



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0038859

A61K 39/00; A61K 38/17; C07K 16/18; (13) B
(51)^{2020.01} A61P 25/06; A61P 29/00; A61K 38/00;
A61K 39/395

(21) 1-2020-01453

(22) 20/09/2018

(86) PCT/US2018/051898 20/09/2018

(87) WO 2019/067293 04/04/2019

(30) 62/565,278 29/09/2017 US

(45) 26/02/2024 431

(43) 27/07/2020 388

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) BEIDLER, Catherine Brautigam (US); JOHNSON, Michael Parvin (US); PATEL, Chetankumar Natvarlal (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT PEPTIT HOẠT HÓA ADENYLAT XYCLAZA TUYẾN YÊN (PACAP)

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên của người, và chế phẩm chứa kháng thể này. Các kháng thể này là hữu dụng để điều trị chứng đau bao gồm đau đầu và/hoặc chứng đau nửa đầu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực dược. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng peptit hoạt hóa peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên (pituitary adenylate cyclase-activating peptide: PACAP), các chế phẩm chứa các kháng thể kháng PACAP như vậy, và các phương pháp sử dụng các kháng thể này để điều trị chứng đau bao gồm chứng đau đầu nguyên phát (bao gồm đau đầu tự chủ dây tam thoa (trigeminal autonomic cephalalgias)), đau đầu thứ phát và chứng đau nửa đầu (bao gồm chứng đau nửa đầu mạn tính).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên (PACAP) là peptit thần kinh (neuropeptit) được phân bố trong khắp hệ thống thần kinh bao gồm hệ thống thần kinh mạch máu, hạch dây thần kinh sinh ba, tủy sống, vùng dưới đồi, và tuyến yên. PACAP tồn tại dưới ít nhất là hai dạng hoạt tính α -amit hóa: PACAP38 (SEQ ID NO: 13), mà gồm 38 axit amin và là dạng hoạt tính phổ biến hơn, thường đại diện cho đến 90% PACAP trong mô động vật có vú; và PACAP27 (SEQ ID NO: 14) mà gồm 27 axit amin đầu tận cùng N giống như PACAP38. PACAP được cho là đóng vai trò trong việc bảo vệ thần kinh, điều biến thần kinh, viêm thần kinh và nhận cảm đau và trong việc gây ra chứng đau, bao gồm các bệnh đau đầu và các chứng đau nửa đầu.

Các bệnh đau đầu và các chứng đau nửa đầu được đánh giá là tác động đến 37 triệu bệnh nhân mỗi năm, với trên hai phần ba số này không được điều trị. (Các) bệnh đau đầu nguyên phát được phân loại là các bệnh đau đầu không phải do bệnh hoặc rối loạn khác hoặc riêng biệt gây ra, trong khi (các) bệnh đau đầu thứ phát được phân loại là các bệnh đau đầu gây ra bởi nguyên nhân cơ sở khác hoặc riêng biệt (ví dụ, chấn thương, ốm, hoặc rối loạn khác). Các chứng đau đầu tự chủ dây tam thoa (Trigeminal autonomic cephalalgias: “TACs”) được phân loại là các bệnh đau đầu nguyên phát mà bao gồm bệnh đau đầu từng đợt và đau đầu cụm mạn tính, đau nửa đầu kịch phát, đau nửa đầu liên tục, và các cơn đau nửa đầu do đau dây thần kinh. (Các) chứng đau nửa đầu đề cập đến các chứng đau nửa đầu “không có cơn thoáng báo” (trước đây gọi là “các

chứng đau nửa đầu nói chung”) và “có cơn thoáng báo” (trước đây gọi là “chứng đau nửa đầu cổ điển”). (Các) chứng đau nửa đầu mạn tính được phân loại thành 15 ngày đau đầu hoặc nhiều hơn mỗi tháng với ít nhất tám ngày trong số đó là có chứng đau nửa đầu. Khi mức độ phổ biến của chứng đau nửa đầu là hai hoặc nhiều cơn mỗi tháng, hoặc khi chứng đau nửa đầu can thiệp đáng kể vào cuộc sống hàng ngày của bệnh nhân và/hoặc khi việc uống thuốc cấp tính là không hiệu quả, bác sỹ điều trị được khuyến khích là xem xét lựa chọn biện pháp điều trị dự phòng. Tuy nhiên, cho đến nay, việc lựa chọn điều trị để phòng ngừa chứng đau nửa đầu thường là không có hiệu quả và các lựa chọn điều trị cấp tính và ngăn ngừa hiện tại (ví dụ, chống tăng huyết áp, chống co giật, chống suy nhược) có hiệu quả thấp và đi kèm với các tác dụng phụ vô hiệu hóa.

Cấu trúc của PACAP đã được biết rõ trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, A. Miyata, A. et al., *Biochem Biophys Res Commun* 170: 643-648 (1990)) là các kháng thể kháng PACAP. Ví dụ, patent Mỹ số 5,486,472A, công bố đơn quốc tế số WO/2012/106407 A3, và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2016-304604 đều bộc lộ các kháng thể kháng PACAP khác nhau và các ứng dụng tiềm năng của nó. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có kháng thể hướng đích PACAP nào được chấp thuận để sử dụng trong điều trị. Do đó, vẫn cần các kháng thể kháng PACAP khác. Cụ thể là, vẫn cần các kháng thể kháng PACAP thay thế mà trung hòa PACAP với hiệu lực cao, cung cấp thời gian tác dụng kéo dài, và có khả năng điều trị chứng đau bao gồm đau đầu nguyên phát và đau đầu thứ phát và các chứng đau nửa đầu bao gồm các chứng đau nửa đầu mạn tính. Đối với tất cả các phép điều trị, độ an toàn và độc tố là yếu tố hạn chế và các kháng thể kháng PACAP khác phải không có tính sinh miễn dịch không chấp nhận được. Do đó, vẫn cần các kháng thể kháng PACAP khác mà giảm nguy cơ sinh miễn dịch ở người. Tốt hơn là các kháng thể kháng PACAP như vậy sẽ cũng có các tính chất hóa lý tốt để tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển, sản xuất, và bào chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể mà gắn kết với PACAP người và bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó HCVR bao gồm các vùng quyết định bổ cứu (CDR) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 và LCVR bao gồm các CDR LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó trình tự axit amin của HCDR1 là SEQ ID NO.3, trình tự axit amin của HCDR2 là SEQ ID NO.4, trình tự axit

amin của HCDR3 là SEQ ID NO.5, trình tự axit amin của LCDR1 là SEQ ID NO.6, trình tự axit amin của LCDR2 là SEQ ID NO.7, và trình tự axit amin của LCDR3 là SEQ ID NO.8. Theo phương án cụ thể, HCDR2 chứa axit aspartic ở gốc 13, HCDR3 chứa asparagin ở gốc 8, LCDR1 chứa serin ở gốc 7, và LCDR2 chứa leuxin ở gốc 7. Theo phương án cụ thể khác, HCDR2 chứa alanin ở gốc 13, HCDR3 chứa threonin ở gốc 8, LCDR1 chứa tryptophan ở gốc 7, và LCDR2 chứa phenylalanin ở gốc 7. Theo phương án cụ thể khác, HCDR2 chứa axit glutamic ở gốc 13, HCDR3 chứa threonin ở gốc 8, LCDR1 chứa tryptophan ở gốc 7, và LCDR2 chứa phenylalanin ở gốc 7. Theo phương án cụ thể khác nữa, HCDR2 chứa glutamin ở gốc 13, HCDR3 chứa threonin ở gốc 8, LCDR1 chứa tryptophan ở gốc 7, và LCDR2 chứa phenylalanin ở gốc 7.

Các phương án của sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết với PACAP người, bao gồm HCVR và LCVR, trong đó trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO.9 và trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO. 10. Theo các phương án cụ thể, HCVR chứa axit aspartic ở gốc 62 và asparagin ở gốc 104, và LCVR chứa serin ở gốc 30 và leuxin ở gốc 55. Theo các phương án cụ thể khác, HCVR chứa alanin ở gốc 62 và threonin ở gốc 104, và LCVR chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55. Theo một số phương án, HCVR chứa axit glutamic ở gốc 62 và threonin ở gốc 104, và LCVR chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55. Theo một số phương án, HCVR chứa glutamin ở gốc 62 và threonin ở gốc 104, và LCVR chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết với PACAP người, gồm chuỗi nặng (HC) và chuỗi nhẹ (LC), trong đó trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO.1 và trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO.2. Theo các phương án cụ thể, HC chứa axit aspartic ở gốc 62, asparagin ở gốc 104, prolin ở gốc 231, alanin ở gốc 237 và alanin ở gốc 238, và LC chứa serin ở gốc 30 và leuxin ở gốc 55. Theo các phương án cụ thể khác, HC chứa alanin ở gốc 62, threonin ở gốc 104, prolin ở gốc 231, alanin ở gốc 237 và alanin ở gốc 238, và LC chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55. Theo các phương án cụ thể khác HC chứa axit glutamic ở gốc 62, threonin ở gốc 104, prolin ở gốc 231, alanin ở gốc 237 và alanin ở gốc 238, và LC chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55. Theo một số phương án cụ thể, HC chứa glutamin ở gốc

