

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040890**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.11

(21) Номер заявки
201990576

(22) Дата подачи заявки
2017.09.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
A61P 25/06 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **ЛЕЧЕНИЕ РЕФРАКТЕРНОЙ МИГРЕНИ**

(31) **62/399,180; 62/558,557**

(32) **2016.09.23; 2017.09.14**

(33) **US**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/IB2017/055777**

(87) **WO 2018/055574 2018.03.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТЕВА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНТЕРНЭШНЛ ГМБХ (СН)**

(72) Изобретатель:
**Бигал Марсело, Айкарди Эрнесто
(US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) BIGAL et al.: "Safety, tolerability, and efficacy of TEV-48125 for preventive treatment of high-frequency episodic migraine: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b study - ScienceDirect", 30 November 2015 (2015-11-30), XP055436900, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442215002495?via=ihub> [retrieved on 2017-12-20] see page 1092, paragraph Methods, subparagraph "Study design and patients"

LI YUANCHAO ET AL.: "Valproate ameliorates nitroglycerin-induced migraine in trigeminal nucleus caudalis in rats through inhibition of NF-κB", JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN, SPRINGER VERLAG ITALIA, MILAN, IT, vol. 17, no. 1, 6 May 2016 (2016-05-06), pages 1-9, XP035679422, ISSN: 1129-2369, DOI: 10.1186/S10194-016-0631-Z [retrieved on 2016-05-06] abstract

(57) В настоящем документе раскрыты способы лечения или снижения частоты возникновения мигрени и/или по меньшей мере одного вторичного симптома, ассоциированного с рефрактерной мигренью у субъекта с рефрактерной мигренью, включающие введение указанному субъекту моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP. Также предложены композиции для использования в раскрытых способах. Кроме этого, описаны антагонистическое антитело G1 и антитела, полученные на основе G1, нацеленные на CGRP.

B1**040890****040890****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке на патент США № 62/399180, поданной 23 сентября 2016 г. и заявке на патент США № 62/558557, поданной 14 сентября 2017. Содержание этих предыдущих заявок полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Мигрень - распространенное неврологическое состояние, характеризующееся приступами головной боли и сопутствующими симптомами, такими как тошнота, рвота, фотофобия и/или фонофобия. В США и Западной Европе общая распространенность мигрени составляет 11% от общей численности населения (6% мужчин; 15-18% женщин). Две наиболее распространенные формы мигрени, мигрень без ауры и мигрень с аурой, проявляются в течение менее 15 дней в месяц и называются эпизодическими формами мигрени (ЭМ) (Lipton et al., *Neurology* 68 (5): 343-349, 2007). Однако у 3-6% лиц ЭМ развивается в любой данный год в значительно более инвалидизирующее состояние, называемое хронической мигренью (ХМ) (Scher et al., *Pain* 106 (1-2): 81-89, 2003). У лиц с ХМ головная боль любой степени тяжести наблюдается в течение 15 и более дней в месяц, и полномасштабная мигрень - не менее 8 дней в месяц. Значительная доля людей с ХМ испытывают ежедневные головные боли и, следовательно, сталкиваются со значительной инвалидностью (Bigal and Lipton, *Neurology* 71(11):848-855, 2008).

В ряде случаев целесообразным может быть профилактическое лекарственное лечение мигрени, в том числе в случаях, когда частота приступов в месяц составляет два или более или когда качество жизни пациента серьезно ухудшается (Evers et al., *Europ. J. Neurol.* 16: 968-981, 2009). Ряд лекарств из разных фармакологических категорий (например, бета-блокаторы, противосудорожные препараты) были одобрены для профилактики мигрени или имеют доказательства класса А в поддержку их применения. Тем не менее, ответ пациента и переносимость в отношении некоторых из этих препаратов варьируются, а соблюдение режима терапии и приверженность к лечению для этих лекарств могут быть недостаточными (Puledda et al., *J. Neurol.* Mar 20. doi: 10.1007/S00415-017-8434, 2017).

Пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP) - это нейропептид, который, как было установлено, участвует в процессах мигрени, как центрально, так и периферически (Eftekhari and Edvinsson, *Then Adv. Neurol. Disord.* 3(6):369-378, 2010, Olesen, *Cephalalgia* 31(5):638, 2011). Во время приступов мигрени уровни CGRP в яремной вене повышены, а внутривенное (в/в) введение CGRP вызывает мигренеподобную головную боль у большинства лиц с мигренью (Ashina et al., *Neurology* 55(9): 1335-1340, 2000, Hansen et al., *Cephalalgia* 30(1):1179-1186, 2010). CGRP участвует в патофизиологии мигрени на всех уровнях, периферически (вазодилатация, воспаление и экстравазация белка), в тройничном ганглии и внутри мозга (Ho et al., *Nat. Rev. Neurol.* 6(10):573-582, 2010). Исследования показали эффективность ингибирования CGRP или антагонистического рецептора CGRP в лечении ЭМ (Bigal et al., *Lancet Neurol.* 14:1081-1090, 2015a, Hewitt et al., *Cephalalgia* 31(6):712-722, 2011, Ho et al., *Lancet* 372(9656):2115-2123, 2008, Olesen et al., *N. Engl. J. Med.* 350(11):1104-1110, 2004) и ХМ (Bigal et al., *Lancet Neurol.* 14:1091-1100, 2015b).

Таким образом, моноклональные антитела, которые модулируют путь CGRP, представляют класс перспективных терапевтических кандидатов для пациентов, у которых предварительное профилактическое лечение ХМ и ЭМ не принесло успеха.

Краткое описание

В данном документе раскрыты антагонистические антитела против CGRP и способы их применения для предотвращения, лечения или снижения частоты мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью (то есть субъекта, который не отвечает благоприятно на предшествующее профилактическое лечение мигрени). Здесь также раскрыты способы предотвращения, лечения или снижения частоты мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, включающие введение субъекту моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP.

Также предложены способы предотвращения, лечения или снижения частоты возникновения по меньшей мере одного вторичного симптома, ассоциированного с рефрактерной мигренью, у субъекта, включающие введение субъекту моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, может составлять от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. Соответственно, в некоторых аспектах способы предотвращения, лечения или снижения частоты возникновения мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью могут включать введение субъекту моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, при этом количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, может составлять от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. В других аспектах способы предотвращения, лечения или уменьшения частоты по меньшей мере одного вторичного симптома, ассоциированного с рефрактерной мигренью у субъекта, могут включать введение субъекту моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, причем количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, может составлять от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. В одном варианте реализации схема введения доз включает введение начальной дозы (или стартовой дозы) антитела приблизительно 675 мг подкожно с последующим ежемесячным подкожным введением дозы антитела приблизительно 225 мг в течение, например, прибли-

тельно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в течение более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Еще одна схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 мин с последующими дозами приблизительно 900 мг, вводимых внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 мин каждый квартал, например, в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Еще одна схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 675 мг, вводимой подкожно, с последующими дозами приблизительно 675 мг, вводимыми подкожно каждый квартал, например, в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет.

Подходящие схемы введения включают, среди прочего, ежемесячное, ежеквартальное или однократное введение. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело можно вводить ежемесячно. Например, моноклональное антитело можно вводить ежемесячно в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более месяцев. В некоторых аспектах моноклональное антитело можно вводить ежемесячно в течение трех или более месяцев. При ежемесячном введении доза моноклонального антитела, вводимого пациенту, может составлять от приблизительно 225 до приблизительно 900 мг.

Моноклональное антитело можно вводить в виде однократной дозы. При введении в виде однократной дозы доза моноклонального антитела, вводимого пациенту, может составлять от приблизительно 675 до приблизительно 1000 мг.

"Лечение или снижение частоты" может включать снижение числа часов головной боли любой степени тяжести, снижение числа дней головной боли любой степени тяжести в месяц, уменьшение использования любых препаратов для острой головной боли (например, специфических для мигрени препаратов для лечения острой головной боли), снижение 6-компонентного балла нетрудоспособности "Оценки влияния головной боли (HIT-6)", улучшение 12-компонентного балла "Краткого опросника оценки общего состояния здоровья" (SF-12) (Ware et al., Med Care 4:220-233, 1996), снижение балла "Общей оценки динамики состояния пациентом" (PGIC) (Hurst et al., J Manipulative Physiol Ther 27:26-35, 2004), улучшение балла "Инструмента оценки сотрясения мозга в спорте 3" (SCAT-3) (McCrory et al. British Journal of Sports Medicine 47:263-266, 2013), или любую их комбинацию. В некоторых вариантах число дней головной боли в месяц может быть уменьшено в течение по меньшей мере семи дней после однократного введения.

В некоторых вариантах реализации число часов головной боли в месяц, испытываемых субъектом после указанного введения, снижается на 40 или более часов (например, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более) по сравнению с уровнем до введения у этого субъекта. Число часов головной боли в месяц может быть снижено более чем на 60 ч. В некоторых вариантах реализации число часов головной боли в месяц, испытываемых субъектом после указанного введения, снижается на 25% или более (например, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или более) по сравнению с уровнем до введения у этого субъекта. Число часов головной боли в месяц может быть снижено на 40% или больше. В некоторых вариантах реализации ежемесячное число часов головной боли, испытываемых субъектом после указанного введения, снижается на три или более дня (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней) от уровня до введения у этого субъекта. В некоторых вариантах число дней головной боли в месяц может быть уменьшено по меньшей мере приблизительно на 50% от уровня до введения у этого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах число дней головной боли в месяц может быть уменьшено по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80% или, по меньшей мере приблизительно на 90%.

В некоторых вариантах реализации введение может представлять собой подкожное введение. В некоторых вариантах реализации введение может представлять собой внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации введение может включать использование предварительно заполненного шприца, предварительно заполненного шприца с предохранительным устройством для иглы, шприца-ручки или автоматического устройства для инъекций, содержащих дозу моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в виде лекарственной формы в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело можно вводить в объеме менее 2 мл, например, приблизительно 1,5 мл.

В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает введение субъекту второго агента одновременно или последовательно с моноклональным антителом. В одном варианте реализации вторым агентом является препарат для лечения острой головной боли (например, специфический для мигрени препарат для лечения острой головной боли). Соответственно, вторым агентом может быть любой из анальгетиков (например, ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, напроксен, диклофенак, парацетамол, ацетилсалициловая кислота плюс парацетамол плюс кофеин, метамизол, феназон или толфенамовая кислота); противорвотные средства (например, метоклопрамид или домперидон); алкалоиды спорыньи (например, тартрат эрготамина или дигидроэрготамин); и триптаны, то есть агонисты 5-HT₁ (напри-

мер, суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, алмотриптан, элетриптан или фроватриптан).

В некоторых вариантах реализации ежемесячное использование второго агента субъектом снижается по меньшей мере приблизительно на 15%, например по меньшей мере на 16%, 17%, 18%, 20%, 22%, 25%, 28%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере приблизительно на 95% после введения моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации таким вторым агентом является триптан.

В некоторых вариантах субъектом является человек.

Моноклональное антитело может представлять собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело содержит (а) антитело, имеющее CDR H1, представленную в SEQ ID NO: 3; CDR H2, представленную в SEQ ID NO: 4; CDR H3, представленную в SEQ ID NO: 5; CDR L1, представленную в SEQ ID NO: 6; CDR L2, представленную в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, представленную в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в табл. 6.

Также раскрыты способы снижения о числа часов головной боли в месяц, испытываемых субъектом с рефрактерной мигренью. В одном варианте реализации такой способ включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, причем моноклональное антитело находится в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 20 (например, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или более часов головной боли) после однократного введения. В некоторых вариантах число часов головной боли в месяц снижается по меньшей мере приблизительно на 50 ч. В одном варианте реализации такой способ включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, причем моноклональное антитело находится в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 15% (например, на 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или более) после однократного введения. В некоторых вариантах число часов головной боли в месяц снижается по меньшей мере приблизительно на 30%. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят ежемесячно. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в виде однократной дозы. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело составлено в виде лекарственной формы в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл, например, приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах субъектом является человек. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело содержит (а) антитело, имеющее CDR H1, представленную в SEQ ID NO: 3; CDR H2, представленную в SEQ ID NO: 4; CDR H3, представленную в SEQ ID NO: 5; CDR L1, представленную в SEQ ID NO: 6; CDR L2, представленную в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, представленную в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в табл. 6.

Также раскрыты способы снижения числа дней головной боли в месяц, испытываемых субъектом с рефрактерной мигренью. В одном варианте реализации такой способ включает введение субъекту количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, причем моноклональное антитело находится в количестве, эффективном для уменьшения числа дней головной боли в месяц по меньшей мере на 3 (например, на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней головной боли) после однократного введения. В некоторых вариантах число дней головной боли в месяц уменьшается по меньшей мере приблизительно на 6 дней головной боли. В некоторых вариантах число дней головной боли в месяц может быть уменьшено по меньшей мере приблизительно на 50% от уровня до введения субъекту. Таким образом, в некоторых аспектах количество дней головной боли в месяц может быть уменьшено по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80% или, по меньшей мере приблизительно на 90%. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят ежемесячно. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в виде однократной дозы. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело составлено в виде лекарственной формы в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл, например, приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах субъектом является человек. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело является человеческим или

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

Также раскрыты способы уменьшения использования любого препарата для лечения острой головной боли у субъекта с рефрактерной мигренью, включающие введение субъекту моноклонального антитела (например, антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP, причем моноклональное антитело находится в количестве, эффективном для уменьшения ежемесячного использования лекарства против головной боли субъектом по меньшей мере на 15% (например, на 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или более). В некоторых вариантах реализации такое лекарственное средство против головной боли выбрано из группы, состоящей из агонистов 5-HT₁, триптанов, опиатов, алкалоидов спорыньи и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств (НПВП). В некоторых вариантах реализации препарат для лечения острой головной боли выбран из анальгетиков (например, ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, напроксен, диклофенак, парацетамол, ацетилсалициловая кислота плюс парацетамол плюс кофеин, метамизол, феназон или толфенамовая кислота); противорвотных средств (например, метоклопрамид или домперидон); алкалоидов спорыньи (например, тартрат эрготамина или дигидроэрготамин); и триптанов, то есть агонистов 5-HT₁ (например, суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, алмотриптан, элетриптан или фроватриптан). В некоторых вариантах реализации препарат для лечения острой головной боли представляет собой триптан. В некоторых вариантах реализации количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят ежемесячно. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в виде однократной дозы. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело приготовлено в виде лекарственной формы в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл, например, приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах субъектом является человек. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело содержит (а) антитело, имеющее CDR H1, представленную в SEQ ID NO: 3; CDR H2, представленную в SEQ ID NO: 4; CDR H3, представленную в SEQ ID NO: 5; CDR L1, представленную в SEQ ID NO: 6; CDR L2, представленную в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, представленную в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в табл. 6.

В одном аспекте изобретение относится к способу предотвращения, лечения или снижения частоты возникновения мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, включающему подкожное введение субъекту загрузочной дозы моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP, причем это количество моноклонального антитела составляет от приблизительно 225 мг до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг (например, три подкожных инъекции по 225 мг каждая) с последующими ежемесячными подкожными инъекциями от приблизительно 100 мг до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 225 мг, в течение от одного до 12 месяцев подряд, например пять месяцев подряд.

В некоторых вариантах реализации такие способы включают отбор субъекта, который не отвечает положительно на лечение мигрени, выбранное из группы, состоящей из топирамата, карбамазепина, дивальпрокса натрия, вальпроата натрия, вальпроевой кислоты, флунаризина, кандесартана, пизотифена, амитриптилина, венлафаксина, нортриптилина, дулоксетина, атенолола, надолола, метопролола, пропранолола, биспролола, тимолола и онаботулинутоксина А. В некоторых вариантах реализации способы включают отбор субъекта, который не отвечает положительно на лечение мигрени, выбранное из группы, состоящей из топирамата, карбамазепина, дивальпрокса натрия, вальпроата натрия, флунаризина, пизотифена, амитриптилина, венлафаксина, нортриптилина, дулоксетина, атенолола, надолола, метопролола, пропранолола, тимолола и онаботулинутоксина А. В некоторых вариантах реализации способы включают отбор субъекта, который не отвечает положительно на лечение мигрени, выбранное из группы, состоящей из пропранолола, метопролола, атенолола, биспролола, топирамата, амитриптилина, флунаризина, кандесартана, онаботулинутоксина А и вальпроевой кислоты. В некоторых вариантах реализации способы включают отбор субъекта, который не отвечает положительно на лечение мигрени, выбранное из пропранолола/метопролола, топирамата, флунаризина, вальпроата/дивальпрокса, амитриптилина, венлафаксина, лизиноприла, кандесартана и препаратов, разрешенных для применения в отдельных странах (например, оксетерона или пизотифена). В других вариантах реализации способы включают отбор субъекта, который не отвечает положительно на один или несколько видов лечения мигрени следующих классов: бета-блокаторы, противосудорожные препараты, трициклические агенты, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты рецептора ангиотензина II. Например, у субъекта может быть задокументирован неадекватный ответ (в медицинской карте или на основании подтверждения врача) по меньшей мере на два профилактических средства (из разных кластеров, как определено ниже). Или у субъекта

может быть задокументирован неадекватный ответ (в медицинской карте или на основании подтверждения врача) на два-четыре класса предшествующих профилактических препаратов (например, из разных кластеров, как определено ниже). В качестве другого примера, у субъекта может быть задокументирован неадекватный ответ (в медицинской карте или на основании подтверждения врача) на два-три класса предшествующих профилактических препаратов (из разных кластеров, как определено ниже) и вальпроат (например, дивалпроэкс натрия, вальпроат натрия или вальпроевую кислоту).

Неадекватный ответ определяется как: отсутствие клинически значимого улучшения, согласно суждению лечащего врача, после по меньшей мере трех месяцев терапии в стабильной дозе, которая считается подходящей для профилактики мигрени в соответствии с руководствами, принятыми в данной стране, или когда лечение должно быть прервано из-за нежелательных явлений, которые сделали его непереносимым для пациента, или препарат противопоказан или не подходит для пациента. Трехмесячный период может не применяться, если препарат является не переносимым, противопоказан или не подходит для пациента. Для онаботулинумтоксина А неадекватный ответ определяется как: отсутствие клинически значимого улучшения согласно суждению лечащего врача после по меньшей мере шести месяцев терапии в стабильной дозе, которая считается подходящей для профилактики мигрени в соответствии с принятыми в данной стране руководствами, или когда лечение необходимо прервать из-за нежелательных явлений, которые сделали его непереносимым для пациента. Или, если предыдущим профилактическим препаратом является онаботулинумтоксин А, с момента последней серии инъекций должно пройти как минимум две серии инъекций и три месяца.

В некоторых вариантах реализации упомянутые кластеры следующие:

кластер А: топирамат, карбамазепин, дивалпроэкс натрия и вальпроат натрия;

кластер В: флунаризин и пизотифен;

кластер С: амитриптилин, венлафаксин, нортриптилин и дулоксетин;

кластер D: атенолол, надолол, метопролол, пропранолол и тимолол;

кластер Е: онаболинумтоксин А.

В некоторых вариантах реализации кластеры являются следующими:

кластер А: бета-блокаторы: пропранолол, метопролол, атенолол и бисопролол;

кластер В: противосудорожные препараты: топирамат;

кластер С: трициклики: амитриптилин;

кластер D: блокатор кальциевых каналов: флунаризин;

кластер Е: антагонист рецептора ангиотензина II: кандесартан;

кластер F: онаболинумтоксин А;

кластер G: вальпроевая кислота.

Дополнительные кластеры (которые могут быть включены в любую из групп кластеров, указанных выше, включают:

кластер а: ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), такой как лизиноприл;

кластер b: препарат на основе бензоциклогептена, такой как пизотифен;

кластер с: антидепрессант, такой как амитриптилин (Элавил), тразодон (Дезирель) и имипрамин (Тофранил) и венлафаксин;

кластер d: противосудорожное средство, такое как фенитоин (Дилантин) или карбамазепин (Тегретол);

кластер е: оксетерон.

В одном аспекте изобретение относится к способу предотвращения, лечения или снижения частоты мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту однократной дозы моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP, причем количество моноклонального антитела составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. В одном варианте реализации субъект является невосприимчивым к лечению по меньшей мере двумя различными профилактическими средствами, выбранными из топирамата, онаботулинумтоксина А и вальпроевой кислоты. В одном варианте реализации субъект является невосприимчивым к профилактическому лечению топираматом, онаботулинумоксином А и вальпроевой кислотой.

В одном аспекте изобретение относится к способу предотвращения, лечения или снижения частоты мигрени у субъекта, страдающего рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антитела против антагониста CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP, причем количество моноклонального антитела составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. В одном варианте реализации субъект является невосприимчивым к по меньшей мере двум различным профилактическим средствам, выбранным из топирамата, онаботулинумтоксина А и вальпроевой кислоты. В одном варианте реализации субъект является невосприимчивым к профилактическому лечению топираматом, онаботулинумоксином А и вальпроевой кислотой. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в виде однократной дозы.

В дополнительном варианте реализации изобретение относится к способам предотвращения, лечения, улучшения, контроля, снижения частоты или замедления развития или прогрессирования мигрени у

индивидуума, у которого диагностирована рефрактерная мигрень (см., например, критерии, описанные в настоящем документе), включающему введение этому индивидууму эффективного количества антагонистического антитела против CGRP в сочетании по меньшей мере с одним дополнительным препаратом для лечения острой головной боли или агентом, полезным для лечения мигрени. Такие дополнительные агенты включают, например, 5-HT₁-подобные агонисты (и агонисты, действующие на другие сайты 5-HT₁), триптаны, опиаты, алкалоиды спорыньи и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НПВП). В некоторых вариантах реализации лек препарат для лечения острой головной боли выбран из анальгетиков (например, ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, напроксен, диклофенак, парацетамол, ацетилсалициловая кислота плюс парацетамол плюс кофеин, метамизол, феназон или толфенамовая кислота); противорвотных средств (например, метоклопрамид или домперидон); алкалоиды спорыньи (например, тартрат эрготамина или дигидроэрготамина); и триптанов, то есть агонистов 5-HT₁ (например, суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, алмотриптан, элетриптан или фроватриптан).

Неограничивающие примеры агонистов 5-HT₁, которые можно использовать в комбинации с антителом против CGRP, включают класс соединений, известных как триптаны, таких как суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, элетриптан, алмотриптан и фроватриптан. Известно, что алкалоиды спорыньи и родственные соединения также обладают агонистической активностью против 5-HT и используются для лечения головных болей. В число этих соединений входят тартрат эрготамина, малеат эргоновина и мезилаты эрголоида (например, мезилат дигидроэргокорнина, дигидроэргокристина, дигидроэргокриптина и дигидроэрготамина (DHE 45)).

Неограничивающие примеры НПВП (в качестве препарата для лечения острой головной боли), которые можно использовать в сочетании с антителом к CGRP, включают аспирин, диклофенак, дифлуцинал, этодолак, фенбуфен, фенпрофен, флуфенизал, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, меклофенамовую кислоту, мефенамовую кислоту, набуметон, напроксен, оксапрозин, фенилбутазон, пироксикам, сулиндак, толметин или зомепаирак, ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), целекоксиб; рофекоксиб; мелоксикам; JTE-522; L-745337; NS398; или соответствующую фармацевтически приемлемую соль.

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

В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP распознает CGRP человека. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP связывается как с человеческим α -CGRP, так и с β -CGRP. В некоторых вариантах антагонистическое антитело против CGRP связывает CGRP человека и крысы. В некоторых вариантах антагонистическое антитело против CGRP связывает С-концевой фрагмент, имеющий аминокислоты 25-37 CGRP. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP связывает С-концевой эпитоп в аминокислотах 25-37 CGRP.

В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В некоторых вариантах реализации антитело человека. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP представляет собой антитело G1 (как описано в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP содержит одну или более CDR (например одну, две, три, четыре, пять или, в некоторых вариантах, все шесть CDR) антитела G1 или вариантов G1, показанных в табл. 6. В других вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP содержит аминокислотную последовательность вариативной области тяжелой цепи, показанную на фиг. 5 (SEQ ID NO: 1), и аминокислотную последовательность вариативной области легкой цепи, показанную на фиг. 5 (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах реализации антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая является иммунологически инертной (включая частично иммунологически инертную), например, не запускает опосредованный комплементом лизис, не стимулирует антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), не активирует микроглию или имеет сниженную одну или несколько из этих активностей. В некоторых вариантах реализации эта константная область модифицирована, как описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; Заявке PCT № PCT/GB99/01441; и/или патентной заявке Великобритании № 9809951.8. В других вариантах реализации антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG2 человека, содержащую следующие мутации: A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2 дикого типа). Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624. В некоторых вариантах реализации эта константная область тяжелой цепи антитела представляет собой тяжелую цепь IgG1 человека с любой из следующих мутаций: 1) A327A330P331 на G327S330S331; 2) E233L234L235G236 (SEQ ID NO: 48) на P233V234A235 с удаленным G236; 3) E233L234L235 на P233V234A235; 4) E233L234L235G236A327A330P331 (SEQ ID NO: 49) на P233V234A235G327S330S331 (SEQ ID NO: 50) с удаленным G236; 5) E233L234L235A327A330P331 (SEQ ID NO: 51) на P233V234A235G327S330S331 (SEQ ID NO: 50); и 6) N297 на A297 или любую другую аминокислоту, кроме N. В некоторых вариантах реализации константная область тяжелой цепи ан-

титела представляет собой тяжелую цепь IgG4 человека с любой из следующих мутаций: E233F234L235G236 (SEQ ID NO: 52) на P233V234A235 с удаленным G236; E233F234L235 на P233V234A235; и S228L235 на P228E235.

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

Аффинность связывания (K_D) антагонистического антитела против CGRP с CGRP (например α -CGRP человека, измеренная с помощью поверхностного плазмонного резонанса при соответствующей температуре, например 25 или 37°C) может составлять от приблизительно 0,02 до приблизительно 200 нМ. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания равна любой из приблизительно 200 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 60 пМ, приблизительно 50 пМ, приблизительно 20 пМ, приблизительно 15 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 5 пМ или приблизительно 2 пМ. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания составляет менее приблизительно 250 нМ, приблизительно 200 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ или приблизительно 50 пМ. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания составляет менее приблизительно 50 нМ.

Антагонистическое антитело против CGRP можно вводить до, во время и/или после мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью. В некоторых вариантах реализации антитело против антагониста CGRP вводят до того, как субъект испытывает симптомы мигрени. Введение антагонистического антитела против CGRP можно осуществлять любыми способами, известными в данной области техники, в том числе: перорально, внутривенно, подкожно, внутриаартериально, внутримышечно, интраназально (например, с ингаляцией или без нее), внутрисердечно, внутриспинально, интраторакально, внутрибрюшинно, внутрижелудочно, сублингвально, чрескожно и/или ингаляционным путем. Введение может быть системным, например, внутривенным или локализованным. В некоторых вариантах реализации начальную дозу или стартовую дозу и одну или более дополнительных доз вводят одинаковым образом, то есть подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации одну или более дополнительных доз вводят другим способом, нежели начальную дозу, то есть начальную дозу можно вводить внутривенно, а одну или более дополнительных доз можно вводить подкожно.

В другом аспекте изобретение относится к применению антагонистического антитела против CGRP для изготовления лекарственного средства для использования в любом из способов, описанных в настоящем документе.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции для предотвращения, лечения или снижения частоты мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, содержащей эффективное количество антагонистического антитела против CGRP, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

В другом аспекте изобретение относится к набору для использования в любом из способов, описанных здесь. В некоторых вариантах реализации такой набор содержит контейнер, композицию, содержащую антагонистическое антитело против CGRP, описанное в настоящем документе, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, и инструкции по применению композиции в любом из способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации в способах, представленных в настоящем документе, используют антагонистические антитела против CGRP и полипептиды, полученные из антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6. Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к антителу G1 (взаимозаменяемо обозначаемому как "G1" и "TEV-48125"), которое произведено экспрессионными векторами, имеющими номера доступа ATCC PTA-6866 и PTA-6867. Например, в одном варианте реализации антитело, содержащее тяжелую цепь, вырабатывается экспрессионным вектором с номером доступа ATCC № PTA-6867. В дополнительном варианте реализации антитело, содержащее легкую цепь, вырабатывается экспрессионным вектором с номером доступа ATCC PTA-6866. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи G1 показаны на фиг. 5. Части определяющей комплементарности области (CDR) антитела G1 (включая CDR по Chothia и Kabat) также показаны на фиг. 5. Подразумевается, что ссылка на любую часть или всю область G1 охватывает последовательности, вырабатываемые экспрессионными векторами, имеющими номера доступа ATCC PTA-6866 и PTA-6867, и/или последовательности, изображенные на фиг. 5. В некоторых вариантах реализации изобретение также относится к вариантам антител G1 с аминокислотными последовательностями, изображенными в табл. 6.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит домен V_H , который по аминокислотной по-

следовательности по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичен SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит домен V_L , который по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичен SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит последовательность тяжелой цепи, которая по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит последовательность легкой цепи, которая по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит фрагмент или область антитела G1 или их варианты, показанные в табл. 6. В одном варианте реализации фрагмент представляет собой легкую цепь антитела G1. В другом варианте реализации фрагмент представляет собой тяжелую цепь антитела G1. В еще одном варианте реализации фрагмент содержит одну или более переменных областей из легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1. В еще одном варианте реализации фрагмент содержит одну или более переменных областей из легкой цепи и/или тяжелой цепи, показанные на фиг. 5. В еще одном варианте реализации фрагмент содержит одну или более CDR из легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1.

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

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

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

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

Константная область тяжелой цепи антител может быть из любых типов константных областей, таких как IgG, IgM, IgD, IgA и IgE; и любых изотипов, таких как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит модифицированную константную область, как описано здесь.

В одном аспекте изобретение относится к композиции для применения для уменьшения числа часов головной боли в месяц, испытываемых субъектом с рефрактерной мигренью. В одном варианте реализации такое применение включает введение субъекту некоторого количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, причем моноклональное антитело находится в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 20 (например, 25, 30, 35, 40,

45, 50, 55, 60, 65, 70 или более часов головной боли) после однократного введения. В некоторых вариантах число часов головной боли в месяц уменьшается по меньшей мере приблизительно на 50 ч. В одном варианте реализации такое применение включает введение субъекту некоторого количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, причем моноклональное антитело находится в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 15% (например, на 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или более) после однократного введения. В некоторых вариантах в месяц число часов головной боли снижается по меньшей мере приблизительно на 30%. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят ежемесячно. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в виде однократной дозы. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело составлено в виде лекарственной формы в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл, например, приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах субъектом является человек. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело содержит (а) антитело, имеющее CDR H1, представленную в SEQ ID NO: 3; CDR H2, представленную в SEQ ID NO: 4; CDR H3, представленную в SEQ ID NO: 5; CDR L1, представленную в SEQ ID NO: 6; CDR L2, представленную в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, представленную в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в табл. 6.

В одном аспекте изобретение относится к композиции для применения для уменьшения числа дней головной боли в месяц, испытываемых субъектом с рефрактерной мигренью. В одном варианте реализации применение включает введение субъекту некоторого количества моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, причем моноклональное антитело находится в количестве, эффективном для уменьшения числа дней головной боли в месяц по меньшей мере на 3 (например, на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней головной боли) после однократной дозы. В некоторых вариантах число дней головной боли в месяц уменьшается по меньшей мере приблизительно на 6 дней головной боли. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP. В некоторых вариантах реализации количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят ежемесячно. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в виде однократной дозы. В некоторых вариантах реализации введение представляет собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело составлено в виде лекарственной формы в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл, например, приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах субъектом является человек. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело содержит (а) антитело, имеющее CDR H1, представленную в SEQ ID NO: 3; CDR H2, представленную в SEQ ID NO: 4; CDR H3, представленную в SEQ ID NO: 5; CDR L1, представленную в SEQ ID NO: 6; CDR L2, представленную в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, представленную в SEQ ID NO: 8; или (b) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в табл. 6.

