

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040241**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.11

(21) Номер заявки
201891284

(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) АНТИТЕЛО, НАПРАВЛЕННОЕ ПРОТИВ CGRP, И СПОСОБЫ ДЛЯ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) **61/488,660**

(32) **2011.05.20**

(33) **US**

(43) **2018.11.30**

(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 Марайя-Кристина (US)

(74) Представитель:
Купцова М.В., Фелицына С.Б. (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) Настоящее изобретение направлено на антитела и их фрагменты, обладающие специфичностью связывания с CGRP. Еще один вариант воплощения настоящего изобретения относится к антителам, описанным здесь, и их связывающим фрагментам, включая последовательности V_H, V_L и CDR-полипептидов, описанные здесь, и полинуклеотиды, кодирующие их. Настоящее изобретение также рассматривает конъюгаты антител против CGRP и их связывающих фрагментов, конъюгированных с одной или более функциональных или обнаруживаемых молекул. Настоящее изобретение также рассматривает способы получения указанных антител против CGRP и их связывающих фрагментов. Варианты воплощения настоящего изобретения также относятся к применению антител против CGRP и их связывающих фрагментов для диагностики, оценки и лечения заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP.

B1**040241****040241****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, аденомедуллин 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, выявлено следующее: (1) строгая корреляция между концентрацией CGRP в плазме и мигренью; (2) вливание CGRP приводит к мигренеподобной головной боли; (3) повышены исходные уровни CGRP; и (4) изменения уровней CGRP в плазме во время приступов мигрени значительно коррелируют с интенсивностью головной боли. Arulmozhi, 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 специфические антитела и их фрагменты, обладающие специфичностью связывания с CGRP, в частности антитела, обладающие желательной эпитопной специфичностью, высоким сродством или авидностью и/или функциональными свойствами. Еще один вариант воплощения настоящего изобретения относится к антителам, описанным здесь, включающим последовательности V_H , V_L и CDR-полипептидов, описанные здесь, и полинуклеотиды, кодирующие их. Предпочтительный вариант воплощения настоящего изобретения направлен на химерные или гуманизированные антитела и их фрагменты (в том числе Fab-фрагменты), способные связываться с CGRP и/или ингибировать биологическую активность, опосредованную связыванием CGRP с рецептором CGRP ("CGRP-R").

В другом предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения рассматриваются полноразмерные антитела и их Fab-фрагменты, ингибирующие продукцию цАМФ, зависимую от CGRP-альфа, CGRP-бета и CGRP крысы. В дополнительном предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения рассматриваются полноразмерные антитела и их Fab-фрагменты, снижающие расширение сосудов у реципиента после введения.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения химерные или гуманизированные антитела и их фрагменты (в том числе Fab-фрагменты), способные связываться с CGRP, можно применять 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: гиперактивность мочевого пузыря и другие заболевания мочевыделительной системы, включая инфекции, боли мочевого пузыря; хроническая боль; нейрогенное воспаление и боль при воспалении; невропатическая боль; боль в глазах; зубная боль; послеоперационная боль, боль, связанная с травмой, боль, связанная с ожогом, сахарный диабет; инсулиннезависимый сахарный диабет и другие воспалительные аутоиммунные заболевания, сосудистые расстройства; воспаление; артрит; гиперреактивность бронхов, астма; шок; сепсис; синдром отмены опиатов; устойчивость к морфину; "приливы" у мужчин и женщин; аллергический дерматит; псориаз; энцефалит; травма головного мозга; эпилепсия; нейродегенеративные заболевания; кожные заболевания, включая зуд, нейрогенное кожное покраснение, розовые угри и эритема; воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, цистит; дисменорея 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 химерные или гуманизированные антитела и их фрагменты (в том числе Fab-фрагменты), способные связываться с CGRP, можно предпочтительно применять 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.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения указанные антитела и их гуманизированные варианты можно получить из иммунных клеток (В-лимфоцитов) кролика и отобрать на основе их гомологии (идентичности последовательности) с последовательностями эмбрионального типа человека. Для указанных антител может требоваться минимальная (или может вообще не требоваться) модифика-

ция последовательности, что облегчает сохранение функциональных свойств после гуманизации. Еще один вариант воплощения настоящего изобретения направлен на фрагменты антител против CGRP, включая V_H , V_L и CDR-полипептиды, например, полученные из иммунных клеток кролика, и полинуклеотиды, кодирующие их, а также применение указанных фрагментов антител и полинуклеотидов, кодирующих их, для создания новых антител и полипептидных композиций, способных связываться с CGRP и/или комплексами CGRP/CGRP-R.

Настоящее изобретение также рассматривает конъюгаты антител против CGRP и их связывающих фрагментов, конъюгированных с одной или более функциональных или обнаруживаемых молекул. Настоящее изобретение также рассматривает способы получения указанных химерных или гуманизированных антител против CGRP или антител против комплексов CGRP/CGRP-R и их связывающих фрагментов. В одном варианте воплощения связывающие фрагменты включают, но не ограничиваются Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv-фрагментами, SMIP (иммунофармацевтическими средствами на основе низкомолекулярных соединений), камелизированными антителами, нанотелами и IgNAR.

Варианты воплощения настоящего изобретения относятся к применению антител против CGRP и их связывающих фрагментов для лечения заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP или его аномальной экспрессией. Настоящее изобретение также относится к применению фрагментов антител против CGRP для лечения заболеваний и расстройств, ассоциированных с CGRP или его аномальной экспрессией. Другие варианты воплощения настоящего изобретения относятся к продукции антител против CGRP или их фрагментов в рекомбинантных клетках-хозяевах, например, таких клетках млекопитающих как клетки CHO, NSO или HEK 293 или клетках дрожжей (например, диплоидных дрожжей, например, диплоидных *Pichia*) и других штаммах дрожжей.

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 антителами 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. ICI (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: ICI - 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 контроля (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 Bachem (Торранс, штат Калифорния, США):

CGRP-альфа: ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKAF-NH₂ (SEQ ID NO: 281), где N-концевой фенилаланин амидирован;

CGRP-бета: ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNNFVPTNVGSKAF-NH₂ (SEQ ID NO: 282), где N-концевой фенилаланин амидирован;

но и любые мембрано-связанные 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*; *Citromyces*; *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 methanolica* 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 а/а 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 антибиотику 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, (b) 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 последователь-

ность, 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 секретируемых 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 секретируемому белку или могут являться нативной последовательностью секретируемого 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 inserции 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. Энхансеры 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. Энхансер 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 inserции 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.* 55:913-949; 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 ПНР-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 BIP (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 BIP, 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 гуманизированному 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, гуманизированные 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 антиген-связывающие фрагменты можно продуцировать с помощью генной инженерии. С помощью этой техники, как и при других способах, антитело-продуцирующие клетки сенсibilизируют 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 устаревания несущественных аминокислот, например для модификации сайта гликозилирования или мини-

мизации 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 деградациии или оптимизации свойств растворимости, или для их лучшего соответствия требованиям, предъявляемым к терапевтическим агентам.

Химерные антитела можно получить рекомбинантными способами путем объединения переменных областей легких и тяжелых цепей (V_L и V_H), полученных из антитело-продуцирующих клеток одного 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 организм 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 инициирующий 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.

"Аmplification" 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 Brunt (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 Fab-область; стеблевой фрагмент "Y"-конфигурации обозначают как Fc-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, вызывавшему 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., p. 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, присутствующих в вариабельных 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 вариабельных областей легких и тяжелых цепей антитела.

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

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:

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKR (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:

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
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:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGI
NDNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLLTVSS
(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:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGINDNT
YYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (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 по-

следовательностей. 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 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: вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21; вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23; областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; и SEQ ID NO: 27) вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21; и областей, определяющих комплементарность (SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; и SEQ ID NO: 30) вариабельной 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 вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21 и последовательность вариабельной 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.

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

TEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (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:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (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: 23 и 24, или ее вариант, и дополнительно включающее последовательность V_L -полипептида, выбранную из: SEQ ID NO: 21 и 22, 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 кДа 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 молекулярной 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; Morgurgo et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:59-72 (1996); Vorobjev et al., *Nucleosides Nucleotides* 18:2745-2750 (1999); и Caliceti et al., *Bioconj. 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 0401384, 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.

пы 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 биолуминесцентные 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, аминокпертин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин; алкилирующие агенты, например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), митомицин C, ломустин (CCNU), 1-метилнитрозомочевину, циклофосфамид, хлорметин, бусульфан, дибромманнит, стрептозотозин, митомицин C, цис-дихлордиаминплатину (II) (DDP), цисплатин и карбоплатин (пареплатин), антрациклины, включая даунорубин (ранее дауномицин), доксорубин (адриамицин), деторубин, карминомицин, идарубин, эпирубин, митоксантрон и бисантрон; антибиотики, например, дактиномицин (ранее актиномицин D), блеомицин, калихемицин, митрамицин и антрамицин (AMC); и антимиотические агенты, например, алкалоиды барвинка, винкристин и винбластин, но не ограничиваются ими. Другие цитотоксические агенты включают паклитаксел (таксол), ридин, экзотоксин *Pseudomonas*, гемцитабин, цитохалазин B, грамицидин D, бромид этидия, эметин, этопозид, тенопозид, колхицин, дигидроксиантрацидион, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромидин, прокарабин, гидроксимочевину, аспарагиназу, кортикостероиды, митотан (O,P'-(DDD)), интерфероны и смеси указанных цитотоксических агентов.

Дополнительные цитотоксические агенты включают такие химиотерапевтические агенты как карбоплатин, цисплатин, паклитаксел, гемцитабин, калихемицин, доксорубин, 5-фторурацил, митомицин C, актиномицин D, циклофосфамид, винкристин и блеомицин, но не ограничиваются ими. Токсичные ферменты растений и бактерий, например ридин, 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. USA 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

(⁴⁷Sc), медь-67 (⁶⁷Cu), галлий-67 (⁶⁷Ga), иттрий-88 (⁸⁸Y), иттрий-90 (⁹⁰Y), иод-125 (¹²⁵I), иод-131 (¹³¹I), самарий-153 (¹⁵³Sm), лютеций-177 (¹⁷⁷Lu), рений-186 (¹⁸⁶Re) или рений-188 (¹⁸⁸Re), и альфа-излучающие агенты, например астат-211 (²¹¹At), свинец-212 (²¹²Pb), висмут-212 (²¹²Bi) или -213 (²¹³Bi) или актиний-225 (²²⁵Ac).

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 кислотную 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 перекрывающим(ми)ся линейным(и) или конформационным(и) эпитопом(ми) и/или конкурирующие за связывание с тем(и) же перекрывающим(ми)ся линейным(и) или конформационным(и) эпитопом(ми) интактного полипептида CGRP человека или его фрагмента, что и антитело против CGRP человека, выбранное из Ab1, Ab2, 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 перекрывающим(ми)ся линейным(и) или конформационным(и) эпитопом(ми) и/или конкурирует за связывание с тем(и) же перекрывающим(ми)ся линейным(и) или конформационным(и) эпитопом(ми) интактного полипептида CGRP человека или его фрагмента, что и 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 химер-

ные или гуманизированные антитела против CGRP выбраны из Ab3.

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 мигреней и головных болей у пациента. Неограничивающие типы мигреней 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 связывает(ют)ся с 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, 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 23, или 24, или их варианта, и/или одного или более из CDR, содержащихся в последовательностях V_L -полипептида, выбранных из 21, или 22, 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 Ab3.

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. В еще одном варианте воплощения все CDR антитела против CGRP человека, обсуждаемого выше, идентичны CDR, содержащимся в антителе против CGRP человека Ab3. В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения все CDR антитела против CGRP человека, обсуждаемого выше, идентичны CDR, содержащимся в антителе против CGRP человека Ab3.

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 каркасные области (FR) в вариабельных областях легких и тяжелых цепей указанного антитела, соответственно, являются FR человека, немодифицированными или модифицированными путем замены одного или более остатков FR человека в вариабельных областях легких или тяжелых цепей соответствующими остатками FR исходного антитела кролика, и где указанные FR человека происходят от последовательностей вариабельных областей легких и тяжелых цепей антитела человека, выбранных из библиотеки последовательностей антител эмбрионального типа человека на основании высокого уровня их гомологии с соответствующими вариабельными 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, связанным 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 послеоперационном 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 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.

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 кроветворных 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 кроветворных клеток костного мозга, множественной миеломы, лейкоза, первичного или вторичного рака костей.

