



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



* B R 1 2 2 0 2 0 0 1 7 6 4 8 B 1 *

(11) BR 122020017648-2 B1

(22) Data do Depósito: 20/03/2015

(45) Data de Concessão: 12/11/2024

(54) Título: COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO OU REDUÇÃO DA INCIDÊNCIA DE ENXAQUECA COMPREENDENDO UM ANTICORPO MONOCLONAL QUE INIBE A VIA DO PEPTÍDEO RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA

(51) Int.Cl.: A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 21/03/2014 US 61/968,897; 23/02/2015 US 62/119,778; 24/11/2014 US 62/083,809.

(73) Titular(es): TEVA PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL GMBH.

(72) Inventor(es): MARCELO BIGAL; SARAH WALTER; HENRY STERN; MICHAEL CHANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2015021887 de 20/03/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/143409 de 24/09/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/08/2020

(62) Pedido Original do Dividido: BR112016021423-4 - 20/03/2015

(57) Resumo: A invenção apresenta métodos para a prevenção ou tratamento de distúrbios associados a CGRP, tais como sintomas vasomotores e/ou dores de cabeça (por exemplo, enxaqueca, dor de cabeça em salvas e dor de cabeça de tensão) por administração de um anticorpo antagonista anti-CGRP. Composições para uso nos métodos divulgados são também fornecidas. Anticorpo antagonista G1 e anticorpos derivados de G1 direcionados a CGRP, também são descritos.

“COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO OU REDUÇÃO DA INCIDÊNCIA DE ENXAQUECA COMPREENDENDO UM ANTICORPO MONOCLONAL QUE INIBE A VIA DO PEPTÍDEO RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA”

[001] Dividido do BR1120160214234, depositado em 20/03/2015.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[002] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente U.S. Provisória No. 61/968.897, depositado em 21 de março de 2014, Pedido de Patente Provisória No. 62/083,809, depositado em 24 de novembro de 2014 e Pedido de Patente U.S. Provisória No. 62/119.778, depositado em 23 de fevereiro de 2015, cujos pedidos são incorporados aqui por referência em suas totalidades, para todos os fins.

Antecedentes

[003] O CGRP (peptídeo relacionado ao gene de calcitonina) é um neuropeptídeo de 37 aminoácidos que pertence à família de peptídeos que inclui calcitonina, adrenomedulina e amilina. Nos seres humanos, existem duas formas de CGRP (α -CGRP e β -CGRP) e elas têm semelhança de atividades. Eles variam em três aminoácidos e apresentam distribuição diferencial. Pelo menos dois subtipos de receptores de CGRP também podem ser responsáveis por atividades diferenciais. O CGRP é um neurotransmissor no sistema nervoso central e mostrou-se um vasodilatador potente na periferia, onde os neurônios contendo CGRP são intimamente associados aos vasos sanguíneos. A vasodilatação mediada por CGRP também está associada com a inflamação neurogênica, como parte de uma cascata de eventos que resulta em um extravasamento de plasma e na vasodilatação da microvasculatura, e está presente na enxaqueca.

[004] O CGRP tem se destacado por sua possível ligação com sintomas vasomotores (Wyon et al. Scand. J. Urol. Nephrol. 35: 92-96 (2001); Wyon et al. Menopause 7(1):25-30 (2000)). Os sintomas vasomotores (VMS), como afrontamentos e suores noturnos, são os sintomas mais comuns associado à menopausa, ocorrendo

em 60% a 80% de todas as mulheres após a menopausa natural ou induzida por cirurgia. Os afrontamentos podem ser uma resposta adaptativa do sistema nervoso central (CNS) aos esteroides sexuais em redução (Freedman *Am. J. Human Biol.* 13:453-464 (2001)). Até o momento, as terapias mais eficazes para os afrontamentos são tratamentos à base de hormônios, incluindo estrógenos e/ou algumas progestinas. Os tratamentos hormonais podem ser eficazes para aliviar os afrontamentos, mas não são adequados para todas as mulheres. Os sintomas psicológicos e emocionais observados, como nervosismo, fadiga, irritabilidade, insônia, depressão, perda de memória, dores de cabeça, ansiedade, nervosismo ou incapacidade de concentração são consideradas como sendo causadas pela privação de sono após o afrontamento e os suores noturnos (Kramer et al., In: Murphy et al., 3^{sup}.rd Int'l Symposium on Recent Advances in Urological Cancer Diagnosis and Treatment-Proceedings, Paris, France: SCI: 3-7 (1992)).

[005] Os homens também sofrem afrontamentos após a retirada dos hormônios esteroides (androgênio). Isso é válido em casos de redução de androgênios associada à idade (Katovich, et al., *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*, 1990, 193(2): 129-35), bem como em casos extremos de privação de hormônios associada a tratamentos para câncer de próstata (Berendsen, et al., *European Journal of Pharmacology*, 2001, 419(1): 47-54). Um terço desses pacientes sofrerá de sintomas persistentes e frequentes, fortes o bastante para causar desconforto e perturbação significativos.

[006] O CGRP é um vasodilatador potente que foi implicado na patologia de outros sintomas vasomotores, como formas de dor de cabeça vascular, incluindo enxaqueca (com ou sem aura) e cefaleia em salvas. Durham, *N. Engl. J. Med.* 350:1073-1075, 2004. Os níveis séricos de CGRP na veia jugular externa são elevados em pacientes durante a enxaqueca. Goadsby et al., *Ann. Neurol.* 28:183-7, 1990. A administração intravenosa de α -CGRP humano induziu dor de cabeça e enxaqueca em

pacientes que sofrem de enxaqueca sem aura, sugerindo que o CGRP tem um papel causador na enxaqueca. Lassen et al., *Cephalalgia* 22:54-61, 2002.

[007] O possível envolvimento do CGRP na enxaqueca foi a base para o desenvolvimento e testagem de uma série de compostos que inibem a liberação do CGRP (por exemplo, sumatriptano), antagonizam no receptor de CGRP (por exemplo, BIBN4096BS derivado de dipeptídeo (Boehringer Ingelheim); CGRP (8- 37)) ou interação com uma ou mais das proteínas associadas ao receptor, como a proteína membrana da atividade do receptor (RAMP) ou proteína componente do receptor (RCP), ambos as quais afetam a ligação do CGRP aos seus receptores. Brain, S. et al., *Trends in Pharmacological Sciences* 23:51-53, 2002. Os subtipos do adrenoceptor alfa 2 e os receptores de adenosina A1 também controlam (inibem) a liberação do CGRP e a ativação trigeminal (Goadsby et al., *Brain* 125:1392-401, 2002). O agonista do receptor de adenosina A1 GR79236 (metrafadil), o qual, demonstrou-se, inibe a vasodilatação neurogênica e a nocicepção trigeminal em seres humanos, também podem ter atividade anti-enxaqueca (Arulmani et al., *Cephalalgia* 25:1082-1090, 2005; Giffin et al., *Cephalalgia* 23: 287-292, 2003.)

[008] Confundir essa teoria implica a observação de que o tratamento com compostos que inibem exclusivamente a inflamação neurogênica (por exemplo, antagonistas de taquicinina NK1) ou a ativação trigeminal (por exemplo, agonistas do receptor de 5HT1D) mostrou-se relativamente ineficaz como tratamento agudo contra enxaqueca, levando alguns investigadores a se questionar se inibir a liberação de CGRP é o mecanismo primário de ação de tratamentos eficazes contra enxaqueca. Arulmani et al., *Eur. J. Pharmacol.* 500:315-330, 2004.

[009] A enxaqueca é uma condição neurológica complexa comum que é caracterizada por graves ataques episódicos de dor de cabeça e características associadas, que podem incluir náusea, vômitos e sensibilidade à luz, som ou movimento. Em alguns pacientes, a dor de cabeça é precedida ou acompanhada por uma aura. A

dor de cabeça pode ser grave e também pode ser unilateral em determinados pacientes.

[0010] Os ataques de enxaqueca são um incômodo no dia a dia. Na Europa Ocidental e nos Estados Unidos, a prevalência geral de vítimas de enxaqueca é de 11% da população em geral (6% do sexo masculino; 15-18% do sexo feminino). Além disso, a frequência média de ataques em um indivíduo é de 1,5/mês. Embora haja uma série de tratamentos disponíveis para aliviar ou reduzir os sintomas, a terapia preventiva é recomendada àqueles pacientes com mais de 3-4 ataques mensais de enxaqueca. Goadsby et al. *New Engl. J. Med.* 346(4): 257-275, 2002.

[0011] A variedade de intervenções farmacológicas que foram usadas para tratar a enxaqueca e a variabilidade nas respostas entre os pacientes são um testemunho da natureza diversa dessa desordem. Assim, esses fármacos relativamente não seletivos como alcaloides de cravagem (por exemplo, ergotamina, di-hidroergotamina, metisergida), que apresentam atividade serotoninérgica, adrenérgica, bem como noradrenérgica e dopaminérgica, têm sido usados há mais de 80 anos para o tratamento de enxaqueca. Outros tratamentos incluem opiatos (por exemplo, oxiconona) e os antagonistas beta-adrenérgicos (por exemplo, propranolol). Alguns pacientes, geralmente aqueles com sintomas mais leves, são capazes de controlar os seus sintomas com medicamentos sem receita médica, como um ou mais agentes anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), como uma combinação de aspirina, acetaminofeno e cafeína (por exemplo, Excedrin® Migraine).

[0012] Mais recentemente, alguns pacientes com enxaqueca foram tratados com topiramato, um anticonvulsivo que bloqueia os canais de sódio dependentes de tensão e certos receptores de glutamato (AMPA-cainato), potência a atividade do receptor de GABA-A e bloqueia a anidrase carbônica. O sucesso relativamente recente da serotonina 5HT-1B/1D e/ou dos agonistas do receptor de 5HT-1A, como sumatriptano, em alguns pacientes, levou os investigadores a propor uma etiologia

serotonérgica do distúrbio. Infelizmente, embora alguns pacientes tenham respondido bem a esse tratamento, outros foram relativamente resistentes aos seus efeitos.

[0013] Foi postulado que a disfunção de um canal de íons nos núcleos aminérgicos do tronco encefálico fundamenta o distúrbio. Contudo, a patofisiologia precisa da enxaqueca ainda não é devidamente compreendida. Mostrou-se que uma forma de enxaqueca, enxaqueca hemiplégica familiar, está associada com mutações de sentido na subunidade $\alpha 1$ do canal de cálcio de tipo P/Q bloqueada por tensão e acredita-se que outras mutações de canal iônico também serão encontradas em outras populações de pacientes. Embora a dilatação dos vasos sanguíneos esteja associada com e exacerbe os sintomas da dor causada pela enxaqueca, acredita-se que esses eventos neurovasculares são resultados da condição, e não sua causa. Em geral, a disfunção das vias do tronco encefálico que modulam as entradas sensoriais é considerada como uma característica unificadora da enxaqueca. Goadsby, P.J. et al., New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2002.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0014] Em alguns aspectos, a invenção aqui divulgada diz respeito a anticorpos anti-CGRP e métodos de anticorpos antagonistas anti-CGRP para tratar ou prevenir os sintomas vasomotores. Exemplos de sintomas vasomotores são fornecidos aqui, como afrontamentos. Em alguns casos, os anticorpos antagonistas anti-CGRP são usados para tratar ou prevenir uma dor de cabeça, como uma enxaqueca com ou sem aura, enxaqueca hemiplegia, cefaleias em salvas, neuralgia migranosa, dores de cabeça crônicas, dores de cabeça de tensão e dores de cabeça resultantes de outras condições médicas (como por infecção ou aumento de pressão no crânio por conta de um tumor).

[0015] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para o tratamento ou prevenção dos sintomas de pelo menos um sintoma vasomotor em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de

um anticorpo antagonista anti-CGRP.

[0016] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para tratar ou prevenir a dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca e cefaleia em salvas) em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP.

[0017] Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para melhorar, controlar, reduzir a incidência de ou atrasar o desenvolvimento ou a progressão da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca e cefaleia em salvas) em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP.

[0018] Em um aspecto, a invenção proporciona um método para tratamento ou redução da incidência de pelo menos um sintoma vasomotor e/ou da dor de cabeça em um indivíduo. Em uma modalidade, o método compreende a administração ao indivíduo por vários dias de uma quantidade de anticorpo monoclonal (por exemplo, o anticorpo antagonista anti-CGRP monoclonal) que modula a via de CGRP, em que a quantidade administrada em cada um desses vários dias é inferior a 1000 mg. Em uma modalidade, o método compreende a administração ao indivíduo por vários dias de uma quantidade de anticorpo monoclonal (por exemplo, o anticorpo antagonista anti-CGRP monoclonal) que modula a via de CGRP, em que a quantidade administrada em cada um desses vários dias fica entre 100 e 2000 mg. Em algumas modalidades, a dor de cabeça é enxaqueca (por exemplo, enxaqueca crônica ou enxaqueca episódica). Em algumas modalidades, dois dentre vários dias são com mais de sete dias de intervalo. Em algumas modalidades, a incidência de dor de cabeça é reduzida por, pelo menos, sete dias após uma única administração. Em algumas modalidades, a quantidade do anticorpo monoclonal administrado em um primeiro dia é diferente da (por exemplo, mais do que) quantidade do anticorpo monoclonal administrado em um segundo dia. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe menos de 3 doses por

mês. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea. Em algumas modalidades, a administração é intravenosa. Em algumas modalidades, a administração compreende o uso de uma seringa pré-preenchida que compreende a quantidade do anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é formulado a uma concentração de 150 mg/mL. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é administrado a um volume de menos de 2 mL. Em algumas modalidades, o montante do anticorpo monoclonal é de menos do que 1000 mg. Em algumas modalidades, as horas das dores de cabeça mensais sofridas pelo indivíduo após a referida administração são reduzidas em 40 ou mais horas (por exemplo, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 ou mais) a partir de um nível pré-administração no indivíduo. As horas de dores de cabeça mensais pode ser reduzida em mais de 60 horas. Em algumas modalidades, as horas de dores de cabeça mensais sofridas pelo indivíduo após a referida administração são reduzidas em 25% ou mais (por exemplo, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% ou mais) em relação a um nível pré-administração no indivíduo. As horas de dores de cabeças mensais podem ser reduzidas em 40% ou mais. Em algumas modalidades, os dias de dores de cabeça mensais sofridas pelo indivíduo após a referida administração são reduzidos em 3 ou mais dias (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais dias) a partir de um nível pré-administração no indivíduo. Em algumas modalidades, o método compreende ainda a administração ao indivíduo de um segundo agente simultaneamente ou sequencialmente com o anticorpo monoclonal. O segundo agente pode ser qualquer um dos agonistas 5-HT₁, triptanos, alcaloides da cravagem do centeio e fármacos anti-inflamatórios não esteroides. Em algumas modalidades, o segundo agente é um agente tomado pelo indivíduo de maneira profilática. Em algumas modalidades, o uso mensal do segundo agente pelo indivíduo é reduzido em pelo menos 15% após a administração do anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o segundo agente é um triptano. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, o

anticorpo monoclonal é um ser humano ou anticorpo monoclonal humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal compreende (a) um anticorpo com uma CDR H1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3; uma CDR H2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8; ou (b) uma variante de um anticorpo de acordo com (a), como mostrado na Tabela 6.

[0019] Em um aspecto, a invenção proporciona um método para reduzir o número de horas de dores de cabeça mensais sofridas por um indivíduo. Em uma modalidade, o método compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade de um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, em que o anticorpo monoclonal está presente em uma quantidade eficaz para diminuir o número de horas mensais das dores de cabeça pelo menos 20 (por exemplo, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ou mais horas de dor de cabeça) após uma dose única. Em algumas modalidades, a quantidade de horas mensais de dores de cabeça é reduzida em pelo menos 50 horas. Em uma modalidade, o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade de um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, em que o anticorpo monoclonal encontra-se em uma quantidade eficaz para reduzir o número de horas mensais das dores de cabeça em pelo menos 15% (por exemplo 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, ou mais) após uma única dose. Em algumas modalidades, o número de horas mensais de dores de cabeça é reduzido em pelo menos cerca de 30%. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é um anticorpo antagonista anti-CGRP. Em algumas modalidades, o montante do anticorpo monoclonal é de menos do que 1000 mg. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe menos de 3 doses por mês. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea ou intravenosa. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é formulado a uma concentração de no mínimo 150 mg/mL. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é administrado a um

volume de menos de 2 mL. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal compreende (a) um anticorpo com uma CDR H1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3; uma CDR H2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8; ou (b) uma variante de um anticorpo de acordo com (a), como mostrado na Tabela 6.

[0020] Em um aspecto, a invenção proporciona um método para reduzir o número de dias de dores de cabeça mensais sofridas por um indivíduo. Em uma modalidade, o método compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade de um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, em que o anticorpo monoclonal é uma quantidade eficaz para reduzir o número de dias mensais das dores de cabeça em pelo menos 3 (por exemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais dias de dor de cabeça) após uma única dose. Em algumas modalidades, o número de dias mensais de dores de cabeça é reduzido em pelo menos cerca de 6 dias de dor de cabeça. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é um anticorpo antagonista anti-CGRP. Em algumas modalidades, o montante do anticorpo monoclonal é de menos do que 1000 mg. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe menos de 3 doses por mês. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea ou intravenosa. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é formulado a uma concentração de no mínimo 150 mg/mL. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é administrado a um volume de menos de 2 mL. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal compreende (a) um anticorpo com uma CDR H1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3; uma CDR H2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3

conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8; ou (b) uma variante de um anticorpo de acordo com (a), como mostrado na Tabela 6.

[0021] Em um aspecto, a invenção proporciona um método para diminuir o uso de um medicamento contra a dor de cabeça em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-CGRP) que modula a via de CGRP, em que o anticorpo monoclonal encontra-se em uma quantidade eficaz para diminuir o uso mensal do medicamento contra a dor de cabeça do indivíduo em pelo menos 15% (por exemplo, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% ou mais). Em algumas modalidades, o medicamento contra a dor de cabeça é selecionado dentre o grupo que consiste em agonistas de 5-HT₁, triptanos, opiatos, antagonistas α -adrenérgicos, alcaloides de cravagem e fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs). Em algumas modalidades, o medicamento contra a dor de cabeça é um triptano. Em algumas modalidades, o montante do anticorpo monoclonal é de menos do que 1000 mg. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe menos de 3 doses por mês. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea ou intravenosa. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é formulado a uma concentração de no mínimo 150 mg/mL. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é administrado a um volume de menos de 2 mL. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal compreende (a) um anticorpo com uma CDR H1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3; uma CDR H2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8; ou (b) uma variante de um anticorpo de acordo

com (a), como mostrado na Tabela 6.

[0022] Em um aspecto, a invenção proporciona um método para o tratamento ou redução da incidência de dor de cabeça (por exemplo, enxaquecas) em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma única dose de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-CGRP monoclonal) em um montante que module a via de CGRP, em que o montante do anticorpo monoclonal é entre 100-2000 mg.

[0023] Em outra modalidade, a invenção proporciona métodos para melhorar, controlar reduzir a incidência da ou retardar o desenvolvimento ou progressão da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca e cefaleia em salvas) em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP em combinação com pelo menos um agente adicional útil para o tratamento da dor de cabeça. Tais agentes adicionais incluem agonistas do tipo 5-HT₁ (e agonistas que atuam em outros locais de 5-HT₁) e fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs).

[0024] Exemplos de agonistas de 5-HT₁ que podem ser usados em combinação com um anticorpo anti-CGRP incluem uma classe de compostos conhecidos como triptanos, como sumatriptano, zolmitriptano, naratriptano, rizatriptano, eletriptano, almotriptano e frovatriptano. Os alcaloides de cravagem e compostos relacionados também são conhecidos por ter uma atividade agonista de 5-HT e foram usados para tratar dores de cabeça, como enxaqueca. Entre esses compostos, estão incluídos tartarato de cravagemamina, maleato de ergonovina e mesilatos ergoloides (por exemplo, di-hidroergocornina, di-hidroergocristina, di-hidroergocriptina e mesilato de di-hidroergotamina (DHE 45)).

[0025] Exemplos de NSAIDs que podem ser usados em combinação com um anticorpo anti-CGRP incluem aspirina, diclofenac, diflusinal, etodolac, fenbufeno, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno,

cetorolac, ácido meclofenâmico, ácido mefenâmico, nabumetona, naproxeno, oxapropizina, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina ou zomepirac, inibidores de ciclooxigenase-2 (COX-2), celecoxib; rofecoxib; meloxicam; JTE-522; L-745337; NS398; ou um sal farmacologicamente aceitável destes.

[0026] Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para melhorar, controlar, reduzir a incidência de ou retardar o desenvolvimento ou a progressão de afrontamentos em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP.

[0027] Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para melhorar, controlar, reduzir a incidência de ou retardar o desenvolvimento ou progressão de afrontamentos em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP em combinação com pelo menos um agente adicional útil para o tratamento de afrontamentos. Esses agentes adicionais incluem, mas não se limitam a, tratamentos à base de hormônios, incluindo estrogênios e/ou progestinas.

[0028] Em uma modalidade, o anticorpo antagonista anti-CGRP usado em qualquer um dos métodos descritos acima é qualquer um dos anticorpos aqui descritos.

[0029] Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP reconhece um CGRP humano. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP se liga a α -CGRP e β -CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP se liga ao CGRP humano e de rato. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP se liga ao fragmento C-terminal com aminoácidos de 25-37 de CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP se liga a um epítipo C-terminal nos aminoácidos de 25-37 de CGRP.

[0030] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CGRP é um anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP é

humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo é humano. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP é um anticorpo G1 (conforme descrito aqui). Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP compreende um ou mais CDR(s) (como um, dois, três, quatro, cinco ou, em algumas modalidades, todos os seis CDRs) do anticorpo G1 ou as variantes de G1 mostradas na Tabela 6. Em outras modalidades, ainda, o anticorpo antagonista anti-CGRP compreende a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada mostrada na Figura 5 (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve mostrada na Figura 5 (SEQ ID NO: 2).

[0031] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante modificada, como uma região constante que é imunologicamente inerte (incluindo parcialmente imunologicamente inerte), por exemplo, não aciona a lise mediada por um complemento, não estimula a citotoxicidade mediata por células dependentes de anticorpo (ADCC), não ativa micróglia ou reduz uma ou mais dessas atividades. Em algumas modalidades, a região constante é modificada conforme descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; Pedido PCT No. PCT/GB99/01441; e/ou o Pedido de Patente UK No. 9809951,8. Em outras modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de IgG2 de cadeia pesada humana, compreendendo as seguintes mutações: A330P331 para S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência de IgG2 de tipo selvagem). Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624. Em algumas modalidades, a região constante de cadeia pesada do anticorpo é uma IgG1 de cadeia pesada humana com qualquer uma das mutações a seguir: 1) A327A330P331 para G327S330S331; 2) E233L234L235G236 (SEQ ID NO: 48) para P233V234A235 com G236 suprimido; 3) E233L234L235 para P233V234A235; 4) E233L234L235G236A327A330P331 (SEQ ID NO: 49) para P233V234A235G327S330S331 (SEQ ID NO: 50) com G236 suprimido; 5) E233L234L235A327A330P331 (SEQ ID NO: 51) para

P233V234A235G327S330S331 (SEQ ID NO: 50); e 6) N297 para A297 ou outro qualquer aminoácido, exceto N. Em algumas modalidades, a região constante da cadeia pesada do anticorpo é uma IgG4 humana de cadeia pesada com qualquer uma das seguintes mutações: E233F234L235G236 (SEQ ID NO: 52) para P233V234A235 com G236 suprimido; E233F234L235 para P233V234A235; e S228L235 para P228E235.

[0032] Em outras modalidades, ainda, a região constante é aglicosilada para a glicosilação ligada a N. Em algumas modalidades, a região constante é aglicosilada para a glicosilação ligada a N pela mutação do resíduo de ligação a oligossacarídeos (como Asn297) e/ou resíduos de flanqueamento que são parte da sequência de reconhecimento de N-glicosilação na região constante. Em algumas modalidades, a região constante aglicosilada para a glicosilação ligada a N. A região constante pode ser aglicosilada para a glicosilação ligada a N, enzimaticamente ou pela expressão em uma célula hospedeira deficiente quanto à glicosilação.

[0033] A afinidade de ligação (KD) de um anticorpo antagonista anti-CGRP ao CGRP (tal como o α -CGRP humano, conforme medido por ressonância plasmônica a uma temperatura adequado, como 25 ou 37 °C) pode ser de cerca de 0,02 a cerca de 200 nM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação fica entre cerca de 200 nM, cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM, cerca de 60 pM, cerca de 50 pM, cerca de 20 pM, cerca de 15 pM, cerca de 10 pM, cerca de 5 pM ou cerca de 2 pM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é inferior a cerca de 250 nM, cerca de 200 nM, cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, cerca de 1 nM, cerca de 500 pM, cerca de 100 pM ou cerca de 50 pM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é inferior a cerca de 50 nM.

[0034] O anticorpo antagonista anti-CGRP pode ser administrado antes, durante e/ou após a dor de cabeça. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP é administrado antes do ataque de dor de cabeça (por exemplo,

enxaqueca e cefaleia em salvas). A administração de um anticorpo antagonista anti-CGRP pode se dar por quaisquer meios conhecidos na técnica, incluindo: por via oral, via intravenosa, via subcutânea, intra-arterialmente, via intramuscular, via intranasal (por exemplo, com ou sem inalação), via intracardial, via intraespinal, intratoracicamente, por via intraperitoneal, por via intraventricular, por via sublingual, por via transdérmica e/ou através de inalação. A administração pode ser sistêmica, por exemplo, por via intravenosa, ou localizada.

[0035] Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP pode ser administrado juntamente com outro agente, como outro agente para tratar dores de cabeça.

[0036] Em outro aspecto, a invenção proporciona o uso de um anticorpo antagonista anti-CGRP para a produção de um medicamento para uso em qualquer um dos métodos descritos aqui, por exemplo: para tratar ou prevenir dores de cabeça.

[0037] Em outro aspecto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica para prevenir ou tratar dores de cabeça (por exemplo, enxaqueca e cefaleia em salvas) que compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP em combinação com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[0038] Em outro aspecto, a invenção proporciona um kit para uso em qualquer um dos métodos descritos aqui. Em algumas modalidades, o kit compreende um recipiente, uma composição que compreende um anticorpo antagonista anti-CGRP aqui descrito, em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável, e instruções para uso da composição em qualquer um dos métodos descritos aqui.

[0039] A presente invenção proporciona também anticorpos antagonista anti-CGRP e polipeptídeos derivados do anticorpo G1 ou suas variantes mostradas na Tabela 6. Por conseguinte, em um aspecto, a invenção proporciona um anticorpo G1 (intercambiavelmente denominado "G1") que é produzido por vetores de expressão com os Nos. de Acesso ATCC PTA-6866 e PTA-6867. Por exemplo, em uma

modalidade, trata-se de um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada produzida pelo vetor de expressão com o No. de acesso ATCC PTA-6867. Em outra modalidade, trata-se de um anticorpo que compreende uma cadeia leve produzida pelo vetor de expressão com o No. de Acesso ATCC PTA-6866. As sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada de G1 são mostradas na Figura 5. As porções da região determinante de complementaridade (CDR) do anticorpo G1 (incluindo Chothia e CDRs de Kabat) também são mostradas na Figura 5. Entende-se que a referência a qualquer parte ou toda a região de G1 abrange sequências produzidas por vetores de expressão que têm o No. de Acesso ATCC. PTA-6866 e PTA-6867 e/ou as sequências ilustradas na Figura 5. Em algumas modalidades, a invenção também proporciona variantes de anticorpos de G1 com as sequências de aminoácidos descritas na Tabela 6.

[0040] Em um aspecto, a invenção proporciona um anticorpo compreendendo um domínio de VH que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntico na sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 1.

[0041] Em outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo compreendendo um domínio VL que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntico na sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 2.

[0042] Em outro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo compreendendo um fragmento ou uma região do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6. Em outra modalidade, o fragmento é um fragmento da cadeia leve do

anticorpo G1. Em outra modalidade, o fragmento é uma cadeia pesada do anticorpo G1. Em outra modalidade, ainda, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada do anticorpo G1. Em outra modalidade, ainda, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada do anticorpo G1 mostrado na Figura 5. Em outra modalidade, ainda, o fragmento contém uma ou mais CDRs de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada do anticorpo G1.

[0043] Em um outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (que podem ou não ser um anticorpo) que compreende um VH CDR3, como estabelecido na SEQ ID NO: 5, ou uma sequência que difere da SEQ ID NO: 5 por 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácidos. Em uma modalidade em particular, essas substituições de aminoácidos são substituições conservadoras.

[0044] Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (que podem ou não ser um anticorpo) que compreende uma VL CDR3 tal como estabelecido na SEQ ID NO: 8, ou uma sequência que difere da SEQ ID NO: 8 por 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições de aminoácidos. Em uma modalidade em particular, essas substituições de aminoácidos são substituições conservadoras.

[0045] Em outro aspecto, a invenção proporciona polipeptídeos (que podem ou não ser um anticorpo) que compreendem um ou mais dos seguintes procedimentos: a) uma ou mais CDR(s) do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; b) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; c) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo G1 ou suas variantes mostradas na Tabela 6; d) três CDRs de cadeia leve do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; e) três CDRs de cadeia pesada do anticorpo G1 ou suas variantes mostradas na Tabela 6; f) três CDRs de cadeia leve e três CDRs de cadeia pesada do anticorpo G1 ou suas variantes mostradas na Tabela 6. Em algumas modalidades, a invenção proporciona ainda polipeptídeos (que podem ou não ser um anticorpo) que

compreendem um ou mais dos seguintes procedimentos: a) uma ou mais (uma, duas, três, quatro, cinco ou seis) CDR(s) derivada(s) do anticorpo G1 ou de suas variantes mostradas na Tabela 6; b) uma CDR derivada da CDR H3 de cadeia pesada do anticorpo G1; e/ou c) uma CDR derivada da CDR L3 de cadeia leve do anticorpo G1. Em algumas modalidades, a CDR é uma CDR mostrada na Figura 5. Em algumas modalidades, uma ou mais CDRs derivadas do anticorpo G1 ou suas variantes mostradas na Tabela 6 são pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 86%, pelo menos cerca de 87%, pelo menos cerca de 88%, pelo menos cerca de 89%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% idênticas a pelo menos uma, pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, ou pelo menos seis CDRs de G1 ou suas variantes.

[0046] Em algumas modalidades, a CDR é uma CDR de Kabat. Em outras modalidades, a CDR é uma CDR de Chothia. Em outras modalidades, a CDR é uma combinação de uma Kabat e uma CDR de Chothia (também denominada "CDR combinada" ou "CDR estendida"). Em outras palavras, para qualquer modalidade contendo mais de uma CDR, as CDRs podem ser de Kabat, Chothia e/ou combinadas.

[0047] Em algumas modalidades, o polipeptídeo (como um anticorpo) compreende a sequência de aminoácidos de KASKXaaVXaaTYVS (SEQ ID NO: 53), em que Xaa na posição 5 é R, W, L, L ou N; e em que Xaa na posição 7 é T, A, D, G, R, S, W ou V. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos de KASKXaaVXaaTYVS (SEQ ID NO: 53) é uma CDR1 de cadeia leve do anticorpo.

[0048] Em algumas modalidades, o polipeptídeo (como um anticorpo) compreende a sequência de aminoácidos de XaaXaaSNRYXaa (SEQ ID NO: 54), em que Xaa na posição 1 é L ou A; em que Xaa na posição 2 é A ou H; e em que Xaa na posição 7 é L, T, I ou S. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos de

XaaXaaSNRYXaa (SEQ ID NO: 54) é uma CDR2 da cadeia leve do anticorpo.

[0049] Em algumas modalidades, o polipeptídeo (como um anticorpo) compreende a sequência de aminoácidos de EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG (SEQ ID NO: 55), em que Xaa na posição 5 é E, R, K, Q ou N; em que Xaa na posição 8 é A, L, N, E, H, S, L, R, C, F, Y, V, D ou P; em que Xaa na posição 9 é S, G, T, Y, C, E, G, A, P, I, N, R, V, D ou H; em que Xaa na posição 12 é H ou F; em que Xaa na posição 15 é E ou D. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos de EIRSXaaSDXaaXaaATXaaYAXaaAVKG (SEQ ID NO: 55) é uma CDR2 de cadeia pesada do anticorpo.

[0050] Em algumas modalidades, o polipeptídeo (como um anticorpo) compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, em que o resíduo de aminoácido na posição 99 da SEQ ID NO: 1 é L ou é substituído por A, N, S, T, V ou R; e em que os resíduos de aminoácidos na posição 100 da SEQ ID NO: 1 é A ou é substituído por L, R, S, V, Y, C, G, T, K ou P.

[0051] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humano. Em outras modalidades, o anticorpo é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo é monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo (ou polipeptídeo) é isolado. Em algumas modalidades, o anticorpo (ou polipeptídeo) é substancialmente puro.

[0052] A região constante da cadeia pesada dos anticorpos podem ser de qualquer tipo de região constante, como IgG, IgM, IgD, IgA e IgE; e quaisquer isotipos, como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

[0053] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante modificada conforme descreve-se aqui.

[0054] Em outro aspecto, a invenção proporciona um polinucleotídeo (que pode ser isolado) compreendendo um polinucleotídeo que codifica um fragmento ou uma região do anticorpo G1 ou suas variantes mostradas na Tabela 6. Em outra

modalidade, o fragmento é um fragmento da cadeia leve do anticorpo G1. Em outra modalidade, o fragmento é uma cadeia pesada do anticorpo G1. Em outra modalidade, ainda, o fragmento contém uma ou mais regiões variáveis de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada do anticorpo G1. Em outra modalidade, ainda, o fragmento contém uma ou mais (ou seja, uma, duas, três, quatro, cinco ou seis) regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada do anticorpo G1.

[0055] Em outro aspecto, a invenção proporciona um polinucleotídeo (que pode ser isolado) compreendendo um polinucleotídeo que codifica o anticorpo G1 ou suas variantes mostradas na Tabela 6. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende um dos ou ambos os polinucleotídeos apresentados na SEQ ID NO: 9 e na SEQ ID NO: 10.

[0056] Em outro aspecto, a invenção proporciona polinucleotídeos que codificam qualquer um dos anticorpos (incluindo fragmentos de anticorpos) ou polipeptídeos aqui descritos.

[0057] Em outro aspecto, a invenção proporciona vetores (incluindo vetores de clonagem e de expressão) e células hospedeiras compreendendo qualquer um dos polinucleotídeos aqui divulgados. Em algumas modalidades, o vetor é pDb.CGRP.hFcGI, tendo o No. ATCC PTA-6867. Em outras modalidades, o vetor é pEb.CGRP.hKGI, tendo o No. ATCC PTA-6866.

[0058] Em outro aspecto, a invenção proporciona uma célula hospedeira que compreende um polinucleotídeo que codifica qualquer um dos anticorpos aqui descritos.

[0059] Em outro aspecto, a invenção proporciona um complexo de CGRP ligado a qualquer um dos anticorpos ou polipeptídeos descritos aqui. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo G1 ou suas variantes mostradas na Tabela 6.

[0060] Em outro aspecto, a invenção proporciona uma composição

farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de qualquer um dos polipeptídeos (incluindo anticorpos, como um anticorpo que compreende uma ou mais CDRs do anticorpo G1) ou polinucleotídeos aqui descritos e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0061] Em outro aspecto, a invenção proporciona um método de geração de um anticorpo G1, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira ou descendente desta sob condições que permitem a produção do anticorpo G1, em que a célula hospedeira compreende um vetor de expressão que codifica o anticorpo G1; e, em algumas modalidades, promovendo a purificação do anticorpo G1. Em algumas modalidades, o vetor de expressão compreende um dos ou ambas as sequências de polinucleotídeos apresentadas na SEQ ID NO: 9 e na SEQ ID NO: 10.

[0062] Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos de produção de qualquer um dos anticorpos ou polipeptídeos aqui descritos, expressando um ou mais polinucleotídeos que codificam o anticorpo (que podem ser expressos separadamente como uma única cadeia leve ou pesada ou a cadeia leve e pesada são expressar a partir de um vetor) ou o polipeptídeo em uma célula adequada, geralmente seguida da recuperação e/ou do isolamento do anticorpo ou dos polipeptídeos de interesse.

[0063] O anticorpo antagonista anti-CGRP e os polipeptídeos, e os polinucleotídeos que codificam os anticorpos e polipeptídeos da presente invenção, podem ser usados para tratar, prevenir, melhorar, controlar ou reduzir a incidência de doenças associadas com o funcionamento anormal do CGRP, como dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca, cefaleia em salvas, cefaleia crônica e dor de cabeça de tensão) e de outras condições que podem ser tratadas ou prevenidas por antagonizar a atividade do CGRP.

[0064] Em outro aspecto, a invenção proporciona kits e composições que compreendem uma ou mais das composições aqui descritas. Esses kits, geralmente em embalagens adequadas e fornecidos com instruções adequadas, são úteis para

qualquer um dos métodos aqui descritos.

[0065] Em um aspecto, a invenção proporciona uma composição para uso de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos.

[0066] Em um aspecto, a invenção proporciona uma composição para uso no tratamento ou redução da incidência de pelo menos um sintoma vasomotor e/ou da dor de cabeça em um indivíduo. Em uma modalidade, o uso compreende a administração ao indivíduo por vários dias de uma quantidade de anticorpo monoclonal (por exemplo, o anticorpo antagonista anti-CGRP monoclonal) que modula a via de CGRP, em que a quantidade administrada em cada um desses vários dias é inferior a 1000 mg. Em uma modalidade, o uso compreende a administração ao indivíduo por vários dias de uma quantidade de anticorpo monoclonal (por exemplo, o anticorpo antagonista anti-CGRP monoclonal) que modula a via de CGRP, em que a quantidade administrada em cada um desses vários dias fica entre 100 e 2000 mg. Em algumas modalidades, a dor de cabeça é enxaqueca (por exemplo, enxaqueca crônica ou enxaqueca episódica). Em algumas modalidades, dois dentre vários dias são com mais de sete dias de intervalo. Em algumas modalidades, a incidência de dor de cabeça é reduzida por, pelo menos, sete dias após uma única administração. Em algumas modalidades, a quantidade do anticorpo monoclonal administrado em um primeiro dia é diferente da (por exemplo, mais do que) quantidade do anticorpo monoclonal administrado em um segundo dia. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe menos de 3 doses por mês. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea. Em algumas modalidades, a administração é intravenosa. Em algumas modalidades, a administração compreende o uso de uma seringa pré-preenchida que compreende a quantidade do anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é formulado a uma concentração de 150 mg/mL. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é administrado a um volume de menos de 2 mL. Em algumas modalidades, o montante do anticorpo monoclonal é de menos do que 1000 mg. Em algumas

modalidades, as horas das dores de cabeça mensais sofridas pelo indivíduo após a referida administração são reduzidas em 40 ou mais horas (por exemplo, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 ou mais) a partir de um nível pré-administração no indivíduo. As horas de dores de cabeça mensais pode ser reduzida em mais de 60 horas. Em algumas modalidades, as horas de dores de cabeça mensais sofridas pelo indivíduo após a referida administração são reduzidas em 25% ou mais (por exemplo, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% ou mais) em relação a um nível pré-administração no indivíduo. As horas de dores de cabeças mensais podem ser reduzidas em 40% ou mais. Em algumas modalidades, os dias de dores de cabeça mensais sofridas pelo indivíduo após a referida administração são reduzidos em 3 ou mais dias (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais dias) a partir de um nível pré-administração no indivíduo. Em algumas modalidades, o uso compreende ainda a administração ao indivíduo de um segundo agente simultaneamente ou sequencialmente com o anticorpo monoclonal. O segundo agente pode ser qualquer um dos agonistas 5-HT₁, triptanos, alcaloides da cravagem do centeio e fármacos anti-inflamatórios não esteroides. Em algumas modalidades, o segundo agente é um agente tomado pelo indivíduo de maneira profilática. Em algumas modalidades, o uso mensal do segundo agente pelo indivíduo é reduzido em pelo menos 15% após a administração do anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o segundo agente é um triptano. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é um ser humano ou anticorpo monoclonal humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal compreende (a) um anticorpo com uma CDR H1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3; uma CDR H2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8; ou (b) uma variante de um anticorpo de acordo com (a), como mostrado na Tabela 6.

[0067] Em um aspecto, a invenção proporciona uma composição para uso em um número decrescente de horas de dores de cabeça mensais sofridas por um indivíduo. Em uma modalidade, o uso compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade de um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, em que o anticorpo monoclonal está presente em uma quantidade eficaz para diminuir o número de horas mensais das dores de cabeça pelo menos 20 (por exemplo, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ou mais horas de dor de cabeça) após uma dose única. Em algumas modalidades, a quantidade de horas mensais de dores de cabeça é reduzida em pelo menos 50 horas. Em uma modalidade, o uso compreende administrar ao indivíduo uma quantidade de um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, em que o anticorpo monoclonal encontra-se em uma quantidade eficaz para reduzir o número de horas mensais das dores de cabeça em pelo menos 15% (por exemplo 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, ou mais) após uma única dose. Em algumas modalidades, o número de horas mensais de dores de cabeça é reduzido em pelo menos cerca de 30%. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é um anticorpo antagonista anti-CGRP. Em algumas modalidades, o montante do anticorpo monoclonal é de menos do que 1000 mg. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe menos de 3 doses por mês. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea ou intravenosa. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é formulado a uma concentração de no mínimo 150 mg/mL. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é administrado a um volume de menos de 2 mL. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal compreende (a) um anticorpo com uma CDR H1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3; uma CDR H2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3, conforme estabelecido na SEQ

ID NO: 8; ou (b) uma variante de um anticorpo de acordo com (a), como mostrado na Tabela 6.

[0068] Em um aspecto, o invento proporciona uma composição para uso na redução de um número de dias mensais dor de cabeça experimentados por um indivíduo. Em uma modalidade, o uso compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade de um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, em que o anticorpo monoclonal é uma quantidade eficaz para reduzir o número de dias mensais das dores de cabeça em pelo menos 3 (por exemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais dias de dor de cabeça) após uma única dose. Em algumas modalidades, o número de dias mensais de dores de cabeça é reduzido em pelo menos cerca de 6 dias de dor de cabeça. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é um anticorpo antagonista anti-CGRP. Em algumas modalidades, o montante do anticorpo monoclonal é de menos do que 1000 mg. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe menos de 3 doses por mês. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea ou intravenosa. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é formulado a uma concentração de no mínimo 150 mg/mL. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é administrado a um volume de menos de 2 mL. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal compreende (a) um anticorpo com uma CDR H1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3; uma CDR H2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8; ou (b) uma variante de um anticorpo de acordo com (a), como mostrado na Tabela 6.

[0069] Em um aspecto, a invenção proporciona uma composição usada para diminuir o uso de um medicamento contra a dor de cabeça em um indivíduo,

compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-CGRP) que modula a via de CGRP, em que o anticorpo monoclonal encontra-se em uma quantidade eficaz para diminuir o uso mensal do medicamento contra a dor de cabeça do indivíduo em pelo menos 15% (por exemplo, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% ou mais). Em algumas modalidades, o medicamento contra a dor de cabeça é selecionado dentre o grupo que consiste em agonistas de 5-HT₁, triptanos, opiatos, antagonistas β -adrenérgicos, alcaloides de cravagem e fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs). Em algumas modalidades, o medicamento contra a dor de cabeça é um triptano. Em algumas modalidades, o montante do anticorpo monoclonal é de menos do que 1000 mg. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe menos de 3 doses por mês. Em algumas modalidades, a administração é subcutânea ou intravenosa. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é formulado a uma concentração de no mínimo 150 mg/mL. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é administrado a um volume de menos de 2 mL. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal é humano ou humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal compreende (a) um anticorpo com uma CDR H1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3; uma CDR H2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8; ou (b) uma variante de um anticorpo de acordo com (a), como mostrado na Tabela 6.

[0070] Em um aspecto, a invenção proporciona uma composição usada para o tratamento ou redução da incidência de dor de cabeça (por exemplo, enxaquecas) em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma única dose de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-CGRP monoclonal) em um montante que module a via de CGRP, em que o montante do anticorpo

monoclonal é entre 100-2000 mg.

Breve Descrição das Figuras

[0071] A Figura 1 é uma tabela que mostra as afinidades de ligação de 12 anticorpos de murino para diferentes fragmentos de α -CGRP humano substituído por alanina. As afinidades de ligação foram medidas a 25 ° C usando Biacore fluindo-se os Fabs pelos CGRPs no chip. Os valores em caixas representam a perda de afinidade de mutantes de alanina em relação ao fragmento parental, 25-37 (itálico), exceto K35A, que derivou de um parental 19-37. Um "a" indica as afinidades para 19-37 e os fragmentos 25-37 são a média \pm o desvio padrão de duas medições independentes em diferentes chips sensores. Um "b" indica essas interações desviadas de um modelo de interação biomolecular simples devido a uma taxa de dissociação bifásica, de modo que suas afinidades foram determinadas pelo uso de um modelo de alteração conformacional. Legenda em escala de cinza: branco (1.0) indica afinidade parental; cinza claro (inferior a 0.5) indica uma afinidade maior do que parental; cinza escuro (mais de 2) indica uma afinidade menos do que parental; e preto indica que nenhuma ligação foi detectada.

[0072] As Figuras 2A e 2B mostram o efeito da administração do CGRP 8-37 (400 nmol/kg), do anticorpo 4901 (25 mg/kg) e do anticorpo 7D11 (25 mg/kg) sobre o fluxo sanguíneo da pele medido na forma de fluxo de células sanguíneas após um estímulo por pulso elétrico de 30 segundos. O CGRP 8-37 foi administrado por via intravenosa (iv) de 3-5 min antes do estímulo por pulsos elétricos. Os anticorpos foram administrados por via intraperitoneal (IP) 72 horas antes do estímulo por pulsos elétricos. Cada ponto nos gráficos representa uma AUC de rato tratado sob as condições indicadas. Cada linha nos gráficos representa a AUC média de ratos tratados com a condição indicada. AUC (área sob a curva) é igual a Δ fluxo x Δ tempo. " Δ fluxo" representa a variação das unidades de fluxo após o estímulo por pulsos elétricos; e " Δ tempo" representa o período de tempo necessário para que o nível de fluxo de

células do sangue retorne ao nível anterior ao estímulo por pulsos elétricos.

[0073] A Figura 3 mostra o efeito da administração diferente de dosagem do anticorpo 4901 (25 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg ou 1 mg/kg) sobre o fluxo sanguíneo da pele medido como fluxo de células sanguíneas após o estímulo por pulsos elétricos durante 30 segundos. Os anticorpos foram administrados por via intravenosa (IV) 24 horas antes da estimulação por pulsos elétricos. Cada ponto nos gráficos representa uma AUC de rato tratado sob as condições indicadas. A linha nos gráficos representa a AUC média de ratos tratados com a condição indicada.

[0074] As Figuras 4A e 4B mostram o efeito da administração do anticorpo 4901 (1 mg/kg ou 10 mg/kg, i.v.), do anticorpo 7E9 (10 mg/kg, iv) e do anticorpo 8B6 (10 mg/kg, i.v.) no fluxo de sangue da pele medido como fluxo de células do sangue após o estímulo por pulsos elétricos de 30 segundos. Os anticorpos foram administrados por via intravenosa (IV), seguido de estímulo por pulsos elétricos 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração do anticorpo. O eixo Y representa a porcentagem de AUC em comparação com o nível de AUC quando nenhum anticorpo foi administrado (tempo 0). O eixo X representa o período de tempo (minutos) entre a administração dos anticorpos e o estímulo por pulsos elétricos. "*" indica $P < 0,05$ e "***" indica $P < 0,01$ em comparação com o tempo 0. Os dados foram analisados usando ANOVA de uma via com um teste de comparação múltipla de Dunnett.

[0075] A Figura 5 mostra a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada (SEQ ID NO: 1) e da região variável de cadeia leve (SEQ ID NO: 2) do anticorpo G1. As CDRs de Kabat estão em negrito e as CDRs de Chothia estão sublinhadas. Os resíduos de aminoácidos para a cadeia pesada e a região variável de cadeia leve estão numerados sequencialmente.

[0076] A Figura 6 mostra o mapeamento de epítipo do anticorpo G1 por competição de peptídeos utilizando Biacore. O α -CGRP n-biotinilado humano foi capturado em um chip sensor SA. O G1 Fab (50 nM) na ausência de um peptídeo competidor ou

pré-incubado por 1 h com 10 μ M de um peptídeo competidor foi vertido no chip. Foi medida a ligação do G1 Fab ao α -CGRP humano no chip. O eixo Y representa a percentagem de ligação bloqueada pela presença do peptídeo competidor em comparação com a ligação na ausência do peptídeo competidor.

[0077] A Figura 7 mostra o efeito da administração do anticorpo G1 (1 mg/kg ou 10 mg/kg, i.v.) ou veículo (PBS, 0,01% de Tween 20) sobre o fluxo de sangue na pele medido como fluxo de células sanguíneas após estímulo por pulsos elétricos durante 30 segundos. O anticorpo G1 ou veículo foi administrado por via intravenosa (IV), seguido de estímulo por pulsos elétricos nervosos 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração do anticorpo. O eixo Y representa a percentagem de AUC em comparação com o nível de AUC quando nenhum anticorpo ou veículo (definido como 100%) foi administrado (tempo 0). O eixo X representa o período de tempo (minutos) entre a administração dos anticorpos e o estímulo por pulsos elétricos. "*" indica $P < 0,05$ e "***" indica $P < 0,01$ em comparação com o veículo. Os dados foram analisados usando ANOVA de duas vias e Bonferroni após os testes.

[0078] A Figura 8A mostra o efeito da administração do anticorpo G1 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg, i.v.) ou veículo (PBS, 0,01% de Tween 20) sobre o fluxo de sangue na pele medido como fluxo de células sanguíneas após estímulo por pulsos elétricos durante 30 segundos 24 horas depois da dosagem. O anticorpo G1 ou veículo foi administrado por via intravenosa (i.v.) 24 horas antes do estímulo por pulsos elétricos nervosos. O eixo Y representa a área total sob a curva (alteração no fluxo de glóbulos multiplicado pela mudança no tempo de estímulo até o fluxo retornar à linha de base, AUC). O eixo X representa doses variáveis de anticorpo G1. "*" indica $P < 0,05$, e "***" indica $P < 0,01$, em comparação com veículo. Os dados foram analisados usando ANOVA e um teste de comparação múltipla de Dunnett.

[0079] A Figura 8B mostra o efeito da administração do anticorpo G1 (0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg, i.v.) ou veículo (PBS, 0,01% de Tween 20)

sobre o fluxo de sangue na pele medido como fluxo de células sanguíneas após estímulo por pulsos elétricos durante 30 segundos 7 dias depois da dosagem. O anticorpo G1 ou veículo foi administrado por via intravenosa (i.v.) 7 dias antes do estímulo por pulsos elétricos nervosos. O eixo Y representa a AUC total. O eixo X representa doses variáveis de anticorpo G1. "***" indica $P < 0,01$, e "****" indica $P < 0,001$, em comparação com veículo. Os dados foram analisados usando ANOVA e um teste de comparação múltipla de Dunnett.

[0080] A Figura 8C é uma análise de ajuste da curva dos dados das Figuras 8A e 8B. O anticorpo G1 ou veículo foi administrado por via intravenosa (i.v.) 24 horas ou 7 dias antes do estímulo por pulsos elétricos nervosos. O eixo Y representa a AUC total. O eixo X representa doses variáveis do anticorpo G1 em "mg/kg" em uma escala logarítmica para determinar EC50.

[0081] A Figura 9 mostra o efeito do anticorpo mu7E9 (10 mg/kg), BIBN4096BS ou veículo (PBS, 0,01% de Tween 20) sobre a mudança de diâmetro da artéria meníngea média após um estímulo do campo elétrico. O anticorpo mu7E9, BIBN4096BS ou veículo foram administrados por via intravenosa (i.v.) no ponto de tempo 0 minutos, depois de uma resposta da linha de base ao estímulo elétrico ter sido estabelecida. O eixo Y representa a mudança no diâmetro da artéria meníngea média após um estímulo do campo elétrico. O diâmetro assente corresponde a 0%. O eixo X representa o tempo (minutos) do estímulo por pulsos elétricos. "*" indica $P < 0,05$ e "****" indica $P < 0,01$ em comparação com o veículo. Os dados foram analisados usando ANOVA e um teste de comparação múltipla de Dunnett.

[0082] A Figura 10 mostra o efeito de várias doses do anticorpo G1 (1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg, i.v.) ou do veículo (PBS, 0,01% de Tween 20) sobre a mudança de diâmetro da artéria meníngea média depois de um estímulo do campo elétrico. O anticorpo G1 ou veículo foi administrado por via intravenosa (i.v.) 7 dias antes do estímulo do campo elétrico. O eixo Y representa a mudança no diâmetro da artéria

meníngica média. O diâmetro assente corresponde a 0%. O eixo X representa a tensão de estímulo. "*" indica $P < 0,05$, "***" indica $P < 0,01$ e "****" indica $P < 0,001$, comparado com o veículo. Os dados foram analisados usando ANOVA de duas vias e Bonferroni após os testes.

[0083] A Figura 11A mostra o efeito do anticorpo mu4901 (10mg/kg) ou do veículo (PBS, 0,01% de Tween 20), administrado por via intravenosa (i.v.) 24 horas antes, sobre a redução da temperatura central induzida por injeção subcutânea de naloxona (1 mg/kg) em ratos viciados em morfina. O eixo Y representa a diferença de temperatura a partir da linha de base. O eixo X representa o tempo medido desde o ponto da injeção de naloxona.

[0084] A Figura 11B mostra o efeito do anticorpo mu4901 (10mg/kg) ou do veículo (PBS, 0,01% de Tween 20), administrado por via intravenosa (i.v.) 24 horas antes, sobre o aumento da temperatura da superfície traseira induzida por injeção subcutânea de naloxona (1 mg/kg) em ratos viciados em morfina. O eixo Y representa a diferença de temperatura a partir da linha de base. O eixo X representa o tempo medido desde o ponto da injeção de naloxona.

[0085] A Figura 12 é um gráfico que ilustra os resultados de um estudo clínico de comparação entre os efeitos de diferentes doses de anticorpo G1 com o placebo.

[0086] A Figura 13 é um gráfico que ilustra os resultados de um estudo clínico de comparação entre os efeitos de diferentes doses de anticorpo G1 com o placebo.

[0087] A Figura 14 é um gráfico que ilustra os resultados de um estudo clínico de comparação entre os efeitos de diferentes doses de anticorpo G1 com o placebo.

[0088] A Figura 15 é um gráfico que ilustra os resultados de um estudo clínico de comparação entre os efeitos de diferentes doses de anticorpo G1 com o placebo.

[0089] A Figura 16 é um gráfico que ilustra os resultados de um estudo clínico de comparação entre os efeitos de diferentes doses de anticorpo G1 com o placebo.

[0090] A Figura 17 é um gráfico que ilustra os resultados de um estudo clínico

de comparação entre os efeitos de diferentes doses de anticorpo G1 com o placebo.

[0091] A Figura 18 é um gráfico que ilustra os resultados de um estudo clínico de comparação entre os efeitos de diferentes doses de anticorpo G1 com o placebo.

Descrição Detalhada

[0092] Em alguns aspectos, a invenção divulgada aqui proporciona métodos para tratar e/ou prevenir sintomas vasomotores (por exemplo, afrontamentos) em um indivíduo pela administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP.

[0093] Em alguns aspectos, a invenção divulgada aqui proporciona métodos para tratar e/ou prevenir dores de cabeça (por exemplo, enxaqueca, cefaleia em salvas, cefaleia crônica e dores de cabeça de tensão) em um indivíduo por meio da administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP. Em alguns casos, a dor de cabeça é uma enxaqueca.