62, threonin ở gốc 104, prolin ở gốc 231, alanin ở gốc 237 và alanin ở gốc 238, và LC chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng. Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị chứng đau như đau đầu, bao gồm đau đầu nguyên phát và đau đầu thứ phát bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng dược phẩm theo sáng chế. Theo phương án khác nữa, đau đầu nguyên phát là TAC. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị chứng đau nửa đầu bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng dược phẩm theo sáng chế. Theo một số phương án như vậy, chứng đau nửa đầu là chứng đau nửa đầu mạn tính. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị chứng đau liên quan đến sự mất hạt dưỡng bào bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng kháng thể hoặc dược phẩm theo sáng chế. Theo một số phương án như vậy, chứng đau liên quan đến sự mất hạt dưỡng bào là chứng đau trong số các bệnh đau đầu nguyên phát hoặc thứ phát và chứng đau nửa đầu.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị chứng đau như đau đầu nguyên phát, đau đầu thứ phát và/hoặc chứng đau nửa đầu bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án, đau đầu nguyên phát là TAC. Theo một số phương án, chứng đau nửa đầu là chứng đau nửa đầu mạn tính.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong trị liệu. Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất kháng thể theo sáng chế để sử dụng trong điều trị chứng đau. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể theo sáng chế để sử dụng trong điều trị chứng đau đầu nguyên phát, đau đầu thứ phát và/hoặc chứng đau nửa đầu.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị chứng đau như đau đầu nguyên phát, đau đầu thứ phát và/hoặc chứng đau nửa đầu. Theo các phương án cụ thể hơn nữa, chứng đau đầu nguyên phát là TAC. Theo một số phương án cụ thể, chứng đau nửa đầu là chứng đau nửa đầu mạn tính.

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử axit nucleic và vector biểu hiện mã hóa kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.1, trong đó gốc 62 là axit aspartic, gốc 104 là asparagin, gốc 231 là prolin, gốc 237 là alanin và gốc 238 là

alanin. Theo một số phương án, gốc 62 là alanin, gốc 104 là threonin, gốc 231 là prolin, gốc 237 là alanin và gốc 238 là alanin. Theo một số phương án, gốc 62 là axit glutamic, gốc 104 là threonin, gốc 231 là prolin, gốc 237 là alanin và gốc 238 là alanin. Theo các phương án khác, gốc 62 là glutamin, gốc 104 là threonin, gốc 231 là prolin, gốc 237 là alanin và gốc 238 là alanin.

Các phương án theo sáng chế còn đề xuất phân tử ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.2, trong đó gốc 30 là serin và gốc 55 là leuxin. Theo một số phương án, gốc 30 là tryptophan và gốc 55 là phenylalanin.

Theo một số phương án, phân tử ADN theo sáng chế là phân tử chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.1 trong đó gốc 62 là axit aspartic, gốc 104 là asparagin, gốc 231 là prolin, gốc 237 là alanin và gốc 238 là alanin, và chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO. 2 trong đó gốc 30 là serin và gốc 55 là leuxin. Theo phương án nhất định, phân tử ADN theo sáng chế là phân tử chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.1 trong đó gốc 62 là alanin, gốc 104 là threonin, gốc 231 là prolin, gốc 237 là alanin và gốc 238 là alanin, và chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.2 trong đó gốc 30 là tryptophan và gốc 55 là phenylalanin. Theo phương án cụ thể, phân tử ADN theo sáng chế chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.1 trong đó gốc 62 là axit glutamic, gốc 104 là threonin, gốc 231 là prolin, gốc 237 là alanin và gốc 238 là alanin, và chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.2 trong đó gốc 30 là tryptophan và gốc 55 là phenylalanin. Theo phương án cụ thể khác phân tử ADN theo sáng chế chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.1 trong đó gốc 62 là glutamin, gốc 104 là threonin, gốc 231 là prolin, gốc 237 là alanin và gốc 238 là alanin, và chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO. 2 trong đó gốc 30 là tryptophan và gốc 55 là phenylalanin. Hơn nữa, sáng chế đề xuất kháng thể được điều chế theo quy trình, trong đó quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa trình tự polynucleotit theo sáng chế, trong điều kiện sao cho kháng thể được biểu hiện, và thu hồi kháng thể theo sáng chế từ tế bào chủ này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả, “kháng thể” là phân tử globulin miễn dịch chứa 2 HC và 2 LC được liên kết liên phân tử bằng các liên kết disulfua. Phần tận cùng amin của mỗi LC và HC bao gồm vùng biến đổi gồm khoảng 100-120 axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm nhận biết kháng nguyên qua các CDR nằm trong đó. Các CDR xen kẽ với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (framework region - “FR”). Mỗi LCVR và HCVR gồm 3 CDR và 4 FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amin đến đầu tận cùng carboxy theo trật tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 3 CDR của LC được gọi là “LCDR1, LCDR2, và LCDR3,” và 3 CDR của HC được gọi là “HCDR1, HCDR2, và HCDR3.” Các CDR chứa hầu hết các gốc tạo thành tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Chức năng liên kết của kháng thể với kháng nguyên cụ thể bị ảnh hưởng nhiều bởi sáu CDR. Việc gán các axit amin vào các miền CDR nằm trong vùng LCVR và HCVR của kháng thể theo sáng chế dựa trên quy tắc đánh số Kabat nổi tiếng (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)), và quy tắc đánh số North (North et al., *A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations*, *Journal of Molecular Biology*, 406:228-256 (2011)).

Các LC được phân loại là kappa hoặc lambda, mỗi chuỗi này đặc trưng bởi vùng hằng định cụ thể đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kháng thể theo sáng chế bao gồm các LC kappa. Các HC được phân loại là gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, và lần lượt xác định các isotyp của kháng thể là IgG, IgM, IgA, IgD, hoặc IgE. Các kháng thể theo sáng chế bao gồm các HC IgG. Các kháng thể IgG có thể được chia tiếp thành các lớp phụ, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Theo phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế là IgG4. Phần tận cùng carboxy của mỗi HC xác định vùng hằng định chủ yếu chịu trách nhiệm về chức năng tác động. Theo phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế có một hoặc nhiều cải biến trong vùng hằng định của mỗi HC mà làm giảm chức năng tác động. Theo phương án cụ thể hơn, các kháng thể theo sáng chế là IgG4 và có các cải biến trong vùng hằng định của cả hai HC mà làm giảm chức năng tác động bao gồm axit amin alanin ở cả hai gốc 237 và 238 (việc đánh số gốc là tuyến tính và dựa trên HC minh họa có trình tự SEQ ID NO.1). Theo phương án cụ thể hơn

nữa, các kháng thể theo sáng chế là IgG4 và có các cải biến trong vùng hằng định của cả hai HC mà làm giảm chức năng tác động bao gồm axit amin alanin ở cả hai gốc 237 và 238 và có các cải biến khác trong vùng hằng định của cả hai HC thúc đẩy sự ổn định bao gồm axit amin prolin ở gốc 231 (việc đánh số gốc là tuyến tính và dựa trên HC minh họa có trình tự SEQ ID NO.1).

Các kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng (“mAb”). Các mAb có thể được tạo ra, chẳng hạn, bằng các công nghệ lai, công nghệ tái tổ hợp, công nghệ biểu hiện bằng thể thực khuẩn, công nghệ tổng hợp, ví dụ, ghép CDR, hoặc sự kết hợp của các công nghệ như vậy hoặc các công nghệ khác đã biết trong lĩnh vực này. Như được đề cập trong bản mô tả, các mAb là các kháng thể thu được từ dòng hoặc bản sao đơn bao gồm, chẳng hạn, dòng sinh vật nhân điển hình, dòng sinh vật nhân nguyên thủy hoặc dòng thể thực khuẩn, và không phải là phương pháp tạo ra dòng này.

Các phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, thư viện thể thực khuẩn có thể được sàng lọc, nhờ đó hàng nghìn mảnh Fab được sàng lọc để tương tác với PACAP tái tổ hợp của người. Các dạng tương tác thu được có thể được thu hồi, tinh chế, và các trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã được biết rõ trong lĩnh vực này, nhờ đó có thể xây dựng được các kháng thể dẫn đầu ban đầu. Các kháng thể theo sáng chế được xử lý để chứa một hoặc nhiều vùng khung của người. Các trình tự dòng mầm vùng khung của người có thể thu được từ ImMunoGeneTics (INGT) qua trang mạng của họ, <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ *The Immunoglobulin FactsBook* của Marie-Paule Lefranc và Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Theo các phương án cụ thể, các vùng khung HC và LC dòng mầm để sử dụng trong kháng thể theo sáng chế lần lượt bao gồm 3-23 và O18.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, kháng thể, hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể, được tạo ra ở dạng phân lập. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân lập” chỉ protein, peptit hoặc axit nucleic không chứa hoặc hầu như không chứa các đại phân tử khác được phát hiện trong môi trường tế bào.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất và tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Chẳng hạn, các trình tự cADN mã hóa HC (ví dụ trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO.1) và LC (ví dụ trình tự axit amin được đưa ra trong