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

Настоящее изобретение также рассматривает одну или более из нуклеотидных последовательностей, 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 (указанные) нуклеотидную(е) 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, антиметаболиты, 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} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M или 10^{-13} M. Предпочтительно антитела против CGRP и их фрагменты связывают CGRP с константой диссоциации, меньшей или равной 10^{-11} M, 5×10^{-12} M или 10^{-12} M. 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 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 вариативной области легкой цепи SEQ ID NO: 21:

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT

CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTATGATAACAACCTACCTAGCCTGGTA

TCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC

ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC

CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAGTTATGA

TTGTAGTAGTGGTGATTGTTTTGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACG

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:

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
 CACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTTTATGATAACAACCTACCTAGCCTGGTA
 TCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATCCACTCTGGC
 ATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAGTTATGA
 TTGTAGTAGTGGTGATTGTTTTGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACG
 TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
 CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA
 GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG
 CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC
 TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (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
 TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
 TCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTATCAATGAT
 AACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC
 CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
 ATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC
 (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
TGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGG
TCCGTCAAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGTCATTGGTATCAATGAT
AACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGACCACGGTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGT
ATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGACCCTCGTCAACGCTCTCGAGCG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
GTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CGCGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACG
AAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTT
CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT
CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (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 гипервариабельные области) последовательности вариабельной 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 гипервариабельные области) последовательности вариабельной 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: полинуклеотид SEQ ID NO: 161, кодирующего последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21; полинуклеотид SEQ ID NO: 162, кодирующего последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 22; полинуклеотид SEQ ID NO: 163, кодирующего последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23; полинуклеотид 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 изобре-

нию 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.

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: 23 и 24, 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 21 и 22, 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: 21 и SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24.

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: 21, 22, 23 или 24.

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 желаемому 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 антител против CGRP и их фрагментов. Способы получения антител против CGRP и их фрагментов, секретируемых 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); Verhoeven, 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. Кодированные 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 HEK293.

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 пеп-

тида 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 спи-

ска 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 мочевого пузыря, 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 родственными опиоидными анальгетиками. 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; 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, вы-

званную 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 лечению 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 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, внутриаертериальное, 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, ацетатин, ацетилсалициловую кислоту (аспирин), алклофенак, альминопрофен, эмоксипин, ампирон, арилалкановые кислоты, азапропазон, бенорилат, беноксапрофен, бромфенак, карпрофен, цеlexоксид, холинсалицилат магния, клофезон, ингибиторы COX-2, дексипрофен, декскетопрофен, диклофенак, дифлунизал, дроксикам, этензамид, этодолак, эторикоксиб, физаламин, фенамовые кислоты, фенбуфен, фенпрофен, флуфенамовую кислоту, флуноксапрофен, флурбипрофен, ибупрофен, ибупроксам, индометацин, индопрофен, кебузон, кетопрофен, кеторолак, лорноксикам, локсопрофен, люмиракоксиб, магния салицилат, мефлофенамовую 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, сульфипиразон, 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, цефпрозил, цефтазидим, цефтибутен, цефтизоксим, цефтобипрол, цефтриаксон, цефуросим, цефалоспорины, хлорамфеникол, циластатин, ципрофлоксацин, кларитромицин, клиндамицин, клотаксациллин, 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, мупиноцин, нафциллин, неомицин, нетилмицин, нитрофурантоин, норфлоксацин, офлоксацин, оксациллин, окситетрациклин, паромомицин, пенициллин, пенициллины, пиперациллин, платензимин, 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, флуодекортизона 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 физиологиче-

ски совместимыми. В одном варианте воплощения носитель подходит для парентерального введения. Предпочтительно, носитель может быть пригоден для внутривенного, внутрибрюшинного, 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, депо-импланты, препараты для инъекций (в том числе подкожных, внутримышечных, внутривенных и внутрикожных), 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 года (публикация патентной заявки США № US2006/0270045), 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, количеств, 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 KLH в полном адъюванте 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 адъюванте 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 TMB 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 A, 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 планшеты для анализа цАМФ. После инкубирования раствора антитела против CGRP α человека в течение одного часа 20 мкл раствора, содержащего клетки, переносили в планшеты для анализа цАМФ. Все образцы тестировали в двух повторностях с соответствующими контролями. Десять микролитров клеток добавляли в лунки и инкубировали планшеты 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 планшеты в течение 1 ч при встряхивании и комнатной температуре. Буфер для считывания (MSD) разбавляли в четыре раза водой и добавляли 100 мкл в каждую лунку планшета. Затем планшеты 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 (DMCO, 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 насливали на 8 мл Lympholyte Rabbit (Cedarlane) в 45-мл конической пробирке (Corning) и центрифугировали в течение 30 минут 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% DMCO/FBS-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.

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 интересные 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 100 мкл, содержащие приблизительно 4×10^7 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.

Амплификация и секвенирование последовательностей антител из антиген-специфичных 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 субклонированные 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 изгото-

вителя 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 1ч, 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 CGRPP выполнили аналогичный анализ с замещением агониста CGRP (конечная концентрация CGRPP 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 , CGRPP 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, содержащих желательный экспрессирующий вектор, интегрированный в их геном.

Трансформация экспрессирующих векторов в гаплоидные штаммы-хозяева *met1* и *lys3* *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 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 PTM1 4,35 мл/л и пеногаситель 204 1,67 мл/л. Раствор микроэлементов PTM1 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 3 ч после пика растворенного кислорода. После указанного периода голодания в реактор добавляли болюс этанола из расчета конечной концентрации этанола 1% (мас./об.). Культуры для ферментации оставляли уравниваться в течение 15-30 мин. 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 PTM1 12 мл/л.

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 гуманизированных 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 гуманизированной аминокислотной последовательности вариабельной 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 I 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 демонстрирует, что антитело Ab3 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, недержанием 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 внутрипузырное 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 ч) 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). Внутрипузырное 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-Фаллавые, 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 часов спустя крыс анестезировали уретаном (1,2 г/кг, подкожно (п/к)). Через 3 ч после п/к введения уретана в мочевого пузырь вводили полиэтиленовый катетер (с внутренним и наружным диаметром 0,58 и 0,96 мм, соответственно) через купол и закрепляли кисетным швом. Температуру тела поддерживали при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (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 мочевого 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 регистрировали 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 околопозвоночные 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 группам 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 среденосителе (Ab2, соответственно вводимое в дозировках 1 мг/кг, 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 (Friesen 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. измере-

ния 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 четким 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 натошак (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 введения баллона.

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

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

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 против человеческого CGRP или фрагмент антитела, содержащие (i) вариабельный полипептид легкой (V_L) цепи, содержащий CDR1 V_L SEQ ID NO: 25, CDR2 V_L SEQ ID NO: 26, CDR3 V_L SEQ ID NO: 27; и вариабельный полипептид тяжелой (V_H) цепи, содержащий CDR1 V_H SEQ ID NO: 28, CDR2 V_H SEQ ID NO: 29 и CDR3 V_H SEQ ID NO: 30.

2. Антитело против человеческого CGRP или фрагмент антитела по п.1, которые содержат полипептид вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 21 и полипептид вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23.

3. Антитело против человеческого CGRP или фрагмент антитела по п.1, которые включают полипептид легкой цепи SEQ ID NO: 22 и полипептид тяжелой цепи SEQ ID NO: 24.

4. Антитело против человеческого CGRP или фрагмент антитела по п.1 или 2, где указанное антитело представляет собой моновалентное антитело.

5. Антитело против человеческого CGRP или фрагмент антитела по пп.1, 2 или 4, где указанный фрагмент выбран из фрагмента Fab, фрагмента Fab' и фрагмента F(ab')₂.

6. Антитело против человеческого CGRP или фрагмент антитела по пп.1-4 или 5, который (i) агликозилирован или (ii) гликозилирован, при условии, что, если указанное антитело или фрагмент гликози-

лированы, они будут содержать только остатки маннозы.

7. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по пп.1-4 или 5, которые не являются N-гликозилированными.

8. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по пп.1-4 или 5, которые содержат область Fc, которая была модифицирована для изменения эффекторной функции, периода полужизни, протеолиза и/или гликозилирования.

9. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по пп.1-4 или 5, который представляет собой гуманизованное, одноцепочечное или химерное антитело.

10. Антитело против человеческого CGRP или фрагмент антитела по пп.1-4 или 5, которые специфически связываются с клетками человека, экспрессирующими CGRP и/или с циркулирующими растворимыми молекулами CGRP *in vivo*.

11. Антитело против человеческого CGRP или фрагмент антитела по п.10, которые специфически связываются с CGRP, экспрессируемым на клетках человека или клетками человека у пациента с заболеванием, расстройством, состоянием или симптомом, связанным с клетками, которые связывают CGRP.

12. Антитело против CGRP человека или его фрагмент по п.11, где заболевание, расстройство, состояние или симптом представляет собой мигрень.

13. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.11, где заболевание, расстройство, состояние или симптом представляет собой мигрень с аурой или без нее.

14. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.11, где заболевание, расстройство, состояние или симптом представляет собой хроническую мигрень, частые эпизодические мигрени или менструальные мигрени.

15. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.11, где заболевание, расстройство, состояние или симптом представляет собой кластерную головную боль.

16. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.1, который прямо или опосредовано присоединен к детектируемой метке или терапевтическому агенту.

17. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.1, где указанный фрагмент антитела представляет собой scFv, верблюжье тело, нанотело или IgNAR (одноцепочечное антитело, полученное от акулы).

18. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.1 или 2, которые содержат константный домен человеческого антитела.

19. Фрагмент антитела против CGRP человека по п.18, где константный домен человеческого антитела представляет собой константный домен человеческого антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

20. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.18, где Fc-область представляет собой IgG1, который содержит мутацию, которая изменяет или устраняет гликозилирование.

21. Антитело против CGRP или фрагмент антитела по любому из пп.1,2,3,4 или 5, которые содержатся в конъюгате, содержащем детектируемый фрагмент или цитотоксический фрагмент.

22. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.21, где указанный детектируемый фрагмент представляет собой флуоресцентный краситель, фермент, субстрат, биолюминесцентный материал, радиоактивный материал или хемилюминесцентный материал.

23. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по п.21, где указанный цитотоксический фрагмент представляет собой цитотоксин, цитотоксический агент или радиоактивный материал.

24. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по любому из пп.1-4 или 5, которые экспрессируются в *Pichia pastoris*.

25. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по любому из пп.1-4 или 5, которые экспрессируются в клетках CHO.

26. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по любому из пп.1-5, где указанное антитело ингибирует ассоциацию CGRP с CGRP-R и/или его мультимерами и/или противодействует биологическим эффектам CGRP.

27. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по любому из пп.1-5, где связывание указанного антитела с CGRP характеризуется скоростью диссоциации (K_{off}), меньшей или равной 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ или 10^{-7} s^{-1} .

28. Антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по пп.1-4 или 5, где указанное антитело ингибирует продукцию комплекса CGRP с CGRP-R и/или его мультимерами.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела против CGRP человека или фрагмента антитела по любому из пп.1-28.

30. Фармацевтическая композиция по п.29, которая подходит для инъекций.

31. Фармацевтическая композиция по п.29, которая дополнительно содержит по меньшей мере один стабилизатор.

32. Фармацевтическая композиция по п.29, которая является лиофилизированной.

33. Нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело против человеческого CGRP или фрагмент антитела по любому из пп.1-28.

34. Нуклеиновая кислота по п.33, которая состоит из предпочтительных кодонов дрожжей или

человека.

35. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.33.

36. Экспрессионный вектор по п.35, который представляет собой плазмиду или рекомбинантный вирусный вектор.

37. Рекомбинантная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело против CGRP человека или фрагмент антитела по любому из пп.1-28.

38. Клетка по п.37, которая выбрана из клетки млекопитающих, дрожжей, бактерий, грибов и насекомых.

39. Клетка по п.38, которая представляет собой дрожжевую клетку.

40. Клетка по п.39, которая представляет собой диплоидную дрожжевую клетку.

41. Дрожжевая клетка по п.39, которая представляет собой дрожжи *Pichia*.

42. Способ лечения заболевания, расстройства, состояния или симптома, связанного с клетками, которые экспрессируют CGRP, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела против человеческого CGRP или фрагмента антитела по любому из пп.1-5.

