ID NO: 162, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 22; полинуклеотида SEQ ID NO: 163, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23; полинуклеотида SEQ ID NO: 164, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 24; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 166 и SEQ ID NO: 167) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 22; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 169 и SEQ ID NO: 170) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 24.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab3, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab3, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 162, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 22, и полинуклеотида SEQ ID NO: 164, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 24.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab3 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab3, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab3 в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab4.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31:

```
CAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAG
TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGT
ATCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCCAAACAACCTGATCTATGATGCATCCACTCTG
GCGTCTGGGGTCCCATCGCGGTTCCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTC
ACCATCAGCGGCGTGCAGTGTAAACGATGCTGCCGCTTACTACTGTCTGGGCAGTTAT
GATTGTAATAATGGTGATTGTTTTGTTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAA
CGT (SEQ ID NO: 171).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 32:

```
CAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAG
TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGT
ATCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCCAAACAACCTGATCTATGATGCATCCACTCTG
GCGTCTGGGGTCCCATCGCGGTTCCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTC
ACCATCAGCGGCGTGCAGTGTAAACGATGCTGCCGCTTACTACTGTCTGGGCAGTTAT
GATTGTAATAATGGTGATTGTTTTGTTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACCTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGGAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCCAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 172).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33:

```
CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGA
CACTCACCTGTTCCGTCTCTGGCATCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTATTAATGGTGCC
ACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCGAC
CACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACSTATTCT
GTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGGCACCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID
NO: 173).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 34:

```
CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGA
CACTCACCTGTTCCGTCTCTGGCATCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTATTAATGGTGCC
ACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCGAC
CACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACSTATTCT
GTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGGCACCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCC
ACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACCGGTGACGGTGT
GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGT
CTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCAC
CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGA
GAGTTGAGCCCAAACTTGTGACAAAATCACAATGCCACCGTGGCCAGCACCTG
AACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCA
TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAA
GCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAG
AGCAATGGGCAGCCGAGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGA
CGGCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 174).
```

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 175; SEQ ID NO: 176 и SEQ ID NO: 177, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гиперварибельные области) последовательности варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 32.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 179 и SEQ ID NO: 180, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гиперварибельные области) последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 34.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 171, кодирующего последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31; полинуклеотида SEQ ID NO: 172, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 32; полинуклеотида SEQ ID NO: 173, кодирующего последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33; полинуклеотида SEQ ID NO: 174, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 34; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 175; SEQ ID NO: 176 и SEQ ID NO: 177) последовательности варибельной

области легкой цепи SEQ ID NO: 31 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 32; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 179 и SEQ ID NO: 180) последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 34.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab4, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab4, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 172, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 32 и полинуклеотида SEQ ID NO: 174, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 34.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab4 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab4, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab4 в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab5.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTA
TCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATGATGCATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTATTACTGTCTGGGCAGTTATG
ATTGTAATAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGAAATCAAAC
GT (SEQ ID NO: 181).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 42:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTA
TCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATGATGCATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTATTACTGTCTGGGCAGTTATG
ATTGTAATAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGAAATCAAAC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTATCCAGAGAGGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCSACA
GAGCAGGACAGCAAAGCAGCAGCCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAACASAAAGTCTACGCTCGGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 182).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43:

```
GAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCC
TGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGG
TCCGTCCAGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTATTAATGGT
GCCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
ATTTCTGTCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGACCCTCGTACCCTCTCGAGC
(SEQ ID NO: 183).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 44:

```
GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGG
TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCATTGGTATTAATGGT
GCCACATACTACCGGAGCTGGGGCGAAAGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
ATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACG
GTGTCGTGGAACCTAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTA
CAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG
CACCTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAAACCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG
AAGACCCTGAGGTCAAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCT
CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCCAGCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTCTGGACT
CCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
AGAAGAGCCTTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 184).
```

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 185; SEQ ID NO: 186 и SEQ ID NO: 187, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 42.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 188; SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 190, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 44.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 181, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41; полинуклеотида SEQ ID NO: 182, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 42; полинуклеотида SEQ ID NO: 183, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43; полинуклеотида SEQ ID NO: 184, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 44; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 185; SEQ ID NO: 186 и SEQ ID NO: 187) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 41 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 42; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 188; SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 190) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 44.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab5, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab5, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 182, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 42, и полинуклеотида SEQ ID NO: 184, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 44.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab5 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab5, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab5 в клетках млекопитающих, например клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab6.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTA
TCAGCAGAAACCAGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATGATGCATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATG
ATTGTAATAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAATCAAAC
GT (SEQ ID NO: 191).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTA
TCAGCAGAAACCAGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATGATGCATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATG
ATTGTAATAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAATCAAAC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAAGTGCCTGTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCAACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 192).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53:

```
GAGGTGCAGTCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGG
TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTATTAATGGT
GCCACATACTACGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
ATTTCTGTGCTAGAGGGACATCTGGGGCCAAGGACCCCTGTCACCGTCTCGAGC
(SAQ ID NO: 193).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 54:

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGG
 TCCGTCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTATTAATGGT
 GCCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
 ATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGACCCCTCGTCACCGTCTCGAGCG
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTG
 GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
 GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTA
 CAGTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGA
 CGCGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG
 CACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACA
 CCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCT
 CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCA
 ACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 GGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACT
 CCGACGGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
 AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 194).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 196 и SEQ ID NO: 197, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 200, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 54.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 191, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51; полинуклеотида SEQ ID NO: 192, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52; полинуклеотида SEQ ID NO: 193, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53; полинуклеотида SEQ ID NO: 194, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 54; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 196 и SEQ ID NO: 197) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 51 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52 и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 200) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 53 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 54.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab6, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab6, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 192, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52, и полинуклеотида SEQ ID NO: 194, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 54.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках

CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например клеток дрожжей, например дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab6 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab6, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab6 в клетках млекопитающих, например клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab7.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61:

```
CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAG
TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATAATTACAACCTTGCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCTCATCGCGATTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCA
CCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATG
ACTGTAGTACTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
```

GT (SEQ ID NO: 201).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 62:

```
CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAG
TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATAATTACAACCTTGCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCTCATCGCGATTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCA
CCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATG
ACTGTAGTACTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAAGTGCCTCTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGCACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 202).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63:

```
CAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGGGGTGCCTGGTCAAGCCTGGGACATCCC
TGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCGTTGGTATTAATGGT
CGCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGTC
GACCACGGTGGATCTGAAAATGACCAGGCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATT
TCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGCACCTGGTCAACCGTCTCGAGC (SEQ
ID NO: 203).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 64:

```
CAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGGGGTGCCTGGTCAAGCCTGGGACATCCC
TGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCGTTGGTATTAATGGT
```

CGCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGTC
 GACCACGGTGGATCTGAAAATGACCAGGCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATT
 TCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGCACCCTGGTACCCTCTCGAGCGCCT
 CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG
 GCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGGTGTCTACAG
 TCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
 ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
 GAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCAC
 CTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCC
 TCATGATCTCCCAGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA
 GACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
 GACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCCTGTGGTCAAGCTCCTCA
 CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC
 AAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
 TCAGCCTGACCTGGTCAAAGGCTTATCCCAGCAGCATGCGCGTGGAGTGGG
 AGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCC
 GACGGTCTTCTTCTCTACAGCAAGTCAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGAGCA
 GGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 204).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 205; SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 207, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 62.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 208; SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 210, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 64.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 201, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61; полинуклеотида SEQ ID NO: 202, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 62; полинуклеотида SEQ ID NO: 203, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63; полинуклеотида SEQ ID NO: 204, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 64; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 205; SEQ ID NO: 206 и SEQ ID NO: 207) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 61 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 62; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 208; SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 210) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 63 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 64.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab7, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab7, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 202, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 62, и полинуклеотида SEQ ID NO: 204, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 64.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab7 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте

воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab7, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab7 в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или НЕК 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab8.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71:

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTACAATTACAACCTACCTTGCCTGGTA
TCAGCAGAAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGA
TTGTAGTACTGGTGATTGTTTGTTCGCGCGAGGAACCAAGGTGGAATCAAACG
T (SEQ ID NO: 211).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 72:

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTACAATTACAACCTACCTTGCCTGGTA
TCAGCAGAAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGA
TTGTAGTACTGGTGATTGTTTGTTCGCGCGAGGAACCAAGGTGGAATCAAACG
TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG
CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC
TCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 212).

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73:

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGG
TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCGTTGGTATCAATGGT
CGCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
ATTTCTGTGCTAGAGGGACATCTGGGGCCAAGGACCCCTCGTCACCGTCTCGAGC
(SEQ ID NO: 213).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 74:

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAACTACATGCAATGGG
 TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTTCGTTGGTATCAATGGT
 CGCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
 ATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCG
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTG
 GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTGACG
 GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTA
 CAGTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
 CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG
 CACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACA
 CCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG
 AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACGCCAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCT
 CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCA
 ACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 GGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
 GGAGAGCAATGGGAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACT
 CCGACGGTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 AGAAGAGCCTCCTCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 214).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 215; SEQ ID NO: 216 и SEQ ID NO: 217, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 72.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 220, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 74.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 211, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71; полинуклеотида SEQ ID NO: 212, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 72; полинуклеотида SEQ ID NO: 213, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73; полинуклеотида SEQ ID NO: 214, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 74; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 215; SEQ ID NO: 216 и SEQ ID NO: 217) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 71 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 72; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 220) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 73 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 74.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab8, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab8, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 212, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 72 и полинуклеотида SEQ ID NO: 214, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 74.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например клеток дрожжей, например дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не

ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab8 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab8, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab8 в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab9.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81:

```
CAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAG
TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAATGTTTATAATAACAACCTACCTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACGTCCACTCTGG
CATCTGGGGTCTCATCGCGATTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCA
CCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATG
ATTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
GT (SEQ ID NO: 221).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 82:

```
CAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAG
TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAATGTTTATAATAACAACCTACCTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACGTCCACTCTGG
CATCTGGGGTCTCATCGCGATTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCA
CCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATG
ATTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAG
TACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 222).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83:

```
CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGA
CACTACCTGCACAGTCTCTGGAATCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAGTGGGTCC
GCCAGTCTCCAGGGAGGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTAGTGATGGTAAAG
ACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGCCGATTCACCATCTCCAAGACCTCGTCGAC
CACGGTGGATCTGAGAATGGCCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT
GTACCAGAGGGGACATCTGGGCCCCGGGACCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID
NO: 223).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 84:

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTACGCCTGGGACACCCCTGA
 CACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAGTGGGTCC
 GCCAGTCTCCAGGGAGGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTAGTGATGGTAAG
 ACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAGACCTCGTCGAC
 CACGGTGGATCTGAGAATGGCCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT
 GTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGGACCCCTCGTACCCGTCTCGAGCGCCTCC
 ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
 GTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCCGGTGTCTACAGTC
 CTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCAC
 CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
 GAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCACGACCTG
 AACTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCA
 TGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
 CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCCACCG
 TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
 GCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
 GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGA
 CGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
 GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGA
 AGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 224).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 225; SEQ ID NO: 226 и SEQ ID NO: 227, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 82.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 229 и SEQ ID NO: 230, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 84.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 221, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81; полинуклеотида SEQ ID NO: 222, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 82; полинуклеотида SEQ ID NO: 223, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83; полинуклеотида SEQ ID NO: 224, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 84; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 225; SEQ ID NO: 226 и SEQ ID NO: 227) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 81 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 82; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 229 и SEQ ID NO: 230) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 83 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 84.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab9, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab9, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 222, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 82, и полинуклеотида SEQ ID NO: 224, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 84.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например клетках

CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab9 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab9, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab9 в клетках млекопитающих, например клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab10.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 91:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAATGTTACAATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
TCAGCAGAAAACCAGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGA
TTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAATCAAACG
T (SEQ ID NO: 231).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 92:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAATGTTACAATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
TCAGCAGAAAACCAGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGA
TTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAATCAAACG
TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG
CAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGC
TCGCCCCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 232).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93:

```
GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCC
TGAGACTCTCTGTGCAGTCTTGAAATCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCCGAGTCATTGGTAGTGATGGT
AAGACATACTACGCGACCTGGGCGAAAAGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAATC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
ATTTCTGTACCAGAGGGACATCTGGGGCAAGGGACCCTCGTACCCGCTCGAGC
(SEQ ID NO: 233).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 94:

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
 TCCGTCAAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGTCAATTGGTAGTGATGGT
 AAGACATACTACGCGACCTGGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAATC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGTGTGT
 ATTTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGACCCCTCGTACCCGTCTCGAGC
 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
 GGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCT
 ACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
 GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGG
 ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCA
 GCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
 TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 AACAAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACC
 AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 234).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 236 и SEQ ID NO: 237, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 91 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 92.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 238; SEQ ID NO: 239 и SEQ ID NO: 240, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 94.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 231, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 91; полинуклеотида SEQ ID NO: 232, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93; полинуклеотида SEQ ID NO: 234, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 94; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 236; и SEQ ID NO: 237) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 91 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 92; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 238; SEQ ID NO: 239 и SEQ ID NO: 240) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 93 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 94.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab10, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab10, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 232, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 92, и полинуклеотида SEQ ID NO: 234, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 94.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например клетках

CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab10 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab10, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab10 в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab11.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101:

```
CAGGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTCCAGCTGTGGGAAGCACAG
TCACCATCAATTGCCGGGCCAGTCAGAGTGTATTATAACAACACTACCTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCA
CCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATG
ATTGTAGTAATGGTGATTGTTTGTTCGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
GT (SEQ ID NO: 241).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 102:

```
CAGGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTCCAGCTGTGGGAAGCACAG
TCACCATCAATTGCCGGGCCAGTCAGAGTGTATTATAACAACACTACCTAGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCA
CCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATG
ATTGTAGTAATGGTGATTGTTTGTTCGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAACCTGCCTCTGTGTGTGCTGTGAATAAATTCTATCCAGAGAGGCCAALAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 242).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103:

```
CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCTGGTACGCCTGGAGGATCCCTGA
CACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACGTCACCTAACTACTATATGCAATGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTGTGAATGGTAAAG
AGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGAC
CACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT
GTGCCAGAGGCGACATCTGGGGCCCGGGGACCCCTGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID
NO: 243).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 104:

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGAGGATCCCTGA
 CACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACGTCACTAACTACTATATGCAATGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTGTGAATGGTAAG
 AGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGTCGAC
 CACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT
 GTGCCAGAGGCGACATCTGGGGCCCGGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCC
 ACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC GG TGACGGTGTG
 GTGGAACCTCAGGCGCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTC
 CTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCAC
 CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
 GAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTCCCAGCACCTG
 AACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCGCAAAACCAAGGACACCCCTCA
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGAC
 CCTGAGGTCAAAGTCAACTGGTACGTGGACGGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCAGTACCGTGTGGTCCAGCGTCTCACCG
 TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAA
 GCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
 GCCTGACCTGCCTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCCTGGAGTGGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGA
 CGGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
 GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGA
 AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 244).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 245; SEQ ID NO: 246 и SEQ ID NO: 247, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 102.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 248; SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 250, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 104.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 241, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101; полинуклеотида SEQ ID NO: 242, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 102; полинуклеотида SEQ ID NO: 243, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103; полинуклеотида SEQ ID NO: 244, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 104; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 245; SEQ ID NO: 246 и SEQ ID NO: 247) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 101 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 102; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 248; SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 250) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 103 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 104.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab11, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab11, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 242, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 102, и полинуклеотида SEQ ID NO: 244, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 104.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, напри-

мер, клеток дрожжей, например дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab11 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab11, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab11 в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или НЕК 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab12.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCGGGCCAGTCAGAGTGTTACTATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
TCAGCAGAAAACCAGGGAAGTTCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGA
TTGTAGTAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGAAATCAAACG
T (SEQ ID NO: 251).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 112:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCGGGCCAGTCAGAGTGTTACTATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
TCAGCAGAAAACCAGGGAAGTTCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGA
TTGTAGTAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGAAATCAAACG
TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTATCCAGAGAGGCCAAAAGTA
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGGA
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAAG
CAGACTACGAGAAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC
TCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 252).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113:

```
GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGACGTCACTAACTACTACATGCAATGGG
TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATTGGTGTGAATGGT
AAGAGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGTGTGT
ATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGACCCTCGTCAACGCTCTCGAGC
(SAQ ID NO: 253).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 114:

```
GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGACGTCACTAACTACTACATGCAATGGG
TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATTGGTGTGAATGGT
AAGAGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGTGTGT
ATTTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGACCCTCGTCAACGCTCTCGAGC
GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCTCAAGGACTACTCCCGAACCAGGTGAC
```

GGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCTCT
 ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
 GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAAGCAACACCAAGGTGG
 ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
 GCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 СААGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCTCC
 TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 АСAАAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC
 AGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAGC
 TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 254).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 255; SEQ ID NO: 256 и SEQ ID NO: 257, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 112.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259 и SEQ ID NO: 260, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 114.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 251, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111; полинуклеотида SEQ ID NO: 252, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 112; полинуклеотида SEQ ID NO: 253, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113; полинуклеотида SEQ ID NO: 254, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 114; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 255; SEQ ID NO: 256 и SEQ ID NO: 257) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 111 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 112; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259 и SEQ ID NO: 260) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 113 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 114.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab12, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab12, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 252, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 112, и полинуклеотида SEQ ID NO: 254, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 114.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab12 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab12, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab12 в клетках млекопитающих, например клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других

штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab13.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121:

```
GCCATCGTGATGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGACAC
AGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAGTCTTTATAATAACAACGCCTTGGCCTG
GTTTCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGATCTATGATGCATCCAAACT
GGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGTGCGGTTGGGTCTGGGACACAGTTCACCTCT
CACCATCAGTGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGGAGGCTACAG
AAGTGATAGTGTGATGGTGTGCTTTCGCCGGAGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
GT (SEQ ID NO: 261).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 122:

```
GCCATCGTGATGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGACAC
AGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAGTCTTTATAATAACAACGCCTTGGCCTG
GTTTCAGCAGAAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGATCTATGATGCATCCAAACT
GGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGTGCGGTTGGGTCTGGGACACAGTTCACCTCT
CACCATCAGTGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGGAGGCTACAG
AAGTGATAGTGTGATGGTGTGCTTTCGCCGGAGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC
GTACGGTGGTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAACTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 262).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123:

```
CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGA
CACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTGCACTTCAGTAGCAATGCAATGTGGTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTTACAATGGTGATGGC
AGCACATACTACGCGAGCTGGGTGAATGGCCGATTCTCCATCTCCAAAACCTCGTCG
ACCACGGTGACTCTGCAACTGAATAGTCTGACAGTCCGCGACACGGCCACGTATTAT
TGTGCGAGAGATCTTGACTTGTGGGGCCCGGGCACCCCTGTCACCGTCTCGAGC
(SEQ ID NO: 263).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 124:

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGA
 CACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTGACTTCAGTAGCAATGCAATGTGGTGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTTACAATGGTGTATGGC
 AGCACATACTACGCGAGCTGGGTGAATGGCCGATTCTCCATCTCCAAAACCTCGTCG
 ACCACGGTGACTCTGCAACTGAATAGTCTGACAGTCCGGACACGGCCACGTATTAT
 TGTGCGAGAGATCTTGACTTGTGGGGCCCGGCACCCCTCTCACCCGTCTCGAGCGCC
 TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGT
 GTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACA
 GTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGG
 CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACAATGCCACCCGTGCCAGCA
 CCTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACC
 CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
 AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTC
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
 CAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCAGCCCC
 GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAAACAATAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTC
 CGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
 AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 264).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 265; SEQ ID NO: 266 и SEQ ID NO: 267, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 122.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 268; SEQ ID NO: 269 и SEQ ID NO: 270, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 124.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 261, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121; полинуклеотида SEQ ID NO: 262, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123; полинуклеотида SEQ ID NO: 264, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 124; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 265; SEQ ID NO: 266 и SEQ ID NO: 267) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 121 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 122; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 268; SEQ ID NO: 269 и SEQ ID NO: 270) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 123 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 124.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab13, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab13, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 262, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 122, и полинуклеотида SEQ ID NO: 264, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 124.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*,

но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab13 (например, папаином), после экспрессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab13, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab13 в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

Антитело Ab14.