SEQ ID NO.2) có thể được tách dòng và xử lý vào vector biểu hiện GS (glutamin synthetaza). Vector biểu hiện globulin miễn dịch được xử lý sau đó có thể được chuyển nhiễm ổn định vào các tế bào CHO. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ thấy được rằng việc biểu hiện kháng thể ở động vật có vú sẽ dẫn đến sự glycosyl hóa, tiêu biểu là ở các vị trí N-glycosyl hóa bảo tồn cao trong vùng Fc. Các dòng ổn định có thể được biến đổi để biểu hiện kháng thể gắn kết đặc hiệu với PACAP người. Các dòng dương tính có thể được nhân rộng trong môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh để sản xuất kháng thể trong thiết bị phản ứng sinh học. Môi trường, mà kháng thể được tiết vào đó, có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, môi trường này có thể được đưa lên cột Protein A hoặc G Sepharose FF mà đã được cân bằng với dung dịch đệm tương thích, như dung dịch muối đệm phosphat một cách thuận tiện. Cột được rửa để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng thể gắn kết được giải hấp, chẳng hạn, bằng gradien pH và các phân đoạn kháng thể được phát hiện, như bằng phương pháp SDS-PAGE, và sau đó được gộp lại. Kháng thể có thể được cô đặc và/hoặc lọc vô trùng bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Thể kết tụ và các multimer hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi ion, hoặc sắc ký hydroxyapatit. Sản phẩm có thể được làm lạnh đông ngay, chẳng hạn ở -70°C hoặc có thể được đông khô.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân. Cụ thể hơn, các kháng thể theo sáng chế được cho là để điều trị nhóm các chứng đau, mà đặc biệt bao gồm đau đầu, cả nguyên phát và thứ phát, và chứng đau nửa đầu bao gồm chứng đau nửa đầu mạn tính. Mặc dù các kháng thể theo sáng chế được cho là hữu dụng trong điều trị chứng đau, bao gồm đau đầu nguyên phát và thứ phát và chứng đau nửa đầu, nhưng các kháng thể này cũng có thể hữu dụng trong việc điều trị các chứng đau khác. Như được sử dụng thay đổi cho nhau trong bản mô tả, “sự điều trị” và/hoặc “việc điều trị” và/hoặc “điều trị” được dự định để chỉ tất cả các quy trình trong đó có thể có việc làm chậm, làm gián đoạn, làm ngừng, kiểm soát, chấm dứt, hoặc đảo ngược sự tiến triển của các rối loạn được mô tả trong bản mô tả, nhưng không nhất thiết là việc loại bỏ hoàn toàn tất cả các triệu chứng của rối loạn. Việc điều trị bao gồm việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở người mà có thể có lợi từ việc làm giảm hoạt tính PACAP, và bao gồm: (a) ức chế tiến triển tiếp theo của

bệnh, *tức là*, làm ngừng sự phát triển của bệnh; (b) làm thuyên giảm bệnh, *tức là* làm cho bệnh hoặc rối loạn thoái triển hoặc làm giảm các triệu chứng hoặc biến chứng của chúng; và (c) ngăn ngừa sự khởi phát các triệu chứng của bệnh.

Như được sử dụng thay đổi cho nhau trong bản mô tả, thuật ngữ “bệnh nhân,” “đối tượng,” và “cá thể,” chỉ người. Theo các phương án nhất định, bệnh nhân còn được đặc trưng bằng bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh lý (ví dụ, bệnh đau, ví dụ đau đầu nguyên phát hoặc đau đầu thứ phát và/hoặc chứng đau nửa đầu bao gồm chứng đau nửa đầu mạn tính) mà sẽ có lợi từ việc giảm hoạt tính PACAP. Theo phương án khác, bệnh nhân còn được đặc trưng là có nguy cơ phát triển các tình trạng bệnh nêu trên, hoặc có tình trạng bệnh lý mà sẽ có lợi từ việc giảm hoạt tính PACAP.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “gắn kết (hoặc gắn kết với)” chỉ tương tác của kháng thể với epitop của PACAP người. Thuật ngữ “epitop” như được sử dụng ở đây chỉ các vị trí ba chiều riêng biệt trên kháng nguyên mà được nhận diện bởi các kháng thể theo sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm mà có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này và chứa kháng thể theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang và/hoặc chất pha loãng dược dụng (ví dụ, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Loyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012, tài liệu này tóm tắt các kỹ thuật bào chế thường đã biết đối với nhà bào chế). Các chất mang thích hợp dùng cho dược phẩm bao gồm nguyên liệu bất kỳ, mà khi được kết hợp với kháng thể theo sáng chế, vẫn giữ được hoạt tính của phân tử này và không tác động tới hệ miễn dịch của bệnh nhân.

Dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân có nguy cơ, hoặc thể hiện bệnh hoặc rối loạn mô tả trên đây qua các đường ngoài tiêu hóa (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong bắp, hoặc qua da). Dược phẩm theo sáng chế chứa lượng “hữu hiệu” hoặc lượng “hữu hiệu trong điều trị”, như được sử dụng thay đổi lẫn nhau trong bản mô tả, của kháng thể theo sáng chế. Lượng hữu hiệu chỉ lượng cần thiết (theo liều và trong các khoảng thời gian và theo các phương pháp sử dụng) để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng hữu hiệu của kháng thể có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và thể trọng của cá thể, và khả năng tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể của kháng thể. Lượng hữu hiệu cũng là

lượng mà trong đó các tác động độc hại hoặc bất lợi bất kỳ của kháng thể theo sáng chế nhỏ hơn rất nhiều so với các tác dụng có lợi trong điều trị.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Xử lý và biểu hiện kháng thể kháng PACAP minh họa

Khi tạo ra kháng thể kháng PACAP theo sáng chế, các vấn đề quan trọng về độ ổn định hóa học và vật lý được tính đến. Ví dụ, vấn đề gặp phải với các cấu trúc được làm giống như của người ban đầu bao gồm ái lực gắn kết thấp, tính sinh miễn dịch không chấp nhận được, sự khử amit vùng biến đổi, sự oxy hóa, sự trùng hợp và hiệu lực thấp.

Do đó, các cải biến hóa học và vật lý được xử lý để cải thiện ái lực gắn kết, loại bỏ hoặc làm giảm sự nhị trùng hóa HC, làm giảm tính sinh miễn dịch, và cải thiện độ ổn định hóa học và vật lý của kháng thể theo sáng chế. Các cải biến axit amin được xử lý trên cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các nghiên cứu độ ổn định rộng rãi cũng được thực hiện và các kháng thể được tạo cấu trúc được sàng lọc về tính chất biểu hiện và tính chịu nhiệt cũng như các tính chất khác bao gồm ái lực gắn kết. Các kháng thể dưới đây, mà bao gồm nhiều biến đổi từ các cấu trúc gốc, được xác định là có ái lực gắn kết cao, ổn định về mặt hóa học và vật lý, có tính sinh miễn dịch thấp và có tính chất dược động học phù hợp với việc dùng hàng tháng. Không có cải biến nào trong số các cải biến chứa kháng thể theo sáng chế được xác định trong các cấu trúc được làm giống như của người ban đầu.

Các kháng thể kháng PACAP minh họa theo sáng chế được thể hiện ở bảng 1. Các kháng thể minh họa bao gồm các chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO: 1 và các chuỗi nhẹ có trình tự SEQ ID NO: 2 cũng như khung HC 3-23 của người và các LC kappa của người với khung O18. Ngoài ra, các cải biến được xử lý trong cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà cải thiện độ ổn định hóa học và vật lý cũng như các tính chất chức năng của các kháng thể được thể hiện trong bảng 1. Mối quan hệ giữa nhiều vùng khác nhau trong kháng thể kháng PACAP minh họa là như sau (việc đánh số các axit amin áp dụng cách đánh số tuyến tính; việc gán các axit amin vào các miền biến đổi dựa trên hệ thống International Immunogenetics Information System[®] có trên trang mạng www.imgt.org; việc gán các axit amin vào các miền CDR dựa trên quy tắc đánh số North nổi tiếng, trừ việc đánh số HCDR2 dựa trên quy tắc đánh số Kabat nổi tiếng):

Bảng 1: Các vùng axit amin của các kháng thể kháng PACAP minh họa theo sáng chế.

SEQ ID NO:1			SEQ ID NO:2		
HCVR	Vùng	Vị trí	LCVR	Vùng	Vị trí
	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
Vùng hằng định	CH	124-449	Vùng hằng định	CL	108-214
Ab A minh họa	62D ; 104N ; 231P ; 237A ; 238A		Ab A minh họa	30S ; 55L	
Ab B minh họa	62A ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		Ab B minh họa	30W ; 55F	
Ab C minh họa	62E ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		Ab C minh họa	30W ; 55F	
Ab D minh họa	62Q ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		Ab D minh họa	30W ; 55F	

Các ví dụ và các thử nghiệm dưới đây chứng minh rằng các kháng thể theo sáng chế là hữu dụng để điều trị chứng đau bao gồm đau đầu nguyên phát và đau đầu thứ phát và chứng đau nửa đầu. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, các ví dụ dưới đây được đưa ra chỉ để minh họa và không mang tính giới hạn, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể tiến hành các sửa đổi khác nhau.

