

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040300**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.18

(21) Номер заявки
202090563

(22) Дата подачи заявки
2018.09.20

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

(54) АНТИ-РАСАР АНТИТЕЛО(31) **62/565,278**(32) **2017.09.29**(33) **US**(43) **2020.06.30**(86) **PCT/US2018/051898**(87) **WO 2019/067293 2019.04.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Бейдлер Кейтрин Бротигем, Джонсон
Майкл Парвин, Пател Четанкумар
Натварлал (US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Глухарёва
А.О., Гизатуллина Е.М., Строкова
О.В., Лебедев В.В., Костюшенкова
М.Ю., Гизатуллин Ш.Ф. (RU)**

(56) **WO-A1-2017106578
US-A1-2016304604
WO-A2-2012106407
WO-A1-9114786**

**RAINER SCHWARZHOFF ET AL.: "Specific
monoclonal antibodies neutralize the action of
PACAP 1-27 or PACAP 1-38 on intestinal muscle
strips in vitro", REGULATORY PEPTIDES, vol.
55, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages
57-66, XP055351445, NL ISSN: 0167-0115, DOI:
10.1016/0167-0115(94)00092-C abstract**

**ZAGAMI ALESSANDRO S. ET AL.:
"Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
and migraine", ANNALS OF CLINICAL AND
TRANSLATIONAL NEUROLOGY, vol. 1, no.
12, 12 November 2014 (2014-11-12), pages
1036-1040, XP055351305, GB ISSN: 2328-9503,
DOI: 10.1002/acn3.113 the whole document**

**SCHYTZ H.W. ET AL.: "PACAP38 induces
migraine-like attacks in patients with migraine without
aura", BRAIN., vol. 132, no. 1, 11 November 2008
(2008-11-11), pages 16-25, XP055128665, GB ISSN:
0006-8950, DOI: 10.1093/brain/awn307 the whole
document**

**VAUDRY D. ET AL.: "Pituitary Adenylate
Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20
Years after the Discovery", PHARMACOLOGICAL
REVIEWS, vol. 61, no. 3, 1 September 2009
(2009-09-01), pages 283-357, XP055129017, ISSN:
0031-6997, DOI: 10.1124/pr.109.001370 the whole
document**

(57) Антитела к активирующему аденилатциклазу гипофиза пептиду человека, композиции, содержащие такие антитела, и способы применения таких антител для лечения боли, включая головную боль и/или мигрень.

B1**040300****040300 B1**

Данное изобретение относится к области медицины. В частности, данное изобретение относится к антителам к активирующему аденилатциклазу гипофиза пептиду (PACAP - pituitary adenylate cyclase-activating peptide), композициям, содержащим такие анти-PACAP антитела, и способам применения таких антител для лечения боли, включая первичные головные боли (включая тригеминальные вегетативные цефалгии), вторичные головные боли и мигрени (включая хроническую мигрень).

Пептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза (PACAP), представляет собой нейропептид, распространенный по всей нервной системе, включая тригеминально-васкулярную систему, полулунный узел, спинной мозг, гипоталамус и гипофиз. PACAP существует по меньшей мере в двух α -амидированных активных формах: PACAP38 (SEQ ID NO: 13), которая содержит 38 аминокислот и является более распространенной активной формой, обычно составляющей до 90% PACAP в ткани млекопитающего; и PACAP27 (SEQ ID NO: 14), которая содержит те же 27 N-концевых аминокислот, что и PACAP38. Считается, что PACAP играет роль в нейропротекции, нейромодуляции, нейрогенном воспалении и ноцицепции, а также в вызове боли, включая головные боли и мигрени.

По оценкам, головные боли и мигрени поражают 37 млн пациентов в год, при этом более двух третей не получают лечения. Первичная головная боль(боли) классифицируется как головная боль, не являющаяся результатом другого, или отдельного, заболевания или нарушения, в то время как вторичная головная боль(боли) классифицируется как головная боль, возникающая в результате другой или отдельной обуславливающей причины (например, травмы, заболевания или другого нарушения). Автономные тригеминальные цефалгии (АТЦ) классифицируются как первичные головные боли, которые включают в себя эпизодическую и хроническую кластерную головную боль, пароксизмальную гемикранию, продолжительную гемикранию и приступы односторонней невралгической головной боли. Мигрень(ни) относится к мигрени "без ранних симптомов" (ранее называемой "обычной мигренью") и "с ранними симптомами" (ранее называемой "классической мигренью"). Хроническая мигрень(ни) классифицируется как 15 или больше дней головной боли в месяц, по меньшей мере восемь из которых являются мигренями. Когда частота мигрени составляет два или больше эпизода в месяц, или когда мигрень значительно мешает повседневной жизни пациента и/или купирующие лекарства являются неэффективными, врачам рекомендуется рассмотреть варианты профилактического лечения. Однако варианты лечения для профилактики мигрени на текущий момент часто бывают неэффективными, и современные варианты профилактического и купирующего лечения (например, гипотензивные средства, противосудорожные препараты, антидепрессанты) имеют низкую эффективность и связанные с побочными эффектами, лишаящими дееспособности.

Структура PACAP хорошо известна в данной области техники (см., например, Miyata, A. et al., *Biochem Biophys Res Commun* 170: 643-648 (1990)), как и анти-PACAP антител. Например, в патенте США № 5486472 А, публикации международной заявки на патент № WO 2012/106407 А3 и публикации заявки на патент США № 2016-304604 раскрыты различные анти-PACAP антитела и их потенциальное использование. Однако на текущий момент ни одно антитело, нацеленное на PACAP, не было одобрено для терапевтического применения. Таким образом, остается потребность в альтернативных анти-PACAP антителах. В частности, по-прежнему существует потребность в альтернативных анти-PACAP антителах, которые нейтрализуют PACAP с высокой эффективностью, обеспечивают пролонгированное действие и способны лечить боль, включая первичные и вторичные головные боли и мигрени, включая хроническую мигрень. Как и при любом терапевтическом лечении, безопасность и токсичность остаются ограничением, и альтернативные анти-PACAP антитела не должны сопровождаться неприемлемой иммуногенностью. Таким образом, остается потребность в альтернативных анти-PACAP антителах, которые демонстрируют сниженный риск иммуногенности у людей. Такие анти-PACAP антитела предпочтительно также будут обладать хорошими физико-химическими свойствами для облегчения разработки, изготовления и приготовления.

Данное изобретение относится к антителу, которое связывается с PACAP человека и которое содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), причем HCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и LCVR содержит CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом аминокислотная последовательность HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 5, аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 6, аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 7, и аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 8. В конкретном варианте осуществления HCDR2 содержит аспарагиновую кислоту в положении остатка 13, HCDR3 содержит аспарагин в положении остатка 8, LCDR1 содержит серин в положении остатка 7, и LCDR2 содержит лейцин в положении остатка 7. В другом конкретном варианте осуществления HCDR2 содержит аланин в положении остатка 13, HCDR3 содержит треонин в положении остатка 8, LCDR1 содержит триптофан в положении остатка 7, и LCDR2 содержит фенилаланин в положении остатка 7. В дополнительном конкретном варианте осуществления HCDR2 содержит глутаминовую кислоту в положении остатка 13, HCDR3 содержит треонин в положении остатка 8, LCDR1 содержит триптофан в положении остатка 7, и LCDR2 содержит фенилаланин в положении остатка 7. В

кодирующим антитела согласно данному изобретению. В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем остаток 62 представляет собой аспарагиновую кислоту, остаток 104 представляет собой аспарагин, остаток 231 представляет собой пролин, остаток 237 представляет собой аланин, и остаток 238 представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления остаток 62 представляет собой аланин, остаток 104 представляет собой треонин, остаток 231 представляет собой пролин, остаток 237 представляет собой аланин, и остаток 238 представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления остаток 62 представляет собой глутаминовую кислоту, остаток 104 представляет собой треонин, остаток 231 представляет собой пролин, остаток 237 представляет собой аланин, и остаток 238 представляет собой аланин. В дополнительных вариантах осуществления остаток 62 представляет собой глутамин, остаток 104 представляет собой треонин, остаток 231 представляет собой пролин, остаток 237 представляет собой аланин, и остаток 238 представляет собой аланин.

