

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6952888号
(P6952888)

(45) 発行日 令和3年10月27日(2021.10.27)

(24) 登録日 令和3年9月30日(2021.9.30)

(51) Int.Cl.	F I
C07K 16/26 (2006.01)	C O 7 K 16/26 Z N A
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A61P 25/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A61P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/04
A61P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/06

請求項の数 21 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-517489 (P2020-517489)	(73) 特許権者	594197872
(86) (22) 出願日	平成30年9月20日 (2018.9.20)		イーライ リリー アンド カンパニー
(65) 公表番号	特表2020-535167 (P2020-535167A)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462
(43) 公表日	令和2年12月3日 (2020.12.3)		85 インディアナポリス リリー コー
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/051898		ポレイト センター (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02019/067293	(74) 代理人	100145403
(87) 国際公開日	平成31年4月4日 (2019.4.4)		弁理士 山尾 憲人
審査請求日	令和2年3月26日 (2020.3.26)	(74) 代理人	100126778
(31) 優先権主張番号	62/565,278		弁理士 品川 永敏
(32) 優先日	平成29年9月29日 (2017.9.29)	(74) 代理人	100162684
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 呉 英燦
		(74) 代理人	100162695
			弁理士 釜平 双美
		(74) 代理人	100156155
			弁理士 水原 正弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PACAP抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

重鎖可変領域(HCVR)および軽鎖可変領域(LCVR)を含むヒト下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドに結合する抗体であって、前記HCVRが、相補性決定領域(CDR)HC DR1、HC DR2、およびHC DR3を含み、前記LCVRが、CDR LC DR1、LC DR2、およびLC DR3を含み、HC DR1のアミノ酸配列が、配列番号3であり、HC DR2のアミノ酸配列が、配列番号4であり、HC DR3のアミノ酸配列が、配列番号5であり、LC DR1のアミノ酸配列が、配列番号6であり、LC DR2のアミノ酸配列が、配列番号7であり、LC DR3のアミノ酸配列が、配列番号8であって、

(1) HC DR2が、残基13にアスパラギン酸を含み、HC DR3が、残基8にアスパラギン酸を含み、LC DR1が、残基7にセリンを含み、LC DR2が、残基7にロイシンを含む抗体、

(2) HC DR2が、残基13にアラニンを含み、HC DR3が、残基8にスレオニンを含み、LC DR1が、残基7にトリプトファンを含み、LC DR2が、残基7にフェニルアラニンを含む抗体、

(3) HC DR2が、残基13にグルタミン酸を含み、HC DR3が、残基8にスレオニンを含み、LC DR1が、残基7にトリプトファンを含み、LC DR2が、残基7にフェニルアラニンを含む抗体、ならびに

(4) HC DR2が、残基13にグルタミンを含み、HC DR3が、残基8にスレオニ

ンを含み、LCDR1が、残基7にトリプトファンを含み、LCDR2が、残基7にフェニルアラニンを含む抗体から選択される、抗体。

【請求項2】

HCDR2が、残基13にアスパラギン酸を含み、HCDR3が、残基8にアスパラギンを含み、LCDR1が、残基7にセリンを含み、LCDR2が、残基7にロイシンを含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

HCDR2が、残基13にアラニンを含み、HCDR3が、残基8にスレオニンを含み、LCDR1が、残基7にトリプトファンを含み、LCDR2が、残基7にフェニルアラニンを含む、請求項1に記載の抗体。

10

【請求項4】

HCDR2が、残基13にグルタミン酸を含み、HCDR3が、残基8にスレオニンを含み、LCDR1が、残基7にトリプトファンを含み、LCDR2が、残基7にフェニルアラニンを含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項5】

HCDR2が、残基13にグルタミンを含み、HCDR3が、残基8にスレオニンを含み、LCDR1が、残基7にトリプトファンを含み、LCDR2が、残基7にフェニルアラニンを含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項6】

重鎖可変領域(HCVR)および軽鎖可変領域(LCVR)を含み、前記HCVRのアミノ酸配列が、配列番号9であり、前記LCVRのアミノ酸配列が、配列番号10である、請求項1に記載の抗体であって、

20

(1) HCVRが、残基62にアスパラギン酸、および残基104にアスパラギンを含み、LCVRが、残基30にセリン、および残基55にロイシンを含む抗体、

(2) HCVRが、残基62にアラニン、および残基104にスレオニンを含み、LCVRが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む抗体、

(3) HCVRが、残基62にグルタミン酸、および残基104にスレオニンを含み、LCVRが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む抗体、
ならびに

30

(4) HCVRが、残基62にグルタミン、および残基104にスレオニンを含み、LCVRが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む抗体から選択される、抗体。

【請求項7】

HCVRが、残基62にアスパラギン酸、および残基104にアスパラギンを含み、LCVRが、残基30にセリン、および残基55にロイシンを含む、請求項6に記載の抗体。

【請求項8】

HCVRが、残基62にアラニン、および残基104にスレオニンを含み、LCVRが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む、請求項6に記載の抗体。

40

【請求項9】

HCVRが、残基62にグルタミン酸、および残基104にスレオニンを含み、LCVRが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む、請求項6に記載の抗体。

【請求項10】

HCVRが、残基62にグルタミン、および残基104にスレオニンを含み、LCVRが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む、請求項6に記載の抗体。

【請求項11】

50

重鎖（HC）および軽鎖（LC）を含むヒト下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドに結合する抗体であって、前記HCのアミノ酸配列が、配列番号1であり、前記LCのアミノ酸配列が、配列番号2であって、

（1）HCが、残基62にアスパラギン酸、残基104にアスパラギン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCが、残基30にセリン、および残基55にロイシンを含む抗体、

（2）HCが、残基62にアラニン、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む抗体、

（3）HCが、残基62にグルタミン酸、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む抗体、ならびに

（4）HCが、残基62にグルタミン、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む抗体
から選択される、抗体。

【請求項12】

HCが、残基62にアスパラギン酸、残基104にアスパラギン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCが、残基30にセリン、および残基55にロイシンを含む、請求項11に記載の抗体。

【請求項13】

HCが、残基62にアラニン、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む、請求項11に記載の抗体。

【請求項14】

HCが、残基62にグルタミン酸、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む、請求項11に記載の抗体。

【請求項15】

HCが、残基62にグルタミン、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCが、残基30にトリプトファン、および残基55にフェニルアラニンを含む、請求項11に記載の抗体。

【請求項16】

請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体を含む、原発性頭痛、二次性頭痛、および片頭痛のうちの1つの治療剤。

【請求項17】

請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体を含む、三叉神経・自律神経性頭痛の治療剤。

【請求項18】

前記三叉神経・自律神経性頭痛が、反復性群発頭痛、慢性群発頭痛、発作性片側頭痛、および片側神経痛様頭痛発作のうちの1つである、請求項17に記載の治療剤。

【請求項19】

原発性頭痛、二次性頭痛、および片頭痛のうちの1つの治療のための薬物の製造に使用するための、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項20】

三叉神経・自律神経性頭痛の治療のための薬物の製造に使用するための、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項21】

前記三叉神経・自律神経性頭痛が、反復性群発頭痛、慢性群発頭痛、発作性片側頭痛、および片側神経痛様頭痛発作のうちの1つである、請求項20に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬の分野に属する。具体的には、本発明は、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)に対する抗体、そのような抗PACAP抗体を含む組成物、ならびに原発性頭痛(三叉神経・自律神経性頭痛を含む)、二次性頭痛、および片頭痛(慢性片頭痛を含む)を含む疼痛の治療のためのそのような抗体の使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)は、三叉神経血管系、三叉神経節、脊髄、視床下部、および下垂体を含む神経系全体に分布する神経ペプチドである。PACAPは、少なくとも2つの -アミド化活性型で存在し、PACAP38(配列番号13)は、38個のアミノ酸を含み、典型的には哺乳動物組織内のPACAPの最大90%に相当するより一般的な活性型であり、PACAP27(配列番号14)は、PACAP38と同じ27個のN末端アミノ酸を含む。PACAPは、神経保護、神経調節、神経性炎症、および侵害受容における役割、ならびに頭痛および片頭痛を含む疼痛を引き起こす役割を果たすと考えられている。