Các kháng thể kháng PACAP minh họa theo sáng chế có thể được biểu hiện và tinh chế chủ yếu như sau. Vector biểu hiện glutamin synthetaza (GS) chứa trình tự ADN mã hóa trình tự axit amin của HC theo bảng 1 (ví dụ, trình tự ADN SEQ ID NO:11 mã hóa HC của kháng thể B minh họa được thể hiện trong bảng 1) và trình tự ADN mã hóa trình tự axit amin LC theo bảng 1 (ví dụ, trình tự ADN SEQ ID NO:12 mã hóa LC của kháng thể B minh họa được thể hiện trong bảng 1) được sử dụng để chuyển nhiễm vào dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary cell line - CHO) bằng cách điện di. Vector biểu hiện mã hóa đoạn khởi đầu SV Early (virus Simian 40E) và gen GS. Việc biểu hiện GS cho phép tổng hợp hóa sinh glutamin, một axit amin cần thiết cho các tế bào CHO. Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được sàng lọc lượng lớn bằng 50 μ M L-methionin sulfoximin (MSX). Khả năng ức chế GS của MSX được sử dụng để tăng tính nghiêm ngặt của việc sàng lọc. Các tế bào có sự tích hợp cADN vector biểu hiện vào vùng có hoạt tính phiên mã của hệ gen tế bào chủ có thể được chọn so với các tế bào CHO kiểu hoang dại, mà biểu hiện mức GS nội sinh. Sản phẩm chuyển nhiễm gộp lại được đưa vào đĩa với mật độ thấp để các tế bào biểu hiện ổn định sinh trưởng nhanh chóng gần như thành dòng vô tính. Các lỗ lớn được sàng lọc về mức biểu hiện kháng thể và sau đó nhân lên trong môi trường nuôi cấy dạng huyền phù không chứa huyết thanh cần dùng để sản xuất. Môi trường đã làm trong mà kháng thể đã được tiết vào đó được đưa lên cột ái lực Protein A mà đã được cân bằng bằng dung dịch đệm tương hợp, như nước muối đệm phosphat (độ pH=7,4). Cột này được rửa bằng dung dịch NaCl 1M để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng thể đã gắn kết được giải hấp, ví dụ, bằng natri xitrat ở độ pH bằng (khoảng) 3,5 và các phân đoạn được trung hòa bằng dung dịch đệm Tris 1M. Các phân đoạn kháng thể được phát hiện, như bằng cách SDS-PAGE hoặc loại trừ kích cỡ phân tích, và sau đó được gộp lại. Thể kết tụ và các multimer hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích cỡ, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi ion, hoặc sắc ký hydroxyapatit. Kháng thể kháng PACAP minh họa theo sáng chế được

cô đặc và/hoặc lọc vô trùng bằng các kỹ thuật thông thường. Độ tinh khiết của kháng thể minh họa sau các bước sắc ký này là lớn hơn 95%. Kháng thể kháng PACAP minh họa theo sáng chế có thể được làm lạnh đông ngay ở -70°C hoặc bảo quản ở 4°C trong vài tháng.

Ví dụ 2: Ái lực gắn kết

Ái lực gắn kết (K_D) đối với mỗi phức hợp kháng thể-kháng nguyên được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm trên cơ sở đĩa 96 lỗ loại trừ động lực (được làm phù hợp với Estep et al., mAbs, 2013, 5:270-278). Ngắn gọn là, chuỗi pha loãng 3 lần đối với mỗi Ab minh họa (được nêu trong bảng 1) được điều chế từ nồng độ ban đầu là 7290pM đến 41fM; mỗi chuỗi gồm đối chứng kháng thể-không kháng nguyên. Các mẫu được điều chế trong dung dịch phong bế Blocker A 3% (khối lượng/thể tích) (MSD, #R93AA-1) và nồng độ kháng nguyên cuối cùng cố định là 30pM PACAP27 biotinyl hóa đầu tận cùng N (tổng hợp theo đơn đặt hàng, CPC Scientific) hoặc PACAP38 biotinyl hóa đầu tận cùng N (Anaspec, #23590) được bổ sung vào mỗi mẫu. Thể tích 100 μl mỗi mẫu kháng thể-kháng nguyên được bổ sung vào từng lỗ của đĩa vi chuẩn độ 96 lỗ (Greiner, EK-20101) với hai bản sao. Đĩa này được bịt kín lại bằng màng dính quang học (Thermo Fisher Scientific, #4311971) và được ủ ở 37°C trong thời gian 3 đến 4 ngày để cân bằng mẫu. Vào ngày trước khi phân tích, mỗi hàng của đĩa MSD chuẩn 96 lỗ (MSD, #L15XA) được phủ bằng 30 μl kháng thể tương ứng (như được sử dụng trong các chuỗi chuẩn độ) ở nồng độ 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trong dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS). Vào ngày thử nghiệm, đĩa chuẩn MSD được rửa một lần bằng 150 μl PBS và được phong bế bằng 150 μl dung dịch phong bế Blocker A 3% trong 45 phút ở 30°C với sự lắc ở tốc độ 300 vòng/phút trên máy lắc MaxQ 4450 benchtop (Thermo Fisher Scientific). Sau khi rửa ba lần bằng PBS, 50 μl mỗi mẫu kháng thể-kháng nguyên (được điều chế và được ủ như được mô tả trên đây) được bổ sung vào đĩa chuẩn MSD và được ủ trong 150 giây ở 30°C với việc lắc ở tốc độ 300 vòng/phút. Sau khi rửa một lần duy nhất bằng PBS, 50 μl dung dịch Streptavidin được gắn thẻ TAG-SULFO nồng độ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (MSD, #R32AD-5) được điều chế trong dung dịch phong bế Blocker A 1% (khối lượng/thể tích) được bổ sung và đĩa chuẩn MSD và đĩa được ủ ở 30°C trong 3 phút với việc lắc ở tốc độ 300 vòng/phút. Đĩa được rửa ba lần nữa bằng PBS sau đó bổ sung dung dịch đệm đọc 1X Read (MSD, #R92TC-2) với lượng 150 $\mu\text{l}/\text{lỗ}$. Đĩa chuẩn MSD được đọc bằng cách sử dụng thiết bị

MESO Quickplex SQ 120/1300 (Meso Scale Discovery). Phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm SigmaPlot (phiên bản 12.5, Systat Software) và ái lực gắn kết (K_D) được xác định bằng cách sử dụng mô hình đường cong logistic bốn thông số tích hợp SigmaPlot. Kết quả được đưa ra trong bảng 2.

Bảng 2: Ái lực gắn kết (K_D) của các phức hợp kháng thể-kháng nguyên ở 37°C

Kháng thể	Ái lực gắn kết, K_D (pM, 37°C)	
	Kháng nguyên (PACAP38)	Kháng nguyên (PACAP27)
Ab A minh họa	không được xác định	37,0
Ab B minh họa	12,8	11,6
Ab C minh họa	14,6	14,5
Ab D minh họa	9,0	10,5

Ví dụ 3: Sự thoái biến PACAP In vivo

Sự thoái biến của PACAP38 tuần hoàn, *in vivo*, được đánh giá ở chuột. Một trong số kháng thể IgG4 đối chứng (10 mg/kg) hoặc kháng thể A minh họa (10 mg/kg) được tiêm vào chuột qua tĩnh mạch. PACAP38 đường cơ sở, trong huyết tương, được đánh giá đối với mỗi con chuột và sau đó các con chuột được tiêm PACAP38 với liều 6µg/kg vào trong tĩnh mạch. Sau khi tiêm PACAP38, các mẫu huyết tương được thu gom trong thời gian 120 phút và tổng mức PACAP38 (được gắn kết hoặc không được gắn kết với kháng thể) được xác định thông qua phương pháp ELISA cải biến. Ngắn gọn là, đĩa MSD 96 lỗ (MSD, catalog #: L15xA-1) được phủ kháng thể kháng PACAP38 (US Biological Cat# P1775-03C) nồng độ 1µg/ml trong PBS với lượng 30 µl/lỗ và ủ qua đêm ở 40°C. Đĩa được rửa ba lần bằng PBST với lượng 200 µl/lỗ sau đó phong bế bằng dung dịch phong bế Blocker A (MSD Cat# R93BA-2) nồng độ 3% trong PBS với lượng 150 µl/lỗ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ với sự quay ở tốc độ 650 vòng/phút. Sau đó, đĩa được rửa ba lần bằng PBST với lượng 200 µl/lỗ. Mẫu định chuẩn PACAP38

(Bachem Cat# H430-0500) được pha loãng ở mức 1000 pg/mL bằng dung dịch đệm thử nghiệm chứa một phần chất pha loãng 2 (MSD Cat# R51-BB-3) và ba mươi chín phần chất pha loãng 3 (MSD Cat# R51BA-3) được bổ sung 200 µg/ml HBR1 (Scantibodies Inc, Cat# 3KC533) và 10 µg/ml Biotin-kháng thể minh họa A. Đường cong chuẩn định chuẩn được chuẩn bị bằng cách pha loãng theo chuỗi ba lần bằng dung dịch đệm thử nghiệm đối với mẫu định chuẩn 1000 pg/mL. Các mẫu huyết tương được pha loãng 40 lần trong chất pha loãng 3 được bổ sung 200 µg/mL HBR1 và 10 µg/mL Biotin-Kháng thể minh họa A. 25 µl nồng độ khác nhau của mẫu định chuẩn và mẫu huyết tương pha loãng được bổ sung vào các lỗ riêng rẽ của đĩa thử nghiệm và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ với sự quay ở tốc độ 650 vòng/phút. Sau khi rửa đĩa 3 lần bằng PBST với lượng 200 µl/lỗ, 25 µl kháng thể của dê kháng IgG người, được gắn thẻ Sulfo-tag (MSD Cat# R32AJ-1) ở nồng độ 0,5 µg/ml trong chất pha loãng 3 được bổ sung vào mỗi lỗ và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó các đĩa được rửa ba lần bằng PBST với lượng 200 µl/lỗ và 150 µl dung dịch đệm đọc T 2X (MSD, Cat# R92TC-3) được bổ sung vào mỗi lỗ và tín hiệu được đọc bằng máy đọc đĩa MSD (kết quả, thể hiện là mức PACAP38 phát hiện được, giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=2-3)). Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Các mức huyết tương PACAP38

Các mức huyết tương PACAP38 (ng/mL) ở các thời điểm sau khi tiêm PACAP38 (giá trị trung bình $\pm$ SEM (N))						
Kháng thể	Đường cơ sở	5 phút	30 phút	60 phút	90 phút	120 phút
Ab A minh họa	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)
Kháng thể IgG4 đối chứng	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)

Kết quả được thể hiện trong bảng 3 chứng minh kháng thể minh họa A ngăn ngừa sự phân bố PACAP38 khi tiêm trong tĩnh mạch nhưng không ngăn ngừa sự phân hủy PACAP38 *in vivo*.