Согласно вариантам осуществления данного изобретения также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, при этом остаток 30 представляет собой серин, а остаток 55 представляет собой лейцин. В некоторых вариантах осуществления остаток 30 представляет собой триптофан, а остаток 55 представляет собой фенилаланин.

В некоторых вариантах осуществления молекула ДНК данной молекулы содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем остаток 62 представляет собой аспарагиновую кислоту, остаток 104 представляет собой аспарагин, остаток 231 представляет собой пролин, остаток 237 представляет собой аланин, и остаток 238 представляет собой аланин, и содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, при этом остаток 30 представляет собой серин, и остаток 55 представляет собой лейцин. В конкретном варианте осуществления молекула ДНК данной молекулы содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем остаток 62 представляет собой аланин, остаток 104 представляет собой треонин, остаток 231 представляет собой пролин, остаток 237 представляет собой аланин, и остаток 238 представляет собой аланин, и содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, при этом остаток 30 представляет собой триптофан, а остаток 55 представляет собой фенилаланин. В конкретном варианте осуществления молекула ДНК данной молекулы содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем остаток 62 представляет собой глутаминовую кислоту, остаток 104 представляет собой треонин, остаток 231 представляет собой пролин, остаток 237 представляет собой аланин, и остаток 238 представляет собой аланин, и содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, при этом остаток 30 представляет собой триптофан, а остаток 55 представляет собой фенилаланин. В другом конкретном варианте осуществления молекула ДНК данной молекулы содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем остаток 62 представляет собой глутамин, остаток 104 представляет собой треонин, остаток 231 представляет собой пролин, остаток 237 представляет собой аланин, и остаток 238 представляет собой аланин, и содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, при этом остаток 30 представляет собой триптофан, а остаток 55 представляет собой фенилаланин. Кроме того, согласно данному изобретению предложено антитело, полученное в соответствии со способом, при этом способ включает в себя культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотидную последовательность согласно данному изобретению, в условиях, при которых антитело экспрессируется, и выделение из указанной клетки-хозяина антитела согласно данному изобретению.

Как применяется в данном документе, "антитело" представляет собой молекулу иммуноглобулина, содержащую 2 HC и 2 LC, связанные дисульфидными связями. Аминоконцевая часть каждой LC и HC содержит вариабельную область из примерно 100-120 аминокислот, в первую очередь, отвечающую за распознавание антигена содержащимися в ней CDR. CDR перемежаются с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая LCVR и HCVR состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 3 CDR LC обозначаются как "LCDR1, LCDR2 и LCDR3", а 3 CDR HC обозначаются как "HCDR1, HCDR2 и HCDR3". CDR содержат большинство остатков, которые формируют специфические связи с антигеном. На функциональную способность антитела связывать определенный антиген в значительной степени влияют шесть CDR. Отнесение аминокислот к доменам CDR в областях LCVR и HCVR антител согласно данному изобретению основано на хорошо известном соглашении по нумерации Кабата (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)), и соглашения по нумерации Нофа (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, *Journal of Molecular Biology*, 406:228-256 (2011)).

LC классифицируются как каппа или лямбда, каждая из которых характеризуется определенной константной областью, известной в данной области техники. Антитела согласно данному изобретению включают в себя каппа LC. HC классифицируют на гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE соответственно. Антитела согласно данному изобретению содержат HC IgG. Антитела IgG могут быть дополнительно разделены на подклассы, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. В конкретном варианте осуществления антитела согласно данному изобретению представляют собой IgG4. Карбоксиконцевая часть каждой HC определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. В конкретном варианте осуществления антитела согласно данному изобретению имеют одну или большее количество модификаций в константной области каждой HC, которые снижают эффекторную функцию. В более конкретном варианте осуществления антитела согласно данному изобретению представляют собой IgG4 и имеют модификации в константной области обеих HC, которые снижают эффекторную функцию, включая аминокислоту аланин в обоих остатках 237 и 238 (нумерация остатков является линейной и основана на иллюстративной HC SEQ ID NO: 1). В еще более конкретном варианте осуществления антитела согласно данному изобретению представляют собой IgG4 и имеют модификации в константной области обеих HC, которые снижают эффекторную функцию, включая аминокислоту аланин по обоим остаткам 237 и 238, и имеют дополнительные модификации в константной области обеих HC, способствующие стабильности, включая аминокислоту пролин в положении остатка 231 (нумерация остатков является линейной и основана на иллюстративной HC SEQ ID NO: 1).

Антитела согласно данному изобретению представляют собой моноклональные антитела (мАт). мАт могут быть получены, например, с помощью гибридных технологий, рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий, например CDR-вставки, или комбинаций таких или других технологий, известных в данной области техники. Как указано в данном документе, мАт представляют собой антитела, полученные из единственной копии или клона, включая, например, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не способ, с помощью которого их получают.

Способы получения и очистки антител хорошо известны в данной области техники. Например, можно подвергнуть скринингу библиотеку фагов, тем самым тысячи Fab-фрагментов подвергают скринингу на взаимодействие с рекомбинантным PACAP человека. Полученные в результате взаимодействия молекулы могут быть выделены, очищены, и аминокислотные последовательности могут быть определены с использованием общепринятых способов, хорошо известных в данной области техники, с помощью которых могут быть сконструированы исходные антитела. Антитела согласно данному изобретению сконструированы так, что они содержат одну или большее количество каркасных областей человека. Каркасные последовательности зародышевой линии человека можно получить в ImMunoGeneTics (INGT) через их веб-сайт, <http://imgt.cines.fr> или из "The Immunoglobulin FactsBook by Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351". Согласно конкретным вариантам осуществления каркасные области HC и LC зародышевой линии для применения в антителах согласно данному изобретению включают в себя 3-23 и 018 соответственно.

В конкретных вариантах осуществления данного изобретения антитело или нуклеиновая кислота, кодирующая его, предоставляется в выделенной форме. Как применяется в данном документе, термин "выделенный" относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, который(ая) свободен(на) или практически свободен(на) от других макромолекулярных частиц, обнаруженных в клеточной среде.

Антитела согласно данному изобретению могут быть получены и очищены с использованием известных способов. Например, последовательности кДНК, кодирующие HC (например, аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1) и LC (например, аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2), могут быть клонированы и введены в GS (глутаминсинтетаза) вектор экспрессии. Затем сконструированный вектор экспрессии иммуноглобулина может быть стабильно трансфицирован в клетки CHO. Специалист в данной области техники поймет, что экспрессия антител в млекопитающих приведет к гликозилированию, обычно на высококонсервативных сайтах N-гликозилирования в области Fc. Стабильные клоны могут быть проверены на экспрессию антитела, специфически связывающегося с PACAP человека. Положительные клоны могут быть размножены в бессывороточной культуральной среде для продукции антител в биореакторах. Среда, в которую было секретируется антитело, может быть очищена обычными способами. Например, среда может быть удобно нанесена на FF колонку с белком А или G с сефарозой, которая была уравновешена совместимым буфером, таким как забуференный фосфатом физиологический раствор. Колонку промывают для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело элюируют, например, градиентом pH, и фракции антитела обнаруживают, например, с помощью ДСН-ПААГ электрофореза и затем объединяют. Антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно отфильтровано с использованием обычных методов. Растворимый агрегат и мультимеры могут быть эффективно удалены обычными методами, включая эксклюзионную, гидрофобного взаимодействия, ионного обмена или гидроксипатитную хро-

матографию. Продукт может быть немедленно заморожен, например, при -70°C , или может быть лиофилизирован.

