



(10) 授权公告号 CN 111164105 B

(45) 授权公告日 2023.07.04

(21) 申请号 201880063106.2

(22) 申请日 2018.09.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111164105 A

(43) 申请公布日 2020.05.15

(30) 优先权数据
62/565,278 2017.09.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/051898 2018.09.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/067293 EN 2019.04.04

(73) 专利权人 伊莱利利公司
地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 C·B·贝德勒 M·P·约翰逊
C·N·帕特尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 史文静 黄革生

(51) Int.Cl.
C07K 16/44 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2016304604 A1, 2016.10.20
EA 201591791 A1, 2016.03.31
WO 2017106578 A1, 2017.06.22
WO 9114786 A1, 1991.10.03
WO 2012106407 A2, 2012.08.09
R Schwarzhoff等. Specific monoclonal antibodies neutralize the action of PACAP 1-27 or PACAP 1-38 on intestinal muscle strips in vitro.《Comparative Study》.1995, 第55卷(第1期), 第57-66页.

审查员 杨莽嘉

权利要求书1页 说明书18页
序列表10页

(54) 发明名称
抗PACAP抗体

(57) 摘要
抗垂体腺苷酸环化酶激活肽的抗体, 包含这类抗PACAP抗体的组合物, 及用这类抗体治疗包括头痛和/或偏头痛在内的疼痛的方法。

1. 结合人垂体腺苷酸环化酶激活肽的抗体,其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中HCVR包含HCDR1、HCDR2和HCDR3以及LCVR包含LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中HCDR1的氨基酸序列是SEQ ID NO.3,HCDR2的氨基酸序列是SEQ ID NO.4,HCDR3的氨基酸序列是SEQ ID NO.5,LCDR1的氨基酸序列是SEQ ID NO.6,LCDR2的氨基酸序列是SEQ ID NO.7,且LCDR3的氨基酸序列是SEQ ID NO.8,

其中HCDR2在残基13处的氨基酸是丙氨酸,HCDR3在残基8处的氨基酸是苏氨酸,LCDR1在残基7处的氨基酸是色氨酸,并且LCDR2在残基7处的氨基酸是苯丙氨酸。

2. 权利要求1的抗体,其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中HCVR的氨基酸序列是SEQ ID NO.9以及LCVR的氨基酸序列是SEQ ID NO.10。

3. 权利要求2的抗体,其中HCVR在残基62处的氨基酸是丙氨酸以及在残基104处的氨基酸是苏氨酸,并且其中LCVR在残基30处的氨基酸是色氨酸以及在残基55处的氨基酸是苯丙氨酸。

4. 结合人垂体腺苷酸环化酶激活肽的抗体,其包含重链(HC)和轻链(LC),其中HC的氨基酸序列是SEQ ID NO.1以及LC的氨基酸序列是SEQ ID NO.2,其中HC在残基62处的氨基酸是丙氨酸以及在残基104处的氨基酸是苏氨酸,并且其中LC在残基30处的氨基酸是色氨酸以及在残基55处的氨基酸是苯丙氨酸。

5. 权利要求4的抗体,其中HC在残基62处的氨基酸是丙氨酸,在残基104处的氨基酸是苏氨酸,在残基231处的氨基酸是脯氨酸,在残基237处的氨基酸是丙氨酸,以及在残基238处的氨基酸是丙氨酸,并且其中LC在残基30处的氨基酸是色氨酸以及在残基55处的氨基酸是苯丙氨酸。

6. 权利要求1至5中任一项的抗体用于制备治疗原发性头痛或继发性头痛的药物的用途。

7. 权利要求1至5中任一项的抗体用于制备治疗偏头痛的药物的用途。

8. 权利要求1至5中任一项的抗体用于制备治疗三叉神经自主头痛的药物的用途。

9. 权利要求8的用途,其中三叉神经自主头痛是发作性丛集性头痛、慢性丛集性头痛、阵发性偏侧头痛和单侧神经痛样头痛发作之一。

抗PACAP抗体

[0001] 本发明属于医药领域。具体而言,本发明涉及抗垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)的抗体,包含这类抗PACAP抗体的组合物,及用这类抗体治疗包括原发性头痛(包括三叉神经自主头痛),继发性头痛和偏头痛(包括慢性偏头痛)在内的疼痛的方法。

[0002] 垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)是一种神经肽,遍布在神经系统中,所述神经系统包括三叉神经血管系统,三叉神经节,脊髓,下丘脑和垂体。PACAP以至少两种 α -酰胺化的活性形式存在:PACAP38(SEQ ID NO:13),其包含38个氨基酸并且是更普遍的活性形式,在哺乳动物组织中通常代表高达90%的PACAP;和PACAP27(SEQ ID NO:14),其包含与PACAP38相同的27个N-末端氨基酸。PACAP被认为在神经保护,神经调节,神经源性炎症和伤害感受,以及在引起包括头痛和偏头痛的疼痛中发挥作用。

[0003] 头痛和偏头痛估计每年影响3700万患者,其中三分之二以上未经治疗。原发性头痛被界定为不是由不同的或不相关的疾病或病症引起的头痛,而继发性头痛被界定为由不同的或不相关的潜在原因(例如,创伤,疾病或其他病症)导致的头痛。三叉神经自主头痛(“TACs”)被界定为原发性头痛,包括发作性和慢性丛集性头痛,阵发性偏侧头痛,连续性偏侧头痛和单侧神经痛样头痛发作。偏头痛是指“无先兆”的偏头痛(以前称为“普通偏头痛”)和“有先兆”的偏头痛(以前称为“经典偏头痛”)。慢性偏头痛被界定为每月头痛15天或以上,并其中至少有8天为偏头痛。当偏头痛的发作率为每月两次或以上,或者当偏头痛显著干扰患者的日常生活工作和/或急性药物治疗无效时,鼓励医生考虑采取预防性治疗选项。然而,迄今为止,用于偏头痛预防的治疗选项经常是无效的,并且当前的预防和急性治疗选项(例如,抗高血压药,抗惊厥药,抗抑郁药)有效率低并且具有相关的致残副作用。

[0004] PACAP的结构是本领域公知的(例如参见A.Miyata,A.等,Biochem Biophys Res Commun 170:643-648(1990)),抗PACAP抗体也是这样。例如,美国专利号5,486,472A,国际专利申请公开号WO/2012/106407A3和美国专利申请公开号2016-304604均公开了各种抗PACAP抗体及其潜在用途。然而,迄今为止,尚无靶向PACAP的抗体被批准用于治疗。因此,仍然存在对可选择的抗PACAP抗体的需要。具体而言,仍然存在对可选择的,能高效中和PACAP,提供持续的作用并且能够治疗包括原发性和继发性头痛以及包括慢性偏头痛在内的偏头痛的疼痛的抗PACAP抗体的需要。如同所有的治疗方法一样,安全性和毒性仍然是限制并且可选择的抗PACAP抗体不得伴随不可接受的免疫原性。因此,仍然存在对展示降低的人体内免疫原性的风险的可选择的抗PACAP抗体的需要。这类抗PACAP抗体还将优选地具有良好的物理化学性质以便于开发,制造和配制。