Ví dụ 4: Ức chế cAMP cảm ứng bởi PACAP27, PACAP38, hoặc VIP

Việc trung hòa sự kích thích cAMP cảm ứng bởi PACAP27, PACAP38, và VIP, bằng các kháng thể theo sáng chế được đánh giá ở các tế bào CHO-K1 (ATCC, catalog # CCL-61) được chuyển nhiễm bằng các vector biểu hiện PAC 1 của người (NP_001186564.1) hoặc VPAC2 của người (NP_003373.2). Các tế bào CHO-K1 được thu hoạch bằng dung dịch đệm phân giải tế bào không enzym (Gibco #313131-014), đếm, ly tâm và tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm thử nghiệm đến mật độ 10.000 tế bào / 25 μ l. Các tế bào đặc (10.000 tế bào trong 25 μ l) được bổ sung vào các lỗ của đĩa 96 lỗ.

Các kháng thể minh họa (được nêu trong bảng 1) được pha loãng theo chuỗi trong 100 μ l dung dịch đệm thử nghiệm (HBSS với canxi và magie (Hyclone, ThermoScientific, SH30268), 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, #A7888), 500 μ M IBMX (Sigma-Aldrich, I5879)), 4 lần đến nồng độ cuối cùng mong muốn. Các kháng thể minh họa được pha loãng được ủ với chất chủ vận (ở mức 2X nồng độ cuối cùng) trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Nồng độ cuối cùng của chất chủ vận: 100 pM đối với PACAP27 và PACAP38 trong thử nghiệm PAC1 người, 800 pM PACAP27 và PACAP38 trong thử nghiệm VPAC2 người, 800 pM VIP trong thử nghiệm VPAC2 người. Sau đó, 25 μ l dung dịch kháng thể minh họa–chất chủ vận được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ (chứa các tế bào) và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sự tạo thành cAMP ở mỗi lỗ được xác định bằng cách sử dụng cAMP femto 2 (Cisbio, 62AM5PEC). 25 μ l dung dịch thử nghiệm cAMP-d2 (Cisbio, 62AM5PEC) được bổ sung vào mỗi lỗ sau đó bổ sung 25 μ l dung dịch thử nghiệm kháng cAMP-Cryptate và đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Tín hiệu HTRF thu được được đo ở mức 665 và 620 nm bằng cách sử dụng thiết bị Envision 12 (Perkin Elmer, kích thích 330 nm), và tỷ lệ kết quả ở các mức 665 và 620 được dựng đồ thị để xác định lượng cAMP (dữ liệu được dựng biểu đồ bằng cách sử dụng Graphpad Prism 7 và các giá trị IC50 được xác định bằng cách sử dụng chương trình khớp mô hình đường cong

logistic bốn thông số tích hợp). Kết quả được cung cấp trong bảng 4 dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Bảng 4: Trung hòa sự gia tăng cAMP cảm ứng bởi PACAP27 và PACAP38 In Vitro

Kháng thể	Mức ức chế (IC ₅₀) (pM, giá trị trung bình $\pm$ SEM (N))				
	PACAP38 (100 pM) trong hPAC1	PACAP27 (100 pM) trong hPAC1	PACAP38 (800 pM) trong hVPAC2	PACAP27 (800 pM) trong hVPAC2	VIP (800 pM) trong hVPAC2
Ab A minh họa	554 $\pm$ 264 (N=2)	2250 (N=1)	714 $\pm$ 194 (N=6)	781 $\pm$ 340 (N=2)	>100.000 (N=1)
Ab B minh họa	265 $\pm$ 62 (N=3)	270 $\pm$ 103 (N=2)	294 $\pm$ 60 (N=3)	605 $\pm$ 135 (N=2)	>100.000 (N=1)
Ab C minh họa	303 $\pm$ 15 (N=3)	311 $\pm$ 29 (N=2)	325 $\pm$ 99 (N=3)	595 $\pm$ 219 (N=2)	>100.000 (N=1)
Ab D minh họa	205 $\pm$ 35 (N=3)	212 $\pm$ 42 (N=2)	243 $\pm$ 112 (N=3)	515 $\pm$ 127 (N=2)	>100.000 (N=1)

Ví dụ 5: Phân tích khả năng sinh miễn dịch

Việc đánh giá khả năng sinh miễn dịch, thông qua mô phỏng trên máy tính, được thực hiện với phần mềm dự báo epitop tế bào T EpiMatrix (trong cổng trên cơ sở web giao diện tái xử lý protein và sàng lọc tương tác (Interactive Screening and Protein Reengineering Interface - ISPRI)(Epivax, Inc.)) bao gồm điểm Epimatrix được điều chỉnh bởi Tregitope. Trình tự protein của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (Light chain variable region- LCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy chain variable region- HCVR) kết hợp với mỗi kháng thể được phân tích riêng rẽ. Theo Epivax, trình tự protein với điểm Epimatrix được điều chỉnh bởi Tregitope lớn hơn không có khả năng sinh miễn

dịch nói chung cao hơn. Việc đánh giá khả năng sinh miễn dịch EpiMatrix Cluster cũng được thực hiện đối với mỗi LCVR và HCVR để nhận diện cụm epitop của tế bào T trong CDR của mỗi kháng thể. Sự có mặt của các cụm epitop của tế bào T, như được xác định bằng sự có mặt của 2 hoặc nhiều EpiBars liên kế, là đi kèm với khả năng sinh miễn dịch nói chung cao hơn. Sử dụng định nghĩa CDR North, không có cụm epitop của tế bào T liên quan đến CDR được nhận diện trong các kháng thể minh họa A, B, hoặc C. Cụm epitop tế bào T của 4 EpiBars liên kế được nhận diện trong CDR2 của LCVR của kháng thể so sánh ALD 1.H (được mô tả là “Ab 1.H” trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2016/0304604) điều này thể hiện rằng kháng thể so sánh có khả năng sinh miễn dịch cao hơn. Kết quả được cung cấp trong các bảng 5A, 5B và 5C.

Bảng 5A: Đánh giá nguy cơ sinh miễn dịch bằng mô phỏng trên máy tính thông qua việc dự báo epitop tế bào T EpiMatrix

Kháng thể	Điểm Epimatrix		
	HCVR	LCVR	HCVR+LCVR
Ab A minh họa	58,84	19,44	40,61
Ab B minh họa	65,12	26,41	47,21
Ab C minh họa	58,74	26,41	43,79
Ab D minh họa	65,49	26,41	47,41
ALD 1.H	70,11	35,2	53,16

Bảng 5B: Đánh giá Epimatrix được điều chỉnh bằng Tregitope

Kháng thể	Điểm Epimatrix được điều chỉnh bằng Tregitope		
	HCVR	LCVR	HCVR+LCVR
Ab A minh họa	-32,82	-34,22	-33,46
Ab B minh họa	-26,54	-27,24	-26,86
Ab C minh họa	-32,92	-27,24	-30,29
Ab D minh họa	-26,17	-27,24	-26,67
ALD 1.H	-28,41	1,41	-13,93

Bảng 5C: Đánh giá nguy cơ sinh miễn dịch bằng mô phỏng trên máy tính thông qua việc đánh giá khả năng sinh miễn dịch cụm EpiMatrix

Kháng thể	Cụm Epibar liên quan đến CDR
Ab A minh họa	0
Ab B minh họa	0
Ab C minh họa	0
Ab D minh họa	0
ALD 1.H	1

Ví dụ 6: Trung hòa sự giải phóng PACAP cảm ứng bởi sự mất hạt dưỡng bào

Các dưỡng bào người được biệt hóa trong môi trường từ các tế bào thân máu tủy sống của người sử dụng môi trường StemSpan (StemCell) và SCF/IL-6. Vào ngày thử nghiệm, các dưỡng bào được cấy ở mật độ 100.000 tế bào trên 50 μ l vào các lỗ của đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ trong dung dịch đệm Tyrode (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,4 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5,6 mM glucoza, 10 mM HEPES và 0,1% BSA, pH bằng 7,4). Các tế bào được xử lý bằng PACAP38 hoặc PACAP27 với sự có mặt hoặc không có mặt của kháng thể minh họa như được mô tả dưới đây.