【0003】

頭痛および片頭痛は、年間3700万人の患者に影響を与え、3分の2超が未治療であると推定されている。原発性頭痛(複数可)は、異なるまたは別個の疾患または障害の結果として生じるものではない頭痛として分類される一方で、二次性頭痛(複数可)は、異なるまたは別個の根本原因(例えば、外傷、疾病、または他の障害)の結果として生じる頭痛として分類される。三叉神経・自律神経性頭痛(「TAC」)は、反復性群発頭痛および慢性群発頭痛、発作性片側頭痛、持続性片側頭痛、ならびに片側神経痛様頭痛発作を含む原発性頭痛として分類される。片頭痛(複数可)は、「前兆を有しない」片頭痛(以前は「普通型片頭痛」と呼ばれた)および「前兆を有する」片頭痛(以前は「古典的片頭痛」と呼ばれた)を指す。慢性片頭痛(複数可)は、1ヶ月当たり15日間以上の頭痛があり、そのうち少なくとも8日間が片頭痛であるものとして分類される。片頭痛の発生率が1ヶ月当たり2回以上の発症である場合、または片頭痛が患者の日課に著しく干渉する、かつ/もしくは急性薬物が有効ではない場合には、医師は、予防的治療選択肢を考慮することが推奨されている。しかしながら、現在まで、片頭痛予防のための治療選択肢は有効ではないことが多く、現在の予防的および急性治療選択肢(例えば、降圧剤、抗けいれん剤、抗うつ剤)は、低い有効性、および関連する身体障害性の副作用を有する。

【0004】

PACAPの構造は、抗PACAP抗体と同様に、当該技術分野で周知である(例えば、A. Miyata, A. et al., Biochem Biophys Res Commun 170: 643-648 (1990)を参照されたい)。例えば、米国特許第5,486,472A号、国際特許出願公開WO/2012/106407A3号、および米国特許出願公開第2016-304604号は全て、様々な抗PACAP抗体およびそれらの潜在的な使用を開示している。しかしながら、現在まで、PACAPを標的とするいかなる抗体も、治療的使用には承認されていない。したがって、代替的な抗PACAP抗体に対する必要性が依然として存在している。具体的には、PACAPを高い効力で中和し、持続した作用期間を提供し、原発性および二次性頭痛ならびに片頭痛(慢性片頭痛を含む)を含む疼痛を治療することができる、代替的な抗PACAP抗体に対する必要性が依然として存在している。全ての治療的処置と同様に、安全性および毒性が、依然として制限となっており、代替的な抗PACAP抗体は、許容できない免疫原性に付随してはならない。したがって、ヒトにおいて低減した免疫原性のリスクを提示する代替的な抗PACAP抗体に対する必要性が依然として存在している。そのような抗PACAP抗体はまた、好ましくは、開発、製造、および製剤化を促進するための良好な物理化学的特性も持つ。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0005】

本発明は、重鎖可変領域（HCVR）および軽鎖可変領域（LCVR）を含むヒトPACAPに結合する抗体を提供し、HCVRは、相補性決定領域（CDR）HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含み、LCVRは、CDR LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含み、HCDR1のアミノ酸配列は、配列番号3であり、HCDR2のアミノ酸配列は、配列番号4であり、HCDR3のアミノ酸配列は、配列番号5であり、LCDR1のアミノ酸配列は、配列番号6であり、LCDR2のアミノ酸配列は、配列番号7であり、LCDR3のアミノ酸配列は、配列番号8である。特定の実施形態では、HCDR2は、残基13にアスパラギン酸を含み、HCDR3は、残基8にアスパラギン酸を含み、LCDR1は、残基7にセリンを含み、LCDR2は、残基7にロイシンを含む。別の特定の実施形態では、HCDR2は、残基13にアラニンを含み、HCDR3は、残基8にスレオニンを含み、LCDR1は、残基7にトリプトファンを含み、LCDR2は、残基7にフェニルアラニンを含む。さらに特定の実施形態では、HCDR2は、残基13にグルタミン酸を含み、HCDR3は、残基8にスレオニンを含み、LCDR1は、残基7にトリプトファンを含み、LCDR2は、残基7にフェニルアラニンを含む。さらに特定の実施形態では、HCDR2は、残基13にグルタミンを含み、HCDR3は、残基8にスレオニンを含み、LCDR1は、残基7にトリプトファンを含み、LCDR2は、残基7にフェニルアラニンを含む。

10

【発明を実施するための形態】

20

【0006】

本発明の実施形態は、HCVRおよびLCVRを含むヒトPACAPに結合する抗体を提供し、HCVRのアミノ酸配列は、配列番号9であり、LCVRのアミノ酸配列は、配列番号10である。特定の実施形態では、HCVRは、残基62にアスパラギン酸および残基104にアスパラギン酸を含み、LCVRは、残基30にセリンおよび残基55にロイシンを含む。他の特定の実施形態では、HCVRは、残基62にアラニンおよび残基104にスレオニンを含み、LCVRは、残基30にトリプトファンおよび残基55にフェニルアラニンを含む。いくつかの実施形態では、HCVRは、残基62にグルタミン酸および残基104にスレオニンを含み、LCVRは、残基30にトリプトファンおよび残基55にフェニルアラニンを含む。いくつかの実施形態では、HCVRは、残基62にグルタミン酸および残基104にスレオニンを含み、LCVRは、残基30にトリプトファンおよび残基55にフェニルアラニンを含む。

30

【0007】

さらなる実施形態では、本発明は、重鎖（HC）および軽鎖（LC）を含むヒトPACAPに結合する抗体を提供し、HCのアミノ酸配列は、配列番号1であり、LCのアミノ酸配列は、配列番号2である。特定の実施形態では、HCは、残基62にアスパラギン酸、残基104にアスパラギン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCは、残基30にセリンおよび残基55にロイシンを含む。他の特定の実施形態では、HCは、残基62にアラニン、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、および残基238にアラニンを含み、LCは、残基30にトリプトファンおよび残基55にフェニルアラニンを含む。他の特定の実施形態では、HCは、残基62にグルタミン酸、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、残基238にアラニンを含み、LCは、残基30にトリプトファンおよび残基55にフェニルアラニンを含む。いくつかの特定の実施形態では、HCは、残基62にグルタミン、残基104にスレオニン、残基231にプロリン、残基237にアラニン、残基238にアラニンを含み、LCは、残基30にトリプトファンおよび残基55にフェニルアラニンを含む。

40

【0008】

本発明はさらに、本発明の抗体と、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤とを含む、薬学的組成物を提供する。さらに、本発明は、原発性および二次性頭

50

痛を含む頭痛などの疼痛を治療する方法であって、疼痛の治療を必要とする患者に、本発明の薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。さらなる実施形態では、原発性頭痛は、TACである。さらなる実施形態では、本発明は、片頭痛を治療する方法であって、片頭痛の治療を必要とする患者に、本発明の薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。いくつかのそのような実施形態では、片頭痛は、慢性片頭痛である。さらに、本発明は、マスト細胞脱顆粒関連疼痛を治療する方法であって、マスト細胞脱顆粒関連疼痛の治療を必要とする患者に、本発明の抗体または薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。いくつかのそのような実施形態によれば、マスト細胞脱顆粒関連疼痛は、原発性または二次性頭痛および片頭痛のうちの1つである。

【0009】

10

加えて、本発明は、原発性頭痛、二次性頭痛、および/または片頭痛などの疼痛を治療する方法であって、疼痛の治療を必要とする患者に、有効量の本発明の抗体を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態によれば、原発性頭痛は、TACである。いくつかの実施形態によれば、片頭痛は、慢性片頭痛である。

【0010】

本発明はまた、療法における使用のための本発明の抗体も提供する。より具体的には、本発明は、疼痛の治療に使用するための本発明の抗体を提供する。特定の実施形態では、本発明は、原発性頭痛、二次性頭痛、および/または片頭痛の治療に使用するための本発明の抗体を提供する。

【0011】

20

本発明は、原発性頭痛、二次性頭痛、および/または片頭痛などの疼痛の治療のための薬物の製造における、本発明の抗体の使用を提供する。さらにより特定の実施形態では、原発性頭痛は、TACである。いくつかの特定の実施形態では、片頭痛は、慢性片頭痛である。

【0012】

本発明はまた、本発明の抗体をコードする核酸分子および発現ベクターにも関する。一実施形態では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を提供し、残基62は、アスパラギン酸であり、残基104は、アスパラギンであり、残基231は、プロリンであり、残基237は、アラニンであり、残基238は、アラニンである。いくつかの実施形態では、残基62は、アラニンであり、残基104は、スレオニンであり、残基231は、プロリンであり、残基237は、アラニンであり、残基238は、アラニンである。いくつかの実施形態では、残基62は、グルタミン酸であり、残基104は、スレオニンであり、残基231は、プロリンであり、残基237は、アラニンであり、残基238は、アラニンである。さらなる実施形態では、残基62は、グルタミンであり、残基104は、スレオニンであり、残基231は、プロリンであり、残基237は、アラニンであり、残基238は、アラニンである。