В одном аспекте изобретение относится к композиции для уменьшения использования любого препарата для лечения острой головной боли у субъекта с рефрактерной мигренью, включающего введение субъекту моноклонального антитела (например, антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP, причем моноклональное антитело находится в количестве, эффективном для уменьшения ежемесячного использования препаратов для лечения острой головной боли субъектом по меньшей мере на 15% (например, на 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или более). В некоторых вариантах реализации лекарственное средство от головной боли выбирают из группы, состоящей из агонистов 5-HT₁, триптанов, опиатов, алкалоидов спорыньи и нестероидных противовоспалительных средств (НПВП). В некоторых вариантах реализации лекарство от головной боли представляет собой триптан или соединение спорыньи. В некоторых вариантах реализации препарат для лечения острой головной боли выбран из группы, состоящей из анальгетиков (например, ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, напроксен, диклофенак, парацетамол, ацетилсалициловая кислота плюс парацетамол плюс кофеин, метамизол, феназон или толфенамовая кислота); противорвотных средств (например, метоклопрамид или домперидон); алкалоиды спорыньи (например, тартрат эрготамина или дигидроэрготамина); и триптанов, то есть агонистов 5-HT₁ (например, суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, алмотриптан, элетриптан или фроватриптан). В некоторых вариантах реализации количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, составляет от приблизительно 675 до приблизительно 1000 мг. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят ежемесячно. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело вводят в виде однократной дозы. В некоторых вариантах реализации введение представляет

собой подкожное или внутривенное введение. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело составлено в виде лекарственной формы в концентрации по меньшей мере 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл, например приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах субъектом является человек. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело содержит (а) антитело, имеющее CDR H1, представленную в SEQ ID NO: 3; CDR H2, представленную в SEQ ID NO: 4; CDR H3, представленную в SEQ ID NO: 5; CDR L1, представленную в SEQ ID NO: 6; CDR L2, представленную в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, представленную в SEQ ID NO: 8; или (б) вариант антитела в соответствии с (а), как показано в табл. 6.

В одном аспекте изобретение относится к композиции для применения для предотвращения, лечения или снижения частоты мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, которое включает введение субъекту однократной дозы моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP, причем количество моноклонального антитела, вводимого пациенту, составляет от приблизительно 675 до приблизительно 1000 мг.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена таблица, показывающая значения аффинности связывания 12 мышинных антител с различными аланинзамещенными фрагментами α -CGRP человека. Аффинность связывания измеряли при 25°C с использованием прибора Biacore, пропуская Fab через CGRP на чипе. Значения в рамке представляют потерю аффинности аланиновых мутантов относительно родительского фрагмента, 25-37 (курсив), за исключением K35A, который был получен из родительского фрагмента 19-37. "a" обозначает аффинность к фрагментам 19-37, а фрагменты 25-37 представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение двух независимых измерений на разных сенсорных чипах. "b" указывает, что эти взаимодействия отклоняются от простой модели бимолекулярного взаимодействия из-за двухфазной скорости диссоциации, поэтому их значения аффинности были определены с использованием модели конформационных изменений. Обозначения серой шкалы: белый цвет (1,0) указывает на родительскую аффинность; светло-серый цвет (менее 0,5) указывает на более высокую аффинность, чем родительскую; темно-серый цвет (более 2) указывает на более низкую аффинность, чем родительскую; а черный цвет означает, что связывания не обнаружено.

На фиг. 2A и 2B показано влияние введения антитела 4901 (400 нмоль/кг), (25 мг/кг) и антитела 7D11 (25 мг/кг) CGRP 8-37 на кожный кровоток, измеренный как поток клеток крови после стимуляции электрическими импульсами в течение 30 с. CGRP 8-37 вводили внутривенно (в/в) за 3-5 мин до электрической стимуляции. Антитела вводили внутривенно (в/в) за 72 ч до электрической стимуляции. Каждая точка на графиках представляет AUC одной крысы, получавшей лечение в указанных условиях. Каждая линия на графиках представляет среднее значение AUC крыс, получавших лечение в указанных условиях. AUC (площадь под кривой) равна $\Delta\text{flux} \times \Delta\text{time}$. " Δflux " представляет изменение единиц измерения потока после электрической импульсной стимуляции; а " Δtime " представляет период времени, необходимый для того, чтобы значение потока клеток крови вернулось к уровню до электрической стимуляции.

На фиг. 3 показано влияние введения различных доз антитела 4901 (25 мг/кг, 5 мг/кг, 2,5 мг/кг или 1 мг/кг) на кожный кровоток, измеренный как поток клеток крови после электрической импульсной стимуляции в течение 30 с. Антитела вводили внутривенно (в/в) за 24 ч до электрической стимуляции. Каждая точка на графике представляет AUC одной крысы, получавшей лечение в указанных условиях. Линия на графике представляет среднее значение AUC крыс, получавших лечение в указанных условиях.

На фиг. 4A и 4B показано влияние введения антител 4901 (1 мг/кг или 10 мг/кг, в/в), антитела 7E9 (10 мг/кг, в/в) и антитела 8B6 (10 мг/кг, в/в) на кожный кровоток, измеренный как поток клеток крови после электрической импульсной стимуляции в течение 30 с. Антитела вводили внутривенно (в/в) с последующей электрической импульсной стимуляцией через 30, 60, 90 и 120 мин после введения антител. Ось Y представляет процент AUC по сравнению с уровнем AUC, когда антитело не вводили (время 0). Ось X представляет собой время (минуты) между введением антител и электрической стимуляцией. "*" обозначает $P < 0,05$, а "***" обозначает $P < 0,01$ по сравнению с моментом времени 0. Данные были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с критерием множественного сравнения Даннетта.

На фиг. 5 показана аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1) и вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 2) антитела G1. CDR по Kabat выделены жирным шрифтом, а CDR по Chothia подчеркнуты. Аминокислотные остатки для вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи пронумерованы последовательно.

На фиг. 6 показано картирование эпитопа антитела G1 посредством конкуренции пептидов с использованием системы Biacore. N-биотинилированный человеческий α -CGRP был зафиксирован на сенсорном чипе SA. На чип наносили G1 Fab (50 нМ) в отсутствие конкурирующего пептида или предварительно инкубировали в течение 1 часа с 10 мкМ конкурирующего пептида. Измеряли связывание Fab G1 с человеческим α -CGRP на чипе. Ось Y представляет процент связывания, заблокированного присутствием

вием конкурирующего пептида, по сравнению со связыванием в отсутствие конкурирующего пептида.

Подробное описание

В некоторых аспектах изобретение, раскрытое в данном документе, относится к способам предотвращения, лечения и/или снижения частоты мигрени у субъекта, страдающего рефрактерной мигренью, путем введения этому индивидууму терапевтически эффективного количества антагонистического антитела против CGRP.

В некоторых аспектах изобретение, раскрытое в настоящем документе, также относится к антагонистическим антителам против CGRP и полипептидам, полученным из G1, или их вариантам, показанным в табл. 6, или их композициям, для использования в лечении и/или уменьшении частоты мигрени у субъекта, страдающего рефрактерной мигренью.

Общие методы

В практике применения различных аспектов настоящего изобретения будут использованы, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы полностью описаны в литературе, такой как: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Определения

Используемый здесь термин "приблизительно" при использовании в отношении числовых диапазонов, пределов или конкретных значений используется для указания того, что приведенные значения могут варьироваться в пределах вплоть до 10% от указанного значения. Таким образом, термин "приблизительно" используется для охвата отклонений $\pm 10\%$ или менее, отклонений $\pm 5\%$ или менее, отклонений $\pm 1\%$ или менее, отклонений $\pm 0,5\%$ или менее или отклонений $\pm 0,1\%$ или менее от указанного значения.

"Антитело" представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д. по меньшей мере через один сайт распознавания антигена, расположенный в варибельной области этой молекулы иммуноглобулина. Этот используемый здесь термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (ScFv), их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела (например доменные антитела) и любые другие модифицированные конфигурации молекулы иммуноглобулина, которые содержат сайт распознавания антигена. Антитело включает антитело любого класса, например IgG, IgA или IgM (или их подкласс), и антитело не обязательно должно относиться к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей иммуноглобулина можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно. Структуры и трехмерные конфигурации субъединиц различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Используемый здесь термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Модификатор "моноклональный" указывает на характер антитела, получаемого из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены гибридомным методом, впервые описанным Kohler and Milstein,

1975, *Nature*, 256: 495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, такими как описанные в Патенте США № 4816567. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек, полученных с использованием методов, описанных, например, в McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348: 552-554.

Используемый здесь термин "гуманизированные" антитела относится к формам не являющихся человеческими (например, мышинных) антител, которые представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки гипервариабельного участка (CDR) реципиента заменены остатками CDR видов, не являющихся человеческими (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и биологической активностью. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Кроме того, гуманизированное антитело может включать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в последовательностях донорной CDR или каркасной области, а включены для дополнительного улучшения и оптимизации функции антитела. В общем случае, гуманизированное антитело включает, по существу, все по меньшей мере из одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все области FR представляют собой области консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также включает по меньшей мере фрагмент константной области или домен (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Антитела могут иметь Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененных относительно исходного антитела, которые также называются одной или несколькими CDR, "полученными из" одной или нескольких CDR из исходного антитела.

Используемый здесь термин "человеческое антитело" означает антитело, имеющее аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, вырабатываемого человеком и/или полученного с использованием любой из методик получения антител человека, известных в данной области техники или раскрытых в данном документе. Это определение человеческого антитела включает антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой цепи человека или по меньшей мере один полипептид легкой цепи человека. Одним из таких примеров является антитело, содержащее мышиную легкую цепь и полипептиды тяжелой цепи человека. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных способов, известных в данной области техники. В одном варианте реализации человеческое антитело выбрано из фаговой библиотеки, причем эта фаговая библиотека экспрессирует человеческие антитела (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Человеческие антитела также могут быть получены путем введения локуса человеческого иммуноглобулина трансгенным животным, например мышам, в которых гены эндогенных иммуноглобулинов частично или полностью инактивированы. Этот подход описан в патентах США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 и 5661016. Альтернативно, человеческое антитело может быть получено путем иммортализации человеческих В-лимфоцитов, которые вырабатывают антитело, направленное против антигена-мишени (такие В-лимфоциты могут быть выделены у индивидуума или могут быть иммунизированы *in vitro*). См., например, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; и Патент США № 5750373.

Используемый здесь термин "пептид, связанный с геном кальцитонина" и "CGRP" относится к любой форме пептида, связанного с геном кальцитонина, и его вариантам, которые сохраняют по меньшей мере часть активности CGRP. Например, CGRP может быть α -CGRP или β -CGRP. Используемый здесь термин CGRP включает все виды нативной последовательности CGRP млекопитающих, например человека, собаки, кошки, лошади и быка.

Используемый здесь термин "антагонистическое антитело против CGRP" (взаимозаменяемо обозначаемое "антитело против CGRP") относится к антителу, которое способно связываться с CGRP и ингибировать биологическую активность CGRP и/или последующий путь (пути), опосредуемый(е) передачей сигналов CGRP. Антагонистическое антитело против CGRP включает антитела, которые модулируют, блокируют, антагонизируют, подавляют или уменьшают (в том числе значительно) биологическую активность CGRP или иным образом противодействуют пути CGRP, включая последующие сигнальные пути, опосредованные передачей сигналов CGRP, такие как связывание рецептора и/или индуцирование клеточного ответа на CGRP. Для задач настоящего изобретения понятно, что термин "антагонистическое антитело против CGRP" охватывает все ранее идентифицированные термины, наименования и функциональные состояния и характеристики, посредством которых сам CGRP, биологическая активность CGRP (включая его способность опосредовать любые виды головной боли, среди прочего) или проявления

биологической активности, по существу, сводятся к нулю, уменьшаются или нейтрализуются в любой значимой степени. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP связывает CGRP и предотвращает связывание CGRP с рецептором CGRP. В других вариантах реализации антитело против CGRP связывает CGRP и предотвращает активацию рецептора CGRP. Здесь приведены примеры антагонистических антител против CGRP.

Используемые здесь термины "G1", "антитело G1", "TEV-48125" и "фреманезумаб" используют взаимозаменяемо для обозначения антагонистического антитела против CGRP, вырабатываемого экспрессионными группами, имеющими номера депозита ATCC PTA-6867 и ATCC PTA 6866. Аминокислотная последовательность переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи показана на фиг. 5. CDR-части антитела G1 (включая CDR по Chothia и Kabat) схематически изображены на фиг. 5. Полинуклеотиды, кодирующие переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, показаны в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Полная аминокислотная последовательность тяжелой цепи G1 показана в SEQ ID NO: 11. Полная аминокислотная последовательность легкой цепи G1 показана в SEQ ID NO: 12. Характеризация и способы получения антитела G1 (и его вариантов) описаны в примерах 1-4 ниже, а также в заявке РСТ № РСТ/IB2006/003181, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки.

Термины "полипептид", "олигопептид", "пептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, может включать модифицированные аминокислоты и может быть прерван фрагментами, не являющимися аминокислотами. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, модифицированный естественным путем или путем вмешательства; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любая другая манипуляция или модификация, такая как конъюгирование с метящим компонентом. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более чем один аналог аминокислоты (включающий, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Следует понимать, что поскольку полипептиды по изобретению основаны на антителе, данные полипептиды могут существовать в виде единичных цепей или ассоциированных цепей.

Используемые здесь взаимозаменяемым образом термины "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги или любой субстрат, который может быть включен в полимер посредством ДНК- или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если присутствует модификация нуклеотидной структуры, она может быть произведена перед или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, таким образом, как конъюгирование с метящим компонентом. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замену одного или более чем одного из встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации незаряженными связями (например метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т.д.) и заряженными связями (например, фосфотриоаты, фосфоридитиоаты и т.д.), содержащие боковые группировки, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), со вставками (например, акридин, псорален и т.д.), содержащие хелатообразователи (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.д.), содержащие алкилаторы, с модифицированными связями (например, α -аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любая из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахарах, может быть заменена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищена стандартными защитными группами, или активирована с получением дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или может быть конъюгирована с твердыми носителями. 5'- и 3'-концевая группа OH может быть фосфорилирована или заменена аминами или органическими копирующими группировками из 1-20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть преобразованы до стандартных защитных групп. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы рибозных или дезоксирибозных сахаров, которые в общем известны в данной области техники, включая, например, 2'-O-метил-, 2'-O-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, карбоциклические аналоги сахаров, α -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и неосновные нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или более чем одна фосфодиэфирная связь может быть заменена альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, среди прочего, варианты реализации, в которых фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), в которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), возможно содержащий эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Предшествующее описание применимо ко всем упомянутым здесь полинуклеоти-

дам, включая РНК и ДНК.

В настоящем документе пациенты с рефрактерной мигренью (или "субъект с рефрактерной мигренью") считаются рефрактерными при наличии у них документированного неадекватного ответа (в медицинской карте или на основании подтверждения врача) по меньшей мере на два профилактических средства (из разных кластеров, определенных ниже). Пациентов с рефрактерной мигренью также можно считать рефрактерными при наличии у них документированного неадекватного ответа (в медицинской карте или на основании подтверждения врача) на два-четыре класса предшествующих профилактических препаратов (из разных кластеров, определенных ниже), например, неадекватный ответ на два класса предшествующих профилактических препаратов, неадекватный ответ на три класса предыдущих профилактических препаратов или неадекватный ответ на четыре класса предыдущих профилактических препаратов.

Неадекватный ответ определяется как: отсутствие клинически значимого улучшения, согласно суждению лечащего врача, после по меньшей мере трех месяцев терапии в стабильной дозе, которая считается подходящей для профилактики мигрени в соответствии с руководствами, принятыми в данной стране, или когда лечение должно быть прервано из-за нежелательных явлений, которые сделали его непереносимым для пациента, или препарат противопоказан или не подходит для пациента. Трехмесячный период может не применяться, если препарат является не переносимым, противопоказан или не подходит для пациента. Для онаботулинумтоксина А неадекватный ответ определяется как: отсутствие клинически значимого улучшения согласно суждению лечащего врача после по меньшей мере шести месяцев терапии в стабильной дозе, которая считается подходящей для профилактики мигрени в соответствии с принятыми в данной стране руководствами, или когда лечение необходимо прервать из-за нежелательных явлений, которые сделали его непереносимым для пациента. Альтернативно, если предыдущим профилактическим препаратом является онаботулинумтоксин А, с момента последней серии инъекций должно пройти как минимум две серии инъекций и три месяца.

В некоторых вариантах реализации упомянутые кластеры следующие:

кластер А: топирамат, карбамазепин, дивалпроекс натрия и вальпроат натрия;

кластер В: флунаризин и пизотифен;

кластер С: амитриптилин, венлафаксин, нортриптилин и дулоксетин;

кластер D: атенолол, надолол, метопролол, пропранолол и тимолол;

кластер Е: онаболинумтоксин А.

В некоторых вариантах реализации кластеры являются следующими:

кластер А: бета-блокаторы: пропранолол, метопролол, атенолол и бисопролол;

кластер В: противосудорожные препараты: топирамат;

кластер С: трициклики: амитриптилин;

кластер D: блокатор кальциевых каналов: флунаризин;

кластер Е: антагонист рецептора ангиотензина II: кандесартан;

кластер F: онаболинумтоксин А;

кластер G: вальпроевая кислота.

В пределах этой группы кластеров субъект считается имеющим рефрактерную мигрень, если у пациента неадекватный ответ на два-четыре класса профилактических лекарственных средств от головной боли. Например, у субъекта есть рефрактерная мигрень при наличии у него неадекватного ответа на два или три лекарства, причем каждое из разных кластеров (А, В, С, D, Е, F) и вальпроевой кислоты (кластер G).

Дополнительные кластеры включают:

кластер а: ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), такой как лизиноприл;

кластер b: препарат на основе бензоциклогептена, такой как пизотифен;

кластер c: антидепрессант, такой как амитриптилин (Элавил), тразодон (Дезирель) и имипрамин (Тофранил) и венлафаксин;

кластер d: противосудорожное средство, такое как фенитоин (Дилантин) или карбамазепин (Тегретол);

кластер e: оксетерон.

Опытный практикующий специалист сможет легко распознать и/или диагностировать субъекта с рефрактерной мигренью.

Используемый здесь термин "предотвращение" обозначает подход, позволяющий предотвратить возникновение или наличие мигрени у субъекта, который еще не испытывает мигрени. Используемый здесь термин "лечение" обозначает подход для получения полезных или желаемых клинических результатов. Для целей данного изобретения полезные или желательные клинические результаты включают, среди прочего, один или несколько из следующих: облегчение любого аспекта рефрактерной мигрени, включая уменьшение тяжести, уменьшение интенсивности боли и других ассоциированных симптомов, уменьшение частота рецидивов, уменьшение количества головных болей в днях или часах в месяц, повышение качества жизни лиц, страдающих от рефрактерной мигрени, и снижение дозы других лекарств (например, препараты для лечения острой головной боли), необходимых для лечения рефрактерной мигрени.

"Снижение частоты" мигрени означает любое из снижения тяжести (которое может включать уменьшение потребности и/или количества (например, воздействия) других лекарств и/или способов ле-

чения, обычно используемых для этого состояния, включая, например, эрготамин, дигидроэрготамин или триптаны), продолжительности и/или частоты (включая, например, задержку или увеличение времени до следующего эпизодического приступа у индивидуума). Как понятно специалистам в данной области техники, индивидуумы могут различаться в зависимости от их реакции на лечение, и, поэтому, например, "способ снижения частоты возникновения мигрени у индивидуума" отражает введение антагонистического антитела против CGRP, исходя из разумных ожиданий, что такое введение может вызвать такое снижение частоты у этого конкретного лица.

"Уменьшение интенсивности" мигрени или одного или нескольких симптомов рефрактерной мигрени означает уменьшение или улучшение одного или нескольких симптомов мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью по сравнению с отсутствием применения антагонистического антитела против CGRP. "Уменьшение интенсивности" также включает сокращение или уменьшение продолжительности симптома.

Используемый здесь термин "контроль рефрактерной мигрени" относится к поддержанию или снижению тяжести или продолжительности одного или нескольких симптомов мигрени, например, частоты приступов мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью (по сравнению с уровнем до лечения). Например, продолжительность или тяжесть головной боли или частота приступов у индивидуума снижается по меньшей мере приблизительно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или 70% по сравнению с уровнем до лечения.

Используемый здесь термин "час головной боли" относится к часу, в течение которого субъект испытывает головную боль. Часы головной боли могут быть выражены в полных часах (например, один час головной боли, два часа головной боли, три часа головной боли и т.д.) или в единицах полных и неполных часов (например, 0,5 ч головной боли, 1,2 ч головной боли, 2,67 ч головной боли и т.д.). Один или более часов головной боли могут быть описаны относительно конкретного интервала времени. Например, "ежедневное число часов головной боли" могут относиться к числу часов головной боли, которые субъект испытывает в течение суточного интервала (например, 24-часового периода). В другом примере "еженедельные часы головной боли" могут относиться к числу часов головной боли, которые субъект испытывает в течение недельного интервала (например, 7-дневного периода). Как можно понять, недельный интервал может соответствовать или не соответствовать календарной неделе. В другом примере "количество головной боли в месяц" может относиться к числу часов головной боли, которые субъект испытывает в течение месяца. Как можно понять, месячный интервал (например, период 28, 29, 30 или 31 день) может варьироваться в зависимости от числа дней в зависимости от конкретного месяца и может соответствовать или не соответствовать календарному месяцу. В еще одном примере "ежегодное число головной боли" могут относиться к числу часов головной боли, которые субъект испытывает в течение года. Как можно понять, годовой интервал (например, период 365 или 366 дней) может варьироваться в зависимости от числа дней в зависимости от конкретного года и может соответствовать или не соответствовать календарному году.

Используемый здесь термин "день головной боли" относится к дню, в течение которого субъект испытывает головную боль. Дни головной боли могут быть выражены в единицах полных дней (например, один день головной боли, два дня головной боли, три дня головной боли и т.д.) или в единицах полных и неполных дней (например, 0,5 дня головной боли, 1,2 дня головной боли, 2,67 дня головной боли и т.д.). Один или более дней головной боли могут быть описаны относительно конкретного временного интервала. Например, "дни головной боли в неделю" могут относиться к числу дней головной боли, которые субъект испытывает в течение недельного интервала (например, 7-дневный период). Как можно понять, недельный интервал может соответствовать или не соответствовать календарной неделе. В другом примере "месячные дни головной боли" могут относиться к числу дней головной боли, которые субъект испытывает в течение месяца. Как можно понять, месячный интервал (например, период 28, 29, 30 или 31 день) может варьироваться в зависимости от числа дней в зависимости от конкретного месяца и может соответствовать или не соответствовать календарному месяцу. В еще одном примере "ежегодные дни головной боли" могут относиться к числу дней головной боли, которые субъект испытывает в течение года. Как можно понять, годовой интервал (например, период 365 или 366 дней) может варьироваться в зависимости от числа дней в зависимости от конкретного года и может соответствовать или не соответствовать календарному году.

Использованный здесь термин "задерживание" развития мигрени воспрепятствование, затруднение, замедление, торможение, стабилизацию и/или откладывание прогрессирования заболевания у субъекта с рефрактерной мигренью. Эта задержка может быть различной продолжительности, в зависимости от истории болезни и/или индивидуумов, которых лечат. Как очевидно для специалиста в данной области техники, достаточное или значительное задерживание может, по сути, включать предотвращение в том смысле, что у индивидуума не развивается мигрень, особенно после постановки диагноза рефрактерной мигрени на основании неадекватного ответа на предшествующее лечение профилактическими средствами. Способ, который "задерживает" развитие симптома, - это способ, который уменьшает вероятность развития симптома в заданном временном интервале и/или уменьшает степень симптомов в заданном временном интервале по сравнению с неиспользованием этого способа. Такие сравнения обычно основа-

ны на клинических исследованиях с использованием статистически значимого числа субъектов.

"Развитие" или "прогрессирование" мигрени означает начальные проявления и/или последующее прогрессирование расстройства у субъекта с рефрактерной мигренью. Развитие мигрени может быть обнаружено и оценено с использованием стандартных клинических способов, хорошо известных в данной области техники.

Используемый здесь термин "эффективная доза" или "эффективное количество" лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для достижения полезных или желаемых результатов. Для профилактического применения полезные или желаемые результаты включают такие результаты, как устранение или уменьшение риска, уменьшение тяжести или задерживание начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнений и промежуточных патологических фенотипов, проявляющихся во время развития заболевания. Для терапевтического использования полезные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение интенсивности боли, продолжительности или частоты приступа рефрактерной мигрени и уменьшение одного или нескольких симптомов, возникающих в результате рефрактерной мигрени (биохимических, гистологических и/или поведенческих), включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся в ходе развития заболевания, повышение качества жизни людей, страдающих от заболевания, уменьшение дозы других лекарств, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарства и/или задержка прогрессирования заболевания пациентов. Эффективная доза может быть введена за один или несколько приемов. Для целей настоящего изобретения эффективная доза лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для реализации профилактического или терапевтического лечения, прямо или косвенно. Как понятно в клиническом контексте, эффективная дозировка лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может достигаться или не достигаться в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективная доза" может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких терапевтических агентов, и можно считать, что один агент вводится в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими агентами может быть достигнут или достигается желаемый результат.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее, более предпочтительно человека. Млекопитающие также включают среди прочего сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних питомцев, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс.

А. Способы предотвращения, лечения или уменьшения рефрактерной мигрени и/или по меньшей мере одного вторичного симптома, ассоциированного с рефрактерной мигренью.

В одном аспекте изобретение относится к способам предотвращения, лечения или снижения частоты мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью. В другом аспекте изобретение относится к способу лечения или снижения частоты по меньшей мере одного вторичного симптома, ассоциированного с рефрактерной мигренью у субъекта. В некоторых вариантах способ включает введение индивидууму эффективного количества антитела или полипептидов, полученных из антитела, которое модулирует путь CGRP (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP).

В другом аспекте изобретение относится к способам предотвращения, уменьшения интенсивности, контроля, снижения частоты или замедления развития или прогрессирования мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью или симптомами, ассоциированными с диагнозом рефрактерной мигрени, включающим введение индивидууму эффективного количества антитела, которое модулирует путь CGRP, или антагонистического антитела против CGRP в комбинации с дополнительным агентом (-ами), полезными для лечения мигрени, причем таким дополнительным агентом (-ами), например, может быть препарат для лечения острой головной боли.

Такие дополнительные агенты включают, среди прочего, агонисты 5-НТ, триптаны, НПВП, анальгетики, противорвотные средства, алкалоиды спорыньи. Например, такое антитело и по меньшей мере один острый дополнительный агент от мигрени можно вводить одновременно, то есть их можно вводить достаточно близко во времени, чтобы позволить их отдельным терапевтическим эффектам перекрываться.

Дополнительные неограничивающие примеры дополнительных агентов для лечения острой головной боли, которые можно вводить в комбинации с анти антителом-антагонистом CGRP, включают одно или более из следующих:

(i) опиоидный анальгетик, например, морфин, героин, гидроморфон, оксиморфон, леворфанол, леваллорфан, метадон, меперидин, фентанил, кокаин, кодеин, дигидрокодеин, оксикодон, гидрокодон, пропоксифен, налмефен, налорфин, налоксон, налтрексон, бупренорфин, буторфанол, налбуфин или пентазоцин;

(ii) нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП), например, аспирин, диклофенак, дифлусинал, этодолак, фенбуфен, фенопрофен, флуфенизал, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, меклофенамовая кислота, мефенамовая кислота, набуметон, напроксен, оксапрозин, фенилбутазон, пироксикам, сулиндак, толметин или зомепирак, ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), целекоксиб; рофекоксиб; мелоксикам; JTE-522; L 745 337; NS398; или соответствующая фармацевтиче-

ски приемлемая соль;

(iii) барбитуратное седативное средство, например, амобарбитал, апробарбитал, бутабарбитал, бутабитал (включая комбинации бутальбитала, например бутальбитал/аспирин/кофеин (Фиоринал®, Актавис) или бутальбитал/парацетамол/кофеин (Фиорицет®, Cardinal Health)), мефобарбитал, метарбитал, метогекситал, пентобарбитал, фенобартитал, секобарбитал, тальбутал, теамилал или тиопентал или соответствующая фармацевтически приемлемая соль;

(iv) барбитуратный анальгетик, например бутальбитал, или соответствующая фармацевтически приемлемая соль, или композиция, содержащая бутальбитал;

(v) бензодиазепин, обладающий седативным действием, например, хлордиазепоксид, клоразепат, диазепам, флуразепам, лоразепам, оксазепам, темазепам или триазолам или соответствующая фармацевтически приемлемая соль;

(vi) антагонист H1, обладающий седативным действием, например дифенгидрамин, пириламин, прометазин, хлорфенирамин или хлорциклизин или соответствующая фармацевтически приемлемая соль;

(vii) седативное средство, такое как глутетимид, мепробамат, метаквалон или дихлоралфеназон или соответствующая фармацевтически приемлемая соль;

(viii) релаксант скелетных мышц, например баклофен, каризопродол, хлорзоксазон, циклобензаприн, метокарбамол или орфренадин или соответствующая фармацевтически приемлемая соль;

(ix) антагонист рецептора NMDA, например декстрометорфан ((+)-3-гидрокси-N-метилморфинан) или его метаболит декстрорфан ((+)-3-гидрокси-N-метилморфинан), кетамин, мемантин, пирролохинолинхинон или цис-4-(фосфометил)-2-пиперидинкарбоновая кислота или соответствующая фармацевтически приемлемая соль;

(x) альфа-адреноблокатор, например, доксазозин, тамсулозин, клонидин или 4-амино-6,7-диметокси-2-(5-метансульфонамидо-1,2,3,4-тетрагидроизохинол-2-ил)-5-(2-пиридил)хиназолин;

(xi) ингибитор ЦОГ-2, например целекоксиб, рофекоксиб или вальдекоксиб;

(xii) анальгетик, являющийся производным анилина, в частности парацетамол;

(xiii) нейролептик, такой как дроперидол;

(xiv) агонист ваниллоидного рецептора (например, ресинифератоксин) или антагонист ваниллоидного рецептора (например, капсазепин);

(xv) местный анестетик, такой как мексилетин;

(xxii) кортикостероид, такой как дексаметазон;

(xxiii) агонист или антагонист серотониновых рецепторов;

(xxiv) холинергический (никотиновый) анальгетик;

(xxv) трамадол;

(xxvi) ингибитор PDEV, такой как силденафил, варденафил или таладафил;

(xxvii) альфа-2-дельта-лиганд, такой как габапентин или прегабалин; и

(xxviii) канабиноид.

Специалистам в данной области техники будет понятно различие между введением лекарственного средства для лечения острой мигрени и для предотвращения мигрени (то есть для профилактического лечения мигрени).

Специалисты в данной области техники смогут определить подходящие количества доз для конкретных агентов, которые следует использовать в комбинации с антителом против CGRP. Например, суматриптан можно вводить в дозировке от приблизительно 0,01 до приблизительно 300 мг. В некоторых случаях суматриптан можно вводить в дозировке от приблизительно 2 мг до приблизительно 300 мг, например, от приблизительно 5 мг до приблизительно 250 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 5 мг до от приблизительно 50 мг или от приблизительно 5 до приблизительно 25 мг. При непарентеральном введении типичная дозировка суматриптана составляет от приблизительно 25 до приблизительно 100 мг, причем обычно предпочтительны приблизительно 50 мг, например приблизительно 45, приблизительно 55 или приблизительно 60 мг.