Настоящее изобретение также направлено на полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антител, обладающих специфичностью связывания с CGRP. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAATGTTTACAATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
TCAGCAGAAAACCCAGGAAAGTTCCSTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGCCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGA
TTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAATCAAACG
```

T (SEQ ID NO:271).

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 132:

```
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAATGTTTACAATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
TCAGCAGAAAACCCAGGAAAGTTCCSTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGCCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGA
TTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAATCAAACG
TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACCTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTA
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGCACAGA
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG
CAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC
TCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 272).
```

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133:

```
GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTAGTGATGGT
AAGACATACTACGCGACCTGGGCGAAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGTGTGT
ATTTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC
(SEQ ID NO: 273).
```

В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из следующей полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 134:

```
GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAATCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTAGTGATGGT
```

AAGACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
 ATTTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGACCCCTCGTCACCGTCTCGAGC
 GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCGAACCCTGTGAC
 GGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTCT
 ACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
 GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGG
 ACGCGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
 GCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
 CAAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
 TCACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC
 AGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
 TCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 274).

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 275; SEQ ID NO: 276 и SEQ ID NO: 277, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 132.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антитела, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одной или более полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 278; SEQ ID NO: 279 и SEQ ID NO: 280, соответствующих полинуклеотидам, кодирующим области, определяющие комплементарность (CDR, или гипервариабельные области) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 134.

Настоящее изобретение также рассматривает полинуклеотидные последовательности, включающие одну или более из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты антител, описанные здесь. В одном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды, кодирующие фрагменты антител, обладающие специфичностью связывания с CGRP, включают или, в качестве альтернативы, состоят из одного, двух, трех или более, в том числе всех следующих полинуклеотидов, кодирующих фрагменты антител: полинуклеотида SEQ ID NO: 271, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131; полинуклеотида SEQ ID NO: 272, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 132; полинуклеотида SEQ ID NO: 273, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133; полинуклеотида SEQ ID NO: 274, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 134; полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 275; SEQ ID NO: 276 и SEQ ID NO: 277) последовательности вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 131 или последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 132; и полинуклеотидов, кодирующих области, определяющие комплементарность (SEQ ID NO: 278; SEQ ID NO: 279 и SEQ ID NO: 280) последовательности вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 133 или последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 134.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения полинуклеотиды по изобретению включают или, в качестве альтернативы, состоят из полинуклеотидов, кодирующих Fab-фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты), обладающие специфичностью связывания с CGRP. По отношению к антителу Ab14, полинуклеотиды, кодирующие полноразмерное антитело Ab14, включают или, в альтернативном случае, состоят из полинуклеотида SEQ ID NO: 272, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 132, и полинуклеотида SEQ ID NO: 274, кодирующего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 134.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения рассматривает указанные полинуклеотиды, внедренные в экспрессирующий вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO, HEK 293, или системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей, например, дрожжей *Pichia*. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им. В одном варианте воплощения изобретения, описанном здесь (ниже), Fab-фрагменты можно получить путем ферментативного гидролиза Ab14 (например, папаином), после экс-

прессии указанных полноразмерных полинуклеотидов в подходящем хозяине. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, например Ab14, или их Fab-фрагменты можно продуцировать путем экспрессии полинуклеотидов Ab14 в клетках млекопитающих, например, клетках CHO, NSO или HEK 293, системах на основе клеток грибов, насекомых или микроорганизмов, например, клеток дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей. Подходящие виды *Pichia* включают вид *Pichia pastoris*, но не ограничиваются им.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность V_H антитела против CGRP, выбранную из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123 или 133, или кодирующий ее вариант, где по меньшей мере один каркасный остаток (FR-остаток) замещен аминокислотой, присутствующей в соответствующем положении V_H -полипептида антитела кролика против CGRP, или путем консервативной аминокислотной замены.

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, включающий полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность V_L антитела против CGRP 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121 или 131, или кодирующую ее вариант, где по меньшей мере один каркасный остаток (FR-остаток) замещен аминокислотой, присутствующей в соответствующем положении V_L -полипептида антитела кролика против CGRP, или путем консервативной аминокислотной замены.

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение направлено на один или более гетерологичных полинуклеотидов, включающих последовательность, кодирующую полипептиды, содержащиеся в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 63; SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 73; SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 83; SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 93; SEQ ID NO: 101 и SEQ ID NO: 103; SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113; SEQ ID NO: 121 и SEQ ID NO: 123; или SEQ ID NO: 131 и SEQ ID NO: 133.

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение направлено на выделенный полинуклеотид, экспрессирующий полипептид, содержащий по меньшей мере один CDR-полипептид, происходящий от антитела против CGRP, причем указанный экспрессированный полипептид сам по себе специфически связывает CGRP или специфически связывает CGRP при экспрессии в сочетании с еще одной полинуклеотидной последовательностью, экспрессирующей полипептид, содержащий по меньшей мере один CDR-полипептид, происходящий от антитела против CGRP, причем указанный по меньшей мере один CDR выбран из CDR, содержащихся в V_L - или V_H -полипептидах SEQ ID NO: 1, 3, 11, 13, 21, 23, 31, 33, 41, 43, 51, 53, 61, 63, 71, 73, 81, 83, 91, 93, 101, 103, 111, 113, 121, 123, 131 или SEQ ID NO: 133.

Кроме того, рассматриваются клетки-хозяева и векторы, включающие указанные полинуклеотиды.

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает векторы, включающие полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей, а также отдельные области, определяющие комплементарность (CDR или гипервариабельные участки), как изложено здесь, а также клетки-хозяева, включающие последовательности указанных векторов. В одном варианте воплощения настоящего изобретения клетка-хозяин является дрожжевой клеткой. В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения указанная дрожжевая клетка-хозяин принадлежит к роду *Pichia*.

Скрининг и выделение В-клеток

В одном варианте воплощения настоящее изобретение рассматривает получение и выделение клональной популяции антиген-специфических В-клеток, которые можно использовать для выделения по меньшей мере одной клетки, специфичной по отношению к антигену CGRP, которую можно использовать для продукции моноклонального антитела против CGRP, специфичного к желательному антигену CGRP, или нуклеотидной последовательности, соответствующей такому антителу. Способы получения и выделения указанной клональной популяции антиген-специфических В-клеток изложены, например, в патентной публикации США № 2007/0269868 Carvalho-Jensen et al., раскрытие которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Способы получения и выделения указанной клональной популяции антиген-специфических В-клеток также описаны здесь в примерах. В данной области техники известны способы "обогащения" клеточной популяции по размеру или плотности. См., например, патент США 5627052. Эти этапы можно использовать в дополнение к обогащению популяции клеток по антигенной специфичности.

Способы гуманизации антител

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение рассматривает способы гуманизации тяжелых и легких цепей антител. Способы гуманизации тяжелых и легких цепей антител, которые можно применять к антителам против CGRP, изложены, например, в публикации патентной заявки США № 2009/0022659 Olson et al. и в патенте США № 7935340 Garcia-Martinez et al., раскрытие каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Способы получения антител и их фрагментов

В еще одном варианте воплощения настоящее изобретение рассматривает способы получения анти-

тел против CGRP и их фрагментов. Способы получения антител против CGRP и их фрагментов, секретрируемых из полиплоидных, предпочтительно диплоидных или тетраплоидных штаммов дрожжей, компетентных по спариванию, изложены, например, в публикации патентной заявки США № 2009/0022659 Olson et al. и в патенте США № 7935340 Garcia-Martinez et al., раскрытие каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Другие способы получения антител хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, способы получения химерных антител в настоящее время хорошо известны в данной области техники (см., например, патент США № 4816567 Cabilly et al.; Morrison et al., P.N.A.S. USA, 81: 8651-55 (1984); Neuberger, M.S. et al., Nature, 314: 268-270 (1985); Boulianne, G.L. et al., Nature, 312:643-46 (1984), раскрытие каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки).

Аналогично, другие способы получения гуманизированных антител в настоящее время хорошо известны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 5530101, 5585089, 5693762 и 6180370 Queen et al.; патенты США №№ 5225539 и 6548640 Winter; патенты США №№ 6054297, 6407213 и 6639055 Carter et al.; патент США №№ 6632927 Adair; Jones, P.T. et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann, L., et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen, M, et al., Science, 239: 1534-36 (1988), раскрытие каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки).

Полипептиды антител по настоящему изобретению, обладающие специфичностью связывания с CGRP, также можно получить путем конструирования с использованием стандартных техник, хорошо известных специалистам в данной области техники, экспрессирующего вектора, включающего оперон и последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь антитела, причем последовательность ДНК, кодирующая CDR, необходимые для специфичности антитела, получена из источника клеток нечеловеческого происхождения, предпочтительно из В-клеток кролика, а последовательность ДНК, кодирующая оставшиеся фрагменты цепи антитела, получена из источника клеток человеческого происхождения.

Второй экспрессирующий вектор получают с использованием тех же стандартных средств, хорошо известных специалистам в данной области техники, причем указанный экспрессирующий вектор содержит оперон и последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь антитела, причем последовательность ДНК, кодирующая CDR, необходимые для специфичности антитела, получена из источника клеток нечеловеческого происхождения, предпочтительно из В-клеток кролика, а последовательность ДНК, кодирующая оставшиеся фрагменты цепи антитела, получена из источника клеток человеческого происхождения.

Указанные векторы экспрессии трансфицируют в клетку-хозяина с помощью стандартных техник, хорошо известных специалистам в данной области техники, с целью получения трансфицированной клетки-хозяина, причем указанную трансфицированную клетку-хозяина культивируют с помощью стандартных техник, хорошо известных специалистам в данной области техники, с целью получения указанных полипептидов антител.

Клетку-хозяина можно совместно трансфицировать двумя экспрессирующими векторами, описанными выше, причем первый экспрессирующий вектор содержит ДНК, кодирующую оперон и полипептид, происходящий от легкой цепи, а второй вектор содержит ДНК, кодирующую оперон, и полипептид, происходящий от тяжелой цепи. Указанные два вектора содержат различные селективные маркеры, но предпочтительно достигают практически равной экспрессии полипептидов тяжелой и легкой цепей. В качестве альтернативы можно использовать единственный вектор, включающий ДНК, кодирующую полипептиды как тяжелой, так и легкой цепей. Кодирующие последовательности тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК и/или геномную ДНК.

Клетки-хозяева, используемые для экспрессии полипептидов антител, могут являться бактериальной клеткой, например, *E. coli*, или эукариотической клеткой, например, *P. pastoris*. В одном варианте воплощения настоящего изобретения для этой цели можно использовать клетку млекопитающего хорошо определенного типа, например, миеломную клетку, линию клеток яичника китайского хомячка (CHO), линию клеток NSO или линию клеток НЕК293.

Общие способы конструирования векторов, способы трансфекции, необходимые для получения клетки-хозяина, и способы культивирования, необходимые для получения полипептидов антител из указанных клеток-хозяев, включают стандартные техники. Хотя в предпочтительном случае линия клеток, используемая для получения антитела, является линией клеток млекопитающего, в качестве альтернативы можно использовать любую другую подходящую линию клеток, например, бактериальную линию клеток, например, бактериальный штамм, происходящий от *E. coli*, или дрожжевую клеточную линию.

Аналогично, после получения полипептиды антител можно очистить в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники, например фильтрацией в тангенциальном потоке, осаждением сульфатом аммония, аффинной колоночной хроматографией и т.п.

Полипептиды антител, описанные здесь, также можно использовать для разработки и синтеза пептида или непептидных миметиков, потенциально пригодных для тех же терапевтических вариантов применения, что и полипептиды антител по изобретению. См., например, статью Saragobi et al., Science, 253: 792-795 (1991), содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Скрининговые анализы

Настоящее изобретение также включает скрининговые анализы, предназначенные для помощи при выявлении заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP, у пациентов, проявляющих симптомы заболевания или расстройства, ассоциированного с CGRP.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP по настоящему изобретению или их CGRP-связывающие фрагменты применяют для обнаружения присутствия CGRP в биологическом образце, полученном от пациента, проявляющего симптомы заболевания или расстройства, ассоциированного с CGRP. Наличие CGRP или его повышенные уровни по сравнению с уровнями CGRP до заболевания в сопоставимом биологическом образце может быть благоприятным для диагностики заболевания или расстройства, ассоциированного с CGRP.

Еще один вариант воплощения настоящего изобретения обеспечивает диагностический или скрининговый анализ для помощи при диагностике заболеваний или расстройств, ассоциированных с CGRP у пациентов, проявляющих симптомы заболевания или расстройства, ассоциированного с CGRP, описанного в данном документе, включая анализ уровня экспрессии CGRP в биологическом образце от указанного пациента с использованием посттрансляционно модифицированного антитела против CGRP или его связывающего фрагмента. Антитело против CGRP или его связывающий фрагмент можно посттрансляционно модифицировать с целью внедрения обнаруживаемой группы, например, группы, представленной выше в настоящем раскрытии.

Уровень CGRP в биологическом образце определяют с использованием модифицированного антитела против CGRP или его связывающего фрагмента, как изложено здесь, и путем сравнения уровня CGRP в биологическом образце со стандартным уровнем CGRP (например, уровнем в нормальных биологических образцах). Опытный врач должен понимать, что среди нормальных биологических образцов может существовать некоторая изменчивость, и принимать это во внимание при оценке результатов. В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP по настоящему изобретению можно применять для установления связи уровней экспрессии CGRP с определенной стадией развития рака. Специалист в данной области техники может измерить CGRP у многочисленных субъектов с целью установления диапазонов экспрессии CGRP, соответствующих клинически определенным стадиям развития рака. Эти диапазоны позволят специалисту в данной области техники измерить CGRP у субъекта с диагнозом рака и установить связь уровней у каждого субъекта с диапазоном, соответствующим стадии указанного рака. Специалист в данной области техники должен понимать, что путем измерения CGRP у пациента через различные промежутки времени можно определить прогрессирование рака.

Вышеописанный анализ можно также применять для мониторинга заболевания или расстройства, где уровень CGRP, полученный в биологическом образце от пациента, предположительно страдающего заболеванием или расстройством, ассоциированным с CGRP, сравнивают с уровнем CGRP в предшествующих биологических образцах от этого же пациента с целью выявления изменений уровня CGRP у указанного пациента, например, в связи со схемой лечения.

Настоящее изобретение также направлено на способ визуализации *in vivo*, обнаруживающий присутствие клеток, экспрессирующих CGRP, включающий введение диагностически эффективного количества диагностической композиции. Указанную визуализацию *in vivo* можно применять, например, для обнаружения или визуализации CGRP-экспрессирующих опухолей или метастазов, и в рамках планирования схемы для разработки эффективного протокола лечения рака. Протокол лечения может включать, например, одно или более из лучевой терапии, химиотерапии, цитокиновой терапии, генной терапии и терапии антителами, а также применения антитела против CGRP или его фрагмента.

Настоящее изобретение также обеспечивает набор для обнаружения связывания антитела против CGRP по изобретению с CGRP. В частности, указанный набор можно применять для обнаружения присутствия CGRP, специфически реагирующего с антителом против CGRP по изобретению или его иммунореактивным фрагментом. Указанный набор может также включать антитело, связанное с подложкой, вторичное антитело, реагирующее с антигеном, и реагент для обнаружения реакции вторичного антитела с антигеном. Такой набор может являться набором для твердофазного ИФА и при необходимости может содержать субстрат, первичные и вторичные антитела и любые другие необходимые реагенты, например, обнаруживаемые группы, субстраты ферментов и цветные реагенты, например, как описано здесь. Диагностический набор также может быть представлен в виде набора для иммуноблоттинга. Диагностический набор также может быть представлен в виде набора для хемилюминесцентного анализа (Meso Scale Discovery, Гейтерсберг, штат Мэриленд, США) Диагностический набор также может быть представлен в виде набора для лантаноидного обнаружения (PerkinElmer, Сан-Хосе, штат Калифорния, США).

Квалифицированный врач должен понимать, что биологический образец включает сыворотку, плазму, мочу, слюну, мазок со слизистых, плевральную жидкость, синовиальную жидкость и спинномозговую жидкость, но не ограничивается ими.

Способы облегчения или уменьшения симптомов, или лечения или предотвращения заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные

здесь, или их фрагменты можно применять для облегчения или снижения симптомов или лечения или предотвращения заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP. Антитела против CGRP, описанные здесь, или их фрагменты, а также комбинации также можно вводить в терапевтически эффективном количестве пациентам, нуждающимся в лечении заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP, в виде фармацевтической композиции, как более подробно описано ниже.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения описанные здесь антитела против CGRP или их фрагменты можно применять для облегчения или снижения симптомов или лечения или профилактики мигреней (с аурой или без нее), потери массы тела, рака или опухолей, ангиогенеза, связанного с раковым или опухолевым ростом, ангиогенеза, связанного с выживанием рака или опухоли, боли, гемиплегических мигреней, кластерных головных болей, мигренозной невралгии, хронических головных болей, головных болей напряжения, общих головных болей, "приливов", хронической пароксизмальной гемикрании, вторичных головных болей вследствие основной структурной проблемы в области головы или шеи, черепной невралгии, синусных головных болей (например, связанных с синуситом), и головных болей или мигреней, вызванных аллергией.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные здесь, или их фрагменты в комбинации со вторым агентом или без него можно применять для облегчения или снижения симптомов, или лечения, или предотвращения следующего неограничивающего списка заболеваний и расстройств: боли, воспалительной боли, боли в постоперационном разрезе, комплексного регионального болевого синдрома, раковой боли, боли при первичном или метастатическом раке костей, боли при переломе, хронической боли, боли при остеопорозном переломе, боли в результате ожога, остеопорозе, подагрической боли в суставах, боли в животе, боли, связанной с кризисом серповидных клеток и другой ноцицептической боли, а также гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы, цирроза печени, нейрогенной боли, невропатической боли, ноцицептической боли, невралгии тройничного нерва, постгерпетической невралгии, фантомной боли конечностей, фибромиалгии, менструальной боли, овариалгии, рефлекторной симпатической дистрофии, нейрогенной боли, боли при остеоартрите или ревматоидном артрите, боли в пояснице, диабетической невропатии, пояснично-крестцовом радикулите, или боли или висцеральной боли, связанной с: желудочно-пищеводным рефлюксом, диспепсией, синдромом раздраженного кишечника, раздраженной толстой кишкой, спазмами толстой кишки, слизистым колитом, воспалительным заболеванием кишечника, болезнью Крона, илеитом, язвенным колитом, почечной коликой, дисменореей, циститом, менструальным периодом, родами, менопаузой, простатитом, панкреатитом, почечной коликой, дисменореей, циститом, в том числе интерстициальным циститом (IC), операцией, связанной с кишечной непроходимостью, дивертикулитом, перитонитом, перикардитом, гепатитом, аппендицитом, колитом, холециститом, эндометриозом, хроническим и/или острым панкреатитом, инфарктом миокарда, боли в почках, плевральной боли, простатите, боли в области таза, травмы органа, хронической ноцицептивной боли, хронической невропатической боли, хронической воспалительной боли, фибромиалгии, приступа неконтролируемой боли и постоянной боли, а также раковой боли, возникающей в результате злокачественного новообразования или рака, предпочтительно выбранного из одного или более из: аденокарциномы железистой ткани, бластомы эмбриональной ткани органов, карциномы эпителиальной ткани, лейкоза в тканях, образующих клетки крови, лимфомы лимфатической ткани, миеломы костного мозга, саркомы в соединительной или опорной ткани, рака надпочечников, лимфомы, связанной со СПИДом, анемии, рака мочевого пузыря, рака костей, рака головного мозга, рака молочной железы, карциноидных опухолей, рака шейки матки, химиотерапии, рака толстой кишки, цитопении, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, рака головы, рака шеи, гепатобилиарного рака, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легких, лимфомы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, опухолей нервной системы, рака ротовой полости, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака кожи, рака желудка, рака яичка, рака щитовидной железы, рака уретры, рака костей, сарком соединительной ткани, рака костной ткани, рака кроветворных клеток, рака костного мозга, множественной миеломы, лейкоза, первичного или вторичного рака костей, опухолей, метастазирующих в кости, опухолей, прорастающих в нервы и полые органы, опухолей, расположенных вблизи нервных структур. Кроме того, в предпочтительном случае раковая боль включает висцеральную боль, предпочтительно висцеральную боль, возникающую в результате рака поджелудочной железы и/или метастазов в брюшную полость. Кроме того, в предпочтительном случае раковая боль включает соматическую боль, предпочтительно соматическую боль, вызванную одним или более заболеваний из рака костей, метастазов в кости, послеоперационной раковой боли, сарком соединительной ткани, рака костной ткани, рака кроветворных клеток костного мозга, множественной миеломы, лейкоза, первичного или вторичного рака костей.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные здесь, или их фрагменты в комбинации со вторым агентом или без него можно применять для облегчения или снижения симптомов, или лечения, или предотвращения следующего неограничивающего списка заболеваний и расстройств: рака или опухолей, ангиогенеза, ассоциированного с раковым или опухолевым ростом, ангиогенеза, ассоциированного с выживанием рака или опухоли.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные

здесь, или их фрагменты в комбинации со вторым агентом или без него можно применять для облегчения или снижения симптомов, или лечения, или предотвращения следующего неограничивающего списка заболеваний и расстройств: нейрогенной, невропатической или ноцицептической боли. Невропатическая боль может включать невралгию тройничного нерва, постгерпетическую невралгию, фантомную боль конечностей, фибромиалгию, менструальную боль, овариалгию, рефлекторную симпатическую дистрофию и нейрогенную боль, но не ограничивается ими. В других предпочтительных вариантах воплощения - это боль при остеоартрите или ревматоидном артрите, боль в пояснице, диабетическая невропатия, пояснично-крестцовый радикулит и другая невропатическая боль.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP и их фрагменты в комбинации со вторым агентом или без него можно применять для облегчения или снижения симптомов, или лечения, или предотвращения следующего неограничивающего списка заболеваний и расстройств: гиперактивности мочевого пузыря и других состояний мочевыделительной системы, желудочно-пищеводного рефлюкса и висцеральной боли, связанной с желудочно-пищеводным рефлюксом, диспепсией, синдромом раздраженного кишечника, воспалительным заболеванием кишечника, болезнью Крона, илеитом, язвенным колитом, почечной коликой, дисменореей, циститом, менструальным периодом, родами, менопаузой, простатитом, пруритом или панкреатитом. Кроме того, рассматриваемые антитела и фрагменты антител против CGRP можно применять отдельно или в сочетании с другими активными агентами, например, опиоидами и неопиоидными анальгетиками, например, НПВС, для обезболивания или усиления эффективности другого анальгетика или для предотвращения или облегчения устойчивости к специфическому анальгетику, например, морфину или родственным опиоидным анальгетикам. Доказательством роли CGRP в блокировании/обращении развития морфин-индуцированного обезболивания является тот факт, что CGRP8-37 и антагонист рецептора CGRP (BIBN4096BS), согласно сообщениям, предотвращает/обращает развитие устойчивости к морфину - (Powell et al., 2000 J Brit J Pharmacol (131):875; Menard et al., 1996 J Neurosci (16):2342; Wang et al., 2009 FASEB J (23):2576; Wang et al., 2010 Pain (151): 194).

Рассматриваемые антитела потенциально можно объединить с любым опиоидным анальгетиком или НПВС или другим анальгетиком, потенциально являющимся другим антителом, с целью повышения или усиления контроля над болью, или обращения или подавления устойчивости к анальгетику, например, опиоидному анальгетику. Это может дать возможность введения такого анальгетика на более длительный срок или в пониженных дозах, тем самым потенциально облегчая неблагоприятные побочные эффекты, связанные с ним.

Термин "опиоидный анальгетик" в данном описании относится ко всем лекарственным средствам, природным или синтетическим, обладающим морфиноподобным действием. Синтетические и полусинтетические опиоидные анальгетики являются производными пяти классов химических соединений: фенантронов; фенилпептиламинов; фенилпиперидинов; морфинанов; и бензоморфанов, все из которых находятся в рамках указанного термина. Примеры опиоидных анальгетиков включают кодеин, дигидрокодеин, диацетилморфин, гидрокодон, гидроморфон, оксиморфон, леворфанол, альфентанил, бупренорфин, буторфанол, фентанил, суфентанил, меперидин, метадон, налбуфин, пропоксифен и пентазоцин или их фармацевтически приемлемые соли.

Термин "НПВС" относится к нестероидному противовоспалительному соединению. НПВС классифицируются на основании их способности ингибировать циклооксигеназу. Циклооксигеназа 1 и циклооксигеназа 2 являются двумя основными изоформами циклооксигеназы, и большинство стандартных НПВС являются смешанными ингибиторами двух указанных изоформ. Большинство стандартных НПВС подпадают под одну из следующих пяти структурных категорий: (1) производные пропионовой кислоты, например ибупрофен, напроксен, напросин, диклофенак и кетопрофен; (2) производные уксусной кислоты, например толметин и сулиндак; (3) производные фенамовой кислоты, например, мефенамовая кислота и меклофенамовая кислота; (4) производные бифенилкарбоновой кислоты, например, дифлунизал и флуфенизал; и (5) оксикамы, например, пироксикам, судоксикам и изоксикам. Описан еще один класс НПВС, селективно ингибирующих циклооксигеназу 2. Ингибиторы Cox-2 описаны, например, в патентах США №№ 5616601; 5604260; 5593994; 5550142; 5536752; 5521213; 5475995; 5639780; 5604253; 5552422; 5510368; 5436265; 5409944; и 5130311, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Некоторые типичные ингибиторы COX-2 включают целекоксиб (SC-58635), DUP-697, флосулид (CGP-28238), мелоксикам, 6-метокси-2-нафтилуксусную кислоту (6-MNA), рофекоксиб, МК-966, набуметон (пролекарство 6-MNA), нимесулид, NS-398, SC-5766, SC-58215, T-614, или их комбинации.

В некоторых вариантах воплощения можно принимать аспирин и/или ацетаминофен в сочетании с рассматриваемым антителом или фрагментом против CGRP. Аспирин является еще одним типом нестероидного противовоспалительного соединения.

В типичном случае неограничивающие заболевания и расстройства, которые можно лечить и/или предотвращать путем введения антител против CGRP по настоящему изобретению, включают боль, вызванную любым состоянием, связанным с нейрогенной, невропатической, воспалительной, термической или ноцицептической болью. В предпочтительном случае указанное расстройство ассоциировано с повышенным уровнем CGRP в области боли. В некоторых вариантах воплощения предпочтительному ле-

чению подвергают невропатическую боль, рефлекторную невралгию тройничного нерва, постгерпетическую невралгию, фантомную боль конечностей, фибромиалгию, рефлекторную симпатическую дистрофию и состояния с нейрогенной болью. В других вариантах воплощения предпочтительному лечению подвергают раковую боль, в частности, боль при раке костей, боль при остеоартрите или ревматоидном артрите, боль в пояснице, боль в послеоперационном разрезе, боль при переломе, боль при остеопорозном переломе, остеопороз, подагрическую боль в суставах, диабетическую невропатию, пояснично-крестцовый радикулит, боли, связанные с кризисом серповидных клеток, мигрень и другую невропатическую и/или ноцицептическую боль. Таким образом, настоящее изобретение включает способы лечения, предотвращения и/или облегчения любого заболевания или расстройства, ассоциированного с активностью CGRP или стимуляцией CGRP (включая любое из вышеупомянутых типичных заболеваний, расстройств и состояний) за счет применения антител и фрагментов антител по изобретению. Терапевтические способы по настоящему изобретению включают введение субъекту любого состава, содержащего антитело против CGRP, как раскрыто здесь, по отдельности или в сочетании с другим активным агентом.

Субъект, которому вводят фармацевтический состав, может являться, например, любым человеком или животным, не являющимся человеком, нуждающимся в таком лечении, профилактике и/или облегчении, или субъектом, который мог бы в другом случае получить благоприятный эффект от ингибирования или ослабления CGRP-опосредованной активности. Например, субъектом может быть человек, которому поставлен диагноз, или который предположительно подвергается риску любого из вышеуказанных заболеваний или расстройств. Настоящее изобретение также включает применение любого из фармацевтических составов, раскрытых здесь, при производстве лекарственного средства для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или расстройства, ассоциированного с активностью CGRP (включая любые из вышеупомянутых типичных заболеваний, расстройств и состояний).

Введение

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные здесь, или их CGRP-связывающие фрагменты, а также комбинации указанных антител или фрагментов антител вводят субъекту в концентрации между приблизительно 0,1 и 100,0 мг/кг массы тела субъекта-реципиента. В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные здесь, или их CGRP-связывающие фрагменты, а также комбинации указанных антител или фрагментов антител вводят субъекту в концентрации приблизительно 0,4 мг/кг массы тела субъекта-реципиента. В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные здесь, или их CGRP-связывающие фрагменты, а также комбинации указанных антител или фрагментов антител вводят субъекту-реципиенту с частотой раз в двадцать шесть недель или менее, например, раз в шестнадцать недель или менее, раз в восемь недель или менее, раз в четыре недели или менее, раз в две недели или менее, раз в неделю или менее, или раз в день или менее.

Fab-фрагменты можно вводить раз в две недели или менее, раз в неделю или менее, раз в день или менее, несколько раз в день и/или раз в несколько часов. В одном варианте воплощения настоящего изобретения пациент получает Fab-фрагменты в количестве от 0,1 мг/кг до 40 мг/кг в день в разделенных дозах от 1 до 6 раз в день, или в форме с замедленным высвобождением, эффективной для получения желательных результатов.

Следует понимать, что концентрация антитела или Fab, вводимого данному пациенту, может быть больше или меньше, чем типичные вводимые концентрации, представленные выше.

Специалист в данной области техники может экспериментально определить эффективную дозировку и частоту приема в рабочем порядке, например, руководствуясь настоящим раскрытием и информацией в Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton L. L., Lazo, J. S., & Parker K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe P. C., & Mycek M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; and Golan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams & Wilkins.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные здесь, или их CGRP-связывающие фрагменты, а также комбинации указанных антител или фрагментов антител вводят субъекту в фармацевтическом составе.

"Фармацевтическая композиция" относится к химической или биологической композиции, подходящей для введения млекопитающему. Такие композиции можно специально составить для введения посредством одного или более из ряда путей, включая буккальное, накожное, эпидуральное, ингаляционное, внутриартериальное, внутрисердечное, интрацеребровентрикулярное, внутрикожное, внутримышечное, интраназальное, внутриглазное, внутрибрюшинное, интраспинальное, интратекальное, внутривенное, пероральное, парентеральное, ректальное (путем клизмы или суппозитория), подкожное, субдермальное, сублингвальное, трансдермальное и трансмукозальное введение, но не ограничиваясь ими. Кроме того, введение можно осуществлять с помощью инъекции, порошка, жидкости, геля, капель или других средств для введения.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения антитела против CGRP, описанные здесь, или их CGRP-связывающие фрагменты, а также комбинации указанных антител или фрагментов антител

можно необязательно вводить субъекту в комбинации с одним или более активных агентов. Такие активные агенты включают анальгетики, антигистаминные, жаропонижающие, противовоспалительные агенты, антибиотики, противовирусные и антицитокиновые агенты. Активные агенты включают агонисты, антагонисты и модуляторы ФНО- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN- α , IFN- γ , BAFF, CXCL13, IP-10, ФРЭС, ЕРО, ЭФР, HRG, фактор роста гепатоцитов (ФРГ), гепцидин, в том числе антитела, активные против любого из вышеперечисленных агентов, а также антитела, активные против любого из их рецепторов. Активные агенты также включают 2-арилпропионовые кислоты, ацеклофенак, ацеметацин, ацетилсалициловую кислоту (аспирин), алклофенак, альминопрофен, эмоксипин, ампирон, арилалкановые кислоты, азапропазон, бенорилат, беноксапрофен, бромфенак, карпрофен, целекоксиб, холинсалицилат магния, клофезон, ингибиторы СОХ-2, дексибупрофен, декскетопрофен, диклофенак, дифлунизал, дроксикам, этензамид, этодолак, эторикоксиб, физаламин, фенамовые кислоты, фенбуфен, фенопрофен, флуфенамовую кислоту, флуноксапрофен, флурбипрофен, ибупрофен, ибупроксам, индометацин, индопрофен, кебузон, кетопрофен, кеторолак, лорноксикам, локсопрофен, люмиракоксиб, магния салицилат, меклофенамовую кислоту, мефенамовую кислоту, мелоксикам, метамизол, метилсалицилат, мофебутазон, набуметон, напроксен, N-арилантраниловые кислоты, фактор роста нервов (NGF), оксаметацин, оксапрозин, оксикамы, оксифенбутазон, парекоксиб, феназон, фенилбутазон, пироксикам, пирпрофен, профены, проглуметацин, производные пиразолидина, рофекоксиб, салицилсалицилат, салициламид, салицилаты, вещество Р, сульфинпиразон, сулиндак, супрофен, теноксикам, тиапрофеновую кислоту, толфенамовую кислоту, толметин и вальдекоксиб, но не ограничиваются ими.

Антигистаминный агент может быть любым соединением, противодействующим действию гистамина или его высвобождению из клеток (например, тучных клеток). Антигистаминные агенты включают акривастин, астемизол, азатадин, азеластин, бетатастин, бромфенирамин, буклизин, цетиризин, аналоги цетиризина, хлорфенирамин, клемастин, CS 560, ципрогептадин, дезлоратадин, дексхлорфенирамин, эбастин, эпинастин, фексофенадин, HSR 609, гидроксизин, левокабастин, лоратидин, метскополамин, мизоластин, норастемизол, фениндамин, прометазин, пириламид, терфенадин и траниласт, но не ограничиваются ими.

Антибиотики включают амикацин, аминогликозиды, амоксициллин, ампициллин, ансамицины, арсфенамин, азитромицин, азлоциллин, азтреонам, бацитрацин, карбацефем, карбапенемы, карбенициллин, цефаклор, цефадроксил, цефалексин, цефалотин, цефамандол, цефазолин, цефдинир, цефдиторен, цефепим, цефиксим, цефоперазон, цефотаксим, цефокситин, цефподоксим, цефprozил, цефтазидим, цефтибутен, цефтизоксим, цефтобипрол, цефтриаксон, цефуроксим, цефалоспорины, хлорамфеникол, циластатин, ципрофлоксацин, кларитромицин, клиндамицин, клоксациллин, колистин, ко-тримоксазол, далфопристин, демеклоциклин, диклоксациллин, диритромицин, дорипенем, доксициклин, эноксацин, эртапенем, эритромицин, этамбутол, флуклоксациллин, фосфомицин, фуразолидон, фузидиевую кислоту, гатифлоксацин, гелданамицин, гентамицин, гликопептиды, гербимицин, имипенем, изониазид, канамицин, левофлоксацин, линкомицин, линезолид, ломефлоксацин, лоракарбеф, макролиды, мафенид, меропенем, метициллин, метронидазол, мезлоциллин, миноциклин, монобактамы, моксифлоксацин, мупироцин, нафциллин, неомицин, нетилмицин, нитрофурантоин, норфлоксацин, офлоксацин, оксациллин, окситетрациклин, паромомицин, пенициллин, пенициллины, пиперациллин, платензимицин, полимиксин В, полипептиды, пронтозил, пиразинамид, хинолоны, хинупристин, рифампицин, рифампин, рокситромицин, спектиномицин, стрептомицин, сульфациламид, сульфаметизол, сульфаниламид, сульфасалазин, сульфисоксазол, сульфонамиды, тейкопланин, телитромицин, тетрациклин, тетрациклины, тикарциллин, тинидазол, тобрамицин, триметоприм, триметоприм-сульфаметоксазол, тролеандомицин, тровафлоксацин и ванкомицин, но не ограничиваются ими.

Активные агенты также включают альдостерон, беклометазон, бетаметазон, кортикостероиды, кортизол, кортизона ацетат, дезоксикортикостерона ацетат, дексаметазон, флудрокортизона ацетат, глюкокортикоиды, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, стероиды и триамцинолон. Кроме того, рассматривается любая подходящая комбинация указанных активных агентов.

"Фармацевтический наполнитель" или "фармацевтически приемлемый наполнитель" является носителем, обычно жидким, используемым для получения состава активного терапевтического агента. В одном варианте воплощения настоящего изобретения активный терапевтический агент является гуманизированным антителом, описанным здесь, или одним или более из его фрагментов. Наполнитель обычно не обеспечивает фармакологическую активность состава, хотя может обеспечивать химическую и/или биологическую стабильность и характеристики высвобождения. Типичные составы можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed., Grennaro, A., Ed., 1995, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Как используется здесь, термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "наполнитель" включает всевозможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты, которые являются физиологически совместимыми. В одном варианте воплощения носитель подходит для парентерального введения. Предпочтительно, носитель может быть пригоден для внутривенного, внутривнутрибрюшинного, внутримышечного или сублингвального введения. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные

водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Использование таких сред и агентов в комбинации с фармацевтически активными веществами хорошо известно в данной области техники. Кроме того, поскольку любая обычная среда или агент несовместима с активным соединением, рассматривается их использование в фармацевтических композициях по изобретению. В композиции можно также включать дополнительные активные соединения.

Фармацевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Настоящее изобретение предусматривает, что фармацевтическая композиция присутствует в лиофилизированной форме. Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного агента. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Настоящее изобретение также рассматривает включение стабилизатора в состав фармацевтической композиции. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования ПАВ.

Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, например, маннит, сорбит, или хлорид натрия. Длительное поглощение композиций, вводимых путем инъекции, можно осуществить путем включения в композицию агента, замедляющего поглощение, например, солей моностеарата и желатина. Кроме того, в состав с замедленным высвобождением, например, в композицию, включающую полимер для медленного высвобождения, можно включить щелочной полипептид. Активные соединения можно изготовить в комбинации с носителями, защищающими соединение от быстрого высвобождения, такими как препараты контролируемого высвобождения, включая импланты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфир, полимолочную кислоту и сополимеры полимолочной и полигликолевой кислот (PLG). Многие способы изготовления таких составов известны специалистам в данной области техники.

В каждом из упомянутых вариантов воплощения соединения можно вводить в различных лекарственных формах. Рассматриваются любые биологически приемлемые лекарственные формы, известные специалистам в данной области техники, и их комбинации. Примеры таких лекарственных форм включают, без ограничения, восстанавливаемые порошки, эликсиры, жидкости, растворы, суспензии, эмульсии, порошки, гранулы, частицы, микрочастицы, диспергируемые гранулы, облатки, препараты для ингаляции, аэрозоль для ингаляции, пластыри, препараты частиц для ингаляции, импланты, депоимпланты, препараты для инъекций (в том числе подкожных, внутримышечных, внутривенных и внутрисуставных), вливаний и их комбинации.

Вышеуказанное описание различных иллюстрированных вариантов воплощения не следует считать исчерпывающим или жестко ограничивающим настоящее изобретение раскрытой формой. Несмотря на то, что здесь описаны конкретные варианты воплощения и примеры настоящего изобретения в целях иллюстрации, специалисты в данной области техники должны понимать, что возможны различные эквивалентные модификации, входящие в рамки изобретения. Информацию об изобретении, представленную здесь, можно применять для других целей, отличающихся от описанных выше примеров.

Указанные и другие изменения можно вносить в изобретение в свете вышеприведенного подробного описания. В общем случае, термины, использованные в следующей далее формуле изобретения, не следует интерпретировать как ограничения изобретения конкретными вариантами воплощения, раскрытыми в настоящем документе и пунктах формулы изобретения. Соответственно, настоящее изобретение не ограничивается указанным раскрытием, и рамки изобретения должны определяться исключительно прилагаемой формулой изобретения.

Настоящее изобретение можно реализовать способами, отличающимися от способов, явным образом описанных в вышеприведенном описании и примерах. В свете вышеприведенной информации возможны различные модификации и изменения настоящего изобретения, которые, таким образом, находятся в рамках прилагаемой формулы изобретения.

Некоторые аспекты информации, относящейся к способам получения клональной популяции антиген-специфичных В-клеток, были раскрыты в предварительной патентной заявке США № 60/801412, поданной 19 мая 2006 года, раскрытие которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Некоторые аспекты информации, относящейся к гуманизации моноклональных антител кролика и предпочтительных модификаций последовательности для поддержания сродства связывания с антигеном, были раскрыты в международной заявке № PCT/US 2008/064421, что соответствует международной публикации № WO/2008/144757 под названием "Novel Rabbit Antibody Humanization Methods and Humanized Rabbit Antibodies", поданной 21 мая 2008 г., раскрытие которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Некоторые аспекты информации, относящейся к получению антител или их фрагментов с помощью

дрожжей, компетентных по спариванию, и соответствующим способам, были раскрыты в патентной заявке США № 11/429053, поданной 8 мая 2006 г. (публикация патентной заявки США № US 2006/0270045), раскрытие которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Некоторые полинуклеотиды и полипептиды антител против CGRP раскрыты в списке последовательностей, прилагаемом к настоящей подаваемой патентной заявке, и раскрытие указанного списка последовательностей полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Полное раскрытие каждого документа (включая патенты, заявки на патенты, журнальные статьи, рефераты, учебные пособия, книги или другие источники), цитируемого в разделах Уровень техники, Подробное описание изобретения и Примеры, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Следующие примеры представлены с целью обеспечить специалистов в данной области техники полным раскрытием и описанием способов реализации и применения рассматриваемого изобретения и не предназначены для ограничения рамок и сущности изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количества, температуры, концентраций и т.д.), однако следует допускать возможность некоторых экспериментальных ошибок и отклонений. Если не указано иное, доли являются массовыми долями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Примеры

Пример 1. Получение антител, связывающих CGRP

За счет применения протокола отбора антител, описанного здесь, можно получить расширенную панель антител.

Стратегия иммунизации

Кроликов иммунизировали CGRP α человека (American Peptides, Саннивейл, штат Калифорния, США и Bachem, Торранс, штат Калифорния, США). Иммунизация состояла из первой подкожной (п/к) инъекции 100 мкг антигена, смешанного с 100 мкг КЛН в полном адьюванте Фрейнда (CFA) (Sigma) с последующими двумя стимуляциями, разнесенными во времени на две недели, каждая из которых содержала 50 мкг антигена, смешанного с 50 мкг в неполном адьюванте Фрейнда (IFA) (Sigma). У животных выполняли отбор крови в день 55, и определяли титры в сыворотке крови с помощью твердофазного ИФА (распознавание антигена) и путем ингибирования CGRP-зависимого повышения уровня цАМФ в SK-N-MC.

Оценка титра при отборе антитела

С целью выявления и описания характеристик антител, связывающихся с CGRP α человека, растворы антител тестировали с помощью твердофазного ИФА. Вкратце, планшеты, покрытые нейтравидином (Thermo Scientific), покрывали CGRP α человека, биотинилированным по N-концу (50 мкл на лунку, 1 мкг/мл), разбавленным буфером для твердофазного ИФА (0,5% желатина рыбьей кожи в PBS, pH 7,4) в течение приблизительно 1 ч при комнатной температуре или, в качестве альтернативы, в течение ночи при 4°C. Затем планшеты дополнительно блокировали буфером для твердофазного ИФА в течение 1 ч при комнатной температуре и промывали буфером для промывки (PBS, 0,05% Твин-20). Протестированные образцы сыворотки последовательно разбавляли буфером для твердофазного ИФА. Пятьдесят микролитров разбавленных образцов сыворотки переносили в лунки и инкубировали при комнатной температуре в течение часа. После указанного инкубирования планшет промывали буфером для промывки. Для развития ответа в лунки добавляли специализированный Fc-HARP против антител кролика (разбавление 1:5000 в буфере для твердофазного ИФА) и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. После этапа 3-кратной промывки раствором для промывки планшет обрабатывали субстратом ТМВ в течение 2 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию с помощью 0,5 М HCl. Поглощение в лунках считывали при 450 нм.

Определение титра образцов сыворотки крови по функциональной активности (ингибирование CGRP-зависимых уровней цАМФ)

С целью выявления и описания характеристик антител с функциональной активностью выполняли анализ ингибирования CGRP-зависимого повышения уровней цАМФ с использованием электрохемилюминесценции (Meso Scale Discovery, MSD). Вкратце, препараты антител, подлежащие тестированию, последовательно разбавляли в буфере для анализа MSD (Hepes, MgCl₂, pH 7,3, 1 мг/мл блокатора А, Meso Scale Discovery) в 96-луночном круглодонном полистирольном планшете (Costar). В указанный планшет добавляли CGRP α человека (конечная концентрация 10 нг/мл), разбавленный буфером для анализа MSD, и инкубировали в течение часа при 37°C. Согласно указаниям изготовителя аналитического набора использовали соответствующие контроли. Клетки нейроэпителиомы человека (SK-N-MC, ATCC) отделяли с помощью раствора ЭДТА (5 мМ в PBS) и промывали ростовой средой (MEM, 10% FBS, антибиотики) посредством центрифугирования. Количество клеток доводили до 2 млн клеток на мл в буфере для анализа и добавляли IBMX (3-изобутил-1-метилксантин, Sigma) до конечной концентрации 0,2 мМ непосредственно перед загрузкой клеток в планшет для анализа цАМФ. После инкубирования раствора антитела против CGRP α человека в течение одного часа 20 мкл раствора, содержащего клетки, переносили в

планшет для анализа цАМФ. Все образцы тестировали в двух повторностях с соответствующими контролями. Десять микролитров клеток добавляли в лунки и инкубировали планшет в течение 30 мин при встряхивании и комнатной температуре. Во время инкубирования клеток с раствором CGRP готовили стоп-раствор путем получения раствора TAG-меченого цАМФ (MSD) в лизирующем буфере (MSD) в разбавлении 1:200. Для остановки инкубирования клеток с CGRP к клеткам добавляли 20 мкл стоп-раствора и инкубировали планшет в течение одного часа при встряхивании и комнатной температуре. Буфер для считывания (MSD) разбавляли в четыре раза водой и добавляли 100 мкл в каждую лунку планшета.