43. Способ по п.42, в котором заболевание, расстройство, состояние или симптом, ассоциированный с клетками, которые экспрессируют CGRP, характеризуется повышенным CGRP, связанным с вазодилатацией, и выбирается из мигрени (с аурой или без), состояния с CGRP-ассоциированной болью, потери веса, рака, опухолей, гиперактивного мочевого пузыря, недержания мочи, зуда, псориаза, язвы, сердечного заболевания, ангиогенеза, связанного с раком, ангиогенеза, связанного с ростом опухоли или устойчивостью 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 на основе структурной проблемы в голове или шее, черепной невралгии, синусовых головных болей, включая синусовые головные боли, связанные с синуситом, аллергических головных болей, аллергической мигрени, боль, ВНЧС (височно-нижнечелюстного заболевания суставов), воспалительной боли, висцеральной боли, боли после разреза, комплексного регионарного болевого синдрома, раковой боли, боли при первичном или метастатическом раке кости, боли при переломе, остеопоротической боли при переломе, боли в результате ожога, остеопороза, боли в суставах при подагре, боли, связанной с серповидно-клеточными кризами, боли, связанной с гепатоцеллюлярной карциномой, боли, связанной с раком молочной железы, боли, связанной с циррозом печени, нейрогенной боли, невропатической боли, ноцицептивной боли, невралгии тройничного нерва, постгерпетической невралгии, фантомной боли в конечностях, фибромиалгии, менструальной боли, овариалгии, рефлекторной симпатической дистрофии, нейрогенной боли, остеоартрита или ревматоидного артрита, боли в пояснице, диабетической невропатии, ишиаса или висцеральной боли, связанной с гастроэзофагеальным рефлюксом, диспепсии, синдрома раздраженного кишечника, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, илеита, язвенного колита, почечной колики, дисменореи, цистита, менструального периода, родов, менопаузы, простатита и панкреатита.

44. Способ по п.42, где заболевание, расстройство, состояние или симптом, связанные с клетками, которые экспрессируют CGRP, характеризуются повышенным CGRP, связанным с вазодилатацией, и выбирают из гиперактивного мочевого пузыря, недержания мочи, боли, хронической боли, нейрогенного воспаления и воспалительной боли, невропатической боли, глазной боли, зубной боли, послеоперационной боли, связанной с травмой боли, диабета, инсулиннезависимого сахарного диабета и других воспалительных аутоиммунных расстройств, сосудистых расстройств, воспаления, артрита, гиперреактивности бронхов, астмы, шока, сепсиса, синдрома отмены опиатов, резистентности к морфину, приливов у мужчин и женщин, аллергического дерматита, псориаза, энцефалита, травмы головного мозга, эпилепсии, нейродегенеративных заболеваний, кожных заболеваний, включая зуд, нейрогенного покраснения кожи, розацеа кожи, эритемы, воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженного кишечника, цистита и дисменореи.

45. Способ по п.42, в котором заболевание, расстройство, состояние или симптом, ассоциированный с клетками, которые экспрессируют CGRP, характеризуется повышенным CGRP, связанным с вазодилатацией, и выбирается из боли, гиперактивного мочевого пузыря, недержания мочи, головной боли и мигрени.

46. Способ по п.42, в котором лечение дополнительно включает введение другого терапевтического агента, выбранного из антигистаминных, противовоспалительных агентов, анальгетиков и антибиотиков.

47. Способ по п.46, в котором анальгетик представляет собой НПВП, опиоидный анальгетик или антитело.

48. Способ по п.47, в котором анальгетик представляет собой опиоид, и способ используется для снижения или предотвращения толерантности к опиоиду.

49. Способ по п.48, в котором опиоид представляет собой морфин или производное морфина.

50. Способ по п.46, где другим анальгетиком является антитело к NGF (фактор роста нервов).

51. Способ по п.42, отличающийся тем, что антитело против CGRP человека или фрагмент антитела вводят в терапевтическом режиме для лечения конкретного заболевания или состояния, связанного с бо-

лю, который включает введение другого терапевтического агента.

52. Способ по п.51, в котором другое терапевтическое средство представляет собой анальгетик.

53. Способ по п. 52, где другой анальгетик представляет собой НПВП, опиоидный анальгетик или антитело.

54. Способ по п.53, где НПВП содержит ингибитор циклооксигеназы 1 и/или циклооксигеназы 2.

55. Способ по п.54, где НПВС выбирают из (1) производных пропионовой кислоты, включая ибу-профен, напроксен, напросин, диклофенак и кетопрофен; (2) производных уксусной кислоты, включая толметин и сулиндак; (3) производных фенамовой кислоты, включая мефенамовую кислоту и меклофе-намовую кислоту; (4) производных бифенилкарбоновой кислоты, включая дифлунизал и флуфенизал; и (5) оксикамов, включая пироксим, судоксикам и изоксикам.

56. Способ по п.52, где другой анальгетик представляет собой фенантрен, фенилгептиламин, фе-нилпиперидин, морфинан или соединение бензоморфана.

57. Способ по п.52, отличающийся тем, что другой анальгетик представляет собой опиоидный анальгетик, выбранный из кодеина, дигидрокодеина, диацетилморфина, гидрокодона, гидроморфона, леворфаноло, оксиморфона, альфентанила, бупренорфина, буторфаноло, фентанила, суфентанила, мета-дона, налбуфина, пропоксифена и пентазоцина, и их фармацевтически приемлемые соли.

58. Способ получения антитела против CGRP человека или фрагмента антитела по пп.1-4 или 5 в дрожжевой культуре, состоящей из диплоидных дрожжевых клеток, которые секретируют в культураль-ную среду по меньшей мере 10-25 мг/л указанного антитела или фрагмента антитела, включающий:

а) введение по меньшей мере одного экспрессионного вектора, содержащего один или несколько гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих указанное антитело, функционально связанных с промо-тором и сигнальной последовательностью, в гаплоидные клетки дрожжей;

б) получение диплоидных дрожжевых клеток из указанных гаплоидных дрожжевых клеток путем спаривания или слияния сферопластов;

с) отбор диплоидных дрожжевых клеток, которые секретируют указанное антитело или фрагмент антитела в культуральную среду;

д) получение стабильных диплоидных дрожжевых культур из указанных диплоидных дрожжевых клеток со стадии (с); а также

е) выделение указанного антитела или фрагмента антитела из стабильных диплоидных дрожжевых культур со стадии (д).

59. Способ по п.58, в котором указанный род дрожжей представляет собой *Pichia*.

60. Способ по п.59, в котором вид *Pichia* выбран из *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica* и *Hansenula po-lymorpha* (*Pichia angusta*).

61. Способ по п.59, в котором вид *Pichia* представляет собой *Pichia pastoris*.

62. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую V_H антитела, по п.1 или 2, где аминокислотная последовательность V_H представляет собой аминокислотную последова-тельность SEQ ID NO: 23.

63. Клетка-хозяин, которая содержит и экспрессирует полинуклеотид по 62.

64. Клетка-хозяин по п.63, которая дополнительно содержит и экспрессирует полинуклеотид, со-держащий последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 V_L антитела.

65. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность V_L антитела по п.1 или 2, где указанная аминокислотная последовательность V_L яв-ляется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

Ab1**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab1 (химера).**

QSLSESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRASSTTVDLKMTS
 LTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSCKDKTITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDFLMISRT
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREFQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab1 (химера).

QSLSESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRASSTTVDLKMTS
 LTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab1 (химера). CDR1: полужирный; CDR2:

подчеркнутый; CDR3: курсив.

QSLSESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRASSTTVDLKMTS
 LTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 8, 9, 10, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab1 (химера). CDR1: полужирный; CDR2:

подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGTCCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCTGGTACGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGACTCG
 ACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTATTA
 ATGATAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGCCTCGTCGACCACGGTGGATCTGA
 AAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGCACCCCTCG
 TCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGCTCTTCCCGCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
 AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
 GCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
 AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCC
 CCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGCTGACGTGGAGCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
 TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACACCGCTCCCGTCTGGACT
 CCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 143)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab1 (химера).

CAGTCCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCTGGTACGCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGACTCG
 ACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTATTA
 ATGATAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGCCTCGTCGACCACGGTGGATCTGA
 AAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAGGCACCCCTCG
 TCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGCTCTTCCCGCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
 AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
 GCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
 AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCC
 CCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGCTGACGTGGAGCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
 TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACACCGCTCCCGTCTGGACT
 CCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 144)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab1 (химера).

QVLTQTASPVSAAVGSTVTINQASQSVYDNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDLECAD
 AATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab1

(химера).

QVLTQTASPVSAAVGSTVTINQASQSVYDNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSTLASGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDLECAD
 AATYYCLGSYDCSSGDCVFVGGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 1)

Белковая последовательность **вариабельной области легкой цепи Ab1 (химера)**. CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQTASPVSAAVGVSTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDLECA
DAATYYCLGSYDCSSGDCFFVGGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 5, 6, соответственно)

Последовательность ДНК **вариабельной области легкой цепи Ab1 (химера)**. CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AGTGTTTATGATAACAACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACAT
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGGAC
CTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGATTGTAGTAGTGGTGATTGTTTGTGTTTCGGCGGAG
GGACCGAGGTGGTGGTCAACGT (SEQ ID NO: 141)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab1 (химера).

CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AGTGTTTATGATAACAACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACAT
CCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGGACCT
GGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGATTGTAGTAGTGGTGATTGTTTGTGTTTCGGCGGAG
GGACCGAGGTGGTGGTCAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
CTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCTGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 142)

Фиг. 1

Ab2

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab2, продуцированная в клетке млекопитающего (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVGINDNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAP
PIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFELYSLKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14)

Белковая последовательность **вариабельной области тяжелой цепи Ab2 (гуманизированная)**.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVGINDNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)

Белковая последовательность **вариабельной области тяжелой цепи Ab2 (гуманизированная)**. CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVGINDNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 18, 19, 20, соответственно)

Последовательность ДНК **вариабельной области тяжелой цепи Ab2 (гуманизированная)**. CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAC
TCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTACGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATGGTA
TCAATGATAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTCTGTGTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAC
CCTCGTACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 153)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab2, продуцированная в клетке млекопитающего (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAC
TCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCATTGGTA
TCAATGATAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAAATCCAGACCACGGTGT
ATCTTCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
CCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCT
GACCAAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
TCCAGCAGCTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
GAGCCCAAAATCTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCGTGGTCAAGGCT
TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCGCTCCCGTCC
TGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID
NO: 154)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab2 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPKGVKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSDYDCSSGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSITYSI.SSTLILSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab2 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPKGVKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSDYDCSSGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 11)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab2 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPKGVKQLIY**STSTLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSDYDCSSGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NOS: 15, 16, 17, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи Ab2 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCC**AGGCCAGTCA**
AGTGTTTATGATAACA**ACTACCTAGCCT**GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTA**TTCTAC**
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC**ACTCTCACCATCAGCAGC**
CTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAGT**ATGATTGTAGTAGTGGTGATTGTTTGTGTTT**CGGCGGAG
GAACCAAGGTGGAAATCAAACGT (SEQ ID NO: 151)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab2 (гуманизированная).

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCA
GTGTTTATGATAACA**ACTACCTAGCCT**GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTA**TTCTAC**
CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTT**CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC**ACTCTCACCATCAGCAGCCTG
CAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAGT**ATGATTGTAGTAGTGGTGATTGTTTGTGTTT**CGGCGGAGG
AACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT**IGAAATCT**
GGAAGTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATA**ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC**
TCCAATCGGGTAACTCCCAAGGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA
CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA**CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA**
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 152)

Фиг. 2

Ab3

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab3, продуцированная в дрожжевой клетке (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPETVCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAP
PIETISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDIGSEFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab3 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 23)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab3 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIGINDNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTLTVSS (SEQ ID NOS: 28, 29, 30, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи Ab3 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAC
TCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATTGGTA
TCAATGATAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAATGAACAGCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTCTGTGTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAC
CCTCGTACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 163)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab3, продуцированная в дрожжевой клетке (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAC
TCGACCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATTGGTA
TCAATGATAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAATGAACAGCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTCTGTGTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAC
CCCTCGTACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGACAGCGGCGCTGGGCTGCTGTGTAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGGAACCTCAGGCGCCCT
GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGCGAGAGTT
GAGCCCAATCTGTGACAAAATCACAACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGG
AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGGACGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCTTGCCTCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGAGACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCT
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAAGACCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID
NO: 164)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab3 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTINCQASQSVYDNNYLAWYQKPKGVKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPED
VATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab3 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTINCQASQSVYDNNYLAWYQKPKGVKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPED
VATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 21)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab3 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTSQSSLSASVGDRTVINCQASQSVYDNNYLAWYQKPGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPED
VATYYCLGSYDCSSGDCFFGGGKVEIKR (SEQ ID NOS: 25, 26, 27, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи Ab3 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AGTGTTTATGATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTAC
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCCTTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGAAGATGTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAGTTATGATTGTAGTAGTGGTGATTGTTTGTTCGGCCGGAG
GAACCAAGGTGGAAATCAAACGT (SEQ ID NO: 161)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab3 (гуманизированная).

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGA
GTGTTTATGATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATC
CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCCTTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTG
CAGCCTGAAGATGTGCAACTTATTACTGTCTAGGCAGTTATGATTGTAGTAGTGGTGATTGTTTGTTCGGCCGGAGG
AACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
OGAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
TCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC
CGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 162)

Фиг. 3

Ab4

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab4 (химера).

QSLSESGGRLVTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWIGVINGATYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTS
LTEDTATYFCARGDIWPGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALISGVHFFPAV
LQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab4 (химера).

QSLSESGGRLVTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWIGVINGATYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTS
LTEDTATYFCARGDIWPGTLTVSS (SEQ ID NO: 33)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab4 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QSLSESGGRLVTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYYMNWVRQAPGKGLEWIGVINGATYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTS
LTEDTATYFCARGDIWPGTLTVSS (SEQ ID NOS: 38, 39, 40, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи Ab4 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGTTCCGTCTCTGGCATCG
ACCTCAGTGGCTACTACATGAACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCAATGGIATT
AATGGTGCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGGATCTG
AAAATGACCAGTCTGACAAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGGCACCTC
GTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 173)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab4 (химера).

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCTGGTCAACGCTGGGACACCCCTGACACTACCTGTTCCGTCTCTGGCATCG
 ACCTCAGTGGCTACTACATGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTATTA
 ATGGTGCCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAACCTCGTCGACCACGGTGGATCTGA
 AAATGACCAGTCTGACAAACGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCCGGGCACCTCG
 TCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
 AGCGGCCCTGGGCTGCTTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG
 CGGCTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCACG
 AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAACTACACATGCCACCGTGCCTCAGCCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
 CCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
 TACGCCAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGTCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCCCTGCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTCAAGCTGACCTGCTGGTCAAAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTCTGGACT
 CCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACACGCAGAAGAGCTCTCTCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 174)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab4 (химера).

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINQASQSVYHNTYLAWYQQKPGQPPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCND
 AAAYYCLGSYDCTNGDCFFVGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 32)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab4 (химера).

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINQASQSVYHNTYLAWYQQKPGQPPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCND
 AAAYYCLGSYDCTNGDCFFVGGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 31)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab4 (химера), CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINQASQSVYHNTYLAWYQQKPGQPPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCND
 DAAAYYCLGSYDCTNGDCFFVGGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 35, 36, 37, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи Ab4 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
 AGTGTATTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCAAACAACTGATCTATGATGC
 ATCCACTCTGGCGCTTGGGGTCCCATCGCGGTTCAGCGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGGG
 GTGCAGTGAACGATGCTGCCGCTTACTACTGTCTGGGCAGTATGATTGTACTAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAG
 GGACCGAGGTGGTGGTCAAAACGT (SEQ ID NO: 171)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab4 (химера).

CAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGA
 GTGTTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCAAACAACTGATCTATGATGCATC
 CACTCTGGCGCTTGGGGTCCCATCGCGGTTCAGCGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGCGGGCTG
 CAGTGTAAACGATGCTGCCGCTTACTACTGTCTGGGCAGTATGATGTACTAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGG
 GACCGAGGTGGTGGTCAAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
 TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAG
 CGTGAAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGCTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 172)

Фиг. 4

Ab5

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab5, продуцированная в клетке млекопитающего (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYIMNWVRQAPGKGLEWVGVIINGATYYASWAKGRFTISRDNSTKTVYLL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPFVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab5 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYIMNWVRQAPGKGLEWVGVIINGATYYASWAKGRFTISRDNSTKTVYLL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 43)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab5 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYIMNWVRQAPGKGLEWVGVIINGATYYASWAKGRFTISRDNSTKTVYLL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 48, 49, 50, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab5 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACCTGGGTCCGTACGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATGGT
ATTAATGGTGCCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
TATCTTCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGTAATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
CCCTCGTACCCTCTCGAGC (SEQ ID NO: 183)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab5, продуцированная в клетке млекопитающего (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACCTGGGTCCGTACGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCAATGGT
TTAATGGTGCCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGTAATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
CCCTCGTACCCTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAGAGCCTCTCGG
GGGCACAGCGGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCT
GACCAGCGGCTGCACACCTTCCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
TCCAGCAGCTTGGGCAACAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCAGCTGAATCTTGGGGGACCGTCACTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCCGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCAGCTGCTGACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGAAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCTGCCCTCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGGAGAACAACTACAAGACCACCGCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCAGGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID
NO: 184)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab5 (гуманизированная).

QVLTQSPSSI.SASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQKPKGVPKQLIYDASTLASGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPED
VATYYCLGSDCTNGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 42)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab5 (гуманизированная).

QVLTQSPSSI.SASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQKPKGVPKQLIYDASTLASGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPED
VATYYCLGSDCTNGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 41)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab5 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTSQSSLSASVGDRTNQCASQSVYHNTYLAWYQQKPKGVKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NOS: 45, 46, 47, соответственно)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab5 (гуманизированная).

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATGATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAATTATGATTGTAATAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAATCAAACGT (SEQ ID NO: 181)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab5 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGTGTATTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATGATGCATCCTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAATTATGATTGTAATAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 182)

Фиг. 5

Ab6

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab6, продуцированная в дрожжевой клетке (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYIMNWVRQAPGKGLEWVGIVGNGATYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMQNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPJEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRFEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab6 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYIMNWVRQAPGKGLEWVGIVGNGATYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMQNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 53).

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab6 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYIMNWVRQAPGKGLEWVGIVGNGATYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMQNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 58, 59, 60, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab6 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAATCGACCTCAGTGGCTACTACATGAAGTGGGTCCGTAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGTCATIGGTATTAATGGTGCCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATCCAAGACCACGGGTATCTTCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAACCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 193)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab6, продуцированная в дрожжевой клетке (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGACCTCAGTGGCTACTACATGAACCTGGGTCCGTACGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGTCAATTGGTA
TTAATTGGTGCCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGTGTGATTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGGA
CCCTCGTCAACGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCAGGCGCCCT
GACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACGCGAGAGTT
GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCACAGCCTGAACTCCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTACATGCTGGTGGTGGACGTGAOCCA
CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCTTGCCCATCTCCCGGAGGAGATGACCAGAACCAGGTACGCTGACCTGGTCAALAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTCT
ATGCTCGTGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID
NO: 194)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab6 (гуманизированная).

QVLTSPPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQKPGKVPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 52)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab6 (гуманизированная).

QVLTSPPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQKPGKVPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 51)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab6 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTSPPSSLSASVGDRTVINCQASQSVYHNTYLAWYQKPGKVPKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NOS: 55, 56, 57, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи Ab6 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGTCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AGTGTTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCTTAAGCAACTGATCTATGATGC
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCTACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTATTACTGTCTGGGCAGTTATGATTGTAATAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAG
GAACCAAGGTGGAAATCAAACGT (SEQ ID NO: 191)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab6 (гуманизированная).

CAAGTGTCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
GTGTTTATCATAACACCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCTTAAGCAACTGATCTATGATGCATC
CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCTACCATCAGCAGCCTG
CAGCCTGAAGATGTTGCAACTATTACTGTCTGGGAGTTATGATTGTAATAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGG
AACCAAGGTGGAAATCAAACGTACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACCTGCCCTGTGTTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
TCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGA
CGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 192)

Фиг. 6

Ab7

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab7 (химера).

QEQLKESGGRLVTPGTSLTLTCTVSGIDL SNHYMQWVRQAPGKLEWIGVVGINGRTYYASWAKGRFTISRTSSTTVDLKM
TRLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSSATKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCSCVMIEALHNIHTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab7 (химера).

QEQLKESGGRLVTPGTSLTLTCTVSGIDL SNHYMQWVRQAPGKLEWIGVVGINGRTYYASWAKGRFTISRTSSTTVDLKM
TRLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO: 63)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab7 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QEQLKESGGRLVTPGTSLTLTCTVSGIDL SNHYMQWVRQAPGKLEWIGVVGINGRTYYASWAKGRFTISRTSSTTVDLKM
TRLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 68, 69, 70, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи Ab7 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTACGCGCTGGGACATCCCTGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGA
ATCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCGTGGG
TATTAATGGTTCGCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGTCGACCAACCGTGGAT
CTGAAAATGACCAGGCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCACGGCACC
CTGGTCACCGTCTCTGAGC (SEQ ID NO: 203)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab7 (химера).

CAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTACGCGCTGGGACATCCCTGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGA
ATCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCGTGGG
ATTAATGGTTCGCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGTCGACCAACCGTGGAT
CTGAAAATGACCAGGCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCACGGCACC
CTGGTCACCGTCTCTGAGCAGCGCTCCACCAAGGGGCTCCAGGTCCTCCCGCTGGCACCCTCTCCAGAGCACCTCTGGGG
GCACAGCGGCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTCGACGGTGTCTGGGAACCTCAGGCGCCCTGA
CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACGTCGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA
GCCCAATCTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCTCT
TTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCGCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCGTGAAGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAG
CAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAACGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGGCTGGTCAAGGCTTC
TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAACAACTACAAGACCAAGCCCTCCCGTGTCT
GACTCCGACGGCTCTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID
NO: 204)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab7 (химера).

QVLTQTASPVSAAVGSTVTINCQASQSVYNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCD
DAATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 62)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab7 (химера).

QVLTQTASPVSAAVGSTVTINCQASQSVYNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCD
DAATYYCLGSYDCSTGDCVFVGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 61)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab7 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLQTASPVSAAVGSVTINCQASQSVYNYNLAWYQQKPGQPPKQLYSTSTLASGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDVQCD
DAATYYCLGSYDCSTGDCFFVGGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 65, 66, 67, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи Ab7 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AGTGTTTATAATTACAACCTACCTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACAT
TCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGATTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCTCACCATCAGCGACG
TGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGACTGTAGTACTGGTATTGTTTGTTCGGCGGAGG
GACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 201)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab7 (химера).

CAAGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AGTGTTTATAATTACAACCTACCTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACAT
CCTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGATTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCTCACCATCAGCGACG
GCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGACTGTAGTACTGGTGAITGTTTGTTCGGCGGAG
GGACCGAGGTGGTGGTCAAACGTACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
CTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 202)

Фиг. 7

Ab8

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLFWVGYYVGINGRITYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLLTVSSASTKGPSVEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLFWVGYYVGINGRITYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 73)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNHYMQWVRQAPGKGLFWVGYYVGINGRITYYASWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLLTVSS (SEQ ID NOS: 78, 79, 80, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGGTCCGTCAAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCGTTGGTA
TCAATGGTTCGACATACTACCGGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAC
CCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 213)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab8 (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGACCTCAGTAACCACTACATGCAATGGGTCCGTTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCTGGTA
TCAATGGTCCGACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC AAGACCACGGTGT
ATCTTCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGTAATTTCTGTGCTAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
CCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGACAGCGGCTGGGCTGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTCTGTGGAACCTAGCGCGCT
GACCAGCGGCTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGGCC
TCCAGCAGCTTGGGCAACCAAGCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
GAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCTTGGGGGGACCGTCACTCTTC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGG
AGCAGTACGCCAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCTTCCCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAAC
CAGAGGTGTACACCTTCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAAGCCGAGAACAACTACAAGACCAAGCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCT
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID
NO: 214)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab8 (гуманизированная).

QVLTSPPSSLSASVGDRTINCAQASQSVYNYNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
VATYYCLGSDYDCSTGDCVFVGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSTLSSTLTLSKADYBKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 72)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab8 (гуманизированная).

QVLTSPPSSLSASVGDRTINCAQASQSVYNYNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
VATYYCLGSDYDCSTGDCVFVGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 71)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab8 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTSPPSSLSASVGDRTINCAQASQSVYNYNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
VATYYCLGSDYDCSTGDCVFVGGGTKVEIKR (SEQ ID NOS: 75, 76, 77, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab8 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAAG
AGTGTTTACAATTACAACCTACCTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTAC
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCAACATCAGCAGC
CTGCAGCCTGAAGATGTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAAGTATGATTGTAGTACTGGTGATTGTTTTCGGCGGAG
GAACCAAGGTGGAAATCAACCGT (SEQ ID NO: 211)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab8 (гуманизированная).

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCAATTGCCAGGCCAGTCAAG
GTGTTTACAATTACAACCTACCTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTACATC
CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCAACATCAGCAGCCTG
CAGCCTGAAGATGTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAAGTATGATTGTAGTACTGGTGATTGTTTTCGGCGGAGG
AACCAAGGTGGAAATCAACCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACCTGCCTCTGTGTGTGCTGTAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA
CGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCTGA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 212)

Фиг. 8

Ab9**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab9 (химера).**

QSLIESSGGRLVTPGTPLTLCTVSGIGLSSYYMQWVRQSPGRGLEWIGVIGSDGKTYATWAKGRFTISKTSSTTVDLRMAS
 LTTEDTATYFCTRGDIWGPGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab9 (химера).