[0094] Em alguns aspectos, a invenção aqui divulgada também proporciona anticorpos antagonistas anti-CGRP e polipeptídeos derivados do G1 e suas variantes mostradas na Tabela 6. Em algumas modalidades, a invenção também proporciona métodos de produzir e utilizar esses anticorpos e polipeptídeos.

[0095] Ao longo deste pedido, várias publicações (incluindo patentes e pedidos de patente) são referenciadas. As divulgações dessas publicações em suas totalidades são incorporadas aqui por referência.

Técnicas Gerais

[0096] A prática dos vários aspectos da presente invenção empregará, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, que estão dentro dos conhecimentos daqueles versados na técnica. Essas técnicas encontram-se completamente explicadas na literatura, como em 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 & P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths & D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley & Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir e C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller e 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 e 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 e C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow e D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti e J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definições

[0097] Um "anticorpo" é uma molécula de imunoglobulina capaz de se ligar a um alvo específico, como um hidrato de carbono, polinucleotídeo, lipídio, polipeptídeo, etc, através de pelo menos um local de reconhecimento de antígeno, localizado na região variável da molécula de imunoglobulina. Tal como aqui usado, o termo engloba não apenas os anticorpos policlonais ou monoclonais intactos, mas também seus fragmentos (como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadeia simples (ScFv), variantes destas, proteínas de fusão que compreendem uma parte do anticorpo (como anticorpos de domínio) e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um local de reconhecimento de antígeno. Um anticorpo inclui um

anticorpo de qualquer classe, como IgG, IgA ou IgM (ou sub-classe dos mesmos), e o anticorpo não precisa ser de nenhuma classe específica. Dependendo da sequência de aminoácidos de anticorpo do domínio constante de suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e vários deles podem ser divididos em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados alfa, delta, ípsilon, gama e mu, respectivamente. As estruturas de subunidade e as configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

[0098] Conforme usado aqui, "anticorpo monoclonal" se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto para mutações possíveis de ocorrência natural, que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único local antigênico. Ademais, em contraste com preparações de anticorpo (policlonal), as quais tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiro descrito por Kohler e Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495, ou podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante, como os descritos na Pat. U.S. No. 4.816.567. Os anticorpos monoclonais também podem ser isolados das bibliotecas de fagos geradas utilizando as técnicas descritas em McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554, por

exemplo.

[0099] Tal como aqui usados, anticorpos "humanizados" referem-se a formas de anticorpos não humanos (por exemplo, murino) de anticorpos que são cadeias de imunoglobulinas, imunoglobulinas quiméricas específicas ou seus fragmentos (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de ligação ao antígeno dos anticorpos) que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulinas não humanas. Em sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de um CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como camundongo, rato ou coelho com a especificidade, afinidade e atividade biológica desejada. Em alguns casos, os resíduos da região estrutural de Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos pelos correspondentes resíduos não humanos. Além disso, o anticorpo humanizado pode compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências da CDR ou das sequências de estrutura, mas são incluídos para refinar e otimizar o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um e, tipicamente dois, domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todas as regiões de CDR correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todas, ou substancialmente todas, as regiões FR são as de uma sequência de consenso imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado, de maneira ideal, também compreenderá pelo menos uma porção de uma região ou domínio constante de imunoglobulina (Fc), normalmente o de uma imunoglobulina humana. Os anticorpos podem ter regiões de Fc modificadas conforme descrito em WO 99/58572. Outras formas de anticorpos humanizados têm uma ou mais CDRs (uma, duas, três, quatro, cinco, seis) que são alteradas no que diz respeito ao anticorpo original, que também são designadas por uma ou mais CDRs "derivadas de" um ou mais CDRs da o anticorpo original.

[00100] Tal como aqui usado, "anticorpo humano" denota um anticorpo que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde à de um anticorpo produzido por um humano e/ou que foi produzido utilizando qualquer uma das técnicas para produção de anticorpos humanos conhecidas na técnica ou aqui divulgadas. Esta definição de um anticorpo humano inclui anticorpos compreendendo pelo menos um polipeptídeo de cadeia pesada humana ou pelo menos um polipeptídeo de cadeia leve humana. Um exemplo é um anticorpo que compreende cadeia leve de murino e polipeptídeos de cadeia pesada humana. Anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na técnica. Em uma modalidade, o anticorpo humano é selecionado dentre uma biblioteca de fagos, em que a biblioteca de fagos expressa anticorpos humanos (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, (EUA) 95:6157-6162; Hoogenboom e Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Os anticorpos humanos também podem ser produzidos pela introdução dos locais de imunoglobulinas humanas em animais transgênicos, por exemplo, camundongos em que os genes de imunoglobulinas endógenas foram parcial ou completamente desativadas Essa abordagem é descrita nas Patentes U.S. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016. Alternativamente, o anticorpo humano pode ser preparado pela imortalização de linfócitos B humanos que produzem um anticorpo direcionado contra um antígeno alvo (esses linfócitos B podem ser recuperados a partir de um indivíduo ou podem ter sido imunizados in vitro). Ver, por exemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; e Patente U.S. No. 5.750.373.

[00101] Tal como aqui usado, os termos "peptídeo relacionado a genes de calcitonina" e "CGRP" referem-se a qualquer forma de peptídeo relacionado a genes de calcitoninas e variantes suas que retêm pelo menos parte da atividade do CGRP. Por exemplo, o CGRP pode ser o α -CGRP ou β -CGRP. Tal como aqui usado, o CGRP

inclui todas as espécies de mamíferos do CGRP de sequência nativa, por exemplo: humanos, caninos, felinos, equinos e bovinos.

[00102] Tal como aqui usado, um "anticorpo antagonista anti-CGRP" (intercambiavelmente denominado "anticorpo anti-CGRP") refere-se a um anticorpo que é capaz de se ligar ao CGRP e inibir a atividade biológica do CGRP e/ou a(s) via(s) à jusante mediadas pela sinalização do CGRP. Um anticorpo antagonista anti-CGRP engloba anticorpos que modulam, bloqueiam, antagonizam, suprimem ou reduzem (incluindo significativamente) a atividade biológica do CGRP ou antagonizam de alguma outra forma a via do CGRP, incluindo vias à jusante mediadas pela sinalização do CGRP, como uma ligação do receptor e/ou o desencadeamento de uma resposta celular ao CGRP. Para fins da presente invenção, será explicitamente entendido que o termo "anticorpo antagonista anti-CGRP" engloba todos os termos identificados anteriormente, títulos e estados funcionais e as características em que o próprio CGRP, a atividade biológica do CGRP (incluindo mas não se limitando à sua capacidade de mediar qualquer aspecto da dor de cabeça) ou as consequências da atividade biológica são substancialmente anuladas, diminuídas ou neutralizadas em qualquer grau significativo. Em algumas modalidades, um anticorpo antagonista anti-CGRP se liga ao CGRP e evita a ligação do CGRP ao receptor de CGRP. Em outras modalidades, um anticorpo anti-CGRP se liga ao CGRP e impede a ativação de um receptor de CGRP. São fornecidos aqui exemplos de anticorpos antagonistas anti-CGRP.

[00103] Tal como aqui usados, os termos "G1" e "anticorpo G1" são usados intercambiavelmente para se referir a um anticorpo produzido por vetores de expressão que têm os números de depósito de ATCC PTA-6867 e ATCC PTA-6866. As sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada são mostradas na Figura 5. As porções de CDR do anticorpo G1 (incluindo Chothia e CDR de Kabat) são representadas de forma esquemática na Figura 5. Os polinucleotídeos que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve são exibidos na

SEQ ID NO: 9 e na SEQ ID NO: 10. A caracterização de G1 é descrita nos Exemplos.

[00104] Os termos "polipeptídeo", "oligopolipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados permutavelmente neste documento para se referir aos polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos modificados, e pode ser interrompido por não aminoácidos. Os termos também englobam um polímero de aminoácido que tenha sido modificado naturalmente ou por intervenção; por exemplo, pela formação da ligação de dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação ou qualquer outra manipulação ou modificação, como conjugação com um componente de marcação. Estão também incluídos na definição, por exemplo, polipeptídeos contendo um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), bem como outras modificações conhecidas na técnica. Entende-se que, visto que os polipeptídeos desta invenção se baseiam em um anticorpo, os polipeptídeos podem ocorrer na forma de cadeias únicas ou cadeias associadas.

[00105] "Polinucleotídeo" ou "ácido nucleico", conforme usados intercambiavelmente aqui, referem-se a polímeros de nucleotídeos de qualquer comprimento e incluem DNA e RNA. Os nucleotídeos podem ser desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos, nucleotídeos modificados ou bases, e/ou seus análogos ou qualquer substrato que pode ser incorporado a um polímero por DNA ou RNA polimerase. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos modificados, como nucleotídeos metilados e seus análogos. Se estiver presente, a modificação da estrutura do nucleotídeo pode ser transmitida antes ou após a montagem do polímero. A sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes não nucleotídeos. Um polinucleotídeo podem ser ainda modificado após a polimerização, como por conjugação com uma componente de marcação. Outros tipos de modificações incluem, por exemplo, "capeamentos", substituição de um ou mais dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente com um análogo, modificações internucleotídicas tais como, por exemplo, aquelas

com ligações descarregadas (por exemplo, fosfonatos de metil, fosfotriésteres, fosfoamidatos, cabamatos, etc.) e com ligações carregadas (por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquelas que contêm porções pendentes, tais como, por exemplo, proteínas (por exemplo, nucleases, toxinas, anticorpos, peptídeos de sinal, poly-L-lisina, etc. .), aquelas com intercaladores (por exemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquelas contendo quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, boro, metais oxidativos, etc.), aquelas contendo alquiladores, aquelas com ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), bem como formas não modificadas de polinucleotídeo(s). Além disso, qualquer um dos grupos hidroxil geralmente presentes nos açúcares pode ser substituído, por exemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegido por grupos protetores padrão, ou ativado para preparar ligações adicionais para nucleotídeos adicionais, ou pode ser conjugado com suportes sólidos ou semissólidos. O OH com terminações 5' e 3' pode ser fosforilado ou substituído por aminas ou porções de grupos de revestimento orgânicos de 1 a 20 átomos de carbono. Outras hidroxilas também podem ser derivadas de grupos protetores padrão. Os polinucleotídeos também podem conter formas análogos de açúcares de ribose ou desoxirribose que geralmente são conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro ou 2'-azido-ribose, análogos de açúcar carbocíclico, açúcares α -anoméricos, açúcares epiméricos, tais como arabinose, xilose ou lixose, açúcares de piranose, açúcares de furanose, heptuloses, análogos acíclicos e análogos de nucleosídeos básicos, como metil-ribósido. Uma ou mais ligações de fosfodiéster podem ser substituídas por grupos de ligação alternativos. Esses grupos de ligação alternativos incluem, mas não estão limitados a, modalidades em que o fosfato é substituído por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH₂ ("formacetal"), em que cada R ou R' é, independentemente, H ou alquil (1-20 C) substituído ou não substituído, contendo, opcionalmente, uma ligação (-O-) de éter, aril, alquenil, cicloalquil, cicloalquenil ou araldil. Nem todas as ligações em um

polinucleotídeo precisam ser idênticas. A descrição anterior se aplica a todos os polinucleotídeos aqui referidos, incluindo RNA e DNA.

[00106] Uma "região variável" de um anticorpo se refere à região variável da cadeia leve do anticorpo ou à região variável da cadeia pesada do anticorpo, tanto sozinha quanto em combinação. As regiões variáveis da cadeia pesada e leve consistem em quatro regiões de framework (FR) conectadas por três regiões determinantes de complementariedade (CDRs), também conhecidas como as regiões hipervariáveis. As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em grande proximidade pelas FRs e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação a antígeno dos anticorpos. Há pelo menos duas técnicas para a determinação das CDRs: (1) uma abordagem com base na variabilidade de sequência de espécies cruzadas (isto é, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); e (2) uma abordagem baseada em estudos cristalográficos de complexos antígeno-anticorpo (Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Tal como aqui usado, uma CDR pode referir-se a uma CDR definida por qualquer uma das abordagens ou por uma combinação de ambas as abordagens.

[00107] Uma "região constante" de um anticorpo se refere à região constante da cadeia leve do anticorpo ou à região constante da cadeia pesada do anticorpo, tanto sozinha quanto em combinação.

[00108] Um epítopo que "preferencialmente se liga" ou "se liga especificamente" (aqui usados indistintamente) a um anticorpo ou a um polipeptídeo é um termo bem compreendido na técnica, e os métodos para determinar essa ligação preferencial ou específica também são devidamente conhecidos na técnica. Uma molécula é referida por apresentar "ligação específica" ou "ligação preferencial" se ela reagir ou se associar com mais frequência, maior rapidez, maior duração e/ou maior afinidade com uma célula ou substância específica do que com células ou substâncias

alternativas. Um anticorpo "liga-se especificamente" ou "liga-se preferencialmente" a um alvo caso se ligue com maior afinidade, avidéz, mais prontamente e/ou com maior duração do que se liga a outras substâncias. Por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente ou preferencialmente a um epítopo de CGRP é um anticorpo que se liga a esse epítopo com uma maior afinidade, avidéz, mais prontamente e/ou com maior duração do que se liga a outros epítopos do CGRP ou epítopos não CGRP. Também é compreendido pela leitura desta definição que, por exemplo, um anticorpo (ou porção ou epítopo) que se liga especificamente ou preferencialmente a um primeiro alvo pode ou não se ligar especificamente ou preferencialmente a um segundo alvo. Assim, "ligação específica" ou "ligação preferencial" não requer necessariamente (embora possam ser incluída) uma ligação exclusiva. Geralmente, mas não necessariamente, a referência a uma ligação significa uma ligação preferencial.

[00109] Tal como aqui usado, "substancialmente puro" refere-se a material que é pelo menos 50% puro (isto é, isento de contaminantes), mais preferencialmente pelo menos 90% puro, mais preferencialmente pelo menos 95% puro, mais preferencialmente pelo menos 98% puro, mais preferencialmente pelo menos 99% puro.

[00110] Uma "célula hospedeira" inclui uma célula de cultura ou uma célula individual que pode ser ou ter sido um receptor para vector (es) para a incorporação de inserções de polinucleotídeos. As células hospedeiras incluem a descendência de uma única célula hospedeira e a descendência pode não ser necessariamente completamente idêntica (em morfologia ou em complemento do DNA genômico à célula parental original devido a uma mutação natural, acidental ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transfectadas in vivo com polinucleotídeo(s) desta invenção.

[00111] O termo "região Fc" é usado para definir uma região C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina. A "região Fc" pode ser uma região Fc de sequência nativa ou uma região Fc variante. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina possam variar, a região Fc de cadeia pesada de IgG

humana está habitualmente definida para alongar a partir de um resíduo de aminoácido na posição Cys226, ou desde Pro230, até ao terminal carboxil da mesma. A numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU de Kabat. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. A região Fc de uma imunoglobulina compreende geralmente dois domínios constantes, CH2 e CH3.

[00112] Tal como aqui usados, "receptor de Fc" e "FcR" descrevem um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é um que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores de FcγRI, FcγRII, e FcγRIII, incluindo subclasses variantes alélicas e formas de splicing alternativas destes receptores. Receptores de FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor inibidor"), que possuem sequências de aminoácidos similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. Os FcRs são analisados em Ravetch & Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel et al., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; e de Haas et al., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. "FcR" também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgG maternas para o feto (Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; e Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

[00113] "Citotoxicidade dependente de complemento" e "CDC" referem-se à lise de um alvo na presença do complemento. A via de ativação do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C1q) a uma molécula (por exemplo, um anticorpo) complexado com um antígeno cognato. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio de CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), pode ser realizado.

[00114] Uma "região Fc funcional" possui no mínimo uma "função efetora" de uma região Fc de sequência nativa. Exemplos de "funções efetoras" incluem a ligação

de Clq, a citotoxicidade dependente de complemento (CDC); a ligação do receptor de Fc; a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC); a fagocitose; a regulação negativa dos receptores da superfície celular (por exemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Tais funções efetoras geralmente exigem que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável de anticorpo) e podem ser avaliadas utilizando vários ensaios conhecidos na técnica para a avaliação de tais funções efetoras de anticorpos.

[00115] Uma "sequência de região Fc nativa" compreende uma sequência de aminoácidos idêntica à sequência de aminoácidos de uma região Fc encontrada na natureza. Uma "região Fc variante" compreende uma sequência de aminoácidos que difere da de uma região Fc de sequência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido, e ainda assim retém pelo menos uma função efetora da região Fc de sequência nativa. Preferencialmente, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácidos em comparação com uma região Fc de sequência nativa ou uma região Fc de um polipeptídeo de origem, por exemplo, de cerca de uma a cerca de dez substituições de aminoácidos, e preferivelmente de cerca de uma a cerca de cinco substituições de aminoácidos em uma região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipeptídeo de origem. A região Fc variante, neste documento, terá preferencialmente pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com uma sequência nativa da região Fc e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo parental, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% de identidade com essa sequência, mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% de identidade com essa sequência.

[00116] Como aqui usados, "citotoxicidade dependente de anticorpo mediada por células" e "ADCC" referem-se a uma reação mediada por células na qual células citotóxicas não específicas que expressam receptores de Fc (FcR) (por exemplo,

células exterminadoras naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem o anticorpo ligado a uma célula alvo e subsequentemente causam a lise da célula alvo. A atividade de ADCC de uma molécula de interesse pode ser avaliada utilizando um ensaio de ADCC in vitro, tal como descrito na Patente U.S. No. 5.500.362 ou 5.821.337. Células efectoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células exterminadoras naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada in vivo, por exemplo, em um modelo animal, tal como aquele divulgado em Clynes et al., 1998, PNAS (EUA), 95:652-656.

[00117] Tal como aqui usado, "tratamento" é uma abordagem para obtenção de resultados clínicos benéficos ou desejados. Para os fins desta invenção, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, um ou mais dentre os seguintes: melhoria em qualquer aspecto da dor de cabeça, incluindo diminuir a gravidade, o alívio da intensidade da dor e outros sintomas associados, redução da frequência de recorrência, o aumento da qualidade de vida daqueles que sofrem de dor de cabeça e a diminuição da dose de outros medicamentos necessários para tratar a dor de cabeça. Para a enxaqueca, outros sintomas associados incluem, mas não estão limitados a náusea, vômitos e sensibilidade à luz, som e/ou movimento. Para a cefaleia em salvas, outros sintomas associados incluem, mas não estão limitados a inchamento sob ou ao redor dos olhos, excesso de lágrimas, olhos vermelhos, coriza ou congestão nasal e vermelhidão no rosto.

[00118] "Reduzir a incidência" de dor de cabeça denota a redução da gravidade (que pode incluir a redução da necessidade de e/ou quantidade de (por exemplo, exposição a) outros fármacos e/ou terapias geralmente usadas para essa condição, incluindo, por exemplo, ergotamina, di-hidroergotamina ou triptanos para a enxaqueca), duração e/ou frequência (incluindo, por exemplo, atrasar ou aumentar o tempo até o próximo ataque episódico em um indivíduo). Conforme entendido por aqueles

versados na técnica, os indivíduos podem variar em termos da sua resposta ao tratamento e, dessa forma, por exemplo, um "método para reduzir a incidência de dores de cabeça em um indivíduo" reflete a administração do anticorpo antagonista anti-CGRP com base na expectativa razoável de que essa administração possivelmente cause uma tal redução na incidência nesse indivíduo em particular.

[00119] "Melhorar" a dor de cabeça ou um ou mais sintomas de dor de cabeça significa uma redução ou melhoria de um ou mais sintomas de dor de cabeça em comparação com não administração de um anticorpo antagonista anti-CGRP. "Melhorar" também inclui o encurtamento ou a redução na duração de um sintoma.

[00120] Tal como aqui usado, "controlar a dor de cabeça" refere-se à manutenção ou redução da gravidade ou duração de um ou mais sintomas de dor de cabeça ou a frequência de ataques de dor de cabeça de um indivíduo (em comparação com o nível anterior ao tratamento). Por exemplo, a duração ou gravidade da dor de cabeça ou a frequência dos ataques é reduzida em pelo menos cerca de qualquer dentre 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, ou 70% no indivíduo em comparação ao nível anterior ao tratamento.

[00121] Tal como aqui usado, um "hora dor de cabeça" refere-se a uma hora durante a qual um indivíduo sofre de dor de cabeça. As horas de dor de cabeça podem ser expressas em termos de horas completas (por exemplo, uma hora de dor de cabeça, duas horas de dor de cabeça, três horas de dor de cabeça, etc.) ou em termos de horas completas e parciais (por exemplo, dor de cabeça de 0,5 hora, dor de cabeça de 1,2 hora, dor de cabeça de 2,67 horas, etc). Uma ou mais horas de dor de cabeça podem ser descritas em relação a um intervalo de tempo específico. Por exemplo, "horas de dores de cabeça diárias" pode se referir ao número de horas de dores de cabeça que um indivíduo sofre no intervalo de um dia (por exemplo, em um período de 24 horas). Em outro exemplo, "horas de dores de cabeça semanais" pode se referir ao número de horas de dores de cabeça que um indivíduo sofre no intervalo de uma

semana (por exemplo, em um período de 7 dias). Como pode ser apreciado, um intervalo de uma semana pode ou não corresponder a um calendário semanal. Em outro exemplo, "horas de dor de cabeça mensais" pode referir-se ao número de horas de dor de cabeça que um indivíduo sofre em um intervalo de um mês. Como pode ser apreciado, um intervalo de um mês (por exemplo, um período de 28-31 dias) pode variar em termos de número de dias a meses, dependendo do mês específico, e pode ou não corresponder a um calendário mensal. Em outro exemplo, "horas de dores de cabeça anuais" pode se referir ao número de horas de dores de cabeça que um indivíduo sofre no intervalo de um ano. Como pode ser apreciado, um intervalo de um ano (por exemplo, um período de 365 ou 366 dias) pode variar em termos de número de dias, dependendo do ano em particular e pode ou não corresponder a um ano civil. Em algumas modalidades, uma hora de dor de cabeça pode ser uma referência a um tipo específico de dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca, cefaleia em salvas, cefaleia crônica e dor de cabeça de tensão). Por exemplo, uma "hora de enxaqueca" pode se referir a uma hora durante o qual um indivíduo sofre de enxaqueca.

[00122] Tal como aqui usado, um "dia de dor de cabeça" refere-se a um dia durante o qual um indivíduo sofre de dor de cabeça. Os dias de dor de cabeça podem ser expressos em termos de dias completos (por exemplo, um dia de dor de cabeça, dois dias de dor de cabeça, três dias de dor de cabeça, etc.) ou em termos de dias completos e parciais (por exemplo, dor de cabeça de 0,5 dia, dor de cabeça de 1,2 dia, dor de cabeça de 2,67 dias, etc). Um ou mais dias de dor de cabeça podem ser descritos em relação a um intervalo de tempo específico. Por exemplo, "dias de dores de cabeça semanais" pode se referir ao número de dias de dores de cabeça que um indivíduo sofre no intervalo de uma semana (por exemplo, em um período de 7 dias). Como pode ser apreciado, um intervalo de uma semana pode ou não corresponder a um calendário semanal. Em outro exemplo, "dias de dor de cabeça mensais" pode referir-se ao número de dias de dor de cabeça que um indivíduo sofre em um intervalo

de um mês. Como pode ser apreciado, um intervalo de um mês (por exemplo, um período de 28-31 dias) pode variar em termos de número de dias a meses, dependendo do mês específico, e pode ou não corresponder a um calendário mensal. Em outro exemplo, "dias de dores de cabeça anuais" pode se referir ao número de dias de dores de cabeça que um indivíduo sofre no intervalo de um ano. Como pode ser apreciado, um intervalo de um ano (por exemplo, um período de 365 ou 366 dias) pode variar em termos de número de dias, dependendo do ano em particular e pode ou não corresponder a um ano civil. Em algumas modalidades, um dia de dor de cabeça pode ser uma referência a um tipo específico de dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca, cefaleia em salvas, cefaleia crônica e dor de cabeça de tensão). Por exemplo, um "dia de enxaqueca" pode se referir a um dia durante o qual um indivíduo sofre de enxaqueca.

[00123] Conforme usado aqui, "retardar" o desenvolvimento da dor de cabeça significa deferir, impedir, atrasar, adiar, estabilizar e/ou postergar a progressão da doença. Esse atraso pode ser de diferentes períodos de tempo, dependendo do histórico da doença e/ou indivíduo sendo tratado. Como é evidente para aqueles versados na técnica, um atraso suficiente ou significativo pode, com efeito, incluir a prevenção, em que o indivíduo não se desenvolve dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca). Um método que "atrasa" o desenvolvimento do sintoma é um método que reduz a probabilidade de se desenvolver o sintoma em um determinado intervalo de tempo e/ou reduz a extensão dos sintomas de um dado período de tempo, quando comparado a não usar o método. Tais comparações são tipicamente com base em estudos clínicos, utilizando um número estatisticamente significativo de indivíduos.

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWV
AVISFDGSIKYSVDSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLNYYD
SSGYYHYKYYGMAVWGQGTTVTVSS

[00124] "Desenvolvimento" ou "progressão" de dor de cabeça significa

manifestações iniciais e/ou progressão da doença. O desenvolvimento de dor de cabeça pode ser detectado e avaliado utilizando técnicas clínicas padrão bem conhecidas na técnica. No entanto, o desenvolvimento refere-se também a progressão que pode ser indetectável. Para efeitos da presente divulgação, o desenvolvimento ou progressão refere-se ao campo biológico dos sintomas. "Desenvolvimento" inclui ocorrência, recorrência e aparecimento. Como usados aqui "início" ou "ocorrência" de dor de cabeça inclui aparecimento inicial e/ou reincidência.

[00125] Tal como aqui usado, uma "dose eficaz" ou "quantidade eficaz" de fármaco, composto, ou composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejados. Para uso profilático, resultados benéficos ou desejados incluem resultados tais como a eliminação ou redução do risco, diminuição da gravidade, ou atraso do aparecimento da doença, incluindo sintomas bioquímicos, histológicos e/ou comportamentais da doença, suas complicações e fenótipos patológicos intermediários que se apresentam durante o desenvolvimento da doença. Para uso terapêutico, os resultados benéficos ou desejados incluem os resultados clínicos, tais como a redução da intensidade da dor, duração ou frequência de ataque de dor de cabeça, e diminuir um ou mais sintomas resultantes da dor de cabeça (de bioquímica, histológico e/ou comportamental), incluindo as suas complicações e fenótipos patológicos intermediários apresentados durante o desenvolvimento da doença, o aumento da qualidade de vida daqueles que sofrem da doença, a diminuição da dose de outros medicamentos necessários para tratar a doença, aumentar o efeito de outro medicamento, e/ou retardar a progressão da doença dos pacientes. Uma dosagem eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. Para os fins desta invenção, uma dosagem eficaz de fármaco, composto, ou composição farmacêutica é uma dosagem suficiente para realizar o tratamento profilático ou terapêutico direta ou indiretamente. Como se entende no contexto clínico, uma dosagem eficaz de um fármaco, composto ou composição farmacêutica pode ou não ser atingida em conjunto

com outro fármaco, composto ou composição farmacêutica. Assim, uma "dosagem eficaz" pode ser considerada no contexto da administração de um ou mais agentes terapêuticos e um único agente pode ser considerado para ser dado em uma quantidade eficaz se, em conjunto com um ou mais outros agentes, um resultado desejável puder ser ou for atingido.

[00126] Um "indivíduo" ou um "indivíduo" é um mamífero, mais preferencialmente um ser humano. Mamíferos incluem, mas não estão limitados a animais de fazenda, animais de desporto, animais de estimação, primatas, cavalos, cães, gatos, camundongos e ratos.

[00127] Como usados aqui, o termo "vetor" se refere a um construto, que é capaz de distribuir e de preferência expressar um ou mais genes ou sequências de interesse em uma célula hospedeira. Exemplos de vetores incluem, entre outros, vetores virais, DNA puro ou vetores de expressão de RNA, plasmídeo, cosmídeo ou vetores do fago, vetores de expressão de DNA ou RNA associados aos agentes de condensação catiônicos, vetores de expressão de DNA ou RNA encapsulados em lipossomas e determinadas células eucarióticas, como células produtoras.

[00128] Tal como aqui se utiliza, "sequência de controle de expressão" significa uma sequência de ácido nucleico que dirige a transcrição de um ácido nucleico. Uma sequência de controle de expressão pode ser um promotor, tal como um promotor constitutivo ou um induzível, ou um potenciador. A sequência de controle de expressão está operacionalmente ligada à sequência de ácido nucleico a ser transcrita.

[00129] Tal como aqui usado, "carreador farmacêuticamente aceitável" ou "excipiente farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer material que, quando combinado com um ingrediente ativo, permite que o ingrediente retenha a atividade biológica e não é reativo com o sistema imune do indivíduo. Exemplos incluem, mas não estão limitados a quaisquer dos carreadores farmacêuticos convencionais tal como uma solução salina tamponada com fosfato, água, emulsões, tais como emulsão de

óleo/água, e vários tipos de agentes molhantes. Os diluentes preferidos para aerossol ou administração parentérica são fosfato salino tamponado, ou (0,9%) de solução salina normal. As composições que compreendem tais veículos são formuladas por métodos convencionais bem conhecidos (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; e Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20a. Ed. Mack Publishing, 2000).

[00130] O termo "kon", tal como aqui usado, pretende referir-se à constante de velocidade para a associação de um anticorpo a um antígeno.

[00131] O termo "koff", tal como aqui usado, pretende referir-se à constante de velocidade para a dissociação de um anticorpo do complexo anticorpo/antígeno.

[00132] O termo "KD", tal como aqui usado, pretende referir-se à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno.

[00133] Tal como aqui usado, o termo "sintoma vasomotor," pretende referir-se a condições relacionadas com a vasodilatação. Esta vasodilatação pode ser associada ou potencialmente associada com dor de cabeça (como enxaqueca com ou sem aura; enxaqueca hemiplégica; enxaqueca crônica; enxaqueca episódica; alta frequência de enxaqueca episódica; cefaleia em salvas; neuralgia hemicraniana; dores de cabeça crônicas, dores de cabeça tensionais, dores de cabeça resultantes de outras condições médicas (tais como a infecção ou aumento da pressão no crânio devido a um tumor); hemicrania paroxística crônica, cefaleias diversas não associadas com uma lesão estrutural; dor de cabeça associada com uma desordem intracraniana não vascular; dor de cabeça associada com a administração de uma substância ou a sua retirada; dor de cabeça associada com a infecção não cefálica; dor de cabeça associada com um distúrbio metabólico; dor de cabeça associada com um distúrbio do crânio, pescoço, olhos, ouvidos, nariz, seios nasais, dentes, boca ou outra estrutura facial ou craniana; neuralgias cranianas e dor de tronco nervoso e dor de deafferentação), rubor quente (ou ondas de calor), ondas de frio, insônia, distúrbios do sono,

transtornos de humor, irritabilidade, transpiração excessiva, suores noturnos, suores durante o dia, fadiga e similares, causados por, inter alia, disfunção de termorregulação.

[00134] Tal como aqui usados, os termos "rubor", "afrontamento" e "calor" são termos reconhecidos na técnica que se referem a uma perturbação episódica da temperatura do corpo, tipicamente constituída por um rubor da pele súbito, geralmente acompanhada por transpiração em um indivíduo.

A. Métodos para a prevenção ou tratamento de sintomas vasomotores e/ou dor de cabeça

[00135] Em um aspecto, a invenção proporciona um método para tratamento ou redução da incidência de pelo menos um sintoma vasomotor em um indivíduo. Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de tratamento ou redução da incidência de dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) em um indivíduo. Em algumas modalidades, o método compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou polipeptídios derivados de anticorpo que modulam a via de CGRP (por exemplo, um anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP). Em algumas modalidades, pelo menos um sintoma vasomotor pode ser associado com a dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) e/ou afrontamentos.

[00136] Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para melhorar, controlar, reduzir a incidência de ou retardar o desenvolvimento ou a progressão de rubores em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP. Em algumas modalidades, pelo menos um sintoma vasomotor pode ser associado com a dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) e/ou afrontamentos.

[00137] Em um outro aspecto, a invenção proporciona métodos para melhorar, controlar, reduzir a incidência de, ou atrasar o desenvolvimento ou a progressão da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) em um indivíduo ou sintomas associados

a dor de cabeça (por exemplo, diarreia ou sensibilidade à luz), que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo que modula a via de CGRP ou um anticorpo antagonista anti-CGRP em combinação com pelo menos um agente adicional para o tratamento da dor de cabeça útil.

[00138] Tais agentes adicionais incluem, mas não estão limitados a agonistas de 5-HT e AINE. Por exemplo, o anticorpo e pelo menos um agente adicional pode ser administrado concomitantemente, ou seja, podem ser dados em proximidade temporal estreita o suficiente para permitir que os seus efeitos terapêuticos individuais se sobreponham. Por exemplo, a quantidade de agonista de 5-HT ou AINE administrado em combinação com um anticorpo anti-CGRP deve ser suficiente para reduzir a frequência de recaídas de dor de cabeça em pacientes ou produzir mais eficácia duradoura em comparação com a administração de qualquer um destes agentes na ausência do outro. Este procedimento pode ser usado para tratar dores de cabeça que caem em qualquer um de uma grande variedade de classes, incluindo: enxaqueca com ou sem aura; enxaqueca hemiplérgica; enxaqueca crônica; enxaqueca episódica; alta frequência de enxaqueca episódica; cefaleia em salvas; neuralgia de enxaqueca; dores de cabeça crônicas; dores de cabeça tensionais; dores de cabeça resultantes de outras condições médicas (por exemplo, infecção ou aumento da pressão no crânio devido a um tumor); hemicrania paroxismal crônica; dores de cabeça diversas não associadas com uma lesão estrutural; dor de cabeça associada com um distúrbio intracraniano não vascular; dor de cabeça associada com a administração de uma substância ou a sua retirada; dor de cabeça associada com a infecção não cefálica; dor de cabeça associada com uma perturbação metabólica; dor de cabeça associada com um distúrbio do crânio, pescoço, olhos, ouvidos, nariz, seios, dentes, na boca ou outra estrutura ou facial craniana; neuralgias cranianas; e dor do tronco do nervo e dor de deaferenciação.

[00139] Exemplos não limitativos adicionais de agentes adicionais que

podem ser administrados em combinação com um anticorpo antagonista anti-CGRP incluem um ou mais dos seguintes:

(i) um analgésico opioide, por exemplo, morfina, heroína, hidromorfona, oximorfona, levorfanol, levalorfanol, metadona, meperidina, fentanil, cocaína, codeína, dihidrocodeína, oxycodona, hidrocodona, propoxifeno, nalmefeno, nalorfina, naloxona, naltrexona, buprenorfina, butorfanol, nalbufina ou pentazocina;

(ii) um fármaco anti-inflamatório não esteroide (AINE), por exemplo, aspirina, diclofenac, diflusinal, etodolac, fenbufeno, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, cetorolac, ácido meclofenâmico, ácido mefenâmico, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmestina ou zomepirac, inibidores da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), celecoxibe; rofecoxibe; meloxicam; JTE-522; L-745337; NS398; ou um seu sal farmacologicamente aceitável;

(iii) um sedativo barbitúrico, por exemplo, amobarbital, aprobarbital, butobarbital, butabital, mefobarbital, metarbitol, metohexital, pentobarbital, fenobarbital, secobarbital, talbutal, teamilal ou tiopental ou um seu sal farmacologicamente aceitável;

(iv) um analgésico barbitúrico, por exemplo, butalbital ou um seu sal farmacologicamente aceitável ou uma composição compreendendo butalbital.

(v) uma benzodiazepina possuindo uma ação sedativa, por exemplo, clordiazepóxido, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam ou triazolam ou um seu sal farmacologicamente aceitável;

(vi) um antagonista de H1 possuindo uma ação sedativa, por exemplo, difenidramina, pirlamina, prometazina, clorfeniramina ou clorciclizina ou um seu sal farmacologicamente aceitável;

(vii) um sedativo, tais como glutetimida, meprobamato, metaqualona, dicloralfenazona ou um seu sal farmacologicamente aceitável;

(viii) um relaxante do músculo esquelético, por exemplo, baclofeno, carisoprodo, clorzoxazona, ciclobenzaprina, metocarbamol ou orfenadina ou um seu sal

farmaceuticamente aceitável;

(ix) um antagonista do receptor de NMDA, por exemplo, dextrometorfano ((+)-3-hidróxi-N-metilmorfinano), ou o seu metabolito dextrorfano ((+)-3-hidróxi-N-metilmorfinano), cetamina, memantina, pirroloquinolina quinona ou ácido cis-4-(fosfonometil)-2-piperidinocarboxílico ou um seu sal farmaceuticamente aceitável;

(x) um alfa-adrenérgico, por exemplo, doxazosina, tamsulosina, clonidina ou 4-amino-6,7-dimetóxi-2-(5-metanossulfonamido-1,2,3,4-tetrahidroisoquinol-2-il)-5-(2-piridil)quinazolina;

(xi) antidepressivos tricíclicos, por exemplo, desipramina, imipramina, amitriptilina ou nortriptilina;

(xii) um anticonvulsivo, por exemplo, carbamazepina ou valproato;

(xiii) um antagonista de taquicinina (NK), particularmente um antagonista de NK-3, NK-2 ou NK-1, por exemplo, (α R,9R)-7-[3,5-bis(trifluorometil)benzil]-8,9,10,11-tetra-hidro-9-metil-5-(4-metilfenil)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7] naftidina-6-13-diona(TAK-637), 5 - [[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etóxi-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinil]metil] -1,2-di-hidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona(MK-869), lanepitant, dapi-tant ou 3 -[[2-metóxi-5-(trifluorometoxi)fenil]metilamino]-2-fenil-piperidina(2S,3S);

(xiv) um antagonista muscarínico, por exemplo, oxibutina, tolterodina, propiverina, cloreto de tróspio ou darifenacina;

(xv) um inibidor de COX-2, por exemplo, celecoxibe, rofecoxibe ou valdecoxibe;

(xvi) um inibidor de COX não seletivo (de preferência com protecção de GI), por exemplo, nitroflurbiprofeno (HCT-1026);

(xvii) um analgésico de alcatrão de hulha, em particular paracetamol;

(xviii) um neuroléptico tal como droperidol;

(xix) um agonista do receptor de vaniloide (por exemplo, resiniferatoxina) ou antagonista (por exemplo, capsazepina);

- (xix) um beta-adrenérgico tal como propranolol;
- (xx) um anestésico local, tal como mexiletina;
- (xxi) um corticosteroide, tal como dexametasona;
- (xxii) um agonista de receptor de serotonina ou antagonista;
- (xxiii) um analgésico colinérgico (nicotínico);
- (xxiv) Tramadol (marca registrada);
- (xxv) um inibidor de PDEV, como sildenafil, vardenafil ou taladafil;
- (xxvi) um ligante de alfa-2-delta, como a gabapentina ou pregabalina;
- (xxvii) um canabinoide; e
- (xxviii) um antidepressivo, como a amitriptilina (Elavil), trazodona (Desyrel), e imipramina (Tofranil) ou anticonvulsivantes, como a fenitoína (Dilantin) ou carbamazepina (Tegretol).

[00140] Aqueles versados na técnica serão capazes de determinar as quantidades de dosagem adequadas para os agentes particulares a serem usados em combinação com um anticorpo anti-CGRP. Por exemplo, o sumatriptano pode ser administrado em uma dosagem desde cerca de 0,01 a cerca de 300 mg. Em alguns casos, o sumatriptano pode ser administrado em uma dosagem de 2 mg a 300 mg. Quando administrada de forma não parentérica, a dosagem típica de sumatriptano é de cerca de 25 a cerca de 100 mg, com cerca de 50 mg sendo geralmente a preferido e, quando administrada parentericamente, a dosagem preferida é cerca de 6 mg. No entanto, estas dosagens podem ser variadas de acordo com métodos padrão na técnica de modo que elas são otimizadas para um paciente particular ou para uma terapia de combinação específica. Além disso, por exemplo, o celecoxibe pode ser administrado em uma quantidade de entre 50 e 500 mg.

[00141] Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos para melhorar, controlar, reduzir a incidência de ou retardar o desenvolvimento ou progressão de afrontamentos em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma

quantidade eficaz de um anticorpo antagonista anti-CGRP em combinação com pelo menos um agente adicional útil para o tratamento de afrontamentos. Esses agentes adicionais incluem, mas não se limitam a, tratamentos à base de hormônios, incluindo estrogênios e/ou algumas progestinas.

[00142] Em outro aspecto, a divulgação providencia um método de tratamento ou redução da incidência de dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) em um indivíduo que compreende a administração ao indivíduo em uma pluralidade de dias de uma quantidade de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo monoclonal, antagonista anti-CGRP) que modula a via de CGRP. Em algumas modalidades, a quantidade do anticorpo monoclonal administrado em cada um da pluralidade de dias pode variar entre 0,1 mg - 5.000 mg, 1 mg - 5000 mg, 10 mg -5000 mg, 100 mg - 5000 mg, 1,000 mg - 5,000 mg , 0,1 mg - 4.000 mg, 1 mg - 4000 mg, 10 mg - 4000 mg, 100 mg - 4000 mg, 1,000 mg - 4,000 mg, 0,1 mg - 3.000 mg, 1 mg - 3000 mg, 10 mg - 3000 mg, 100 mg - 3000 mg, 1,000 mg - 3,000 mg, 0,1 mg - 2.000 mg, 1 mg - 2000 mg, 10 mg - 2000 mg, 100 mg - 2000 mg, 1,000 mg - 2,000 mg, 0,1 mg - 1.000 mg, 1 mg - 1,000 mg, 10 mg - 1000 mg ou 100 mg - 1000 mg. Em algumas modalidades, a quantidade situa-se entre 100 - 2000 mg.

[00143] Em outro aspecto, a divulgação providencia um método de tratamento ou redução da incidência de dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) em um indivíduo que compreende a administração ao indivíduo de uma dose única de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo monoclonal, antagonista anti-CGRP) em uma quantidade que modula a via de CGRP. Em algumas modalidades, a dose única pode ser uma quantidade de anticorpo entre 0,1 mg - 5.000 mg, 1 mg - 5000 mg, 10 mg -5000 mg, 100 mg - 5000 mg, 1,000 mg - 5,000 mg, 0,1 mg - 4.000 mg, 1 mg - 4000 mg, 10 mg - 4000 mg, 100 mg - 4000 mg, 1,000 mg - 4,000 mg, 0,1 mg - 3.000 mg, 1 mg - 3000 mg, 10 mg - 3000 mg, 100 mg - 3000 mg, 1000 mg - 3000 mg, de 0,1 mg - 2.000 mg, 1 mg - 2000 mg, 10 mg - 2000 mg, 100 mg - 2000 mg,

1,000 mg - 2,000 mg, 0,1 mg - 1.000 mg, 1 mg -1000 mg, 10 mg - 1000 mg ou 100 mg - 1000 mg. Em algumas modalidades, a dose única pode ser uma quantidade de anticorpo entre 100 - 2000 mg.

[00144] Em outro aspecto, a divulgação providencia um método de tratamento ou redução da incidência de pelo menos um sintoma vasomotor em um indivíduo que compreende a administração ao indivíduo em uma pluralidade de dias de uma quantidade de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo monoclonal, antagonista anti-CGRP) que modula a via de CGRP. Em algumas modalidades, a quantidade do anticorpo monoclonal administrado em cada um da pluralidade de dias pode variar entre 0,1 mg - 5.000 mg, 1 mg - 5000 mg, 10 mg -5000 mg, 100 mg - 5000 mg, 1,000 mg - 5,000 mg , 0,1 mg - 4.000 mg, 1 mg - 4000 mg, 10 mg - 4000 mg, 100 mg - 4000 mg, 1,000 mg - 4,000 mg, 0,1 mg - 3.000 mg, 1 mg - 3000 mg, 10 mg - 3000 mg, 100 mg - 3000 mg, 1,000 mg - 3,000 mg, 0,1 mg - 2.000 mg, 1 mg - 2000 mg, 10 mg - 2000 mg, 100 mg - 2000 mg, 1,000 mg - 2,000 mg, 0,1 mg - 1.000 mg, 1 mg - 1,000 mg, 10 mg - 1000 mg ou 100 mg - 1000 mg. Em algumas modalidades, a quantidade situa-se entre 100 - 2000 mg.

[00145] Em outro aspecto, a revelação providencia um método de diminuir o número de horas mensais de dor de cabeça experimentadas por um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo monoclonal, antagonista anti-CGRP) que modula a via de CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o número de horas de dor de cabeça mensais por, pelo menos, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 ou mais horas de dor de cabeça após uma única dose. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o número de horas de dor de cabeça mensais por, pelo menos, 20 horas de dor de cabeça, após uma dose única. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma

quantidade eficaz para diminuir o número de horas de dor de cabeça mensais por, pelo menos, 40 horas de dor de cabeça. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o número de horas de dor de cabeça mensais por, pelo menos, 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% ou mais após uma dose única. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o número de horas de dor de cabeça mensal de pelo menos 15% após uma dose única.

[00146] Em outro aspecto, a revelação providencia um método de diminuir o número de dias mensais de dor de cabeça experimentadas por um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo monoclonal, antagonista anti-CGRP) que modula a via de CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o número de dias de dor de cabeça mensais por, pelo menos, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais dias de dor de cabeça após uma única dose. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o número de dias de dor de cabeça mensais por pelo menos 3 dias de dor de cabeça, após uma dose única. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o número de dias de dor de cabeça mensais por, pelo menos, 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% ou mais após uma dose única.

[00147] Em outro aspecto, a divulgação providencia um método para diminuir o uso de um medicamento anti-dor de cabeça em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de um anticorpo monoclonal (por exemplo, um anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) que modula a via de CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o

uso mensal do medicamento anti-dor de cabeça do indivíduo por, pelo menos, 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% ou mais. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal pode ser em uma quantidade eficaz para diminuir o uso mensal do medicamento anti-dor de cabeça do indivíduo em pelo menos 15%. O medicamento anti-dor de cabeça pode ser qualquer tipo de medicamento anti-dor de cabeça descrito aqui em outro local. Exemplos não limitativos de medicamentos anti-dor de cabeça incluem agonistas de 5-HT₁ (e agonistas que atuam em outros locais de 5-HT₁), triptanos (por exemplo, sumatriptano, zolmitriptano, naratriptano, rizatriptano, eletriptano, almotriptano, afrovatriptan), alcaloides da cravagem do centeio (por exemplo, tartarato de ergotamina, maleato de ergonovina, e ergoloides mesilatos (por exemplo, di-hidroergocornina, diidroergocristina, diidroergocriptina, e diidroergotamina mesilato (DHE 45)) e fármacos não esteroides anti-inflamatórios (NSAIDs) (por exemplo, aspirina, diclofenac, diflusinal, etodolac, fenbufeno, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, cetorolac, ácido meclofenâmico, ácido mefenâmico, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina ou zomepirac, inibidores da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), celecoxibe; rofecoxibe; meloxicam; JTE-522, L-745337; NS398; ou um sal farmacologicamente aceitável respectivo), opiatos (por exemplo, oxicodona) e antagonistas β -adrenérgicos (por exemplo, propranolol).

[00148] No que diz respeito a todos os métodos descritos aqui, as referências a anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais que modulam a via de CGRP, anticorpos antagonistas anti-CGRP, anticorpos antagonistas monoclonais anti-CGRP), também incluem composições que compreendem um ou mais destes agentes. Por conseguinte, uma tal composição pode ser usada de acordo com um método referindo-se a um anticorpo aqui descrito. Estas composições podem ainda compreender excipientes adequados, tais como excipientes farmacologicamente aceitáveis, tal como

descrito aqui em outro local. A presente invenção pode ser usada sozinha ou em combinação com outros métodos de tratamento convencionais.

[00149] Um anticorpo aqui descrito (por exemplo, um anticorpo monoclonal, um anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) pode ser administrado a um indivíduo ou indivíduo em qualquer dose terapêutica, através de qualquer via adequada e em qualquer formulação adequada. Deve ser aparente para aquele versado na técnica que os exemplos aqui descritos não se destinam a ser limitantes, mas para serem ilustrativos das técnicas disponíveis. Por conseguinte, em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito pode ser administrado a um indivíduo de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, por exemplo, como em bolus ou por infusão contínua ao longo de um período de tempo, pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, sublingual, intra-arterial, intra-sinovial, por meio de insuflação, intratecal, oral, inalação, intranasal (por exemplo, com ou sem inalação), bucal, retal, transdérmica, intracardíaca, intra-óssea, intradérmica, transmucosal, vaginal, intravítrea, peri-articular, local, epicutânea ou tópica. A administração pode ser sistêmica, por exemplo, administração intravenosa, ou localizada. Nebulizadores comercialmente disponíveis para formulações líquidas, incluindo nebulizadores de jacto e nebulizadores ultrassônicos são úteis para a administração. As formulações líquidas podem ser diretamente nebulizadas e o pó liofilizado pode ser nebulizado após reconstituição. Alternativamente, um anticorpo aqui descrito pode ser transformado em aerossol utilizando uma formulação de fluorocarbono e um inalador de dose calibrada, ou inalado como um pó liofilizado e moído.

[00150] Em algumas modalidades, um anticorpo aqui descrito pode ser administrado por meio de técnicas de entrega local específicas do local ou dirigidas. Os exemplos de técnicas de entrega local ou específica do local alvo incluem várias fontes implantáveis de depósito do anticorpo ou cateteres de entrega local, tais como

cateteres de infusão, um cateter, ou um cateter de agulha, enxertos sintéticos, envoltórios adventícios, shunts e stents ou outros dispositivos implantáveis, carreadores específicos do local, injeção direta, ou aplicação direta. Ver, por exemplo, a Publicação PCT No. WO 00/53211 e Patente US N° 5.981.568.

[00151] Várias formulações de um anticorpo aqui descrito podem ser usadas para a administração. Em algumas modalidades, um anticorpo pode ser administrado puro. Em algumas modalidades, o anticorpo e um excipiente farmacologicamente aceitável pode ser em várias formulações. Os excipientes farmacologicamente aceitáveis são conhecidos na técnica, e são substâncias relativamente inertes que facilitam a administração de uma substância farmacologicamente eficaz. Por exemplo, um excipiente pode dar forma ou consistência, ou atuar como um diluente. Os excipientes adequados incluem, mas não se limitam a agentes estabilizantes, agentes molhantes e emulsionantes, sais para variar a osmolaridade, agentes de encapsulação, tampões e potenciadores da penetração na pele. Excipientes, bem como formulações para a entrega de fármaco por via parentérica e não parenteral são apresentados em Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20a. Ed. Mack Publishing (2000).

[00152] Em algumas modalidades, estes agentes, incluindo os anticorpos aqui descritos, podem ser formulados para administração por injeção (por exemplo, intraperitonealmente, intravenosamente, subcutaneamente, intramuscularmente etc.) Por conseguinte, estes agentes podem ser combinados com veículos farmacologicamente aceitáveis, tais como solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose, e outros semelhantes. O regime de dosagem particular, isto é, a dose, o momento e a repetição, irá depender do indivíduo em particular e da história médica do indivíduo.

[00153] Em algumas modalidades, estes agentes, incluindo os anticorpos aqui descritos, podem ser formulados para administração periférica. Tais formulações podem ser administradas através de qualquer via periférica adequada, incluindo por via intravenosa e por via subcutânea. Um agente preparado para

administração periférica pode incluir uma substância, medicamento, e/ou o anticorpo que não é administrado centralmente, espinal, intratecal, ou diretamente para o SNC. Exemplos não limitantes de vias de administração periféricas incluem uma via que é a via oral, sublingual, bucal, tópica, retal, via inalação, transdérmica, subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intracardíaca, intra-óssea, intradérmica, intra-peritoneal, transmucosa, vaginal, intravítrea, intra-articular, peri-articular, local ou epicutânea.

[00154] As formulações terapêuticas dos anticorpos usados de acordo com a presente invenção podem ser preparadas para armazenamento e/ou uso por mistura de um anticorpo possuindo o grau de pureza desejado com opcionais carreadores, excipientes farmacologicamente aceitáveis ou estabilizantes (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* 20a. Ed. Mack Publishing (2000)), e podem em alguns casos estar na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os carreadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregues. Uma formulação terapêutica de um anticorpo pode compreender um ou mais carreadores farmacologicamente aceitáveis, excipientes ou estabilizantes tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos não limitativos; sais, tais como cloreto de sódio; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butilo ou álcool benzílico; alquilparabenos, tais como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas de polipeptídios, tais como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos (por exemplo, em concentrações de 0,1 mM a 100 mM, 0,1 mM a 1 mM, 0,01 mM a 50 mM, 1 mM a 50 mM, 1 mM a 30 mM, 1 mM a 20 mM, 10 mM a 25 mM) tais como glicina, glutamina, metionina, asparagina, histidina, arginina,

ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes (por exemplo, em concentrações de 0,001 mg/ml a 1 mg/mL, 0,001 mg/ml a 1 mg/mL, 0,001 mg/ml a 0,1 mg/mL, 0,001 mg/ml a 0,01 mg/ml, 0,01 mg/mL a 0,1 mg/ml) tal como EDTA (por exemplo, EDTA dissódico di-hidratado); açúcares (por exemplo, em concentrações de 1 mg/mL a 500 mg/mL, 10 mg/mL a 200 mg/mL, 10 mg/mL a 100 mg/mL, 50 mg/mL a 150 mg/ml), tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; sal formador de contra-íões tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos (por exemplo, em concentrações de 0,01 mg/ml a 10 mg/ml, 0,01 mg/mL a 1 mg/ml, 0,1 mg/mL a 1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,5 mg/mL), tais como TweenTM (Por exemplo, polissorbato (por exemplo, polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80)), PLURONIC^{STM} ou polietilenoglicol (PEG).

[00155] Uma formulação de anticorpo pode ser caracterizada em termos de qualquer uma de uma variedade de propriedades físicas. Por exemplo, uma formulação líquida de anticorpo pode ter qualquer pH adequado para o efeito terapêutico, segurança e de armazenamento. Por exemplo, o pH de uma formulação de anticorpo líquido pode ser a partir de pH 4 a cerca de pH 9, a partir do pH 5 a pH 8, de pH 5 a pH 7 ou a partir de pH 6 a pH 8. Em algumas modalidades, uma formulação de anticorpo líquido pode ter um pH de 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 ou 10 ou superior, ou inferior.

[00156] Em um outro exemplo, uma formulação líquida de anticorpo pode ter qualquer viscosidade adequada para eficácia terapêutica, a segurança e armazenamento. Por exemplo, a viscosidade de uma formulação líquida de anticorpo pode ser de 0,5 centipoise (cP) a 100 cP, 1 cP a 50 cP, um 1 cP para 20 cP, 1 cP a 15 cP ou 5 cP para 15 cP a 25 ° C. Em algumas modalidades, uma formulação de anticorpo líquido pode ter uma viscosidade de 0,5 cP, 1 cP, 1,2 cP, 1,4 cP, 1,6 cP, 1,8 cP, 2,0 cP, 2,2 cP, 2,4 cP, 2,6 cP, 2,8 cP, 3,0 cP, 3.2 cP, 3,4 cP, 3,6 cP, 3,8 cP, 4,0 cP, 4,2

cP, 4,4 cP, 4,6 cP, 4,8 cP, 5,0 cP, 5,2 cP, 5,4 cP, 5,6 cP, 5,8 cP, 6,0 cP, 6,2 cP, 6,4 cP, 6,6 cP, 6,8 cP, 7,0 cP, 7,2 cP, 7,4 cP, 7,6 cP, 7,8 cP, 8,0 cP, 8,2 cP, 8,4 cP, 8,6 cP, 8,8 cP, 9,0 cP, 9,2 cP, 9,4 cP, 9,6 cP, 9,8 cP, 10,0 cP, 10,2 cP, 10,4 cP, 10,6 cP, 10,8 cP, 11,0 cP, 11,2 cP, 11,4 cP, 11,6 cP, 11,8 cP, 12,0 cP, 12,2 cP, 12,4 cP, 12,6 cP, 12,8 cP, 13,0 cP, 13,2 cP, 13,4 cP, 13,6 cP, 13,8 cP, 14,0 cP, 14,2 cP, 14,4 cP, 14,6 cP, 14,8 cP, ou 15,0 cP a 25 ° C ou a viscosidade pode ser maior ou menor.

[00157] Em um outro exemplo, uma formulação líquida de anticorpo pode ter qualquer condutividade adequada para eficácia terapêutica, segurança e armazenamento. Por exemplo, a condutividade de uma formulação de anticorpo líquido pode ser de 0,1 milisiemens por centímetro (mS/cm) a 15 mS/cm, 0,1 mS/cm a 10 mS/cm, 0,1 mS/cm a 5 mS/cm, 0,1 ms/cm a 2 mS/cm ou 0,1 mS/cm a 1,5 mS/cm. Em algumas modalidades, uma formulação de anticorpo líquido pode ter uma condutividade de 0,19 mS/cm, 0,59 mS/cm, 1,09 mS/cm, 1,19 mS/cm, 1,29 mS/cm, 1,39 mS/cm, de 1,49 mS/cm, 1,59 mS/cm, 1,69 mS/cm, 1,79 mS/cm, de 1,89 mS/cm, de 1,99 mS/cm, 2,09 mS/cm, 2,19 mS/cm, 2,29 mS/cm, de 2,39 mS/cm, de 2,49 mS/cm, 2,59 mS/cm, 2,69 mS/cm, de 2,79 mS/cm, de 2,89 mS/cm, 2,99 mS/cm, 3,09 mS/cm, 3,19 mS/cm, 3,29 mS/cm, 3,39 mS/cm, 3,49 mS/cm, 3,59 mS/cm, 3,69 mS/cm, de 3,79 mS/cm, 3,89 mS/cm, 3,99 mS/cm, de 4,09 mS/cm, 4,19 mS/cm, 4,29 mS/cm, 4,39 mS/cm, de 4,49 mS/cm, 4,59 mS/cm, 4,69 mS/cm, de 4,79 mS/cm, de 4,89 mS/cm, 4,99 mS/cm, 5,09 mS/cm, 6,09 mS/cm, 6,59 mS/cm, 7,09 mS/cm, 7,59 mS/cm, 8,09 mS/cm, 8,59 mS/cm, 9,09 mS/cm, de 9,59 mS/cm, 10,09 mS/cm, 10,59 mS/cm, 11,09 mS/cm, de 11,59 mS/cm, 12,09 mS/cm, 12,59 mS/cm, 13,09 mS/cm, 13,59 mS/cm, 14,09 mS/cm, de 14,59 mS/cm ou 15,09 mS/cm ou a condutividade pode ser maior ou menor.

[00158] Em um outro exemplo, uma formulação líquida de anticorpo pode ter qualquer osmolalidade adequada para eficácia terapêutica, segurança e armazenamento. Por exemplo, a osmolalidade de uma formulação de anticorpo líquido pode ser a partir de 50 miliosmole por quilograma (mOsm/kg) a 5.000 mOsm/kg, 50 mOsm/kg

e 2000 mOsm/kg, 50 mOsm/kg e 1000 mOsm/kg, 50 mOsm/kg a 750 mOsm/kg ou 50 mOsm/kg a 500 mOsm/kg. Em algumas modalidades, uma formulação de anticorpo líquido pode ter uma osmolalidade de 50 mOsm/kg, 60 mOsm/kg, 70 mOsm/kg, 80 mOsm/kg, 90 mOsm/kg, 100 mOsm/kg, 120 mOsm/kg, 140 mOsm/kg, 160 mOsm/kg, 180 mOsm/kg, 200 mOsm/kg, 220 mOsm/kg, 240 mOsm/kg, 260 mOsm/kg, 280 mOsm/kg, 300 mOsm/kg, 320 mOsm/kg, 340 mOsm/kg, 360 mOsm/kg, 380 mOsm/kg, 400 mOsm/kg, 420 mOsm/kg, 440 mOsm/kg, 460 mOsm/kg, 480 mOsm/kg, 500 mOsm/kg, 520 mOsm/kg, 540 mOsm/kg, 560 mOsm/kg, 580 mOsm/kg, 600 mOsm/kg, 620 mOsm/kg, 640 mOsm/kg, 660 mOsm/kg, 680 mOsm/kg, 700 mOsm/kg, 720 mOsm/kg, 740 mOsm/kg, 760 mOsm/kg, 780 mOsm/kg, 800 mOsm/kg, 820 mOsm/kg, 840 mOsm/kg, 860 mOsm/kg, 880 mOsm/kg, 900 mOsm/kg, 920 mOsm/kg, 940 mOsm/kg, 960 mOsm/kg, 980 mOsm/kg, de 1000 mOsm/kg, de 1050 mOsm/kg, de 1100 mOsm/kg, 1150 mOsm/kg, de 1200 mOsm/kg, de 1250 mOsm/kg, de 1300 mOsm/kg, 1350 mOsm/kg, 1400 mOsm/kg, 1450 mOsm/kg, de 1500 mOsm/kg, ou a osmolalidade pode ser mais elevada ou mais baixa.

[00159] Os lipossomas contendo o anticorpo podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); e Pat.U.S. N°s. 4.485.045 e 4.544.545. Os lipossomas com tempo de circulação aumentado são divulgados na Patente U.S. No. 5.013.556. Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase inversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros de tamanho de poro definido para obter lipossomas com o diâmetro desejado.

[00160] Os ingredientes ativos também podem ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou pela polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas gelatinosas e

microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de distribuição de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas da albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20a. Ed. Mack Publishing (2000).

[00161] Preparações de liberação prolongada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo nas quais as matrizes estão na forma de artigos moldados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou álcool poli(vinílico), polilactidas (Patente U.S. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico 7 etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinil não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis, tais como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), sucrose acetato isobutirato e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[00162] As formulações a serem usadas para a administração in vivo devem ser geralmente estéreis. Isso é facilmente conseguido, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéreis. As composições de anticorpo terapêuticas geralmente são colocadas em um recipiente com uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00163] As composições de acordo com a presente invenção podem estar em formas de dosagem unitárias, tais como comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, grânulos, soluções ou suspensões, ou supositórios, para administração oral, parentérica ou retal, ou administração por inalação ou insuflação. Em alguns casos, uma forma de dosagem unitária pode ser fornecida em um recipiente pré-carregado (por exemplo,

uma seringa pré-preenchida) útil na administração da unidade de dosagem a um indivíduo.

[00164] Para preparar composições sólidas, tais como comprimidos, o principal ingrediente ativo pode ser misturado com um transportador farmacêutico, por exemplo, ingredientes de fabricação de comprimidos convencionais, tais como amido de milho, lactose, sacarose, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, fosfato dicálcico ou gomas, e outros diluentes farmacêuticos, por exemplo, água, para formar uma composição de pré-formulação sólida contendo uma mistura homogênea de um composto da presente invenção, ou um sal farmacêuticamente aceitável atóxico do mesmo. Ao se referir a essas composições de pré-formulação como homogêneas, entende-se que o ingrediente ativo é disperso uniformemente ao longo de toda a composição, de forma que a composição possa ser facilmente subdividida igualmente em formas de dosagem unitárias efetivas, tais como comprimidos, pílulas e cápsulas. Esta composição de pré formulação sólida então é subdividida em formas de dosagem de unidade do tipo descrito acima contendo a partir de cerca de 0.1 a cerca de 500 mg do ingrediente ativo da presente invenção. As pastilhas ou pílulas da composição nova podem ser revestidas ou caso contrário compostas para prover uma forma de dosagem, proporcionando a vantagem de ação prolongada. Por exemplo, o comprimido ou pílula pode compreender um componente de dosagem interna e um de dosagem externa, o último estando na forma de um envelope sobre o anterior. Os dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que serve para resistir à desintegração no estômago e permite que o componente interno passe intacto para o duodeno ou para ser retardado na libertação. Uma variedade de materiais pode ser usada para tais camadas entéricas ou revestimentos, tais materiais, incluindo uma série de ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com tais materiais, como goma-laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

[00165] Agentes tensoativos adequados incluem, em particular, agentes não

iônicos, tais como Tween (por exemplo, TweenTM 20, 40, 60, 80 ou 85) e outros sorbitanos (por exemplo SpanTM 20, 40, 60, 80 ou 85). As composições com um agente tensoativo vão compreender, convenientemente, entre de 0,05 e 5% de agente tensoativo e podem situar-se entre 0,1 e 2,5%. Será apreciado que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo manitol ou outros veículos farmacologicamente aceitáveis, se necessário.

[00166] Emulsões adequadas podem ser preparadas utilizando emulsões graxas disponíveis comercialmente, tais como IntralipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM e LipiphysanTM. O ingrediente ativo pode ser ou dissolvido em uma composição de emulsão pré-misturada ou, alternativamente, pode ser dissolvido em um óleo (por exemplo óleo de soja, óleo de cártamo, óleo de semente de algodão, óleo de sésamo, óleo de milho ou óleo de amêndoa) e uma emulsão formada por mistura com um fosfolípido (por exemplo, fosfolípidios de ovo, fosfolípidios de soja ou lecitina de soja) e água. Será apreciado que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo glicerol ou glicose, para ajustar a tonicidade da emulsão. Emulsões adequadas conterão tipicamente óleo até 20%, por exemplo, entre 5 e 20%. A emulsão de gordura pode compreender gotículas de gordura entre 0,1 e 1,0 μm , particularmente 0,1 e 0,5 μm , e tem um pH na gama de 5,5 a 8,0.

[00167] As composições de emulsão podem ser as que são preparadas por mistura de um anticorpo com IntralipidTM ou os seus componentes (óleo de soja, fosfolípidios de ovo, glicerol e água).

[00168] As composições para inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes aquosos ou orgânicos farmacologicamente aceitáveis, ou misturas dos mesmos, e pós. As composições líquidas ou sólidas podem conter excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados conforme estabelecido acima. Em algumas modalidades, as composições são administradas pela via oral ou nasal respiratória para efeito local ou sistêmico. As composições em solventes

farmaceuticamente aceitáveis de preferência estéreis podem ser nebulizadas por uso de gases. As soluções nebulizadas podem ser respiradas diretamente do dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode estar ligado a uma máscara facial, tenda ou máquina de respiração de pressão intermitente positiva. As composições em solução, suspensão ou em pó também podem ser administradas, de preferência oralmente ou nasalmente, a partir de dispositivos que distribuem a formulação de uma forma apropriada.

[00169] Em algumas modalidades, uma formulação que compreende um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito pode ser preparada por qualquer via apropriada de administração, com uma quantidade de anticorpo que vão desde de 0,1 mg a 3000 mg, 1 mg a 1000 mg, de 100 a 1000 mg, ou 100 a 500 mg. Em alguns casos, uma formulação que compreende um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito pode compreender uma quantidade de anticorpo de, no máximo, ou pelo menos 0,1 mg, 1 mg, 100 mg, 1 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 450 mg, 475 mg, 500 mg, 525 mg, 550 mg, 575 mg, 600 mg, 625 mg, 650 mg, 675 mg, 700 mg, 725 mg, 750 mg, 775 mg, 800 mg, 825 mg, 850 mg, 875 mg, 900 mg, 925 mg, 950 mg, 975 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1200 mg, 1300 mg, 1400 mg, 1500 mg, 1600 mg, 1700 mg, 1800 mg, 1900 mg, 2000 mg e 3000 mg.

[00170] Em algumas modalidades, uma formulação líquida que compreende um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito pode ser preparada por qualquer via apropriada de administração, com uma concentração de anticorpo que vai de 0,1-500 mg/ml, 0,1 a 375 mg/ml, 0,1 a 250

mg/ml, 0,1 a 175 mg/ml, 0,1 a 100 mg/mL, 1 mg/mL a 500 mg/mL, 1 mg/mL a 375 mg/mL, 1 mg/mL a 300 mg/mL, 1 mg/mL a 250 mg/mL, 1 mg/mL a 200 mg/mL, 1 mg/mL a 150 mg/mL, 1 mg/mL a 100 mg/mL, 10 mg/mL a 500 mg/mL, 10 mg/mL a 375 mg/mL, 10 mg/mL a 250 mg/mL, 10 mg/mL a 150 mg/mL, 10 mg/mL a 100 mg/mL, 100 mg/mL a 500 mg/mL, 100 mg/mL a 450 mg/mL, 100 mg/mL a 400 mg/mL, 100 mg/mL a 350 mg/mL, 100 mg/mL a 300 mg/mL, 100 mg/mL a 250 mg/mL, 100 mg/mL a 200 mg/mL ou 100 mg/mL a 150 mg/mL. Em algumas modalidades, uma formulação líquida pode compreender um anticorpo aqui descrito, a uma concentração de, no máximo, de, pelo menos, ou menos do que 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, ou 500 mg/mL.

[00171] Uma formulação de anticorpo pode compreender um ou mais componentes, incluindo o anticorpo e outras espécies descritas aqui em outro local. O anticorpo e outros componentes podem ser em qualquer quantidade adequada e/ou de qualquer concentração adequada para eficácia terapêutica do anticorpo, de segurança e de armazenamento. Em um exemplo, uma formulação de anticorpo pode ser uma solução que compreende 51,4 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo anti-CGRP antagonista, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), histidina a 20 mM, 0,1 mg/mL de metionina, 84 mg/ml de di-hidrato de trealose, 0,05 mg/mL de EDTA dissódico di-hidratado, e 0,2 mg/ml de polissorbato 80.

[00172] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 200 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), arginina a 15 mM, 78 mg/mL de sacarose, 0,3 mg/ml de EDTA, e 0,1 mg/ml de polissorbato 80.

[00173] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode

compreender 175 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), glicina a 20 mM, 88 mg/ml de trealose di-hidratado, 0,015 mg/ml de EDTA e 0,25 mg/ml de polissorbato 80.

[00174] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 225 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), asparagina a 23 mM, 84 mg/ml de sorbitol, 0,1 mg/ml de EDTA e 0,15 mg/ml de polissorbato 60.

[00175] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 150 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), asparagina a 17 mM, 74 mg/ml de manitol, 0,025 mg/ml de EDTA e 0,2 mg/ml de polissorbato 80.

[00176] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 100 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), arginina a 16 mM, 87 mg/ml de manitol, 0,025 mg/ml de EDTA e 0,15 mg/ml de polissorbato 20.

[00177] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 250 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), 25 mM de histidina, 74 mg/ml de manitol, 0,025 mg/ml de EDTA e 0,25 mg/ml de polissorbato 20.

[00178] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 50 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), arginina a 19 mM, 84 mg/mL de sacarose, 0,05 mg/ml de EDTA e 0,3 mg/ml de polissorbato 80.

[00179] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 125 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo

antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), glicina a 22 mM, 79 mg/ml de trealose di-hidratado, 0,15 mg/ml de EDTA e 0,15 mg/ml de polissorbato 80.

[00180] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode ser uma solução que compreende 175 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo anti-CGRP antagonista, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), histidina a 20 mM, 0,1 mg/mL de metionina, 84 mg/ml de di-hidrato de trealose, 0,05 mg/mL de EDTA dissódico di-hidratado, e 0,2 mg/ml de polissorbato 80.

[00181] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 200 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), arginina a 30 mM, 78 mg/mL de sacarose, 0,3 mg/ml de EDTA, e 0,1 mg/ml de polissorbato 80.

[00182] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 175 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), glicina a 20 mM, 88 mg/ml de trealose di-hidratado, 0,015 mg/ml de EDTA e 0,15 mg/ml de polissorbato 80.

[00183] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 150 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), 20 mM de histidina, 84 mg/mL de sacarose, 0,05 mg/ml de EDTA e 0,2 mg/ml de polissorbato 80.

[00184] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 225 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), histidina a 23 mM, 84 mg/ml de sorbitol, 0,1 mg/ml de EDTA e 0,15 mg/ml de polissorbato 60.

[00185] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode

compreender 150 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), asparagina a 17 mM, 74 mg/ml de manitol, 0,3 mg/ml de EDTA e 0,2 mg/ml de polissorbato 80.

[00186] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 100 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), arginina a 16 mM, 87 mg/ml de manitol, 0,025 mg/ml de EDTA e 0,25 mg/ml de polissorbato 20.

[00187] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 250 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), histidina a 25 mM, 89 mg/ml de sorbitol, 0,025 mg/ml de EDTA e 0,25 mg/ml de polissorbato 20.

[00188] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 125 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), arginina a 29 mM, 84 mg/mL de sacarose, 0,05 mg/ml de EDTA e 0,3 mg/ml de polissorbato 80.

[00189] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 150 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), asparagina a 25 mM, 84 mg/ml de manitol, 0,05 mg/ml de EDTA e 0,2 mg/ml de polissorbato 80.

[00190] Em um outro exemplo, uma formulação de anticorpo pode compreender 145 mg/mL de anticorpo (por exemplo, anticorpo G1, um outro anticorpo antagonista anti-CGRP, um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), histidina a 22 mM, 72 mg/ml de trealose di-hidratado, 0,05 mg/ml de EDTA e 0,1 mg/ml de polissorbato 80.

[00191] Um anticorpo aqui descrito pode ser administrado utilizando qualquer método adequado, incluindo por injeção (por exemplo, intraperitonealmente,

intravenosamente, subcutaneamente, intramuscularmente, etc.). Os anticorpos também podem ser administrados por inalação, tal como aqui descrito. Em alguns casos, um anticorpo pode ser administrado por via nasal com ou sem inalação. De um modo geral, para a administração de um anticorpo aqui descrito, uma dosagem candidata inicial pode ser de cerca de 2 mg/kg. Para a finalidade da presente invenção, uma dosagem diária típica pode variar de cerca de qualquer um de 3µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Por exemplo, pode ser usado de dosagem de cerca de 1 mg/kg, cerca de 2,5 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 10 mg/kg, e cerca de 25 mg/kg. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas, ou até que os níveis terapêuticos suficientes são conseguidos, por exemplo, para reduzir a dor. Um regime de dosagem exemplar compreende a administração de uma dose inicial de cerca de 8,5 mg/kg, seguida por uma dose de manutenção semanal de cerca de 2,8 mg/kg de um anticorpo, ou seguida de uma dose de manutenção de cerca de 2,8 mg/kg a cada duas semanas. Outro regime de dosagem exemplar compreende a administração de uma dose de 100 mg, 125 mg, 150 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 675 mg, ou 900 mg para um indivíduo uma vez por mês por via subcutânea. Outro regime de dosagem exemplar compreende a administração de uma dose inicial de 675 mg por via subcutânea, seguida por uma dose mensal de 225 mg do anticorpo por via subcutânea. Contudo, outros regimes de dosagem podem ser úteis, dependendo do padrão de decaimento farmacocinético que o praticante deseje atingir. Por exemplo, em algumas modalidades, as doses de uma e quatro vezes por semana estão contempladas. O progresso desta terapia é facilmente monitorado por técnicas e ensaios convencionais. O regime de dosagem (incluindo o antagonista usado de CGRP) pode variar ao longo do tempo.

[00192] Em algumas modalidades, a dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito e administrado a um indivíduo pode variar de 0,1 µg a 3000 mg, 1 mg a 1000 mg, de 100 a 1000 mg, 100 a 500 mg, de 0,1 mg a 5000 mg, 1 mg a 4000 mg, 250 mg a 1000 mg, 500 mg a 1000 mg, de 100 mg a 900 mg, 400 mg a 900 mg, de 10 mg a 3000 mg, de 10 mg a 2000 mg, 100 mg a 2000 mg, de 150 mg a 2000 mg, 200 mg a 2000 mg, 250 mg a 2000 mg, 300 mg a 2000 mg, 350 mg a 2000 mg, 400 mg a 2000 mg, 450 mg a 2000 mg, 500 mg a 2000 mg, 550 mg a 2000 mg, 600 mg a 2000 mg, 650 mg a 2000 mg, 700 mg a 2000 mg, 750 mg a 2000 mg, 800 mg a 2000 mg, 850 mg a 2000 mg, 900 mg a 2000 mg, 950 mg a 2000 mg, ou 1000 mg a 2000 mg. Em algumas modalidades, a dose ou quantidade de um anticorpo aqui descrito e administrado a um indivíduo pode ser, pode ser, no máximo, pode ser menor do que, ou pode ser, pelo menos 0,1 µg, 1 µg, 100 µg, 1 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 450 mg, 475 mg, 500 mg, 525 mg, 550 mg, 575 mg, 600 mg, 625 mg, 650 mg, 675 mg, 700 mg, 725 mg, 750 mg, 775 mg, 800 mg, 825 mg, 850 mg, 875 mg, 900 mg, 925 mg, 950 mg, 975 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1200 mg, 1300 mg, 1400 mg, 1500 mg, 1600 mg, 1700 mg, 1800 mg, 1900 mg, 2000 mg e 3000 mg. Em algumas modalidades, a quantidade situa-se entre 100 - 2000 mg.

[00193] Em algumas modalidades, a dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito e administrado a um indivíduo pode variar de 0,1 a 500, 0,1 a 100, 0,1 a 50, 0,1 a 20, 0,1 a 10, 1 a 10, 1 a 7, de 1 a 5 ou 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal. Em algumas modalidades, a dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal anti-

CGRP antagonista) aqui descrito e administrado a um indivíduo pode ser, pode ser, no máximo, pode ser menor do que, ou pode ser, pelo menos, 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, ou 500 mg/kg de peso corporal.

[00194] Em algumas modalidades, a frequência em que uma dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito é administrado a um indivíduo pode variar. Em algumas modalidades, uma única dose de anticorpo pode ser administrada a um indivíduo através de terapia. Em algumas modalidades, a frequência em que uma dose ou quantidade de um anticorpo é administrada a um indivíduo é constante (por exemplo, administrada uma vez por mês). Em algumas modalidades, a frequência em que uma dose ou quantidade de um anticorpo aqui descrito é administrada a um indivíduo é variável (por exemplo, uma dose inicial seguida de uma dose de um mês, seguida por doses adicionais em três meses e sete meses). Em algumas modalidades, a frequência na qual um anticorpo é administrado a um indivíduo é, é, pelo menos, é menos do que, ou é, no máximo, um, dois, três, quatro, cinco, ou seis vezes por dia. Em algumas modalidades, a frequência com a qual um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) é administrado a um indivíduo é, é, pelo menos, é menos do que, ou é, no máximo, um, dois, três, quatro, cinco, ou seis a doses por dia.

[00195] Em algumas modalidades, a frequência em que é administrada uma dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula

a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito, para um indivíduo é, é pelo menos, é menor que, ou é, no máximo, um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, ou vinte tempo (s) por cada um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, vinte, vinte e um, vinte e dois, vinte e três, vinte e quatro, vinte e cinco, vinte e seis, vinte e sete, vinte e oito, vinte e nove, trinta, trinta e um, trinta e dois, trinta e três, trinta e quatro, trinta e cinco, trinta e seis, trinta e sete, trinta e oito, trinta e nove, quarenta, quarenta e um, quarenta e dois, quarenta e três, quarenta e quatro, quarenta e cinco, quarenta e seis, quarenta e sete, quarenta e oito, quarenta e nove, cinquenta, cinquenta e cinco, sessenta, sessenta e cinco, setenta, setenta e cinco, oitenta, oitenta e cinco, noventa, noventa e cinco, cem, cento e vinte e cinco, cento e cinquenta, cento e oitenta, ou duzentos dias.

[00196] Em algumas modalidades, a frequência em que é administrada uma dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito, para um indivíduo é, é pelo menos, é menor que, ou é, no máximo, um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, ou vinte tempo (s) por cada um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, vinte, vinte e um, vinte e dois, vinte e três, vinte e quatro, vinte e cinco, vinte e seis, vinte e sete, vinte e oito, vinte e nove, trinta, trinta e um, trinta e dois, trinta e três, trinta e quatro, trinta e cinco, trinta e seis, trinta e sete, trinta e oito, trinta e nove, quarenta, quarenta e um, quarenta e dois, quarenta e três, quarenta e quatro, quarenta e cinco, quarenta e seis, quarenta e sete, quarenta e oito, quarenta e nove, cinquenta, cinquenta e cinco, sessenta, sessenta e cinco, setenta, setenta e cinco, oitenta, oitenta e cinco, noventa, noventa e cinco ou

cem semanas. Em algumas modalidades, a frequência com a qual um anticorpo (por exemplo, anticorpo, monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, o anticorpo antagonista monoclonal anti-CGRP) aqui descrito é administrado a um indivíduo é inferior a um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, catorze, quinze ou doses por semana.

[00197] Em algumas modalidades, a frequência em que uma dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, monoclonal anti-CGRP anticorpo antagonista) é administrada a um indivíduo é, é pelo menos, é menor que, ou é, no máximo, um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, ou vinte vezes por cada mês, a cada dois meses, a cada três meses, a cada quatro meses, a cada cinco meses, de seis em seis meses, a cada sete meses, a cada oito meses, a cada nove meses, a cada dez meses, a cada onze meses, a cada doze meses, cada treze meses, a cada quatorze meses, de quinze em quinze meses, a cada dezesseis meses, a cada dezessete meses ou a cada 18 meses. Em algumas modalidades, a frequência com a qual um anticorpo (por exemplo, anticorpo, monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, o anticorpo antagonista monoclonal anti-CGRP) aqui descrito é administrado a um indivíduo é inferior a um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, catorze, quinze ou doses por mês. Em algumas modalidades, uma dose ou quantidade de um anticorpo pode ser administrada (por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente) a um indivíduo uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes, sete vezes, oito vezes, nove vezes, dez vezes ou mais por mês.

[00198] Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de 50 mg, 100 mg a 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg,

1000 mg, 1050 mg, 1100 mg, 1150 mg, 1200 mg, 1250 mg, 1300 mg, 1350 mg, 1400 mg, 1450 mg, 1500 mg de , 1550 mg, 1600 mg, 1650 mg, 1700 mg, 1750 mg, 1800 mg, 1850 mg, 1900 mg, 1950 mg, 2000 mg, 2,050 mg, 2,100 mg, 2,150 mg, 2200 mg, 2250 mg, 2300 mg, 2350 mg, 2400 mg, 2450 mg, 2500 mg, 2550 mg, 2600 mg, 2650 mg, 2700 mg, 2750 mg, 2800 mg, 2850 mg, 2900 mg, 2950 mg, 3000 mg, ou mais pode ser administrado (por exemplo, subcutaneamente ou por via intravenosa) a um indivíduo uma vez por mês. Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de entre 0,1 mg a 5000 mg, 1 mg a 4000 mg, de 10 mg a 3000 mg, de 10 mg a 2000 mg, 100 mg a 2000 mg, de 150 mg a 2000 mg, 200 mg a 2000 mg, 250 mg a 2000 mg, 300 mg a 2000 mg, 350 mg a 2000 mg, 400 mg a 2000 mg, 450 mg a 2000 mg, 500 mg a 2000 mg, 550 mg a 2000 mg, 600 mg e 2000 mg, 650 mg a 2000 mg, 700 mg a 2000 mg, 750 mg a 2000 mg, 800 mg a 2000 mg, 850 mg a 2000 mg, 900 mg a 2000 mg, 950 mg a 2000 mg, ou 1000 mg a 2000 mg pode ser administrado (por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente) a um indivíduo uma vez por mês. Em algumas modalidades, entre 100 - 2000 mg de anticorpo são administrados uma vez por mês.

[00199] Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de 50 mg, 100 mg a 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1050 mg, 1100 mg, 1150 mg, 1200 mg, 1250 mg, 1300 mg, 1350 mg, 1400 mg, 1450 mg, 1500 mg de , 1550 mg, 1600 mg, 1650 mg, 1700 mg, 1750 mg, 1800 mg, 1850 mg, 1900 mg, 1950 mg, 2000 mg, 2,050 mg, 2,100 mg, 2,150 mg, 2200 mg, 2250 mg, 2300 mg, 2350 mg, 2400 mg, 2450 mg, 2500 mg, 2550 mg, 2600 mg, 2650 mg, 2700 mg, 2750 mg, 2800 mg, 2850 mg, 2900 mg, 2950 mg, 3000 mg, ou mais pode ser administrado (por exemplo, subcutaneamente ou por via intravenosa) a um indivíduo uma vez a cada três meses. Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de entre 0,1 mg a 5000 mg, 1 mg a 4000 mg, de 10 mg a

3000 mg, de 10 mg a 2000 mg, 100 mg a 2000 mg, de 150 mg a 2000 mg, 200 mg a 2000 mg, 250 mg a 2000 mg, 300 mg a 2000 mg, 350 mg a 2000 mg, 400 mg a 2000 mg, 450 mg a 2000 mg, 500 mg a 2000 mg, 550 mg a 2000 mg, 600 mg e 2000 mg, 650 mg a 2000 mg, 700 mg a 2000 mg, 750 mg a 2000 mg, 800 mg a 2000 mg, 850 mg a 2000 mg, 900 mg a 2000 mg, 950 mg a 2000 mg, ou 1000 mg a 2000 mg pode ser administrado (por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente) a um indivíduo uma vez a cada três meses. Em algumas modalidades, entre 450 mg a 2000 mg é administrada uma vez de três em três meses, ou menos.

[00200] Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de 50 mg, 100 mg a 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1050 mg, 1100 mg, 1150 mg, 1200 mg, 1250 mg, 1300 mg, 1350 mg, 1400 mg, 1450 mg, 1500 mg , 1550 mg, 1600 mg, 1650 mg, 1700 mg, 1750 mg, 1800 mg, 1850 mg, 1900 mg, 1950 mg, 2000 mg, 2,050 mg, 2,100 mg, 2,150 mg, 2200 mg, 2250 mg, 2300 mg, 2350 mg, 2400 mg, 2450 mg, 2500 mg, 2550 mg, 2600 mg, 2650 mg, 2700 mg, 2750 mg, 2800 mg, 2850 mg, 2900 mg, 2950 mg, 3000 mg, ou mais pode ser administrado (por exemplo, subcutaneamente ou por via intravenosa) a um indivíduo uma vez a cada seis meses. Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de entre 0,1 mg a 5000 mg, 1 mg a 4000 mg, de 10 mg a 3000 mg, de 10 mg a 2000 mg, 100 mg a 2000 mg, 150 mg a 2000 mg, 200 mg a 2000 mg, 250 mg a 2000 mg, 300 mg a 2000 mg, 350 mg a 2000 mg, 400 mg a 2000 mg, 450 mg a 2000 mg, 500 mg a 2000 mg, 550 mg a 2000 mg, 600 mg e 2000 mg, 650 mg a 2000 mg, 700 mg a 2000 mg, 750 mg a 2000 mg, 800 mg a 2000 mg, 850 mg a 2000 mg, 900 mg a 2000 mg, 950 mg a 2000 mg, ou 1000 mg a 2000 mg pode ser administrado (por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente) a um indivíduo uma vez a cada seis meses. Em algumas modalidades, entre 450 mg a 2000 mg é administrada uma vez de seis em seis meses, ou menos.

[00201] Em algumas modalidades, a frequência à qual é administrada uma dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) a um indivíduo (por exemplo, por via subcutânea ou por via intravenosa) é, é, pelo menos, é menor que, ou é, no máximo, um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, ou vinte vezes por cada trimestre. Como pode ser apreciado, um "trimestre" pode se referir a um período de um trimestre ou também pode se referir a um trimestre civil, como um período de tempo de 1 janeiro - 31 março, 1 abril - 30 junho, 1 julho - 30 setembro ou outubro 1 - 31 de dezembro. Em alguns casos, um "trimestre" pode referir-se um período de tempo de cerca de três meses.

[00202] Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de 50 mg, 100 mg a 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1050 mg, 1100 mg, 1150 mg, 1200 mg, 1250 mg, 1300 mg, 1350 mg, 1400 mg, 1450 mg, 1500 mg, 1550 mg, 1600 mg, 1650 mg, 1700 mg, 1750 mg, 1800 mg, 1850 mg, 1900 mg, 1950 mg, 2000 mg, 2,050 mg, 2,100 mg, 2,150 mg, 2200 mg, 2250 mg, 2300 mg, 2350 mg, 2400 mg, 2450 mg, 2500 mg, 2550 mg, 2600 mg, 2650 mg, 2700 mg, 2750 mg, 2800 mg, 2850 mg, 2900 mg, 2950 mg, 3000 mg, ou mais pode ser administrado (por exemplo, subcutaneamente ou por via intravenosa) a um indivíduo uma vez a cada trimestre. Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de entre 0,1 mg a 5000 mg, 1 mg a 4000 mg, de 10 mg a 3000 mg, de 10 mg a 2000 mg, 100 mg a 2000 mg, de 150 mg a 2000 mg, 200 mg a 2000 mg, 250 mg a 2000 mg, 300 mg a 2000 mg, 350 mg a 2000 mg, 400 mg a 2000 mg, 450 mg a 2000 mg, 500 mg a 2000 mg, 550 mg a 2000 mg, 600 mg e 2000 mg, 650 mg a 2000 mg, 700 mg a 2000 mg, 750 mg a 2000 mg, 800 mg a 2000 mg, 850 mg a 2000 mg, 900 mg a 2000 mg, 950 mg a 2000 mg, ou 1000 mg a 2000 mg pode ser administrado

(por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente) a um indivíduo uma vez a cada trimestre.

[00203] Em algumas modalidades, a frequência em que é administrada uma dose ou quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo, monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) é, é pelo menos, é menos do que , ou é no máximo, uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, ou vinte vezes por a cada ano, a cada dois anos, a cada três anos, a cada quatro anos, ou de cinco em cinco anos. Em algumas modalidades, a frequência com a qual um anticorpo (por exemplo, anticorpo, monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) é administrado a um indivíduo é inferior a um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, vinte, vinte e um, vinte e dois, vinte e três, vinte e quatro ou vinte e cinco doses por ano.

[00204] Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de 50 mg, 100 mg a 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1050 mg, 1100 mg, 1150 mg, 1200 mg, 1250 mg, 1300 mg, 1350 mg, 1400 mg, 1450 mg, 1500 mg , 1550 mg, 1600 mg, 1650 mg, 1700 mg, 1750 mg, 1800 mg, 1850 mg, 1900 mg, 1950 mg, 2000 mg, 2,050 mg, 2,100 mg, 2,150 mg, 2200 mg, 2250 mg, 2300 mg, 2350 mg, 2400 mg, 2450 mg, 2500 mg, 2550 mg, 2600 mg, 2650 mg, 2700 mg, 2750 mg, 2800 mg, 2850 mg, 2900 mg, 2950 mg, 3000 mg, ou mais pode ser administrado a um indivíduo uma vez a cada ano. Em algumas modalidades, um anticorpo em uma dose ou quantidade de entre 0,1 mg a 5000 mg, 1 mg a 4000 mg, de 10 mg a 3000 mg, de 10 mg a 2000 mg, 100 mg a 2000 mg, de 150 mg a 2000 mg, 200 mg a 2000 mg, 250 mg a 2000 mg, 300 mg a 2000 mg, 350 mg a 2000

mg, 400 mg a 2000 mg, 450 mg a 2000 mg, 500 mg a 2000 mg, 550 mg a 2000 mg, 600 mg e 2000 mg, 650 mg a 2000 mg, 700 mg a 2000 mg, 750 mg a 2000 mg, 800 mg a 2000 mg, 850 mg a 2000 mg, 900 mg a 2000 mg, 950 mg a 2000 mg, ou 1000 mg a 2000 mg pode ser administrado (por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente) a um indivíduo uma vez a cada ano. Em algumas modalidades, entre 450 mg a 2000 mg é administrada uma vez de ano em ano, ou menos.

[00205] Em algumas modalidades, um método pode compreender a administração de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito a um indivíduo em uma pluralidade de dias. Duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito ou mais dias da pluralidade de dias podem ser mais do que 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 ou mais dias de intervalo. Em algumas modalidades, duas da pluralidade de dias são mais do que um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, catorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezenove, vinte, vinte e um, vinte e dois, vinte e três, vinte e quatro, vinte e cinco, vinte e seis, vinte e sete, vinte e oito, vinte e nove, trinta ou mais dias de intervalo. Além disso, em algumas modalidades, a quantidade de anticorpo administrada no primeiro dia de uma pluralidade de dias pode ser diferente (por exemplo, maior ou menor) do que a quantidade de anticorpo administrada no segundo dia.

[00206] Em algumas modalidades, uma dose inicial (por exemplo, uma dose de carga) de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, o anticorpo antagonista monoclonal anti-CGRP) aqui descrita pode ser administrada a um indivíduo, seguido pela administração de uma ou mais doses adicionais, em intervalos desejados. Em algumas modalidades, a dose inicial e uma ou mais das doses adicionais são a mesma dose. Em algumas modalidades, a uma ou mais doses adicionais são uma dose diferente do

que a dose inicial. Em algumas modalidades, a frequência na qual as uma ou mais doses adicionais são administradas é constante (por exemplo, todos os meses). Em algumas modalidades, a frequência na qual as uma ou mais doses adicionais são administradas é variável (por exemplo, uma dose adicional administrada um mês após a dose inicial, seguida por mais uma dose adicional de três meses após a dose inicial). Pode ser usado qualquer regime desejável e/ou terapêutico de dose de carga inicial, doses adicionais, e a frequência (por exemplo, incluindo as aqui descritas) de doses adicionais. Um regime exemplificativo inclui uma dose de carga inicial de 675 mg de anticorpo antagonista anti-CGRP administrada por via subcutânea, seguido por doses de manutenção de 225 mg subsequentes do anticorpo administrado por via subcutânea em intervalos de um mês.

[00207] Em algumas modalidades, uma dose inicial de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP monoclonal) de 0,1 µg, 1 µg, 100 µg, 1 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 450 mg, 475 mg, 500 mg, 525 mg, 550 mg, 575 mg, 600 mg, 625 mg, 650 mg, 675 mg, 700 mg, 725 mg, 750 mg, 775 mg, 800 mg, 825 mg, 850 mg, 875 mg, 900 mg, 925 mg, 950 mg, 975 mg, 1000 mg, 1500 mg, 2000 mg e 3000 mg pode ser administrada a um indivíduo, seguido por uma ou mais doses adicionais do anticorpo de 0,1 µg, 1 µg, 100 µg, 1 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 450 mg, 475 mg, 500 mg, 525 mg, 550 mg, 575 mg, 600 mg, 625 mg, 650 mg, 675 mg, 700 mg, 725 mg, 750 mg, 775 mg, 800 mg, 825 mg, 850 mg, 875 mg, 900 mg, 925 mg, 950 mg, 975 mg, 1000 mg, 1500 mg, 2000 mg e 3000 mg.

[00208] Em algumas modalidades, uma dose ou quantidade de anticorpo (por exemplo, anticorpo, monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista

anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrita pode ser dividida em sub-doses e administrada como sub-doses múltiplas, dependendo, por exemplo, da via de administração e/ou formulação particular administrada. Por exemplo, nos casos em que a dose é administrada por via subcutânea, a dose subcutânea pode ser dividida em sub-doses múltiplas e cada sub-dose administrada em um local diferente, a fim de evitar, por exemplo, uma injeção subcutânea única maior em uma única local. Por exemplo, uma dose subcutânea de 900 mg pode ser dividida em quatro sub-doses de 225 mg cada e cada dose de 225 mg administrada em local diferente, o que pode ajudar a minimizar o volume injetado em cada local. A divisão de sub-doses pode ser igual (por exemplo, 4 sub-doses iguais) ou pode ser diferente (por exemplo, 4 sub-doses, duas das sub-doses duas vezes tão grandes quanto as outras sub-doses).

[00209] Em algumas modalidades, o número de doses de anticorpo administrado a um indivíduo ao longo do curso do tratamento pode variar dependendo de, por exemplo, conseguir a redução da incidência de um sintoma vasomotor e/ou dor de cabeça no indivíduo. Em algumas modalidades, o sintoma vasomotor é associado com uma forma de dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca, enxaqueca crónica, enxaqueca episódica, outro tipo de dor de cabeça, etc.). Por exemplo, o número de doses administradas ao longo do curso do tratamento pode ser, pelo menos, ou pode ser, no máximo, 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 ou 50. Em alguns casos (por exemplo, nos casos em que um indivíduo tem enxaqueca crónica), o tratamento pode ser dado indefinidamente. Em alguns casos, o tratamento pode ser agudo de tal forma que, no máximo, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 doses são administradas a um indivíduo para o tratamento.

[00210] Em algumas modalidades, uma dose (ou sub-dose) ou a quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui

descrita pode ser formulada em uma formulação líquida e administrada (por exemplo, por injeção subcutânea, por via de injeção intravenosa) a um indivíduo. Em tais casos, o volume de anticorpo compreendendo a formulação líquida pode variar dependendo de, por exemplo, a concentração de anticorpo na formulação líquida, a dose desejada do anticorpo, e/ou da via de administração usada. Por exemplo, o volume de formulação líquida compreendendo um anticorpo aqui descrito e administrada (por exemplo, através de uma injeção, tal como, por exemplo, uma injeção subcutânea ou injeção intravenosa) a um indivíduo pode ser a partir de 0,001 mL de 10,0 mL, 0,01 mL a 5,0 ml, 0,1 ml a 5 ml, 0,1 ml a 3 ml, 0,5 ml a 2,5 ml, ou 1 ml a 2,5 ml. Por exemplo, o volume da formulação líquida que compreende um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito e administrado (por exemplo, através de uma injeção, tal como, por exemplo, uma injeção subcutânea, uma injeção intravenosa) a um indivíduo pode ser, pode ser, pelo menos, pode ser menor do que, ou pode ser, no máximo, 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, ou 10,0 mL.

[00211] Em algumas modalidades, uma dose (ou sub-dose) ou a quantidade de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrita pode ser fornecida em recipientes pré-cheios úteis na administração de anticorpo a um indivíduo. Tais recipientes pré-cheios podem ser concebidos para autoadministração ou para administração por outrem. Por exemplo, uma dose (ou sub-dose) ou a quantidade de anticorpo aqui descrito podem ser fornecidas como uma formulação líquida em seringas pré-preenchidas. Em tais exemplos, as seringas pré-

preenchidas podem ser concebidas para autoadministração ou para administração por outrem. Em alguns casos, as seringas pré-preenchidas podem ser concebidas para administração por via subcutânea e/ou intravenosa.

[00212] Para a finalidade da presente invenção, a dosagem apropriada de um anticorpo pode depender do anticorpo (ou suas composições) usado, do tipo e da gravidade do sintoma vasomotor, do tipo e da gravidade da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) ou outra condição para ser tratadas, se o agente é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia anterior, da história clínica do paciente e da resposta ao agente, e da descrição do médico assistente. Normalmente, o clínico irá administrar o anticorpo até que uma dosagem que alcance o resultado desejado seja atingida. A dose e/ou a frequência pode variar ao longo do curso do tratamento.

[00213] Considerações empíricas, tais como a meia-vida, geralmente vão contribuir para a determinação da dosagem. Por exemplo, os anticorpos que são compatíveis com o sistema imunológico humano, tais como anticorpos humanizados ou anticorpos completamente humanos, podem ser usados para prolongar a semivida do anticorpo e para evitar que o anticorpo seja atacado pelo sistema imune do hospedeiro. A frequência de administração pode ser determinada e ajustada durante o curso da terapia, e é geralmente, mas não necessariamente, com base no tratamento e/ou supressão e/ou melhoria e/ou o atraso da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) ou outra condição. Alternativamente, formulações de liberação contínua sustentada de anticorpos podem ser apropriadas. Várias formulações e dispositivos para a realização de liberação prolongada são conhecidas na técnica.

[00214] Em uma modalidade, as dosagens para um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) descrito aqui podem ser determinadas empiricamente, em indivíduos a quem foi administrada uma ou mais administrações do anticorpo. Aos indivíduos são dadas doses incrementais de um anticorpo. Para

avaliar a eficácia de um anticorpo, um indicador da doença pode ser seguido.

[00215] A administração de um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) em conformidade com os métodos da presente invenção pode ser contínua ou intermitente, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do receptor, se o objetivo da administração é fator terapêutico ou profilático, e outros conhecidos dos profissionais especializados. A administração de um anticorpo pode ser essencialmente contínua ao longo de um período pré-selecionado de tempo ou pode ser de uma série de doses espaçadas, por exemplo, quer antes, durante ou após o desenvolvimento de dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca); antes; durante; antes e depois; durante e após o; antes e durante; ou antes, durante, e após o desenvolvimento de dor de cabeça. A administração pode ser antes, durante e/ou depois de qualquer acontecimento que possa dar origem a dor de cabeça.

[00216] Em algumas modalidades, mais do que um anticorpo pode estar presente. Pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco diferentes, ou mais anticorpos podem estar presentes. Geralmente, os anticorpos podem ter atividades complementares que não se afetam adversamente umas às outras. Um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito também pode ser usado em conjunto com outros antagonistas de CGRP ou antagonistas dos receptores de CGRP. Por exemplo, um ou mais dos seguintes antagonistas de CGRP podem ser usados: uma molécula anti-sense dirigida a um CGRP (incluindo uma molécula anti-sense direcionado a um ácido nucleico que codifica o CGRP), um composto inibidor de CGRP, um análogo estrutural de CGRP, uma mutação dominante negativa de um receptor de CGRP que se liga a um CGRP, e um anticorpo anti-receptor de CGRP. Um anticorpo pode também ser usados em conjunto com outros agentes que servem para reforçar e/ou complementar a eficácia

dos agentes.

[00217] Diagnóstico ou avaliação da dor de cabeça é bem estabelecido na técnica. A avaliação pode ser realizada com base em medidas subjetivas, como a caracterização do paciente dos sintomas. Por exemplo, enxaqueca pode ser diagnosticada com base nos seguintes critérios: 1) ataques episódicos de dor de cabeça de duração de 4 a 72 horas; 2) com dois dos seguintes sintomas: dor unilateral, latejante, agravação em movimento, e dor de intensidade moderada ou grave; e 3) um dos seguintes sintomas: náuseas ou vômitos, e fotofobia ou fonofobia. Goadsby et al., N. Engl. J. Med. 346:257-270, 2002. Em algumas modalidades, a avaliação da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) pode ser via hora dor de cabeça, tal como descrito aqui em outro local. Por exemplo avaliação da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) pode ser em termos de horas diárias de dor de cabeça, dor de cabeça em horas semanais, horas de dor de cabeça mensais e/ou em horas de dor de cabeça anuais. Em alguns casos, hora dor de cabeça pode ser conforme relatado pelo indivíduo.

[00218] A eficácia do tratamento pode ser avaliada por métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, o alívio da dor pode ser avaliado. Por conseguinte, em algumas modalidades, o alívio da dor é subjetivamente observado após 1, 2, ou algumas horas após a administração de um anticorpo anti-CGRP. Em algumas modalidades, a frequência de ataques de dor de cabeça é subjetivamente observada após administração de um anticorpo anti-CGRP.

[00219] Em algumas modalidades, um método para o tratamento ou redução da incidência de dor de cabeça em um indivíduo, tal como aqui descrito, pode reduzir a incidência de dor de cabeça, após uma única administração de um anticorpo (por exemplo, anticorpo, monoclonal que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo antimonoclonal antagonista -CGRP) aqui descrito, para um período de tempo prolongado. Por exemplo, a incidência de dor de cabeça pode ser

reduzida para pelo menos 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 ou mais dias após uma única administração.

[00220] Em algumas modalidades, um método para o tratamento ou redução da incidência de dor de cabeça em um indivíduo, tal como aqui descrito, pode reduzir o número de horas de dor de cabeça experimentados por um objeto a partir de um nível pré-administração após a administração de uma ou mais doses de um anticorpo (por exemplo, monoclonal anticorpo que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito para o indivíduo. Por exemplo, horas de dor de cabeça diárias experimentadas pelo indivíduo após a administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o indivíduo podem ser reduzidas por 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 ou 24 horas de dor de cabeça de um nível pré-administração no indivíduo. Em alguns casos, horas de dor de cabeça diárias experimentadas pelo indivíduo após a administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o indivíduo podem ser reduzidas em 0,5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais, relativamente a um nível pré-administração no indivíduo. Em outro exemplo, horas semanais de dor de cabeça no indivíduo após administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o indivíduo podem ser reduzidas por 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ou mais horas de dor de cabeça de um nível pré-administração no indivíduo. Em alguns casos, horas de dor de cabeça semanais experimentadas pelo indivíduo após a administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o indivíduo podem ser reduzidas em 0,5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais, relativamente a um nível pré-administração no indivíduo. Em outro exemplo, horas mensais de dor de cabeça no indivíduo após administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o

indivíduo podem ser reduzidas por 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 ou mais horas de dor de cabeça de um nível pré-administração. Em alguns casos, horas de dor de cabeça semanais experimentadas pelo indivíduo após a administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o indivíduo podem ser reduzidas em 0,5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais, relativamente a um nível pré-administração no indivíduo.

[00221] Em algumas modalidades, um método para o tratamento ou redução da incidência de dor de cabeça em um indivíduo, tal como aqui descrito, pode reduzir o número de dias de dor de cabeça experimentados por um objeto a partir de um nível pré-administração após a administração de uma ou mais doses de um anticorpo (por exemplo, monoclonal anticorpo que modula a via de CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP) aqui descrito para o indivíduo. Por exemplo, dias semanais de dor de cabeça no indivíduo após administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o indivíduo podem ser reduzidos por 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, ou 7 dias de dor de cabeça de um nível pré-administração no indivíduo. Em alguns casos, dias de dor de cabeça semanais experimentadas pelo indivíduo após a administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o indivíduo podem ser reduzidos em 0,5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais, relativamente a um nível pré-administração no indivíduo. Em outro exemplo, dias mensais de dor de cabeça no indivíduo após administração de uma ou mais doses de um anticorpo para o indivíduo podem ser reduzidos por 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 ou mais dias de dor de cabeça de um nível pré-administração.

[00222] Em algumas modalidades, um método pode compreender a administração a um indivíduo de um ou mais agentes adicionais simultaneamente ou sequencialmente com um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal que modula a via de

CGRP, o anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal antagonista anti-CGRP). Em algumas modalidades, um agente adicional pode ser um medicamento anti-dor de cabeça, tal como um exemplo de medicamentos anti-dor de cabeça (por exemplo, agonistas de 5-HT₁, triptanos, alcaloides de cravagem do centeio, opiáceos, □antagonistas p-adrenérgicos, NSAIDs) aqui descritos em outro local. Em algumas modalidades, um efeito terapêutico pode ser maior em comparação com o uso de um anticorpo ou um ou mais agentes adicionais sozinhos. Deste modo, um efeito sinérgico entre um anticorpo e um ou mais agentes adicionais pode ser alcançado. Em algumas modalidades, um ou mais agentes podem ser tomados por um indivíduo profilaticamente.

B. anticorpos antagonistas anti-CGRP

[00223] Em algumas modalidades, os métodos da invenção utilizam um anticorpo, que pode ser um anticorpo antagonista anti-CGRP. Um anticorpo antagonista anti-CGRP pode referir-se a qualquer molécula de anticorpo que bloqueia, suprime ou reduz (incluindo significativamente) a atividade biológica de CGRP, incluindo vias a jusante mediadas por sinalização de CGRP, tais como ligação e/ou desencadeamento de uma resposta celular ao receptor de CGRP.

[00224] Um anticorpo antagonista anti-CGRP pode exibir qualquer um ou mais das seguintes características: (a) se ligam a CGRP; (B) bloqueiam o CGRP a partir da ligação ao seu receptor(es); (c) ativam o bloco ou diminuem o receptor de CGRP (incluindo a ativação de AMPc); (d) inibem a atividade biológica de CGRP ou vias a jusante mediadas pela função de sinalização de CGRP; (e) previnem, melhoram ou tratam qualquer aspecto da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca); (f) aumentam a depuração de CGRP; e (g) inibem (redução), produzem ou libertam a síntese de CGRP. Anticorpos antagonista anti-CGRP são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Tan et al., Clin. Sci. (Lond). 89:565-73, 1995; Sigma (Missouri, US), número do produto C7113 (clone #4901); Plourde et al., Peptides 14:1225-1229, 1993.

[00225] Em algumas modalidades, o anticorpo reage com o CGRP de uma maneira que inibe CGRP, e/ou a via de CGRP, incluindo vias a jusante mediadas pela função de sinalização de CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP reconhece CGRP humano. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP humano liga-se a ambos α -CGRP e β -CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP se liga ao CGRP humano e de rato. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP se liga ao fragmento C-terminal com aminoácidos de 25-37 de CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP se liga a um epítipo C-terminal nos aminoácidos de 25-37 de CGRP.

[00226] Os anticorpos úteis na presente invenção podem incluir anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpos (por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos heteroconjugados, única cadeia (scFv), os seus mutantes, proteínas de fusão compreendendo uma porção de anticorpo (por exemplo, um anticorpo de domínio), anticorpos humanizados e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um local de reconhecimento do antígeno da especificidade requerida, incluindo variantes de glicosilação de anticorpos, sequência de aminoácidos variantes de anticorpos, e anticorpos modificados covalentemente. Os anticorpos podem ser murinos, ratos, humanos, ou de qualquer outra origem (incluindo anticorpos quiméricos ou humanizados).

[00227] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CGRP é um anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP é humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo é humano. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP é um anticorpo G1 (conforme descrito aqui). Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP compreende um ou mais CDR(s) (como um, dois, três, quatro, cinco ou, em algumas modalidades, todos os

seis CDRs) do anticorpo G1 ou as variantes de G1 mostradas na Tabela 6. Em outras modalidades, ainda, o anticorpo antagonista anti-CGRP compreende a sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada mostrada na Figura 5 (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve mostrada na Figura 5 (SEQ ID NO: 2).

[00228] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve (LCVR) e uma região variável de cadeia pesada (HCVR) selecionadas de entre os grupos que consistem em:(a) LCVR17 (SEQ ID NO: 58) e HCVR22 (SEQ ID NO: 59); (b) LCVR18 (SEQ ID NO: 60) e HCVR23 (SEQ ID NO: 61); (c) LCVR19 (SEQ ID NO: 62) e HCVR24 (SEQ ID NO: 63); (d) LCVR20 (SEQ ID NO: 64) e HCVR25 (SEQ ID NO: 65); (e) LCVR21 (SEQ ID NO: 66) e HCVR26 (SEQ ID NO: 67); (f) LCVR27 (SEQ ID NO: 68) e HCVR28 (SEQ ID NO: 69); (g) LCVR29 (SEQ ID NO: 70) e HCVR30 (SEQ ID NO: 71); (h) LCVR31 (SEQ ID NO: 72) e HCVR32 (SEQ ID NO: 73); (i) LCVR33 (SEQ ID NO: 74) e HCVR34 (SEQ ID NO: 75); (j) LCVR35 (SEQ ID NO: 76) e HCVR36 (SEQ ID NO: 77); e (k) LCVR37 (SEQ ID NO: 78) e HCVR38 (SEQ ID NO: 79). As sequências destas regiões são aqui proporcionadas. Outros exemplos de anticorpos estão descritos em US20110305711, US20120294802, US20120294797 e US20100172895, os quais são aqui incorporados por referência.

[00229] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte aqui descrita. Em algumas modalidades, a região constante é modificada conforme descrito em Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; Pedido PCT No. PCT/GB99/01441; e/ou o Pedido de Patente UK No. 9809951,8. Em outras modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de IgG2 de cadeia pesada humana, compreendendo as seguintes mutações: A330P331 para S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência de IgG2 de tipo selvagem). Eur. J. Immunol. (1999)

29:2613-2624. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de IgG4 compreendendo as seguintes mutações: E233F234L235 para P233V234A235. Em ainda outras modalidades, a região constante é aglicosilada para a glicosilação ligada a N. Em algumas modalidades, a região constante é aglicosilada para a glicosilação ligada a N pela mutação do resíduo de ligação a oligossacarídeos (como Asn297) e/ou resíduos de flanqueamento que são parte da sequência de reconhecimento de N-glicosilação na região constante. Em algumas modalidades, a região constante aglicosilada para a glicosilação ligada a N. A região constante pode ser aglicosilada para a glicosilação ligada a N, enzimaticamente ou pela expressão em uma célula hospedeira deficiente quanto à glicosilação.

[00230] A afinidade de ligação (KD) de um anticorpo anti-CGRP para CGRP (tal como humano α -CGRP) pode ser de cerca de 0,02 a cerca de 200 nM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação fica entre aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, cerca de 15 pM, cerca de 10 pM, cerca de 5 pM ou cerca de 2 pM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é inferior a cerca de 250 nM, cerca de 200 nM, cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM ou aproximadamente 50 pM.

[00231] Uma maneira de determinar a afinidade de ligação de anticorpos para CGRP é medindo a afinidade de ligação de fragmentos Fab monofuncionais do anticorpo. Para obter fragmentos Fab monofuncionais, um anticorpo (por exemplo, IgG) pode ser clivado com papaína ou expresso de forma recombinante. A afinidade de um fragmento anti-CGRP de Fab de um anticorpo pode ser determinada por ressonância de plasma de superfície (ressonância de plasmon de superfície Biacore3000™ (SPR), sistema BIAcore, INC, Piscataway NJ), equipado com chips sensores de

estreptavidina pré-imobilizada (SA) usando tampão de execução HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 a mM, 0,005% v/v Tensoativo P20). CGRP humano biotilado (ou qualquer outro CGRP) pode ser diluído em tampão de HBS-EP para uma concentração de menos do que 0,5 ug/mL e injetado ao longo dos canais de chip individuais usando tempos de contato variáveis, para realizar duas gamas de densidade de antígeno, quer 50-200 unidades de resposta (RU) para estudos cinéticos por menorizados ou 800-1.000 RU para ensaios de triagem. Estudos de regeneração mostraram que o NaOH a 25 mM em 25% v/v de etanol remove eficazmente o Fab ligado, mantendo a atividade de CGRP no chip para mais de 200 injeções. Tipicamente, diluições em série (abrangendo concentrações de KD estimado de 0.1-10x) de amostras de Fab purificado foram injetadas durante 1 min a 100 µL/hora e são permitidos tempos de até duas horas de dissociação. As concentrações das proteínas Fab são determinadas por ELISA e/ou eletroforese de SDS-PAGE utilizando um fragmento de Fab de concentração conhecida (tal como determinado por análise de aminoácidos) como um padrão. Taxas de cinética de associação (k_{on}) e taxas de dissociação (k_{off}) foram obtidas simultaneamente através do ajuste dos dados globais a um modelo 1:1 de ligação de Langmuir (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110), utilizando o programa BIAevaluation. Valores de constante de equilíbrio de dissociação (KD) são calculados como k_{off}/k_{on} . Este protocolo é adequado para uso na determinação da afinidade de ligação de um anticorpo a qualquer CGRP, incluindo CGRP humano, CGRP de outro mamífero (tal como CGRP de camundongo, o CGRP de rato, CGRP de primata), bem como diferentes formas de CGRP (tais como as formas α e β). A afinidade de ligação de um anticorpo é geralmente medida a 25 ° C, mas também pode ser medida a 37 ° C.

[00232] Os anticorpos, incluindo anticorpos antagonistas anti-CGRP, podem ser feitos por qualquer método conhecido na técnica. A rota e calendário de imunização do animal hospedeiro são geralmente de acordo com técnicas estabelecidas e

convencionais para estimulação e produção de anticorpos, como descrito adicionalmente aqui. As técnicas gerais para a produção de anticorpos humanos e de camundongo são conhecidas na técnica e são aqui descritas.

[00233] É contemplado que qualquer indivíduo mamífero, incluindo seres humanos ou células produtoras de anticorpos dos mesmos podem ser manipulados para servir como base para a produção de mamíferos, incluindo linhagens celulares de hibridoma humano. Tipicamente, o animal hospedeiro é inoculado por via intraperitoneal, por via intramuscular, por via oral, por via subcutânea, intraplantar, e/ou por via intradérmica com uma quantidade de imunógeno, incluindo tal como aqui descrito.

[00234] Os hibridomas podem ser preparados a partir dos linfócitos e células de mieloma imortalizadas utilizando a técnica de hibridação de células somáticas geral de Kohler, B. e Milstein, C. (1975) Nature 256: 495-497 ou como modificado por Buck, D.W., et al, Em. In vitro, 18: 377-381 (1982). Linhagens de mieloma disponíveis, incluindo, mas não se limitando a X63-Ag8.653 e aquelas a partir do Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EUA, podem ser usadas na hibridação. Geralmente, a técnica envolve a fusão de células de mieloma e células linfoides utilizando um fusogen tais como polietileno glicol, ou por meios elétricos bem conhecidos daqueles versados na técnica. Após a fusão, as células são separadas do meio de fusão e crescidas em um meio de crescimento seletivo, tal como a hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT), para eliminar as células parentais não hibridadas. Qualquer um dos meios aqui descritos, completados com ou sem soro, podem ser usados para a cultura de hibridomas que segregam anticorpos monoclonais. Como outra alternativa à técnica de fusão celular, as células B imortalizadas por EBV podem ser usadas para produzir anticorpos monoclonais (por exemplo, anticorpos monoclonais anti-CGRP) da presente invenção. Os hibridomas são expandidos e subclonados, se desejado, e os sobrenadantes são testados para a atividade anti-imunógeno por procedimentos de imunoensaio convencionais (por exemplo, radioimunoensaio, imunoensaio

enzimático, ou imunoenensaio de fluorescência).

[00235] Os hibridomas que podem ser usados como fonte de anticorpos abrangem todos os derivados, as células de progênie dos hibridomas parentais que produzem anticorpos monoclonais específicos para o CGRP, ou uma porção respectiva.

[00236] Os hibridomas que produzem tais anticorpos podem ser crescidos in vitro ou in vivo, utilizando procedimentos conhecidos. Os anticorpos monoclonais podem ser isolados a partir dos fluidos corporais ou de meios de cultura, por meio de procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais, tais como precipitação com sulfato de amônio, eletroforese em gel, diálise, cromatografia e ultrafiltração, se desejado. Atividade indesejada, se presente, pode ser removida, por exemplo, executando a preparação sobre adsorventes feitos do imunógeno ligado a uma fase sólida e eluindo ou libertando os anticorpos desejados fora do imunógeno. A imunização de um animal hospedeiro com um CGRP humano, ou um fragmento contendo a sequência de aminoácidos alvo conjugada com uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina de lapa *Fissurella*, albumina sérica, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja, utilizando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}_1\text{N} = \text{C} = \text{NR}$, onde R e R1 são grupos alquil diferentes, pode produzir uma população de anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais).

[00237] Se desejado, um anticorpo (por exemplo, anticorpo monoclonal ou policlonal antagonista anti-CGRP) de interesse pode ser sequenciado e a sequência de polinucleotídeo pode então ser clonada em um vector de expressão ou propagação. A sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida em um vector em uma célula hospedeira e a célula hospedeira pode então ser expandida e

congelada para futuro uso. Em alternativa, a sequência de polinucleotídeo pode ser usado para a manipulação genética para "humanizar" o anticorpo ou para melhorar a afinidade, ou outras características do anticorpo. Por exemplo, a região constante pode ser manipulada para se assemelhar a mais regiões constantes humanas para evitar a resposta imunológica se o anticorpo é usado em ensaios clínicos e tratamentos em seres humanos. Pode ser desejável manipular geneticamente a sequência de anticorpo para obter uma maior afinidade para o CGRP e uma maior eficácia na inibição de CGRP. Será evidente para aquele versado na técnica que uma ou mais alterações de polinucleotídeos podem ser feitas com o anticorpo antagonista anti-CGRP e ainda manter a sua capacidade de ligação a CGRP.

[00238] Humanizar um anticorpo monoclonal pode compreender quatro etapas gerais. Estas são: (1) determinar as sequências de nucleotídeos e sequência de aminoácidos previstas dos domínios variáveis de cadeia leve e pesada do anticorpo de partida (2) projetar o anticorpo humanizado, ou seja, decidir qual a região estrutural de anticorpo a ser usada durante o processo de humanização (3) metodologias/técnicas de humanização real e (4) a transfecção e expressão do anticorpo humanizado. Ver, por exemplo, Patentes US N° 4816567. 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5,530,101; 5.693.761; 5693762; 5585089; e 6.180.370.

[00239] Um número de moléculas de anticorpo "humanizadas" que compreendem um local de ligação a antígeno derivado de uma imunoglobulina não humana têm sido descritas, incluindo anticorpos quiméricos tendo regiões V de roedor modificadas e de roedor e as suas regiões determinantes de complementaridade associada (CDRs) fundidas com domínios constantes humanos. Ver, por exemplo, Winter et al. *Nature* 349:293-299 (1991), Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538 (1987), e Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583 (1987). Outras referências descrevem CDRs de roedor enxertadas em uma região de estrutura de suporte humana (FR) antes da fusão com um domínio

constante de anticorpo humano apropriado. Ver, por exemplo, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al. *Science* 239:1534-1536 (1988), e Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986). Outra referência descreve CDRs de roedor suportadas por regiões de estrutura folheada de roedor de forma recombinante. Ver, por exemplo, Publicação de Patente Europeia N° 0.519.596. Estas moléculas "humanizadas" são projetadas para minimizar a resposta imunológica indesejável para moléculas de anticorpos anti-humanos de roedor, o que limita a duração e a eficácia de aplicações terapêuticas de tais frações em receptores humanos. Por exemplo, a região constante de anticorpo pode ser manipulada de modo que é imunologicamente inerte (por exemplo, não provoca a lise do complemento). Ver, por exemplo, a Publicação PCT No. PCT/GB99/01441; Pedido de Patente UK No. 9809951,8. Outros métodos de humanizar anticorpos que também podem ser usados são descritos por Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19: 2471-2476 (1991) e nas Patentes US N°s 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; e 6.350.861; e na Publicação PCT No. WO 01/27160.

[00240] Em ainda outra alternativa, os anticorpos totalmente humanos podem ser obtidos utilizando camundongos disponíveis comercialmente que foram manipulados para expressar proteínas específicas de imunoglobulina humana. Os animais transgênicos que são projetados para produzir uma mais desejável (por exemplo, anticorpos totalmente humanos) resposta imunitária, ou mais robusta, também podem ser usados para a geração de anticorpos humanizados ou humanos. Exemplos de tal tecnologia são Xenomouse™ da Abgenix, Inc. (Fremont, CA) e HuMAb-Mouse® e TC Mouse™ da Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

[00241] Em uma alternativa, os anticorpos podem ser feitos de forma recombinante e expressos utilizando qualquer método conhecido na técnica. Em outra alternativa, os anticorpos podem ser feitos de forma recombinante por tecnologia de apresentação em fagos. Ver, por exemplo, Patentes US N°s 5,565, 332. 5.580.717;

5.733.743; e 6.265.150; e Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994). Alternativamente, a tecnologia de apresentação em fagos (McCafferty et al, *Nature* 348:552-553 (1990)) pode ser usada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo in vitro, a partir de repertórios variáveis de imunoglobulina (V) de genes do domínio de doadores não imunizados. De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpo são clonados em-estrutura em um gene de proteína de revestimento principal ou menor de um bacteriófago filamentoso, tal como M13 ou fd, e exibido como fragmentos de anticorpo funcionais na superfície da partícula de fago. Porque a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de fita simples do genoma do fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo resultam também na seleção do gene que codifica o anticorpo que exibe aquelas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exposição de fago pode ser executada em uma variedade de formatos; para revisões ver, por exemplo, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Diversas fontes de segmentos V-gene podem ser usadas para a exposição de fago. Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) isolaram uma disposição diversa de anticorpos anti-oxazolona de uma biblioteca combinatorial aleatória pequena de genes V derivados dos baços de camundongos imunizados. Um repertorio de genes V dos doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos a uma disposição diversa de antígenos (incluindo antígenos próprios) podem ser isolados essencialmente depois das técnicas descritas por Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), ou Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Em uma resposta imunitária natural, os genes de anticorpos acumulam mutações a uma taxa elevada (hipermutação somática). Algumas das alterações introduzidas conferirão maior afinidade, e as células B que exibem imunoglobulina de alta afinidade de superfície são preferencialmente replicadas e diferenciadas durante o desafio com antígeno subsequente. Este processo natural pode ser imitado empregando a técnica conhecida como "rearranjo de

cadeias". Marks, et al., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). Neste método, a afinidade de anticorpos humanos "primários" obtidos por exibição em fagos pode ser melhorada substituindo sequencialmente os genes da região V de cadeia pesada e leve com repertórios de variantes que ocorrem naturalmente (repertórios) de genes do domínio V obtidos de dadores não imunizados. Esta técnica permite a produção de anticorpos e fragmentos de anticorpo com afinidades no intervalo de pM-nM. Uma estratégia para a preparação de fagos muito grandes repertórios de anticorpos (também conhecida como "a principal de todas as bibliotecas") foi descrita por Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993). Embaralhamento genético pode também ser usado para derivar anticorpos humanos a partir de anticorpos de roedor, onde o anticorpo humano tem afinidades e especificidades semelhantes às do anticorpo de roedor de partida. De acordo com este método, que é também referido como "impressão de epítipo", o gene do domínio V de cadeia pesada ou leve de anticorpos de roedores obtidos pela técnica de apresentação em fagos é substituído com um repertório de genes do domínio V humano, criando quimeras do roedor-humano. A seleção com antígeno resulta no isolamento de regiões variáveis humanas capazes de restaurar um sítio de ligação ao antígeno funcional, ou seja, o epítipo governa (impressa) a escolha do parceiro. Quando o processo é repetido de modo a substituir o domínio V de roedor remanescente, obtém um anticorpo humano (ver PCT No. de publicação WO 93/06213, publicado em 1 de abril, 1993). Ao contrário da humanização tradicional de anticorpos de roedor por enxerto de CDR, esta técnica proporciona anticorpos completamente humanos, que não têm estrutura ou CDR de origem nos resíduos de roedor.

[00242] É aparente que, embora a discussão acima se refere aos anticorpos humanizados, os princípios gerais discutidos são aplicáveis para a personalização de anticorpos para uso, por exemplo, em cães, gatos, primatas, bovinos e equinos. É ainda evidente que um ou mais aspectos da humanização de um anticorpo aqui

descrito pode ser combinado, por exemplo, enxerto de CDR, mutação de framework e mutação de CDR.

[00243] Os anticorpos podem ser feitos de forma recombinante, em primeiro lugar isolando os anticorpos e as células produtoras de anticorpos a partir de animais hospedeiros, obtendo a sequência do gene, e utilizando a sequência do gene para expressar o anticorpo de forma recombinante em células hospedeiras (por exemplo, células CHO). Outro método que pode ser empregue é o de expressar a sequência do anticorpo em plantas (por exemplo, tabaco) ou leite transgênico. Os métodos para expressar anticorpos de forma recombinante em plantas ou leite têm sido divulgados. Ver, por exemplo, Peeters, et al. *Vaccine* 19:2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar *Int.Rev.Immunol* 13:65 (1995); and Pollock, et al., *J Immunol Methods* 231:147(1999). Os métodos para preparar derivados de anticorpos, por exemplo, humanizados, de cadeia simples, etc., são conhecidos na técnica.

[00244] Os imunoenaios e as técnicas de triagem de citometria de fluxo, tais como células ativadas por fluorescência (FACS), também podem ser usadas para isolar anticorpos que são específicos para o CGRP.

[00245] Os anticorpos podem ser ligados a muitos transportadores diferentes. Os transportadores podem ser ativos e/ou inertes. Exemplos de transportadores bem conhecidos incluem polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilases, vidro, celuloses naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetite. A natureza do transportador pode ser solúvel ou insolúvel. Os versados na técnica conhecerão outros transportadores adequados para a ligação de anticorpos, ou serão capazes de os determinar, utilizando experimentação de rotina. Em algumas modalidades, o transportador compreende uma porção que tem como alvo o miocárdio.

[00246] DNA que codifica o anticorpo monoclonal é facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam

as cadeias pesadas e leves dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como uma fonte preferencial de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão (tal como os vetores de expressão descritos na Publicação PCT No. WO 87/04462), que são então transfectados para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outro modo não produzem proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Ver, por exemplo, a Publicação PCT No. WO 87/04462. O DNA também pode ser modificado, por exemplo, por substituição da sequência de codificação para domínios constantes humanos de cadeia pesada e leve no lugar das sequências homólogas de murídeo, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 (1984), ou unindo covalentemente à sequência de codificação da imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo de não imunoglobulina. Desta maneira, anticorpos "quiméricos" ou "híbridos" que são preparados têm a especificidade de ligação de um anticorpo monoclonal anti-CGRP aqui.

[00247] Os anticorpos (anticorpos antagonistas, por exemplo, anti-CGRP) e polipeptídeos derivados de anticorpos podem ser identificados ou caracterizados utilizando métodos conhecidos na técnica, em que a redução, melhoria ou a neutralização de uma atividade biológica de CGRP é detectada e/ou medida. Por exemplo, o anticorpo antagonista anti-CGRP, também pode ser identificado por incubação de um agente candidato com CGRP e monitorização de qualquer uma ou mais das seguintes características: (a) ligam a CGRP; (b) bloqueiam o CGRP a partir da ligação ao seu receptor (es); (c) ativam o bloco ou diminuem o receptor de CGRP (incluindo a ativação de AMPc); (d) inibem a atividade biológica de CGRP ou vias a jusante mediadas pela função de sinalização de CGRP; (e) previnem, melhoram ou tratam qualquer aspecto da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca); (f) aumentam a depuração de CGRP; e (g) inibem (redução), produzem ou libertam a síntese de CGRP. Em algumas

modalidades, um anticorpo ou polipeptídeo antagonista anti-CGRP é identificado por incubação de um agente candidato com CGRP e monitorização da ligação a redução e/ou do tratador ou neutralização de uma atividade biológica de CGRP. O ensaio de ligação pode ser realizado com polipeptídeo (s) purificado (s) CGRP, ou com células que expressam naturalmente, ou transfectadas para expressar, polipeptídeo (s) de CGRP. Em uma modalidade, o ensaio de ligação é um ensaio de ligação competitiva, em que a capacidade de um anticorpo candidato para competir com um anticorpo antagonista anti-CGRP conhecido pela ligação CGRP é avaliada. O ensaio pode ser realizado em vários formatos, incluindo o formato ELISA. Em outras modalidades, um anticorpo antagonista anti-CGRP é identificado por incubação de um agente candidato com CGRP e monitorização inibição da ligação e ativação do receptor auxiliar de CGRP expresso na superfície de uma célula.

[00248] Após a identificação inicial, a atividade de um anticorpo candidato (por exemplo, anticorpo antagonista anti-CGRP) pode ser ainda confirmada e refinada por bioensaios conhecidos, para testar as atividades biológicas orientadas. Alternativamente, bioensaios podem ser usados para rastrear candidatos diretamente. Por exemplo, CGRP promove uma série de alterações mensuráveis nas células que respondem. Estes incluem, mas não estão limitados à estimulação de cAMP na célula (por exemplo, células SK-N-MC). A atividade antagonista pode também ser medida usando modelos animais, tais como a medição vasodilatação cutânea induzida pela estimulação do nervo safeno de camundongo. Escott et al., Br. J. Pharmacol. 110: 772-776, 1993. Os modelos animais de dor de cabeça (tais como, enxaqueca) pode ainda são usados para testar a eficácia dos anticorpos ou polipeptídeos antagonistas. Reuter, et al., Functional Neurology (15) Suppl.3, 2000. Alguns dos métodos para identificação e caracterização de anticorpo antagonista anti-CGRP ou polipeptídeo são descritos em detalhe nos Exemplos.

[00249] Os anticorpos, incluindo anticorpos antagonistas anti-CGRP, podem

ser caracterizados utilizando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um método consiste em identificar o epítipo ao qual se liga, ou "mapeamento de epítipo". Existem muitos métodos conhecidos na técnica para o mapeamento e caracterizar a localização de epítipos nas proteínas, incluindo resolver a estrutura cristalina de um complexo anticorpo-antígeno, ensaios de competição, ensaios de expressão de fragmento de gene, e ensaios à base de peptídeos sintéticos, como descrito, por exemplo, no capítulo 11 do Harlow e Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. Em um exemplo adicional, o mapeamento de epítipo pode ser usado para determinar a sequência à qual um anticorpo anti-CGRP liga o anticorpo antagonista. Mapeamento de epítipos está comercialmente disponível a partir de várias fontes, por exemplo, sistemas de PEPSCAN (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Holanda). O epítipo pode ser um epítipo linear, isto é, contido em uma única extensão de aminoácidos, ou um epítipo conformacional formado por uma interação tridimensional de aminoácidos que necessariamente não pode ser contida em um estiramento único. Os peptídeos de comprimentos variáveis (por exemplo, pelo menos 4-6 aminoácidos de comprimento) podem ser isolados ou sintetizados (por exemplo, de forma recombinante) e usados para ensaios de ligação com um anticorpo antagonista anti-CGRP. Em outro exemplo, o epítipo ao qual liga o anticorpo antagonista anti-CGRP pode ser determinado em um rastreamento sistemático utilizando peptídeos sobrepostos derivados da sequência de CGRP e determinação da ligação pelo anticorpo antagonista anti-CGRP. De acordo com os ensaios de expressão de fragmento de gene, o frame de leitura aberta que codifica o CGRP é fragmentado aleatoriamente ou por construtos genéticos específicos e a reatividade dos fragmentos expressos de CGRP com o anticorpo a ser testado é determinado. Os fragmentos de genes podem, por exemplo, serem produzidos por PCR e depois transcritos e traduzidos em proteínas *in vitro*, na presença de aminoácidos radioativos. A ligação do anticorpo aos fragmentos de CGRP marcados

radioativamente é então determinada através de imunoprecipitação e eletroforese em gel. Certos epítomos podem também ser identificados através do uso de grandes bibliotecas de sequências peptídicas aleatórias apresentadas na superfície de partículas de fago (bibliotecas de fago). Alternativamente, uma biblioteca definida de fragmentos sobrepostos de peptídeos pode ser testada para a ligação ao anticorpo de teste em ensaios de ligação simples. Em um exemplo adicional, a mutagênese de um antígeno de domínio, as experiências de permutação de domínio alanina e mutagênese de varredura de ligação pode ser realizado para identificar resíduos necessários, suficiente, e/ou necessário para a ligação ao epítomo. Por exemplo, experiências de permutação de domínio podem ser realizadas utilizando um CGRP mutante em que vários fragmentos do polipeptídeo de CGRP foram substituídos (trocado) com sequências de uma proteína intimamente relacionada, mas antigenicamente distintas (por exemplo, outro membro da família de proteínas de neurotrofina). Ao avaliar a ligação do anticorpo para o CGRP mutante, a importância do fragmento de CGRP em particular para a ligação do anticorpo pode ser avaliada.

[00250] Ainda um outro método que pode ser usado para caracterizar um anticorpo, incluindo um anticorpo antagonista anti-CGRP, é o uso de ensaios de competição com outros anticorpos conhecidos por se ligarem ao mesmo antígeno, isto é, vários fragmentos de CGRP, para determinar se o anticorpo antagonista anti-CGRP se liga ao mesmo epítomo que outros anticorpos. Os ensaios de competição são bem conhecidos dos versados na técnica.

[00251] Um vetor de expressão pode ser usado para direcionar a expressão de um anticorpo, incluindo um anticorpo antagonista anti-CGRP. Um especialista na técnica está familiarizado com a administração de vetores de expressão para obter a expressão de uma proteína exógena in vivo. Ver, por exemplo, Patentes US No. 6.436.908; 6.413.942; e 6.376.471. A administração de vetores de expressão inclui a administração local ou sistêmica, incluindo por injeção, administração oral, pistola de

partículas ou administração caracterizada e administração tópica. Em uma outra modalidade, o vetor de expressão é administrado diretamente ao tronco simpático ou gânglio, ou em uma artéria coronária, átrio, ventricular ou pericárdio.

[00252] Entrega direcionada de composições terapêuticas que contenham um vetor de expressão, ou polinucleotídeos subgenômicos também podem ser usados. As técnicas de distribuição de DNA mediadas pelo receptor são descritas em, por exemplo, Findeis et al., *Trends Biotechnol.* (1993) 11:202; Chiou et al., *Gene Therapeutics: Methods and Applications Of Direct Gene Transfer* (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:3655; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1991) 266:338. As composições terapêuticas contendo um polinucleotídeo são administradas em uma gama de cerca de 100 ng a cerca de 200 mg de DNA para administração local em um protocolo de terapia genética. As gamas de concentração de cerca de 500 ng a cerca de 50 mg, cerca de 1 µg a cerca de 2 mg, cerca de 5 µg a cerca de 500 µg, e cerca de 20 µg a cerca de 100 µg de DNA também pode ser usado durante um protocolo de terapia gênica. Os polinucleotídeos e polipeptídeos terapêuticos podem ser fornecidos utilizando veículos de entrega de genes. O veículo de entrega de genes pode ser de origem viral ou não viral (veja genericamente, Jolly, *Cancer Gene Therapy* (1994) 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy* (1994) 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy* (1995) 1:185; and Kaplitt, *Nature Genetics* (1994) 6:148). A expressão de tais sequências de codificação pode ser induzida utilizando promotores de mamífero endógenos ou heterólogos. A expressão da sequência codificante pode ser constitutiva ou regulada.

[00253] Os vetores baseados em vírus para a entrega de um polinucleotídeo desejado e expressão em uma célula desejada são bem conhecidos na técnica. Veículos de base viral exemplares incluem, mas não se limitam aos retrovírus recombinantes (ver, por exemplo, Publicação PCT Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO

93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; U.S. Patent Nos. 5, 219,740 e 4,777,127; Patente GB No. 2200651; e patente EP No. 0 345 242), vetores baseados em alfavírus (por exemplo, vetores de vírus Sindbis, vírus Semliki da floresta (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), o vírus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) e vírus da encefalite equina venezuelana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), e vetores de vírus (AAV) adeno-associados (ver, por exemplo, publicação PCT Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 e WO 95/00655). A administração de DNA ligado a adenovírus mortos conforme descrito em Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147 podem também ser empregues.

[00254] Veículos de distribuição não virais e métodos também podem ser usados, incluindo, mas não se limitando ao DNA condensado policatiônico ligado ou não ligado a adenovírus mortos sozinhos (ver, por exemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); DNA ligado ao ligante (ver, por exemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células de veículos de libertação de célula eucariótica (ver, por exemplo, Patente US No. 5814482; Publicação PCT Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; e WO 97/42338) e neutralização de cargas ou fusão nucleico com membranas celulares. O DNA nu pode também ser empregue. Métodos de introdução de DNA nu exemplares são descritos na Publicação PCT No. WO 90/11092 e Patente US No.5.580.859. Os lipossomas que podem atuar como veículos de entrega de genes são descritos na Patente US No. 5422120; Publicação PCT Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; e EP 0.524.968. Abordagens adicionais são descritas em Philip, Mol. Biol Cell. (1994) 14: 2411, e em Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 1581.

C. Anticorpo G1 e afins anticorpos, polipeptídeos, polinucleotídeos, vetores e células hospedeiras

[00255] Esta invenção abrange composições, incluindo composições

farmacêuticas, compreendendo o anticorpo G1 e suas variantes mostradas na Tabela 6 ou polipeptídeo derivado de anticorpo G1 e suas variantes mostradas na Tabela 6; e polinucleotídeos compreendendo sequências que codificam G1 e suas variantes ou o polipeptídeo. Em algumas modalidades, as composições compreendem um ou mais anticorpos ou polipeptídeos (que podem ou não ser um anticorpo) que se ligam a CGRP, e/ou um ou mais polinucleotídeos que compreendem sequências que codificam para um ou mais anticorpos ou polipeptídeos que se ligam ao CGRP. Estas composições podem ainda compreender excipientes adequados, tais como excipientes farmacologicamente aceitáveis, incluindo tampões, os quais são bem conhecidos na técnica.

[00256] Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP, e polipeptídeos da invenção são caracterizadas por qualquer (uma ou mais) das seguintes características: (a) ligam a CGRP; (b) bloqueiam o CGRP a partir da ligação ao seu receptor (es); (c) ativam o bloco ou diminuem o receptor de CGRP (incluindo a ativação de AMPc); (d) inibem a atividade biológica de CGRP ou vias a jusante mediadas pela função de sinalização de CGRP; (e) previnem, melhoram ou tratam qualquer aspecto da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca); (f) aumentam a depuração de CGRP; e (g) inibem (redução), produzem ou libertam a síntese de CGRP.

[00257] Em algumas modalidades, a invenção proporciona qualquer um dos seguintes, ou composições (incluindo composições farmacêuticas) que compreendem qualquer um dos seguintes: (a) o anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (b) um fragmento ou uma região de anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (c) uma cadeia leve de anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (d) uma cadeia pesada do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (e) uma ou mais das região (es) variável (s) a partir de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada de anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (f) um ou mais CDR (s) (um, dois, três, quatro, cinco ou seis CDR) do

anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (g) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo G1; (h) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (i) três CDR da cadeia leve do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (j) três CDR da cadeia pesada do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (k) três CDR da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada, do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; e (l) um anticorpo que compreende qualquer um de (b) até (k). Em algumas modalidades, a invenção proporciona também polipeptídeos que compreendem qualquer um ou mais dos acima.

[00258] As porções de CDR do anticorpo G1 (incluindo Chothia e CDR de Kabat) são representadas de forma esquemática na Figura 5. Determinação das regiões CDR está bem dentro do versado na técnica. Entende-se que em algumas modalidades, os CDR podem ser uma combinação de Kabat e Chothia CDR (também denominado "CDR combinados" ou "CDRs") prolongados. Em algumas modalidades, os CDR são os CDR de Kabat. Em outras modalidades, os CDR são os CDR de Chothia. Em outras palavras, nas modalidades com mais do que um CDR, os CDR podem ser qualquer um de Kabat, Chothia, CDRs de combinação, ou suas combinações.

[00259] Em algumas modalidades, a invenção proporciona um polipeptídeo (que pode ou não ser um anticorpo) que compreende pelo menos uma CDR, pelo menos dois, pelo menos três, ou pelo menos quatro, pelo menos cinco, ou todos os seis CDR que são substancialmente idênticos a pelo menos um CDR, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco ou todos os seis CDR de G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6. Outras modalidades incluem anticorpos que possuem, pelo menos, dois, três, quatro, cinco, ou seis CDR (s) que são substancialmente idênticos a pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis CDR de G1 ou derivados de G1. Em algumas modalidades, pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, ou seis CDR (s) são, pelo menos, cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntico a pelo menos um, dois, três, quatro, cinco ou seis CDR de G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6. Entende-se que, para os fins desta invenção, a especificidade de ligação e/ou atividade global é geralmente mantida, embora o grau de atividade pode variar em relação ao G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6 (pode ser maior ou menor).

[00260] Em algumas modalidades, a invenção também proporciona um polipeptídeo (que pode ou não ser um anticorpo) que compreende uma sequência de aminoácidos de G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6 que tem qualquer um dos seguintes: pelo menos 5 aminoácidos contíguos, em 8 aminoácidos menos contíguos, pelo menos cerca de 10 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 15 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 20 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 25 aminoácidos contíguos, pelo menos cerca de 30 aminoácidos contíguos de uma sequência de G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6, em que pelo menos 3 dos aminoácidos são a partir de uma região variável de G1 (Figura 5) ou as suas variantes mostradas na Tabela 6. Em uma modalidade, a região variável é a partir de uma cadeia leve de G1. Em uma outra modalidade, a região variável é a partir de uma cadeia pesada de G1. Um polipeptídeo exemplificativo tem aminoácido contíguo (comprimentos descritos acima) a partir de ambas as regiões variáveis de cadeia pesada e leve de G1. Em uma outra modalidade, os 5 (ou mais) aminoácidos contíguos são provenientes de uma região determinante de complementaridade (CDR) do G1 mostrado na Figura 5. Em algumas modalidades, os aminoácidos contíguos são provenientes de uma região variável de G1.

[00261] A afinidade de ligação (KD) De um anticorpo anti-CGRP e antagonista de CGRP para polipeptídeo (tal como humano α -CGRP) pode ser de cerca de 0,06 a cerca de 200 nM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação fica entre aproximadamente 200 nM, 100 nM, aproximadamente de 50 nM, aproximadamente de 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100

pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente de 15 pM, aproximadamente de 10 pM, aproximadamente de 5 pM ou aproximadamente de 2 pM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação é inferior a cerca de 250 nM, aproximadamente de 200 nM, aproximadamente de 100 nM, aproximadamente de 50 nM, aproximadamente de 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM ou aproximadamente 50 pM.

[00262] Em algumas modalidades, a invenção também proporciona métodos de produzir qualquer um desses anticorpos e polipeptídeos. Os anticorpos da presente invenção podem ser feitos por processos conhecidos na técnica. Os polipeptídeos podem ser produzidos por degradação proteolítica ou outro dos anticorpos, por métodos recombinantes (isto é, polipeptídeos individuais ou de fusão) como descrito acima ou por síntese química. Os polipeptídeos dos anticorpos, especialmente polipeptídeos mais curtos até cerca de 50 aminoácidos, são feitos convenientemente por síntese química. Os métodos de síntese química são conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, um anticorpo pode ser produzido por um sintetizador de polipeptídeos automático utilizando o método de fase sólida. Ver também, Patentes US Nos 5,807,715; 4,816,567; e 6,331,415.

[00263] Em outra alternativa, os anticorpos podem ser feitos de forma recombinante, utilizando procedimentos que são bem conhecidos na técnica. Em uma modalidade, um polinucleotídeo que compreende uma sequência que codifica para a cadeia pesada e/ou da cadeia leve de regiões variáveis de anticorpo G1 mostradas na SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10. Em uma outra modalidade, o polinucleotídeo compreendendo a sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10 são clonados em um ou mais vetores para a expressão ou propagação. A sequência que codifica o anticorpo de interesse pode ser mantida em um vetor em uma célula hospedeira e a célula hospedeira pode então ser expandida e congelada

para futuro uso. Os vetores (incluindo vetores de expressão) e células hospedeiras são aqui adicionalmente descritos.

[00264] Em algumas modalidades, a invenção também engloba fragmentos de cadeia única região variável ("scFv") de anticorpos desta invenção, tal como G1. Fragmentos de região variável de cadeia única são feitas por regiões variáveis de cadeia leve e pesada de ligação e/ou através do uso de um peptídeo de ligação curta. Bird et al. (1988) Science 242: 423-426. Um exemplo de um peptídeo de ligação é (GGGS)₃ (SEQ ID NO: 57) que liga a aproximadamente 3,5 nm entre o terminal carboxil de uma região variável e o terminal amino da outra região variável. Os ligantes de outras sequências foram concebidos e usados. Bird et al. (1988). Os ligantes podem por sua vez serem modificados para funções adicionais, tais como ligação de fármacos ou ligação a suportes sólidos. As únicas variantes de cadeia podem ser produzidas de forma recombinante ou sinteticamente. Para a produção sintética de scFv, um sintetizador automático pode ser usado. Para a produção recombinante de scFv, um plasmídeo contendo polinucleotídeo que codifica o adequado scFv pode ser introduzido em uma célula hospedeira adequada, quer eucariótica, tal como de levedura, planta, células de inseto ou de mamífero, ou procariótica, tal como E. coli. Os polinucleotídeos que codificam o scFv de interesse pode ser feito por meio de manipulações de rotina, tais como ligação de polinucleotídeos. O scFv resultante pode ser isolado utilizando técnicas de purificação de proteínas padrão conhecidas na técnica.

[00265] Outras formas de anticorpos de cadeia simples, tais como diacorpos estão também englobados. Diacorpos são forma bivalente, anticorpos bi-específicos em que domínios de VH e de VL são expressos em uma cadeia única de polipeptídeos, mas usando um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, assim, forçando os domínios a par com domínios complementares de outra cadeia e criando dois locais de ligação do antígeno (ver por exemplo, Holliger, p., et al. (1993) Proc. Natl. Acad Sci. USA 90:6444-6448;

Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

[00266] Por exemplo, os anticorpos bi-específicos, os anticorpos monoclonais que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes, podem ser preparados utilizando os anticorpos aqui descritos. Os métodos para preparar anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Suresh et al, 1986, Methods in Enzymology. 121: 210). Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos foi baseada na co-expressão de dois pares de imunoglobulina de cadeia pesada e de cadeia leve, com as duas cadeias pesadas tendo especificidades diferentes (Millstein e Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

[00267] De acordo com uma abordagem para fazer anticorpos biespecíficos, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação anticorpo-antígeno) são fundidos com sequências de domínios constantes de imunoglobulina. A fusão é preferivelmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das da charneira, regiões CH2 e CH3. É preferencial ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) que contém o sítio necessário para a ligação da cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são co-transfectados para um organismo hospedeiro adequado. Isso provê maior flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos polipeptídicos em modalidades quando razões desiguais das três cadeias polipeptídicas usadas na construção proveem os rendimentos ótimos. É, no entanto, possível inserir as sequências codificadoras para duas ou para todas as três cadeias polipeptídicas em um vetor de expressão quando a expressão de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em proporções iguais resulta em rendimentos elevados ou quando as proporções não têm significado em particular.

[00268] Em uma abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos por

uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina híbrida (provendo uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Esta estrutura assimétrica, com uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica, facilita a separação do composto biespecífico desejado das combinações de cadeias de imunoglobulina indesejadas. Esta abordagem é descrita na Publicação PCT No. WO 94/04690, publicado 03 de março de 1994.

[00269] Os anticorpos heteroconjugados, que compreendem dois anticorpos ligados covalentemente, estão também dentro do âmbito da invenção. Tais anticorpos têm sido usados para direcionar células do sistema imunitário para células indesejadas (Patente US 4,676,980), e para tratamento da infecção por HIV (publicação de pedido PCT Nos. WO 91/00360 e WO 92/200373; EP 03089). Os anticorpos heteroconjugados podem ser produzidos utilizando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Agentes e técnicas de ligação cruzada adequadas são bem conhecidas na técnica, e são descritas na Patente US No. 4.676.980.

[00270] Os anticorpos quiméricos ou híbridos também podem ser preparados in vitro utilizando métodos conhecidos de química de proteínas sintéticas, incluindo os que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas usando uma reação de troca de bissulfeto ou pela formação de uma ligação de tioéter. Iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato são exemplos de reagentes apropriados para esta finalidade.

[00271] O anticorpo humanizado que compreende um ou mais CDR do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6, ou um ou mais CDRs derivados do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6 podem ser preparados utilizando quaisquer métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, podem ser usados quatro etapas gerais para humanizar um anticorpo monoclonal.

[00272] Em algumas modalidades, a invenção abrange modificações ao

anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6, incluindo os anticorpos funcionalmente equivalentes que não afetam significativamente as suas propriedades e variantes que melhoraram ou atividade reduzida e/ou afinidade. Por exemplo, a sequência de aminoácidos do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6, pode ser mutado para obter um anticorpo com a afinidade de ligação desejada para CGRP. A modificação de polipeptídeos é prática de rotina na técnica e não necessita de ser aqui descrita em detalhe. A modificação de polipeptídeos é exemplificada nos Exemplos. Exemplos de polipeptídeos modificados incluem polipeptídeos com substituições conservativas de resíduos de aminoácidos, uma ou mais deleções ou adições de aminoácidos que não alteram de forma significativa prejudicialmente a atividade funcional, ou o uso de análogos químicos.

[00273] As inserções de sequência de aminoácidos incluem fusões amino e/ou carbóxi-terminais que variam em comprimento de um resíduo a polipeptídeos que contém cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequenciais de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionil do terminal N ou o anticorpo fundido com uma etiqueta de epítipo. Outras variantes de inserção da molécula de anticorpo incluem a fusão ao terminal N ou C do anticorpo de uma enzima ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida sérica do anticorpo.

[00274] Variantes de substituição têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo removido e um resíduo diferente inserido no seu lugar. Os locais de maior interesse para mutagênese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas as alterações de FR também são contempladas. As substituições conservativas são mostradas na Tabela 1, sob o título de "substituições conservativas". Se estas substituições resultam em uma alteração na atividade biológica, então alterações mais substanciais, denominadas "substituições exemplificativas" na Tabela 1, ou como adicionalmente descrito acima em referência a classes de aminoácidos,

podem ser introduzidas e os produtos são rastreados.

[00275] Tabela 1: Substituições de Aminoácidos

Resíduo Original	Substituições conservativas	Substituições Exemplares
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; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucine; 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; Norleucina

[00276] Modificações substanciais nas propriedades biológicas do anticorpo são alcançados por meio de substituições seletivas que se diferem de modo significativo em seus efeitos de manutenção de (a) da estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação helicoidal ou de lâmina, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo ou (c) o total da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural estão divididos em grupos com base em

propriedades comuns da cadeia lateral:

[00277] (1) Não polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[00278] (2) Polar sem carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[00279] (3) Ácidos (carregados negativamente): Asp, Glu;

[00280] (4) Básico (carregados positivamente): Lys, Arg;

[00281] (5) Resíduos que influenciam a orientação de cadeia: Gli, Pro; e

[00282] (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

[00283] As substituições não conservadoras são feitas para a troca de um membro de uma dessas classes por outra classe.

[00284] Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada do anticorpo pode também ser substituído, geralmente por serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir ligação cruzada aberrante. Por outro lado, ligações (s) de cisteína podem ser adicionadas ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade particularmente quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv.

[00285] Modificações de aminoácidos podem variar de mudança ou modificação de um ou mais aminoácidos para completar a reformulação de uma região, tal como a região variável. As alterações na região variável podem alterar a afinidade e/ou especificidade de ligação. Em algumas modalidades, não mais do que uma a cinco substituições de aminoácidos conservativas são feitas dentro de um domínio CDR. Em outras modalidades, não mais do que uma a três substituições de aminoácidos conservativas são feitas dentro de um domínio CDR. Em ainda outras modalidades, o domínio CDR é CDR H3 e/ou CDR L3.

[00286] Modificações incluem polipeptídeos glicosilados e não glicosilados, assim como polipeptídeos com outras modificações pós-translacionais, tais como, por exemplo, glicosilação com diferentes açúcares, acetilação e fosforilação. Os anticorpos são glicosilados em posições conservativas nas suas regiões constantes (Jefferis

e Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). As cadeias laterais de oligossacarídeos das imunoglobulinas afetam a função da proteína (Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29: 4175-4180) e a interação intramolecular entre partes da glicoproteína, o que pode afetar a conformação e superfície tridimensional da glicoproteína apresentadas (Hefferis e Lund, supra; Wyss e Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Os oligossacarídeos podem também servir para alvejar uma determinada glicoproteína de certas moléculas baseadas em estruturas de reconhecimento específico. A glicosilação de anticorpos também foi relatada para afetar a citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC). Em particular, as células CHO com expressão regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII), uma glicosiltransferase catalisando a formação de GlcNAc bissetriz, foi relatada ter melhorado a atividade de ADCC (Umana et al., 1999, Mature Biotech. 17:176-180).

[00287] A glicosilação de anticorpos é tipicamente ligada a N ou ligada a O. Ligada a N se refere à ligação do radical carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas asparagina-X-serina, aspargina-X-treonina, e asparagina-X-cisteína, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da fração carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Assim, a presença de qualquer uma dessas sequências de tripeptídeo em um polipeptídeo cria um local de glicosilação em potencial. Glicosilação O-ligada refere-se à anexação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxisina também possam ser usadas.

[00288] Adição de locais de glicosilação ao anticorpo é realizada convenientemente ao se alterar a sequência de aminoácidos de tal forma que contenha uma ou mais das sequências de tripeptídeo descritas acima (para locais de glicosilação de ligação a N). A alteração também pode ser pela adição de, ou substituição por um ou

mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para locais de glicosilação ligada a O).

[00289] O padrão de glicosilação de anticorpos podem também ser alterados sem alterar a sequência de nucleotídeos subjacentes. A glicosilação depende em grande medida da célula hospedeira usada para expressar o anticorpo. Uma vez que o tipo de célula usada para expressão de glicoproteínas recombinantes, anticorpos, por exemplo, como agentes terapêuticos potenciais é raramente a célula nativa, variações no padrão de glicosilação dos anticorpos pode ser esperado (ver, por exemplo, Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 9062-9070).

[00290] Para além da escolha de células hospedeiras, fatores que afetam a glicosilação durante a produção recombinante de anticorpos incluem o modo de crescimento, a formulação de meios de comunicação, densidade da cultura, oxigenação, pH, esquemas de purificação e semelhantes. Vários métodos têm sido propostos para alterar o padrão de glicosilação conseguido em um determinado organismo hospedeiro, incluindo a introdução ou sobre-expressam determinadas enzimas envolvidas na produção de oligossacarídeos (Patente US Nos 5.047.335; 5.510.261 e 5.278,299). A glicosilação, ou certos tipos de glicosilação, podem ser enzimaticamente removidas da glicoproteína, por exemplo utilizando endoglicosidase H (Endo H), N-glicosidase F, endoglicosidase F1, endoglicosidase F2, endoglicosidase F3. Além disso, a célula hospedeira recombinante pode ser geneticamente modificada para ser deficiente no processamento de certos tipos de polissacarídeos. Estas e outras técnicas são bem conhecidas na técnica.

[00291] Outros métodos de modificação incluem o uso de técnicas de acoplamento conhecidas na técnica, incluindo, mas não limitado a meios enzimáticos, substituição oxidativa e quelação. As modificações podem ser usadas, por exemplo, para fixação de rótulos para imunoensaio. Polipeptídeos G1 modificados podem ser feitos utilizando procedimentos estabelecidos na técnica e podem ser rastreados

utilizando ensaios padrão conhecidos na técnica, alguns dos quais são descritos abaixo e nos Exemplos.

[00292] Em algumas modalidades da invenção, o anticorpo compreende uma região constante modificada, tal como uma região constante que é imunologicamente inerte ou parcialmente inerte, por exemplo, não desencadear lise mediada pelo complemento, não estimula a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), ou não ativa microglia; ou reduziram atividades (em comparação com o anticorpo não modificado) em qualquer um ou mais dos seguintes: provocando lise mediada pelo complemento, estimulando a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), ou ativando a microglia. Diferentes modificações da região constante podem ser usadas para alcançar o nível e/ou a combinação de funções efetoras ótimas. Ver, por exemplo, 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); and Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76 (1998). Em algumas modalidades, a região constante é modificada conforme descrito em *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624; Pedido PCT No. PCT/GB99/01441; e/ou o Pedido de Patente UK No. 9809951,8. Em outras modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de IgG de cadeia pesada humana, compreendendo as seguintes mutações: A330P331 para S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência de IgG2 de tipo selvagem). *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-2624. Em ainda outras formas de realização, a região constante é aglicosilada para a glicosilação ligada a N. Em algumas modalidades, a região constante é aglicosilada para a glicosilação de ligada a N por mutação do resíduo de aminoácido glicosilado ou flanqueando os resíduos que fazem parte da sequência de reconhecimento de glicosilação N da região constante. Por exemplo, local de glicosilação N de N297 pode ser mutado para A, Q, K, ou H. Ver, Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601 (1989); and Jefferis et al.,

Immunological Reviews 163:59-76 (1998). Em algumas modalidades, a região constante aglicosilada para a glicosilação ligada a N. A região constante pode ser aglicosilada para a glicosilação de ligada a N enzimaticamente (tais como a remoção de carboidrato pela enzima PNGase), ou pela expressão em uma célula hospedeira de glicosilação deficiente.

[00293] Outras modificações de anticorpos incluem anticorpos que foram modificados, tal como descrito na Publicação PCT No. WO 99/58572, publicada 18 de novembro de 1999. Estes anticorpos compreendem, para além de um domínio de ligação direcionada para a molécula alvo, um domínio efetor possuindo uma sequência de aminoácidos homóloga substancialmente a todo ou parte de um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana. Estes anticorpos são capazes de se ligarem à molécula alvo sem desencadear lise dependente do complemento significativa ou destruição mediada por células do alvo. Em algumas modalidades, o domínio efetor é capaz de se ligar especificamente a FcRn e/ou FcγRIIb. Estes são tipicamente baseados em domínios quiméricos derivados de duas ou mais de cadeia pesada de imunoglobulina humana de domínios CH2. Os anticorpos modificados desta forma são particularmente adequados para uso em terapia de anticorpo crônico, a fim de evitar reações adversas inflamatórias e outras para a terapia de anticorpo convencional.

[00294] Em algumas modalidades, a invenção inclui modalidades maturadas por afinidade. Por exemplo, os anticorpos maturados por afinidade podem ser produzidos por procedimentos conhecidos na técnica (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; e WO2004/058184).

[00295] Os métodos seguintes podem ser usados para ajustar a afinidade de

um anticorpo e para a caracterização de um CDR. Uma forma de caracterizar um CDR de um anticorpo e/ou a alteração (tal como a melhoria) a afinidade de ligação de um polipeptídeo, tal como um anticorpo, denominado "mutagênese de varredura de biblioteca". Geralmente, mutagênese de varredura de biblioteca funciona da seguinte maneira. Uma ou mais posições de aminoácidos do CDR são substituídos com dois ou mais (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20) aminoácidos, utilizando métodos reconhecidos na técnica. Isto gera pequenas bibliotecas de clones (em algumas modalidades, um para cada posição de aminoácido que é analisado), cada um com uma complexidade de dois ou mais membros (se dois ou mais aminoácidos estão substituídos em cada posição). Geralmente, a biblioteca também inclui um clone compreendendo o aminoácido nativo (não substituído). Um pequeno número de clones, por exemplo, cerca de 20-80 clones (dependendo da complexidade da biblioteca), a partir de cada biblioteca são rastreados quanto à afinidade de ligação para o polipeptídeo alvo (ou outro alvo de ligação), e os candidatos com um aumento, o mesmo, diminuído ou sem ligação são identificados. Métodos para determinação da afinidade de ligação são bem conhecidos na técnica. A afinidade de ligação pode ser determinada utilizando análise de ressonância plasmônica de superfície Biacore, que detecta diferenças na afinidade de ligação cerca de duas vezes ou superior. Biacore é particularmente útil quando o anticorpo de partida já se liga com uma afinidade relativamente elevada, por exemplo um KD de cerca de 10 nM ou inferiores. O rastreio utilizando ressonância plasmônica de superfície Biacore é descrito nos Exemplos, aqui.

[00296] A afinidade de ligação pode ser determinada utilizando Kinexa Biosensor, ensaios de proximidade de cintilação, ELISA, imunoenaios ORIGEN (IGEN), extinção de fluorescência, transferência de fluorescência, e/ou exibição de levedura. A afinidade de ligação pode também ser rastreada usando um bioensaio adequado.

[00297] Em algumas modalidades, a cada posição de aminoácido em um

CDR é substituído (em algumas modalidades, uma de cada vez), com todos os 20 aminoácidos naturais utilizando métodos de mutagênese reconhecidos na técnica (algumas das quais são aqui descritas). Isto gera pequenas bibliotecas de clones (em algumas modalidades, um para cada posição de aminoácido que é analisado), cada um com uma complexidade de 20 membros (se 20 aminoácidos estão substituídos em cada posição).

[00298] Em algumas modalidades, a biblioteca a ser rastreada compreende substituições em duas ou mais posições, as quais podem estar situadas no mesmo CDR ou em dois ou mais CDRs. Assim, a biblioteca pode compreender substituições em duas ou mais posições de um CDR. A biblioteca pode compreender substituição em duas ou mais posições em dois ou mais CDRs. A biblioteca pode compreender substituição em 3, 4, 5, ou mais posições, referidas posições encontradas em dois, três, quatro, cinco ou seis CDRs. A substituição pode ser preparada utilizando códons de baixa redundância. Ver, por exemplo, a Tabela 2 de Balint et al, (1993) Gene 137 (1):. 109-18).

[00299] O CDR pode ser CDRH3 e/ou CDRL3. O CDR pode ser um ou mais de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 e/ou CDRH3. O CDR pode ser um CDR de Kabat, um CDR de Chothia, ou um CDR estendido.

[00300] Candidatos com ligação melhorada podem ser sequenciados, identificando assim um mutante de substituição CDR que resulta na melhoria de afinidade (também denominada uma substituição "melhorado"). Os candidatos que se ligam também podem ser sequenciados, identificando assim uma substituição CDR que mantém a ligação.

[00301] Várias rodadas de rastreio podem ser realizadas. Por exemplo, os candidatos (cada um compreendendo uma substituição de aminoácido em uma ou mais das posições de um ou mais CDR) com ligação melhorada também são úteis para a concepção de uma segunda biblioteca contendo, pelo menos, o aminoácido

original e substituído em cada posição CDR melhorada (ou seja, posição do aminoácido no CDR em que um mutante de substituição apresentaram melhora da ligação). Preparação e rastreamento ou seleção desta biblioteca é discutido mais abaixo.

[00302] Biblioteca de mutagênese de varredura também proporciona um meio para a caracterização de um CDR, na medida em que a frequência de clones com ligação melhorada, a mesma ligação, diminuição da ligação ou nenhuma ligação a informação também fornece, sobre a importância de cada posição de aminoácido para a estabilidade do complexo anticorpo-antígeno. Por exemplo, se uma posição de CDR retém a ligação quando alterado para todos os 20 aminoácidos, que a posição é identificada como uma posição que é improvável que seja necessária para a ligação ao antígeno. Por outro lado, se uma posição de CDR retém ligação em apenas uma pequena percentagem de substituições, que a posição é identificada como uma posição que é importante para a função de CDR. Assim, os métodos de mutagênese de varredura de biblioteca geram informações sobre as posições nos CDR que podem ser alterados para muitos aminoácidos diferentes (incluindo todos os aminoácidos 20), e as posições nos CDR que não podem ser alterados ou que só podem ser alterados para alguns aminoácidos.

[00303] Os candidatos com afinidade melhorada podem ser combinados em uma segunda biblioteca, que inclui o aminoácido melhorado, o aminoácido inicial nessa posição, e pode ainda incluir substituições adicionais nessa posição, dependendo da complexidade da biblioteca que é desejada ou permitida usando o método de triagem ou seleção desejada. Além disso, se desejado, a posição de aminoácido adjacente pode ser randomizada para, pelo menos, dois ou mais aminoácidos. A randomização de aminoácidos adjacentes podem permitir flexibilidade conformacional adicional no CDR mutante, o qual pode, por sua vez, permitir ou facilitar a introdução de um número maior de melhorar as mutações. A biblioteca também pode compreender a substituição em posições que não apresentem afinidade melhorada na primeira

rodada de triagem.

[00304] A segunda biblioteca é pesquisada ou selecionada para os membros da biblioteca com uma melhor e/ou alterada afinidade de ligação utilizando qualquer método conhecido na técnica, incluindo o rastreamento utilizando análise de ressonância de plasmon de superfície BIAcore, e seleção usando qualquer método conhecido na técnica para seleção, incluindo a exibição de fagos, display de levedura e de apresentação de ribossoma.

[00305] Em algumas modalidades, a invenção engloba também proteínas de fusão compreendendo um ou mais fragmentos ou regiões dos anticorpos (tais como G1) ou polipeptídeos da presente invenção. Em uma modalidade, um polipeptídeo de fusão é desde que compreende pelo menos 10 aminoácidos contíguos da região variável da cadeia leve mostrada na SEQ ID NO: 2 (Figura 5) e/ou, pelo menos, 10 aminoácidos da região variável da cadeia pesada mostradas nas SEQ ID NO: 1 (Figura 5). Em outras modalidades, um polipeptídeo de fusão é desde que compreende pelo menos cerca de 10, pelo menos cerca de 15, pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 25, ou pelo menos cerca de 30 aminoácidos contíguos da região variável da cadeia leve mostrado na SEQ ID NO:2 (Figura 5) e/ou, pelo menos, cerca de 10, pelo menos cerca de 15, pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 25, ou pelo menos cerca de 30 aminoácidos contíguos da região variável da cadeia pesada mostrada em SEQ ID NO: 1 (Figura 5). Em uma outra modalidade, o polipeptídeo de fusão compreende uma região variável de cadeia leve e/ou uma região variável da cadeia pesada de G1, como mostrado na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 1 da Figura 5. Em uma outra modalidade, o polipeptídeo de fusão compreende um ou mais CDR(s) de G1. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo de fusão compreende CDR H3 e/ou CDR L3 de anticorpo G1. Para os fins desta invenção, uma proteína de fusão G1 contém um ou mais anticorpos G1 e outra sequência de aminoácidos para o qual não está ligado na molécula nativa, por exemplo, uma sequência heteróloga ou uma sequência

homóloga a partir de outra região. Exemplos de sequências heterólogas incluem, mas não estão limitados a uma "marcação", tais como um marcador FLAG ou um marcador 6His (SEQ ID NO: 56). Marcações são bem conhecidos na técnica.

[00306] Um polipeptídeo de fusão G1 podem ser criados por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, de forma recombinante ou sinteticamente. Tipicamente, as proteínas de fusão G1 desta invenção são feitas por preparação de uma expressão de um polinucleotídeo que os codifica utilizando métodos recombinantes aqui descritos, embora eles também podem ser preparados por outros meios conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, síntese química.

[00307] Em alguns aspectos, a presente invenção também proporciona composições que compreendem anticorpos ou polipeptídeos derivados de G1 conjugado (por exemplo, ligados) a um agente que facilitam o acoplamento a um suporte sólido (tal como biotina ou avidina). Para simplicidade, a referência será feita geralmente ao G1 ou anticorpos com o entendimento de que estes métodos são aplicáveis a qualquer uma das modalidades de ligação de CGRP aqui descritas. Conjugação geralmente se refere a ligação destes componentes como aqui descrito. O ligante (que é geralmente a fixação desses componentes em associação próxima, pelo menos, para a administração) pode ser conseguida em qualquer número de maneiras. Por exemplo, uma reação direta entre um agente e um anticorpo é possível quando cada um possui um substituinte capaz de reagir com o outro. Por exemplo, um grupo nucleofílico, como um amino ou grupo sulfidril, pode ser capaz de reagir com um grupo contendo carbonil, como um anidrido ou um haleto ácido, ou com um grupo alquil contendo um bom grupo lábil (por exemplo, um haleto) no outro.

[00308] Um anticorpo ou polipeptídeo pode ser ligado a um agente de marcação (alternativamente designado por "etiqueta") tal como uma molécula fluorescente, uma molécula radioativa ou quaisquer outros marcadores conhecidos na técnica. As etiquetas são conhecidas na técnica que geralmente proporcionam (direta ou

indiretamente) um sinal.

[00309] Em algumas modalidades, a invenção proporciona também composições (incluindo composições farmacêuticas) e kits compreendendo anticorpo G1, e/ou qualquer ou todos os anticorpos ou polipeptídeos aqui descritos.

[00310] Em algumas modalidades, a invenção também proporciona polinucleotídeos isolados que codificam os anticorpos e polipeptídeos da presente invenção (incluindo um anticorpo compreendendo as sequências polipeptídicas das regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve mostrada na Figura 5), e vetores e células hospedeiras compreendendo o polinucleotídeo.

[00311] Em algumas modalidades, a invenção proporciona polinucleotídeos (ou composições, incluindo composições farmacêuticas) que compreendem codificação de polinucleotídeos de qualquer um dos seguintes: (a) o anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (b) um fragmento ou uma região de anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (c) uma cadeia leve de anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (d) uma cadeia pesada do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (e) uma ou mais das região (es) variável (s) a partir de uma cadeia leve e/ou uma cadeia pesada de anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (f) um ou mais CDR (s) (um, dois, três, quatro, cinco ou seis CDR) do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (g) CDR H3 da cadeia pesada do anticorpo G1; (h) CDR L3 da cadeia leve do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (i) três CDR da cadeia leve do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (j) três CDR da cadeia pesada do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; (k) três CDR da cadeia leve e três CDRs da cadeia pesada, do anticorpo G1 ou as suas variantes mostradas na Tabela 6; e (l) um anticorpo que compreende qualquer um de (b) até (k). Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende um dos ou ambos os polinucleotídeo(s) apresentados na SEQ ID NO: 9 e na SEQ ID NO: 10.

[00312] Em um outro aspecto, a invenção proporciona polinucleotídeos que codificam qualquer um dos anticorpos (incluindo fragmentos de anticorpos) e polipeptídeos aqui descritos, tais como anticorpos e polipeptídeos que têm função efetora prejudicada. Os polinucleotídeos podem ser produzidos por procedimentos conhecidos na técnica.

[00313] Em um outro aspecto, a invenção proporciona composições (tais como uma composição farmacêutica), que compreende qualquer um dos polinucleotídeos da invenção. Em algumas modalidades, a composição compreende um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo que codifica o anticorpo G1 tal como aqui descrito. Em outra modalidade, a composição compreende um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo que codifica qualquer um dos anticorpos ou polipeptídeos aqui descritos. Em ainda outras modalidades, a composição compreende um dos ou ambos os polinucleotídeos apresentados na SEQ ID NO: 9 e na SEQ ID NO: 10. Os vetores de expressão, e a administração de composições de polinucleotídeos são aqui adicionalmente descritos.

[00314] Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de fabricação de qualquer um dos polinucleotídeos aqui descritos.

[00315] Os polinucleotídeos complementares a tais sequências também estão englobados pela presente invenção. Os polinucleotídeos podem ser de cadeia simples (codificante ou anti-sense) ou de cadeia dupla e podem ser DNA (genômico, cDNA ou sintético) ou moléculas de RNA. Moléculas de RNA incluem moléculas HnRNA, que contêm íntrons e correspondem a uma molécula de DNA de um modo um-para-um, e moléculas de mRNA, os quais não contêm íntrons. Adicionais de codificação ou sequências não codificadoras podem, mas não necessariamente, estar presente dentro de um polinucleotídeo da presente invenção, e um polinucleotídeo pode, mas não necessita de ser ligada a outras moléculas e/ou materiais de suporte.

[00316] Os polinucleotídeos podem compreender uma sequência nativa (ou

seja, uma sequência endógena que codifica um anticorpo ou uma sua porção) ou podem compreender uma variante de uma tal sequência. Variantes de polinucleotídeos contêm uma ou mais substituições, adições, deleções e/ou inserções tais que a imunorreatividade do polipeptídeo codificado não é diminuído, em relação a uma molécula imunorreativa nativa. O efeito sobre a imunorreatividade do polipeptídeo codificado pode ser geralmente avaliado como aqui descrito. As variantes exibem de um modo preferido, pelo menos, cerca de 70% de identidade, mais preferencialmente pelo menos cerca de 80% de identidade e mais preferencialmente pelo menos 90% de identidade sobre a uma sequência polinucleotídica que codifica um anticorpo nativo ou uma sua porção.

[00317] Duas sequências polipeptídicas ou polinucleotídicas são referidas como sendo "idêntica", se a sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos nas duas sequências é a mesma quando alinhadas para correspondência máxima, tal como descrito abaixo. A comparação entre duas sequências é tipicamente realizada comparando as sequências através de uma janela de comparação para identificar e comparar regiões locais de similaridade de sequência. Uma "janela de comparação", tal como aqui usada, se refere a um segmento de pelo menos cerca de 20 posições contíguas, geralmente de 30 a cerca de 75, de 40 a cerca de 50, em que uma sequência pode ser comparada com uma sequência referência do mesmo número de posições contíguas após as duas sequências são alinhadas de forma ótima.

[00318] O alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido utilizando o programa Megalign no local Lasergene de software de bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando os parâmetros por defeito. Este programa incorpora vários esquemas de alinhamento descritos nas seguintes referências: Dayhoff, M.O. (1978) Um modelo de mudança evolucionária em proteínas - Matrizes para a detecção de relacionamentos distantes. Em Dayhoff, MO (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation,

Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 80: 726-730.

[00319] De preferência, a "porcentagem de identidade de sequência" é determinada por comparação de duas sequências otimamente alinhadas em uma janela de comparação de pelo menos 20 posições, em que a porção da sequência de polinucleotídeo ou polipeptídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (ou seja, lacunas) de 20 por cento ou menos, normalmente 5 a 15 por cento, ou 10 a 12 por cento, em comparação com as sequências de referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ótimo das duas sequências. A porcentagem é calculada determinando o número de posições nas quais as bases de ácido nucleico idêntica ou resíduo de aminoácido ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições correspondentes, dividindo o número de posições correspondentes pelo número total de posições na sequência de referência (isto é, o tamanho da janela) e multiplicando os resultados por 100 para render a porcentagem de identidade de sequência.

[00320] As variantes podem também, ou em alternativa, ser substancialmente homólogos a um gene nativo, ou uma porção ou complementar do mesmo. Tais variantes de polinucleotídeos são capazes de hibridar sob condições moderadamente rigorosas com uma sequência de DNA de ocorrência natural que codifica um anticorpo nativo (ou uma sequência complementar).

[00321] "Condições moderadamente rigorosas" adequadas incluem pré-

lavagem em uma solução de 5 X SSC, 0,5% SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridação a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante a noite; seguido de duas lavagens a 65°C durante 20 minutos, com cada de 2X, 0,5X e 0,2X SSC contendo 0. 1 % SDS.

[00322] Tal como aqui se utiliza, "condições altamente rigorosas" ou "condições muito rigorosas" são as que: (1) empregam baixa força iônica e temperatura elevada para lavagem, por exemplo 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M de citrato de sódio/0,1% de dodecilsulfato de sódio a 50°C; (2) empregam durante a hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, 50% (p/p) de formamida com 0,1% de albumina de soro de bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50mM de tampão de fosfato de sódio a pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, citrato de sódio 75 mM a 42°C; ou (3) empregam 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sódio de 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5x solução de Denhardt, DNA de esperma de salmão sonificado (50µg/ml), 0,1% de SDS, e 10% de sulfato de dextrano a 42°C, com lavagens a 42°C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e 50% de formamida a 55°C, seguido por uma lavagem de elevado rigor que consiste em 0,1 x SSC contendo EDTA a 55°C. O versado na técnica reconhecerá como ajustar a temperatura, força iônica, etc., conforme necessário para acomodar fatores tais como comprimento da sonda e semelhantes.

[00323] Será apreciado por aqueles versados na técnica que, como resultado da degenerescência do código genético, há muitas sequências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo, tal como descrito neste documento. Alguns desses polinucleotídeos suportar homologia mínima com a sequência de nucleotídeos de qualquer gene nativo. No entanto, os polinucleotídeos que variam devido a diferenças no uso de codões estão especificamente contemplados pela presente invenção. Além disso, os alelos dos genes compreendendo as sequências polinucleotídicas aqui fornecidas estão dentro do âmbito da presente invenção. Os alelos são genes endógenos que são alterados como resultado de uma ou mais mutações, tais como deleções, adições

e/ou substituições de nucleotídeos. O mRNA e a proteína resultante pode, mas não precisa, tem uma estrutura ou função alterada. Os alelos podem ser identificados utilizando técnicas convencionais (tais como a hibridização, amplificação e/ou base de dados de comparação de sequências).

[00324] Os polinucleotídeos da presente invenção podem ser obtidos utilizando síntese química, métodos recombinantes, ou por PCR. Os métodos de síntese química de polinucleotídeos são bem conhecidos na técnica e não necessitam de ser aqui descritos em detalhe. Um versado na técnica pode utilizar as sequências aqui proporcionadas e um sintetizador de DNA comercial para a produção de uma sequência de DNA desejada.

[00325] Para a preparação de polinucleotídeos, utilizando métodos recombinantes, um polinucleotídeo compreendendo uma sequência desejada pode ser inserido em um vetor adequado e o vetor por sua vez pode ser introduzido em uma célula hospedeira adequada para replicação e amplificação, como discutido aqui. Os polinucleotídeos podem ser inseridos nas células hospedeiras por qualquer meio conhecido na técnica. As células são transformadas por introdução de um polinucleotídeo exógeno por absorção direta, endocitose, transfecção, acasalamento de F ou eletroporação. Uma vez introduzido, o polinucleotídeo exógeno pode ser mantido dentro da célula como um vetor não integrado (tal como um plasmídeo) ou integrado no genoma da célula hospedeira. O polinucleotídeo assim amplificado pode ser isolado a partir da célula hospedeira através de métodos bem conhecidos na técnica. Ver, p.ex., Sambrook et al. (1989).

[00326] Como alternativa, PCR permite a reprodução de sequências de DNA. A tecnologia de PCR é bem conhecida na técnica e é descrita na Patente US Nos 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 e 4,683,202, assim como por PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkhäuser Press, Boston (1994).

[00327] RNA pode ser obtido usando o DNA isolado em um vetor apropriado

e inserindo-o em uma célula hospedeira adequada. Quando a célula se replica e o DNA é transcrito em RNA, o RNA pode ser isolado utilizando métodos bem conhecidos dos versados na técnica, como descrito em Sambrook et al., (1989), por exemplo.

[00328] Os vetores de clonagem adequados podem ser construídos de acordo com técnicas padrão ou podem ser selecionados a partir de um grande número de vetores de clonagem disponíveis na técnica. Embora o vetor de clonagem selecionado possa variar de acordo com a célula hospedeira se destina a ser usado, os vetores de clonagem úteis terão geralmente a capacidade de auto-replicar, podem possuir um único alvo para uma endonuclease de restrição particular, e/ou podem transportar genes para um marcador que pode ser usado na seleção de clones que contenham o vetor. Os exemplos adequados incluem plasmídeos e vírus bacterianos, por exemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por exemplo, pBS SK+) e seus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, DNA de fago e vetores de vaivém, tais como PSA3 e pAT28. Estes e muitos outros vetores de clonagem estão disponíveis a partir de fornecedores comerciais tais como BioRad, Stratagene e Invitrogen.

[00329] Os vetores de expressão são em geral construtos de polinucleotídeo replicável que contêm um polinucleotídeo de acordo com qualquer um dos vários aspectos da invenção. Está implícito que um vetor de expressão deve ser replicado nas células hospedeiras, quer como epissomas ou como uma parte integral do DNA cromossômico. Vetores de expressão adequados incluem, mas não estão limitados aos plasmídeos, vetores virais, incluindo adenovírus, adenovírus associados, retrovírus, cosmídeos e vetor (es) de expressão descritos na Publicação PCT No. WO 87/04462. Os componentes do vetor podem geralmente incluir, mas não estão limitados a um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinal; uma origem de replicação; um ou mais genes marcadores; elementos de controle transcricional adequado (tais como promotores, estimuladores e terminador). Para a expressão (ou seja, tradução), um ou mais elementos controladores de translação também são geralmente necessários, tais

como locais de ligação ao ribossoma, sítios de iniciação da tradução, e parar códons.

[00330] Os vetores que contêm os polinucleotídeos de interesse podem ser introduzidos na célula hospedeira por qualquer de um número de meios adequados, incluindo eletroporação, transfecção empregando cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, ou outras substâncias; bombardeamento de microprojéteis; lipofecção; e infecção (por exemplo, onde o vetor é um agente infeccioso tal como o vírus vaccinia). A opção de introduzir vetores ou polinucleotídeos dependerá frequentemente das características da célula hospedeira.

[00331] Em alguns aspectos, a invenção também proporciona células hospedeiras compreendendo qualquer um dos polinucleotídeos aqui descritos. Quaisquer células hospedeiras capazes de sobre-expressar DNAs heterólogos podem ser usados para a finalidade de isolar os genes que codificam o anticorpo, polipeptídeo ou proteína de interesse. Exemplos não limitativos de células hospedeiras de mamífero incluem, mas não se limitam às células COS, células HeLa, e células CHO. Ver também a Publicação PCT No. WO 87/04462. As células hospedeiras não de mamífero adequadas incluem células procarióticas (tais como *E. coli* ou *B. subtilis*) e de levedura (tais como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; ou *K. lactis*). De preferência, as células hospedeiras expressam os cDNA a um nível de cerca de 5 vezes superior, mais preferencialmente 10 vezes maior, ainda mais preferivelmente 20 vezes mais elevado do que a do anticorpo ou proteína de interesse endógena correspondente, se presente, nas células hospedeiras. O rastreio das células hospedeiras durante uma ligação específica para A \square 1-40 é efetuada por um imunoensaio ou FACS. Uma célula que sobre-expressa o anticorpo ou a proteína de interesse pode ser identificada.

D. Composições

[00332] Em algumas modalidades, as composições usadas no método da invenção compreendem uma quantidade eficaz de um anticorpo (por exemplo, anticorpo antagonista anti-CGRP, anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP), ou um

polipeptídeo derivado de anticorpo aqui descrito. Exemplos de tais composições, bem como a forma como para formular, são também descritas em uma seção anterior e inferior. Em uma modalidade, a composição compreende ainda um antagonista do CGRP. Em algumas modalidades, a composição compreende um ou mais anticorpos monoclonais que modulam a via de CGRP. Em algumas modalidades, a composição compreende um ou mais anticorpos antagonista anti-CGRP. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP reconhece CGRP humano. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP é humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP compreende uma região constante que não desencadeia uma resposta imunitária indesejada ou indesejável, tal como a lise mediada por anticorpo ou ADCC. Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP compreende um ou mais CDR(s) de anticorpo G1 (tal como uma, duas, três, quatro, cinco, ou, em algumas modalidades, todas as seis CDR de G1). Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista anti-CGRP é humano.

[00333] Entende-se que as composições podem compreender mais do que um anticorpo (por exemplo, mais do que um anticorpo antagonista anti-CGRP-- uma mistura de anticorpos antagonista anti-CGRP que reconhecem diferentes epítomos de CGRP). Outras composições exemplificativas compreendem mais de uns anticorpos antagonistas anti-CGRP que reconhecem o mesmo epítomo (s), ou de diferentes espécies de anticorpos antagonista anti-CGRP que se ligam a diferentes epítomos de CGRP.

[00334] Uma composição pode ainda compreender transportadores, excipientes ou estabilizadores (Remington: The Science e Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregues. Uma formulação terapêutica de um anticorpo pode compreender um ou mais transportadores, excipientes ou estabilizadores

farmaceuticamente aceitáveis, com exemplos não limitantes de tais espécies que incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácido orgânicos; sais como cloreto de sódio; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; preservativos (tais como cloreto de amônio de octadecildimetilbenzil; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butil ou álcool benzil; alquilparabenos, tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cre-sol); peso molecular inferior (menos do que cerca de 10 resíduos) polipeptídeos; proteínas, tais como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos (por exemplo, em concentrações de 0,1 mM a 100 mM, 0,1 mM a 1 mM, 0,01 mM a 50 mM, 1 mM a 50 mM, 1 mM a 30 mM, 1 mM a 20 mM, 10 mM a 25 mM) tais como glicina, glutamina, metionina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monosacarídeos, disacarídeos, e outros carboidratos incluindo glucose, manose, ou dextrinas; agentes de quelação (por exemplo, em concentrações de 0,001 mg/mL a 1 mg/mL, 0,001 mg/mL a 1 mg/mL, 0,001 mg/mL a 0,1 mg/mL, 0,001 mg/mL a 0,01 mg/mL) tais como EDTA (por exemplo, disódio EDTA dihidrato); açúcares (por exemplo, em concentrações de 1 mg/mL a 500 mg/mL, 10 mg/mL a 200 mg/mL, 10 mg/mL a 100 mg/mL, 50 mg/mL a 150 mg/mL) tais como sucrose, manitol, trehalose ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de proteína de Zn); e/ou tensoativos não iônicos (por exemplo, em concentrações de 0,01 mg/mL a 10 mg/mL, 0,01 mg/mL a 1 mg/mL, 0,1 mg/mL a 1 mg/mL, 0,01 mg/mL a 0,5 mg/mL) tais como TWEENTM (por exemplo, polisorbato (por exemplo, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80)), PLURONICSTM ou polietileno glicol (PEG). Os excipientes farmacologicamente aceitáveis são aqui adicionalmente descritos.

[00335] Um anticorpo (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-CGRP) e suas composições podem também ser usados em conjunto com outros agentes que servem para reforçar e/ou complementar a eficácia dos agentes.

E. Kits

[00336] Em um aspecto, a invenção também fornece kits para uso nos presentes métodos. Os kits podem incluir um ou mais recipientes que compreendem um anticorpo aqui descrito (por exemplo, um anticorpo antagonista anti-CGRP (tal como um anticorpo humanizado)) ou polipeptídeo aqui descrito e instruções para uso de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos. Geralmente, estas instruções incluem uma descrição da administração do anticorpo para tratar, melhorar ou prevenir a dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca) de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos. O kit pode ainda compreender uma descrição de selecionar um indivíduo adequado para tratamento com base em identificar se esse indivíduo tem dor de cabeça, ou se o indivíduo está em risco de ter dor de cabeça. Em ainda outras modalidades, as instruções compreendem uma descrição da administração de um anticorpo (por exemplo, o anticorpo antagonista anti-CGRP) a um indivíduo em risco de ter dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca).

[00337] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo é humano. Em outras modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em outras modalidades, o anticorpo compreende um ou mais CDR(s) de anticorpo G1 (tal como uma, duas, três, quatro, cinco, ou, em algumas modalidades, todas as seis CDR de G1).

[00338] As instruções relativas ao uso de um anticorpo (por exemplo, anticorpo antagonista anti-CGRP) geralmente incluem informações como a dosagem, horário de dosagem, e via de administração para o tratamento pretendido. Os recipientes podem ser doses unitárias, embalagens em lote (por exemplo, embalagens multi-dose) ou doses de sub-unidade. Instruções fornecidas nos kits são instruções sobre um rótulo ou bula (por exemplo, uma folha de papel incluído no kit) normalmente escrita, mas as instruções legíveis por máquina (por exemplo, instruções realizadas em um disco de armazenamento magnético ou óptico) também são aceitáveis.

[00339] A etiqueta ou bula informativa indica que a composição é usada para o tratamento, melhoria e/ou prevenção da dor de cabeça (por exemplo, enxaqueca). As instruções podem ser fornecidas para a prática de qualquer dos métodos aqui descritos.

[00340] Os kits da invenção presente são em embalagens apropriadas. Embalagem adequada inclui, mas não está limitada às ampolas, garrafas, jarros, embalagens flexíveis (por exemplo, Mylar selado ou sacos de plástico), e semelhantes. Também estão contempladas as embalagens para o uso em combinação com um dispositivo específico, como um inalador, dispositivo de administração nasal (por exemplo, um atomizador) ou um dispositivo de infusão tal como uma minibomba. Um kit pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa ou frasco de solução intravenosa que tem uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O recipiente pode também ter uma porta de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco possuindo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um anticorpo antagonista anti-CGRP e/ou um anticorpo monoclonal que modula a via de CGRP. O recipiente pode ainda compreender um segundo agente farmacologicamente ativo.

[00341] Os kits podem proporcionar opcionalmente componentes adicionais tais como tampões e informação interpretativa. Normalmente, o kit compreende um recipiente e uma etiqueta ou bula informativa (s) sobre ou associado com o recipiente.

[00342] Os Exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar, mas não limitar a invenção.

Exemplos

Exemplo 1: Geração e caracterização de anticorpos monoclonais direcionados contra CGRP

[00343] Geração de anticorpos anti-CGRP. Para gerar anticorpos anti-CGRP

que têm reatividade cruzada entre espécies de camundongo e CGRP humano, os camundongos foram imunizados com 25-100 µg de α-CGRP ou β-CGRP humano conjugado com KLH em adjuvante (50 µl por 100 µl, na pata por camundongo total) a vários intervalos. A imunização foi realizada geralmente como descrito no Geerligts HJ et al., 1989, J. Immunol. Methods 124:95-102; Kenney JS et al., 1989, J. Immunol. Methods 121:157-166; and Wicher K et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:128-135. Os camundongos foram primeiro imunizados com 50 µg de α-CGRP ou β-CGRP humano conjugado com KLH em CFA (adjuvante completo de Freund). Após 21 dias, os camundongos foram secundariamente imunizados com 25 µg de β-CGRP humano (para os camundongos imunizados com o primeiro humano α-CGRP) ou α-CGRP (para os camundongos imunizados com o primeiro humano β-CGRP) conjugado com KLH em IFA (adjuvante de Freund incompleto). Vinte e três dias mais tarde, após a segunda imunização, terceira imunização foi realizada com 25 µg de camundongo α-CGRP conjugado com KLH em IFA. Dez dias mais tarde, os títulos de anticorpos foram testados por meio de ELISA. Adiante a imunização foi realizada com 25 µg do peptídeo (de camundongo α-CGRP-KLH) em IFA 34 dias após a terceira imunização. Reforço final foi realizado com 100 µg peptídeo solúvel (camundongo de α-CGRP) 32 dias após a imunização por diante.

[00344] Os esplenócitos foram obtidos a partir do camundongo imunizado e fundidos com células de mieloma NSO, na proporção de 10: 1, com polietileno-glicol 1500. Os híbridos foram plaqueados em placas de 96 poços em DMEM contendo 20% de soro de cavalo e 2-oxaloacetato/piruvato/insulina (Sigma), e seleção hipoxantina/aminopterin/timidina foi iniciada. No dia 8, 100 µl de DMEM contendo soro de cavalo a 20% foi adicionado a todos os poços. Os sobrenadantes dos híbridos foram pesquisados utilizando imunoensaio de captura de anticorpo. Determinação da classe de anticorpos foi feita com anticorpos específicos para a segunda classe.

[00345] Um painel de linhas celulares produtores de anticorpos monoclonais

foi selecionado com base na sua ligação ao CGRP humano e de camundongo para posterior caracterização. Estes anticorpos e características estão apresentados a seguir nas Tabelas 2 e 3.

[00346] Purificação e preparação do fragmento Fab. Os anticorpos monoclonais selecionados para posterior caracterização foram purificados a partir de sobrenadantes de culturas de hibridoma utilizando proteína A da cromatografia de afinidade. Os sobrenadantes foram equilibrados a pH 8. Os sobrenadantes foram então carregados para a coluna de proteína A MabSelect (Amersham Biosciences # 17-5199-02) equilibrada com PBS a pH 8. A coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de PBS, pH 8. Os anticorpos foram eluídos com tampão de citrato-fosfato de 50 mM, a pH 3. Os anticorpos eluídos foram neutralizados com 1 M de tampão fosfato, pH 8. Os anticorpos purificados foram dialisados com PBS, pH 7,4. As concentrações de anticorpos foram determinadas por SDS-PAGE, utilizando um anticorpo monoclonal de murino da curva padrão.

[00347] Os Fab foram preparados por proteólise de papaína de anticorpos completos utilizando o kit Immunopure Fab (Pierce #44885) e purificou-se por fluxo através de cromatografia de proteína A, seguindo as instruções do fabricante. As concentrações foram determinadas por ELISA e/ou eletroforese de SDS-PAGE utilizando um Fab padrão de concentração conhecida (determinada por análise de aminoácidos), e por A280 utilizando $1\text{OD} = 0,6 \text{ mg/ml}$ (ou equivalente teórico baseado na sequência de aminoácidos).

[00348] Determinação de afinidade dos Fabs. Afinidades dos anticorpos monoclonais anti-CGRP foram determinadas em ambas as 25°C ou 37°C , utilizando o sistema de ressonância plasmônica de superfície Biacore3000™ (SPR) (BIAcore, Inc., Piscataway NJ), com o próprio tampão de operação do fabricante, HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% p/p de polissorbato 20). A afinidade foi determinada pela captura de peptídeos de CGRP terminalmente biotinizado

de N (pedidos personalizados a partir de GenScript Corporation, New Jersey ou global Peptide Services, Colorado) via estreptavidina pré-imobilizada em SA chip e medição cinética de ligação do anticorpo Fab titulada através da superfície do CGRP. Biotinilado CGRP foi diluído em HBS-EP e injetado sobre o chip, a uma concentração de menos do que 0,001 mg/ml. Usando o tempo de fluxo variável entre os canais de fichas individuais, duas gamas de densidade de antígeno foram alcançadas: <50 unidades de resposta (RU) para estudos cinéticos pormenorizados e cerca de 800 RU para estudos de concentração e de triagem. Duas ou três vezes diluições em série em concentrações tipicamente abrangendo 1 μ M - 0,1 nM (destinado a 0.1-10x estimado KD) de fragmentos Fab purificados durante 1 minuto a 100 Foram μ permitted L/min e tempos de dissociação de 10 minutos foram injetados. Depois de cada ciclo de ligação, as superfícies foram regeneradas com NaOH a 25 mM em 25% p/p de etanol, que foi tolerada ao longo de centenas de ciclos. Cinética de velocidade de associação (Kon) e taxa de dissociação (koff) foram obtidas simultaneamente através do ajuste dos dados a um modelo 1:1 de ligação de Langmuir (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110), utilizando o programa BIAevaluation. As constantes de dissociação em equilíbrio globais (KD) ou "afinidades" foram calculadas a partir da razão $KD = koff/kon$. As afinidades dos fragmentos Fab murino estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

[00349] Mapeamento de epítomos dos anticorpos anti-CGRP murino. Para determinar o epítomo que os anticorpos anti-CGRP humano ligam em α -CGRP, as afinidades dos fragmentos Fab para vários fragmentos de ligação de CGRP foram medidas tal como descrito acima através da captura de fragmentos de CGRP terminalmente biotinilado de N dos aminoácidos 19-37 e aminoácidos 25-37 sobre um chip sensor SA. A Figura 1 mostra as suas afinidades de ligação medidas a 25°C. Como mostrado na Figura 1, todos os anticorpos, exceto o anticorpo 4901, ligam aos fragmentos de α -CGRP humano 19-37 e 25-37 com afinidade semelhante para a sua

afinidade de ligação ao comprimento completo humano de α -CGRP (1-37). Anticorpo 4901 se liga ao fragmento de α -CGRP humano 25-37 com seis vezes menores afinidade do que ligação ao fragmento de α -CGRP humano de corpo inteiro, principalmente devido a uma perda de taxa off. Os dados indicam que estes anticorpos anti-CGRP geralmente se ligam a extremidade do terminal C de CGRP.

[00350] Varredura de alanina foi realizada para caracterizar ainda mais os aminoácidos em α -CGRP humano envolvidos na ligação de anticorpos anti-CGRP. Diferentes variantes de α -CGRP humano com substituições únicas de alanina foram geradas por síntese de peptídeos. As suas sequências de aminoácidos são apresentadas na Tabela 4, juntamente com todos os outros peptídeos usados na análise Biacore. As afinidades dos fragmentos Fab dos anticorpos anti-CGRP a estas variantes foram determinadas usando Biacore, como descrito acima. Como mostrado na Figura 1, todos os 12 anticorpos alvo de um epítipo do terminal C, com F37 de aminoácidos sendo o resíduo mais importante. A mutação de F37 para alanina reduziu significativamente a afinidade ou mesmo completamente eliminada ligação dos anticorpos anti-CGRP para o peptídeo. O próximo resíduo de aminoácido mais importante é G33, no entanto, apenas os anticorpos de elevada afinidade (7E9, 8B6, 10A8 e 7D11) foram influenciados pela substituição de alanina nesta posição. O resíduo aminoácido S34 também desempenha uma significativa, mas menor, em função da ligação destes quatro anticorpos de elevada afinidade.

[00351] Tabela 2. Características dos anticorpos monoclonais anti-CGRP humano que se ligam a α -CGRP e a sua atividade antagonista

Anticorpos	KD para α -CGRP humana ao 25 °C (nM)	KD para α -CGRP humana a 37 °C (nM)	Bloqueio com base na célula de ligação α -CGRP humana para seu receptor, a 25 °C à base das células (medido através da ativação de cAMP)	IC50 (sítios de ligação nM) a 25°C (temp. ambiente) medidos no ensaio de ligação de radioligante.
7E9	1,0	0,9	Sim	2,5

8B6	1,1	1,2	Sim	4,0
10A8	2,1	3,0	Sim	n.d.
7D11	4,4	5,4	Sim	n.d.
6H2	9,3	42	Sim	12,9
4901	61	139	Sim	58
14E10	80	179	Sim	n.d.
9B8	85	183	Não	n.d.
13C2	94	379	Não	n.d.
14A9	148	581	Não	n.d.
6D5	210	647	Não	n.d.
1C5	296	652	Não	n.d.

Nota: O anticorpo 4901 está disponível comercialmente (Sigma, Produto No. C7113).

nd = não determinado

[00352] Tabela 3. Características dos anticorpos monoclonais anti-CGRP camundongo que se ligam a α -CGRP e a atividade antagonista

Anticorpos	KD para α -CGRP camundongo a 37 °C (nM)	Bloqueio com base na célula de ligação de α -CGRP camundongo para seu receptor, a 25 °C (medido através da ativação de cAMP)	In vivo no ensaio de bloqueio do nervo safeno
4901	3,4	Sim	Sim
7E9	47	Sim	Sim
6H2	54	Não	Não
8B6	75	Sim	Sim
7D11	218	Sim	Sim
10A8	451	Não	n.d.
9B8	876	Não	n.d.
14E10	922	Não	n.d.
13C2	> 1000	Não	n.d.
14A9	> 1000	Não	n.d.
6D5	> 1000	Não	n.d.
1C5	> 1000	Não	n.d.

"n.d." indica que nenhum teste foi realizado para o anticorpo.

[00353] Tabela 4 As sequências de aminoácidos de fragmentos α -CGRP humano (SEQ ID NOS: 15-40) e peptídeos relacionados (SEQ ID NOS: 41-47). Todos os peptídeos são terminalmente C amidado exceto SEQ ID NOS: 36-40. Resíduos em negrito indicam mutações pontuais.

CGRP	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO
1-37 (WT)	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVP TNVGSKAF	15
8-37	VTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKA F	16
19-37	SGGVVKNNFVPTNVGSKAF	17
P29A (19-37)	SGGVVKNNFVATNVGSKAF	18
K35A (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSAAF	19
K35E (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSEAF	20
K35M (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSMFAF	21
K35Q (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSQAF	22
F37A (19-37)	SGGVVKNNFVPTNVGSKAA	23
25-38A	NNFVPTNVGSKAFA	24
25-37	NNFVPTNVGSKAF	25
F27A (25-37)	NNAVPTNVGSKAF	26
V28A (25-37)	NNFAPTNVGSKAF	27
P29A (25-37)	NNFVATNVGSKAF	28
T30A (25-37)	NNFVPANVGSKAF	29
N31A (25-37)	NNFVPTAVGSKAF	30
V32A (25-37)	NNFVPTNAGSKAF	31
G33A (25-37)	NNFVPTNVASKAF	32
S34A (25-37)	NNFVPTNVGAKAF	33
F37A (25-37)	NNFVPTNVGSKAA	34
26-37	NFVPTNVGSKAF	35
19-37-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKAF	36
19-36-COOH	SGGVVKNNFVPTNVGSKA	37
1-36-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVP TNVGSKA	38
1-19-COOH	ACDTATCVTHRLAGLLSRS	39
1-13-COOH	ACDTATCVTHRLA	40
camundongo	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVP	41

CGRP	Sequência de aminoácidos	SEQ ID NO
α (1-37)	TNVGSEAF	
camundongo α (19-37)	SGGVVKDNFVPTNVGSEAF	42
humano β (1-37)	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVP TNVGSKAF	43
camundongo β (1-37)	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVP TNVGSKAF	44
Calcitonina humana (1-32)	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGV GAP	45
Amilina hu- mana (1-37)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSST NVGSNTY	46
Adrenomedu- lina Humana (1-52)	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAH QIQFTDK DKDNVAPRSKISPQGY	47

Exemplo 2: Rastreamento de anticorpos antagonistas anti-CGRP utilizando ensaios *in vitro*.

[00354] Anticorpos anti-CGRP de camundongos foram ainda pesquisados quanto à atividade antagonista *in vitro* utilizando um ensaio com base celular de cAMP e ativação ensaio de ligação.

[00355] A atividade antagonista medida pelo ensaio de cAMP. Cinco microlitros de α -CGRP humano ou de camundongo (concentração final de 50 nM) na presença ou ausência de um anticorpo anti-CGRP (concentração final de 1-3000 nM), ou de α -CGRP camundongos ou α -CGRP humanos (concentração final de 0,1 nM-10 μ M; como um controle positivo para a ativação de c-AMP) foi dispensado em uma placa de 384 cavidades (Nunc, Cat. No. 264657). Dez microlitros de células (humano SK-N-MC se α -CGRP humano é usado, ou de camundongo L6 da ATCC se α -CGRP camundongo é usado) em tampão de estimulação (20 mM de HEPES, pH 7,4, NaCl de

146 mM, 5 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂ 500 uM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)) foram adicionados aos poços da placa. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 30 min.

[00356] Após a incubação, a ativação de cAMP foi realizada utilizando Ensaio de Complementação do Fragmento de Enzima HitHunter™ (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. O ensaio se baseia em uma βenzima galactosidase geneticamente modificada que consiste em dois fragmentos denominados Enzima Receptora (EA) e Enzima do Dador (ED). Quando os dois fragmentos são separados, a enzima é inativa. Quando os fragmentos são juntos podem recombinar-se espontaneamente para formar uma enzima ativa por um processo chamado de complementação. A plataforma de ensaio CEF utiliza um conjugado de peptídeo de ED-cAMP em que cAMP é reconhecido por anticorpos anti-cAMP. Este fragmento ED é capaz de reassociação com a EA para formar uma enzima ativa. No ensaio, o anticorpo anti-cAMP é otimamente titulado para ligar o conjugado ED-cAMP e inibir a formação de enzima. Os níveis de cAMP em amostras de lisados celulares competem com o conjugado de cAMP-ED para a ligação ao anticorpo anti-cAMP. A quantidade de conjugado de ED livre no ensaio é proporcional à concentração de cAMP. Portanto, o cAMP é medido pela formação de uma enzima ativa que é quantificada pela rotatividade de βsubstrato luminescente de galactosidase. O ensaio de ativação de cAMP foi realizado pela adição de 10 µl de tampão de lise e o anticorpo anti-cAMP (proporção 1: 1) seguindo a incubação à temperatura ambiente durante 60 min. Em seguida, 10 µl do reagente de ED-cAMP foi adicionado a cada poço e incubado durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, 20 µl do reagente de EA e mistura CL (contendo o substrato) (relação 1: 1) foi adicionado a cada poço e incubado durante 1-3 horas ou durante a noite à temperatura ambiente. A placa foi lida a 1 segundo/poço no instrumento PMT ou 30 segundos/lugar no imager. Os anticorpos que inibem a ativação de cAMP pelo α-CGRP foram identificados (referido como "sim") nas Tabelas

2 e 3 acima. Os dados das Tabelas 2 e 3 indicam que os anticorpos que demonstraram a atividade antagonista no ensaio geralmente têm elevada afinidade. Por exemplo, os anticorpos tendo KD (determinado a 25 °C) de cerca de 80 nM ou menos ao α -CGRP humano ou tendo KD (determinado a 37°C) de cerca de 47 nM ou menos ao α -CGRP camundongo mostrou atividade antagonista neste ensaio.

[00357] O Ensaio De Ligação do Radioligante. Ensaio de ligação foi realizado para medir a IC50 de anticorpo anti-CGRP no bloqueio do CGRP a partir da ligação ao receptor, como descrito anteriormente. Zimmermann et al., *Peptides* 16:421-4, 1995; Mallee et al., *J. Biol. Chem.* 277:14294-8, 2002. As membranas (25 μ g) a partir de células SK-N-MC foram incubadas durante 90 min à temperatura ambiente em tampão de incubação (50 mM Tris-HCL, pH 7.4, 5 mM MgCL2, 0.1% BSA) contendo 10 pM 125I-human α -CGRP em um volume total de 1 mL. Para determinar as concentrações de inibição (IC50), anticorpos ou CGRP não marcado (como um controle), a partir de uma solução de estoque maior do que cerca de 100 vezes foram dissolvidos a várias concentrações no tampão de incubação e incubados ao mesmo tempo com as membranas e 10 pM 125I-humano α -CGRP. A incubação foi terminada por filtração através de um filtro de microfibras de vidro (GF/B, 1 μ m) que tinham sido bloqueadas com 0,5% polietilimimina. As curvas de resposta à dose foram representados graficamente e valores Ki foram determinados usando a equação: $K_i = IC_{50}/(1 + ([\text{ligante}]/KD))$; onde a dissociação constante de equilíbrio KD = 8 pM para α -CGRP humano ao receptor CGRP1 como presente nas células SK-N-MC, e Bmax = 0,025 pmol/mg de proteína. O valor IC50 relatado (em termos de moléculas de IgG), foi convertido em sítios de ligação (por multiplicação por 2) de modo que ele pode ser comparado com as afinidades (KD) determinado pela Biacore (ver Tabela 2).

[00358] A Tabela 2 mostra o IC50 de anticorpos de murino 7E9, 8B6, 6H2 e 4901. Os dados indicam que a afinidade do anticorpo geralmente se correlaciona com IC50: anticorpos com maior afinidade (valores KD inferiores) têm IC50 menor no

ensaio de ligação de radioligante.

Exemplo 3: Efeito de anticorpos antagonistas anti-CGRP em vasodilatação cutânea induzida pela estimulação do nervo safeno de camundongo

[00359] Para testar a atividade antagonista dos anticorpos anti-CGRP, efeito dos anticorpos sobre a vasodilatação cutânea pela estimulação do nervo safeno de rato foi testada utilizando um modelo de rato descrito anteriormente. Escott et al., Br. J. Pharmacol. 110:772-776, 1993. Neste modelo de camundongo, a estimulação elétrica do nervo safeno induz a libertação de CGRP das terminações nervosas, resultando em um aumento no fluxo sanguíneo da pele. O fluxo de sangue na pele do pé de camundongos Sprague Dawley (170-300 g, de Charles River Hollister) foi medido após a estimulação do nervo safeno. Os camundongos foram mantidos sob anestesia com isoflurano a 2%. Tosilato de bretílio (30 mg/kg, administrada IV) foi dada no início da experiência para minimizar vasoconstrição devida à estimulação concomitante das fibras simpáticas do nervo safeno. A temperatura corporal foi mantida a 37°C pela uso de uma sonda retal termostaticamente ligada a um cobertor de aquecimento de temperatura pad. Os compostos, incluindo os anticorpos, controle positivo (CGRP 8-37), e veículo (PBS, 0,01% de Tween 20) foram administrados por via intravenosa através da veia femural direita, exceto para a experiência apresentada na Figura 3, o composto de teste e de controle foram injetados através na veia da cauda, e para as experiências mostradas nas Figuras 2A e 2B, os anticorpos 4901 e 7D11 foram injetados por via intraperitoneal (IP). Composto do controle positivo CGRP 8-37 (antagonista de vasodilatação), devido a sua meia-vida curta, foi dada 3-5 min antes da estimulação do nervo a 400 nmol/kg (200 µl). Tan et al., Clin. Sci. 89:656-73, 1995. Os anticorpos foram administrados em doses diferentes (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, e 25 mg/kg).

[00360] Para as experiências apresentadas nas Figuras 2A e 2B, o anticorpo 4901 (25 mg/kg), o anticorpo 7D11 (25 mg/kg), ou controle de veículo (PBS com

Tween 20 a 0,01%) foi administrado por via intraperitoneal (IP) 72 horas antes da estimulação de pulso elétrico. Por experiência apresentada na Figura 3, o anticorpo 4901 (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, ou 25 mg/kg) ou de controle de veículo (PBS com Tween 20 a 0,01%) foi administrado por via intravenosa 24 horas antes da estimulação por pulsos elétricos. Após a administração de anticorpos ou o veículo de controle, o nervo safena do membro posterior direito foi exposto cirurgicamente, cortado de forma proximal e coberto com película de plástico para evitar a secagem. Uma sonda de laser Doppler foi colocado sobre o lado médio-dorsal da pele da pata traseira, que é a região inervada pelo nervo safeno. Fluxo sanguíneo da pele, medido como fluxo de células sanguíneas, foi monitorado com um medidor laser de fluxo Doppler. Quando uma linha de base estável fluxo (menos de 5% de variação) foi estabelecida durante pelo menos 5 minutos, o nervo foi colocado sobre eletrodos de platinas bipolares e eletricamente estimuladas com 60 pulsos (2 Hz, 10 V, 1 ms, durante 30 seg) e, em seguida, novamente 20 minutos mais tarde. Alteração cumulativa no fluxo sanguíneo da pele foi calculado pela área sob a curva de tempo de fluxo (AUC, que é igual a variação no fluxo multiplicada pela mudança no tempo) para cada fluxo de resposta a estímulo de pulso elétrico. A média da resposta do fluxo sanguíneo para as duas estimulações foi feita. Os animais foram mantidos sob anestesia por um período de uma a três horas.

[00361] Como mostrado na Figura 2A e Figura 2B, aumento do fluxo de sangue estimulados por aplicação de pulsos eletrônicos no nervo safeno foi inibido pela presença de CGRP 8-37 (400 nmol/kg, administrada i.v.), anticorpo 4901 (25 mg/kg, ip administrado), ou anticorpo 7D11 (25 mg/kg, ip administrado), em comparação com o controle. CGRP 8-37 foi administrado 3-5 min antes da estimulação do nervo safeno; e os anticorpos foram administrados 72 horas antes da estimulação do nervo safeno. Como mostrado na Figura 3, aumento do fluxo de sangue estimulados por aplicação de pulsos eletrônicos no nervo safeno foi inibido pela presença de anticorpo 4901 em

doses diferentes (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, e 25 mg/kg) administrado por via intravenosa em 24 h antes da estimulação do nervo safeno.

[00362] Para as experiências apresentadas nas Figuras 4A e 4B, nervo safeno foi exposta cirurgicamente antes da administração do anticorpo. O nervo safeno do membro posterior direito foi exposto cirurgicamente, cortado proximalmente e coberto com película de plástico para evitar a secagem. Uma sonda de laser Doppler foi colocado sobre o lado médio-dorsal da pele da pata traseira, que é a região inervada pelo nervo safeno. Fluxo sanguíneo da pele, medido como fluxo de células sanguíneas, foi monitorado com um medidor laser de fluxo Doppler. Trinta a quarenta e cinco minutos após a injeção de bretílio tosilato, quando um fluxo de linha de base estável (menos de 5% de variação) foi estabelecido durante pelo menos 5 minutos, o nervo foi colocado sobre elétrodos de platina bipolares e estimulado eletricamente (2 Hz, 10V, 1 ms, por 30 seg) e novamente 20 minutos depois. A média de fluxo da resposta do fluxo sanguíneo para estas duas estimulações foi usada para estabelecer a resposta de linha de base (tempo 0) de estimulação elétrica. O anticorpo 4901 (1 mg/kg ou 10 mg/kg), 7E9 de anticorpos (10 mg/kg), o anticorpo 8B6 (10 mg/kg), ou veículo (PBS com Tween 20 a 0,01%) foram, em seguida, administrados por via intravenosa (i.v.). O nervo foi subsequentemente estimulado (2Hz, 10V, 1 ms, for 30 segundos) em 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração do anticorpo ou veículo. Os animais foram mantidos sob anestesia por um período de cerca de três horas. Alteração cumulativa no fluxo sanguíneo da pele foi calculado pela área sob a curva de tempo de fluxo (AUC, que é igual a variação no fluxo multiplicada pela mudança no tempo) para cada fluxo de resposta a estímulos de impulsos elétricos.

[00363] Como mostrado na Figura 4A, aumento do fluxo de sangue estimuladas por aplicação de pulsos eletrônicos no nervo safeno foi significativamente inibida pela presença de anticorpo 4901 de 1 mg/kg i.v. administrado, quando a estimulação de pulso eletrônico foi aplicado em 60 min, 90 min e 120 min depois a administração

do anticorpo, e aumentar o fluxo de sangue estimuladas por aplicação de pulsos eletrônicos no nervo safeno foi significativamente inibida pela presença de anticorpo 4901 de 10 mg/kg i.v. administrado, quando a estimulação de pulso eletrônico foi aplicada em 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração do anticorpo. A Figura 4B mostra que o aumento do fluxo de sangue estimulado por aplicação de pulsos eletrônicos no nervo safeno foi significativamente inibido pela presença de anticorpo 7E9 (10 mg/kg, i.v. administrado) quando a estimulação de pulso eletrônico foi aplicado em 30 min, 60 min, 90 min, e 120 minutos após a administração do anticorpo, e pela presença de anticorpo 8B6 (10 mg/kg, i.v. administrado) quando a estimulação de pulso eletrônico foi aplicado 30 min após a administração do anticorpo.

[00364] Estes dados indicam que os anticorpos 4901, 7E9, 7D11, e 8B6 são eficazes no bloqueio da atividade de CGRP como medido por vasodilatação cutânea induzida pela estimulação do nervo safeno de camundongo.

Exemplo 4 Caracterização do anticorpo anti-CGRP de G1 e dos suas variantes

[00365] As sequências de aminoácidos para a região da cadeia leve e a região variável da cadeia pesada variável do anticorpo anti-CGRP de G1 são mostrados na Figura 5. Os seguintes métodos foram usados para expressão e caracterização de anticorpo G1 e seus variantes.

[00366] Vetores de Expressão Usados. A expressão do fragmento Fab dos anticorpos estava sob controle de um promotor LacZ indutível de IPTG semelhante ao descrito em Barbas (2001) Phage display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press pg. 2.10. Vector pComb3X), no entanto, modificações incluíram a adição e a expressão dos seguintes domínios adicionais: o domínio constante da cadeia leve de kapa humana e o domínio constante CH1 de imunoglobulina humana IgG2, a região C da cadeia de Ig da gama-2, número de acesso da proteína P01859; cadeia leve de Imunoglobulina kappa (Homo sapiens),

número de acesso da proteína CAA09181.

[00367] Pequena escala de preparação Fab. A partir de *E. coli* transformada (ou utilizando células TG1 competentes por eletroporação ou células 10 superiores quimicamente competentes) com uma biblioteca de Fab, as colônias individuais foram usadas para inocular tanto uma placa mestre (agar de LB + carbenicilina (50 ug/mL) + 2% glicose) e uma placa de trabalho (2 ml/poço, de 96 poços/placa) em que cada poço continha 1,5 ml de LB + carbenicilina (50 ug/mL) + 2% de glucose. Um gás permeável do adesivo de vedação (ABgene, Surrey, UK) foi aplicado sobre a placa. Ambas as placas foram incubadas a 30 °C durante 12-16h; a placa de trabalho foi agitada vigorosamente. A placa mestre foi armazenada a 4 °C até ser necessária, enquanto que as células a partir da placa de trabalho foram sedimentadas (4000 rpm, 4 °C, 20 min) e resuspensas em 1,0 ml de LB carbenicilina (50 ug/ml) + IPTG 0,5 mM para induzir a expressão de Fabs pela agitação vigorosa durante 5 h a 30 °C. As células induzidas foram centrifugadas a 4000 rpm, 4 °C durante 20 minutos e resuspensas em 0,6 ml de tampão de Biacore HB-SEP (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% p/p P20). Lise de células resuspensas HB-SEP foi realizada por congelamento (-80 °C) e depois de descongelar a 37°C. Os lisados celulares foram centrifugados a 4000 rpm, 4 °C durante 1 hora para separar os detritos a partir dos sobrenadantes contendo Fab, que foram filtrados, subsequentemente, 0,2 (um) utilizando Sistema de ensaio de Millipore MultiScreen de 96 Placas de Filtração de Poços e distribuidor de vácuo. BIAcore foi usado para analisar os sobrenadantes filtrados por injeção através de CGRPs no chip sensor. Clones selecionados por afinidade expressando Fabs foram resgatados a partir da placa principal, que forneceu DNA modelo para PCR, sequenciamento e preparação de plasmídeos.

[00368] Larga escala de preparação Fab. Para obter os parâmetros cinéticos, os Fabs foram expressos em uma escala maior como se segue. Frascos Erlenmeyer contendo 150 ml de LB + carbenicilina (50 ug/mL) + 2% de glucose foram inoculados

com 1 mL de um "arranque" da cultura durante a noite a partir de um clone de expressão de Fab por E. coli selecionado por afinidade. O restante da cultura iniciadora (~ 3 mL) foi usado para preparar DNA do plasmídeo (mini-prep QIAprep, kit Qiagen) para sequenciação e manipulação adicional. A grande cultura foi incubada a 30 °C com agitação vigorosa até uma OD_{600nm} de 1,0 foi atingido (tipicamente 12-16 h). As células foram sedimentadas por centrifugação a 4000 rpm, 4 °C durante 20 minutos, e resuspensas em 150 ml de LB + carbenicilina IPTG (50 ug/ml) + 0,5 mM. Após 5 h expressão a 30 °C, as células foram sedimentadas por centrifugação a 4000 rpm, 4 °C durante 20 minutos, resuspensas em 10 mL de tampão de Biacore HBS-EP, e lisadas usando uma única congelação (-80°C)/ciclo de descongelamento (37°C). Os lisados celulares foram sedimentados por centrifugação a 4000 rpm, 4 °C durante 1 hora, e o sobrenadante foi recolhido e filtrado (0,2 um). Os sobrenadantes filtrados foram carregados em Ni-NTA Superflow Sepharose (Qiagen, Valencia. CA) colunas equilibrada com PBS, pH 8, em seguida, lavada com 5 volumes de coluna de PBS, pH 8. Fabs individuais em diferentes frações eluídas com PBS (pH 8) imidazole 300 mM. As frações contendo Fabs foram reunidas e dialisadas em PBS, em seguida quantificado por ELISA antes da caracterização por afinidade.

[00369] Preparação do Anticorpo Total. Para a expressão de anticorpos completos, regiões variáveis das cadeias pesada e leve foram clonadas em vetores de expressão de mamífero e transfectadas utilizando Lipofectamina nas células HEK 293 para a expressão transitória. Os anticorpos foram purificados utilizando proteína A, utilizando métodos padrão.

[00370] Vektor pDb.CGRP.hFcGI é um vetor de expressão que compreende a cadeia pesada do anticorpo G1, e é adequado para expressão transitória ou estável da cadeia pesada. Vektor pDb.CGRP.hFcGI tem sequências de nucleotídeos que correspondem às seguintes regiões: a região de promotor de citomegalovírus murino (nucleotídeos 7-612); um íntron sintético (nucleotídeos 613-1679); região de codificação

de DHFR (nucleotídeos 688-1253); peptídeo de sinal hormônio de crescimento humano (nucleotídeos 1899-1976); cadeia pesada da região variável de G1 (nucleotídeos 1977-2621); cadeia pesada de IgG2 da região constante humana contendo as seguintes mutações: A330P331 para S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência de IgG2 do tipo selvagem; ver Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624). Vetor pDb.CGRP.hFcGI foi depositado na ATCC em 15 de julho de 2005 e foi atribuída ao No. de Acesso ATCC PTA-6867.

[00371] Vetor pEb.CGRP.hKGI é um vetor de expressão que compreende a cadeia leve do anticorpo G1, e é adequado para expressão transitória da cadeia leve. Vetor pEb.CGRP.hKGI tem sequências de nucleotídeos que correspondem às seguintes regiões: a região de promotor de citomegalovírus murino (nucleotídeos 2-613); íntron de EF-1 humano (nucleotídeos 614-1149); peptídeo de sinal hormona de crescimento humano (nucleotídeos 1160-1237); anticorpo G1 da região variável de cadeia leve (nucleotídeos 1238-1558); região constante da cadeia de kapa humano (nucleotídeos 1559-1882). Vetor pEb.CGRP.hKGI foi depositado na ATCC em 15 de julho de 2005 e foi atribuída ao No. de Acesso ATCC PTA-6866.

[00372] Ensaio de Biacore para a determinação de afinidade. Afinidades do anticorpo monoclonal de G1 e seus variantes foram determinados em ambas as 25 °C ou 37 °C utilizando o sistema de ressonância de plasmon de superfície Biacore3000™ (SPR) (BIAcore, Inc., Piscataway NJ). A afinidade foi determinada pela captura do CGPR terminalmente biotinizado de N ou fragmentos via estreptavidina pré-imobilizada (chip sensor SA) e medir a cinética de ligação do anticorpo dos fragmentos Fab ou variantes G1 titulado entre os CGRP ou fragmento no chip. Todos os ensaios foram conduzidos no tampão de execução de Biacore HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% p/p de polissorbato 20). Superfícies de CGRP foram preparadas por diluir o CGRP do biotinizado de N até uma concentração de menos do que 0,001 mg/mL em tampão HBS-EP e injetando-o através do chip sensor

SA, utilizando tempos de contato variáveis. Superfícies de baixa capacidade, correspondendo aos níveis de captura <50 unidades de resposta (RU) foram usadas para estudos de cinética de alta resolução, enquanto superfícies de alta capacidade (cerca de 800 RU de CGRP capturada) foram usadas para estudos de concentração, triagem, e determinações de solução de afinidade. Os dados cinéticos foram obtidos por diluição de anticorpo Fab de G1 em série em incrementos de duas ou três vezes a concentrações abrangendo 1 μ M-0,1 nM (que visa 0.1-10x o KD estimado). As amostras foram tipicamente injetadas por um minuto a 100 μ L/min foram permitidas e tempo de dissociação de pelo menos 10 minutos. Depois de cada ciclo de ligação, as superfícies foram regeneradas com NaOH a 25 mM em 25% p/p de etanol, que foi tolerada ao longo de centenas de ciclos. Uma série de titulação inteira (normalmente gerada em duplicado) estava apta a nível global para um modelo 1: 1 de Langmuir de ligação usando o programa BIAevaluation. Este voltou a um par único de constantes cinéticas de associação e dissociação (respectivamente, k_{on} e k_{off}) para cada interação de ligação, cuja proporção deu a constante de equilíbrio de dissociação ($KD = k_{off}/k_{on}$). Afinidades (valores KD) assim determinados estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

[00373] Análise de alta resolução de interações de ligação com taxas off extremamente lentas. Para interações com taxas off extremamente lentas (em particular, o anticorpo G1 de ligação Fab ao \square -CGRP humana no chip a 25 °C), as afinidades foram obtidas em uma experiência de duas partes. O protocolo acima descrito foi usado com as seguintes modificações. A taxa constante de associação (k_{on}) foi determinada por injeção de uma série de titulação de 2 vezes (em duplicado) que mede 550 nm-1 nM durante 30 segundos a 100 μ L/min e permitindo que apenas uma fase de dissociação de 30 seg. A taxa constante de dissociação (k_{off}) foi determinada por injeção de três concentrações (alta, média e baixa) de uma mesma série de titulação, em duplicado, durante 30 segundos e permitindo uma fase de dissociação de 2 horas. A afinidade (KD) de cada interação foi obtida combinando a valores k_{on} e k_{off} obtidos

nos dois tipos de experiências, conforme mostrado na Tabela 5.

[00374] Determinação de solução de afinidade por Biacore. A afinidade de solução de anticorpo G1 para α -CGRP camundongo e F37A (19-37) α -CGRP humano foi medida por Biacore a 37 °C. A superfície do chip CGRP de alta capacidade foi usada (o α -CGRP humano de elevada afinidade foi escolhido para fins de detecção) e tampão de execução HBS-EP foi fluído em 5 uL/min. Fragmento Fab do anticorpo G1 a uma concentração constante de 5 nM (destinado a ser igual ou inferior ao esperado KD da interação baseada em solução) foi pré-incubada com peptídeo competindo, ou α -CGRP camundongo ou F37A (19-37) α -CGRP humano, em concentrações finais abrangendo de 1 nM a 1 uM em 3 diluições em série. As soluções Fab de anticorpos G1 na ausência ou na presença do peptídeo competidor à base de solução, foram injetadas através de CGRP no chip e a depleção das respostas de ligação detectada na superfície do chip como resultado da solução de competição foi monitorizado.

[00375] Estas respostas de ligação foram convertidas em "concentrações de Fab livres", utilizando uma curva de calibração, que foi construída por titulação de anticorpo Fab G1 sozinho (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,325 e 0 nM) em todo o CGRP no chip. "Concentrações de Fab livres" foram representadas graficamente contra a concentração de peptídeo competidor baseado em solução usado para gerar cada ponto de dados e ajuste para um modelo de afinidade de solução utilizando o programa BIAevaluation. As afinidades de solução determinadas (indiretamente) desta maneira são mostradas nas Tabelas 5 e 7 e foram usadas para validar as afinidades obtidas quando Fabs são injetados diretamente através de CGRPs N-biotiniladas em um chip SA. O acordo estreito entre as afinidades determinadas por estes dois métodos confirma que titular uma versão N-biotinilada do CGRP ao chip não altera a sua atividade de ligação de solução nativa.

[00376] A Tabela 5 abaixo mostra as afinidades de ligação do anticorpo G1

ao α -CGRP humano, β -CGRP humano, α -CGRP de rato e β -CGRP de rato determinado por BIAcore, fluindo fragmentos Fab através de CGRPs N-biotiniladas em um chip SA. Para melhor resolver as afinidades de ligação de interações com offrates extremamente lento, também as afinidades foram determinadas em uma experiência de duas partes, para complementar esta orientação de ensaio, também foi determinada a afinidade da interação da solução de α -CGRP de rato (como descrito acima). O acordo estreito entre as afinidades medidas em ambas as orientações do ensaio confirma que a afinidade de ligação α -CGRP de rato nativo em solução não é alterada quando é N-biotinilada e titulada a um chip SA.

[00377] Tabela 5. Afinidades de ligação dos Fabs anticorpo G1 titulados através de CGRPs no chip

CGRP no chip	Temp. (°C)	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (nM)
α -CGRP Humana	25	1,86 x 10 ⁵	7,80 x 10 ⁻⁶	0,042 (7%, n=4)*
α -CGRP Humana	37	5,78 x 10 ⁵	3,63 x 10 ⁻⁵	0,063 (4%, n=2)*
β -CGRP Humana	37	4,51 x 10 ⁵	6,98 x 10 ⁻⁵	0,155
α -CGRP de Rato	25	5,08 x 10 ⁴	6,18 x 10 ⁻⁵	1,22 (12%, n=2)*
α -CGRP de Rato	37	1,55 x 10 ⁵	3,99 x 10 ⁻⁴	2,57* (Solução KD=10 (50%, n=4)**)
β -CGRP de Rato	37	5,16 x 10 ⁵	7,85 x 10 ⁻⁵	0,152

[00378] *Afinidades para α -CGRPs (de rato e humanas) foram determinadas em uma experiência de duas partes de alta resolução, na qual a fase de dissociação foi monitorada por 2 horas (os valores para kon, koff, and KD representam a média de n réplicas de experiências com o desvio médio expresso com uma variância percentual). Afinidades para β -CGRPs (rato e humano) foram determinadas por análise global utilizando apenas uma fase de dissociação de 20 min, o que não era suficientemente preciso para quantificar os seus extremamente offrates (seus offrates provavelmente mais lentos do que o indicado aqui e, portanto, suas afinidades são

provavelmente ainda maiores). Anticorpo G1 Fab dissociado de forma extremamente lenta a partir de todos os CGRPs (exceto α -rato CGRP) com offrates que aproximaram o limite de resolução do ensaio Biacore (especialmente a 25°C).

[00379] ** Solução de afinidade determinada medindo a diminuição das respostas de ligação detectadas pelo CGRP no chip para anticorpo G1 Fab pré-incubado com ratos baseados em soluções α -CGRP concorrentes.

[00380] A Tabela 6 abaixo mostra anticorpos possuindo a variação da sequência de aminoácidos, em comparação com o anticorpo G1 e suas afinidades quer no α -CGRP de rato quer no α -CGRP humana. Todas as substituições de aminoácidos das variantes mostradas na Tabela 6 são descritas em relação à sequência de G1. As afinidades de ligação dos fragmentos Fab foram determinadas por Biacore fazendo-os fluir através de CGRPs em um chip SA.

[00381] Tabela 6. As sequências de aminoácidos e os dados de afinidade de ligação para variantes de anticorpo G1 determinadas a 37°C por Biacore.

Clone	L1	L2	H2	HC-FW3	α -rato koff (1/s)	α -rato KD (nM)	α -humano koff (1/s)	α -humano KD (nM)
G1					<u>3,99x10⁻⁴</u>	<u>2,57</u>	<u>3,63 x10⁻⁵</u>	<u>0,063</u>
M1				A100L	1,10x10 ⁻³		1,73x10 ⁻⁴	
M2				L99A A100R	<u>2,6x10⁻³</u>	<u>58</u>	<u>3,1x10⁻⁴</u>	<u>3</u>
M3				L99A A100S	<u>2,0x10⁻³</u>	<u>61</u>	<u>2,1x10⁻⁴</u>	<u>1,7</u>
M4				L99A A100V	1,52x10 ⁻³	84,4	6,95x10 ⁻⁵	0,43
M5				L99A A100Y	7,35x10 ⁻⁴	40,8	3,22x10 ⁻⁵	0,20
M6				L99N	7,84x10 ⁻⁴	43,6	1,33x10 ⁻⁴	0,83

Clone	L1	L2	H2	HC-FW3	α -rato koff (1/s)	α -rato KD (nM)	α -humano koff (1/s)	α -hu- mano KD (nM)
M7				L99N A100C	$9,18 \times 10^{-4}$	51,0	$2,43 \times 10^{-4}$	1,52
M8				L99N A100G	$7,45 \times 10^{-4}$	41,4	$9,20 \times 10^{-5}$	0,58
M9				L99N A100Y	n.d.	n.d.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M10				L99S A100S	$1,51 \times 10^{-3}$	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 A100V	$1,94 \times 10^{-3}$	107,8	$1,01 \times 10^{-4}$	0,63
M1				L99T A100G	$1,84 \times 10^{-3}$	102,2	$1,86 \times 10^{-4}$	1,16
M14				L99T A100K	n.d.	n.d.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M15				L99T A100P	$1,15 \times 10^{-3}$	63,9	$1,58 \times 10^{-5}$	0,10
M16				L99T A100S	$9,96 \times 10^{-4}$	55,3	$1,65 \times 10^{-4}$	1,03
M17				L99T A100	$2,06 \times 10^{-3}$	114,4	$1,85 \times 10^{-4}$	1,16
M18				L99 A100G	$1,22 \times 10^{-3}$	67,8	$7,03 \times 10^{-5}$	0,44
M19				L99V A100R	n.d.	n.d.	$1,00 \times 10^{-5}$	0,06
M20	R28W			L99R A100L	$1,44 \times 10^{-3}$	80,0	$1,36 \times 10^{-4}$	0,85

Clone	L1	L2	H2	HC-FW3	α -rato koff (1/s)	α -rato KD (nM)	α -humano koff (1/s)	α -hu- mano KD (nM)
M21	R28W			L99S	<u>$6,95 \times 10^{-4}$</u>	<u>15,2</u>	<u>$1,42 \times 10^{-4}$</u>	<u>1,23</u>
M22	R28W			L99T	$1,10 \times 10^{-3}$	61,1	$1,16 \times 10^{-4}$	0,73
M23	R28G			L99T A100V	$7,99 \times 10^{-4}$	44,4	$1,30 \times 10^{-4}$	0,81
M24	R28L			L99T A100V	$1,04 \times 10^{-3}$	57,8	$1,48 \times 10^{-4}$	0,93
M25	R28N			L99T A100V	<u>$1,4 \times 10^{-3}$</u>	<u>76</u>	<u>$1,4 \times 10^{-4}$</u>	<u>1,3</u>
M26	R28N		A57G	L99T A100V	$9,24 \times 10^{-4}$	51,3	$1,48 \times 10^{-4}$	0,93
M27	R28N T30A			L99T A100V	$3,41 \times 10^{-3}$	189,4	$3,57 \times 10^{-4}$	2,23
M28	R28N T30D		E54R A57N	L99T A100V	$1,25 \times 10^{-3}$	69,4	$9,96 \times 10^{-5}$	0,62
M29	R28N T30G			L99T A100V	$3,59 \times 10^{-3}$	199,4	$3,80 \times 10^{-4}$	2,38
M30	R28N T30G		E54K A57E	L99T A100V	$6,38 \times 10^{-3}$	354,4	$5,90 \times 10^{-4}$	3,69
M31	R28N T30G		E54K A57G	L99T A100V	$3,61 \times 10^{-3}$	200,6	$3,47 \times 10^{-4}$	2,17
M32	R28N T30G		E54K A57H	L99T A100V	$2,96 \times 10^{-3}$	164,4	$2,71 \times 10^{-4}$	1,69
M33	R28N T30G		E54K A57N S58G	L99T A100V	$9,22 \times 10^{-3}$	512,2	$7,50 \times 10^{-4}$	4,69
M34	R28N T30G		E54K A57N S58T	L99T A100V	$2,17 \times 10^{-3}$	120,6	$6,46 \times 10^{-4}$	4,04

Clone	L1	L2	H2	HC-FW3	α -rato koff (1/s)	α -rato KD (nM)	α -humano koff (1/s)	α -hu- mano KD (nM)
M35	R28N T30G		E54K A57S	L99T A100V	$3,99 \times 10^{-3}$	221,7	$3,39 \times 10^{-4}$	2,12
M36	R28N T30R			L99T A100V	$4,79 \times 10^{-3}$	266,1	$2,39 \times 10^{-4}$	1,49
M37	R28N T30S		A57G	L99T A100V	$1,45 \times 10^{-3}$	80,6	$2,26 \times 10^{-4}$	1,41
M38	R28N T30W			L99T A100V	$5,11 \times 10^{-3}$	283,9	$2,18 \times 10^{-4}$	1,36
M39	R28N	G50A L56T	A57N S58Y	L99T A100V	$9,95 \times 10^{-3}$	552,8	$4,25 \times 10^{-4}$	2,66
M40	R28N	G50A L56T	E54K A57L	L99T A100V	0,36	20000,0	$1,28 \times 10^{-3}$	8,00
M41	R28N	G50A L56T	E54K A57N E64D	L99T A100V	$4,53 \times 10^{-3}$	251,7	$2,10 \times 10^{-4}$	1,31
M42	R28N	G50A L56T	E54K A57N H61F	L99T A100V	$7,52 \times 10^{-3}$	417,8	$4,17 \times 10^{-4}$	2,61
M43	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58C	L99T A100V	$4,53 \times 10^{-3}$	251,7	$2,63 \times 10^{-4}$	1,64
M44	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	<u>$6,13 \times 10^{-3}$</u>	<u>443</u>	<u>$2,10 \times 10^{-4}$</u>	<u>2,05</u>
M45	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E E64D	L99T A100V	<u>$5,58 \times 10^{-3}$</u>	<u>259</u>	<u>$2,11 \times 10^{-4}$</u>	<u>1,85</u>

Clone	L1	L2	H2	HC-FW3	α -rato koff (1/s)	α -rato KD (nM)	α -humano koff (1/s)	α -hu- mano KD (nM)
M46	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58E H61F	L99T A100V	$2,94 \times 10^{-3}$	163,3	$5,39 \times 10^{-4}$	3,37
M47	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58G	L99T A100V	$8,23 \times 10^{-3}$	457,2	$3,32 \times 10^{-4}$	2,08
M48	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58L	L99T A100V	0,0343	1905,6	$8,42 \times 10^{-4}$	5,26
M49	R28N	G50A L56T	E54K A57N S58Y H61F	L99T A100V	0,0148	822,2	$5,95 \times 10^{-4}$	3,72
M50	R28N	G50A L56T	E54K A57R	L99T A100V	$5,30 \times 10^{-3}$	294,4	$4,06 \times 10^{-4}$	2,54
M51	R28N	L56I	E54K A57G	L99T A100V	$1,18 \times 10^{-3}$	65,6	$1,31 \times 10^{-4}$	0,82
M52	R28N	L56I	E54K A57N S58A	L99T A100V	$2,29 \times 10^{-3}$	127,2	$2,81 \times 10^{-4}$	1,76
M53	R28N	L56I	E54K A57N S58G	L99T A100V	$1,91 \times 10^{-3}$	106,1	$3,74 \times 10^{-4}$	2,34
M54	R28N T30A	G50A	E54K A57N S58P	L99T A100V	$2,16 \times 10^{-3}$	120,0	$1,79 \times 10^{-3}$	11,19
M55	R28N T30A	L56S	E54K A57N	L99T A100V	$5,85 \times 10^{-3}$	325,0	$4,78 \times 10^{-4}$	2,99

Clone	L1	L2	H2	HC-FW3	α -rato koff (1/s)	α -rato KD (nM)	α -humano koff (1/s)	α -hu- mano KD (nM)
			S58E E64D					
M56	R28N T30D	L56S	E54K A57N H61F	L99T A100V	9,35x10 ⁻³	519,4	4,79x10 ⁻⁴	2,99
M57	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	<u>0,0104</u>	<u>1,200</u>	<u>3,22x10⁻⁴</u>	<u>3,08</u>
M58	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58I H61F	L99T A100V	Nenhuma ligação	n.d.	1,95x10 ⁻³	12,19
M59	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58N H61F	L99T A100V	0,0123	683,3	5,24x10 ⁻⁴	3,28
M60	R28N T30D	L56S	E54K A57N S58R H61F	L99T A100V	0,0272	1511,1	9,11x10 ⁻⁴	5,69
M61	R28N T30G	A51H	E54Q A57N H61F	L99T A100V	5,21x10 ⁻³	289,4	4,59x10 ⁻⁴	2,87
M62	R28N T30G	A51H L56T	E54K A57N S58E	L99T A100V	<u>5,75x10⁻³</u>	<u>242</u>	<u>5,57x10⁻⁴</u>	<u>5,86</u>
M63	R28N T30G	G50A	E54K A57N	L99T A100V	2,65x10 ⁻³	147,2	1,50x10 ⁻³	9,38

Clone	L1	L2	H2	HC-FW3	α -rato koff (1/s)	α -rato KD (nM)	α -humano koff (1/s)	α -hu- mano KD (nM)
			S58T					
M64	R28N T30G	G50A	E54K A57N S58V	L99T A100V	0,0234	1300,0	$1,32 \times 10^{-3}$	8,25
M65	R28N T30G	G50A L56I	E54K A57C	L99T A100V	$4,07 \times 10^{-3}$	226,1	$8,03 \times 10^{-4}$	5,02
M66	R28N T30G	L56I	E54K A57E	L99T A100V	$5,11 \times 10^{-3}$	283,9	$5,20 \times 10^{-4}$	3,25
M67	R28N T30G	L56I	E54K A57F	L99T A100V	$1,71 \times 10^{-3}$	95,0	$8,20 \times 10^{-4}$	5,13
M68	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58D E64D	L99T A100V	$6,76 \times 10^{-3}$	375,6	$4,28 \times 10^{-4}$	2,68
M69	R28N T30G	L56I	E54K A57N S58E	L99T A100V	$1,81 \times 10^{-3}$	100,6	$7,33 \times 10^{-4}$	4,58
M70	R28N T30G	L56I	E54K A57S	L99T A100V	$6,07 \times 10^{-3}$	337,2	$5,59 \times 10^{-4}$	3,49
M71	R28N T30G	L56I	E54K A57Y	L99T A100V	$2,12 \times 10^{-3}$	117,8	$1,28 \times 10^{-3}$	8,00
M72	R28N T30G	L56S	E54K	L99T A100V	$3,95 \times 10^{-3}$	219,4	$4,00 \times 10^{-4}$	2,50
M73	R28N T30G	L56S	E54K A57N S58Y E64D	L99T A100V	$3,00 \times 10^{-3}$	166,7	$2,55 \times 10^{-4}$	1,59
M74	R28N	L56S	E54K	L99T	$6,03 \times 10^{-3}$	335,0	$5,97 \times 10^{-4}$	3,73

Clone	L1	L2	H2	HC-FW3	α -rato koff (1/s)	α -rato KD (nM)	α -humano koff (1/s)	α -hu- mano KD (nM)
	T30G		A57S	A100V				
M75	R28N T30G	L56S	E54K A57V	L99T A100V	1,87x10 ⁻²	1038,9	1,16x10 ⁻³	7,25
M76	R28N T30S	G50A L56T	A57G	L99T A100V	1,16x10 ⁻³	64,4	3,64x10 ⁻⁴	2,28
M77	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57D	L99T A100V	0,0143	794,4	4,77x10 ⁻⁴	2,98
M78	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57N S58T	L99T A100V	0,167	9277,8	1,31x10 ⁻³	8,19
M79	R28N T30S	G50A L56T	E54K A57P	L99T A100V	0,19	10555,6	1,29x10 ⁻³	8,06
M80	R28N T30S	L56I	E54K A57N S58V	L99T A100V	0,0993	5516,7	2,09x10 ⁻³	13,06
M81	R28N T30S	L56S	E54K A57N S58E	L99T A100V	4,29x10 ⁻³	238,3	4,90x10 ⁻⁴	3,06
M82	R28N T30V	A51H L56T	A57N	L99T A100V	6,99x10 ⁻³	388,3	8,77x10 ⁻⁴	5,48
M83	R28N T30V	A51H L56T	E54K A57N S5M H61F	L99T A100V	Nenhuma ligação	n.d.	9,33x10 ⁻⁴	5,83
M84	R28N T30V	A51H L56T	E54N A57N	L99T A100V	1,76x10 ⁻²	977,8	1,08x10 ⁻³	6,75

[00382] Todas as CDRs incluindo tanto CDRs Kabat e Chothia. Os resíduos de aminoácidos são numerados sequencialmente (ver Figura 5). Todos os clones têm

sequências L3+H1+H3 idênticas ao G1.

[00383] $KD = k_{off}/k_{on}$. Todos os valores k_{off} foram determinados em um modo de triagem, exceto aquelas que são sublinhados, que foram obtidos por análise global de uma série de concentração Fab (G1 foi analisado em um modo de alta resolução). Os valores sublinhados KD foram, por conseguinte, determinados experimentalmente através da medição k_{on} . Outros valores k_{on} foram estimados como sendo o mesmo como M25.

[00384] nd = não determinado

[00385] Para determinar o epítipo em α -CGRP humano que é reconhecido pelo anticorpo G1, foram usados ensaios Biacore descritos acima. α -CGRP humana foi comprada como uma versão N-biotinilada para permitir a sua captura de alta afinidade através de chips sensores SA. A ligação do fragmento Fab G1 para a α -CGRP humana no chip na ausência ou na presença de um peptídeo CGRP foi determinada. Tipicamente, uma solução peptídeo/Fab 2000:1 mol (por exemplo, 10 μ M de peptídeo em 50 nM G1 Fab) foi injetada através de α -CGRP humana no chip. A Figura 6 mostra a percentagem de ligação bloqueada por peptídeo concorrente. Os dados apresentados na Figura 6 indicam que os peptídeos que bloqueiam a ligação 100% de Fab G1 a α -CGRP humana são 1-37 (WT), 8-37, 26-37, P29A (19-37), K35A (19-37), K35E (19-37), e K35M (19-37) da α -CGRP humana; 1-37 de β -CGRP (WT); 1-37 α -CGRP de rato (WT); e 1-37 β -CGRP de rato (WT). Todos estes peptídeos estão amidados na extremidade C-terminal. Peptídeos F37a (19-37) e (19-37 este último não amidados no C-terminal) de α -CGRP humana também bloquearam cerca de 80% a 90% da ligação de G1 Fab a α -CGRP humana. Peptídeo 1-36 (não amidados no C-terminal) de α -CGRP humana bloqueou cerca de 40% da ligação de Fab G1 a α -CGRP humana. Fragmento de peptídeo 19-36 (amidados no C-terminal) de α -CGRP humana; fragmentos de peptídeos 1-13 e 1-19 de α -CGRP humana (nenhum dos quais estão amidados no C-terminal); e amilina humana, calcitonina e adrenomedulina (todos

amidado no C-terminal) não competiu com a ligação de Fab G1 a α -CGRP humana no chip. Estes dados demonstram que G1 tem como alvo um epítipo C-terminal de CGRP e que tanto a identidade do resíduo mais terminal (F37) e a sua amidação é importante para a ligação.

[00386] As afinidades de ligação de Fab G1 para variantes de α -CGRP humana (a 37°C) foi também determinada. A Tabela 7 abaixo mostra as afinidades como medidas diretamente por titulação de G1 Fab entre α -CGRP humana N-biotinilada e variantes no chip. Os dados da Tabela 7 indicam que anticorpo G1 se liga a um epítipo C-terminal com F37 e G33 sendo os resíduos mais importantes. O G1 não se liga a CGRP quando um resíduo de aminoácido adicional (alanina) é adicionado no C-terminal (o qual é amidado).

[00387] Tabela 7. As afinidades de ligação de Fab G1 a α -CGRP humana e variantes medidas a 37°C (ver Tabela 4 para as suas sequências de aminoácidos)

CGRP no chip	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (nM)
1-37 (WT)	4,68x10 ⁵	7,63x10 ⁻⁵	0,16 (alta resolução KD = 0,06)
19-37	4,60x10 ⁵	7,30x10 ⁻⁵	0,16
25-37	3,10x10 ⁵	8,80x10 ⁻⁵	0,28
F27A (25-37)	3,25x10 ⁵	1,24x10 ⁻⁴	0,38
V28A (25-37)	3,32x10 ⁵	9,38x10 ⁻⁵	0,28
P29A (25-37)	2,26x10 ⁵	1,78x10 ⁻⁴	0,79
T30A (25-37)	1,79x10 ⁵	8,41x10 ⁻⁵	0,47
N31A (25-37)	2,17x10 ⁵	1,14x10 ⁻⁴	0,53
V32A (25-37)	2,02x10 ⁵	3,46x10 ⁻⁴	1,71
G33A (25-37)	2,07x10 ⁵	0,0291	141
S34A (25-37)	2,51x10 ⁵	7,64x10 ⁻⁴	3,04
K35A (19-37)	2,23x10 ⁵	2,97x10 ⁻⁴	1,33
K35E (19-37)	5,95x10 ⁴	5,79x10 ⁻⁴	9,73
K35M (19-37)	2,63x10 ⁵	1,34x10 ⁻⁴	0,51
K35Q (19-37)	1,95x10 ⁵	2,70x10 ⁻⁴	1,38

CGRP no chip	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (nM)
F37A (25-37)	8,90x10 ⁴	8,48x10 ⁻³	95 (solução KD = 172 nM)
38A (25-38A)	-	-	Nenhuma ligação detectada

[00388] Os dados acima indicam que o epítopo que o anticorpo G1 liga está na extremidade C-terminal de α -CGRP humana, e os aminoácidos 33 e 37 na α -CGRP humana são importantes para a ligação do anticorpo G1. Além disso, a amidação do resíduo F37 é importante para a ligação.

Exemplo 5: Efeito de anticorpo G1 anti-CGRP antagonista em vasodilatação cutânea induzida pela estimulação do nervo safeno de rato

[00389] Para testar a atividade antagonista de anticorpo G1 anti-CGRP, efeito do anticorpo sobre a vasodilatação cutânea pela estimulação do nervo safeno de rato foi testada utilizando um modelo de rato descrito no Exemplo 3. Resumidamente, os ratos foram mantidos a anestesia com isoflurano a 2%. Tosilato de bretílio (30 mg/kg, administrada IV) foi dada no início da experiência para minimizar vasoconstrição devida à estimulação concomitante das fibras simpáticas do nervo safeno. A temperatura corporal foi mantida a 37°C pelo uso de uma sonda retal termostaticamente ligada a um cobertor de aquecimento de temperatura controlada. O nervo safeno do membro posterior direito foi exposto cirurgicamente, cortado proximalmente e coberto com filme plástico para evitar a secagem. Uma sonda de laser Doppler foi colocado sobre o lado médio-dorsal da pele da pata traseira, que é a região inervada pelo nervo safeno. Fluxo sanguíneo da pele, medido como fluxo de células sanguíneas, foi monitorado com um medidor laser de fluxo Doppler. Em experiências para determinar os efeitos de anticorpo dentro de duas horas após a injeção de trinta a quarenta e cinco minutos após a injeção de bretílio tosilato, quando um fluxo de linha de base estável (menos de 5% de variação) foi estabelecido durante pelo menos 5 minutos, o nervo foi colocado sobre elétrodos de platina bipolares e estimulado eletricamente (2 Hz, 10V, 1 ms, por 30 seg) e novamente 20 minutos depois. A média de fluxo da resposta do fluxo sanguíneo para estas duas estimulações foi usada para estabelecer a

resposta de linha de base (tempo 0) de estimulação elétrica. Anticorpo G1 (1 mg/kg ou 10 mg/kg) ou veículo (PBS com 0,01% de Tween 20 de volume igual a 10 mg/kg G1) foram, em seguida, administrados por via intravenosa (IV). O nervo foi subsequentemente estimulado (2Hz, 10V, 1 ms, for 30 segundos) em 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração do anticorpo. Os animais foram mantidos sob anestesia por um período de cerca de três horas. Alteração cumulativa no fluxo sanguíneo da pele foi calculado pela área sob a curva de tempo de fluxo (AUC, que é igual a variação no fluxo multiplicada pela mudança no tempo) para cada fluxo de resposta a estímulos de impulsos elétricos.

[00390] Como mostrado na Figura 7, o aumento de fluxo de sangue estimulado por aplicação de impulsos eletrônicos no nervo safeno foi significativamente inibido pela presença de anticorpo G1 a 1 mg/kg (administrado IV), em comparação com o veículo, quando o nervo safeno foi eletricamente estimulado a 90 min após a administração do anticorpo. Aumento de fluxo de sangue estimulado por aplicação de impulsos eletrônicos no nervo safeno foi significativamente inibido pela presença do anticorpo G1 a 10 mg/kg (administrado IV), em comparação com o veículo, quando o nervo safeno foi estimulado eletricamente aos 90 minutos e 120 minutos após administração do anticorpo.

[00391] Em experiências para determinar os efeitos dos anticorpos em pontos de tempo mais longos no ensaio de safena, ratos foram injetados IV com as doses indicadas de anticorpo de 24 horas ou 7 dias antes de preparar o animal para a estimulação do nervo safeno como descrito acima. Nestas experiências foi possível estabelecer uma linha de base de resposta em ratos individuais para estimulação por pulsos elétricos antes da dosagem, os grupos assim tratados foram comparados com animais tratados com veículo (PBS, 0,01% Tween 20) em 24 horas ou 7 dias.

[00392] Como mostrado nas Figuras 8A e 8B aumenta o fluxo de sangue na pele da pata traseira dorso-medial evocada pela estimulação do nervo safeno foram

significativamente inibidos nos grupos de animais doseados com 10 mg/kg ou 3 mg/kg G1 em qualquer das 24 horas ou 7 dias antes da estimulação, em comparação com os grupos doseados com veículo nos mesmos pontos de tempo.

[00393] A figura 8C representa uma análise de ajuste de curva aplicada aos dados de resposta de dose representada nas figuras 8A e 8B para determinar a dose necessária para 50% de efeito máximo (EC50). O EC50 24 horas é 1,3 mg/kg e o EC50 em 7 dias é ligeiramente mais baixo (0,8 mg/kg).

Exemplo 6: Efeito agudo de ensaio do anticorpo antagonista anti-CGRP mu7E9 em uma artéria dural (janela craniana fechada)

[00394] Modelo de Janela Craniana Fechada: O objetivo desta experiência foi determinar o efeito agudo de anticorpos antagonista anti-CGRP e compará-lo com o efeito agudo do antagonista do receptor de CGRP BIBN4096BS. As experiências foram realizadas como anteriormente descrito (Williamson et al., Cephalalgia 17(4):518-24 (1997)) com as seguintes modificações. Ratos Sprague Dawley (300-400g) foram anestesiadas com 70 mg/kg de pentobarbital de IP. A anestesia foi mantida com pentobarbital 20 mg/kg/hora IV. Os ratos foram canulados na veia jugular para a administração de todos os medicamentos. A pressão arterial foi monitorada com uma sonda (cateter mikro-tip, Millar Instruments) enfiada através da artéria femoral para a aorta abdominal. Os ratos foram traqueostomizados e frequência respiratória foi mantida a 75 respirações por minuto em um volume de 3,5 ml. Após a fixação da cabeça de um instrumento estereotáxico e a remoção do couro cabeludo, uma janela 2x6mm na zona parietal esquerda apenas lateralmente à sutura sagital foi feita diluindo o osso com uma broca de dentista. Utilizando um micromanipulador, um eletrodo de platina bipolar foi reduzido sobre a superfície e coberta com óleo mineral pesado. Lateralmente à janela do eletrodo de uma outra janela de milímetro 5x6 foi criado e preenchido com óleo mineral pesado, através do qual o diâmetro de um ramo da artéria meníngea média (MMA) foi monitorada continuamente com uma câmara

CCD e um analisador de dimensão de vídeo (Living Systems). Os ratos foram descansados por não menos de 45 minutos após a preparação. Uma resposta de linha de base para a estimulação elétrica foi estabelecida (15 V, 10 hz, 0,5 ms pulses, 30 segundos) e, em seguida, os ratos foram doseados IV com o composto experimental (10 mg/kg mu7E9, 300 µg/kg BIBN4096BS ou PBS 0,01% de Tween 20). Estimulações elétricas adicionais foram feitas em 5 (BIBN4096BS), 30, 60, 90 e 120 minutos após a dosagem. Todos os dados foram gravados utilizando programa gráfico (ADInstruments).

[00395] Como mostrado na Figura 9 mu7E9 a 10 mg/kg bloqueia dilatação MMA significativamente evocada por estimulação do campo elétrico dentro de 60 minutos após a dosagem e mantém o efeito em toda a duração do ensaio (120 minutos). Para efeitos de comparação BIBN4096BS bloqueia dilatação MMA dentro de 5 minutos após a administração, mas o efeito desapareceu completamente em 90 minutos. A magnitude do bloqueio é comparável entre BIBN4096BS e mu7E9.

Exemplo 7: Efeito crônico de ensaio do anticorpo antagonista anti-CGRP G1 em uma artéria dural (janela craniana fechada)

[00396] O objetivo desta experiência foi determinar se o anticorpo anti CGRP ainda poderia bloquear dilatação MMA estimulada eletricamente 7 dias após a dosagem. Preparação dos ratos foi idêntica a da experiência aguda descrita acima (Exemplo 6) com as seguintes exceções. Os ratos foram injetados por via IV (10mg/kg, 3mg/kg ou 1mg/kg G1) 7 dias antes da criação da preparação e estimulação da janela craniana fechada. Foi impossível estabelecer uma resposta de dilatação linha de base para estimulação elétrica antes da dosagem como na experiência aguda de modo que os grupos de anticorpo foram comparados com grupo de controle doseado de dilatação do MMA em um veículo (PBS, 0,01% de Tween 20). Depois que os ratos foram deixados em repouso durante não menos do que 45 minutos, a dura-máter foi eletricamente estimulada em intervalos de 30 minutos. As estimulações foram em pulsos

de 2,5V, 5V, 10V, 15V e 20V, todos a 10 Hz, 0,5 ms de 30 segundos.

[00397] Como mostrado na Figura 10 G1 a 10 mg/kg e 3 mg/kg bloquearam significativamente dilatação MMA evocados por estimulação elétrica na gama de 10 a 20 volts. Estes dados demonstram que G1 pode bloquear dilatação MMA eletricamente estimulada até 7 dias após a dosagem.

Exemplo 8: Modelo de retirada de morfina de ondas de calor

[00398] O modelo de retirada de morfina de rato é um modelo de roedor estabelecido para mecanismos de ondas de calor na menopausa (Sipe et al, Brain Res 1028 (2): 191-202 (2004); Merchenthaler et al, Maturitas 30: 307-316 (1998); Katovich et al., Brain Res. 494: 85-94 (1989); . Simpkins et al, Life Sciences 32: 1957-1966 (1983)). Basicamente, os ratos são viciados em morfina através da implantação de grânulos de morfina sob a pele. Após a dependência, os animais são injetados com naloxona (antagonista opiáceo), que os envia para a retirada imediatamente. Esta retirada é acompanhada por um aumento da temperatura da pele, uma diminuição da temperatura corporal central, um aumento do ritmo cardíaco e um aumento no soro de hormônio luteinizante. Estes são todos semelhantes em magnitude e velocidade do que ocorre nas ondas de calor humanas (Simpkins et al, Life Sciences 32: 1957-1966 (1983)). Além disso, quando os ratos são tratados com estradiol antes da indução de retirada, os sintomas de ondas de calor são reduzidos (Merchenthaler et al, Maturitas 30: 307-316 (1998)). É por isso que acredita-se que o modelo de retirada da morfina imita ondas de calor clínicas.

[00399] Ratas ovariectomizadas foram pedidas de Charles River Laboratories. Não inferior a 7 dias após a ovariectomia dependência de morfina foi criada através da implantação de uma pastilha de morfina (75 mg de base de morfina) por via subcutânea. Dois dias mais tarde foram implantados mais 2 grânulos. No dia seguinte ratos foram injetados intravenosamente com 10 mg/kg 4901 [**] ou veículo (PBS, 0,01% Tween). Dois dias após a segunda granulação os ratos foram anestesiados

com cetamina (90 mg/kg) e ligeiramente restringidos. Uma temperatura de superfície termopar foi colada na base da cauda e um termopar retal é usado para medir a temperatura central. Os dados foram gravados utilizando software gráfico (ADInstruments). Depois da gravação de 15 minutos de temperatura de linha de base estável, naloxona (1 mg/kg) foi injetado por via subcutânea. A temperatura foi registrada continuamente durante os próximos 60 minutos. Os resultados são mostrados nas Figuras 11A e 11B.

Exemplo 9: Tratamento Da Enxaqueca Crônica

[00400] Um indivíduo humano do sexo masculino de 45 anos é identificado como tendo tido enxaqueca crônica por pelo menos três meses. Identificação de ter tido enxaqueca crônica é conseguida por observação de uma história de dores de cabeça frequentes sugestivas de enxaqueca crônica (por exemplo, 15 dias por mês) durante pelo menos três meses anteriores à triagem. Verificação de frequência de dor de cabeça é conseguida através de informações de linha de base de dores de cabeça prospectivamente coletadas em pelo menos, 15 dias, com pelo menos 8 dias por mês cumprindo qualquer uma das seguintes opções: i. qualificar-se como sendo um ataque de enxaqueca; e/ou ii. precedida ou acompanhada de aura de enxaqueca.

[00401] A fim de reduzir a incidência de enxaqueca no indivíduo, o indivíduo é administrado com uma dose de 225 mg de anticorpo anti-CGRP antagonista (por exemplo, anticorpo G1). O anticorpo antagonista anti-CGRP é fornecido como uma formulação líquida a uma concentração de 150 mg/mL. A dose de 225 mg é administrada como uma injeção subcutânea de 1,5 mL na parte traseira de uma parte superior do braço do corpo do indivíduo. Alternativamente, a dose pode ser fornecida para o indivíduo através de infusão intravenosa. Em tais casos, 5,85 mL de 150 mg/mL de anticorpo-CGRP pode ser combinado com 0,9% de Solução de Cloreto De Sódio (solução salina normal) em uma bolsa de IV para um volume total de 130 mL na bolsa. 100 mL do volume do saco IV é infundido intravenosamente ao indivíduo ao longo de

uma hora, para uma dose total de 225 mg. A dosagem é repetida a cada vinte e oito dias até se observar uma redução da incidência de enxaqueca. Uma redução na incidência de enxaqueca crônica é examinada utilizando uma variedade de critérios que incluem o número de dias de dor de cabeça, o número de horas durante as quais ocorre dores de cabeça (por exemplo, horas de dor de cabeça), a gravidade das dores de cabeça, e o número de dias de enxaqueca observada no indivíduo.

Exemplo 10: Tratamento Da Enxaqueca Crônica

[00402] Um indivíduo humano do sexo feminino de 37 anos é identificado como tendo tido enxaqueca crônica por pelo menos três meses. Identificação de ter tido enxaqueca crônica é conseguida por observação de uma história de dores de cabeça frequentes sugestivas de enxaqueca crônica (por exemplo, 15 dias por mês) durante pelo menos três meses anteriores à triagem. Verificação de frequência de dor de cabeça é conseguida através de informações de linha de base de dores de cabeça prospectivamente coletadas em pelo menos, 15 dias, com pelo menos 8 dias por mês cumprindo qualquer uma das seguintes opções: i. qualificar-se como sendo um ataque de enxaqueca; e/ou ii. precedida ou acompanhada de aura de enxaqueca.

[00403] A fim de reduzir a incidência de enxaqueca no indivíduo, o indivíduo é administrado com uma dose de carga inicial de 675 mg de anticorpo anti-CGRP antagonista (por exemplo, anticorpo G1). O anticorpo antagonista anti-CGRP é fornecido como uma formulação líquida a uma concentração de 150 mg/mL. A dose de carga de 675 mg é administrada como três injeções de 225 mg subcutâneas de 1,5 ml a várias regiões (por exemplo, parte de trás da parte superior dos braços, abdômen inferior/barriga/cintura, frente das coxas, etc.) do corpo do indivíduo. A dosagem é repetida a cada vinte e oito dias a 225 mg (por exemplo, através de uma injeção subcutânea de 1,5 mL no braço do indivíduo) até se observar uma redução da incidência de enxaqueca. Uma redução na incidência de enxaqueca crônica é examinada utilizando uma variedade de critérios que incluem o número de dias de dor de cabeça, o

número de horas durante as quais ocorre dores de cabeça (por exemplo, horas de dor de cabeça), a gravidade das dores de cabeça, e o número de dias de enxaqueca observada no indivíduo.

Exemplo 11: Tratamento Da Enxaqueca Crônica

[00404] Um indivíduo humano do sexo masculino de 23 anos é identificado como tendo tido enxaqueca crônica por pelo menos três meses. Identificação de ter tido enxaqueca crônica é conseguida por observação de uma história de dores de cabeça frequentes sugestivas de enxaqueca crônica (por exemplo, 15 dias por mês) durante pelo menos três meses anteriores à triagem. Verificação de frequência de dor de cabeça é conseguida através de informações de linha de base de dores de cabeça prospectivamente coletadas em pelo menos, 15 dias, com pelo menos 8 dias por mês cumprindo qualquer UMA das seguintes opções: i. qualificar-se como sendo um ataque de enxaqueca; e/ou ii. precedida ou acompanhada de aura de enxaqueca.

[00405] A fim de reduzir a incidência de enxaqueca no indivíduo, o indivíduo é administrado com uma dose de 900 mg de anticorpo anti-CGRP antagonista (por exemplo, anticorpo G1). O anticorpo antagonista anti-CGRP é fornecido como uma formulação líquida a uma concentração de 150 mg/mL. A dose de 900 mg é administrada como quatro injeções subcutâneas 225 mg de 1,5 mL a várias regiões (por exemplo, parte de trás da parte superior do braço, abdome inferior/barriga/cintura, frente das coxas, etc) do corpo do indivíduo. A dosagem é repetida a cada vinte e oito dias até se observar uma redução da incidência de enxaqueca. Uma redução na incidência de enxaqueca crônica é examinada utilizando uma variedade de critérios que incluem o número de dias de dor de cabeça, o número de horas durante as quais ocorre dores de cabeça (por exemplo, horas de dor de cabeça), a gravidade das dores de cabeça, e o número de dias de enxaqueca observada no indivíduo.

Exemplo 12: Tratamento de Enxaqueca Episódica

[00406] Um indivíduo humano do sexo masculino de 28 anos de idade é

identificado como tendo tido enxaqueca episódica em alta frequência. Indivíduos são identificados como tendo enxaqueca episódica em alta frequência utilizando critérios que incluem: ter uma história de dores de cabeça em mais de 8 dias por mês por pelo menos 3 meses antes de triagem; e verificação da frequência de dor de cabeça através de informação de base coletadas prospectivamente demonstrar dores de cabeça (de qualquer tipo), de 8 a 14 dias, com pelo menos 8 dias, preenchendo os critérios para, pelo menos, um dos seguintes: i. enxaqueca; II. enxaqueca provável; e/ou iii. uso de compostos de triptano ou ergotamina.

[00407] A fim de reduzir a incidência de enxaqueca no indivíduo, o indivíduo é administrado com uma dose de 675 mg de anticorpo anti-CGRP antagonista (por exemplo, anticorpo G1). O anticorpo antagonista anti-CGRP é fornecido como uma formulação líquida a uma concentração de 150 mg/mL. A dose de 675 mg é administrada como três injeções subcutâneas de 225 mg de 1,5 mL a várias regiões (por exemplo, parte de trás da parte superior do braço, abdome inferior/barriga/cintura, frente das coxas, Etc) do corpo do indivíduo. A dosagem é repetida a cada vinte e oito dias até se observar uma redução da incidência de enxaqueca. Uma redução na incidência de enxaqueca episódica é examinada utilizando uma variedade de critérios que incluem o número de dias de dor de cabeça, o número de horas durante as quais ocorre dores de cabeça (por exemplo, horas de dor de cabeça), a gravidade das dores de cabeça, e o número de dias de enxaqueca observada no indivíduo.

Exemplo 13: Tratamento de Enxaqueca Episódica

[00408] Um indivíduo humano do sexo feminino de 52 anos é identificado como tendo tido enxaqueca episódica em alta frequência. Indivíduos são identificados como tendo enxaqueca episódica em alta frequência utilizando critérios que incluem: ter uma história de dores de cabeça em mais de 8 dias por mês por pelo menos 3 meses antes de triagem; e verificação da frequência de dor de cabeça através de informação de base coletadas prospectivamente demonstrar dores de cabeça (de

qualquer tipo), de 8 a 14 dias, com pelo menos 8 dias, preenchendo os critérios para, pelo menos, um dos seguintes: i. enxaqueca; II. enxaqueca provável; e/ou iii. uso de compostos de triptano ou ergotamina.

[00409] A fim de reduzir a incidência de enxaqueca no indivíduo, o indivíduo é administrado com uma dose de 225 mg de anticorpo anti-CGRP antagonista (por exemplo, anticorpo G1). O anticorpo antagonista anti-CGRP é fornecido como uma formulação líquida a uma concentração de 150 mg/mL. A dose de 225 mg é administrada como uma injeção subcutânea de 1,5 mL na parte traseira de uma parte superior do braço do corpo do indivíduo. A dosagem é repetida a cada vinte e oito dias até se observar uma redução da incidência de enxaqueca. Uma redução na incidência de enxaqueca episódica é examinada utilizando uma variedade de observações que incluem o número de dias de dor de cabeça, o número de horas durante as quais ocorrem dores de cabeça, a gravidade das dores de cabeça, e o número de dias de enxaqueca no indivíduo.

Exemplo 14: Toxicologia Não Clínica e Farmacocinética

[00410] Anti-CGRP G1 anticorpo antagonista foi bem tolerado em estudos de toxicidade de 1 mês-IV de doses repetidas em ratos Sprague-Dawley (SD) e macacos cynomolgus e nenhuma toxicidade do órgão alvo foi determinada em qualquer um destes estudos. Nenhum nível de evento adverso observado (NOAEL) de 100 mg/kg/semana foi estabelecido para ambos os estudos com ratos e macacos. Este nível de dose correspondeu a exposição sistêmica, com uma concentração máxima (C_{max}) de 2570 e 3440 µg/mL e as áreas sob a curva (AUC (0-168h)) de 194000 µg·h/mL e 299000 µg·h/mL (Dia 22) em ratos e macacos, respectivamente.

[00411] Em um estudo com ratos IV/SC de 3 meses, não foram identificados quaisquer toxicidades de órgãos-alvo e G1 foi bem tolerado até à dose mais elevada testada, 300 mg/kg. Em um estudo em macacos de três meses, observou-se inflamação perivascular da artéria ciliar, como resultado da deposição de complexos imunes

a ≥ 100 mg/kg. Esta descoberta foi atribuída a resposta imunogênica do macaco para um anticorpo humanizado e não foi considerada como sendo clinicamente relevante. A dose mais elevada testada de 300 mg/kg no presente estudo em macacos são pelo menos 10 vezes maior do que a maior dose clínica antecipada de 2000 mg ou 29 mg/kg em uma base de mg/kg (assumindo um peso médio indivíduo de 70 kg).

Exemplo 15: Farmacocinética Clínica

[00412] O PK de anticorpo G1 após exposição única IV foi examinado em quatro estudos randomizados e controlados por placebo duplo-cegos examinando doses entre 10 e 2,000 mg. As concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) foram alcançadas logo após o final da infusão intravenosa de 1 hora. O tempo médio para C_{max} (T_{max}) variou de 1,0 a 3,0 horas, seguido por um declínio multifásico. C_{max} e a exposição total aumentou de forma quase linear com doses crescentes de G1. Meia-vida terminal (t_{1/2}) variou de 36,4 a 48,3 dias. Não há evidência de metabolismo G1 no fígado, o modo primário do metabolismo é por degradação proteossômica.

[00413] Um estudo definiu a farmacocinética de 30 mg e 300 mg doses administradas duas vezes, duas semanas de intervalo. As concentrações máximas e a área sob o perfil temporal de concentração aumentou com o aumento da dose. A meia-vida terminal aparente (t_{1/2}) após a segunda dose foi de 41,2 dias (30 mg) e 50,0 dias (300 mg) (média aritmética). As taxas de acumulação de plasma de G1 após duas doses administradas IV a 15 dias de intervalo, foram 1,5 (30 mg) e 1,4 (300 mg).

Exemplo 16: Segurança Clínica e Farmacocinética

[00414] Em seis estudos, anticorpo G1 foi administrado a 118 homens e mulheres saudáveis, enquanto 57 indivíduos do sexo masculino e feminino receberam placebo. O estudo incluiu doses IV individuais que variam de 0,2 mg até 2,000 mg, duas doses IV de até 300 mg administradas uma vez a cada 14 dias, e administração SC de 225 e 900 mg. Os seis estudos incluídos: dois estudos de dose única IV escalada de PK e farmacodinâmica (PD) em homens saudáveis (estudos B0141001 e

B0141002); um estudo cross-over de coorte duplo controlado por placebo para examinar os efeitos agudos da administração IV de anticorpo G1 sobre a resposta de dilatação por capsaicina em voluntários saudáveis (B0141006); um estudo de dose de grupo paralelo repetida de anticorpo G1 em masculinos saudáveis e voluntários do sexo feminino (B0141007); um estudo de dose única avaliando a segurança e tolerabilidade de doses até 2,000 mg administrados IV a voluntários femininos saudáveis (B0141008), e um estudo comparando a relativa segurança e biodisponibilidade entre administração IV e SC (G1-SC-IV).

[00415] Os seis estudos estão resumidos a seguir na Tabela 11. Dos cinco estudos IV (B0141001, B0141002, B0141006, B0141007 e B0141008), três tiveram projetos e avaliações praticamente idênticas. Estudo B014100 testou doses de 0,2 mg, 1 mg e 3 mg dados como uma única infusão IV de uma hora. O estudo teve um projeto paralelo. Os participantes foram confinados na clínica durante sete dias após a infusão, com múltiplas avaliações sobre cada um desses dias. Após a alta, os pacientes foram reavaliados uma semana após descarga (dia14), e, em seguida, um, dois e três meses após a infusão. Estudo B0141002 testou doses variando de 10 mg a 1000 mg como uma única administração. Finalmente, Estudo B0141008 testou doses de 300 mg, 1000 mg, 1500 mg ou 2000 mg. Estudo B0141006 era diferente dos outros, uma vez que também tem como objetivo integrar leituras farmacodinâmicas através da medição da inibição da dilatação por capsaicina até uma semana após a infusão IV do anticorpo G1.

[00416] Para os estudos IV, eventos adversos (EAs) perfis foram relatados apenas para o primeiro período dosado. Estudo B0141007 testou várias doses de anticorpo G1 em 30 ou 300 mg IV dada duas semanas de intervalo, utilizando um projeto paralelo. Cada indivíduo elegível foi atribuída uma sequência de randomização através de um sistema interativo baseado na Web que continha a designação do tratamento. O esquema de randomização foi desenvolvido pelo estatístico principal. Os

participantes em todos os estudos eram homens geralmente saudáveis e mulheres (de 18 a 65 anos de idade); todos os participantes assinaram termo de consentimento informado. Todos os estudos foram aprovados pelos conselhos de investigação (IRBs). AEs foram definidos como qualquer ocorrência médica desfavorável, em participantes de estudos clínicos, com ou sem relação causal com o fármaco do estudo. AEs observados após a administração do fármaco em estudo ou placebo foram denominados "emergente do tratamento" AE (TEAEs) independentemente do potencial de causalidade com o fármaco do estudo. Todos os indivíduos que experimentam TEAEs foram seguidos em intervalos de tempo apropriados até que o evento tivesse resolvido ou até que o evento tivesse estabilizado e/ou chegaram a uma nova linha de base. Todas os TEAEs foram classificados como sendo leve, moderada ou grave. AEs graves (EAG) foram definidos a priori como qualquer ocorrência médica desfavorável, que em qualquer dose resultou em morte, foi uma ameaça à vida (ou seja, o indivíduo estava em risco iminente de morte no momento do evento), exigiu a hospitalização ou o prolongamento de hospitalização existente, resultou na incapacidade deficiente/incapacidade persistente (por exemplo, uma interrupção substancial da capacidade do indivíduo para realizar as funções normais de vida), resultou em uma anomalia/defeito de nascença ou qualquer outro evento clinicamente importante. O tratamento relacionado com AE (TRAEs) estava sendo considerado quando uma das seguintes situações estava presente: 1) uma relação temporal entre os primeiros sintomas da AE e administração do medicamento experimental podia ser identificado; 2) a AE não poderia ser facilmente explicada pelo estado clínico do paciente, a doença intercorrente, ou terapias concomitantes; 3) a AE diminuiu com a descontinuação da redução do produto ou dose de investigação.

[00417] A pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura oral foram medidas na triagem, pré-dose, imediatamente após o final da infusão e várias vezes durante confinamentos dos pacientes nas clínicas, bem como em todas as visitas

clínicas. Os exames laboratoriais incluíram químicas do soro, hematologia e urinálise. Hematologia, química, coagulação e exames laboratoriais de segurança de urina foram realizadas em vários horários de estudo. Os ECGs foram registrados na triagem, pré-dose no Dia 1, imediatamente após o final da infusão e outras cinco vezes durante o primeiro dia, bem como em todas as visitas clínicas. Valores QTcF foram derivadas utilizando a fórmula de correção (QTcF) da frequência cardíaca de Fridericia. Valores absolutos e mudanças de linha de base para os parâmetros de ECG intervalo QT, frequência cardíaca, intervalo QTcF, intervalo PR e QRS foram avaliados por coorte, tratamento e pós-dose de tempo. Além das avaliações de segurança descritos acima, Protocolo B014008 incluiu avaliações completas oftálmicas no início do estudo e em três momentos após a dosagem (Dia 28, Dia 84 e Dia 168).

[00418] Os dados clínicos e sinais vitais foram resumidas utilizando tabelas descritivas e estatísticas de resumo. Laboratório e outros dados de segurança foram resumidos como uma função de qualquer alteração (valores fora do intervalo de referência), assim como quaisquer alterações clinicamente relevantes, que foram definidas a priori. As tabelas de resumo foram estratificadas por dose, e os dados foram reunidos através dos estudos. Além disso, as comparações de dados consolidados para todas as exposições anticorpo G1 foram contrastadas com placebo. Placebo também foi contrastado com doses de anticorpo G1 de 100 mg e mais elevadas (100 mg, 300 mg, 1000 mg, 1500 mg e 2000 mg), e com doses de anticorpo G1 de 1000 mg e mais elevadas (1000 mg, 1500 mg e 2000 mg).

[00419] No estudo IV/SC (G1-SC-IV), trinta e seis indivíduos foram distribuídos aleatoriamente para receber uma única administração do anticorpo G1 (225 ou 900 mg) ou placebo, entregue tanto como um (SC) de injeção subcutânea de bolus ou de uma infusão IV de 1 hora. Os indivíduos foram confinados na unidade de pesquisa clínica durante sete dias após a administração, e retornou à clínica periodicamente para visitas adicionais ambulatoriais para estudar dia 90. Os ECGs foram

realizados extensivamente no Dia 1 (pré-dose, Horas 1, 6, 12), Dia 3, Dia 7, enquanto os indivíduos foram confinados e uma vez no fim do estudo (dia 90). Os sinais vitais, incluindo temperatura, pressão arterial e frequência cardíaca, foram coletados antes da dose, dias 1, 3, 7 e 90.

Tabela 11

Estudo	População de estudo	O Tratamento com Anticorpo G1
B0141001	Homens adultos saudáveis (n = 24)	Por via intravenosa (IV) de infusão única de 0,2, 1 ou 3 mg em coortes de oito (seis/coorte, tratamento ativo; dois em coorte placebo)
B0141002	Homens adultos saudáveis (n = 40)	IV infusão única de 10, 30, 100, 300 ou 1000 mg em coortes de oito (seis/coorte, tratamento ativo; 10 no coorte de placebo)
B0141006	Homens adultos saudáveis (n = 12)	Dois coortes modificados cross-over, placebo ou 300 mg infusão IV em coortes de seis. No primeiro período, todos os participantes receberam placebo. Para o segundo período (incluído aqui), 12 participantes receberam placebo e 11 receberam 300 mg.
B0141007	Homens adultos saudáveis e mulheres (n = 21)	Duas IV infusões duas semanas de intervalo a 30 ou 300 mg em coortes de 10 ou 11 (seis/coorte, tratamento ativo; nove no coorte de placebo)
B0141008	Mulheres adultas	Infusão IV única de 300, 1000,

Estudo	População de estudo	O Tratamento com Anticorpo G1
	saudáveis (n = 31)	1500, ou 2000 mg (cinco em 2000 mg de coorte; seis/coorte grupos de tratamento restantes; oito em coorte de placebo)
G1-SC-IV	Trinta e seis indivíduos (n = 36)	Injeção de bolus subcutânea única (SC) ou infusão IV única de 225 ou 900 mg

[00420] Do outro lado da ampla gama de dosagens avaliadas nos cinco estudos IV (0,2 a 2,000 mg), anticorpo G1 IV foi aceitavelmente tolerado. A Tabela 8 resume a taxa global de eventos adversos (AE) por dose para os estudos IV. Com base nestes resultados de tolerabilidade, as preocupações de segurança evidentes não surgiram. Em todos os ensaios nos estudos IV, os participantes que receberam placebo relataram uma média de 1,3 eventos adversos emergentes do tratamento (TEAEs). Estes são todos os acontecimentos notificados, independentemente da opinião do investigador da relação com o fármaco do estudo. Em todas as doses IV G1, a taxa foi de 1,4 TEAEs/indivíduo. Os indivíduos que receberam doses G1 de 100 mg ou superior tiveram uma média de 1,5 TEAEs; aqueles recebendo doses de 1,000 mg ou superior tiveram uma média de 1,6 TEAEs.

Tabela 8

	Indivíduos Avaliados para AE	Número de AEs – n (N)	Indivíduos com AE – n (N)	Indivíduo com AE grave – n (N)	Indivíduo com AE grave – n(N)	Indivíduos Descontinuados Para a AES – n (N)	Descontinuações de dose Reduzida ou temporárias – n (N)
Placebo	45	57 (11)	23 (8)	0	0	2 (1)	0
0,2mg	6	5 (0)	2 (0)	0	0	0	0

1mg	6	1 (1)	3 (0)	0	0	0	0
3mg	6	10 (2)	4 (1)	0	0	0	0
10mg	6	5 (1)	4 (1)	0	0	0	0
30mg	12	21 (11)	8 (5)	0	0	0	0
100mg	6	5 (1)	4 (1)	0	0	0	0
300mg	29	47 (10)	20 (7)	1 (1)	1 (1)	0	0
1000mg	12	17 (4)	8 (4)	0	0	0	0
1500mg	6	8 (0)	3 (0)	0	1 (0)	0	0
2000mg	5	12 (2)	4 (1)	0	0	0	1 (1)

[00421] AE = eventos adversos; n = qualquer evento, o tratamento relacionado ou não; (N) = tratamento considerado relacionado pelo investigador. Nota: Para protocolo B0141006 (placebo e 300 mg), apenas os dados para o primeiro período de tratamento ativo foi incluído, devido à sua natureza cross-over

[00422] Nos estudos IV, eventos adversos relacionados ao tratamento (TRAEs ou AES que podem estar relacionados à terapia de acordo com o investigador principal) foram relatados em 21,2% dos indivíduos que receberam IV G1, em comparação com 17,7% nos que receberam placebo. Em doses de 100 mg de G1 ou superior, TRAEs ocorreu em 22,4% dos participantes. Em doses de 1,000 mg ou mais, TRAEs ocorreu em 21,7% dos participantes. O anticorpo G1 não parece estar associado com quaisquer padrões clinicamente relevantes das mudanças nos sinais vitais (pressão arterial sistólica e diastólica [BP], temperatura e frequência cardíaca [HR]), eletrocardiograma (ECG) anomalias (incluindo QTcB e QTcF), reações a infusões no local, ou achados laboratoriais clínicos. Houve efeitos limitados em testes da função hepática (aspartato aminotransferase [AST], alanina aminotransferase [ALT], bilirrubina total, e fosfatase alcalina), com um aumento de grau 1 em bilirrubina total em um

indivíduo que recebeu placebo (Estudo B0141001), e um aumento de grau 1 da ALT em um indivíduo que recebeu placebo (Estudo B0141002). Alterações da função hepática clinicamente significativas não foram observadas entre indivíduos que receberam qualquer uma das doses estudadas de G1. Não havia nenhuma evidência de diferenças entre G1 e placebo em testes hematológicos que avaliam a função renal, eletrólitos, ou em testes de urina.

[00423] No estudo IV/SC (G1-SC-IV), segurança e tolerabilidade foram comparáveis entre rotas de distribuição SC e IV. A média de frequência cardíaca e pressão arterial (diastólica e sistólica) não foram afetadas pelo tratamento anticorpo G1, nem houve quaisquer alterações significativas em nenhum dos parâmetros cardiovasculares após o tratamento com SC anticorpo G1. Um resumo das TRAEs observadas durante o estudo SC é mostrado abaixo na Tabela 12.

Tabela 12

	900 mg (N=6)	225 mg (N=6)	Placebo (N=6)
Doenças GI	2 (33,3%)	0	1 (16,7%)
CNS	0	1 (16,7%)	0
Infecções e Infestações	0	0	0
Tecidos Conectivo e Musculoesquelético	0	0	0
Respiratória	0	0	0
Doenças Reprodutivas e da Mama	0	0	0
Lesões	0	0	0
Gravidez	0	0	0
Renal	1 (16,7%)	0	0
Vascular	0	0	0

[00424] Nos estudos de dose única (B0141001, B0141002, B0141006 e B0141008), parâmetros farmacocinéticos (PK) foram calculados para doses

compreendidas entre 30 mg e 2,000 mg. Média de meia-vida terminal de grupo ($t_{1/2}$) variou de aproximadamente 40 a 48 dias. C_{max} e a exposição total (assessed by AUC_{inf}) aumentou com o aumento da dose. O aumento na AUC_{inf} parecia ser aproximadamente proporcional à dose entre 30 e 1000 mg e parecia ser maior do que proporcional à dose entre 1,000 e 2,000 mg. O volume de distribuição era baixo, entre 6-10 L.

[00425] No estudo de duas doses (B0141007), a meia-vida terminal aparente depois de uma segunda dose situou-se entre 41 e 50 dias. As concentrações plasmáticas acumularam após a segunda dose, com uma taxa de acumulação de cerca de 1,5. Além disso, no estudo IV/SC (G1-SC-IV), as avaliações farmacocinéticas indicaram G1 tiveram uma meia-vida terminal semelhante, quando entregaram SC como IV.

Exemplo 17: Prevenção da enxaqueca crônica em um estudo clínico de anti-corpo G1

[00426] Um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, dupla-simulação, grupo paralelo, controlado por placebo de doses múltiplas comparando anti-CGRP G1 anticorpo antagonista ao placebo foi realizado em indivíduos com enxaqueca crônica. Indivíduos de qualificados entraram em uma linha de base, 28 dias período de pré-tratamento. Indivíduos tiveram suas informações de dor de cabeça e saúde capturadas diariamente durante todo o estudo, utilizando um sistema de diário eletrônico de dor de cabeça. Nenhuma alteração em medicamentos para enxaqueca foi autorizada durante o período de estudo ou pré-tratamento. Os critérios de inclusão foram os seguintes: (1) machos ou fêmeas com idade entre 18 e 65 anos; (2) um documento de consentimento informado assinado e datado, indicando que o indivíduo tenha sido informado de todos os aspectos pertinentes do estudo, incluindo quaisquer riscos conhecidos e potenciais e tratamentos alternativos disponíveis; (3) enxaqueca crônica satisfazendo os critérios de diagnóstico listados na Classificação Internacional de Cefaléias (ICHD-III beta version, 2013); (4) os indivíduos podem utilizar até dois

medicamentos diferentes diários de enxaqueca preventivas para enxaqueca (por exemplo, topiramato, propranolol, amitriptilina) ou para outras condições médicas (por exemplo, propranolol sendo usado para hipertensão) se a dose e o regime foi estável por pelo menos 2 meses antes do início da de 28 dias de execução no período; (5) Índice de Massa Corporal (IMC) de 17,5 a 34,5 kg/m², e um peso total do corpo entre 50 kg e 120 kg, inclusive; (6) indivíduo é ou não de potencial reprodutivo, tal como definido nos métodos ou se indivíduo é de potencial reprodutivo, eles concordam, quer para permanecer abstinente ou utilizar (ou fazer seu parceiro utilizar) um método aceitável de controle de natalidade dentro da duração prevista do estudo; (7) demonstrar a conformidade com o diário eletrônico de dor de cabeça durante o período de pré-tratamento de entrada de dados de dor de cabeça em um mínimo de 24/28 dias (85% de conformidade). Critérios de diagnóstico de enxaqueca crônica em (3) acima foram os seguintes: (a) história de dores de cabeça frequentes, sugerindo enxaqueca crônica (15 dias por mês) por pelo menos três meses antes da triagem; (B) verificação da frequência de dor de cabeça através de informações de linha de base coletados prospectivamente durante a fase de pré-tratamento de 28 dias demonstrando dores de cabeça em pelo menos 15 dias, com pelo menos 8 dias por mês que preenchem qualquer um de (i) qualificar como sendo um ataque de enxaqueca, (ii) precedida ou acompanhada de aura de enxaqueca, ou (iii) aliviada por derivados de ergotamina ou triptano.

[00427] Os critérios de exclusão exigem que os indivíduos não satisfaçam a qualquer das seguintes: (1) O início da enxaqueca crônica após a idade de 50 anos; (2) indivíduo tem recebido toxina onabotulinum A para enxaqueca ou por quaisquer razões médicas ou estéticas que requerem injeções na cabeça, face ou pescoço durante os seis meses anteriores à triagem; (3) indivíduo utiliza medicamentos contendo opioides (incluindo codeína) ou barbitúricos (incluindo Fiorinal®, Fioracet®, ou qualquer outra combinação que contenha butalbital) em mais de 4 dias por mês para o

tratamento de enxaqueca ou por qualquer outro motivo (4) falhou > 2 categorias de medicamentos ou > 3 medicamentos preventivos (dentro de duas categorias de medicamentos) devido à falta de eficácia para o tratamento profilático da enxaqueca episódica ou crônica após um julgamento terapêutico adequado; (5) doença hematológica, renal, endócrina, pulmonar, gastrointestinal, geniturinária, neurológica ou ocular clinicamente significativa à descrição do investigador; (6) indivíduos com evidência ou história clínica de problemas psiquiátricos clinicamente significativos, incluindo depressão severa, transtorno do pânico ou transtorno de ansiedade generalizada (de acordo com critérios do Diagnostic and Statistical Manual de 5ª edição [DSM-5]); (7) a pressão arterial sistólica na triagem acima de 160 mm Hg ou inferior a 90 mm Hg; (8) a pressão arterial diastólica na triagem acima de 110 mm Hg ou inferior a 50 mm de Hg; (9) história de doença cardiovascular clinicamente significativa ou isquemia vascular (tal como do miocárdio, neurológico [por exemplo, isquemia cerebral], isquemia de extremidade ou outro evento isquêmico); (10) história de câncer anterior ou atual, com a exceção dos indivíduos com carcinoma de células basais que foi excisado; (11) mulheres grávidas ou amamentando; (12) História de reações de hipersensibilidade a proteínas injetadas, incluindo anticorpos monoclonais; (13) tratamento com um fármaco experimental dentro de 30 dias da entrada no estudo (14) anormalidade clinicamente significativa na linha de base 12-superfície principal do ECG, incluindo pausas sinusais >2 segundos, segundo ou terceiro bloqueio cardíaco ou outras anormalidades julgadas clinicamente significativas pelo investigador. (15) uma linha de base 12-principal do ECG demonstrando QTcF >450 msec para homens e 470 msec para mulheres na triagem (se QTcF excedeu esses valores, o ECG foi repetido e a média dos três valores QTcF usados para determinar a elegibilidade potencial do indivíduo; QTc obtido utilizando cálculo Fridericia); (16) qualquer achado que, no julgamento do investigador é significativamente clinicamente anormal, incluindo valores de hematologia, químicas de sangue, testes de coagulação ou urinálise (testes

anormais foram permitidos de ser repetidos para confirmação) (17) enzimas hepáticas (alanina aminotransferase [ALT], aspartato aminotransferase [AST], fosfatase alcalina) > 1,3 vezes acima do limite normal (ULN) após confirmação em um teste repetido; (18) creatinina sérica >1,5 vezes o ULN, proteinúria clinicamente significativa (vareta de urina +4) ou evidência de doença renal.

[00428] Indivíduos confirmados como tendo enxaqueca crônica e elevada conformidade com o diário de dor diária durante o período de pré-tratamento foram randomizados na visita 2 (dia 1) em um dos três braços de tratamento. A randomização foi realizada utilizando um sistema eletrônico de resposta interativa na web. Os indivíduos foram estratificados com base no sexo e uso de medicamentos de enxaqueca de linha de base. O tratamento foi administrado uma vez por mês (cada 28 dias) para um total de três tratamentos ao longo de um período de 3 meses. Administração do tratamento ocorreu na visita 2 (dia 1; primeira dose), visita 3 (dia 29; segunda dose), e visita 4 (dia 57, a terceira e última dose). Avaliações de saída final do estudo foram realizadas na visita 5 (dia 85), cerca de 28 dias após a terceira e última dose. As injeções foram administradas por via subcutânea durante um período de 3 meses (cada 28 dias) a indivíduos em cada um dos grupos seguintes: (1) aqueles randomizados para o braço de 900 mg recebeu quatro injeções ativas a cada 28 dias; (2) aqueles randomizados para o braço de 675/225 mg receberam três injeções ativas e uma de placebo durante o primeiro tratamento, e uma injeção ativa e três de placebo para o segundo e terceiro tratamentos; (3) aqueles randomizados para placebo receberam quatro injeções de placebo a cada 28 dias. Injeções ativas continham 225 mg de anticorpo G1. Endpoints foram obtidos a partir de um diário eletrônico de dor diária, um sistema interativo baseado na web que gravaram os dados para o período anterior de 24 horas. Duração global de dor de cabeça foi registrada numericamente, em horas, bem como o número de horas com dor de cabeça em cada nível de gravidade. Gravidade dor de cabeça foi subjetivamente avaliada pelo indivíduo em momentos

pré-definidos da seguinte forma: nenhuma dor, dor leve, dor moderada e dor intensa. Os indivíduos também foram convidados para registrar se os seguintes sintomas associados estavam presentes ou ausentes em pontos de tempo pré-definidos: fotofobia, fonofobia, náuseas e vômitos. Um ponto de extremidade adicional foi derivado de monitoramento do uso de triptanos (por exemplo, sumatriptano) como um medicamento anti-dor de cabeça aguda por indivíduos do estudo ao longo do curso do estudo. Um resumo da disposição e demografia de indivíduos do estudo é apresentado na Tabela 9.

Tabela 9

	Placebo	675/225 mg	900 mg	Total
Randomizado	89	88	87	264
Concluído	77 (86,5%)	72 (81,8%)	76 (87,4%)	225
Analisados como ITT	89 (100%)	87 (98,9%)	85 (97,7%)	261 (98,9%)
Em Análise de Se- gurança	89 (100%)	88 (100%)	86 (98,9%)	263 (99,6%)
Não Foi concluído	12 (13,5%)	16 (18,2%)	11 (12,6%)	39 (14,8%)
Idade (anos mé- dios)	40,7	40	41,5	40,75
% de mulheres	85,4%	86,3%	86,2%	85,9%
Anos com enxa- queca	20,4	15,8	18,7	18,3

[00429] A diminuição média em número de horas de dor de cabeça em relação à linha de base em cada uma das semanas 1, 2 e 3 (W1, W2, W3 e, respectivamente) para cada um dos grupos é representada graficamente na FIGURA 15. Os resultados mostram uma diminuição significativa em ambos os grupos de tratamento

em relação ao grupo de placebo em cada um de W1, W2 e W3, incluindo a primeira semana.

[00430] A diminuição média em número de horas de dor de cabeça em relação à linha de base em cada um dos meses 1, 2, e 3 (M1, M2, e M3, respectivamente) para cada um dos grupos é representada graficamente na FIGURA 12. Os resultados mostram uma diminuição significativa em ambos os grupos de tratamento relativamente ao grupo placebo em todos os três pontos de tempo, incluindo após a primeira dose. A significância estatística em relação ao grupo placebo, para os dados na Figura 12 é fornecida pelos valores de p indicados.

[00431] Número médio de horas de dor de cabeça em cada grupo no início do estudo e na visita 2, 3 e 4 (V2, V3 e V4, respectivamente) é representado graficamente na FIGURA 13. Os resultados mostram uma diminuição significativa em ambos os grupos de tratamento relativamente ao grupo placebo em todos os três pontos de tempo, incluindo após a primeira dose.

[00432] A diminuição média em número de horas de dor de cabeça moderada ou severa em relação à linha de base em cada um dos meses 1, 2, e 3 (M1, M2, e M3, respectivamente) para cada um dos grupos é representada na FIGURA 14. Os resultados mostram uma diminuição estatisticamente significativa em ambos os grupos de tratamento relativamente ao grupo placebo em todos os três pontos de tempo, incluindo após a primeira dose. A significância estatística em relação ao grupo placebo é fornecida pelos valores p indicados.

[00433] A diminuição média em número de usos dos triptanos como uma medicação de resgate aguda em relação à linha de base em cada um dos meses 1, 2, e 3 (M1, M2, e M3, respectivamente) para cada um dos grupos é representada graficamente na FIGURA 16. Os resultados mostram uma diminuição significativa em uso de triptanos em ambos os grupos de tratamento relativamente ao grupo placebo em todos os três pontos de tempo, incluindo após a primeira dose. A significância estatística em

relação ao grupo placebo é fornecida pelos valores p indicados na FIGURA 16.

[00434] Uma diminuição significativa no número de horas de dor de cabeça também foi observada em indivíduos que utilizam medicamentos preventivos (por exemplo, topiramato e amitriptilina ou propranolol) em relação a um grupo de placebo.

[00435] Ambas as doses foram bem toleradas, e nenhum problema de segurança emergiu. Um resumo dos acontecimentos adversos emergentes do tratamento (TEAE) por grupo é fornecido na Tabela 10. A diferença no TEAE relacionado é quase totalmente explicada por eventos relacionados com injeção leves (eritema, algum desconforto). O TEAE grave não estava relacionados com fármacos (sem eventos adversos relacionados com o fármaco).

Tabela 10

	Placebo N (%)	675/225 mg N (%)	900 mg N (%)
TEAE	36 (40,4)	47 (53,4)	41 (47,7)
TEAE relacionada	15 (16,9)	25 (28,4)	28 (32,6)
TEAE grave	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (2,3)
TEAE Causando Descontinuação	1 (1,1)	6 (6,8)	5 (5,8)
Óbitos	0	0	0

Exemplo 18: Prevenção de alta frequência de enxaqueca episódica em um estudo clínico de anticorpo G1

[00436] Um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, estudo de grupo paralelo comparando anti-CGRP anticorpo G1 com o placebo foi realizado em indivíduos com alta frequência de enxaqueca episódica (HFEM). O desenho do estudo seguiu o do Exemplo 17, com duas diferenças. Em primeiro lugar, os critérios de inclusão (3) foi por indivíduos que preenchem os critérios para a enxaqueca episódica de acordo com a segunda edição do The International Headache Society (Olesen e Steiner 2004), que experimentam a enxaqueca em alta frequência

da seguinte forma: (a) Histórico de dores de cabeça em mais de 8 dias por mês para pelo menos 3 meses antes de triagem; (B) a verificação da frequência de dor de cabeça através de informação de linha de base coletada prospectivamente durante os a fase pré-tratamento de 28 dias demonstrando dor de cabeça (de qualquer tipo) de 8 a 14 dias, com pelo menos 8 dias cumprindo critérios para pelo menos um dos (i) enxaqueca, (ii) provável enxaqueca, ou (iii) o uso de compostos de triptano ou ergotamina. Em segundo lugar, esquemas de dosagem foram alterados para os grupos que receberam G1. Especificamente, as injeções foram administradas por via subcutânea durante um período de 3 meses (cada 28 dias) a indivíduos em cada um dos grupos seguintes: (1) aqueles randomizados para o braço de 675 mg receberam 675 mg de G1 a cada 28 dias; (2) aqueles randomizados para o braço de 225 mg recebem 225 mg de G1 a cada 28 dias; e (3) aqueles randomizados para placebo recebem uma injeção de placebo a cada 28 dias. Um resumo da disposição e demografia de indivíduos no estudo é apresentado na Tabela 13. Endpoints do estudo incluíram redução do número de dias de enxaqueca e diminuição do número de dias de dor de cabeça de qualquer gravidade.

Tabela 13

	Placebo	225 mg	675 mg	Total
Randomizado	104	96	97	297
Analisados como ITT	104 (100%)	95 (99%)	96 (99%)	295 (99%)
Em Análise de Segurança	104 (100%)	96 (100%)	97 (100%)	297 (100%)
Idade (anos médios)	42,0	40,8	40,7	41,2
% de mulheres	88%	91%	85%	88%
% branco	82%	77%	76%	78%

[00437] A diminuição média em número de dias de enxaqueca em relação à linha de base em cada um dos meses 1, 2, e 3 (M1, M2, e M3, respectivamente) para

cada um dos grupos é representada na FIGURA 17. Os resultados mostram uma diminuição estatisticamente significativa em ambos os grupos de tratamento relativamente ao grupo placebo em todos os três pontos de tempo, incluindo após a primeira dose. A significância estatística em relação ao grupo placebo é fornecida pelos valores p indicados.

[00438] A diminuição média em número de dias de dor de cabeça de qualquer gravidade em relação à linha de base em cada um dos meses 1, 2, e 3 (M1, M2, e M3, respectivamente) para cada um dos grupos é representada na FIGURA 18. Os resultados mostram uma diminuição estatisticamente significativa em ambos os grupos de tratamento relativamente ao grupo placebo em todos os três pontos de tempo, incluindo após a primeira dose. A significância estatística em relação ao grupo placebo é fornecida pelos valores p indicados.

[00439] Ambas as doses foram bem toleradas, e nenhum problema de segurança emergiu. Um resumo dos acontecimentos adversos emergentes do tratamento (TEAE) por grupo é fornecido na Tabela 14. Os quatro TEAEs graves foram devidos a um caso de fratura de fíbula, um caso de tremor devido à interrupção da medicação e dois casos de enxaqueca que requerem tratamento de sala de emergência (ER).

Tabela 14

	Placebo N (%)	225 mg N (%)	675 mg N (%)
TEAE	58 (56)	44 (46)	57 (59)
TEAE relacionada	24 (23%)	26 (27%)	24 (25%)
TEAE grave	0	2 (2%)	2 (2%)
TEAE grave relacionado	0	0	0
TEAE Causando Descontinuação	0	4 (4%)	2 (2%)
Óbitos	0	0	0

Exemplo 19: Segurança não clínica

[00440] Dois estudos que avaliam a segurança de anticorpo G1 foram realizados em macacos cinomolgos. No primeiro estudo, foi avaliada a segurança de uma única dose de anticorpo G1. No segundo estudo, foi avaliada a segurança de doses repetidas de anticorpo G1. Cada um dos estudos e os seus resultados são ainda descritos em pormenor abaixo. Para ambos os estudos de dose repetida e única, anticorpo G1 foi formulado como uma solução de 51,4 mg/mL em histidina 20 mM, 84 mg/mL de dihidrato de trealose, 0,2 mg/mL de polissorbato 80, 0,05 mg/mL de dihidrato de dissódio de EDTA e 0,1 mg/mL de L-metionina, a pH ~ 5,5. Veículo foi formulado de forma idêntica sem anticorpo G1. Além disso, em ambos os estudos, as amostras de sangue foram colhidas periodicamente para análise de concentração de plasma de anticorpo G1 utilizando um método validado de ELISA.

[00441] Os dados foram agregados pela primeira vez em tabelas de resumo e figuras utilizando GraphPad Prism (versão 6,0) e Excel 2010 (Microsoft). Para estudo de exposição única, dados de telemetria foram analisados utilizando ANOVA. A análise foi realizada utilizando SAS Lançamento 8,2. A fim de normalizar o intervalo QT ao longo de um intervalo de R-R

[00442] intervalos, Fatores de Correção Animal individual (IACFs) foram gerados para cada animal, relacionando cada intervalo-RR com o seu intervalo QT associado. A regressão linear da relação QT/intervalo-RR foi determinado para o conjunto de dados. O declive desta regressão linear foi usada como o IACF para o animal associado em todos os tratamentos. Este IACF foi usado para calcular o intervalo QT corrigido (QTc) utilizando a seguinte equação:

[00443] $QT-I(c) = \text{intervalo QT corrigido para a frequência cardíaca} = QT-I - [(RR - 300) \cdot (IACF)]$.

[00444] Para o estudo de dose múltipla, ANOVA de 1 fator foi também usado para analisar os dados. Se a análise de variância foi significativa ($P \leq 0,05$), pós-teste de Dunnett foi usado para as comparações entre os grupos. Para cada um dos sexos,

o grupo tratado foi comparado com o grupo de controle (veículo) ao nível de probabilidade de duas caudas de 5%.

Estudo de telemetria de dose única

[00445] Oito macacos adultos cinomolgos machos (Primatas Charles River) foram cirurgicamente instrumentados com telêmetros e deixados a recuperar durante pelo menos duas semanas. Implantes (DSI TL11M2-D70-PCT) e receptores (RMC-1) foram fabricados pela Data Sciences International.

[00446] Os animais foram aclimatados a gaiolas de telemetria de aquisição de dados, pelo menos, durante a noite antes da dosagem. Durante a aclimação, gravação de pré-estudo dos parâmetros hemodinâmicos foi realizado para verificar se os transdutores e equipamentos estavam funcionando corretamente. Durante a aquisição de dados de telemetria, os animais foram alojados individualmente em gaiolas equipadas com os receptores de telemetria. Em dias de não coleta, os animais foram alojados em gaiolas sem os receptores de telemetria. Os animais foram mantidos em um ciclo diário de 12-horas de luz e 12 horas de escuro, com água ad libitum e alimentados com dieta primata certificada.

[00447] Para a primeira fase do estudo, aos animais (8 machos) foram administrados apenas veículo, e os dados de telemetria foram coletados começando ~ 1 hora de pré-dose até 22 horas pós-dose. Seis dias após a administração do veículo, os mesmos animais receberam uma única administração IV de anticorpo G1 (100 mg/kg, uma dose ~ 10 vezes maior do que a EC50 farmacológica em macacos cinomolgos). Dados eletrocardiográficos e hemodinâmicas telemetrados foram novamente registrados continuamente de todos os animais. Além disso, estes animais foram monitorados durante ~ 24 horas nos dias 3, 7, 10 e 14 depois de receber a dose única do anticorpo G1. Telemetria ECG e sinais de pressão arterial foram transmitidos através dos dispositivos de rádio-telemetria implantados para receptores montados em cada gaiola. Os sinais adquiridos foram passados através de uma matriz de troca de dados

(DSI modelo DEM) e em um sistema de aquisição de dados baseado em PC (software DSI Ponemah P3 versão 3,4); o software de análise de dados foi Emka Technologies versão 2,4,0,20

[00448] (Emka Technologies). A taxa de amostragem analógica/digital foi de 1,000 Hz para os dados telemetrados de ECG e 500 Hz para os dados de pressão arterial. Os dados foram registrados como médias de 1 min.

[00449] Pressão arterial sistólica (SBP) média do grupo foi semelhante antes e após o tratamento com anticorpo G1 ao longo do primeiro dia após a administração e nos dias subsequentes (animais telemetrados nos dias 3, 7, 10 e 14 em intervalos de tempo idênticos como o dia 1). Nas horas de 1-4 após a administração quando as concentrações sanguíneas anticorpo G1 estavam em níveis máximos (concentração média de 3,500 mg/mL em 4 horas), as médias de PAS foram de 111 mmHg, em comparação com 113 mmHg ao mesmo intervalo de tempo após a administração do veículo. Além disso, a SBP foi de 110 mmHg nos dias 3 e 7, 109 mmHg no dia 10 e 110 mmHg no dia 14 após a administração do anticorpo G1. Dados SBP semelhantes foram registrados para outros intervalos de tempo. Uma vez que este foi um estudo cruzado projetado, os animais tratados serviram como seus próprios controles. Quando os dados foram analisados como diferenças na pressão arterial após a administração do anticorpo G1 comparado com o tratamento do veículo, há pequenas reduções estatisticamente significativas na SBP no último intervalo de tempo nos dias 7, 10 e 14.

[00450] Após o tratamento com anticorpo G1, pressão arterial diastólica (DBP) foi anotada como sendo cerca de 3 mmHg inferior aos valores médios obtidos após a administração do veículo. Das horas 5-22, a média do grupo para o grupo de veículo e anticorpo G1 foram semelhantes. A mesma tendência foi observada em outros dias, quando um ligeiro decréscimo na DBP (variando de 2,62-3,5 mmHg) ocorreu no primeiro intervalo medido, com algumas mudanças de magnitude similares vistas

esporadicamente nos dias 7-10 no intervalo de horas 7-22. Semelhante ao que foi visto pela DBP, pequenas diminuições na frequência cardíaca foram vistas durante a primeira avaliação (horas 1-4) em relação ao tratamento do veículo. As diferenças eram indetectáveis durante as avaliações intermediárias e foram mais uma vez vistas entre as horas 18-22 em todos os dias.

[00451] Além disso, no que diz respeito a resultados de ECG, não houve alterações estatisticamente significativas no intervalo QTc em qualquer ponto de tempo, em relação ao tratamento com veículo. Embora as mudanças estatisticamente significativas na RR, PR, RS e QT foram vistos ao longo do período de 14 dias, quando comparado com o veículo, todos eles foram menores em valor absoluto.

Estudo de segurança de dose repetida

[00452] O estudo de segurança de dose repetida incluiu 48 adultos, pareados por sexo (6 por sexo por grupo) de macacos cinomolgos anticorpos G1-naive (Primate Charles River). Os animais receberam veículo ou anticorpo G1 como uma injeção intravenosa, uma vez por semana durante 14 semanas em doses de 10 mg/kg, 100 mg/kg ou 300 mg/kg. Em cada grupo, dois animais de cada sexo foram deixados recuperar durante um adicional de 4 meses após o fim da dosagem.

Medições de ECG e pressão arterial foram registradas uma vez durante a fase de pré-estudo, duas vezes depois que estado estável foi alcançado (antes da dosagem e 4 horas após a dose no dia 85) e uma vez ~ 1 semana após o fim da dosagem (dia 103 da fase de recuperação). Os animais foram anestesiados com cetamina e ECGs foram gravados utilizando oito derivações. Medição de ECGs (incluindo a frequência cardíaca) foi feita com os dados capturados utilizando o sistema de Life Science Suite Ponemah Physiology Platform via DSI, utilizando derivações I, II, aVF, CG4RL e CV4LL, como padrão. A correção da frequência cardíaca para o intervalo QT (QTc) foi calculada utilizando a fórmula Bazett.

[00453] A pressão sanguínea foi registrada antes da primeira dose, após 12

semanas de dosagem (13 doses) e, aproximadamente, 1 semana após o fim da dosagem. Nenhuma alteração significativa foi notada na SBP ou DBP em qualquer dos grupos de animais tratados em relação aos animais tratados com veículo. Frequências cardíacas médias do grupo eram relativamente consistentes nos grupos de dose e pontos de tempo medidos, sem diferenças estatísticas medidas. As concentrações plasmáticas de anticorpo G1 foram medidas durante a primeira semana de administração e, no momento das avaliações da pressão sanguínea e do ECG, demonstrando acumulação com dosagem semanal repetida.

[00454] Além disso, com relação ao ECG, não houve diferenças significativas no intervalo QT em todas as doses e intervalos de tempo. Além disso, nenhuma mudança significativa ou relevante no ECG foi observada para qualquer um dos parâmetros do ECG avaliados ao longo do estudo.

[00455] Em suma, o anticorpo G1 foi muito bem tolerado em ambos os estudos, sem alterações clinicamente significativas observadas em qualquer parâmetro hemodinâmico, nem quaisquer alterações relevantes observadas em qualquer parâmetro ECG. Em macacos cinomolgos, parâmetros cardiovasculares e hemodinâmicos não parecem ser afetados pela inibição de longo prazo de CGRP com anticorpo G1.

[00456] Entende-se que os exemplos e modalidades aqui descritos são apenas para fins ilustrativos, e que várias modificações ou alterações na luz vão ser sugeridas para pessoas versadas na técnica e devem ser incluídas dentro do sentido e do alcance deste pedido. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente aqui são incorporados por referência em sua totalidade, para todos os propósitos, na mesma medida como se cada publicação individual ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

Depósito de Material biológico

[00457] Os seguintes materiais foram depositados com a American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA

(ATCC):

Material	<u>Anticorpo No.</u>	<u>ATCC Acesso</u> <u>No.</u>	<u>Data de Depósito:</u>
pDb.CGRP.hFcGI	Cadeia pesada G1	PTA-6867	15 de julho de 2005
pEb.CGRP.hKGI	Cadeia leve G1	PTA-6866	15 de julho de 2005

[00458] Vetor pEb.CGRP.hKGI é um polinucleotídeo que codifica para a região variável de cadeia leve de G1 e a região constante de cadeia leve kappa; e o vetor pDb.CGRP.hFcGI é um polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada da região variável e a região constante G1 a cadeia pesada de IgG2 contendo as seguintes mutações: A330P331 a S330S331 (numeração de aminoácidos com referência à sequência de IgG2 do tipo selvagem; ver Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624).

[00459] Estes depósitos foram feitos sob as disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para Efeitos do Procedimento em Matéria de Patentes e seus Regulamentos (Tratado de Budapeste). Isto assegura a manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos a partir da data do depósito. O depósito será disponibilizado pela ATCC sob os termos do Tratado de Budapeste, e indivíduo a um acordo entre Rinat Neuroscience Corp e a ATCC, que assegura a disponibilidade permanente e não restrita da progênie da cultura do depósito ao público após concessão da patente US pertinente ou após aberta ao público de qualquer pedido de patente estrangeira ou U.S., o que ocorrer primeiro, e assegura a disponibilidade da progênie a alguém determinado pelo Comissário de Patentes e Marcas Comerciais dos EUA de ter direito aos mesmos de acordo com USC 35 Seção 122 e as regras do Comissário nos termos da mesma (incluindo CFR 37 Seção 1,14 com particular referência para 886 OG 638).

[00460] O cessionário do presente pedido concordou que se uma cultura dos materiais depositados vier a morrer ou se perder ou for destruída quando cultivada sob condições adequadas, os materiais serão prontamente substituídos após

notificação, com outro do mesmo. A disponibilidade do material depositado não deve ser interpretada como uma licença para a prática da invenção em contravenção dos direitos concedidos sob a autoridade de qualquer governo de acordo com as suas leis de patentes.

[00461] Sequências de Anticorpos

[00462] Região variável da sequência de aminoácidos de cadeia pesada G1 (SEQ ID NO:1)

[00463] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKG
LEWVAEIRSESDASATHYAEAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAY
FDYGLAIQNYWGQGTLVTVSS

[00464] Região variável de sequência de aminoácidos de cadeia leve G1 (SEQ ID NO: 2)

[00465] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPR
LLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGT
KLEIK

[00466] G1 CDR H1 (CDR estendido) (SEQ ID NO:3)

[00467] GFTFSNYWIS

[00468] G1 CDR H2 (CDR estendido) (SEQ ID NO:4)

[00469] EIRSESDASATHYAEAVKG

[00470] G1 CDR H3 (SEQ ID NO:5)

[00471] YFDYGLAIQNY

[00472] G1 CDR L1 (SEQ ID NO:6)

[00473] KASKRVTTYVS

[00474] G1 CDR L2 (SEQ ID NO:7)

[00475] GASNRYL

[00476] G1 CDR L3 (SEQ ID NO:8)

[00477] SQSYNYPYT

[00478] Região variável de sequência de nucleotídeos de cadeia pesada G1 (SEQ ID NO:9)

[00479] gaagttcagctggtgaatccggtggtggtctggtcagccaggtggtccctgcgtctg-
tctgcgctgcttccggttcaccttctccaactactggatctcctgggttcgtcaggctcctggtaaaggctggaatgggt
tgctgaaatccgttccgaatccgacgcgtccgctaccattacgctgaagctgttaaagg-
tcgttcaccatctcccgtagacaacgctaagaactccctgtacctgcagatgaactccctgcgtgctgaagacaccgct
gttactactgcctggcttactttgactacggctctggctatccagaactactggggtcaggg-
taccctggttaccggttctcc

[00480] Região variável de sequência de nucleotídeos de cadeia leve G1 (SEQ ID NO:10)

[00481] gaaatcgttctgaccagctccccggctaccctgtccctgtccccaggtgaacgtgctac-
cctgtcctgcaaagctccaaacgggtaccacctacgtttcctgggtaccagcagaaacccggctaggctcctcgtctg
ctgatctacgggtctccaaccgttacctcggtatcccagctcgtttctccggttccggtt-
ccggtaccgacttaccctgaccatctcctccctggaacccgaagacttcgctgttactactgcagtcagtcctacaact
accctacaccttccggtcagggtaccaaactggaaatcaaa

[00482] Sequência de aminoácidos de anticorpos completa de cadeia pesada G1 (incluindo IgG2 modificada tal como aqui descrito) (SEQ ID NO: 11)

[00483] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWISWVRQAPGKG
LEWVAEIRSESDASATHYAEAVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLAY
FDYGLAIQNYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN
TKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

[00484] Sequência de aminoácidos de anticorpos completa de cadeia leve

G1(SEQ ID NO:12)

[00485] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASKRVTTYVSWYQQKPGQAPR
LLIYGASNRYLGIPARFSGSGSGTDFLTLSLEPEDFAVYYCSQSYNYPYTFGQGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00486] Sequência de nucleotídeos de anticorpos completa de cadeia pesada
G1 (incluindo IgG2 modificada tal como aqui descrito) (SEQ ID NO: 13)

[00487] gaagttcagctggtgaatccggtggtggtcagccaggtggtccctgcgtctg-
tctgcgctgctccggttcaccttccaactactggatctcctgggtcgtcaggctcctggtaaaggctggaatgggt
tgctgaaatccgtccgaatccgacgcgtccgctaccattacgctgaagctgttaaagg-
tcgtttcaccatctcccgtagacaacgctaagaactccctgtacctgcagatgaactccctgcgtgctgaagacaccgct
gttactactgcctggcttactttgactacggtctggctatccagaactactggggtcaggg-
taccctggtaccgttccctccgctccaccaagggcccatctgtctccactggccccatgctcccgagcacctccg
agagcacagccgccccggtgcctggtcaaggactactccagaacctgtgaccgtg-
tctggaactctggcgctctgaccagcggcgtgcacacctccagctgtcctgcagtcctcaggtctctactccctcag
cagcgtggtgaccgtgccatccagcaactcggcaccagacctacacctgcaacgtagat-
cacaagccaagcaacaccaaggtcgacaagaccgtggagagaaagtgtgtgaggaggtccacctgtccagccc
ctccagtgccggaccatccgtgttctgtccctccaaagccaaggacac-
cctgatgatctccagaaccccagaggtgacctgtgtggtggtgacgtgtcccacgaggaccagaggtgcagttca
actggtatgtggacggagtgagggtgcacaacgccaagaccaagccaagagaggagcagtt-
caactccacctcagagtggtgagcgtgctgaccgtggtgcaccaggactggctgaacggaaaggagtataagtgt
aggtgtccaacaaggactgcatccagcatcgagaagaccttccaagaccaagggacag-
ccaagagagccacaggtgtataccctgccccatccagagaggagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtc
tggtgaagggattctatccatccgacatcgccgtggagtgaggagccaacggacagcca-
gagaacaactataagaccaccctccaatgctggactccgacggatccttctcctgtattccaagctgaccgtggaca
agttccagatggcagcagggaaacgtgttcttctgtccgtgatgcacgaggccctgcacaac-
cactatacccagaagagcctgtccctgtctccaggaaagtaa

[00488] Sequência de nucleotídeos de anticorpos completa de cadeia leve G1 (SEQ ID NO: 14)

[00489] gaaatcgttctgaccagctccccggctaccctgtccctgtccccagggtgaacgtgctac-
 cctgtcctgcaaagctccaacgggtaccacctacgtttcctgggtaccagcagaaacccgggtcaggctcctcgtctg
 ctgatctacgggtgctccaaccgttacctcgggtatcccagctcgtttctccgggtccgggtt-
 ccgggtaccgacttcaccctgaccatctcctccctggaacccgaagacttcgctgtttactactgcagtcagtcctacaact
 acccctacaccttcgggtcagggtaccaaactggaaatcaaacgcactgtggctgcac-
 catctgtcttcatcttccctccatctgatgagcagttgaaatccggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataactctatcc
 gcgcgaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatccggtaactcccagga-
 gagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgaccctgagcaaagcagac
 tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagttctccagtc-
 caaagagcttcaaccgcggtgagtgctaa

[00490] Comparação de sequência de aminoácidos de humano e rato CGRP (α -CGRP humano (SEQ ID NO:15); β -CGRP humano (SEQ ID NO:43); α -CGRP rato (SEQ ID NO:41); e β -CGRP rato (SEQ ID NO:44)):

[00491] NH2-ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSKAF-
 CONH2 (α -CGRP humano)

[00492] NH2-ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTNVGSKAF-
 CONH2 (β -CGRP humano)

[00493] NH2-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSEAF-
 CONH2 (α -CGRP rato)

[00494] NH2-SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSKAF-
 CONH2 (β -CGRP rato)

[00495] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR17 de cadeia leve (SEQ ID NO:58)

[00496] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPK
 LLIYYTSEYHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGT

KLEIK

[00497] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR22 de cadeia pesada (SEQ ID NO:59)

[00498] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPG
QGLEWMGAIYEGTGDTRYIQKFAGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
LSDYVSGFSYWGGTLTVSS

[00499] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR18 de cadeia leve (SEQ ID NO:60)

[00500] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPK
LLIYYTSEYHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGDALPPTFGQGT
KLEIK

[00501] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR23 de cadeia pesada (SEQ ID NO:61)

[00502] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPG
QGLEWMGAIYEGTGKTVYIQKFAGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
LSDYVSGFSYWGGTLTVSS

[00503] Sequência de aminoácidos de região variável de cadeia leve LCVR19 (SEQ ID NO:62)

[00504] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKDISKYLWYQQKPGKAPK
LLIYYTSGYHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGT
KVEIK

[00505] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR24 de cadeia pesada (SEQ ID NO:63)

[00506] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPG
QGLEWMGAIYEGTGKTVYIQKFADRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARL
SDYVSGFGYWGGTTTVTVSS

[00507] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR20 de cadeia leve

(SEQ ID NO:64)

[00508] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIDKYLNWYQQKPGKAPK
LLIYYTSEYHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGDALPPTFGQGT
KLEIK

[00509] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR25 de cadeia pe-
sada (SEQ ID NO:65)

[00510] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPG
QGLEWMGAIYEGTGKTVYIQKFAGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
LSDYVSGFGYWGQGTLVTVSS

[00511] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR21 de cadeia leve
(SEQ ID NO:66)

[00512] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIDKYLNWYQQKPGKAPK
LLIYYTSGYHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDALPPTFGGGT
KVEIK

[00513] Sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada
HCVR26 (SEQ ID NO:67)

[00514] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFGNYWMQWVRQAPG
QGLEWMGAIYEGTGKTVYIQKFAGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARL
SDYVSGFGYWGQGTTVTVSS

[00515] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR27 de cadeia leve
(SEQ ID NO:68)

[00516] QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKV
PKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCF
VFGGGTKVEIKR

[00517] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR28 de cadeia pe-
sada (SEQ ID NO:69)

[00518] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGIDLSGYYMNWVRQAPGK

GLEWVGVIGINGATYYASWAKGRFTISRDN SKTTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGD
IWGQGTLVTVSS

[00519] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR29 de cadeia leve
(SEQ ID NO:70)

[00520] QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGKV
PKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCF
VFGGGTKVEIKR

[00521] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR30 de cadeia pe-
sada (SEQ ID NO:71)

[00522] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGK
GLEWVGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRDN SKTTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGD
IWGQGTLVTVSS

[00523] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR31 de cadeia leve
(SEQ ID NO:72)

[00524] QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYDNNYLAWYQQKPGKV
PKQLIYSTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCSSGDCF
VFGGGTKVEIKR

[00525] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR32 de cadeia pe-
sada (SEQ ID NO:73)

[00526] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLDLSSYYMQWVRQAPGK
GLEWVGVIGINDNTYYASWAKGRFTISRDN SKTTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGD
IWGQGTLVTVSS

[00527] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR33 de cadeia leve
(SEQ ID NO:74)

[00528] QVLTQTPSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGQP
PKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCNDAAAYYCLGSYDCTNGDC
FVFGGGTEVVVKR

[00529] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR34 de cadeia pesada (SEQ ID NO:75)

[00530] QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCSVSGIDLSGYMNVWRQAPGKGL
EWIGVIGINGATYYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARGDIWGP
GTLVTVSS

[00531] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR35 de cadeia leve (SEQ ID NO:76)

[00532] QVLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSVYHNTYLAWYQQKPGKV
PKQLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLGSYDCTNGDCF
VFGGGTKVEIKR

[00533] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR36 de cadeia pesada (SEQ ID NO:77)

[00534] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSGYMNVWRQAPGK
GLEWVIGINGATYYASWAKGRFTISRDNKTTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGD
IWGQGTLVTVSS

[00535] Sequência de aminoácidos de região variável LCVR37 de cadeia leve (SEQ ID NO:78)

[00536] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAP
KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSTTLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSAVVF
GGTKLTVL

[00537] Sequência de aminoácidos de região variável HCVR38 de cadeia pesada (SEQ ID NO:79)

[00538] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGK
GLEWVAVISFDGSIKYSVDSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARD
LNYYDSSGYHYKYYGMAVWGQGTTVTVSS

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para o tratamento ou redução da incidência de enxaqueca em um indivíduo **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um anticorpo monoclonal que inibe a via do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) a uma concentração de 150 mg/mL,

em que o anticorpo monoclonal compreende uma CDR H1 como apresentada na SEQ ID: 3; uma CDR H2 como apresentada na SEQ ID NO: 4; uma CDR H3 como apresentada na SEQ ID NO: 5; uma CDR L1 como apresentada na SEQ ID NO: 6; uma CDR L2 como apresentada na SEQ ID NO: 7; e uma CDR L3 como apresentada na SEQ ID NO: 8.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição é uma formulação subcutânea ou intravenosa.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida composição está contida em uma seringa pré-preenchida em um volume de menos do que 2 mL.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a referida composição está contida em uma seringa pré-preenchida em um volume de 1,5 mL.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo monoclonal a uma concentração de 225 mg/1,5 mL.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a enxaqueca é enxaqueca crônica.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a enxaqueca é enxaqueca episódica.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o anticorpo monoclonal é humano ou humanizado.

Figura 1

Fab	K _D (nM)	K _D (nM)	K _D (nM)	K _D (mutante/parente)												
				1-37 (WT)	19-37 ^a	25-37 ^b	F27A	V28A	P29A	T30A	N31A	V32A	G33A	S34A	K35A	F37A
7E9	1.0	1.1±0.8	0.14±0.05	1.0	1.0	26	7	9	41	1256	69	4	3598			
8B6	1.1	1.5±1.2	0.45±0.08	1.0	1.0	9	2.2	3	5	496	26	3	2527			
10A8	2.1	2.4±1.4	1.0±0.2	1.0	1.0	9	4	4	11	36	82	13	2152			
7D11	4.4	10±7	3.4±0.4	1.1	1.0	7	4	5	5	86	18	1.4	420			
6H2	9.3	7.8±0.2	8.5±0.5	0.9	1.0	1.0	0.8	4	11	14	0.5	1.0				
4901	60.5	52±12	296±115	0.8	0.8	0.2	0.2	0.3	0.9	1.3	0.8	0.3				
14E10	79.7	91±3	117.4±0.7	0.8	0.8	11	3	18	2	1	3	0.4 ^b				
9B8	84.7	76±20	96±28	0.8	0.8	0.6	0.6	0.7	0.6	1.3	4	0.4 ^b				
13C2	94.4	86±13	137±5	0.7	0.7	0.5	0.4	0.6	0.2	0.9	1.1	0.4 ^b				
14A9	148.4	219±114	246±20	0.8	0.7	0.7	0.5	0.8	0.7	1.6	1.3	6				
6D5	209.9	207±26	378±22	0.8	0.7	0.5	0.4	0.6	0.5	3	1.1	5				
1C5	296.4	223±51	430±173	0.8	0.8	0.6	0.4	0.6	0.6	1.1	1.1	5				

Figura 2A

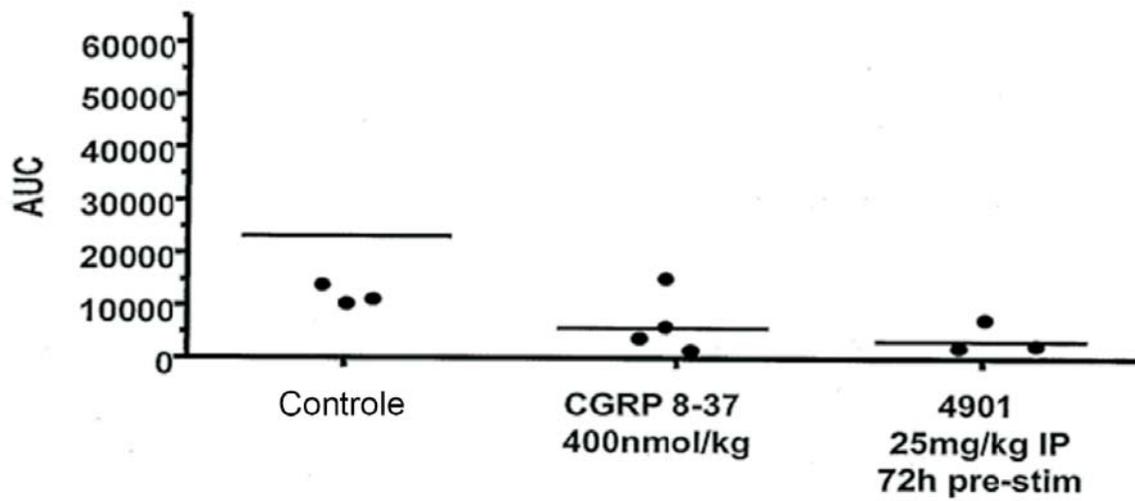


Figura 2B

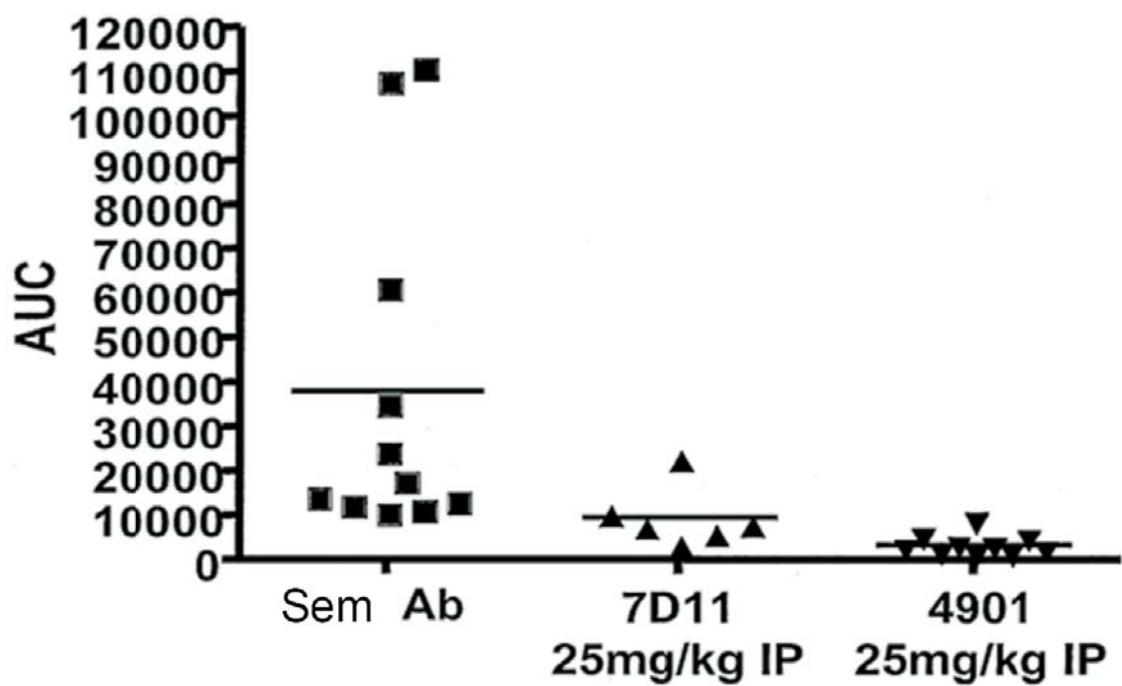


Figura 3

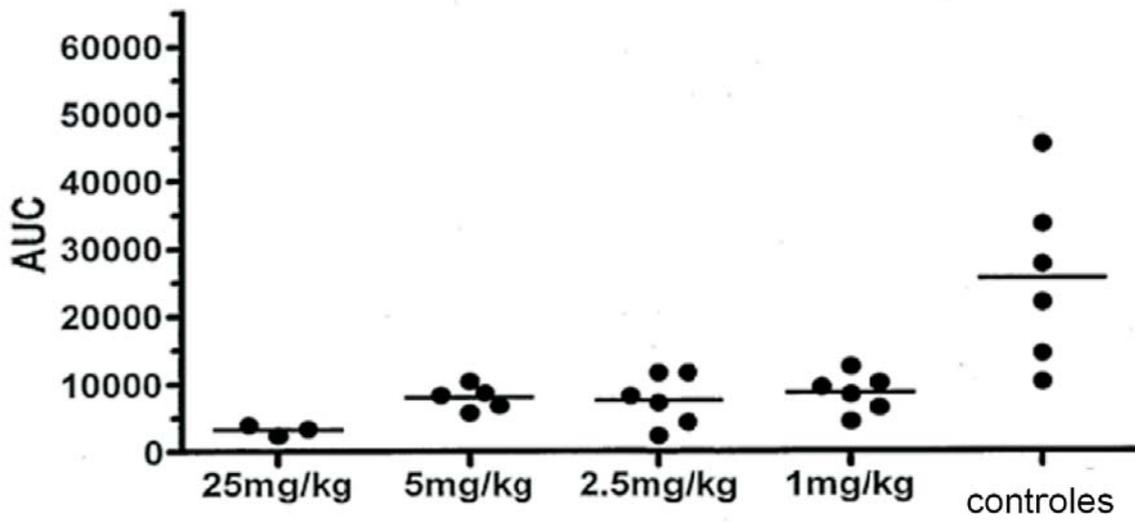


Figura 4A

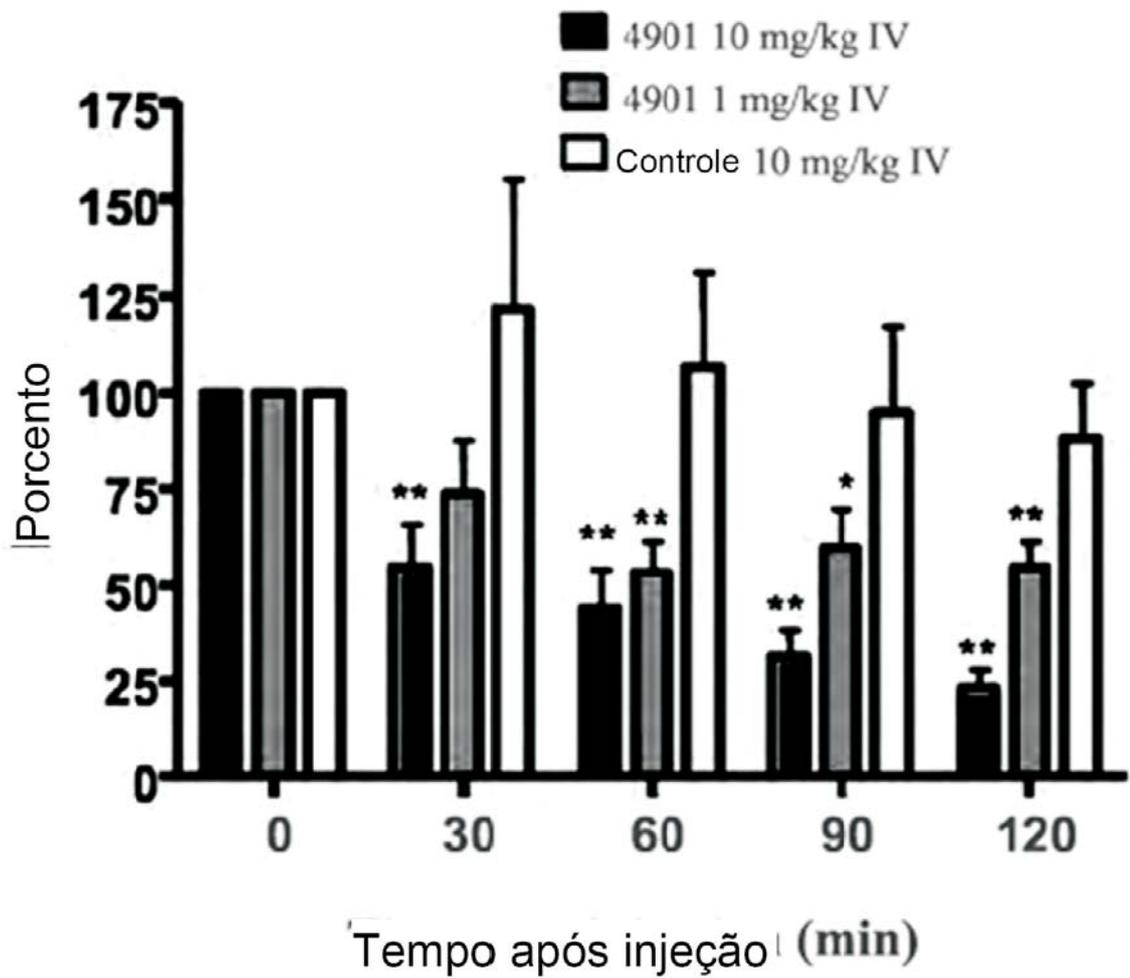


Figura 4B

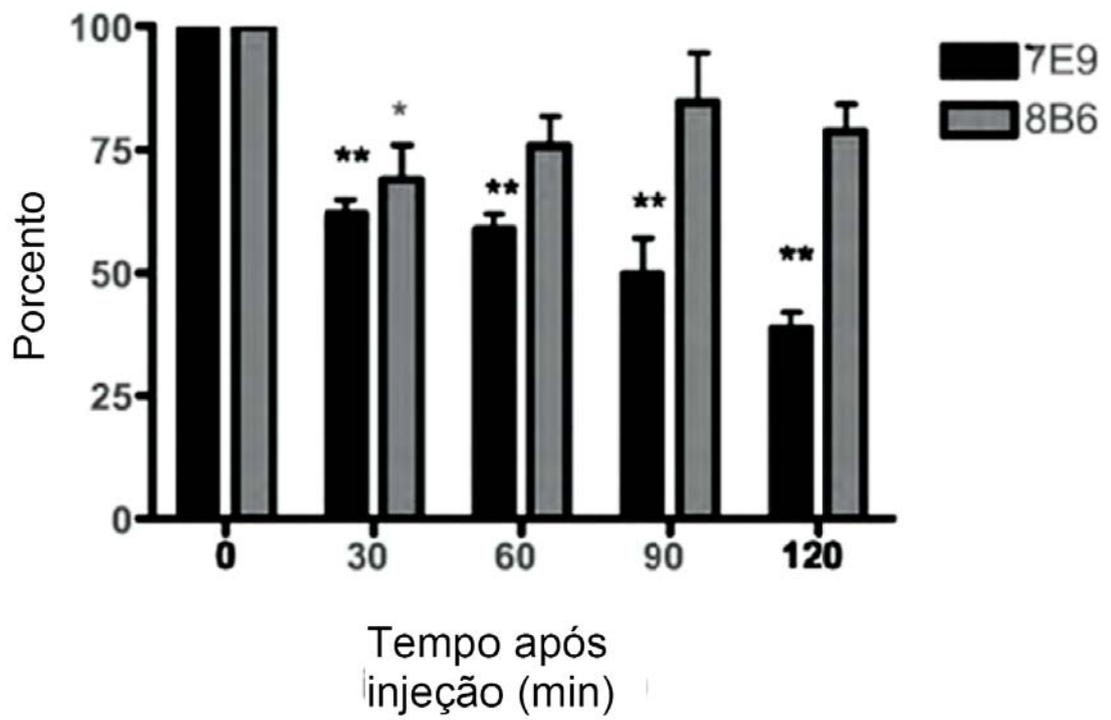


Figura 5

Bold=Kabat CDR
Sublinhado=Chothia CDR

Cadeia pesada G1

```

1           5           10           15           20           25           30
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S      H1
31           35           40           45           50           55           60
N Y W I S W V R Q A P G K G L E W V A E I R S E S D A S A T      H2
61           65           70           75           80           85           90
H Y A E A V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A
91           95           100           105           110           115           120
E D T A V Y Y C L A Y F D Y G L A I Q N Y W G Q G T L V T V      H3
121 122
S S

```

Cadeia leve G1

```

1           5           10           15           20           25           30
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C K A S K R V T      L1
31           35           40           45           50           55           60
T Y V S W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S N R Y L G I P A      L2
61           65           70           75           80           85           90
R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C S Q
91           95           100           105           107
S Y N Y P Y T F G Q G T K L E I K      L3

```

Figura 6

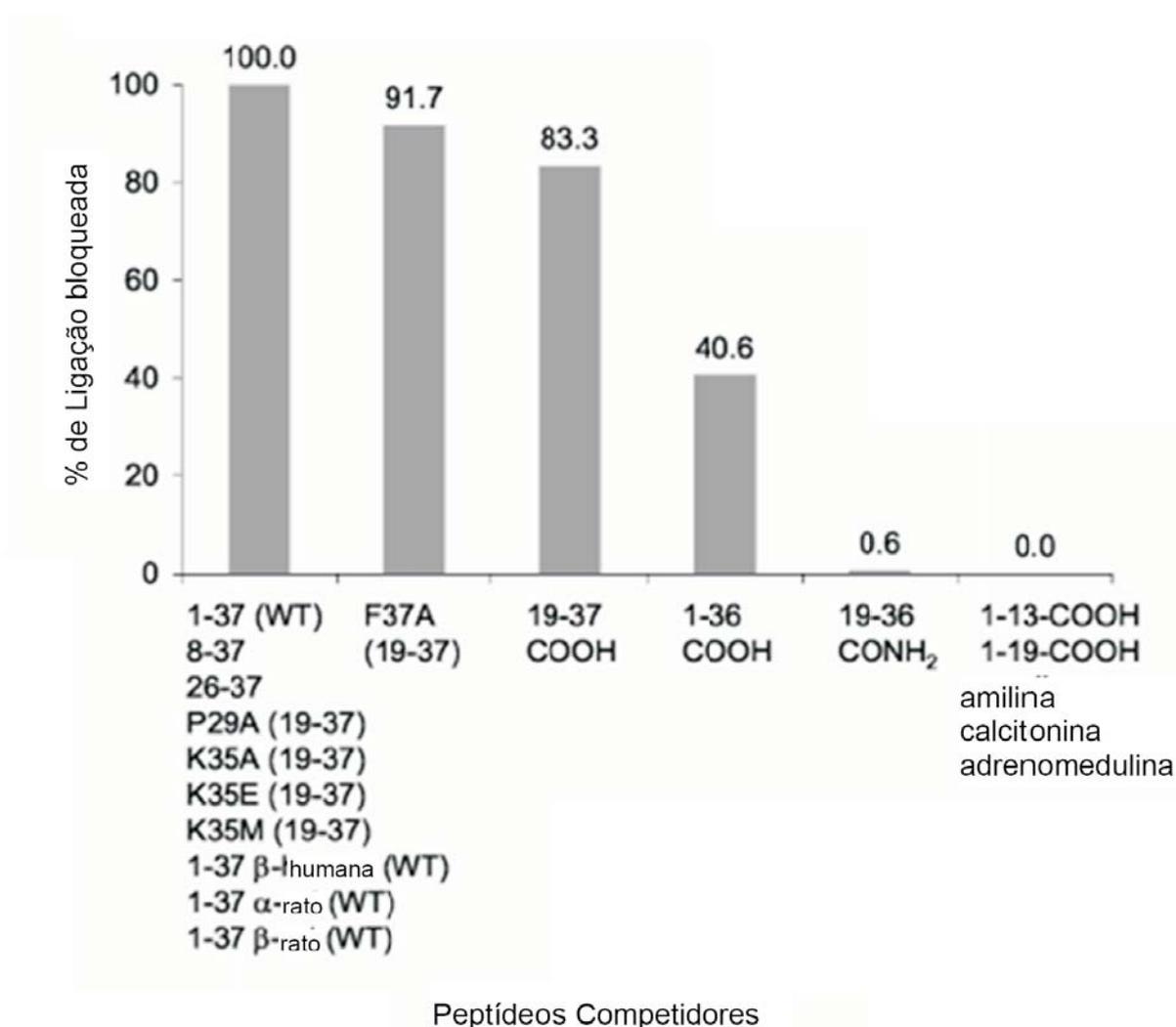


Figura 7

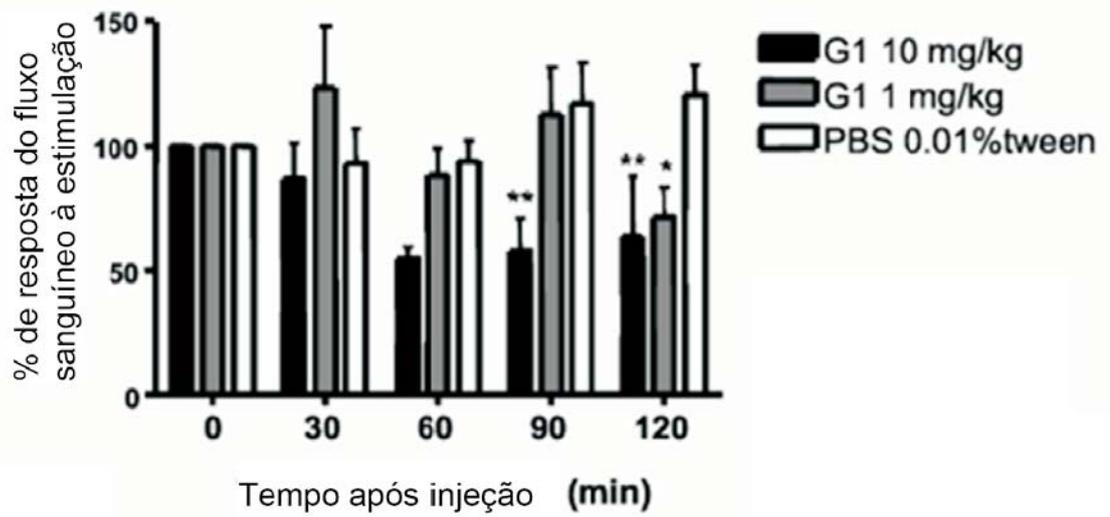


Figura 8A

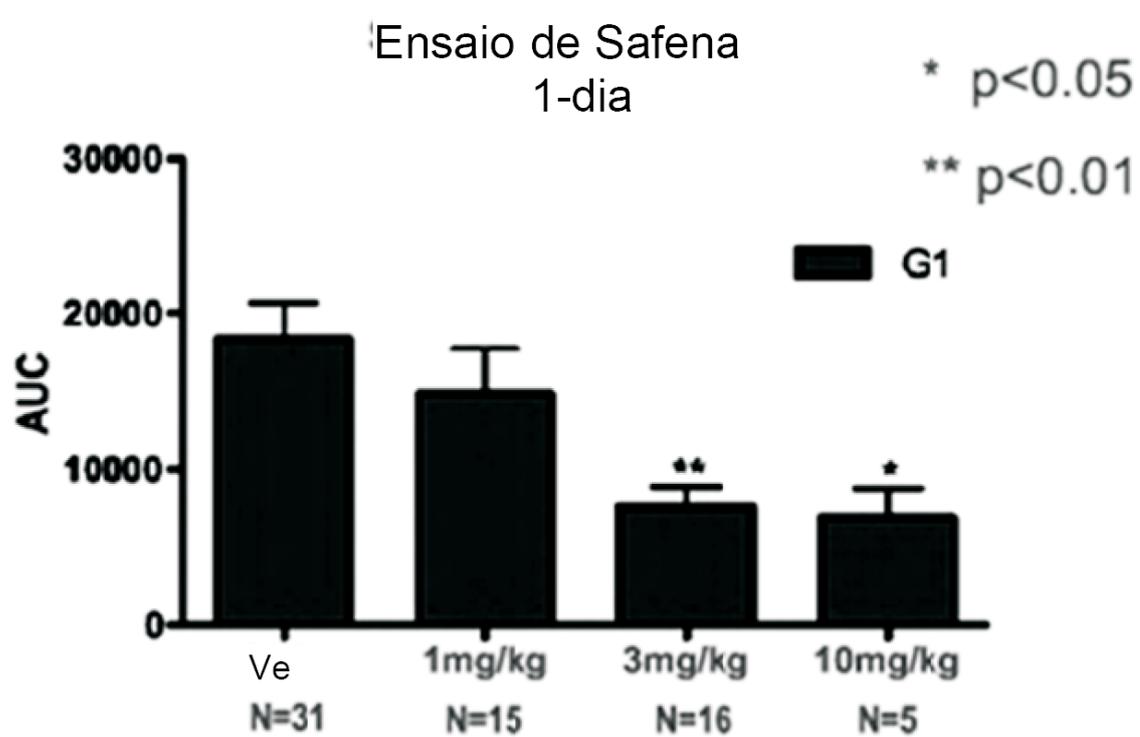


Figura 8B

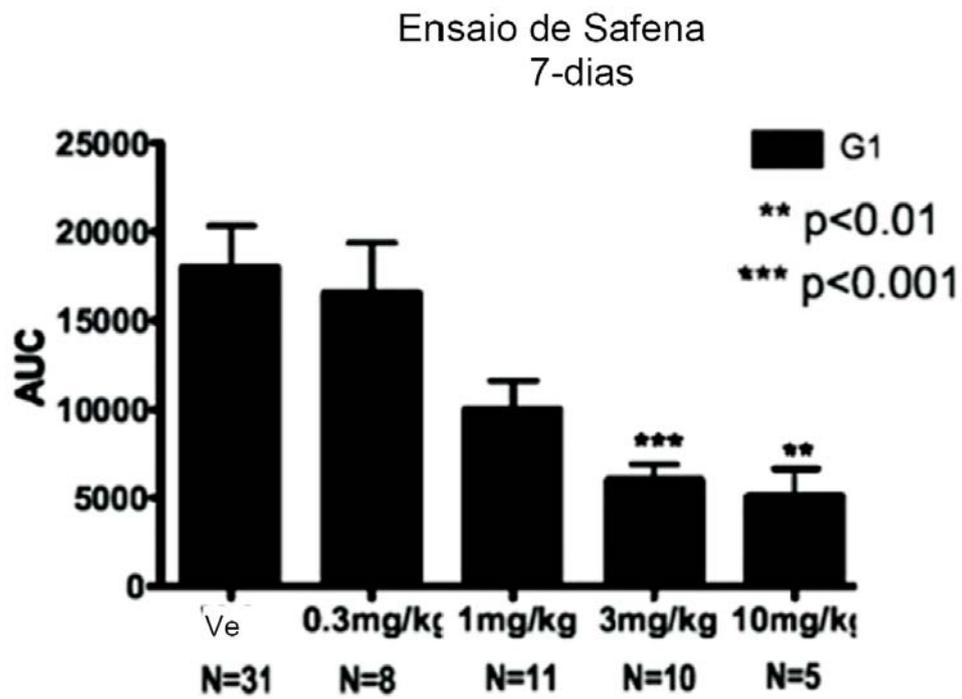


Figura 8C

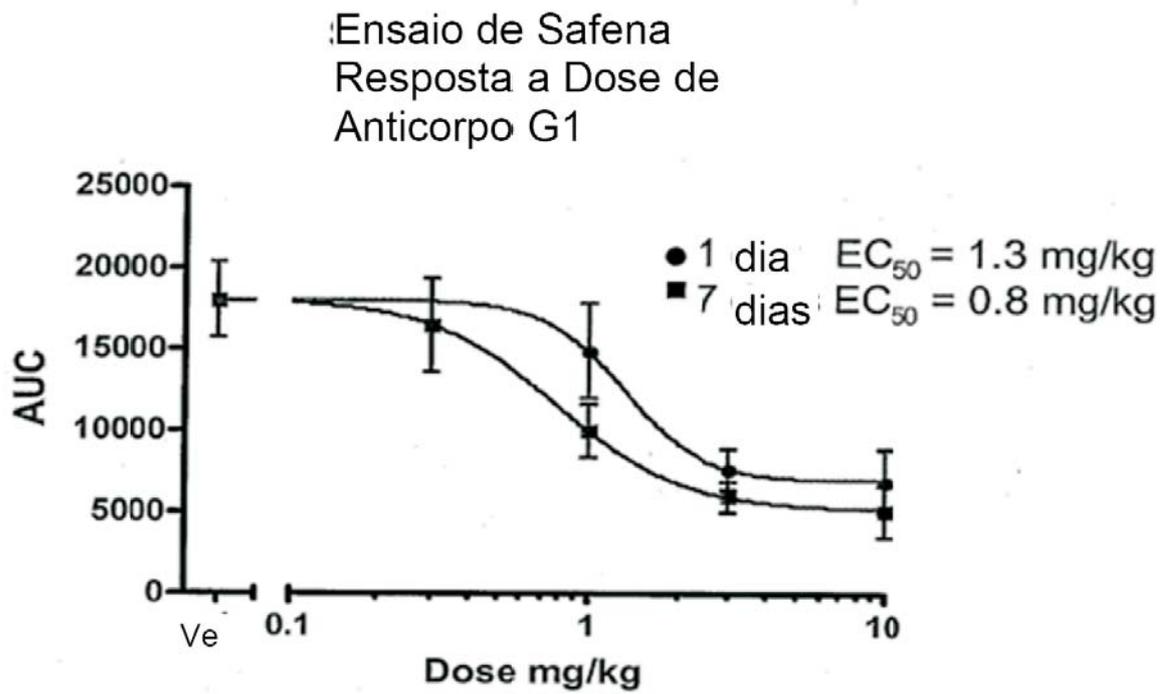


Figura 9

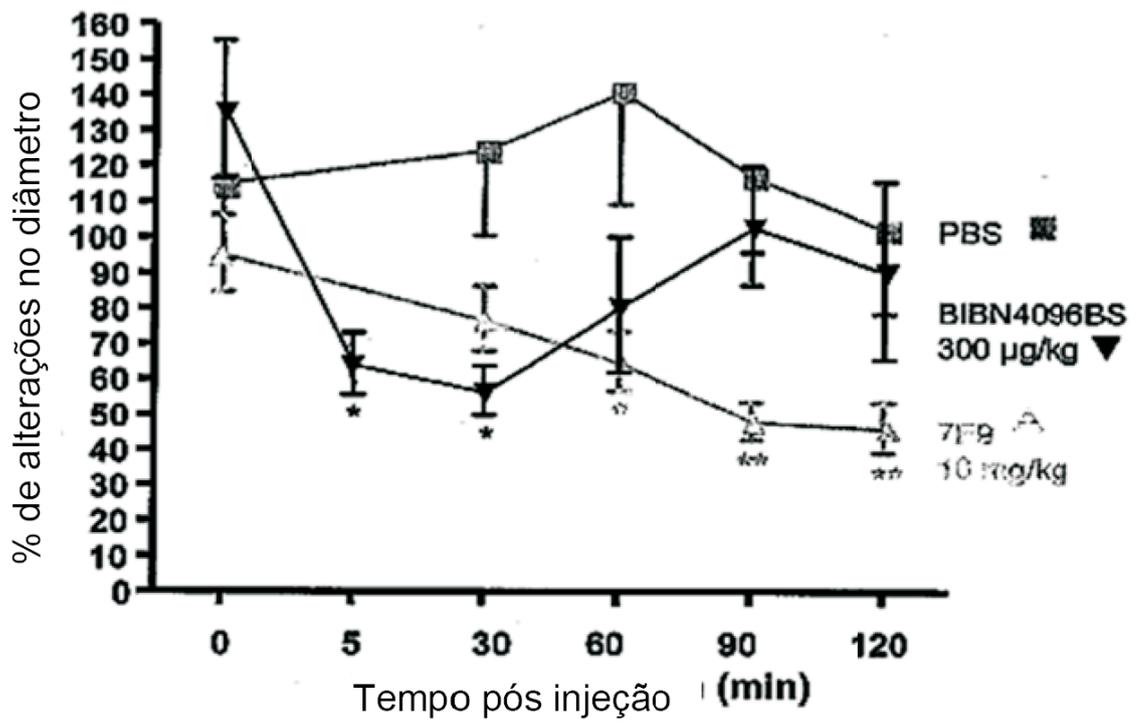


Figura 10

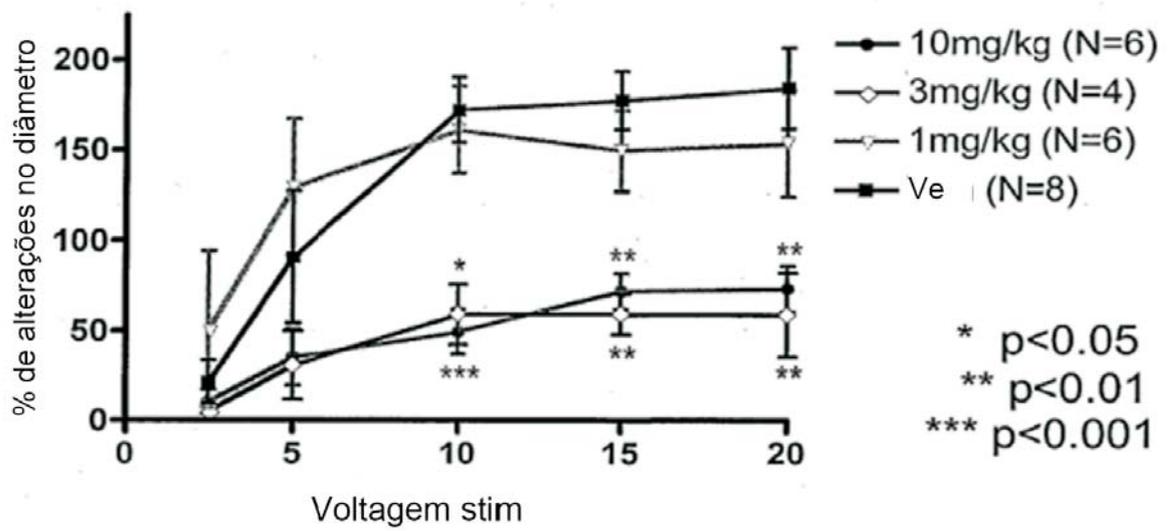


Figura 11A

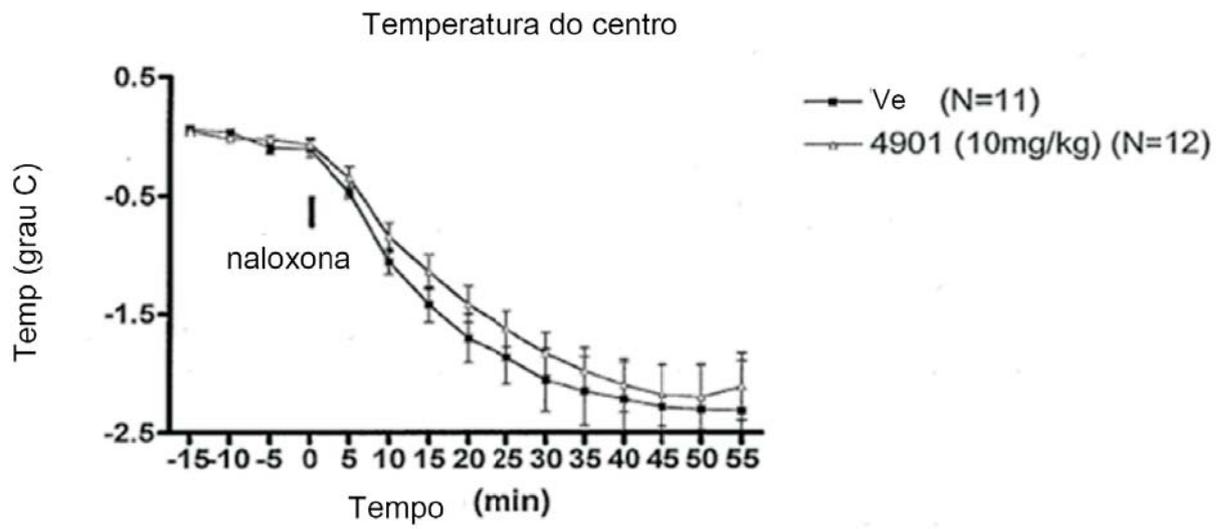
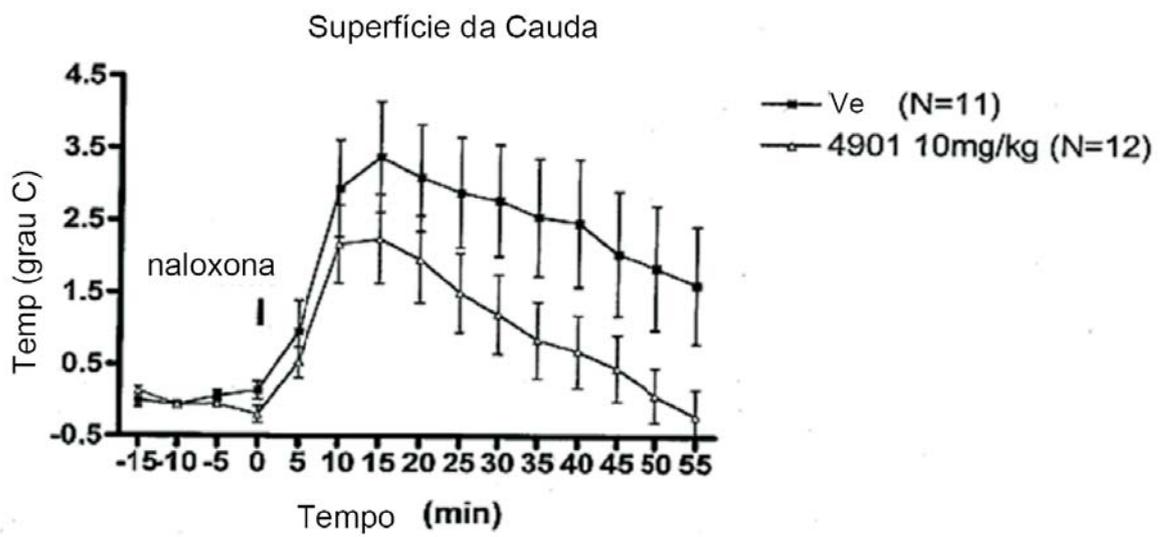


Figura 11B



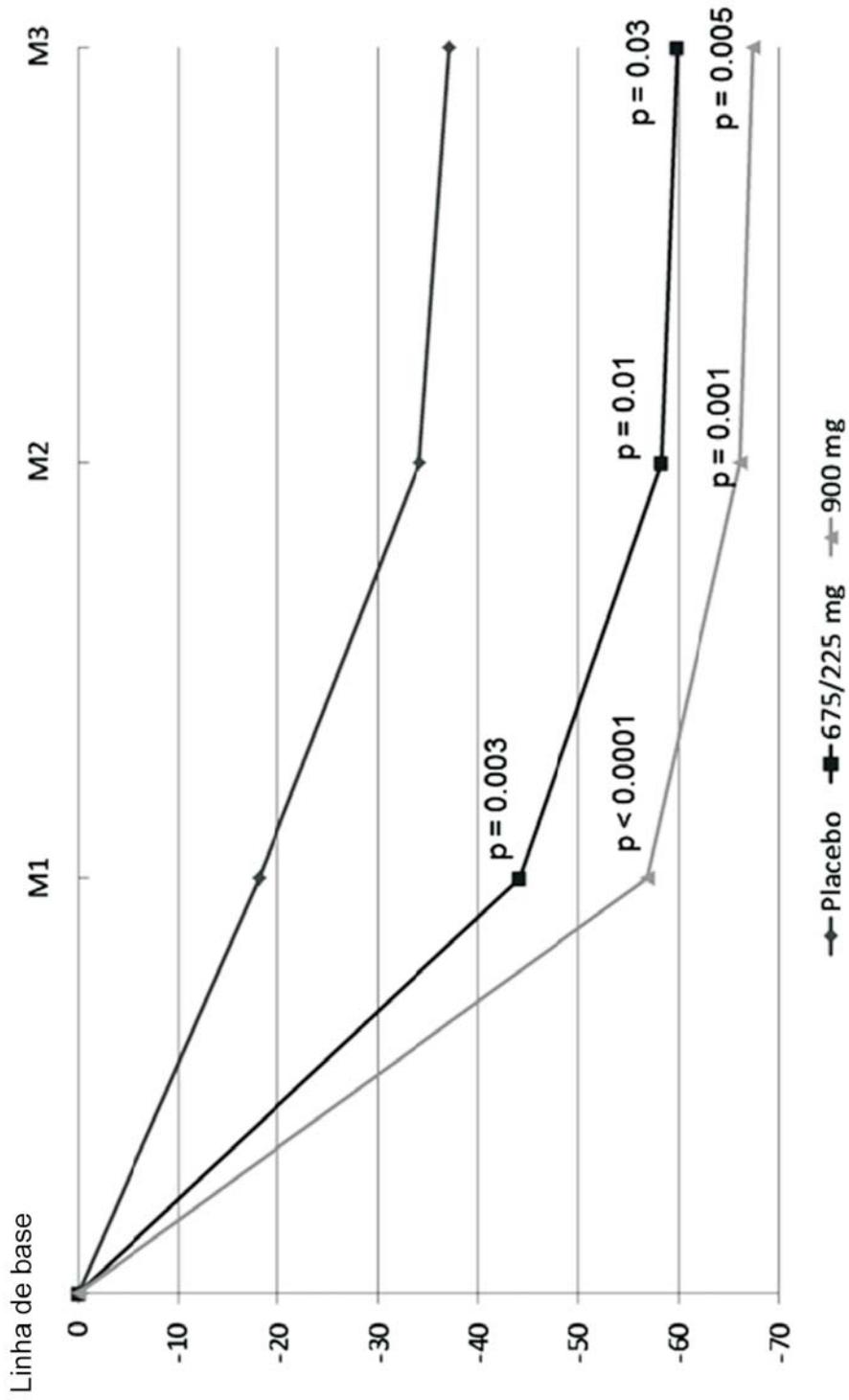


Figura 12

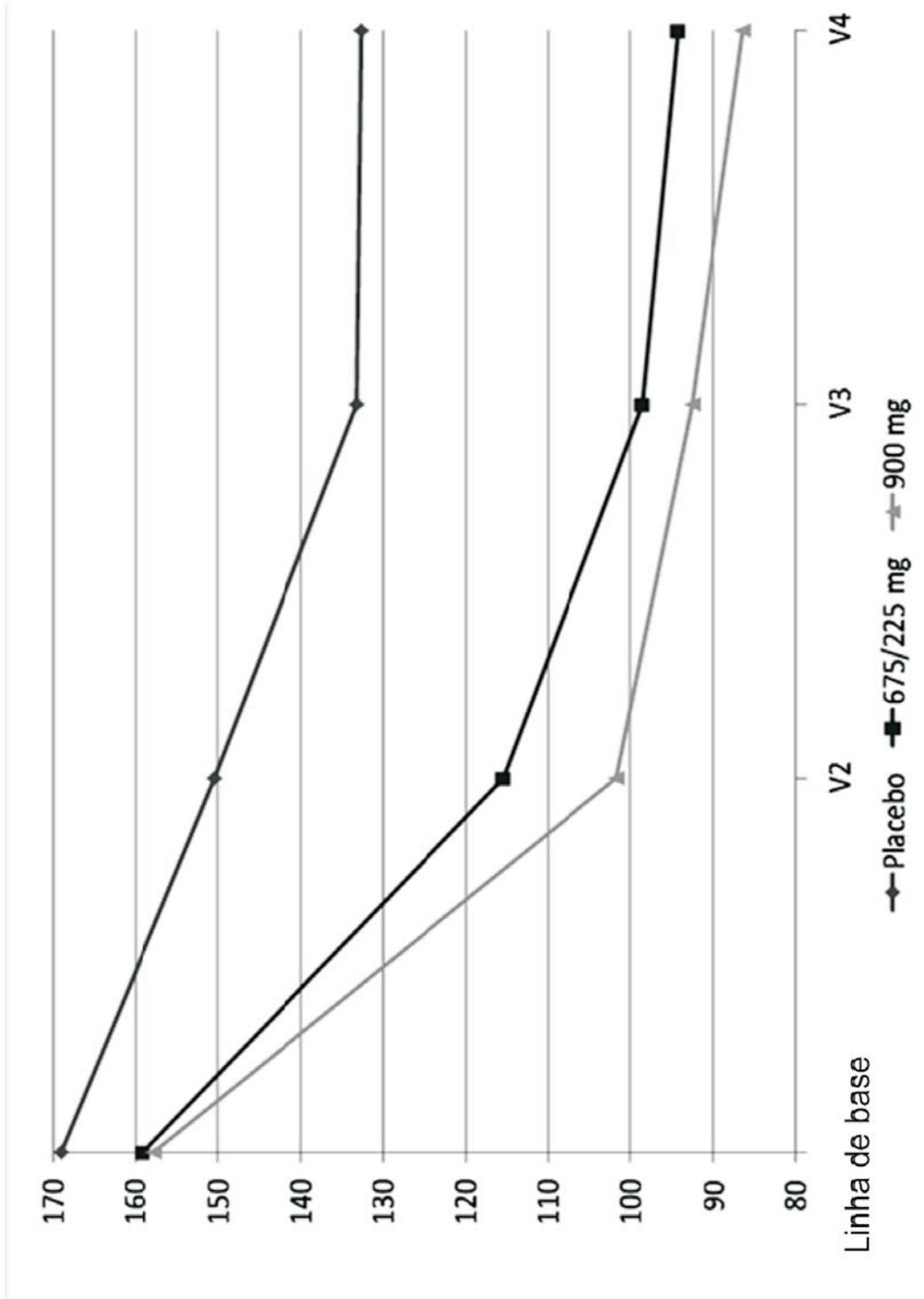


Figura 13

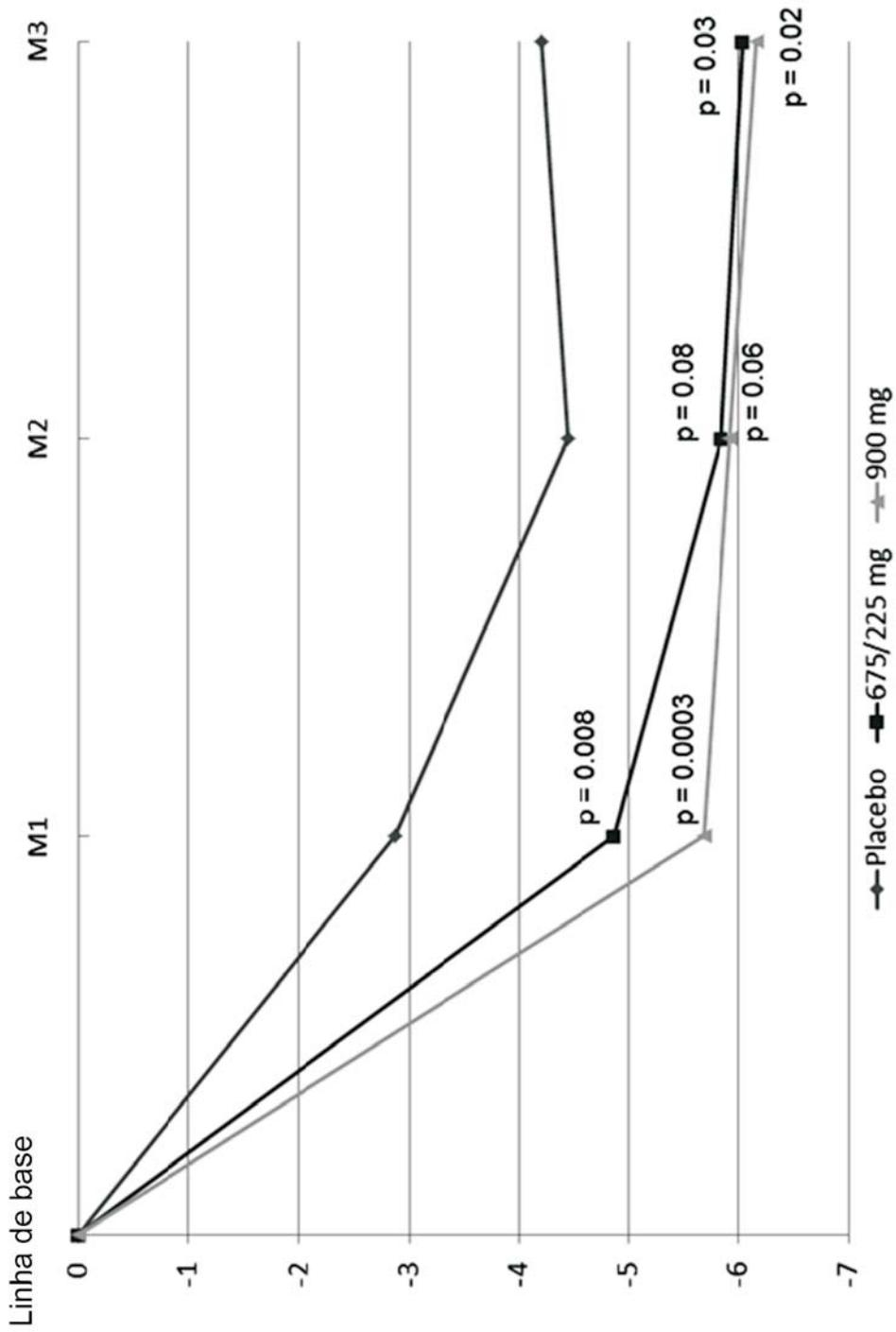


Figura 14

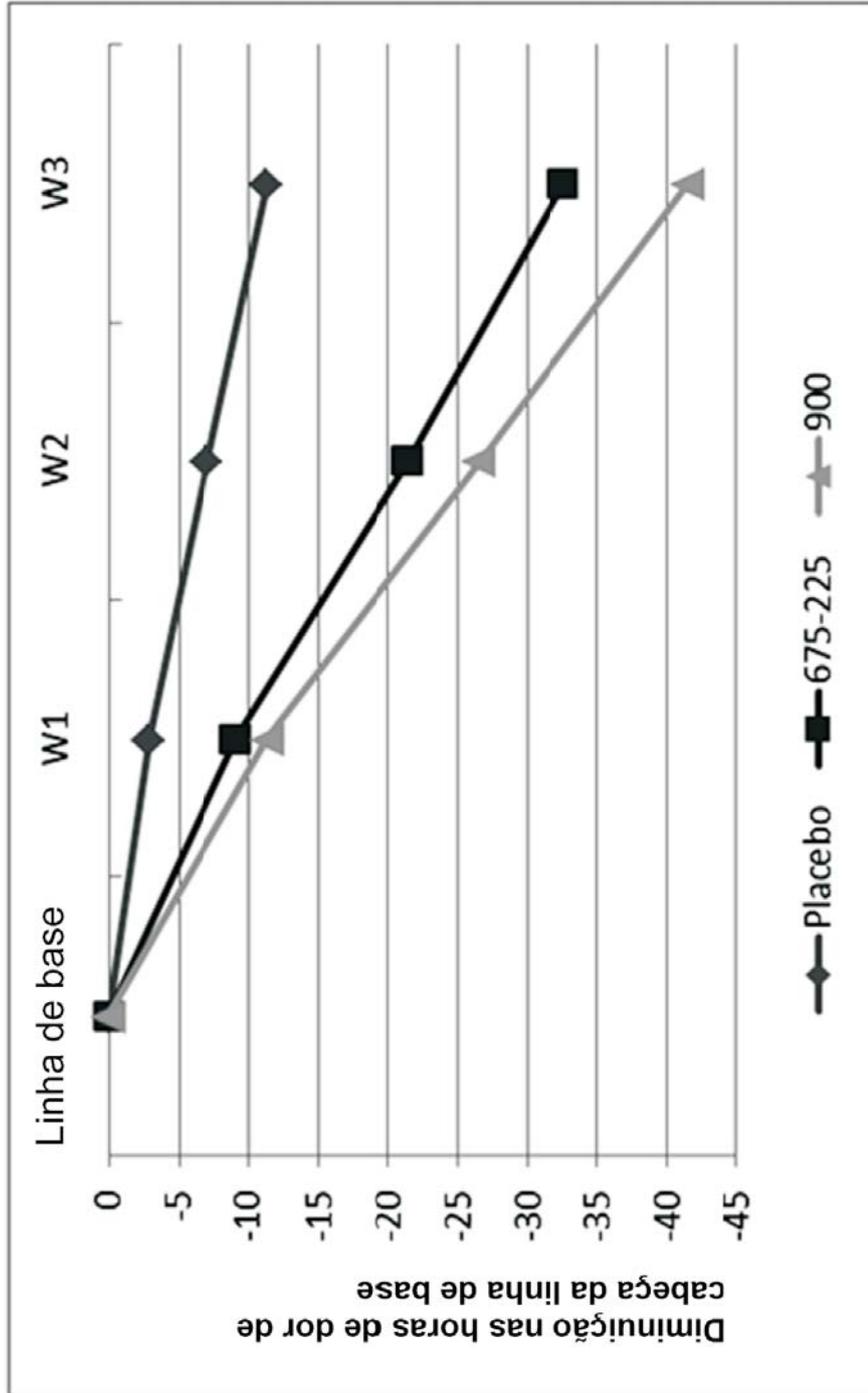


Figura 15

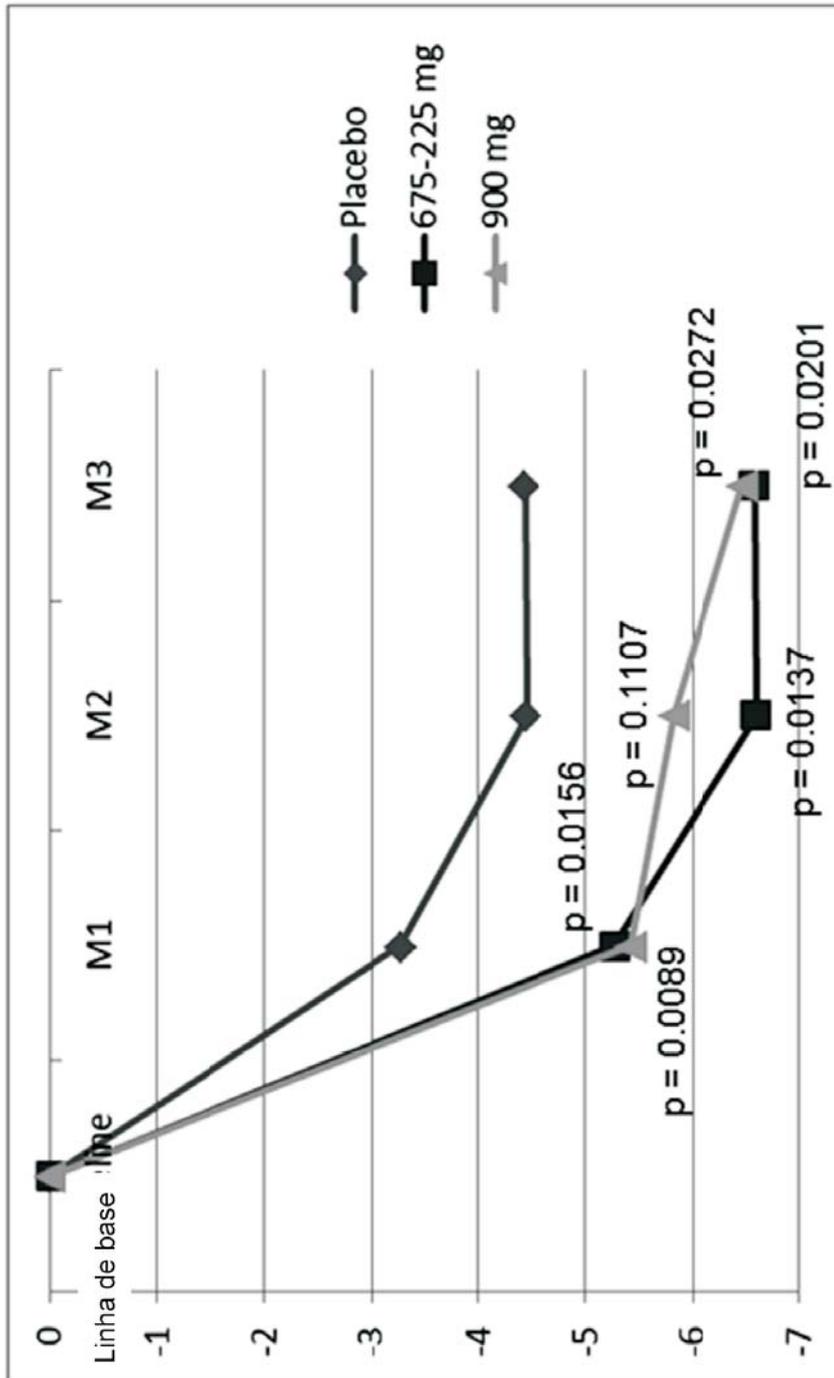


Figura 16

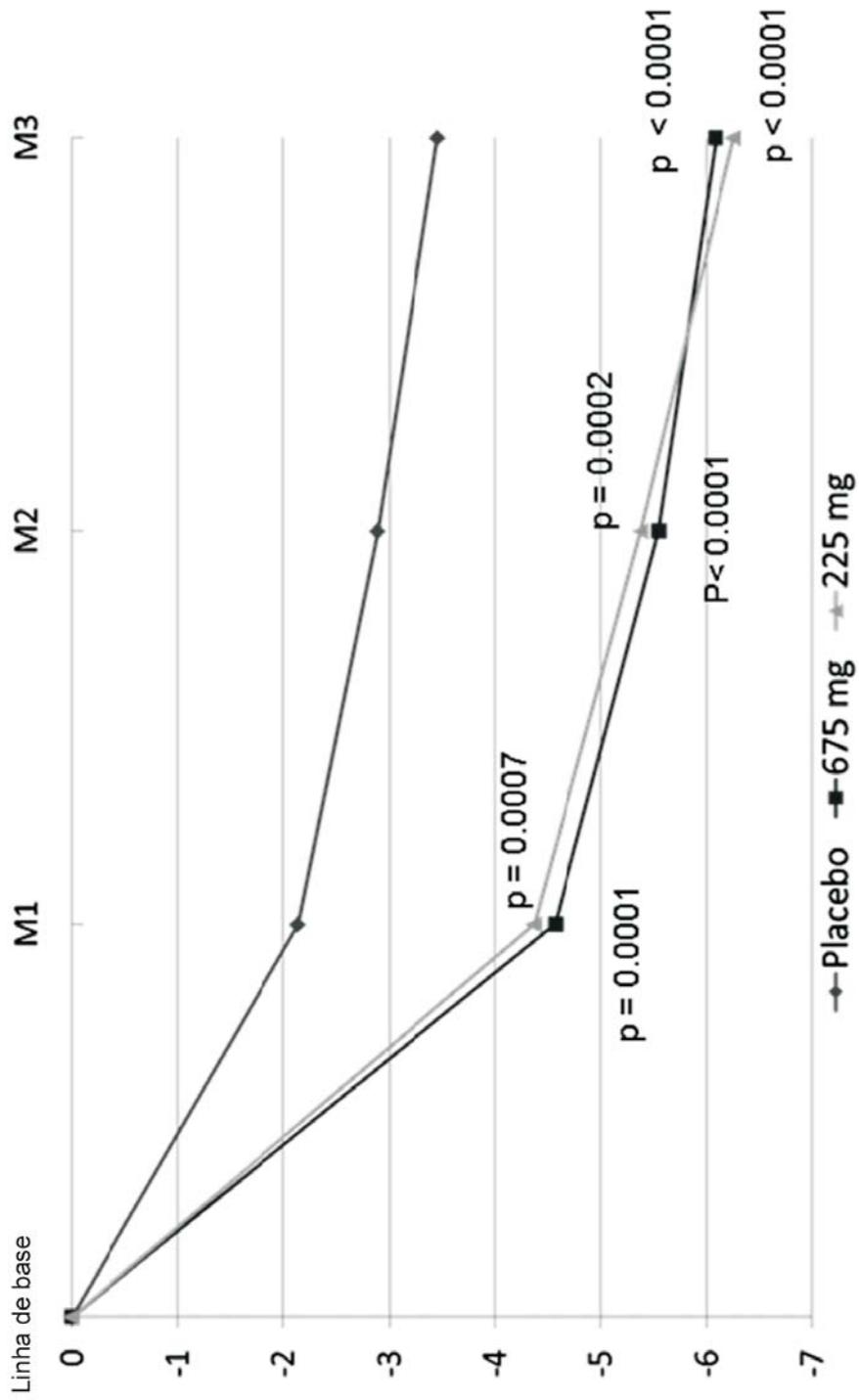


Figura 17

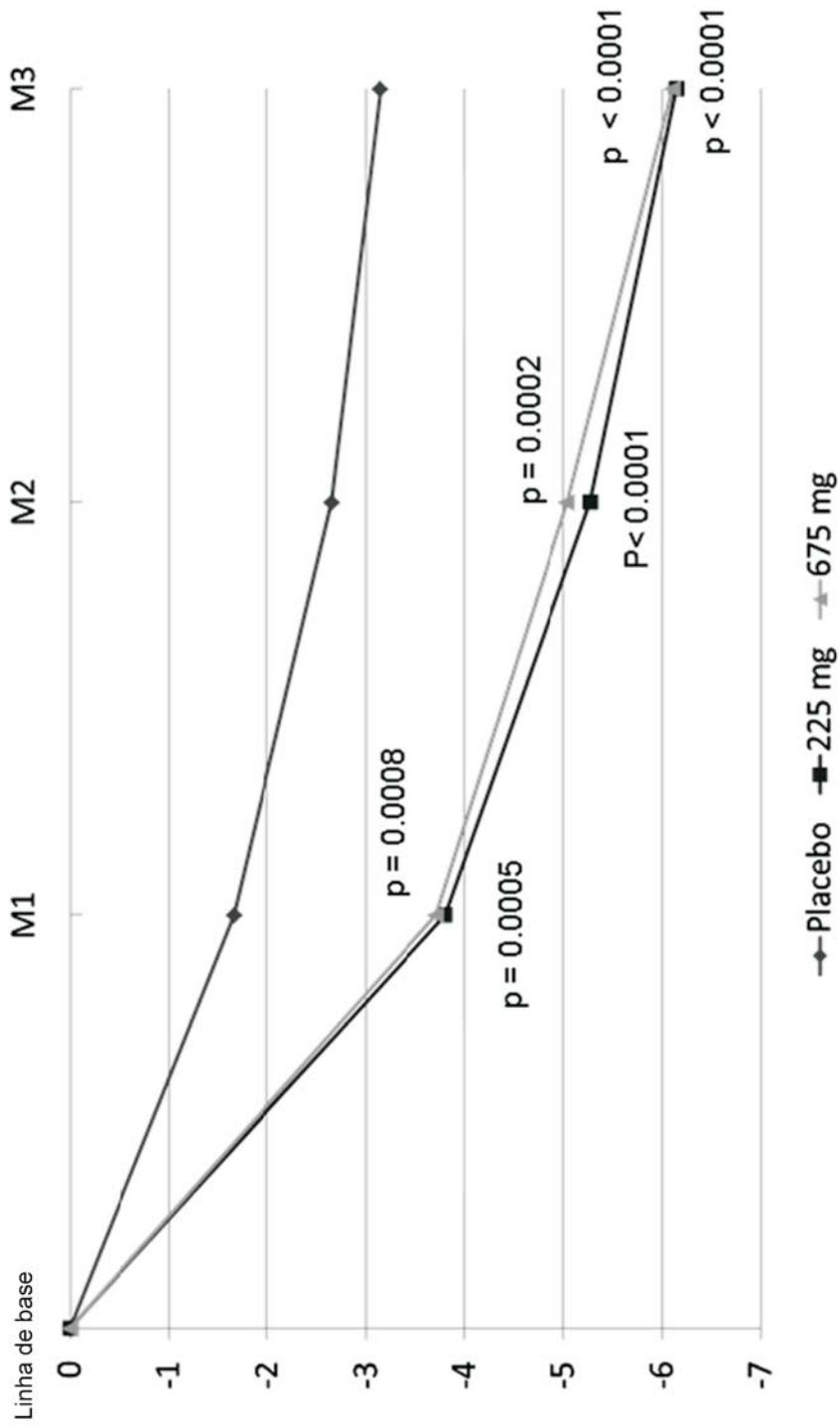


Figura 18