Затем планшет считывали с помощью Sector Imager 2400 (MSD) и использовали программное обеспечение Prism для аппроксимации данных и определения IC₅₀.

Сбор ткани

После установления приемлемых титров кролика(ов) умерщвляли. Селезенку, лимфатические узлы и цельную кровь собирали и обрабатывали следующим образом:

Селезенку и лимфатические узлы перерабатывали в суспензию отдельных клеток путем диссоциации ткани и продавливания через стерильную проволочную сетку с размером ячеек 70 мкм (Fisher) плунжером 20-мл шприца. Клетки собирали в PBS. Клетки дважды промывали центрифугированием. После последней промывки определяли плотность клеток с помощью трипанового синего. Клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин, супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в соответствующем объеме 10% диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma) в FBS (Hyclone) и разливали по 1 мл/флакон. Флаконы хранили при минус 70°C в камере медленной заморозки в течение 24 ч и хранили в жидком азоте.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли путем смешивания цельной крови с равными частями среды с низким содержанием глюкозы, описанной выше, не содержащей FBS. 35 мл смеси цельной крови осторожно насаивали на 8 мл Lympholyte Rabbit (Cedarlane) в 45-мл конической пробирке (Corning) и центрифугировали в течение 30 мин при 2500 об/мин при комнатной температуре без тормозной системы. После центрифугирования слой МПК тщательно удаляли с помощью стеклянной пипетки Пастера (VWR), объединяли и помещали в чистый 50-мл флакон. Клетки дважды промывали модифицированной средой, описанной выше, путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре и определяли плотность клеток путем окрашивания трипановым синим. После последней промывки клетки ресуспендировали в соответствующем объеме 10% ДМСО/PBS-среды и замораживали, как описано выше.

Отбор, обогащение и условия культивирования В-клеток

В день создания культуры В-клеток МПК, спленоциты или флаконы с клетками лимфоузлов подвергали оттаиванию для использования. Флаконы извлекали из резервуара LN2 и помещали в водяную баню при 37°C до оттаивания. Содержание флаконов переносили в 15-мл коническую центрифужную пробирку (Corning) и медленно добавляли в пробирку 10 мл модифицированной среды RPMI, описанной выше. Клетки центрифугировали в течение 5 мин при 2000 об/мин, супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в 10 мл свежей среды. Плотность и жизнеспособность клеток определяли с помощью трипанового синего.

Следующий протокол использовали для Ab1 и Ab13

Клетки предварительно смешивали с биотинилированным CGRP α человека следующим образом. Клетки повторно промывали и ресуспендировали из расчета 1E07 клеток/80 мкл среды. Биотинилированный CGRP α человека добавляли к суспензии клеток в конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Несвязанный биотинилированный CGRP α человека удаляли посредством двух 10-мл промывок с использованием PBF [PBS, не содержащий Ca/Mg (Hyclone), 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BCA) (Sigma - без биотина)]. После второй промывки клетки ресуспендировали из расчета 1E07 клеток/80 мкл PBF и добавляли к суспензии клеток 20 мкл стрептавидиновых гранул MACS® (Miltenyi Biotec, Оберн, штат Калифорния, США) на 10E7 клеток. Клетки и гранулы инкубировали при 4°C в течение 15 мин и однократно промывали 2 мл PBF на 10E7 клеток.

Следующий протокол использовали для Ab4, Ab7, Ab9 и Ab11.

Биотинилированный CGRP α человека предварительно добавляли к стрептавидиновым гранулам следующим образом. Семьдесят пять микролитров стрептавидиновых гранул (Miltenyi Biotec, Оберн, штат Калифорния, США) смешивали с huCGRP α , биотинилированным по N-концу (конечная концентрация 10 мкг/мл) и 300 мкл PBF. Указанную смесь инкубировали при 4°C в течение 30 мин, несвязанный биотинилированный CGRP α человека удаляли с использованием разделительной колонки MACS® (Miltenyi Biotec) при промывке 1 мл с целью удаления несвязанного материала. Затем материал выгружали, затем использовали, чтобы ресуспендировать клетки из расчета 100 мкл на 1E7 клеток, затем инкубировали смесь при 4°C в течение 30 мин и однократно промывали 10 мл PBF.

Как для протокола а), так и б) применимо следующее: После промывки клетки ресуспендировали в 500 мкл PBF и откладывали. Колонку MACS® MS (Miltenyi Biotec, Оберн, штат Калифорния, США)

предварительно промывали 500 мл PBF на магнитной подставке (Milteni). Суспензию клеток наносили на колонку через предварительный фильтр и собирали несвязанную фракцию. Колонку промывали 2,5 мл буфера PBF. Колонку снимали с магнитной подставки и помещали на чистую, стерильную 1,5-мл пробирку Эппендорфа. Сверху на колонку добавляли 1 мл буфера PBF и собирали положительные отобраные клетки. Выход и жизнеспособность положительной фракции клеток определяли с помощью окрашивания трипанового синего. Выход положительного отбора составлял в среднем 1% от начальной концентрации клеток.

Для получения информации об уровнях диссеминирования культуры провели предварительный скрининг клеток. Планшеты засеивали из расчета 10, 25, 50, 100 или 200 обогащенных В-клеток/лунку. Кроме того, каждая лунка содержала облученные клетки EL-4.B5 (5000 рад) из расчета 50000 клеток/лунку и соответствующий уровень супернатанта активированных Т-клеток кролика (см. публикацию патентной заявки США № 20070269868) (в диапазоне 1-5% в зависимости от препарата) в модифицированной среде RPMI с высоким уровнем глюкозы при конечном объеме 250 мкл/лунку. Культуры инкубировали в течение 5-7 дней при 37°C и 4% CO₂.

Скрининг культуры В-клеток по распознаванию антигена (твердофазный ИФА)

Для идентификации лунок, продуцирующих антитела против CGRP α человека использовали тот же протокол, что описан для определения титра образцов сыворотки по распознаванию антигена (твердофазный ИФА), со следующими изменениями. Вкратце, планшеты, покрытые нейтравидином, покрывали смесью CGRP α человека, биотинилированного по N- и C-концу (50 мкл на лунку, по 1 мкг/мл каждого из них). Образцы супернатанта В-клеток (50 мкл) тестировали без предварительного разбавления.

Выявление функциональной активности в супернатантах В-клеток с использованием CGRP-зависимой продукции цАМФ

Для выявления функциональной активности в супернатантах В-клеток использовали процедуру, аналогичную описанной для определения функционального титра образцов сыворотки, со следующими изменениями. Вкратце, вместо разбавленных образцов поликлональной сыворотки использовали супернатант В-клеток (20 мкл).

Выделение антиген-специфических В-клеток

Планшеты, содержавшие интересующие лунки, извлекали из холодильника при -70°C, клетки из каждой лунки восстанавливали путем пяти промывок 200 мкл среды (10% полная RPMI, 55 мкМ BME) на лунку. Восстановленные клетки осаждали центрифугированием, супернатант осторожно удаляли. Осажденные клетки ресуспендировали в 100 мкл среды. Для выявления клеток, экспрессирующих антитела, магнитные гранулы, покрытые стрептавидином (M280 Dynabeads, Invitrogen) покрывали комбинацией CGRP α человека, биотинилированного по N- и C-концу. Отдельные партии биотинилированного CGRP α человека оптимизировали путем последовательного разбавления. Затем сто микролитров, содержащих приблизительно 4 \times 10⁷ покрытых гранул, смешивали с ресуспендированными клетками. К указанной смеси добавляли 15 мкл H&L IgG-FITC козы против антител кролика (Jackson ImmunoResearch), разбавленных средой 1:100.

Двадцать микролитров клеток/гранул/суспензии H&L против антител кролика удаляли и распределяли в виде 5-мкл капель по однолуночным предметным стеклам, предварительно обработанным Sigma-cote (Sigma) в общей сложности от 35 до 40 капель на стекло. Для погружения капель использовали непроницаемый барьер из парафинового масла (JT Baker); стекло инкубировали в течение 90 мин в инкубаторе при 37°C и 4% CO₂ в темноте.

Специфические В-клетки, продуцирующие антитело, можно было идентифицировать по флуоресцентному кольцу вокруг них, получаемому за счет секреции антител, распознавания биотинилированного антигена, связанного с гранулами, и последующего обнаружения с помощью реагента для флуоресцентного обнаружения IgG. После выявления клетки, представляющей интерес, ее извлекали с помощью микроманипулятора (Eppendorf). Одиночную клетку, синтезирующую и экспортирующую антитело, переносили в микроцентрифужную пробирку, замораживали с помощью сухого льда и хранили при минус 70°C.

Аmplификация и секвенирование последовательностей антител из антигенспецифических В-клеток

Последовательности антител восстанавливали с помощью комбинированного способа на основе ОТ-ПЦР из одиночной выделенной В-клетки. Для отжига консервативных и константных областей генов иммуноглобулина-мишени (тяжелых и легких цепей), например, последовательностей иммуноглобулинов кролика, разработали праймеры, содержащие сайты рестрикции; для амплификации последовательности антител использовали восстановление на основе двухэтапной вложенной ПЦР. Ампликоны из каждой лунки анализировали на восстановление и целостность по размеру. Затем полученные фрагменты расщепляли с помощью AluI для фингерпринта клональных свойств последовательности. Идентичные последовательности демонстрировали общую картину фрагментации при электрофоретическом анализе. Затем исходные фрагменты ампликона тяжелой и легкой цепей расщепляли по сайтам рестрикции, содержащимся в праймерах для ПЦР, и клонировали в экспрессирующий вектор. Вектор, содержащий суб-

клонированные фрагменты ДНК, амплифицировали и очищали. Последовательность субклонированных тяжелых и легких цепей проверяли до экспрессии.

Рекомбинантная продукция моноклонального антитела с желательной антигенной специфичностью и/или функциональными свойствами

Для определения антигенной специфичности и функциональных свойств антител, восстановленных из специфических В-клеток, векторы, контролирующие экспрессию желательных последовательностей спаренных тяжелых и легких цепей, трансфицировали в клетки НЕК-293.

Распознавание антигена рекомбинантными антителами согласно твердофазному ИФА

С целью оценки способности рекомбинантных экспрессируемых антител связываться с CGRP α человека растворы антител тестировали с помощью твердофазного ИФА. Все этапы инкубирования выполняли при комнатной температуре. Вкратце, планшеты Immulon IV (Thermo Scientific) покрывали раствором, содержащим CGRP α (1 мкг/мл в PBS) в течение 2 ч. Затем планшеты, покрытые CGRP α , трижды промывали буфером для промывки (PBS, 0,05% Твин-20). Затем планшеты блокировали с использованием блокирующего раствора (PBS, 0,5% желатина рыбьей кожи, 0,05% Твин-20) в течение приблизительно 1 ч. Затем удаляли блокирующий раствор и инкубировали планшеты с последовательными разведениями тестируемого антитела в течение приблизительно 1 ч. В конце указанного инкубирования планшет трижды промывали буфером для промывки и дополнительно инкубировали с раствором вторичного антитела (конъюгированный с пероксидазой и аффинно очищенный F(ab')₂-фрагмент антитела козы против IgG человека, специфичный по отношению к Fc-фрагменту (Jackson Immunoresearch) в течение приблизительно 45 мин и трижды промывали. В этот момент добавляли раствор субстрата (ТМБ-субстрат пероксидазы, BioFX) и инкубировали в течение 3-5 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением раствора HCl (0,5 M) и считывали планшет при 450 нм с использованием планшет-ридера.

Результаты: фиг. 15-18 демонстрируют, что антитела Ab1-Ab14 против CGRP связывались с CGRP α и распознавали его.

Оценка функциональных характеристик рекомбинантных антител путем модуляции CGRP-зависимых внутриклеточных уровней цАМФ и перекрестной реакционной способности с CGRP крысы

Для оценки способности рекомбинантного экспрессируемого антитела ингибировать CGRP α -опосредованные повышенные клеточные уровни анализа цАМФ использовали аналитический набор на основе электрохемилюминесценции (Meso Scale Discovery, MSD). Вкратце, препараты антител, подлежащие тестированию, последовательно разбавляли в буфере для анализа MSD (Hepes, MgCl₂, pH 7,3, 1 мг/мл блокатора A, Meso Scale Discovery) в 96-луночном круглодонном полистирольном планшете (Costar). В указанный планшет добавляли CGRP α человека (конечная концентрация 25 нг/мл), разбавленный буфером для анализа MSD, и инкубировали в течение одного часа при 37°C. Согласно указаниям изготовителя аналитического набора использовали соответствующие контроли. Клетки нейроэпителиомы человека (SK-N-MC, ATCC) отделяли с помощью раствора ЭДТА (5 мМ) и промывали ростовой средой (MEM, 10% FBS, антибиотики) посредством центрифугирования. Количество клеток доводили до 2 млн клеток на мл в буфере для анализа и добавляли IBMX (3-изобутил-1-метилксантин, 50 мМ, Sigma) до конечной концентрации 0,2 мМ непосредственно перед загрузкой клеток в планшет для анализа цАМФ. Раствор антитела против CGRP α человека инкубировали в течение 1 ч, после чего 20 мкл раствора, содержащего клетки, переносили в планшет для анализа цАМФ. Все образцы тестировали в двух повторностях с соответствующими контролями. Десять микролитров клеток добавляли в лунки и инкубировали планшет в течение 30 мин при встряхивании. Во время инкубирования клеток с раствором CGRP готовили стоп-раствор путем получения раствора TAG-меченого цАМФ (MSD) в лизирующем буфере (MSD) в разбавлении 1:200. Для остановки инкубирования клеток с CGRP к клеткам добавляли 20 мкл стоп-раствора и инкубировали планшет в течение 1 ч при встряхивании. Буфер для считывания (MSD) разбавляли в четыре раза водой и добавляли 100 мкл в каждую лунку планшета. Затем планшет считывали с помощью Sector Imager 2400 (MSD) и использовали программное обеспечение Prism для аппроксимации данных и определения IC₅₀.

Для проверки способности рекомбинантных антител противодействовать человеческому CGRP β выполнили аналогичный анализ с замещением агониста CGRP (конечная концентрация CGRP β 10 нг/мл). Оценка рекомбинантных антител по отношению к распознаванию и ингибированию синтеза цАМФ, опосредованного CGRP крысы, проводили с использованием CGRP крысы (конечная концентрация 5 нг/мл) и линии клеток крысы L6 (ATCC).

Результаты: фиг. 19-37 демонстрируют, что антитела Ab1-Ab14 против CGRP ингибировали повышенные уровни цАМФ в клетке, опосредованные CGRP α , CGRP β и CGRP крысы.

Пример 2. Ферментативное получение Fab-фрагментов

Гидролиз папаином проводили с использованием иммобилизованного папаина (Thermo/Pierce) в соответствии с инструкциями изготовителя. Вкратце, очищенные антитела инкубировали в цистеин/HCl-буфере с иммобилизованным папаином при 37°C и осторожном встряхивании. Гидролиз контролировали путем отбора аликвот и анализа отщепления тяжелой цепи с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ. Для

остановки реакции удаляли иммобилизованный папаин, смесь промывали с помощью 50 мМ Трис, pH 7,5 и фильтровали. Негидролизованное полноразмерное антитело и Fc-фрагменты удаляли с помощью колонки MabSelectSure (GE).

Пример 3. Экспрессия в дрожжевых клетках

Конструирование экспрессирующих векторов *Pichia pastoris* для тяжелой и легкой цепи

Фрагменты гуманизированной легкой и тяжелой цепи коммерчески синтезировали и субклонировали в экспрессирующий вектор pGAP. Экспрессирующий вектор pGAP использовал GAP-промотор для контроля экспрессии иммуноглобулиновой цепи и лидерную последовательность человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) для экспорта. Кроме того, указанный вектор содержал обычные элементы, например, бактериальный сайт инициации репликации и копию гена устойчивости к канамицину, придававшего *P. pastoris* устойчивость к антибиотику G418. G418 обеспечивал средство отбора штаммов, сохранивших желательный экспрессирующий вектор, интегрированный в их геном.

Трансформация экспрессирующих векторов в гаплоидные штаммы-хозяева *met1* и *Iys3* *Pichia pastoris*

Все способы, используемые для трансформации гаплоидных штаммов *P. pastoris* и манипуляции половым циклом *P. pastoris* выполняли, как описано в *Pichia Protocols (Methods in Molecular Biology Higgings, DR, and Cregg, JM, Eds. 1998. Humana Press, Totowa, NJ)*. Перед трансформацией каждый вектор переводили в линейную форму в пределах последовательностей GAP-промотора для стимуляции интеграции вектора в локус GAP-промотора генома *P. pastoris*. Гаплоидные штаммы трансфицировали с помощью электропорации и отбирали успешные трансформанты на чашках с YPDS (дрожжевой экстракт, пептон, декстроза с сорбитом) агаром с G418. Количество копий генов тяжелых и легких цепей определяли в гаплоидных штаммах с помощью саузерн-блоттинга. Затем скрещивали гаплоидные штаммы и осуществляли отбор по способности расти в отсутствие маркеров аминокислот (т.е. Lys и Met). Затем полученные диплоидные клоны подвергали окончательному саузерн-блоттингу для подтверждения количества копий генов тяжелых и легких цепей. Клон, экспрессировавший интересующее антитело, выбирали с помощью биосенсоров на основе белка A, использующих интерферометрию в биослое для контроля экспрессии (Octet, ForteBio).

Пример 4. Экспрессия Ab3, Ab6 и Ab14 в *Pichia pastoris*

Для экспрессии полноразмерного антитела сконструировали три штамма *Pichia*. Для всех штаммов, экспрессирующих полноразмерное антитело, создали гаплоидные штаммы, а затем выполнили их скрещивание. Один гаплоидный штамм экспрессировал полноразмерную последовательность легкой цепи, а другой гаплоидный штамм экспрессировал полноразмерную последовательность тяжелой цепи. Каждый диплоидный штамм использовали для получения исследовательского банка клеток и для экспрессии в биореакторе.

Вначале размножали инокулят с помощью исследовательского банка клеток в среде, состоящей из следующих питательных веществ (% мас./об): дрожжевой экстракт 3%, безводная декстроза 4%, YNB 1,34%, биотин 0,004% и 100 мМ фосфат калия. Для получения инокулята для ферментеров банк клеток размножали приблизительно в течение 24 ч в инкубаторе с качалкой при 30°C и 300 об/мин. Затем 10% инокулят добавляли в резервуары Labfors с рабочим объемом 2,5 л, содержащие 1 л стерильной ростовой среды. Ростовая среда состояла из следующих питательных веществ: сульфат калия 18,2 г/л, одноосновный фосфат аммония 36,4 г/л, двухосновный фосфат калия 12,8 г/л, гептагидрат сульфата магния 3,72 г/л, дигидрат цитрата натрия 10 г/л, глицерин 40 г/л, дрожжевой экстракт 30 г/л, микроэлементы РТМ1 4,35 мл/л и пеногаситель 204 1,67 мл/л. Раствор микроэлементов РТМ1 состоял из следующих компонентов: пентагидрат сульфата меди 6 г/л, иодид натрия 0,08 г/л, гидрат сульфата марганца 3 г/л, дигидрат молибдата натрия 0,2 г/л, борная кислота 0,02 г/л, хлорид кобальта 0,5 г/л, хлорид цинка 20 г/л, гептагидрат сульфата железа (II) 65 г/л, биотин 0,2 г/л и серная кислота 5 мл/л.

Параметры управления процессом в биореакторе устанавливали следующим образом: Перемешивание 1000 об/мин, воздушный поток 1,35 стандартных литров в минуту, температура 28°C, pH поддерживали на уровне шести с помощью гидроксида аммония. Дополнительную подачу кислорода не осуществляли.

Культуры для ферментации выращивали в течение приблизительно 12-16 ч до израсходования исходного глицерина, на что указывал пик концентрации растворенного кислорода. Культуры поддерживали без источника углерода в течение приблизительно трех часов после пика растворенного кислорода. После указанного периода голодания в реактор добавляли болюс этанола из расчета конечной концентрации этанола 1% (масс/об). Культуры для ферментации оставляли уравниваться в течение 15-30 минут. Подачу питательной среды начинали через 30 мин после болюсного добавления этанола и устанавливали на постоянной скорости 1 мл/мин на 40 мин, затем насос среды контролировали с помощью датчика этанола, поддерживая концентрацию этанола 1% в течение оставшегося времени, с использованием датчика-зонда этанола (Raven Biotech). Питательная среда состояла из следующих компонентов: дрожжевой экстракт 50 г/л, глюкоза 500 г/л, гептагидрат сульфата магния 3 г/л, и микроэлементы РТМ1 12 мл/л. Для ферментации полноразмерных Ab6 и Ab14 в питательную среду также добавляли дигидрат

цитрата натрия (0,5 г/л). Общее время ферментации составляло приблизительно 90 ч.

Пример 5. Способы гуманизации антител

Способы гуманизации антител были описаны ранее в опубликованном патенте США № 7935340, раскрытие которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых случаях требовалось определение необходимости дополнительных остатков каркасных областей кролика для поддержания активности. В некоторых случаях для минимизации потерь сродства или активности гуманизованных антител все еще требовались некоторые критические остатки каркасных областей кролика. В этих случаях для получения желательной активности было необходимо вновь заменить одну или несколько аминокислот каркасной области из последовательностей эмбрионального типа человека на исходные аминокислоты кролика. Указанные изменения определяли экспериментально с целью идентификации остатков последовательности кролика, необходимых для сохранения сродства и активности. Они располагались в конце гуманизованной аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи.

Пример 6. Ингибирование связывания CGRP с его клеточным рецептором

Для оценки способности рекомбинантно экспрессируемых антител ингибировать связывание CGRP с его клеточным рецептором выполняли анализ связывания радиоактивного лиганда, как описано ранее [Elshourbagy et al, *Endocrinology* 139: 1678 (1998); Zimmerman et al., *Peptides*, 16: 421 (1995)]. Использовали мембранные препараты рекомбинантных рецепторов CGRP человека, рецептора, подобного рецептору кальцитонина, и RAMP1 (Chemiscreen, Millipore). Разбавления антител предварительно инкубировали с CGRP α человека, меченным ^{125}I (0,03 нМ) в течение 30 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание оценивали в присутствии 0,1 мкМ CGRP α человека. Мембраны фильтровали и промывали. Затем выполняли подсчет частиц на фильтрах для определения специфически связанного CGRP α человека, меченного ^{125}I .

Результаты: фиг. 38 демонстрирует, что антитела Ab1-Ab13 против CGRP ингибировали связывание CGRP с его клеточным рецептором.

Пример 7.

Ингибирование нейрогенного расширения сосудов антителами против CGRP у крыс CGRP является мощным сосудорасширяющим фактором (*Nature* 313: 54-56 (1985) и *Br J. Clin. Pharmacol.* 26(6):691-5. (1988)). Для оценки антител против CGRP использовали фармакодинамический анализ для неинвазивного измерения активности, антагонистической рецептору CGRP. Данная модель основана на изменениях в кожном кровотоке, измеряемых с помощью лазерной доплеровской визуализации после наружного применения раствора капсаицина. Капсаицин активирует транзитный рецепторный потенциал рецептора ваниллоидов 1 типа (TRPV-1), приводя к нейрогенному воспалению и расширению сосудов за счет локального высвобождения вазоактивных медиаторов, включая CGRP и вещество P (*Br. J. Pharmacol.* 110: 772-776 (1993)).

На день до анализа расширения сосудов животным в/б (внутрибрюшинно) вводили тестируемый агент или контроль. После введения дозы животных брили и депилировали в области поясницы со стороны спины на площади приблизительно 2×6 см. Затем животных возвращали в клетки на ночь. В день анализа, приблизительно через 24 ч после введения дозы, животных анестезировали газообразным изофлураном, помещали на термостатируемую грелку-матрац и оснащали носовым конусом для непрерывной доставки изофлурана. Для наблюдения за расширением сосудов использовали лазерный доплеровский тепловизор. Пучок когерентного красного света, генерируемого 633-нм гелий-неоновым лазером, направляли на выбритую прямоугольную область площадью 2×6 см и сканировали в режиме среднего разрешения. Вначале получали исходную доплеровскую сканограмму и заранее определяли расположение размещения О-кольца путем выявления двух областей с одинаково низким потоком. На выбранные области помещали два резиновых О-кольца (диаметром ~1 см) и выполняли исходное сканирование. Непосредственно после завершения сканирования в области каждого из двух О-колец наносили 1 мг капсаицина в 5 мкл раствора этанол: ацетон (1:1). Доплеровское сканирование повторяли через 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 27,5 и 30 мин после нанесения капсаицина. Процентное изменение по сравнению с исходным средним потоком в каждом из двух О-колец наносили на график результатов расширения сосудов, обусловленного капсаицином.

Для тестирования способности рекомбинантно экспрессируемых антител ингибировать связывание CGRP с его клеточным рецептором выполняли анализ связывания радиоактивного лиганда, как описано ранее.

Результаты: фиг. 39 и 40 демонстрируют, что антитела Ab3 и Ab6 против CGRP снижали расширение сосудов в указанной модели после введения капсаицина.

Пример 8. Действие введения антитела против CGRP на гиперактивность мочевого пузыря

Эксперименты проводили с целью оценки потенциальной эффективности введения антитела против CGRP на удержание мочи в мочевом пузыре и гиперактивность мочевого пузыря. Удержание мочи в мочевом пузыре является равновесием между закрытием уретры и активностью сжимающей мышцы, а гиперактивность мочевого пузыря является состоянием, характеризующимся неотложными позывами, не-

держанием мочи, частым мочеиспусканием и никтурией. Некоторые бессистемные данные, приведенные в литературе, указывают, что CGRP может быть вовлечен в удержание мочи и может коррелировать с и, возможно, являться причиной патологической гиперактивности мочевого пузыря. Соответственно, существовала надежда, что антитела против CGRP по изобретению, особенно учитывая их высокое сродство к CGRP, потенциально могли помочь предотвратить или смягчить это, иногда инвалидизирующее, состояние. (Доказательство того, что CGRP может участвовать в гиперактивности мочевого пузыря, включает тот факт, что CGRP присутствует в мочевыводящих путях, DRG и спинном мозге (Wharton et al., 1986 Neurosci (3):727). Кроме того, афферентные С-волокна важны для проведения импульсов, участвующих в мочеиспускании, в спинной мозг (Yoshida et al., 2011 J Pharmacol Sci (112): 128), а CGRP влияет на указанные волокна. Кроме того, сообщалось, что внутривезикулярное введение ботокса подавляет CGRP и значительно снижает интервал между сокращениями в модели боли в мочевом пузыре, вызванной уксусной кислотой (Chuang et al., 2004 J Urol (172): 1529; Chuang et al., 2009 J Urol (182):786)). Кроме того, недавно сообщалось, что введение антитела против CGRP якобы снижало количество сокращений мочевого пузыря в модели гиперактивности мочевого пузыря, индуцированной скипидаром (Pfizer заявка на патент PCT WO 2011/024113)).

Материалы и способы

Животные:

Самок крыс Sprague-Dawley (247 - 299 г) (Charles River Laboratories, Сен-Жермен-сюр-л'Арбрель, Франция) доставили в лабораторию не позднее по меньшей мере за 5 дней до экспериментов с целью их акклиматизации в лабораторных условиях. Их разместили по 3 на клетку (полипропиленовые клетки типа E размером 1032 см²) и содержали с неограниченным доступом к пище (корм для грызунов Teklad 2016 global rodents, Harlan 03800 Гана, Франция) и воде. Подстилку из опилок (Souralit 2912 плюс, Souralit, 17080 Жирона, Испания) для клеток грызунов меняли два раза в неделю. Животных содержали при комнатной температуре (20 ± 2°C) с циклом чередования свет-темнота 12/12 ч (светлая фаза с 7 до 19 часов) и относительной влажности 40-70%.

Лабораторное оборудование

Катетеры для мочевого пузыря присоединяли с помощью Т-трубки к тензодатчику MX 860 Novatrans III Gold (Medex Medical SARL, Нант-Каркефу, Франция) и шприцевому насосу (70-2208 Model II plus, Harvard Apparatus, Лез-Юлис, Франция и Razel R-99E, Fisher Bioblock, Илькирш, Франция). Внутривезикулярное давление непрерывно регистрировали с использованием интерфейса PowerFab (ADInstruments Pty Ltd, Касл-Хилл, Австралия) и программного обеспечения Chart®, работающего на ПК. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Excel®.

Тестируемые соединения

Тестируемое антитело против CGRP (Ab3)

Антитело отрицательного контроля (антитело против дигитоксина).

Реактивы

Физиологический раствор (0,9% NaCl) (№ партии 11043411, № CAS 7647-14-5) приобрели в B-Braun через Centravet (Лапалис, Франция).

Анестетик

Уретан (№ партии BCBC9294, № CAS 51-79-6) и фенобарбитал натрия (№ партии 150A1, № CAS 76-74-4) были поставлены Sigma-Aldrich (Сен-Кантен-Фаллаве, Франция) и Centravet (Лапалис, Франция), соответственно.

Экспериментальные группы

В экспериментах использовали две экспериментальные группы по 10 крыс. Каждой группе вводили 10 мг/кг контроля или антитела против CGRP:

Схема исследования

Экспериментальная процедура

Самкам крыс вводили тестируемое антитело или антитело отрицательного контроля внутривенно в дозе 10 мг/кг за 18 ч до экспериментов с использованием инъекции в хвостовую вену. Пятнадцать (15) часов спустя крыс анестезировали уретаном (1,2 г/кг, подкожно (п/к)). Через три (3) часа после п/к введения уретана в мочевой пузырь вводили полиэтиленовый катетер (с внутренним и наружным диаметром 0,58 и 0,96 мм, соответственно) через купол и закрепляли кистетным швом. Температуру тела поддерживали при 37 ± 2°C (контроллер TCAT-2LV, Physitemp, ADInstruments Pty Ltd., Касл-Хилл, Австралия) в течение всего эксперимента.

Цистометрический эксперимент

Цистометрические исследования проводили на наркотизированных самках крыс после операции. Физиологический раствор при комнатной температуре непрерывно вливали в мочевой пузырь при постоянной скорости потока (2 мл/ч) в течение по меньшей мере 30 мин.

В конце цистометрических экспериментов животных умерщвляли с помощью смертельной инъекции (1 мл) пентобарбитала натрия (54,7 мг/мл) (№ CAS 76-74-4) с последующим смещением шейных позвонков.

Цистометрические параметры

Измеряемыми цистометрическими параметрами являлись:

Амплитуда мочеиспускания (AM), т.е. давление между пороговым давлением и максимальным давлением мочеиспускания (мм рт.ст.),

Интервал между сокращениями (ICI), т.е. время между двумя последовательными мочеиспусканиями (с),

Частота мочеиспускания (MF), т.е. количество сокращений мочеиспускания/15 мин (пиков/15 мин).

Критерии исключения

Двух крыс исключили из экспериментов: Одну из них исключили ввиду гиперактивности мочевого пузыря во время внутрипузырного вливания физиологического раствора, а другую - потому, что глубина анестезии менялась в ходе эксперимента, что вызывало модификации цистометрического профиля.

Анализ результатов

Для каждой крысы рассчитывали значения AM и ICI как среднее за последние четыре-пять мочеиспусканий во время вливания физиологического раствора. Значения MF рассчитывали как среднее по количеству мочеиспусканий, полученных для двух 15-минутных интервалов во время вливания физиологического раствора.

Результаты представлены в виде "средние значения \pm стандартная ошибка среднего" (\pm sem). Фигуры и статистические анализы выполняли с использованием GraphPad Prism® (версия 4; GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, штат Калифорния, США).

Статистическое сравнение значений (вливание физиологического раствора) в группе антитела против CGRP по сравнению с контрольной группой антител проводили с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

$P < 0,05$ принимали за статистическую значимость.

Результаты:

Как показано на фиг. 41, ICI был значительно выше, а MF - значительно ниже в группе, обработанной антителом против CGRP (фиг. 41A и B, соответственно; $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок). Значимого различия для AM между группами не наблюдали (фиг. 41C, $p > 0,05$, t-критерий Стьюдента для независимых выборок).

Эти результаты показывают, что антитела против CGRP можно применять для предотвращения или облегчения гиперактивности мочевого пузыря, улучшения удержания мочи и лечения связанных с ними состояний мочевыделительной системы.

Пример 9. Облегчение невропатической боли у крыс

Повреждение периферических нервов часто приводит к хронической рефлекторной боли невропатического происхождения. Указанный болевой синдром состоит из чувствительности к внешним раздражителям (например, механическим и/или тепловым), которые обычно не вызывают боли. Как следствие, невропатическая боль не поддается традиционным подходам к обезболиванию, что затрудняет ее лечение. Невропатическую боль можно экспериментально смоделировать у животных с помощью хирургической травмы периферических нервов. Модель Чанга является одной из таких систем, где невропатическую боль индуцируют путем перевязки спинномозговых нервов L5 и L6.

В данном примере перевязку спинномозгового нерва проводили на самцах крыс Sprague Dawley. У них тестировали болевую чувствительность на 13-й день (подтверждение аллодинии), а затем вновь после каждого введения Ab2 с помощью теста механической аллодинии фон Фрея для оценки возможной активности против аллодинии.

Способы

Самцов крыс Sprague Dawley (Harlan Laboratories) массой 200-225 г по прибытии вынимали из коробок и размещали в клетках. Каждое животное подвергали санитарному осмотру, включая оценку состояния шерсти, конечностей и отверстий. Каждое животное также проверяли на предмет любых аномальных признаков позы или при движении. Обнаружено, что все животные были здоровы, и их включили в исследование.

Крыс акклиматизировали в течение минимум двух дней до начала экспериментальных процедур, за исключением рандомизации массы тела, которую зарегистрировали на следующий день после прибытия. Животных содержали по отдельности в прозрачных поликарбонатных стандартных клетках или прозрачных поликарбонатных клетках-микроизоляторах с сертифицированной облученной контактной подстилкой. Доступ к пище и воде предоставили без ограничений. Климат-контроль установили на поддержание температуры 18-26°C (64-79°F) при относительной влажности от 30 до 70%. Поддерживали цикл свет:темнота 12:12 ч.

Исходный порог тестировали у крыс с помощью нитей фон Фрея в дни акклиматизации -4 или -1.

В день 0 животных подвергли процедуре перевязки спинномозгового нерва. Все операции выполняли асептически. Перед операцией крыс анестезировали. Область спины брили и подготавливали для асептической операции. Крыс помещали в положение лежа на брюхе и делали надрез чуть левее средней линии в области L4 - S2. Левые окологривочные мышцы отделяли от остистых отростков (L4 - S2).

Перегибали дугоотростчатый сустав L6 - S1 и осторожно обрезали поперечный отросток, чтобы обеспечить пространство для доступа к спинномозговым нервам L4 и L5. Левые спинномозговые нервы L5 и L6 выделяли и перевязывали 6,0 шелковыми швами. Затем закрывали разрез соответствующим шовным материалом и зажимами для кожных ран. После операции животным вводили раствор Рингера с лактатом (3,0-5,0 мл) путем подкожной инъекции.

У всех животных из групп 1 и 2 проводили тест фон Фрея в дни -4 или -1, 13, 14 и 17. Измерение в день 13 выполняли перед введением дозы. Тест механической аллодинии фон Фрея оценивает антиноцицептивные свойства обезболивающих соединений. В данном тесте животных вначале приучают к испытательной камере, чтобы они были достаточно спокойны для оценки их болевого порога. Лаборант, не имеющий информации об экспериментальных группах, оказывает легкое давление на левую заднюю лапу крысы с использованием набора градуированных нейлоновых нитей (нитей фон Фрея) с увеличивающимся диаметром. Нитями перпендикулярно нажимают на брюшную поверхность лапы, пока они не согнутся. При ощущении боли крыса реагирует путем отдергивания лапы. Порог аллодинии определяли с помощью способа Chaplan вверх-вниз (Chaplan et al., *J Neurosci Methods*, 53:55-63, 1994), обеспечивающего точную силу для отдергивания для каждой крысы с помощью психофизической шкалы тестирования.

Животных распределяли на две экспериментальные группы на 13 день, основываясь на показателях фон Фрея. Животных, у которых показатель фон Фрея превышал 6 г, исключили из исследования. Средние показатели фон Фрея для каждой группы изучали для гарантии того, что средние значения и стандартное отклонение удовлетворяли предположению однородности. Дозы однократно вводили путем в/б инъекции в день 13 (через 13 дней после операции) для группы 1 (Ab2) и группы 2 (антитело отрицательного контроля) (11 животных в каждой группе; Ab2 и антитела отрицательного контроля вводили в дозе 10 мг/кг). Группа 1 получила дополнительную в/в болюсную (для вывода из наркоза) инъекцию Ab2 в день 17 до тестирования поведения.

Образцы крови группы 1 для получения плазмы собирали в день 17 и анализировали титр Ab2.

За исключением ожидаемых наблюдений в области операции и приволакивания лапы, связанных с операцией Чанга, аномальных наблюдений зафиксировано не было. Оказалось, что лечение не оказывало отрицательного влияния на общее состояние здоровья животного и не нарушало нормального увеличения массы тела, ожидаемого у крыс этого возраста.

Результаты

У всех животных, подвергавшихся исходному тестированию до операции в день 0, показатель фон Фрея составлял 15 (не приведено), что указывало на нормальную чувствительность. На 13-й день (перед введением антитела) показатели фон Фрея у всех животных были ниже 6 г, что указывало на развившуюся чувствительность к внешним механическим раздражителям, за исключением двух животных, исключенных из исследования. Средние показатели фон Фрея на 13 день составляли менее 3 г (фиг. 42, левая группа столбиков). После тестирования в день 13 животным вводили Ab2 или антитело отрицательного контроля (10 мг/кг). В дни 14 и 17 повторно тестировали показатели фон Фрея, и они были выше в Ab2-обработанных животных, чем в контрольной группе (фиг. 42, средняя и правая группы столбиков, соответственно).

Эти результаты показывают, что лечение антителом против CGRP, например Ab2, может помочь предотвратить или облегчить нейропатическую боль.

Пример 10. Первый эксперимент по оценке действия введения антитела против CGRP на анальгезию (модель подергивания хвоста)

Три различных эксперимента (примеры 10-12) проводили с целью оценки потенциальной эффективности введения антитела против CGRP на анальгезию или боль. Во всех указанных экспериментах использовали модель реакции подергивания хвоста грызунов (также называемую отдергиванием хвоста), поскольку реакция подергивания хвоста грызуна на тепловое излучение является широко используемой моделью для обнаружения потенциально полезных анальгетиков. Этот анализ особенно полезен для различения морфиноподобных анальгетиков центрального действия (активных) и неопиоидных противовоспалительных средств или противовоспалительных средств периферического действия (неактивных). Модель животного, а также способы и материалы, использованные здесь, описаны ниже.

Материалы и способы

Животные: Самцы крыс Sprague Dawley массой 150 ± 20 г.

Тестируемое антитело против CGRP: Ab2

Среда-носитель: 15 мМ гистидина, 250 мМ сорбита, pH 5,5

Анальгетик: Морфин

Процедуры реакции подергивания хвоста: Время (в секундах), необходимое для того, чтобы вызвать реакцию подергивания хвоста, вызванную сфокусированным тепловым излучением, измеряли как болевой порог в группах из 10 самцов крыс Sprague Dawley массой 150 ± 20 г. Исходное тестирование реакции подергивания хвоста выполнили в день 0. Крыс, характеризовавшихся реакцией подергивания хвоста 3-5 с, включили в исследование и распределили по сбалансированным экспериментальным груп-

пам на основании исходных реакций подергивания хвоста. Использовали 15-секундную отсечку во избежание повреждения тканей.

Развитие устойчивости к морфину

Каждая из 3 групп по 10 самцов крыс Sprague Dawley получала среду-носитель -физиологический раствор (2 мл/кг) 2 раза в день (утром и вечером) путем в/б введения. Кроме того, одной из 3 групп дополнительно в/б вводили анальгетик (морфин) в дозе 5 мг/кг 2 раза в день в течение 7 последовательных дней. Второй из 3 групп крыс в/б вводили антитело против CGRP по изобретению (Ab2) в дозе 10 мг/кг в виде однократного болюса в день 0. Затем каждую крысу в различных группах тестировали на реакцию подергивания хвоста раз в день через 30 мин после утренней дозы.

Для сравнения групп, получавших контрольную среду-носитель и тестируемое соединение, использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим t-критерием Даннетта. $P < 0,05$ считали значимым.

Результаты указанных экспериментов показаны на фиг. 43. Результаты показывают, что тестируемое антитело против CGRP при введении в дозе 10 мг/кг вызывало значимый длительный обезболивающий эффект при термическом болевом раздражителе. Конечные образцы крови всех протестированных крыс собирали путем пункции сердца и впоследствии анализировали на титр Ab2.

Пример 11. Второй эксперимент по подергиванию хвоста для оценки действия антитела против CGRP на анальгезию (титрование дозы антитела)

Второй набор экспериментов по подергиванию хвоста проводили с целью оценки действия различных доз антитела против CGRP на анальгезию с помощью антитела против CGRP по изобретению (Ab2). Крысы, используемые в указанных экспериментах, были аналогичны крысам, использованным в предыдущем эксперименте; протокол подергивания хвоста также был практически аналогичен. В указанном эксперименте сравнивали анальгезию в различных группах животных, получавших различные дозировки антитела против CGRP с целью оценки влияния дозировки на анальгезию. Во второй серии экспериментов сравнивали пять групп подопытных животных следующим образом. Первая контрольная группа животных получала только среду-носитель (15 мМ гистидина, 250 мМ сорбита, pH 5,5), 3 группы животных получали различные дозировки одного и того же антитела против CGRP, содержащегося в среде-носителе (Ab2, соответственно вводимое в дозировках 1, 3 мг/кг или 10 мг/кг в день 0), а пятая группа животных получала 10 мг/кг антитела отрицательного контроля (антитела против дигитоксина) также в день 0.

Протоколы подергивания хвоста в остальном выполнялись практически как описано выше. Для сравнения групп, получавших контрольную среду-носитель, антитело отрицательного контроля и тестируемое антитело против CGRP, оценку результатов вновь выполняли с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим t-критерием Даннетта. $P < 0,05$ считали значимым.

Результаты указанных экспериментов показаны на фиг. 44. На ней видно, что более высокие дозировки тестируемого антитела (антитело Ab2 против CGRP по изобретению) оказывали обезболивающее действие лучше, чем более низкие дозировки. Как и ожидалось, антитело отрицательного контроля не оказывало заметного влияния на анальгезию по сравнению с контрольными группами.

Пример 12. Третий эксперимент по подергиванию хвоста для оценки действия совместного введения антитела против CGRP и морфина на анальгезию

Третий набор экспериментов по подергиванию хвоста также проводили с целью оценки действия совместного введения антитела против CGRP и морфина на анальгезию. В указанных экспериментах первой группе животных вводили только ту же среду-носитель в дозировке 5 мл/кг. Второй группе животных вводили морфин в дни 1-10 в дозировке 5 мг/кг два раза в день, причем таким животным в день 0 также вводили антитело Ab2 против CGRP в дозировке 10 мг/кг. Третьей группе животных вводили морфин только в дни 1-4 также в дозировке 5 мг/кг два раза в день, и дополнительно вводили антитело Ab2 в день 0 в дозировке 10 мг/кг. Все препараты вводили в/б.

Эксперименты по подергиванию хвоста выполняли в каждой из указанных групп животных ежедневно в дни 0-10. Для сравнения групп, получавших контрольную среду-носитель, антитело отрицательного контроля и тестируемое антитело против CGRP, оценку результатов указанных экспериментов по подергиванию хвоста вновь выполняли с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим t-критерием Даннетта. $P < 0,05$ считали значимым.

Сводные результаты указанного сравнения показаны на фиг. 45. Животные, обработанные Ab2, получавшие ежедневную дозу морфина в течение всего эксперимента, демонстрировали устойчивость к морфину, и после дня 5 время подергивания хвоста уменьшилось почти до уровня контрольных животных, получавших среду-носитель. В противоположность этому, у животных, обработанных Ab2, получавших морфин только до дня 4, время подергивания хвоста улучшилось на 5-й день и оставалось улучшенным до дня 8. Результаты показывают, что введение антитела против CGRP могло оказывать обезболивающее действие даже после начала устойчивости к морфину, которое могло быть более выраженным при отмене морфина.

Пример 13. Облегчение висцеральной боли у крыс

Пациенты, страдающие от синдрома раздраженного кишечника (СРК), демонстрируют более низкий висцеральный сенсорный порог при растяжении толстой кишки с помощью баллона (Ritchie, Gut, 1973, 14:125-32). Предполагают, что при СРК усиливается болевая чувствительность оси головной мозг-кишечник при нормальной картине активации. Ранее было показано, что введение тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS) в проксимальный отдел толстой кишки вызвало хроническую гиперчувствительность толстой кишки, измеряемой у бодрствующих крыс по снижению порога болевой чувствительности в ответ на растяжение толстой кишки (Dior et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2002, 302: 1013-22). Указанная хроническая гиперчувствительность обнаруживалась в дистальном невоспаленном отделе толстой кишки и сохранялась в течение 21 дня. Это имитировало некоторые характеристики СРК и поэтому может использоваться в качестве модели для экспериментального исследования патофизиологических аспектов этого расстройства. Указанный анализ используют для определения потенциального антигиперчувствительного действия соединений против TNBS-индуцированной гиперчувствительности толстой кишки.

Несколько исследований подразумевали участие CGRP в висцеральной боли (Friese et al., Regul Pept 1997;70:1-7; Gschossmann et al., Neurogastroenterol Motil 2001;13:229-36; Julia and Bueno, Am J Physiol 1997;272:G141-6; Plourde et al., Am J Physiol 1997; 273:G191-6). CGRP является наиболее распространенным пептидом капсаицин-чувствительных афферентных волокон желудочно-кишечного происхождения, что составляет до 80% от общей иммунореактивности пептида (Clague et al., Neurosci Lett 1985;56:63-8; Sternini et al., Gastroenterology 1987;93:852-62). Кроме того, инъекция CGRP вызывает гиперчувствительность толстой кишки в модели TNBS (Delafoy et al., 2006, Gut 55:940-5), которая устраняется за счет пептида-антагониста CGRP (CGRP 8-37).

В настоящем примере описано тестирование антитела против CGRP в модели висцеральной боли (TNBS-индуцированной хронической гиперчувствительности толстой кишки) у крыс.

Способы

В данное исследование включали самцов крыс Sprague-Dawley массой 390-450 г на дату операции. Их содержали в комнате с контролируемой температурой (19,5-24,5°C) и относительной влажностью (45-65%) при 12-ч цикле свет/темнота. Животных содержали по 2 или 3 на клетку и наблюдали во время периода акклиматизации (по меньшей мере 5 дней) перед испытанием. Каждую крысу идентифицировали по хвостовой метке. Исследование проводили в соответствии с рекомендациями Комитета по исследованиям и этическим проблемам I.A.S.P. (1983) и Европейскими методическими руководствами 2010/63/UE.

Чувствительность толстой кишки индуцировали путем хирургического введения тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS, 50 мг/кг) за 7 дней до тестирования поведения. Животных подвергали операции натощак (24 ч). Вкратце, под анестезией (ацепромазин 5 мг/кг/кетамин 30 мг/кг) выполняли инъекцию TNBS (50 мг/кг, 1 мл/кг) в проксимальную часть толстой кишки (в 1 см от слепой кишки). После операции животных возвращали в их клетки в регулируемой среде, и кормили без ограничения до даты тестирования через 7 дней. "Наивных" животных (крыс, не подвергавшихся операции) размещали в тех же условиях.

Животным внутривенно вводили антитело Ab2 против CGRP или антитело отрицательного контроля (и то, и другое в дозе 10 мг/кг) за 24 ч до определения порога толстой кишки. В данное исследование включили три группы крыс:

Группа 1: "Наивная" группа, состоявшая из животных, не подвергавшихся операции или обработке TNBS в день -7 и получавших контрольное антитело за 24 ч (т.е. в день -1) до тестирования (т.е. измерения порога растяжения толстой кишки в день 0) (n = 7).

Группа 2: Группа "TNBS", состоявшая из животных, подвергавшихся операции в день -7 и получавших контрольное антитело за 24 ч (т.е. в день -1) до тестирования (т.е. измерения порога растяжения толстой кишки в день 0) (n = 8).

Группа 3: "Обработанная" группа, состоявшая из животных, подвергавшихся операции в день -7 и получавших Ab2 за 24 ч (т.е. в день -1) до дня тестирования (т.е. измерения порога растяжения толстой кишки в день 0) (n = 8).

Через семь дней (день 7) после инъекции TNBS чувствительность толстой кишки оценивали путем измерения давления внутри толстой кишки, необходимого для вызывания поведенческой реакции при растяжении толстой кишки вследствие раздувания баллона, введенного в толстую кишку. Тесты проводил экспериментатор, не имеющий информации о составе групп. Указанная реакция характеризуется подниманием задней части тела животных и четко видимым сжатием брюха, соответствующим сильным сокращениям (Al Chaer et al., Gastroenterology 2000, 119:1276-1285) и использовалась в качестве маркера боли (Bourdu et al., Gastroenterology, 2005: 128, 1996-2008). Баллон (5 см) вводили ректально минимально инвазивным образом на 10 см от ануса натощак (24 ч) бодрствующим животным, а катетер приклеивали к основанию хвоста. Затем крыс помещали в середину коробки из плексигласа и присоединяли катетер к электронному баростату. После 30-мин периода акклиматизации со вставленным баллоном давление в толстой кишке постепенно повышали от 5 до 75 мм ртутного столба (отсечка) на 5 мм рт.ст. каждые 30 с до проявления болевого поведения. Выполняли четыре определения через 30, 50, 70 и 90 мин после вве-

дения баллона.

Используя данные по каждому тестированию, рассчитывали процентную активность по отношению к гиперчувствительности толстой кишки, индуцированной введением TNBS в толстую кишку, следующим образом

$$(\text{Процент активности})_{\text{Обработка}} = \frac{\text{Порог растяжения}_{\text{Обработка}} - \text{Порог растяжения}_{\text{TNBS NHS}}}{\text{Порог растяжения}_{\text{Наив}} - \text{Порог растяжения}_{\text{TNBS NHS}}} \times 100$$

Порог растяжения_{Обработка} является среднеарифметическим значением для "обработанной" группы; Порог растяжения_{TNBS} является среднеарифметическим значением для группы "TNBS", а Порог растяжения_{Наив} является среднеарифметическим значением для "наивной" группы.

Результаты

Способность антитела против CGRP облегчать висцеральную боль тестировали в модели крысы, у которой индуцировали хроническую гиперчувствительность толстой кишки введением TNBS. Висцеральную боль количественно оценивали, измеряя порог растяжения толстой кишки, т.е. внутрибрюшное давление, которое животные могли терпеть, не демонстрируя поведенческой реакции (сокращения мышц). Более высокие значения порога растяжения толстой кишки указывали на меньшую чувствительность. Как и ожидалось, обработка TNBS приводила к значительно сниженному порогу растяжения толстой кишки по сравнению с наивными животными (фиг. 46, сравнение среднего столбика (обработка TNBS) и левого столбика (наивные)). Введение Ab2 улучшало порог растяжения толстой кишки по сравнению с контрольными животными (фиг. 46, сравнение правого столбика (обработка Ab2) и среднего столбика (контроль)). Улучшение при введении Ab2 было статистически значимым ($p < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента по сравнению с TNBS + группой отрицательного контроля). Рассчитанная активность Ab2 против гиперчувствительности составила 27% (что указывает на степень облегчения TNBS-индуцированной гиперчувствительности).

Данные результаты показывают, что антитела против CGRP можно применять для предотвращения или облегчения висцеральной боли.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент против пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP) человека, включающее: (i) полипептид переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 31 и (ii) полипептид переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 или их гуманизированный вариант.
2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое является гуманизированным.
3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которое является одноцепочечным.
4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое является химерным.
5. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, одновалентного антитела, scFv, камелизованного антитела, нанотела, IgNAR (одноцепочечного антитела, полученного из акул).
6. Антигенсвязывающий фрагмент по п.5, отличающийся тем, что указанный фрагмент является Fab-фрагментом.
7. Антигенсвязывающий фрагмент по п.5, отличающийся тем, что указанный фрагмент представляет собой metMab.
8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое является (i) агликозилированным или (ii) гликозилированным при условии, что в случае гликозилирования указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента они содержат только остатки маннозы.
9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое не является N-гликозилированным.
10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которые содержат Fc-область, модифицированную для изменения эффекторной функции, периода полужизни, протеолиза и/или гликозилирования.
11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое специфически связывается с CGRP-экспрессирующими клетками человека и/или циркулирующими растворимыми молекулами CGRP in vivo.