Антитела согласно данному изобретению могут быть использованы в лечении пациентов. Более конкретно, ожидается, что антитела согласно данному изобретению будут лечить класс боли, который конкретно включает головную боль как первичную, так и вторичную, и мигрень, включая хроническую мигрень. Хотя ожидается, что антитела согласно данному изобретению будут полезны в лечении боли, включая первичную и вторичную головную боль и мигрень, такие антитела также могут быть полезны в лечении другой боли. Как используется в данном документе взаимозаменяемо, "лечение", и/или "процесс лечения", и/или "лечить" предназначены для обозначения всех процессов, в которых может происходить замедление, прерывание, купирование, контроль, остановка или изменение прогрессирования нарушения, описанного в данном документе, но не обязательно указывает на полное устранение всех симптомов нарушения. Лечение включает в себя введение антитела согласно данному изобретению для лечения заболевания или патологии у человека, который бы получил пользу от снижения активности РАСАР, и включает в себя (а) ингибирование дополнительного прогрессирования заболевания, т.е. прекращение его развития; (б) облегчение заболевания, т.е. вызов регрессии заболевания или патологии, или ослабления его симптомов или осложнений; и (в) предотвращение появления симптомов заболевания.

Как используется в данном документе взаимозаменяемо, термин "пациент", "субъект" и "индивид" относится к человеку. В некоторых вариантах осуществления пациент дополнительно характеризуется заболеванием, нарушением или патологией (например, болью, например первичной или вторичной головной болью и/или мигренью, включая хроническую мигрень), который получает пользу от снижения активности РАСАР. В другом варианте осуществления пациент дополнительно характеризуется как подверженный риску развития патологии, описанной выше, или патологии, которая бы улучшилась из-за уменьшения активности РАСАР.

Как применяется в данном документе, термин "связывается (или связывается с)" относится к взаимодействию антитела с эпитопом РАСАР человека. Термин "эпитоп", как применяется в данном документе, относится к дискретным трехмерным сайтам антигена, которые распознаются антителами согласно данному изобретению.

Антитело согласно данному изобретению может быть включено в фармацевтическую композицию, которая может быть приготовлена способами, хорошо известными в данной области техники, и содержит антитело согласно данному изобретению и один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей и/или разбавителей) (например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Loyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012, в котором представлен сборник методов приготовления, общеизвестных практикующим специалистам). Подходящие носители для фармацевтических композиций включают в себя любой материал, который в сочетании с антителом согласно данному изобретению сохраняет активность молекулы и не вступает в реакцию с иммунной системой пациента.

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело согласно данному изобретению, может быть введена пациенту с риском, или проявлением, заболеваний или нарушений, как описано в данном документе, парентеральными путями (например, подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным или трансдермальным). Фармацевтическая композиция согласно данному изобретению содержит "эффективное" или "терапевтически эффективное" количество, которые используются в данном документе взаимозаменяемо, антитела согласно данному изобретению. Эффективное количество относится к количеству, необходимому (в дозах и в течение периодов времени и с целями введения) для достижения желаемого терапевтического результата. Эффективное количество антитела может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и масса индивида, и способности антитела вызывать желаемый ответ у индивида. Эффективным количеством является также количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела согласно данному изобретению перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

Примеры

Пример 1. Конструирование и экспрессия иллюстративных анти-РАСАР антител.

Сталкивались с существенными проблемами, связанными с химической и физической стабильностью, при конструировании анти-РАСАР антитела согласно данному изобретению. Например, проблемы, испытанные с исходными гуманизированными конструкциями, включают в себя низкую аффинность связывания, неприемлемую иммуногенность, деамидирование вариабельной области, окисление, изомеризацию и низкую активность.

Поэтому были разработаны химические и физические модификации для улучшения аффинности связывания, устранения или уменьшения димеризации НС, снижения иммуногенности и улучшения химической и физической стабильности антител согласно данному изобретению. Аминокислотные модификации были сконструированы как для тяжелых, так и для легких цепей. Также были проведены обширные исследования стабильности белка, и сконструированные антитела были подвергнуты скринингу на свойства экспрессии и термостабильности, а также другие свойства, включая аффинность связывания. Следующие антитела, которые содержат многочисленные модификации исходных конструкций, идентифицированы как обладающие высокой аффинностью связывания, химически и физически стабильные,

обладающие низкой иммуногенностью и обладающие фармакокинетическими свойствами, совместимыми с ежемесячным введением. Ни одна из модификаций, содержащихся в антителах согласно данному изобретению, не была идентифицирована в исходно гуманизированных конструкциях.

Иллюстративные анти-РАСАР антитела согласно данному изобретению представлены в табл. 1. Иллюстративные антитела содержат тяжелые цепи SEQ ID NO: 1 и легкие цепи SEQ ID NO: 2, а также каркасные области 3-23 HC человека и LC каппа человека с каркасом O18. Кроме того, сконструированные модификации как в легкой, так и в тяжелой цепях, которые улучшают химическую и физическую стабильность, а также функциональные свойства антител, представлены в табл. 1. Взаимосвязь различных областей приведенных иллюстративных анти-РАСАР антител выглядит следующим образом (для нумерации аминокислот применяется линейная нумерация; присвоение аминокислот переменным доменам основано на Международной информационной системе иммуногенетики®, доступной по адресу www.imgt.org; присвоение аминокислот доменам CDR основано на хорошо известном соглашении о нумерации Нофа (North), за исключением HCDR2, которое основано на хорошо известном соглашении о нумерации Кабата):

Таблица 1

Аминокислотные области иллюстративных анти-РАСАР антител согласно данному изобретению

SEQ ID NO:1			SEQ ID NO:2		
HCVR	Область	Позиции	LCVR	Область	Позиции
	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
Константная	CH	124-449	Константная	CL	108-214
Иллюстративное Ат А	62D ; 104N ; 231P ; 237A ; 238A		Иллюстративное Ат А	30S ; 55L	
Иллюстративное Ат В	62A ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		Иллюстративное Ат В	30W ; 55F	
Иллюстративное Ат С	62E ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		Иллюстративное Ат С	30W ; 55F	
Иллюстративное Ат D	62Q ; 104T ; 231P ; 237A ; 238A		Иллюстративное Ат D	30W ; 55F	

Следующие примеры и анализы демонстрируют, что антитела согласно данному изобретению полезны для лечения боли, включая первичную и вторичную головную боль и мигрень. Однако следует понимать, что следующие примеры изложены в качестве иллюстрации, а не ограничения, и что специалистом в данной области техники могут быть сделаны различные модификации.