QSLIESSGGRLVTPGTPLTLCTVSGIGLSSYYMQWVRQSPGRGLEWIGVIGSDGKTYATWAKGRFTISKTSSTTVDLRMAS
 LTTEDTATYFCTRGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO: 83)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab9 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QSLIESSGGRLVTPGTPLTLCTVSGIGLSSYYMQWVRQSPGRGLEWIGVIGSDGKTYATWAKGRFTISKTSSTTVDLRMAS
 LTTEDTATYFCTRGDIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 88, 89, 90, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab9 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGAATCG
 GCCTCAGTAGCTACTACATGCAGTGGGTCCGCCAGTCTCCAGGGAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCAATGGTAGT
 GATGGTAAGACATACTACCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAGACCTCGTCACCCACGGTGGATCTG
 AGAATGGCCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTACAGAGGGGACATCTGGGGCCCCGGGACCCCTC
 GTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 223)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab9 (химера).

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGAATCG
 GCCTCAGTAGCTACTACATGCAGTGGGTCCGCCAGTCTCCAGGGAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCAATGGTAGT
 ATGGTAAGACATACTACCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAGACCTCGTCGACCCACGGTGGATCTGA
 GAATGGCCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTACAGAGGGGACATCTGGGGCCCCGGGACCCCTCG
 TCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
 AGCGGCCCTGGGTGCTGCTGCTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG
 CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
 AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
 TACGCCAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACACAG
 GTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACT
 CCGACGGTCTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 224)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab9 (химера).

QVLITQTPSPVSAAVGSTVTINQASQNVYNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISDVQCD
 DAATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIHPPSDEQLKSGTASVVCLENNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 82)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab9 (химера).

QVLITQTPSPVSAAVGSTVTINQASQNVYNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISDVQCD
 DAATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 81)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab9 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCQASQNVYNNNYLAWYQQKPGQPPKQLIYSTSLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISDVQCD
DAATYYCLGSYDCSRGDCFIYFGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 85, 86, 87, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab9 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AATGTTTATAATAACAACACTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACGTC
GTCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGATTACAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCTCACCATCAGCGAC
GTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTATGATTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGG
GGACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 221)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab9 (химера).

CAAGTGCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGA
ATGTTTATAATAACAACACTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATTCTACGTC
CACTCTGGCATCTGGGTCTCATCGCGATTACAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCTCACCATCAGCGACGTG
CAGTGTGACGATGCTGGCACTTACTACTGTCTAGGCAGTATGATTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGG
GACCGAGGTGGTGGTCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGTAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGATAACGCC
TCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGTA
CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 222)

Фиг. 9

Ab10

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDNSTKTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLTVTVSSASTKGPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRITPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDNSTKTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 93)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGVIGSDGKTYATWAKGRFTISRDNSTKTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 98, 99, 100, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTACAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCATTGGTA
GTGATGGTAAGACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTCTGTACAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAC
CCTCGTCAACGCTCTCGAGC (SEQ ID NO: 233)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab10 (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCACTCTCTGGAA
TCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTGAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCAATTGGTA
GTGATGGTAAGACATACTACGCGACCTGGGGCGAAAGGCCGATTACCACTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGTATTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
CCCTCGTACCGCTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCT
GACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAGAGIT
GAOCCCAAATCTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCTCACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAC
CACAGGTGACACCCCTGCCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTACGCTGACCTGGCTCAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID
NO: 234)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab10 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQNVNYYLAWYQKPKVKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGKTKVEIKR (SEQ ID NO: 92)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab10 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQNVNYYLAWYQKPKVKVKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGKTKVEIKR (SEQ ID NO: 91)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab10 (гуманизированная). CDR1: ...
полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCQASQNVNYYLAWYQKPKVKVKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
VATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGKTKVEIKR (SEQ ID NOS: 95, 96, 97, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab10 (гуманизированная). CDR1:

полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AATGTTTACAATAACAATACTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTAC
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGATTGTAGTCGTGGTGAATTGTTTGTTCGGCGGAG
GAACCAAGGTGGAATCAACCGT (SEQ ID NO: 231)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab10 (гуманизированная).

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
ATGTTTACAATAACAATACTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTACATC
CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCACCATCAGCAGCCTG
CAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGATTGTAGTCGTGGTGAATTGTTTGTTCGGCGGAGG
AACCAAGGTGGAATCAACCGTACCGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCC
TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA
CGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGCTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 232)

Фиг. 10

Ab11**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab11 (химера).**

QSLLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDVTNYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGVNGKRYIASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMT
SLTTEDTATYFCARGDIWPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVI.DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 104)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab11 (химера).

QSLLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDVTNYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGVNGKRYIASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMT
SLTTEDTATYFCARGDIWPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 103)

Белковая последовательность вариательной области тяжелой цепи Ab11 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QSLLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDVTNYMQWVRQAPGKGLEWIGVIGVNGKRYIASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMT
SLTTEDTATYFCARGDIWPGTLVTVSS (SEQ ID NOS: 108, 109, 110, соответственно)

Последовательность ДНК вариательной области тяжелой цепи Ab11 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTGCCTGGTCACGCCTGGAGGATCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCG
ACGTCACTAACTACTATATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTGTGA
ATGGTAAAGAGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCGACACCGGTGGATCTGA
AAATGACCACTGTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGCGACATCTGGGGCCCGGGGACCCCTCG
CACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 243)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab11 (химера).

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTGCCTGGTCACGCCTGGAGGATCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCG
ACGTCACTAACTACTATATGCAATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTGGTGTGA
ATGGTAAAGAGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCGACACCGGTGGATCTGA
AAATGACCACTGTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGCGACATCTGGGGCCCGGGGACCCCTCG
TCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCTCGGACCTCTCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGCGGCCCTGACCA
CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
AAATCTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
CCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG
ACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAG
TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCAAG
GTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACT
CCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTCATGTCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 244)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab11 (химера).

QVLTQTASPVSPAVGSTVTINCRASQSVYYNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDD
AATYYCLGSYDCSNGDCFVFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKSDTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 102)

Белковая последовательность вариательной области легкой цепи Ab11 (химера).

QVLTQTASPVSPAVGSTVTINCRASQSVYYNNYLAWYQKPGQPPKQLIYSTSLASGVSSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDD
AATYYCLGSYDCSNGDCFVFGGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 101)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab11 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVL TQTASPVPSPAVGSTVTINCRASQSVYYNNYLAWYQQKPGQPPKQLIY STSLASGVSSSRFKGSGSGTQFTLTISDVQCD
DAATYYCLGSDCSNGDCFVFGGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 105, 106, 107, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab11 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTCCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCGGGGCCAGTCAG
AGTGTTTATTATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATCTAC
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTACCATCAGCGAC
GTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGATTGTAGTAATGGTGATTGTTTTCGGCGGAG
GGACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 241)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab11 (химера).

CAGGTGCTGACCCAGACTGCATCCCCGTGTCTCCAGCTGTGGGAAGCACAGTCACCATCAATTGCCGGGGCCAGTCAGA
GTGTATTATTATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCAACTGATCTATCTACATC
CACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTACCATCAGCGACGTG
CAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCAGTTATGATTGTAGTAATGGTGATTGTTTTCGGCGGAGG
GACCGAGGTGGTGGTCAAACGTACGGTGGTGCACCATCTGTCTTCTCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACCTGCTCTGTTGTGTGCTGTAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
TCCAAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA
CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 242)

Фиг. 11

Ab12

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab12 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVGNGKRYYASWAKGRFTISRDN SKTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
RIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 114)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab12 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVGNGKRYYASWAKGRFTISRDN SKTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 113)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab12 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDVTNYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVGNGKRYYASWAKGRFTISRDN SKTTVY
LQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLVTVSS (SEQ ID NOS: 118, 119, 120, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab12 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGACGTCACTAACTACTACATGCAATGGGTCCGTACGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCATTGGTG
TGAATGGTAAAGAGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGACACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGTAATTTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAAGGGAC
CCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 253)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab12 (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGACGTCACTAACTACTACATGCAATGGGTCCGTACGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCATTGGTG
TGAATGGTAAAGAGATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAATCCAAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGTGTATTCTGTGCCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
CCCTCGTACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCTGG
GGGACAGCGGCTGGGCTGCTGTGCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGC GCCCT
GACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
TCCAGCAGCTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT
GAGCCAAATCTTGTGACAAATCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAATCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACCGTGAGCCA
CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGGCTCAAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID
NO: 254)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab12 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCRAQSQSVYYNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDV
ATYYCLGSYDCSNGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 112)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab12 (гуманизированная).

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCRAQSQSVYYNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDV
ATYYCLGSYDCSNGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 111)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab12 (гуманизированная). CDR1: полуужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTQSPSSLSASVGDRTVINCRAQSQSVYYNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDV
ATYYCLGSYDCSNGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NOS: 115, 116, 117, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи Ab12 (гуманизированная). CDR1: полуужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCGGGCCAGTCAG
AGTGTTTTACTATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTAC
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCTACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGAAGATGTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGATTGTAGTAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAG
GAACCAAGGTGGAATCAAACGT (SEQ ID NO: 251)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab12 (гуманизированная).

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCGGGCCAGTCAGA
GTGTTTACTATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGTTCCTAAGCAACTGATCTATTCTACATC
CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCTACCATCAGCAGCCTG
CAGCCTGAAGATGTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGATTGTAGTAATGGTGATTGTTTGTTCGGCGGAGG
AACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC
TCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGTA
CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 252)

Фиг. 12

Ab13**Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab13 (химера).**

QSVESGGGLVQPEGLSLTCTASGDFSSNAMWVVRQAPGKLEWIGCIYNGDGSTYYASWVNGRFSISKTSSTTVTLQL
 NSLTVAADTATYYCARDLDLWGPGLVTYSSASTKGPSVEFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNIHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 124)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab13 (химера).

QSVESGGGLVQPEGLSLTCTASGDFSSNAMWVVRQAPGKLEWIGCIYNGDGSTYYASWVNGRFSISKTSSTTVTLQL
 NSLTVAADTATYYCARDLDLWGPGLVTYSS (SEQ ID NO: 123)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab13 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QSVESGGGLVQPEGLSLTCTASGDFSSNAMWVVRQAPGKLEWIGCIYNGDGSTYYASWVNGRFSISKTSSTTVTLQL
 NSLTVAADTATYYCARDLDLWGPGLVTYSS (SEQ ID NOS: 128, 129, 130, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab13 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATT
 GACTTCAGTAGCAATGCAATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTACAA
 TGGTGATGGCAGCACATACTACGCCGAGCTGGGTGAATGGCCGATTCTCCATCTCCAAACCTCGTCGACACCGGTGACT
 CTGCAACTGAATAGTCTGACAGTCCGCCGACACGGCCACGTATTATTGTGCGAGAGATCTTGACTTGTGGGGCCCGGGCAC
 CCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 263)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab13 (химера).

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATT
 GACTTCAGTAGCAATGCAATGTGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTACAA
 TGGTGATGGCAGCACATACTACGCCGAGCTGGGTGAATGGCCGATTCTCCATCTCCAAACCTCGTCGACACCGGTGACT
 TGCACACTGAATAGTCTGACAGTCCGCCGACACGGCCACGTATTATTGTGCGAGAGATCTTGACTTGTGGGGCCCGGGCAC
 CCTCGTCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCTGGG
 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTG
 ACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCTAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
 CCAGCAGCTTGGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
 AGCCCAAACTTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT
 CTTCCTCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAC
 GAAGACCTTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGA
 GCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCC
 ACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCTGGTCAAGGCTT
 CTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTCT
 TGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTCA
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (SEQ ID
 NO: 264)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab13 (химера).

AIVMTQTPSSKSVPGDVTINQASESLYNNALAWFQKPGQPPKRLIYDASKLASGVPSRFSGGGSGTQFTLTISGVQCD
 DAATYYCGGYRSDSVDGVAFAAGGTEVVVKRTVAAPSVHFPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 122)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab13 (химера).

AIVMTQTPSSKSVPGDVTINQASESLYNNALAWFQKPGQPPKRLIYDASKLASGVPSRFSGGGSGTQFTLTISGVQCD
 DAATYYCGGYRSDSVDGVAFAAGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 121)

Белковая последовательность варибельной области легкой цепи Ab13 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

AIVMTQTPTSSKSVPVGDTVTINCQASESLYNNALAWFQKPGQPPKRLIYDASKLASGVPSRFSGGSGTQFTLTISGVQCD
DAATYYCGGYRSDSYDGVAFAGGTEVVVKR (SEQ ID NOS: 125, 126, 127, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области легкой цепи Ab13 (химера). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GCCATCGTGATGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGACACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGT
GAGAGTCTTTATAATAACAACGCCCTTGGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGATCTATGA
TGATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCACGCGGTTCAGTGGCGGTGGGTCTGGGACACAGTTCCTCACCATCAGT
GGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGGAGGCTACAGAAAGTGATAGTGTGATGGTGTTCGCCGGA
GGGACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ ID NO: 261)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab13 (химера).

GCCATCGTGATGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGACACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGT
AGAGTCTTTATAATAACAACGCCCTTGGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCGCCTGATCTATGATGC
ATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCACGCGGTTCAGTGGCGGTGGGTCTGGGACACAGTTCCTCACCATCAGTGGC
GTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGGAGGCTACAGAAAGTGATAGTGTGATGGTGTTCGCCGGA
GGACCGAGGTGGTGGTCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAACTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
CTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGT
ACCGTGTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 262)

Фиг. 13

Ab14

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIGSDGKITYYATWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTICNVNHIKPSNTKVDARVEPKSCDKTHCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRFEQYASTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKKVSNNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKLS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIGSDGKITYYATWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCTRGDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 133)

Белковая последовательность варибельной области тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIGLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIGSDGKITYYATWAKGRFTISRDNSTTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCTRGD/WGQGLTVTVSS (SEQ ID NOS: 138, 139, 140, соответственно)

Последовательность ДНК варибельной области тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTCAATGGTA
GTGATGGTAAGACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGTATTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGAC
CCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 273)

Полноразмерная последовательность ДНК тяжелой цепи Ab14 (гуманизированная).

GAGGTGCAGCTTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGTCTCTGGAA
TCGGCCTCAGTAGCTACTACATGCAATGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGTCATTGGTA
GTGATGGTAAGACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGACCACGGTGT
ATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTGATTTCTGTACCAGAGGGGACATCTGGGGCCAAGGGA
CCCTCGTCAACGCTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCT
GACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCT
TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACGCGAGAGTT
GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTTCC
TCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCA
CGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCTCCAGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCTGCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCTGTC
TGGACTCCGACGGCTCTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID
NO: 274)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab14 (гуманизированная).

QVLTSPPSSLSASVGDRVTINCQASQNVYNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPED
VATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 132)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab14 (гуманизированная).

QVLTSPPSSLSASVGDRVTINCQASQNVYNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPED
VATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 131)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab14 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

QVLTSPPSSLSASVGDRVTINCQASQNVYNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPED
VATYYCLGSYDCSRGDCFVFGGGTKVEIKR (SEQ ID NOS: 135, 136, 137, соответственно)

Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи Ab14 (гуманизированная). CDR1: полужирный; CDR2: подчеркнутый; CDR3: курсив.

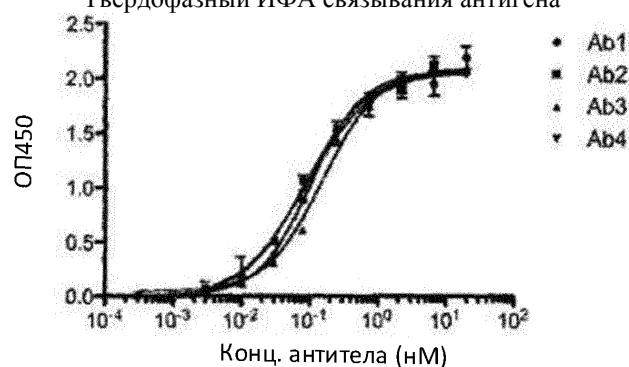
CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAG
AATGTTTACAATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTAC
ATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAGTTATGATTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTCTTTCGGCGGAG
GAACCAAGGTGGAATCAAACGT (SEQ ID NO: 271)

Полноразмерная последовательность ДНК легкой цепи Ab14 (гуманизированная).

CAAGTGCTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGA
ATGTTTACAATAACAACCTACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCTTAAGCAACTGATCTATCTACATC
CACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG
CAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCTGGGCAAGTTATGATTGTAGTCGTGGTGATTGTTTGTCTTTCGGCGGAGG
AACCAAGGTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAACCTGCTCTGTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA
CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (SEQ ID NO: 272)

Фиг. 14

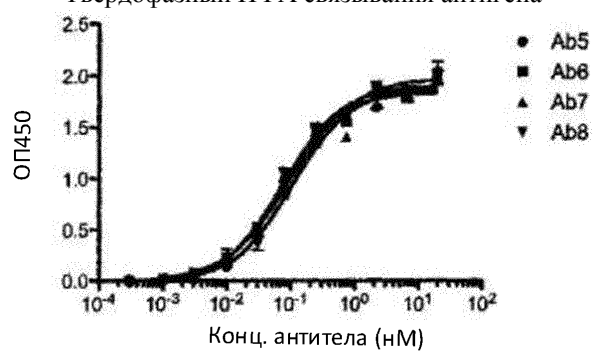
Твердофазный ИФА CGRP α человека
Твердофазный ИФА связывания антигена



	EC50 (нМ)
Ab1	103
Ab2	83
Ab3	154
Ab4	88

Фиг. 15

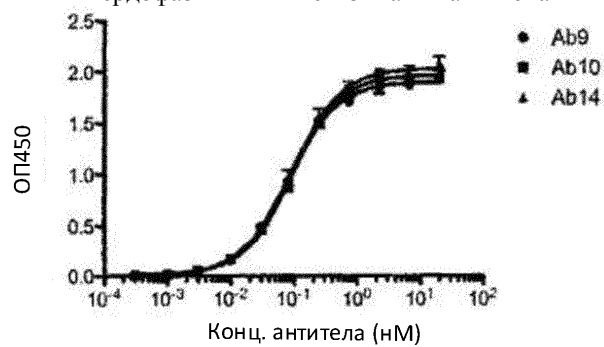
Твердофазный ИФА CGRP α человека
Твердофазный ИФА связывания антигена



	EC50 (нМ)
Ab5	103
Ab6	95
Ab7	70
Ab8	74

Фиг. 16

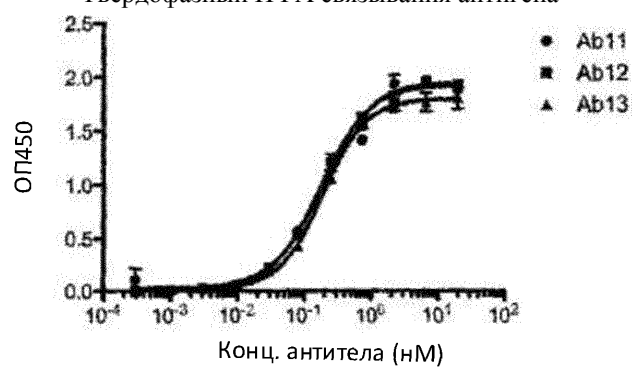
Твердофазный ИФА CGRP α человека
Твердофазный ИФА связывания антигена



	EC50 (нМ)
Ab9	79
Ab10	92
Ab14	89

Фиг. 17

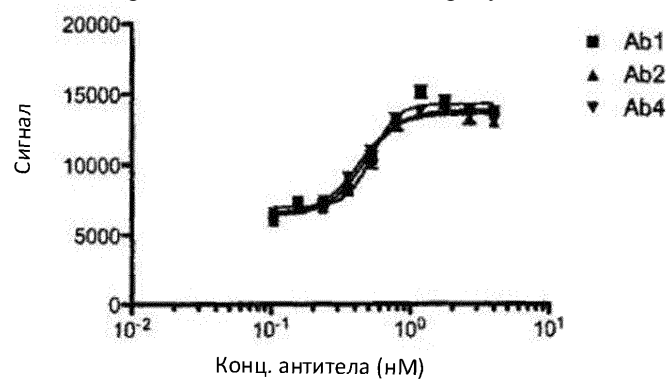
Твердофазный ИФА CGRP α человека
Твердофазный ИФА связывания антигена



	EC50 (nM)
Ab11	184
Ab12	171
Ab13	188

Фиг. 18

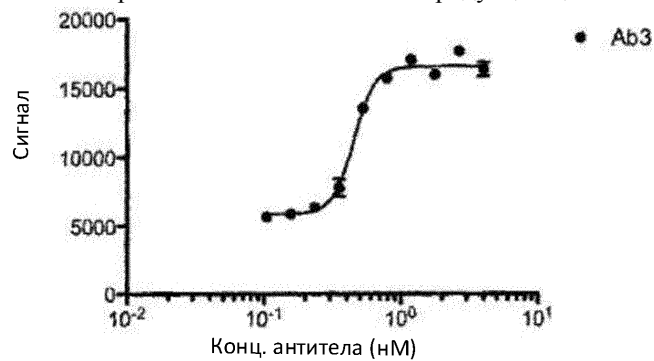
цАМФ CGRP α человека
Ингибирование CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (nM)
Ab1	531
Ab2	452
Ab4	429

Фиг. 19

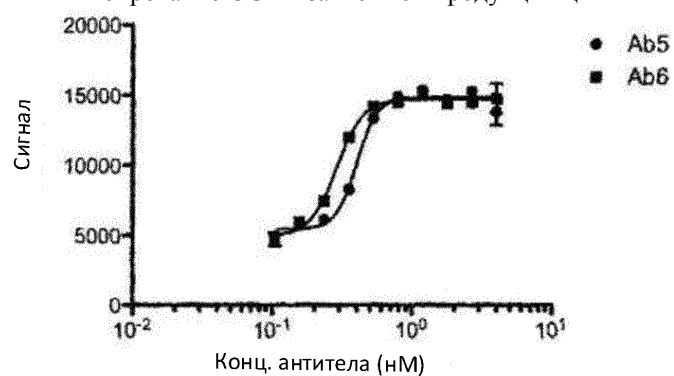
цАМФ CGRP α человека
Ингибирование CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (nM)
Ab3	452

Фиг. 20

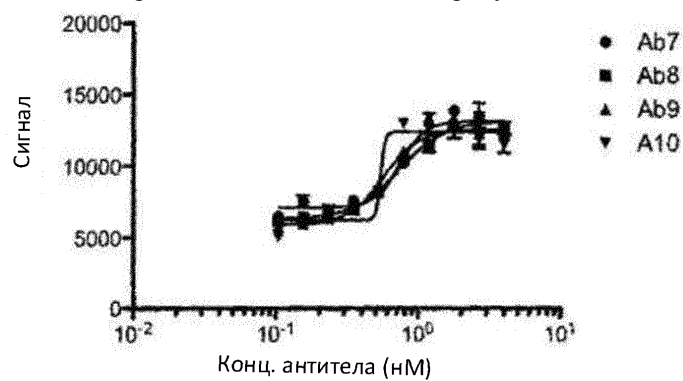
цАМФ CGRP α человека
Ингибирование CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab5	400
Ab6	288

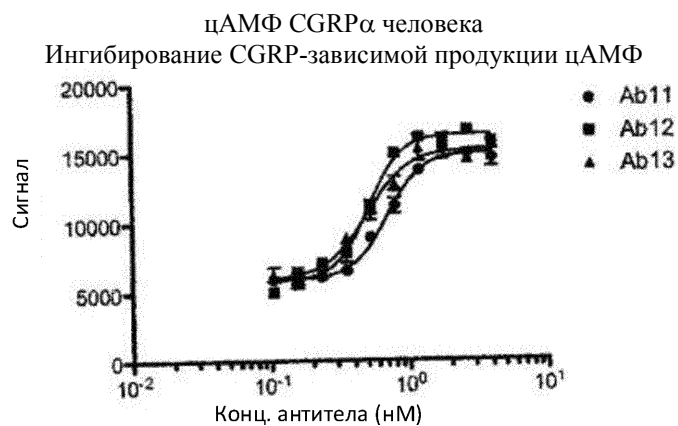
Фиг. 21

цАМФ CGRP α человека
Ингибирование CGRP-зависимой продукции цАМФ



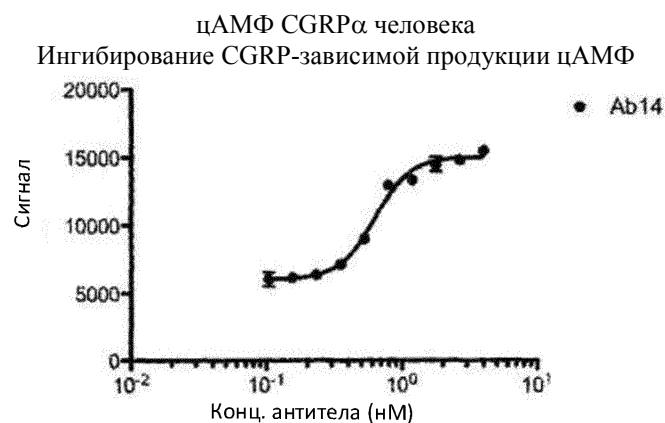
	EC50 (нМ)
Ab7	743
Ab8	734
Ab9	568
A10	542