30

【0013】

本発明の実施形態はまた、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子も提供し、残基30は、セリンであり、残基55は、ロイシンである。いくつかの実施形態では、残基30は、トリプトファンであり、残基55は、フェニルアラニンである。

40

【0014】

いくつかの実施形態では、本分子のDNA分子は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、残基62は、アスパラギン酸であり、残基104は、アスパラギンであり、残基231は、プロリンであり、残基237は、アラニンであり、残基238は、アラニンであり、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、残基30はセリンであり、残基55はロイシンである。特定の実施形態では、本分子のDNA分子は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、残基62は

50

アラニン、残基 104 はスレオニン、残基 231 はプロリン、残基 237 はアラニンであり、残基 238 はアラニンであり、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、残基 30 は、トリプトファンであり、残基 55 は、フェニルアラニンである。特定の実施形態では、本分子の DNA 分子は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、残基 62 は、グルタミン酸であり、残基 104 は、スレオニンであり、残基 231 は、プロリンであり、残基 237 は、アラニンであり、残基 238 は、アラニンであり、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、残基 30 は、トリプトファンであり、残基 55 は、フェニルアラニンである。別の特定の実施形態では、本分子の DNA 分子は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、残基 62 は、グルタミンであり、残基 104 は、スレオニンであり、残基 231 は、プロリンであり、残基 237 は、アラニンであり、残基 238 は、アラニンであり、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、残基 30 は、トリプトファンであり、残基 55 は、フェニルアラニンである。さらに、本発明は、プロセスに従って調製された抗体を提供し、該プロセスは、本発明のポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞を、抗体が発現されるような条件下で培養することと、該宿主細胞から本発明の抗体を回収することを含む。

10

【0015】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された 2 つの HC および 2 つの LC を含む免疫グロブリン分子である。各 LC および HC のアミノ末端部分は、その中に収容される CDR を介した抗原認識を主に担う約 100 ~ 120 個のアミノ酸の変域領域を含む。CDR には、フレーム領域（「FR」）と呼ばれる、より保存された領域が散在している。各 LCVR および HCVR は、以下の FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 の順で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置された 3 つの CDR および 4 つの FR から構成される。LC の 3 つの CDR は、「LCDR1、LCDR2、および LCDR3」と呼ばれ、HC の 3 つの CDR は、「HCDR1、HCDR2、および HCDR3」と呼ばれる。CDR は、抗原と特異的な相互作用を形成する残基の大部分を含む。ある抗体が特定の抗原と結合する機能的な能力は、6 つの CDR によって大きく影響される。本発明の抗体の LCVR および HCVR 領域内の CDR ドメインへのアミノ酸の割り当ては、周知の Kabat 番号付け規則（Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-93 (1971)、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)、および North 番号付け規則（North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406: 228-256 (2011)）に基づいている。

20

30

【0016】

LC は、カッパまたはラムダとして分類され、これらは各々、当該技術分野で既知の特定の定常領域を特徴とする。本発明の抗体は、カッパ LC を含む。HC は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、それぞれ抗体のアイソタイプを IgG、IgM、IgA、IgD、または IgE として定義する。本発明の抗体は、IgG HC を含む。IgG 抗体は、サブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 にさらに分けることができる。特定の実施形態では、本発明の抗体は、IgG4 である。各 HC のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主に担う定常領域を定義する。特定の実施形態では、本発明の抗体は、エフェクター機能を低減する、各 HC の定常領域内の 1 つ以上の修飾を有する。より特定の実施形態では、本発明の抗体は、IgG4 であり、残基 237 および 238 の両方のアミノ酸アラニンを含むエフェクター機能を

40

50

低減する、両方のHCの定常領域内の修飾を有する（残基番号付けは直線的であり、例示される配列番号1のHCに基づく）。さらにより特定の実施形態では、本発明の抗体は、IgG4であり、残基237および238の両方のアミノ酸アラニンを含むエフェクター機能を低減する、両方のHCの定常領域内の修飾を有し、残基231のアミノ酸プロリンを含む安定性を促進する、両方のHCの定常領域内のさらなる修飾を有する（残基番号付けは直線的であり、例示される配列番号1のHCに基づく）。

【0017】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体（「mAb」）である。mAbは、例えば、ハイブリドーマ技術、組み換え技術、ファージ提示技術、合成技術、例えば、CDR移植、またはそのような技術または当該技術分野で既知の他の技術の組み合わせによって産生することができる。本明細書で言及される場合、mAbは、単一のコピーまたはクローン（例えば、任意の真核生物、原核生物、もしくはファージのクローンを含む）に由来する抗体であり、それが産生される方法ではない。

10

【0018】

抗体を産生および精製する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、ファージライブラリをスクリーニングすることができ、それにより、組み換えヒトPACAPとの相互作用について数千のFab断片をスクリーニングする。結果として生じる相互作用を回収、精製し、当該技術分野で周知の従来の方法を使用してアミノ酸配列を決定することができ、それにより、初期リード抗体を構築することができる。本発明の抗体は、1つ以上のヒトフレームワーク領域を含有するように設計されている。ヒトフレームワークの生殖系列配列は、Immunogenetics (INGT) からそのウェブサイト (<http://imgt.cines.fr>) を通して、またはThe Immunoglobulin Facts Book by Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001 (ISBN 012441351) から得ることができる。特定の実施形態によれば、本発明の抗体に使用するための生殖系列HCおよびLCフレームワーク領域はそれぞれ、3~23および018を含む。

20

【0019】

本発明の特定の実施形態では、抗体、または抗体をコードする核酸は、単離された形態で提供される。本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、細胞環境内に見出される他の高分子種を含まないか、または実質的に含まない、タンパク質、ポリペプチド、または核酸を指す。

30

【0020】

本発明の抗体は、既知の方法を使用して調製および精製することができる。例えば、HC（例えば、配列番号1によって与えられるアミノ酸配列）およびLC（例えば、配列番号2によって与えられるアミノ酸配列）をコードするcDNA配列をクローニングし、GS（グルタミンシンターゼ）発現ベクター中に操作することができる。次いで、操作された免疫グロブリン発現ベクターを、CHO細胞中に安定してトランスフェクトすることができる。当業者であれば理解されるように、抗体の哺乳動物発現は、典型的には、Fc領域内の高度に保存されたN-グリコシル化部位でのグリコシル化をもたらすであろう。安定したクローンは、ヒトPACAPに特異的に結合する抗体の発現について検証することができる。陽性クローンは、バイオリクター内での抗体産生のために無血清培地へと増殖させることができる。抗体が分泌された培地は、従来技術によって精製することができる。例えば、培地は、リン酸緩衝生理食塩水などの適合性のある緩衝液で平衡化したプロテインAまたはG Sepharose FFカラムに好都合に適用することができる。カラムを洗浄して、非特異的結合構成成分を除去する。結合した抗体を、例えば、pH勾配によって溶出させ、抗体画分を、SDS-PAGEなどによって検出し、次いでプールする。抗体は、一般的な技術を使用して濃縮および/または滅菌濾過されてもよい。可溶性凝集体および多量体は、サイズ排除、疎水性相互作用、イオン交換、またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含む、一般的な技術によって効率的に除去すること

40

50

ができる。産生物は、例えば、-70 で直ちに凍結させても、凍結乾燥させてもよい。

【0021】

本発明の抗体は、患者の治療に使用することができる。より具体的には、本発明の抗体は、あるクラスの疼痛（具体的には、原発性および二次性の両方の頭痛、ならびに片頭痛（慢性片頭痛を含む）を含む）を治療することが期待される。本発明の抗体は、原発性および二次性頭痛ならびに片頭痛を含む疼痛の治療に有用であることが期待されるが、そのような抗体はまた、他の疼痛の治療にも有用である可能性がある。本明細書で互換的に使用される場合、「治療」および/または「治療すること」および/または「治療する」は、本明細書に記載の障害の進行の緩徐化、妨害、抑止、制御、停止、または逆転が存在し得る全てのプロセスを指すことが意図されるが、全ての障害の症状の完全な排除を必ずしも示すものではない。治療は、PACAP活性の低減から利益を得るであろうヒトにおける疾患または病態の治療のための本発明の抗体の投与を含み、(a) 疾患のさらなる進行を阻害すること、すなわち、その発症を抑止することと、(b) 疾患を緩和すること、すなわち、疾患もしくは障害の退縮を引き起こすか、またはその症状もしくは合併症を緩和することと、(c) 症状の疾患の発症を予防することを含む。