Когда суматриптан вводят парентерально, предпочтительная дозировка составляет приблизительно 6 мг, например, приблизительно 5 мг, приблизительно 7 мг или приблизительно 8 мг. Однако эти дозы могут варьироваться в соответствии со способами, стандартными в данной области техники, так что их оптимизируют для конкретного пациента или для конкретной комбинированной терапии. Кроме того, например, целекоксиб можно вводить в количестве от 50 до 500 мг, например, от приблизительно 50 мг до приблизительно 400 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 300 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 400 мг или от приблизительно 200 до приблизительно 300 мг. Кроме того, на этикетке для любого зарегистрированного лекарства для лечения острой головной боли также могут быть указаны соответствующие дозы для достижения желаемого результата.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предотвращения, лечения или сни-

жения частоты возникновения мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации количество моноклонального антитела, вводимого в каждый из ряда дней, может составлять 0,1-5000 мг, 1-5000 мг, 10-5000 мг, 100-5000 мг, 1000-5000 мг, 0,1-4000 мг, 1-4000 мг, 10-4000 мг, 100-4000 мг, 1000-4000 мг, 0,1-3000 мг, 1-3000 мг, 10-3000 мг, 100-3000 мг, 1000-3000 мг, 0,1-2000 мг, 1-2000 мг, 10-2000 мг, 100-2000 мг, 1000-2000 мг, 0,1-1000 мг, 1-1000 мг, 10-1000 мг или 100-1000 мг. В некоторых вариантах реализации это количество составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. Иллюстративная схема введения доз включает введение начальной дозы антитела приблизительно 675 мг подкожно с последующей ежемесячной дозой антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже периода более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Другая иллюстративная схема введения включает подкожное введение начальной дозы антитела приблизительно 225 мг, а затем ежемесячной дозы антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в период более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Еще одна схема введения доз включает введение начальной дозы антитела приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 минут с последующими дозами приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 минут каждый квартал в течение, например, одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Еще одна схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 675 мг, вводимой подкожно, с последующими дозами приблизительно 675 мг, вводимыми подкожно каждый квартал, например, в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Однако могут быть полезны и другие схемы дозирования, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач. В некоторых вариантах реализации начальную дозу (то есть стартовую дозу) и одну или несколько дополнительных доз вводят одинаковым способом, например, подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации одну или более дополнительных доз вводят другим способом, нежели начальную или стартовую дозу, например, начальную дозу можно вводить внутривенно, а одну или более дополнительных доз можно вводить подкожно.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предотвращения, лечения или уменьшения частоты возникновения мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью включающему введение субъекту однократной дозы моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации однократная доза может представлять собой количество антитела, равное 0,1-5000 мг, 1-5000 мг, 10-5000 мг, 100-5000 мг, 1000-5000 мг, 0,1-4000 мг, 1-4000 мг, 10-4000 мг, 100-4000 мг, 1000-4000 мг, 0,1-3000 мг, 1-3000 мг, 10-3000 мг, 100-3000 мг, 1000-3000 мг, 0,1-2000 мг, 1-2000 мг, 10-2000 мг, 100-2000 мг, 1000-2000 мг, 0,1-1000 мг, 1-1000 мг, 10-1000 мг или 100-1000 мг. В некоторых вариантах реализации однократная доза может представлять собой количество антитела от 225 до 1000 мг, например, приблизительно 225 мг, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. В другом варианте реализации однократная доза может представлять собой количество антитела от 675 до 900 мг.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предотвращения, лечения или уменьшения частоты возникновения мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту месячной дозы моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в количестве, которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации однократная доза может представлять собой количество антитела 0,1-5000 мг, 1-5000 мг, 10-5000 мг, 100-5000 мг, 1000-5000 мг, 0,1-4000 мг, 1-4000 мг, 10-4000 мг, 100-4000 мг, 1000-4000 мг, 0,1-3000 мг, 1-3000 мг, 10-3000 мг, 100-3000 мг, 1000-3000 мг, 0,1-2000 мг, 1-2000 мг, 10-2000 мг, 100-2000 мг, 1000-2000 мг, 0,1-1000 мг, 1-1000 мг, 10-1000 мг или 100-1000 мг. В некоторых вариантах реализации месячная доза может представлять собой количество антитела от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 225 мг, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. Иллюстративная схема включает введение начальной дозы антитела приблизительно 675 мг подкожно с последующей ежемесячным введением дозы антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в течение более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Другая иллюстративная схема включает введение начальной дозы антитела приблизительно 225 мг подкожно с последующей месячной дозой антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в течение более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Еще одна схема дозирования включает введение начальной дозы антитела приблизительно 900 мг внутривенно инфузией в течение приблизительно 60 мин с последующими дозами

приблизительно 900 мг внутривенно инфузией в течение приблизительно 60 мин каждый квартал, например, в течение одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Еще одна схема дозирования включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 675 мг, вводимой подкожно, с последующими дозами приблизительно 675 мг, вводимыми подкожно каждый квартал, например, в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Однако могут быть полезны и другие режимы дозирования, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач. В некоторых вариантах реализации начальную дозу (то есть стартовую дозу) и одну или несколько дополнительных доз вводят одинаковым способом, например, подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации одну или более дополнительных доз вводят другим способом, нежели начальную или стартовую дозу, например, начальную дозу можно вводить внутривенно, а одну или более дополнительных доз можно вводить подкожно.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения числа часов головной боли в месяц, испытываемых субъектом с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более часов головной боли после однократной, месячной или ежеквартальной дозы. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 20 ч головной боли после однократной дозы, месячной дозы или ежеквартальной дозы. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125 или более часов головной боли. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более после однократной дозы. В некоторых вариантах реализации моноклональное вещество может находиться в количестве, эффективном для уменьшения числа часов головной боли в месяц по меньшей мере на 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более после однократной дозы, ежемесячной дозы или ежеквартальной дозы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения числа дней головной боли в месяц, испытываемых субъектом, с рефрактерной мигренью, включающему введение этому субъекту количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в количестве, эффективном для уменьшения числа дней головной боли в месяц по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней головной боли после однократной дозы. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в количестве, эффективном для уменьшения числа дней головной боли в месяц по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней головной боли после ежемесячной дозы или ежеквартальной дозы. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в количестве, эффективном для уменьшения числа дней головной боли в месяц по меньшей мере на 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более после однократной дозы, ежемесячной дозы или ежеквартальной дозы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения использования препарата для лечения острой головной боли у субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения ежедневного, ежемесячного, ежеквартального и/или ежегодного использования субъектом лекарства от головной боли по меньшей мере на 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения ежемесячного использования лекарственного средства против головной боли субъектом по меньшей мере на 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более. Препарат против головной боли может представлять собой любой тип препарата для лечения острой головной боли, описанного здесь. Препараты для лечения острой могут представлять собой специфические лекарства от мигрени, которые могут быть определены специалистом в данной области (например, триптаны и соединения спорыньи). Неограничивающие примеры препаратов против головной боли включают, например, агонисты 5-HT₁ (и агонисты, действующие на другие сайты 5-HT₁), триптаны (например, суматриптан, золмитриптан, наратриптан, ризатриптан, элетриптан, алмотриптан, афроватриптан), алкалоиды споры-

нии (например, эрготамина тартрат, эргоновина малеат и дигидроэрготоксина мезилат (например, дигидроэргокорнина, дигидроэргокристина, дигидроэргокриптина и дигидроэрготамина мезилат (DHE 45)) и нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) (например, аспирин, диклофенак, дифлунисал, этодолак, фенбуфен, фенпрофен, флуфенизал, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, меклофенамовая кислота, мефенамовая кислота, набуметон, напроксен, оксапрозин, фенилбутазон, пироксикам, сулиндак, толметин или зомепирак, ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), цефекоксиб; рофекоксиб; мелоксикам; JTE-522; L-745,337; NS398 или соответствующую фармацевтически приемлемую соль), опиаты/опиоды (например, кодеин, оксикодон) и барбитураты.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения среднемесячного числа дней использования препарата для лечения острой головной боли, специфического против мигрени, у субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в количестве, эффективном для уменьшения среднемесячного числа дней использования препарата для лечения острой головной боли по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней после однократного приема. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в количестве, эффективном для уменьшения среднемесячного числа дней использования препарата для лечения острой головной боли по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней после ежемесячной дозы или ежеквартальной дозы. В некоторых вариантах реализации препарата для лечения острой головной боли, специфического для мигрени, представляет собой триптан или соединение спорыньи.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения среднемесячного числа дней с тошнотой и/или рвотой, испытываемых субъектом с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в количестве, эффективном для уменьшения количества дней в месяц с тошнотой и/или рвотой по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней с тошнотой и/или рвотой после однократного введения. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может быть в количестве, эффективном для уменьшения количества дней в месяц с тошнотой и/или рвотой по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней с тошнотой и/или рвотой после ежемесячной дозы или ежеквартальной дозы. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения количества дней с тошнотой и/или рвотой в месяц по меньшей мере на 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более после однократной, ежемесячной или ежеквартальной дозы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения среднемесячного числа дней с фотофобией и/или фонофобией, испытываемым субъектом с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту количества моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения числа дней в месяц с фотофобией и/или фонофобией, по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней с фотофобией и/или фонофобией после однократного приема. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения числа дней с фотофобией и/или фонофобией в месяц, по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дней с фотофобией и/или фонофобией после ежемесячной дозы или ежеквартальной дозы. В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело может находиться в количестве, эффективном для уменьшения числа дней с фотофобией и/или фонофобией в месяц, по меньшей мере на 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более после однократной, ежемесячной или ежеквартальной дозы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу улучшения качества жизни субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации изменения в качестве жизни сообщаются самим субъектом. В некоторых вариантах реализации изменения в качестве жизни субъекта измеряют с использованием специфического для мигрени опросника качества жизни (MSQOL). Опросник MSQOL и его различные версии известны в данной области техники.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу улучшения качества жизни субъекта, связанного со здоровьем, включающему введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации изменения в качестве жизни сообщаются самим субъектом. В некоторых вариантах реализации изменения качества жизни человека, связанного со здоровьем, измеряют с использовани-

ем опросника EuroQoL-5 Dimension (EQ 5D). Опросник EQ 5D и его различные варианты известны в данной области техники.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения степени инвалидизации, обусловленной мигренью, у субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение указанному субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации изменения в степени инвалидизации, обусловленной мигренью, сообщаются самим субъектом. В некоторых вариантах реализации изменения степени инвалидизации, обусловленной мигренью, у субъекта измеряют с использованием 6-компонентной Оценки влияния головной боли (HIT-6). HIT-6 и ее различные варианты известны в данной области техники.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу уменьшения степени инвалидизации, обусловленной мигренью, у субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации изменения в степени инвалидизации, обусловленной мигренью, сообщаются самим субъектом. В некоторых вариантах реализации изменения степени инвалидизации, обусловленной мигренью, у субъекта измеряют с использованием Опросника для оценки степени инвалидизации, обусловленной мигренью (MIDAS). Опросник MIDAS и его различные варианты известны в данной области техники.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения депрессии у субъекта, включающему введение субъекту с рефрактерной мигренью моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации изменения статуса депрессии сообщаются самим субъектом. В некоторых вариантах реализации изменения статуса депрессии у субъекта измеряют с использованием Опросника о состоянии здоровья пациента из двух пунктов (PHQ-2) или Опросника о состоянии здоровья пациента из девяти пунктов (PHQ-9). В некоторых вариантах реализации изменения в состоянии депрессии субъекта измеряют с использованием Опросника о состоянии здоровья пациента из двух пунктов (PHQ-2) и Опросника о состоянии здоровья пациента из девяти пунктов (PHQ-9).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу улучшения производительности труда и активности субъекта с рефрактерной мигренью, включающему введение субъекту моноклонального антитела (например, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), которое модулирует путь CGRP. В некоторых вариантах реализации изменения производительности труда и активности сообщаются самим субъектом. В некоторых вариантах реализации изменения производительности труда и активности субъекта измеряют с использованием опросника "Снижение производительности труда и активности" (WPAI). Опросник WPAI и его различные версии известны в данной области техники.

В отношении всех способов, описанных в данном документе, ссылки на антитела (например, моноклональные антитела, которые модулируют путь CGRP, антагонистические антитела против CGRP, моноклональные антагонистические антитела против CGRP) также включают композиции, содержащие один или более из этих агентов. Соответственно, такую композицию можно использовать согласно способу, относящемуся к антителу, описанному здесь. Эти композиции могут дополнительно содержать подходящие вспомогательные вещества, такие как фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, описанные в другом месте в настоящем документе.

Описанное здесь антитело (например, моноклональное антитело, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP) можно вводить индивидууму или субъекту в любой терапевтической дозе любым подходящим путем и в любом подходящем составе. Специалисту в данной области техники должно быть очевидно, что примеры, описанные здесь, предназначены не для ограничения, а для иллюстрации доступных методик. Соответственно, в некоторых вариантах реализации антитело, описанное здесь, может быть введено субъекту в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение, например, в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение периода времени, например, приблизительно 10 мин, приблизительно 20 мин, приблизительно 30 мин, приблизительно 40 мин, приблизительно 50 мин, приблизительно 60 мин, приблизительно 90 мин, приблизительно 120 мин, приблизительно 180 мин или приблизительно 240 мин. Описанное здесь антитело также может быть введено субъекту путем подкожного, внутримышечного, внутривентриального, интрацереброспинального, внутрисуставного, сублингвального, внутриартериального, интрасиновиального введения, с помощью инфузии, путем интратекального, орального, ингаляционного, интраназального (например, с или без ингаляции), буккального, ректального, трансдермального, внутрисердечного, внутрикостного, внутрикожного, трансмукозального, вагинального, интравитреального, внутрисуставного, местного, надкожного или наружного введения. Введение может быть системным, например внутривенным, или локализованным. Для введения пригодны коммерчески доступные распылители для жидких составов, включая струйные распылители и ультразвуковые распылители. Жидкие составы можно распылять непосредственно, а лиофилизированный порошок можно распылять после разведения. Альтернативно, антитело, описанное в настоящем документе, можно распылять в виде аэрозоля с использованием фторуглеродного препарата и ингалятора с отмеренными дозами, или ингалировать в виде

лиофилизированного и измельченного порошка.

В некоторых вариантах реализации антитела, описанное в настоящем документе, может быть введено с помощью методов сайт-специфической или целевой локальной доставки. Примеры сайт-специфических или целевых методов локальной доставки включают различные имплантируемые депо-источники антител или катетеры локальной доставки, такие как инфузионные катетеры, постоянный катетер или игольчатый катетер, синтетические трансплантаты, адвентициальные аппликаторы, шунты и стенты или другие имплантируемые устройства, сайт-специфические носители, прямую инъекцию или непосредственное применение. См., например, публикацию заявки РСТ WO 00/53211 и патент США № 5981568, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Для введения могут быть использованы различные препараты антитела, описанные здесь. В некоторых вариантах реализации антитела можно вводить в чистом виде. В некоторых вариантах реализации антитела и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество могут находиться в различных лекарственных формах. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества известны в данной области техники и представляют собой относительно инертные вещества, которые облегчают введение фармакологически эффективного вещества. Например, вспомогательное вещество может придавать форму или консистенцию или действовать как разбавитель. Подходящие вспомогательные вещества включают, среди прочего, стабилизирующие агенты, смачивающие и эмульгирующие агенты, соли для изменения осмолярности, капсулирующие агенты, буферы и усилители проницаемости кожи. Вспомогательные вещества, а также составы для парентеральной и непарентеральной доставки лекарств изложены в справочнике Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

В некоторых вариантах реализации эти агенты, включая антитела, описанные здесь, могут быть приготовлены в виде состава для введения путем инъекции (например, внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно и т.д.). Соответственно, эти агенты можно комбинировать с фармацевтически приемлемыми носителями, такими как физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и тому подобное. Конкретная схема введения доз, то есть доза, время и повторность, будет зависеть от конкретного индивидуума и истории болезни этого индивидуума.

В некоторых вариантах реализации эти агенты, включая антитела, описанные в настоящем документе, могут быть приготовлены в виде состава для периферического введения. Такие составы можно вводить периферически любым подходящим периферическим путем, в том числе внутривенно и подкожно. Препарат, приготовленный для периферического введения, может включать вещество, лекарственное средство и/или антитело, которое не подлежит доставке центрально, спинально, интратекально или непосредственно в ЦНС. Неограничивающие примеры периферических путей введения включают в себя путь, который представляет собой пероральный, подъязычный, буккальный, наружный, ректальный, посредством ингаляции, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутриартериальный, внутримышечный, внутрисердечный, внутрикостный, внутрикожный, внутрибрюшинный, трансмукозальный, вагинальный, интравитреальный, внутрисуставный, периартикулярный, местный или внутрикожный путь.

Терапевтические составы антител, используемые в соответствии с настоящим раскрытием, могут быть приготовлены для хранения и/или применения путем смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington, The Science and Practice of Pharmacy). 20th Ed. Mack Publishing (2000)), и в некоторых случаях может быть в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях. Терапевтическая композиция антитела может содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или стабилизаторов с неограничивающими примерами таких видов, которые включают такие буферы, как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмоний хлорид; гексаметионий хлорид; бензалконий хлорид, бензетоний хлорид; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и т-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты (например, в концентрациях от 0,1 до 100 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,01 до 50 мМ, от 1 до 50 мМ, от 1 до 30 мМ, от 1 до 20 мМ, от 10 до 25 мМ) такие как глицин, глутамин, метионин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты (например, в концентрациях от 0,001 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 0,1 мг/мл, от 0,001 мг/мл до 0,01 мг/мл, 0,01 мг/мл до 0,1 мг/мл), такие как ЭДТА (например, дигидрат динатриевой соли ЭДТА); сахара (например, в концентрациях от 1 мг/мл до 500 мг/мл, от 10 мг/мл до 200 мг/мл, от 10 мг/мл до 100 мг/мл, от 50 мг/мл до 150 мг/мл), такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества (например, в концентрациях от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,01 до 1 мг/мл, от 0,1 до 1 мг/мл, от 0,01 до 0,5 мг/мл/мл), такие как TWEEN (например, полисорбат (например, полисорбат 20, полисор-

бат 40, полисорбат 60, полисорбат 80)), PLURONICS или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Композиция, содержащая антитело, может быть охарактеризована точки зрения любых физических свойств. Например, жидкая композиция антитела может иметь любой подходящий pH для терапевтической эффективности, безопасности и хранения. Например, pH жидкой композиции антитела может составлять от 4 до 9, от 5 до 8, от 5 до 7 или от 6 до 8. В некоторых вариантах жидкая композиция антитела может иметь pH приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или приблизительно 10 или выше или ниже.

В другом примере жидкая композиция антитела может иметь любую подходящую вязкость для терапевтической эффективности, безопасности и хранения. Например, вязкость жидкой композиции антитела может составлять от приблизительно 0,5 сантипуаз (сП) до приблизительно 100 сП, от приблизительно 1 сП до приблизительно 50 сП, от приблизительно 1 сП до приблизительно 20 сП, от приблизительно 1 сП до приблизительно 15 сП или приблизительно от 5 до 15 сП при 25°C. В некоторых вариантах реализации жидкая композиция антитела может иметь вязкость приблизительно 0,5 сП, 1 сП, 1,2 сП, 1,4 сП, 1,6 сП, 1,8 сП, 2,0 сП, 2,2 сП, 2,4 сП, 2,6 сП, 2,8 сП, 3,0 сП, 3,2 сП, 3,4 сП, 3,6 сП, 3,8 сП, 4,0 сП, 4,2 сП, 4,4 сП, 4,6 сП, 4,8 сП, 5,0 сП, 5,2 сП, 5,4 сП, 5,6 сП, 5,8 сП, 6,0 сП, 6,2 сП, 6,4 сП, 6,6 сП, 6,8 сП, 7,0 сП, 7,2 сП, 7,4 сП, 7,6 сП, 7,8 сП, 8,0 сП, 8,2 сП, 8,4 сП, 8,6 сП, 8,8 сП, 9,0 сП, 9,2 сП, 9,4 сП, 9,6 сП, 9,8 сП, 10,0 сП, 10,2 сП, 10,4 сП, 10,6 сП, 10,8 сП, 11,0 сП, 11,2 сП, 11,4 сП, 11,6 сП, 11,8 сП, 12,0 сП, 12,2 сП, 12,4 сП, 12,6 сП, 12,8 сП, 13,0 сП, 13,2 сП, 13,4 сП, 13,6 сП, 13,8 сП, 14,0 сП, 14,2 сП, 14,4 сП, 14,6 сП, 14,8 сП или приблизительно 15 сП при 25°C, или вязкость может быть выше или ниже.

В другом примере жидкая композиция антитела может иметь любую подходящую проводимость для терапевтической эффективности, безопасности и хранения. Например, проводимость жидкой композиции антитела может составлять от приблизительно 0,1 миллисименса на сантиметр (мСм/см) до приблизительно 15 мСм/см, от 0,1 мСм/см до 10 мСм/см, от 0,1 мСм/см до 5 мСм/см, от 0,1 мСм/см до 2 мСм/см или от 0,1 мСм/см до 1,5 мСм/см. В некоторых вариантах реализации жидкая композиция антитела может иметь проводимость 0,19 мСм/см, 0,59 мСм/см, 1,09 мСм/см, 1,19 мСм/см, 1,29 мСм/см, 1,39 мСм/см, 1,49 мСм/см, 1,59 мСм/см, 1,69 мСм/см, 1,79 мСм/см, 1,89 мСм/см, 1,99 мСм/см, 2,09 мСм/см, 2,19 мСм/см, 2,29 мСм/см, 2,39 мСм/см, 2,49 мСм/см, 2,59 мСм/см, 2,69 мСм/см, 2,79 мСм/см, 2,89 мСм/см, 2,99 мСм/см, 3,09 мСм/см, 3,19 мСм/см, 3,29 мСм/см, 3,39 мСм/см, 3,49 мСм/см, 3,59 мСм/см, 3,69 мСм/см, 3,79 мСм/см, 3,89 мСм/см, 3,99 мСм/см, 4,09 мСм/см, 4,19 мСм/см, 4,29 мСм/см, 4,39 мСм/см, 4,49 мСм/см, 4,59 мСм/см, 4,69 мСм/см, 4,79 мСм/см, 4,89 мСм/см, 4,99 мСм/см, 5,09 мСм/см, 6,09 мСм/см, 6,59 мСм/см, 7,09 мСм/см, 7,59 мСм/см, 8,09 мСм/см, 8,59 мСм/см, 9,09 мСм/см, 9,59 мСм/см, 10,09 мСм/см, 10,59 мСм/см, 11,09 мСм/см, 11,59 мСм/см, 12,09 мСм/см, 12,59 мСм/см, 13,09 мСм/см, 13,59 мСм/см, 14,09 мСм/см, 14,59 мСм/см или приблизительно 15,09 мСм/см, или проводимость может быть выше или ниже.

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

Липосомы, содержащие антитело, могут быть получены способами, известными в данной области техники, такими как описанные в Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); и патентах США №№ 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты в патенте США № 5013556. Особенно полезные липосомы могут быть получены методом обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-derivатизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-РЕ). Чтобы получить липосомы с желаемым диаметром, их экструдировать через фильтры с определенным размером пор.

Активные ингредиенты также могут быть захвачены в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли-(метилметакрилата), соответственно, в системах доставки коллоидных лекарственных средств (например, липосомы), альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методики раскрыты в Remington, The Science

and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Также могут быть приготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем эти матрицы имеют форму фасонных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц замедленного высвобождения включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли (2-гидроксиэтилметакрилат) или 'поли (виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT (инъектируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), изобутират ацетата сахарозы и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Составы, используемые для введения *in vivo*, как правило, должны быть стерильными. Это легко достигается, например, фильтрацией через стерилизующие фильтрующие мембраны. Композиции терапевтических антител обычно помещают в контейнер со стерильным доступом через порт, например, мешок для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций.

Композиции по настоящему изобретению могут быть в единичных стандартных дозированных формах, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии или суппозитории, для перорального, парентерального или ректального введения или введения путем ингаляции или инсuffляции. В некоторых случаях единичная стандартная лекарственная форма может поставляться в предварительно заполненной емкости (например, в предварительно заполненном шприце), полезной для введения единичной стандартной дозы субъекту.

В некоторых вариантах реализации композиция, содержащая антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанная здесь, может быть приготовлен для любого подходящего пути введения с количеством антитела в диапазоне от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 3000 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 1000 мг или от приблизительно 100 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 1500 мг, приблизительно 1500 мг до приблизительно 2500 мг или от приблизительно 2000 до приблизительно 3000 мг. В некоторых случаях композиция, содержащая антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанная в настоящем документе, может содержать количество антитела, самое большее или по меньшей мере приблизительно 0,1 мг, 1 мг, 100 мг, 1 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг, 625 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 725 мг, 750 мг, 775 мг, 800 мг, 825 мг, 850 мг, 875 мг, 900 мг, 925 мг, 950 мг, 975 мг, 1000 мг, 1100 мг, 1200 мг, 1300 мг, 1400 мг, 1500 мг, 1600 мг, 1700 мг, 1800 мг, 1900 мг, 2000 мг или приблизительно 3000 мг.

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

Композиция антитела может содержать один или более компонентов, включая антитело и другие виды, описанные здесь в другом месте. Антитело и другие компоненты могут находиться в любом под-

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

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

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

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

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

Описанное здесь антитело можно вводить любым подходящим способом, включая инъекцию (например, внутривенно, подкожно, внутривнутрибрюшинно, внутримышечно и т.д.). Антитела также можно вводить путем ингаляции, как описано здесь. В некоторых случаях антитело может вводить назально с ингаляцией или без нее. Как правило, для введения антитела, описанного в настоящем документе, начальная потенциальная дозировка может составлять приблизительно 2 мг/кг. Для цели настоящего изобретения типичная суточная доза может составлять от приблизительно 3 мкг/кг до 30 мкг/кг от 300 мкг/кг до 3 мг/кг, от 30 мг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Например, можно использовать дозу приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг и приблизительно 30 мг/кг. Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов или пока не будут достигнуты достаточные терапевтические уровни, например, для уменьшения боли. Иллюстративная схема введения включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 8,5 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг с последующей поддерживающей дозой приблизительно 2,8 мг/кг антитела или с последующей поддерживающей дозой приблизительно 2,8 мг/кг раз в две недели. Другая иллюстративная схема введения включает введение дозы приблизительно 100 мг, 125 мг, 150 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг субъекту один раз в месяц (например, приблизительно каждые 28 дней) внутривенно инфузией в течение приблизительно одного часа или подкожно. Например, иллюстративная схема может включать введение начальной дозы антитела приблизительно 225 мг подкожно с последующей ежемесячной дозой антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в течение более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Другая иллюстративная схема введения включает введение начальной или стартовой дозы антитела приблизительно 675 мг подкожно с последующей ежемесячной дозой антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в течение более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Еще одна схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 минут с последующими дозами приблизительно 900 мг, вводимых внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 минут ежеквартально, например, в течение одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Еще одна схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 675 мг, вводимой подкожно, с последующими дозами приблизительно 675 мг, вводимыми подкожно ежеквартально, например, в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Однако могут быть полезны другие схемы введения, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач. Например, в некоторых вариантах реализации предусматривается введение от приблизительно одного до приблизительно четырех раз в неделю. Прогресс этой терапии легко контролировать с помощью традиционных методик и анализов. Схема введения (включая используемый антагонист(ы) CGRP) может изменяться со временем.

В некоторых вариантах реализации доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного здесь и вводимого субъекту, может варьироваться от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 3000 мг, от 1 до 1000 мг, от 100 до 1000 мг, от 100

до 500 мг, от 0,1 до 5000 мг, от 1 до 4000 мг, от 250 до 1000 мг, от 500 до 1000 мг, от 100 до 900 мг, от 400 до 900 мг, от 10 до 3000 мг, от 10 до 2000 мг, от 100 до 2000 мг, от 150 до 2000 мг, от 200 до 2000 мг, от 250 до 2000 мг, от 300 до 2000 мг, 350 мг до 2000 мг, от 400 до 2000 мг, от 450 до 2000 мг, от 500 до 2000 мг, от 550 до 2000 мг, от 600 до 2000 мг, от 650 до 2000 мг, от 700 до 2000 мг, от 750 до 2000 мг, от 800 до 2000 мг, от 850 до 2000 мг, от 900 до 2000 мг, от 950 до 2000 мг или от 1000 до 2000 мг. В некоторых вариантах реализации доза или количество антитела, описанного в настоящем документе и вводимого субъекту, может быть, может быть самое большее, может быть меньше или может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1 мкг, 1 мкг, 100 мкг, 1 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг, 625 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 725 мг, 750 мг, 775 мг, 800 мг, 825 мг, 850 мг, 875 мг, 900 мг, 925 мг, 950 мг, 975 мг, 1000 мг, 1100 мг, 1200 мг, 1300 мг, 1400 мг, 1500 мг, 1600 мг, 1700 мг, 1800 мг, 1900 мг, 2000 мг или приблизительно 3000 мг. В некоторых вариантах реализации это количество составляет от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 225 мг, приблизительно 675 мг или приблизительно 900 мг. Иллюстративная схема включает введение начальной дозы антитела приблизительно 225 мг подкожно с последующей ежемесячной дозой антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в течение более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Иллюстративная схема включает введение начальной дозы антитела приблизительно 675 мг подкожно с последующей ежемесячной дозой антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в течение более одного года (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Еще одна схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 минут с последующими дозами приблизительно 900 мг, вводимыми внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 минут ежеквартально, например, в течение одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Еще один режим дозирования включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 675 мг, вводимой подкожно, с последующими дозами приблизительно 675 мг, вводимыми подкожно ежеквартально, например, в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Однако могут быть полезны другие схемы введения, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач.

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

В некоторых вариантах реализации частота, с которой доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного здесь, вводится субъекту, может варьироваться. В некоторых вариантах реализации субъекту может быть введена одна доза антитела на протяжении всей терапии. В некоторых вариантах реализации частота, с которой дозу или количество антитела вводят субъекту, является постоянной (например, дозу вводят приблизительно один раз в месяц или приблизительно один раз в квартал). В некоторых вариантах реализации частота, с которой пациенту вводят дозу или количество антитела, составляет приблизительно раз в квартал в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. В некоторых вариантах реализации частота, с которой дозу или количество антитела, описанного здесь, вводят субъекту, является изменяемой (например, начальная или стартовая доза, за которой следует доза один раз в месяц, за которой следуют дополнительные дозы приблизительно через три месяца и приблизительно через семь месяцев). В некоторых вариантах реализации частота, с которой антитело вводят субъекту, составляет по меньшей мере, составляет меньше или составляет самое большее приблизительно один, два, три, четыре, пять или шесть раз в день. В некоторых вариантах реализации частота, с которой антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP) вводят субъекту, составляет по меньшей мере,

меньше или самое большее приблизительно одну, две, три, четыре, пять или шесть доз в день.

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

В некоторых вариантах реализации частота, с которой субъекту вводят дозу или количество антигена (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), составляет по меньшей мере, меньше или самое большее один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать раз каждую неделю, каждые две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать, двадцать один, двадцать два, двадцать три, двадцать четыре, двадцать пять, двадцать шесть, двадцать семь, двадцать восемь, двадцать девять, тридцать, тридцать один, тридцать два, тридцать три, тридцать четыре, тридцать пять, тридцать шесть, тридцать семь, тридцать восемь, тридцать девять, сорок, сорок один, сорок два, сорок три, сорок четыре, сорок пять, сорок шесть, сорок семь, сорок восемь, сорок девять, пятьдесят, пятьдесят пять, шестьдесят, шестьдесят пять, семьдесят, семьдесят пять, восемьдесят, восемьдесят пять, девяносто, девяносто пять или сто недель. В некоторых вариантах реализации частота, с которой антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное здесь, вводят субъекту, составляет менее, чем одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать доз в неделю.

В некоторых вариантах реализации частота, с которой пациенту вводят дозу или количество антигена (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), составляет по меньшей мере, меньше или самое большее один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать раз каждый месяц, каждые два месяца, каждые три месяца, каждые четыре месяца, каждые пять месяцев, каждые шесть месяцев, каждые семь месяцев, каждые восемь месяцев, каждые девять месяцев, каждые десять месяцев, каждые одиннадцать месяцев, каждые двенадцать месяцев, каждые тринадцать месяцев, каждые четырнадцать месяцев, каждые пятнадцать месяцев, каждые шестнадцать месяцев, каждые семнадцать месяцев или каждые восемнадцать месяцев. В некоторых вариантах реализации частота, с которой пациенту вводят дозу или количество антигена (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), составляет приблизительно один раз в месяц. В некоторых вариантах реализации частота, с которой пациенту вводят дозу или количество антигена (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), составляет приблизительно один раз каждые три месяца. В некоторых вариантах реализации частота, с которой антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное здесь, вводят субъекту менее чем приблизительно одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать доз в месяц. В некоторых вариантах реализации дозу или количество антигена можно вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или больше раз в месяц.

В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг,

2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг или более могут вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту один раз в месяц. В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно от 0,1 до 5000 мг, от 1 до 4000 мг, от 10 до 3000 мг, от 10 до 2000 мг, от 100 до 2000 мг, от 150 до 2000 мг, от 200 до 2000 мг, от 250 до 2000 мг, от 300 до 2000 мг, от 350 до 2000 мг, от 400 до 2000 мг, от 450 до 2000 мг, от 500 до 2000 мг, от 550 до 2000 мг, 600 мг до 2000 мг, от 650 до 2000 мг, от 700 до 2000 мг, от 750 до 2000 мг, от 800 до 2000 мг, от 850 до 2000 мг, от 900 до 2000 мг, от 950 до 2000 мг или приблизительно 1000 мг. До 2000 мг могут вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту один раз в месяц. В некоторых вариантах реализации от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг, например, приблизительно 225 мг антитела вводят один раз в месяц. Иллюстративная схема введения включает введение начальной дозы антитела приблизительно 675 мг подкожно с последующей ежемесячной дозой антитела приблизительно 225 мг подкожно в течение, например, приблизительно двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев или даже в течение периода, превышающего один год (например, 18 месяцев, двух лет или трех лет). Однако могут быть полезны и другие схемы введения, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач.

В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг или более могут вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту каждые три месяца. В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно от 0,1 до 5000 мг, от 1 до 4000 мг, от 10 до 3000 мг, от 10 до 2000 мг, от 100 до 2000 мг, от 150 до 2000 мг, от 200 до 2000 мг, от 250 до 2000 мг, от 300 до 2000 мг, от 350 до 2000 мг, от 400 до 2000 мг, от 450 до 2000 мг, от 500 до 2000 мг, от 550 до 2000 мг, 600 мг до 2000 мг, от 650 до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг или от 1000 мг до 2000 мг могут вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту каждые три месяца. В некоторых вариантах реализации от приблизительно 225 до приблизительно 1000 мг вводят один раз каждые три месяца или менее, например, приблизительно 675 мг вводят подкожно приблизительно каждые три месяца или приблизительно 900 мг вводят приблизительно каждые три месяца внутривенно в виде инфузии. Иллюстративная схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 мин с последующими дозами приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 мин каждые три месяца в течение одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Другая иллюстративная схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 675 мг, вводимой подкожно, с последующим введением доз приблизительно 675 мг, вводимых подкожно, каждые три месяца в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Однако могут быть полезны другие схемы введения, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач.