Các thử nghiệm điểm đơn được thực hiện bằng cách bổ sung 25 μ l kháng thể minh họa cô đặc 4X trên một lỗ (nồng độ cuối cùng của kháng thể minh họa là 153 μ M). Các thử nghiệm đường cong theo liều được thực hiện bằng cách bổ sung 25 μ l kháng thể cô đặc 4X trên một lỗ để khoảng liều cuối cùng là từ 0 đến 153 μ M (các thể pha loãng ba lần). 25 μ l PACAP38 hoặc PACAP27 cô đặc 4X được bổ sung vào mỗi lỗ đến nồng độ cuối cùng của PACAP (38 hoặc 27) là 1 μ M. Môi trường thử nghiệm chỉ được sử dụng khi không có đối chứng điều trị và IgG4 mAb được sử dụng làm đối chứng âm tính. Thử nghiệm được thực hiện ba lần. Các đĩa 96 lỗ được đặt vào tủ áp (37°C) trong 30 phút. Sau khi ủ, dịch nổi được thu gom với lượng 30 μ l/lỗ và hoạt tính tryptaza được đo bằng thử nghiệm thương mại (Millipore). Phần trăm (%) giải phóng tryptaza trong dịch nổi được tính bằng phương trình sau: ((Mức giải phóng tryptaza thử nghiệm – mức giải phóng tryptaza đối chứng chất dẫn thuốc) / (mức giải phóng tryptaza tổng cộng – mức giải phóng tryptaza đối chứng chất dẫn thuốc) x 100, trong đó mức giải phóng

tryptaza tổng cộng thu được bằng các làm đông lạnh/rã đông các dưỡng bào). Kết quả được cung cấp trong các bảng 6A, 6B và 6C.

Bảng 6A: Khả năng ức chế theo điểm đơn đối với sự giải phóng tryptaza cảm ứng bởi PACAP (27 và 38) ở các dưỡng bào của người

	Phần trăm giải phóng tryptaza khi bổ sung PACAP38 hoặc 27 (%)	
Kháng thể	PACAP38	PACAP27
Ab B minh họa	4,9 ± 1,1	21 ± 1,4
Ab C minh họa	5,5 ± 1,4	14,2 ± 1,1
Ab D minh họa	4,2 ± 0,7	15,1 ± 4,0
Chỉ có môi trường thử nghiệm	-0,3 ± 0,3	-0,3 ± 0,3
mAb IgG4	103,6 ± 0,5	109,7 ± 0,4

Bảng 6B: Khả năng ức chế theo đường cong liều đối với sự giải phóng tryptaza cảm ứng bởi PACAP27 ở các dưỡng bào của người

Kháng thể	Liều (uM)	Phần trăm giải phóng tryptaza khi bổ sung PACAP27 (%)
Ab B minh họa	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
Ab C minh họa	153	9,7 ± 2,3
	51	17,8 ± 2,3
	17	8,0 ± 0,6

	5,6	$11,5 \pm 4,9$
	1,8	$10,4 \pm 2,6$
	0,6	$55,4 \pm 6,0$
	0,2	$85,2 \pm 1,6$
	0	$85,8 \pm 4,8$
Ab D minh họa	153	$9,4 \pm 0,8$
	51	$26,0 \pm 6,3$
	17	$19,8 \pm 3,4$
	5,6	$16,4 \pm 10,8$
	1,8	$20,3 \pm 8,4$
	0,6	$73,0 \pm 2,1$
	0,2	$86,5 \pm 1,8$
	0	$92,7 \pm 1,5$
Chỉ có môi trường thử nghiệm		$-0,2 \pm 1,0$
IgG4 mAb	153	$94,8 \pm 4,8$

Bảng 6C: Khả năng ức chế theo đường cong liều đối với sự giải phóng tryptaza cảm ứng bởi PACAP38 ở các dưỡng bào của người

Kháng thể	Liều (uM)	Phần trăm giải phóng tryptaza khi bổ sung PACAP38 (%)
Ab B minh họa	153	$2,0 \pm 0,3$
	51	$14,6 \pm 2,1$
	17	$14,9 \pm 2,6$
	5,6	$22,0 \pm 4,1$
	1,8	$25,2 \pm 1,4$
	0,6	$52,4 \pm 9,3$
	0,2	$73,7 \pm 1,3$

	0	77,2 ± 1,0
Ab C minh họa	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
Ab D minh họa	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
Chỉ có môi trường thử nghiệm		-0,2 ± 1,0
IgG4 mAb	153	79,6 ± 4,1

Ví dụ 7: Trung hòa cAMP cảm ứng bởi PACAP *In Vivo*

Khả năng trung hòa sự gia tăng cAMP huyết tương cảm ứng bởi PACAP, *in vivo*, được đánh giá ở mô hình chuột CD-1 (Envigo). Ngắn gọn là, các con chuột nhắt CD-1 được dùng dưới da liều 10 mg/kg của một trong số: Kháng thể IgG4 đối chứng (N= 6); Kháng thể IgG4 đối chứng cộng với PBS/rolipram duy nhất (N= 5); Kháng thể B

minh họa (N=5); Kháng thể C minh họa (N=5); hoặc kháng thể D minh họa (N=6). Ba ngày sau khi điều trị bằng kháng thể, các con chuột được dùng trong tĩnh mạch PACAP38 (13 nmol/kg) cộng với rolipram (100ug/mL); một số con chuột đã được điều trị trước đó bằng kháng thể đối chứng IgG4 được dùng trong tĩnh mạch PBS (chứa 0,2% etanol, 1% BSA, 5 ml/kg, và rolipram (100 µg/ml) duy nhất. Mười phút sau khi điều trị bằng PACAP38, máu được thu gom trong ống chứa EDTA và huyết tương được tách ra bằng cách ly tâm. Các mức cAMP trong huyết tương được xác định bằng cách sử dụng ELISA cAMP có trên thị trường (Cell Bios, Inc.) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phân tích thống kê áp dụng logarit nồng độ cAMP biến nạp trong phân tích ANOVA một chiều (Graphpad Prism 7) sau đó phân tích hậu định (post hoc) Dunnett. Kết quả được nêu trong bảng 7 dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SE.

Bảng 7: Mức cAMP trong huyết tương được cảm ứng bởi PACAP

Kháng thể	Mức cAMP trong huyết tương (nM, giá trị trung bình $\pm$ SEM)
Ab đối chứng IgG4 (Cộng với PBS/rolipram duy nhất)	238 $\pm$ 60 (N=5) *
Ab đối chứng IgG4 (cộng với PACAP)	4095 $\pm$ 318 (N=6)
Ab B minh họa (cộng với PACAP)	715 $\pm$ 60 (N=5) *
Ab C minh họa (cộng với PACAP)	666 $\pm$ 96 (N=5) *
Ab D minh họa (cộng với PACAP)	560 $\pm$ 130 (N=6) *

*p<0,0001 với Ab đối chứng IgG4 (PACAP38)

Ví dụ 8: Trung hòa sự thoát mạch protein huyết tương màng cứng được cảm ứng bởi sự kích thích hạch thần kinh sinh ba *In Vivo*

Khả năng của các kháng thể kháng PACAP theo sáng chế trong việc phong bế, *in vivo*, sự thoát mạch protein huyết tương được cảm ứng bằng sự giải phóng PACAP sau khi kích thích hạch thần kinh sinh ba được kiểm tra bằng cách sử dụng mô hình chuột. Ngắn gọn là, các con chuột Sprague-Dawley (Envigo, chuột đực, trọng lượng 250-350 g) được dùng dưới da một trong số: Kháng thể minh họa A ở liều 1-10 mg/kg; kháng thể minh họa B ở liều 3-30 mg/kg; hoặc Ab IgG4 đối chứng ở liều 3 hoặc 10 mg/kg. Bảy mươi hai giờ sau, các con chuột được gây mê bằng Nembutal (65 mg/kg, trong phúc mạc) và cho vào khung định vị nổi (David Kopf Instruments) với các thanh dao sắc đặt ở -2,5 mm. Rạch trên da một đường ở giữa, sau đó khoan hai cặp lỗ hai bên qua sọ (3,2 mm phía sau, 1,8 và 3,8 mm phía bên, tất cả các tọa độ được tham chiếu so với thóp). Các cặp điện cực kích thích bằng thép không gỉ (Rhodes Medical Systems, Inc.) được để thấp thông qua các lỗ ở cả hai bán cầu đến độ sâu 9,2 mm, tính từ màng cứng. Hai phút trước khi kích thích hạch thần kinh sinh ba, albumin huyết thanh bò được đánh dấu fluorescein isothiocyanat (FITC-BSA) (20 mg/kg, trong tĩnh mạch), dấu chuẩn đối với sự thoát mạch protein, được tiêm vào tĩnh mạch đuôi. Hạch thần kinh sinh ba trái được kích thích trong 5 phút ở cường độ dòng là 1,0 mA (5 Hz, khoảng thời gian xung là 5 mili giây) với thiết bị kích thích Model S48 Grass với bộ tách quang điện PSIU6 (Grass-Telefactor). Năm phút sau khi kích thích, các con chuột được giết bằng cách hút hết máu với 40 ml nước muối.