[0005] 本发明提供了结合人PACAP的抗体,其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR),其中HCVR包含互补决定区(CDRs)HCDR1,HCDR2和HCDR3并且LCVR包含互补决定区LCDR1,LCDR2和LCDR3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO.3,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO.4,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO.5,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO.6,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO.7,LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO.8。在一个具体实施方案中,HCDR2在残基13处包含天冬氨酸,HCDR3在残基8处包含天冬酰胺,LCDR1在残基7处包含丝氨酸,并且LCDR2在残基7处包含亮氨酸。在另一个具体实施方案中,HCDR2在残基13处包含丙

氨酸,HC DR3在残基8处包含苏氨酸。LC DR1在残基7处包含色氨酸,并且LC DR2在残基7处包含苯丙氨酸。在另一具体实施方案中,HC DR2在残基13处包含谷氨酸,HC DR3在残基8处包含苏氨酸,LC DR1在残基7处包含色氨酸,LC DR2在残基7处包含苯丙氨酸。在另一个甚至更具体的实施方案中,HC DR2在残基13处包含谷氨酰胺,HC DR3在残基8处包含苏氨酸,LC DR1在残基7处包含色氨酸,并且LC DR2在残基7处包含苯丙氨酸。

[0006] 本发明的实施方案提供了结合人PACAP的抗体,其包含HCVR和LCVR,其中HCVR的氨基酸序列为SEQ ID NO.9,而LCVR的氨基酸序列为SEQ ID NO.10。在具体实施方案中,HCVR在残基62处包含天冬氨酸,在残基104处包含天冬酰胺,并且LCVR在残基30处包含丝氨酸,在残基55处包含亮氨酸。在另外的具体实施方案中,HCVR在残基62处包含丙氨酸,在残基104处包含苏氨酸,并且LCVR在残基30处包含色氨酸,在残基55处包含苯丙氨酸。在某些实施方案中,HCVR在残基62处包含谷氨酸,在残基104处包含苏氨酸,并且LCVR在残基30处包含色氨酸和在残基55处包含苯丙氨酸。在某些实施方案中,HCVR在残基62处包含谷氨酰胺,在残基104处包含苏氨酸,并且LCVR在残基30处包含色氨酸,在残基55处包含苯丙氨酸。

[0007] 在另外的实施方案中,本发明提供了结合人PACAP的抗体,其包含重链(HC)和轻链(LC),其中HC的氨基酸序列为SEQ ID NO.1且LC的氨基酸序列为LC为SEQ ID NO.2。在具体实施方案中,HC在残基62处包含天冬氨酸,在残基104处包含天冬酰胺,在残基231处包含脯氨酸,在残基237处包含丙氨酸,以及在残基238处包含丙氨酸,并且LC在残基30处包含丝氨酸以及在残基55处包含亮氨酸。在另外的具体实施方案中,HC在残基62处包含丙氨酸,在残基104处包含苏氨酸,在残基231处包含脯氨酸,在残基237处包含丙氨酸,以及在残基238处包含丙氨酸,并且LC在残基30处包含色氨酸以及在残基55处包含苯丙氨酸。在另外的具体实施方案中,HC在残基62处包含谷氨酸,在残基104处包含苏氨酸,在残基231处包含脯氨酸,在残基237处包含丙氨酸,以及在残基238处包含丙氨酸,并且LC在残基30处包含色氨酸以及在残基55处包含苯丙氨酸。在某些具体实施方案中,HC在残基62处包含谷氨酰胺,在残基104处包含苏氨酸,在残基231处包含脯氨酸,在残基237处包含丙氨酸,以及在残基238处包含丙氨酸,并且LC在残基30处上包含色氨酸以及在残基55处上包含苯丙氨酸。

[0008] 本发明还提供了包含本发明的抗体和一种或多种可药用载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。另外,本发明提供治疗诸如包括原发性和继发性头痛在内的头痛之类的疼痛的方法,其包括对有需要的患者施用本发明的药物组合物。在甚至另一个实施方案中,原发性头痛是TAC。在甚至另一个实施方案中,本发明提供了治疗偏头痛的方法,其包括对有需要的患者施用本发明的药物组合物。在某些这样的实施方案中,偏头痛是慢性偏头痛。本发明还提供了治疗与肥大细胞脱颗粒相关疼痛的方法,其包括对有需要的患者施用本发明的抗体或药物组合物。根据某些这样的实施方案,肥大细胞脱颗粒相关疼痛是原发性或继发性头痛和偏头痛中之一。

[0009] 此外,本发明提供了治疗疼痛例如原发性头痛,继发性头痛和/或偏头痛的方法,其包括对有需要的患者施用有效量的本发明的抗体。根据某些实施方案,原发性头痛是TAC。根据某些实施方案,偏头痛是慢性偏头痛。

[0010] 本发明还提供用于治疗的本发明的抗体。更具体地,本发明提供用于治疗疼痛的本发明的抗体。在具体实施方案中,本发明提供用于治疗原发性头痛,继发性头痛和/或偏头痛的本发明的抗体。

[0011] 另外,本发明提供了本发明的抗体在制备用于治疗疼痛例如原发性头痛、继发性头痛和/或偏头痛的药物中的用途。在甚至更具体的实施方案中,原发性头痛是TAC。在某些具体实施方案中,偏头痛是慢性偏头痛。

[0012] 本发明还涉及编码本发明抗体的核酸分子和表达载体。在一个实施方案中,本发明提供了DNA分子,其包含编码具有SEQ ID NO.1的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基62是天冬氨酸,残基104是天冬酰胺,残基231是脯氨酸。残基237是丙氨酸,以及残基238是丙氨酸。在某些实施方案中,残基62是丙氨酸,残基104是苏氨酸,残基231是脯氨酸,残基237是丙氨酸以及残基238是丙氨酸。在某些实施方案中,残基62是谷氨酸,残基104是苏氨酸,残基231是脯氨酸,残基237是丙氨酸以及残基238是丙氨酸。在另一些实施方案中,残基62是谷氨酰胺,残基104是苏氨酸,残基231是脯氨酸,残基237是丙氨酸并且残基238是丙氨酸。

[0013] 本发明的实施方案还提供了一种DNA分子,其包含编码具有SEQ ID NO.2的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基30是丝氨酸以及残基55是亮氨酸。在某些实施方案中,残基30是色氨酸,以及残基55是苯丙氨酸。

[0014] 在某些实施方案中,本分子的DNA分子包含编码具有SEQ ID NO.1的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基62是天冬氨酸,残基104是天冬酰胺,残基231是脯氨酸,残基237是丙氨酸以及残基238是丙氨酸,并包含编码具有SEQ ID NO.2的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基30是丝氨酸以及残基55是亮氨酸。在一个具体实施方案中,本分子的DNA分子包含编码具有SEQ ID NO.1的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基62是丙氨酸,残基104是苏氨酸,残基231是脯氨酸,残基237是丙氨酸以及残基238是丙氨酸,并包含编码具有SEQ ID NO.2的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基30是色氨酸以及残基55是苯丙氨酸。在一个具体实施方案中,本分子的DNA分子包含编码具有SEQ ID NO.1的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基62是谷氨酸,残基104是苏氨酸,残基231是脯氨酸,残基237是丙氨酸以及残基238是丙氨酸,并包含编码具有SEQ ID NO.2的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基30是色氨酸以及残基55是苯丙氨酸。在另一个具体实施方案中,本分子的DNA分子包含编码具有SEQ ID NO.1的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基62是谷氨酰胺,残基104是苏氨酸,残基231是脯氨酸,残基237是丙氨酸以及残基238是丙氨酸,并包含编码具有SEQ ID NO.2的氨基酸序列的多肽的多核苷酸序列,其中残基30是色氨酸以及残基55是苯丙氨酸。本发明还提供根据方法制备的抗体,其中所述方法包括在表达所述抗体的条件下培养包含本发明的多核苷酸序列的宿主细胞,并从所述宿主细胞中回收本发明的抗体。