В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг или более могут вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту каждые шесть месяцев. В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно от 0,1 до 5000 мг, от 1 до 4000 мг, от 10 до 3000 мг, от 10 до 2000 мг, от 100 до 2000 мг, от 150 до 2000 мг, от 200 до 2000 мг, от 250 до 2000 мг, от 300 до 2000 мг, от 350 до 2000 мг, от 400 до 2000 мг, от 450 до 2000 мг, от 500 до 2000 мг, от 550 до 2000 мг, 600 мг до 2000 мг, от 650 до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг или от 1000 мг до 2000 мг могут вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту каждые шесть месяцев. В некоторых вариантах реализации от 225 до 1000 мг вводят один раз каждые шесть месяцев или менее. Однако могут быть полезны и другие схемы введения, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач.

В некоторых вариантах реализации частота, с которой дозу или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) вводят субъекту (например, подкожно или внутривенно), составляет по меньшей мере, меньше или самое большее один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать,

шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать раз каждый квартал. Предполагается, что "квартал" может относиться к периоду, равному четверти года или может также относиться к календарному кварталу, такому как период 1 января - 31 марта, 1 апреля - 30 июня, 1 июля - 30 сентября или 1 октября - 31 декабря. В некоторых случаях "квартал" может относиться к периоду времени продолжительностью приблизительно три месяца.

В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг или более могут вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту каждый квартал. В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно от 0,1 до 5000 мг, от 1 до 4000 мг, от 10 до 3000 мг, от 10 до 2000 мг, от 100 до 2000 мг, от 150 до 2000 мг, от 200 до 2000 мг, от 250 до 2000 мг, от 300 до 2000 мг, от 350 до 2000 мг, от 400 до 2000 мг, от 450 до 2000 мг, от 500 до 2000 мг, от 550 до 2000 мг, 600 мг до 2000 мг, от 650 мг до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг или от 1000 мг до 2000 мг могут вводить (например, подкожно или внутривенно в виде инфузии) субъекту каждый квартал. Иллюстративная схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 мин с последующими дозами приблизительно 900 мг внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 минут каждый квартал в течение одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Другая иллюстративная схема включает введение начальной или стартовой дозы приблизительно 675 мг, вводимой подкожно, с последующим введением доз приблизительно 675 мг, вводимых подкожно, каждый квартал в течение приблизительно одного года, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет. Однако могут быть полезны и другие схемы введения, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого желает достичь практикующий врач.

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

В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1250 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг, 1500 мг, 1550 мг, 1600 мг, 1650 мг, 1700 мг, 1750 мг, 1800 мг, 1850 мг, 1900 мг, 1950 мг, 2000 мг, 2050 мг, 2100 мг, 2150 мг, 2200 мг, 2250 мг, 2300 мг, 2350 мг, 2400 мг, 2450 мг, 2500 мг, 2550 мг, 2600 мг, 2650 мг, 2700 мг, 2750 мг, 2800 мг, 2850 мг, 2900 мг, 2950 мг, 3000 мг или более могут вводить субъекту один раз в год. В некоторых вариантах реализации антитело в дозе или количестве приблизительно от 0,1 до 5000 мг, от 1 до 4000 мг, от 10 до 3000 мг, от 10 до 2000 мг, от 100 до 2000 мг, от 150 до 2000 мг, от 200 до 2000 мг, от 250 до 2000 мг, от 300 до 2000 мг, от 350 до 2000 мг, от 400 до 2000 мг, от 450 до 2000 мг, от 500 до 2000 мг, от 550 до 2000 мг, 600 мг до 2000 мг, от 650 мг до 2000 мг, от 700 мг до 2000 мг, от 750 мг до 2000 мг, от 800 мг до 2000 мг, от 850 мг до 2000 мг, от 900 мг до 2000 мг, от 950 мг до 2000 мг или от 1000 мг до 2000 мг могут вводить субъекту один раз в год. В некоторых вариантах реализации от приблизительно 450 мг до приблизительно 2000 мг вводят один раз в год или менее.

В некоторых вариантах реализации способ может включать введение антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в настоящем документе, субъекту в течение нескольких дней. Между такими двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью или более днями введения могут быть промежутки более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или более дней. В некоторых вариантах реализации между двумя из этих нескольких дней могут быть промежутки более одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати, пятнадцати, шестнадцати, семнадцати, восемнадцати, девятнадцати, двадцати, двадцати одного, двадцати двух, двадцати трех, двадцати четырех, двадцати пяти, двадцати шести, двадцати семи, двадца-

ти восьми, двадцати девяти, тридцати или более дней. Кроме того, в некоторых вариантах реализации количество антитела, вводимого в первый день из этих нескольких дней, может отличаться (например, быть выше или ниже) от количества антитела, вводимого во второй день.

В некоторых вариантах реализации начальную дозу (которая также может упоминаться как нагрузочная доза или стартовая доза) антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного здесь субъекту могут вводить с последующим введением одной или нескольких дополнительных доз с желаемыми интервалами. В некоторых вариантах реализации начальная доза (или стартовая доза) и одна или более дополнительных доз представляют собой одну и ту же дозу. В некоторых вариантах реализации одна или более дополнительных доз представляют собой дозу, отличную от начальной или стартовой дозы. В некоторых вариантах реализации начальная доза и одна или более дополнительных доз вводятся одинаковым способом, то есть подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации одну или более дополнительных доз вводят другим способом, чем начальная доза, например, начальную дозу могут вводить внутривенно, а одну или более дополнительных доз могут вводить подкожно. В некоторых вариантах реализации частота, с которой вводят одну или более дополнительных доз, является постоянной (например, каждый месяц или каждые три месяца). В некоторых вариантах реализации частота, с которой вводят одну или более дополнительных доз, является переменной (например, одну дополнительную дозу вводят через один месяц после начальной дозы, а затем еще одну дополнительную дозу вводят через три месяца после начальной дозы). Может быть использована любая желательная и/или терапевтическая схема введения начальной нагрузочной дозы, дополнительных доз и частоты (например, включая описанные здесь) дополнительных доз. Иллюстративная схема включает начальную нагрузочную дозу приблизительно 225 мг антагонистического антитела против CGRP, вводимого подкожно, с последующими поддерживающими дозами приблизительно 225 мг антитела, вводимого подкожно с интервалами в один месяц. Иллюстративная схема включает начальную нагрузочную дозу приблизительно 675 мг антагонистического антитела против CGRP подкожно, с последующими поддерживающими дозами приблизительно 225 мг антитела подкожно с интервалами в один месяц. Еще одна иллюстративная схема введения включает начальную дозу приблизительно 900 мг антагонистического антитела против CGRP, вводимого внутривенно в инфузии в течение приблизительно 60 минут, с последующими поддерживающими дозами приблизительно 900 мг антагонистического антитела против CGRP внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 минут с трехмесячным интервалом. Другая иллюстративная схема включает начальную или стартовую дозу приблизительно 675 мг антагонистического антитела против CGRP, вводимого подкожно, с последующими поддерживающими дозами приблизительно 675 мг антагонистического антитела против CGRP подкожно с трехмесячными интервалами.

В некоторых вариантах реализации начальная доза (или стартовая доза) антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) для введения субъекту может составлять приблизительно 0,1 мкг, 1 мкг, 100 мкг, 1 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг, 625 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 725 мг, 750 мг, 775 мг, 800 мг, 825 мг, 850 мг, 875 мг, 900 мг, 925 мг, 950 мг, 975 мг, 1000 мг, 1500 мг, 2000 мг или приблизительно 3000 мг с последующей одной или несколькими дополнительными дозами антитела величиной приблизительно 0,1 мкг, 1 мкг, 100 мкг, 1 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг, 525 мг, 550 мг, 575 мг, 600 мг, 625 мг, 650 мг, 675 мг, 700 мг, 725 мг, 750 мг, 775 мг, 800 мг, 825 мг, 850 мг, 875 мг, 900 мг, 925 мг, 950 мг, 975 мг, 1000 мг, 1500 мг, 2000 мг или приблизительно 3000 мг. Иллюстративная схема введения включает начальную нагрузочную дозу приблизительно 225 мг антагонистического антитела против CGRP, вводимого подкожно, с последующими поддерживающими дозами приблизительно 225 мг антитела, вводимого подкожно с интервалами в один месяц. Иллюстративная схема включает начальную нагрузочную дозу приблизительно 675 мг антагонистического антитела против CGRP, вводимого подкожно, с последующими поддерживающими дозами приблизительно 225 мг антитела подкожно с интервалами в один месяц. Еще одна иллюстративная схема включает начальную дозу приблизительно 900 мг антагонистического антитела против CGRP, вводимую внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 мин, с последующими поддерживающими дозами приблизительно 900 мг антагонистического антитела против CGRP внутривенно в виде инфузии в течение приблизительно 60 мин с трехмесячными интервалами. Другая иллюстративная схема включает начальную или стартовую дозу приблизительно 675 мг антагонистического антитела против CGRP, вводимого подкожно, с последующими поддерживающими дозами приблизительно 675 мг антагонистического антитела против CGRP подкожно с трехмесячными интервалами.

В некоторых вариантах реализации доза или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанные здесь, может быть разделено на субдозы и вводиться в виде нескольких субдоз в зависимости от, например, способа введения и/или конкретного вводимого состава. Например, в случаях, когда дозу вводят подкожно, подкожная доза может быть разделе-

на несколько субдоз, и каждую субдозу вводят в другом месте, чтобы избежать, например, более крупной однократной подкожной инъекции в одном месте. Например, внутривенная доза 900 мг может быть разделена на четыре субдозы по 225 мг каждая. В качестве другого примера, подкожная доза 675 мг может быть разделена на три субдозы по 225 мг каждая, и каждая доза 225 мг может быть введена в другом месте, что поможет минимизировать объем, вводимый в каждом месте. Разделение субдоз может быть равным (например, три равные субдозы) или может быть неравным (например, три субдозы, из которых две в два раза больше, чем другие субдозы).

В некоторых вариантах реализации количество доз антител, вводимых субъекту в течение курса лечения, может варьироваться в зависимости, например, от достижения сниженной частоты возникновения рефрактерной мигрени и/или вторичного симптома, ассоциированного с рефрактерной мигренью у этого субъекта. Например, количество доз, вводимых в течение курса лечения, может составлять, может быть по меньшей мере, или может быть самое большее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 доз, или лечение может предоставляться неопределенно долго. В некоторых случаях лечение может быть острым, так что субъекту для лечения вводят самое большее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 доз.

В некоторых вариантах реализации доза (или субдоза) или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного здесь, могут быть приготовлены в виде жидкой композиции и введены (например, посредством подкожной инъекции, посредством внутривенной инъекции) субъекту. В таких случаях объем жидкой композиции, содержащей антитело, может варьироваться в зависимости, например, от концентрации антитела в жидкой композиции, желаемой дозы антитела и/или используемого пути введения. Например, объем жидкой композиции, содержащей антитело, описанное здесь, и вводимой (например, посредством инъекции, такой как, например, подкожная инъекция или внутривенная инфузия) субъекту, может составлять от приблизительно 0,001 мл до приблизительно 10,0 мл, от приблизительно 0,01 до приблизительно 5,0 мл, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мл, от приблизительно 0,1 до приблизительно 3 мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,5 мл или от приблизительно 1 до приблизительно 2,5 мл. Например, объем жидкой композиции, содержащей антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное здесь, и вводимой (например, посредством инъекции, такой как, например, подкожная инъекция или внутривенная инфузия) субъекту может составлять, может быть по меньшей мере, или может быть самое большее приблизительно 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или приблизительно 10,0 мл.

В некоторых вариантах реализации доза (или частичная доза) или количество антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в настоящем документе, могут поставляться в предварительно заполненных сосудах, пригодных для введения антитела субъекту. Такие предварительно заполненные сосуды могут быть предназначены для самостоятельного введения или введения другим лицом. Например, доза (или субдоза) или количество антитела, описанные в настоящем документе, могут поставляться в виде жидкой композиции в предварительно заполненных шприцах, предварительно заполненных шприцах с защитным устройством для иглы, шприц-ручках или автоматических устройствах для инъекций. В таких примерах предварительно заполненные шприцы могут быть предназначены для самостоятельного введения или для введения другим лицом. В некоторых случаях предварительно заполненные шприцы или автоматические устройства для инъекций могут быть предназначены для подкожного введения и/или внутривенного введения.

Для целей настоящего изобретения подходящая доза антитела может зависеть от используемого антитела (или его композиций), типа и серьезности вторичного симптома, типа и тяжести рефрактерной мигрени или другого состояния, подлежащего лечению, независимо от того, вводят ли этот агент в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на него, а также на усмотрение лечащего врача. Как правило, врач назначает это антитело до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, которая принесет желаемый результат. Доза и/или частота могут варьироваться в течение курса лечения.

Определению дозировки, как правило, будут способствовать эмпирические соображения, такие как время полужизни. Например, для продления периода полужизни антитела и предотвращения атаки на антитело иммунной системой хозяина могут быть использованы антитела, которые совместимы с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела. Частота введения может быть определена и скорректирована в течение курса терапии и обычно, но не обязательно, основана на лечении, и/или подавлении, и/или ослаблении, и/или задержке рефрактерной мигрени или другого состояния. Альтернативно, целесообразными могут быть составы антител с непрерывным высвобождением. В данной области техники известны различные составы и устройства для дос-

тижения замедленного высвобождения.

В одном варианте реализации дозировки для антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного в настоящем документе, могут быть определены эмпирически у лиц, которым было назначено одно или более введений антитела. Таким лицам дают постепенно нарастающие дозы антител. Чтобы оценить эффективность антитела, можно отслеживать какой-то показатель заболевания.

Введение антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP) в соответствии со способами по настоящему изобретению может быть непрерывным или прерывистым, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, от того, является ли цель введения терапевтической или профилактической, и других факторов, известных квалифицированным специалистам. Введение антитела может быть, по существу, непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может осуществляться в виде серии разнесенных по времени доз, например, до, во время или после развития рефрактерной мигрени; до; во время; до и после; во время и после; до и во время; или до, во время и после развития рефрактерной мигрени. Введение может осуществляться до, во время и/или после любого события, которое может привести к рефрактерной мигрени.

В некоторых вариантах может присутствовать более одного антитела. Могут присутствовать по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять различных или более антител. Как правило, эти антитела могут иметь комплементарное действие, не оказывая отрицательного влияния друг на друга. Антитело (например, моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональное антагонистическое антитело против CGRP), описанное здесь, также можно использовать в сочетании с другими антагонистами CGRP или антагонистами рецептора CGRP. Например, можно использовать один или более из следующих антагонистов CGRP: антисмысловая молекула, нацеленная на CGRP (включая антисмысловую молекулу, направленную на нуклеиновую кислоту, кодирующую CGRP), ингибирующее CGRP соединение, структурный аналог CGRP, доминантно-негативная мутация рецептора CGRP, которая связывает CGRP, и антитело против рецептора CGRP. Антитело также можно использовать в сочетании с другими агентами, которые служат для усиления и/или дополнения эффективности соответствующих агентов.

Диагностика или оценка рефрактерной мигрени хорошо известны в данной области техники. Оценка может быть выполнена на основании субъективных показателей, таких как характеристика симптомов пациентом и история болезни, документирующая неадекватный ответ на предшествующее профилактическое лечение. В некоторых вариантах реализации оценка рефрактерной мигрени может осуществляться на основании числа часов головной боли, как описано в другом месте в данном документе. Например, оценка рефрактерной мигрени может выражаться в ежедневном числе часов головной боли, еженедельном числе часов головной боли, числе часов головной боли в месяц и/или числе часов головной боли в год. В некоторых случаях число часов головной боли может быть определено со слов субъекта.

Эффективность лечения может быть оценена способами, хорошо известными в данной области техники. Например, можно оценить облегчение боли. Соответственно, в некоторых вариантах наблюдают субъективное облегчение боли через 1, 2 или более часов после введения антитела против CGRP. В некоторых вариантах реализации субъективно наблюдают частоту приступов рефрактерной мигрени после введения антитела против CGRP.

В некоторых вариантах реализации способ предотвращения, лечения или уменьшения частоты возникновения мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, описанный в настоящем документе, может снижать частоту возникновения мигрени после однократного введения антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного здесь, в течение продолжительного периода времени. Например, частота мигрени может быть снижена по меньшей мере на 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более дней после однократного введения.

В некоторых вариантах реализации способ лечения или снижения частоты мигрени у субъекта, описанный в настоящем документе (например, с рефрактерной мигренью) может уменьшить количество часов головной боли, испытываемых субъектом, от уровня до введения, после введения субъекту одной или нескольких доз антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного здесь. Например, ежедневное число часов головной боли, испытываемых субъектом после введения субъекту одной или нескольких доз антитела, может быть уменьшено на 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа головной боли от уровня у субъекта до введения. В некоторых случаях ежедневное число часов головной боли, испытываемых субъектом после введения одной или нескольких доз антитела субъекту, может быть уменьшено на 0,5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%

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

В некоторых вариантах реализации способ лечения или снижения частоты мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью, описанный в настоящем документе, может уменьшить количество дней головной боли, испытываемых субъектом, от уровня до введения, после введения одной или нескольких доз антитела (например, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антагонистического антитела против CGRP), описанного здесь, субъекту. Например, еженедельное число часов головной боли, испытываемых субъектом после введения одной или нескольких доз антитела субъекту, может быть уменьшено на 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7 дней головной боли от уровня до введения. В некоторых случаях еженедельное число часов головной боли, испытываемых субъектом после введения одной или нескольких доз антитела субъекту, может быть уменьшено на 0,5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более по сравнению с уровнем до введения. В другом примере число часов головной боли в месяц, испытываемых субъектом после введения одной или нескольких доз антитела субъекту, может быть уменьшено на 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более дней головной боли от уровня до введения.

В некоторых вариантах реализации способ может включать введение субъекту одного или нескольких дополнительных агентов одновременно или последовательно с антителом (например, моноклональным антителом, которое модулирует путь CGRP, антагонистическое антитело против CGRP, моноклональным антагонистическим антителом против CGRP). В некоторых вариантах реализации такой дополнительный агент может представлять собой препарат для лечения острой головной боли, такой как агонисты 5-HT₁, триптаны, алкалоиды спорыньи, опиаты и НПВП), описанные в другом месте данного документа. В некоторых вариантах реализации терапевтический эффект может быть больше по сравнению с использованием антитела или одного или нескольких дополнительных агентов по отдельности. Соответственно, может быть достигнут синергетический эффект между антителом и одним или несколькими дополнительными агентами.

В. Антитела-антагонисты CGRP.

В некоторых вариантах реализации в способах по изобретению используют антитело, которое может представлять собой антагонистическое антитело против CGRP. Термин "антагонистическое антитело против CGRP" может относиться к любой молекуле антитела, которая блокирует, подавляет или снижает (в том числе значительно) биологическую активность CGRP, включая нижестоящие пути, опосредованные передачей сигналов CGRP, такие как связывание рецептора и/или индуцирование клеточного ответа на CGRP.

Антагонистическое антитело против CGRP может проявлять любую одну или более из следующих характеристик: (a) связываться с CGRP; (b) блокировать связывание CGRP с его рецептором(ами); (c) блокировать или уменьшать активацию рецептора CGRP (включая, среди прочего, активацию цАМФ); (d) ингибировать биологическую активность CGRP или нижестоящие пути, опосредованные сигнальной функцией CGRP; (e) предотвращать, облегчать или вылечивать любой аспект рефрактерной мигрени; (f) увеличивать клиренс CGRP; и (g) ингибировать (уменьшать) синтез, выработку или высвобождение CGRP. Антитела против CGRP-антагонистов известны в данной области техники. См., например, Tan et al., Clin. Sci. (Lond). 89:565-73, 1995; Sigma (Миссури, США), номер продукта C7113 (клон №4901); Plourde et al., Peptides 14:1225-1229, 1993.

В некоторых вариантах реализации антитело реагирует с CGRP таким образом, который ингибирует CGRP и/или путь CGRP, включая нижестоящие пути, опосредованные сигнальной функцией CGRP. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP распознает CGRP человека. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP связывается как с человеческим α -CGRP, так и с β -CGRP. В некоторых вариантах антагонистическое антитело против CGRP связывает CGRP человека и крысы. В некоторых вариантах антагонистическое антитело против CGRP связывает C-концевой фрагмент, имеющий аминокислоты 25-37 CGRP. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP связывает C-концевой эпитоп в аминокислотах 25-37 CGRP.

Антитела, используемые в настоящем изобретении, могут включать моноклональные антитела, поликлональные антитела, фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc и т.д.), химерные антитела, биспецифичные антитела, гетероконъюгатные антитела, одноцепочечные фрагменты (ScFv), их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела (например, доменное антитело), гуманизированные антитела и любые другие модифицированные конфигурации молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена требуемой специфичности, включая гликозилированные варианты антител, варианты аминокислотной последовательности антител и ковалентно модифицированные антитела. Антитела могут быть мышиного, крысиного, человеческого или любого другого происхождения (включая химерные или гуманизированные антитела).

В некоторых вариантах антагонистическое антитело против CGRP представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В некоторых вариантах реализации антитело является человеческим. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP представляет собой антитело G1 (описанное в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP содержит одну или более CDR (например одну, две, три, четыре, пять или, в некоторых вариантах, все шесть CDR) антитела G1 или вариантов G1, показанных в табл. 6. В других вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, показанную на фиг. 5 (SEQ ID NO: 1), и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, показанную на фиг. 5 (SEQ ID NO: 2). В других вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи полноразмерного антитела, представленную в SEQ ID NO: 11, и аминокислотную последовательность легкой цепи полноразмерного антитела представленную в SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), выбранные из групп, состоящих из: (a) LCVR17 (SEQ ID NO: 58) и HCVR22 (SEQ ID NO: 59); (b) LCVR18 (SEQ ID NO: 60) и HCVR23 (SEQ ID NO: 61); (c) LCVR19 (SEQ ID NO: 62) и HCVR24 (SEQ ID NO: 63); (d) LCVR20 (SEQ ID NO: 64) и HCVR25 (SEQ ID NO: 65); (e) LCVR21 (SEQ ID NO: 66) и HCVR26 (SEQ ID NO: 67); (f) LCVR27 (SEQ ID NO: 68) и HCVR28 (SEQ ID NO: 69); (g) LCVR29 (SEQ ID NO: 70) и HCVR30 (SEQ ID NO: 71); (h) LCVR31 (SEQ ID NO: 72) и HCVR32 (SEQ ID NO: 73); (i) LCVR33 (SEQ ID NO: 74) и HCVR34 (SEQ ID NO: 75); (j) LCVR35 (SEQ ID NO: 76) и HCVR36 (SEQ ID NO: 77); и (k) LCVR37 (SEQ ID NO: 78) и HCVR38 (SEQ ID NO: 79). Последовательности этих областей представлены в данном документе. Другие примеры антител против CGRP описаны в US 20110305711 (SEQ ID NO: 5, 6, 7, 12, 16, 19, 24, 29, 34 и 39), US 20120294802, US 20120294797 (SEQ ID NO: 51-60), которые включены в данный документ в качестве ссылки во всей их полноте. Например, могут быть использованы антитела с любой из следующих последовательностей.

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи Ab6

(гуманизированного) (US20120294797)

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLA
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIK
R (SEQ ID NO:80)

Полноразмерная белковая последовательность легкой цепи Ab6

(гуманизированного) (US20120294797)

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLA
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:81)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи Ab6
(гуманизированного) (US20120294797)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNWVRQAPGKGLEWVGIVING
ATYYASWAKGRFTISRDN SKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGT LTVS
S (SEQ ID NO:82)

Полноразмерная белковая последовательность тяжелой цепи Ab6 -
произведенного дрожжами (US20120294797)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNWVRQAPGKGLEWVGIVING
ATYYASWAKGRFTISRDN SKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGT LTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYASTYRVSVLT VLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:83)

CDR1 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи Ab6
(гуманизированного) (US20120294797)

QASQSVYHNTYLA (SEQ ID NO:84)

CDR2 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи Ab6
(гуманизированного) (US20120294797)

DASTLAS (SEQ ID NO:85)

CDR3 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи Ab6
(гуманизированного) (US20120294797)

LGSYDCTNGDCFV (SEQ ID NO:86)

CDR1 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи Ab6
(гуманизированного) (US20120294797)
GYVMN (SEQ ID NO:87)

CDR2 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи Ab6
(гуманизированного) (US20120294797)
IGINGATYYASWAKG (SEQ ID NO:88)

CDR3 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи Ab6
(гуманизированного) (US20120294797)
GDI (SEQ ID NO:89)

CDR3 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи
(US20110305711)
QQGDALPPT (SEQ ID NO:90)

CDR1 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи
(US20110305711)
RASKDISKYL (SEQ ID NO:91)

CDR2 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи
(US20110305711)
YTSGYSH (SEQ ID NO:92)

CDR1 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи
(US20110305711)
GYTFGNYWMQ (SEQ ID NO:93)

CDR2 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи
(US20110305711)
AIYEGTGKTVYIQKFAD (SEQ ID NO:94)

CDR3 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи
(US20110305711)
 LSDYVSGFGY (SEQ ID NO:95)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи
(US20110305711)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSGYHSG
 VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID
 NO:96)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи
(US20110305711)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
 GTGKTVYIQKFADRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSDYVSGFGYW
 GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:97)

Белковая последовательность легкой цепи (US20110305711)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASKDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSGYHSG
 VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGTKVEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO:98)

Белковая последовательность тяжелой цепи (US20110305711)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
 GTGKTVYIQKFADRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSDYVSGFGYW
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK
 YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSS
 SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSLG (SEQ ID NO:99)

В некоторых вариантах реализации антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая является иммунологически инертной, как описано здесь. В некоторых вариантах реализации константная область модифицирована, как описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; Заявка PCT № PCT/GB99/01441; и/или патентной заявке Великобритании № 9809951.8. В других вариантах реализации антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG2 человека, содержащую следующие мутации: с A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2 дикого типа). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624. В некоторых вариантах реализации антитело содержит константную область IgG4, содержащую следующие мутации: с E233F234L235 на P233V234A235. В других вариантах реализации константная область является агликозилированной в отношении N-связанного гликозилирования. В некоторых вариантах реализации константная область является агликозилированной в отношении N-связанного гликозилирования путем мутации остатка присоединения олигосахарида (такого как Asn297) и/или фланкирующих остатков, которые являются частью последовательности распознавания N-гликозилирования в константной области. В некоторых вариантах реализации константная область является агликозилированной в отношении N-связанного гликозилирования. Константная область может быть агликозилирована в отношении N-связанного гликозилирования ферментативно или путем экспрессии в клетке-хозяине с дефицитом гликозилирования.

Аффинность связывания (K_D) антагонистического антитела против CGRP с CGRP (такой как человеческий α -CGRP) может составлять от приблизительно 0,02 до приблизительно 200 нМ. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания составляет любую из приблизительно 200 нМ, приблизи-

тельно 100 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 60 пМ, приблизительно 50 пМ, приблизительно 20 пМ, приблизительно 15 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 5 пМ или приблизительно 2 пМ. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания составляет менее чем приблизительно 250 нМ, приблизительно 200 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ или приблизительно 50 пМ.

Одним из способов определения аффинности связывания антител с CGRP является измерение аффинности связывания монофункциональных Fab-фрагментов антитела. Чтобы получить монофункциональные Fab-фрагменты, антитело (например, IgG) может быть расщеплено папаином или экспрессировано рекомбинантно. Аффинность Fab-фрагмента антитела против CGRP можно определить с помощью прибора поверхностного плазмонного резонанса (система поверхностного плазмонного резонанса Biacore3000™ (SPR), Biacore, INC, Пискатауэй, Нью-Джерси), снабженного предварительно иммобилизованными сенсорными чипами (SA) со стрептавидином, используя подвижный буфер HBS-EP (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% об./об. ПАВ P20). Биотинилированный человеческий CGRP (или любой другой CGRP) может быть разведен в буфере HBS-EP до концентрации менее 0,5 мкг/мл и инъецирован через отдельные каналы чипа с использованием переменных значений времени контакта, чтобы достичь двух диапазонов плотности антигена; либо 50-200 единиц ответа (RU) для детальных кинетических исследований, либо 800-1000 RU для скрининговых анализов. Исследования регенерации показали, что 25 mM NaOH в этаноле 25% об./об. эффективно удаляют связанный Fab, сохраняя при этом активность CGRP на чипе в течение более 200 инъекций. Как правило, серийные разведения (охватывающие концентрации $0,1-10 \times$ расчетная K_D) очищенных образцов Fab вводят в течение 1 мин со скоростью 100 мкл/мин, и допускаются значения времени диссоциации до 2 ч. Концентрации белков Fab определяют с помощью ИФА и/или электрофореза в ДНС-ПААГ с использованием Fab известной концентрации (по данным аминокислотного анализа) в качестве стандарта. Значения скорости кинетической ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) получают одновременно путем подгонки данных глобально к модели связывания Ленгмюра 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) используя программу B devaluation. Значения равновесной константы диссоциации (K_D) рассчитывают как k_{off}/k_{on} . Этот протокол пригоден для использования при определении аффинности связывания антитела с любым CGRP, включая CGRP человека, CGRP другого млекопитающего (такого как CGRP мыши, CGRP крысы, CGRP приматов), а также различные формы CGRP (такие как α - и β -форма). Аффинность связывания антитела обычно измеряют при 25°C, но также можно измерять при 37°C.

Антитела, в том числе антитела-антагонисты CGRP, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники. Путь и график иммунизации животного-хозяина обычно соответствуют общепринятым и всем известным методам стимуляции и выработки антител, как далее описано в настоящем документе. Общие методики получения антител человека и мыши известны в данной области техники и описаны здесь.

Предполагается, что любым субъектом-млекопитающим, включая человека, или клетками, вырабатывающими антитела, из них, можно манипулировать, используя их в качестве основы для выработки линий клеток гибридомы млекопитающего, включая человека. Как правило, животное-хозяин инокулируют внутрибрюшинно, внутримышечно, перорально, подкожно, внутриплантарно и/или внутрикожно определенным количеством иммуногена, в том числе, как описано здесь.

Антитела (например, антитела-антагонисты CGRP) и полипептиды, полученные из антител, могут быть идентифицированы или охарактеризованы с использованием способов, известных в данной области техники, посредством которых обнаруживается и/или измеряется уменьшение, ослабление или нейтрализация биологической активности CGRP. Например, антагонистическое антитело против CGRP также может быть идентифицировано путем инкубации агента-кандидата с CGRP и мониторинга любой одной или более из следующих характеристик: (a) связывание с CGRP; (b) блокирование связывания CGRP с его рецептором(ми); (c) блокирование или уменьшение активации рецептора CGRP (включая активацию цАМФ); (d) ингибирование биологической активности CGRP или нижестоящих путей, опосредованные сигнальной функцией CGRP; (e) предотвращение, ослабление или лечение любого аспекта рефрактерной мигрени; (f) увеличение клиренса CGRP; и (g) ингибирование (уменьшение) синтеза, выработки или высвобождения CGRP. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP или полипептид идентифицируют путем инкубации агента-кандидата с CGRP и мониторинга связывания и/или сопутствующего снижения или нейтрализации биологической активности CGRP. Анализ связывания может быть выполнен с очищенным полипептидом(ами) CGRP или с клетками, естественным образом экспрессирующими или трансфицированными для экспрессии полипептида(ов) CGRP. В одном варианте реализации анализ связывания представляет собой анализ конкурентного связывания, в котором оценивают способность антитела-кандидата конкурировать с известным антагонистом CGRP за связывание CGRP. Анализ может быть выполнен в различных форматах, включая формат ИФА. В других вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP идентифицируют путем инкубации агента-кандидата с CGRP и мониторинга связывания и сопутствующего ингибирования активации рецептора

CGRP, экспрессируемого на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации антитело против рецептора CGRP можно использовать в любом из способов, описанных здесь. Например, могут быть использованы антитела против рецептора CGRP, как описано в US 20100172895 и патенте США № 9102731, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей их полноте. Таким образом, можно использовать антитела с любой из следующих последовательностей.