Sau khi giết các con chuột, đỉnh sọ được loại bỏ và màng cứng được thu gom. Các mẫu màng được lấy ra khỏi cả hai bán cầu, tráng rửa bằng nước, và trải phẳng lên tấm kính chứa mẫu của kính hiển vi. Các tấm kính này được làm khô trong 15 phút trên máy làm ẩm tấm kính và các mô được đặt kính với dung dịch 70% glyxerol/nước. Kính hiển vi huỳnh quang (Zeiss) được trang bị máy đơn sắc mạng lưới và quang phổ kế được sử dụng để định lượng màu FITC-BSA trong mỗi mẫu màng cứng. Sự thoát mạch cảm ứng bởi sự kích thích điện đối với hạch thần kinh sinh ba là tác động thuộc cùng một phía của cơ thể (tức là chỉ xảy ra ở phía màng cứng trong đó hạch thần kinh sinh ba được kích thích), do đó cho phép một nửa màng cứng không được kích thích có tác dụng làm đối chứng. Tỷ lệ sự thoát mạch trong màng cứng từ phía được kích thích so với phía không được kích thích được tính. Kết quả được cung cấp trong bảng 8 (giá trị trung bình $\pm$ SE).

Bảng 8: Sự thoát mạch protein huyết tương màng cứng được cảm ứng bởi sự kích thích hạch thần kinh sinh ba

Kháng thể (mg/kg)	Tỷ lệ thoát mạch (giá trị trung bình $\pm$ SEM)
Ab đối chứng IgG4 (10 mg/kg) (N=3)	1,87 $\pm$ 0,04
Ab A minh họa (1 mg/kg) (N=3)	1,93 $\pm$ 0,04
Ab A minh họa (3 mg/kg) (N=3)	1,59 $\pm$ 0,07
Ab A minh họa (10 mg/kg) (N=3)	1,13 $\pm$ 0,05
Ab đối chứng IgG4 (3 mg/kg) (N=3)	1,82 $\pm$ 0,02
Ab đối chứng IgG4 (10 mg/kg) (N=3)	1,90 $\pm$ 0,04
Ab đối chứng IgG4 (30 mg/kg) (N=3)	1,95 $\pm$ 0,05
Ab B minh họa (3 mg/kg) (N=3)	1,83 $\pm$ 0,06
Ab B minh họa (10 mg/kg) (N=3)	1,21 $\pm$ 0,06
Ab B minh họa (30 mg/kg) (N=3)	1,07 $\pm$ 0,04

Ví dụ 9: Dược động học của kháng thể kháng PACAP minh họa

Dược động học huyết thanh của các kháng thể minh họa theo sáng chế được đặc trưng hóa ở các con khỉ cynomolgus đực (n=2) sau khi dùng dưới da duy nhất bằng thử nghiệm IgG toàn bộ. Các con vật được tiêm dưới da bằng kháng thể minh họa B (10mg/kg) và các mẫu huyết thanh được thu gom ở các thời điểm 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 336, 504 và 672 giờ sau khi tiêm. Thử nghiệm IgG toàn bộ được thực hiện nói chung như được mô tả ở đây. Ngắn gọn là, kháng thể dê kháng IgG F(ab')₂ người nồng độ 1 ug/mL (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Catalog Number 109-006-097) được phủ lên đĩa Immulon 4HBX với lượng 100 uL/lỗ. Các lỗ được ủ

bằng một trong số các mẫu chuẩn (đường cong chuẩn đối với kháng thể minh họa B được chuẩn bị từ 15,63-1.000 ng/mL), mẫu đối chứng hoặc mẫu huyết thanh, sau đó ủ với peroxidaza cải ngựa Fc-chuột kháng IgG người được pha loãng ở mức 1:10.000 (HRP; SouthernBiotech, Catalog Number 9040-05) với lượng 100 μ l/lỗ để phát hiện. Các chất phản ứng phát hiện không gắn kết được rửa trôi. Sau đó, hệ cơ chất peroxidaza Microwell TMB được bổ sung vào các lỗ với lượng 100 μ l/lỗ. Dừng hiện màu bằng cách bổ sung dung dịch dừng phản ứng TMB với lượng 100 μ l/lỗ và mật độ quang được đo ở 450 nm với sự hiệu chỉnh bước sóng được đặt ở 630 nm. Khả năng phản ứng miễn dịch được xác định từ các lượng đã biết của kháng thể minh họa B trong 100% huyết thanh khỉ cynomolgus, sau đó bằng thể pha loãng yêu cầu tối thiểu 1:10 trong Casein Blocker™ trong PBS sử dụng thuật toán 5 thông số (StatLia; version 3.2). Theo quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, mức thanh thải biểu kiến (CL/F) 0,49 mL/giờ/kg, thể tích phân bố biểu kiến (V/F) 114,0 mL/kg, và thời gian bán thải cuối cùng 171 giờ được tính bằng cách phân tích không ngăn được tính đối với kháng thể minh họa B. Kết quả được động học thu được là thích hợp với các kháng thể trị liệu có khả năng kéo dài thời gian tác dụng.

Trình tự

HC minh họa (SEQ ID NO.1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
LSGGSTYYAXSHKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVREVGASX
HNYYGMDVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD
HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPXCPAPEXXGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

trong đó, X ở gốc 62 là một trong số D, A, E và Q; X ở gốc 104 là một trong số N và T;
X ở gốc 231 là một trong số P và S; X ở gốc 237 là một trong số A và F; và X ở gốc 238
là một trong số A và L.

LC minh họa (SEQ ID NO.2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIXRWLAWYQQKPGKAPKLLIHDASQ
LXEGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSSLQPEDIATYYCQQFDLLPLTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

trong đó X ở gốc 30 là một trong số S và W; và X ở gốc 55 là một trong số L và F.

HCDR1 minh họa (SEQ ID NO.3)

AASGFTFSSYYMS

HCDR2 minh họa (SEQ ID NO.4)

AISLSGGSTYYAXSHKG

trong đó X ở gốc 13 là một trong số D, A, E và Q.

HCDR3 minh họa (SEQ ID NO.5)

VREVGASXHNYYGMDV

trong đó X ở gốc 8 là một trong số N và T.

LCDR1 minh họa (SEQ ID NO.6)

RASQSIXRWLA

trong đó X ở gốc 7 là một trong số S và W.

LCDR2 minh họa (SEQ ID NO.7)

HDASQLXE

trong đó X ở gốc 7 là một trong số L và F.

LCDR3 minh họa (SEQ ID NO.8)

QQFDLLPLT

HCVR minh họa (SEQ ID NO.9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
LSGGSTYYAXSHKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVREVGASX
HNYYGMDVWGQGTMTVTVSS

trong đó, X ở gốc 62 là một trong số D, A, E và Q; và X ở gốc 104 là một trong số N và T.

LCVR minh họa (SEQ ID NO.10)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIXRWLAWYQQKPGKAPKLLIHDASQ
LXEGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQFDLLPLTFGGGGTKVEIK

trong đó X ở gốc 30 là một trong số S và W; và X ở gốc 55 là một trong số L và F.

Trình tự nucleotit mã hóa HC của Ab B minh họa (SEQ ID NO.11)

gaggtgcagctgttgagctctgggggaggc ttgtacagcctgggggggtccctgagactc
tcctgtgcagcctctggattcacctttagc agctattacatgagctgggtccgccaggt
ccagggaaggggctggagtggtctcagct attagtctgagtggtgtagcacatactac
gcagcgtcccacaagggccggttcaccatc tccagagacaattccaagaacacgctgtat
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggccgtatattactgtgtccgggaggtg
ggagctagcactcacaactactacggtatg gacgtctggggccaagggaacctggtcacc
gtctcttcagcttctaccaagggcccatcg gtcttcccgtagcgcctgtccaggagc
acctccgagagcacagccgccctgggtgc ctggtcaaggactacttccccgaaccggtg
acggtgtcgtggaactcaggcgcctgacc agcggcgtgcacacctcccggctgtccta
cagtcctcaggactctactccctcagcagc gtggtgaccgtgccctccagcagcttgggc
acgaagacctacacctgcaacgtagatcac aagcccagcaacaccaaggtggacaagaga
gttgagtccaaatatggtcccccattgccc cctgcccagcacctgaggccgccggggga
ccatcagttctctgttcccccaaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccct
gaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagc caggaagaccccgaggtccagttcaactgg
tacgtggatggcgtggaggtgcataatgcc aagacaaagccgcgggaggagcagttcaac
agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc gtctgcaccaggactggctgaacggcaag
gagtacaagtgcagggtctccaacaaaggc ctccgctctccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagagccacag gtgtacaccctgccccatcccaggaggag
atgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc ctggtcaaaggcttctaccccagcgacatc
gccgtggagtgaggaaagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacgcctcccgtg
ctggactccgacggctccttctctctac agcaggctaaccgtggacaagagcaggtgg
caggaggggaatgtcttctcatgtccgtg atgcatgaggctctgcacaaccactacaca
cagaagagcctctccctgtctctgggt