[0015] 本文所用的“抗体”是包含通过二硫键互相连接的2HC和2LC的免疫球蛋白分子。每条LC和HC的氨基末端部分包括约100-120个氨基酸的主要通过其中所含的CDR负责抗原识别的可变区。CDR之间散布更保守的区域,称为构架区(“FR”)。每个LCVR和HCVR由3个CDR和4个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。LC的3个CDR被称为“LCDR1,LCDR2和LCDR3”,以及HC的3个CDR被称为“HCDR1,HCDR2和HCDR3”。CDR包含了大多数与抗原形成特异性相互作用的残基。抗体结合特定抗原功能的能力在很大程度上受这六个CDR的影响。根据公知的Kabat编号惯例(Kabat等,Ann.NY Acad.Sci.190:382-93(1971);Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,

U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242(1991)) 和North编号惯例(North等,A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology,406:228-256(2011)) 将氨基酸分配至本发明的抗体的LCVR和HCVR区内的CDR结构域。

[0016] LC分类为kappa (κ) 或lambda (λ), 它们各自以本领域已知的特定恒定区为特征。本发明的抗体包括kappa (κ) LC。HC分为gamma (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ) 或epsilon (ϵ), 并将抗体的同种型分别定义为IgG, IgM, IgA, IgD或IgE。本发明的抗体包括IgG HC。IgG抗体可以进一步分为亚类, 例如IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。在一个具体实施方案中, 本发明的抗体是IgG4。每条HC的羧基末端部分确定了主要负责效应子功能的恒定区。在一个具体实施方案中, 本发明的抗体在每条HC的恒定区有一个或多个降低效应子功能的修饰。在一个更具体的实施方案中, 本发明的抗体是IgG4, 并且在两条HC的恒定区中具有降低了效应子功能的修饰, 包括在残基237和238处的氨基酸丙氨酸(残基编号是线性的并且基于示例性SEQ ID NO.1的HC)。在一个甚至更具体的实施方案中, 本发明的抗体是IgG4, 并且在两条HC的恒定区中都具有降低效应子功能的修饰, 包括在残基237和238处的氨基酸丙氨酸, 并且在两条HC的恒定区中都具有另外的提高稳定性的修饰, 包括残基231处的氨基酸脯氨酸(残基编号是线性的并且基于示例性SEQ ID NO.1的HC)。

[0017] 本发明的抗体是单克隆抗体 (“mAb”)。mAb可以例如通过杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、合成技术(例如CDR移植)或这类或其他的本领域已知的技术的组合来产生。本文所指的mAb是衍生自单个拷贝或克隆的抗体, 所述克隆包括例如任何真核, 原核或噬菌体克隆, 而不是其产生方法。

[0018] 产生和纯化抗体的方法是本领域公知的。例如, 可以筛选噬菌体文库, 从而筛选数千个Fab片段与重组人PACAP的相互作用。所得到的相互作用可以回收, 纯化, 并使用本领域公知的常规方法确定氨基酸序列, 从而可以构建起始的前导抗体。本发明的抗体是经工程化以包含一个或多个个人构架区的。可以通过其网站<http://imgt.cines.fr>从ImMunoGeneTics(INGT), 或从Immunoglobulin FactsBook, Marie-Paule Lefranc和Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351获得人类构架胚系序列。根据具体的实施方案, 用于本发明的抗体的种系HC和LC构架区分别包括3-23和018。

[0019] 在本发明的具体实施方案中, 以分离的形式提供抗体或编码其的核酸。本文所用的术语“分离的”指这样的蛋白质、肽或核酸, 其不含或基本不含其他见于细胞环境中的该大分子种类。

[0020] 可以使用已知方法制备和纯化本发明的抗体。例如, 可以将编码HC(例如, SEQ ID NO.1给出的氨基酸序列)和LC(例如, SEQ ID NO.2给出的氨基酸序列)的cDNA序列克隆并工程化到GS(谷氨酰胺合成酶)表达载体中。然后可以将工程化的免疫球蛋白表达载体稳定转染到CHO细胞中。如本领域技术人员将会理解的, 抗体哺乳动物表达会引起糖基化, 通常位于Fc区域中高度保守的N-糖基化位点处。可以针对特异性结合人PACAP的抗体的表达验证稳定克隆。阳性克隆可以扩增到无血清培养基中, 以在生物反应器中生产抗体。可以通过常规技术纯化已经分泌了抗体的培养基。例如, 可将培养基方便地加至用相容的缓冲液例如磷酸盐缓冲盐溶液平衡的Protein A或G Sepharose FF柱。洗柱以去除非特异性结合组分。例如通过pH梯度洗脱结合的抗体, 并诸如通过SDS-PAGE检测抗体级分, 然后合并。抗体可以

用常用技术浓缩和/或除菌过滤。可溶性聚集体和多聚体可通过常用技术有效去除,包括尺寸排阻、疏水相互作用、离子交换或羟基磷灰石色谱。产物可以立即冷冻,例如在-70℃,或可以冻干。

[0021] 本发明的抗体可用于治疗患者。更具体地,期望本发明的抗体可治疗一类疼痛,其特别地包括原发性和继发性头痛,以及包括慢性偏头痛在内的偏头痛。尽管期望本发明的抗体用于治疗疼痛,包括原发性和继发性头痛以及偏头痛,但这类抗体还可用于其他疼痛的治疗。如同在本文中可互换地使用的,“治疗”以及其各个词性形式“treatment and/or treating and/or treat”意指其中可能存在减慢,中断,阻滞,控制,阻止或逆转本文所描述病症进展的所有过程,但未必表明所有病症症状的完全消除。治疗包括施用本发明的抗体以治疗人的疾病或病况,其将从PACAP活性的降低中受益,并且包括:(a)抑制疾病的进一步进展,即,阻止其发展;(b)减轻疾病,即引起疾病或病症的消退或缓解其症状或并发症;(c)预防具有症状的疾病的发作。

[0022] 如同在本文中可互换地使用的,术语“患者”,“受试者”和“个体”是指人。在某些实施方案中,所述患者的特征还在于疾病,病症或病况(例如疼痛,例如原发性或继发性头痛和/或偏头痛,包括慢性偏头痛),其将受益于PACAP活性的降低。在另一个实施方案中,所述患者的特征还在于处于发生如上描述的病况或将从PACAP活性降低中受益的病况的风险中。

[0023] 如本文所用,术语“结合(或结合到)”是指抗体与人PACAP的表位的相互作用。术语“表位”如本文所用指的是被本发明的抗体识别的抗原的分散的三维位点。

[0024] 可以将本发明的抗体并入药物组合物中,该药物组合物可以通过本领域公知的方法制备,并且包含本发明的抗体和一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂(例如,Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第22版, Loyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012年,其提供了从业人员通常已知的配制技术汇编。适用于药物组合物的载体包括任何与本发明的抗体结合后可保留分子活性且对患者免疫系统无反应性的物质。