Фиг. 22



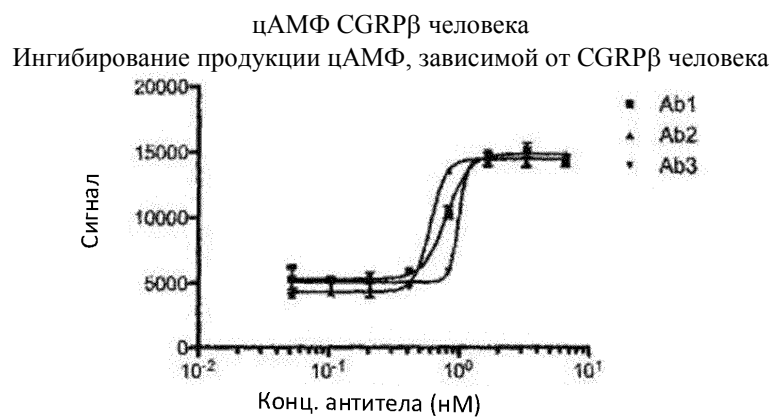
	EC50 (нМ)
Ab11	698
Ab12	511
Ab13	498

Фиг. 23



	EC50 (нМ)
Ab14	631

Фиг. 24



	EC50 (нМ)
Ab1	801
Ab2	601
Ab3	989

Фиг. 25

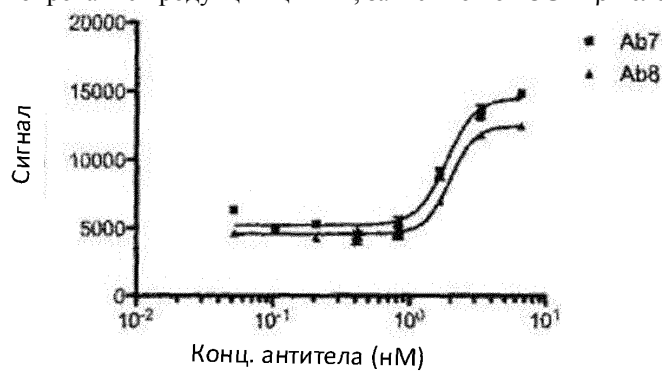
цАМФ CGRP β человека
Ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP β человека



	EC50 (nM)
Ab4	805
Ab5	875
Ab6	740

Фиг. 26

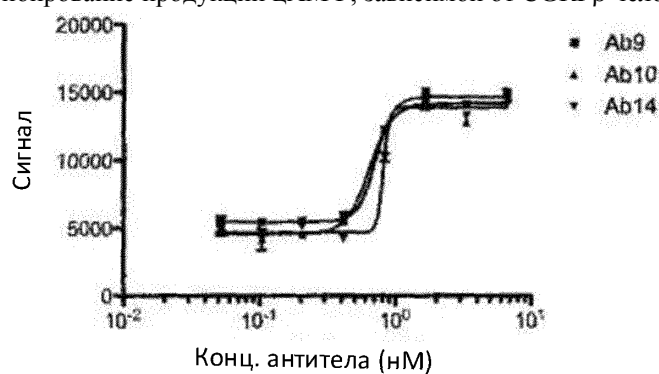
цАМФ CGRP β человека
Ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP β человека



	EC50 (nM)
Ab7	1858
Ab8	1981

Фиг. 27

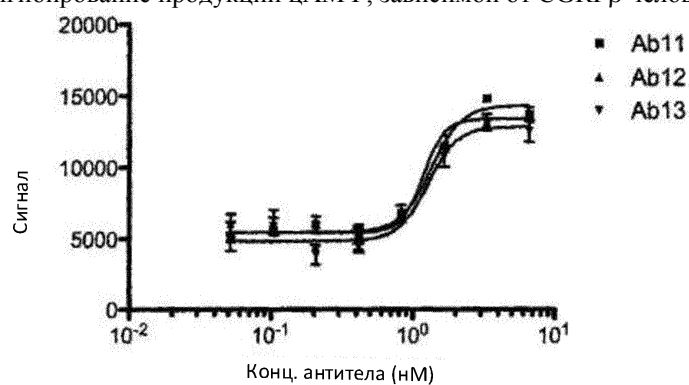
цАМФ CGRP β человека
Ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP β человека



	EC50 (nM)
Ab9	716
Ab10	641
Ab14	812

Фиг. 28

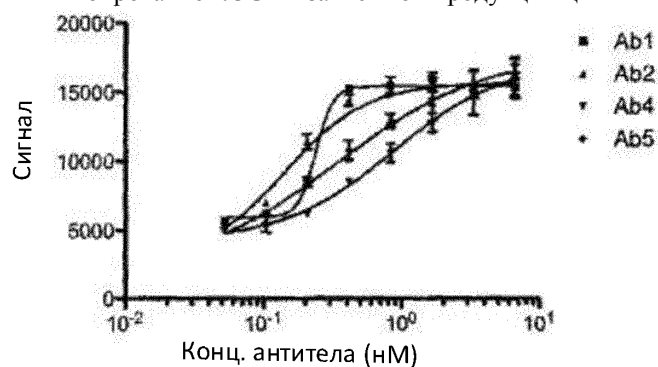
цАМФ CGRP β человека
Ингибирование продукции цАМФ, зависимой от CGRP β человека



	EC50 (нМ)
Ab11	1344
Ab12	1181
Ab13	1276

Фиг. 29

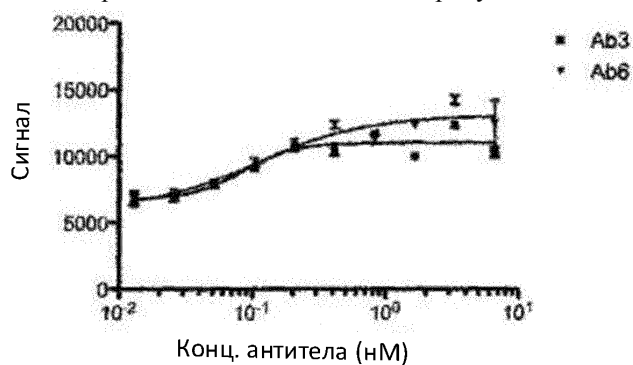
цАМФ CGRP крысы
Ингибирование rCGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab1	239
Ab2	142
Ab4	868
Ab5	334

Фиг. 30

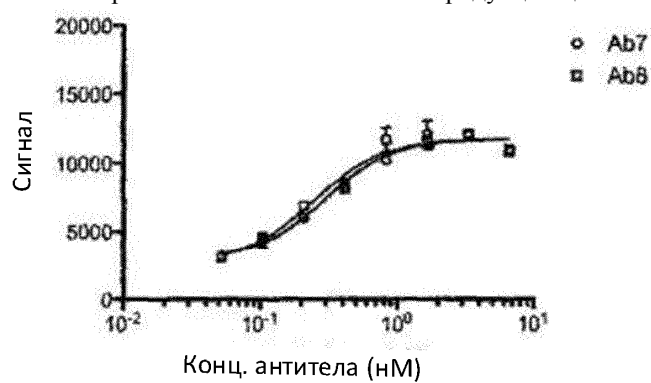
цАМФ CGRP крысы
Ингибирование rCGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab3	85
Ab6	111

Фиг. 31

цАМФ CGRP крысы
Ингибирование *gt*CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab7	297
Ab8	243

Фиг. 32

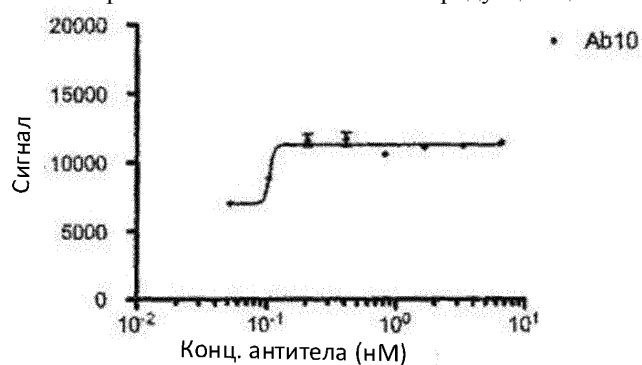
цАМФ CGRP крысы
Ингибирование *gt*CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab9	62

Фиг. 33

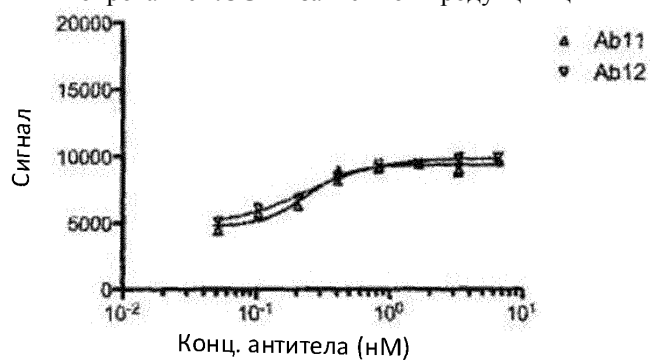
цАМФ CGRP крысы
Ингибирование *gt*CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab10	105

Фиг. 34

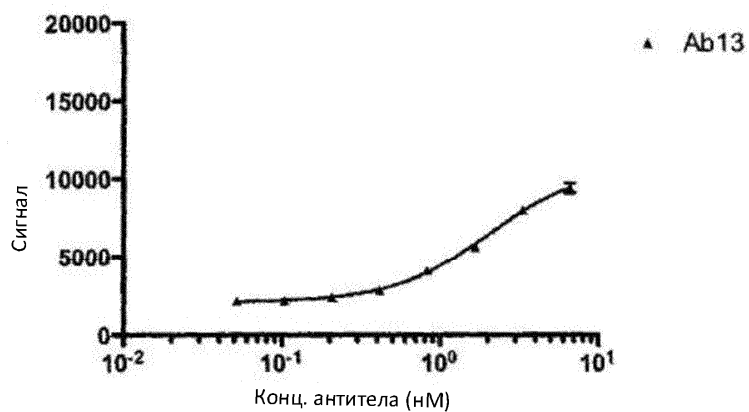
цАМФ CGRP крысы
Ингибирование *tr*CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab11	239
Ab12	236

Фиг. 35

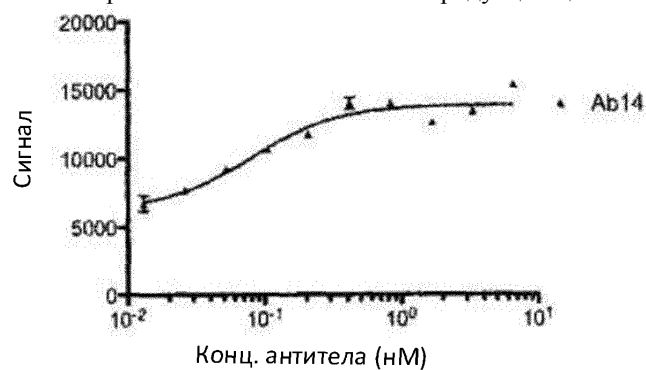
цАМФ CGRP крысы
Ингибирование *tr*CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab13	2036