Иллюстративные анти-РАСАР антитела согласно данному изобретению могут быть экспрессированы и очищены, по существу, следующим образом. Глутаминсинтетазный (GS) вектор экспрессии, содержащий последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность HC согласно табл. 1 (например, последовательность ДНК SEQ ID NO: 11, кодирующая HC иллюстративного антитела В, представленного в табл. 1), и ДНК последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность LC согласно табл. 1 (например, последовательность ДНК SEQ ID NO: 12, кодирующая LC иллюстративного антитела В, представленного в табл. 1), используется для трансфекции линии клеток яичника китайского хомячка (CHO) путем электропорации. Вектор экспрессии кодирует ранний промотор вируса обезьян (вирус обезьян 40E) и ген GS. Экспрессия GS обеспечивает биохимический синтез глутамина, аминокислоты, необходимой клеткам CHO. После трансфекции клетки подвергают массовому отбору с помощью 50 мкМ L-метионинсульфоксимида (MSX). Ингибирование GS с помощью MSX используется для повышения строгости отбора. Клетки с вставкой кДНК вектора экспрессии в транскрипционно активные области генома клетки-хозяина могут быть отсеяны от клеток CHO дикого типа, которые экспрессируют эндогенный уровень GS. Трансфицированные пулы высевают с низкой плотностью, чтобы обеспечить почти клональный рост стабильно экспрессирующихся клеток. Главные лунки подвергают скринингу на экспрессию антител и затем увеличивают количество в бессывороточных суспензионных культурах, которые будут использоваться для производства. Очищенную среду, в которую было секретировано антитело, наносят на аффинную колонку с белком А, которая уравновешена совместимым буфером, таким как забуференный фосфатом физиологический раствор (pH 7,4). Колонку промывают 1М NaCl для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело элюируют, например, цитратом натрия при pH (примерно) 3,5, и фракции нейтрализуют 1М трис-буфером. Фракции антитела обнаруживают, например, с помощью ДСН-ПААГ электрофореза или аналитического исключения по размеру, а затем объединяют. Растворимый агрегат и мультимеры могут быть эффективно удалены

обычными методами, включая эксклюзионную, гидрофобного взаимодействия, ионного обмена или гидроксиапатитную хроматографию. Иллюстративное анти-РАСАР антитело согласно данному изобретению концентрируют и/или стерильно фильтруют, используя обычные методики. Чистота иллюстративного антитела после этих стадий хроматографии составляет больше чем 95%. Иллюстративное анти-РАСАР антитело согласно данному изобретению может быть немедленно заморожено при -70°C или храниться при 4°C в течение нескольких месяцев.

Пример 2. Аффинность связывания.

Аффинность связывания (K_d) для каждого комплекса антитело-антиген определяют с использованием анализа кинетического исключения в 96-луночных планках (адаптировано из Estep et al., mAbs, 2013, 5:270-278). Вкратце, серии 3-кратных разведений для каждого иллюстративного Ат (указанных в табл. 1) готовят от начальной концентрации 7290 до 41 мкМ; каждая серия содержит пустой контроль антитела. Образцы готовят в 3% (мас./об.) растворе блокатора А (MSD, кат. № R93AA-1) и добавляют к каждому образцу фиксированную конечную концентрацию антигена 30 пМ биотинилированного по N-концу РАСАР27 (заказной синтез, CPC Scientific) или биотинилированного по N-концу РАСАР38 (Anaspec, кат. № 23590). 100 мкл каждого образца антиген-антитело добавляют в отдельные лунки 96-луночной планки для микротитрования (Greiner, EK-20101) в двух повторностях. Планку закрывают оптической клейкой пленкой (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4311971) и инкубируют при 37°C в течение 3-4 дней, чтобы обеспечить уравнивание образца (концентр.). За день до анализа, каждый ряд 96-луночной стандартной планки MSD (MSD, кат. № L15XA) покрывают 30 мкл соответствующего антитела (как используется в титровочной серии) в концентрации 3 мкг/мл в физиологическом растворе с фосфатным буфером (ФСБ). В день эксперимента стандартную планку MSD промывают один раз 150 мкл ФСБ и блокируют 150 мкл 3% раствора блокатора А в течение 45 мин при 30°C при встряхивании 300 об/мин на настольном шейкере MaxQ 4450 (Thermo Fisher Scientific). После трех промывок ФСБ, 50 мкл каждого образца антиген-антитело (приготовленного и инкубированного, как описано выше) добавляют в стандартную планку MSD и инкубируют в течение 150 с при 30°C со встряхиванием 300 об/мин. После однократной промывки ФСБ, добавляют 50 мкл 1 мкг/мл меченого SULFO-TAG стрептавидина (MSD, кат. № R32AD-5), приготовленного в 1% (мас./об.) растворе блокатора А, и стандартную планку MSD и планку инкубируют при 30°C в течение 3 мин при встряхивании 300 об/мин. Планку еще три раза промывают ФСБ с последующим добавлением 150 мкл/лунка 1X буфера считывания (MSD, кат. № R92TC-2). Стандартную планку MSD считывают с использованием прибора MESO Quickplex SQ 120/1300 (Meso Scale Discovery). Анализ данных выполняют с использованием SigmaPlot (версия 12.5, программное обеспечение Systat) и аффинность связывания (K_d) определяют с использованием интегрированной модели четырехпараметрической логистической кривой SigmaPlot. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Аффинность связывания (K_d) комплексов антитело-антиген при 37°C

Антитело	Аффинность связывания, K_d (нМ, 37°C)	
	Антиген (РАСАР38)	Антиген (РАСАР27)
Иллюстративное Ат А	<i>не определено</i>	37,0
Иллюстративное Ат В	12,8	11,6
Иллюстративное Ат С	14,6	14,5
Иллюстративное Ат D	9,0	10,5

Пример 3. Разрушение РАСАР in vivo.

Разрушение циркулирующего РАСАР38 in vivo оценивали на крысах. Одно из контрольное антитело IgG4 (10 мг/кг) или иллюстративное антитело А (10 мг/кг) вводили крысам внутривенно. Исходный уровень РАСАР38 в плазме оценивали для каждой крысы, а затем крысам внутривенно вводили 6 мкг/кг РАСАР38. После инъекции РАСАР38 образцы плазмы собирали в течение 120-минутного периода времени и определяли общие уровни РАСАР38 (связанного или несвязанного с антителом) с помощью модифицированного ИФА. Вкратце, 96-луночную MSD-планку (кат. №: L15xA-1) покрывали 30 мкл/лунка 1 мкг/мл анти-РАСАР38 антитела (US Biological, кат. № P1775-03C) в ФСБ, и инкубировали в течение ночи при 40°C . Планку трижды промывали 200 мкл/лунка ФСБТ (ФСБ + Tween) с последующим блокированием 150 мкл/лунка 3% блокатором А (MSD, кат. № R93BA-2) в ФСБ при комнатной температуре в течение 1 ч с вращением 650 об/мин. После этого планку трижды промывали 200 мкл/лунка ФСБТ. Калибровочный раствор РАСАР38 (Bachem, кат. № H430-0500) разбавляли до 1000 пг/мл с помощью буфера для анализа, содержащего одну часть разбавителя 2 (MSD, кат. № R51-BB-3) и тридцать девять частей разбавителя 3 (MSD, кат. № R51BA-3) с добавлением 200 мкг/мл HBR1 (Scantibodies Inc, кат. № ЗКС533) и 10 мкг/мл биотин-иллюстративное антитело А. Стандартную калибровочную кривую получали трехкратным серийным разведением калибровочного раствора 1000 пг/мл с помощью буфера для анализа. Образцы плазмы разводил в 40 раз в разбавителе 3 с добавлением 200 мкг/мл

HBR1 и 10 мкг/мл биотин-иллюстративное антитело А. 25 мкл различных концентраций образцов калибровочного раствора и разведенной плазмы добавляли в отдельные лунки плашки для анализа и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч с вращением 650 об/мин. После промывки плашки 3 раза 200 мкл/лунка ФСБТ, в каждую лунку добавляли 25 мкл 0,5 мкг/мл меченого сульфо-тэгом козьего античеловеческого IgG (MSD, кат. № R32AJ-1) в разбавителе 3, и плашку инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем плашки трижды промывали 200 мкл/лунка ФСБТ и 150 мкл 2X буфера считывания Т (MSD, кат. № R92TC-3) добавляли в каждую лунку, сигнал считывали с помощью прибора считывания плашек MSD (результаты представлены как обнаруживаемые уровни PACAP38, среднее \pm СОС (n = 2-3)). Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Антитело	Уровни PACAP38 в плазме (нг/мл) в контрольные моменты времени после инъекции PACAP38 (среднее значение \pm СОС (N))					
	исходная точка	5 мин.	30 мин.	60 мин.	90 мин.	120 мин.
Иллюстративное Ат А	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)
Контрольное Ат IgG4	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)

Результаты, представленные в табл. 3, демонстрируют то, что иллюстративное антитело А предотвращает распространение PACAP38 при внутривенной инъекции, но не предотвращает разрушение PACAP38 *in vivo*.

Пример 4. Ингибирование PACAP27, PACAP38 или VIP-индуцированного цАМФ.

Нейтрализацию PACAP27, PACAP38 и VIP-индуцированную стимуляцию цАМФ антителами согласно данному изобретению оценивали в клетках CHO-K1 (ATCC, кат. № CCL-61), трансфицированных векторами, экспрессирующими либо PAC 1 человека (NP001186564.1), либо VPAC2 человека (NP_003373.2). Клетки CHO-K1 собирали с помощью неферментного буфера диссоциации клеток (Gibco, кат. № 313131-014), подсчитывали, центрифугировали и ресуспендировали в буфере для анализа до 10000 клеток/25 мкл. Концентрированные клетки (10000 в 25 мкл) добавляли в лунки 96-луночной плашки.

Иллюстративные антитела (указанные в табл. 1) серийно разводили в 100 мкл буфера для анализа (HBSS с кальцием и магнием (Hyclone, ThermoScientific, SH30268), 0,1% БСА (Sigma-Aldrich, кат. № A7888), 500 мкМ IBMX (Sigma-Aldrich) (I5879)), до 4-кратной желаемой конечной концентрации. Разведенные иллюстративные антитела инкубировали с агонистом (при 2-кратной конечной концентрации) в течение 15 мин при комнатной температуре. Конечные концентрации агониста: 100 пМ для PACAP27 и PACAP38 в анализах с PAC1 человека, 800 пМ PACAP27 и PACAP38 с VPAC2 человека, 800 пМ VIP с VPAC2 человека. После этого 25 мкл раствора иллюстративное антитело-агонист добавляли в отдельные лунки 96-луночной плашки (содержащей клетки) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Образование цАМФ в каждой лунке определяли с использованием цАМФ фемто 2 (сAMP femto 2) (Cisbio, 62AM5PEC). 25 мкл рабочего раствора цАМФ-d2 (Cisbio, 62AM5PEC) добавляли в каждую лунку с последующим добавлением 25 мкл рабочего раствора анти-цАМФ-криптата и плашку инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Результирующий сигнал HTRF измеряли при 665 и 620 нм с использованием прибора Envision 12 (Perkin Elmer, возбуждение 330 нм) и отношение 665/620 наносили на график для количественного определения цАМФ (график по данным строили с использованием Graphpad Prism 7, а значения IC₅₀ определяли с использованием интегрированной процедуры подгонки четырехпараметрической модели логистической кривой). Результаты представлены в табл. 4 как среднее \pm СОС.

Нейтрализация *in vitro* индуцированного PACAP27 и PACAP38 увеличения цАМФ

Антитело	Ингибирование (IC50) (пМ, среднее ± СОС (N))				
	PACAP38 (100 пМ) в hPAC1	PACAP27 (100 пМ) в hPAC1	PACAP38 (800 пМ) в hVPAC2	PACAP27 (800 пМ) в hVPAC2	VIP (800 пМ) в hVPAC2
Иллюстративное Ат А	554 ± 264 (N=2)	2250 (N=1)	714 ± 194 (N=6)	781 ± 340 (N=2)	>100,000 (N=1)
Иллюстративное Ат В	265 ± 62 (N=3)	270 ± 103 (N=2)	294 ± 60 (N=3)	605 ± 135 (N=2)	>100,000 (N=1)
Иллюстративное Ат С	303 ± 15 (N=3)	311 ± 29 (N=2)	325 ± 99 (N=3)	595 ± 219 (N=2)	>100,000 (N=1)
Иллюстративное Ат D	205 ± 35 (N=3)	212 ± 42 (N=2)	243 ± 112 (N=3)	515 ± 127 (N=2)	>100,000 (N=1)

Пример 5. Анализ иммуногенности.

Оценка иммуногенности *in silico* выполняется с помощью программного обеспечения EpiMatrix для прогнозирования эпитопов Т-лимфоцитов (на веб-портале Интерактивного скрининга и Реинжиниринга белка (ISPRI) (EpiVax, Inc.)), включая скорректированные по Tregitope показатели EpiMatrix. Белковые последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) и варибельной области тяжелой цепи (HCVR), связанные с каждым антителом, анализируют отдельно. Согласно EpiVax, белковые последовательности с показателями EpiMatrix, скорректированными по Tregitope, больше нуля, имеют более высокий общий иммуногенный потенциал. Оценка EpiMatrix кластеров иммуногенности также проводится для каждой LCVR и HCVR, чтобы идентифицировать кластеры эпитопов Т-лимфоцитов в пределах CDR каждого антитела. Наличие кластеров эпитопов Т-лимфоцитов, что определяется наличием 2 или большего количества смежных EpiBars, связано с более высоким общим иммуногенным потенциалом. Используя определение CDR Нофа, в иллюстративных антителах А, В или С не идентифицированы ассоциированные с CDR кластеры эпитопов Т-лимфоцитов. Эпитопный кластер Т-лимфоцита из 4 смежных EpiBars идентифицирован в CDR2 LCVR сравниваемого антитела ALD 1.H (описано как Ab 1.H в публикации патента США № 2016/0304604), что указывает на то, что сравниваемое антитело имеет более высокий иммуногенный потенциал. Результаты представлены в табл. 5А, 5В и 5С.

Таблица 5А

Оценка риска иммуногенности *in silico* с помощью предсказания EpiMatrix эпитопа Т-лимфоцитов

Антитело	Балл EpiMatrix		
	HCVR	LCVR	HCVR+LCVR
Иллюстративное Ат А	58,84	19,44	40,61
Иллюстративное Ат В	65,12	26,41	47,21
Иллюстративное Ат С	58,74	26,41	43,79
Иллюстративное Ат D	65,49	26,41	47,41
ALD 1.H	70,11	35,2	53,16

Скорректированная по Tregitope оценка EpiMatrix

Антитело	Скорректированная по Tregitope Оценка EpiMatrix		
	HCVR	LCVR	HCVR+LCVR
Иллюстративное Ат А	-32,82	-34,22	-33,46
Иллюстративное Ат В	-26,54	-27,24	-26,86
Иллюстративное Ат С	-32,92	-27,24	-30,29
Иллюстративное Ат D	-26,17	-27,24	-26,67
ALD 1.H	-28,41	1,41	-13,93

Таблица 5С

Оценка риска иммуногенности in silico с помощью оценивания EpiMatrix кластеров иммуногенности

Антитело	Связанные с CDR кластеры
	EpiBar
Иллюстративное Ат А	0
Иллюстративное Ат В	0
Иллюстративное Ат С	0
Иллюстративное Ат D	0
ALD 1.H	1

Пример 6. Нейтрализация дегрануляции тучных клеток, вызванной высвобождением PASCAP.

Тучные клетки человека дифференцируют в культуре из стволовых клеток пуповинной крови человека с использованием StemSpan Media (StemCell) и ФСК(фактор стволовых клеток)/ИЛ-6. В день анализа тучные клетки высевают в количестве 100000 клеток/50 мкл/лунка в 96-луночную плашку для культивирования ткани в буфере Тайрода (130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,4 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 5,6 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES и 0,1% БСА, pH 7,4). Клетки обрабатывают PASCAP38 или PASCAP27 в присутствии или в отсутствие иллюстративного антитела, как описано ниже.

Определения по одному параметру выполняют путем добавления 25 мкл 4X-концентрированного иллюстративного антитела/лунка (конечная концентрация 153 мкМ иллюстративного антитела). Анализы зависимости от дозы проводят путем добавления 25 мкл 4X-концентрированного антитела/лунка для конечного диапазона доз от 0 до 153 мкМ (трехкратные разведения). 25 мкл 4X-концентрированного PASCAP38 или PASCAP27 добавляют в каждую лунку до конечной концентрации 1 мкМ PASCAP (38 или 27). Только среда для анализа используется в качестве контроля без обработки, а mAt IgG4 используется в качестве отрицательного контроля. Анализ проводится три раза. 96-луночные плашки помещают в инкубатор (37°C) на 30 мин. После инкубации собирают 30 мкл/лунка супернатанта и измеряют активность триптазы с помощью коммерческого анализа (Millipore). Процент (%) высвобождения триптазы в супернатанте рассчитывают по следующему уравнению:

$$\frac{\text{((экспериментальное высвобождение триптазы - высвобождение триптазы контрольного переносчика))}}{\text{(общее высвобождение триптазы - высвобождение триптазы контрольного переносчика)}} \times 100,$$
где общее высвобождение триптазы получают путем замораживания/оттаивания тучных клеток). Результаты представлены в табл. 6А, 6В и 6С.

Таблица 6А

Ингибирование для одного параметра индуцированного РАСАР (27 и 38) высвобождения триптазы в тучных клетках человека

Антитело	Процент высвобождения триптазы при добавлении РАСАР38 или 27 (%)	
	РАСАР38	РАСАР27
Иллюстративное Ат В	4,9 ± 1,1	21 ± 1,4
Иллюстративное Ат С	5,5 ± 1,4	14,2 ± 1,1
Иллюстративное Ат D	4,2 ± 0,7	15,1 ± 4,0
Анализ только культур. среды	-0,3 ± 0,3	-0,3 ± 0,3
мАт IgG4	103,6 ± 0,5	109,7 ± 0,4

Таблица 6В

Зависимость ингибирования от дозы индуцированного РАСАР27 высвобождения триптазы в тучных клетках человека

Антитело	Доза (мкМ)	Процент высвобождения триптазы при добавлении РАСАР27 (%)
Иллюстративное Ат В	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
Иллюстративное Ат С	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
Иллюстративное Ат 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
Анализ только культур. среды		-0,2 ± 1,0
мАт IgG4	153	94,8 ± 4,8

Зависимость ингибирования от дозы индуцированного РАСАР38 высвобождения триптазы в тучных клетках человека

Антитело	Доза (мкМ)	Процент высвобождения триптазы при добавлении РАСАР38 (%)
Иллюстративное Ат В	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
Иллюстративное Ат С	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
Иллюстративное Ат D	153	1,7 ± 0,1
	51	14,7 ± 1,5
	17	19,6 ± 3,6
	5,6	25,9 ± 6,2
	1,8	31,3 ± 3,8
	0,6	64,5 ± 4,1
	0,2	74,0 ± 1,8
	0	76,5 ± 0,7
Анализ только культур. среды		-0,2 ± 1,0
мАт IgG4	153	79,6 ± 4,1

Пример 7. In vivo РАСАР-индуцированная нейтрализация цАМФ.

Нейтрализацию РАСАР-индуцированного повышения цАМФ в плазме in vivo оценивали на мышинной модели CD-1 (Envigo). Вкратце, самцам мышей CD-1 подкожно вводили 10 мг/кг одного из контрольного антитела IgG4 (N=6); контрольного антитела IgG4 плюс только ФСБ/ролипрам (N=5); иллюстративного антитела В (N=5); иллюстративного антитела С (N=5) или иллюстративного антитела D (N=6). Через три дня после обработки антителами мышам внутривенно вводили РАСАР38 (13 нмоль/кг) плюс ролипрам (100 мкг/мл); некоторым мышам, ранее обработанным контрольным антителом IgG4, внутривенно вводили только ФСБ (содержащий 0,2% этанол, 1% БСА, 5 мл/кг и ролипрам (100 мкг/мл)). Через 10 мин после обработки РАСАР38 кровь собирали в пробирки, содержащие ЭДТК, и плазму отделяли центрифугированием. Уровни цАМФ в плазме определяли с использованием коммерчески доступного цАМФ-ИФА (Cell Bios, Inc.) в соответствии с инструкциями производителя. В статистическом анализе применяют логарифм-трансформированную концентрацию цАМФ в однофакторном дисперсионном анализе (Graphpad Prism 7) с последующим вторичным анализом Даннетта. Результаты представлены в табл. 7 как среднее ± СО.

РАСАР-индуцированные уровни цАМФ в плазме

Антитело	Уровни цАМФ в плазме (нМ, среднее ± СОС)
Контрольное Ат IgG4 (плюс только ФСБ/ролипрам)	238 ± 60 (N=5) *
Контрольное Ат IgG4 (плюс РАСАР)	4095 ± 318 (N=6)
Иллюстративное Ат В (плюс РАСАР)	715 ± 60 (N=5) *
Иллюстративное Ат С (плюс РАСАР)	666 ± 96 (N=5) *
Иллюстративное Ат D (плюс РАСАР)	560 ± 130 (N=6) *

* $p < 0,0001$ в сравнение с контрольным Ат IgG4 (РАСАР38).

Пример 8. Нейтрализация индуцированного стимуляцией полулунного узла пропотевания белка плазмы в твердой оболочке мозга *in vivo*.

Способность анти-РАСАР антител согласно данному изобретению блокировать *in vivo* пропотевание белков плазмы, индуцированное высвобождением РАСАР после стимуляции полулунного узла, исследовали на крысиной модели. Вкратце, крысам Спрейг-Доули (Envigo, самцы, 250-350 г) подкожно вводят одно из 1-10 мг/кг иллюстративного антитела А; 3-30 мг/кг иллюстративного антитела В или 3 или 10 мг/кг контрольного Ат IgG4. 72 ч спустя крыс анестезируют нембуталом (65 мг/кг, внутривенно) и помещают в стереотаксическую рамку (David Kopf Instruments) с панелью резцов, установленной на -2,5 мм. Делают срединный сагитальный разрез черепа, после чего в черепе просверливают две пары двусторонних отверстий (3,2 мм сзади, 1,8 и 3,8 мм сбоку, все координаты относительно брегмы). Пары стимулирующих электродов из нержавеющей стали (Rhodes Medical Systems, Inc.) опускают через отверстия в обоих полушариях на глубину 9,2 мм от твердой мозговой оболочки. За две минуты до стимуляции полулунного узла в бедренную вену вводят меченный флуоресцеин-изотиоцианатом бычий сывороточный альбумин (FITC-БСА) (20 мг/кг, внутривенно) - маркера пропотевания белка. Левый полулунный узел стимулируют в течение 5 мин при силе тока 1,0 мА (5 Гц, длительность импульса 5 мс) с помощью устройства для стимуляции Model S48 Grass с блоком фотоэлектрической развязки PSIU6 (Grass-Telefactor). Через 5 мин после стимуляции крыс умерщвляют путем обескровливания с помощью 40 мл физиологического раствора.

После умерщвления крыс верхнюю часть черепа удаляют и собирают твердую оболочку. Образцы оболочки изымают из обоих полушарий, промывают водой и разравнивают на предметных стеклах. Предметные стекла сушат в течение 15 мин на нагревателе предметных стекол и ткани покрывают 70% раствором глицерина/воды. Флуоресцентный микроскоп (Zeiss), снабженный дифракционным монохроматором и спектрофотометром, используют для количественного определения красителя FITC-БСА в каждом образце твердой оболочки мозга. Пропотевание, вызванное электрической стимуляцией полулунного узла, является ипсилатеральным эффектом (т.е. происходит только на той стороне твердой оболочки мозга, на которой стимулируют полулунный узел), что позволяет нестимулированной половине твердой мозговой оболочки служить в качестве контроля. Рассчитывают соотношение пропотевания в твердой оболочке мозга с стимулированной стороны по отношению к нестимулированной. Результаты представлены в табл. 8 (среднее ± СО).

Пропотевание белка плазмы в твердой оболочке мозга, вызванное стимуляцией полулунного узла

Антитело (мг/кг)	<u>Коэффициент пропотевания</u> (среднее ± СОС)
Контрольное Ат IgG4 (10 мг/кг) (N=3)	1,87 ± 0,04
Иллюстративное Ат А (1 мг/кг) (N=3)	1,93 ± 0,04
Иллюстративное Ат А (3 мг/кг) (N=3)	1,59 ± 0,07
Иллюстративное Ат А (10 мг/кг) (N=3)	1,13 ± 0,05
Контрольное Ат IgG4 (3 мг/кг) (N=3)	1,82 ± 0,02
Контрольное Ат IgG4 (10 мг/кг) (N=3)	1,90 ± 0,04
Контрольное Ат IgG4 (30 мг/кг) (N=3)	1,95 ± 0,05
Иллюстративное Ат В (3 мг/кг) (N=3)	1,83 ± 0,06
Иллюстративное Ат В (10 мг/кг) (N=3)	1,21 ± 0,06
Иллюстративное Ат В (30 мг/кг) (N=3)	1,07 ± 0,04

Пример 9. Фармакокинетика иллюстративных анти-РАСАР антител.

Определяли фармакокинетику в сыворотке иллюстративных антител согласно данному изобретению у самцов яванского макака (n=2) после однократного п-кож. введения с помощью анализа общего IgG. Животным подкожно вводили иллюстративное антитело В (10 мг/кг) и образцы сыворотки собирали через 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 336, 504 и 672 ч после инъекции. Анализ общего IgG проводили в целом, как описано в данном документе. Вкратце, 100 мкл/лунка 1 мкг/мл козьего анти-человеческий IgG F(ab')₂ антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., кат. № 109-006-097) наносили на плашку Immulon 4НВХ. Лунки инкубировали с одним из стандартов (стандартную кривую для иллюстративного антитела В получали из 15,63-1000 нг/мл), контрольными или сывороточными образцами и затем с 100 мкл/лунка разведенного 1:10000 мышинным анти-IgG человека Fc-пероксидазы хрена (HRP; SouthernBiotech, кат. № 9040-05) для обнаружения. Не связавшийся реагент для обнаружения смывали. После этого в лунки добавляли 100 мкл/лунка TMB Microwell Peroxidase Substrate System. Развитие цвета останавливали добавлением 100 мкл/лунка раствора TMB Stop и оптическую плотность измеряли при 450 нм с коррекцией длины волны, установленной на 630 нм. Иммунореактивность определяли по известным количествам иллюстративного антитела В в 100% сыворотке яванских макаков, с последующим минимальным необходимым разведением 1:10 в казеине Blocker™ в ФСБ с использованием 5-параметрического алгоритма (StatLia; версия 3.2). Следуя процедурам, по существу, как описано выше, наблюдаемый клиренс (CL/F) 0,49 мл/ч/кг, наблюдаемый объем распределения (V/F) 114,0 мл/кг и конечный период полужизни, составляющий 171 ч, рассчитанный с помощью некомпартментного анализа, рассчитывали для иллюстративного антитела В. Полученные фармакокинетические результаты согласуются с терапевтическими антителами, способными к увеличенной продолжительности действия.

Последовательности

Иллюстративная HC (SEQ ID NO: 1)

```
EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAISLS
GGSTYYAXSHKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVREVGASXHN
YGMADVWQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPS
NTKVDKRVESKYGPPCPXCPAPEXXGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
```

где X в положении остатка 62 представляет собой одну из D, A, E и Q; X в положении остатка 104 представляет собой одну из N и T; X в положении остатка 231 представляет собой одну из P и S; X в положении остатка 237 представляет собой одну из A и F; и X в положении остатка 238 представляет собой одну из A и L.

Иллюстративная LC (SEQ ID NO: 2)

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIXRWLAWYQQKPGKAPKLLIHDA
SQLXEGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQFDLLPLTFGGG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC
```

где X в положении остатка 30 представляет собой одну из S и W; и X в положении остатка 55 представляет собой одну из L и F.

Иллюстративная HCDR1 (SEQ ID NO: 3)

AASGFTFSSYYMS

Иллюстративная HCDR2 (SEQ ID NO: 4)

AISLSGGSTYYAXSHKG

где X в положении остатка 13 представляет собой одну из D, A, E и Q.

Иллюстративная HCDR3 (SEQ ID NO: 5)

VREVGASXHNYYGMDV

где X в положении остатка 8 представляет собой одну из N и T.

Иллюстративная LCDR1 (SEQ ID NO: 6)

RASQSIXRWLA

где X в положении остатка 7 представляет собой одну из S и W.

Иллюстративная LCDR2 (SEQ ID NO: 7)

HDASQLXE

где X в положении остатка 7 представляет собой одну из L и F.

Иллюстративная LCDR3 (SEQ ID NO: 8)

QQFDLLPLT

Иллюстративная HCVR (SEQ ID NO: 9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAISLS
GGSTYYAXSHKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVREVGASXHNYY
YGMDEVWGQGMVTVSS

где X в положении остатка 62 представляет собой одну из D, A, E и Q; и X в положении остатка 104 представляет собой одну из N и T.

Иллюстративная LCVR (SEQ ID NO: 10)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIXRWLAWYQQKPGKAPKLLIHDSQLX
EGVPSRFSGSGSDTFTFTISSLPEDIATYYCQQFDLLPLTFGGGKVEIK

где X в положении остатка 30 представляет собой одну из S и W; и X в положении остатка 55 представляет собой одну из L и F.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая HC иллюстративного Ат В (SEQ ID NO: 11)

gagggtgcagctgtggagtctggggaggcttgtagcagcctgggggctcctgagactc
tctgtgcagcctctgattcaccttagc agctattacatgagctgggtccgccaggct
ccaggaaggggctggagtgggtctcagct attagtctgagtggtagcacatactac
gcagcgtcccacaagggccggtcaccatc tccagagacaattccaagaacacgctgtat
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggccgtatattactgttccgggaggtg
ggagctagcactcacaactactacggtatg gacgtctggggccaagggaccatggtcacc
gtctctcagcttctaccaagggcccatcg gtctcccgtagcgcctgctccaggagc
acctccgagagcacagccgccctgggctgc ctggtcaaggactactccccgaaccggtg
acggtgctgtggaactcaggcgcctgacc agcggcgtgcacacctcccggctgtccta
cagtcctcaggacttactccctcagcagc gtggtgacctgacctccagcagctgggc
acgaagacctacacctgcaacgtatgac aagcccagcaacaccaaggtggacaagaga
gttgagccaatatgttcccccatgccca cctgcccagcacctgaggccgcccggggga
ccatcagctctctgttcccccaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccct
gaggtcacgtgctggtgggtgacgtgagc caggaagaccccagggtccagttcaactgg
tacgtggatggcgtggaggtgcataatgcc aagacaagccgcccaggagcagttcaac
agcacgtaccgtgtgtcagcgtcctcacc gtctgcaccaggactggctgaacggcaag
gagtacaagtgaaggtctccaacaaggc ctcccgtcctccatcgagaaaacctctcc
aaagccaagggcagccccgagagccacag gtgtacacctgccccatcccaggaggag
atgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc ctggtcaaggcttctaccccagcgacatc
gcccgtggagtgggaagcaatgggagccg gagaacaactacaagaccacgctcccgtg
ctggactccgagcctcttctctctac agcaggctaaccgtggacaagagcaggtgg
caggagggaatgtcttctcatgctccgtg atgcatgaggctctgcacaaccactacaca
cagaagagcctctcccgtctctgggt

Нуклеотидная последовательность, кодирующая LC иллюстративного Ат В (SEQ ID NO: 12)

gacatccagatgaccagctctccatcctcc ctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
 atcacttgcggcgagtcagagtatttgg aggtgggtggcctggtatcagcagaaacca
 gggaaagcccctaagctcctgatccacgat gcatcccaattgtcgaaggggtcccatca
 aggttcagtggaagtggatctgggacagat ttactttaccatcagcagcctgcagcct
 gaagatattgcaacatattactgtcaacag ttgatttgctccctctcactttcggcgga
 gggaccaaggtggagatcaaacggaccgtg gctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca
 tctgatgagcagttgaaatctggaactgcc tctgttgtgtgcctgctgaataacttctat
 cccagagaggccaaagtacagtggaaggtg gataacgcctccaatcgggtaactccag
 gagagtgtcacagagcaggacagcaaggac agcacctacagcctcagcagcaccctgacg
 ctgagcaagcagactacgagaaacacaaa gtctacgcctgcgaagtaccatcagggc
 ctgagctcgccgtcacaaagagcttcaac
 aggggagagtg

Аминокислотная последовательность рекомбинантного PACAP 38 человека (SEQ ID NO: 13)

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK

где К в положении остатка 38 является пост-трансляционно модифицированной с помощью С-концевого амидирования.

Аминокислотная последовательность рекомбинантного PACAP 27 человека (SEQ ID NO: 14)

HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL

где L в положении остатка 27 является пост-трансляционно модифицированной с помощью С-концевого амидирования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с активирующим аденилатциклазу гипофиза пептидом человека и которое содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), причем указанная HCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и указанная LCVR содержит CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом аминокислотная последовательность HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 4, аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 5, аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 6, аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 7, и аминокислотная последовательность LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 8, причем

HCDR2 содержит аспарагиновую кислоту в положении остатка 13; HCDR3 содержит аспарагин в положении остатка 8; LCDR1 содержит серин в положении остатка 7; и LCDR2 содержит лейцин в положении остатка 7, или

HCDR2 содержит аланин в положении остатка 13; HCDR3 содержит треонин в положении остатка 8; LCDR1 содержит триптофан в положении остатка 7; и LCDR2 содержит фенилаланин в положении остатка 7, или

HCDR2 содержит глутаминовую кислоту в положении остатка 13; HCDR3 содержит треонин в положении остатка 8; LCDR1 содержит триптофан в положении остатка 7; и LCDR2 содержит фенилаланин в положении остатка 7, или

HCDR2 содержит глутамин в положении остатка 13; HCDR3 содержит треонин в положении остатка 8; LCDR1 содержит триптофан в положении остатка 7; и LCDR2 содержит фенилаланин в положении остатка 7.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что HCDR2 содержит аспарагиновую кислоту в положении остатка 13; HCDR3 содержит аспарагин в положении остатка 8; LCDR1 содержит серин в положении остатка 7; и LCDR2 содержит лейцин в положении остатка 7.

3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что HCDR2 содержит аланин в положении остатка 13; HCDR3 содержит треонин в положении остатка 8; LCDR1 содержит триптофан в положении остатка 7; и LCDR2 содержит фенилаланин в положении остатка 7.

4. Антитело по п.1, отличающееся тем, что HCDR2 содержит глутаминовую кислоту в положении остатка 13; HCDR3 содержит треонин в положении остатка 8; LCDR1 содержит триптофан в положении остатка 7; и LCDR2 содержит фенилаланин в положении остатка 7.

5. Антитело по п.1, отличающееся тем, что HCDR2 содержит глутамин в положении остатка 13; HCDR3 содержит треонин в положении остатка 8; LCDR1 содержит триптофан в положении остатка 7; и LCDR2 содержит фенилаланин в положении остатка 7.

6. Антитело по п.1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) и вариабельную область легкой цепи (LCVR), отличающееся тем, что аминокислотная последовательность указанной HCVR представляет собой SEQ ID NO: 9, и аминокислотная последовательность указанной LCVR представляет собой SEQ ID NO: 10.

7. Антитело по п.6, отличающееся тем, что HCVR содержит аспарагиновую кислоту в положении

остатка 62 и аспарагин в положении остатка 104, и отличающееся тем, что LCVR содержит серин в положении остатка 30 и лейцин в положении остатка 55.

8. Антитело по п.6, отличающееся тем, что HCVR содержит аланин в положении остатка 62 и треонин в положении остатка 104, и отличающееся тем, что LCVR содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55.

9. Антитело по п.6, отличающееся тем, что HCVR содержит глутаминовую кислоту в положении остатка 62 и треонин в положении остатка 104, и отличающееся тем, что LCVR содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55.

10. Антитело по п.6, отличающееся тем, что HCVR содержит глутамин в положении остатка 62 и треонин в положении остатка 104, и отличающееся тем, что LCVR содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55.

11. Антитело, которое связывается с активирующим аденилатциклазу гипофиза пептидом человека, содержащее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем аминокислотная последовательность указанной HC представляет собой SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность указанной LC представляет собой SEQ ID NO: 2; и причем

HC содержит аспарагиновую кислоту в положении остатка 62, аспарагин в положении остатка 104, пролин в положении остатка 231, аланин в положении остатка 237 и аланин в положении остатка 238, и LC содержит серин в положении остатка 30 и лейцин в положении остатка 55, или

HC содержит аланин в положении остатка 62, треонин в положении остатка 104, пролин в положении остатка 231, аланин в положении остатка 237 и аланин в положении остатка 238, и LC содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55, или

HC содержит глутаминовую кислоту в положении остатка 62, треонин в положении остатка 104, пролин в положении остатка 231, аланин в положении остатка 237 и аланин в положении остатка 238, и LC содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55, или

HC содержит глутамин в положении остатка 62, треонин в положении остатка 104, пролин в положении остатка 231, аланин в положении остатка 237 и аланин в положении остатка 238, и LC содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55.

12. Антитело по п.11, отличающееся тем, что HC содержит аспарагиновую кислоту в положении остатка 62, аспарагин в положении остатка 104, пролин в положении остатка 231, аланин в положении остатка 237 и аланин в положении остатка 238, и отличающееся тем, что LC содержит серин в положении остатка 30 и лейцин в положении остатка 55.

13. Антитело по п.11, отличающееся тем, что HC содержит аланин в положении остатка 62, треонин в положении остатка 104, пролин в положении остатка 231, аланин в положении остатка 237 и аланин в положении остатка 238, и отличающееся тем, что LC содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55.

14. Антитело по п.11, отличающееся тем, что HC содержит глутаминовую кислоту в положении остатка 62, треонин в положении остатка 104, пролин в положении остатка 231, аланин в положении остатка 237 и аланин в положении остатка 238, и отличающееся тем, что LC содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55.

15. Антитело по п.11, отличающееся тем, что HC содержит глутамин в положении остатка 62, треонин в положении остатка 104, пролин в положении остатка 231, аланин в положении остатка 237 и аланин в положении остатка 238, и отличающееся тем, что LC содержит триптофан в положении остатка 30 и фенилаланин в положении остатка 55.

16. Способ лечения одного из первичной головной боли, вторичной головной боли и мигрени, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела по любому из пп.1-15.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанная первичная головная боль представляет собой тригеминальную вегетативную цефалгию.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанная тригеминальная вегетативная цефалгия представляет собой одно из эпизодической кластерной головной боли, хронической кластерной головной боли, пароксизмальной гемикрании и приступа односторонней невралгической головной боли.