12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.11, которое специфически связывается с CGRP, экспрессированным на клетках или клетками человека у пациента с заболеванием, расстройством, состоянием или симптомом, ассоциированным с клетками, связывающимися с CGRP.
13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент человека по п.12, где указанное заболевание является мигренью.
14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.13, где указанное заболевание является мигренью с аурой или без нее.
15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.13, где указанное заболевание является хронической мигренью, частой эпизодической мигренью или менструальной мигренью.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где указанное заболевание, расстройство, состояние или симптом является кластерной головной болью.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибируют связывание CGRP с CGRP-R и/или его мультимерами, и/или оказывает антагонистическое действие на биологические эффекты CGRP.

18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с CGRP со скоростью диссоциации (K_{off}), меньшей или равной 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, 10^{-5} c^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, 10^{-6} c^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-7} c^{-1} .

19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент ингибируют образование комплекса CGRP с CGRP-R и/или его мультимерами и продукцию CGRP с CGRP-R и/или его мультимеров.

20. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, которые включает константный домен антитела человека.

21. Антитело антигенсвязывающий фрагмент по п.20, где константный домен антитела человека является IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 константным доменом антитела человека.

22. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.21, где указанная Fc-область содержит мутацию, изменяющую или устраняющую гликозилирование.

23. Конъюгат против пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP) человека, для лечения расстройства, характеризующегося повышенной экспрессией CGRP, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент непосредственно или опосредованно присоединены к терапевтическому агенту.

24. Конъюгат против пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP) человека, для детекции CGRP человека, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где антитело или антигенсвязывающий непосредственно или опосредованно присоединены к обнаруживаемой группе.

25. Конъюгат по п.24, где указанная обнаруживаемая группа является флуоресцентным красителем, ферментом, субстратом, биолюминесцентным веществом, радиоактивным веществом или хемилуминесцентным веществом.

26. Конъюгат против пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP) человека, для лечения расстройства, характеризующегося повышенной экспрессией CGRP, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где антитело или антигенсвязывающий непосредственно или опосредованно присоединены к функциональной группе, которая является стрептавидином, авидином, биотином, цитотоксином, цитотоксическим агентом или радиоактивным материалом.

27. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент против CGRP человека по любому из пп.1-22.

28. Нуклеотидная последовательность по п.27, отличающаяся тем, что состоит из кодонов, предпочтительных для дрожжей или человека.

29. Экспрессионный вектор, включающий нуклеотидную последовательность по п.27 или 28.

30. Экспрессионный вектор по п.29, отличающийся тем, что является плазмидой или рекомбинантным вирусным вектором.

31. Рекомбинантная клетка, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22.

32. Рекомбинантная клетка по п.31, отличающаяся тем, что выбрана из клетки млекопитающего, дрожжевой, бактериальной, грибной клетки и клетки насекомого.

33. Рекомбинантная клетка по п.32, отличающаяся тем, что является дрожжевой клеткой.

34. Рекомбинантная клетка по п.33, отличающаяся тем, что является диплоидной дрожжевой клеткой.

35. Рекомбинантная клетка по п.34, отличающаяся тем, что является клеткой дрожжей *Pichia*.

36. Способ лечения заболевания, расстройства, состояния или симптома, ассоциированного с клетками, которые экспрессируют CGRP, причем указанный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-22.

37. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанное заболевание, расстройство, состояние или симптом, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют CGRP, характеризуется повышенным CGRP, ассоциированным с расширением сосудов, и выбрано из мигрени (с аурой или без нее), состояния с CGRP-ассоциированной болью, рака, опухолей, гиперактивности мочевого пузыря, недержания мочи, зуда, псориаза, язвы, ангиогенеза, связанного с раковым ростом, ангиогенеза, связанного с опухолевым ростом, ангиогенеза, связанного с выживанием опухоли, мигреней, хронических мигреней, частых эпизодических мигреней, менструальных мигреней, гемиплегических мигреней, кластерных головных болей, мигренозной невралгии, хронических головных болей, головных болей напряжения, общих головных болей, "приливов", хронической пароксизмальной гемикрании, вторичных головных болей вследствие основной структурной проблемы в области головы или шеи, черепной невралгии, синусных голов-

ных болей (например, связанных с синуситом), головных болей, вызванных аллергией, или мигреней, вызванных аллергией, боли, заболеваний височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС), воспалительной боли, висцеральной боли, боли в постоперационном разрезе, комплексного регионального болевого синдрома, боли при раке, боли при первичном или метастатическом раке костей, боли при переломе, боли при остеопорозном переломе, боли в результате ожога, подагрической боли в суставах, боли, связанной с кризисом серповидных клеток, боли, ассоциированной с гепатоцеллюлярной карциномой, боли, ассоциированной с раком молочной железы, боли, ассоциированной с циррозом печени, нейрогенной боли, невропатической боли, ноцицептической боли, невралгии тройничного нерва, постгерпетической невралгии, фантомной боли конечностей, фибромиалгии, менструальной боли, овариалгии, рефлекторной симпатической дистрофии, нейрогенной боли, боли при остеоартрите или ревматоидном артрите, боли в пояснице, пояснично-крестцового радикулита или висцеральной боли, связанной с желудочно-пищеводным рефлюксом, воспалительного заболевания кишечника, почечной колики, простатита или панкреатита.

38. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанное заболевание, расстройство, состояние или симптом, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют CGRP, характеризуется повышенным CGRP, ассоциированным с расширением сосудов, и выбрано из гиперактивности мочевого пузыря; недержания мочи; боли; хронической боли; нейрогенного воспаления и воспалительной боли; невропатической боли; боли в глазах; зубной боли; послеоперационной боли, боли, связанной с травмой, диабета; инсулиннезависимого сахарного диабета и других воспалительных аутоиммунных заболеваний, сосудистых расстройств; воспаления; артрита; гиперреактивности бронхов, астмы; синдрома отмены опиатов; устойчивости к морфину; "приливов" у мужчин и женщин; аллергического дерматита; псориаза; энцефалита; травмы мозга; эпилепсии; кожных заболеваний, включающих зуд, нейрогенного кожного покраснения, розовых угрей и эритемы и воспалительного заболевания кишечника.

39. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанное заболевание, расстройство, состояние или симптом, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют CGRP, характеризуется повышенным CGRP, ассоциированным с расширением сосудов, и выбрано из боли, гиперактивности мочевого пузыря, недержания мочи, головной боли и мигрени.

40. Способ по п.36, отличающийся тем, что лечение дополнительно включает введение другого терапевтического агента, выбранного из антигистаминов, противовоспалительных агентов, анальгетиков и антибиотиков.

41. Способ по п.40, отличающийся тем, что указанный анальгетик является НПВС или опиоидным анальгетиком.

42. Способ по п.41, отличающийся тем, что указанный анальгетик является опиоидом, где введение по меньшей мере одного антитела или антигенсвязывающего фрагмента снижает или предотвращает устойчивость к данному опиоиду.

43. Способ по п.41, отличающийся тем, что указанный опиоид является морфином или производным морфина.

44. Способ по п.40, отличающийся тем, что указанный анальгетик является антителом или фрагментом антитела против фактора роста нервов (NGF).

45. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанное заболевание, расстройство, состояние или симптом, ассоциированные с клетками, которые экспрессируют CGRP, связано с болью и лечение включает введение еще одного терапевтического агента.

46. Способ по п.45, отличающийся тем, что указанный другой терапевтический агент выбран из химиотерапевтического агента, анальгетика, противовоспалительного агента, иммунодепрессанта, цитокина, антипролиферативного агента, противорвотного агента и цитотоксина.

47. Способ по п.45, отличающийся тем, что указанный другой терапевтический агент является анальгетиком.

48. Способ по п.47, отличающийся тем, что указанный анальгетик является НПВС или опиоидным анальгетиком.

49. Способ по п.47, отличающийся тем, что указанный анальгетик является антителом или фрагментом антитела против фактора роста нервов (NGF).

50. Способ по п.48, отличающийся тем, что указанный другой анальгетик является НПВС, включающим ингибитор циклооксигеназы 1 и/или циклооксигеназы 2.

51. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанное НПВС выбрано из (1) производных пропионовой кислоты, в том числе ибупрофена, напроксена, напросина, диклофенака и кетопрофена; (2) производных уксусной кислоты, в том числе толметина и сулиндака; (3) производных фенамовой кислоты, в том числе мефенамовой кислоты и меклофенамовой кислоты; (4) производных бифенилкарбоновой кислоты, в том числе дифлунизала и флуфенизала; и (5) оксикамов, в том числе пироксикама, судоксикама и изоксикама.

52. Способ по п.48, отличающийся тем, что указанный другой анальгетик является фенантроном; фенилгептиламином; фенилпиперидином; морфинанами или бензоморфановым соединением.

53. Способ по п.48, отличающийся тем, что указанный другой анальгетик является опиоидным

анальгетиком, выбранным из кодеина, дигидрокодеина, диацетилморфина, гидрокодона, гидроморфона, оксиморфона, леворфанолола, альфентанила, бупренорфина, буторфанолола, фентанила, суфентанила, меперидина, метадона, налбуфина, пропоксифена и пентазоцина и их фармацевтически приемлемых солей.

54. Способ по п.52 или 53, отличающийся тем, что комбинированное введение анальгетика и анти-CGRP антитела или антигенсвязывающего фрагмента усиливает обезболивающий эффект, вызываемый ими, и/или уменьшает устойчивость к анальгетику.

55. Способ по п.54, отличающийся тем, что указанный анальгетик является морфином или производным морфина или их фармацевтически приемлемой солью.

56. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-22 в культуре полиплоидных дрожжей, стабильно экспрессирующей и выделяющей в питательную среду по меньшей мере 10-25 мг/л указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий: (i) внедрение в гаплоидную дрожжевую клетку по меньшей мере одного экспрессирующего вектора, содержащего один или более гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где полинуклеотиды функционально связаны с промотором и сигнальной последовательностью в гаплоидной дрожжевой клетке; (ii) получение полиплоидных дрожжей путем спаривания или слияния сферопластов указанной гаплоидной дрожжевой клетки; (iii) отбор полиплоидных дрожжевых клеток, стабильно экспрессирующих и секретирующих в культуральную среду указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент; и (iv) получение стабильных полиплоидных дрожжевых культур из указанных полиплоидных дрожжевых клеток (iii), которые стабильно экспрессируют и секретируют в культуральную среду по меньшей мере 10-25 мг/л указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента; и (v) выделение указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента из указанных стабильных полиплоидных дрожжевых культур (iv).

57. Способ по п.56, отличающийся тем, что дрожжи относятся к роду *Pichia*.

58. Способ по п.57, отличающийся тем, что виды *Pichia* выбраны из *Pichia pastoris*, *Pichia methanolic* и *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*).

59. Способ по п.58, отличающийся тем, что вид *Pichia* является *Pichia pastoris*.

60. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22 для лечения, профилактики или уменьшения интенсивности заболеваний и расстройств, связанных с CGRP.

61. Фармацевтическая композиция по п.60, отличающаяся тем, что пригодна для инъекции.

62. Фармацевтическая композиция по п.60, отличающаяся тем, что дополнительно включает по меньшей мере один стабилизатор.

63. Фармацевтическая композиция по п.60, отличающаяся тем, что является лиофилизированной.

Ab1

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab1 (химера).

QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKLEWIGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRASSTVDLKMTS
LTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNFKVDRKRVKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDFTLMISRTP
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab1 (химера).

QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKLEWIGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRASSTVDLKMTS
LTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab1 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKLEWIGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRASSTVDLKMTS
LTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 8, 9, 10, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab1 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CATTCCTCGAAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTACGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGACTCG
ACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCGGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATGGGATTA
ATGATAACACATACTACCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGCTCGTCCGACCACGGTGGATCTGA
AAATGACCAGTCTGACAAACGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGCACCTCTGT
CACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 143)

Фиг. 1

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab1 (химера).

CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGTCCCTGGTCAACGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGACTCG
 ACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCAATTGGATTA
 ATGATAACACATACTACCGGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGCCTCGTCGACCACGGTGGATCTGA
 AAATGACCAAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGACCCCTCG
 TCACCGTCTCAGCGCCCTCCACCAAGGGCCCTATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCTCCAAAGGACCTCTGGGGGAC
 AGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACTCAGGCCCTGACCAAG
 CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGC
 AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGTAGGCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACATGCCCACCGTGGCCAGCACTGAACCTCTGGGGGGACCGTCACTTCTCCCTTCC
 CCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGGACGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGAGGAGCAG
 TACGCCAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTACCCTCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCAATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAGCAATGGGACGCCGAGAACAACCTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACT
 CCGACCGTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAAGCTTCTCATGCTC
 CGTGTGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 144)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab1 (химера).

QVLTQTASPVSAAVGVSTVITNCQASQSVYDNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSVSGTQFTLTISDLECAD
 AAITYYCLGSYDCSSGDCFFVGGGTEVVVVKRYVAAPSVFIPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDKSDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab1 (химера).

QVLTQTASPVSAAVGVSTVITNCQASQSVYDNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSVSGTQFTLTISDLECAD
 AAITYYCLGSYDCSSGDCFFVGGGTEVVVVKR (SEQ ID NO: 1)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab1 (химера). CDR1: полуэпигенный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQTASPVSAAVGVSTVITNCQASQSVYDNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSVSGTQFTLTISDLECAD
 DAATYYCLGSYDCSSGDCFFVGGGTEVVVVKR (SEQ ID NOS: 5, 6, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab1 (химера). CDR1: полуэпигенный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTGACCCAGACTGCATCCCGGTGCTGCAAGCTGGGAAAGCACAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAAG
 AGTGTATTATGATAACAACCTACCTAGCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATCTAC
 ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAAAGGACAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCACCATCAGCGAC
 CTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTAGGCAGTATGATTGTAGTGGTATTGTTTGTCTCGCGGAG
 GGACCGAGGTGGTGTCAAACGT (SEQ ID NO: 141)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab1 (химера).

CAAGTGTGACCCAGACTGCATCCCGGTGCTGCAAGCTGGGAAAGCACAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAAG
 AGTGTATTATGATAACAACCTACCTAGCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATCTAC
 CCATCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAAAGGACAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCACCATCAGCGAC
 GGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTAGGCAGTATGATTGTAGTGGTGTGTTTGTCTCGCGGAG
 GGACCGAGGTGGTGTCAAACGTACCGTGGTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTGTAAATC
 TGGAACTCCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
 CTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAAACAAGTCTACCGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCTGTC
 ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 142)

Ab2**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab2 (гуманизированная).**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKRVPEKSCDKHTITCPPAPELGGPVSFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRELQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab2 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab2 (гуманизированная). CDR1: полуэпигенный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 18, 19, 20, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab2 (гуманизированная). CDR1: полуэпигенный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCGAGTCTCGGAC
 TCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGGAGTCAITGGT
 TCAATGATAACACATACTACCGGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCAATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
 ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGGAC
 CCTCGTACCCGCTCTCGAGC (SEQ ID NO: 153)

Фиг. 2

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab2, продуцированная в клетке млекопитающего (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGTCAGTCTCTGGAC
 TCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATGGTA
 TCAATGATAACACATACTACCGAGCTGGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGACCCAGGTGT
 ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTGCTAGAGGGGACACTCTGGGGCCAAAGGA
 CCTCTGTCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCTGG
 GGGACAGCGGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCAGGCCCT
 GACCAGCGGGCTGCACACTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
 TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAGGTGGACAAGAGAGTT
 GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACATGCCCACCGTCCAGCAGCTGAACTCTCTGGGGGACCGTCACTTCTC
 TCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCTGAGGTCAAAGTCACTGCTGAGTGGAGCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGGGAGG
 AGCAGTACCGCACAGTACCGTGTGGTCAAGGCTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAAGGATACA
 AGTGAAGGTTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACACTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGA
 CACAGGTGACACCTGCCCTTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGACAATGGGACCGCGAGACAACACTACAAGACCAGCCCTCCGCTGC
 TGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGAGGTTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTC
 ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID
 NO: 154)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab2 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPKVPKQLIYSTSLASGVPFRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSSGDCFFVGGGKVEIKR (SEQ ID NO: 12)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab2 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPKVPKQLIYSTSLASGVPFRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSSGDCFFVGGGKVEIKR (SEQ ID NO: 11)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab2 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPKVPKQLIYSTSLASGVPFRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSSGDCFFVGGGKVEIKR (SEQ ID NOS: 15, 16, 17, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab2 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACTCAATGGCCAGGCCAGTFCAG
 AGTGTTTATGATAACAACACTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTAC
 ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCACTGAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC
 CTCAGCCTGGAAGATGTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAATGATTGTAGTGTGTGATGTTTGTTCGGCGGAG
 GAACCAAGGTGGAATCAAACGT (SEQ ID NO: 151)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab2 (гуманизированная).

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACTCAATGGCCAGGCCAGTFCAG
 GTGTTTATGATAACAACACTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTACATC
 CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCACTGAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC
 CAGCCTGGAAGATGTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAATGATTGTAGTGTGTGATGTTTGTTCGGCGGAG
 AACCAAGGTGGAATCAAACGTACCGTGGTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTGAATCT
 GGAACCTCTGTGTGTGCTGTGTAATACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCC
 TCCAATCGGTAACITCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCCTCAGCCTCAGCAGCACCTGA
 CGCTGAGCAAAGCAACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTGCCCGCTA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 152)

Ab3**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab3, продуцированная в дрожжевой клетке (гуманизированная).**

EVQLVESGGGLVQPQGSRLSCAVSGLDLSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWQGTIVTVSSASTKGPSVFLPSSKSTSGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
 MISRTPREVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLIIQDWWLNGKEYKCKVSNKALP
 ARIKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDIGFELYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCSPVNH:ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab3 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPQGSRLSCAVSGLDLSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWQGTIVTVSS (SEQ ID NO: 23)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab3 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPQGSRLSCAVSGLDLSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWQGTIVTVSS (SEQ ID NOS: 28, 29, 30, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab3 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGTCAGTCTCTGGAC
 TCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATGGTA
 TCAATGATAACAACATACTACCGGAGCTGGGGCAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGACCCAGGCTGT
 ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTGCTAGAGGGGACTCTGGGGCCAAAGGGAC
 CCTCTGACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 163)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab3, продуцированная в дрожжевой клетке (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCTCGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCGAGTCTCTGGAC
 TCGACTCAGTAGTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCAATGGTA
 TCAATGATAACACATACTACCGAGCTGGGGGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGACCAACGGTGT
 ATCTTCAAATGAACAGCTGAGAGCTGAGGACACTGTGTGTATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGGA
 CCTCGTCAACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCCCTCCTCAAAGAGCACCTTGG
 GGGACAGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCGAACCCGGTGCAGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCT
 GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGGCC
 TCCAGCAGCTTGGGCAACAGCTACATCTGCAACGTAATCACAAGCCAGCAACCAAGTGGACGCGAGAGTT
 GAGCCCAAATCTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGGCCAGCAGCTGAACTCTGGGGGACCCCTCAGTCTTCC
 TCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTATGATCTCCCGGACCCCTGAGTACATCGGTGGTGGGAGCGTGAAGCA
 CGAAGACCCGAGGTCAAAGTCAACTGGTACGTGGACGGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGG
 AGCAGTACCCAGCAGTACCGTGTGGTGCAGCTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGCACAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGA AAAACATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAC
 CACAGGTGACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCAGCAGCATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGGGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTACAGCAAGTCACTCCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGCTTCTC
 ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACACAGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID
 NO: 164)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab3 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQKPKGVKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED
 VATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYFKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab3 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQKPKGVKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED
 VATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKR (SEQ ID NO: 21)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab3 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQKPKGVKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED
 VATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKR (SEQ ID NOS: 25, 26, 27, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab3 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAAG
 AGTGTATGATAAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATCTAC
 ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAATCAGCAGC
 CTGCAGCTGAAGATGTTGCAACTTATCTGTCTAGGCAGTATGATTGATGATGTTGTTTTCGGCGGAG
 GAACCAAGGTGAAATCAACCGT (SEQ ID NO: 161)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab3 (гуманизированная).

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAAG
 GTGTATGATAAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATCTACATC
 CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAATCAGCAGC
 CAGCTGAAGATGTTGCAACTTATCTGTCTAGGCAGTATGATTGATGATGTTGTTTTCGGCGGAG
 AACCAAGGTGAAATCAACCGTACCGTGGTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCATCTGATGAGCAGTGAATCT
 GAACTGCCTCTGTGTGTGCTGTGAATACTTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAACCGCC
 TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGCACAGACAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAGCCTGA
 CGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCCTGCAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCTCA
 CAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 162)

Ab4**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab4 (химера).**

QSLSESGGRLVTPGTPPLTLCVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKLEWIGVIGINGATYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTS
 LTEDTATYFCARGDIWPGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHFTPAV
 IQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHITCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCVSMHEALFNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 34)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab4 (химера).

QSLSESGGRLVTPGTPPLTLCVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKLEWIGVIGINGATYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTS
 LTEDTATYFCARGDIWPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab4 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QSLSESGGRLVTPGTPPLTLCVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKLEWIGVIGINGATYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTS
 LTEDTATYFCARGDIWPGTLVTVSS (SEQ ID NOS: 38, 39, 40, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab4 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTGCCTGGTCAAGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGTTCCGCTCTCGGATCG
 ACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGGTCGCGCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCAATGGTAT
 AATGGTGCACATACTACCGAGCTGGGGGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGTGCAGCCAGGTGGATCTG
 AAAATGACAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGGCACCCCTC
 GTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 173)

Фиг. 4

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab4 (химера).

CAAGTGGTGGAGGAGTCCGGGGGTTCGCTGGTACGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGTTCCGTCTCTGGCATCG
 ACCTCAGTGGCTACTACATGAACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTATTA
 ATGGTGCACATACTACGCGAGCTGGGCGCAAGGGCCGATTCACCATCTCCAAACCTCTGTCGACCCAGGTTGATCTGA
 AAATGACCAGTCTGACAAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGTCAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGACCTCG
 TCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCTGGCACCCTCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGGAC
 AGCGCCCTGGGTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGTGGAACCTAGGCGCCCTGACCCAG
 CGGCTGACACACTTCCCGGTCTGCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTTCCTCCAGC
 AGCTTGGGACCCAGACTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGATGTGAGCC
 AAATCTGTGACA AAATCACACATGCCACCGTCCAGCACCTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCC
 CCCC AAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAG
 TACGCCAGCAGTACCGTGTGGTACGCTCTACCCTGTCACCCAGGACTGGTGAATGCCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCACAG
 GTGTACACCCCTGCCCTCCTCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATC
 CCAGCAGCATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACAAGACACCGCTCCCGTCTGGACT
 CCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTATGCTC
 CGTATGATGATGAGGCTCGCACAACTACACCGCAGAAGGCTCTCCCTGCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 174)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab4 (химера).

QVLTQTPSPVSAAVGTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQKPGPPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGTQFTLTISGVQCN
 AAAYTCLGSYDCTNGDCVFVGGTEVVVKRYAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVFKSFNRGEC (SEQ ID NO: 32)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab4 (химера).

QVLTQTPSPVSAAVGTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQKPGPPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGTQFTLTISGVQCN
 AAAYTCLGSYDCTNGDCVFVGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 31)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab4 (химера), CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQTPSPVSAAVGTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQKPGPPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGTQFTLTISGVQCN
 DAAAYTCLGSYDCTNGDCVFVGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 35, 36, 37, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области легкой цепи Ab4 (химера), CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCCACCATAATGCCAGGCCAGTCAAG
 AGTGTTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGCAGCCTCCAAACAACATGATCTATGATGC
 ATCCACTCTGGCGCTCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCACCATCAGCGGC
 GTGCAAGTAAACGATGCTGCCCTTACTACTGTCTGGGCAATTATGATTGTACTAAATGGTATTGTTTGTTCGGCGGAG
 GGACCGAGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 171)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab4 (химера).

CAAGTGTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCCACCATAATGCCAGGCCAGTCAAG
 GTGTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGCAGCCTCCAAACAACATGATCTATGATGCATC
 CACTCTGGCGCTCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCACCATCAGCGGC
 CAGTGTAAACGATGCTGCCCTTACTACTGTCTGGGCAATTATGATTGTACTAAATGGTATTGTTTGTTCGGCGGAG
 GACCGAGGTGGTCAAACGTACGGTGGTGCACCATCTGTCTTACTCTCCCGCATCTGATGAGCAGTGAATCT
 GGAATGCCTCTGTGTGTCTGCTGTAATAACTTCTATCCAGAGAGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
 TCCAAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGTA
 CGTGAAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACCGCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCCGCCGCTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 172)

Ab5**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab5, продуцированная в клетке млекопитающего (гуманизированная).**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWVGVINGATYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVY
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDIL
 MISRTPEVYTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFLVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab5 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWVGVINGATYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 43)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab5 (гуманизированная), CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWVGVINGATYYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 48, 49, 50, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab5 (гуманизированная), CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
 TCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACCTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCAATTGGT
 ATTAATGGTGCACATACTACCGGAGCTGGGCGAAAAGGCGGATTCACCACTCCAGAGACAATCCAAGACCAGGGT
 TATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
 CCCTCTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 183)

Фиг. 5

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab5, продуцированная в клетке млекопитающего (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
 TCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCAITGGTA
 TTAATGGTGCCACATACTACCGGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCACTCCAGAGACAAATCCAAGACCAGGTGT
 ATCTTCAAATGAAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGGA
 CCCTCTGTCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGG
 GGGCACAGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTACCGGTCTGTGGAACTCAGGCGCCCT
 GACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTGGCC
 TCCAGCAGCTTGGGCAACAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT
 GAGCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTTCC
 TCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACCTGAGGCCA
 CGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGG
 AGCAGTACCGCCAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCTCTGCAACAGGACTGGTGAATGGCAAGGATACA
 AGTCAAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCAGCAGCATCGCGTGGAGTGGGAGAACATGGGACGCCGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCTGGC
 TGGACTCCGACCGCTCTTCTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCCCTCTTCTC
 ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID
 NO: 184)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab5 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQOKPGKVPKQLIYDASTLASGVPSPRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATIYCLGSYDCTNGDCFVFGGKTKVEIKRIVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLENNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSYISLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 42)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab5 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQOKPGKVPKQLIYDASTLASGVPSPRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATIYCLGSYDCTNGDCFVFGGKTKVEIKR (SEQ ID NO: 41)

**Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab5 (гуманизированная). CDR1:
 подчеркнутый; CDR2: ; CDR3: .**

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQOKPGKVPKQLIYDASTLASGVPSPRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATIYCLGSYDCTNGDCFVFGGKTKVEIKR (SEQ ID NOS: 45, 46, 47, соответственно)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab5 (гуманизированная).

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCAATTGCCAGGCAGTGCAG
 AGTGTATTATCATAACACCTACCTGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATGATGC
 ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC
 CTGCAGCCTGAAGATGTGCAACTATTACTGTCTGGCAGTTATGATTGTACTAATGGTATGTGTTTGTCTCGGGGAGG
 GAACCAAGGTGGAAATCAAACGT (SEQ ID NO: 181)

Последовательность ДНК вариательной области легкой цепи Ab5

(гуманизированная). CDR1: ; CDR2: ; CDR3: .
 CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCAATTGCCAGGCAGTGCAG
 GTGTTTATCATAACACCTACCTGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATGATGCATC
 SACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG
 CAGCTGAAGATGTGCAACTATTACTGTCTGGCAGTTATGATTGTACTAATGGTATGTGTTTGTCTCGGGGAGG
 AACCAAGGTGGAAATCAAACGTACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCAAGTGAATCT
 GGAACCTGCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCT
 TCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACTACAGCTCAGCAGCAGCCCTGA
 CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTCGGAAGTACCCATCAGGGCTGAGCTGCCCTGCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 182)

Ab6**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab6, продуцированная в дрожжевой клетке (гуманизированная).**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNVWRQAPGKGLEWVGVINGATYYASWAKGRFTISRDNKTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVY
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 IEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSRFEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab6 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNVWRQAPGKGLEWVGVINGATYYASWAKGRFTISRDNKTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 53)

**Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab6 (гуманизированная). CDR1:
 подчеркнутый; CDR2: ; CDR3: .**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNVWRQAPGKGLEWVGVINGATYYASWAKGRFTISRDNKTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 58, 59, 60, соответственно)

**Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab6 (гуманизированная). CDR1:
 подчеркнутый; CDR2: ; CDR3: .**

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
 TCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCAITGGT
 ATTAATGGTCCACATACTACCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATCACCACTCCAGAGACAAATCCAAGACCACGGTGT
 TATCTTCAAATGAAACAGCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTCTTACAGGGGACTCTGGGGCCAAAGGGA
 CCCTCTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 193)

Фиг. 6

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab6, продуцированная в дрожжевой клетке (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCTCGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
 TCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACTGGGTCCCTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCAATGGTA
 TTAATGGTGCCACATACTACCGAGCTGGGGGAAAGGCCGATACCATCTCCAGAGACAATTTCAAAGACCACGGTGT
 ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTCTAGAGGGGACATCTGGGGCAAGGGA
 CCTCGTCAACCTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTCGCACCTCTCTCAAAGACACTCTGG
 GGGCACAGCGCCCTGGGTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTACGGGTGTCGTGGAACACTAGCGCCCT
 GACCAGGGCGTGCACACTTCCCGGCTGCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGGACCGTGCCT
 TCCAGCAGTGGGCAACAGACTACATCTGCACGTGAATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACGGGAGAGT
 GAGCCCAAACTCTGTGACAAAACACTCACATGCCCACCGTCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCC
 TCTTCCCTCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAA
 CGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAATATGCCAAGACAAGCCGCGGGGAGG
 AGCAGTACGCCAGCAGCTACCGTGGTTCAGCGTCTCACCGTCTGACACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGAAGGTCTTCAAACAAGCCCTCCAGCCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAAC
 CACAGGTGACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGT
 TCTATCCAGCAGATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGGGAGAACACTACAAGACCAGCCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACCGCTCTTCTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGAGGGAACCTCTTCT
 ATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID
 NO: 194)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab6 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQKPKGVKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED
 VAITYYCLGSYDCTNGDCFVFGGKTKVEIKRIVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDKSDTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGPE (SEQ ID NO: 52)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab6 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQKPKGVKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED
 VATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGKTKVEIKR (SEQ ID NO: 51)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab6 (гуманизированная). CDR1: полу жирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQKPKGVKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED
 VATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGKTKVEIKR (SEQ ID NOS: 55, 56, 57, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab6 (гуманизированная). CDR1: полу жирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCAATTGCCAGGCCAGTCA
 AGTGTATATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAGTTCTAAGCAACTGATCTATGATG
 ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTACAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG
 CTCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATCTGCTGGGCAAGTATGATGTACTAATGGTGTGTTGTTGTTTCGGCGGAGG
 AACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGATGAAATCT
 GGAAGTCCCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
 TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGA
 CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTTGCAGAGTCAACCATCAGGGCCAGTCTGCTCCCGTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 191)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab6 (гуманизированная).

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCAATTGCCAGGCCAGTCA
 GATGTATATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAGTTCTAAGCAACTGATCTATGATG
 ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTACAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG
 CTCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATCTGCTGGGCAAGTATGATGTACTAATGGTGTGTTGTTGTTTCGGCGGAGG
 AACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGATGAAATCT
 GGAAGTCCCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
 TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGA
 CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTTGCAGAGTCAACCATCAGGGCCAGTCTGCTCCCGTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 192)

Ab7**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab7 (химера).**

QEQLKESGGRLVTPGTSLLTCTVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLEWIGVVGINGRITYYASWAKGRFTISRSTTVDLKM
 TRLTTEEDATYFCARGDIWPGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 AVLQSSGLYSLSSVTVVPSLGTQTYICNVNHPKSNKTKVDKRVKPKSCKDTHTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVYDKSRW
 QGQNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab7 (химера).

QEQLKESGGRLVTPGTSLLTCTVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLEWIGVVGINGRITYYASWAKGRFTISRSTTVDLKM
 TRLTTEEDATYFCARGDIWPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 63)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab7 (химера). CDR1: полу жирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QEQLKESGGRLVTPGTSLLTCTVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLEWIGVVGINGRITYYASWAKGRFTISRSTTVDLKM
 TRLTTEEDATYFCARGDIWPGTLVTVSS (SEQ ID NOS: 68, 69, 70, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab7 (химера). CDR1: полу жирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGGACAGCTGAAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTACGCTGGGACATCCCTGACACTACCTGCACCTCTCTGGA
 ATCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGTCCGCCAGGCTCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCTGG
 TATTAATGGTCCGACATACTACCGGAGCTGGGGCAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGTCCGACCAAGGTGGAT
 CTGAAAATGACCAAGGCTGACAACCGAGGACAGGCCACCTATTTCTGTCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGCCAC
 CTGGTCAACCTCTCGAGC (SEQ ID NO: 203)

Фиг. 7

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab7 (химера).

CAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTACGCCTGGGACATCCCTGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGA
ATCGACCTCAGTAAACCACTACATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCGTTGGT
ATTAAATGGTCCACATACTACCGGAGCTGGGGCAAAGGCCGATTCACCACTCCAGAACCTCGTGCACCCAGCGTTGGAT
CTGAAAATGACCAAGGCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGGCCAT
CTGGTCACTGCTGAGCGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCTGGGG
GCACAGCGCCCTGGGCTGCTGTGCAAGGACTACTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTAGCCGCTCTGA
CCAGCGGCGTGCACACTTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCCTGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA
GCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAATCTTGGGGGACCGTCACTTCTCTC
TTCCCCAAAACCAAGGACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTGACATGGCTGGTGGAGCTGAGGCCACG
AAGACCCCTGAGGTCAAGTCACTGGTACGTGACGGCGTGGAGGTGCAATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAG
CAGTACCGCAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCACTCAGAAAACCACTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACA
CAGGTGTACACCTGCCCAATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGGTGAATGGCAAGGCTTC
TATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAAACAATACAAAGCACCGCTCCCGTCTC
GACTCCGACGGCTCTTCTCTCAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCAT
GCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID
NO: 204)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab7 (химера).

QVLTQTASPVSAAVGSVTINCAQSQSVYNYLAWYQQKPGPPKQLIYSTSLASGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCD
DAATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGTEVVKRFVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQSDKSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKFNRGEC (SEQ ID NO: 62)

Белковая последовательность переменной области легкой цепи Ab7 (химера).

QVLTQTASPVSAAVGSVTINCAQSQSVYNYLAWYQQKPGPPKQLIYSTSLASGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCD
DAATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGTEVVKRF (SEQ ID NO: 61)

Белковая последовательность переменной области легкой цепи Ab7 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQTASPVSAAVGSVTINCAQSQSVYNYLAWYQQKPGPPKQLIYSTSLASGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCD
DAATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGTEVVKRF (SEQ ID NOS: 65, 66, 67, соответственно)

Последовательность ДНК переменной области легкой цепи Ab7 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTGACCCAGACTGCATCCCGTGTCTGACGCTGTGGGAAGCACAGTCACCAATCAATTGCCAGGCCAGTCA
AGTGTGTTAATAATCAACTACCTTGGCTGATCAGCAGAAACAGGGCAGCTCCCAAGCACTGATCTATCTACA
TCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCACTCGCATTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTCACTCTCACCAAGCAGC
TGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTATGACTGTAGTACTGGTGTATTGTTTGTTCGGCGGAGG
GACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 201)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab7 (химера).

CAAGTGTGACCCAGACTGCATCCCGTGTCTGACGCTGTGGGAAGCACAGTCACCAATCAATTGCCAGGCCAGTCA
AGTGTGTTAATAATCAACTACCTTGGCTGATCAGCAGAAACAGGGCAGCTCCCAAGCACTGATCTATCTACA
TCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCACTCGCATTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTCACTCTCACCAAGCAGC
GAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTATGACTGTAGTACTGGTGTATTGTTTGTTCGGCGGAGG
GACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 201)

Ab8**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная).**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNHYMQWVVRQAPGKGLFVWVGVVINGRITYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWQGTLVTVSSASTKGPSVEPLAPSSKSTSGGTAALGLVLYDYPPEVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHPKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHITCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
RTEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)

Белковая последовательность переменной области тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNHYMQWVVRQAPGKGLFVWVGVVINGRITYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 73)

Белковая последовательность переменной области тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNHYMQWVVRQAPGKGLFVWVGVVINGRITYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWQGTLVTVSS (SEQ ID NOS: 78, 79, 80, соответственно)

Последовательность ДНК переменной области тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGTCCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCCACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCTGGTA
TCAATGGTCCACATACTACCGAGCTGGGGCAAAGGCCGATTCACCACTCTCCAGAGACAATTCCAAGACCAGGTGT
ATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGAC
CCTCGTACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 213)

Фиг. 8

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная).

GAGGTGACAGCTTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGACAGTCTCTGGAA
 TCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCCGGAGTCGTTGGTA
 TCAATGGTCCGACATACCTACCGAGCTGGGGCAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCC AAGACCACGGTGT
 ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTGTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
 CCCTCGTCAACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCTCAAAGACACCTCTGG
 GGGCAGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCT
 GACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGTGCTTACAGTCTCAGGACTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGGCC
 TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
 OAGCCCAATCTTTGACAAAACCTACACATGCCCACCCGTGCCCAGCACCTGAACTCTGGGGGACCGTCACTCTTCC
 TCTTCCCCCAAAACCCAAAGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGG
 AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTGACCCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAGAGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAACCACTCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCTGCCCAATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGCTGACCTGCTGCTCAAGGCT
 TCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTC
 ATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCAACCACTACACGACAGAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID
 NO: 214)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab8 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYNYNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGVPSPRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSTGDCFFVGGGTKVEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYVEKIKVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 72)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab8 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYNYNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGVPSPRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSTGDCFFVGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 71)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab8 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYNYNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGVPSPRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSTGDCFFVGGGTKVEIKR (SEQ ID NOS: 75, 76, 77, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области легкой цепи Ab8 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACCAATGCCAGGCCAGTCAAG
 AGTGTTCACAAATTAACAACCTACCTTGGCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATCTAC
 ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCATCTCGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCCTCTCACCATCAGCAGC
 CTGACGCTGAAGATGTGCAACTATTACTGTCTGGGCAGTATGATTGTAGTACTGGTGATTGTTTTCGGCGGAG
 GAACCAAGGTGGAAATCAAACT (SEQ ID NO: 211)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab8 (гуманизированная).

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACCAATGCCAGGCCAGTCAAG
 GTGTTTACAATTACAACCTACCTTGGCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATCTACATC
 CACTCTGGCATCTGGGGTCCATCTCGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCCTCTCACCATCAGCAGCCTG
 CAGCCGAAAGATGTGCAACTATTACTGTCTGGGCAAGTATGATTGTAGTACTGGTGAATGTTTTCGGCGGAGG
 AACCAAGGTGGAAATCAAACTGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAATGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCTG
 TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAGCCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA
 CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCTCGCAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 212)

Ab9**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab9 (химера).**

QSL EESGRLVTPGTPPLTCTVSGIGLSSYYMQWVRQSPGRGLEWIGVIGSDGKTYATWAKGRFTISKTSSTTVDLRMAS
 LTTEDTATYFCTRGDIWPGTLVTVSSASTKPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHIIFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITMISRTP
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIK
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab9 (химера).

QSL EESGRLVTPGTPPLTCTVSGIGLSSYYMQWVRQSPGRGLEWIGVIGSDGKTYATWAKGRFTISKTSSTTVDLRMAS
 LTTEDTATYFCTRGDIWPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 83)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab9 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QSL EESGRLVTPGTPPLTCTVSGIGLSSYYMQWVRQSPGRGLEWIGVIGSDGKTYATWAKGRFTISKTSSTTVDLRMAS
 LTTEDTATYFCTRGDIWPGTLVTVSS (SEQ ID NOS: 88, 89, 90, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab9 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTACCGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGCTCTGGAATCG
 GCCTCAGTAGCTACTACATGCAGTGGGTCCGCCAGTCTCCAGGAGGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCAITGGTAGT
 GATGGTAAAGACATACTACCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCAAGACCTCTGTCGACCACGGTGGATCTG
 AGAATGCCAGTCTGACAACCCAGGACACCGCCACTATTCTGTACCAAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGGGACCCCTC
 GTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 223)

Фиг. 9

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab9 (химера).

CAGTCCGCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCAACGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCCGCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGTCCGCCAGTCTCCAGGGAAGGGGGTGGAAATGGATCGGAGTCAITGGTAGTGTATGGTAAGACATACTACCGGACCTGGGGCGAAAGGCCGATTACCACTCCAAAGACCTCGCGACCACGGTGGATCTGA GAATGGCCAGTCTGACAAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGGGACCTCGTACACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGTCTTCCCGCTGGCACCTCTCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTACCGGTGCTGTGGAACTCAGGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGCTGCCCTCCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACCTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAGTGTAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCAACCGTCCAGCACCTGAACTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCTGGTGGACGTGGACGTCACGCAAG ACCCTGAGGTCAAAGTTCAAAGTGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAATAATGCAAGACAAAGCCCGGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAGCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCGTGTCAGAGGCTTCTATC CCAGGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGATCCGACCGCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAAGGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 224)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab9 (химера).

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCAASQNVYNNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFRSGSGTQFTLTISDVQCD DAATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGTEVVVKRTVAAPSVFIHPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQBSVTEQDSKDSYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKFNRQBC (SEQ ID NO: 82)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab9 (химера).

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCAASQNVYNNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFRSGSGTQFTLTISDVQCD DAATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 81)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab9 (химера). CDR1: полу жирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCAASQNVYNNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFRSGSGTQFTLTISDVQCD DAATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 85, 86, 87, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области легкой цепи Ab9 (химера). CDR1: полу жирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAG AATGTTATAATAACAACACTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTAC TCCCACTTGGCATCTGGGGTCTCATCGGATTCAGAGGACAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCACCACATCAGCGAC GTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTACTACTGTCTAGGCAGTATGATTGAGTGTGGTGTGTTTTCGGCGGAG GGACCAGGTTGGTGTCAAACGTACGGTGGTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCACTGATGAGCAGTGAATAATCT GGAACCTGCTCTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC TCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA CGTGTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGGAAGTACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGACTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 221)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab9 (химера).

CAAGTCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAGA ATGTTATAATAACAACACTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACGT CACICTGGCATCTGGGGTCTCATCGGATTCAGAGGACAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCACCACATCAGCGACGT CAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGCTAGGCAGTATGATGTGAGTCTGTGATGATGTTTGTGTTTTCGGCGGAGG GACCCAGGTTGGTGGTCAAACGTACGGTGGTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCACTGATGAGCAGTGAATAATCT GGAACCTGCTCTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC TCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA CGTGTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTCGGAAGTACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGACTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 222)

Ab10**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная).**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDN SKTTVYL QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH TFPAAVQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKPCDKTHTCPPCPAPELLGGPVFLFPPKPKDPLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVRGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSYVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDN SKTTVYL QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 93)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная). CDR1: полу жирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDN SKTTVYL QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLVTVSS (SEQ ID NOS: 98, 99, 100, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная). CDR1: полу жирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA TCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCCGGAGTCAATGGTA GTGATGGTAAGACATACTACCGCACCTGGGGCGAAAGCCGATACCACTCTCCAGAGACAATCCAAGACCAAGGTGT ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAC CCTCGTCAACCTCTCGAGC (SEQ ID NO: 233)

Фиг. 10

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
 TCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCAATGGTA
 GTGATGGTAAGACA TACTACGCCACCTGGGGCAAAAGGCCGATTCACCACTCCAGAGACAATCCAAGACCAAGGTGT
 ATCTTCAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTACAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGGA
 CCTCGTCAACCTCTCGAAGCCTCCACCAAGGGCCCACTCGGTCTTCCCTCCGACCTCTCCTCAAGAGCACCTCTGG
 GGGCACAGCGGCCCTGGGTGCTGTCAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGGTGCTGTGAACTCAGGCGCCCT
 GACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTCCCT
 TCCAGCAGTCTGGGACCCAGACTACATCTGCAACCTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
 GAGCCCAATCTTGTGACAAAACACACATGGCCACCGTCCAGCAGCTGAACTCTGGGGGACCGTCAAGTCTTCC
 TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCA
 CGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGGGAGG
 AGCAGTACCGCAGCACGTACCTGTGGTCAAGCTCCTCAGCGTCTGCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGAAGGTCTCCACAAAGCCCTCCAGCCCACTCGAAGAAACATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAC
 CACAGGTGACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGGCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACCGCGGAGAAACAACACCAAGACACCGCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACCGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGCTCTTCT
 ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACACTACACCGAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID
 NO: 234)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab10 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQNVNYYLAWYQQKPKGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSRGDCVFVGGGFKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVYCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSYSLSSITLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 92)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab10 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQNVNYYLAWYQQKPKGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSRGDCVFVGGGFKVEIKR (SEQ ID NO: 91)

**Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab10 (гуманизированная). CDR1:
 полу жирный; CDR2: ; CDR3: .**

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQNVNYYLAWYQQKPKGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSRGDCVFVGGGFKVEIKR (SEQ ID NOS: 95, 96, 97, соответственно)

**Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab10 (гуманизированная). CDR1:
 полу жирный; CDR2: ; CDR3: .**

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCAATTGCCAGGCCAGTCTAG
 AATGTTTACAATAACAACACTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTAC
ATCCACTCTGGCATCTGGGTCCCATCTCGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC
 CTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTACTGTCTGGGCAGTATGATTGATGCTGGTGAITTTTTCGGCGGAG
 GAACCAAGGTGGAATCAACAGT (SEQ ID NO: 231)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab10 (гуманизированная).

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCAATTGCCAGGCCAGTCTAG
 ATGTTTACAATAACAACACTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTAC
 CACTCTGGCATCTGGGTC

Ab11**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab11 (химера).**

QSLAESGGRI.VTPGGSLTLCTVSGIDVTNYYMQWVVRQAPGKLEWIGVIGVNGKRYASWAKGRFTISKTSSTVLDKMT
 SLTTEDTATYFCARGD/WGPGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALISGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSLTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVFEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMISRT
 PEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDNLGKGEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRFEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVDSIDGSFFLYSLKTVDKSRWQ
 QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 104)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab11 (химера).

QSLAESGGRI.VTPGGSLTLCTVSGIDVTNYYMQWVVRQAPGKLEWIGVIGVNGKRYASWAKGRFTISKTSSTVLDKMT
 SLTTEDTATYFCARGD/WGPGTLTVSS (SEQ ID NO: 103)

**Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab11 (химера). CDR1:
 CDR2: ; CDR3: .**

QSLAESGGRI.VTPGGSLTLCTVSGIDVTNYYMQWVVRQAPGKLEWIGVIGVNGKRYASWAKGRFTISKTSSTVLDKMT
 SLTTEDTATYFCARGD/WGPGTLTVSS (SEQ ID NOS: 108, 109, 110, соответственно)

**Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab11 (химера). CDR1:
 CDR2: ; CDR3: .**

CAGTCTGCTGGAGGATCTGGGGTCTGCGCTGGTCAAGCCTGGAGGATCCCTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGAACTCG
 ACGTCACTAACTATAATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGATCTGGTGTGA
 ATGGTAAGAGATACTACCGGAGCTGGCGGAAAGGCCGATTACCATCTCCAACCTCGTGCACACCGGTGGATCTGA
 AATGACCACTGTGACAAACCGAGGACACGCCACCTATTTCTGTGCAGAGGCGCATCTGGGGCCCGGGGACCCCTGT
 CACCGTCTGAGC (SEQ ID NO: 243)

Фиг. 11

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab11 (химера).

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGCCCTGGAGGATCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAAATCG
 ACGTCACTAACTACTATATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCAATGGGTGGA
 ATGGTAAGAGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCCAGCCAGGTCGGATCTGA
 LAATGACCAAGTGTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGTCAGAGGCGACACTCTGGGGCCCGGGGACCCTCG
 TACCCGCTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGGAC
 AGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTACCGGTGCTGTTGGAACCTCAGCGCCCTGACCA
 CGGGTGCACACTTCCCGGTGCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTCCCTCCAGC
 AGCTTGGGACCCAGACTACATCTGCAACGTGAATCAAAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTGTGAGCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCTTCC
 CCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAAAAGCCCGGGAGGAGCAG
 TACCAGACACGTACCGGTGGTACGGCTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCTCGAGAAAACCAATCTCCAAAGCCAAAGGGGACGCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCCTCCCGTGGTGA
 CCGACCGCTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGCAGAAGGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 244)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab11 (химера).

QVLQTASPVPVAVGSTVTINCRASQSVYYNNYLAWYQOKPGPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDD
 AATYYCLGSYDCSNGDCFFVGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCILNFPYREAKVQWKVDNALQSGNS
 QRSVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 102)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab11 (химера).

QVLQTASPVPVAVGSTVTINCRASQSVYYNNYLAWYQOKPGPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDD
 AATYYCLGSYDCSNGDCFFVGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 101)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab11 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLQTASPVPVAVGSTVTINCRASQSVYYNNYLAWYQOKPGPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDD
 AATYYCLGSYDCSNGDCFFVGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 105, 106, 107, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab11 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGGTGCTGACCCAGACTGCATCCCGGTGCTCAGCTGTGGGAAGCACAGTCAACATCAATTGCGGGCCAGTCAAG
 AGTGTGTTATATAACAACACTACCTAGCCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGCAGCCCTCCCAAGCAACTGATCTATCTAC
 ATCCCATCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTCACTCACTCACTCACTCACTCA
 GTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTATGATTGATGATGTTGTTTTCGGCGGAG
 GGACCGAGGTGGTGTCAACCGT (SEQ ID NO: 241)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab11 (химера).

CAGGTGCTGACCCAGACTGCATCCCGGTGCTCAGCTGTGGGAAGCACAGTCAACATCAATTGCGGGCCAGTCAAG
 GTGTTTATTATAACAACACTACCTAGCCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGCAGCCCTCCCAAGCAACTGATCTATCTACATC
 CACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTCACTCTCACCATCAGCGACGTG
 CAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTATGATTGATGATGTTGTTTTCGGCGGAGG
 GACCGAGGTGGTGGTCAAACGTACCGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAAGTGAATCT
 GGAACCTGCTCTGTGTGTGCTGCTGAAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATCAACGCC
 TCCAACTGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAGCTACAGCCCTCAGCAGCCCTGA
 CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACCGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGTCCGCCCTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 242)

Ab12**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab12 (гуманизованная).**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKLEWVGVIGVNGKRYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYCKVSNKALPA
 PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVPLDSDGFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 114)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab12 (гуманизованная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKLEWVGVIGVNGKRYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 113)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab12 (гуманизованная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKLEWVGVIGVNGKRYASWAKGRFTISRDNKSTTVYL
 LQMSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLVTVSS (SEQ ID NOS: 118, 119, 120, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab12 (гуманизованная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGCACTCTGGAA
 TCGACGTCACTAACTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCCGAGTCAITGGTIG
 TGAATGGTAAGAGATACTACCGAGCTGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAAGACCACGGTGT
 ATCTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGAC
 CCTCTGACCCGCTCGAGC (SEQ ID NO: 253)

Фиг. 12

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab13 (химера).

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGCACACTACCTGCACAGCCTCTGGATTCC
 GACTTCAGTAGCAATGCAATGTGGTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCAATTTACAAT
 GGATGGGCAGCACATACTACGCGAGCTGGGTGAATGGCCGATTCTCCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTC
 TGCACAACTAATAGTCTGACAGTTCGCGGACACGGCCACGATATTTATGTGCGAGAGATCTTGACTTGTGGGGGCCCCGGC
 CCTCGTACCCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCGCACCCCTCCCTCAAGAGCACCTCTGGG
 GGCACAGCGGCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTG
 ACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCT
 CCAGCAGTTGGGCACCCAGACTACATCTGCAACGTGAATCAACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
 AGCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGGCCAGCAGCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCT
 CTCCCCCAAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCTGGTGGTGGACCTGAGCCAC
 GAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGA
 GCAGTACGCCAGCAGTACCGTGGTTCAGCGTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACA
 GTGCAAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACC
 ACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCTGTTCAAAAGGCTT
 CTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTCT
 GGACTCCGACGGCTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTCA
 TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGAGAAGACCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID
 NO: 264)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab13 (химера).

AIVMTQTPSSKSVVPGDVTINQASELYNNALAWFQQKPGQPPKRLIYDASKLASGVPSRFSGGSGTQFTLPSGVQCD
 DAATYYCGGYRSDSVGVAFAGGTEVVVVRTVAAPSVFPPSDEQLKSTASVLLNNFYPREAKVQWVNDALQSGN
 SQESVTFQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQQLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 122)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab13 (химера).

AIVMTQTPSSKSVVPGDVTINQASELYNNALAWFQQKPGQPPKRLIYDASKLASGVPSRFSGGSGTQFTLPSGVQCD
 DAATYYCGGYRSDSVGVAFAGGTEVVVVKR (SEQ ID NO: 121)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab13 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

AIVMTQTPSSKSVVPGDVTINQASELYNNALAWFQQKPGQPPKRLIYDASKLASGVPSRFSGGSGTQFTLPSGVQCD
 DAATYYCGGYRSDSVGVAFAGGTEVVVVKR (SEQ ID NOS: 125, 126, 127, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области легкой цепи Ab13 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GCCATCGTATGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGACACAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGT
 GAGAGTCTTTATAATAACAACGCCTTGGCCTGGTTTCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGATCTATGATGC
 TGCAATCCAACTGGCACTGGGGTCCCATCGCGGTTCACTGGCGGTTGAGTGGCGGTGGGTCTGGGACACAGTCACTCTCACCATCAGT
 GCGGTGCGAGTGTGACGATGCTGCCACTACTACTGTGGAGGCTACAGAAGTATGATGTTGATGGTGTGCTTCCGCCGGA
 GGGACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 261)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab13 (химера).

GCCATCGTATGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGACACAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGT
 GAGAGTCTTTATAATAACAACGCCTTGGCCTGGTTTCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGATCTATGATGC
 ATCCAACTGGCAGTCTGGGGTCCCATCGCGGTTCACTGGCGGTTGAGTGGCGGTGGGTCTGGGACACAGTCACTCTCACCATCAGTGGC
 GTGCAATCCAACTGGCACTGGGGTCCCATCGCGGTTCACTGGCGGTTGAGTGGCGGTGGGTCTGGGACACAGTCACTCTCACCATCAGT
 GCGGTGCGAGTGTGACGATGCTGCCACTACTACTGTGGAGGCTACAGAAGTATGATGTTGATGGTGTGCTTCCGCCGGA
 GGGACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 262)

Ab14**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная).**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVWRQAPGKLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDNKSTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIVGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH
 TTPAVALQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQYICNVNHPKPSNTKVDARVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDILM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRFEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFGYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGFFLYSKLTVDKSK
 RWQQGNVFSCVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVWRQAPGKLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDNKSTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIVGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 133)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVWRQAPGKLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDNKSTVYL
 QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIVGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 138, 139, 140, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGTCTGTGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
 TCCGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCTATGGTGA
 GFGATGGTAAAGACATACTACCGCAGCTGGGGCAAGGGCGGATACCAATCTCCAGAGACAATTCAAAGACCAGGTTG
 ATCTCAAATGAACAGCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAC
 CCTCGTACCCTCTCGAGC (SEQ ID NO: 273)

Фиг. 14

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
 TCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGTGGAGTGGGTCCGGAGTCAATTGGTA
 GTGATGGTAAGACATACTACCGGACCTGGGCGAAAGGCCGATTCCACATCTCCAGAGACAATTCC AAGACCACGGTGT
 ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGTAATTTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGGA
 CCTCCGTCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCTCAAAGAGCACCTCTGG
 GGCACAGCGGCCCTGGGTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACCGGTGTCGGTGTCTGTGGAACCTAGGCGCCCT
 GACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGTGCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCTCCAGCAGCGTGGTGGACCGTGGCC
 TCCAGCAGCTTGGCCACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACCGGAGAGTT
 GAGCCCAAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCTCTGGGGGACCGTCACTCTCC
 TCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGGGTGGTGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGG
 AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGCTCTCACCGTCTGCACAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGC AAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCTCATCGAGAAAACATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAC
 CACAAGGTGACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCAGCAGCATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAAACA ACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCT
 ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID
 NO: 274)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab14 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQNVYNNYLAWYQQKPKGKVPKQLIYSTLTLASGVPVSRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSRGDCVFVGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 132)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab14 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQNVYNNYLAWYQQKPKGKVPKQLIYSTLTLASGVPVSRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSRGDCVFVGGGKVEIKR (SEQ ID NO: 131)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab14 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQSPSSLASVGDRTVINCQASQNVYNNYLAWYQQKPKGKVPKQLIYSTLTLASGVPVSRFSGSGSDFTLTISSLQPED
 VATYYCLGSYDCSRGDCVFVGGGKVEIKR (SEQ ID NOS: 135, 136, 137, соответственно)

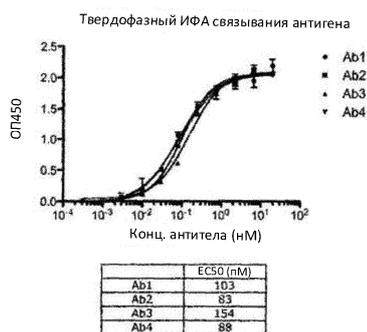
Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи Ab14 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAAG
 AATGTTTACAATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTTAC
 ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTACAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAATCAGCAGC
 CTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATCTGTCTGGCCAGTATGATTGATGCTGGTGAATTGTTTGTTCGGCGGAG
 GAACCAAGGTGAAATCAAACGT (SEQ ID NO: 271)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab14 (гуманизированная).

CAAGTGTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAAG
 ATGTTTACAATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTTACATC
 CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTACAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAATCAGCAGC
 CAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATCTGTCTGGCCAGTATGATTGATGCTGGTGAATTGTTTGTTCGGCGGAGG
 AACCAAGGTGAAATCAAACGTACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAATGCTCTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCC
 TCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA
 CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACCGCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCCTGAGCTCGCCGCTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 272)

Твердофазный ИФА CGRPα человека



Фиг. 15

Твердофазный ИФА CGRP α человека

Фиг. 16

Твердофазный ИФА CGRP α человека

Фиг. 17

Твердофазный ИФА CGRP α человека

Фиг. 18

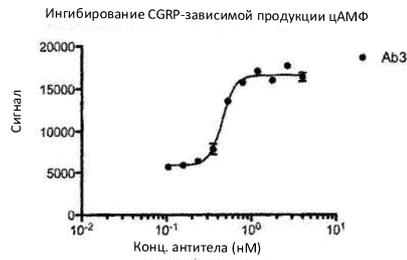
цАМФ CGRPα человека



	EC50 (nM)
Ab1	531
Ab2	452
Ab4	429

Фиг. 19

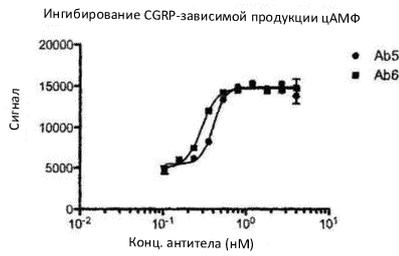
цАМФ CGRPα человека



	EC50 (nM)
Ab3	452

Фиг. 20

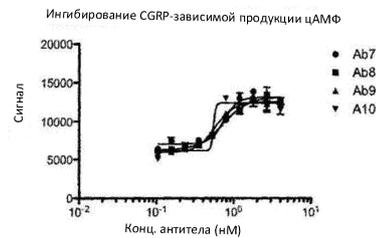
цАМФ CGRPα человека



	EC50 (nM)
Ab5	400
Ab6	288

Фиг. 21

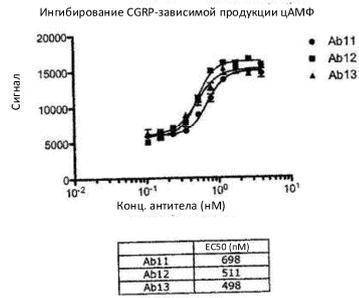
цАМФ CGRPα человека



	EC50 (nM)
Ab7	743
Ab8	734
Ab9	566
A10	542

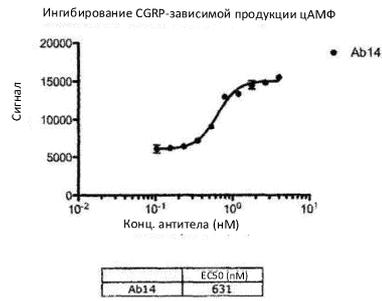
Фиг. 22

цАМФ CGRP α человека



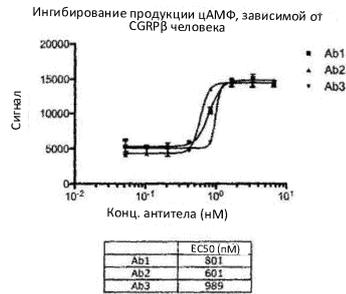
Фиг. 23

цАМФ CGRP α человека



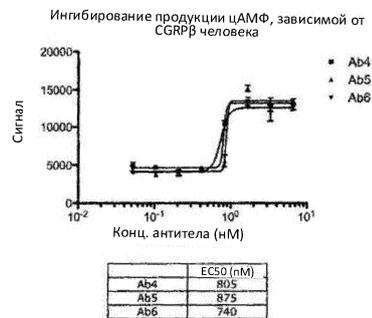
Фиг. 24

цАМФ CGRP β человека



Фиг. 25

цАМФ CGRP β человека



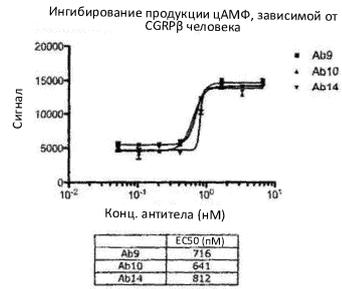
Фиг. 26

цАМФ CGRPβ человека



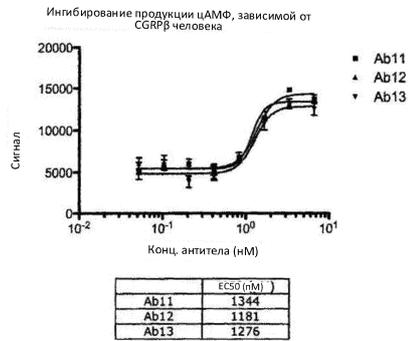
Фиг. 27

цАМФ CGRPβ человека



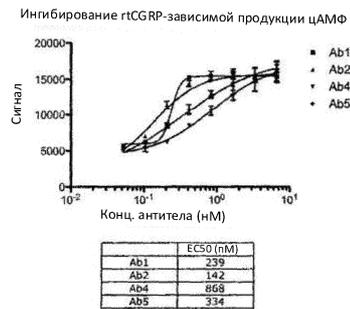
Фиг. 28

цАМФ CGRPβ человека



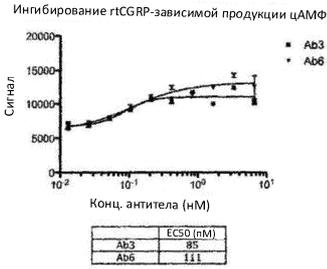
Фиг. 29

цАМФ CGRP крысы



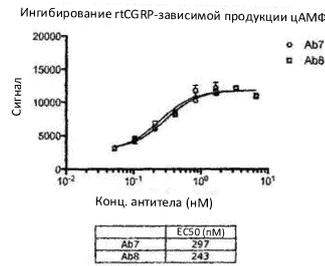
Фиг. 30

цАМФ CGRP крысы



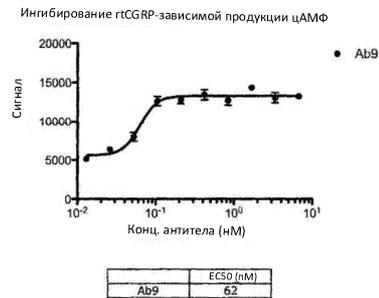
Фиг. 31

цАМФ CGRP крысы



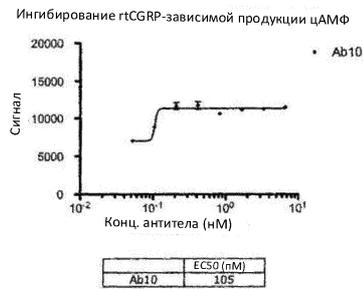
Фиг. 32

цАМФ CGRP крысы



Фиг. 33

цАМФ CGRP крысы



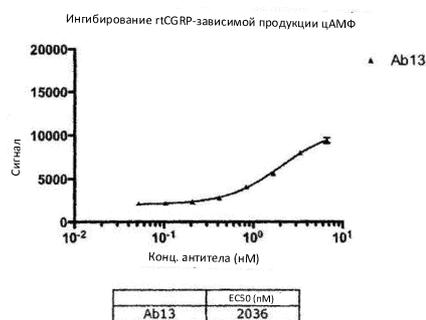
Фиг. 34

цАМФ CGRP крысы



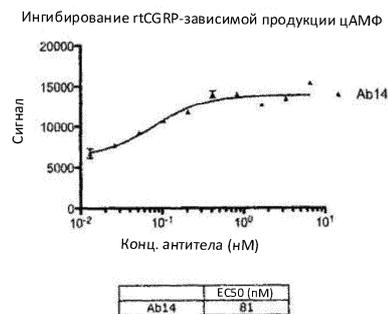
Фиг. 35

цАМФ CGRP крысы



Фиг. 36

цАМФ CGRP крысы



Фиг. 37

Ингибирование связывания радиолганда

	IC ₅₀ (нМ)	K _i (нМ)
Ab1	0.585	0.46
Ab2	0.482	0.378
Ab3	2.49	10.96
Ab4	0.579	0.455
Ab5	0.586	0.461
Ab6	2.46	1.94
Ab7	4.53	3.56
Ab8	0.936	0.736
Ab9	2.03	1.6
Ab10	0.28	0.22
Ab11	2.26	1.78
Ab12	0.315	0.248
Ab13	0.335	0.264

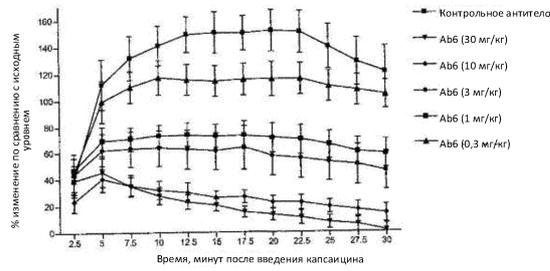
Фиг. 38

Снижение расширения сосудов после введения капсаицина

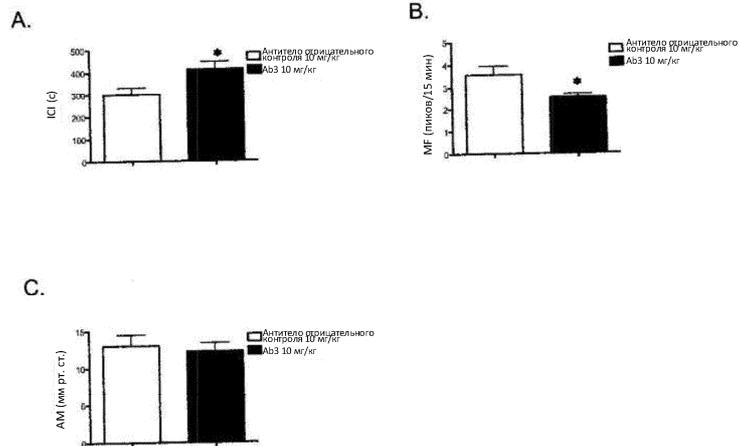


Фиг. 39

Снижение расширения сосудов после введения капсаицина

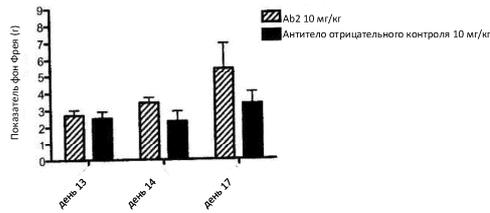


Фиг. 40

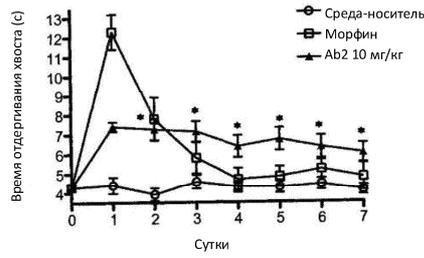


*p < 0,05 согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок, сравнение с антителом отрицательного контроля

Фиг. 41

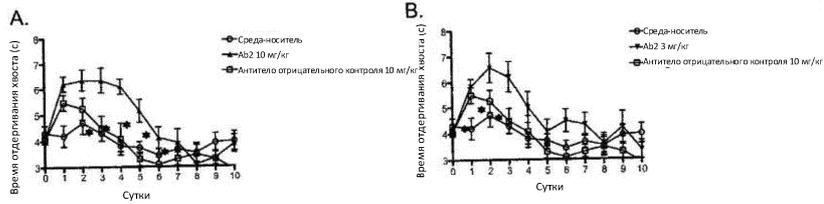


Фиг. 42



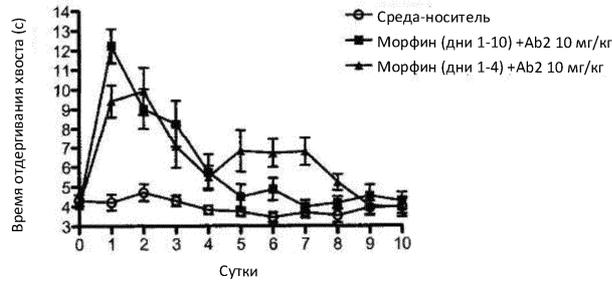
*p < 0,05 согласно однофакторному дисперсионному анализу с последующим тестом Даннетта, сравнение со средой-носителем

Фиг. 43

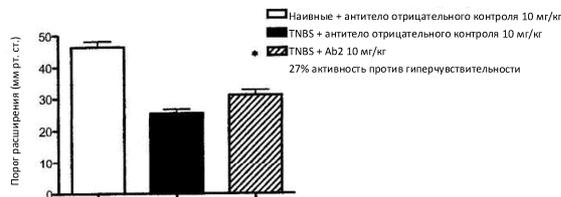


*p < 0,05 согласно однофакторному дисперсионному анализу с последующим тестом Даннетта, сравнение со средой-носителем

Фиг. 44



Фиг. 45



*p < 0,05 согласно t-критерию Стьюдента, сравнение с группой TNBS + контроль

Фиг. 46