CDR1 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи (Патент

США № 9102731)

SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:100)

CDR2 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи (Патент

США № 9102731)

DNNKRPS (SEQ ID NO:101)

CDR3 белковой последовательности вариабельной области легкой цепи (Патент

США № 9102731)

GTWDSRLSAVV (SEQ ID NO:102)

CDR1 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи

(Патент США № 9102731)

SFGMH (SEQ ID NO:103)

CDR2 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи
(Патент США № 9102731)
 VISFDGSIKYSVDSVKG (SEQ ID NO:104)

CDR3 белковой последовательности вариабельной области тяжелой цепи
(Патент США № 9102731)
 DRLNYYDSSGYHYKYYGMAV (SEQ ID NO:105)

Белковая последовательность вариабельной области легкой цепи (Патент США
№ 9102731)
 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP
 SGIPDRFSGSKSGTSTTLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSAVVFGGGKLTVL
 (SEQ ID NO:106)

Белковая последовательность вариабельной области тяжелой цепи (Патент
США № 9102731)
 QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSFGMHVVRQAPGKGLEWVAVISFD
 GSIKYSVDSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLNYYDSSGY
 HYKYYGMAVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:107)

Белковая последовательность легкой цепи (Патент США № 9102731)
 MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY
 VSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSTTLGITGLQTGDEADYYC
 GTWDSRLSAVVFGGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP
 GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV
 THEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:108)

Белковая последовательность тяжелой цепи (Патент США № 9102731)
 MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSF
 GMHVVRQAPGKGLEWVAVISFDGSIKYSVDSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLR
 AEDTAVYYCARDRLNYYDSSGYHYKYYGMAVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL
 APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
 TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:109)

После первоначальной идентификации активность антитела-кандидата (например, антагонистического антитела против CGRP) может быть дополнительно подтверждена и уточнена с помощью биоанализов, известных для тестирования целевых видов биологической активности. В качестве альтернативы, биологические тесты могут быть использованы для непосредственного отбора кандидатов. Некоторые из способов идентификации и характеристики антагонистического антитела против CGRP или полипептида подробно описаны в нижеследующих примерах.

Антитела, включая антитела-антагонисты CGRP, могут быть охарактеризованы с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Например, один способ состоит в том, чтобы идентифицировать эпитоп, с которым оно связывается, или "картирование эпитопа". В данной области техники известно много способов для картирования и характеристики расположения эпитопов на белках, включая определение кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, конкурентные анализы, анализы экспрессии фрагментов генов и анализы с использованием синтетических пептидов, как описано, например, в главе 11 справочника Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999.

Еще один способ, который можно использовать для характеристики антител, включая антагонистическое антитело против CGRP, заключается в использовании конкурентных анализов с другими антителами, о которых известно, что они связываются с тем же антигеном, то есть с различными фрагментами на CGRP, чтобы определить, связывается ли данное антагонистическое антитело против CGRP с тем же эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в данной области техники.

С. Антитело G1 и родственные антитела, полипептиды, полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева.

Данное изобретение охватывает композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие антитело G1 и его варианты, показанные в табл. 6, или полипептид, полученный из антитела G1, и его варианты, показанные в табл. 6; и полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие G1 и его варианты или полипептид. В некоторых вариантах реализации композиции содержат одно или более антител или полипептидов (которые могут быть или не быть антителами), которые связываются с CGRP, и/или один или более полинуклеотидов, содержащих последовательности, кодирующие одно или более антител или полипептидов, которые связываются с CGRP. Эти композиции могут дополнительно содержать подходящие вспомогательные вещества, например фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, включая буферы, которые хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации антитела-антагонисты CGRP и полипептиды по изобретению характеризуются любой (одной или более) из следующих характеристик: (a) связываются с CGRP; (b) блокируют связывание CGRP с его рецептором(ми); (c) блокируют или уменьшают активацию рецептора CGRP (включая активацию цАМФ); (d) ингибируют биологическую активность CGRP или нижестоящие пути, опосредованные сигнальной функцией CGRP; (e) предотвращают, облегчают или лечат любой аспект рефрактерной мигрени; (f) увеличивают клиренс CGRP; и (g) ингибируют (уменьшают) синтез, выработку или высвобождение CGRP.

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к любому из следующего или к композициям (включая фармацевтические композиции), содержащим любое из следующего: (a) антитело G1 или его варианты, показанные в табл. 6; (b) фрагмент или область антитела G1 или его варианты, показанные в табл. 6; (c) легкая цепь антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6; (d) тяжелая цепь антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6; (e) одну или более вариабельных областей из легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6; (f) одна или более CDR (одна, две, три, четыре, пять или шесть CDR) антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6; (g) H3 CDR из тяжелой цепи антитела G1; (h) L3 CDR из легкой цепи антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6; (i) три CDR из легкой цепи антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6; (j) три CDR из тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6; (k) три CDR из легкой цепи и три CDR из тяжелой цепи антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6; и (l) антитело, содержащее любое из (b)-(k). В некоторых вариантах реализации изобретение также относится к полипептидам, содержащим любое одно или более из вышеуказанных.

Части CDR антитела G1 (включая CDR по Chothia и Kabat) схематически изображены на фиг. 5. Определение областей CDR хорошо известно специалистам в данной области техники. При этом подразумевается, что в некоторых вариантах реализации CDR могут представлять собой комбинацию CDR по Kabat и Chothia (также называемые "комбинированные CDR" или "расширенные CDR"). В некоторых вариантах реализации CDR представляют собой CDR по Kabat. В других вариантах реализации CDR представляют собой CDR Chothia. Другими словами, в вариантах реализации с более чем одним CDR, такие CDR могут быть любыми из CDR по Kabat, CDR по Chothia, комбинированных CDR или их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к полипептиду (который может быть или не быть антителом), который включает по меньшей мере одну CDR, по меньшей мере две, по меньшей мере три, или, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или все шесть CDR, которые по существу идентичны по меньшей мере одной CDR, по меньшей мере двум, по меньшей мере трем, по меньшей мере четырем, по меньшей мере пяти или всем шести CDR антитела G1 или его вариантов, показанным в табл. 6. Другие варианты реализации включают антитела, которые имеют по меньшей мере две, три, четыре, пять или шесть CDR, которые по существу идентичны по меньшей мере двум, трем, четырем, пяти или шести CDR антитела G1 или получены из G1. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна, две, три, четыре, пять или шесть CDR идентичны по меньшей мере приблизительно на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по меньшей мере одной, двум, трем, четырем, пяти или шести CDR антитела G1 или его вариантов, показанным в табл. 6. При этом подразумевается, что для целей данного изобретения специфичность и/или общая активность связывания обычно сохраняется, хотя степень активности может варьироваться по сравнению с G1 или его вариантами, показанными в табл. 6 (может быть больше или меньше).

В некоторых вариантах реализации изобретение также относится к полипептиду (который может быть или не быть антителом), который содержит аминокислотную последовательность G1 или его вариантов, показанных в табл. 6, который имеет любое из следующего: по меньшей мере 5 смежных аминокислот, по меньшей мере 8 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 10 смежных аминокислот,

кислот, по меньшей мере приблизительно 15 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 20 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 25 смежных аминокислот, по меньшей мере приблизительно 30 смежных аминокислот последовательности G1 или его вариантов, показанных в табл. 6, причем по меньшей мере 3 аминокислоты происходят из вариабельной области G1 (фиг. 5), или ее вариантов, показанных в табл. 6. В одном варианте вариабельная область происходит из легкой цепи G1. В другом варианте реализации вариабельная область происходит из тяжелой цепи G1. Иллюстративный полипептид имеет смежные аминокислоты (длины описаны выше) из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей G1. В другом варианте реализации 5 (или более) смежных аминокислот происходят из определяющей комплементарности области (CDR) антитела G1, показанной на фиг. 5. В некоторых вариантах реализации смежные аминокислоты происходят из вариабельной области G1.

Аффинность связывания (K_D) антагонистического антитела против CGRP и полипептида с CGRP (например, α -CGRP человека) может составлять от приблизительно 0,06 до приблизительно 200 нМ. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания составляет приблизительно 200 нМ, 100 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 60 пМ, приблизительно 50 пМ, приблизительно 20 пМ, приблизительно 15 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 5 пМ или приблизительно 2 пМ. В некоторых вариантах реализации аффинность связывания составляет менее приблизительно 250 нМ, приблизительно 200 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ или приблизительно 50 пМ.

Антитела, предложенные в настоящем документе, могут быть получены с помощью процедур, известных в данной области техники. Полипептиды могут быть получены с помощью протеолитической или другой дегградации антител, рекомбинантными способами (то есть простые или слитые полипептиды), как описано выше, или с помощью химического синтеза. Полипептиды антител, особенно более короткие полипептиды, вплоть до приблизительно 50 аминокислот, удобно получать химическим синтезом. Способы химического синтеза известны в данной области техники и являются коммерчески доступными. Например, антитело может быть получено с помощью автоматического синтезатора полипептидов с использованием твердофазного метода. См. также патенты США № 5807715; 4816567; и 6331415.

В другой альтернативе антитела могут быть получены рекомбинантно с использованием процедур, которые хорошо известны в данной области техники. В одном варианте реализации полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела G1, представленные в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. В другом варианте реализации полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, клонируют в один или более векторов для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая рассматриваемое антитело, может сохраняться в векторе в клетке-хозяине, а затем клетка-хозяин может быть размножена и заморожена для будущего использования. Векторы (включая экспрессионные векторы) и клетки-хозяева далее описаны в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации изобретение также охватывает одноцепочечные фрагменты вариабельной области ("scFv") антител этого изобретения, таких как G1. Одноцепочечные фрагменты вариабельной области получают путем связывания вариабельных областей легкой и/или тяжелой цепи с использованием короткого связывающего пептида. Bird et al. (1988) Science 242: 423-426. Примером связывающего пептида является (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 57), который соединяет приблизительно 3,5 нм между карбокси-концом одной вариабельной области и амино-концом другой вариабельной области. Были разработаны и использованы линкеры и других последовательностей (Bird et al. (1988)). В свою очередь, линкеры могут быть модифицированы для дополнительных функций, таких как прикрепление лекарственных средств или прикрепление к твердым носителям. Одноцепочечные варианты цепью могут быть получены либо рекомбинантным, либо синтетическим путем. Для синтетического получения scFv можно использовать автоматический синтезатор. Для рекомбинантного получения scFv подходящая плазмида, содержащая полинуклеотид, который кодирует scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяина, либо эукариотическую, такую как клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, либо прокариотическую, такую как E.coli. Полинуклеотиды, кодирующие scFv, могут быть получены обычными манипуляциями, такими как лигирование полинуклеотидов. Полученный scFv может быть выделен с использованием стандартных способов очистки белка, известных в данной области техники.

Сюда также включены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой двухвалентные, биспецифичные антитела, в которых домены V_H и V_L экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который слишком короток, чтобы допустить спаривание между двумя доменами в одной цепи, тем самым вынуждая домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавая два сайта связывания антигена (см., например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Например, с использованием антител, раскрытых в данном документе, могут быть получены биспецифичные антитела, моноклональные антитела, которые имеют специфичность связывания по меньшей мере с двумя разными антигенами. Способы получения биспецифичных антител известны в данной об-

ласти техники (см., например, Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121: 210). Традиционно рекомбинантная выработка биспецифических антител основывалась на совместной экспрессии двух пар тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, причем две тяжелые цепи имели различную специфичность (Millstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

Согласно одному из подходов к получению биспецифических антител переменные домены антител с желаемой специфичностью связывания (сайты объединения антитело-антиген) сливаются с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Такое слияние предпочтительно происходит с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающим по меньшей мере часть шарнирных областей, областей CH2 и CH3.

Предпочтительно, чтобы первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствовала по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, при желании, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессионные уровни и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в регулировании взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в вариантах реализации, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в этой конструкции, обеспечивают оптимальный выход антител. Однако возможно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессионный вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам антител или когда их соотношения не имеют особого значения.

В одном из подходов биспецифические антитела состоят из тяжелой цепи гибридного иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и парой тяжелой цепи-легкой цепи гибридного иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другом плече. Эта асимметричная структура с легкой цепью иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы способствует отделению желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина. Этот подход описан в публикации РСТ № WO 94/04690.

В объем изобретения также входят гетероконъюгатные антитела, содержащие два ковалентно связанных антитела. Такие антитела были использованы для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (публикация заявки РСТ № WO 91/00360 и WO 92/200373; EP 03089). Гетероконъюгатные антитела могут быть получены с использованием любых удобных способов перекрестного сшивания. Подходящие сшивающие агенты и методики хорошо известны в данной области техники и описаны в патенте США № 4676980.

Химерные или гибридные антитела могут быть также получены *in vitro* с использованием известных методов химии синтетических белков, в том числе с использованием сшивающих агентов. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с использованием реакции дисульфидного обмена или путем образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для этой цели включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

Гуманизированное антитело, содержащее одну или более CDR антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6, или одну или более CDR, полученных из антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6, можно получить с использованием любых способов, известных в данной области техники. Например, для гуманизации моноклонального антитела могут быть использованы четыре основных этапа.

В некоторых вариантах реализации изобретение охватывает модификации антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6, включая функционально эквивалентные антитела, которые не оказывают значительного влияния на их свойства, и варианты, которые обладают повышенной или пониженной активностью и/или аффинностью. Например, аминокислотная последовательность антитела G1 или его вариантов, показанных в табл. 6, может быть мутирована для получения антитела с желаемой аффинностью связывания с CGRP. Модификация полипептидов является обычной практикой в данной области техники и не нуждается в подробном описании в данном документе. Модификация полипептидов подробнее описана в примерах. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одной или более делециями или добавлениями аминокислот, которые не оказывают значительного вредного воздействия на функциональную активность, или использованием химических аналогов.

Вставки аминокислотной последовательности включают аминокислотные и/или карбоксильно-концевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также внутрипоследовательные вставки одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком или антитело, слитое с эпитопной меткой. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние с N- или C-концом антитела какого-то фермента или полипептида, которое увеличивает время полужизни антитела в сыворотке.

В вариантах с заменой по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела удален, а другой остаток вставлен на его место. Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также рассматриваются изменения FR. Консервативные замены показаны в табл. 1 под заголовком "консервативные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то могут быть внесены более существенные измене-

ния, обозначенные как "иллюстративные замены" в табл. 1, или, как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и полученные продукты будут подвергнуты скринингу.

Таблица 1. Аминокислотные замены

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

Существенные модификации в биологических свойствах антитела достигаются путем выбора замен, которые значительно различаются по своему воздействию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы на целевом сайте, или (с) объема боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки делятся на группы, исходя из общих свойств боковых цепей:

- (1) неполярные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) полярные без заряда: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные (отрицательно заряженные): Asp, Glu;
- (4) основные (положительно заряженные): Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe, His.

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

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной конформации антитела, также может быть заменен, как правило, серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения аберрантного сшивания. И наоборот, цистеиновую связь(и) можно добавлять к антителу для улучшения его стабильности, особенно когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv.

Модификации аминокислот могут варьироваться от замены или модификации одной или нескольких аминокислот до полной реорганизации области, такой как вариабельная область. Изменения в вариабельной области могут изменить аффинность связывания и/или специфичность. В некоторых вариантах реализации не более чем от одной до пяти консервативных аминокислотных замен выполняют в домене CDR. В других вариантах реализации в домене CDR проводят не более одной-трех консервативных аминокислотных замен. В других вариантах реализации домен CDR представляет собой CDR H3 и/или CDR L3.

Модификации также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также

полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование различными сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Антитела гликозилированы в консервативных положениях в их константных областях (Jefferis and Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функцию белка (Boyd et al., 1996, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, *Biochem.* 29:4175-4180) и внутримолекулярное взаимодействие между частями гликопротеина, что может влиять на конформацию и представленную трехмерную поверхность гликопротеина (Jefferis and Lund, *supra*; Wyss and Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Олигосахариды также могут служить для нацеливания данного гликопротеина на определенные молекулы на основании специфических структур распознавания. Также сообщалось, что гликозилирование антител влияет на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В частности, сообщалось, что клетки CHO с регулируемой тетрациклином экспрессией $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), гликозилтрансферазы, катализирующей образование бисектирующего GlcNAc, обладают улучшенной активностью ADCC (Umana et al., 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180).

Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. Термин "N-связанное" относится к присоединению углеводной части к боковой цепи остатка аспарагина. Последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина являются трипептидные последовательности аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин и аспарагин-X-цистеин, где X - любая аминокислота, кроме пролина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. "O-связанное гликозилирование" относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикамнокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также может быть осуществлено путем добавления или замены одним или несколькими остатками серина или треонина к последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

Другие способы модификации включают использование способов связывания, известных в данной области техники, включая, среди прочего, ферментативные средства, окислительное замещение и хелатирование. Модификации могут быть использованы, например, для прикрепления меток для иммуноанализа. Модифицированные полипептиды G1 могут быть получены с использованием установленных процедур в данной области техники и могут быть подвергнуты скринингу с использованием стандартных анализов, известных в данной области техники, некоторые из которых описаны ниже и в примерах.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая иммунологически инертна или частично инертна, например, не запускает опосредованный комплементом лизис, не стимулирует антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), или не активирует микроглию; или имеет пониженную активность (по сравнению с немодифицированным антителом) в любом одном или более из следующего: стимуляция опосредованного комплементом лизиса, стимуляция антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) или активация микроглии. Для достижения оптимального уровня и/или комбинации эффекторных функций могут использоваться различные модификации константной области. См. например, Morgan et al., *Immunology* 86:319-324 (1995); Lund et al., *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969 (1996); Idusogie et al., *J. Immunology* 164:4178-4184 (2000); Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); и Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). В некоторых вариантах реализации константную область модифицируют, как описано в *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; Заявке РСТ № РСТ/GB99/01441; и/или патентной заявке Великобритании № 9809951.8. В других вариантах реализации антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG2 человека, содержащую следующие мутации: с A330P331 на S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2 дикого типа). *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624. В других вариантах реализации константная область является агликозилированной для N-связанного гликозилирования. В некоторых вариантах реализации константная область агликозилирована для N-связанного гликозилирования путем мутации гликозилированного аминокислотного остатка или фланкирующих остатков, которые являются частью последовательности распознавания N-гликозилирования в константной области. Например, сайт N-гликозилирования N297 может быть мутирован в A, Q, K или H. См., Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); и Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). В некоторых вариантах реализации константная область является агликозилированной для N-связанного гликозилирования. Константная область может быть агликозилирована для N-связанного гликозилирования ферментативно (например удалением углеводов ферментом ПНГазой) или путем экспрессии в клетке-хозяине с дефицитом гликозилирования.

Другие модификации антител включают антитела, которые были модифицированы, как описано в публикации РСТ № WO 99/58572, опубликованной 18 ноября 1999 г. Эти антитела содержат, помимо

домена связывания, нацеленного на молекулу-мишень, эффекторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, по существу, гомологичную всей или части константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Эти антитела способны связывать молекулу-мишень без значительного зависящего от комплемента лизиса, или клеточно-опосредованного разрушения мишени. В некоторых вариантах реализации эффекторный домен способен специфически связывать FcRn и/или FcγRIIb. Как правило, эти рецепторы основаны на химерных доменах, полученных из двух или более CH2-доменов тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина. Антитела, модифицированные таким образом, особенно подходят для использования в хронической терапии антителами, чтобы избежать воспалительных и других нежелательных реакций на обычную терапию антителами.

В некоторых вариантах реализации изобретение включает в себя варианты антитела со зрелой аффинностью. Например, антитела со зрелой аффинностью могут быть получены с помощью процедур, известных в данной области техники (Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783; Barbas et al., 1994, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813; Schier et al., 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.*, 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9; Hawkins et al., 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896; и WO 2004/058184).

В некоторых вариантах реализации изобретение также охватывает слитые белки, содержащие один или более фрагментов или областей из антител (таких как G1) или полипептидов по настоящему изобретению. В одном варианте реализации предусмотрен слитый полипептид, который содержит по меньшей мере 10 смежных аминокислот вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2 (фиг. 5), и/или по меньшей мере 10 аминокислот вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1 (фиг. 5). В других вариантах реализации предусмотрен слитый полипептид, который содержит по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25 или, по меньшей мере приблизительно 30 смежных аминокислот вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2 (фиг. 5) и/или по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 15, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 25 или по меньшей мере приблизительно 30 смежных аминокислот вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1 (фиг. 5). В другом варианте реализации такой слитый полипептид содержит вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи G1, как показано в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 1 на фиг. 5. В другом варианте реализации слитый полипептид содержит один или более CDR из G1. В других вариантах реализации слитый полипептид содержит CDR H3 и/или CDR L3 антитела G1. Для целей данного изобретения слитый белок G1 содержит одно или более антител G1 и другую аминокислотную последовательность, к которой он не присоединен в нативной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другой области. Иллюстративные гетерологичные последовательности включают, среди прочего, "метку", такую как метка FLAG или метка 6His (SEQ ID NO: 56). Метки хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретение также относится к композициям (включая фармацевтические композиции) и наборам, содержащим антитело G1 и/или любое или все антитела или полипептиды, описанные здесь.

Предпочтительно, "процент идентичности последовательности" определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения величиной по меньшей мере 20 положений, причем часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (то есть гэпы) 20% или менее, обычно от 5 до 15% или от 10 до 12%, по сравнению с контрольными последовательностями (которые не содержат добавления или удаления) для оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Этот процент рассчитывается путем определения количества положений, в которых идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях, что дает число совпадающих положений, с последующим делением числа совпадающих положений на общее количество положений в контрольной последовательности (т.е. размер окна) и умножением результатов на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности.

Варианты могут также или альтернативно быть по существу гомологичными нативному гену или его части или комплементу. Такие полинуклеотидные варианты способны гибридизоваться в умеренно строгих условиях с природной последовательностью ДНК, кодирующей нативное антитело (или комплементарную последовательность).

D. Композиции.

В некоторых вариантах реализации композиции, используемые в способе по изобретению, содержат эффективное количество антитела (например, антагонистического антитела против CGRP, моноклонального антитела, которое модулирует путь CGRP) или полипептида, полученного из антитела, описанного здесь. Примеры таких композиций, а также способы их приготовления также описаны в предыдущем разделе и ниже. В одном варианте реализации композиция дополнительно содержит антагонист CGRP. В некоторых вариантах реализации композиция содержит одно или более моноклональных антител, которые модулируют путь CGRP. В некоторых вариантах композиция содержит одно или более ан-

тител-антагонистов CGRP. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP распознает CGRP человека. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP является гуманизированным. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP содержит константную область, которая не запускает нежелательный или нежелательный иммунный ответ, такой как антитело-опосредованный лизис или ADCC. В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP содержит одну или более CDR антитела G1 (например, одну, две, три, четыре, пять или, в некоторых вариантах реализации, все шесть CDR из G1). В некоторых вариантах реализации антагонистическое антитело против CGRP является человеческим.

При этом подразумевается, что композиции могут содержать более одного антитела (например, более одного антагонистического антитела против CGRP - смесь антител-антагонистов CGRP, которые распознают различные эпитопы CGRP). Другие иллюстративные композиции содержат более одного антагонистического антитела против CGRP, которые распознают один и тот же эпитоп(ы), или разные виды антител-антагонистов CGRP, которые связываются с различными эпитопами CGRP.

Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K.E. Hoover). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях. Терапевтический состав антитела может содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или стабилизаторов с неограничивающими примерами таких разновидностей, которые включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметоний хлорид; бензалконий хлорид, бензетоний хлорид; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3 пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты (например, в концентрациях от 0,1 до 100 мМ, от 0,1 до 1 мМ, от 0,01 до 50 мМ, от 1 до 50 мМ, от 1 до 30 мМ, от 1 до 20 мМ, от 10 до 25 мМ), такие как глицин, глутамин, метионин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты (например, в концентрациях от 0,001 до 1 мг/мл, от 0,001 до 1 мг/мл, от 0,001 до 0,1 мг/мл, от 0,001 до 0,01 мг/мл), такие как ЭДТА (например, дигидрат динатриевой соли ЭДТА); сахара (например, в концентрациях от 1 мг/мл до 500 мг/мл, от 10 мг/мл до 200 мг/мл, от 10 мг/мл до 100 мг/мл, от 50 мг/мл до 150 мг/мл), такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества (например, в концентрациях от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,01 до 1 мг/мл, от 0,1 до 1 мг/мл, от 0,01 до 0,5 мг/мл/мл), такой как TWEEN™ (например, полисорбат (например, полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80)), PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества описаны далее в настоящем документе.

Антитело (например, антагонистическое антитело против CGRP) и его композиции также можно использовать в сочетании с другими агентами, которые служат для усиления и/или дополнения эффективности агентов.

Е. Наборы.

В одном аспекте изобретение также относится к наборам для использования в настоящих способах. Наборы могут включать один или более контейнеров, содержащих антитело, описанное в данном документе (например, антагонистическое антитело против CGRP (такое как гуманизированное антитело)), или полипептид, описанные в данном документе, и инструкции по применению в соответствии с любым из способов, описанных в настоящем документе. Как правило, эти инструкции содержат описание введения антитела для лечения, улучшения или предотвращения рефрактерной мигрени в соответствии с любым из способов, описанных в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать описание отбора индивидуумов, подходящих для лечения, исходя из определения того, имеется ли у этого индивидуума рефрактерная мигрень, или существует ли риск развития рефрактерной мигрени у этого индивидуума. В других вариантах реализации инструкции содержат описание введения антитела (например, антагонистического антитела против CGRP) индивидууму с риском развития рефрактерной мигрени.

В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах реализации антитело является человеческим. В других вариантах реализации антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации антитело содержит одну или более CDR антитела G1 (например, одну, две, три, четыре, пять или, в некоторых вариантах реализации, все шесть CDR из G1).

Инструкции, относящиеся к применению антитела (например, антагонистического антитела против CGRP), обычно включают информацию о дозировке, схеме дозирования и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой единичные дозы, многодозовые упаковки или

субъединичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, лист бумаги, включенный в набор), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции, хранящиеся на магнитном или оптическом диске для хранения).

Такая этикетка или вкладыш в упаковку указывает, что данная композиция используется для лечения, уменьшения интенсивности и/или предотвращения мигрени у субъекта с рефрактерной мигренью. Инструкции могут быть предоставлены для реализации любого из способов, описанных здесь.

Наборы по настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, среди прочего, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные пакеты из майлара или пластика) и тому подобное. Также рассматриваются упаковки для использования в сочетании со специальным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или инфузионное устройство, такое как мининасос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Контейнер также может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере, один активный агент в композиции представляет собой антагонистическое антитело против CGRP и/или моноклональное антитело, которое модулирует путь CGRP. Контейнер может дополнительно содержать второй фармацевтически активный агент.

Наборы могут дополнительно содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и разъясняющую информацию. Как правило, набор включает контейнер и этикетку или вкладыш(и) упаковки на контейнере или связанные с контейнером.

Дополнительные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения изложены в следующих пронумерованных пунктах.

1. Способ лечения рефрактерной мигрени у субъекта, включающий: выбор субъекта, который не отвечает положительно на профилактическое лечение мигрени средством, выбранным из группы, состоящей из топирамата, карбамазепина, дивалпрокса натрия, вальпроата натрия, вальпроевой кислоты, флунаризина, кандесартана, пизотифена, амитриптилина, венлафаксина, нортриптилина, дулоксетина, атенолола, надолола, метопролола, пропранолола, биопропола, тимолола и онаботулинумтоксина А; и введение субъекту терапевтически эффективного количества моноклонального антитела, которое модулирует путь пептида, связанного с геном кальцитонина, (CGRP).

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что субъект не отвечает положительно на лечение мигрени после приблизительно трех месяцев и/или у него развиваются нежелательные побочные эффекты.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят субъекту внутривенно или подкожно.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в дозе приблизительно 675 мг.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в дозе приблизительно 225 мг в виде трех отдельных инъекций.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в дозе приблизительно 675 мг с последующими дозами приблизительно 225 мг с интервалами в один месяц.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в дозе приблизительно 675 мг с пятью последующими дозами приблизительно 225 мг с интервалами в один месяц.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение включает введение указанного антитела субъекту из предварительно заполненного шприца, предварительно заполненного шприца с предохранительным устройством для иглы, шприца-ручки или автоматического устройства для инъекций, содержащих дозу моноклонального антитела.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в виде состава, содержащего антитело в концентрации по меньшей мере приблизительно 150 мг/мл.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело представляет собой антагонистическое антитело против CGRP.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что моноклональное антитело является человеческим или гуманизированным.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антагонистическое антитело против CGRP.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело содержит CDR H1, представленную в SEQ ID NO: 3; CDR H2, представленную в SEQ ID NO: 4; CDR H3, представленную в SEQ ID NO: 5; CDR L1, представленную в SEQ ID NO: 6; CDR L2, представленную в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, представленную в SEQ ID NO: 8.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело представляет собой

антитело типа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что субъектом является человек.

17. Способ по п.1, включающий введение субъекту второго агента одновременно или последовательно с указанным моноклональным антителом, причем второй агент представляет собой препарат для лечения острой головной боли.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что после введения указанного моноклонального антитела ежемесячное использование второго агента субъектом уменьшается по меньшей мере на 15%.

19. Композиция для применения согласно любому из предшествующих пунктов.

Следующие примеры приведены для иллюстрации, но не для ограничения изобретения. При этом подразумевается, что примеры и варианты реализации, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в соответствии с этим будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и сферу применения данной заявки. Все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные в данном документе, настоящим включены посредством ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Получение и характеристика моноклональных антител, направленных против CGRP.

Получение антител против CGRP.

Для создания антител против CGRP, которые обладают межвидовой реактивностью к CGRP крысы и человека, мышей иммунизировали 25-100 мкг человеческого α -CGRP или β -CGRP, конъюгированного с KLH (гемоцианин лимфы улитки) в адьюванте (50 мкл на подушечку стопы, всего 100 мкл на мышью) с различными интервалами. Иммунизацию обычно проводили, как описано в Geerligs HJ et al., 1989, J. Immunol. Methods 124:95-102; Kenney JS et al., 1989, J. Immunol. Methods 121:157-166; и Wicher K et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:128-135. Мышей сначала иммунизировали 50 мкг человеческого α -CGRP или β -CGRP, конъюгированного с KLH в CFA (полный адьювант Фрейнда). Через 21 день мышью вторично иммунизировали 25 мкг человеческого β -CGRP (для мышью, вначале иммунизированных человеческим α -CGRP) или α -CGRP (для мышью, вначале иммунизированных человеческим β -CGRP), конъюгированных с KLH в IFA (неполный адьювант Фрейнда). Через двадцать три дня после второй иммунизации была выполнена третья иммунизация 25 мкг крысиного α -CGRP, конъюгированного с KLH в IFA. Через десять дней титры антител были протестированы с помощью ИФА. Четвертую иммунизацию проводили 25 мкг пептида (крысиный α -CGRP-KLH) в IFA через 34 дня после третьей иммунизации. Финальный бустер проводили введением 100 мкг растворимого пептида (крысиный α -CGRP) через 32 дня после четвертой иммунизации.

Спленоциты получали от иммунизированной мыши и сливали с клетками миеломы NSO в соотношении 10:1 с полиэтиленгликолем 1500. Гибриды высевали в 96-луночные планшеты в среде DMEM, содержащей 20% лошадиной сыворотки и 2-оксалоацетата/пирувата/инсулина (Sigma) и начинали отбор в среде с гипоксантин-аминоптерин-тимидином. На 8 день во все лунки добавляли 100 мкл DMEM, содержащей 20% лошадиной сыворотки. Супернатанты гибридов подвергали скринингу с использованием иммуноанализа с захватом антител. Определение класса антител выполняли с помощью вторичных антител, специфичных для данного класса.

Панель из линий клеток, вырабатывающих моноклональные антитела, отбирали для дальнейшей характеристики исходя из их связывания с CGRP человека и крысы. Эти антитела и характеристики приведены ниже в табл. 2 и 3.

Очистка и получение Fab-фрагмента.

Моноклональные антитела, отобранные для дальнейшей характеристики, очищали от супернатантов гибридомных культур с использованием аффинной хроматографии с белком А. Супернатанты уравнивали до pH 8. Затем супернатанты загружали в колонку MabSelect с белком А (Amersham Biosciences № 17-5199-02), уравнированную PBS до pH 8. Колонку промывали PBS pH 8 в количестве, равном 5 объемам колонки. Антитела элюировали 50 mM цитрат-фосфатного буфера, pH 3. Элюированные антитела нейтрализовали 1 M фосфатного буфера, pH 8. Очищенные антитела диализовали с помощью PBS, pH 7,4. Концентрации антител определяли с помощью электрофореза ДНС-ПААГ, используя стандартную кривую мышинового моноклонального антитела.

Фрагменты Fab получали путем протеолиза полных антител папаином с использованием набора Immunopure Fab (Pierce № 44885) и очищали с помощью проточной хроматографии на белке А, следуя инструкциям производителя. Концентрации определяли с помощью ИФА и/или электрофореза в ДНС-ПААГ, используя стандартный Fab известной концентрации (определяемый аминокислотным анализом), и A280, используя значение 1OD (оптическая плотность)=0,6 мг/мл (или теоретический эквивалент, с учетом аминокислотной последовательности).