[0025] 包含本发明的抗体的药物组合物可以通过胃肠外途径(例如皮下、静脉内、腹膜内、肌内或透皮)对处于本文所述疾病或病症风险或显示本文所述疾病或病症的患者施用。本发明的药物组合物包含在本文中可互换使用的“有效量”或“治疗有效量”的本发明的抗体。有效量指达到所希望得到的治疗结果所必需的量(在剂量、持续时期和施用方式上)。抗体的有效量可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及抗体在个体中引起所希望得到的反应的能力等因素而变。有效量也是在其中本发明抗体的治疗性有益效果超出了任何毒性或有害作用的量。

实施例

[0026] 实施例1. 示例性抗PACAP抗体的工程化和表达

[0027] 当构建本发明的抗PACAP抗体时,遇到了与化学和物理稳定性有关的重大问题。例如,最初的人源化构建体遇到的问题包括低结合亲和力,不可接受的免疫原性,可变区脱酰胺,氧化,异构化和低功效。

[0028] 因此,对本发明的抗体,进行了对化学和物理的工程化改造以改善结合亲和力,消

除或减少HC二聚化,降低免疫原性以及改善化学和物理稳定性。在整个重链和轻链上都进行了氨基酸修饰的工程化。还施行了广泛的蛋白质稳定性研究,并针对表达和热稳定性特性以及其他特性(包括结合亲和力)筛选了构建的抗体。以下抗体,包含来自原始构建体的许多修饰,被鉴定为具有高结合亲和力,化学和物理稳定,具有低免疫原性及具有与每月施用相一致的药代动力学特性。在最初的人源化构建体中没有鉴定出包含本发明抗体的修饰。

[0029] 表1中列出了本发明的示例性抗PACAP抗体。示例性抗体包括SEQ ID NO:1的重链和SEQ ID NO:2的轻链,以及人HC构架3-23和带有构架018的人κLC。此外,表1中还提供了改善了抗体化学和物理稳定性及功能特性的轻链和重链内的工程化修饰。示例性抗PACAP抗体的各个区域之间的关系如下(氨基酸编号采用线性编号;将氨基酸分配至可变区结构域是基于在www.imgt.org可获得的International Immunogenetics Information System®;将氨基酸分配至CDR结构域是基于公知的North编号惯例,其中基于公知的Kabat编号惯例的HCDR2除外):

[0030] 表1:本发明的示例性抗PACAP抗体的氨基酸区域。

SEQ ID NO:1			SEQ ID NO:2		
重链可变区	区域	位置	轻链可变区	区域	位置
	FRH1	1-22		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
恒定区	CH	124-449	恒定区	CL	108-214
示例性抗体 A	62D ; 104N ; 231P ; 237A ; 238A		示例性抗体 A	30S ; 55L	
示例性抗体 B	62A ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		示例性抗体 B	30W ; 55F	
示例性抗体 C	62E ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		示例性抗体 C	30W ; 55F	
体 C			体 C		
示例性抗体 D	62Q ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		示例性抗体 D	30W ; 55F	

[0031] [0032] [0033] 以下实施例和测定法证明本发明的抗体可用于治疗疼痛,包括原发性和继发性头痛以及偏头痛。但是,应理解,以下实施例以说明而非限制的方式给出,本领域普通技术人员可进行多种修改。

[0034] 本发明的示例性抗PACAP抗体基本可以按照如下方法进行表达和纯化。用包含编码根据表1的HC氨基酸序列的DNA序列(例如,编码表1中所示的示例性抗体B的HC的SEQ ID

NO:11的DNA序列)和编码根据表1的LC氨基酸序列的DNA序列(例如,编码表1中所示的示例性抗体B的LC的SEQ ID NO:12的DNA序列)的谷氨酰胺合成酶(GS)表达载体通过电穿孔转染中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)。该表达载体编码SV早期(猿猴病毒40E)启动子和GS基因。表达GS允许了CHO细胞需要的氨基酸谷氨酰胺的生物化学合成。转染后,用50 μ M L-甲硫氨酸亚砷亚胺(L-methionine sulfoximine;MSX)对细胞进行混合选择(bulk selection)。利用MSX对GS的抑制作用提高选择的严格性。相对于表达内源性GS水平的CHO野生型细胞,表达载体cDNA整合到宿主细胞基因组的转录活性区域中的细胞可以被选择出来。将转染汇集物以低密度铺板以允许稳定表达细胞接近克隆生长。筛选主孔中的抗体表达,然后在无血清悬浮培养中放大以用于生产。将抗体已分泌进入其中的澄清培养基加至用相容的缓冲液如磷酸缓冲盐溶液(pH 7.4)平衡的蛋白A亲和柱。用1M NaCl洗柱以去除非特异性结合组分。例如用pH(约)3.5的柠檬酸钠洗脱结合的抗体,并用1M Tris缓冲液中和级分。如通过SDS-PAGE或分析型尺寸排阻检测抗体级分,然后合并。可溶性聚集体和多聚体可通过常用技术有效去除,包括尺寸排阻、疏水相互作用、离子交换或羟基磷灰石色谱。本发明的示例性抗PACAP抗体可以用常用技术浓缩和/或除菌过滤。在这些色谱步骤之后,示例性抗体的纯度大于95%。本发明的示例性抗PACAP抗体可以立即冷冻于-70 $^{\circ}$ C或在4 $^{\circ}$ C保存几个月。

[0035] 实施例2. 结合亲和力

[0036] 使用基于动力学排阻的96孔板的测定方法(改编自Estep等人,mAbs,2013,5:270-278)确定每种抗体-抗原复合物的结合亲和力(K_D)。简而言之,制备每种示例性抗体(表1所列)的3倍稀释系列,从7290pM的起始浓度至41fM;每个系列均包含抗体空白对照。样品制备于3%(w/v)Blocker A溶液(MSD,#R93AA-1)中,并将固定的最终抗原浓度为30pM的N端生物素化PACAP27(定制合成,CPC Scientific)或N端生物素化PACAP38(Anaspec,#23590)添加到每个样品中。将100 μ l体积的每种抗原-抗体样品添加到96孔微量滴定板(Greiner,EK-20101)的各个孔中,一式两份。用光学粘性膜(Thermo Fisher Scientific,#4311971)封板,并在37 $^{\circ}$ C下孵育3至4天使样品平衡。在分析前一天用30 μ l以3 μ g/ml浓度在磷酸盐缓冲液(PBS)中的相应抗体(如用于滴定系列的)包被96孔MSD标准板(MSD,#L15XA)的每一行。在实验当天,将MSD标准板用150 μ l PBS洗一次后,在30 $^{\circ}$ C置于MaxQ 4450台式摇床(Thermo Fisher Scientific),以300rpm的摇动用150 μ l 3%Blocker A溶液封闭45分钟。用PBS洗涤3次后,将50 μ l的每种抗原抗体样品(如上所描述制备和孵育的)添加到MSD标准板中,并在30 $^{\circ}$ C以300rpm摇动孵育150秒。用PBS进行单次洗涤后,加入50 μ l在1%(w/v)Blocker A溶液中制备的1 μ g/ml SULFO-TAG标记的链霉亲和素(MSD,#R32AD-5)到MSD标准板中,并将板在30 $^{\circ}$ C以300rpm摇动孵育3分钟。用PBS再洗板3次,然后每孔加入150 μ l 1 \times Read缓冲液(MSD,#R92TC-2)。使用MESO Quickplex SQ 120/1300仪器(Meso Scale Discovery)读取MSD标准板。使用SigmaPlot(Version 12.5,Systat Software)完成数据分析,并用SigmaPlot的集成四参数逻辑曲线模型(Four Parameter Logistic Curve Model)确定结合亲和力(K_D)。结果在表2中提供。