10

【0022】

本明細書で互換的に使用される場合、「患者」、「対象」、および「個体」という用語は、ヒトを指す。特定の実施形態では、患者は、PACAP活性の低減から利益を得るであろう疾患、障害、または病態（例えば、疼痛、例えば、原発性もしくは二次性頭痛、および/または片頭痛（慢性片頭痛を含む））をさらに特徴とする。別の実施形態では、患者は、上記の病態、またはPACAP活性の低減から利益を得るであろう病態を発症するリスクがあることをさらに特徴とする。

20

【0023】

本明細書で使用される場合、「結合する（または、に結合する）」という用語は、抗体とヒトPACAPのエピトープとの相互作用を指す。本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、本発明の抗体によって認識される抗原の別個の三次元部位を指す。

【0024】

本発明の抗体は、当該技術分野で周知の方法によって調製することができ、本発明の抗体と、1つ以上の薬学的に許容される担体（複数可）および/または希釈剤（複数可）とを含む、薬学的組成物に組み込むことができる（例えば、一般に開業医に知られている製剤化技術の概要を提供する、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Lloyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012）。薬学的組成物に好適な担体には、本発明の抗体と組み合わせたときに分子の活性を保持し、かつ患者の免疫系とは非反応性である、任意の材料が含まれる。

30

【0025】

本発明の抗体を含む薬学的組成物は、親経路（例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、または経皮）によって、本明細書に記載の疾患または障害のリスクがあるか、またはそれを呈する患者に投与することができる。本発明の薬学的組成物は、「有効」量または「治療有効」量（本明細書で互換的に使用される）の本発明の抗体を含有する。有効量は、所望の治療結果を達成するのに必要な量（投与量および期間および投与手段で）を指す。抗体の有効量は、個体の病状、年齢、性別、および体重、ならびに抗体が個体において所望の応答を誘発する能力などの因子に応じて変動し得る。有効量はまた、本発明の抗体の任意の毒性効果または有害効果よりも治療的に有益な効果が上回る量である。

40

【実施例】

【0026】

実施例1. 例示される抗PACAP抗体の操作および発現

本発明の抗PACAP抗体の構築時に、化学的および物理的安定性に関連する重要な問題に遭遇した。例えば、初期ヒト化構築物で遭遇する問題には、低い結合親和性、許容で

50

きない免疫原性、可変領域の脱アミド化、酸化、異性化、および低い効力が含まれる。

【 0 0 2 7 】

したがって、化学的および物理的修飾を操作して、本発明の抗体の結合親和性を改善し、H C二量体化を排除または低減し、免疫原性を低減し、かつ化学的および物理的安定性を改善するようにした。重鎖および軽鎖の両方の全体を通して、アミノ酸修飾を操作した。広範なタンパク質安定性研究もまた実行し、構築した抗体を、発現および熱安定性特性、ならびに結合親和性を含む他の特性についてスクリーニングした。元の構築物からの多数の修飾を含む以下の抗体は、高い結合親和性を持ち、化学的および物理的に安定しており、低い免疫原性を持ち、毎月の投与と一致する薬物動態特性を持つことが特定されている。本発明の抗体を含む修飾はいずれも、初期ヒト化構築物では特定されなかった。

10

【 0 0 2 8 】

本発明の例示される抗P A C A P抗体を、表1に提示する。例示される抗体には、配列番号1の重鎖および配列番号2の軽鎖、ならびにヒトH Cフレームワーク3 ~ 23、およびフレームワークO 18を有するヒトC A P L Cが含まれる。加えて、抗体の化学的および物理的安定性ならびに機能的特性を改善する、軽鎖および重鎖の両方における操作した修飾を、表1に提供する。例示される抗P A C A P抗体の様々な領域の関係は、以下のとおりである(アミノ酸の番号付けには、直線的な番号付けが適用され、可変ドメインへのアミノ酸の割り当ては、www . i m g t . o r gで入手可能なI n t e r n a t i o n a l I m m u n o g e n e t i c s I n f o r m a t i o n S y s t e m (登録商標)に基づき、C D Rドメインへのアミノ酸の割り当ては、周知のK a b a t番号付け規則に基づくH C D R 2を除いて、周知のN o r t h番号付け規則に基づく)

20

【表1】

表1: 本発明の例示される抗PACAP抗体のアミノ酸領域。

	配列番号1		配列番号2		
	領域	位置	領域	位置	
HCVR	FRH1	1~22	LCVR	FRL1	1~23
	HCDR1	23~35		LCDR1	24~34
	FRH2	36~49		FRL2	35~48
	HCDR2	50~66		LCDR2	49~56
	FRH3	67~96		FRL3	57~88
	HCDR3	97~112		LCDR3	89~97
	FRH4	113~123		FRL4	98~107
定常	CH	124~449	定常	CL	108~214
例示される抗体 A	62D; 104N; 231P; 237A; 238A		例示される抗体 A	30S; 55L	
例示される抗体 B	62A; 104T; 231P; 237A; 238A		例示される抗体 B	30W; 55F	
例示される抗体 C	62E; 104T; 231P; 237A; 238A		例示される抗体 C	30W; 55F	
例示される抗体 D	62Q; 104T; 231P; 237A; 238A		例示される抗体 D	30W; 55F	

30

40

【 0 0 2 9 】

以下の実施例およびアッセイは、本発明の抗体が原発性および二次性頭痛ならびに片頭痛を含む疼痛の治療に有用であることを実証している。しかしながら、以下の実施例は、限定ではなく例示として記載されており、当業者によって様々な修正がなされ得ることが理解されるべきである。

【 0 0 3 0 】

本発明の例示される抗P A C A P抗体は、本質的に以下のとおりに発現および精製され得る。表1に記載のH Cアミノ酸配列をコードするD N A配列(例えば、表1に提示される例示される抗体BのH Cをコードする配列番号11のD N A配列)および表1に記載の

50

LCアミノ酸配列をコードするDNA配列（例えば、表1に提示される例示される抗体BのLCをコードする配列番号12のDNA配列）を含有するグルタミンシンターゼ（GS）発現ベクターを使用して、チャイニーズハムスター卵巣細胞株（CHO）を電気穿孔によってトランスフェクトする。この発現ベクターは、SV初期（サルウイルス40E）プロモーターおよびGSの遺伝子をコードする。GSの発現は、CHO細胞によって必要とされるアミノ酸であるグルタミンの生化学的合成を可能にする。トランスフェクション後、細胞を50 μMのL-メチオニンスルホキシミ（MSX）でバルク選択にかける。MSXによるGSの阻害を利用して、選択の厳密性を増加させる。宿主細胞ゲノムの転写活性領域に発現ベクターcDNAを組み込んだ細胞が、内在的レベルのGSを発現するCHO野生型細胞に対して選択され得る。トランスフェクトされたプールを低密度でプレATINGして、安定した発現細胞のクローンに近い成長を可能にする。マスターウェルを、抗体発現についてスクリーニングし、次いで無血清懸濁培養物中で増殖させて、産生に使用する。抗体が分泌された浄化培地を、リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）などの適合性のある緩衝液で平衡化したプロテインA親和性カラムに適用する。このカラムを1MのNaClで洗浄して、非特異的結合構成成分を除去する。結合した抗体を、例えば、pH（約）3.5のクエン酸ナトリウムで溶出させ、画分を1Mのトリス緩衝液で中和する。抗体画分を、SDS-PAGEまたは分析的サイズ排除などによって検出し、次いでプールする。可溶性凝集体および多量体は、サイズ排除、疎水性相互作用、イオン交換、またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含む、一般的な技術によって効率的に除去することができる。本発明の例示される抗PACAP抗体を、一般的な技術を使用して濃縮および/または滅菌濾過する。これらのクロマトグラフィーステップ後の例示される抗体の純度は、95%超である。本発明の例示される抗PACAP抗体は、-70 で直ちに凍結させても、4 で数ヶ月間保管してもよい。