Фиг. 36

цАМФ CGRP крысы
Ингибирование *tr*CGRP-зависимой продукции цАМФ



	EC50 (нМ)
Ab14	81

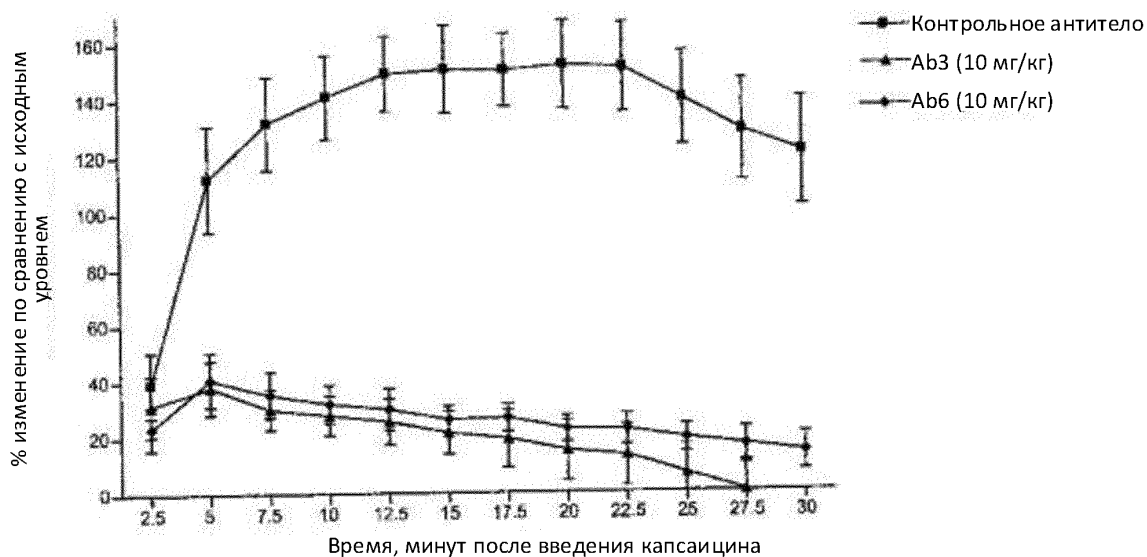
Фиг. 37

Ингибирование связывания радиолиганда

	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

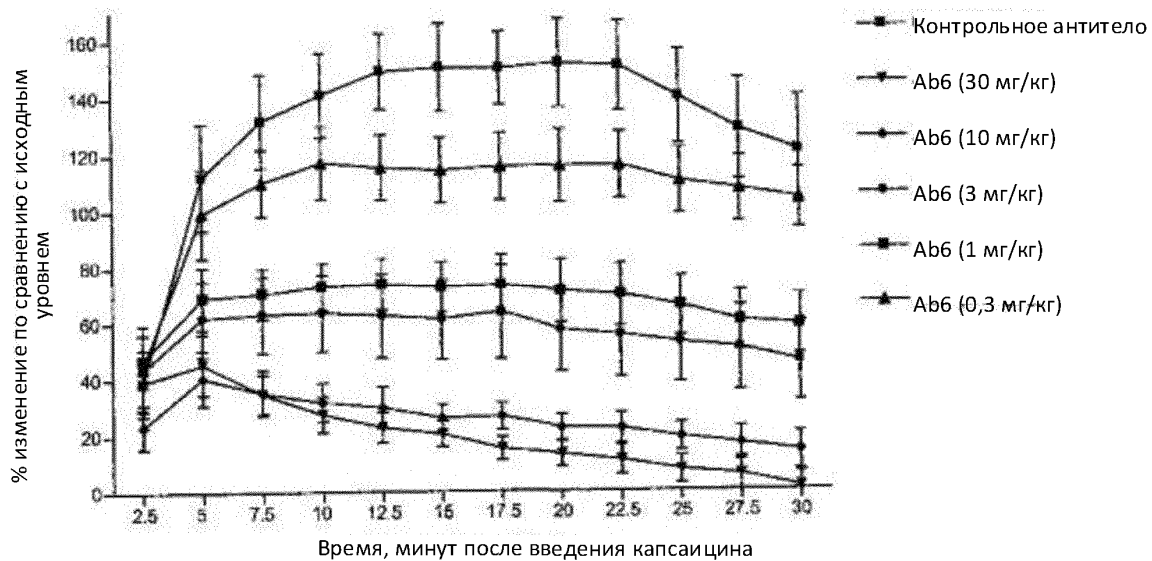
Фиг. 38

Снижение расширения сосудов после введения капсаицина

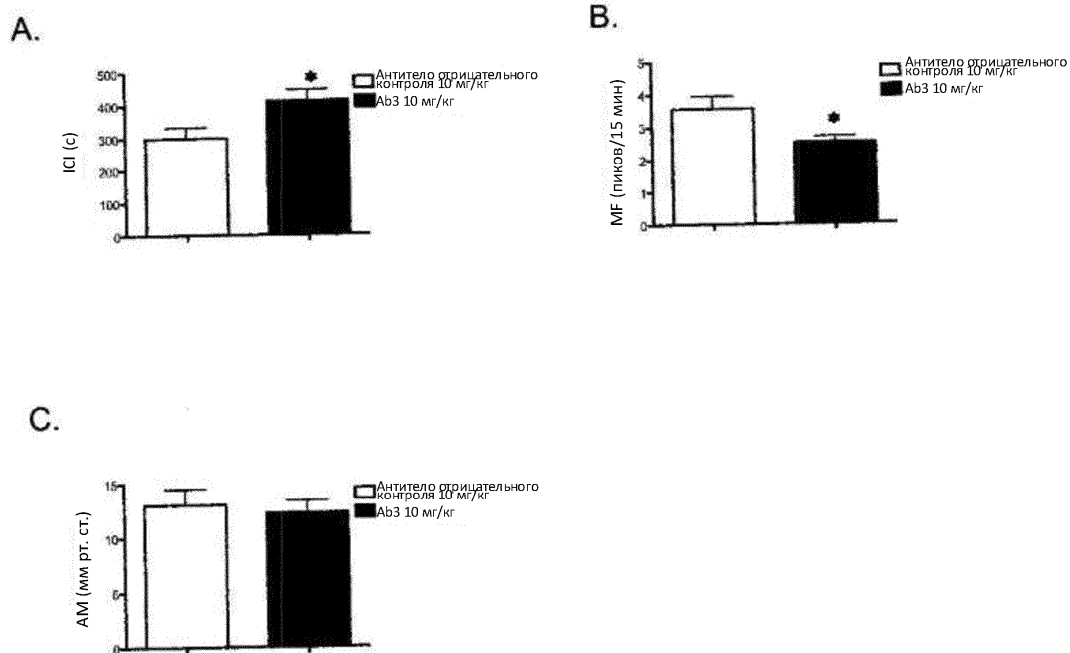


Фиг. 39

Снижение расширения сосудов после введения капсаицина

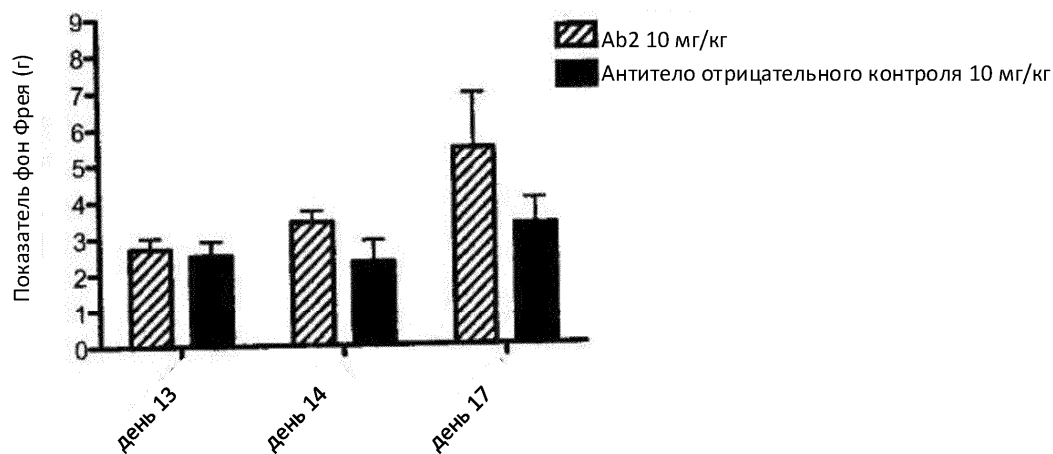


Фиг. 40

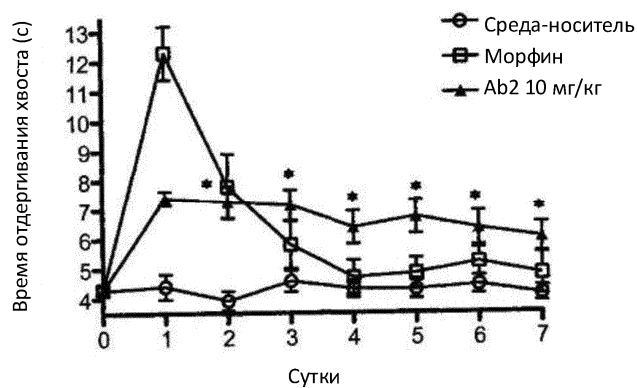


* $p < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок, сравнение с антителом отрицательного контроля

Фиг. 41

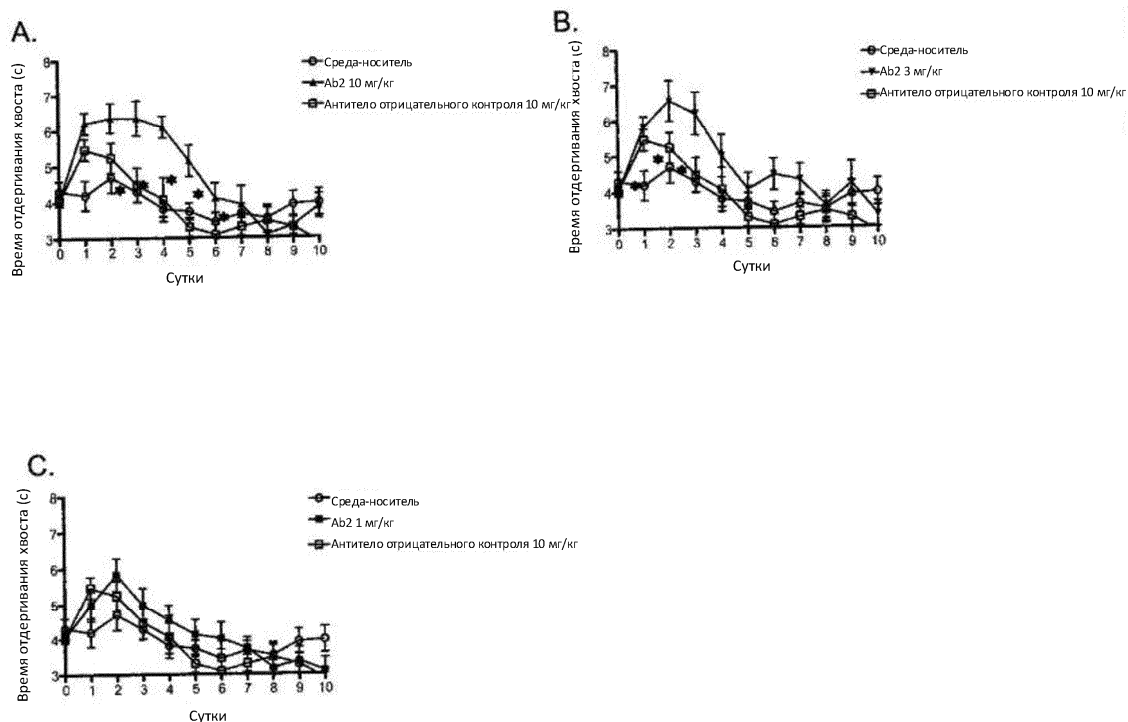


Фиг. 42



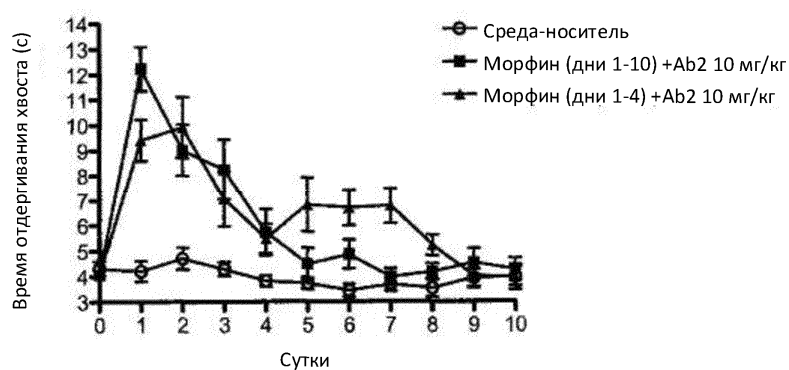
* $p < 0,05$ согласно однофакторному дисперсионному анализу с последующим тестом Даннетта, сравнение со средой-носителем

Фиг. 43

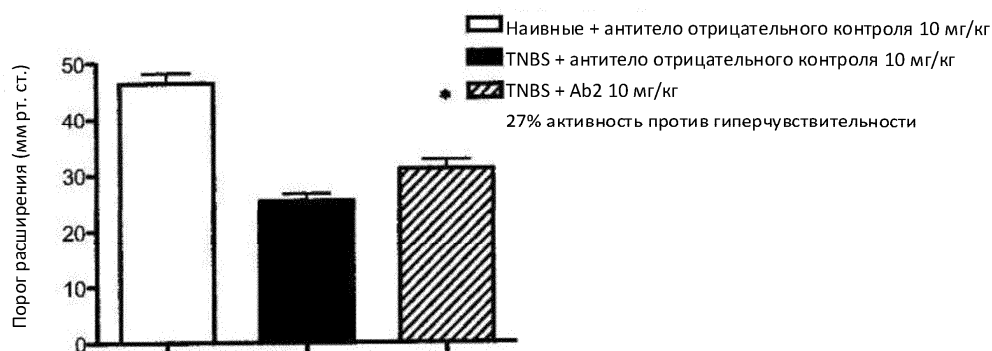


* $p < 0,05$ согласно однофакторному дисперсионному анализу с последующим тестом Даннетта, сравнение со средой-носителем

Фиг. 44



Фиг. 45



* $p < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента, сравнение с группой TNBS + контроль

Фиг. 46



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2