[0037] 表2:在37 $^{\circ}$ C时抗体-抗原复合物的结合亲和力(K_D)

		结合亲和力, K_D (pM, 37°C)	
	抗体	抗原 (PACAP38)	抗原 (PACAP27)
[0038]	示例性抗体 A	未确定	37.0
	示例性抗体 B	12.8	11.6
[0039]	示例性抗体 C	14.6	14.5
	示例性抗体 D	9.0	10.5

[0040] 实施例3. 体内(Invivo)PACAP降解

[0041] 在大鼠中评估体内循环PACAP38的降解。将一种对照IgG4抗体(10mg/kg)或示例性抗体A(10mg/kg)静脉注射给大鼠。评估每只大鼠血浆中的PACAP38基线,然后通过静脉内向大鼠注射6 μ g/kg的PACAP38。注射PACAP38后,在120分钟内收集血浆样品,并通过改进的ELISA形式确定PACAP38的总水平(与抗体结合或未结合的)。简而言之,用在PBS中的1 μ g/ml抗PACAP38抗体(US Biological目录号P1775-03C)以30 μ l/孔包被96孔MSD板(MSD,目录号:L15xA-1),并在40°C孵育过夜。用200 μ l/孔的PBST洗板3次,然后用150 μ l/孔的于PBS中的3%Blocker A(MSD目录号R93BA-2)在室温下以650rpm旋转封闭1小时。之后,用200 μ l/孔PBST洗板3次。用含有1份稀释剂2(MSD目录号R51-BB-3)和39份稀释剂3(MSD目录号R51BA-3)的测定缓冲液稀释PACAP38的校准物(Bachem目录号H430-0500)到1000pg/mL,并补充200 μ g/ml的HBR1(Scantibodies Inc,目录号3KC533)和10 μ g/ml的生物素-示例性抗体A。通过用测定缓冲液对1000pg/mL的校准物进行三倍系列稀释来制备校准物标准曲线。将血浆样品用补充了200 μ g/mL HBR1和10 μ g/mL生物素-示例性抗体A的稀释剂3稀释40倍。将25 μ l不同浓度的校准物和稀释的血浆样品加入测定板的各个孔中并以650rpm的转速在室温下旋转孵育2小时。用200 μ l/孔PBST洗板3次后,向每个孔中加入25 μ l在稀释剂3中的0.5 μ g/ml磺基标签标记的山羊抗人IgG(MSD目录号R32AJ-1),并将平板在室温下孵育1小时。随后,将板用200 μ l/孔PBST洗板3次,并向每个孔中添加150 μ l 2X读取缓冲液T(MSD,目录号R92TC-3),用MSD读板器读取信号(结果显示为可检测的PACAP38水平,平均值 \pm SEM(n=2-3))。结果列于表3。

[0042] 表3:PACAP38血浆水平

		PACAP38 注射后以下时间点的 PACAP38 血浆水平 (平均值 \pm SEM (N)) (ng/mL)					
	抗体	基线	5 分钟	30 分钟	60 分钟	90 分钟	120 分钟
[0044]	示例性抗体 A	0.4 \pm 0.0 (2)	200.0 \pm 23.0 (3)	74.1 \pm 11.8 (3)	37.8 \pm 3.2 (3)	20.7 \pm 2.9 (3)	11.7 \pm 2.5 (2)
	对照 IgG4 抗体	0.5 \pm 0.5 (3)	6.2 \pm 2.5 (3)	2.3 \pm 0.9 (3)	1.1 \pm 0.3 (3)	0.5 \pm 0.2 (3)	0.3 \pm 0.1 (3)

[0045] 示于表3中的结果表明静脉注射示例性抗体A阻止了PACAP38的分布,但没有阻止PACAP38的体内降解。

[0046] 实施例4. 抑制PACAP27, PACAP38或VIP诱导的cAMP

[0047] 在转染了表达人PAC 1(NP_001186564.1)或人VPAC2(NP_003373.2)的载体的CHO-K1细胞(ATCC,目录号CCL-61)中评估了本发明的抗体对PACAP27,PACAP38和VIP诱导的cAMP刺激的中和作用。用非酶细胞解离液(Cell Dissociation Buffer,Gibco#313131-014)收获CHO-K1细胞,计数,离心并重悬于测定缓冲液中至10,000个细胞/25 μ l。将浓缩的细胞(25 μ l中10,000个)加至96孔板的孔中。

[0048] 在100 μ l测定缓冲液(含钙和镁的HBSS(Hyclone,ThermoScientific,SH30268),0.1%BSA(Sigma-Aldrich,#A7888),500 μ M IBMX(Sigma-Aldrich,I5879))中连续稀释示例性抗体(表1中所列)至所需最终浓度的4倍。将稀释的示例性抗体与激动剂(2倍终浓度)在室温下孵育15分钟。激动剂的终浓度是:人PAC1中PACAP27和PACAP38为100pM,人VPAC2中PACAP27和PACAP38为800pM,人VPAC2测定中VIP为800pM。此后,将25 μ l的示例性抗体-激动剂溶液添加到96孔板的各个孔中(包含细胞),并在室温下孵育1小时。使用cAMP femto 2(Cisbio,62AM5PEC)确定每个孔中的cAMP形成。将25 μ l cAMP-d2工作溶液(Cisbio,62AM5PEC)添加到每个孔中,然后添加25 μ l抗cAMP-穴状配合物(Anti-cAMP-Cryptate)工作溶液,并将板于室温黑暗孵育1小时。使用Envision 12(Perkin Elmer,激发光330nm)仪器在665和620nm处测量产生的HTRF信号,并绘制665/620的比例以量化cAMP(数据使用Graphpad Prism 7绘制,IC50值使用集成的四参数逻辑曲线模型拟合例程序)。结果在表4中提供为平均值 \pm SEM。

[0049] 表4:体外中和PACAP27和PACAP38诱导的cAMP升高

抗体	抑制(IC50) (pM, 平均值 \pm SEM(N))				
	PACAP38 (100 pM) 在人 PAC1 中	PACAP27 (100 pM) 在人 PAC1 中	PACAP38 (800 pM) 在人 VPAC2 中	PACAP27 (800 pM) 在人 VPAC2 中	VIP (800 pM) 在人 VPAC2 中
[0050] 示例性抗体 A	554 \pm 264 (N=2)	2250 (N=1)	714 \pm 194 (N=6)	781 \pm 340 (N=2)	>100,000 (N=1)
示例性抗体 B	265 \pm 62 (N=3)	270 \pm 103 (N=2)	294 \pm 60 (N=3)	605 \pm 135 (N=2)	>100,000 (N=1)
示例性抗体 C	303 \pm 15 (N=3)	311 \pm 29 (N=2)	325 \pm 99 (N=3)	595 \pm 219 (N=2)	>100,000 (N=1)
示例性抗体 D	205 \pm 35 (N=3)	212 \pm 42 (N=2)	243 \pm 112 (N=3)	515 \pm 127 (N=2)	>100,000 (N=1)