【0031】

実施例2．結合親和性

各抗体-抗原複合体の結合親和性（ K_D ）を、動的排除96ウェルプレートベースの assays（Estep et al., mAbs, 2013, 5:270-278から適応）を使用して決定する。簡潔には、例示される各抗体（表1に記載）の3倍希釈系列（各系列は、抗体ブランク対照を含む）を、7290 pM ~ 41 fMの開始濃度から調製する。試料を、3%（w/v）のプロッカーA溶液（MSD、番号R93AA-1）中で調製し、30 pMのN末端ビオチン化PACAP27（カスタム合成、CPC Scientific）またはN末端ビオチン化PACAP38（Anaspec、番号23590）の固定最終抗原濃度を、各試料に添加する。100 μlの体積の各抗原-抗体試料を、96ウェルマイクロタイタープレート（Greiner、EK-20101）の個々のウェルに二連で添加する。プレートを、光学接着フィルム（Thermo Fisher Scientific、番号4311971）で密封し、37 で3~4日間インキュベートして、試料の平衡を可能にする。分析前日に、96ウェルMSD標準プレート（MSD、番号L15XA）の各列を、リン酸緩衝生理食塩水中3 μg/mlの濃度の、30 μlの（滴定系列で使用される）対応する抗体でコーティングする（PBS）。実験当日に、MSD標準プレートを、150 μlのPBSで1回洗浄し、Max Q4450ペンチトップ振盪機（Thermo Fisher Scientific）で300 rpmで振盪しながら、30 で45分間、150 μlの3%の遮断剤A溶液で遮断する。PBSで3回洗浄した後、（上記のように調製およびインキュベートした）50 μlの各抗原-抗体試料をMSD標準プレートに添加し、300 rpmで振盪しながら、30 で150秒間インキュベートする。PBSで1回洗浄した後、1%（w/v）の遮断剤A溶液中で調製した50 μlの1 μg/mlのSULFO-TAG標識ストレプトアビジン（MSD、番号R32AD-5）を添加し、MSD標準プレートおよびプレートを、300 rpmで振盪しながら、30 で3分間インキュベートする。プレートをPBSでさらに3回洗浄した後、150 μl/ウェルの1X読み取り緩衝液（MSD、番号R92TC-2）を添加する。MSD標準プレートは、MESO Quickplex SQ120/1300機器

10

20

30

40

50

(Meso Scale Discovery) を使用して読み取る。データ分析は、SigmaPlot (バージョン 12.5、Systat Software) を使用して行い、結合親和性 (K_D) を、SigmaPlot に組み込まれた 4 つのパラメータのロジスティック曲線モデルを使用して決定する。結果を、表 2 に提供する。

【表 2】

表 2 : 37°Cでの抗体-抗原複合体の結合親和性 (K_D)

抗体	結合親和性、 K_D (pM, 37°C)	
	抗原 (PACAP38)	抗原 (PACAP27)
例示される抗体 A	決定せず	37.0
例示される抗体 B	12.8	11.6
例示される抗体 C	14.6	14.5
例示される抗体 D	9.0	10.5

10

【0032】

実施例 3 . インビボでの PACAP 分解

インビボでの循環 PACAP38 の分解を、ラットにおいて評価する。対照 IgG4 抗体 (10 mg / kg) または例示される抗体 A (10 mg / kg) のうちの一方を、ラットに静脈内注射する。血漿中のベースライン PACAP38 を各ラットについて評価し、次いでラットに 6 μ g / kg の PACAP38 を静脈内注射する。PACAP38 注射後、血漿試料を 120 分間かけて収集し、PACAP38 の総レベル (抗体に結合しているものまたは未結合のもの) を、修正 ELISA 形式を介して決定する。簡潔には、96 ウェル MSD プレート (MSD、カタログ番号: L15xA-1) を、PBS 中、30 μ l / ウェルの 1 μ g / ml の抗 PACAP38 抗体 (US Biological カタログ番号 P1775-03C) でコーティングし、40 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートする。プレートを 200 μ l / ウェルの PBST で 3 回洗浄した後、PBS 中、150 μ l / ウェルの 3% の遮断剤 A (MSD カタログ番号 R93BA-2) で、650 rpm で回転させながら、室温で 1 時間遮断する。その後、プレートを、200 μ l / ウェルの PBST で 3 回洗浄する。PACAP38 (Bachem カタログ番号 H430-0500) の検量用試料を、200 μ g / ml の HBR1 (Scantibodies Inc、カタログ番号 3KC533) および 10 μ g / ml のピオチン - 例示される抗体 A を補充した、1 部の希釈剤 2 (MSD カタログ番号 R51-BB-3) および 39 部の希釈剤 3 (MSD カタログ番号 R51BA-3) を含有するアッセイ緩衝液を用いて、1000 pg / mL で希釈する。1000 pg / mL の検量用試料をアッセイ緩衝液で 3 倍連続希釈することによって、検量用試料の標準曲線を用意する。血漿試料を、200 μ g / mL の HBR1 および 10 μ g / mL のピオチン - 例示される抗体 A を補充した希釈剤 3 中に、40 倍に希釈する。25 μ l の異なる濃度の検量用試料および希釈した血漿試料を、アッセイプレートの個々のウェルに添加し、650 rpm で回転させながら、室温で 2 時間インキュベートする。プレートを 200 μ l / ウェルの PBST で 3 回洗浄した後、希釈剤 3 中、25 μ l の 0.5 μ g / ml の Sulfo-Tag 標識ヤギ抗ヒト IgG (MSD カタログ番号 R32AJ-1) を各ウェルに添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートする。次いで、プレートを 200 μ l / ウェルの PBST で 3 回洗浄し、150 μ l の 2X 読み取り緩衝液 T (MSD、カタログ番号 R92TC-3) を各ウェルに添加し、MSD プレートリーダーでシグナルを読み取る (検出可能な PACAP38 レベルとして提示される結果、平均 \pm 平均値の標準誤差 (n = 2 ~ 3))。結果を、表 3 に提示する。

20

30

40

【表 3】

表 3 : PACAP38 の血漿レベル

抗体	PACAP38 注射後の時点での、PACAP38 の血漿レベル (ng/mL)					
	ベースライン	5 分後	30 分後	60 分後	90 分後	120 分後
例示される抗体 A	0.4 ± 0.0 (2)	200.0 ± 23.0 (3)	74.1 ± 11.8 (3)	37.8 ± 3.2 (3)	20.7 ± 2.9 (3)	11.7 ± 2.5 (2)
対照 IgG4 Ab	0.5 ± 0.5 (3)	6.2 ± 2.5 (3)	2.3 ± 0.9 (3)	1.1 ± 0.3 (3)	0.5 ± 0.2 (3)	0.3 ± 0.1 (3)

10

【 0 0 3 3 】

表 3 に提示される結果は、例示される抗体 A が静脈内注射時に PACAP38 の分布を予防するが、インビボでの PACAP38 の分解は予防しないことを実証している。

【 0 0 3 4 】

実施例 4 . PACAP27、PACAP38、またはVIP誘導性cAMPの阻害

本発明の抗体によるPACAP27、PACAP38、およびVIP誘導性cAMP刺激の中和を、ヒトPAC1(NP__001186564.1)またはヒトVPAC2(NP__003373.2)のいずれかを発現するベクターでトランスフェクトされたCHO-K1細胞(ATCC、カタログ番号CCL-61)内で評価する。CHO-K1細胞を非酵素的細胞解離緩衝液(Gibco番号313131-014)で収集し、計数し、遠心分離し、アッセイ緩衝液中に10,000個の細胞/25µlになるまで再懸濁する。濃縮した細胞(25µl中10,000個)を、96ウェルプレートのウェルに添加する。

20

【 0 0 3 5 】

例示される抗体(表1に記載)を、100µlのアッセイ緩衝液(カルシウムおよびマグネシウムを有するHBSS(Hyclone、ThermoScientific、SH30268)、0.1%のBSA(Sigma-Aldrich、番号A7888)、500µMのIBMX(Sigma-Aldrich、I5879)中で4倍の所望の最終濃度になるまで連続希釈する。希釈した例示される抗体を、(最終濃度の2倍の)アゴニストとともに室温で15分間インキュベートする。アゴニストの最終濃度:ヒトPAC1中のPACAP27およびPACAP38について100pM、ヒトVPAC2中のPACAP27およびPACAP38について800pM、ヒトVPAC2アッセイでは800pMのVIP。その後、25µlの例示される抗体-アゴニスト溶液を、(細胞を含有する)96ウェルプレートの個々のウェルに添加し、室温で1時間インキュベートする。各ウェル内のcAMP形成を、cAMP femto2(Cisbio、62AM5PEC)を使用して決定する。25µlのcAMP-d2標準溶液(Cisbio、62AM5PEC)を各ウェルに添加した後、25µlの抗cAMP-クリプテート標準溶液を添加し、プレートを、暗所、室温で1時間インキュベートする。結果として生じるHTRFシグナルを、Envision12(Perkin Elmer、励起330nm)機器を使用して665および620nmで測定し、665/620の比率をプロットして、cAMPを定量化する(データは、Graphpad Prism7を使用してプロットし、IC50値は、組み込まれた4つのパラメータのロジスティック曲線モデル適合ルーチンを使用して決定する)。結果を、平均±平均値の標準誤差として表4に提供する。