Trình tự nucleotit mã hóa LC của Ab B minh họa (SEQ ID NO.12)

gacatccagatgacccagtcctccatcctcc ctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
 atcacttgccgggagtcagagtatttgg aggtggttggcctggatcagcagaaacca
 gggaaagcccctaagctcctgatccacgat gcatcccaattgttcgaaggggtcccatca
 aggttcagtgggaagtggatctgggacagat ttactttcaccatcagcagcctgcagcct
 gaagatattgcaacatattactgtcaacag ttgtattgctccctctcactttcggcgga
 gggaccaaggtggagatcaaacggaccgtg gctgcaccatctgtcttcatttcccgccca
 tctgatgagcagttgaaatctggaactgcc tctgtgtgtgcctgctgaataacttctat
 cccagagaggccaaagtacagtgggaaggtg gataacgccctccaatcgggtaactcccag
 gagagtgtcacagagcaggacagcaaggac agcacctacagcctcagcagcaccctgacg
 ctgagcaaagcagactacgagaaacacaaa gtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc
 ctgagctcggccgtcacaagagcttcaac
 aggggagagtgc

Trình tự axit amin của PACAP 38 người tái tổ hợp (SEQ ID NO.13)

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNK

trong đó K ở gốc 38 được sửa đổi sau dịch mã bằng cách amit hóa đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của PACAP 27 người tái tổ hợp (SEQ ID NO.14)

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL

trong đó L ở gốc 27 được sửa đổi sau dịch mã bằng cách amit hóa đầu tận cùng C.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết với peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên của người bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó HCVR chứa các vùng quyết định bổ cứu (CDR): HCDR1, HCDR2, và HCDR3 và LCVR chứa các CDR: LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó trình tự axit amin của HCDR1 là SEQ ID NO: 3, trình tự axit amin của HCDR2 là SEQ ID NO: 4, trình tự axit amin của HCDR3 là SEQ ID NO: 5, trình tự axit amin của LCDR1 là SEQ ID NO: 6, trình tự axit amin của LCDR2 là SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin của LCDR3 là SEQ ID NO: 8, và trong đó HCDR2 chứa axit aspartic, alanin, axit glutamic hoặc glutamin ở gốc 13 của SEQ ID NO: 4; HCDR3 chứa asparagin hoặc threonin ở gốc 8 của SEQ ID NO: 5; LCDR1 chứa serin hoặc tryptophan ở gốc 7 của SEQ ID NO: 6; và LCDR2 chứa leuxin hoặc phenylalanin ở gốc 7 của SEQ ID NO: 7.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó HCDR2 chứa axit aspartic ở gốc 13; HCDR3 chứa asparagin ở gốc 8; LCDR1 chứa serin ở gốc 7; và LCDR2 chứa leuxin ở gốc 7.
3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó HCDR2 chứa alanin ở gốc 13; HCDR3 chứa threonin ở gốc 8; LCDR1 chứa tryptophan ở gốc 7; và LCDR2 chứa phenylalanin ở gốc 7.
4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó HCDR2 chứa axit glutamic ở gốc 13; HCDR3 chứa threonin ở gốc 8; LCDR1 chứa tryptophan ở gốc 7; và LCDR2 chứa phenylalanin ở gốc 7.
5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó HCDR2 chứa glutamin ở gốc 13; HCDR3 chứa threonin ở gốc 8; LCDR1 chứa tryptophan ở gốc 7; và LCDR2 chứa phenylalanin ở gốc 7.
6. Kháng thể theo điểm 1, bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO.9 và trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO. 10.

7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó HCVR chứa axit aspartic ở gốc 62 và asparagin ở gốc 104, và trong đó LCVR chứa serin ở gốc 30 và leuxin ở gốc 55.
8. Kháng thể theo điểm 6, trong đó HCVR chứa alanin ở gốc 62 và threonin ở gốc 104, và trong đó LCVR chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55.
9. Kháng thể theo điểm 6, trong đó HCVR chứa axit glutamic ở gốc 62 và threonin ở gốc 104, và trong đó LCVR chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55.
10. Kháng thể theo điểm 6, trong đó HCVR chứa glutamin ở gốc 62 và threonin ở gốc 104, và trong đó LCVR chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55.
11. Kháng thể gắn kết với peptit hoạt hóa adenylat xyclaza tuyến yên của người gồm chuỗi nặng (HC) và chuỗi nhẹ (LC), trong đó trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO: 1 và trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO: 2, trong đó HC chứa axit aspartic, alanin, axit glutamic hoặc glutamin ở gốc 62 và asparagin hoặc threonin ở gốc 104 của SEQ ID NO: 1 và trong đó LC chứa serin hoặc tryptophan ở gốc 30 và leuxin hoặc phenylalanin ở gốc 55 của SEQ ID NO: 2.
12. Kháng thể theo điểm 11, trong đó HC chứa axit aspartic ở gốc 62, asparagin ở gốc 104, prolin ở gốc 231, alanin ở gốc 237 và alanin ở gốc 238, và trong đó LC chứa serin ở gốc 30 và leuxin ở gốc 55.
13. Kháng thể theo điểm 11, trong đó HC chứa alanin ở gốc 62, threonin ở gốc 104, prolin ở gốc 231, alanin ở gốc 237 và alanin ở gốc 238, và trong đó LC chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55.
14. Kháng thể theo điểm 11, trong đó HC chứa axit glutamic ở gốc 62, threonin ở gốc 104, prolin ở gốc 231, alanin ở gốc 237 và alanin ở gốc 238, và trong đó LC chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55.
15. Kháng thể theo điểm 11, trong đó HC chứa glutamin ở gốc 62, threonin ở gốc 104, prolin ở gốc 231, alanin ở gốc 237 và alanin ở gốc 238, và trong đó LC chứa tryptophan ở gốc 30 và phenylalanin ở gốc 55.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ELI LILLY AND COMPANY
 <120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT PEPTIT HOẠT HÓA ADENYLAT XYCLAZA TUYẾN YÊN (PACAP)
 <130> X21602
 <150> 62/565,278
 <151> 2017-09-29
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> HC minh họa
 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
 <222> (62)..(62)
 <223> Xaa ở gốc 62 là một trong số Asp, Ala, Glu, và Gln
 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
 <222> (104)..(104)
 <223> Xaa ở gốc 104 là một trong số Asn và Thr
 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
 <222> (231)..(231)
 <223> Xaa ở gốc 231 là một trong số Pro và Ser
 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
 <222> (237)..(237)
 <223> Xaa ở gốc 237 là một trong số Ala và Phe
 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
 <222> (238)..(238)
 <223> Xaa ở gốc 238 là một trong số Ala và Leu
 <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

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

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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC minh họa

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (30)..(30)
<223> Xaa ở gốc 30 là một trong số Ser và Trp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (55)..(55)
<223> Xaa ở gốc 55 là một trong số Leu và Phe

<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
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
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	145	150	155
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> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 minh họa

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 minh họa

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở gốc 13 là một trong số Asp, Ala, Glu và Gln

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 minh họa

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP

<222> (8)..(8)

<223> Xaa ở gốc 8 là một trong số Asn và Thr

<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> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1 minh họa

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP

<222> (7)..(7)

<223> Xaa ở gốc 7 là một trong số Ser và Trp

<400> 6

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

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2 minh họa

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP

<222> (7)..(7)

<223> Xaa ở gốc 7 là một trong số Leu và Phe

<400> 7

His Asp Ala Ser Gln Leu Xaa Glu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 minh họa

<400> 8

Gln Gln Phe Asp Leu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 9

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCVR minh họa

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP

<222> (62)..(62)

<223> Xaa ở gốc 62 là một trong số Asp, Ala, Glu và Gln

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP

<222> (104)..(104)

<223> Xaa ở gốc 104 là một trong số Asn và Thr

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

38859

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> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCVR minh họa

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (30)..(30)
<223> Xaa ở gốc 30 là một trong số Ser và Trp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (55)..(55)
<223> Xaa ở gốc 55 là một trong số Leu và Phe

<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> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit mã hóa HC của Ab B minh họa

<400> 11

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctattaca tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtctga gtggtggtag cacatactac	180
gcagcgtccc acaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgt ccgggagggtg	300
ggagctagca ctcaacta ctacggtatg gacgtctggg gccaagggac catgggtcacc	360
gtctcttcag cttctaccaa gggcccatcg gtcttccgc tagcgccctg ctccaggagc	420
acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg	480
acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcggtgc acaccttccc ggctgtccta	540
cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc	600
acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga	660
gttgagtcca aatatgggtcc cccatgocca ccctgcccag cacctgaggc cgccggggga	720
ccatcagtct tctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggacccct	780
gaggtcacgt gcgtgggtggg ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg	840
tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac	900
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag	960
gagtacaagt gcaagggtctc caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag	1080
atgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc	1140

gccgtggagt gggaaagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg 1260
 caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tctgggt 1347

<210> 12
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa LC của Ab B minh họa

<400> 12
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtca gagtatttgg aggtggttgg cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatccacgat gcatcccaat tgttcgaagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttacttttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag tttgatttgc tccctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acggaccgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 13
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PACAP 38 tái tổ hợp của người

<220>
 <221> GỐC ĐƯỢC SỬA ĐỔI
 <222> (38)..(38)
 <223> Lys ở gốc 38 được sửa đổi sau dịch mã bằng cách amit hóa đầu tận cùng C

<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> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> PACAP27 tái tổ hợp của người

```
<220>
<221> GỐC ĐƯỢC SỬA ĐỔI
<222> (27)..(27)
<223> Leu ở gốc 27 được sửa đổi sau dịch mã bằng cách amit hóa đầu tận
cùng C
```

<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