[0051] 实施例5.免疫原性分析

[0052] 使用包括Tregitope-adjusted Epimatrix得分的EpiMatrix T细胞表位预测软件(在Interactive Screening and Protein Reengineering Interface(ISPRI)的在线门户(Epivax,Inc.)中)进行计算机模拟免疫原性评估。与每种抗体相关的轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)蛋白序列分别进行了分析。根据Epivax,Tregitope-adjusted Epimatrix得分大于零的蛋白质序列具有更高的总体免疫原性潜力。还对每个LCVR和HCVR进行EpiMatrix簇免疫原性评估,以鉴定每种抗体的CDR内的T细胞表位簇。由2个或多个相邻EpiBars的存在所定义的T细胞表位簇的存在与更高的总体免疫原性潜力相关。使用North CDR定义,在示例性抗体A,B或C中未鉴定到CDR相关的T细胞表位簇。在比较抗体ALD 1.H(在美国专利公开号US 2016/0304604中描述为“抗体1.H”)的LCVR的CDR2中鉴定到有4个相邻EpiBar的T细胞表位簇,表明比较抗体具有更高的免疫原性潜力。结果提供在表5A,

5B和5C中。

[0053] 表5A:通过EpiMatrix T细胞表位预测进行的计算机模拟免疫原性风险评估

[0054]	Epimatrix 得分		
	抗体	HCVR	LCVR

[0055]	示例性抗体 A	58.84	19.44	40.61
	示例性抗体 B	65.12	26.41	47.21
	示例性抗体 C	58.74	26.41	43.79
	示例性抗体 D	65.49	26.41	47.41
	ALD 1.H	70.11	35.2	53.16

[0056] 表5B:Tregitope-Adjusted Epimatrix评估

[0057]	Tregitope-Adjusted Epimatrix 得分			
	抗体	HCVR	LCVR	HCVR+LCVR
	示例性抗体 A	-32.82	-34.22	-33.46
	示例性抗体 B	-26.54	-27.24	-26.86
	示例性抗体 C	-32.92	-27.24	-30.29
	示例性抗体 D	-26.17	-27.24	-26.67
	ALD 1.H	-28.41	1.41	-13.93

[0058] 表5C:通过EpiMatrix簇免疫原性评估进行的计算机模拟免疫原性风险评估

[0059]	抗体	CDR相关的Epibar簇
	示例性抗体A	0
	示例性抗体B	0
	示例性抗体C	0
	示例性抗体D	0
	ALD 1.H	1

[0060] 实施例6.中和肥大细胞脱颗粒诱导的PACAP释放

[0061] 使用StemSpan培养基 (StemCell) 和SCF/IL-6使得培养中人类脐带血干细胞分化为人肥大细胞。在测定当天,将肥大细胞以悬于Tyrode's缓冲液(130mM NaCl, 5mM KCl, 1.4mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 5.6mM葡萄糖, 10mM HEPES和0.1%BSA, pH 7.4)中每50 μ l 100,000个细胞铺板到96孔组织培养板的孔中。如下所述,在存在或不存在示例性抗体的情况下,用PACAP38或PACAP27处理细胞。

[0062] 通过添加每孔25 μ l 4X浓缩的示例性抗体(最终浓度为153 μ M示例性抗体)进行单点测试。通过添加每孔25 μ l 4X浓缩抗体至最终剂量范围为0至153 μ M(三倍稀释)进行剂量曲线测试。每个孔中添加25 μ l 4X浓缩的PACAP38或PACAP27,至最终浓度为1 μ M PACAP(38或27)。仅测定培养基用作无处理对照,而IgG4单抗用作阴性对照。一式三份进行测试。将96孔板置于培养箱(37 $^{\circ}$ C)中30分钟。孵育后,收集30 μ l/孔的上清液,并通过商品化测定法(Millipore)测量类胰蛋白酶的活性。通过以下公式计算上清液中类胰蛋白酶的释放百分比(%):((实验组类胰蛋白酶的释放-载体对照组类胰蛋白酶的释放)/(类胰蛋白酶的总释放量-载体对照组类胰蛋白酶的释放) \times 100,其中通过冷冻/解冻肥大细胞获得类胰蛋白酶的总释放量)。结果提供在表6A,6B和6C中。

[0063] 表6A:人肥大细胞中PACAP(27和38)诱导的类胰蛋白酶释放的单点抑制

		添加 PACAP38 或 27 后类胰蛋白酶的释放百分比 (%)	
抗体		PACAP38	PACAP27
[0064]	示例性抗体 B	4.9 \pm 1.1	21 \pm 1.4
	示例性抗体 C	5.5 \pm 1.4	14.2 \pm 1.1
	示例性抗体 D	4.2 \pm 0.7	15.1 \pm 4.0
	仅测定培养基	-0.3 \pm 0.3	-0.3 \pm 0.3
	IgG4 mAb	103.6 \pm 0.5	109.7 \pm 0.4

[0065] 表6B:人肥大细胞中PACAP27诱导的类胰蛋白酶释放的剂量曲线抑制

[0066]

抗体	剂量 (μM)	添加 PACAP27 后类胰蛋白酶的 释放百分比 (%)
示例性抗体 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
示例性抗体 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
示例性抗体 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

[0067]	仅测定培养基		-0.2 ± 1.0
	IgG4 单抗	153	94.8 ± 4.8

[0068] 表6C:人肥大细胞中PACAP38诱导的类胰蛋白酶释放的剂量曲线抑制

抗体	剂量 (μM)	添加 PACAP38 后类胰蛋白酶释放的百分比(%)
示例性抗体 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
示例性抗体 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
示例性抗体 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

[0070]		0.2	74.0 ± 1.8
		0	76.5 ± 0.7
	仅测定培养基		-0.2 ± 1.0
	IgG4 mAb	153	79.6 ± 4.1

[0071] 实施例7. 体内PACAP诱导的cAMP中和

[0072] 在CD-1鼠模型 (Envigo) 中评估体内PACAP诱导的血浆cAMP升高的中和作用。简而言之, 雄性CD-1小鼠以10mg/kg通过皮下施用以下之一: 对照IgG4抗体 (N=6); 对照IgG4抗体仅加PBS/咯利普兰 (N=5); 示例性抗体B (N=5); 示例性抗体C (N=5); 或示例性抗体D (N=6)。抗体处理后三天, 给小鼠静脉内施用PACAP38 (13nmols/kg) 加咯利普兰 (100µg/mL); 某些先前接受IgG4对照抗体处理的小鼠仅静脉内施用PBS (含0.2%乙醇, 1%BSA, 5ml/kg) 和咯利普兰 (100µg/ml)。在PACAP38处理十分钟后, 将血液收集在含有EDTA的试管中, 并离心分离血浆。使用可商购的cAMP ELISA (Cell Bios, Inc.), 根据制造商的说明测定血浆中cAMP的水平, 统计分析将对数转换cAMP浓度应用于单向方差分析 (one-way ANOVA, Graphpad Prism 7), 然后进行Dunnett事后比较分析 (Dunnett's post hoc analysis), 结果列于表7中, 为均值 ± SE。

[0073] 表7: PACAP诱导的血浆cAMP水平

	抗体	血浆 cAMP 水平 (nM, 平均值 ± SEM)
[0074]	IgG4 对照抗体 (仅加 PBS/咯利普兰)	238 ± 60 (N=5) *
	IgG4 对照抗体 (加 PACAP)	4095 ± 318 (N=6)
	示例性抗体 B (加 PACAP)	715 ± 60 (N=5) *
	示例性抗体 C (加 PACAP)	666 ± 96 (N=5) *
	示例性抗体 D (加 PACAP)	560 ± 130 (N=6) *

[0075] *p<0.0001vs. IgG4对照抗体 (PACAP38)

[0076] 实施例8. 体内 (InVivo) 中和三叉神经节刺激诱导的硬膜血浆蛋白外渗

[0077] 使用大鼠模型检测了本发明的抗PACAP抗体在体内 (in vivo) 阻断三叉神经节刺激后释放PACAP诱导的血浆蛋白外渗的能力。简而言之, Sprague-Dawley大鼠 (Envigo, 雄性, 250-350g) 通过皮下施用以下之一: 1-10mg/kg示例性抗体A; 3-30mg/kg例示抗体B; 或3或10mg/kg的对照IgG4抗体。72小时后, 用戊巴比妥钠 (65mg/kg, 腹腔内) 麻醉大鼠, 并将其置于门齿杆设置在-2.5mm的立体定位架 (David Kopf Instruments) 中。行中线矢状头皮切口, 然后钻两对双侧孔穿过颅骨 (后部3.2毫米, 侧部1.8毫米和3.8毫米, 所有坐标均参照前

囱)。成对的不锈钢刺激电极(Rhodes Medical Systems, Inc.)向下经过这些孔从硬膜进入双侧半球,降至9.2毫米深度。在三叉神经节刺激前两分钟,将荧光素异硫氰酸酯标记的牛血清白蛋白(FITC-BSA) (20mg/kg, 静脉注射), 蛋白质外渗的标记物, 注入股静脉。使用带有PSIU6光电隔离单元的Model S48 Grass Instrument Stimulator(Grass-Telefactor), 以1.0mA (5Hz, 5毫秒脉冲持续时间) 的电流强度刺激左三叉神经节5分钟。刺激后五分钟, 通过40ml 盐水驱血处死大鼠。

[0078] 处死大鼠后, 除去颅骨顶部并收集硬膜。从双侧半球取膜样品, 用水冲洗, 然后在显微镜载玻片上平展。将载玻片在载玻片加热器上干燥15分钟, 然后组织用70%甘油/水溶液加盖盖玻片。使用配备有光栅单色光镜和分光光度计的荧光显微镜(Zeiss) 对每个硬膜样品中的FITC-BSA染料进行定量。对三叉神经节电刺激引起的外渗是同侧效应(即仅发生在三叉神经节被刺激的一侧硬膜), 因此允许未受刺激的一半硬膜作为对照。计算刺激侧与未刺激侧硬膜外渗的比率。结果提供在表8中(平均值±SE)。

[0079] 表8: 三叉神经节刺激诱导的硬膜血浆蛋白外渗

	抗体 (mg/kg)	外渗比率 (均值 ± SEM)
[0080]	IgG4 对照抗体 (10 mg/kg) (N=3)	1.87 ± 0.04
	示例性抗体 A (1 mg/kg) (N=3)	1.93 ± 0.04
	示例性抗体 A (3 mg/kg) (N=3)	1.59 ± 0.07
	示例性抗体 A (10 mg/kg) (N=3)	1.13 ± 0.05
	IgG4 对照抗体(3 mg/kg) (N=3)	1.82 ± 0.02
[0081]	IgG4 对照抗体(10 mg/kg) (N=3)	1.90 ± 0.04
	IgG4 对照抗体(30 mg/kg) (N=3)	1.95 ± 0.05
	示例性抗体 B (3 mg/kg) (N=3)	1.83 ± 0.06
	示例性抗体 B (10 mg/kg) (N=3)	1.21 ± 0.06
	示例性抗体 B (30 mg/kg) (N=3)	1.07 ± 0.04

[0082] 实施例9. 示例性抗PACAP抗体的药代动力学

[0083] 在雄性食蟹猴(n=2)中, 单次皮下施用后通过总IgG测定表征了本发明的示例性抗体的血清药代动力学。给动物皮下注射示例性抗体B(10mg/kg), 并在注射后1、3、6、24、48、72、96、120、144、168、240、336、504和672小时收集血清样品。总IgG测定大体上如本文所述实施。简而言之, 1μg/mL 山羊抗人IgG F(ab')₂ 抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 目录号109-006-097) 以100μL/孔包被Immulon 4HBX板。将孔与标准品(制备示例性抗体B15.63-1000ng/mL的标准曲线), 对照或血清样品之一进行孵育, 然后

用100 μ l/孔的1:10,000稀释的小鼠抗人IgG Fc-辣根过氧化物酶 (HRP;SouthernBiotech, 目录号9040-05) 进行检测。洗掉未结合的检测试剂。之后,向孔中加入100 μ l/孔TMB微孔过氧化物酶底物系统。通过添加100 μ l/孔的TMB终止液停止显色,并在450nm波长处测量光密度,并将波长校正设置为630nm。通过在100%食蟹猴血清中的已知量示例性抗体B,然后以最小所需稀释度1:10稀释于在PBS中的BlockerTMCasein中,使用5参数算法 (StatLia; Version 3.2),确定免疫反应性。后续过程基本按照以上描述,就示例性抗体B计算表观清除率(CL/F)为0.49mL/hr/kg,表观分布容积(V/F)为114.0mL/kg,通过非房室分析计算的终末半衰期为171小时。获得的药代动力学结果与能够延长作用时间的治疗性抗体一致。

[0084] 序列

[0085] 示例性重链 (SEQ ID NO.1)

[0086] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAISLSGGSTYYAXSHKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVREVGASXHNYYGMDVWGQGTMTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES
KYGPPCPXCPAPEXXGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG

[0087] 其中,X在残基62处是D、A、E和Q之一;X在残基104处是N和T之一;X在残基231处是P和X之一;X在残基237处是A和F之一;以及X在残基238处是A和L之一。

[0088] 示例性轻链 (SEQ ID NO.2)

[0089] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIKRWLAWYQQKPKGKAPKLLIHDASQLXEGVPSRFRSGSGSGT
DFTFTISSLQPEDATYYCQQFDLLPLTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0090] 其中X在残基30处是S和W之一;以及X在残基55处是L和F之一。

[0091] 示例性HCDR1 (SEQ ID NO.3)

[0092] AASGFTFSSYYMS

[0093] 示例性HCDR2 (SEQ ID NO.4)

[0094] AISLSGGSTYYAXSHKG

[0095] 其中X在残基13处是D、A、E和Q之一。

[0096] 示例性HCDR3 (SEQ ID NO.5)

[0097] VREVGASXHNYYGMDV

[0098] 其中X在残基8处是N和T之一。

[0099] 示例性LCDR1 (SEQ ID NO.6)

[0100] RASQSIXRWLA

[0101] 其中X在残基7处是S和W之一。

[0102] 示例性LCDR2 (SEQ ID NO.7)

[0103] HDASQLXE

[0104] 其中X在残基7处是L和F之一。

[0105] 示例性LCDR3 (SEQ ID NO.8)

[0106] QQFDLLPLT

[0107] 示例性HCVR (SEQ ID NO.9)

[0108] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAISLSGGSTYYAXSHKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVREV GASXHNYYGMDVWGQGMVTVSS

[0109] 其中,X在残基62处是D、A、E和Q之一;以及X在残基104处是N和T之一。

[0110] 示例性LCVR (SEQ ID NO.10)

[0111] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIXRWLAWYQQKPGKAPKLLIHDASQLXEGVPSRFSGSGSGT
DFTFTISLQPEDATYYCQQFDLLPLTFGGGTKVEIK

[0112] 其中X在残基30处是S和W之一;以及X在残基55处是L和F之一。

[0113] 编码示例性抗体B的HC的核苷酸序列 (SEQ ID NO.11)

[0114] gaggtgcagctgttggagtctgggggaggc ttggtacagcctggggggtcctgagactctcctgtg
cagcctctggattcacctttagc agctattacatgagctgggtccgccaggtccaggaaggggctggagtggg
tctcagct attagtctgagtggtagc acatactacgcagcgtcccacaagggccggttcaccatc tccaga
gacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggcctatattactgtgtc
cgggaggtgggagctagcactcacaactactacggtatg gacgtctggggccaaggaccatggtcaccgtctct
tcagcttctaccaagggcccatcg gtcttcccgtagcgcctgtccaggagcactccgagagcacagccgcc
ctgggctgc ctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgacc agcgg
cgtgcacaccttcccggctgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagc gtggtgaccgtgccctccag
cagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcac aagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttga
gtccaaatatggtccccatgccc cctgcccagcacctgaggccgccggggaccatcagtcttctctgttccc
cccaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagc cagg
aagaccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgcc aagacaaagccgcgggagg
agcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc gtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagt
acaagtgaaggtctccaacaaagge ctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagcccc
gagagccacag gtgtacaccctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc ctg
gtcaaaggttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccg gagaacaactacaagacc
acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctac agcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcag
gaggggaatgtcttctcatgctccgtg atgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctg
tctctgggt

[0115] 编码示例性抗体B的LC的核苷酸序列 (SEQ ID NO.12)

[0116] gacatccagatgaccagctctccatctcc ctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactt
gccgggcgagtcagagtatttgg aggtggttggcctggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctga
tccacgat gcatcccaattgttcgaaggggtcccatcaaggttcagtggaagtggatctgggacagat tttact
ttcaccatcagcagcctgcagcctgaagatattgcaacatattactgtcaacag tttgatttgcctcctcact
ttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacggaccgtg gctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
gagcagttgaaatctggaactgcc tctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
tggaaggtg gataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggac agcac
ctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaa gtctacgctgcgaagtca
ccatcagggcctgagctcgcctcacaagagcttcaacaggggagagtgc

[0117] 重组人PACAP38的氨基酸序列 (SEQ ID NO.13)

- [0118] HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVK NK
- [0119] 其中残基38处的K通过C端酰胺化被翻译后修饰。
- [0120] 重组人PACAP27的氨基酸序列 (SEQ ID NO.14)
- [0121] HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL
- [0122] 其中残基27处的L通过C端酰胺化被翻译后修饰。

序列表

<110> 伊莱利利公司

<120> 抗PACAP抗体

<130> X21602

<150> 62/565,278

<151> 2017-09-29

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性重链

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (62)..(62)

<223> 在残基62处的Xaa是Asp, Ala, Glu, 和Gln之一

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (104)..(104)

<223> 在残基104处的Xaa是Asn和Thr之一

[0001]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (231)..(231)

<223> 在残基231处的Xaa是Pro和Ser之一

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (237)..(237)

<223> 在残基237处的Xaa是Ala和Phe之一

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (238)..(238)

<223> 在残基238处的Xaa是Ala和Leu之一

<400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Leu Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Xaa Ser His

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Glu Val Gly Ala Ser Xaa His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 [0002] Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Xaa Cys Pro Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 [0003] Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Gly

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 示例性轻链

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> 在残基30处的Xaa是Ser和Trp之一

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> 在残基55处的Xaa是Leu和Phe之一

 <400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Xaa Arg Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Gln Leu Xaa Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Leu Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

[0004]

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性HCDR1

<400> 3

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 示例性HCDR2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> 在残基13处的Xaa是Asp, Ala, Glu和Gln之一

<400> 4

Ala Ile Ser Leu Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Xaa Ser His Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0005]

<220>
 <223> 示例性HCDR3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> 在残基8处的Xaa是Asn和Thr之一

<400> 5

Val Arg Glu Val Gly Ala Ser Xaa His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 示例性LCDR1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> 在残基7处的Xaa是Ser和Trp之一

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Xaa Arg Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 示例性LCDR2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> 在残基7处的Xaa是Leu和Phe之一

<400> 7

His Asp Ala Ser Gln Leu Xaa Glu
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 示例性LCDR3

<400> 8

[0006] Gln Gln Phe Asp Leu Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 示例性HCVR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (62)..(62)
 <223> 在残基62处的Xaa是Asp, Ala, Glu, 和Gln之一

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (104)..(104)
 <223> 在残基104处的Xaa是Asn和Thr之一

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Leu Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Xaa Ser His
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Glu Val Gly Ala Ser Xaa His Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性LCVR

[0007]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> 在残基30处的Xaa是Ser和Trp之一

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(55)
<223> 在残基55处的Xaa是Leu和Phe之一

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Xaa Arg Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Gln Leu Xaa Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Leu Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码示例性抗体B重链的核苷酸序列

<400> 11

gagggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctattaca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtctga gtggtgtag cacatactac 180

gcagcgtccc acaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgt ccgggaggtg 300

ggagctagca ctcaacta ctacggatg gacgtctggg gccaaaggac catggtcacc 360

gtctctcag cttctacaa gggcccatcg gtctcccgc tagcgcctg ctccaggagc 420

[0008]

acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctgggtcaagg actactccc cgaaccggtg 480

acgggtgctg ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acacctccc ggctgtccta 540

cagtctcag gacttactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600

acgaagacct acactgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaga 660

gttgagtcca aatatgtcc cccatgccc cctgcccag cacctgaggc cgccggggga 720

ccatcagtct tctgttccc ccaaaaacc aaggacactc tcatgatctc ccggaccctc 780

gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 840

tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac 900

agcacgtacc gtgtggtagc cgtctcacc gtctcagcagg actggtgct gaacggcaag 960

gagtacaagt gcaaggctc caacaaaggc ctcccgtct ccatcgagaa aacctctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacacc tgccccatc ccaggaggag 1080

atgaccaaga accaggtagc cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctacc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggaaagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt ctctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

caggagggga atgtctctc atgctcgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 1320

cagaagagcc tctcctgct tctgggt 1347

<210> 12
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 编码示例性抗体B轻链的核苷酸序列

 <400> 12
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtca gagtatttgg aggtggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatccacgat gcatccaat tgttcgaagg ggtccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag ttgatttgc tcctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acggaccgtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccgccca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

[0009]

<210> 13
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 重组人PACAP 38

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (38)..(38)
 <223> 残基38处的Lys进行了C端酰胺化的翻译后修饰

<400> 13
 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 1 5 10 15

 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
 20 25 30

 Gln Arg Val Lys Asn Lys
 35

<210> 14
 <211> 27

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重组人PACAP27

[0010] <220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> 残基27处的Leu进行了C端酰胺化的翻译后修饰

<400> 14

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
 20 25