30

40

【表 4】

表 4：インビトロでの PACAP27 および PACAP38 誘導性 cAMP 増加の中和

抗体	阻害 (IC50) (pM、平均±平均値の標準誤差 (N))				
	hPAC1 中の PACAP38 (100 pM)	hPAC1 中の PACAP27 (100 pM)	hVPAC2 中の PACAP38 (800 pM)	hVPAC2 中の PACAP27 (800 pM)	hVPAC2 中 の VIP (800 pM)
例示される 抗体 A	554 ± 264 (N=2)	2250 (N=1)	714 ± 194 (N=6)	781 ± 340 (N=2)	>100,000 (N=1)
例示される 抗体 B	265 ± 62 (N=3)	270 ± 103 (N=2)	294 ± 60 (N=3)	605 ± 135 (N=2)	>100,000 (N=1)
例示される 抗体 C	303 ± 15 (N=3)	311 ± 29 (N=2)	325 ± 99 (N=3)	595 ± 219 (N=2)	>100,000 (N=1)
例示される 抗体 D	205 ± 35 (N=3)	212 ± 42 (N=2)	243 ± 112 (N=3)	515 ± 127 (N=2)	>100,000 (N=1)

10

【 0 0 3 6 】

実施例 5 . 免疫原性分析

20

インシリコでの免疫原性評価を、Tregitope で調整した EpiMatrix スコアを含む、EpiMatrix T細胞エピトープ予測ソフトウェア (Interactive Screening and Protein Reengineering Interface (ISPRI) Web ベースポータル (EpiVax, Inc.) 内) で実行する。各抗体に関連する軽鎖可変領域 (LCVR) および重鎖可変領域 (HCVR) のタンパク質配列を、別個に分析する。EpiVax によれば、Tregitope で調整した EpiMatrix スコアがゼロ超であるタンパク質配列は、より高い全体的な免疫原性を有する。EpiMatrix クラスターの免疫原性評価もまた、各 LCVR および HCVR に対して実行して、各抗体の CDR 内の T細胞エピトープクラスターを特定する。2つ以上の隣接する EpiBar の存在によって定義される T細胞エピトープクラスターの存在は、より高い全体的な免疫原性に関連する。North の CDR の定義を使用すると、例示される抗体 A、B、または C では、CDR 関連 T細胞エピトープクラスターは特定されない。4つの隣接する EpiBar の T細胞エピトープクラスターは、比較抗体 ALD1.H (米国特許公開第 US 2016/0304604 号に「Ab1.H」と記載される) の LCVR の CDR 2 中で特定され、これは、比較抗体がより高い免疫原性を有することを示している。結果を、表 5 A、5 B、および 5 C に提供する。

30

【表 5】

表 5A：EpiMatrix の T細胞エピトープ予測を介したインシリコでの免疫原性リスク評価

抗体	Epimatrix スコア		
	HCVR	LCVR	HCVR+LCVR
例示される抗体 A	58.84	19.44	40.61
例示される抗体 B	65.12	26.41	47.21
例示される抗体 C	58.74	26.41	43.79
例示される抗体 D	65.49	26.41	47.41
ALD1.H	70.11	35.2	53.16

40

【表 6】

表 5B : Tregitope で調整した Epimatrix 評価

抗体	Tregitope で調整した Epimatrix スコア		
	HCVR	LCVR	HCVR+LCVR
例示される抗体 A	-32.82	-34.22	-33.46
例示される抗体 B	-26.54	-27.24	-26.86
例示される抗体 C	-32.92	-27.24	-30.29
例示される抗体 D	-26.17	-27.24	-26.67
ALDI.H	-28.41	1.41	-13.93

10

【表 7】

表 5C : EpiMatrix クラスターの免疫原性評価を介したインシリコでの免疫原性リスク評価

抗体	CDR 関連 Epibar クラスター
例示される抗体 A	0
例示される抗体 B	0
例示される抗体 C	0
例示される抗体 D	0
ALDI.H	1

20

【 0 0 3 7 】

実施例 6 . マスト細胞脱顆粒誘導性 P A C A P 放出の中和

ヒトマスト細胞は、StemSpan Media (StemCell) および SCF / IL - 6 を使用して、ヒト臍帯血幹細胞から培養物中で分化する。アッセイ当日に、マスト細胞を、タイロド緩衝液 (1 3 0 m M の NaCl、5 m M の KCl、1 . 4 m M の CaCl₂、1 m M の MgCl₂、5 . 6 m M のグルコース、1 0 m M の HEPES、および 0 . 1 % の BSA、pH 7 . 4) 中、9 6 ウェル組織培養プレートのウェルに、5 0 μ l 当たり 1 0 0 , 0 0 0 個の細胞でプレATINGする。後述の例示される抗体の存在下または不在下で、細胞を P A C A P 3 8 または P A C A P 2 7 で処理する。

30

【 0 0 3 8 】

1 ウェル当たり 2 5 μ l の 4 倍濃縮した例示される抗体 (1 5 3 μ M の例示される抗体の最終濃度) を添加することによって、単一点試験を実行する。1 ウェル当たり 2 5 μ l の 4 倍濃縮した抗体を、0 ~ 1 5 3 μ M の最終用量範囲 (3 倍希釈) になるように添加することによって、用量曲線試験を実行する。2 5 μ l の 4 倍濃縮した P A C A P 3 8 または P A C A P 2 7 を、1 μ M の P A C A P (3 8 または 2 7) の最終濃度になるまで各ウェルに添加した。アッセイ培地のみを未処理対照として使用し、I g G 4 m A b を陰性対照として使用する。試験は、三連で行う。9 6 ウェルプレートを、インキュベーター (3 7) 内に 3 0 分間置く。インキュベーション後、3 0 μ l / ウェルの上清を収集し、トリプターゼ活性を市販のアッセイ (Millipore) によって測定する。上清中のトリプターゼ放出パーセント (%) を、以下の等式によって計算する : (実験トリプターゼ放出 - ビヒクル対照トリプターゼ放出) / (総トリプターゼ放出 - ビヒクル対照トリプターゼ放出) × 1 0 0 (式中、総トリプターゼ放出は、マスト細胞を凍結 / 解凍することによって得られる) 。結果を、表 6 A、6 B、および 6 C に提供する。

40

【表 8】

表 6A：ヒトマスト細胞内での PACAP (27 および 38) 誘導性トリプターゼ放出の単一点阻害

抗体	PACAP38 または 27 の添加時の トリプターゼ放出パーセンテージ (%)	
	PACAP38	PACAP27
例示される抗体 B	4.9 ± 1.1	21 ± 1.4
例示される抗体 C	5.5 ± 1.4	14.2 ± 1.1
例示される抗体 D	4.2 ± 0.7	15.1 ± 4.0
アッセイ培地のみ	-0.3 ± 0.3	-0.3 ± 0.3
IgG4 mAb	103.6 ± 0.5	109.7 ± 0.4

10

【表 9】

表 6B：ヒトマスト細胞内での PACAP27 誘導性トリプターゼ放出の用量曲線阻害

抗体	用量 (uM)	PACAP27 の添加時のトリプターゼ 放出パーセンテージ (%)
例示される抗体 B	153	10.3 ± 0.9
	51	19.4 ± 6.4
	17	11.6 ± 7.1
	5.6	8.1 ± 2.9
	1.8	11.7 ± 1.6
	0.6	54.0 ± 2.0
	0.2	78.1 ± 1.0
	0	85.2 ± 3.4
例示される抗体 C	153	9.7 ± 2.3
	51	17.8 ± 2.3
	17	8.0 ± 0.6
	5.6	11.5 ± 4.9
	1.8	10.4 ± 2.6
	0.6	55.4 ± 6.0
	0.2	85.2 ± 1.6
	0	85.8 ± 4.8
例示される抗体 D	153	9.4 ± 0.8
	51	26.0 ± 6.3
	17	19.8 ± 3.4
	5.6	16.4 ± 10.8
	1.8	20.3 ± 8.4
	0.6	73.0 ± 2.1
	0.2	86.5 ± 1.8
	0	92.7 ± 1.5
アッセイ培地のみ		-0.2 ± 1.0
IgG4 mAb	153	94.8 ± 4.8