Определение аффинности Fab.

Аффинность моноклональных антител против CGRP определяли при 25 или 37°C с использованием

системы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Biacore3000™, Biacore, INC, Пискатауэй, Нью-Джерси) с собственным подвижным буфером производителя, HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% об./об. полисорбата P20). Аффинность определяли путем захвата N-концевых биотинилированных пептидов CGRP (произведенных по индивидуальному заказу GenScript Corporation, Нью-Джерси, или Global Peptide Services, Колорадо) через предварительно иммобилизованный стрептавидин на чипе SA и измерения кинетики связывания антитела Fab, титруемого по поверхности CGRP. Биотинилированный CGRP разводили в HBS-EP и инъецировали по поверхности чипа в концентрации менее 0,001 мг/мл. Используя переменное время протекания через отдельные каналы чипа, были получены два диапазона плотности антигена: <50 единиц ответа (RU) для детальных кинетических исследований и приблизительно 800 RU для исследований концентрации и скрининга. Двух- или трехкратные серийные разведения, как правило, при концентрациях от 1 мкМ до 0,1 нМ (с расчетом на 0,1-10 × предполагаемую K_D) очищенных фрагментов Fab вводили в течение 1 минуты со скоростью 100 мкл/мин, а время диссоциации составляло 10 минут. После каждого цикла связывания поверхности регенерировали с помощью 25 mM NaOH в этаноле 25% об./об., что допускалось в течение нескольких сотен циклов. Скорость кинетической ассоциации (k_{on}) и скорость диссоциации (k_{off}) получали одновременно путем подгонки данных к модели связывания Ленгмюра 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) с использованием программы BIAevaluation. Глобальные константы диссоциации равновесия (K_d) или "аффинность" рассчитывали из отношения $K_D = k_{off}/k_{on}$. Аффинность Fab-фрагментов мыши показана в табл. 2 и 3.

Эпитопное картирование мышиных антител против CGRP. Для определения эпитопа, который антитела против CGRP связывают с α -CGRP человека, аффинности связывания Fab-фрагментов с различными CGRP-фрагментами измеряли, как описано выше, путем захвата N-концевых биотинилированных CGRP-фрагментов, аминокислот 19-37 и аминокислот 25-37 на чипе датчика SA. Фиг. 1 показывает их аффинность связывания, измеренную при 25°C. Как показано на фиг. 1, все антитела, за исключением антитела 4901, связываются с фрагментами α -CGRP человека 19-37 и 25-37 с аффинностью, близкой к их аффинности связывания с полноразмерным человеческим α -CGRP (1-37). Антитело 4901 связывается с фрагментом α -CGRP человека 25-37 с аффинностью, в шесть раз меньшей, чем связывание с полноразмерным фрагментом α -CGRP человека, главным образом из-за потери скорости диссоциации. Эти данные показывают, что эти антитела против CGRP как правило связываются с С-терминальным концом CGRP.

Для дальнейшей характеристики аминокислот в человеческом α -CGRP, участвующих в связывании антител против CGRP, было выполнено аланиновое сканирование. Различные варианты человеческого α -CGRP с единичными аланиновыми заменами получали путем пептидного синтеза. Их аминокислотные последовательности показаны в табл. 4 вместе со всеми другими пептидами, использованными в анализе Biacore. Аффинность Fab-фрагментов антител против CGRP к этим вариантам определяли с использованием Biacore, как описано выше. Как показано на фиг. 1, все 12 антител нацелены на С-концевой эпитоп, причем аминокислота F37 является наиболее важным остатком. Замена F37 на аланин значительно снижает аффинность или даже полностью устраняет связывание антител против CGRP с пептидом. Следующим наиболее важным аминокислотным остатком является G33, однако замена аланином в этом положении затронула только антитела с высокой аффинностью (7E9, 8B6, 10A8 и 7D11). Аминокислотный остаток S34 также играет значительную, но меньшую роль в связывании этих четырех высокоаффинных антител.

Таблица 2. Характеристики связывания моноклональных антител против CGRP с α -CGRP человека и их антагонистическая активность

Антитела	K_D в отношении α -CGRP человека при 25°C (нМ)	K_D в отношении α -CGRP человека при 37°C (нМ)	Клеточное блокирование связывания α -CGRP человека с его рецептором при 25°C (измерено по активации цАМФ)	IC ₅₀ (нМ сайты связывания) при 25°C (комнатная температура), измеренные в анализе связывания с радиолигандом.
7E9	1,0	0,9	Да	2,5
8B6	1,1	1,2	Да	4,0
10A8	2,1	3,0	Да	n.d.
7D11	4,4	5,4	Да	n.d.
6H2	9,3	42	Да	12,9
4901	61	139	Да	58
14E10	80	179	Да	n.d.
9B8	85	183	Нет	n.d.

13C2	94	379	Нет	n.d.
14A9	148	581	Нет	n.d.
6D5	210	647	Нет	n.d.
1C5	296	652	Нет	n.d.

Примечание: антитело 4901 является коммерчески доступным (Sigma, продукт № C7113)

n.d. = не определено

Таблица 3. Характеристики связывания моноклональных антител против CGRP с α -CGRP крысы и их антагонистическая активность

Антитела	K _d в отношении α -CGRP крысы при 37°C (нМ)	Клеточное блокирование связывания α -CGRP крысы с его рецептором при 25°C (измерено по активации цАМФ)	Блокировка in vivo в анализе подкожного нерва
4901	3,4	Да	Да
7E9	47	Да	Да
6H2	54	Нет	Нет
8B6	75	Да	Да
7D11	218	Да	Да
10A8	451	Нет	n.d.
9B8	876	Нет	n.d.
14E10	922	Нет	n.d.
13C2	> 1000	Нет	n.d.
14A9	> 1000	Нет	n.d.
6D5	> 1000	Нет	n.d.
1C5	> 1000	Нет	n.d.

"n.d." означает, что для этого антитела тест не проводили

Таблица 4. Аминокислотные последовательности фрагментов α -CGRP человека (SEQ ID NO: 15-40) и родственных пептидов (SEQ ID NO: 41-47).

Все пептиды амидированы на С-конце, кроме SEQ ID NO: 36-40.

Остатки, выделенные жирным шрифтом, указывают точечные мутации

CGRP	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
1-37 (WT)	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKA	15
	F	
8-37	VTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKAF	16

CGRP	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
19-37	SGGVVKNNFVPTNVGSKAF	17
P29A (19-37)	SGGVVKNNFVATNVGSKAF	18
K35A (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSAAF	19
K35E (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSEAF	20
K35M (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSMAF	21
K35Q (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSQAF	22
F37A (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSKAA	23
25-38A	NNFVPTNVGSKAFA	24
25-37	NNFVPTNVGSKAF	25
F27A (25-37)	NNAVPTNVGSKAF	26
V28A (25-37)	NNFAPTNVGSKAF	27
P29A (25-37)	NNFVATNVGSKAF	28
T30A (25-37)	NNFVPANVGSKAF	29
N31A (25-37)	NNFVPTAVGSKAF	30
V32A (25-37)	NNFVPTNAGSKAF	31
G33A (25-37)	NNFVPTNVASKAF	32
S34A (25-37)	NNFVPTNVGAKAF	33
F37A (25-37)	NNFVPTNVGSKAA	34
26-37	NFVPTNVGSKAF	35
19-37-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKAF	36
19-36-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKA	37
1-36-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKA	38
1-19-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRS	39
1-13-COOH	ACDTATCVTHRLA	40
α крысы (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF	41
α крысы (19-37)	SGGVVKDNFVPTNVGSEAF	42
β человека (1-37)	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNFVPTNVGSKAF	43
β крысы (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSKAF	44
Кальцитонин человека (1-32)	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	45
Амилин человека (1-37)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY	46
Адреномедуллин человека (1-52)	YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLANHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY	47

Пример 2. Скрининг антител-антагонистов CGRP с использованием анализов *in vitro*.

Мышинные антитела против CGRP дополнительно подвергали скринингу на антагонистическую активность *in vitro* с использованием клеточного анализа активации цАМФ и анализа связывания.

Антагонистическая активность, измеренная количественным анализом цАМФ. Пять микролитров α -CGRP человека или крысы (конечная концентрация 50 нМ) в присутствии или в отсутствие антитела против CGRP (конечная концентрация 1-3000 нМ) или α -CGRP крысы или α -CGRP человека (конечная концентрация 0,1 нМ-10 мкМ; в качестве положительного контроля для активации цАМФ) помещали в 384-луночный планшет (Nunc, кат. № 264657). Десять микролитров клеток (SK-N-MC человека, если используется α -CGRP человека, или L6 крысы от ATCC, если используется α -CGRP крысы) в стимулирующем буфере (20 мМ HEPES, pH 7,4, 146 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂ и 500 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX)) добавляли в лунки планшета. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

После инкубации осуществляли активацию цАМФ с использованием анализа комплементации фрагментов фермента HitHunter™ (Applied Biosystems), следуя инструкции производителя. Этот анализ основан на генно-инженерном β -галактозидазном ферменте, который состоит из двух фрагментов - ферментного акцептора (ЕА) и энзимного донора (ЕД). Когда эти два фрагмента разделены, фермент неактивен. Когда фрагменты находятся вместе, они могут спонтанно рекомбинировать с образованием активного фермента с помощью процесса, называемого комплементацией. В платформе для анализа ЕФС используют пептидный конъюгат ЕД-цАМФ, в котором цАМФ распознается анти-цАМФ. Этот фрагмент ЕД способен повторно связываться с ЕА с образованием активного фермента. В этом анализе антитело против цАМФ оптимально титруют для связывания конъюгата ЕД-цАМФ и ингибирования образования фермента. Уровни цАМФ в образцах клеточного лизата конкурируют с конъюгатом ЕД-цАМФ за связы-

вание с антителом против цАМФ. Количество свободного ED конъюгата в анализе пропорционально концентрации цАМФ. Поэтому цАМФ измеряют по образованию активного фермента, который количественно определяется оборотом люминесцентного субстрата β -галактозидазы. Анализ активации цАМФ проводили путем добавления 10 мкл буфера для лизиса и антитела против цАМФ (соотношение 1:1) с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента ED-цАМФ и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации в каждую лунку добавляли 20 мкл реагента EA и смеси CL (содержащей субстрат) (соотношение 1:1) и инкубировали в течение 1-3 ч или в течение ночи при комнатной температуре. Планшет считывали со скоростью 1 с/лунку на приборе PMT или 30 с/место на тепловизоре. Были определены антитела, которые ингибируют активацию цАМФ под действием α -CGRP (обозначены как "да") в табл. 2 и 3 выше. Данные в табл. 2 и 3 показывают, что антитела, которые продемонстрировали антагонистическую активность в этом анализе, как правило имеют высокую аффинность. Например, антитела, имеющие K_D (определенную при 25°C) приблизительно 80 нМ или менее к α -CGRP человека или имеющие K_d (определенную при 37°C) приблизительно 47 нМ или менее к α -CGRP крысы, в этом анализе показали антагонистическую активность.

Анализ связывания радиолиганда.

Проводили анализ связывания для измерения IC_{50} антитела против CGRP при блокировании связывания CGRP с рецептором, как описано ранее. Zimmermann et al., *Peptides* 16:421-4, 1995; Mallee et al., *J. Biol. Chem.* 277:14294-8, 2002. Мембраны (25 мкг) из клеток SK-N-MC инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре в инкубационном буфере (50 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1% BSA), содержащем 10 пМ меченого ^{125}I α -CGRP человека в общем объеме 1 мл. Чтобы определить концентрации ингибирования (IC_{50}), антитела или немеченый CGRP (в качестве контроля) из приблизительно 100-кратного исходного раствора растворяли при различных концентрациях в инкубационном буфере и инкубировали одновременно с мембранами и 10 пМ ^{125}I - α -CGRP человека. Инкубацию прекращали фильтрованием через фильтр из стекловолокна (класс GF/B, 1 мкм), который блокировали 0,5% полиэтилэфирмином. Были построены кривые доза-ответ, и были определены значения K_i с использованием уравнения: $K_i = IC_{50} / (1 + ([лиганд]/K_D))$; в котором константа равновесной диссоциации $K_D = 8$ пМ для человеческого α -CGRP к рецептору CGRP1, который присутствует в клетках SK-N-MC и $B_{max} = 0,025$ пмоль/мг белка. Измеренное значение IC_{50} (в пересчете на молекулы IgG) было преобразовано с учетом сайтов связывания (умножив его на 2), чтобы его можно было сравнить с аффинностью (K_D), определенной с помощью Biotage (см. табл. 2).

Табл. 2 показывает IC_{50} антител мыши 7E9, 8B6, 6H2 и 4901. Данные показывают, что аффинность антитела обычно коррелирует с IC_{50} : антитела с более высокой аффинностью (более низкие значения K_D) в анализе связывания радиолиганда имеют более низкое значение IC_{50} .

Пример 3. Влияние антител-антагонистов CGRP на вазодилатацию кожи, вызванную стимуляцией подкожного нерва крысы.

Чтобы протестировать антагонистическую активность антител против CGRP, проверяли влияние антител на вазодилатацию кожи путем стимуляции подкожного нерва крысы с использованием модели на крысах, описанной ранее. Escott et al., *Br. J. Pharmacol.* 110: 772-776, 1993. В этой модели на крысах электрическая стимуляция подкожного нерва вызывает высвобождение CGRP из нервных окончаний, что приводит к увеличению кровотока в коже. Кровоток в коже стоп самцов крыс Спрэг-Дуэли (170-300 г, поставщик Charles River Hollister) измеряли после стимуляции подкожного нерва. Крыс держали под анестезией 2% изофлураном. В начале эксперимента вводили бретилия тозилат (30 мг/кг, внутривенно) для минимизации вазоконстрикции из-за сопутствующей стимуляции симпатических волокон подкожного нерва. Температуру тела поддерживали на уровне 37°C с помощью ректального зонда, термостатически подключенного к терморегулятору с контролируемой температурой. Соединения, включающие антитела, положительный контроль (CGRP 8-37) и носитель (PBS, 0,01% Tween 20), вводили внутривенно через правую бедренную вену, за исключением эксперимента, показанного на фиг. 3, тестируемое соединение и контроль вводили через хвостовую вену, а для экспериментов, показанных на фиг. 2А и 2В, антитела 4901 и 7D11 вводили внутрибрюшинно (IP). Положительное контрольное соединение CGRP 8-37 (антагонист вазодилатации), из-за его короткого времени полужизни, вводили за 3-5 мин до нервной стимуляции в количестве 400 нмоль/кг (200 мкл). Tan et al., *Clin. Sci.* 89:656-73, 1995. Антитела вводили в разных дозах (1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 25 мг/кг).

Для экспериментов, показанных на фиг. 2А и 2В, антитело 4901 (25 мг/кг), антитело 7D11 (25 мг/кг) или контрольный носитель (PBS с 0,01% Tween 20) вводили внутрибрюшинно (IP) за 72 ч до электрической импульсной стимуляции. Для эксперимента, показанного на фиг. 3, антитело 4901 (1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг или 25 мг/кг) или контрольный носитель (PBS с 0,01% Tween 20) вводили внутривенно за 24 ч до электрической импульсной стимуляции. После введения антител или контрольного носителя подкожный нерв правой задней конечности обнажали хирургическим путем, разрезали проксимально и покрывали полиэтиленовой пленкой для предотвращения высыхания. На медиодорсальную сторону кожи задней лапы, которая является областью, иннервируемой подкожным нервом, помещали лазерный доплеров-

ский зонд. Кровоток в коже, измеренный как поток клеток крови, контролировали лазерным доплеровским расходомером. Когда был установлен стабильный фоновый поток (отклонение менее 5%) в течение не менее 5 мин, нерв помещали на платиновые биполярные электроды и стимулировали 60 электрическими импульсами (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с), а затем снова через 20 мин. Кумулятивное изменение кровотока в коже оценивали по площади под кривой зависимости потока от времени (AUC, которая равна изменению потока, умноженному на изменение времени) для каждой реакции потока на электрическую импульсную стимуляцию. Регистрировали среднее значение реакции кровотока на две стимуляции. Животных держали под наркозом в течение одного-трех часов.

Как показано на фиг. 2А и фиг. 2В, присутствие CGRP 8-37 (400 нмоль/кг, внутривенно), антитела 4901 (25 мг/кг, внутривенно) или антитела 7D11 (25 мг/кг, внутривенно) ингибировало увеличение кровотока, стимулированное применением электронных импульсов к подкожному нерву, по сравнению с контролем. CGRP 8-37 вводили за 3-5 мин до стимуляции подкожного нерва; а антитела вводили за 72 ч до стимуляции подкожного нерва. Как показано на фиг. 3, увеличение кровотока, стимулированное воздействием электронных импульсов на подкожном нерве, было ингибировано присутствием антитела 4901 в различных дозах (1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг и 25 мг/кг), вводимых внутривенно за 24 ч до стимуляции подкожного нерва.

Для экспериментов, показанных на фиг. 4А и 4В, перед введением антитела подкожный нерв подвергали хирургическому воздействию. Подкожный нерв правой задней конечности обнажали хирургическим путем, разрезали проксимально и покрывали полиэтиленовой пленкой для предотвращения высыхания. На медиодорсальную сторону кожи задней лапы, которая является областью, иннервируемой подкожным нервом, помещали лазерный доплеровский зонд. Кровоток в коже, измеренный как поток клеток крови, контролировали лазерным доплеровским расходомером. Через тридцать-сорок пять минут после инъекции бретилия третилата, когда установился стабильный фоновый поток (отклонение менее 5%) в течение не менее 5 мин, нерв помещали на платиновые биполярные электроды и стимулировали 60 электрическими импульсами (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с), а затем снова через 20 мин. Среднее значение реакции потока кровотока на эти две стимуляции было использовано для определения фоновой реакции (время 0) на электрическую стимуляцию. Затем внутривенно вводили антитело 4901 (1 мг/кг или 10 мг/кг), антитело 7Е9 (10 мг/кг), антитело 8В6 (10 мг/кг) или носитель (PBS с 0,01% Tween 20) (в/в). Затем нерв стимулировали (2 Гц, 10 В, 1 мс, в течение 30 с) через 30, 60, 90 и 120 мин после введения антитела или носителя. Животных держали под наркозом в течение приблизительно трех часов. Кумулятивное изменение кровотока в коже оценивали по площади под кривой зависимости потока от времени (AUC, которая равна изменению потока, умноженному на изменение времени) для каждой реакции потока на стимуляцию электрическими импульсами.

Как показано на фиг. 4А, увеличение кровотока, стимулированное воздействием электронных импульсов на подкожный нерв, было значительно ингибировано присутствием антитела 4901 в дозе 1 мг/кг внутривенно, когда стимуляция электронными импульсами применялась через 60 мин, 90 мин и 120 мин после введения антитела, и увеличение кровотока, стимулированное воздействием электронных импульсов на подкожный, было значительно ингибировано присутствием антитела 4901 в дозе 10 мг/кг, вводимого в/в, когда стимуляция электронными импульсами применялась через 30 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин после введения антител. На фигуре 4В показано, что увеличение кровотока, стимулированное воздействием электронных импульсов на подкожный нерв, было значительно ингибировано присутствием антитела 7Е9 (10 мг/кг, внутривенно), когда электронная импульсная стимуляция применялась через 30 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин после введения антитела, и присутствием антитела 8В6 (10 мг/кг, внутривенно), когда стимуляция электронными импульсами применялась через 30 мин после введения антитела.

Эти данные указывают на то, что антитела 4901, 7Е9, D11 и 8В6 эффективны в блокировании активности CGRP, измеренной по вазодилатации кожи, вызванной стимуляцией подкожного нерва крысы.

Пример 4. Характеризация анти-CGRP-антитела G1 и его вариантов.

Аминокислотные последовательности для варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела против CGRP G1 показаны на фиг. 5. Для экспрессии и характеристики антитела G1 и его вариантов были использованы следующие методы.

Используемый экспрессионный вектор.

Экспрессия Fab-фрагмента антител находилась под контролем индуцируемого IPTG промотора lacZ, сходного с описанным в руководстве Barbas (2001). Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press pg. 2.10. Vector pComb3X), однако, модификации включали добавление и экспрессию следующих дополнительных доменов: константный домен легкой цепи каппа человека и константный домен CH1 иммуноглобулина человека IgG2, С-область цепи Ig-гамма-2, номер доступа белка P01859; легкая цепь иммуноглобулина каппа (Homo sapiens), номер доступа белка CAA09181.

Получение Fab в небольшом масштабе.

Из E.coli, трансформированной (с использованием клеток TG1, компетентных для электропорации, либо химически компетентных клеток Top 10) библиотекой Fab, использовали отдельные колонии для инокуляции как мастер-планшета (агар LB+карбенициллин (50 мкг/мл) + 2% глюкоза), так и рабочего

планшета (2 мл/лунку, 96-луночный/планшет), причем каждая лунка содержала 1,5 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 2% глюкозы. На планшет было нанесено газопроницаемое адгезивное уплотнение (ABgene, Суррей, Великобритания). Обе планшета инкубировали при 30°C в течение 12-16 ч; рабочий планшет энергично встряхивали. Мастер-планшет хранили при 4°C до тех пор, пока он не требовался, в то время как клетки из рабочего планшета осаждали (4000 об/мин, 4°C, 20 мин) и ресуспендировали в 1,0 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 0,5 мМ IPTG с целью индуцировать экспрессию Fab энергичным встряхиванием в течение 5 ч при 30°C. Индуцированные клетки центрифугировали при 4000 об/мин, 4°C в течение 20 мин и ресуспендировали в 0,6 мл буфера Biscore HB-SEP (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% об./об. P20). Лизис ресуспендированных HB-SEP клеток осуществляли путем замораживания (80°C) и затем оттаивания при 37°C. Клеточные лизаты центрифугировали при 4000 об/мин, 4°C в течение 1 ч, чтобы отделить дебрис от Fab-содержащих супернатантов, которые впоследствии фильтровали (0,2 мкм) с использованием 96-луночного фильтрационного планшета Millipore MultiScreen Assay System и вакуумного коллектора. Для анализа отфильтрованных супернатантов использовали Biscore, вводя их через CGRP на сенсорном чипе. Отобранные по аффинности клоны, экспрессирующие Fab, извлекали из мастер-планшета, получая матричную ДНК для ПЦР, секвенирования и приготовления плазмиды.

Крупномасштабное получение Fab.

Для получения кинетических параметров Fab экспрессировали в большем масштабе следующим образом. Колбы Эрленмейера, содержащие 150 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 2% глюкозы, инокулировали 1 мл "стартовой" ночной культуры из отобранного по аффинности Fab-экспрессирующего клона *E.coli*. Оставшуюся часть стартовой культуры (~3 мл) использовали для приготовления плазмидной ДНК (QIAprep mini-prep, набор Qiagen) для секвенирования и дальнейших манипуляций. Полученную крупномасштабную культуру инкубировали при 30°C при энергичном встряхивании до достижения величины OD 1,0 на длине волны 600 нм (обычно 12-16 ч). Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин, 4°C в течение 20 мин и ресуспендировали в 150 мл LB + карбенициллин (50 мкг/мл) + 0,5 мМ IPTG. Через 5 ч экспрессии при 30°C клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин, 4°C в течение 20 мин, ресуспендировали в 10 мл буфера Biscore HBS-EP и лизировали с использованием однократного цикла замораживания (-80°C)/оттаивания (37°C). Клеточные лизаты осаждали центрифугированием при 4000 об/мин, 4°C в течение одного часа, а супернатант собирали и фильтровали (0,2 мкм). Отфильтрованные супернатанты загружали в колонки с сверхпоточной сефарозой Superflow Ni-NTA (Qiagen, Валенсия, Калифорния), уравновешенные PBS, pH 8, затем промывали 5 объемами колонки PBS, pH 8. Отдельные Fab-фрагменты элюировали в разных фракциях с помощью PBS (pH 8) + 300 Мм имидазола. Фракции, содержащие Fab, объединяли и диализовали в PBS, затем количественно определяли с помощью ИФА до характеристики аффинности.

Получение полноразмерных антител.

Для экспрессии полноразмерных антител вариабельные области тяжелой и легкой цепей клонировали в экспрессионных векторах млекопитающих и трансфицировали с использованием липофектамина в клетки HEK 293 для временной экспрессии. Антитела очищали с помощью белка А с использованием стандартных методов.

Вектор pDb.CGRP.hFcGI представляет собой экспрессионный вектор, содержащий тяжелую цепь антитела G1, и подходит для транзитной или стабильной экспрессии тяжелой цепи. Вектор pDb.CGRP.hFcGI содержит нуклеотидные последовательности, соответствующие следующим областям: промоторная область цитомегаловируса мыши (нуклеотиды 7-612); синтетический интрон (нуклеотиды 613-1679); кодирующая область DHFR (нуклеотиды 688-1253); сигнальный пептид гормона роста человека (нуклеотиды 1899-1976); вариабельная область тяжелой цепи G1 (нуклеотиды 1977-2621); константная область тяжелой цепи IgG2 человека, содержащая следующие мутации: из A330P331 в S330S331 (нумерация аминокислот со ссылкой на последовательность IgG2 дикого типа; см. *Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2613-2624). Вектор pDb.CGRP.hFcGI был депонирован в ATCC 15 июля 2005 года, и ему был присвоен номер доступа ATCC PTA-6867.

Вектор pEb.CGRP.hKGI представляет собой экспрессионный вектор, содержащий легкую цепь антитела G1, и подходит для транзитной экспрессии легкой цепи. Вектор pEb.CGRP.hKGI содержит нуклеотидные последовательности, соответствующие следующим областям: промоторная область цитомегаловируса мыши (нуклеотиды 2-613); интрон EF-1 человека (нуклеотиды 614-1149); сигнальный пептид гормона роста человека (нуклеотиды 1160-1237); вариабельная область легкой цепи антитела G1 (нуклеотиды 1238-1558); константная область цепи каппа человека (нуклеотиды 1559-1882). Вектор pEb.CGRP.hKGI был депонирован в ATCC 15 июля 2005 г. и получил номер доступа ATCC PTA-6866.

Анализ Biscore для определения аффинности.

Аффинность моноклонального антитела G1 и его вариантов определяли либо при 25°C, либо при 37°C с использованием системы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biscore3000™ (Biscore, INC, Пискатауэй, Нью-Джерси). Аффинность определяли путем захвата биотинилированного с N-конца CGRP или его фрагментов с помощью предварительно иммобилизованного стрептавидина (сенсорный чип SA) и измерения кинетики связывания Fab-фрагментов антитела G1 или вариантов, титрованных на

CGRP или фрагменте на чипе. Все анализы Biacore проводили в рабочем буфере HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% об./об. полисорбата P20). Поверхности CGRP готовили разбавлением N-биотинилированного CGRP до концентрации менее 0,001 мг/мл в буфере HBS-EP и вводили его через сенсорный чип SA, используя переменное время контакта. Поверхности с низкой емкостью, соответствующие уровням захвата <50 единиц отклика (RU), использовали для кинетических исследований с высоким разрешением, тогда как поверхности с высокой емкостью (приблизительно 800 RU захваченного CGRP) использовали для исследований концентрации, скрининга и определения аффинности в растворе. Кинетические данные получали путем серийного разведения Fab антитела G1 с двукратным или трехкратным приращением до концентраций от 1 мкМ до 0,1 нМ (цель - $0,1-10 \times$ расчетная K_D). Образцы обычно вводили в течение 1 мин на скорости 100 мкл/мин, и время диссоциации составляло по меньшей мере 10 мин. После каждого цикла связывания поверхности регенерировали с помощью 25 mM NaOH в 25% об./об. этаноле, в течение сотен циклов. Всю серию титрования (как правило, генерируемую в двух повторностях) глобально аппроксимировали к модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программы BIAevaluation. Это позволило получить уникальную пару кинетических констант скорости ассоциации и диссоциации (соответственно, k_{on} и k_{off}) для каждого взаимодействия связывания, отношения которых дали равновесную константу диссоциации ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Определенные таким образом величины аффинности (значения K_D) перечислены в табл. 6 и 7.

Анализ с высоким разрешением связывающих взаимодействий с чрезвычайно медленными скоростями диссоциации. Для взаимодействий с чрезвычайно медленными скоростями диссоциации (в частности, связывание Fab антитела G1 с человеческим α -CGRP на чипе при 25°C) величины аффинности были получены в эксперименте из двух частей. Описанный выше протокол использовали со следующими модификациями. Константу скорости ассоциации (k_{on}) определяли путем введения серии 2-кратного титрования (в двух повторностях), охватывающей 550 нМ - 1 нМ, в течение 30 с на скорости 100 мкл/мин и позволяющей только 30-секундную фазу диссоциации. Константу скорости диссоциации (k_{off}) определяли путем введения трех концентраций (высокой, средней и низкой) из одной и той же серии титрования в двух экземплярах в течение 30 с с обеспечением 2-часовой фазы диссоциации. Аффинность (K_D) каждого взаимодействия получали путем объединения значений k_{on} и k_{off} , полученных в обоих типах экспериментов, как показано в табл. 5.

Определение аффинности в растворе с помощью Biacore.

Аффинность в растворе антитела G1 к крысиному α -CGRP и человеческому α -CGRP F37A (19-37) измеряли с помощью Biacore при 37°C. Использовали поверхность чипа CGRP с высокой пропускной способностью (для целей обнаружения был выбран человеческий α -CGRP с высокой аффинностью), и рабочий буфер HBS-EP пропускали со скоростью 5 мкл/мин. Фрагмент Fab антитела G1 в постоянной концентрации 5 нМ (с целью достижения или ниже ожидаемой K_D взаимодействия на основе раствора) предварительно инкубировали с конкурирующим пептидом, либо крысиным α -CGRP либо α -CGRP F37A (19-37) человека, в конечных концентрациях от 1 нМ до 1 мкМ в 3-кратных серийных разведениях. Растворы Fab антитела G1 в отсутствие или в присутствии конкурирующего пептида на основе раствора вводили через CGRP на чипе и отслеживали истощение ответов связывания, обнаруженных на поверхности чипа в результате конкуренции раствора. Эти ответы связывания были преобразованы в "концентрации свободного Fab" с использованием калибровочной кривой, которая была построена путем титрования одного только Fab антитела G1 (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,325 и 0 нМ) через CGRP на чипе. "Концентрации свободного Fab" наносили на график зависимости от концентрации конкурирующего пептида на основе раствора, используемого для создания каждой точки данных и аппроксимировали к модели аффинности в растворе с использованием программного обеспечения BIAevaluation. Значения аффинности в растворе, определенные (косвенно) таким образом, показанные в табл. 5 и 7, использовали для проверки значений аффинности, полученных, когда Fab вводили непосредственно через N-биотинилированные CGRP на чипе SA. Тесное согласие между значениями аффинности, определенными этими двумя методами, подтверждает, что привязывание N-биотинилированной версии CGRP к чипу не изменяет его нативную активность связывания с раствором.

В приведенной ниже табл. 5 показана аффинность связывания антитела G1 с α -CGRP человека, β -CGRP человека, α -CGRP крысы и β -CGRP крысы, определенное с помощью Biacore, при протекании фрагментов Fab через N-биотинилированные CGRP на чипе SA. Чтобы точнее определить аффинность связывающих взаимодействий с чрезвычайно низкими скоростями диссоциации, значения аффинности также определяли в эксперименте, состоящем из двух частей для дополнения этой ориентации анализа, также определяли аффинность в растворе взаимодействия α -CGRP крысы (как описано выше). Близкое совпадение значений аффинности, измеренных в обеих ориентациях анализа, подтверждает, что аффинность связывания нативного α -CGRP крысы в растворе не изменяется, когда он N-биотинилирован и привязан к чипу SA.

Таблица 5. Аффинность связывания Fab антител G1, титрованных на CGRP на чипе

CGRP на чипе	Температура (°C)	k_{on} (1/мс)	k_{off} (1/с)	K_D (нмоль)
α -CGRP человек	25	$1,86 \times 10^5$	$7,80 \times 10^{-6}$	0,042 (7%, n=4)*
α -CGRP человек	37	$5,78 \times 10^5$	$3,63 \times 10^{-5}$	0,063 (4%, n=2)*
β -CGRP человек	37	$4,51 \times 10^5$	$6,98 \times 10^{-5}$	0,155
α -CGRP крысы	25	$5,08 \times 10^4$	$6,18 \times 10^{-5}$	1,22 (12%, n=2)*
α -CGRP крысы	37	$1,55 \times 10^5$	$3,99 \times 10^{-4}$	2,57* (в растворе $K_D=10$ (50%, n=4)**
β -CGRP крысы	37	$5,16 \times 10^5$	$7,85 \times 10^{-5}$	0,152

* Аффинность к α -CGRP (крысы и человека) определяли в эксперименте из двух частей с высоким разрешением, в котором фазу диссоциации отслеживали в течение 2 ч (значения k_{on} , k_{off} и K_D представляют собой среднее из n повторных экспериментов, при выражении стандартного отклонения в виде процентного отклонения). Аффинность к β -CGRP (крысы и человека) определяли глобальным анализом, используя только 20-минутную фазу диссоциации, что было недостаточно точно для количественной оценки их экстремальных скоростей диссоциации (их скорости диссоциации, вероятно, медленнее, чем указано здесь, и, следовательно, их аффинность, вероятно, даже выше). Fab антитела G1 очень медленно диссоциировал от всех CGRP (кроме α -CGRP крысы) с скоростями диссоциации, которые приближались к пределу разрешения анализа Biacore (в частности при 25°C).

** Аффинность в растворе определяли путем измерения истощения ответов связывания, обнаруженных на CGRP на чипе для Fab антитела G1, предварительно инкубированном с раствором-конкурентом α -CGRP крысы.

В приведенной ниже табл. 6 показаны антитела с вариацией аминокислотной последовательности по сравнению с антителом G1, и их аффинность к α -CGRP крысы и α -CGRP человека. Все аминокислотные замены вариантов, показанных в табл. 6, описаны относительно последовательности G1. Аффинность связывания фрагментов Fab определяли с помощью Biacore путем пропуска их через CGRP на чипе SA.

Таблица 6. Аминокислотные последовательности и данные по аффинности связывания для вариантов антитела G1, определенные при 37°C с помощью Biacore

Кло н	L1	L2	H2	HC-FW3	k_{off} α -крысы (1/с)	K_D α -крысы (нмоль)	k_{off} α -человек (1/с)	K_D α -человек (нмоль)
G1					$\times 10^{-4}$	2,57	$3,63 \times 10^{-5}$	0,063
M1				A100L	$1,10 \times 10^{-3}$		$1,73 \times 10^{-4}$	
M2				L99A A100 R	$2,6 \times 10^{-3}$	58	$3,1 \times 10^{-4}$	3
M3				L99A A100 S	$2,0 \times 10^{-3}$	61	$2,1 \times 10^{-4}$	1,7
M4				L99A A100 V	$1,52 \times 10^{-3}$	84,4	$6,95 \times 10^{-5}$	0,43
M5				L99A A100 Y	$7,35 \times 10^{-4}$	40,8	$3,22 \times 10^{-5}$	0,20
M6				L99N	$7,84 \times 10^{-4}$	43,6	$1,33 \times 10^{-4}$	0,83
M7				L99N A100 C	$9,18 \times 10^{-4}$	51,0	$2,43 \times 10^{-4}$	1,52

M8				L99N A100 G	$7,45 \times 10^{-4}$	41,4	$9,20 \times 10^{-5}$	0,58
M9				L99N A100 Y	n.d.	n.d.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M10				L99S A100 S	$1,51 \times 10^{-3}$	83,9	$1,73 \times 10^{-4}$	1,08
M11				L99S A100T	$4,83 \times 10^{-3}$	268,3	$2,83 \times 10^{-4}$	1,77
M12				L99S A100 V	$1,94 \times 10^{-3}$	107,8	$1,01 \times 10^{-4}$	0,63
M13				L99T A100 G	$1,84 \times 10^{-3}$	102,2	$1,86 \times 10^{-4}$	1,16
M14				L99T A100 K	n.d.	n.d.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M15				L99T A100 P	$1,15 \times 10^{-3}$	63,9	$1,58 \times 10^{-5}$	0,10
M16				L99T A100 S	$9,96 \times 10^{-4}$	55,3	$1,65 \times 10^{-4}$	1,03
M17				L99T A100 V	$2,06 \times 10^{-3}$	114,4	$1,85 \times 10^{-4}$	1,16
M18				L99V A100 G	$1,22 \times 10^{-3}$	67,8	$7,03 \times 10^{-5}$	0,44
M19				L99V A100 R	n.d.	n.d.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M20	R28 W			L99R A100L	$1,44 \times 10^{-3}$	80,0	$1,36 \times 10^{-4}$	0,85
M21	R28 W			L99S	<u>$6,95 \times 10^{-4}$</u>	<u>15,2</u>	<u>$1,42 \times 10^{-4}$</u>	<u>1,23</u>
M22	R28 W			L99T	$1,10 \times 10^{-3}$	61,1	$1,16 \times 10^{-4}$	0,73
M23	R28G			L99T A100 V	$7,99 \times 10^{-4}$	44,4	$1,30 \times 10^{-4}$	0,81

M24	R28L			L99T A100 V	$1,04 \times 10^{-3}$	57,8	$1,48 \times 10^{-4}$	0,93
M25	R28N			L99T A100 V	<u>$1,4 \times 10^{-3}$</u>	<u>76</u>	<u>$1,4 \times 10^{-4}$</u>	<u>1,3</u>
M26	R28N		A57 G	L99T A100 V	$9,24 \times 10^{-4}$	51,3	$1,48 \times 10^{-4}$	0,93
M27	R28N T30A			L99T A100 V	$3,41 \times 10^{-3}$	189,4	$3,57 \times 10^{-4}$	2,23
M28	R28N T30D		E54 R A57 N	L99T A100 V	$1,25 \times 10^{-3}$	69,4	$9,96 \times 10^{-5}$	0,62
M29	R28N T30G			L99T A100 V	$3,59 \times 10^{-3}$	199,4	$3,80 \times 10^{-4}$	2,38
M30	R28N T30G		E54K A57E	L99T A100 V	$6,38 \times 10^{-3}$	354,4	$5,90 \times 10^{-4}$	3,69
M31	R28N T30G		E54K A57 G	L99T A100 V	$3,61 \times 10^{-3}$	200,6	$3,47 \times 10^{-4}$	2,17
M32	R28N T30G		E54K A57 H	L99T A100 V	$2,96 \times 10^{-3}$	164,4	$2,71 \times 10^{-4}$	1,69
M33	R28N T30G		E54K A57 N S58 G	L99T A100 V	$9,22 \times 10^{-3}$	512,2	$7,50 \times 10^{-4}$	4,69
M34	R28N T30G		E54K A57 N S58T	L99T A100 V	$2,17 \times 10^{-3}$	120,6	$6,46 \times 10^{-4}$	4,04
M35	R28N T30G		E54K A57S	L99T A100 V	$3,99 \times 10^{-3}$	221,7	$3,39 \times 10^{-4}$	2,12
M36	R28N T30R			L99T A100 V	$4,79 \times 10^{-3}$	266,1	$2,39 \times 10^{-4}$	1,49

M37	R28N T30S		A57 G	L99T A100 V	$1,45 \times 10^{-3}$	80,6	$2,26 \times 10^{-4}$	1,41
M38	R28N T30 W			L99T A100 V	$5,11 \times 10^{-3}$	283,9	$2,18 \times 10^{-4}$	1,36
M39	R28N	G50 A L56T	A57 N S58Y	L99T A100 V	$9,95 \times 10^{-3}$	552,8	$4,25 \times 10^{-4}$	2,66
M40	R28N	G50 A L56T	E54K A57L	L99T A100 V	0,36	20000, 0	$1,28 \times 10^{-3}$	8,00
M41	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N E64 D	L99T A100 V	$4,53 \times 10^{-3}$	251,7	$2,10 \times 10^{-4}$	1,31
M42	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N H61F	L99T A100 V	$7,52 \times 10^{-3}$	417,8	$4,17 \times 10^{-4}$	2,61
M43	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N S58 C	L99T A100 V	$4,53 \times 10^{-3}$	251,7	$2,63 \times 10^{-4}$	1,64
M44	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N S58E	L99T A100 V	<u>$6,13 \times 10^{-3}$</u>	<u>443</u>	<u>$2,10 \times 10^{-4}$</u>	<u>2,05</u>
M45	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N S58E E64 D	L99T A100 V	<u>$5,58 \times 10^{-3}$</u>	<u>259</u>	<u>$2,11 \times 10^{-4}$</u>	<u>1,85</u>
M46	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N S58E H61F	L99T A100 V	$2,94 \times 10^{-3}$	163,3	$5,39 \times 10^{-4}$	3,37
M47	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N	L99T A100 V	$8,23 \times 10^{-3}$	457,2	$3,32 \times 10^{-4}$	2,08

			S58 G					
M48	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N S58L	L99T A100 V	0,0343	1905,6	$8,42 \times 10^{-4}$	5,26
M49	R28N	G50 A L56T	E54K A57 N S58Y H61F	L99T A100 V	0,0148	822,2	$5,95 \times 10^{-4}$	3,72
M50	R28N	G50 A L56T	E54K A57 R	L99T A100 V	$5,30 \times 10^{-3}$	294,4	$4,06 \times 10^{-4}$	2,54
M51	R28N	L56I	E54K A57 G	L99T A100 V	$1,18 \times 10^{-3}$	65,6	$1,31 \times 10^{-4}$	0,82
M52	R28N	L56I	E54K A57 N S58A	L99T A100 V	$2,29 \times 10^{-3}$	127,2	$2,81 \times 10^{-4}$	1,76
M53	R28N	L56I	E54K A57 N S58 G	L99T A100 V	$1,91 \times 10^{-3}$	106,1	$3,74 \times 10^{-4}$	2,34
M54	R28N T30A	G50 A	E54K A57 N S58P	L99T A100 V	$2,16 \times 10^{-3}$	120,0	$1,79 \times 10^{-3}$	11,19
M55	R28N T30A	L56S	E54K A57 N S58E E64 D	L99T A100 V	$5,85 \times 10^{-3}$	325,0	$4,78 \times 10^{-4}$	2,99
M56	R28N T30D	L56S	E54K A57 N H61F	L99T A100 V	$9,35 \times 10^{-3}$	519,4	$4,79 \times 10^{-4}$	2,99
M57	R28N T30D	L56S	E54K A57 N S58E	L99T A100 V	<u>0,0104</u>	<u>1,200</u>	<u>$3,22 \times 10^{-4}$</u>	<u>3,08</u>

M58	R28N T30D	L56S	E54K A57 N S58I H61F	L99T A100 V	Отсутстви е связывани я	n.d.	$1,95 \times 10^{-3}$	12,19
M59	R28N T30D	L56S	E54K A57 N S58 N H61F	L99T A100 V	0,0123	683,3	$5,24 \times 10^{-4}$	3,28
M60	R28N T30D	L56S	E54K A57 N S58 R H61F	L99T A100 V	0,0272	1511,1	$9,11 \times 10^{-4}$	5,69
M61	R28N T30G	A51 H	E54 Q A57 N H61F	L99T A100 V	$5,21 \times 10^{-3}$	289,4	$4,59 \times 10^{-4}$	2,87
M62	R28N T30G	A51 H L56T	E54K A57 N S58E	L99T A100 V	$5,75 \times 10^{-3}$	<u>242</u>	$5,57 \times 10^{-4}$	<u>5,86</u>
M63	R28N T30G	G50 A	E54K A57 N S58T	L99T A100 V	$2,65 \times 10^{-3}$	147,2	$1,50 \times 10^{-3}$	9,38
M64	R28N T30G	G50 A	E54K A57 N S58V	L99T A100 V	0,0234	1300,0	$1,32 \times 10^{-3}$	8,25
M65	R28N T30G	G50 A L56I	E54K A57 C	L99T A100 V	$4,07 \times 10^{-3}$	226,1	$8,03 \times 10^{-4}$	5,02
M66	R28N T30G	L56I	E54K A57E	L99T A100 V	$5,11 \times 10^{-3}$	283,9	$5,20 \times 10^{-4}$	3,25
M67	R28N T30G	L56I	E54K A57F	L99T A100 V	$1,71 \times 10^{-3}$	95,0	$8,20 \times 10^{-4}$	5,13
M68	R28N T30G	L56I	E54K	L99T	$6,76 \times 10^{-3}$	375,6	$4,28 \times 10^{-4}$	2,68

			A57 N S58 D E64 D	A100 V				
M69	R28N T30G	L56I	E54K A57 N S58E	L99T A100 V	$1,81 \times 10^{-3}$	100,6	$7,33 \times 10^{-4}$	4,58
M70	R28N T30G	L56I	E54K A57S	L99T A100 V	$6,07 \times 10^{-3}$	337,2	$5,59 \times 10^{-4}$	3,49
M71	R28N T30G	L56I	E54K A57Y	L99T A100 V	$2,12 \times 10^{-3}$	117,8	$1,28 \times 10^{-3}$	8,00
M72	R28N T30G	L56S	E54K	L99T A100 V	$3,95 \times 10^{-3}$	219,4	$4,00 \times 10^{-4}$	2,50
M73	R28N T30G	L56S	E54K A57 N S58Y E64 D	L99T A100 V	$3,00 \times 10^{-3}$	166,7	$2,55 \times 10^{-4}$	1,59
M74	R28N T30G	L56S	E54K A57S	L99T A100 V	$6,03 \times 10^{-3}$	335,0	$5,97 \times 10^{-4}$	3,73
M75	R28N T30G	L56S	E54K A57V	L99T A100 V	$1,87 \times 10^{-2}$	1038,9	$1,16 \times 10^{-3}$	7,25
M76	R28N T30S	G50 A L56T	A57 G	L99T A100 V	$1,16 \times 10^{-3}$	64,4	$3,64 \times 10^{-4}$	2,28
M77	R28N T30S	G50 A L56T	E54K A57 D	L99T A100 V	0,0143	794,4	$4,77 \times 10^{-4}$	2,98
M78	R28N T30S	G50 A L56T	E54K A57 N S58T	L99T A100 V	0,167	9277,8	$1,31 \times 10^{-3}$	8,19
M79	R28N T30S	G50 A L56T	E54K A57P	L99T A100 V	0,19	10555,6	$1,29 \times 10^{-3}$	8,06
M80	R28N T30S	L56I	E54K A57 N S58V	L99T A100 V	0,0993	5516,7	$2,09 \times 10^{-3}$	13,06
M81	R28N T30S	L56S	E54K A57 N S58E	L99T A100 V	$4,29 \times 10^{-3}$	238,3	$4,90 \times 10^{-4}$	3,06
M82	R28N T30V	A51 H L56T	A57 N	L99T A100 V	$6,99 \times 10^{-3}$	388,3	$8,77 \times 10^{-4}$	5,48
M83	R28N T30V	A51 H L56T	E54K A57 N S58 M H61F	L99T A100 V	Отсутстви е связывани я	n.d.	$9,33 \times 10^{-4}$	5,83
M84	R28N T30V	A51 H L56T	E54 N A57 N	L99T A100 V	$1,76 \times 10^{-2}$	977,8	$1,08 \times 10^{-3}$	6,75

Все CDR включают CDR по Kabat и Chothia. Аминокислотные остатки пронумерованы последовательно (см. фиг. 5). У всех клонов последовательности L3+H1+H3 идентичны антителу G1. $K_D = k_{off}/k_{on}$. Все значения k_{off} были определены в режиме скрининга, кроме подчеркнутых, которые были получены с помощью глобального анализа ряда концентраций Fab (G1 было проанализировано в режиме высокого разрешения). Поэтому подчеркнутые значения K_D были определены экспериментально путем измерения

k_{on} . Другие значения k_{on} были оценены как совпадающие с M25.

n.d. = не определено

Для определения эпитопа на α -CGRP человека, который распознается антителом G1, использовали анализы Biotage, описанные выше. Человеческий α -CGRP был приобретен в виде N-биотинилированной версии, чтобы обеспечить его высокоаффинный захват с помощью сенсорных чипов SA. Определяли связывание Fab-фрагмента G1 с α -CGRP человека на чипе в отсутствие или в присутствии пептида CGRP. Как правило, инъецировали раствор 2000:1 моль пептида/Fab (например, 10 мкМ пептида в 50 нМ Fab G1) через α -CGRP человека на чипе. На фиг. 6 показан процент связывания, блокируемый конкурирующим пептидом. Данные на фиг. 6, показывают, что пептиды, блокирующие 100% связывания Fab G1 с α -CGRP человека, включают 1-37 (WT), 8-37, 26-37, P29A (19-37), K35A (19-37) K35E (19-37) и K35M (19-37) α -CGRP человека; 1-37 β -CGRP (WT); 1-37 крысиного α -CGRP (WT); и 1-37 крысиного β -CGRP (WT). Все эти пептиды амидированы на С-конце. Пептиды F37A (19-37) и 19-37 (последний не амидирован на С-конце) человеческого α -CGRP также блокировали от 80 до 90% связывания Fab G1 с человеческим α -CGRP. Пептид 1-36 (не амидированный на С-конце) человеческого α -CGRP блокирует приблизительно 40% связывания Fab G1 с человеческим α -CGRP. Пептидный фрагмент 19-36 (амидированный на С-конце) человеческого α -CGRP; пептидные фрагменты 1-13 и 1-19 человеческого α -CGRP (ни один из которых не амидирован на С-конце); и человеческий амилин, кальцитонин и адреномедуллин (все амидированные на С-конце) не конкурируют со связыванием Fab G1 с человеческим α -CGRP на чипе. Эти данные демонстрируют, что G1 нацелен на С-концевой эпитоп CGRP и что для связывания важны как наименование самого терминального остатка (F37), так и его амидирование.

Также определяли аффинность связывания Fab G1 с вариантами человеческого α -CGRP (при 37°C). В приведенной ниже табл. 7 показана аффинность, измеренная непосредственно путем титрования Fab G1 по N-биотинилированному α -CGRP человека и его вариантам на чипе. Данные в табл. 7 показывают, что антитело G1 связывается с С-концевым эпитопом, причем наиболее важными остатками являются F37 и G33. G1 не связывается с CGRP, когда на С-конце добавлен дополнительный аминокислотный остаток (аланин) (который амидирован).

Таблица 7. Аффинность связывания Fab G1 с человеческим α -CGRP и вариантам, измеренная при 37°C (их аминокислотные последовательности см. в табл. 4)

CGRP на чипе	k_{on} (1/мс)	k_{off} (1/с)	K_D (нмоль)
1-37 (WT)	$4,68 \times 10^5$	$7,63 \times 10^{-5}$	0,16 (K_D высокого разрешения = 0,06)
19-37	$4,60 \times 10^5$	$7,30 \times 10^{-5}$	0,16
25-37	$3,10 \times 10^5$	$8,80 \times 10^{-5}$	0,28
F27A (25-37)	$3,25 \times 10^5$	$1,24 \times 10^{-4}$	0,38
V28A (25-37)	$3,32 \times 10^5$	$9,38 \times 10^{-5}$	0,28
P29A (25-37)	$2,26 \times 10^5$	$1,78 \times 10^{-4}$	0,79
T30A (25-37)	$1,79 \times 10^5$	$8,41 \times 10^{-5}$	0,47
N31A (25-37)	$2,17 \times 10^5$	$1,14 \times 10^{-4}$	0,53
V32A (25-37)	$2,02 \times 10^5$	$3,46 \times 10^{-4}$	1,71
G33A (25-37)	$2,07 \times 10^5$	0,0291	141
S34A (25-37)	$2,51 \times 10^5$	$7,64 \times 10^{-4}$	3,04
K35A (19-37)	$2,23 \times 10^5$	$2,97 \times 10^{-4}$	1,33
K35E (19-37)	$5,95 \times 10^4$	$5,79 \times 10^{-4}$	9,73
K35M (19-37)	$2,63 \times 10^5$	$1,34 \times 10^{-4}$	0,51
K35Q (19-37)	$1,95 \times 10^5$	$2,70 \times 10^{-4}$	1,38
F37A (25-37)	$8,90 \times 10^4$	$8,48 \times 10^{-3}$	95 (K_D в растворе = 172 нмоль)
38A (25-38A)	-	-	Связывание не обнаружено

Приведенные выше данные указывают на то, что эпитоп, который связывает антитело G1, находится на С-конце человеческого α -CGRP, и для связывания антитела G1 важны аминокислоты 33 и 37 на α -

CGRP человека. Также для связывания важно амидирование остатка F37.

Пример 5. Клиническое исследование.

Проводится клиническое исследование с целью оценки эффективности и безопасности фреманезумаба для профилактического лечения мигрени у пациентов с неадекватным ответом на предшествующее профилактическое лечение. Фреманезумаб (TEV-48125) представляет собой полностью гуманизированное моноклональное антитело IgG 2a/каппа для введения подкожным путем для профилактического лечения мигрени. Фреманезумаб является мощным, селективным связывателем пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP), блокирующим связывание обеих изоформ CGRP (α - и β -CGRP) с рецептором CGRP.

Цели.

Основная цель исследования - продемонстрировать эффективность введения фреманезумаба в виде ежемесячных и ежеквартальных подкожных (п/к) инъекций взрослым пациентам с мигренью с неадекватным ответом на два-четыре класса предшествующих профилактических препаратов по сравнению с плацебо.

Вторичной целью исследования является дальнейшая оценка эффективности фреманезумаба, вводимого в виде ежемесячных и ежеквартальных подкожных инъекций взрослым пациентам с мигренью с неадекватным ответом на два-четыре класса предшествующих профилактических препаратов по сравнению с плацебо.

Вторичной целью исследования также является оценка безопасности и переносимости фреманезумаба, вводимого в виде ежемесячных и ежеквартальных подкожных инъекций взрослым пациентам с мигренью с неадекватным ответом на два-четыре класса предшествующих профилактических препаратов по сравнению с плацебо.

Исследовательские цели заключаются в следующем:

дальнейшая оценка эффективности фреманезумаба у взрослых пациентов с мигренью с неадекватным ответом на два-четыре класса предшествующих профилактических препаратов по сравнению с плацебо оценка иммуногенности и влияния антител к препарату (ADA) на клинический исход;

изучение корреляции между фармакокинетическими параметрами и эффективностью фреманезумаба;

изучение взаимосвязи между генетическими полиморфизмами, появлением/тяжестью мигрени и эффективностью и безопасностью фреманезумаба.

Дизайн клинического исследования.

Многоцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование в параллельных группах с периодом открытой терапии проводится для оценки эффективности, безопасности и переносимости ежемесячного и ежеквартального подкожного (п/к) введения фреманезумаба по сравнению с плацебо у пациентов с хронической мигренью (ХМ) и эпизодической мигренью (ЭМ) с неадекватным ответом на предшествующее лечение профилактическими средствами. Исследование будет состоять из скринингового визита, вводного периода (28 дней), 12-недельного периода двойного слепого, плацебо-контролируемого лечения, 12-недельного периода открытого лечения и визита последующего наблюдения в течение 6 месяцев после последней дозы фреманезумаба для сбора образцов крови на присутствие ADA. В конце открытого периода лечения (через 4 недели после последней дозы) будет назначен визит в конце лечения (визит 8), и пациенты должны вернуться к лечению своими лечащими врачами. Пациенты должны получать стандартную медицинскую помощь после выхода из исследования или окончания 24-недельного периода лечения/исследования, в зависимости от обстоятельств.

Двойной слепой период.

На исходном визите (визит 2) пациенты случайным образом распределяются по группам лечения фреманезумабом (2 различных схемы дозирования) или плацебо в соотношении 1:1:1 следующим образом.

Для пациентов с ХМ:

п/к введение 675 мг фреманезумаба на визите 2 с последующим ежемесячным п/к введением 225 мг фреманезумаба в течение 2 месяцев; или

п/к введение 675 мг фреманезумаба на визите 2 с последующим ежемесячным п/к введением соответствующего плацебо в течение 2 месяцев; или

3 ежемесячные дозы соответствующего плацебо.

Для пациентов с ЭМ:

п/к введение фреманезумаба в дозе 225 мг плюс 2 инъекции соответствующего плацебо в качестве первой дозы с последующим ежемесячным п/к введением 225 мг фреманезумаба в течение 2 месяцев; или

п/к введение фреманезумаба в дозе 675 мг в качестве первой дозы с последующим ежемесячным п/к введением соответствующего плацебо в течение 2 месяцев; или 3 ежемесячные дозы соответствующего плацебо.

Период открытого лечения.

После визита 4 все пациенты, завершившие двойной слепой период, переходят в период открытого лечения. Все пациенты (ХМ и ЭМ) будут получать п/к 225 мг фреманезумаба ежемесячно в течение 3 месяцев, (визиты 5, 6 и 7).

Рандомизация и назначение лечения для двойного слепого периода выполняется с использованием электронной технологии интерактивного ответа (IRT). Исследование стратифицировано с учетом ХМ или ЭМ, пола, страны и особой группы неудач лечения, определяемой как пациенты с неадекватным ответом на вальпроовую кислоту. Кроме того, пациенты в особой группе неудач лечения должны иметь неадекватный ответ на 2-3 других класса профилактических препаратов от мигрени, определенных здесь. Соотношение пациентов с ХМ и с ЭМ в исследовании должно составлять приблизительно 50:50 в каждой подгруппе.

Период открытого лечения не будет рандомизирован, поскольку все пациенты будут получать одинаковую месячную дозу (225 мг фреманезумаба).

ХМ определяется как:

пациент соответствует следующим критериям ХМ согласно проспективно собранной исходной информации в течение 28-дневного вводного периода:

головная боль, наблюдающаяся в течение ≥ 15 дней.

В течение ≥ 8 дней выполнение любого из следующих условий:

диагностические критерии С и D из ICHD-3 для 1.1, "Мигрень без ауры";

диагностические критерии В и С из ICHD-3 для 1.2 "Мигрень с аурой";

вероятная мигрень (подтип мигрени, при котором отсутствует только один критерий мигрени);

пациент принимал триптан или производное спорыньи для лечения устойчивой головной боли.

ЭМ определяется как:

пациент соответствует следующим критериям ЭМ согласно проспективно собранной исходной информации в течение 28-дневного вводного периода: головная боль, наблюдающаяся в течение ≥ 6 дней, но < 15 дней. В течение ≥ 4 дней выполнение любого из следующих условий:

диагностические критерии С и D из ICHD-3 для 1.1, "Мигрень без ауры";

диагностические критерии В и С из ICHD-3 для 1.2 "Мигрень с аурой";

вероятная мигрень (подтип мигрени, при котором отсутствует только один критерий мигрени);

пациент принимал триптан или производное спорыньи для лечения устойчивой головной боли.

Лечение в слепом режиме вводят п/к один раз в месяц (приблизительно каждые 28 дней), в общей сложности 3 дозы (визиты 2, 3 и 4), а открытое лечение вводят в количестве в общей сложности 3 доз (визиты 5, 6, и 7). Заключительные оценки исследования выполняют на визите 8 (визит в конце лечения [ЕОТ]), приблизительно через 4 недели после введения последней дозы фреманезумаба. Визит последующего наблюдения назначено через 6,0 месяцев (> 5 периодов полужизни) после последнего введения исследуемого лекарственного средства для забора крови на ADA. Пациентам, которые прекращают лечение досрочно, визит последующего наблюдения будет назначен через 6,0 месяцев после последней дозы. Планируется, что общая продолжительность участия пациентов в исследовании составит 50 недель, включая вводный период продолжительностью 28 дней, период двойного слепого лечения продолжительностью 12 недель, период открытого лечения продолжительностью 12 недель и 1 визит последующего наблюдения в неделю 46. Ожидается, что пациенты пройдут всю продолжительность исследования, включая период открытого лечения и визит последующего наблюдения.

Конец исследования определяется как последний визит последнего пациента (визит последующего наблюдения, визит 9). Однако после окончания периода двойного слепого лечения последнего пациента произойдет промежуточная блокировка базы данных для анализа этой части данных исследования. Вторая промежуточная блокировка базы данных произойдет после окончания периода открытого лечения. Общая продолжительность исследования, включая 6-месячный период последующего наблюдения, составит приблизительно 2 года.

Конечные точки.

Первичной конечной точкой эффективности является среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднемесячного числа дней с мигренью в течение 12-недельного периода после 1-й дозы фреманезумаба.

Вторичные конечные точки для дальнейшей демонстрации эффективности включают: доля пациентов, достигших не менее 50% снижения среднемесячного числа дней с мигренью в течение 12-недельного периода после 1-й дозы фреманезумаба.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднемесячного числа дней с головной болью по меньшей мере средней степени тяжести в течение 12-недельного периода после 1-й дозы фреманезумаба.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднемесячного числа дней с мигренью в течение 4-недельного периода после 1-й дозы фреманезумаба.

Доля пациентов, достигших не менее 50% снижения среднемесячного числа дней с мигренью в течение 4-недельного периода после 1-й дозы фреманезумаба.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднемесячного числа дней использования любых препаратов для лечения острой головной боли в течение 12-недельного периода после 1-й дозы фреманезумаба.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней с головной болью по меньшей мере средней степени тяжести в течение 4-недельного периода после 1-й дозы фреманезумаба.

Вторичные конечные точки для демонстрации безопасности и переносимости включают: частота нежелательных явлений на протяжении всего исследования.

Анализ результатов клинических лабораторных тестов (биохимический анализ сыворотки, гематология, коагуляция и анализ мочи) в указанные моменты времени.

Анализ измерений основных показателей жизнедеятельности (систолическое и диастолическое артериальное давление, температура в ротовой полости и частота пульса) на каждом визите. Примечание: в случаях подозрения на анафилаксию и тяжелую гиперчувствительность будут измерять насыщение кислородом.

Анализ результатов электрокардиограммы (ЭКГ) с 12 отведениями в указанные моменты времени.

Использование сопутствующих лекарств для лечения нежелательных явлений во время исследования. Число (%) пациентов, которые не завершили исследование из-за нежелательных явлений.

Анализ клинически значимых изменений при физических осмотрах, включая массу тела.

Частота тяжелых реакций гиперчувствительности/анафилаксии. Суицидальные мысли и поведение, измеряемые по шкале eC-SSRS.

Исследовательские цели для демонстрации эффективности

Оценка эффективности фреманезумаба у взрослых пациентов с мигренью с неадекватным ответом на два-четыре класса предшествующих профилактических препаратов.

Исследовательские конечные точки для периода двойного слепого лечения:

доля пациентов, достигших по меньшей мере 75% снижения среднемесячного числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата.

Доля пациентов, достигших полного (100%) ответа (отсутствие головной боли) в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата.

Доля пациентов, достигших полного (100%) ответа (отсутствие головной боли) на протяжении по меньшей мере одного месяца в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата. Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднемесячного числа часов головной боли по меньшей мере средней степени тяжести в течение 12-недельного периода после (1-й) дозы исследуемого препарата.

Доля пациентов, достигших по меньшей мере 50% снижения числа дней мигрени в течение 4-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата, для которых этот уровень эффекта сохраняется в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата.

Доля пациентов, достигших по меньшей мере 75% снижения числа дней мигрени в течение 4-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата, для которых этот уровень эффекта сохраняется в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднемесячного числа дней с тошнотой или рвотой в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднемесячного числа дней с фотофобией и фонофобией в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднемесячного числа дней использования специфических для мигрени препаратов для лечения острой головной боли (триптаны и соединения спорыньи) в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата для пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение топирамата для лечения мигрени.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата для пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение онаботулинтоксина А для лечения мигрени.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата для пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение вальпроевой кислоты от мигрени.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 1-й дозы исследуемого препарата для подгруппы пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение 2-3 классов профилактических препаратов и вальпроевой кислоты от мигрени.

Доля пациентов, достигших по меньшей мере 50% снижения среднемесячного числа дней с мигренью в течение 12-недельного периода после 1-й дозы фреманезумаба для подгруппы пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение 2-3 классов профилактических препаратов и вальпроевой кислоты от мигрени.

Среднее изменение от исходного уровня (день 0) балла инвалидизации, измеренное с помощью 6-компонентной оценки влияния головной боли (НПТ-6), через 4 недели после введения 3-й дозы исследуемого

мого препарата. Среднее изменение от исходного уровня (0 день) балла инвалидизации, измеренное с помощью опросника для оценки степени инвалидизации, обусловленной мигренью (MIDAS), через 4 недели после введения 3-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение качества жизни от исходного уровня (день 0), измеренное с помощью специфического для мигрени опросника качества жизни (MSQOL), через 4 недели после введения 3-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (день 0) состояния здоровья, измеренное с помощью опросника EuroQol-5 Dimension (EQ-5D-5L), через 4 недели после введения 3-й дозы исследуемого препарата. Среднее изменение от исходного уровня (день 0) статуса депрессии пациента, измеренное с помощью Опросника о состоянии здоровья пациента из двух пунктов (PHQ-2) и Опросника о состоянии здоровья пациента из девяти пунктов (PHQ-9), через 4 недели после введения 3-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (день 0) производительности труда пациента и ухудшения его активности, измеренное с помощью опросника "Производительность труда и снижение активности" (WPAI), через 4 недели после введения 3-й дозы исследуемого препарата. Среднее изменение от исходного уровня (день 0) удовлетворенности пациента, измеренное по шкале "Общей оценки динамики состояния пациентом" (PGIC) у пациента, через 4 недели после 3-й дозы исследуемого препарата.

Исследовательские конечные точки для периода открытого лечения.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 4-й дозы фреманезумаба.

Доля пациентов, достигших по меньшей мере 50% снижения от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 4-й дозы фреманезумаба.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа дней с головной болью по меньшей мере средней степени тяжести в течение 12-недельного периода после 4-й дозы фреманезумаба.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа дней использования любых препаратов для лечения острой головной боли в течение 12-недельного периода после 4-й дозы фреманезумаба.