20

30

40

【表 10】

表 6C：ヒトマスト細胞内での PACAP38 誘導性トリプターゼ放出の用量曲線阻害

抗体	用量 (uM)	PACAP38 の添加時のトリプターゼ放出パーセンテージ (%)
例示される抗体 B	153	2.0 ± 0.3
	51	14.6 ± 2.1
	17	14.9 ± 2.6
	5.6	22.0 ± 4.1
	1.8	25.2 ± 1.4
	0.6	52.4 ± 9.3
	0.2	73.7 ± 1.3
	0	77.2 ± 1.0
例示される抗体 C	153	2.8 ± 0.3
	51	12.1 ± 2.3
	17	15.5 ± 0.9
	5.6	21.9 ± 3.8
	1.8	26.5 ± 4.3
	0.6	66.6 ± 1.0
	0.2	77.6 ± 0.3
	0	80.3 ± 2.6
例示される抗体 D	153	1.7 ± 0.1
	51	14.7 ± 1.5
	17	19.6 ± 3.6
	5.6	25.9 ± 6.2
	1.8	31.3 ± 3.8
	0.6	64.5 ± 4.1
	0.2	74.0 ± 1.8
	0	76.5 ± 0.7
アッセイ培地のみ		-0.2 ± 1.0
IgG4 mAb	153	79.6 ± 4.1

【 0 0 3 9 】

実施例 7 . インビボでの PACAP 誘導性 cAMP 中和

インビボでの PACAP 誘導性血漿 cAMP 増加の中和を、CD - 1 マウスモデル (Envigo) で評価する。簡潔には、雄の CD - 1 マウスに、対照 IgG4 抗体 (N = 6)、対照 IgG4 抗体 + PBS / ロリプラムのみ (N = 5)、例示される抗体 B (N = 5)、例示される抗体 C (N = 5)、または例示される抗体 D (N = 6) のいずれかを 10 mg / kg 皮下投与する。抗体治療の 3 日後、マウスに、PACAP38 (13 nmol / kg) + ロリプラム (100 ug / mL) を静脈内投与し、以前に IgG4 対照抗体で治療した数匹のマウスには、(0.2% のエタノール、1% の BSA、5 ml / kg、およびロリプラム (100 ug / mL) のみを含む) PBS を静脈内投与する。PACAP38 治療の 10 分後、EDTA 含有チューブに血液を収集し、遠心分離によって血漿を分離する。市販の cAMP ELISA (Cell Bios, Inc.) を製造業者の指示に従って使用して、cAMP の血漿レベルを決定する。統計分析は、一元 ANOVA (Graphpad Prism 7) で対数変換した cAMP 濃度を適用した後、ダネット事後分析を適用する。結果を、平均 ± 標準誤差として表 7 に記載する。

【表 1 1】

表 7 : PACAP 誘導性血漿 cAMP レベル

抗体	血漿 cAMP レベル (nM、平均±平均値の標準誤差)
IgG4 対照抗体 (+PBS/ロリプラムのみ)	238 ± 60 (N=5) *
IgG4 対照抗体 (+PACAP)	4095 ± 318 (N=6)
例示される抗体 B (+PACAP)	715 ± 60 (N=5) *
例示される抗体 C (+PACAP)	666 ± 96 (N=5) *
例示される抗体 D (+PACAP)	560 ± 130 (N=6) *

*p<0.0001 対 IgG4 対照抗体 (PACAP38)

【 0 0 4 0 】

実施例 8 . インビボでの三叉神経節刺激誘導性硬膜血漿タンパク質の血管外漏出の中和

本発明の抗 P A C A P 抗体が、三叉神経節の刺激後に P A C A P の放出によって誘導される血漿タンパク質の血管外漏出をインビボで遮断する能力を、ラットモデルを使用して調査する。簡潔には、スプラーグドローラーラット (E n v i g o、雄、250 ~ 350 g) に、1 ~ 10 mg / k g の例示される抗体 A、3 ~ 30 mg / k g の例示される抗体 B、または 3 もしくは 10 mg / k g の対照 I g G 4 抗体のうちの 1 つを皮下投与する。7 2 時間後、ラットをネンブータル (65 mg / k g、腹腔内) で麻酔し、切歯バーを - 2 . 5 mm に設定した定位固定枠 (D a v i d K o p f I n s t r u m e n t s) 内に置く。正中線矢状頭皮切開を行った後、頭蓋骨に二対の両側の穴をドリルで開ける (後側 3 . 2 mm、外側 1 . 8 および 3 . 8 mm、全ての座標は十字縫合を基準とする)。一対のステンレス鋼刺激電極 (R h o d e s M e d i c a l S y s t e m s , I n c .) を、硬膜から両半球の穴を通して 9 . 2 mm の深さまで下げる。三叉神経節刺激の 2 分前に、タンパク質の血管外漏出のマーカであるフルオレセインイソチオシアネート標識ウシ血清アルブミン (F I T C - B S A) (20 mg / k g、静脈内) を、大腿静脈に注射する。左三叉神経節を、P S I U 6 光電式分離ユニット (G r a s s - T e l e f a c t o r) を備えた M o d e l S 4 8 G r a s s I n s t r u m e n t S t i m u l a t o r を用いて、1 . 0 mA (5 H z、5 ミリ秒のパルス持続時間) の電流強度で 5 分間刺激する。刺激の 5 分後、40 ml の食塩水で失血させることによってラットを屠殺する。

【 0 0 4 1 】

ラットの屠殺後、頭蓋骨の上部を除去し、硬膜を収集する。両半球から膜試料を除去し、水で濯ぎ、顕微鏡スライド上に平らに広げる。スライドをスライドウォーマーで 15 分間乾燥させ、組織を 70 % のグリセロール / 水の溶液とともにカバーガラスをかける。回折格子モノクロメータおよび分光光度計を備えた蛍光顕微鏡 (Z e i s s) を使用して、各硬膜試料の F I T C - B S A 色素を定量化する。三叉神経節の電気刺激によって誘導される血管外漏出は、同側効果であり (すなわち、三叉神経節が刺激される硬膜の側でのみ生じる)、したがって、硬膜の刺激されていない半分が対照として機能することが可能となる。刺激した側からの硬膜と刺激されていない側からの硬膜との血管外漏出の比率を計算する。結果を、表 8 に提供する (平均 ± 標準誤差)。

【表 1 2】

表 8：三叉神経節刺激誘導性硬膜血漿タンパク質血管外漏出

抗体 (mg/kg)	血管外漏出率 (平均±平均値の標準誤差)
IgG4 対照抗体 (10 mg/kg) (N=3)	1.87 ± 0.04
例示的な抗体 A (1 mg/kg) (N=3)	1.93 ± 0.04
例示的な抗体 A (3 mg/kg) (N=3)	1.59 ± 0.07
例示的な抗体 A (10 mg/kg) (N=3)	1.13 ± 0.05
IgG4 対照抗体 (3 mg/kg) (N=3)	1.82 ± 0.02
IgG4 対照抗体 (10 mg/kg) (N=3)	1.90 ± 0.04
IgG4 対照抗体 (30 mg/kg) (N=3)	1.95 ± 0.05
例示される抗体 B (3 mg/kg) (N=3)	1.83 ± 0.06
例示される抗体 B (10 mg/kg) (N=3)	1.21 ± 0.06
例示される抗体 B (30 mg/kg) (N=3)	1.07 ± 0.04