Доля пациентов, достигших по меньшей мере 75% снижения от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата.

Доля пациентов, достигших полного (100%) ответа (отсутствие головной боли) в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата.

Доля пациентов, достигших полного (100%) ответа (отсутствие головной боли) на протяжении по меньшей мере одного месяца в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата. Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа часов головной боли по меньшей мере средней степени тяжести в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата.

Доля пациентов, достигших по меньшей мере 50% снижения от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 4-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата, для которых этот уровень эффекта сохраняется в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата.

Доля пациентов, достигших по меньшей мере 75% снижения от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 4-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата, для которых этот уровень эффекта сохраняется в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа дней с тошнотой или рвотой в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа дней с фотофобией и фонофобией в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) среднemesячного числа дней использования специфических для мигрени препаратов для лечения острой головной боли (триптаны и соединения спорыньи) в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата для пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение топирамата для лечения мигрени.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата для пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение онаботулинтоксина А для лечения мигрени.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата для пациентов, у которых в прошлом

неудачным было применение вальпроевой кислоты от мигрени.

Среднее изменение от исходного уровня (28-дневный вводный период) числа дней мигрени в течение 12-недельного периода после 4-й дозы исследуемого препарата для подгруппы пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение 2-3 классов профилактических препаратов и вальпроевой кислоты от мигрени.

Доля пациентов, достигших по меньшей мере 50% снижения среднемесячного числа дней с мигренью в течение 12-недельного периода после 4-й дозы фреманезумаба для подгруппы пациентов, у которых в прошлом неудачным было применение 2-3 классов профилактических препаратов и вальпроевой кислоты от мигрени. Среднее изменение от исходного уровня (день 0) балла инвалидизации, измеренное с помощью 6-компонентной Оценки влияния головной боли (HIT-6), через 4 недели после введения 6-й дозы исследуемого препарата. Среднее изменение от исходного уровня (0 день) балла инвалидизации, измеренное с помощью Опросника для оценки степени инвалидизации, обусловленной мигренью (MIDAS), через 4 недели после введения 6-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение качества жизни от исходного уровня (день 0), измеренное с помощью Специфического для мигрени опросника качества жизни (MSQOL), через 4 недели после введения 6-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (день 0) состояния здоровья, измеренное с помощью опросника EuroQol-5 Dimension (EQ-5D-5L), через 4 недели после введения 6-й дозы исследуемого препарата. Среднее изменение от исходного уровня (день 0) статуса депрессии пациента, измеренное с помощью Опросника о состоянии здоровья пациента из двух пунктов (PHQ-2) и Опросника о состоянии здоровья пациента из девяти пунктов (PHQ-9), через 4 недели после введения 6-й дозы исследуемого препарата.

Среднее изменение от исходного уровня (день 0) производительности труда пациента и ухудшения его активности, измеренное с помощью опросника "Производительность труда и снижение активности" (WPAI), через 4 недели после введения 6-й дозы исследуемого препарата.

Исследовательские конечные точки для периодов и двойного слепого, и открытого лечения.

Оценка иммунотенной реакции на фреманезумаб и влияния ADA на клинические исходы у пациентов, получавших п/к фреманезумаб. Изучение взаимосвязи между генетическими полиморфизмами (в том числе в комплексе рецептор-лиганд связанного с геном кальцитонина пептида (CGRP), в генах предрасположенности к мигрени и в еще не обнаруженных локусах) и появлением/тяжестью мигрени, нежелательными явлениями, вызванными препаратом, и эффективностью фреманезумаба.

Исследуемая популяция.

Исследуемая популяция состоит из пациентов мужского и женского пола в возрасте от 18 до 70 лет включительно, с мигренью в анамнезе (согласно определению критериев Международной классификацией расстройств головной боли, 3 редакция [ICHD-3] [IHS 2013]) в течение не менее 12 месяцев до скринингового визита и диагноза эпизодической или хронической мигрени, проспективно задокументированного посредством обзора данных о головной боли, ежедневно регистрируемых в электронном дневнике для записи головной боли в течение 28-дневного вводного периода.

На момент скринингового визита пациенты должны иметь документально подтвержденный неадекватный ответ на два-четыре класса предшествующих профилактических препаратов от мигрени в течение последних 10 лет (на основании медицинской карты или подтверждения лечащего врача).

Подгруппа этих пациентов (не менее 120 пациентов) должна иметь документированный неадекватный ответ на 2-3 класса предшествующих профилактических препаратов и, кроме того, неадекватный ответ на вальпроевую кислоту. Все неадекватные ответы должны наблюдаться в течение последних 10 лет (на основании медицинской карты или подтверждения лечащего врача).

Предшествующие профилактические препараты для лечения мигрени следующие (см. Martelletti et al., J. Headache Pain, 15(1):47, 2014):

бета-блокаторы: пропранолол, метопролол, атенолол и бисопролол;

противосудорожные препараты: топирамат;

трициклики: амитриптилин;

блокатор кальциевых каналов: флунаризин;

антагонист рецептора ангиотензина II: кандесартан;

онаботулинумтоксин А;

вальпроевая кислота.

На протяжении всего исследования использование перечисленных выше лекарств ежедневно для других показаний не допускается. Любые из перечисленных лекарств разрешены, если они применяются в виде местных или глазных капель. Другие лекарства в тех же классах, но не включенные в этот список, разрешены.

Неадекватный ответ на предшествующие профилактические лекарства от мигрени (включая вальпроевую кислоту) определяется следующим образом.

У пациентов должен быть задокументированный неадекватный ответ (на основании медицинской карты или подтверждения лечащего врача) на два-четыре класса предшествующих профилактических

препаратов из приведенного выше списка, независимо от того, к какому классу относится препарат.

Неадекватный ответ определяется следующим образом: отсутствие клинически значимого улучшения, согласно суждению лечащего врача, после по меньшей мере трех месяцев терапии в стабильной дозе, которая считается подходящей для профилактики мигрени в соответствии с руководствами, принятыми в данной стране, или когда лечение должно быть прервано из-за нежелательных явлений, которые сделали его непереносимым для пациента, или препарат противопоказан или не подходит для пациента. Трехмесячный период может не применяться, если препарат является не переносимым, противопоказан или не подходит для пациента.

Если не принесшим ранее успеха профилактическим препаратом является онаботулинумтоксин А, с момента последней серии инъекций должно пройти как минимум две серии инъекций и три месяца до скринингового визита.

Критерии включения пациентов.

Пациенты включаются в исследование, только если они отвечают всем следующим критериям.

- a) Пациент способен дать подписанное информированное согласие.
- b) Пациент мужского или женского пола в возрасте от 18 до 70 лет включительно.
- c) Пациент имеет диагноз мигрени с началом в возрасте ≤ 50 лет.
- d) По мнению исследователей, пациент находится в хорошем состоянии, что определяется на основании истории болезни, физического осмотра, лабораторных исследований и ЭКГ.
- e) Масса тела ≥ 45 кг и индекс массы тела (ИМТ) в диапазоне от 17,5 до 34,9 кг/м² (включительно).
- f) У пациента в анамнезе мигрень (в соответствии с критериями ICHD-3 [IHS 2013]) или клиническое суждение предполагает диагноз мигрени (который нельзя объяснить лучше другим диагнозом ICHD-3) ≥ 12 месяцев до скринингового визита.
- g) Пациент удовлетворяет следующим критериям мигрени согласно проспективно собранной исходной информации в течение 28-дневного вводного периода.

Для пациентов с ХМ:

головная боль, наблюдающаяся в течение ≥ 15 дней.

В течение ≥ 8 дней выполнение любого из следующих условий:

- i) диагностические критерии С и D из ICHD-3 для 1.1, "Мигрень без ауры";
- ii) диагностические критерии В и С из ICHD-3 для 1.2 "Мигрень с аурой";
- iii) вероятная мигрень (подтип мигрени, при котором отсутствует только один критерий мигрени);
- iv) пациент принимал триптан или производное спорыньи для лечения устойчивой головной боли.

Для пациентов с ЭМ:

головная боль, наблюдающаяся в течение ≥ 6 дней.

В течение ≥ 4 дней выполнение любого из следующих условий:

- i) диагностические критерии С и D из ICHD-3 для 1.1, "Мигрень без ауры";
- ii) диагностические критерии В и С из ICHD-3 для 1.2 "Мигрень с аурой";
- iii) вероятная мигрень (подтип мигрени, при котором отсутствует только один критерий мигрени);
- iv) пациент принимал триптан или производное спорыньи для лечения устойчивой головной боли.

h) На момент скрининга у пациента должен был задокументированный неадекватный ответ на два-четыре класса предыдущих профилактических лекарств от мигрени, согласно определению в данном документе, в течение последних 10 лет (на основании медицинской карты или подтверждения лечащего врача). Неадекватный ответ на предшествующие профилактические лекарства от мигрени (включая вальпроовую кислоту) определяется как: отсутствие клинически значимого улучшения согласно лечащего врача после по меньшей мере 3 месяцев терапии в стабильной дозе, которая считается подходящей для профилактики мигрени в соответствии с руководствами, принятыми в данной стране, или когда лечение должно быть прервано из-за нежелательных явлений, которые сделали его непереносимым для пациента, или препарат противопоказан или не подходит для пациента. Трехмесячный период не применяется, если препарат является не переносимым или противопоказан пациенту. Если если предыдущим профилактическим препаратом является онаботулинумтоксин А, с момента последней серии инъекций должно пройти как минимум две серии инъекций и три месяца.

i) Пациент соглашается не начинать прием каких-либо лекарств от мигрени, согласно определению в настоящем документе, в течение вводного периода, периода двойного слепого лечения и периода открытого лечения. К моменту скринингового визита должно минуть по меньшей мере пять периодов полувыведения этих лекарств со времени, когда пациент принимал какие-либо лекарства от мигрени, согласно определению в настоящем документе.

j) Дозы других рецептурных лекарств, которые не определены в качестве предшествующих препаратов для профилактики мигрени, согласно определению в настоящем документе, должны быть стабильными в течение не менее 2 месяцев до скринингового визита, причем в течение периода двойного слепого лечения в исследовании изменений дозы не ожидается.

k) Пациент продемонстрировал соблюдение режима заполнения электронного дневника головной боли во время вводного периода, вводя в течение вводного периода данные о головной боли суммарно

как минимум за 24 дня (соблюдение режима заполнения дневника ~85%).

l) Женщины могут быть включены только в случае отрицательного результата теста на бета-хорионический гонадотропин человека (β -ХГЧ) в сыворотке крови на скрининговом визите, стерильности или постменопаузального периода.

m) Женщины, обладающие репродуктивным потенциалом (WOCBP), чьи партнеры-мужчины являются потенциально фертильными (например, без вазэктомии), должны использовать высокоэффективные методы контроля над рождаемостью в течение периода исследования и периода последующего наблюдения (т.е. начиная со скринингового визита) и в течение 6,0 месяцев после прекращения ИЛП.

n) Мужчины должны быть бесплодными или, если они потенциально могут быть фертильными/репродуктивно компетентными (не являются хирургически [например, в результате вазэктомии] или врожденно бесплодными), а их партнерши обладают репродуктивным потенциалом, должны использовать вместе со своими партнершами приемлемые методы контроля рождаемости на протяжении всего исследования и в течение 6,0 месяцев после прекращения ИЛП.

o) Пациент должен быть готов и способен соблюдать ограничения исследования, оставаться в клинике в течение требуемого периода времени в течение периода исследования и возвращаться в клинику для оценок последующего наблюдения.

Критерии исключения пациентов.

Пациенты исключаются из участия в этом исследовании, если они соответствуют любому из следующих критериев.

a) На момент скринингового визита пациент принимает любые профилактические лекарства от мигрени, как определено в настоящем документе, независимо от медицинских показаний, в течение более 5 дней, и ожидает продолжения приема этих лекарств.

b) Пациент получал онаботулинтоксин А для лечения мигрени или по любым медицинским или косметическим причинам, требующим инъекций в голову, лицо или шею в течение 3 месяцев до скринингового визита.

c) Пациент использует препараты, содержащие опиоиды (включая кодеин) или барбитураты (включая бутальбитал/аспирин/кофеин (Фиоринал®, Actavis plc), бутальбитал/парацетамол/кофеин (Фиорисет®, Cardinal Health) или любую другую комбинацию, содержащую бутальбитал), более 4 дней в течение вводного периода для лечения мигрени или по любой другой причине.

d) Пациент использовал вмешательство/устройство (например, запланированную проводниковую анестезию и транскраниальную магнитную стимуляцию) для лечения мигрени в течение 2 месяцев до скринингового визита.

e) Пациент использует триптаны/алкалоиды спорыньи в качестве профилактической терапии при мигрени.

f) Пациент использует нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) в качестве профилактической терапии мигрени практически ежедневно по другим показаниям.

Примечание. Допускается применение низких доз аспирина (например, 81 мг) для профилактики сердечнососудистых заболеваний.

g) Пациент страдает от постоянных головных болей, определяемых как головные боли в течение более 80% времени бодрствования, и менее 4 дней без головной боли в месяц. Ежедневная головная боль является приемлемой, если пациент испытывает головную боль в течение 80% или менее от времени бодрствования в большинство дней.

h) У пациента имеет клинически значимое гематологическое, сердечное, почечное, эндокринное, легочное, желудочно-кишечное, мочеполовое, неврологическое, печеночное или глазное заболевание, которое, по мнению исследователя, может поставить под угрозу или повлиять на способность пациента участвовать в этом исследовании.

i) Свидетельство наличия в настоящем или в анамнезе клинически значимых психиатрических проблем, которые, по мнению исследователя, могут поставить под угрозу или повлиять на способность пациента участвовать в этом исследовании, включая большую депрессию, паническое расстройство или генерализованное тревожное расстройство, любую попытку самоубийства в прошлом или суицидальные мысли с определенным планом в последние два года до скринингового визита или текущие суицидальные мысли, измеренные по eC-SSRS.

j) Наличие в анамнезе клинически значимых сердечно-сосудистых заболеваний или сосудистой ишемии (например, ишемии миокарда, неврологической ишемии (например, церебральной ишемии), периферической ишемии конечностей или других ишемических событий) или тромбоэмболических событий (тромботических или эмболических событий артериального или венозного происхождения), таких как острое нарушение мозгового кровообращения (включая транзиторные ишемические атаки), тромбоз глубоких вен или тромбоэмболия легочной артерии.

k) Наличие в анамнезе инфекции вируса иммунодефицита человека, туберкулеза или хронической инфекции гепатита В или С.

l) Наличие в настоящем или в анамнезе рака, за исключением надлежащим образом вылеченного

немеланомного рака кожи за последние 5 лет.

m) Беременные или кормящие женщины или пациенты, которые планируют забеременеть во время исследования.

n) Участие в клиническом исследовании нового химического вещества или рецептурного лекарственного средства в течение 2 месяцев до скринингового визита (или 3 месяцев в случае биологических препаратов, если период полужизни биологических препаратов неизвестен) или 5 периодов полужизни, в зависимости от того, что дольше, или участие в настоящее время в другом исследовании ИЛП (или медицинского устройства).

o) Любое предшествующее применение моноклонального антитела, нацеленного на путь CGRP (такого как AMG 334, ALD304, LY2951742 или фреманезумаб).

p) Любой результат исходного ЭКГ с 12 отведениями, сочтенный клинически значимым по мнению исследователя.

q) Любой результат обследования, который, по мнению исследователя, является клинически значимой аномалией, включая данные биохимии сыворотки, гематологии, коагуляции и анализа мочи (тесты с аномальным результатом могут быть повторены для подтверждения).

r) Печеночные ферменты (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза и щелочная фосфатаза) $>1,5 \times$ верхнего предела нормального (ВПН) диапазона после подтверждения в повторном тесте или подозреваемое гепатоцеллюлярное повреждение, которое соответствует критериям закона Хая на скрининговом визите.

s) Сывороточный креатинин $>1,5 \times$ ВПН, клинически значимая протеинурия или признаки заболевания почек на скрининговом визите.

t) Наличие в анамнезе злоупотребления алкоголем в течение 2 лет до скринингового визита.

u) Наличие в анамнезе злоупотребления наркотиками и лекарственными препаратами в течение последних 2 лет или зависимости от наркотиков и лекарственных препаратов в течение последних 5 лет.

v) Пациент не способен участвовать в исследовании или успешно завершить его, по мнению его врача или исследователя, по любой из следующих причин:

является умственно или юридически недееспособным или неспособным дать согласие по любой причине; находится под стражей по административному или юридическому решению, под опекой или помещен в санаторий или социальное учреждение;

отсутствует возможность связаться в случае чрезвычайной ситуации;

наличие любого другого состояния, которое, по мнению исследователя, делает пациента неподходящим для включения в исследование.

w) Пациент является сотрудником центра исследования или спонсора, который непосредственно участвует в исследовании или родственник такого сотрудника. x. Пациент ранее уже не прошел скрининг для исследования.

Последовательности антитела.

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи G1

(SEQ ID NO:1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSES
DASATHYAEAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNY
WGQGTLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи G1

(SEQ ID NO:2)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYL
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIK

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

GFTFSNYWIS

G1 CDR H2 (расширенная CDR) (SEQ ID NO:4)

EIRSESDASATHYAEAVKG

G1 CDR H3 (SEQ ID NO:5)

YFDYGLAIQNY

G1 CDR L1 (SEQ ID NO:6)

KASKRVTTYVS

G1 CDR L2 (SEQ ID NO:7)

GASNRYL

G1 CDR L3 (SEQ ID NO:8)

SQSYNYPYT

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

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCCT
GCGTCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGTTTCACCTTCTCCAATACTGGATCTCCTG
GGTTCGTCAAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTTGCTGAAATCCGTTCCG
AATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAAAGGTCGTTTCACCA
TCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTG
CTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTA
TCCAGAACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCC

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

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACGTG
CTACCCCTGTCCTGCAAAGCTTCAAACGGGTTACCACCTACGTTTCCTGGTACCAG
CAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACCGTTACCT
CGGTATCCAGCTCGTTTCTCCGGTCCGGTCCGGTACCGACTTCACCCTGACCA
TCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTCAGTCCTACAAC
TACCCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAAATCAAA

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи полноразмерного антитела G1 (включающего описанный здесь модифицированный IgG2) (SEQ ID NO:11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSES
DASATHYAEAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAYFDYGLAIQNY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYL
GIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи полноразмерного антитела G1
(включая описанный здесь модифицированный IGG2) (SEQ ID NO:13)

GAAGTTCAGCTGGTTGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCAGGTGGTTCCT
GCGTCTGTCTGCGCTGCTTCCGGTTTACCTTCTCCAACTACTGGATCTCTCTG
GGTTCGTCAGGCTCCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGCTGAAATCCGTTCCG
AATCCGACGCGTCCGCTACCCATTACGCTGAAGCTGTAAAGGTCGTTTCACCA
TCTCCCGTGACAACGCTAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGTG
CTGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCCTGGCTTACTTTGACTACGGTCTGGCTA
TCCAGAACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCCTCCGCCTCCACC
AAGGGCCCCTCTGTCTTCCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGAG
CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCAGAACCTGTGACCG
TGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCAGCTGTC
CTGCAGTCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCCAG
CAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAAGTACACAAGCCAAGCAACA
CCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTTGTGTGGAGTGTCACCTTGT
CCAGCCCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCAAA
GGACACCTGATGATCTCCAGAACCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACG
TGTCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAG
AGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAGGAG
TATAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGAAGTCCATCCAGCATCGAGAAGACCATC
TCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCCCCATC
CAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGAT
TCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGAGAAC
AACTATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCTGTAT
TCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTTG

TTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGCCTGTCCC
TGTCTCCAGGAAAGTAA

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

GAAATCGTTCTGACCCAGTCCCCGGCTACCCTGTCCCTGTCCCCAGGTGAACG
TGCTACCCTGTCCTGCAAAGCTTCAAACGGGTACCACCTACGTTTCCTGGTA
CCAGCAGAAACCCGGTCAGGCTCCTCGTCTGCTGATCTACGGTGCTTCCAACC
GTTACCTCGGTATCCCAGCTCGTTTCTCCGGTTCCGGTTCCGGTACCGACTTCA
CCCTGACCATCTCCTCCCTGGAACCCGAAGACTTCGCTGTTTACTACTGCAGTC
AGTCCTACAACCTACCCCTACACCTTCGGTCAGGGTACCAAACCTGGAAATCAAAC
GCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCCGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCGCGCAGAG
CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAG
AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT
GACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
CCCATCAGGGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGTGC
TAA

Сравнение аминокислотной последовательности человеческого и крысиного CGRP (человеческий α -CGRP (SEQ ID NO: 15); человеческий β -CGRP (SEQ ID NO: 43); крысиный α -CGRP (SEQ ID NO: 41) и крысиный β -CGRP (SEQ ID NO:44)):
NH₂-ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (human α -CGRP)
NH₂-ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (human β -CGRP)
NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSEAF-CONH₂ (rat α -CGRP)
NH₂-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSKAF-CONH₂ (rat β -CGRP)

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSEYHS
GVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGTKLEIK

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

HCVR22 (SEQ ID NO:59)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGDTRYIQKFAGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARLSDYVSGFSY
WGQGTLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

LCVR18 (SEQ ID NO:60)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSEYHS
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGTKLEIK

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

HCVR23 (SEQ ID NO:61)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGKTVYIQKFAGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARLSDYVSGFSY
WGQGTLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

LCVR19 (SEQ ID NO:62)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKDISKYNWYQQKPGKAPKLLIYYTSGYHSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGTKVEIK

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

HCVR24 (SEQ ID NO:63)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGKTVYIQKFADRVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLSDYVSGFGYW
GQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

LCVR20 (SEQ ID NO:64)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIDKYNWYQQKPGKAPKLLIYYTSEYHSG
VPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGTKLEIK

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGKTVYIQKFAGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARLSDYVSGFGY
WGQGTTLVTVSS

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDKYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSGYHS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGTKVEIK

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

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFGNYWMQWVRQAPGQGLEWMGAIYE
GTGKTVYIQKFAGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLSDYVSGFGYW
GQGTTLVTVSS

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

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLA
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIK
R

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNWVRQAPGKGLEWVGVIING
ATYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTTLTVS
S

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

QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLA
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTKVEIK
R

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

HCVR30 (SEQ ID NO:71)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVIN
DNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTV
SS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

LCVR31 (SEQ ID NO:72)

QVLTQSPSSLSASVGDRTINCASQSVYDNNYLAWYQQKPGKVPKQLIYSTSTLA
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCFVFGGGTKVEIK
R

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

HCVR32 (SEQ ID NO:73)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGKGLEWVGIVIN
DNTYYASWAKGRFTISRDNSTTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGLTVTV
SS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

LCVR33 (SEQ ID NO:74)

QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCASQSVYHNTYLAWYQQKPGQPPKQLIYDASTLA
SGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCNDAAAYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTEWV
KR

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

HCVR34 (SEQ ID NO:75)

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYMNNWVRQAPGKLEWIGVINGAT
YYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGPGLTVTVSS

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

QVLTQSPSSLSASVGDRTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKVPKQLIYDASTLA
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCFVFGGGTKVEIK
 R

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSGYMNNWVRQAPGKGLEWVGIVING
 ATYYASWAKGRFTISRDNSTTKVYLMNSLRAEDTAVYFCARGDIWGQGTLLTVS
 S

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

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP
 SGIPDRFSGSKSGTSTTLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSAWVFGGGTKLTVL

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи
HCVR38 (SEQ ID NO:79)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHVWRQAPGKGLEWVAVISFD
 GSIKYSVDSVKGRFTISRDNSTNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLNYYDSSGY
 NYKYYGMAVWGQGTITVTVSS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения мигрени у субъекта, указанный способ включает
 выбор субъекта, который неадекватно отвечает на два или более различных классов средств для профилактического лечения мигрени, выбранных из группы, состоящей из бета-блокаторов, противосудорожных средств, трициклов, блокаторов кальциевых каналов, антагонистов рецепторов ангиотензина II, онаботулинумтоксина А и вальпроатов; и
 введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества гуманизированного антагонистического моноклонального антитела против пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP), которое содержит CDR H1, представленную в SEQ ID NO: 3; CDR H2, представленную в SEQ ID NO: 4; CDR H3, представленную в SEQ ID NO: 5; CDR L1, представленную в SEQ ID NO: 6; CDR L2, представленную в SEQ ID NO: 7; и CDR L3, представленную в SEQ ID NO: 8.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в дозе приблизительно 225 мг с последующими дозами приблизительно 225 мг с интервалами в один месяц.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение включает введение антитела субъекту из предварительно заполненного шприца, предварительно заполненного шприца с предохранительным устройством для иглы, шприца-ручки или автоматического устройства для инъекций, содержащих дозу указанного моноклонального антитела.
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в виде состава, содержащего антитело в концентрации по меньшей мере приблизительно 150 мг/мл.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в объеме менее 2 мл.
7. Способ по п.1, включающий введение указанному субъекту второго агента одновременно или последовательно с указанным моноклональным антителом, причем второй агент представляет собой препарат для лечения острой головной боли.
8. Способ по п.7, отличающийся тем, что после введения моноклонального антитела ежемесячное использование субъектом указанного второго агента снижается по меньшей мере на 15%.
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в дозе приблизительно 675 мг.
10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанную дозу приблизительно 675 мг вводят в виде трех отдельных инъекций по приблизительно 225 мг.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят в дозе приблизительно 675 мг с последующими дозами приблизительно 675 мг, вводимыми каждый квартал.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело вводят подкожно.

13. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанную дозу приблизительно 675 мг вводят в виде трех отдельных инъекций по приблизительно 225 мг.

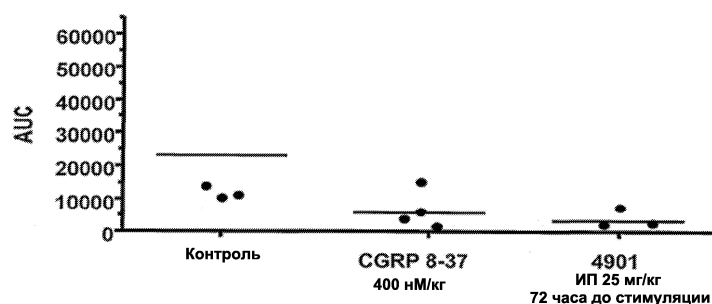
14. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 1.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 2.

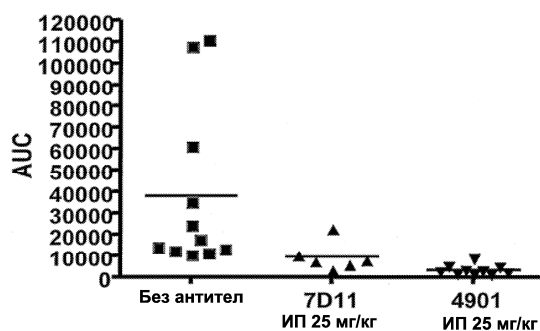
16. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную как SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, представленную как SEQ ID NO: 2.

Fab	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (мутант/родитель)										
				F27A	V28A	P29A	T30A	N31A	V32A	G33A	S34A	K35A	F37A	
7E9	1.0	1.1±0.8	0.14±0.05	1.0	1.0	26	7	9	41	1256	69	4	3598	
8B6	1.1	1.5±1.2	0.45±0.08	1.0	1.0	9	2.2	3	5	496	26	3	2827	
10A8	2.1	2.4±1.4	1.0±0.2	1.0	1.0	9	4	4	11	36	82	13	2153	
7D11	4.4	10±7	3.4±0.4	1.1	1.0	7	4	5	5	86	18	1.4	420	
6H2	9.3	7.8±0.2	8.5±0.5	0.9	1.0	1.0	0.8	4	11	14	0.5	1.0		
4901	60.5	52±12	296±113	0.8	0.8	0.2	0.2	0.3	0.9	1.3	0.8	0.3		
14E10	79.7	91±3	117.4±0.7	0.8	0.8	11	3	18	2	1	3	0.4 ^b		
9B8	84.7	76±20	96±28	0.8	0.8	0.6	0.6	0.7	0.6	1.3	4	0.4 ^b		
13C2	94.4	86±13	137±5	0.7	0.7	0.5	0.4	0.6	0.2	0.9	1.1	0.4 ^b		
14A9	148.4	219±114	246±20	0.8	0.7	0.7	0.5	0.8	0.7	1.6	1.3	6		
6D5	209.9	207±26	378±22	0.8	0.7	0.5	0.4	0.6	0.5	3	1.1	5		
1C5	296.4	223±51	430±173	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6	0.6	1.1	1.1	5		

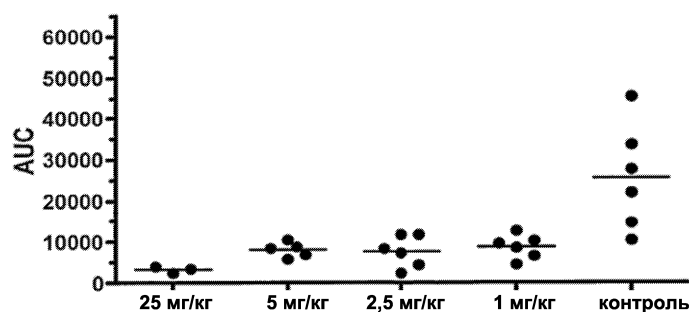
Фиг. 1



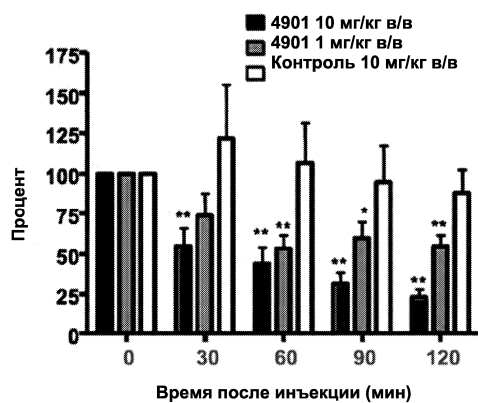
Фиг. 2А



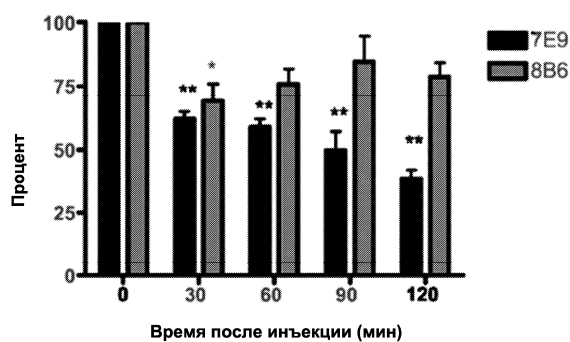
Фиг. 2В



Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4В

Жирный шрифт = CDR по Кабат
Подчеркивание = CDR по Чотиа

Тяжелая цепь G1

```

1      5      10      15      20      25      30      H1
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
31      35      40      45      50      55      60      H2
HYWISWVRQAPGKGLEWVAEIRSESDASAT
41      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90
HYAEAVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRA
91      95      100      105      110      115      120      H3
EDTAVYYCLAYFDYGLAIGNYWGQGTLLVTV
121 122
SS

```

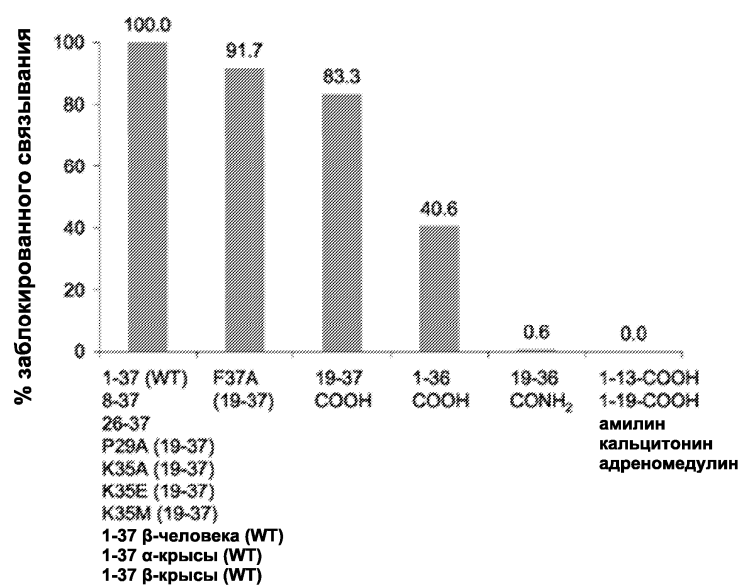
Легкая цепь G1

```

1      5      10      15      20      25      30      L1
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASRRVT
31      35      40      45      50      55      60      L2
TYVSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYLCIPA
41      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90
RFGSGSGSGTDFLTLTISSELPEDFAVYYCSQ
91      95      100      105      107      L3
SYNYPYTFGQGTGLEIK

```

Фиг. 5



Конкурирующие пептиды

Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2