10

【 0 0 4 2】

実施例 9. 例示される抗 P A C A P 抗体の薬物動態

20

本発明の例示される抗体の血清薬物動態を、総 I g G アッセイによって、単回皮下投与後の雄のカニクイザル (n = 2) において特性評価する。動物に例示される抗体 B (10 mg / kg) を皮下注射し、注射の 1、3、6、24、48、72、96、120、144、168、240、336、504、および 672 時間後に血清試料を収集する。総 I g G アッセイを、一般に本明細書に記載のように実行する。簡潔には、100 uL / ウェルの 1 u g / mL のヤギ抗ヒト I g G F (a b ') 2 抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , I n c . 、カタログ番号 109 - 006 - 097) を、Immulon 4 HBX プレートにコーティングする。ウェルを、標準物質 (例示される抗体 B の標準曲線は、15.63 ~ 1,000 ng / mL から用意する)、対照、または血清試料のうちの 1 つとともにインキュベートした後、検出のために 100 uL / ウェルの 1 : 10,000 に希釈したマウス抗ヒト I g G F c - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP、Southern Biotech、カタログ番号 9040 - 05) とともにインキュベートする。未結合の検出試薬を、洗い流す。その後、100 uL / ウェルの TMB Microwell Peroxidase Substrate System を、ウェルに添加する。100 uL / ウェルの TMB Stop Solution の添加によって発色を停止させ、波長補正を 630 nm に設定して 450 nm で光学濃度を測定する。免疫反応性を、100% のカニクイザル血清中、既知量の例示される抗体 B から決定した後、5 パラメータのアルゴリズム (StatLia、バージョン 3.2) を使用して、PBS 中、Blocker (商標) カゼインで最低限必要な 1 : 10 に希釈する。本質的に上記の手順に従って、0.49 mL / 時 / kg の見かけ上のクリアランス (CL / F)、114.0 mL / kg の見かけ上の分布体積 (V / F)、および非コンパートメント分析によって計算される 171 時間の最終半減期を、例示される抗体 B について計算する。得られた薬物動態結果は、延長した時間にわたって作用することができる治療抗体と一致している。

30

40

【 0 0 4 3】

配列

例示される HC (配列番号 1)

E V Q L L 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 S Y Y M S W V R Q A
P G K G L E W V S A I S L S G G S T Y Y A X S H K G R F T I S R D N S K N T L Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V R E V G A S X H N Y Y G M D V W G Q G T M V T

50

V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V
 T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
 T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P X C P A P E X X G G
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E
 M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
 Q K S L S L S L G

式中、残基62のXは、D、A、E、およびQのうちの1つであり、残基104のXは、NおよびTのうちの1つであり、残基231のXは、PおよびSのうちの1つであり、残基237のXは、AおよびFのうちの1つであり、残基238のXは、AおよびLのうちの1つである。

10

【0044】

例示されるLC(配列番号2)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I X R W L A W Y Q Q K P
 G K A P K L L I H D A S Q L X E G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P
 E D I A T Y Y C Q Q F D L L P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
 L S S P V T K S F N R G E C

20

式中、残基30のXは、SおよびWのうちの1つであり、残基55のXは、LおよびFのうちの1つである。

【0045】

例示されるHCDR1(配列番号3)

A A S G F T F S S Y Y M S

【0046】

例示されるHCDR2(配列番号4)

A I S L S G G S T Y Y A X S H K G

式中、残基13のXは、D、A、E、およびQのうちの1つである。

30

【0047】

例示されるHCDR3(配列番号5)

V R E V G A S X H N Y Y G M D V

式中、残基8のXは、NおよびTのうちの1つである。

【0048】

例示されるLCDR1(配列番号6)

R A S Q S I X R W L A

式中、残基7のXは、SおよびWのうちの1つである。

【0049】

例示されるLCDR2(配列番号7)

H D A S Q L X E

式中、残基7のXは、LおよびFのうちの1つである。

40

【0050】

例示されるLCDR3(配列番号8)

Q Q F D L L P L T

【0051】

例示されるHCVR(配列番号9)

E V Q L L 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 S Y Y M S W V R Q A
 P G K G L E W V S A I S L S G G S T Y Y A X S H K G R F T I S R D N S K N T L Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V R E V G A S X H N Y Y G M D V W G Q G T M V T

50

V S S

式中、残基 6 2 の X は、D、A、E、および Q のうちの 1 つであり、残基 1 0 4 の X は、N および T のうちの 1 つである。

【 0 0 5 2 】

例示される L C V R (配列番号 1 0)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I X R W L A W Y Q Q K P
G K A P K L L I H D A S Q L X E G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P
E D I A T Y Y C Q Q F D L L P L T F G G G T K V E I K

式中、残基 3 0 の X は、S および W のうちの 1 つであり、残基 5 5 の X は、L および F のうちの 1 つである。

10

【 0 0 5 3 】

例示される抗体 B の H C をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 1 1)

g a g g t g c a g c t g t t g g a g t c t g g g g g a g g c t t g g t a c a g
c c t g g g g g g t c c c t g a g a c t c
t c c t g t g c a g c c t c t g g a t t c a c c t t t a g c a g c t a t t a c
a t g a g c t g g g t c c g c c a g g c t
c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g g t c t c a g c t a t t a g t c t g
a g t g g t g g t a g c a c a t a c t a c
g c a g c g t c c c a c a a g g g c c g g t t c a c c a t c t c c a g a g a c
a a t t c c a a g a a c a c g c t g t a t
c t g c a a a t g a a c a g c c t g a g a g c c g a g g a c a c g g c c g t a
t a t t a c t g t g t c c g g g a g g t g
g g a g c t a g c a c t c a c a a c t a c t a c g g t a t g g a c g t c t g g
g g c c a a g g g a c c a t g g t c a c c
g t c t c t t c a g c t t c t a c c a a g g g c c c a t c g g t c t t c c c g
c t a g c g c c c t g c t c c a g g a g c
a c c t c c g a g a g c a c a g c c g c c c t g g g c t g c c t g g t c a a g
g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g
a c g g t g t c g t g g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g
c a c a c c t t c c c g g c t g t c c t a
c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g c a g c g t g g t g a c c
g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c
a c g a a g a c c t a c a c c t g c a a c g t a g a t c a c a a g c c c a g c
a a c a c c a a g g t g g a c a a g a g a
g t t g a g t c c a a a t a t g g t c c c c c a t g c c c a c c c t g c c c a
g c a c c t g a g g c c g c c g g g g g a
c c a t c a g t c t t c c t g t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c t
c t c a t g a t c t t c c c g g a c c c c t
g a g g t c a c g t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a g g a a g a c
c c c g a g g t c c a g t t c a a c t g g
t a c g t g g a t g g c g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g
c c g c g g g a g g a g c a g t t c a a c
a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a c
c a g g a c t g g c t g a a c g g c a a g
g a g t a c a a g t g c a a g g t c t c c a a c a a a g g c c t c c c g t c c
t c c a t c g a g a a a a c c a t c t c c
a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a g c c a c a g g t g t a c a c c
c t g c c c c a t c c c a g g a g g a g
a t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a
g g c t t c t a c c c a g c g a c a t c

20

30

40

50

g c c g t g g a g t g g g a a a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a c
t a c a a g a c c c a c g c c t c c c g t g
c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a g g c t a
a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g
c a g g a g g g g a a t g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a g
g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c a
c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c t g g g t

【0054】

例示される抗体BのLCをコードするヌクレオチド配列(配列番号12)

g a c a t c c a g a t g a c c c a g t c t c c a t c c t c c c t g t c t g c a 10
t c t g t a g g a g a c a g a g t c a c c
a t c a c t t g c c g g g c g a g t c a g a g t a t t t g g a g g t g g t t g
g c c t g g t a t c a g c a g a a a c c a
g g g a a a g c c c c t a a g c t c c t g a t c c a c g a t g c a t c c c a a
t t g t t c g a a g g g g t c c c a t c a
a g g t t c a g t g g a a g t g g a t c t g g g a c a g a t t t t a c t t t c
a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c t
g a a g a t a t t g c a a c a t a t t a c t g t c a a c a g t t t g a t t t g
c t c c c t c t c a c t t t c g g c g g a
g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g g a c c g t g g c t g c a c c a 20
t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a
t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g
t g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t
c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c
c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g
g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c
a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g
c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a g a a a c a c a a a g t c t a c g c c
t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c
c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c 30
a g g g g a g a g t g c

【0055】

組み換えヒトPACAP38のアミノ酸配列(配列番号13)

HSDGI FTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK

式中、残基38のKは、C末端アミド化によって翻訳後修飾されている

【0056】

組み換えヒトPACAP27のアミノ酸配列(配列番号14)

HSDGI FTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL

式中、残基27のLは、C末端アミド化によって翻訳後修飾されている

【配列表】

0006952888000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 1 2 N 15/13

- (72)発明者 キャサリン・ブローティガム・バイドラー
アメリカ合衆国46206-6288インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス6288、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内
- (72)発明者 マイケル・ブラビン・ジョンソン
アメリカ合衆国46206-6288インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス6288、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内
- (72)発明者 チェタンクマール・ナトヴァルラル・パテル
アメリカ合衆国46206-6288インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス6288、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

審査官 山本 晋也

- (56)参考文献 国際公開第2017/106578(WO, A1)
米国特許出願公開第2016/0304604(US, A1)
特表平06-500001(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K
C 1 2 N 1 5 /
A 6 1 K
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq