



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0056644
(43) 공개일자 2024년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/24 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7012887(분할)
(22) 출원일자(국제) 2019년05월10일
심사청구일자 2024년04월18일
(62) 원출원 특허 10-2020-7029693
원출원일자(국제) 2019년05월10일
심사청구일자 2020년10월15일
(85) 번역문제출일자 2024년04월18일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2019/053895
(87) 국제공개번호 WO 2019/215702
국제공개일자 2019년11월14일
(30) 우선권주장
62/669,648 2018년05월10일 미국(US)
62/838,187 2019년04월24일 미국(US)

(71) 출원인
주식회사 뉴라클사이언스
서울특별시 성북구 안암로 145, 702-2 (안암동5가, 고려대학교자연계캠퍼스산학관)
(72) 발명자
김봉철
경기도 성남시 분당구 동판교로 155
김원경
서울특별시 동대문구 왕산로 86, 오피스텔동 825호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인추현

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 서열 유사성 19, 멤버 A5 항체를 갖는 항-패밀리 및 그의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 FAM19A5에 특이적으로 결합하는 항체 및 이러한 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 양상에서, 항체는 인간 대상에서 번역원성을 감소시키기 위해 탈면역화된다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 이러한 항체를 이용하여 FAM19A5 활성을 조절할 수 있고, 예를 들어 반응성 신경아교증 및/또는 반응성 성상세포의 과도한 증식을 억제, 저하, 감소 또는 역전시킬 수 있다.

본 발명은 또한 인간 FAM19A5에 특이적으로 결합하는 항체를 투여함으로써 중추신경계 손상, 퇴행성 뇌장애, 신경병성 통증 또는 암과 같은 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1a

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
1-65_VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFS	SYQMGWVRQAPGKGLEWVG	VINKSGSDTSY	
SS01-13_VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFS	SYQMGWVRQAPGKGLEWVG	VINKSGSDTSY	
SS01-13-S5_VH	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFTFS	SYQMGWVRQAPGKGLEWVS	AINKSGSDTSY	
S5-SG_VH	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFTFS	SYQMGWVRQAPGKGLEWVS	AINKGGSDTSY	
	*****	*	*****	..***.*****
	FR3	CDR3	FR4	
1-65_VH	GSAVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTGTYFCAK	GSASYITAATIDA	WGHGTEVIV	
SS01-13_VH	GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAK	GSASYITAATIDA	WGHGTEVIV	
SS01-13-S5_VH	GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAK	GSASYITAATIDA	WGHGTEVIV	
S5-SG_VH	GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAK	GSASYITAATIDA	WGHGTEVIV	
	*****	: **:*.*****.	*****	*****
1-65_VH	SS			
SS01-13_VH	SS			
SS01-13-S5_VH	SS			
S5-SG_VH	SS			
	**			

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

윤정원

세종특별자치시 달빛로 80, 1217동 402호

정준호

경기도 성남시 분당구 서현로 170, T동 1801호

진준영

경기도 과천시 별양로 12, 338동 1602호

유은희

서울특별시 동작구 여의대방로10가길 1, 303호

명세서

청구범위

청구항 1

서열 유사성 19, 멤버 A5(FAM19A5) 단백질을 갖는 인간 패밀리에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 부분("항-FAM19A5 항체")으로서,

상기 항-FAM19A5 항체는 CDMLPCLEGGCDLLINRSG의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 2의 아미노산 90 내지 109)의 FAM19A5 에피토프의 단편에 결합하며,

하기의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 기준 항체와 FAM19A5 에피토프와의 결합에서 교차-경쟁하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체:

(i) SEQ ID NO: 30에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL); 또는

(ii) SEQ ID NO: 31에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항-FAM19A5 항체는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 99 내지 107(즉, EGCDLLINR) 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 102, 103, 105 및 107(즉, DL-I-R) 에 상응하는 하나 이상의 아미노산에서 FAM19A5 에피토프 단편에 결합하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 항-FAM19A5 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, (i) 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iii) 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iv) 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (v) 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 14에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; 그리고 (vi) 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 항-FAM19A5 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, (i) 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iii) 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iv) 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (v) 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; 그리고 (vi) 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 항-FAM19A5 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, (i) 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iii) 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iv) 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (v) 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; 그리고 (vi) 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 6

제 3항 내지 제 5항 중 어느 하나에 있어서,

상기 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고, VH는 SEQ ID NO: 17, 30 또는 31에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및 VL은 SEQ ID NO: 18 또는 32에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 7

제 1항에 있어서,

항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 이의 변이체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 8

제 1항에 있어서,

키메라 항체, 인간 항체 또는 인간화된 항체인 항-FAM19A5 항체.

청구항 9

제 1항에 있어서,

Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 또는 단쇄 Fv(scFv)를 포함하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 10

제 9항에 있어서,

scFv인 항-FAM19A5 항체.

청구항 11

제 10항에 있어서,

scFv는 VH 및 VL을 포함하고, VH는 SEQ ID NO: 17, 30 또는 31에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 VL은 SEQ ID NO: 18 또는 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 12

제 1항에 있어서,

다음 특성 중 1 이상을 나타내는 항-FAM19A5 항체:

- (a) 효소-결합 면역흡착분석(ELISA)에 의해 측정될 때 10 nM 이하의 KD를 갖는 가용성 인간 FAM19A5에 결합하고;
- (b) ELISA에 의해 측정될 때 10 nM 이하의 KD를 갖는 막 결합된 인간 FAM19A5에 결합하고;
- (c) 반응성 신경아교증의 발병을 감소, 역전, 지연 또는 예방하고;
- (d) 반응성 성상세포의 과도한 증식을 억제하고;
- (e) 뉴로칸 및 뉴런-아교 항원 2(NG2)를 포함하는 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 발현을 감소시키고;
- (f) 뉴런의 핵에서 c-fos 및 pERK의 발현을 증가시키고;
- (g) 뉴런의 생존을 촉진하고;
- (h) 뉴런에서 GAP43의 발현을 증가시키고;
- (i) 축삭의 재성장을 촉진하고;

- (j) 종양의 성장을 억제하고;
- (k) 면역세포의 종양으로의 침윤을 향상시키고;
- (l) 뉴런 세포의 종양으로의 침윤을 향상시키고;
- (m) 대식세포 또는 미세아교세포의 포식작용을 향상시키고;
- (n) 대식세포 또는 미세아교세포의 미토콘드리아 막 전위를 증가시키고;
- (o) 골수-유래 억제세포(MDSC)의 종양으로의 보충을 감소시키고;
- (p) 종양에서 괴사 및 부종을 감소시키고;
- (q) 종양의 조직 투과성을 감소시키고; 및
- (r) 종양에서 혈류량을 증가시킴.

청구항 13

제 1항의 항-FAM19A5 항체를 암호화하는 핵산.

청구항 14

제 1항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 15

제 14항의 벡터를 포함하는 단리된 세포.

청구항 16

제제에 연결된 제 1항의 항-FAM19A5 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 17

적합한 조건 하에서 제 15항의 세포를 배양하고 항체를 단리하는 단계를 포함하는, 인간 FAM19A5 단백질에 특이적으로 결합하는 항-FAM19A5 항체의 제조방법.

청구항 18

제 1항에 있어서,

필요로 하는 대상에서 질환 또는 병태를 치료하기 위한 항-FAM19A5 항체.

청구항 19

제 18항에 있어서,

질환 또는 병태가 종양, 섬유증, 녹내장, 기분 장애, 신경퇴행성 질환, 뇌졸중 또는 신경병성 통증을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 20

제 19항에 있어서,

질병 또는 병태가 종양인 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 21

제 20항에 있어서,

종양이 흑색종, 췌장암, 신경아교종, 유방암, 림프종, 폐암, 신장암, 전립선암, 섬유육종, 결장 선암종, 간암 또는 난소암을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 22

제 21항에 있어서,
신경아교종이 다형성 교모세포종(GBM)인 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 23

제 18항에 있어서,
항체가 혈관의 정상화를 유도하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 24

제 23항에 있어서,
혈관의 정상화는 증가된 연결성, 증가된 벽 두께, 감소된 혈관 직경, 보다 규칙적인 혈관 방향 및 분포 패턴, 증가된 혈관 수, 누출 및 투과성 감소, 혈관에서의 증가된 혈관주위세포 적용범위 및 근접성, 증가된 산소화 또는 이들의 조합을 포함하는 혈관의 특성 변화를 수반하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 25

제 20항에 있어서,
항체가 종양의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 26

제 20항에 있어서,
항체가 면역세포의 종양으로의 침윤을 향상시키는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 27

제 26항에 있어서,
면역세포가 대식세포, 수지상 세포, T 림프구, B 림프구, 자연살해(NK) 세포, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 28

제 27항에 있어서,
면역세포가 비대를 추가로 나타내는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 29

제 26항에 있어서,
면역세포의 종양으로의 침윤 강화는 신경 세포의 종양으로의 침윤 증가를 동반하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 30

제 29항에 있어서,
신경 세포는 성상세포, 신경아교세포 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 31

제 20항에 있어서,
항체가 대식세포 또는 미세아교세포의 포식작용을 향상시키는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 32

제 20항에 있어서,

항체는 대식세포 또는 미세아교세포의 미토콘드리아 막 전위를 증가시키는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 33

제 20항에 있어서,

항체가 골수-유래 억제세포(MDSC)의 종양으로의 보충을 감소시키는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 34

제 20항에 있어서,

항체가 종양의 괴사 및 부종을 감소시키는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 35

제 20항에 있어서,

항체가 종양의 조직 투과성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 36

제 20항에 있어서,

항체가 종양의 혈류량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 37

제 18항에 있어서,

추가 치료제를 투여하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

청구항 38

제 37항에 있어서,

추가 치료제가 화학요법, 면역요법, 방사선요법 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-FAM19A5 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원과 함께 제출된 ASCII 텍스트 파일(파일명: 3763_011PC02_SeqListing_ST25.txt; 크기: 34,309 바이트; 및 생성일: 2019년 5월 10일)에 전자적으로 제출된 서열목록의 내용은 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0002] 본 발명은 서열 유사성 19, 멤버 A5(FAM19A5)를 갖는 패밀리에 특이적으로 결합하는 항체(예를 들어 탈면역화된), 이러한 항체를 포함하는 조성물, 및 중추신경계 손상으로 인한 것과 같은 장애 또는 질환을 예방 또는 치료하기 위해 대상에게 이러한 항체를 사용하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0003] FAM19A5는 5개의 고도로 상동성인 작은 단백질로 구성된 단백질의 TAFI 서브패밀리의 멤버이다. Tang T. Y. *et al.*, *Genomics* 83(4): 727-34 (2004). 이들 단백질은 고정된 위치에 보존된 시스테인 잔기를 함유하고, CC-케모카인 패밀리의 멤버인 대식세포 염증성 단백질 1-알파(MIP-1-알파)와 먼 관계에 있다. TAFI 단백질은 주로 뇌 및 척수의 특정 영역에서 발현된다. 이들 단백질은 신경발생 과정에서 성체 신경 줄기세포에 의해 생성되고 분비되는 것으로 여겨진다.

- [0005] [0004] FAM19A5는 척추동물의 뇌에서 주로 발견되며, FAM19A5는 완전한 중추신경계의 발달, 분화, 형성에 중요하며 중추신경계 손상 및/또는 질병의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 미국 특허공개 제 2015/0118230 호.
- [0006] [0005] FAM19A5를 억제하는 것은 중추신경계를 치료하는데 중요한 역할을 할 수 있으며, FAM19A5에 특이적으로 결합하고 FAM19A5 활성을 조절할 수 있는 항체를 개발할 필요가 여전히 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] [0006] 본 발명은 서열 유사성 19, 멤버 A5(FAM19A5) 단백질("항-FAM19A5 항체")을 갖는 인간 패밀리에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 여기서 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 SEQ ID NOs: 5, 6 및 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 이들 각각은 임의로 1, 2 또는 3개의 돌연변이를 갖고; 여기서 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 SEQ ID NOs: 8, 9 및 10의 아미노산 서열을 포함하고; 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 중 적어도 하나는 1, 2 또는 3개의 돌연변이를 포함하고; 그리고 여기서 항체는 SEQ ID NO: 11에 제시된 VH 및 SEQ ID NO: 12에 제시된 VL을 포함하는 기준 항체와 비교하여 인간에서 면역원성이 감소되었다. 일부 실시형태에서, 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열(GSASYITAATIDA)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5(SYQMG)에 제시된 아미노산 서열을 임의로 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 6에 제시된 아미노산 서열(VINKSGSDTS)을 임의로 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다.

과제의 해결 수단

- [0010] [0007] 일부 실시형태에서, 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열(GNDDYSSDSGYVGV)을 임의로 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다.
- [0011] [0008] 일부 실시형태에서, 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열(SGGGSSGYGYG)을 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 4에서 글리신이 지방족 아미노산에 치환된 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 지방족 아미노산은 알라닌, 발린, 류신 또는 이소류신을 포함한다.
- [0012] [0009] 일부 실시형태에서, 경쇄 CDR2는 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 SEQ ID NO: 9(WNDKRPS)에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 9의 아미노산 1에서 트립토판(Tryptophan)이 염기성 아미노산으로 치환된 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 염기성 아미노산은 아르기닌, 히스티딘 또는 리신을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 9의 아미노산 2에서 아스파라긴이 산성 아미노산으로 치환된 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 산성 아미노산은 아스파르트산 또는 글루탐산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 9의 아미노산 4에서 리신이 산성 아미노산으로 치환된 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 산성 아미노산은 아스파르트산 또는 글루탐산을 포함한다.
- [0013] [0010] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 중쇄(heavy chain) CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 경쇄(light chain) CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 여기서 (i) 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, (ii) 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, (iii) 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, (iv) 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, (v) 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 14에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 및 (vi) 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0014] [0011] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및/또는 여기서 VL은 SEQ ID NO: 12에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산

서열을 포함한다.

- [0015] [0012] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 기준 항체와 교차-경쟁하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 VL은 SEQ ID NO: 12에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 기준 항체와 교차-경쟁하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 30에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 VL은 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 기준 항체와 교차-경쟁하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 31에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 VL은 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 기준 항체와 교차-경쟁하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 31에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, VL은 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0016] [0013] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 이의 변이체 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 키메라 항체, 인간 항체 또는 인간화된 항체이다.
- [0017] [0014] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 또는 단쇄(single chain) Fv(scFv)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 scFv이다. 특정 실시형태에서, scFv는 VH 및 VL을 포함하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 17에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0018] [0015] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 다음 특성 중 1 이상을 나타낸다: (a) 효소-결합 면역흡착분석(ELISA)에 의해 측정될 때 10 nM 이하의 KD를 갖는 가용성 인간 FAM19A5에 결합하고; (b) ELISA에 의해 측정될 때 10 nM 이하의 KD를 갖는 막 결합된 인간 FAM19A5에 결합하고; (c) 반응성 신경아교증(gliosis)의 발병을 감소, 역전, 지연 및/또는 예방하고; (d) 반응성 성상세포(astrocytes)의 과도한 증식을 억제하고; (e) 뉴로칸(neurocan) 및 뉴런-아교(neuron-glia) 항원 2(NG2)를 포함하는 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 발현을 감소시키고; (f) 뉴런의 핵에서 c-fos 및 pERK의 발현을 증가시키고; (g) 뉴런의 생존을 촉진하고; (h) 뉴런에서 GAP43의 발현을 증가시키고; (i) 축삭(axon)의 재생을 촉진하고; (j) 예를 들어 종양에서 혈관의 정상화를 유도하고; (k) 종양의 성장을 억제하고; (l) 면역세포의 종양으로의 침윤(infiltration)을 향상시키고; (m) 뉴런 세포의 종양으로의 침윤을 향상시키고; (n) 대식세포 또는 미세아교세포(microglia)의 포식작용(phagocytic activity)을 향상시키고; (o) 대식세포 또는 미세아교세포의 미토콘드리아 막 전위를 증가시키고; (p) 골수-유래 억제세포(MDSC)의 종양으로의 보충(recruitment)을 감소시키고; (q) 종양에서 괴사(necrosis) 및 부종(edema)을 감소시키고; (r) 종양의 조직 투과성을 감소시키고; 및 (s) 종양에서 혈류량을 증가시킨다.
- [0019] [0016] 본 발명에서는 또한 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체, 핵산을 포함하는 벡터, 벡터를 포함하는 세포 및 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체를 포함하는 면역접합체(immunoconjugates)를 암호화하는 핵산이 제공된다. 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체를 포함하는 조성물 및 담체가 또한 본 명세서에 개시된다. 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 본 발명의 면역접합체를 포함하는 키트 및 사용 설명서를 제공한다.
- [0020] [0017] 본 발명은 또한 적합한 조건 하에서 본 명세서에 개시된 세포를 배양하고 항체를 분리하는 것을 포함하고, 인간 FAM19A5 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법을 또한 제공한다.
- [0021] [0018] 본 발명은 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체를 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상에서 질환 또는 병태(condition)를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시형태에서, 질환 또는 병태는 종양, 섬유증, 녹내장, 기분 장애, 신경퇴행성 질환(예를 들어, 알츠하이머병), 뇌졸중 또는 신경병성 통증을 포함한다. 특정 실시형태에서, 질환 또는 병태는 종양이다.
- [0022] [0019] 일부 실시형태에서, 종양은 흑색종(melanoma), 췌장암, 신경아교종(glioma), 유방암, 림프종, 폐암, 신장암, 전립선암, 섬유육종(fibrosarcoma), 결장 선암증(colon adenocarcinoma), 간암 또는 난소암을 포함한다. 특정 실시형태에서, 신경아교종은 다형성 교모세포종(GBM)이다.
- [0023] [0020] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 혈관의 정상화를 유도한다. 특정 실시형태에서, 혈관의 정상화는 증가된 연결성, 증가된 벽 두께, 감소된 혈관 직경,

보다 규칙적인 혈관 방향 및 분포 패턴, 증가된 혈관 수, 누출 및 투과성 감소, 혈관에서의 혈관주위세포 적용 범위(pericyte coverage) 및 근접성 증가, 산소화 증가 또는 이들의 조합을 포함하는 혈관의 특성 변화를 동반한다.

- [0024] [0021] 일부 실시형태에서, 본 명세서의 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 종양의 성장을 억제한다.
- [0025] [0022] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 면역세포의 종양으로의 침윤을 향상시킨다. 특정 실시형태에서, 면역세포는 대식세포, 수지상(dendritic) 세포, T 림프구, B 림프구, 자연살해(NK) 세포 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역세포는 비대(hypertrophy)를 추가로 나타낸다. 일부 실시형태에서, 종양으로의 면역세포의 강화된 침윤은 종양으로의 뉴런 세포의 침윤 증가를 동반한다. 특정 실시형태에서, 뉴런 세포는 성상세포, 신경아교세포(glia cell) 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0026] [0023] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 대식세포 또는 미세아교세포의 포식작용을 향상시킨다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 대식세포 또는 미세아교세포의 미토콘드리아 막 전위를 증가시킨다.
- [0027] [0024] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 골수-유래 억제세포(MDSC)의 종양으로의 보충(recruitment)을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 종양의 괴사 및 부종을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 종양의 조직 투과성을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체, 핵산, 벡터, 세포 또는 면역접합체는 종양에서 혈류 속도를 증가시킨다.
- [0028] [0025] 일부 실시형태에서, 질환 또는 장애를 치료하는 방법은 추가의 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 치료방법은 화학 요법, 면역 요법, 방사선 요법 또는 이들의 조합을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0030] [0026] 도 1a 및 1b는 하기 탈면역화된 1-65 항체에 대한 1-65 항체의 중쇄 가변영역(도 1a) 및 경쇄 가변영역(도 1b)의 서열 정렬을 제공한다: (i) SS01-13; (ii) SS01-13-s5; 및 (iii) S5-SG(본 명세서에서 S5-2.GKNG 항체 또는 1-65-S53G 항체로도 기술됨). 중쇄 및 경쇄 CDR 및 FR은 도 1a 및 1b 모두에 표시되어 있다.
- [0027] 도 2는 1-65 항체의 경쇄 가변영역(VL)(상위 3줄) 및 중쇄 가변영역(VH)(하위 3줄)의 잠재적 면역원성 부위를 확인한다. VL은 SEQ ID NO: 12에 해당하고, VH는 SEQ ID NO: 11에 해당한다. 1-65 항체의 프레임워크 영역에 사용된 인간 점라인(germline)에 대한 서열이 또한 제시되어 있다: VL = 면역글로불린 램다 가변 3-25(IGLV3-25*02) 및 면역글로불린 램다 결합 2(IGLJ2*01); VH = 면역글로불린 중쇄 가변 3-23(IGHV3-23*02) 및 면역글로불린 중쇄 결합 1(IGHJ1*01). 사용된 인간 점라인은 1-65 클론에 대해 가장 상동적인 인간 점라인(IgBLAST, NCBI)이었다. ITOPE™ 분석에 의해 결정된 바와 같이, 높고 중간 정도의 면역원성 잠재력을 갖는 무차별(promiscuous) MHC 클래스 II 결합 펩티드가 제시되어 있다. 구체적으로, 높은 면역원성 잠재력을 갖는 MHCII 결합 펩티드는 다음과 같다: (i) 펩티드 #2: SEQ ID NO: 12의 잔기 46-54(IYWDKRPS), (ii) 펩티드 #8: SEQ ID NOs: 48-56의 잔기: 11(VGVINKSGS), (iii) 펩티드 #10: SEQ ID NO: 11의 잔기 79-87(VRLQLNNLR); 및 (iv) 펩티드 #13: SEQ ID NO: 11의 잔기 103-111(YITAATIDA). 적당한 면역원성 잠재력을 갖는 MHCII 결합성 펩티드는 다음과 같다: (i) 펩티드 #1: SEQ ID NO: 12의 잔기 16-24(VKITCSGGG); (ii) 펩티드 #3: SEQ ID NO: 12의 잔기 71-79(LTITGVQAE); (iii) 펩티드 #4: SEQ ID NO: 11의 잔기 18-26(LSLVCKASG); (iv) 펩티드 #5: SEQ ID NO: 11의 잔기 20-28(LVCKASGFT); (v) 펩티드 #6: SEQ ID NO: 11의 잔기 32-40(YQMGWVRQA); (vi) 펩티드 #7: SEQ ID NO: 11의 잔기 45-53(LEWVGIVNK); (vii) 펩티드 #9: SEQ ID NO: 11의 잔기 64-72(VKGRATISR); (viii) 펩티드 #11: SEQ ID NO: 11의 잔기 81-87(LQLNNLR); (ix) 펩티드 #12: SEQ ID NO: 11의 잔기 86-94(LRAEDTGTY). T 세포 에피토프 데이터베이스로부터의 상동성 펩티드는 다음과 같다: 펩티드 #5, 펩티드 #6, 펩티드 #9 및 펩티드 #12. 총 13개의 결합 펩티드가 확인되었으며, 이는 펩티드 #1-#13으로 표시된다. 각각의 결합 펩티드에 대한 "P1"은 제1 앵커 위치를 나타낸다.
- [0028] 도 3a 및 3b는 탈면역화된 1-65 항체의 결합 분석을 제공한다. 항체를 탈면역화시키기 위해, 클론 1-65의 MHC 클래스 II 결합 영역에서 동일하지 않은 아미노산 잔기는 인간 점라인 서열에서 상응하는 아미노산으

로 치환되었다. 도 3a는 다음 중 경쇄 가변영역(VL) 및 중쇄 가변영역(VH)의 서열 비교를 제공한다: (i) 정상 1-65 항체("클론 1-65"), (ii) 완전히 탈면역화된 1-65 항체("완전 탈면역화된 클론 1-65"), 및 (iii) 2개의 아미노산(잔기 23(FR1 영역) 및 잔기 54(HCDR2 영역) 및 VH(SEQ ID NO: 11)의 잔기 54(HCDR2 영역)를 제외하고 탈면역화된 것("탈면역화된 클론 3-2"). "탈면역화된 클론 3-2" 항체는 또한 본 명세서에서 "SS01-13-s5" 항체로서 기술된다(예를 들어, 도 1a 및 1b 참조). ITOPE™ 분석에 의해 결정된 바와 같이, 높고 중간 정도의 면역원성 잠재력을 갖는 아미노산 잔기는 박스로 표시되고 각각 "1" 및 "2"로 표시된다. 도 3b는 (i) 정상 1-65 항체, (ii) 완전히 탈면역화된 1-65 항체, 및 (iii) ELISA에 의해 측정된 바와 같이, FAM19A5 단백질에 대한 중쇄 CDR2 항체를 갖는 하나의 아미노산을 제외하고 탈면역화된("탈면역화된 클론-1-65") 것의 결합 비교를 나타낸다. 파지를 표시하는 각각의 단쇄 가변 단편(scFv)을 FAM19A5(■) 또는 항-HA 항체(□)로 코팅된 미량정량(microtiter) 플레이트의 웰에 첨가하였다. BSA로 코팅된 대조 웰에서 배경신호를 측정하였다. 웰을 HRP-공액 결합된(conjugated) 항-M13 항체로 조사(probe)하였다. 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 결과는 4회 수행된 실험으로부터 획득된 평균±SD로 표시된다.

[0029] 도 4a, 4b, 4c, 및 4d는 하기와 같이 2개의 상이한 탈면역화된 1-65 항체의 분석을 제공한다: (i) 도 3a 및 3b에 나타난 것과 동일한 탈면역화된 항체인 "탈면역화된 클론 1-65"; 및 (ii) HCDR2에서 잠재적인 N-글리코실화 부위를 제거하도록 변형된 것을 제외하고는 "탈면역화된 클론 1-65"와 동일한 "탈면역화된 클론 S5-SG"("S5-SG")(HCDR2의 아미노산 5에서 S 내지 G(즉, SEQ ID NO: 11의 잔기 54), "*"로 식별됨). 도 4a 및 4b는 SDS-PAGE를 사용하여 측정된 항체의 크기 및 발현 수준을 나타낸다. 도 4a에서, 레인 "1" 및 "2"는 각각 항체 SS01-13-S5 및 S5-SG에 상응한다. 레인 "1" 및 "2" 내에서, "A" 및 "B"는 각각 원심분리 전 및 원심분리 후에 상응한다. 도 4b에서, 좌측 패널은 감소하는 SDS-PAGE를 나타내고, 우측 패널은 비-감소 SDS-PAGE를 나타낸다. 도 4c는 항체의 경쇄 가변영역(VL) 및 중쇄 가변영역(VH)의 서열 비교를 제공한다. 도 4d는 (i) 정상 1-65 항체("클론 1-65"), (ii) 탈면역화된 1-65 항체(본 발명에서 SS01-13-S5 항체로도 기술됨) 및 (iii) ELISA에 의해 측정된 바와 같이, FAM19A5 단백질에 대한 탈면역화된 클론 S5-SG 항체의 결합 비교를 나타낸다. 파지를 나타내는 각 단쇄 가변 단편(scFv)을 FAM19A5(■) 또는 항-HA 항체(□)로 코팅된 미량정량 플레이트의 웰에 첨가하였다. BSA로 코팅된 대조 웰에서 배경신호를 측정하였다. 웰은 HRP-공액결합된 항-M13 항체로 조사되었다. 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 4회 수행된 실험으로부터 획득된 평균±SD로 표시된다.

[0030] 도 5a, 5b 및 5c는 FAM19A5 단백질에 대한 항체 1-65(도 5a), SS01-13-S5(도 5b) 및 S5-SG(도 5c)의 결합에 대한 SPR 시험결과를 제공한다. 각각의 도 5a-5c에서, 센서그램은 상단에 제공되고 항체의 결합 친화도의 정량적 값(k_a , k_d , K_D 및 R_{max})은 하단의 표에 제공된다.

[0031] 도 6a, 6b, 6c 및 6d는 FAM19A5 단백질에 대한 1-65, SS01-13-S5 및 S5-SG 항체의 결합에 대한 ELISA 결과를 제공한다. 도 6a, 6b 및 6c는 각각 다양한 농도의 항체에 대한 막대 그래프로서 항체 1-65, SS01-13-S5 및 S5-SG에 대한 결과를 나타낸다. 도 6d는 항체에 대한 EC50 값을 포함하는 표를 제공한다.

[0032] 도 7a, 7b 및 7c는 처리 후 BV2 세포에 의한 PHRODO™ Green E. coli BioParticles의 식세포(phagocytic) 흡수의 비교를 제공한다. BV2 세포는 다음 중 하나로 처리되었다: (i) PBS, (ii) 인간 FAM19A5-Fc 단백질 단독($0 \mu\text{g/mL}$ 그룹), 또는 (iii) 1-65(도 7a), SS01-13-S5(도 7b) 또는 S5-SG(도 7c) 항체의 다양한 농도($3.125 \mu\text{g/mL}$, $6.25 \mu\text{g/mL}$, $12.5 \mu\text{g/mL}$ 또는 $25 \mu\text{g/mL}$)와 조합된 인간 FAM19A5-Fc 단백질. 데이터는 평균±S.D로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] [0033] 본 명세서에 개시된 것은 서열 유사성 19, 멤버 A5(FAM19A5) 단백질을("항-FAM19A5 항체")를 갖는 인간 패밀리에 특이적으로 결합하고 본 명세서에 개시된 1 이상의 특성을 나타내는 단리된 단클론성 항체 또는 이의 항원 결합 부분이다. 구체적으로, 항-FAM19A5 항체는 인간 대상에서 면역원성을 감소시키기 위해 탈면역화되었다.

[0032] [0034] 본 명세서에 기술된 개시 내용의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어 및 문구가 정의된다. 추가적인 정의는 상세한 설명 전체에 걸쳐 제시되어 있다.

[0033] I. 정의

[0034] [0035] 본 명세서 전체에서, 용어 "한" 또는 "어떤"은 1 이상을 의미한다. 예를 들어 "한 항체"는 1 이상의 항체를 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이, 용어 "한"(또는 "어떤"), "1 이상의" 및 "적어도 하나의"는 본 명

세서에서 상호 교환하여 사용될 수 있다.

- [0035] [0036] 또한, "및/또는"은 두 명시된 특징 또는 성분 각각이 나머지 하나와 함께 또는 단독으로 구체적으로 개시된다는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, "A 및/또는 B"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독), 및 "B"(단독)을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, "A, B 및/또는 C"은 A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독)의 양태들을 각각 포함하는 것으로 의도된다.
- [0036] [0037] 어떤 양태가 "포함하는"으로 서술된 경우 "구성되는" 및/또는 "본질적으로 구성되는"으로 설명된 다른 유사한 양태도 또한 제공되는 것으로 이해된다.
- [0037] [0038] 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명의 당업자에게 통상 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 예를 들어, 문헌(the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press)은 본 명세서에서 사용된 대부분의 용어에 대한 일반적인 사전적 의미를 당업자에게 제공한다.
- [0038] [0039] 단위, 접두사 및 기호는 Systeme International de Unites(SI)에서 승인된 형태로 표시된다. 수치 범위는 그 범위를 한정하는 숫자들을 포괄적으로 포함한다. 특별한 언급이 없는 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카르복시 배향으로 좌측에서 우측으로 쓰여진다. 개시된 표제는 본 발명의 다양한 양태의 제한이 아니며, 이들은 전체적으로 명세서를 참조한 것일 수 있다. 따라서, 하기 정의된 용어들은 그 전체가 명세서를 참조하여 더 상세하게 설명된다.
- [0039] [0040] 본 명세서에서 용어 "약"은 대략(approximately), 대충(roughly), 근처(around), 또는 근처의 영역 내를 의미한다. 용어 "약"이 수치 범위와 함께 사용될 때 그것은 제시된 수치 값 위와 아래로 경계를 확장시킴으로써 해당 범위를 변형한다. 일반적으로, 용어 "약"은, 예를 들어 위나 아래로(더 높거나 더 낮게) 10 퍼센트까지 언급된 값의 위와 아래로 수치 값을 변형할 수 있다.
- [0040] [0041] 용어 "서열 유사성 19, 멤버 A5를 갖는 패밀리" 또는 "FAM19A5"는 5개의 고도로 상동성인 단백질의 TAFa 패밀리("FAM19 패밀리"라고도 알려져 있음)에 속하며 뇌와 척수에서 우세하게 발현되는 단백질을 말한다. FAM19A5는 또한 TAFa5 또는 케모카인-유사 단백질 TAFa-5(Chemokine-like protein TAFa-5)라고도 알려져 있다.
- [0041] [0042] 인간에서, FAM19A5를 암호화하는 유전자는 염색체 22에 위치된다. 선택적 스플라이싱(splicing)에 의해 생성되는 것으로 추정되는 다수의 인간 FAM19A5(UniProt: Q7Z5A7) 이소형이 존재한다: 132개의 아미노산으로 구성된 이소형 1(UniProt: Q7Z5A7-1); 125개의 아미노산으로 구성된 이소형 2(UniProt: Q7Z5A7-2); 및 53개의 아미노산으로 구성된 이소형 3(UniProt: Q7Z5A7-3). 인간 FAM19A5 단백질은 막 결합 형태와 가용성(분비된) 형태로 존재하는 것으로 추정된다. 이소형 1은 하나의 경막 영역을 가진 막 단백질인 것으로 추정된다. 이소형 2는 분비된 단백질(가용성)로서 Tang T Y *et al.*, *Genomics* 83(4):727-34(2004)에 보고되었고, 아미노산 위치 1-25에 신호 펩티드를 함유한다. 이소형 1은 막 단백질인 것으로 추정된다. 아래는 3가지 공지된 인간 FAM19A5 이소형의 아미노산 서열이다.
- [0042] (I) 이소형 1(UniProt: Q7Z5A7-1, 경막 단백질): 이 이소형은 표준 서열로서 선택되었다.
- [0043] MAPSPRTGSR QDATALPSMS STFWAFMILA SLLIAYCSQL AAGTCEIVTL DRDSSQPRRT IARQTARAC RKGQIAGTTR ARPACVDARI IKTKQWCDML PCLEGECDL LINRSGWTCT QPGGRIKTTT VS(SEQ ID NO: 1)
- [0044] (II) 이소형 2(UniProt: Q7Z5A7-2, 가용성 단백질):
- [0045] MQLLKALWAL AGAALCCFLV LVIHAQFLKE GQLAAGTCEI VTLD RDSSQP RRTIARQTAR CACRKGQIAG TTRARPACVD ARIIKTKQWC DMLPCLEGECDLLINRSGW TCTQPGGRIK TTTVS(SEQ ID NO: 2)
- [0046] (III) 이소형 3(UniProt: Q7Z5A7-3):
- [0047] MYHHREWPARI IKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTC TQPGGRIKTT TVS(SEQ ID NO: 3)
- [0048] [0043] 용어 "FAM19A5"는 세포에 의해 자연적으로 발현되는 FAM19A5의 임의의 변이체 또는 이소형을 포함한다. 따라서, 본 명세서에 개시된 항체는 동일한 종의 상이한 이소형(예를 들어, 인간 FAM19A5의 상이한 이소형)들과 교차-반응할 수 있거나, 또는 인간 이외의 종의 FAM19A5(예를 들어 마우스 FAM19A5)와 교차-반응할 수 있다. 대안적으로, 항체는 인간 FAM19A5에 특이적일 수 있으며, 다른 종과는 교차-반응성을 나타내지 못할 수 있다.

FAM19A5 또는 이의 임의의 변이체 및 이소형은 이들을 자연적으로 발현하는 세포 또는 조직으로부터 분리되거나 또는 재조합적으로 생성될 수 있다. 인간 FAM19A5를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 GenBank 수탁번호 BC039396을 가지며 다음의 서열을 가진다:

[표 1a]인간 FAM19A5의 폴리뉴클레오티드 서열

	폴리뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO: 4)
FAM19A5 (GenBank Accession No. BC039396)	ggcggcgagg gatggcgcg cgcggggcccg cacgtggagg ccggcgcggg ggcggcgga gggcccggctg ctgagacgct ctgctgcccc ccggcggggc gccggcgctt caatggcgcc atgcccagg accggcagcc ggcaagatgc gaccgcccgt cccagcatgt cctcaacttt ctgggctgtc atgacgtg ccagcctgct catgcctac tgcagtgcg tggccggcg cacctgtgag attgtgacct tggaccggga cagcagccag cctcggagga cgatgcccc gcagaccgcc cgctgtgctg gtagaaagg gcagatgcc ggcaccacga gagccggcc cgctgtgtg gacgaagaa tcatcaagac caagcagtggt tgtgacatgc ttccgtgtct ggagggggaa ggctgcgact tgttaataa ccggtcaggc tggacgtgca cgagcccg cgggaggata aagaccacca cggctcctg acaaacacag cccctgaggg ggccccggga gtggccttgg ctcctggag agcccacgtc tcagccacag ttctccactc gcctcgact tcaccgttc tctgcccgc gccactccg ttccctgtg gtccgtgaag gacggcctca ggccttggca tctgagctt cggtctgtcc agccgacccg aggaggccgg actcagacac ataggcgggg ggcggcact ggcatcagca atacgcagtc tgtgggagcc cggccgccc cagccccgc cgaccgtggc gttggccctg ctgtctcag aggaggagga ggaggaggca gtcggcgag ccacagaagg ctgcagccca gcccgctga gacacgacgc ctgcccagg ggactgtcag gcacagaagc ggcctcctc cgtgcccag actgtccgaa ttgctttat ttcttatac tttagtata ctccatagac caaagagcaa aatctatctg aacctggacg caccctcact gtcagggtcc ctggggtcgc ttgtgcgggc gggaggggca tgggtggcaga gacatgtgtg tggccccgc ggagcggaga ggcggcgctt ggtggaggcc tccacccag gagcaccgc cacaccctc gagcagggc ttgggtgctg cggaggccgt ggcacacctg cgggaggcag cgacggcccc cagcagacg ccgggaacgc aggcgcttt attcctctgt acttagatca acttgaccgt actaaatcc ctttctgtt taaccagtta aacatgcctc ttctacagct ccattttga tagttggata atccagtatc tgccaagagc atgttgggtc tcccgtagt gctgcctcat cgatacccca tttagctcca gaaagcaag aaaactcgag taacacttgt ttgaaagaga tcattaaatg tattttgcaa agcccaaaaa aaaaaaaaaa a

[0044] 용어 "FAM19A5 단백질에 대한 길항제"는 FAM19A5 단백질의 발현을 억제하는 모든 길항제를 말한다. 이러한 길항제는 펩티드, 핵산, 또는 화합물일 수 있다. 더 구체적으로, 길항제는 안티센스-올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, miRNA, dsRNA, 앵타머, FAM19A5 표적화 PNA(펩티드 핵산), 또는 이들을 포함하는 벡터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 길항제는 FAM19A5 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 이의 항원-결합 부분일 수 있다.

[0045] 용어 "항체" 및 "항체들"은 당업계의 용어이며 본 명세서에서 상호 교환하여 사용될 수 있고, 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 가진 분자를 말한다. 본 명세서에서 사용된 용어는 전체 항체 및 임의의 항원결합 단편(즉 "항원-결합 부분") 또는 이들의 단쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, "항체"는 이황화물 결합에 의해 상호-연결된 적어도 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질, 또는 이의 항원-결합 부분을 말한다. 다른 실시형태에서, "항체"는 단일 가변 도메인, 예를 들어 VH 도메인을 포함하는 단쇄 항체를 말한다. 각 중쇄는 중쇄 가변영역(VH로 약칭)과 중쇄 불변영역으로 이루어진다. 특정 자연-발생 항체에서, 중쇄 불변영역은 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 특정 자연-발생 항체에서, 각 경쇄는 경쇄 가변영역

(VL로 약칭)과 경쇄 불변영역으로 이루어진다. 경쇄 불변영역은 하나의 도메인 CL로 이루어진다.

[0053] [0046] VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이라 칭하는 더 보존된 영역과 산재된 상보성 결정영역(CDR)이라 칭하는 초가변성의 영역으로 더 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR와 4개의 FR로 이루어지며, 이들은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4의 순서로 아미노-말단에서 카르복시-말단을 향해 배열된다. 중쇄 및 경쇄의 가변영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변영역은 면역 시스템의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 정통 보체(complement) 시스템의 제1 성분(C1q)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자들과 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0054] [0047] 용어 "Kabat 넘버링" 및 유사 용어는 당업계에서 인정되며 항체, 또는 이의 항원-결합 부분의 중쇄 및 경쇄 가변영역에서 아미노산 잔기를 넘버링하는 시스템을 말한다. 특정 양태에서, 항체의 CDR은 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 결정될 수 있다(예를 들어, Kabat EA & Wu TT (1971) *Ann NY Acad Sci* 190: 382-391 and Kabat E.A. *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No 91-3242 참조). Kabat 넘버링 시스템을 이용하면, 항체 중쇄 분자 내에서의 CDR은 전형적으로 아미노산 위치 31 내지 35(이것은 선택적으로 35 이후에 1 또는 2개의 추가의 아미노산을 포함할 수 있음; Kabat 넘버링 방식에서 35A 및 35B로 언급됨)(CDR1), 아미노산 위치 50 내지 65(CDR2), 및 아미노산 위치 95 내지 102(CDR3)에 존재한다. Kabat 넘버링 시스템을 이용하면, 항체 경쇄 분자 내에서 CDR은 전형적으로 아미노산 위치 24 내지 34(CDR1), 아미노산 위치 50 내지 56(CDR2), 및 아미노산 위치 89 내지 97(CDR3)에 존재한다. 특정일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체의 CDR은 Kabat 넘버링 방식에 따라서 결정되었다.

[0055] [0048] 용어 "Kabat에서의 아미노산 위치 넘버링", "Kabat 위치", 및 그의 변형 용어는 문헌(Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991))에서 항체 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 말한다. 이 넘버링 시스템을 사용하면, 실제 전형 아미노산 서열은 더 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있는데, 이것은 가변 도메인의 FW 또는 CDR의 단축, 또는 이것에의 삽입에 해당한다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 이후 단일 아미노산 삽입(Kabat에 따르면 잔기 52a) 및 중쇄 FW 잔기 82 이후 삽입된 잔기(Kabat에 따르면 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다(표 1b 참조).

[0056] [표 1b]

Loop	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32...34
		(Kabat Numbering)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Chothia Numbering)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0057]

[0058] [0049] 잔기의 Kabat 넘버링은 "표준" Kabat 넘버링된 서열과 항체의 서열의 상동성의 영역에서 정렬에 의해 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다. Chothia는 구조 루프의 위치를 대신 말한다(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Chothia CDR-H1 루프의 단부는 Kabat 넘버링 관례를 이용하여 넘버링되었을 때 루프의 길이에 따라 H32 내지 H34 사이에서 변한다(이것은 Kabat 넘버링 방식이 H35A와 H35B에 삽입을 위치시키기 때문이다; 35A나 35B도 존재하지 않는다면 루프는 32에서 끝난다; 35A만 존재하면 루프는 33에서 끝난다; 35A와 35B가 둘 모두 존재하면 루프는 34에서 끝난다). AbM 초가변영역은 Kabat CDR과 Chothia 구조 루프 사이의 절충점을 표시하며, Oxford Molecular's AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 이용된다.

[0059] [0050] IMGT(ImMunoGeneTics)는 또한 CDR을 포함하는 면역글로불린 가변영역에 대한 넘버링 시스템을 제공한다. 예를 들어 Lefranc, M.P. *et al.*, *Dev Comp Immunol.* 27: 55-77(2003)를 참고하며, 이것은 본 명세서에 참고로 포함된다. IMGT 넘버링 시스템은 5,000개를 넘는 서열의 정렬, 구조 데이터, 및 초가변 루프의 특성화에 기초했

으며, 모든 종에 대해 가변영역과 CDR 영역을 용이하게 비교한다. IMGT 넘버링 스키마(schema)에 따르면, VH-CDR1은 위치 26 내지 35에 있고, VH-CDR2는 위치 51 내지 57에 있고, VH-CDR3은 위치 93 내지 102에 있고, VL-CDR1은 위치 27 내지 32에 있고, VL-CDR2는 위치 50 내지 52에 있고, 그리고 VL-CDR3은 위치 89 내지 97에 있다.

[0060] [0051] 본 명세서에 개시된 모든 중쇄 불변영역 아미노산 위치에 대해, 넘버링은 서열화된 최초의 인간 IgG1인 골수종 단백질 EU의 아미노산 서열을 설명한 문헌(Edelman *et al.*, 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63(1):78-85)에 최초로 제시된 EU 인덱스에 따른다. Edelman 등의 EU 인덱스는 또한 문헌(Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)에도 제시된다. 따라서, 용어 "Kabat에 제시된 EU 인덱스" 또는 "Kabat의 EU 인덱스" 및 "Kabat에 제시된 EU 인덱스에 따른 ...위치" 및 문법적으로 변형된 용어는 Kabat 1991에 제시된 것과 같은 Edelman 등의 인간 IgG1 EU 항체에 기초한 잔기 넘버링 시스템을 말한다.

[0061] [0052] 가변 도메인(중쇄와 경쇄 모두) 및 경쇄 불변영역 아미노산 서열에 사용된 넘버링 시스템은 Kabat 1991에 제시된 것이다.

[0062] [0053] 항체는 면역글로불린 분자의 임의의 타입(예를 들어 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY), 임의의 유형(예를 들어 IgD, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 또는 IgA2), 또는 임의의 아형(예를 들어 인간에서 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4; 및 마우스에서 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)를 가질 수 있다. 면역글로불린, 예를 들어 IgG1은 몇몇 동종이형으로 존재하며, 이들은 최대 몇 개의 아미노산이 서로 상이하다. 본 명세서에 개시된 항체는 통상 알려진 이소타입, 유형, 아형, 또는 동종이형 중 어느 것으로부터 유래할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 아형 또는 이들의 임의의 하이브리드이다. 특정 실시형태에서, 항체는 인간 IgG1 아형, 인간 IgG2 아형, 인간 IgG4 아형, 또는 인간 IgG2/IgG4 아형의 것이다.

[0063] [0054] "항체"는, 예로서, 자연발생 및 비-자연발생 항체; 단클론성 및 다클론성 항체; 키메라 및 인간화된 항체; 인간 및 비-인간 항체, 전체 합성 항체; 단쇄 항체; 단일 특이적 항체; 다중 특이적 항체(이중 특이적 항체를 포함); 2개의 중쇄와 2개의 경쇄 분자를 포함하는 테트라머 항체; 항체 경쇄 모노머; 항체 중쇄 모노머; 항체 경쇄 다이머; 항체 중쇄 다이머; 항체 경쇄-항체 중쇄 쌍; 인트라바디; 헤테로공액결합 항체; 1가 항체; 단쇄 항체; 카멜라이즈드(camelized) 항체; 아피바디(affibodies); 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들어 항-항-Id 항체를 포함), 및 충분히 항원 결합할 수 있는 단일 모노머 가변 항체 도메인(예를 들어 VH 도메인 또는 VL 도메인)으로 구성된 결합 분자를 포함하는 단일-도메인 항체(sdAb)를 포함한다. Harman M. M. and Haard H. J. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77(1): 13-22(2007).

[0064] [0055] 본 명세서에서 용어 "항체의 항원-결합 부분" 또는 "항체의 항원-결합 단편"은 항원(예를 들어 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 항체의 1 이상의 단편을 말한다. 이러한 "단편"은, 예를 들어 약 8 내지 약 1,500개 아미노산 길이, 적합하게는 약 8 내지 약 745개 아미노산 길이, 적합하게는 약 8 내지 약 300개, 약 8 내지 약 200개 아미노산, 또는 약 10개 내지 약 50, 또는 100개 아미노산 길이이다. 항체의 항원-결합 기능은 전장(full-length) 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 항체, 예를 들어 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체의 "항원-결합 부분"에 포함되는 결합 단편의 예들은 (i) VL, VH, CL, 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화물 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, 및 이황화물-연결된 Fvs(sdFv); (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정영역(CDR) 또는 (vii) 합성 링커에 의해 선택적으로 이어질 수 있는 2 이상의 단리된 CDR의 조합을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2 도메인인 VL과 VH는 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 합성 링커에 의해 재조합 방법을 이용하여 이어질 수 있으며, 이로써 VL과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성한 단일 단백질 사슬(단쇄 Fv(scFv)라고 함)이 될 수 있다(예를 들어 Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참조). 이러한 단쇄 항체도 또한 항체의 "항원-결합부분"에 포함된다. 이들 항체 단편은 당업자에게 공지된 종래의 기술을 이용하여 얻어지며, 단편들은 무손상 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다. 항원-결합 부분은 재조합 DNA 기술에 의해, 또는 무손상 면역글로불린의 효소 또는 화학 절단에 의해 생성될 수 있다.

[0065] [0056] 본 명세서에서 용어 "가변영역" 또는 "가변 도메인"은 당업계에서 통상적으로 상호 교환적으로 사용된다. 가변영역은 전형적으로 항체의 일부분, 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 일부분, 전형적으로 성숙한 중

쇄에서 약 아미노 말단 110 내지 120개 아미노산 및 성숙한 경쇄에서 약 90 내지 115개 아미노산을 말하며, 항체 중 서열이 광범하게 상이하고, 특정 항원에 대한 특정 항체의 결합 및 특이성과 관련하여 사용된다. 서열 변동성은 상보성 결정영역(CDR)이라고 불리는 영역에 집중되며, 가변 도메인에서 더 고도로 보존된 영역은 프레임워크 영역(FR)이라고 불린다.

[0066] [0057] 특정 메커니즘이나 이론에 구속되지 않고, 경쇄 및 중쇄의 CDR은 항원과 항체의 상호작용 및 특이성을 주로 담당하는 것으로 추정된다. 특정 실시형태에서, 가변영역은 인간 가변영역이다. 특정 실시형태에서, 가변영역은 설치류 또는 무린 CDR과 인간 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 가변영역은 영장류(예를 들어 비-인간 영장류) 가변영역이다. 특정 실시형태에서, 가변영역은 설치류 또는 무린 CDR과 영장류(예를 들어 비-인간 영장류) 프레임워크 영역(FR)을 포함한다.

[0067] [0058] 본 명세서에서, 용어 "중쇄"(HC)는 항체와 관련하여 사용된 경우, 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 임의의 상이한 타입, 예를 들어 알파(α), 델타(δ), 입실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)를 말할 수 있으며, 이들은 각각 IgG의 아형, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하여, 항체의 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 유형을 발생시킨다.

[0068] [0059] 본 명세서에서, 용어 "경쇄"(LC)는 항체와 관련하여 사용된 경우, 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 임의의 상이한 타입, 예를 들어 카파(κ) 및 람다(λ)를 말할 수 있다. 경쇄 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다. 특정일 실시형태에서, 경쇄는 인간 경쇄이다.

[0069] [0060] 용어 "VL" 및 "VL 도메인"은 상호 교환하여 사용되며 항체의 경쇄 가변영역을 말한다.

[0070] [0061] 용어 "VH" 및 "VH 도메인"은 상호 교환하여 사용되며 항체의 중쇄 가변영역을 말한다.

[0071] [0062] 본 명세서에서, 용어 "불변영역" 또는 "불변 도메인"은 상호 교환 가능하며 당업계에서의 통상적인 의미를 가진다. 불변 도메인은 항체 부분이며, 예를 들어 항체와 항원의 결합에는 직접 관여되지 않지만 Fc 수용체와의 상호작용과 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낼 수 있는 경쇄 및/또는 중쇄의 카르복시 말단 부분이다. 면역글로불린 분자의 불변영역은 일반적으로 면역글로불린 가변 도메인에 비해 더 보존된 아미노산 서열을 가진다.

[0072] [0063] "Fc 영역"(단편 결정화 가능한 영역) 또는 "Fc 도메인" 또는 "Fc"는 면역 시스템의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 상에 위치한 Fc 수용체 또는 정통 보체 시스템의 제1 성분(C1q)과의 결합을 포함하여, 숙주 조직 또는 인자들과 면역글로불린의 결합을 매개하는 항체의 중쇄의 C-말단 영역을 말한다. 따라서, Fc 영역은 제1 불변영역 면역글로불린 도메인(예를 들어 CH1 또는 CL)을 제외한 항체의 불변영역을 포함한다. IgG, IgA 및 IgD 항체 이소타입에서, Fc 영역은 항체의 두 중쇄의 제2(CH2) 및 제3(CH3) 불변 도메인으로부터 유래된 2개의 동일한 단백질 단편을 포함한다; IgM 및 IgE Fc 영역은 각 폴리펩티드 사슬에 3개의 중쇄 불변 도메인(CH 도메인 2-4)을 포함한다. IgG의 경우, Fc 영역은 면역글로불린 도메인 C γ 2 및 C γ 3과 C γ 1과 C γ 2 사이의 힌지를 포함한다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양하지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 C226이나 P230에 있는 아미노산 잔기(또는 이들 두 아미노산 사이의 아미노산)에서 중쇄의 카르복시-말단까지 늘어난 것으로서 한정되며, 여기서 넘버링은 Kabat에서와 같은 EU 인덱스를 따른다. 인간 IgG Fc 영역의 CH2 도메인은 약 아미노산 231에서 약 아미노산 340까지 연장되고, CH3 도메인은 Fc 영역에서 Cm 도메인의 C-말단 측에 위치되는데, 그것은 IgG의 약 아미노산 341에서 약 아미노산 447까지 연장된다. Fc 영역은 임의의 동종이형 변이체를 포함하는 자생서열 Fc, 또는 변이체 Fc(예를 들어 비-자연발생 Fc)일 수 있다. 또한, Fc는 단리된 상태의 영역을 말하거나 또는 "Fc 융합 단백질"(예를 들어 항체 또는 면역유착(immunoadhesion))이라고도 하는, "Fc 영역을 포함하는 결합 단백질"과 같은 Fc-포함 단백질 폴리펩티드와 관계된 영역을 말한다.

[0073] [0064] "자생서열 Fc 영역" 또는 "자생서열 Fc"는 자연에서 발견된 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 자생서열 인간 Fc 영역은 자생서열 인간 IgG1 Fc 영역; 자생서열 인간 IgG2 Fc 영역; 자생서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 자생서열 인간 IgG4 Fc 영역뿐만 아니라 이들의 자연발생 변이체를 포함한다. 자생서열 Fc는 Fe들의 다양한 동종이형을 포함한다(예를 들어 Jefferis *et al.*, (2009) *mAbs* 1:1; Vidarsson G *et al.*, *Front Immunol.* 5:520(2014년 10월 20일 온라인 공개) 참조).

[0074] [0065] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 면역글로불린의 Fc 영역에 결합하는 수용체이다. IgG 항체에 결합하는 FcR은 Fc γ R 패밀리의 수용체를 포함하고, 이들 수용체의 대립형질 변이체 및 다른 방식으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ R 패밀리는 3개의 활성화 수용체(마우스에서의 Fc γ RI, Fc γ RIII, 및 Fc γ RIV; 인간에서의 Fc γ RIA, Fc γ RIIA, 및 Fc γ RIIIA)와 하나의 억제 수용체(Fc γ RIIB)로 구성된다. 인간 IgG1은 대부분의 인간 Fc 수

용체와 결합하며 가장 강한 Fc 이펙터 기능을 도출한다. 인간 IgG1가 결합하는 활성화 Fc 수용체의 종류에 대해서는 뮤린 IgG2a와 동등하다고 간주된다. 반면, 인간 IgG4는 최소한의 Fc 이펙터 기능을 도출한다(Vidarsson G *et al.*, *Front Immunol.* 5:520(2014년 10월 20일 온라인 공개) 참조).

[0075] [0066] 불변영역은 1 이상의 이펙터 기능을 제거하기 위해, 예를 들어 재조합 기술에 의해 조작될 수 있다. "이펙터 기능"은 항체 Fc 영역과 Fc 수용체 또는 리간드의 상호작용, 또는 그로부터 생기는 생화학적 사례(event)를 말한다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합, 보체 의존성 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, Fc γ R-매개 이펙터 기능, 예컨대 ADCC 및 항체 의존성 세포-매개 포식작용(phagocytosis)(ADCP), 및 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향조절을 포함한다. 이러한 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인(예를 들어 항체 가변 도메인)과 조합되는 것을 필요로 한다. 따라서, 용어 "Fc 기능이 없는 불변영역"은 Fc 영역에 의해 매개된 1 이상의 이펙터 기능이 감소되거나 없는 불변영역을 포함한다.

[0076] [0067] 항체의 이펙터 기능은 상이한 접근법에 의해 감소 또는 회피될 수 있다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역을 결여한 항체 단편(예를 들어 예컨대 Fab, F(ab')₂, 단쇄 Fv(scFv), 또는 모노머 VH 또는 VL 도메인으로 구성된 sdAb)을 사용하여 감소되거나 회피될 수 있다. 대안적으로, Fc 영역의 다른 가치있는 속성(예를 들어 연장된 반감기 및 헤테로다имер화)은 보유하면서 항체의 이펙터 기능을 감소시키기 위해 소위 말하는 무글리코실화(aglycosylated) 항체가 Fc 영역에서 특정 잔기에 연결된 당을 제거함으로써 생성될 수 있다. 무글리코실화 항체는, 예를 들어 당이 부착된 잔기를 결실 또는 변경함으로써, 당을 효소적으로 제거함으로써, 글리코실화 억제제의 존재하에 배양된 세포에서 항체를 생성함으로써, 또는 단백질을 글리코실화할 수 없는 세포(예를 들어 박테리아 숙주세포)에서 항체를 발현함으로써 생성될 수 있다(예를 들어 미국 특허공개 제 20120100140 호 참조). 다른 접근법은 이펙터 기능이 감소된 IgG 아형으로부터의 Fc 영역을 이용하는 것인데, 예를 들어 IgG2 및 IgG4 항체는 IgG1 및 IgG3보다 더 낮은 수준의 Fc 이펙터 기능을 갖는 것을 특징으로 한다. Fc 부분의 CH2 도메인에서 힌지 영역에 가장 가까이 있는 잔기가 항체의 이펙터 기능을 담당하며, 그것은 선천 면역 시스템의 이펙터 세포 상에서 C1q(보체) 및 IgG-Fc 수용체(Fc γ R)에 대해 상당히 중첩된 결합 부위를 함유한다(Vidarsson G *et al.*, *Front Immunol.* 5:520(2014년 10월 20일 온라인 공개)). 따라서, Fc 이펙터 기능이 감소되거나 없는 항체는, 예를 들어 IgG4 이소타입의 IgG 항체로부터의 CH2 도메인과 IgG1 이소타입의 IgG 항체로부터의 CH3 도메인을 포함하는 키메라 Fc 영역, 또는 IgG2로부터의 힌지 영역과 IgG4로부터의 CH2 영역을 포함하는 키메라 Fc 영역(예를 들어 Lau C *et al.*, *J Immunol.* 191:4769-4777 (2013) 참조), 또는 변경된 Fc 이펙터 기능, 예를 들어 Fc 기능이 감소되거나 없는 돌연변이를 가진 Fc 영역을 생성함으로써 제조될 수 있다. 돌연변이를 가진 이러한 Fc 영역은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허공개 제 20120100140 호와 거기 인용된 미국출원 및 PCT 출원들 그리고 An *et al.*, *mAbs* 1:6, 572-579 (2009)를 참고하며, 이들의 개시는 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0077] [0068] "힌지", "힌지 도메인" 또는 "힌지 영역" 또는 "항체 힌지 영역"은 CH1 도메인을 CH2 도메인과 결합하고 힌지의 상부, 중앙, 및 하부 부분을 포함하는 중쇄 불변영역의 도메인을 말한다(Roux *et al.*, *J. Immunol* 1998 161:4083). 힌지는 항체의 결합 영역과 이펙터 영역 사이에 가요성의 수준을 변화시키며, 또한 두 중쇄 불변영역 사이에 분자간 이황화물 결합을 위한 부위를 제공한다. 본 명세서에 개시된 힌지는 모든 IgG 이소타입에 대해 Glu216에서 시작해서 Gly237에서 끝난다(Roux *et al.*, 1998 *J Immunol* 161:4083). 야생형 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 힌지의 서열이 당업계에 공지되어 있다(예를 들어 Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No 91-3242; Vidarsson G *et al.*, *Front Immunol.* 5:520(2014년 10월 20일 온라인 공개) 참조).

[0078] [0069] 용어 "CH1 도메인"은 중쇄 불변 도메인에서 가변 도메인과 힌지를 연결하는 중쇄 불변영역을 말한다. 본 명세서에 개시된 CH1 도메인은 A118에서 시작해서 V215에서 끝난다. 용어 "CH1 도메인"은 야생형 CH1 도메인, 뿐만아니라 이의 자연적으로 존재하는 변이체(예를 들어 동종이형)를 포함한다. (야생형 및 동종이형을 포함하는) IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4의 CH1 도메인 서열은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Kabat EA *et al.*, (1991)(상동) 및 Vidarsson G *et al.*, *Front Immunol.* 5:520(2014년 10월 20일 온라인 공개) 참조). 예시적인 CH1 도메인은 항체의 생물학적 활성, 예를 들어 반감기를 변형하는 돌연변이를 가진 CH1 도메인을 포함하며, 이들은 예를 들어 미국 특허공개 제 20120100140 호 및 거기 인용된 미국특허 및 공보들과 PCT 공보들에 개시된다.

[0079] [0070] 용어 "CH2 도메인"은 중쇄 불변 도메인에서 힌지와 CH3 도메인을 연결하는 중쇄 불변영역을 말한다. 본 명세서에 개시된 CH2 도메인은 P238에서 시작해서 K340에서 끝난다. 용어 "CH2 도메인"은 야생형 CH2 도메인,

뿐만 아니라 이의 자연적으로 존재하는 변이체(예를 들어 동종이형)를 포함한다. (야생형 및 동종이형을 포함하는) IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4의 CH2 도메인 서열은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Kabat EA *et al.*, (1991)(상동) 및 Vidarsson G *et al.*, *Front Immunol.* 5:520(2014년 10월 20일 온라인 공개) 참조). 예시적인 CH2 도메인은 항체의 생물학적 활성, 예를 들어 반감기 및/또는 감소된 Fc 이펙터 기능을 변형하는 돌연변이를 가진 CH2 도메인을 포함하며, 이들은 예를 들어 미국 특허공개 제 20120100140 호 및 거기 인용된 미국특허 및 공보와 PCT 공보들에 개시된다.

[0080] [0071] 용어 "CH3 도메인"은 중쇄 불변 도메인에서 CH2 도메인에 대해 C-말단인 중쇄 불변영역을 말한다. 본 명세서에 개시된 CH3 도메인은 G341에서 시작해서 K447에서 끝난다. 용어 "CH3 도메인"은 야생형 CH3 도메인, 뿐만 아니라 이의 자연적으로 존재하는 변이체(예를 들어 동종이형)를 포함한다. (야생형 및 동종이형을 포함하는) IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4의 CH3 도메인 서열은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Kabat EA *et al.*, (1991)(상동) 및 Vidarsson G *et al.*, *Front Immunol.* 5:520(2014년 10월 20일 온라인 공개) 참조). 예시적인 CH3 도메인은 항체의 생물학적 활성, 예를 들어 반감기를 변형하는 돌연변이를 가진 CH3 도메인을 포함하며, 이들은 예를 들어 미국 특허공개 제 20120100140 호 및 거기 인용된 미국특허 및 공보와 PCT 공보들에 개시된다.

[0081] [0072] 본 명세서에서 용어 "이소타입"은 중쇄 불변영역 유전자에 의해 암호화되는 항체 유형(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, 및 IgE 항체)을 말한다.

[0082] [0073] 용어 "동종이형"은 몇 개의 아미노산이 차이가 있는 특정한 이소타입 그룹 내에서 자연발생한 변이체를 말한다(예를 들어 Jefferis *et al.*, (2009) *mAbs* 1:1 참조). 본 명세서에 개시된 항체는 임의의 동종이형을 가질 수 있다. IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4의 동종이형은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Kabat EA *et al.*, (1991)(상동); Vidarsson G *et al.*, *Front Immunol.* 5:520(2014년 10월 20일 온라인 공개); 및 Lefranc MP, *mAbs* 1:4, 1-7(2009) 참조).

[0083] [0074] 용어 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 함께 본 명세서에서 상호 교환하여 사용된다.

[0084] [0075] 본 명세서에서, 용어 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 가진 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 말한다. 예를 들어 FAM19A5에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 FAM19A5 이외의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다. 그러나, FAM19A5의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 상이한 종으로부터의 다른 FAM19A5 단백질에 대해 교차-반응성을 가질 수 있다.

[0085] [0076] "결합 친화성"은 일반적으로 분자(예를 들어 항체)의 단일결합 부위와 그것의 결합 파트너(예를 들어 항원) 간의 비-공유 상호작용의 전체 합계 강도를 말한다. 특별한 언급이 없는 한, 용어 "결합 친화성"은 결합 쌍의 멤버(예를 들어 항체와 항원) 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화성을 말한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리상수(K_D)에 의해 표시될 수 있다. 친화성은, 제한되지는 않지만, 평형 해리상수(K_D), 및 평형 결합상수(K_A)를 포함하는, 당업계에 공지된 다수의 방식으로 측정 및/또는 표시될 수 있다. K_D 는 k_{off}/k_{on} 의 몫으로부터 계산되고 몰 농도(M)로 표시되며, K_A 는 k_{on}/k_{off} 의 몫으로부터 계산된다. k_{on} 은 예를 들어 항원에 대한 항체의 결합속도 상수를 말하고, k_{off} 는 예를 들어 항원에 대한 항체의 해리속도 상수를 말한다. k_{on} 및 k_{off} 는 면역분석(예를 들어 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)), BIACORE[®] 또는 역학적 배제 분석(KinExA)과 같은, 당업자에게 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0086] [0077] 본 명세서에서, 용어 "특이적으로 결합한다", "특이적으로 인식한다", "특이적 결합", "선택적 결합" 및 "선택적으로 결합한다"는 항체와 관련하여 유사한 용어들로서 항원(예를 들어 에피토프 또는 면역 복합체)에 결합하는 분자(예를 들어 항체)를 말하며, 이러한 결합은 당업자에 의해 이해되는 바와 같다. 항원에 특이적으로 결합하는 분자는, 예를 들어 면역분석, BIACORE[®] KinExA 3000 기기(Sapidyne Instruments, Boise, ID), 또는 당업계에 공지된 다른 분석들에 의해 결정되었을 때, 일반적으로 더 낮은 친화성으로 다른 펩티드 또는 폴리펩티드에 결합할 수 있다. 특정일 실시형태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 분자는 이 분자가 다른 항원에 결합할 때의 K_A 보다 적어도 2 logs, 2.5 logs, 3 logs, 4 logs 또는 그 이상 더 큰 K_A 로 그 항원에 결합한다.

[0087] [0078] 항체는 전형적으로 10^{-5} 내지 10^{-11} M 이하의 해리상수(K_D)에 의해 반영되는, 높은 친화성으로 동족 항원

에 특이적으로 결합한다. 약 10^{-4} M를 초과하는 K_D 는 일반적으로 비특이적 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 항원과 "특이적으로 결합하는" 항체는 높은 친화성으로 항원 및 실질적으로 동일한 항원에 결합하는 항체를 말하며, 이것은 예를 들어 정해진 항원을 사용하여 면역분석(예를 들어 ELISA) 또는 BIACORE 2000 기기에서 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술에 의해 결정되었을 때, 10^{-7} M 이하, 바람직하게 10^{-8} M 이하, 더욱 바람직하게 10^{-9} M 이하, 및 가장 바람직하게 10^{-8} M 내지 10^{-10} M 이하의 K_D 를 갖는 것을 의미하고, 이것은 관련 없는 항원에는 높은 친화성으로 결합하지 않는다.

[0088] [0079] 본 명세서에서, 용어 "항원"은 임의의 천연 또는 합성 면역원성 물질, 예컨대 단백질, 펩티드 또는 합텐을 말한다. 항원은 FAM19A5 또는 이의 단편일 수 있다.

[0089] [0080] 본 명세서에서, "에피토프"는 당업계의 용어로서 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 국소화된 영역을 말한다. 에피토프는, 예를 들어 폴리펩티드의 연속(contiguous) 아미노산들(선형 또는 연속 에피토프)일 수 있거나, 또는 에피토프는, 예를 들어 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들의 2 이상의 비-연속 영역들이 합쳐진 것(입체형태적, 비-선형, 불연속, 또는 비-연속 에피토프)일 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 항상 그렇지는 않지만 전형적으로 변성 용매에 노출시 보유하고, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로 처리시 상실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간적 입체형태에서 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 20개 아미노산을 포함한다. 에피토프가 주어진 항체에 의해 결합된 것을 결정하는 방법(즉 에피토프 맵핑)이 당업계에 공지되어 있고, 이것은 예를 들어 면역블롯팅 및 면역침전 분석을 포함하며, 예를 들어 FAM19A5로부터의 중첩 또는 연속 펩티드가 주어진 항체(예를 들어 항-FAM19A5 항체)와의 반응성에 대해 시험된다. 에피토프의 공간적 입체형태를 결정하는 방법은 당업계의 기술 및 본 명세서에 개시된 것들을 포함하며, 예를 들어 X-선 결정학, 2-차원 핵자기공명 및 HDX-MS를 포함한다(예를 들어 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol 66, G. E. Morris, Ed. (1996) 참조).

[0090] [0081] 특정 실시형태에서, 항체가 결합한 에피토프는, 예를 들어 NMR 분광법, X-선 회절 결정학 연구, ELISA 분석, 질량분광법과 결합된 수소/중수소 교환(예를 들어 액체 크로마토그래피 전자분무 질량분광법), 어레이-기반 올리고-펩티드 스캐닝 분석, 및/또는 돌연변이 유발 맵핑(예를 들어 부위-지정 돌연변이 유발 맵핑)에 의해 결정될 수 있다. X-선 결정학의 경우, 결정화는 당업계에 공지된 방법 중 어느 것을 이용하여 달성될 수 있다(예를 들어 Giege R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). 항체:항원 결정은 공지된 X-선 회절 기술을 이용하여 연구될 수 있으며, X-PLOR(Yale University, 1992, Molecular Simulations, Inc.에 의해 배포; 예를 들어 *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; 미국 특허공개 제2004/0014194호 참조), 및 BUSTER(Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1):37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10):1316-1323)과 같은 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 연구될 수 있다. 돌연변이 유발 맵핑 연구는 당업자에게 공지된 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 알려진 스캐닝 돌연변이 유발 기술을 포함하는 돌연변이 유발 기술에 대한 설명은, 예를 들어 Champe M *et al.*, (1995) *J Biol Chem* 270:1388-1394 및 Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085를 참고한다.

[0091] [0082] 용어 "에피토프 맵핑"은 항체-항원 인식에 대한 분자 결정소(determinant)의 확인 과정을 말한다.

[0092] [0083] 2 이상의 항체와 관련하여 용어 "동일한 에피토프에 결합한다"는 주어진 방법에 의해 결정되었을 때 항체들이 아미노산 잔기의 동일한 세그먼트에 결합한다는 것을 의미한다. 항체들이 본 명세서에 개시된 항체와 "FAM19A5 상의 동일한 에피토프"에 결합하는지의 여부를 결정하는 기술은, 에피토프 맵핑 방법, 예컨대 에피토프의 원자 분해능을 제공하는 항원:항체 복합체의 결정의 X-선 분석 및 수소/중수소 교환 질량분광법(HDX-MS)을 포함한다. 다른 방법은 항체와 항원 단편 또는 항원의 돌연변이된 변이체의 결합을 모니터링하며, 여기서 항원 서열 내에서 아미노산 잔기의 변형으로 인한 결합의 손실이 주로 에피토프 성분의 표시로서 간주된다. 이에 더하여, 에피토프 맵핑용 컴퓨터 조합 방법이 또한 이용될 수 있다. 이들 방법은 조합 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리로부터 특정한 짧은 펩티드를 친화성 분리할 수 있는 관심 항체의 능력에 의존한다. 동일한 VH 및 VL 또는 동일한 CDR 1, 2 및 3 서열을 가진 항체는 동일한 에피토프에 결합할 것으로 예상된다.

[0093] [0084] "표적과의 결합을 위해 다른 항체와 경합하는" 항체는 나머지 항체와 표적의 결합을 (부분적으로 또는 완전히)억제하는 항체를 말한다. 두 항체가 표적과의 결합에 대해 서로 경합하는지의 여부, 즉 하나의 항체가

나머지 항체와 표적의 결합을 억제하는지의 여부와 억제하는 정도는 공지된 경합 실험을 사용하여 결정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 항체는 다른 항체와 표적의 결합에 대해 경합하며 이 결합을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%까지 억제한다. 억제 또는 경합의 수준은 항체가 "차단 항체"(즉 표적과 먼저 인큐베이션된 저온 항체)인지에 따라 달라질 수 있다. 경합 분석은, 예를 들어 Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:101101/pdb.prot 4277 또는 Ed Harlow and David Lane에 의한 "Using Antibodies"(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999)의 제11장에 설명된대로 수행될 수 있다. 경합 항체는 동일한 에피토프, 중첩 에피토프 또는 인접 에피토프(예를 들어 입체장애에 의해 증명된 대로)에 결합한다.

[0094] [0085] 다른 경합 결합 분석은 고체상 직접 또는 간접 방사성 면역분석(RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소면역 분석(EIA), 샌드위치 경합 분석(Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983) 참조); 고체상 직접 바이오틴-아비딘 EIA(Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986) 참조); 고체상 직접 표지화 분석, 고체상 직접 표지화 샌드위치 분석(Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988) 참조); 1-125 라벨을 사용한 고체상 직접 표지된 RIA(Morel *et al.*, *Mol Immunol.* 25(1):7 (1988) 참조); 고체상 직접 바이오틴-아비딘 EIA(Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); 및 직접 표지화 RIA(Moldenhauer *et al.*, *Scand J Immunol.* 32:77 (1990))를 포함한다.

[0095] [0086] "이중특이적" 또는 "이중기능성 항체"는 두 상이한 중쇄/경쇄 쌍과 두 상이한 결합 부위를 가진 인공 하이브리드 항체이다. 이중특이적 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함하는 여러가지 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어 Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)를 참조.

[0096] [0087] 본 명세서에서, 용어 "단클론성 항체"는 특정 에피토프에 대해 단일결합 특이성 및 친화성을 나타내는 항체 또는 모든 항체가 특정 에피토프에 대해 단일결합 특이성 및 친화성을 나타내는 항체들의 조성물을 말한다. 따라서, 용어 "인간 단클론성 항체"는 단일결합 특이성을 나타내고 인간 점라인 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 선택적 불변영역을 가진 항체 또는 항체 조성물을 말한다. 일부 실시형태에서, 인간 단클론성 항체는 유전자도입 비-인간 동물, 예를 들어 불멸화 세포에 융합된 인간 중쇄 도입유전자와 경쇄 도입유전자를 포함하는 계능을 가진, 유전자도입 마우스로부터 얻어진 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.

[0097] [0088] 본 명세서에서, 용어 "재조합 인간 항체"는 (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자도입 또는 염색체 도입된(transchromosomal)인 동물(예를 들어 마우스)로부터 단리된 항체 또는 그로부터 제조된 하이브리도마, (b) 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주세포로부터, 예를 들어 트랜스펙토마(transfectoma)로부터 단리된 항체, (c) 재조합, 조합 인간 항체 라이브리도마로부터 단리된 항체, 및 (d) 다른 DNA 서열에 대한 인간 면역글로불린 유전자 서열을 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체와 같은, 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 점라인 유전자에 의해 암호화되지만, 예를 들어 항체 성숙화 동안 발생하는 후속 재배열 및 돌연변이를 포함하는 특정한 인간 점라인 면역글로불린 서열을 이용하는 가변 및 불변영역을 포함한다. 당업계에 공지된 대로(예를 들어 Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125 참조), 가변영역은 외래 항원에 대해 특이적인 항체를 형성하도록 재배열한 다양한 유전자에 의해 암호화된, 항원 결합 도메인을 함유한다. 재배열에 더하여, 가변영역은 외래 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키기 위해 다수의 단일 아미노산 변화(체세포 돌연변이 또는 초돌연변이라고 함)에 의해 더 변형될 수 있다. 불변영역은 항원에 대한 추가의 반응(즉 이소타입 스위치)에서 변할 것이다. 따라서, 항원에 반응하여 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 폴리펩티드를 암호화하는 재배열되고 체세포 돌연변이된 핵산 분자는 원래 핵산 분자와 서열 동일성을 가질 수 없지만, 실질적으로 동일하거나 유사할 것이다(즉 적어도 80% 동일성을 가짐).

[0098] [0089] 용어 "인간 항체(HuMAb)"는 프레임워크와 CDR 영역이 둘 모두 인간 점라인 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변영역을 가진 항체를 말한다. 또한, 이 항체가 불변영역을 함유한다면, 불변영역 역시 인간 점라인 면역글로불린 서열로부터 유래된다. 본 명세서에 개시된 항체는 인간 점라인 면역글로불린 서열(예를 들어 시험관 내 무작위 또는 부위-특정 돌연변이 유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 그러나, 본 명세서에 개시된 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유류 종의 점라인으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 접목된 항체는 포함하지 않는다. 용어 "인간 항체"와 "완전한 인간 항체"는 동의어로서 사용된다.

[0099] [0090] 용어 "인간화된 항체"는 비-인간 항체의 CDR 도메인 밖의 아미노산의 일부, 대부분 또는 전부가 인간 면

역글로불린으로부터 유래된 상응하는 아미노산으로 치환된 항체를 말한다. 항체의 인간화된 형태의 일부 실시형태에서, CDR 도메인 밖의 아미노산의 일부, 대부분 또는 전부가 인간 면역글로불린으로부터의 아미노산으로 치환되고, 1 이상의 CDR 영역 내의 아미노산의 일부, 대부분 또는 전부는 그대로 남는다. 아미노산의 작은 첨가, 결실, 삽입, 치환 또는 변형은 항체가 특정 항원에 결합하는 능력을 없애지 않는 한 허용된다. "인간화된 항체"는 원래 항체와 유사한 항원 특이성을 보유한다.

[0100] [0091] 본 명세서에서 용어 "탈면역화된" 또는 "탈면역화"는 예를 들어 인간 대상에서 그의 면역원성을 감소시키기 위해 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 변형되는 과정을 지칭한다. 예를 들어, 원래 항체로부터의 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL) 서열을 분석할 수 있고, 인간 T 세포 에피토프 "맵"은 상보성-결정영역(CDR) 및 서열 내의 다른 주요 잔기와 관련하여 에피토프의 위치를 나타내는 각 V 영역으로부터 생성될 수 있다. T 세포 에피토프 맵으로부터 개별 T 세포 에피토프는 최종 항체의 활성 변경 위험이 낮은 대안적인 아미노산 치환을 확인하기 위해 분석된다. 아미노산 치환의 조합을 포함하는 다양한 대안의 VH 및 VL 서열이 설계되고, 이들 서열은 후속하여 본 명세서에 개시된 진단 및 치료 방법에 사용하기 위해 다양한 FAM19A5-특이적 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 도입되고, 이어서 이들은 기능에 대한 시험을 한다. 이어서 변형된 V 및 인간 C 영역을 포함하는 완전한 중쇄 및 경쇄 유전자를 발현 벡터로 클로닝하고 후속 플라스미드를 전체 항체의 생성을 위해 세포주에 도입한다. 이어서, 항체를 적절한 생화학적 및 생물학적 분석에서 비교하고, 최적의 변이체를 확인한다. 본 명세서에 기재된 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법, 예를 들어 WO 98/52976 또는 WO 00/34317을 이용하여 항체를 탈면역화시킬 수 있다.

[0101] [0092] "키메라 항체"는 하나의 종으로부터 가변영역이 유래되고 다른 종으로부터 불변영역이 유래된 항체, 예컨대 마우스 항체로부터 가변영역이 유래되고 인간 항체로부터 불변영역이 유래된 항체를 말한다.

[0102] [0093] 본 명세서에서 용어 "교차-반응한다"는 상이한 종들로부터의 FAM19A5에 결합하는 본 명세서에 개시된 항체의 능력을 말한다. 예를 들어, 인간 FAM19A5에 결합하는 본 명세서에 개시된 항체는 또한 다른 종의 FAM19A5 (예를 들어 마우스 FAM19A5)에도 결합할 수 있다. 교차-반응성은 결합 분석(예를 들어 SPR, ELISA)에서 정제된 항원과의 특이적 반응성을 검출함으로써 또는 FAM19A5를 생리학적으로 발현하는 세포와의 결합, 또는 기능적 상호작용을 검출함으로써 측정될 수 있다. 교차-반응성을 결정하는 방법은 본 명세서에 개시된 표준 결합 분석, 예를 들어 BIACORE[®] 2000 SPR 기기(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 사용한 BIACORE[®] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 분석, 또는 유세포계수(flow cytometric) 기술을 포함한다.

[0103] [0094] 용어 "자연-발생"은 자연에서 발견될 수 있다는 것을 말한다. 예를 들어, 자연의 출처로부터 분리될 수 있고 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체(바이러스 포함)에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연-발생적이다.

[0104] [0095] 용어 "폴리펩티드"는 적어도 2개의 연속 연결된 아미노산 잔기를 포함하는 사슬을 말하며, 사슬의 길이에 상한은 없다. 단백질에서의 1 이상의 아미노산 잔기는, 제한되지는 않지만, 글리코실화, 포스포릴화 또는 이황화물 결합 형성과 같은 변형을 함유할 수 있다. "단백질"은 1 이상의 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0105] [0096] 본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함한다. 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있고, cDNA일 수 있다.

[0106] [0097] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 그것이 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 한 가지 타입의 벡터는 "플라스미드"이고, 이것은 추가의 DNA 세그먼트가 리게이션(ligation)될 수 있는 원형의 이중가닥 DNA 루프를 말한다. 다른 타입의 벡터는 추가의 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈에 리게이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정한 벡터(예를 들어 박테리아 복제 기원을 가진 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터)는 이들이 도입된 숙주세포에서 자가 복제할 수 있다. 다른 벡터(예를 들어 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주세포에 도입 시 숙주세포의 게놈에 통합될 수 있고, 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정한 벡터는 이들이 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본 명세서에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")로 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용성을 가진 발현 벡터는 주로 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드"와 "벡터"는 플라스미드가 벡터의 가장 흔히 사용되는 형태이기 때문에 상호 교환하여 사용될 수 있다. 그러나, 바이러스(예를 들어 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스) 벡터와 같은 다른 형태의 발현 벡터도 또한 포함되며, 이들은 동등한 기능을 수행한다.

[0107] [0098] 본 명세서에서, 용어 "재조합 숙주세포"(또는 간단히 "숙주세포")는 세포에 자연적으로 존재하지 않는 핵산을 포함하는 세포를 말하며, 재조합 발현 벡터가 도입된 세포일 수 있다. 이러한 용어는 특정한 해당 세포

뿐만 아니라 이러한 세포의 자손도 언급한다는 것이 이해되어야 한다. 돌연변이나 환경적 영향으로 인해 이어진 세대들에서는 특정한 변형이 일어날 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로 모 세포와 동일할 수 없지만 그래도 여전히 용어 "숙주세포"의 범위 내에 포함된다.

- [0108] [0099] 본 명세서에서, 용어 "연결된"은 2 이상의 분자의 회합을 말한다. 연결은 공유결합 또는 비-공유결합일 수 있다. 연결은 또한 유전자 연결(즉 재조합적으로 융합됨)일 수 있다. 이러한 연결은 화학적 공액결합(conjugation) 및 재조합 단백질 생성과 같은 당업계에 공지된 여러가지 기술을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0109] [0100] 본 명세서에서, 용어 "투여"는 당업자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템(delivery systems) 중 어느 것을 이용하여, 대상에게 치료제 또는 치료제를 포함하는 조성물을 물리적으로 주입하는 것을 말한다. 본 명세서에 개시된 항체의 바람직한 투여경로는 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 척추 또는 다른 비경구투여경로, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 것을 포함한다. 본 명세서에서, 용어 "비경구 투여"는 일반적으로 주사에 의한, 장(enteral) 및 국부적(topical) 투여 이외의 다른 투여방식을 의미하며, 제한되지는 않지만, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 림프내, 병소내, 낭내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내, 피내(intradermal), 기관지경(transtracheal), 피하(subcutaneous), 표피하, 관절내, 피막하, 척추내, 경막의 및 흉골내 주사 및 주입, 뿐만 아니라 생체내 전기천공을 포함한다. 대안적으로, 본 명세서에 개시된 항체는 비-비경구 경로를 통해서, 예컨대 국부적, 상피 또는 점막 투여경로를 통해서, 예를 들어 비내, 경구, 질, 직장, 설하 또는 국부적 경로를 통해서 투여될 수 있다. 또한, 투여는, 예를 들어 1회, 여러 번, 및/또는 한 번 이상의 연장된 기간에 걸쳐서 수행될 수 있다.
- [0110] [0101] 본 명세서에서, 용어 "치료한다", "치료하는" 및 "치료"는 질환과 관련된 증상, 합병증, 병태 또는 생화학적 지표의 진행, 발생, 심각성 또는 재발을 반전, 개선, 완화, 억제 또는 지연시킬 목적으로 대상에 대해 수행된 임의의 종류의 개입 또는 과정, 또는 대상에게 활성제를 투여하는 것을 말한다. 치료는 질환을 가진 대상 또는 질환을 갖지 않은 대상(예를 들어 예방을 위해)에 대해 이루어질 수 있다.
- [0111] [0102] 본 명세서에서, 용어 "대상"은 임의의 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어 포유류 및 비-포유류, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.
- [0112] [0103] 본 명세서에서 용어 "신경아교종의 발병(onset)" 또는 "반응성 신경아교종의 발병"은 신경아교종의 시작 또는 개시를 포함한다. 신경아교종은 예를 들어 외상, 뇌척수 손상, 뇌종양, 감염, 허혈(ischemia), 뇌졸중, 자가면역 반응, 및/또는 신경퇴행성 질환으로 인한 손상 또는 상해에 대한 반응으로 중추신경계에서 신경아교세포의 비특이성 반응 변화이며, 성상세포, 미세아교세포, 희소돌기아교세포(oligodendrocytes)를 포함한 여러 상이한 유형의 신경아교세포의 증식 또는 비대(hypertrophy)를 포함한다. 신경아교종의 발병은 흉터 형성으로 이어질 수 있으며, 이는 상처입거나 손상된 CNS의 부분에서 축삭 재생을 억제한다. 신경아교종 발병의 유해한 영향은 뉴런에 돌이킬 수 없는 또는 영구적인 손상 및/또는 주변 뉴런의 회복을 방지하는 것을 포함한다. 따라서, 용어 "신경아교종의 발병지연" 및 "반응성 신경아교종의 발병지연"은 신경아교종의 시작 또는 개시 및 이와 관련된 CNS의 유해 효과를 억제, 둔화, 저지 또는 예방하는 것을 포함한다.
- [0113] [0104] 본 명세서에서 용어 "반응성 성상세포의 과도한 증식"은 예를 들어, CNS 상해, 외상, 손상, 뇌척수 손상, 뇌종양, 감염, 허혈, 뇌졸중, 자가면역 반응 및/또는 신경퇴행성 질환으로부터 근처 뉴런의 파괴로 인한 성상세포 수의 비정상적인 증가를 포함한다. 반응성 성상세포의 과도한 증식은 흉터 형성을 포함하여 CNS에 유해한 영향을 줄 수 있는데, 이는 외상을 입거나 손상당한 CNS의 일부에서의 축삭 재생, 염증의 악화, 반응성 산소 종의 신경독성 수준의 생성 및 방출, 잠재적인 흥분독성 글루타메이트의 방출, 발작 발생(seizure genesis)에 대한 잠재적 기여, 혈액-뇌 장벽 기능의 손상(compromise), 외상과 뇌졸중 동안 세포독성 부종, 성상세포의 만성 사이토카인 활성화가 만성 통증에 기여할 가능성, 및 CNS 손상 후 2차 변성을 억제한다. Sofroniew, Michael V. (2009) *Trends in Neurosciences*, 32(12): 638-47; McGraw, J. et al., (2001) *Journal of Neuroscience Research* 63(2): 109-15; 및 Sofroniew, M. V. (2005) *The Neuroscientist* 11(5): 400-7. 따라서, 용어 "반응성 성상세포의 과도한 증식 억제"는 반응성 성상세포의 과도하거나 비정상적인 증식 및 이와 관련된 CNS의 유해한 영향을 억제, 둔화, 저하, 제한 또는 방지하는 것을 포함한다.
- [0114] [0105] 본 명세서에서 용어 "콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸"은 단백질 코어 및 콘드로이틴 설페이트로 구성된 프로테오글리칸을 포함한다. CSPG로도 알려진 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸은 발달 및 성체 CNS에 걸쳐 광범위하게 발현되는 세포외 매트릭스 분자이다. CSPG는 신경 발달 및 아교세포 흉터 형성에 중요한 역할을 하며, CNS에서 손상 후 축삭 재생을 억제한다. 알려진 CSPG는 아그레칸(CSPG1), 버시칸(CSPG2), 뉴로칸

(CSPG3), CSPG4(또는 뉴런-아교세포 항원 2(NG2)), CSPG5, SMC3(CSPG6, 염색체 3의 구조적 유지), 브레비칸(CSPG7) 및 CD44(CSPG8, 분화 44의 클러스터), 포스포칸뉴로칸(CSPG3)을 포함한다. Rhodes, K. E. 및 Fawcett, J. W. (2004) *Journal of Anatom.* 204(1): 33-48. 따라서, 용어 "콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 발현 감소"는 1 이상의 CSGP의 수준 하락, 억제, 감소, 또는 1 이상의 CSGP의 활성 감소 또는 불활성화를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 용어는 뉴로칸, NG2 또는 둘 모두의 수준을 하락, 억제, 감소시키거나, 뉴로칸, NG2 또는 둘 모두의 활성을 감소시키거나 불활성화시키는 것을 포함한다.

[0115] [0106] 본 명세서에서 용어 "뉴런"은 전기적 및 화학적 신호를 통해 정보를 처리하고 전송하는 전기적 여기 가능한 세포를 포함한다. 뉴런은 CNS의 뇌 및 척수 및 말초신경계(PNS)의 신경절(spinal cord)의 주요 구성요소이며, 서로 연결되어 신경 네트워크를 형성할 수 있다. 전형적인 뉴런은 세포체(소마), 수상돌기(dendrite) 및 축삭으로 구성된다. 뉴런의 소마(세포체)는 핵을 함유한다. 뉴런의 수상돌기는 뉴런에 대한 대부분의 입력이 발생하는 많은 가지를 갖는 세포 연장이다. 축삭은 소마에서 연장되는 더 미세한 케이블 같은 돌기이며, 신경신호를 소마에서 멀리 전달하고 특정 유형의 정보를 다시 소마로 전달한다. 용어 "뉴런의 재생장 촉진"은 바람직하게는 손상 또는 상해 후 뉴런을 자극, 촉진, 증가 또는 활성화시키는 것을 포함한다.

[0116] [0107] 본 명세서에서 용어 "c-fos"는 신경전달물질의 자극에 의해 빠르게 유도되는 원핵생물 c-fos를 포함한다. c-fos는 마우스 및 인간을 포함한 많은 종에 존재한다. c-fos 유전자 및 단백질은 공지되어 있고 특성화되어 있다. Curran, T, The c-fos proto-oncogene, pp 307-327(The Oncogene Handbook, Reddy EP *et al.*, (eds.) Elsevier) (1988) 참조. c-fos의 발현은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 노던 블롯, 정량적 PCR 또는 면역조직화학에 의해 결정될 수 있다. 용어 "c-fos의 발현 증가"는 c-fos mRNA, c-fos 단백질 또는 c-fos 단백질 활성 수준을 증가시키는 것을 포함한다.

[0117] [0108] 본 명세서에서 용어 "pERK"는 인산화된 세포의 신호-조절 키나제를 포함한다. 세포의 신호-조절 키나제 또는 ERK는 ERK1 및 ERK2를 포함하고, 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK) 패밀리의 멤버이다. ERK는 그것의 상류 키나제에 의해 인산화를 통해 활성화되어 pERK를 형성하고, 이는 이어서 하류 표적을 활성화시킨다. ERK는 학습 및 기억과 통증과민에 기초한 신경 및 시냅스 소성에 관여한다. Ji R.R. *et al.*, *Nat Neurosci* (1999) 2: 1114-1119. ERK 유전자, 단백질, 인산화 및 활성화는 공지되어 있고 특성화되며, ERK 및 pERK의 발현은 당업계에 공지된 방법(예를 들어, 노던 블롯, 정량적 PCR 또는 면역조직화학)에 의해 결정될 수 있다. Gao Y. J. 및 Ji R. R., *Open Pain J.* (2009) 2:11-17 참조. 용어 "pERK의 발현 증가"는 ERK mRNA, ERK 단백질 또는 pERK 활성의 수준을 증가시키는 것을 포함한다.

[0118] [0109] 본 명세서에서 용어 "GAP43"은 "성장 관련 단백질 43"으로도 알려져 있으며, 신경돌기 형성, 재생 및 소성을 촉진시키는 신경조직-특이적 단백질이다. Benowitz L.I. and Routtenberg A. (1997) *Trends in Neurosciences* 20(2): 84-91; Aarts L. H. *et al.*, (1998) *Advances in Experimental Medicine and Biology* 446: 85-106. 인간 GAP43은 GAP43 유전자에 의해 암호화된다. 인간 GAP43 폴리펩티드 서열(UniProt: KB-P17677) 및 폴리펩티드를 암호화하는 cDNA 서열은 당업계에 공지되어 있다. Kosik K. S. *et al.*, (1988) *Neuron* 1(2): 127-32; Ng S. C. *et al.*, (1988) *Neuron* 1(2): 133-9. GAP43의 발현은 당업계에 공지된 방법(예를 들어, 노던 블롯, 정량적 PCR 또는 면역조직화학)에 의해 결정될 수 있다. 용어 "뉴런에서 GAP43 증가"는 GAP43 mRNA, GAP43 단백질의 수준을 향상 또는 증가시키거나 또는 GAP43 단백질의 활성을 증가시키는 것을 포함한다.

[0119] [0110] 본 명세서에서, 용어 "치료적 유효량"은 대상의 질환 또는 장애를 "치료"하거나 또는 질환 또는 장애(예를 들어, 중추신경계 손상)의 위험, 잠재성, 가능성 또는 발생을 감소하는데 효과적인 약물을 단독으로 또는 다른 치료제와 조합된 양을 말한다. "치료적 유효량"은 질환 또는 장애 (예를 들어, 외상성 뇌손상 또는 본 명세서에 개시된 다른 질환과 같은 중추신경계 손상)를 갖고 있거나 가질 위험을 갖는 대상에게 약간의 개선 또는 이점을 제공하는 약물 또는 치료제의 양을 포함한다. 따라서, "치료적 유효량"은 질환의 위험, 잠재성, 가능성 또는 발생을 감소시키거나 또는 일부 완화, 경감시키고 및/또는 적어도 하나의 지표(예를 들어 반응성 신경아교증의 발병)를 감소시키고, 및/또는 질환 또는 장애의 적어도 하나의 임상 증상을 감소시키는 양이다.

[0120] II. 항-FAM19A5 항체

[0121] [0111] 본 발명에서는 특정 기능적 특징 또는 특성을 특징으로 하는 항체, 예를 들어 단클론성 항체를 개시한다. 예를 들어, 인간 FAM19A5에 특이적으로 결합하는 항체는 인간에서 면역성이 높은(즉, 탈면역화된) 영역 또는 잔기를 제거 및/또는 변형함으로써 돌연변이(예를 들어, 치환 또는 제거)되었다. 따라서, 본 명세서에 개시된 항체, 즉 항-FAM19A5 항체는 기준 항체(예를 들어, 탈면역화되지 않은 상응하는 항체, 예를 들어 1-65

항체)와 비교하여 인간 대상에 투여될 때 면역원성을 감소시켰다.

[0122] [0112] 또한, 본 명세서에 기재된 항체는 하기 기능적 특성 중 1 이상을 나타낸다:

[0123] (a) 10 nM 이하의 K_D 를 갖는 가용성 인간 FAM19A5에 결합하고;

[0124] (b) 10 nM 이하의 K_D 를 갖는 막 결합된 인간 FAM19A5에 결합하고;

[0125] (c) 반응성 신경아교증의 발병을 감소, 역전, 지연 및/또는 예방하고;

[0126] (d) 반응성 성상세포의 과도한 증식을 억제하고;

[0127] (e) 뉴로칸 및 뉴런-아교세포 항원 2(NG2)를 포함하는 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 발현을 감소시키고;

[0128] (f) 뉴런의 핵에서 c-fos 및 pERK의 발현을 증가시키고;

[0129] (g) 뉴런의 생존을 촉진하고;

[0130] (h) 뉴런에서 GAP43의 발현을 증가시키고; 및

[0131] (i) 축삭의 재성장을 촉진한다.

[0132] [0113] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 인간 대상에게 투여될 때 기준 항체(예를 들어, 탈면역화되지 않은 상응하는 항체, 예를 들어, 항체 1-65)에 비해 항체가 덜 면역원성이 되도록 면역화되었다. 일부 실시형태에서, 항체의 면역원성은 기준 항체(예를 들어, 면역화되지 않은, 상응하는 항체, 예를 들어 항체 1-65)와 비교하여 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 100% 감소되었다. 일부 실시형태에서, 탈면역화 과정은 항체의 결합 친화성을 변경시키지 않는다.

[0133] [0114] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는, 예를 들어 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M(1 nM) 이하, 10^{-10} M(0.1 nM) 이하, 10^{-11} M 이하, 또는 10^{-12} M 이하, 예를 들어 10^{-12} M 내지 10^{-7} M, 10^{-11} M 내지 10^{-7} M, 10^{-10} M 내지 10^{-7} M, 또는 10^{-9} M 내지 10^{-7} M, 예를 들어 10^{-12} M, 5×10^{-12} M, 10^{-11} M, 5×10^{-11} M, 10^{-10} M, 5×10^{-10} M, 10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 10^{-8} M, 5×10^{-8} M, 10^{-7} M, 또는 5×10^{-7} M의 K_D 를 갖는 높은 친화성으로 가용성 인간 FAM19A5 또는 막-결합 인간에 특이적으로 결합한다. 다양한 종의 인간 FAM19A5에 대한 항체의 결합 능력을 평가하는 표준 분석은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯, 및 RIA를 포함한다. 적합한 분석들이 실시예에 상세히 설명된다. 항체의 결합 동력학(예를 들어 결합 친화성)은 또한 ELISA, BIACORE® 분석 또는 KinExA과 같은 당업계에 공지된 표준 분석에 의해 평가될 수 있다. FAM19A5의 기능적 특성(예를 들어 리간드 결합)에 대한 항체의 효과를 평가하는 분석이 아래 및 실시예에 더 상세히 설명된다.

[0134] [0115] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는, 예를 들어 ELISA에 의해 결정되었을 때, 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M(10 nM) 이하, 10^{-9} M(1 nM) 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-12} M 내지 10^{-7} M, 10^{-11} M 내지 10^{-7} M, 10^{-10} M 내지 10^{-7} M, 10^{-9} M 내지 10^{-7} M, 또는 10^{-8} M 내지 10^{-7} M의 K_D 를 갖는 가용성 인간 FAM19A5와 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 10 nM 이하, 예를 들어 0.1 내지 10 nM, 0.1 내지 5 nM, 0.1 내지 1 nM, 0.5 내지 10 nM, 0.5 내지 5 nM, 0.5 내지 1 nM, 1 내지 10 nM, 1 내지 5 nM, 또는 5 내지 10 nM의 K_D 를 갖는 가용성 FAM19A5와 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는, ELISA에 의해 결정되었을 때, 약 1 pM, 2 pM, 3 pM, 4 pM, 5 pM, 6 pM, 7 pM, 8 pM, 9 pM, 10 pM, 20 pM, 30 pM, 40 pM, 50 pM, 60 pM, 70 pM, 80 pM, 90 pM, 100 pM, 200 pM, 300 pM, 400 pM, 500 pM, 600 pM, 700 pM, 800 pM, 또는 900 pM, 또는 약 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 또는 9 nM, 또는 약 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 또는 90 nM의 K_D 를 갖는 가용성 인간 FAM19A5와 특이적으로 결합한다.

[0135] [0116] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는, 예를 들어 ELISA에 의해 결정될 때, 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M(10 nM) 이하, 10^{-9} M(1 nM) 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-12} M 내지 10^{-7} M, 10^{-11} M 내지 10^{-7} M, 10^{-10} M 내지 10^{-7} M, 10^{-9} M 내지

10^{-7} M, 또는 10^{-8} M 내지 10^{-7} M의 K_D 를 갖는 막 결합된 인간과 특이적으로 결합한다. 특정 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는, ELISA에 의해 결정될 때, 10 nM 이하, 예를 들어 0.1 내지 10 nM, 0.1 내지 5 nM, 0.1 내지 1 nM, 0.5 내지 10 nM, 0.5 내지 5 nM, 0.5 내지 1 nM, 1 내지 10 nM, 1 내지 5 nM, 또는 5 내지 10 nM의 K_D 를 갖는 막-결합된 인간 FAM19A5와 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는, ELISA에 의해 결정될 때, 약 1 pM, 2 pM, 3 pM, 4 pM, 5 pM, 6 pM, 7 pM, 8 pM, 9 pM, 10 pM, 20 pM, 30 pM, 40 pM, 50 pM, 60 pM, 70 pM, 80 pM, 90 pM, 100 pM, 200 pM, 300 pM, 400 pM, 500 pM, 600 pM, 700 pM, 800 pM, 또는 900 pM, 또는 약 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 또는 9 nM, 또는 약 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 또는 90 nM의 K_D 를 갖는 막-결합된 인간 FAM19A5와 특이적으로 결합한다.

[0136] [0117] 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 신경아교종의 발병을 지연 또는 억제할 수 있고, 예를 들면 외상, 뇌척수 손상, 뇌종양, 감염, 허혈, 뇌졸중, 자가면역 반응 및/또는 신경퇴행성 질환으로 인한 손상 또는 상해에 반응하여 중추신경계(CNS, 예를 들어 뇌 및/또는 척수)에서 신경아교세포의 비특이적 반응성 변화의 개시 또는 발병을 지연, 둔화 또는 제한할 수 있다.

[0137] [0118] 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 반응성 성상세포의 과도하거나 비정상적인 증식 및 이와 관련된 CNS의 유해한 효과를 지연, 억제, 둔화, 제한, 저하 또는 예방할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 예를 들어 CNS 손상, 외상, 부상, 뇌척수 손상, 뇌종양, 감염, 허혈, 뇌졸중, 자가면역 반응 및/또는 신경퇴행성 질환으로부터 뉴런의 파괴로 인한 성상세포 수의 비정상적인 증가를 억제 또는 예방할 수 있고, CNS에서 흥터 형성을 억제 또는 예방할 수 있고, 반응성 산소 종의 신경독성 수준의 방출 또는 잠재적으로 흥분독성 글루타메이트의 방출을 억제 또는 감소시킬 수 있고, CNS 손상 후 발작, 통증 및/또는 2차 변성을 감소하거나 억제할 수 있다. 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 바람직하게는 CNS 손상 또는 상해 후 뉴런 및/또는 축삭의 재생장을 촉진, 자극, 증가 또는 활성화시킬 수 있다.

[0138] [0119] 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 단백질 코어 및 콘드로이틴 설페이트(CSGP), 이를테면 아그레칸(CSPG1), 버시칸(CSPG2), 뉴로칸(CSPG3), CSPG4(또는 뉴런-아교세포 항원 2(NG2)), CSPG5, SMC3(CSPG6, 염색체 3의 구조적 유지), 브레비칸(CSPG7), CD44(CSPG8, 분화 클러스터 44) 및 포스포판칸뉴로칸(CSPG3)으로 구성된 프로테오글리칸을 포함하는 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 발현을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 뉴로칸 및/또는 NG2의 수준, 또는 뉴로칸 및/또는 NG2의 활성을 억제, 하락 또는 감소시킨다.

[0139] [0120] 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 뉴런의 핵에서 c-fos 및 pERK의 발현을 증가시킬 수 있고, 이를테면 c-fos 및 pERK의 mRNA, 단백질 및/또는 단백질 활성을 증가시킬 수 있다. 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 또한 GAP43 mRNA, GAP43 단백질의 발현 수준을 증가 또는 향상시키거나 GAP43 단백질 활성을 증가 또는 향상시킬 수 있다.

[0140] [0121] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 여기서 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 SEQ ID NOs: 5, 6 및 7에 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하고, 이들 각각은 임의로 1, 2 또는 3개의 돌연변이를 포함하고; 여기서 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 SEQ ID NOs: 8, 9 및 10의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하고, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 중 적어도 하나는 1, 2 또는 3개의 돌연변이를 포함하고; 그리고 여기서 항체는 SEQ ID NO: 11에 제시된 VH 및 SEQ ID NO: 12에 제시된 VL을 포함하는 기준 항체와 비교하여 인간 대상에서 감소된 면역원성을 갖는다.

[0141] [0122] 일부 실시형태에서, 항체에 포함된 돌연변이는 치환, 결실 및/또는 삽입이다. 일 실시형태에서, 돌연변이는 치환, 예를 들어 보존적 치환이다. 본 발명에서 사용된 "보존적 치환"(보존적 대체라고도 지칭됨)은 주어진 아미노산을 유사한 생화학적 특성(예를 들어, 전하, 소수성 및 크기)을 갖는 상이한 아미노산으로 변화시키는 아미노산 치환을 의미한다. 아미노산을 분류하는 방법에는 여러 가지가 있지만, 종종 구조와 R기의 일반적인 화학적 특성을 기준으로 6개의 주요 그룹으로 분류된다.

[0142] [표 2] 아미노산 분류

분류	아미노산
지방족	글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신
히드록실 또는 황/셀레늄-함유	세린, 시스테인, 셀레노시스테인, 트레오닌, 메티오닌
시클릭	프롤린
방향족	페닐알라닌, 티로신, 트립토판
염기성	히스티딘, 리신, 아르기닌
산성 및 그의 아미드	아스파르테이트, 글루탐에이트, 아스파라긴, 글루타민

[0143]

[0144]

[0123] 반대로, 라디칼 치환 또는 라디칼 대체는 상이한 물리화학적 특성을 갖는 최종 아미노산으로 초기 아미노산을 교환하는 아미노산 치환이다. 특정 실시형태에서, FAM19A5 항체에서의 아미노산 돌연변이는 라디칼 치환이다. 다른 실시형태에서, FAM19A5 항체에서의 아미노산 돌연변이는 보존적 치환 및 라디칼 치환의 조합이다.

[0145]

[0124] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체의 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열(GSASYITAATIDA)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열(SYQMG)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 6에 제시된 아미노산 서열(VINKSGSDTS)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 6에 제시된 아미노산 서열을 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 1에서 발린이 지방족 아미노산에 치환된 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 지방족 아미노산은 알라닌을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 5에서 세린이 지방족 아미노산에 치환된 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 지방족 아미노산은 글리신을 포함한다.

[0146]

[0125] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체의 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열(SGGGSSGYGYG)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열을 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 4에서 글리신이 지방족 아미노산에 치환된 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 지방족 아미노산은 알라닌, 발린, 류신 또는 이소류신을 포함한다. 특정 실시형태에서, 지방족 아미노산은 알라닌이다.

[0147]

[0126] 일부 실시형태에서, 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열(WNDKRPS)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열을 1, 2, 3 또는 4개의 돌연변이와 함께 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 9의 아미노산 1에서 트립토판이 염기성 아미노산으로 치환된 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 염기성 아미노산은 아르기닌, 히스티딘 또는 리신을 포함한다. 특정 실시형태에서, 염기성 아미노산은 리신이다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 9의 아미노산 2에서 아스파라긴이 산성 아미노산으로 치환된 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 산성 아미노산은 아스파르트산 또는 글루탐산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 9의 아미노산 3에서 아스파르트산이 히드록실 또는 황/셀레늄 함유 아미노산으로 치환된 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 히드록실 또는 황/셀레늄 함유 아미노산은 세린을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 9의 아미노산 4에서 리신이 산성 아미노산으로 치환된 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 산성 아미노산은 아스파르트산 또는 글루탐산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 산성 아미노산은 글루탐산이다.

[0148]

[0127] 일부 실시형태에서, 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열(GNDDYSSDSGYGVG)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 1, 2 또는 3개의 돌연변이와 함께 포함한다.

[0149]

[0128] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 인간화된다. 다른 실시형태에서, 인간화된 항-FAM19A5는 인간 항체의 프레임워크 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 항체의 프레임워크 영역(즉, VH의 FR1, FR2, FR3 및 FR4 및/또는 VL의 FR1, FR2, FR3 및 FR4) 내에 1 이상(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 이상)의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 VH의 FR1 내에 돌연변이를 포함한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 11의 잔기 21에서 아미노산 치환(예를 들어, 발린이 지방족 아미노산, 예를 들어, 세린으로)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 11의 잔기 19에서 아미노산 치환(예를 들어, 세린이 염기성 아미노산, 예를 들어 아르기닌으로)을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항

-FAM19A5 항체는 VH의 FR2 내에 1 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 11의 잔기 49에서 아미노산 치환(예를 들어, 글리신이 히드록실 또는 황/셀레늄 함유 아미노산, 예를 들어 세린으로)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 VH의 FR3 내에 1 이상의 돌연변이(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 돌연변이)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 11의 잔기 79(예를 들어 발린이 염기성 아미노산, 예를 들어 리신으로), 잔기 80(예를 들어 아르기닌이 방향족 아미노산, 예를 들어 티로신으로), 잔기 83(예를 들어 리신이 히드록실 또는 황/셀레늄-함유 아미노산, 예를 들어 메티오닌으로), 잔기 85(예를 들어 아스파라긴이 히드록실 또는 황/셀레늄-함유 아미노산, 예를 들어 세린으로), 잔기 92(예를 들어 글리신이 지방족 아미노산, 예를 들어 알라닌으로) 및/또는 잔기 93(예를 들어 트레오닌이 지방족 아미노산, 예를 들어 발린으로)에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0150] [0129] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 VL의 FR1 내에 돌연변이(예를 들어, 1개 또는 2개의 돌연변이)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 잔기 16에서 아미노산 치환(예를 들어, 발린이 지방족 아미노산, 예를 들어 알라닌으로)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 12의 잔기 17에서 아미노산 치환(예를 들어, 리신을 염기성 아미노산, 예를 들어 아르기닌으로)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 VL의 FR2 내에 1 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 12의 아미노산 잔기 37의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 VL의 FR3 내에 돌연변이를 포함한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 12의 아미노산 잔기 64에서 치환(예를 들어, 리신을 히드록실 또는 황/셀레늄 함유 아미노산, 예를 들어 세린으로)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 12의 잔기 73에서 치환(예를 들어, 트레오닌이 히드록실 또는 황/셀레늄-함유 아미노산, 예를 들어 세린으로)을 포함한다.

[0151] [0130] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 여기서 (i) 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iii) 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iv) 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (v) 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 14에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; 및 (vi) 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0152] [0131] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 그리고 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 여기서 (i) 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iii) 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iv) 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (v) 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; 및 (vi) 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0153] [0132] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 그리고 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 여기서 (i) 중쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 중쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iii) 중쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (iv) 경쇄 CDR1은 SEQ ID NO: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (v) 경쇄 CDR2는 SEQ ID NO: 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; 및 (vi) 경쇄 CDR3은 SEQ ID NO: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0154] [0133] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고. 및/또는 여기서 VL은 SEQ ID NO: 12에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 항체는 SEQ ID NO: 11에 제시된 VH 및 SEQ ID NO: 12에 제시된 VL을 포함하는 기준 항체와 비교하여 감소된 면역원성을 갖는다.

[0155] [0134] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 17에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 및/또는 여기서 VL은 SEQ ID NO: 18에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도

도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 항체는 SEQ ID NO: 11에 제시된 VH 및 SEQ ID NO: 12에 제시된 VL을 포함하는 기준 항체에 비하여 감소된 면역원성을 갖는다.

[0156] [0135] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 30에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고 및/또는 여기서 VL은 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 항체는 SEQ ID NO: 11에 제시된 VH 및 SEQ ID NO: 12에 제시된 VL을 포함하는 기준 항체에 비하여 감소된 면역원성을 갖는다.

[0157] [0136] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 31에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고 및/또는 여기서 VL은 SEQ ID NO: 32에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 항체는 SEQ ID NO: 11에 제시된 VH 및 SEQ ID NO: 12에 제시된 VL을 포함하는 기준 항체와 비교하여 감소된 면역원성을 갖는다.

[0158] [0137] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하는 기준 항체와 교차-경쟁하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 VL은 SEQ ID NO: 12에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 VH 및 VL을 포함하는 기준 항체와 동일한 인간 FAM19A5 에피토프에 결합하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 VL은 SEQ ID NO: 12에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간 FAM19A5 에피토프는 SEQ ID NO: 15에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간 FAM19A5 에피토프는 아미노산 GCDLLINR (SEQ ID NO: 16)을 포함한다.

[0159] [0138] 특정 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 기준 항체(예를 들어, 1-65 항체)를 갖는 인간 FAM19A5 에피토프와 결합하기 위해(또는 결합을 억제하기 위해) 교차-경쟁한다.

[0160] [0139] 특정 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 이러한 기준 항체(예를 들어, 1-65 항체)의 인간 FAM19A5와의 결합을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 까지 억제한다. 경쟁 항체는 동일한 에피토프, 중첩 에피토프 또는 인접한 에피토프에 결합한다(예를 들어 입체장애에 의해 입증됨). 2개의 항체가 표적에 결합하기 위해 서로 경쟁하는지 여부는 RIA 및 EIA와 같이 당업계에 공지된 경쟁 실험을 이용하여 결정될 수 있다.

[0161] [0140] 두 항체가 동일한 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하는 기술은 예를 들어 에피토프 맵핑 방법, 예를 들어 에피토프의 원자 분해능을 제공하는 항원:항체 복합체 결정의 x-선 분석, 수소/중수소 교환 질량 분석법(HDX-MS), 및 항원 단편에 대한 항체의 결합 또는 항원의 돌연변이된 변이를 모니터링하는 방법을 포함하고, 여기서 항원 서열 내의 아미노산 잔기의 변형으로 인한 결합 손실은 종종 에피토프 성분의 표시인 에피토프 맵핑을 위한 계산조합 방법으로 간주된다.

[0162] [0141] 본 발명의 방법에 유용한 항-FAM19A5 항체는, 예를 들어 항체를 인간 FAM19A5의 단편에 결합시킴으로써 결정된 바와 같이 성숙한 인간 FAM19A5의 1 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 CDMLPCLEGEGCDLLINRSG의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 15 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 90 내지 109), 예를 들어 SEQ ID NO: 15의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산을 갖는 에피토프에 위치하는 단편에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 1 이상의 아미노산 잔기 99 내지 107(즉, EGCDLLINR), 예를 들어 아미노산 잔기 102, 103, 105 및 107(즉, DL-I-R)에 결합한다.

[0163] [0142] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 에피토프는 SEQ ID NO: 15와 적어도 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 그의 천연 형태(즉, 비변성)로 SEQ ID NO: 15 또는 이의 단편에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 글리코실화 및 글리코실화되지 않은 인간 FAM19A5 둘 모두에

결합한다.

[0164] [0143] 일부 실시형태에서, 본 발명은 예를 들어 면역 분석(예를 들어 면역 분석법, 예, ELISA), 표면 플라즈몬 공명 또는 동역학적 배제 분석에 의해 측정될 때 FAM19A5 패밀리의 다른 단백질에 비해 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 더 높은 친화도로 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 예를 들어 면역 분석에 의해 측정되는 바와 같이 FAM19A 패밀리에서 다른 단백질과의 교차 반응성 없이 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 결합한다.

[0165] [0144] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 천연 항체가 아니거나 자연-발생 항체가 아니다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 더 많은, 더 적은 또는 다른 유형의 번역(translation) 후 변형을 가짐으로써 자연적으로 발생하는 항체의 것들과는 다른 번역 후 변형을 갖는다.

[0166] [0145] 본 개시 내용의 예시적인 항체의 VH 및 VL CDR의 아미노산 서열은 각각 표 3 및 4에 제공된다. VH 및 VL 아미노산 서열은 각각 표 5 및 6에 제공된다.

[0167] [표 3] 가변 중쇄 CDR 아미노산 서열(Kabat를 이용하여 식별)

Antibody	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Anti-FAM19A5 ("SS01-13")	SYQMG (SEQ ID NO: 5)	VINKSGSDTS (SEQ ID NO: 6)	GSASYITAATIDA (SEQ ID NO: 7)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13-s5")	SYQMG (SEQ ID NO: 5)	AINKSGSDTS (SEQ ID NO: 27)	GSASYITAATIDA (SEQ ID NO: 7)
Anti-FAM19A5 ("S5-SG")	SYQMG (SEQ ID NO: 5)	AINKGGSDTS (SEQ ID NO: 28)	GSASYITAATIDA (SEQ ID NO: 7)
Reference anti-FAM19A5 Antibody ("1-65")	SYQMG (SEQ ID NO: 5)	VINKSGSDTS (SEQ ID NO: 6)	GSASYITAATIDA (SEQ ID NO: 7)

[0168]

[0169] [표 4] 가변 경쇄 CDR 아미노산 서열(Kabat를 이용하여 식별)

Antibody	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Anti-FAM19A5 ("SS01-13")	SGGASSGYGYG (SEQ ID NO: 13)	KDDERPS (SEQ ID NO: 14)	GNDDYSSDSGYVGV (SEQ ID NO: 10)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13-s5")	SGGASSGYGYG (SEQ ID NO: 13)	KDSERPS (SEQ ID NO: 29)	GNDDYSSDSGYVGV (SEQ ID NO: 10)
Anti-FAM19A5 ("S5-SG")	SGGASSGYGYG (SEQ ID NO: 13)	KDSERPS (SEQ ID NO: 29)	GNDDYSSDSGYVGV (SEQ ID NO: 10)
Reference anti-FAM19A5 Antibody ("1-65")	SGGGSSGYGYG (SEQ ID NO: 8)	WNDKRPS (SEQ ID NO: 9)	GNDDYSSDSGYVGV (SEQ ID NO: 10)

[0170]

[0171] [표 5] 가변 중쇄 아미노산 서열

Antibody	VH Amino Acid Sequence (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13")	AVTLDESGGGLQTPGGALSLCKASGFTFSSYQMGWVRQAPGKGLEWVGVINKSGSDTSY GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLLRAEDTAVYFCAKGSASYITAATIDAWGHGTEVIV SS (SEQ ID NO: 17)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13-s5")	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFTFSSYQMGWVRQAPGKGLEWVSAINKSGSDTSY GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLLRAEDTAVYFCAKGSASYITAATIDAWGHGTEVIV SS (SEQ ID NO: 30)
Anti-FAM19A5 ("S5-SG")	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFTFSSYQMGWVRQAPGKGLEWVSAINKSGSDTSY GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLLRAEDTAVYFCAKGSASYITAATIDAWGHGTEVIV SS (SEQ ID NO: 31)
Reference anti-FAM19A5 Antibody ("1-65")	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYQMGWVRQAPGKGLEWVGVINKSGSDTSY GSAVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLLRAEDTGTIFYCAKGSASYITAATIDAWGHGTEVIV SS (SEQ ID NO: 11)

[0172]

[0173] [표 6] 가변 경쇄 아미노산 서열

Antibody	VL Amino Acid Sequence (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13")	ALTQPSSVSANPGETVRITCSGGASSGYGYGWYQQKPSSAPLTVIYKDDERPSDIPSRFS GSSSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFCGNDDYSSDSGYVGVFGAGTTTLTVL (SEQ ID NO: 18)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13-s5")	ALTQPSSVSANPGETARITCSGGASSGYGYGWYQQKPSSAPLTVIYKDSERPSDIPSRFS GSSSGSTHTLTISGVQAEDEAVYFCGNDDYSSDSGYVGVFGAGTTTLTVL (SEQ ID NO: 32)
Anti-FAM19A5 ("S5-SG")	ALTQPSSVSANPGETARITCSGGASSGYGYGWYQQKPSSAPLTVIYKDSERPSDIPSRFS GSSSGSTHTLTISGVQAEDEAVYFCGNDDYSSDSGYVGVFGAGTTTLTVL (SEQ ID NO: 32)
Reference anti-FAM19A5 Antibody ("1-65")	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGSSGYGYGWYQQKSPSSAPLTVIYWNDRPSDIPSRFSGSKSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFCGNDDYSSDSGYVGVFGAGTTTLTVL (SEQ ID NO: 12)

[0174]

[0146] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변영역(VH)은 SEQ ID NO: 17의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 및/또는 경쇄 가변영역(VL)은 SEQ ID NO: 18의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열에 제시된 VH를 포함하고, 및/또는 VL은 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함한다.

[0176]

[0147] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변영역(VH)은 SEQ ID NO: 30의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 및/또는 경쇄 가변영역(VL)은 SEQ ID NO: 32의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열에 제시된 VH를 포함하고, 및/또는 VL은 SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함한다.

[0177]

[0148] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변영역(VH)은 SEQ ID NO: 31의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 및/또는 경쇄 가변영역(VL)은 SEQ ID NO: 32의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 SEQ ID NO: 31의 아미

노산 서열에서 제시된 VH를 포함하고, 및/또는 VL은 SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0178] [0149] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변영역은 SEQ ID NO: 17, 30 또는 31에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 및/또는 경쇄 가변영역은 SEQ ID NO: 18 또는 32에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 VH는 SEQ ID NO: 17, 30 또는 31의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 그리고 VL은 SEQ ID NO: 18 또는 32의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.
- [0179] [0150] 본 명세서에 기술된 VH 도메인 또는 이의 1 이상의 CDR은 중쇄, 예를 들어 전장 중쇄를 형성하기 위한 불변의 도메인에 연결될 수 있다. 유사하게, 본 명세서에 기재된 VL 도메인 또는 이의 1 이상의 CDR은 경쇄, 예를 들어 전장 경쇄를 형성하기 위한 불변 도메인에 결합될 수 있다. 전장 중쇄 및 전장 경쇄가 결합하여 전장 항체를 형성한다.
- [0180] [0151] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 항체 경쇄 및 중쇄, 예를 들어 별도의 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체를 제공한다. 경쇄와 관련하여, 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 경쇄는 카파 경쇄이다. 다른 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 경쇄는 람다 경쇄이다. 또 다른 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 경쇄는 인간 카파 경쇄 또는 인간 람다 경쇄이다. 특정 실시형태에서, FAM19A5 폴리펩티드(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 본 명세서에 기재된 임의의 VL 또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하고, 여기서 경쇄의 불변영역은 인간 카파 경쇄 불변영역의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, FAM19A5 폴리펩티드(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 본 명세서에 기재된 VL 또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하고, 여기서 경쇄의 불변영역은 인간 람다 경쇄 불변영역의 아미노산 서열을 포함한다. 인간 불변영역 서열의 비제한적 예는 당업계에 기술되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제 5,693,780 호 및 카바트(Kabat) EA *et al.*, (1991)을 참조한다.
- [0181] [0152] 중쇄와 관련하여, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄는 알파(α), 델타(δ), 입실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ) 중쇄일 수 있다. 다른 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄는 인간 알파(α), 델타(δ), 입실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ) 중쇄를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 본 명세서에 기재된 항체는 본 명세서에 기재된 VH 또는 VH CDR 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하고, 여기서 중쇄의 불변영역은 인간 감마(γ) 중쇄 불변영역의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 본 명세서에 기재된 항체는 본 명세서에 기재된 VH 또는 VH CDR 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하고, 여기서 중쇄의 불변영역은 본 명세서에 기술되거나 당업계에 공지된 인간 중쇄의 아미노산을 포함한다. 인간 불변영역 서열의 비제한적인 예는 당업계에 기술되어 있으며, 예를 들어 미국특허 제 5,693,780 호 및 Kabat EA *et al.*, (1991)을 참조한다.
- [0182] [0153] 일부 실시형태에서, FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 본 명세서에 기재된 항체는 VH 또는 VH CDR 및 VL 및 VL CDR을 포함하는 VL 도메인 및 VH 도메인을 포함하고, 여기서 불변영역은 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 면역글로불린 분자 또는 인간 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 면역글로불린 분자의 불변영역의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 특정 실시형태에서, FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 본 명세서에 기재된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인 및 VH 도메인을 포함하고, 여기서 불변영역은 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 면역글로불린 분자, 면역글로불린 분자의 임의의 서브클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)의 불변영역의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 불변영역은 서브클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4) 및 동종이형(예를 들어, G1m, G2m, G3m 및 nG4m) 및 그의 변이체를 포함하여 자연 발생하는 인간 IgG의 불변영역의 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, Vidarsson G. *et al.*, *Front Immunol.* 5:520 (2014년 10월 20일 온라인 게시됨) 및 Jefferis R. 및 Lefranc MP, *mAbs* 1:4, 1-7 (2009) 참조. 일부 실시형태에서, 불변영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변영역의 아미노산 서열 또는 그의 변이체를 포함한다.
- [0183] [0154] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 Fc 이펙터 기능, 예를 들어 보체-의존성 세포독성(CDC) 및/또는 항체-의존성 세포성 포식작용(ADCP)을 갖지 않는다. 이펙터 기능은 Fc 영역에 의해 매개되고, Fc 영역의 CH2 도메인에서 힌지 영역에 가장 근접한 잔기는 선천 면역계의 이펙터 세포 상에서 C1q(보체)

및 IgG-Fc 수용체(FcγR)에 대해 상당히 증착된 결합 부위를 포함하므로 항체의 이펙터 기능을 담당한다. 또한, IgG2 및 IgG4 항체는 IgG1 및 IgG3 항체보다 더 낮은 수준의 Fc 이펙터 기능을 갖는다. 항체의 이펙터 기능은 다음과 같이 당업계에서 공지된 상이한 접근법에 의해 감소되거나 회피될 수 있다: (1) Fc 영역을 결여한 항체 단편(예를 들어 Fab, F(ab')₂, 단쇄 Fv(scFv), 또는 모노머 VH 또는 VL 도메인으로 구성된 sdAb)의 사용; (2) 당이 부착된 잔기의 결실 또는 변경, 효소적으로 당을 제거, 글리코실화 억제제의 존재하에 배양된 세포에서 항체의 생성, 또는 단백질을 글리코실화할 수 없는 세포(예를 들어 박테리아 숙주세포)에서의 항체의 발현(박테리아 숙주세포, 미국 특허공개 제 20120100140 호 참조)에 의해 생성될 수 있는, 무글리코실화 항체의 생성; (3) 이펙터 기능이 감소된 IgG 아형으로부터의 Fc 영역의 이용(예를 들어 IgG2 또는 IgG4 항체로부터의 Fc 영역 또는 IgG2 또는 IgG4 항체로부터의 CH2 도메인을 포함하는 키메라 Fc 영역, 예를 들어 미국 특허공개 제 20120100140 호 및 Lau C *et al.*, *J Immunol.* 191:4769-4777 (2013) 참조); 및 (4) Fc 기능이 감소되거나 없는 돌연변이를 가진 Fc 영역의 생성(미국 특허공개 제 20120100140 호 및 거기 인용된 미국출원 및 PCT 출원들과 An *et al.*, *mAbs* 1:6, 572-579 (2009) 참조).

[0184] [0155] 그러므로, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 단쇄 Fv(scFv), 또는 단량체성 VH 또는 VL 도메인으로 구성된 sdAb이다. 이러한 항체 단편은 당업계에 공지되어 있으며 상기 설명되어 있다.

[0185] [0156] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 단쇄 Fv이다. 예시적인 항-FAM19A5 scFv의 아미노산 서열은 하기 표 7에 제공된다.

[0186] [표 7] 항-FAM19A5 scFv의 아미노산 서열

ScFv Antibody	VL Amino Acid Sequence (SEQ ID NO)
Reference Anti-FAM19A5 ("1-65") scFv	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSSGYGYGWYQQKSPSSAPLTVIYWNDKRPSDIPSRFSGSKSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFCGNDDYSSDSGYVGVFGAGTTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYQMGWVRQAPGKGLEWVGVINKSGSDTSYGS AVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTGT YFCAKGSASYITAATIDAWHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 19)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13") scFv	ALTQPSSVSANPGETVRITCSGGASSGYGYGWYQQKSPSSAPLTVIYKDDERPSDIPSRFSGSSSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFCGNDDYSSDSGYVGVFGAGTTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYQMGWVRQAPGKGLEWVGVINKSGSDTSYGS AVKGRATISRDNQSTLYLQMNMLRAEDTAVYFCAKGSASYITAATIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 20)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13-s5") scFv	ALTQPSSVSANPGETARITCSGGASSGYGYGWYQQKSPSSAPLTVIYKDSERPSDIPSRFSGSSSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFCGNDDYSSDSGYVGVFGAGTTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALRLSKASGFTFSSYQMGWVRQAPGKGLEWVSAINKSGSDTSYGS AVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGSASYITAATIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 33)
Anti-FAM19A5 ("S5-SG") scFv	ALTQPSSVSANPGETARITCSGGASSGYGYGWYQQKSPSSAPLTVIYKDSERPSDIPSRFSGSSSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFCGNDDYSSDSGYVGVFGAGTTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALRLSKASGFTFSSYQMGWVRQAPGKGLEWVSAINKGGSDTSYGS AVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGSASYITAATIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 34)

[0187] [0157] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 Fc 이펙터 기능이 감소되거나 없는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 불변영역은 인간 IgG2 또는 IgG4의 Fc 영역의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 IgG2/IgG4 이소타입이다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 IgG4 이소타입의 IgG 항체로부터의 CH2 도메인과 IgG1 이소타입의 IgG 항체로부터의 CH3 도메인을 포함하는 키메라 Fc 영역, 또는 IgG2로부터의 힌지 영역과 IgG4로부터의 CH2 영역을 포함하는 키메라 Fc 영역, 또는 감소되거나 없는 Fc 기능을 가져오는 돌연변이를 가진 Fc 영역을 포함한다. Fc 이펙터 기능이 감소되거나 없는 Fc 영역은 당업계에 공지된 것들을 포함한다(예를 들어, Lau C. *et al.*, *J Immunol.* 191:4769-4777 (2013); An *et al.*, *mAbs* 1:6, 572-579 (2009); 및 미국 특허공개 제 20120100140 호 및 거기 인용된 미국특허와 특허공개 및 PCT 공개들을 참조). 또한, Fc 이펙터 기능이 감소되거나 없는 Fc 영역은 당업자에 의해 쉽게 제조될 수 있다.

[0189] III. 핵산 분자

[0190] [0158] 본 발명의 다른 양태는 본 명세서에서 기술된 항체 중 어느 하나를 암호화하는 1 이상의 핵산 분자에 관한 것이다. 핵산은 전체 세포에, 세포 용해물에, 또는 부분적으로 정제된 형태나 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알칼리성/SDS 처리, CsCl 밴딩(banding), 칼럼 크로마토그래피, 제한효소, 한천젤

(agarose gel) 전기영동 및 당업계에 공지된 다른 기술들을 포함하는 표준 기술에 의해, 다른 세포성분 또는 다른 오염물, 예를 들어 다른 세포 핵산(예를 들어 다른 염색체 DNA, 예컨대 자연에서 단리된 DNA에 연결된 염색체 DNA) 또는 단백질로부터 정제되었을 때, "단리되거나" 또는 "실질적으로 순수하다"(F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York 참조). 본 명세서에 개시된 핵산은, 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있고, 인트론 서열을 함유할 수 있거나 또는 함유하지 않을 수 있다. 특정 실시형태에서, 핵산은 cDNA 분자이다.

[0191] [0159] 본 명세서에 개시된 핵산은 표준 분자생물학 기술을 이용하여 얻어질 수 있다. 하이브리도마(예를 들어 하기 설명되는 인간 면역글로불린 유전자를 지닌 유전자도입 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현된 항체의 경우, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 얻어질 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리(예를 들어 파지 디스플레이 기술을 사용)로부터 얻어진 항체의 경우, 이 항체를 암호화하는 핵산이 라이브러리로부터 회수될 수 있다.

[0192] [0160] 본 명세서에 개시된 특정 핵산 분자는 본 발명의 항-FAM19A5 항체의 VH 및 VL 서열을 암호화하는 것들이다. 이러한 항체의 VH 및 VL 서열을 암호화하는 예시적인 DNA 서열은 각각 표 8 및 9에 제시되어 있다.

[0193] [표 8]: 가변 중쇄 폴리뉴클레오티드 서열

Antibody	Variable Heavy Chain Polynucleotide Sequence (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 (SS01-13)	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCCGGAGGAGCGCTCTCTCTC TCTTGCAAAGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTATCAGATGGGCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATGGGTCGGTGTATTAAACAAGTCTGGTAGTGACACATCATA GGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAC CTGCAGATGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCTGTTTACTTCTGCGCCAAAGGTTCT GCTAGTTACATAACTGCTGCTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTC TCCTCC (SEQ ID NO: 21)
Anti-FAM19A5 (SS01-13-s5)	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC TCTTGCAAAGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTATCAGATGGGCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATGGGTCAGCGCGATTAATAAGAGCGGTAGTGACACATCATA GGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTCAGGGCTGAGGACACCGCTGTTTACTTCTGCGCCAAAGGTTCT GCTAGTTACATAACTGCTGCTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTC TCCTCC (SEQ ID NO: 35)
Anti-FAM19A5 (S5-SG)	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC TCTTGCAAAGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTATCAGATGGGCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATGGGTCAGCGCGATTAATAAGGGCGGTAGTGACACATCATA GGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTCAGGGCTGAGGACACCGCTGTTTACTTCTGCGCCAAAGGTTCT GCTAGTTACATAACTGCTGCTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTC TCCTCC (SEQ ID NO: 36)
Reference Anti-FAM19A5 (1-65)	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTC GTCTGCAAAGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTATCAGATGGGCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATGGGTCGGTGTATTAAACAAGAGTGGTAGTGACACATCATA GGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGG CTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTTCTGCGCCAAAGGTTCT GCTAGTTATATAACTGCTGCTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTC TCCTCC (SEQ ID NO: 23)

[0194]

[0195] [표 9]: 가변 경쇄 폴리뉴클레오티드 서열

Antibody	Variable Light Chain Polynucleotide Sequence (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 (SS01-13)	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGGAACTGTTTCGTATCACCTGC TCCGGGGGTGCTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGCCTAGCAGTGCC CCTCTCACTGTGATCTACAAAGACGACGAAAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCC GGTTCCCTCTTCCGGCTCCACACACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAG GCTGTATATTTCTGTGGGAATGATGACTACAGCAGTGATAGTGGATATGTCGGTGTATTT GGGGCCGGGACAACCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 22)
Anti-FAM19A5 (SS01-13-s5)	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGGAACTGCGCGTATCACCTGC TCCGGTGGTGCTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGCCTAGCAGTGCC CCTCTCACTGTGATCTACAAAGACTCTGAAAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCC GGTTCCCTCTTCCGGCTCCACACACACATTAACCATCAGCGGGGTCCAAGCCGAGGACGAG GCTGTATATTTCTGTGGGAATGATGACTACAGCAGTGATAGTGGATATGTCGGTGTATTT GGGGCCGGGACAACCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 37)
Anti-FAM19A5 (S5-SG)	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGGAACTGCGCGTATCACCTGC TCCGGTGGTGCTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGCCTAGCAGTGCC CCTCTCACTGTGATCTACAAAGACTCTGAAAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCC GGTTCCCTCTTCCGGCTCCACACACACATTAACCATCAGCGGGGTCCAAGCCGAGGACGAG GCTGTATATTTCTGTGGGAATGATGACTACAGCAGTGATAGTGGATATGTCGGTGTATTT GGGGCCGGGACAACCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 38)
Anti-FAM19A5 (1-65)	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGGAACTGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGGTGGTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTAGCAGT GCCCTCTCACTGTGATCTACTGGAACGACAAGACCCCTCGGACATCCCTTCACGATTCT TCCGGTTCCAATCCGGCTCCACACACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGAC GAGGCTGTATATTTCTGTGGGAATGATGACTACAGCAGTGATAGTGGATATGTCGGTGTAT TTTGGGGCCGGGACAACCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 24)

[0196]

[0197] [0161] 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체를 제조하는 방법은 신호 펩티드와 함께 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 각각 SEQ ID NOs: 21 및 22를 포함하는 세포주에서 중쇄 및 경쇄를 발현하는 것을 포함할 수 있다. 이들 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주세포는 본 발명에 포함된다.

[0198]

[0162] VH 및 VL 세그먼트를 암호화하는 DNA 단편이 얻어진 후, 이들 DNA 단편은, 예를 들어 가변영역 유전자를 전장 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환하기 위해, 표준 재조합 DNA 기술에 의해 더 조작될 수 있다. 이들 조작에서, VL- 또는 VH-암호화 DNA 단편은 항체 불변영역 또는 가요성 링커와 같은 다른 단백질을 암호화하는 다른 DNA 단편에 작동 가능하게 연결된다. 본 명세서에서 용어 "작동 가능하게 연결된"은 2개의 DNA 단편에 의해 암호화된 아미노산 서열이 인-프레임(in-frame)을 유지하도록 2개의 DNA 단편이 이어지는 것을 의미한다.

[0199]

[0163] VH 영역을 암호화하는 단리된 DNA는 VH-암호화 DNA를 중쇄 불변영역(힌지, CH1, CH2 및/또는 CH3)을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동 가능하게 연결함으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있으며(예를 들어 Kabat, E.A., *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No 91-3242 참조), 이들 영역을 포함하는 DNA 단편이 표준 PCR 증폭에 의해 얻어질 수 있다. 중쇄 불변영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변영역, 예를 들어 IgG2 및/또는 IgG4 불변영역일 수 있다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, VH-암호화 DNA는 단지 중쇄 CH1 불변영역만을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0200]

[0164] VL 영역을 암호화하는 단리된 DNA는 VL-암호화 DNA를 경쇄 불변영역 CL을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동 가능하게 연결함으로써 전장 경쇄 유전자(뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있으며(예를 들어 Kabat, E.A., *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No 91-3242 참조), 이들 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻어질 수 있다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 불변영역일 수 있다.

[0201]

[0165] scFv 유전자를 생성하기 위해, VH- 및 VL-암호화 DNA 단편은 가요성 링커를 암호화하는, 예를 들어 아미노산 서열 (Gly4-Ser)3을 암호화하는 다른 단편에 작동 가능하게 연결되며, 이로써 VL과 VH 영역이 가요성 링커에 의해 결합된 상태로 VH 및 VL 서열은 연속 단백질로 발현될 수 있다(예를 들어 Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554 참조). 예시적인 항-FAM19A5 scFv의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열은 각각 표 7 (위) 및 10에 제공된다.

[0202] [표 10] 항-FAM19A5 scFv의 뉴클레오티드 서열

ScFv Antibody	VL Amino Acid Sequence (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 ("I-65") scFv	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCCTGGGGAAACTGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGGTGCTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTAGCAGTGCCCTCTCACTGTGATCTACTGGAACGACAAGAGACCCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATCCGGCTCCACACACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTATATTTCTGTGGGAATGATGACTACAGCAGTGATAGTGGATATGTCGGTGTA TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCTAGGTCAGTCCTCTAGATCTTCCGGCGGTGGTGGCAGCTCCGGTGGTGGCGGTTCCGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTATCAGATGGGCTGGGTGCGACAGGCGCCCGCAAGGGGCTGGAATGGGTCGGTGTTATTAACAAGAGTGGTAGTGACACATCATACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACTTCTGCGCCAAAGGTTCTGCTAGTTATATAACTGCTGCTACCATCGACGCATGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 25)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13") scFv	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCCTGGGGAAACTGTTCTGATCACCTGCTCCGGGGGTGCTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGCCTAGCAGTGCCCTCTCACTGTGATCTACAAAGACGACGAAAGACCCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCTCTTCCGGCTCCACACACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTATATTTCTGTGGGAATGATGACTACAGCAGTGATAGTGGATATGTCGGTGTA TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCTAGGTCAGTCCTCTAGATCTTCCGGCGGTGGTGGCAGCTCCGGTGGTGGCGGTTCCGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCTCTCTCTTGCAGGCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTATCAGATGGGCTGGGTGCGACAGGCGCCCGCAAGGGGCTGGAATGGGTCGGTGTTATTAACAAGTCTGGTAGTGACACATCATACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTACCTGCAGATGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCTGTTTACTTCTGCGCCAAAGGTTCTGCTAGTTACATAACTGCTGCTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 26)
Anti-FAM19A5 ("SS01-13-s5") scFv	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCCTGGGGAAACTGCGCGTATCACCTGCTCCGGTGGTGTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGCCTAGCAGTGCCCTCTCACTGTGATCTACAAAGACTCTGAAAGACCCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCTCTTCCGGCTCCACACACACATTAACCATCAGCGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTATATTTCTGTGGGAATGATGACTACAGCAGTGATAGTGGATATGTCGGTGTA TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCTAGGTCAGTCCTCTAGATCTTCCGGCGGTGGTGGATCCTCTGGTGGTGGTGGTTCGCCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCCGCCTCTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTATCAGATGGGCTGGGTGCGACAGGCGCCCGCAAGGGGCTGGAATGGGTCAGCGCATTAATAAGAGCGGTAGTGACACATCATACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTACCTGCAGATGAACAGCCTCAGGGCTGAGGACACCGCTGTTTACTTCTGCGCCAAAGGTTCTGCTAGTTACATAACTGCTGCTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 39)
Anti-FAM19A5 ("S5-SG") scFv	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCCTGGGGAAACTGCGCGTATCACCTGCTCCGGTGGTGTAGCAGTGGCTATGGTTATGGCTGGTATCAGCAGAAGCCTAGCAGTGCCCTCTCACTGTGATCTACAAAGACTCTGAAAGACCCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCTCTTCCGGCTCCACACACACATTAACCATCAGCGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTATATTTCTGTGGGAATGATGACTACAGCAGTGATAGTGGATATGTCGGTGTA TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCTAGGTCAGTCCTCTAGATCTTCCGGCGGTGGTGGATCCTCTGGTGGTGGTGGTTCGCCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCCGCCTCTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTATCAGATGGGCTGGGTGCGACAGGCGCCCGCAAGGGGCTGGAATGGGTCAGCGCATTAATAAGGGCGTAGTGACACATCATACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTACCTGCAGATGAACAGCCTCAGGGCTGAGGACACCGCTGTTTACTTCTGCGCCAAAGGTTCTGCTAGTTACATAACTGCTGCTACCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 40)

[0203]

[0204] [0166] 일부 실시형태에서, 본 발명은 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 다른 실시형태에서, 벡터는 유전자 치료법에 사용될 수 있다.

[0205] [0167] 본 발명에 적합한 벡터는 발현 벡터, 바이러스 벡터, 및 플라스미드 벡터를 포함한다. 일 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0206] [0168] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 발현 벡터는, 적절한 숙주세포에 도입되었을 때, 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역을 위한 필수 요소, 또는 RNA 바이러스 벡터의 경우, 복제 및 번역을 위한 필수 요소를 함유하는 임의의 핵산 구성물을 말한다. 발현 벡터는 플라스미드, 파지미드, 바이러스, 및 이들의 유도체를 포함할 수 있다.

[0207] [0169] 본 개시 내용의 발현 벡터는 본 명세서에 개시된 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 항체에 대한 코딩 서열은 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다. 본 발명에 사용된

바와 같이, 2개의 핵산 서열은 각 성분 핵산 서열이 그의 기능성을 유지하도록 하는 방식으로 공유결합될 때 작동 가능하게 연결된다. 코딩 서열 및 유전자 발현 제어 서열은 유전자 발현 제어 서열의 영향 또는 제어하에 코딩 서열의 발현 또는 전사 및/또는 번역을 배치하는 방식으로 공유결합될 때 작동 가능하게 연결된다고 한다. 5' 유전자 발현 서열에서 프로모터의 유도가 코딩 서열의 전사를 초래하는 경우 그리고 두 DNA 서열 사이의 결합 특성이 (1) 프레임-시프트 돌연변이의 도입을 초래하지 않거나, (2) 프로모터 영역이 코딩 서열의 전사를 지시하는 능력을 방해하지 않거나, (3) 상응하는 RNA 전사체가 단백질로 번역되는 능력을 방해하지 않는 경우, 2개의 DNA 서열은 작동 가능하게 연결되어 있다고 한다. 따라서, 유전자 발현 서열이 코딩 핵산 서열의 전사에 영향을 주어 생성된 전사물이 원하는 항체로 번역될 수 있는 경우, 유전자 발현 서열은 코딩 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 것이다.

[0208] [0170] 바이러스 벡터는 비제한적이지만 다음 바이러스로부터 핵산 서열을 포함한다: 레트로바이러스, 예컨대 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스, 하비(Harvey) 뮤린 육종 바이러스, 뮤린 유선 종양 바이러스 및 루스(Rous) 육종 바이러스; 렌티바이러스; 아데노바이러스; 아데노-관련 바이러스; SV40-형 바이러스; 폴리오마 바이러스; 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스; 유두종 바이러스; 헤르페스 바이러스; 백시니아 바이러스; 소아마비 바이러스; 및 레트로바이러스와 같은 RNA 바이러스. 당업계에 공지된 다른 벡터를 쉽게 이용할 수 있다. 특정 바이러스 벡터는 비 필수 유전자가 관심 유전자로 대체된 비-세포 병원성 진핵 바이러스에 기초한다. 비-세포 병원성 바이러스는 레트로바이러스를 포함하며, 이의 라이프 사이클은 숙주세포 DNA로의 후속적인 바이러스 통합과 함께 게놈 바이러스 RNA의 DNA로의 역전사를 포함한다. 레트로바이러스는 인간 유전자 치료 시험을 위해 승인되었다. 복제가 불충분한(즉, 원하는 단백질의 합성을 지시할 수는 있지만, 감염성 입자를 제조할 수는 없는) 레트로바이러스가 가장 유용하다. 이러한 유전자 변형된 레트로바이러스 발현 벡터는 생체내에서 유전자의 고효율 형질 도입에 대한 일반적인 유용성을 갖는다. 복제-결핍 레트로바이러스를 생성하기 위한 표준 프로토콜(외인성 유전물질을 플라스미드 내로 혼입, 플라스미드로 패키징 세포주의 형질 감염, 패키징 세포주에 의한 재조합 레트로바이러스의 생성, 조직 배양 배지로부터 바이러스 입자의 수집 및 바이러스 입자로 표적 세포의 감염의 단계를 포함)은 Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) 및 Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991)에 제공된다.

[0209] [0171] 일 실시형태에서, 바이러스는 아데노-관련 바이러스인 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 아데노-관련 바이러스는 복제 불충분하도록 조작될 수 있고 광범위한 세포 유형 및 종을 감염시킬 수 있다. 또한 열 및 지질 용매 안정성; 조혈 세포를 포함하여 다양한 계통의 세포에서 높은 형질 도입 빈도; 및 중복감염(superinfection) 억제에 기여로 다수의 형질도입(transduction) 허용과 같은 장점이 있다. 보고된 바와 같이, 아데노-관련 바이러스는 부위-특이적 방식으로 인간 세포 DNA에 통합될 수 있으며, 이로써 삽입 돌연변이 유발의 가능성 및 레트로바이러스 감염의 삽입된 유전자 발현 특성의 가변성을 최소화 할 수 있다. 또한, 야생형 아데노-관련 바이러스 감염은 선택적 압박이 없을 때 100회 이상 조직에서 추적되었으며, 이는 아데노-관련 바이러스 게놈 통합이 비교적 안정한 사례임을 암시한다. 아데노-관련 바이러스는 또한 염색체외(extrachromosomal) 방식으로 기능할 수 도 있다.

[0210] [0172] 다른 실시형태에서, 벡터는 렌티바이러스로부터 유래된다. 특정 실시형태에서, 벡터는 비분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스의 벡터이다.

[0211] [0173] 렌티바이러스 게놈 및 프로바이러스 DNA는 전형적으로 레트로바이러스에서 발견되는 3개의 유전자: gag, pol 및 env를 가지며, 이들은 2개의 긴 말단 반복(LTR) 서열에 의해 측면에 위치한다. gag 유전자는 내부 구조(매트릭스, 캡시드 및 뉴클레오캡시드) 단백질을 암호화하고; pol 유전자는 RNA-지시된 DNA 폴리머라제(역전사 효소), 프로테아제 및 인테그라제를 암호화하고; env 유전자는 바이러스 외피 당단백질을 암호화한다. 5' 및 3' LTR's는 비리온 RNA's의 전사 및 폴리아데닐화를 촉진시키는 역할을한다. LTR은 바이러스 복제에 필요한 다른 모든 시스-작용(cis-acting) 서열을 포함한다. 렌티바이러스는 vif, vpr, tat, rev, vpu, nef 및 vpx (HIV-1, HIV-2 및/또는 SIV에서)를 포함한 추가 유전자를 가지고 있다.

[0212] [0174] 5' LTR에 인접하여 게놈(tRNA 프라이머 결합 부위)의 역전사 및 바이러스 RNA의 입자내로의 효율적인 캡슐화(Psi 부위)에 필요한 서열이다. 캡슐화(또는 레트로바이러스 RNA의 감염성 비리온으로의 패키징)에 필요한 서열이 바이러스 게놈에서 누락되면, 시스 결합은 게놈 RNA의 캡슐화를 방지한다.

[0213] [0175] 그러나, 생성된 돌연변이체는 모든 비리온 단백질의 합성을 지시할 수 있는 상태로 남아있다. 본 발명은 패키징 기능, 즉 gag, pol 및 env 뿐만 아니라 rev 및 tat를 보유하는 2 이상의 벡터로 적합한 숙주세포를 형질

감염시키는 단계를 포함하는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스의 제조방법을 제공한다. 이하에 개시되는 바와 같이, 기능적 tat 유전자가 결여된 벡터는 특정 적용에 바람직하다. 따라서, 예를 들어, 제 1 벡터는 바이러스 gag 및 바이러스 pol을 암호화하는 핵산을 제공할 수 있고, 다른 벡터는 패키징 세포를 생성하기 위해 바이러스 env를 암호화하는 핵산을 제공할 수 있다. 본 명세서에서 전달 벡터로서 확인된 이종성(heterologous) 유전자를 패키징 세포 내로 제공하는 벡터를 도입하면 관심있는 외래 유전자를 보유하는 감염성 바이러스 입자를 방출하는 생산자 세포가 생성된다.

- [0214] [0176] 전술한 벡터 및 외래 유전자의 구성에 따르면, 제2 벡터는 바이러스 외피(env) 유전자를 암호화하는 핵산을 제공할 수 있다. env 유전자는 레트로바이러스를 포함하여 거의 모든 적합한 바이러스로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, env 단백질은 인간 및 다른 종의 세포의 형질도입을 허용하는 양쪽성 외피 단백질이다.
- [0215] [0177] 레트로바이러스-유래된 env 유전자의 예는 모로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV 또는 MMLV), 하비 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV 또는 HSV), 뮤린 유선 종양 바이러스(MuMTV 또는 MMTV), 기번아페 백혈병 바이러스(gibbon ape leukemia virus)(GalV 또는 GALV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 및 루스 육종 바이러스(RSV)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 소수포 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus)(VSV) 단백질 G(VSV G)와 같은 다른 env 유전자, 간염 바이러스 및 인플루엔자의 유전자도 사용될 수 있다.
- [0216] [0178] 바이러스 env 핵산 서열을 제공하는 벡터는 본 명세서의 다른 곳에 기술된 조절 서열과 작동 가능하게 관련된다.
- [0217] [0179] 특정 실시형태에서, 벡터는 벡터가 비-분열 세포를 형질 도입시키는 능력을 손상시키지 않으면서 HIV 독성 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef가 결실된 렌티바이러스 벡터를 포함한다.
- [0218] [0180] 일부 실시형태에서, 벡터는 3' LTR의 U3 영역의 결실을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 포함한다. U3 영역의 결실은 전체 삭제 또는 부분 삭제일 수 있다.
- [0219] [0181] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 FVIII 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 본 발명의 렌티바이러스 벡터는 (a) gag, pol 또는 gag 및 pol 유전자를 포함하는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 (b) 이종성 env 유전자를 포함하는 제2 뉴클레오타이드 서열로 세포에서 형질감염될 수 있고; 여기서 렌티바이러스 벡터는 기능성 tat 유전자가 결여되어 있다. 다른 실시형태에서, 세포는 rev 유전자를 포함하는 제4 뉴클레오타이드 서열로 추가로 형질 감염된다. 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 vif, vpr, vpu, vpx 및 nef, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 기능성 유전자가 결여되어 있다.
- [0220] [0182] 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 gag 단백질, Rev-반응 요소, 중심 폴리푸린 트랙(cPPT), 또는 이들의 임의의 조합을 암호화하는 1 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0221] [0183] 렌티바이러스 벡터의 예는 WO 9931251, WO 9712622, WO 9817815, WO 9817816 및 WO 9818934에 개시되어 있으며, 이들은 그 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0222] [0184] 다른 벡터는 플라스미드 벡터를 포함한다. 플라스미드 벡터는 본 기술분야에서 광범위하게 기술되어 있으며 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 참조. 과거 수년 동안, 플라스미드 벡터는 숙주 계통 내에서 복제하여 숙주 계통으로 통합할 수 없기 때문에 생체내에서 세포로 유전자를 전달하는데 특히 유리한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 숙주세포와 호환성인 프로모터를 갖는 이들 플라스미드는 플라스미드 내에 작동 가능하게 암호화된 유전자로부터 펩티드를 발현할 수 있다. 상업용 공급 업체에서 입수할 수 있고 일반적으로 사용되는 일부 플라스미드는 pBR322, pUC18, pUC19, 다양한 pcDNA 플라스미드, pRC/CMV, 다양한 pCMV 플라스미드, pSV40 및 pBlueScript를 포함한다. 특정 플라스미드의 추가 예는 pcDNA3.1, 카탈로그 번호 V79020; pcDNA3.1/hygro, 카탈로그 번호 V87020; pcDNA4/myc-His, 카탈로그 번호 V86320; 및 pBudCE4.1, 카탈로그 번호 V53220가 있으며, 이들 모두는 Invitrogen (Carlsbad, CA)제이다. 다른 플라스미드는 당업자에게 잘 알려져 있다. 또한, 플라스미드는 DNA의 특정 단편을 제거 및/또는 추가하기 위해 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 맞춤형 설계될 수 있다.

[0223] IV. 항체 생성

- [0224] [0185] FAM19A5에 면역특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 인간 FAM19A5)은 항체의 합성을 위해 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 화학적 합성 또는 재조합 발현 기술에 의해 생성될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은, 특별한 언급이 없는 한, 분자생물학, 미생물학, 유전자 분석, 재조합 DNA, 유기화학, 생

화학, PCR, 올리고뉴클레오타이드 합성 및 변형, 핵산 혼성화, 및 당업계 기술범위 내의 관련 분야의 종래 기술들을 이용한다. 이들 기술은 예를 들어 본 명세서에서 인용된 참고문헌들에 기술되어 있고, 자세히 설명되어 있다. 예를 들어, Maniatis T *et al.*, (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 참조.

- [0225] [0186] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체는, 예를 들어 합성, DNA 서열의 유전자 조작을 통한 생성을 수반하는 임의의 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체(예를 들어 재조합 항체)이다. 특정 실시형태에서, 이러한 항체는 생체내 동물 또는 포유류(예를 들어 인간)의 항체 점라인 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않는 서열(예를 들어 DNA 서열 또는 아미노산 서열)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체는 탈면역화되었다.
- [0226] [0187] 실시예(예를 들어, 실시예 2)에 기재된 바와 같이, 항-FAM19A5 항체는 단백 합성 FAM19A5 펩티드로 면역화함으로써 초기에 생성되었다. 따라서, 인간 대상에게 투여될 때 면역원성의 위험을 최소화하기 위해, 항-FAM19A5 항체(예를 들어, 1-65)는 인간 항체의 면역원성 서열과 더 유사하도록 변형되었다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 탈면역화된 항-FAM19A5 항체는 탈면역화되지 않은 상응하는 대응 항체와 비교하여 인간 FAM19A5와 유사한 결합 친화도를 갖는다. 항체를 탈면역화하는 방법은 본 발명에 개시되어 있으며 당업계에 공지되어 있다.
- [0227] [0188] 특정 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 세포 또는 숙주세포를 배양하는 것을 포함하여 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 면역 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조방법을 제공한다. 특정 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 세포 또는 숙주세포(예를 들어, 본 명세서에 개시된 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포 또는 숙주세포)를 사용하여 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현(예를 들어, 재조합 발현)함으로써 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 면역 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 세포는 단리된 세포이다. 특정 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 세포내로 도입되었다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 방법은 세포 또는 숙주세포로부터 수득된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0228] [0189] 다클론성 항체를 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Chapter 11 in, *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York).
- [0229] [0190] 단클론성 항체는 하이브리도마, 재조합 및 파지 디스플레이 기술 또는 이들의 조합을 이용하는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 단클론성 항체는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, in : *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981)에 개시된 하이브리도마 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "단클론성 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생성된 항체에 제한되지 않는다. 예를 들어, 단클론성 항체는 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 단편, 예를 들어 이러한 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 외인적으로 발현하는 숙주세포로부터 재조합적으로 생성될 수 있다.
- [0230] [0191] 특정 실시형태에서, 본 명세서에서 "단클론성 항체"는 단일 세포 (예를 들어, 하이브리도마 또는 재조합 항체를 생성하는 숙주세포)에 의해 생성된 항체이며, 여기서 항체는 예를 들어 ELISA 또는 당업계에 공지되어 있거나 본 명세서의 실시예에 기재된 다른 항원-결합 또는 경쟁적 결합 분석에 의해 결정된 바와 같이 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 면역 특이적으로 결합한다. 특정 실시형태에서, 단클론성 항체는 키메라 항체 또는 인간화된 항체일 수 있다. 특정 실시형태에서, 단클론성 항체는 1가 항체 또는 다가(예를 들어, 2가) 항체이다. 특정 실시형태에서, 단클론성 항체는 단일 특이적 또는 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체)이다. 본 명세서에 개시된 단클론성 항체는 예를 들어 Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495에 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 기술을 이용하여

파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 클론 세포주 및 이에 의해 발현된 단클론성 항체의 제조를 위한 다른 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Chapter 11 in: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al*, supra 참조).

- [0231] [0192] 하이브리도마 기술을 사용하여 특정 항체를 생성하고 스크리닝하는 방법은 일상적이고 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 양, 염소, 토끼, 쥐, 햄스터 또는 짧은 꼬리 원숭이와 같은 다른 적절한 숙주동물은 면역화에 사용되는 단백질(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도하도록 면역화된다. 대안적으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 이어서 림프구를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 용합제를 사용하여 골수종 세포와 용합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다(Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). 또한, RIMMS(반복 면역화 다중 부위) 기술을 이용하여 동물을 면역화 할 수 있다(Kilpatrick KE *et al.*, (1997) *Hybridoma* 16: 381-9, 전체 내용이 참고로 포함됨).
- [0232] [0193] 일부 실시형태에서, 마우스(또는 다른 동물, 예컨대 닭, 쥐, 원숭이, 당나귀, 돼지, 양, 햄스터 또는 개)는 항원(예를 들어, FAM19A5, 예컨대 인간 FAM19A5)으로 면역화될 수 있고, 면역 반응이 검출되고, 예를 들어 항원에 특이적인 항체가 마우스 혈청에서 검출되면, 마우스 비장을 수거하고 비장세포를 분리해낸다. 이어서, 비장세포를 공지된 기술에 의해 임의의 적합한 골수종 세포, 예를 들어 American Type Culture Collection (ATCC[®]) (Manassas, VA)으로부터 입수 가능한 세포주 SP20의 세포에 용합시켜 하이브리도마를 형성한다. 하이브리도마는 제한된 희석에 의해 선택되고 클로닝된다. 특정 실시형태에서, 면역화된 마우스의 림프절은 수거되고 NSO 골수종 세포와 용합된다.
- [0233] [0194] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포는 바람직하게는 용합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 접종되고 성장된다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 하이포크산틴(hypoxanthine) 구아닌 포스포리보실 전이효소(HGPRT 또는 HPRT)가 결합되어 있는 경우, 하이브리도마의 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘(HAT 배지)을 포함할 것이며, 이 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.
- [0234] [0195] 특정 실시형태는 효율적으로 용합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 안정적인 고수준의 항체 생산을 지원하며, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 골수종 세포를 이용한다. 이들 중에서 골수종 세포주는 무린 골수종 선(myeloma line), 예컨대 NSO 세포주 또는 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA로부터 입수 가능한 MOPC-21 및 MPC11 마우스 종양, 및 American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA로부터 구입 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8.653 세포에서 유래된 것들이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 단클론성 항체의 생성에 대해 기술되어 있다(Kozbor D (1984) *J Immunol* 133: 3001-5; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).
- [0235] [0196] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 대한 단클론성 항체의 생성에 대해 분석된다. 하이브리도마 세포에 의해 생성된 단클론성 항체의 결합 특이성은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예컨대 방사선 면역분석(RIA) 또는 효소-연결 면역흡수 분석(ELISA)에 의해 결정된다.
- [0236] [0197] 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후, 제한 희석절차에 의해 클론을 서브클로닝하고 표준 방법 (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, supra)에 의해 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI 1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수(ascites) 종양으로서 생체내에서 성장될 수 있다.
- [0237] [0198] 서브클론에 의해 분비된 단클론성 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.
- [0238] [0199] 본 명세서에 기재된 항체는 특이적 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)를 인식하고 당업자에게 공지된 임의의 기술에 의해 생성될 수 있는 항체 단편을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 파파인(Fab 단편을 생성하기 위해) 또는 펩신(F(ab')₂ 단편을 생성하기 위해)과 같은 효소를 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질분해 절단에 의해 생성될 수 있다. Fab 단편은 항체 분자의 2개의 동일한 아암(arm) 중 하나에 상응하고 중쇄의 VH 및 CH1 도메인과 쌍을 이루는 완전한 경쇄를 함유한다. F(ab')₂ 단편은 힌지 영역에

서 이항화물 결합에 의해 연결된 항체 분자의 2개의 항원-결합 아암을 함유한다.

- [0239] [0200] 또한, 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또한 당업계에 공지된 다양한 파지 디스플레이 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능적 항체 도메인은 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 보유하는 파지 입자의 표면에 표시된다. 특히, VH 및 VL 도메인을 암호화하는 DNA 서열은 동물 cDNA 라이브러리(예를 들어, 영향받은 조직의 뮤린 또는 닭 cDNA 라이브러리와 같은 인간 또는 비인간)로부터 증폭된다. VH 및 VL 도메인을 암호화하는 DNA는 PCR에 의해 scFv 링커와 함께 재조합되고 파지미드 벡터내로 클로닝된다. 대장균에서 벡터를 전기 천공하고 대장균을 헬퍼 파지로 감염시킨다. 이들 방법에 사용된 파지는 전형적으로 fd 및 M13을 포함하는 사상(filamentous) 파지이고, 그리고 VH 및 VL 도메인은 일반적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII에 재조합적으로 융합된다. 특정 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는 예를 들어 표지된 항원 또는 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 항원에 의해 선택되거나 확인될 수 있다. 본 명세서에 개시된 항체를 제조하는데 이용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는 다음 문헌에 기재되어 있다: Brinkman U *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.*, (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L *et al.*, (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; PCT 출원번호 PCT/GB91/001134; 국제공개 번호 WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401, 및 WO 97/13844; 및 미국특허 번호 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 및 5,969,108.
- [0240] [0201] 상기 참고 문헌에 기재된 바와 같이, 파지 선택 후, 파지로부터의 항체 코딩 영역은 단리되어 인간 항체 또는 임의의 다른 원하는 항원 결합 단편을 포함하는 전체 항체를 생성하고 임의의 원하는 숙주에서 발현되도록 사용될 수 있으며, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아를 포함하는 임의의 원하는 숙주에서, 예를 들어 하기 기재된 바와 같이 발현된다. Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편과 같은 항체 단편을 재조합적으로 생성하는 기술은 PCT 공개 WO 92/22324; Mullinax RL *et al.*, (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H *et al.*, (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; 및 Better M *et al.*, (1988) *Science* 240: 1041-1043에 기재된 바와 같은 공지된 방법에 의해 실시될 수 있다.
- [0241] [0202] 일 양상에서, 전체 항체를 생성하기 위해, VH 또는 VL 뉴클레오타이드 서열, 제한 부위 및 제한 부위를 보호하기 위한 측면에 위치하는(flanking) 서열을 포함하는 PCR 프라이머를 사용하여 템플레이트(template)로부터 VH 또는 VL 서열, 예를 들어 scFv 클론을 증폭시킬 수 있다. 당업자에게 공지된 클로닝 기술을 이용하여, PCR 증폭된 VH 도메인은 VH 불변영역을 발현하는 벡터내로 클로닝될 수 있고, 그리고 PCR 증폭된 VL 도메인은 VL 불변영역, 예를 들어 인간 카파 또는 람다 불변영역을 발현하는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. VH 및 VL 도메인은 또한 필요한 불변영역을 발현하는 하나의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 중쇄 전환 벡터 및 경쇄 전환 벡터는 이어서 세포주로 공동 형질감염되어 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 전장 항체, 예를 들어 IgG를 발현하는 안정한 또는 일시적인 세포주를 생성한다.
- [0242] [0203] 키메라 항체는 항체의 상이한 부분이 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래된 분자이다. 예를 들어, 키메라 항체는 인간 항체의 불변영역에 융합된 비인간 동물(예를 들어, 마우스, 쥐 또는 닭) 단클론성 항체의 가변영역을 함유할 수 있다. 키메라 항체를 생성하는 방법은 당업계에 공지되어있다. 예를 들어, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD *et al.*, (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; 및 미국특허 번호 5,807,715, 4,816,567, 4,816,397 및 6,331,415 참조.
- [0243] [0204] 인간화된 항체는 미리 결정된 항원에 결합할 수 있고, 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 프레임워크 영역 및 비-인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 CDR(예를 들어, 뮤린 또는 닭 면역글로불린)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 인간화된 항체는 또한 면역글로불린 불변영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 일부를 포함한다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 인간화된 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함한 모든 종류의 면역글로불린, 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한 임의의 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 인간화된 항체는 다음과 같이 당업계에 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있지만 이에 제한되지 않는다: CDR-그래프팅(유럽특허 EP 239400; 국제공개 번호 WO 91/09967; 및 미국특허 5,225,539, 5,530,101 및 5,585,089), 베니어링(veneering) 또는 재포장(resurfacing)(유럽특허 EP 592106 및 EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28 (4/5): 489-498; Studnicka GM *et al.*, (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; 및 Roguska MA *et al.*, (1994) *PNAS* 91: 969-

973), 체인 서플링(미국특허 5,565,332), 및 예를 들어 미국특허 6,407,213, 미국특허 5,766,886. 국제공개 WO 93/17105; Tan P *et al.*, (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C *et al.*, (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V *et al.*, (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M *et al.*, (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.*, (1996) *Protein Eng* 9(10): 895 904; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res.* 55(23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 및 Pedersen JT *et al.*, (1994) *7 Mol Biol* 235(3): 959-73에 기재된 기술. 또한 미국출원 공개 US 2005/0042664 A1 (2005년 2월 24일)는 그 전문이 본 명세서에서 참고로 포함된다.

[0244] [0205] 다중 특이적(예를 들어, 이중 특이적) 항체를 제조하는 방법은, 예를 들어 미국특허 7,951,917; 7,183,076; 8,227,577; 5,837,242; 5,989,830; 5,869,620; 6,132,992 및 8,586,713에 기재되어 있다.

[0245] [0206] 단일 도메인 항체, 예를 들어 경쇄가 결여된 항체는 당업계에 공지된 방법에 의해 생성될 수 있다. Riechmann L & Muyldermans S (1999) *J Immunol* 231: 25-38; Nuttall SD *et al.*, (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74(4): 277-302; 미국특허 6,005,079; 및 국제공개 번호 WO 94/04678, WO 94/25591 및 WO 01/44301 참조.

[0246] [0207] 또한, FAM19A5 항원에 면역 특이적으로 결합하는 항체는 결국 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 항원을 "모방"하는 항-이디오타입 항체를 생성하는데 이용될 수 있다. (예를 들어, Greenspan NS & Bona CA (1989) *FASEB J* 7(5): 437-444; 및 Nissinoff A (1991) *J Immunol* 147(8): 2429-2438 참조).

[0247] [0208] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체와 동일한 FAM19A5의 에피토프(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 결합하는 본 명세서에 개시된 항체는 인간 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체가 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 결합하는 것을 경쟁적으로 차단하는(예를 들어, 용량 의존적 방식으로) 항체(예를 들어, 1-65)는 인간 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0248] [0209] 인간 항체는 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 기능성 내인성 면역 글로불린을 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 유전자도입 마우스가 사용될 수 있다. 특히, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체는 무작위로 또는 상동 재조합에 의해 마우스 배아 줄기세포 내로 도입될 수 있다. 대안적으로, 인간 가변영역, 불변영역 및 다양성 영역은 인간 중쇄 및 경쇄 유전자 이외에 마우스 배아 줄기세포 내로 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동 재조합에 의해 인간 면역글로불린 유전자와의 도입과 함께 개별적으로 또는 동시에 비기능적으로 될 수 있다. 특히, JH 영역의 동형접합성(homozygous) 결실은 내인성 항체 생성을 방지한다. 변형된 배아 줄기세포를 확장시키고 배반포(blastocysts) 내로 미세주사하여 키메라 마우스를 생산한다. 이어서 키메라 마우스를 키워 인간 항체를 발현하는 동형 자손을 생산한다. 유전자도입 마우스는 선택된 항원, 예를 들어 항원(예를 들어, FAM19A5)의 전부 또는 일부에 의해 정상적인 방식으로 면역화된다. 항원에 대해 지시된 단클론성 항체는 종래의 하이브리도마 기술을 이용하여 면역화된 유전자도입 마우스로부터 수득될 수 있다. 형질전환 마우스에 의해 수거된 인간 면역글로불린 도입유전자는 B 세포 분화 동안 재배열되고, 이어서 클래스 전환 및 체세포 돌연변이를 수행한다. 따라서, 이러한 기술을 이용하여 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 생성할 수 있다. 인간 항체를 생성하기 위한 이 기술에 대한 개요는 Lonberg N & Huszar D (1995) *Int Rev Immunol* 13: 65-93을 참조한다. 인간 항체 및 인간 단클론성 항체를 생성하기 위한 이 기술 및 이러한 항체를 생성하기 위한 프로토콜에 대한 상세한 논의는, 예를 들어 국제공개 WO 98/24893, WO 96/34096 및 WO 96/33735; 및 미국특허 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318 및 5,939,598를 참조한다. 인간 항체를 생성할 수 있는 마우스의 예는 XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc.; 미국특허 6,075,181 및 6,150,184), HUAB-MOUSE™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; 미국특허 5,545,806 및 5,569,825), TRANS CHROMO MOUSE™(Kirin) 및 KM MOUSE™ (Medarex/Kirin)를 포함한다.

[0249] [0210] FAM19A5에 특이적으로 결합하는 인간 항체(예를 들어, 인간 FAM19A5)는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하여 상술한 파지 디스플레이 방법을 포함하여 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한 미국특허 4,444,887, 4,716,111 및 5,885,793; 및 국제공개 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741 참조.

[0250] [0211] 일부 실시형태에서, 인간 항체는 마우스-인간 하이브리도마를 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 엡스타인-바 바이러스(EBV)로 형질전환된 인간 말초 혈액 림프구는 마우스 골수종 세포와 융합되어 인간 단클론성 항체를 분비하는 마우스-인간 하이브리도마를 생성할 수 있고, 그리고 이들 마우스-인간 하이브리도마는 표적 항원에 면역 특이적으로 결합하는 인간 단클론성 항체를 분비하는 것들(예를 들어, 인간 FAM19A5와 같은

FAM19A5)을 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지 및 기술되어 있다. 예를 들어, Shinmoto H *et al.*, (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y *et al.*, (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31 참조.

[0251] **V. 항체의 조작(engineering) 방법**

[0252] [0212] 상기 논의된 바와 같이, 본 명세서에 개시된 VH 및 VL 서열을 갖는 항-FAM19A5 항체는 VH 및/또는 VL 서열, 또는 이에 부착된 불변영역(들)을 변형시킴으로써 새로운 항-FAM19A5 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 개시된 다른 양상에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체의 구조적 특징은 본 명세서에 개시된 항체의 적어도 하나의 기능적 특성, 예를 들어 인간 FAM19A5 에의 결합을 보유하는 구조적으로 관련된 항-FAM19A5 항체를 생성하는데 사용된다. 예를 들어, 조작 방법의 출발 물질은 본 명세서에 제공된 VH 및/또는 VL 서열, 또는 이의 1 이상의 CDR 영역이다. 조작된 항체를 생성하기 위해, 본 명세서에 제공된 1 이상의 VH 및/또는 VL 서열 또는 그의 1 이상의 CDR 영역을 갖는 항체를 실제로 제조(즉, 단백질로 발현)할 필요는 없다. 오히려, 서열(들)에 함유된 정보는 출발물질로서 사용되어 원래 서열(들)로부터 유래된 "제2 세대" 서열(들)을 생성한 다음, "제2 세대" 서열(들)을 제조하고 단백질로 발현한다.

[0253] [0213] 따라서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 항-FAM19A5 항체의 제조방법을 제공한다:

[0254] (a) (i) 표 3에 제시된 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열 또는 표 5에 제시된 중쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역 서열; 및 (ii) 표 4에 제시된 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열 또는 표 6에 제시된 중쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역 서열을 제공하는 단계;

[0255] (b) 적어도 하나의 변경된 항체 서열을 생성하기 위해 중쇄 가변영역 서열 및/또는 경쇄 가변영역 서열 내에 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변경시키는 단계; 및

[0256] (c) 변경된 항체 서열을 단백질로서 발현하는 단계.

[0257] [0214] 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 변경된 항체 서열을 제조하고 발현할 수 있다.

[0258] [0215] 일부 실시형태에서, 변경된 항체 서열(들)에 의해 암호화된 항체는 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체의 기능적 특성 중 하나, 일부 또는 전부를 보유하는 항체이며, 이는 다음을 포함한다:

[0259] (1) 인간 대상에서 감소된 면역원성;

[0260] (2) 예를 들어 Biacore에 의해 측정될 때 10 nM 이하(예를 들어, 0.01 nM 내지 10 nM)의 K_D 를 갖는 가용성 인간 FAM19A5에의 결합;

[0261] (3) 예를 들어 ELISA에 의해 측정될 때 10 nM 이하(예를 들어, 0.01 nM 내지 1 nM)의 K_D 를 갖는 막 결합된 인간 FAM19A5에의 결합;

[0262] (4) 예를 들어, ELISA에 의해 측정될 때 1 nM 이하(예를 들어, 0.01 nM 내지 1 nM)의 EC_{50} 을 갖는 막 결합된 인간 FAM19A5 에의 결합;

[0263] (5) 반응성 신경아교증의 발병 감소, 역전, 지연 및/또는 예방;

[0264] (6) 반응성 성상세포의 과도한 증식 억제;

[0265] (7) 뉴로칸 및 뉴런-신경아교 항원 2(NG2)를 포함하는 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 발현 감소;

[0266] (8) 뉴런의 핵에서 c-fos 및 pERK의 발현 증가;

[0267] (9) 뉴런의 생존 촉진;

[0268] (10) 뉴런에서 GAP43의 발현 증가;

[0269] (11) 축삭의 재성장 촉진; 및

[0270] (12) 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체를 갖는 인간 FAM19A5에 결합하기 위한 어느 한 방향 또는 양 방향 경쟁.

[0271] [0216] 변경된 항체는 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11, 또는 상기 (1) 내지 (12)에 제시된 모든 기능적 특성을 나타낼 수 있다. 변형된 항체의 기능적 특성은 당업

계에서 이용 가능하고 및/또는 본 명세서에 기재된 표준 분석, 예를 들어 실시예(예를 들어, ELISA, FACS)에 기재된 것과 같은 표준 분석을 이용하여 평가될 수 있다.

[0272]

[0217] 본 명세서에 제시된 항체 조작 방법의 특정 실시형태에서, 돌연변이는 항-FAM19A5 항체 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 또는 선택적으로 도입될 수 있고, 그 결과 생성되어 변형된 항-FAM19A5 항체는 결합 활성 및/또는 본 명세서에 제시된 다른 기능적 특성을 위해 스크리닝될 수 있다. 돌연변이 방법은 당업계 기술 분야에 기술되어 있다. 예를 들어, Short의 PCT 공개 WO 02/092780은 포화 돌연변이 유발, 합성 리게이션 어셈블리 또는 이들의 조합을 이용하여 항체 돌연변이를 생성 및 스크리닝하는 방법을 기술한다. 대안적으로, Lazar 등의 PCT 공개 WO 03/074679에서는 항체의 물리화학적 특성을 최적화하기 위해 전산 스크리닝 방법을 이용하는 방법을 기술한다.

[0273]

VI. 세포와 벡터

[0274]

[0218] 특정 양상에서, 본 발명은 FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5) 및 관련 폴리뉴클레오타이드 및 발현벡터에 특이적으로 결합하는 본 명세서에 기술된 항체(또는 이의 항원-결합 단편)를 발현하는(예를 들어, 재조합적으로) 세포(예를 들어, 숙주세포)(또는 그의 항원-결합 단편)를 제공한다. 본 발명은 항-FAM19A5 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 숙주세포, 예를 들어 포유동물 세포에서의 재조합 발현을 위한 단편을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터(예를 들어, 발현 벡터)를 제공한다. 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 항-FAM19A5 항체(예를 들어, 인간 또는 인간화된 항체)를 재조합적으로 발현시키기 위한 이러한 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 특정 양상에서, 본 발명은 숙주세포로부터 이러한 항체를 발현시키는, 본 명세서에 기재된 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0275]

[0219] FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 특이적으로 결합하는 본 명세서에 기술된 항체(예를 들어, 전장 항체, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 단쇄 항체)의 재조합 발현은 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 벡터의 구성을 포함한다. 본 명세서에 기재된 항체 분자, 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 이의 단편(예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 수득되면, 항체 분자를 생성하기 위한 벡터는 당업계에 공지된 기술을 이용하는 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 뉴클레오타이드 서열을 암호화하는 항체 또는 항체 단편(예를 들어, 경쇄 또는 중쇄)을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시켜 단백질을 제조하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 항체 또는 항체 단편(예를 들어, 경쇄 또는 중쇄) 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어신호를 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법은 예를 들어 시험 관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 항체 분자, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 항체 또는 이의 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 또는 작동 가능하게 프로모터에 연결된 중쇄 또는 경쇄 CDR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제 가능한 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 예를 들어 항체 분자의 불변영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고(예를 들어, 국제공개 번호 WO 86/05807 및 WO 89/01036; 및 미국특허 번호 5,122,464 참조), 그리고 항체의 가변 도메인은 전체 중쇄, 전체 경쇄, 또는 전체 중쇄 및 경쇄 모두의 발현을 위해 이러한 벡터에 클로닝될 수 있다.

[0276]

[0220] 발현 벡터는 통상적인 기술에 의해 세포(예를 들어, 숙주세포)로 전달될 수 있고, 이어서 생성된 세포는 통상적인 기술에 의해 배양되어 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, 본 발명의 항-FAM19A5 항체의 VH 및/또는 VL, 또는 VH 및/또는 VL CDR 중 1 이상을 포함하는 항체) 또는 그의 단편을 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 단편, 또는 이의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 단편, 또는 숙주세포에서 이러한 서열의 발현을 위한 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 단쇄 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주세포를 제공한다. 특정 실시형태에서, 이중-사슬연결된 항체의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄 모두를 개별적으로 암호화하는 벡터는 하기에 상세히 기재된 바와 같이 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위해 숙주세포에서 공동-발현될 수 있다. 특정 실시형태에서, 숙주세포는 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 및 경쇄 모두를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 그의 단편을 포함하는 벡터를 함유한다. 특정 실시형태에서, 숙주세포는 2개의 상이한 벡터를 함유하는 데, 제1 벡터는 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 또는 중쇄 가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 단편을 포함하고, 그리고 제2 벡터는 본 명세서에 기재된 항체의 경쇄 또는 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 단편을 포함한다. 다른 실시형태에서, 제1 숙주세포는 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 또는 중쇄 가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1 벡터 또는 그의 단편을 포함하고, 그리고 제2 숙주세포는 본 명세서에 기재된 항체의 경쇄 또는 경쇄 가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 벡터를 포함한다. 특정 실시형태에서, 중쇄/중쇄 가변영역은 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 형성하기 위해 제2 세포의 경쇄/경쇄 가변영역과 관련된

제1 세포에 의해 발현된다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 이러한 제1 숙주세포 및 제2 숙주세포를 포함하는 숙주세포의 집단을 제공한다.

[0277] [0221] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체의 경쇄/경쇄 가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 벡터, 및 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체의 중쇄/중쇄 가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 벡터를 포함하는 벡터의 집단(population)을 제공한다.

[0278] [0222] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 이용하여 본 명세서에 기재된 항체 분자를 발현시킬 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심있는 코딩 서열이 생성되고 후속적으로 정제될 수 있는 비히클을 나타내지만, 또한 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환 또는 형질감염될 때 본 명세서에 기재된 항체 분자를 현장에서 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 이들은 다음과 같은 것들을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다: 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 항체 코딩 서열을 함유하는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예를 들어, 대장균 및 B. 섭틸리스)와 같은 미생물; 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예를 들어, 사카로마이세스 피키아); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜리 플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템(예를 들어, 클라미도모나스 레인하르트티와 같은 녹조류); 또는 포유동물 세포의 계능(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)로부터 유래된 프로모터를 함유하는 재조합 발현 구성물을 수거하는 포유동물 세포 시스템(예를 들어 COS(예를 들어 COS1 또는 COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa 및 NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 및 BMT10 세포). 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현하기 위한 세포는 CHO 세포, 예를 들어 CHO GS SYSTEM™ (Lonza)의 CHO 세포이다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체를 발현하기 위한 세포는 인간 세포, 예를 들어 인간 세포주이다. 특정 실시형태에서, 포유동물 발현 벡터는 POPTIVEC™ 또는 pcDNA3.3이다. 특정 실시형태에서, 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위해 대장균과 같은 박테리아 세포 또는 진핵 세포(예를 들어, 포유동물 세포)가 재조합 항체 분자의 발현에 사용된다. 예를 들어, 인간 사이토메갈로 바이러스로부터의 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 포유동물 세포는 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-5; 및 Cockett MI *et al.*, (1990) Biotechnology 8(7): 662-7). 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 CHO 세포 또는 NSO 세포에 의해 생성된다. 특정 실시형태에서, FAM19A5(예를 들어, 인간 FAM19A5)에 면역 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 발현은 구성적 프로모터, 유도성 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터에 의해 조절된다.

[0279] [0223] 박테리아 시스템에서, 발현되는 항체 분자에 의도된 용도에 따라 다수의 발현 벡터가 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 대량의 이러한 항체가 생성될 때, 항체 분자의 약학 조성물의 생성을 위해, 용이하게 정제된 높은 수준의 융합 단백질 생성물의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는 대장균 발현 벡터 pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794)을 포함하나, 이에 제한되지는 않으며, 여기서 항체 코딩 서열은 융합 단백질이 생성되도록 lac Z 코딩 영역의 프레임내 벡터; pIN 벡터(Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509); 등에 개별적으로 리게이션될 수 있다. 예를 들어, pGEX 벡터는 글루타티온 5-전이효소(GST)와의 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며 매트릭스 글루타티온 아가로오스(agarose) 비드에 흡착 및 결합한 후 유리 글루타티온의 존재하에 용리시킴으로써 용균된(lysed) 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 모이어티(moiety)로부터 방출될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계된다.

[0280] [0224] 곤충 시스템에서, 오토그래파 칼리포니카(Autographa californica) 핵 폴리헤드린 바이러스(AcNPV)는 예를 들어 외래 유전자를 발현하는 벡터로서 사용될 수 있다. 바이러스는 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포에서 성장한다. 항체 코딩 서열은 바이러스의 비-필수영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자)에 개별적으로 클로닝될 수 있고 AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 놓일 수 있다.

[0281] [0225] 포유동물 숙주세포에서, 다수의 바이러스-기반 발현 시스템이 이용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심있는 항체 코딩 서열은 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어 후기 프로모터 및 3중 리더 서열에 리게이션될 수 있다. 이어서, 이 키메라 유전자는 시험관내 또는 생체내 재조합에

의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비-필수 영역(예를 들어, 영역 E1 또는 E3)에서의 삽입은 감염된 숙주에서 항체 분자를 발현할 수 있고 생존할 수 있는 재조합 바이러스를 초래할 것이다(예를 들어, Logan J & Shenk T (1984) *PNAS* 81(12): 3655-9 참조). 삽입된 항체 코딩 서열의 효율적인 번역을 위해 특정 개시신호가 필요할 수도 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 또한, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 원하는 코딩 서열의 판독 프레임과 동일한 위상이어야 한다. 이들 외인성 번역 제어신호 및 개시 코돈은 천연 및 합성 둘 모두의 다양한 기원일 수 있다. 적절한 전사 증진인자(enhancer) 요소, 전사 종결자(terminator) 등을 포함시킴으로써 발현 효율을 향상시킬 수 있다(예를 들어, Bitter G *et al.*, (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544 참조).

[0282] [0226] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 원하는 특정 방식으로 유전자 생성물을 변형 및 가공하는 숙주 세포 균주를 선택할 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예를 들어, 글리코실화) 및 가공(예를 들어, 절단)은 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역 후 가공 및 변형을 위한 특징적이고 특이적인 메커니즘을 갖는다. 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하기 위해 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 이를 위해, 유전자 생성물의 일차 전사, 글리코실화 및 인산화의 적절한 처리를 위한 세포기구(cellular machinery)를 보유하는 진핵생물(eukaryotic) 숙주세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유동물 숙주세포는 다음과 같은 것들을 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다: CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NSO(임의의 면역글로불린 사슬을 내생적으로 생성하지 않는 무린 골수종 세포주), CRL7030, COS(예를 들어, COS 1 또는 COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293 T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC 1, BSC40, YB/20, BMT10 및 HsS78Bst 세포. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체는 포유동물 세포, 예컨대 CHO 세포에서 생성된다.

[0283] [0227] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 푸코스 함량이 감소되거나 푸코스 함량이 없다. 이러한 항체는 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 항체는 푸코실화 능력이 없거나 부족한 세포에서 발현될 수 있다. 특정 예에서, 1,6-푸코실 전이효소의 양쪽 대립유전자의 녹아웃(knockout)을 갖는 세포주는 푸코스 함량이 감소된 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 생성하는데 사용될 수 있다. POTEILLIGENT[®] 시스템(Lonza)은 푸코스 함량이 감소된 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 생성하는데 이용될 수 있는 그러한 시스템의 예이다.

[0284] [0228] 재조합 단백질의 장기간 고수율 생산을 위해, 안정한 발현 세포가 생성될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체를 안정적으로 발현하는 세포주는 그의 항원 결합 부분을 조작할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 본 명세서에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 형성하도록 회합된 경쇄/경쇄 가변 도메인 및 중쇄/중쇄 가변 도메인을 안정적으로 발현한다.

[0285] [0229] 특정 양상에서, 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 대신에, 숙주세포는 적절한 발현 제어 요소(예를 들어, 프로모터, 증진인자, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선택 가능한 마커에 의해 제어되는 DNA로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA/폴리뉴클레오티드의 도입 후, 조작된 세포는 농축 배지에서 1-2일 동안 성장한 다음 선택 배지로 전환될 수 있다. 재조합 플라스미드에서 선별 가능한 마커는 선별에 대한 내성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 그들의 염색체에 안정적으로 통합하고 성장하여 병소(foci)를 형성하여 결국 세포주로 클로닝되고 확장될 수 있게 한다. 이 방법은 유리하게는 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체 또는 이의 항체 결합 부분을 발현하는 세포주를 조작하는 데 사용될 수 있다. 이러한 조작된 세포주는 특히 항체 분자와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 조성물의 스크리닝 및 평가에 유용할 수 있다.

[0286] [0230] 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(Wigler M *et al.*, (1977) *Cell* 11 (1): 223-32), 하이포크산틴가아닌 포스포리보실 전이효소(Szybalska EH & Szybalski W (1962) *PNAS* 48(12): 2026-2034) 및 아데닌 포스포리보실 전이효소(Lowy I *et al.*, (1980) *Cell* 22(3): 817-23) 유전자를 비제한적으로 포함하는 수많은 선택 시스템이 각각 tk-, hgprrt- 또는 aprt-세포에 이용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성은 다음 유전자에 대한 선택의 기초로 이용될 수 있다: 메토타렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr (Wigler M *et al.*, (1980) *PNAS* 77(6): 3567-70; O'Hare K *et al.*, (1981) *PNAS* 78: 1527-31); 미코페놀산에 대한 내성을 부여하는 gpt (Mulligan RC & Berg P (1981) *PNAS* 78(4): 2072-6); 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 부여하는 neo (Wu GY & Wu CH (1991) *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32: 573-596; 멀리건 RC (1993) *Science* 260: 926-932; 및 Morgan RA & Anderson WF (1993) *Ann Rev Biochem* 62: 191-217; Nabel GJ & Feigner PL (1993) *Trends Biotechnol* 11(5): 211-5); 및 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygro (Santerre RF *et al.*, (1984) *Gene* 30(1-3): 147-56). 재조합 DNA 기술 분야에서 통상적으로 공지된 방

법은 원하는 재조합 클론을 선택하기 위해 일상적으로 적용될 수 있으며, 이러한 방법은 예를 들어 다음 문헌에 기술되었으며, 이들은 그 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다: Ausubel FM *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); 및 Chapters 12 and 13, Dracopoli NC *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbere-Garapin F *et al.*, (1981) *J Mol Biol* 150: 1-14,

[0287] [0231] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다(검토를 위해 Bebbington CR & Hentschel CCG 참조, DNA 클로닝에서 포유동물 세포에서 클로닝된 유전자의 발현을 위한 유전자 증폭에 기초한 벡터의 사용, Vol 3(Academic Press, New York, 1987). 항체를 발현하는 벡터 시스템에서 마커가 증폭될 수 있는 경우, 숙주세포 배양에 존재하는 억제제 수준의 증가는 마커 유전자의 복제 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역은 항체 유전자와 관련되어 있기 때문에, 항체의 생성은 또한 증가할 것이다(Crouse GF *et al.*, (1983) *Mol Cell Biol* 3: 257-66).

[0288] [0232] 숙주세포는 본 명세서에 기술된 2개 이상의 발현 벡터, 즉 중쇄 유래 폴리펩티드를 암호화하는 제1 벡터 및 경쇄 유래 폴리펩티드를 암호화하는 제2 벡터로 공동 형질감염될 수 있다. 2개의 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동일한 발현을 가능하게 하는 동일하고 선택 가능한 마커를 함유할 수 있다. 숙주세포는 상이한 양의 2개 이상의 발현 벡터로 공동-형질감염될 수 있다. 예를 들어, 숙주세포는 제1 발현 벡터 및 제2 발현 벡터 중 다음 어느 하나의 비율로 형질감염될 수 있다: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 또는 1:50.

[0289] [0233] 대안적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 모두를 암호화하고 발현할 수 있는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 상황에서, 과량의 무독성 중쇄를 피하기 위해 경쇄를 중쇄 앞에 위치시켜야 한다(Proudfoot NJ (1986) *Nature* 322: 562-565; 및 Kohler G (1980) *PNAS* 77: 2197-2199). 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다. 발현 벡터는 모노시스트로닉 또는 멀티시스트로닉일 수 있다. 멀티시스트로닉 핵산 구성물은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상, 또는 2-5, 5-10 또는 10-20 유전자/뉴클레오티드 서열의 범위를 암호화할 수 있다. 예를 들어, 비시스트로닉 핵산 구성물은 다음 순서로 프로모터, 제1 유전자(예를 들어, 본 명세서에 기술된 항체의 중쇄), 및 제2 유전자(예를 들어, 본명세서에 기술된 항체의 경쇄)를 포함할 수 있다. 이러한 발현 벡터에서, 두 유전자의 전사는 프로모터에 의해 구동될 수 있는 반면, 제1 유전자로부터의 mRNA의 번역은 캡-의존적 스캐닝 메커니즘에 의해 이루어질 수 있고, 제2 유전자로부터의 mRNA의 번역은 예를 들어, IRES에 의한 캡-독립적 메커니즘에 의해 이루어질 수 있다.

[0290] [0234] 본 명세서에 기재된 항체 분자가 재조합 발현에 의해 생성되면, 항체 분자는 면역글로불린 분자의 정제를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 크로마토그래피(예를 들어, 이온교환, 친화도, 특히 단백질 A 후의 특정 항원에 대한 친화도, 및 사이징 컬럼크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 항체는 정제를 용이하게 하기 위해 본 명세서에 기재되거나 당업계에 공지된 이중 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.

[0291] [0235] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 단리되거나 정제된다. 일반적으로, 단리된 항체는 단리된 항체와 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체이다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 제제는 실질적으로 세포 물질 및/또는 화학 전구체가 없다. "세포 물질이 실질적으로 없다"는 문구는 항체가 단리되거나 재조합적으로 생성되는 세포의 세포성분으로부터 항체가 분리되는 항체의 제제를 포함하는 의미이다. 따라서, 실질적으로 세포물질이 없는 항체는 이중성 단백질(본 명세서에서 "오염 단백질"로도 지칭됨)이 약 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1% 미만(건조 중량 기준)인 항체의 제제 및/또는 항체의 변이체, 예를 들어, 상이한 번역 후 변형 형태의 항체 또는 다른 상이한 버전의 항체(또는 항체 결합 부분)를 갖는 항체의 제제를 포함한다. 항체가 재조합적으로 생성될 때, 또한 일반적으로 배양 배지가 실질적으로 없으며, 즉 배양 배지는 단백질 제제의 부피의 약 20% 미만, 10% 미만, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1%를 나타낸다. 항체가 화학적 합성에 의해 생성되는 경우, 일반적으로 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없으며, 즉 단백질의 합성에 관여하는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질로부터 분리된다. 따라서, 이러한 항체의 제제는 관심 항체 이외의 화학적 전구체 또는 화합물의 약 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만(건조 중량 기준)을 갖는다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 단리되거나 정제된다.

[0292] VII. 분석

[0293] [0236] 본 명세서에 기재된 항체는 예를 들어 표준 ELISA에 의해 FAM19A5에 의 결합에 대해 시험될 수 있다. 간

단히 설명하면, 미량정량(microtiter) 플레이트를 PBS에서 1-2 $\mu\text{g/ml}$ 로 정제된 FAM19A5로 코팅한 다음, PBS에서 5% 소 혈청 알부민으로 차단하였다. 항체의 희석액(예를 들어, FAM19A5-면역화된 마우스로부터의 혈장의 희석액)을 각 웰에 첨가하고 37 °C에서 1-2 시간 동안 배양한다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척한 후 37 °C에서 1 시간 동안 홀스래디쉬 퍼옥시다제(Horseradish peroxidase, HRP)에 공액결합된 2차 시약(예를 들어, 인간 항체의 경우, 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 다클론성 시약)과 함께 배양한다. 세척 후, 플레이트에 ABTS 기질(Moss Inc., 제품: ABTS-1000)을 전개하고 OD 415-495에서 분광광도계로 분석하였다. 면역화된 마우스로부터의 혈청은 이어서 인간 FAM19A5를 발현하는 세포주에 결합하기 위해 유동 세포측정법에 의해 추가로 스크리닝되지만, FAM19A5를 발현하지 않는 대조군 세포주에는 결합되지 않는다. 간단히 설명하면, 1:20 희석에서 FAM19A5 발현 CHO 세포를 항-FAM19A5 항체와 함께 배양함으로써 항-FAM19A5 항체의 결합을 평가한다. 세포를 세척하고 PE-표지된 항-인간 IgG Ab로 결합을 검출하였다. 유세포(flow cytometric) 분석은 FACS 캔 유세포 분석(Becton Dickinson, San Jose, CA)을 사용하여 수행된다. 바람직하게는, 가장 높은 역가를 발생시키는 마우스가 융합에 사용될 것이다.

[0294] [0237] 상기 기술한 바와 같은 ELISA 분석법은 FAM19A5 면역원과 양성 반응성을 나타내는 항체를 생성하는 항체 및 하이브리도마를 스크리닝하는데 이용될 수 있다. 바람직하게는 FAM19A5에 높은 친화력으로 결합하는 항체를 생성하는 하이브리도마를 서브클로닝하고 추가로 특성화할 수 있다. 모세포의 반응성을 유지하는(ELISA에 의해) 각 하이브리도마로부터 하나의 클론이 세포 배양을 만들고 항체 정제를 위해 선택될 수 있다.

[0295] [0238] 항-FAM19A5 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마는 단클론성 항체 정제를 위해 2-리터 스피너-플라스크에서 성장될 수 있다. 단백질을 A-세파로스(Pharmacia, Piscataway, NJ)로의 친화성 크로마토그래피 전에 상청액을 여과하고 농축시킬 수 있다. 용리된 IgG는 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피로 확인하여 순도를 보장할 수 있다. 완충 용액은 PBS 내로 교환될 수 있고, 농도는 1.43 소멸계수를 이용하여 OD 280에 의해 결정될 수 있다. 단클론성 항체는 분취되고 -80 °C에서 저장될 수 있다.

[0296] [0239] 선택된 항-FAM19A5 단클론성 항체가 독특한 에피토프에 결합하는지를 결정하기 위해, 각 항체는 시판되는 시약(Pierce, IL)을 사용하여 비오틴화될 수 있다. 비오틴화된 MAb 결합은 스트렙타비딘 표지된 프로브(probe)로 검출될 수 있다. 비표지된 단클론성 항체 및 비오틴화된 단클론성 항체를 사용한 경쟁 연구는 상기 기재된 FAM19A5 코팅된 ELISA 플레이트를 사용하여 수행될 수 있다.

[0297] [0240] 정제된 항체의 이소타입을 결정하기 위해, 이소타입 ELISA는 특정 이소타입의 항체에 특이적인 시약을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 인간 단클론성 항체의 이소타입을 결정하기 위해, 미량정량 플레이트의 웰을 4 °C에서 밤새 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 항-인간 면역글로불린으로 코팅할 수 있다. 1% BSA로 차단한 후, 플레이트를 주위 온도에서 1 내지 2시간 동안 1 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 시험 단클론성 항체 또는 정제된 이소타입 대조군과 반응시킨다. 이어서 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이적 알칼리성 포스파타제-공액결합된 프로브와 반응시킬 수 있다. 플레이트에는 전술한 바와 같이 전개되고 분석된다.

[0298] [0241] FAM19A5를 발현하는 살아있는 세포에 대한 단클론성 항체의 결합을 시험하기 위해, 실시예에 기재된 바와 같이 유세포 분석법을 이용할 수 있다. 간단히 말하면, 막-결합 FAM19A5(표준 성장 조건 하에서 성장)를 발현하는 세포주는 4 °C에서 1시간 동안 0.1% BSA를 함유하는 PBS에서 다양한 농도의 단클론성 항체와 혼합된다. 세척 후, 세포를 1차 항체 염색과 동일한 조건 하에서 플루오레세인(Fluorescein)-표지된 항-IgG 항체와 반응시킨다. 샘플은 단일 세포 상에 게이트하기 위해 광 및 측면 산란 특성을 이용하여 FACSscan 기기에 의해 분석될 수 있고 표지된 항체의 결합이 결정된다. 형광현미경법을 이용하는 대안적인 분석법이 유세포 분석법에 추가하여 또는 대신에 사용될 수 있다. 세포는 상기 기술된 바와 같이 정확하게 염색될 수 있고 형광현미경에 의해 검사될 수 있다. 이 방법을 이용하면 개별 세포를 시각화 할 수 있지만 항원의 밀도에 따라 감도가 감소될 수 있다.

[0299] [0242] 웨스턴 블롯팅에 의해 FAM19A5 항원과의 반응성에 대해 항-FAM19A5 항체를 추가로 시험할 수 있다. 간단히 설명하면, FAM19A5를 발현하는 세포로부터의 세포 추출물을 제조하고 나트륨 도데실설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 할 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원을 니트로셀룰로오스 막으로 옮기고, 20% 마우스 혈청으로 차단하고, 시험할 단클론성 항체로 조사한다. IgG 결합은 항-IgG 알칼리성 포스파타제를 사용하여 검출될 수 있고 BCIP/NBT 기질 정제(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)로 현상될 수 있다.

[0300] [0243] 다양한 항-FAM19A5 항체의 결합 친화도, 교차-반응성 및 결합 동역학을 분석하는 방법은 당업계에 공지된 표준 분석법, 예를 들어 BIACORE™ 2000 SPR 기기(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 사용하는 BIACORE™ 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석을 포함한다.

- [0301] [0244] 일 실시형태에서, 항체는 가용성 형태의 인간 FAM19A5에 특이적으로 결합한다. 일 실시형태에서, 항체는 막-결합 형태의 인간 FAM19A5에 특이적으로 결합한다. 항체는 FAM19A5의 특정 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다(예를 들어, SEQ ID NO: 15 또는 SEQ ID NO: 15 내의 단편). 특정 실시형태에서, 항체는 바람직하게는 높은 친화도로 인간 FAM19A5에 결합하고, 단백질의 FAM19 서브패밀리의 다른 멤버와 교차-반응하지 않는다.
- [0302] **VIII. 이중특이적 분자**
- [0303] [0245] 본 명세서에 기재된 항체는 이중 특이적 분자를 형성하는데 사용될 수 있다. 항-FAM19A5 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 다른 기능성 분자, 예를 들어 다른 펩티드 또는 단백질(예를 들어, 수용체에 대한 다른 항체 또는 리간드)에 유도되거나 연결되어 적어도 2개의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하는 분자를 생성할 수 있다. IL-6, CNTF, LIF, EGF 및 TGF α 와 같은 사이토카인은 단백질 신호 트랜스듀서(transducer) 및 전사 3의 활성화제(STAT3)를 활성화시킴으로써 신경아교증 및/또는 반응성 성상교세포증(astrogliosis)의 발병 트리거로서 연루되었으며(Balasingam *et al.*, *J. Neurosci.* 14(2): 846-56 (1994); Winter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 20; 92(13): 5865-9 (1995)), 이는 CNS 손상 후 반응성 성상교세포증의 많은 양상을 조절한다. Herrmann J. E. *et al.*, *J. Neurosci.* 28(28): 7231-7243 (2008). 예를 들어, STAT3의 부재 또는 감소는 아교세포섬유 산성 단백질(GFAP)의 약화된 상향조절, 성상세포 비대의 실패, 및 염증의 확산 증가, 병변 부피증가 및 CNS 손상 후 부분적으로 약화된 운동회복을 초래한다. Herrmann J. E. *et al.*, *J. Neurosci.* 28(28): 7231-7243 (2008). 따라서, 예를 들어, 항-FAM19A5 항체는 조합 치료를 위한 신경아교증의 발병 및/또는 반응성 성상교세포증의 과도한 증식에 관여하는 임의의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 scFv, 예를 들어 IL-6, CNTF, LIF, EGF 또는 TGF α 에 대한 항체에 연결될 수 있다.
- [0304] [0246] 또한, 항-FAM19A5 항체는, 대상의 중추신경계 손상(예를 들어, 외상성 뇌손상, 뇌척수 손상, 뇌졸중 또는 뇌종양), 뇌척수계 손상, 퇴행성 뇌장애(예를 들어 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, ALS), 퇴행성 뇌척수 또는 신경장애 또는 신경병성 통증을 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 항체 또는 scFv에 연결될 수 있다(섹션 XII의 질환 또는 장애 참조). 예를 들어, 항-FAM19A5 항체는 다발성 경화증을 치료하는 항체 또는 scFv, 예를 들어 Natalizumab(TYSABRI[®]), Alemtuzumab(LEMTRADA[®])에 연결될 수 있다.
- [0305] [0247] 본 명세서에 기술된 항체는 실제로 2개 이상의 상이한 결합 부위 및/또는 표적 분자에 결합하는 다중 특이적 분자를 생성하기 위해 1 이상의 다른 기능성 분자에 유도되거나 연결될 수 있으며; 이러한 다중 특이적 분자는 또한 본 명세서에 사용된 용어 "이중 특이적 분자"에 의해 포함되도록 의도된다. 본 명세서에 기재된 이중 특이적 분자를 생성하기 위해, 본 명세서에 기재된 항체는 이중 특이적 분자가 생성되도록 1 이상의 다른 결합 분자, 예컨대 또 다른 항체, 그의 항체 결합 부분, 펩티드 또는 모방 결합(binding mimetic)에 기능적으로 연결될 수 있다(예를 들어, 화학적 결합, 유전자 융합, 비공유 결합 또는 기타 방식에 의해). 일 실시형태에서, 이중 특이적 분자는 FAM19A5 및 VEGF에 결합한다. 다른 실시형태에서, 이중 특이적 분자는 FAM19A5 및 EGF에 결합한다.
- [0306] [0248] 따라서, 본 발명은 FAM19A5에 대한 적어도 하나의 제1 결합 특이성 및 제2 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 포함하는 이중 특이적 분자를 제공한다. 이중 특이적 분자가 다중 특이적인 본 발명의 실시형태에서, 분자는 제3 결합 특이성을 추가로 포함할 수 있다.
- [0307] [0249] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 이중 특이적 분자는 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 또는 단쇄 Fv(scFv)을 포함하는 1 이상의 항체 또는 그의 항체 결합 부분을 결합 특이성으로서 포함한다. 항체는 또한 경쇄 또는 중쇄 이량체, 또는 이의 임의의 최소 단편, 예컨대 Ladner 등의 미국특허 4,946,778에 기술된 바와 같은 Fv 또는 단쇄 구성물질 수 있으며, 상기 특허의 내용은 참고로 포함된다.
- [0308] [0250] 인간 단클론성 항체가 바람직하지만, 본 명세서에 기재된 이중 특이적 분자에 이용될 수 있는 다른 항체는 무린, 키메라 및 인간화된 단클론성 항체이다.
- [0309] [0251] 본 명세서에 기재된 이중 특이적 분자는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 구성 성분 결합 특이성을 공액결합함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 이중 특이적 분자의 각 결합 특이성은 개별적으로 생성된 후 서로 공액결합될 수 있다. 결합 특이성이 단백질 또는 펩티드인 경우, 공유공액결합을 위해 다양한 커플링제 또는 가교제가 사용될 수 있다. 가교제의 예로는 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB), α -페닐렌디말레이미드(α PDM), N-숙신이미딜-3-(2-피리리딘티오)프로피오네이트(SPDP) 및 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(설포-SMCC)이 있다(예를 들어, Karpovsky *et al.*, (1984) *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, MA *et al.*, (1985) *Proc. Natl*

Acad. Sci. USA 82: 8648 참조). 다른 방법은 Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* 78, 118-132; Brennan *et al.*, (1985) *Science* 229: 81-83) 및 Glennie *et al.*, (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375 참조). 바람직한 공액결합제(conjugating agents)는 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)로부터 입수 가능한 SATA 및 설폰-SMCC 이다.

[0310] [0252] 결합 특이성이 항체인 경우, 이들은 2개 중쇄의 C-말단 힌지 영역의 설프히드릴 결합을 통해 공액결합될 수 있다. 특히 바람직일 실시형태에서, 힌지 영역은 공액결합 전에 홀수, 바람직하게는 하나의 설프히드릴 잔기를 함유하도록 변형된다.

[0311] [0253] 대안적으로, 두 결합 특이성은 동일한 벡터에서 암호화될 수 있고 동일한 숙주세포에서 발현 및 집합될 수 있다. 이 방법은 이중 특이적 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, mAb x (scFv)₂, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질인 경우에 특히 유용하다. 이중 특이적 항체는 각 중쇄의 C-말단에 scFv를 갖는 항체를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 이중 특이적 분자는 하나의 단쇄 항체 및 결합 결정인자를 포함하는 단쇄 분자, 또는 2개의 결합 결정인자를 포함하는 단쇄 이중 특이적 분자일 수 있다. 이중 특이적 분자는 적어도 2개의 단쇄 분자를 포함할 수 있다. 이중 특이적 분자의 제조방법은 예를 들어 미국특허 번호 5,260,203; 미국특허 번호 5,455,030; 미국특허 번호 4,881,175; 미국특허 번호 5,132,405; 미국특허 번호 5,091,513; 미국특허 번호 5,476,786; 미국특허 번호 5,013,653; 미국특허 번호 5,258,498; 및 미국특허 번호 5,482,858에 기술되어 있다.

[0312] [0254] 이중 특이적 분자의 이들의 특이적 표적에 대한 결합은 효소-연결 면역흡착 분석(ELISA), 방사선면역분석(RIA), FACS 분석, 생체분석(예를 들어, 성장억제) 또는 웨스턴 블롯 분석과 같이 당업계에 공지된 방법을 이용하여 확인될 수 있다. 이들 분석 각각은 일반적으로 관심있는 복합체에 특이적인 표지된 시약(예를 들어, 항체)을 사용함으로써 특히 관심있는 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다.

[0313] IX. 진단

[0314] [0255] 일 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체에 부착된 모이어티는 결합 모이어티, 표지 모이어티 및 생물학적 활성 모이어티로 이루어진 군에서 선택된다.

[0315] [0256] 본 명세서에 기재된 항체는 샘플 시험 및 생체내 영상화를 포함하여 진단 목적으로 사용될 수 있으며, 이를 위해 항체(또는 이의 결합 부분)를 적절한 검출 시약(agent)에 공액결합시켜 면역접합체를 형성할 수 있다. 진단 목적을 위해, 적절한 시약은 전신 영상화를 위한 방사성 동위원소, 및 방사성 동위원소, 효소, 형광 라벨 및 샘플 시험에 적합한 다른 항체 태그를 포함하는 검출 가능한 라벨이다.

[0316] [0257] 검출 가능한 라벨은 시험관내 진단 분야에서 현재 사용되는 다양한 유형 중 어느 것일 수 있으며, 그 예로는 콜로이드성 금과 같은 금속 졸, N2S2, N3S 또는 N4 타입의 펩티드 킬레이트제와 함께 제공된 I¹²⁵ 또는 Tc⁹⁹와 같은 동위원소를 포함하는 미립자 라벨, 형광 마커, 발광 마커, 인광 마커 등을 포함하는 발색단, 주어진 물질을 검출 가능한 마커로 전환시키는 효소 라벨, 및 증폭 후 이를테면 폴리머라제 연쇄반응에 의해 나타나는 폴리뉴클레오티드 태그가 있다. 적합한 효소 라벨은 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제 등을 포함한다. 예를 들어, 라벨은 아다만틸 메톡시포스포릴옥시 페닐디옥세탄(AMPPD), 이나트륨 3-(4-(메톡시스포로{1,2-디옥세탄-3,2'-(5'-클로로)트리시클로{3.3.1,1 3,7}데칸}-4-일) 페닐포스페이트(CSPD)와 같은 1,2-디옥세탄 물질의 전환 후 화학발광의 존재 또는 형성을 측정함으로써 검출되는 효소 알칼리성 포스파타제, 뿐만 아니라 CDP 및 CDP-star[®] 또는 당업계에서 공지된 기타 발광성 물질, 예를 들어 테르븀(III) 및 유로퓸(III)과 같은 적합한 란타나이드의 킬레이트일 수 있다. 검출 수단은 선택된 라벨에 의해 결정된다. 라벨 또는 그 반응 생성물의 외관은, 라벨이 미립자이고 적절한 수준으로 축적된 경우 육안으로 식별하거나, 또는 표준 관행에 따라 분광광도계, 발광계, 형광계 등과 같은 기구를 사용하여 식별할 수 있다.

[0317] [0258] 본 명세서에 기재된 항체는 또한 항체-약물 접합체(ADC)와 같은 면역접합체를 형성하기 위해 치료제에 공액결합될 수 있다. 적합한 치료제는 신경아교종 및/또는 반응성 성상교세포종의 발병 조절제 및/또는 퇴행성 뇌장애, 중추신경계 손상 또는 신경병성 통증 치료제를 포함한다. 퇴행성 뇌장애를 치료하기 위한 치료제는 헌팅턴병(Huntington's disease), 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증 및 근위축성 측삭경화증(ALS)을 치료하기 위한 약물을 포함한다. 이는 퇴행성 뇌장애를 치료하는 데 일반적으로 사용되는 약물, 예를 들어 섹션 XII에 설명된 약물을 포함한다.

[0318] [0259] 면역접합체는 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 바람직하게는, 공액결합 방법은 실질적으로

(또는 거의) 비-면역원성 연결, 예를 들어 펩티드-(즉, 아미드-), 설파이드-, (입체적으로 가리어진), 디설파이드-, 히드라존- 및 에테르 연결을 초래한다. 이들 연결은 거의 비-면역원성이며 혈청 내에서 적절한 안정성을 나타낸다(예를 들어, Senter, P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886 참조).

[0319] [0260] 모이어티 및 항체의 생화학적 성질에 따라, 상이한 공액결합 전략이 이용될 수 있다. 모이어티가 50 내지 500개 아미노산의 자연발생 또는 재조합인 경우, 단백질 공액결합체의 합성을 위한 화학을 기술하는 교과서에 표준 절차가 있으며, 이는 당업자가 용이하게 따를 수 있다(예를 들어, Hackenberger, C.P.R., and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074 참조). 일 실시형태에서, 말레이이미도 모이어티와 항체 또는 모이어티 내의 시스테인 잔기와의 반응이 이용된다. 이것은 예를 들어 항체의 Fab 또는 Fab'-단편이 사용되는 경우 특히 적합한 결합(coupling) 화학이다. 대안적으로 일 실시형태에서, 항체 또는 모이어티의 C-말단에 결합하는 것이 수행된다. 단백질, 예를 들어 Fab-단편의 C-말단 변형은 기재된 바와 같이 실시될 수 있다(Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

[0320] [0261] 일반적으로, 부위 특이적 반응 및 공유 결합은 존재하는 다른 작용기의 반응성과 직교하는(orthogonal) 반응성을 갖는 천연 아미노산을 아미노산으로 변환시키는 것에 기초한다. 예를 들어, 희귀한 서열 컨텍스트 내의 특이적인 시스테인은 알데히드에서 효소적으로 전환될 수 있다(Frese, M. A. and Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427 참조). 주어진 서열 컨텍스트에서 천연 아미노산과 특정 효소의 특이적 효소 반응성을 이용하여 원하는 아미노산 변형을 얻는 것도 가능하다(예를 들어, Taki, M. *et al.*, *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. *et al.*, *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136 참조). 프로테아제-촉매화된 C-N 결합 형성은 Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403에 의해 이용된다.

[0321] [0262] 부위 특이적 반응 및 공유결합은 또한 말단 아미노산과 적절한 변형 시약의 선택적 반응에 의해 달성될 수 있다. 벤조니트릴과 N-말단 시스테인의 반응성(Ren, H. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662 참조)은 부위-특이적 공유결합을 달성하기 위해 이용될 수 있다. 천연 화학적 리게이션은 또한 C-말단 시스테인 잔기에 의존할 수 있다(Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96).

[0322] [0263] EP 1 074 563은 양으로 하전된 아미노산의 스트레치(stretch)에 위치한 시스테인과 음으로 하전된 아미노산의 스트레치 내에서 시스테인의 빠른 반응을 기초로하는 공액결합 방법을 기술한다.

[0323] [0264] 모이어티는 또한 합성 펩티드 또는 펩티드 모방체일 수 있다. 폴리펩티드가 화학적으로 합성되는 경우, 직교 화학적 반응성을 갖는 아미노산은 이러한 합성 동안 혼입될 수 있다(예를 들어, De Graaf, A. J. *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295 참조). 매우 다양한 직교 작용기가 위태롭고 합성 펩티드에 도입될 수 있기 때문에, 이러한 펩티드가 링커에 공액결합하는 것은 표준 화학이다.

[0324] [0265] 단일-표지된 폴리펩티드를 수득하기 위해, 1:1 화학량론을 갖는 공액결합은 다른 공액결합 부생물로부터 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다. 이 절차는 염료-표지된 결합 쌍 멤버 및 하전된 링커를 사용함으로써 촉진될 수 있다. 이러한 종류의 표지되고 음으로 하전된 결합 쌍 멤버를 사용함으로써, 단일 공액결합된 폴리펩티드는, 하전 및 분자량의 차이가 분리에 이용될 수 있기 때문에, 비-표지된 폴리펩티드 및 1 이상의 링커를 갖는 폴리펩티드로부터 쉽게 분리된다. 형광 염료는 표지된 1가 결합체와 같은 비-결합 성분으로부터 복합체를 정제하는데 유용할 수 있다.

[0325] X. 제약학적 조성물

[0326] [0266] 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제(Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co, Easton, PA) 중에서 원하는 정도의 순도를 가진 본 명세서에 개시된 방법에 유용한 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 포함하는 조성물이 개시된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제는 이용된 투약량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이며, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드, 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저 분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코오스, 만노오스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물들; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로오

스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체(예를 들어 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온 계면활성제, 예컨대 TWEEN[®], PLURONICS[®] 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다.

[0327] [0267] 특정일 실시형태에서, 제약학적 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체 중에 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 부분, 이중 특이적 분자, 또는 면역접합체, 및 선택적으로 1 이상의 추가의 예방 또는 치료제를 포함한다. 특정일 실시형태에서, 제약학적 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체 중에 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 부분의 유효량, 및 선택적으로 1 이상의 추가의 예방 또는 치료제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 제약학적 조성물에 포함된 유일한 활성성분이다. 본 명세서에 개시된 제약학적 조성물은 FAM19A5 활성을 증진, 유발 또는 활성화하고 그리고 중추신경계 손상, 퇴행성 뇌장애 또는 신경병성 통증과 같은 병태를 치료하는데 유용하다.

[0328] [0268] 비경구 제제에 사용된 제약학적으로 허용되는 담체는 수성 비히클, 비수성 비히클, 항균제, 등장제, 완충제, 항산화제, 국소 마취제, 현탁 및 분산제, 유화제, 금속이온 봉쇄제 또는 킬레이트화제 및 다른 제약학적으로 허용되는 물질을 포함한다. 수성 비히클의 예들은 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장 텍스트로오스 주사액, 멸균수 주사액, 텍스트로오스 및 락테이트 링거 주사액을 포함한다. 비수성 비경구 비히클은 식물 기원의 고정유, 면실유, 옥수수유, 참깨유 및 땅콩유를 포함한다. 정균(bacteriostatic) 또는 정진균(fungistatic) 농도의 항균제가 다수-용량 용기에 포장된 비경구 제제에 첨가될 수 있으며, 이들은 페놀 또는 크레졸, 수은-함유 물질, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-히드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤잘코늄 클로라이드 및 벤제토늄 클로라이드를 포함한다. 등장제(isotonic agent)는 염화나트륨 및 텍스트로오스를 포함한다. 완충제는 포스페이트 및 시트레이트를 포함한다. 항산화제는 중화산나트륨을 포함한다. 국소 마취제는 프로카인 염산염을 포함한다. 현탁제 및 분산제는 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다. 유화제는 폴리소르베이트 80(TWEEN[®] 80)을 포함한다. 금속이온의 봉쇄제 또는 킬레이트화제는 EDTA를 포함한다. 제약학적 담체는 또한 수 혼화성 비히클용 에틸알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜을 포함하고, pH 조정용 수산화나트륨, 염산, 시트르산 또는 락트산을 포함한다.

[0329] [0269] 제약학적 조성물은 대상에 대한 임의의 투여경로에 맞게 제제화될 수 있다. 투여경로의 구체적인 예들은 비내, 경구, 비경구, 척추강내, 뇌실내, 폐, 피하, 또는 심실내 경로를 포함한다. 피하, 근육내 또는 정맥내 주사를 특징으로 하는 비경구 투여가 또한 고려된다. 주사가 가능 물질이 종래의 형태로, 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전에 액체 중에서 용액 또는 현탁액으로 되기에 적합한 고체 형태, 또는 에멀전으로서 제조될 수 있다. 주사가 가능 물질, 용액 및 에멀전은 또한 1 이상의 부형제를 함유한다. 적합한 부형제는, 예를 들어 물, 식염수, 텍스트로오스, 글리세롤 또는 에탄올이다. 또한, 원한다면, 투여될 제약학적 조성물은 소량의 비-독성 보조물질, 예컨대 습윤 또는 유화제, pH 완충제, 안정제, 용해성 증진제, 및 다른 이러한 제제들, 예컨대 나트륨 아세테이트, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 및 시클로텍스트리트를 함유할 수 있다.

[0330] [0270] 항체의 비경구 투여용 제제는 바로 주사 가능한 멸균 용액, 사용 직전에 용매와 바로 조합될 수 있는 동결건조된 분말과 같은 멸균건조 가용성 제제, 피하주사용 정제, 바로 주사 가능한 멸균 현탁액, 사용 직전에 비히클과 바로 조합될 수 있는 멸균건조 불용성 제제 및 멸균 에멀전을 포함한다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0331] [0271] 정맥내 투여되는 경우, 적합한 담체는 생리학적인 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수(PBS), 및 증점 및 용해제를 함유하는 용액, 예컨대 글루코오스, 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리프로필렌 글리콜 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0332] [0272] 항체를 포함하는 국부용 혼합물은 국소 및 전신 투여에 대해 설명된 대로 제조된다. 얻어진 혼합물은 용액, 현탁액, 에멀전 등일 수 있으며, 크림, 젤, 연고, 에멀전, 용액, 엘릭시르, 로션, 현탁액, 팅크제, 페이스트, 폼, 에어로졸, 관주제, 스프레이, 좌약, 붕대, 피부 패치 또는 국부적 투여에 적합한 임의의 다른 제제로서 제제화될 수 있다.

[0333] [0273] 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 부분은, 예컨대 흡입에 의한, 국부적 투여용 에어로졸로서 제제화될 수 있다(예를 들어 미국특허 제4,044,126호, 제4,414,209호 및 제4,364,923호 참조, 이 특허들은 염증성 질환, 특히 천식의 치료에 유용한 스테로이드의 분배를 위한 에어로졸을 개시함). 기도 투여용의 이들 제제는 분무기용의 에어로졸 또는 용액의 형태이거나, 또는 흡입제용의 초미세 분말일 수 있으며, 단독으로 사용되거나 또는 락토오스와 같은 비활성 담체와 조합하여 사용된다. 이 경우, 제제의 입자는, 일부 실시형태에서

50 마이크론 미만, 일부 실시형태에서 10 마이크론 미만의 직경을 가진다.

[0334] [0274] 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 국소 또는 국부적 적용, 예컨대 피부 및 점막에 국부적 적용, 예컨대 눈에 국소 적용을 위해, 젤, 크림 및 로션으로 제제화될 수 있고, 눈에 적용 또는 수조내 또는 척추내 적용을 위해 제제화될 수 있다. 국부적 투여는 경피 전달을 위해 고려되며, 또한 눈이나 점막투여, 또는 흡입 요법용으로 고려된다. 다른 제약학적으로 허용되는 부형제와 조합하여 또는 단독으로 항체의 코 용액이 또한 투여될 수 있다.

[0335] [0275] 이온영동 및 전기영동 장치를 포함하는 경피 패치가 당업자에게 공지되어 있으며, 항체 투여용으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 패치는 미국특허 6,267,983, 6,261,595, 6,256,533, 6,167,301, 6,024,975, 6,010,715, 5,985,317, 5,983,134, 5,948,433, 및 5,860,957에 개시되어 있다.

[0336] [0276] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 포함하는 제약학적 조성물은 동결건조된 분말이며, 이것은 용액, 에멀전 및 다른 혼합물로서 투여용으로 재구성될 수 있다. 동결건조된 분말은 또한 고형물 또는 겔로서 재구성 및 제제화될 수 있다. 동결건조된 분말은 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 부분, 또는 이의 제약학적으로 허용되는 유도체를 적합한 용매에 용해함으로써 제조된다. 일부 실시형태에서, 동결건조된 분말은 멸균 상태이다. 용매는 분말 또는 분말로부터 제조된 재구성 용액의 안정성 또는 다른 약물학적 성분을 개선하는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는, 제한은 아니지만, 텍스트로오스, 소르비톨, 프럭토오스, 콘 시럽, 자일리톨, 글리세린, 글루코오스, 수크로오스 또는 다른 적합한 제제를 포함한다. 또한, 용매는, 일부 실시형태에서, pH가 약 중성인 완충제, 예컨대 시트레이트, 나트륨 또는 칼륨 포스페이트 또는 당업자에게 알려진 다른 완충제를 함유할 수 있다. 용액을 후속 멸균 여과한 후 당업자에게 공지된 표준 조건하에서의 동결건조는 원하는 제제를 제공한다. 일부 실시형태에서, 얻어진 용액은 동결건조용 바이알에 배분된다. 각 바이알은 화합물의 단일 투약량 또는 다수 투약량을 함유할 수 있다. 동결건조된 분말은 적절한 조건하에, 예컨대 약 4℃ 내지 실온에서 보관될 수 있다.

[0337] [0277] 주사용수에 의한 이 동결건조된 분말의 재구성은 비경구 투여에 사용하기 위한 제제를 제공한다. 재구성을 위해 동결건조된 분말이 멸균수 또는 다른 적합한 담체에 첨가된다. 정확한 양은 선택된 화합물에 의존한다. 이러한 양은 경험적으로 결정될 수 있다.

[0338] [0278] 본 명세서에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 부분, 이중특이적 분자, 또는 면역접합체 및 본 명세서에 개시된 다른 조성물은 또한 치료 대상의 특정 조직, 수용체, 또는 다른 신체 영역에 표적화되도록 제제화될 수 있다. 많은 표적화 방법이 당업자에게 공지되어 있다. 모든 이러한 표적화 방법을 본 조성물에 사용하는 것이 고려된다. 표적화 방법의 비제한적 예들은, 예를 들어 미국특허 제6,316,652호, 제6,274,552호, 제6,271,359호, 제6,253,872호, 제6,139,865호, 제6,131,570호, 제6,120,751호, 제6,071,495호, 제6,060,082호, 제6,048,736호, 제6,039,975호, 제6,004,534호, 제5,985,307호, 제5,972,366호, 제5,900,252호, 제5,840,674호, 제5,759,542호 및 제5,709,874호를 참고한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 중추신경계 손상, 퇴행성 뇌장애 또는 신경병성 통증을 치료하기 위해 표적화된다.

[0339] [0279] 생체내 투여에 사용되는 조성물은 멸균될 수 있다. 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 멸균될 수 있다.

[0340] **XI. 키트**

[0341] [0280] 본 명세서에 개시된 1 이상의 항체, 또는 이의 항원-결합 부분, 이중특이적 분자, 또는 이의 면역접합체를 포함하는 키트가 제공된다. 특정일 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 1 이상의 항체 또는 이의 항원-결합 부분과 같은, 제약학적 조성물의 성분들 중 1 이상으로 채워진 1 이상의 용기, 선택적인 사용 설명서를 포함하는 제약학적 팩 또는 키트가 제공된다. 일부 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 개시된 제약학적 조성물 및 임의의 예방 또는 치료제를 함유한다.

[0342] **XII. 치료적 용도 및 방법**

[0343] [0281] 본 발명은 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체, 이중 특이적 분자 또는 면역접합체, 또는 이들의 조성물을 이를 필요로 하는 대상(예를 들어, 인간)에게 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 CNS의 손상 또는 상해를 완화시키는 방법을 제공한다.

[0344] [0282] 다른 양상에서, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체를 대상에게 투여하는 것을 포함하여, 대상에서 신경아교증의 시작 또는 개시 및 CNS의 관련된 유해한 영향을 억제, 둔화, 저하, 제한, 감소, 역전 또는 예방하는

방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 대상에게 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체를 투여하는 것을 포함하여, 대상에서 반응성 정상세포의 과도하거나 비정상적인 증식 및 이와 관련된 CNS의 유해한 영향을 억제, 둔화, 저하, 제한, 감소, 역전, 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체를 대상에게 투여하는 것을 포함하여, 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸의 발현을 축소, 억제 또는 감소하거나(뉴로칸, NG2 또는 모두의 수준을 포함), 또는 불활성 뉴런, NG2 또는 모두의 활성을 감소하거나 부여하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은, 본원에 기재된 항-FAM9A5 항체를 대상에게 투여하는 것을 포함하여, 바람직하게는 대상에서 손상 또는 상해 후 뉴런의 성장을 자극, 촉진, 증가 또는 활성화시키는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체를 대상에게 투여하여 c-fos mRNA, c-fos 단백질 또는 c-fos 단백질 활성의 수준을 증가시키고, 바람직하게는 뉴런의 핵에서 ERK mRNA, ERK 단백질 또는 pERK 활성의 수준을 증가시키는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5를 대상에게 투여하여, 바람직하게는 뉴런에서 GAP43 mRNA, GAP43 단백질의 수준을 향상 또는 증가시키거나, 또는 GAP43 단백질의 활성을 증가시키는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 항-FAM19A5 항체를 대상에게 투여하여, 필요로하는 대상에서 뉴런의 생존을 증진 또는 촉진시키고 및/또는 축삭의 재성장을 촉진시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 대상은 인간, 바람직하게는 CNS 손상, 외상, 부상, 뇌척수 손상, 뇌종양, 감염, 허혈, 뇌졸중, 자가면역 반응 및/또는 신경퇴행성 질환으로부터의 뉴런 손상 또는 상해를 갖는 인간이다.

[0345] [0283] 일부 양상에서, 본 발명은 또한 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체를 대상에게 투여하여 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 질환, 장애 또는 병태는 중추신경계 손상, 뇌척수계 손상, 퇴행성 뇌장애, 퇴행성 뇌척수액 또는 신경장애 또는 신경병성 통증을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중추신경계 손상은 외상성 뇌손상, 뇌척수 손상, 뇌졸중, 뇌종양 또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 퇴행성 뇌장애는 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 근위축성측삭 경화증(ALS) 또는 이들의 조합이다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체 또는 그의 조성물을 대상에게 투여하여 필요로하는 대상에서 외상성 뇌손상, 뇌척수 손상, 뇌졸중, 뇌종양 또는 이들의 조합을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체 또는 그의 조성물을 대상에게 투여하여 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, ALS를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 대상은 인간이다.

[0346] [0284] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 중추신경계 손상(예를 들어, 외상성 뇌손상, 뇌척수 손상, 뇌졸중 또는 뇌종양), 뇌척수액계 손상, 퇴행성 뇌장애(예를 들어, 헌팅턴병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, ALS), 퇴행성 뇌척수액 또는 신경장애 또는 신경병성 통증을 치료하기 위한 1 이상의 추가 제제와 조합하여 투여될 수 있다.

[0347] [0285] 일부 실시형태에서, 질환, 장애 또는 병태는 종양, 섬유증, 녹내장 또는 기분장애를 포함한다. 특정 실시형태에서, 질환, 장애 또는 병태는 종양을 포함한다. 일부 실시형태에서, 종양은 흑색종, 췌장암, 신경아교종(예를 들어, 다형성아교모세포종(GBM)), 유방암, 림프종, 폐암, 신장암, 전립선암, 섬유육종, 결장 선암종, 간암 또는 난소암을 포함한다.

[0348] [0286] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 예를 들어 종양 내의 혈관 정상화를 유도한다. 일부 실시형태에서, 혈관의 정상화는 증가된 연결성, 증가된 벽 두께, 감소된 혈관직경, 보다 규칙적인 혈관 방향 및 분포 패턴, 증가된 혈관 수, 누출 및 투과성 감소, 혈관에서의 증가된 혈관주위세포 적용범위 및 근접성, 증가된 산소화 또는 이들의 조합을 포함하는 혈관의 특성 변화를 수반한다.

[0349] [0287] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 종양의 성장을 억제한다. 일부 실시형태에서, 종양의 성장은 기준(예를 들어, 항-FAM19A5 항체를 투여받지 않은 대상에서 종양의 성장)과 비교하여 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 억제된다.

[0350] [0288] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 면역세포의 종양으로의 침윤을 향상시킨다. 일부 실시형태에서, 종양으로의 면역세포의 침윤은 기준(예를 들어, 항-FAM19A5 항체를 투여받지 않은 암 대상)과 비교하여 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 촉진/증가된다. 특정 실시형태에서, 면역세포는 대식세포, 수지상 세포, T 림프구, B 림프구, 자연살해(NK) 세포 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역세포는 비대를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 면역세포의 종양으로의 침윤은 신경 세포의 종양으로의 침윤 증가를 동반한다. 특정 실시형태에서, 뉴런 세포는 정상세포, 신경아교세포 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0351] [0289] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 대식세포 또는 미세아교세포의 포식작용을 향상

시킨다. 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 대식세포 또는 미세아교세포의 미토콘드리아 막 전위를 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 포식작용 또는 미토콘드리아 막 전위는 기준(예를 들어, 항-FAM19A5 항체를 투여받지 않은 암 대상)과 비교하여 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 촉진 또는 증가된다.

[0352] [0290] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체는 종양의 괴사 및 부종을 감소시킨다. 다른 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 종양의 조직 투과성을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 종양의 괴사 및 부종 또는 조직 투과성은 기준(예를 들어, 항-FAM19A5 항체를 투여받지 않은 암 대상)과 비교하여 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 감소된다.

[0353] [0291] 일부 실시형태에서, 항-FAM19A5 항체는 종양에서 혈류속도를 증가시킨다. 특정 실시형태에서, 혈류속도는 기준(예를 들어, 항-FAM19A5 항체를 투여받지 않은 암 대상)과 비교하여 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 증가된다.

[0354] [0292] 일부 실시형태에서, 종양을 치료하는 방법은 추가의 치료제를 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 추가의 치료제는 화학요법, 면역요법, 방사선요법 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역요법은 단클론성 항체, 키메라 항원 수용체(CAR) 요법, T-세포 요법, NK-세포요법, 수지상 세포(DC)요법, 입양 세포전달(ACT), 면역 체크포인트 조절제, 사이토카인, 암 백신, 보조제, 종양 용해성 바이러스 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 화학 요법은 테모졸로마이드, 켈시타빈, 파클리탁셀, 카보플라틴, 시스플라틴, 엘로톡수맙, 레날리도마이드, 텍사메타손, 옥살리플라틴 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0355] [0293] 일부 실시형태에서, 치료 유효량의 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체 또는 그의 조성물이 투여된다. 대상(예를 들어, 인간)을 치료할 때, 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체의 치료적 유효량은 질환의 연령, 성별, 중증도와 같은 인자에 의존한다.

[0356] [0294] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체 또는 그의 조성물은 정맥내, 경구, 비경구, 경막내, 수막공간내, 뇌실내, 폐, 피하, 피부, 근육내, 또는 심실내로 투여된다.

[0357] [0295] 다음의 실시예들은 예시적으로 제공되나 제한적인 것은 아니다.

[0358] 실시예

[0359] 실시예 1: 인간 FAM19A5 단백질의 발현 및 정제

[0360] [0296] 재조합 인간 FAM19A5 단백질을 아래 설명된 대로 생성해서 정제하고, 이 정제된 단백질을 결합 친화성 분석에 기초한 항체 스크리닝 분석에 사용하였다. 먼저, FAM19A5 유전자를 발현하는 LPS-hT 플라스미드를 박테리아로 형질전환하고 단백질 과발현을 유도하였다. 생성된 FAM19A5 단백질을 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제하였다. 이미다졸을 점차 높은 농도로 사용하여 Ni-칼럼으로부터 His-태그된 FAM19A5 단백질을 제거하였다. 용액 중 단백질 발현을 코마씨 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) R-250 염료를 사용하여 측정하였다. FAM19A5 이미다졸 함유 용액만을 취하고 PBS를 사용하여 FAM19A5 단백질을 농축하였다. 농축이 완료되었을 때 FAM19A5 단백질의 순도와 농도를 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 측정하였다. 이어서 농축된 단백질을 사용하여 FAM19A5-특이적 항체에 대해 스크리닝하였다.

[0361] 실시예 2: 항체 라이브러리 FAM19A5의 생성

[0362] 1. 면역화

[0363] [0297] FAM19A5 단백질을 닭의 면역화를 위한 항원으로서 사용하였다. 합성 펩티드 KLH 공액결합체(conjugate) 50 µg을 750 µL 포스페이트 완충 식염수(PBS)에 혼합하고 37°C에서 30분간 인큐베이션하였다. 이후, 2% 스쿠알렌 내독소 MPL(모노포스포포లే이트 지질 A종)에서 독소를 제거하고, 유중수(water-in-oil) 에멀전 보조제(RIBI + MPL + TDM + CWS 보조제, Sigma, St. Louis, Mo, USA)를 함유하는 TDW 및 CWS의 세포벽 성분의 미코박테리아를 에멀전화하고, 이것을 이후 3마리의 닭과 4마리의 토끼에 피하주사하였다. 닭과 토끼는 면역화 사이에 대략 2-3주 간격으로 총 3회 및 4회 면역화하였다. FAM19A5 단백질을 과발현했던 HEK293T 세포의 세포 용리액을 사용하여 면역화된 동물들로부터 얻어진 항체의 역가(titer)를 면역 블롯팅을 통해서 측정하였다.

[0364] 2. 면역화된 닭 및 토끼로부터 단쇄 가변 단편(scFv) 라이브러리의 제조

[0365] [0298] TRI 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 상기 설명된 면역화된 닭의 비장, 골수 및 활액낭(synovial sac)으로부터 RNA를 추출하였다. Oligo-dT 프라이머와 SUPERScript™ III 제1-가닥 합성 시스템

(First-Strand Synthesis System)(Invitrogen)을 이용하여 제1 가닥 cDNA를 합성하였다. 동물의 면역 시스템으로부터 얻어진 cDNA에 대해, 확장형 고 충실도 PCR 시스템(Expand High Fidelity PCR System)(Roche Molecular Systems, IN, USA)을 사용하여 단쇄 가변영역 라이브러리를 생성하였다. 각 반응에서 cDNA 1 μ L, 각 프라이머 60 pmol, 10 x 반응 완충 용액 10 μ L, 8 μ L의 2.5 mM dNTP(Promega, Madison, WI, USA), 및 Taq DNA 중합효소 0.5 μ L를 물과 혼합하였다. 최종 부피는 100 μ L이었다. PCR 반응을 다음의 조건을 이용하여 수행하였다: 30 사이클 (i) 94°C에서 15초, (ii) 56°C에서 30초, 및 (iii) 72°C에서 90초, 이후 72°C에서 10분간 최종 연장. 약 350 bp의 길이를 가진 단편을 포함하는 PCR 생성물을 1.5% 한천겔 위에 로딩하고, 전기영동 후 QIAGEN Gel II 추출 키트(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 사용하여 뉴클레오티드 단편을 정제하였다. 정제된 PCR 생성물을 OD 260 nm에서 판독하여 정량하였다(1 유닛 OD = 50 μ g/mL).

[0366] [0299] 제2 PCR로부터의 2개의 VH 및 VL 제1 생성물을 중첩 연장 PCR(Overlap extension PCR)에 의해 무작위로 연결하였다. 각 PCR 반응물을 100 ng의 정제된 VL 및 VH 생성물, 각 프라이머 60 pmol, 10 x 반응 완충액 10 μ L, 8 μ L의 2.5 mM dNTP, Taq DNA 중합효소 0.5 μ L 및 물과 100 μ L의 최종 부피로 혼합하였다. PCR을 다음의 조건하에서 수행하였다: 25 사이클 (i) 94°C에서 15초, (ii) 56°C에서 30초, 및 (iii) 72°C에서 2분, 이후 72°C에서 10분간 최종 연장. 약 700 bp의 길이를 가진 단쇄 가변영역 단편을 포함하는 PCR 생성물을 1.5% 한천겔 위에 로딩하고, 전기영동 후 QIAGEN II Gel Extract Kit(QIAGEN)를 사용하여 뉴클레오티드 단편을 정제하였다. 정제된 PCR 생성물을 OD 260 nm에서 판독하여 정량하였다(1 유닛 OD = 50 μ g/mL).

[0367] 3. 라이브러리, 리게이션 및 형질전환

[0368] [0300] PCR 생성물의 scFv 단편과 벡터 pComb3X-SS(The Scripps Research Institute, CA, USA)를 Sfi I 제한효소로 절단(digest)하였다. 정제된 중첩 PCT 생성물 10 μ g을 Sfi I 360 유닛(16 유닛당 μ g DNA, Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA), 10 x 반응 완충액 20 μ L 및 물과 혼합하여 최종 부피 200 μ L로 하였다. pComb3X-SS 벡터 20 μ g을 Sfi I 120 유닛(6 유닛당 μ g DNA), 10 x 반응 완충액 20 μ L 및 물과 혼합하여 최종 부피 200 μ L로 하였다. 혼합물을 50°C에서 8시간 동안 절단하였다. 이후, scFv 단편(약 700 bp) 및 벡터(약 3,400 bp)를 포함하는 절단된 생성물을 1% 한천겔 위에 로딩하고 Gel Extraction Kit II QIAGEN(QIAGEN, Valencia, CA, USA)을 사용하여 정제하였다. Sfi I-제한된 pComb3X 벡터 1,400 ng과 절단된 scFv 단편 700 ng을 5 x 연결효소(ligase) 완충제, 10 μ L의 T4 DNA 연결효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 물과 혼합하여 최종 부피 200 μ L로 하였다. 혼합물을 16°C에서 16시간 동안 인큐베이션하여 리게이션을 수행하였다.

[0369] [0301] 에탄올로 침전 후 DNA 펠릿을 물 15 μ L에 용해하였다. 라이브러리를 생성하기 위해, 리게이션 샘플을 대장균 균주 ER2738(New England Biolabs Inc, Hitchin, Hertfordshire, SG4 OTY, England, UK)에 바이브레이터 유전자(유전자 펄서: Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 전기천공을 통해서 형질전환하였다. 세포를 수퍼 브로스(SB) 배지 5 mL와 혼합하고 37°C에서 1시간 동안 250 rpm에서 교반하면서 인큐베이션하였다. 이후, 100 mg/mL 카나마이신 3 μ L를 SB 배지 10 mL에 첨가하였다. 라이브러리 크기를 결정하기 위해, 배양물 샘플 0.1 μ L, 1 μ L 및 10 μ L를 50 μ g/mL 카나마이신을 함유하는 루리아 브로스(Luria Broth)(LB) 한천판 위에 문질러 발랐다. 1시간 교반 후, 100 mg/mL 카나마이신 4.5 μ L를 LB 배양물에 첨가하고 추가로 1시간 더 교반하였다. 이후, 물 중의 VCM13 헬퍼 파지 2 mL($>10^{11}$ cfu/mL)를 100 mg/mL 카나마이신 92.5 μ L를 함유하는 예열된 LB(183mL)와 함께 LB 배지에 첨가하였다. 이 혼합물을 추가로 2시간 동안 37°C에서 250 rpm에서 교반하였다. 이후, 카나마이신 280 μ L (50 mg/mL)를 배양물에 첨가하고 37°C에서 하룻밤 교반하였다. 다음날, 박테리아 펠릿을 고속 원심분리기(Beckman, JA-10 로터)를 사용하여 4°C, 3,000 g에서 원심분리하였다. 이후, 박테리아 펠릿을 사용하여 파지미드 DNA를 추출하고 상청액은 멸균 원심분리 병으로 옮겼다. 이후, 폴리에틸렌 글리콜-8000(PEG-8000, Sigma) 8 g과 염화나트륨(NaCl, Merck) 6 g을 상청액에 첨가한 다음 얼음에 30분간 유지하였다. 이후, 상청액을 4°C, 15,000 g에서 15분간 원심분리하였다. 이후, 상청액을 버리고, 1% BSA-재생을 함유하는 파지 펠릿 Tris를 완충 식염수(TBS)에 현탁하였다.

[0370] 실시예 3: 면역화된 항원에 대한 라이브러리 패닝(바이오-패닝)(bio-panning)

[0371] [0302] 자기 비드(Dynabeads M-270 Epoxy, Invitrogen)를 사용하여 바이오-패닝을 수행하였다. 실온에서 대략 1×10^7 비드를 제조함 FAM19A5 단백질 5 μ g으로 실온에서 20시간 동안 비드와 단백질을 함께 회전교반하여 코팅하였다. 코팅이 완료되면 비드를 포스페이트 완충 식염수(PBS)로 4번 세척하고 실온에서 3% BSA를 함유하는 PBS 중에서 1시간 동안 차단하였다. 이후, 코팅된 비드를 상기 설명된 파지-디스플레이된 scFv와 함께 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 항원 코팅된 비드에 결합되지 않은 파지를 제거하기 위해, 비드를 0.05% Tween 20/PBS

로 세척하였다. 이후, 결합된 파지를 50 μ L의 0.1 M 글리신/염화수소(0.1 M 글리신-HCl, pH 2.2)로 용출하고 염화수소와 함께 2M Tris(Tris-HCl, pH 9.1) 3 μ L로 중화하였다. 이 파지-함유 상청액을 사용하여 대장균 ER2738 세포를 감염시켰고, VCSM13 헬퍼 파지를 사용하여 하룻밤 증폭하고 구제(rescue)하였다. 또한, 50 μ g/mL 카나마이신을 함유하는 LB 한천판 상에 파지-감염된 배양물을 블롯팅(blotting)함으로써 파지-감염된 배양물로부터의 파지 역가(titer)에 의해 투입(인풋) 및 생성(아웃풋)을 결정하였다. 다음날, PEG-8000과 NaCl을 사용하여 파지를 침전시켰고, 이어서 이것을 바이오패닝에 사용하였다. 바이오패닝은 상기 과정을 반복함으로써 최대 총 5회 수행하였다. 각 증폭에서 파지를 스크리닝하고 FAM19A5 단백질에 대한 높은 친화성을 위해 선택하였다.

[0372] 실시예 4: 파지 ELISA에 의한 클론의 선택

[0373] [0303] 바이오-패닝으로부터 선택된 클론을 분석하기 위해, 파지-디스플레이된 scFv로부터 개별 클론을 무작위로 선택하고 ELISA를 이용하여 클론이 FAM19A5 재조합 단백질에 결합하는 것을 확인하였다. FAM19A5 재조합 단백질을 0.1M NaHCO₃ 완충제에 희석하고, 단백질을 웰 당 100 ng을 사용하여 16시간 동안 4°C에서 96-웰 미량정량 플레이트를 코팅하였다. 다음날, 플레이트를 1시간 동안 37°C에서 3% BSA/PBS로 차단하였다. 이후, 파지 상청액을 6% BSA/PBS와 혼합하고 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 이후, 상청액을 함유하는 플레이트를 0.05% Tween-20/PBS로 세척하였다. HRP-공액결합된 M13 항체(α -M13-HRP, Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA)를 1/5,000으로 희석하였다. 희석된 항체 50 μ L를 플레이트에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 및 세척 후, 색 전개(color development)를 위해 플레이트에 0.05M 시트레이트 완충 용액, 1 μ g/mL의 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)(ABTS, Amresco, Solon, OH, USA), 및 0.1% H₂O₂를 첨가하였다. 각 웰에 대한 흡광도를 405 nm에서 측정하였다.

[0374] [0304] FAM19A5 재조합 단백질에 결합하고 높은 흡광도를 나타낸 면역화된 닭으로부터 생성된 24개 클론을 분석하였다. 24개 클론으로부터 독특한 서열을 가진 13개의 scFv 클론을 얻었다. 면역화된 토끼(테이터 미도시)로부터 생성된 클론의 경우, 164개의 클론이 서열화되어 174개의 클론이 초기에 확인되었다. 이들 클론으로부터 22개의 최종 독특한 ScFv 서열을 수득하였다.

[0375] 실시예 5: 탈면역화된 항-FAM19A5 항체의 생성

[0376] 1. 항-FAM19A5 항체(클론 1-65)의 탈면역화

[0377] [0305] 인간 대상에게 투여될 때 면역원성의 위험을 감소시키기 위해, 항-FAM19A5 항체(예를 들어, 1-65) 내에서 높은 면역원성의 특정 영역을 확인하기 위해 실리코(silico) 분석(EpiScreen Immunogenicity Analysis, Antitope Ltd., UK)을 수행하였다. 무차별(promiscuous) MHC 클래스 II 결합 펩티드를 확인하기 위해, iTopeTM (Abzena plc., UK)을 전체 서열에 걸쳐 중첩된 9-mer 펩티드에 대해 수행하였다. 잠재적인 T 세포 에피토프는 34개의 상이한 MHC 클래스 II 대립유전자에 대한 상호작용의 분석을 통해 예측되었다. 클론 1-65는 총 13개의 비-점라인 무차별 MHC 클래스 II 결합 펩티드를 함유하였다(도 2). 1-65 항체 및 SS01-13(즉, 탈면역화 후 1-65 항체)의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 서열 정렬이 도 1a 및 1b에 각각 제공되어 있다.

[0378] [0306] 또한, 무차별 MHC 클래스 II 결합 펩티드는 10,000개 이상의 펩티드에 대한 T 세포 자극분석에 의해 구획된 CD4⁺ T 세포 에피토프 데이터베이스인 TCEDTM (Abzena plc., UK)에 의해 분석되었다. 클론 1-65는 4개의 무차별 MHC 클래스 II 결합 펩티드가 공지된 T 세포 에피토프에 대해 높은 상동성을 가짐을 나타냈다(도 2).

[0379] 2. 복합 항체 라이브러리의 구축

[0380] [0307] 복합 항체 라이브러리는 면역원성과 관련된 CD4⁺ T 세포 에피토프를 회피하도록 설계되었다. 라이브러리 구축을 위해 가장 상동성인 인간 점라인을 선택하기 위해, 클론 1-65의 프레임워크를 IgBLAST 데이터베이스(NCBI)로 분석하였다. 인간 점라인 IGLV3-25^{*}02, IGLJ2^{*}01, IGHV3-23^{*}02 및 IGHJ1^{*}01 유전자는 클론 1-65에 대해 선택되었다(도 1). 가장 상동성인 인간 점라인 서열에서 클론 1-65의 동일하지 않은 특정 아미노산 잔기 MHC 클래스 II 결합 영역을 상응하는 아미노산으로 대체하도록 라이브러리를 구축하였다. 특히, 펩티드 중의 p1, p4, p6, p7 및 p9 잔기는 MHC 클래스 II 대립유전자의 결합 그루브(groove)와의 상호작용에 중요하다(James EA, Moustakas AK, Bui J, Nouv R, Papadopoulos GK, Kwok WW. *J Immunol.* 2009;183(5):3249-58).

[0381] [0308] 인간 및 닭 아미노산 모두를 커버하기 위해 축퇴성 코돈(degenerate codons)을 암호화하는 올리고뉴클레오타이드의 연속 중첩연장 중합효소 사슬반응(PCR)을 수행하여 전술한 바와 같이 부위-지향 돌연변이 유발 라이브

리리를 생성하였다(Baek DS, Kim YS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 463(3): 414-20). PCR 생성물을 파지미드 벡터내로 서브클로닝하고, 전술한 바와 같이 파지 제조를 위해 대장균 균주 ER2738 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)로 형질전환시켰다(Han J, Lee JH, Park S, Yoon S, Yoon A, Hwang DB *et al.*, *Exp Mol Med*. 2016; 48(11): e271).

[0382] 3. 바이오패닝 및 클론 선택

[0309] 양성 클론을 단리하기 위해, 바이오패닝 및 파지 효소 면역분석을 전술한 바와 같이 수행하였다(Barbas CF. *Phage display: 실험실 설명서*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001). FAM19A5에 대한 반응성을 갖는 파지 클론을 선택하고 그의 뉴클레오티드 서열을 생거(sanger) 서열화에 의해 결정하였다. FAM19A5에 대한 친화성이 유지되는 가장 적은 수의 무차별 MHC 클래스 II 결합 에피토프를 갖는 scFv 클론이 최종적으로 선택되었다.

[0310] 클론 1-65에서 총 6개의 무차별 MHC 클래스 II 결합 에피토프가 탈면역화된 클론 1-65(즉, SS01-13-S5 항체)에서 제거되었다(도 3a). CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3에서 무차별 MHC 클래스 II 결합 에피토프는 제거될 수 없었다(즉, 도 3a의 결합 펩티드 #6, #7, #8 및 #13). 또한, HFR1에 위치한 결합 펩티드 #4의 p6 잔기 및 결합 펩티드 #5의 p4 잔기가 결합 활성에서 결정적인 역할을 하기 때문에, HFR1에서의 무차별 MHC 클래스 II 결합 에피토프는 제거될 수 없었다. 탈면역화된 클론 1-65 항체와 FAM19A5 단백질에 대한 야생형 1-65 항체의 결합의 비교는 도 3b에 제공된다.

[0385] 실시예 6 탈면역화된 항-FAM19A5 항체(클론 1-65)의 CDR-H2에서 잠재적 N-글리코실화 부위의 부위-지향 제거

[0311] 부위-지향된 돌연변이 유발 라이브러리를 구축하기 위해, 클론 1-65 scFv를 암호화하는 유전자를 PCR의 템플레이트로서 사용하였다. CDR-H2의 S53은 전술한 바와 같이 NNK 변성 코돈(N=A, T, G 또는 C, K= G 또는 T)을 암호화하는 올리고뉴클레오티드로 무작위화되었다(Lee HK, Jin J, Kim SI, Kang MJ, Yi EC, Kim JE, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 493(1): 325-31). 중첩 연장 PCR에 의해 증폭된 scFv 단편을 상기 파지미드 벡터내로 서브클로닝하고, 상술한 바와 같이 파지 제조를 위해 ER2738(New England BioLabs) 내로 형질전환시켰다.

[0312] 형질전환 후 역가 플레이트로부터, 파지를 표시하는 무작위로 선택된 돌연변이체 scFv를 구제하고 전술한 바와 같이 파지효소 면역분석을 실시하였다(Barbas CF. *Phage display: 실험실 설명서*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001). FAM19A5에 대해 유사한 반응성을 나타내는 파지 클론을 선택하고 그의 뉴클레오티드 서열을 생거 서열화에 의해 결정하였다. S53은 트레오닌, 글리신 및 류신으로 치환될 수 있다. 이들 결과는 클론 1-65의 CDR-H2에서 잠재적인 N-글리코실화 부위가 세린을 류신 또는 글리신으로 대체함으로써 제거될 수 있음을 밝혀냈다.

[0313] 세린(S53G)(즉, S5-SG 항체)으로부터 글리신으로 치환된 탈면역화된 클론 1-65(즉, SS01-13-S5 항체)는 올리고뉴클레오티드를 사용하는 중첩 연장 PCR에 의해 구축되었다(도 4c). 파지미드 벡터내로 서브클로닝한 후, 파지를 표시하는 S5-SG 항체를 구제하고 상술한 바와 같이 파지효소 면역분석을 수행하였다. 항체의 발현 수준 및 크기는 도 4a 및 4b에 제공되어 있다. S5-SG 항체("탈면역화된 클론 1-65-S53G")는 탈면역화된 클론 1-65(즉, SS01-13-S5 항체)보다 FAM19A5 단백질에 대한 친화성이 더 낮았다(도 4d).

[0389] 실시예 7: 결합 친화도 분석

[0314] 본 명세서에 개시된 상이한 항-FAM19A5 항체의 FAM19A5 단백질에 대한 결합 친화도를 추가로 평가하기 위해, SPR 및 ELISA 분석 둘 모두를 사용하였다.

[0315] SPR 분석을 위해, 다음 프로토콜이 사용되었다. FAM19A5 단백질을 부동화 완충액(10 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5) 중에 희석시켰다(2 μ g/mL). CM5 센서 칩을 에틸(디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC)(400 mM) 및 NHS(100 mM)의 혼합물로 420초 동안 활성화시켰다. 이어서, 2 μ g/mL의 FAM19A5 단백질(부동화 완충액 중, pH 4.5)을 10 μ L/분의 유속으로 420초 동안 Fc2 샘플 채널에 주입하여 약 50 RU 수준에 도달하였다. 그 후, 칩을 420초 동안 유량 10 μ L/분으로 1M 에탄올아민 염화수소에 의해 비활성화시켰다. 기준 표면 Fc1 채널도 제조되었고 유사하게 활성화 및 비활성화되었다. 항-FAM19A5 항체를 런닝 완충액(HBS-EP; 0.005% Tween-20을 갖는 1 x HEPES, pH 7.4)에서 상이한 농도(90 nM, 30 nM, 10 nM, 3.3 nM, 1.1 nM, 0 nM)로 희석하였다. 희석된 항-FAM19A5 항체를 60초의 회합 단계(association phase) 동안 30 μ L/분의 유속으로 Fc1-Fc2 채널에 주사하였다. 이어서 단일 사이클 동역학 모드를 통한 300초 해리단계(dissociation phase)가 이어졌다. 각 분석 사이클 후, 센서 칩 표면을 60초 동안 30 μ L/분의 유속으로 10 mM 글리신-HCl, pH 1.5로 재생시켰다. 데이터는 BIA 평

가 소프트웨어를 사용하여 1:1 피팅에 대해 분석되었다.

- [0392] [0316] ELISA 분석을 위해, 다음 프로토콜이 사용되었다. 항-토끼 Fc 항체(50 mM 탄산염 완충액, pH 9.6에서 1 μ g/mL의 농도로 희석됨)를 사용하여 4°C에서 밤새 96-웰 플레이트(100 μ L/웰)를 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 세척 완충액(PBST: 0.05% Tween-20/PBS)로 총 5회 세척하였다. 그 다음 플레이트를 차단 완충액(1% BSA/PBST) (150 μ L/웰)로 37°C에서 1시간 동안 차단하고 세척 완충액으로 다시 세척하였다. 이어서, 차단 완충액에 희석된 50 ng/mL의 FAM19A5-토끼 Fc(FAM19A5-rFc 라고도 함) 항원을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 추가로 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후, 세척 완충액으로 플레이트를 다시 총 5회 세척하였다. 상이한 농도(2,055 pM, 685 pM, 228.3 pM, 76.1 pM, 25.4 pM, 8.5 pM, 2.8 pM, 0 pM)로 차단 완충액 중의 희석된 항-FAM19A5 항체를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고(세척 완충액 중 총 5회 세척), 이어서 희석된 항-인간 카파 경쇄-HRP(차단 완충액 중 1:10,000)를 웰에 첨가하였다(100 μ L/웰). 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 이어서, 플레이트를 다시 세척하고 TMB 용액(100 μ L/웰)으로 처리하였다. 이 반응을 100 μ L의 황산(2N H₂SO₄)을 사용하여 중단하고, 96 웰 마이크로플레이트 리더(Molecular Device)를 사용하여 450 nm에서의 흡수를 통해 색 변화의 정도를 검출하였다.
- [0393] [0317] 분석 결과는 도 5a-5c 및 도 6a-6d에 도시되어 있다. 도 5a-5c에 도시된 바와 같이, SPR의 결과는 시험된 3개의 항-FAM19A5 항체 중 1-65 항체가 가장 큰 결합 친화도로 FAM19A5 단백질에 결합함을 시사하였다. 1-65 항체는 0.345 nM의 K_D를 갖는 반면, SS01-13-S5 및 S5-SG 항체는 각각 2.201 nM 및 1.797 nM의 K_D를 가졌다. 도 6에 도시된 바와 같이 ELISA 분석으로 유사한 결과가 관찰되었다.
- [0394] 실시예 8: 면역세포의 식세포능(phagocytic ability)에 대한 항-FAM19A5 항체의 효과 평가
- [0395] [0318] 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체가 특정 면역세포의 식세포능에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해, BV 세포(부동화된 쥐 미세아교 세포주)를 사용하였다. 간단히 설명하면, BV2 세포를 96-웰 플레이트(5 x 10³/100 μ L/웰) 상에 플레이팅하고 6시간 동안 37°C의 5% CO₂에서 인큐베이션 하였다. 이어서, 세포를 인간 FAM19A5-Fc 단백질(0.25 μ M, 로트번호 170815) 단독으로 또는 항-FAM19A5 항체 1-65, SS01-13-S5 또는 S5-SG의 다양한 농도(3.125 μ g/mL, 6.25 μ g/mL, 12.5 μ g/mL 또는 25 μ g/mL)로 조합하여 처리하였다. 대조군의 세포를 PBS 단독으로 처리하였다. 처리된 세포를 추가 16시간 동안 37°C의 5% CO₂에서 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후, PHRODO™ Green E. coli BioParticles (Thermofisher, P35366)를 세포에 첨가하였다(15 μ g/100 μ L/웰). 그 다음 INCUCYTE® (Sartorius)를 사용하여 1시간마다 녹색형광 강도를 측정하여 BioParticles의 식세포 흡수를 관찰하였다.
- [0396] [0319] 도 7a-7c에 도시된 바와 같이, 인간 FAM19A5-Fc 단백질로 BV2 세포를 처리한 경우, BV2 세포의 식세포능을 억제하였다. 그러나, 인간 FAM19A5-Fc 단백질 및 임의의 시험된 항-FAM19A5 항체의 조합물로 BV2 세포를 처리한 경우 농도-의존적 방식으로 포식작용을 회복시켰다. BioParticles로 처리 약 10 시간 후, 대조군(즉, PBS 단독)과 비교하여, 항체 1-65, SS01-13-S5 및 S5-SG에서 관찰된 포식작용의 양은 각각 다음과 같았다: 86%, 96% 및 89%. 이들 결과는 1-65 항체와 같이 탈면역화된 SS01-13-S5 및 S5-SG가 BV2 세포에서 FAM19A5-Fc 단백질 매개된 억제를 효과적으로 차단할 수 있음을 입증한다.
- [0397] 실시예 9: 뇌손상 동물 모델에서 항-FAM19A5 항체의 용도
- [0398] [0320] 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체의 생체내 기능을 평가하기 위해, 외상성 뇌손상(TBI) 마우스 모델이 사용될 것이다. 간단히 설명하면, 마우스에 상이한 항-FAM19A5 항체를 투여할 것이다. TBI 유도(TBI5D) 후에 동물을 희생시킬 것이다. 항-FAM19A5 항체의 효과, 예를 들어 외상성 뇌손상 후 반음영(penumbra) 부위의 반응성 신경아교증의 발병이 측정될 것이다.
- [0399] 실시예 10: 유도성 흑색종(melanoma) 모델에서 항-FAM19A5 항체의 항암효과
- [0400] [0321] 본 개시 내용의 항-FAM19A5 항체의 항암효과를 평가하기 위해, 유도성 마우스 흑색종 모델이 사용될 것이다. 간단히 설명하면, 흑색종은 수컷 Tyr::CreER; Braf+/+; Ptenlox/lox 마우스(Jackson Lab, USA)를 암컷 Tyr::CreER; BrafCA/CA; Ptenlox/lox와 교배함으로써 Tyr::CreER; BrafCA/+; Ptenlox/lox 마우스를 생산할 것이다. Dankort D., et al., Nat Genet 41(5): 544-52 (2009) 참조. 흑색종은 출생 후 약 7주에 자발적으로 유도될 것이다. 마우스는 종양 부피 및 흑색종 수에 따라 분류될 것이다.

- [0401] [0322] 분리 후, 동물은 항-FAM19A5 항체 또는 인간 IgG 대조군 항체를 투여받을 것이다. 이어서, 투여 후 다양한 시점에 동물에서 흑색종의 부피 분석을 수행할 것이다.
- [0402] 실시예 11: 신경병성 통증 동물 모델에서 항-FAM19A5 항체의 사용
- [0403] [0323] 본 명세서에 개시된 항-FAM19A5 항체의 생체내 기능을 평가하기 위해, 만성 수축 손상(CCI)의 마우스 모델이 사용될 것이다. 간단히 설명하면, 마우스에는 상이한 항-FAM19A5 항체가 투여될 것이다. 이어서, 투여 후 약 1주일에 음낭 신경 리게이션을 통해 말초신경 손상이 동물에서 유도될 것이다. 손상 후 다양한 시점에서, 기계적 이질통(allodynia)(물리적 외부자극에 대한 반응) 및 열 통각과민(hyperalgesia)(온도 상승에 대한 반응) 모두가 동물에서 평가될 것이다. 기계적 이질통은 폰 프레이(Von Frey) 모노필라멘트(0.16g)를 손상된 발에 여러 번 적용하고 동물이 통증에 반응하는 빈도를 관찰하여 평가된다. 열 통각과민은 하그레브스(Hargreaves) 시험을 이용하여 평가되며, 여기서 방사형 열 자극(강도: 30)이 손상된 발에 적용되고 발 철회(withdrawal) 지연 시간이 결정된다.
- [0404] [0324] 개요 및 요약 부분이 아닌 상세한 설명 부분이 청구항들을 해석하기 위해 사용되는 것으로 이해되어야 한다. 개요 및 요약 부분은 본 발명자(들)에 의해 고찰된 대로 본 발명의 전부는 아니지만 1 이상의 예시적인 실시형태를 제시할 수 있고, 따라서 본 발명과 첨부된 청구항을 어떤 식으로도 제한하려고 의도하지 않는다.
- [0405] [0325] 본 발명은 명시된 기능들과 이들의 관계의 실시형태를 예시하는 기능적 구성요소의 보조하에 상기에서 개시되었다. 이들 기능적 구성요소의 경계는 설명의 편의를 위해 본 명세서에서 자의적으로 한정되었다. 명시된 기능들과 이들의 관계가 적절히 수행되는 한 대안의 경계도 한정될 수 있다.
- [0406] [0326] 특정한 실시형태들에 대한 전술한 설명은 본 발명의 일반적인 성질을 충분히 드러낼 것이며, 제3자는 당업계의 지식을 적용함으로써 본 발명의 일반적인 개념으로부터 벗어나지 않고 과도한 실험 없이 이러한 특정한 실시형태들을 다양한 용도에 맞게 쉽게 변형 및/또는 개조할 수 있다. 따라서, 이러한 개조 및 변형은 본 명세서에 제시된 교시 및 지침에 기초하여 개시된 실시형태들의 등가물의 의미와 범위 내에 있도록 의도된다. 본 명세서에서 사용된 문구 또는 용어는 제한이 아닌 설명의 목적을 위한 것임이 이해되어야 하며, 본 명세서의 용어 또는 문구는 교시 및 지침에 비추어 당업자에 의해 해석되어야 한다.
- [0407] [0327] 본 발명의 범위 및 영역은 상기 설명된 예시의 실시형태들 중 어느 것에 의해 제한되어서는 안되며, 청구항 및 그것의 등가물에 따라서만 한정되어야 한다.
- [0408] [0328] 본 명세서에서 인용된 모든 간행물, 특허, 특허출원, 인터넷 사이트 및 수탁번호/데이터베이스 서열(폴리뉴클레오타이드와 폴리펩티드 서열을 모두 포함)은 각 개별 간행물, 특허, 특허출원, 인터넷 사이트 또는 수탁번호/데이터베이스 서열이 참고로 포함되도록 구체적으로 그리고 개별적으로 적시된 것과 동일한 범위로 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.
- [0409] [0329] 본 PCT 출원은 2018년 5월 10일자 제출된 미국 가출원 제 62/669,648 호 및 2019년 4월 24일자 제출된 미국 가출원 제 62/838,187 호의 우선권을 주장하며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참고로서 포함된다.

도면

도면1a

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
1-65_VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFS	SYQMGWVRQAPGKGLEWVG	VINKSGSDTSY	
SS01-13_VH	AVTLDESGGGLQTPGGALSLCKASGFTFS	SYQMGWVRQAPGKGLEWVG	VINKSGSDTSY	
SS01-13-S5_VH	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFTFS	SYQMGWVRQAPGKGLEWVS	AINKSGSDTSY	
S5-SG_VH	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFTFS	SYQMGWVRQAPGKGLEWVS	AINKGGSDTSY	
	*****	*	*****	*****
	FR3	CDR3	FR4	
1-65_VH	GS AVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTGTYFCAK	GSASYITAATIDAW	GHGTEVIV	
SS01-13_VH	GS AVKGRATISRDNQSTLYLQMNNLRAEDTAVYFCAK	GSASYITAATIDAW	GHGTEVIV	
SS01-13-S5_VH	GS AVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAK	GSASYITAATIDAW	GHGTEVIV	
S5-SG_VH	GS AVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAK	GSASYITAATIDAW	GHGTEVIV	
	*****	: **	*****	*****
1-65_VH	SS			
SS01-13_VH	SS			
SS01-13-S5_VH	SS			
S5-SG_VH	SS			
	**			

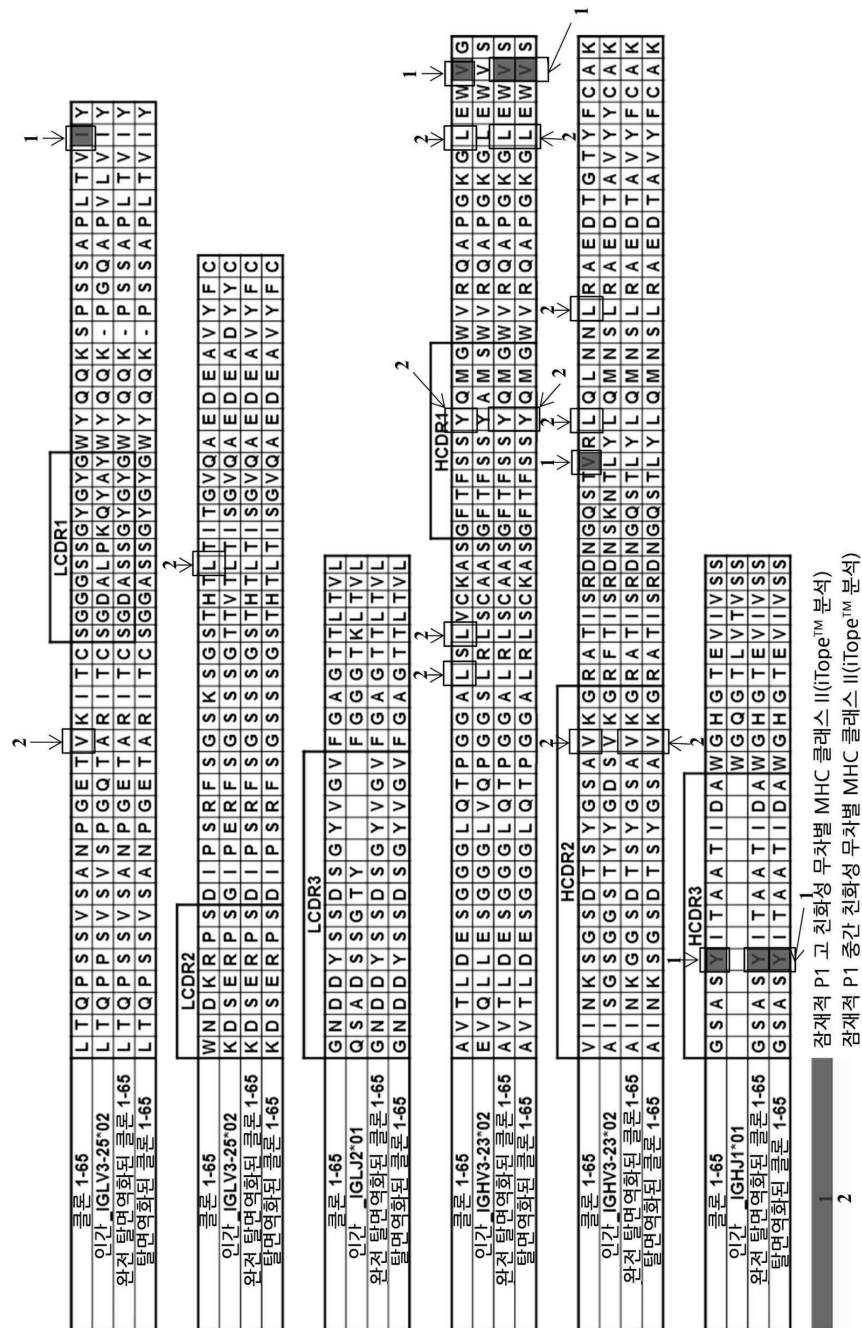
도면1b

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
1-65_VL	ALTQPSSVSANPGETVKITCS	SGGGSSGYGYG	WYQQKSPSSAPLTVIY	WNDKRPSDIPSRF
SS01-13_VL	ALTQPSSVSANPGETVRITCS	SGGASSGYGYG	WYQQK-PSSAPLTVIY	KDDERPSDIPSRF
SS01-13-S5_VL	ALTQPSSVSANPGETARITCS	SGGASSGYGYG	WYQQK-PSSAPLTVIY	KDSERPSDIPSRF
S5-SG_VL	ALTQPSSVSANPGETARITCS	SGGASSGYGYG	WYQQK-PSSAPLTVIY	KDSERPSDIPSRF
	*****	: **	*****	*****
	FR3	CDR3	FR4	
1-65_VL	SGSKSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFC	GNDDYSSDSGYVGV	FGAGTTTLTVL	
SS01-13_VL	SGSSSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFC	GNDDYSSDSGYVGV	FGAGTTTLTVL	
SS01-13-S5_VL	SGSSSGSTHTLTISGVQAEDEAVYFC	GNDDYSSDSGYVGV	FGAGTTTLTVL	
S5-SG_VL	SGSSSGSTHTLTISGVQAEDEAVYFC	GNDDYSSDSGYVGV	FGAGTTTLTVL	
	***	*****	*****	*****

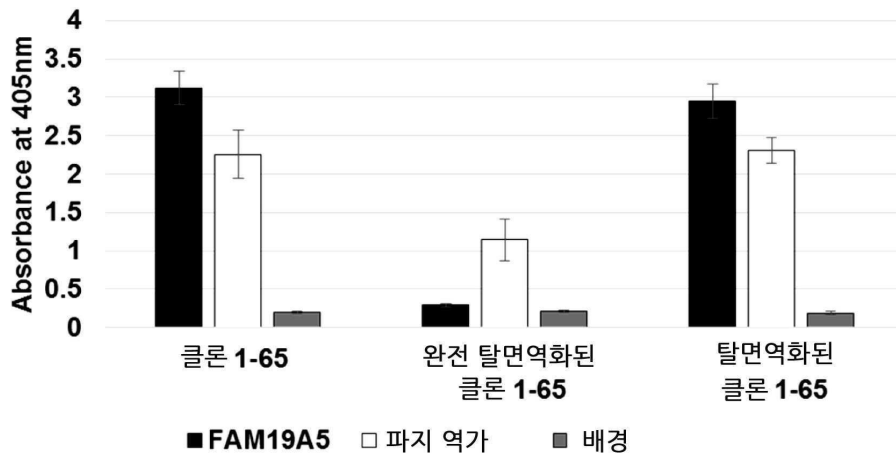
도면2

[illegible]

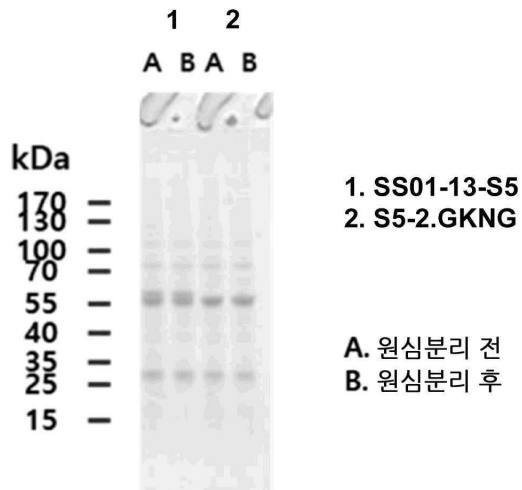
도면3a



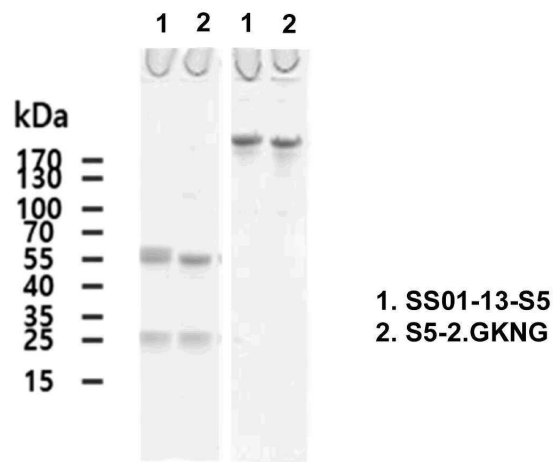
도면3b



도면4a



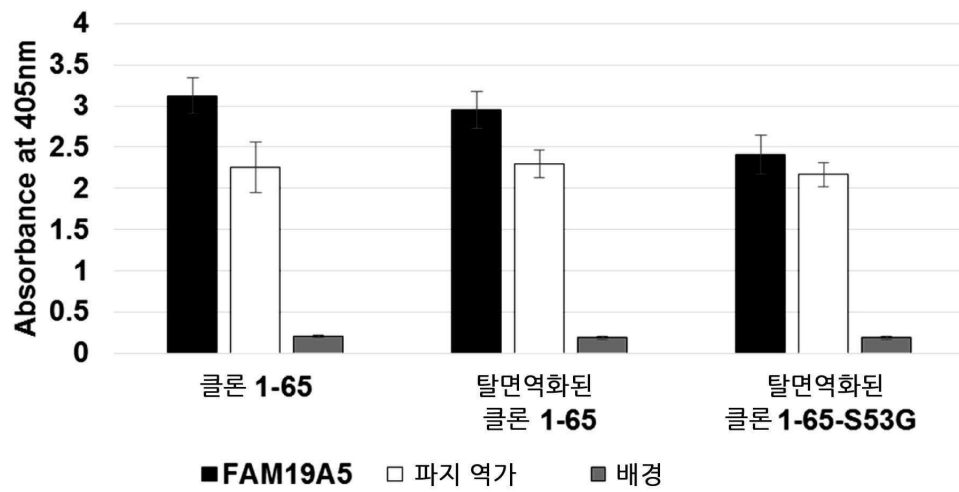
도면4b



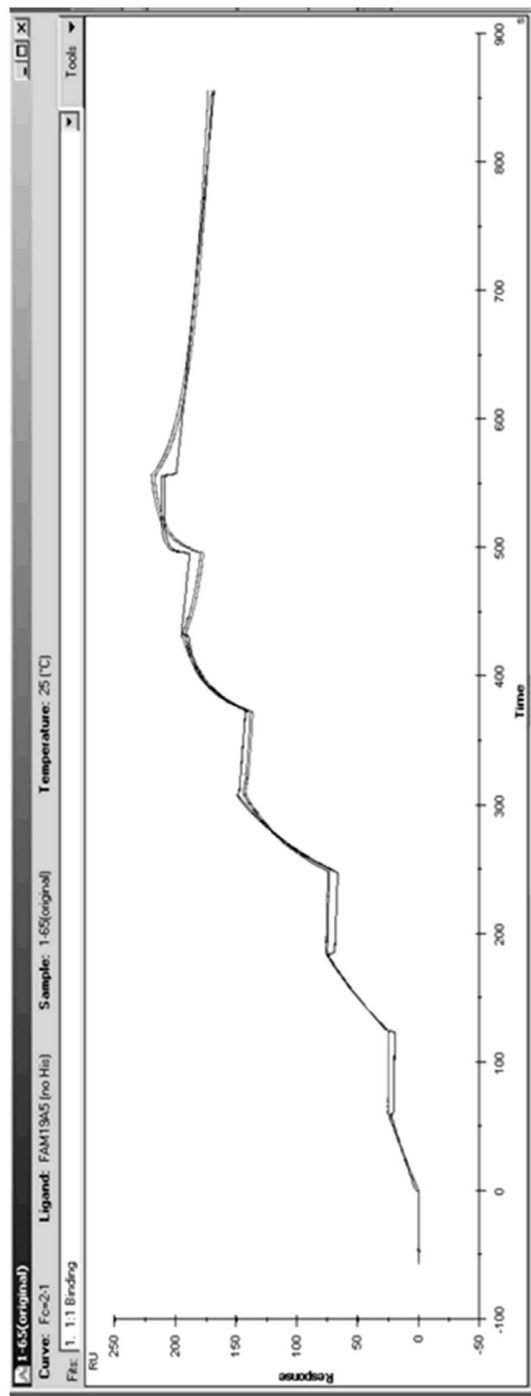
도면4c

타면역화되 클론 1-65	L T Q P S S V S A N P G E T A R I T C S G G A S S G Y G Y G W Y Y Q K P S S A P L T V I Y	LCDR1	L T Q P S S V S A N P G E T A R I T C S G G A S S G Y G Y G W Y Y Q K P S S A P L T V I Y
타면역화되 클론 1-65-S53G	L T Q P S S V S A N P G E T A R I T C S G G A S S G Y G Y G W Y Y Q K P S S A P L T V I Y		L T Q P S S V S A N P G E T A R I T C S G G A S S G Y G Y G W Y Y Q K P S S A P L T V I Y
타면역화되 클론 1-65	K D S I E R P S D I P S R F S G S S S G S T H T L T I S G V Q A E D E A V Y F C	LCDR2	K D S I E R P S D I P S R F S G S S S G S T H T L T I S G V Q A E D E A V Y F C
타면역화되 클론 1-65-S53G	K D S I E R P S D I P S R F S G S S S G S T H T L T I S G V Q A E D E A V Y F C		K D S I E R P S D I P S R F S G S S S G S T H T L T I S G V Q A E D E A V Y F C
타면역화되 클론 1-65	G N D D Y S S D S G Y V G V F G A G T T L T V L	LCDR3	G N D D Y S S D S G Y V G V F G A G T T L T V L
타면역화되 클론 1-65-S53G	G N D D Y S S D S G Y V G V F G A G T T L T V L		G N D D Y S S D S G Y V G V F G A G T T L T V L
타면역화되 클론 1-65	A V T L D E I S G G G L Q T P G G A L R L S C K A S G F T F S S Y Q M G W V R Q A P G K G L E W V S	HCDR1	A V T L D E I S G G G L Q T P G G A L R L S C K A S G F T F S S Y Q M G W V R Q A P G K G L E W V S
타면역화되 클론 1-65-S53G	A V T L D E I S G G G L Q T P G G A L R L S C K A S G F T F S S Y Q M G W V R Q A P G K G L E W V S		A V T L D E I S G G G L Q T P G G A L R L S C K A S G F T F S S Y Q M G W V R Q A P G K G L E W V S
타면역화되 클론 1-65	A I N K S G S D T S Y G S A V K G R A T I S R D N G Q S T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C A I K	* HCDR2	A I N K S G S D T S Y G S A V K G R A T I S R D N G Q S T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C A I K
타면역화되 클론 1-65-S53G	A I N K G G S D T S Y G S A V K G R A T I S R D N G Q S T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C A I K		A I N K G G S D T S Y G S A V K G R A T I S R D N G Q S T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y F C A I K
타면역화되 클론 1-65	G S A S Y I T A A T I D A W G H G T E V I V S S	HCDR3	G S A S Y I T A A T I D A W G H G T E V I V S S
타면역화되 클론 1-65-S53G	G S A S Y I T A A T I D A W G H G T E V I V S S		G S A S Y I T A A T I D A W G H G T E V I V S S

도면4d

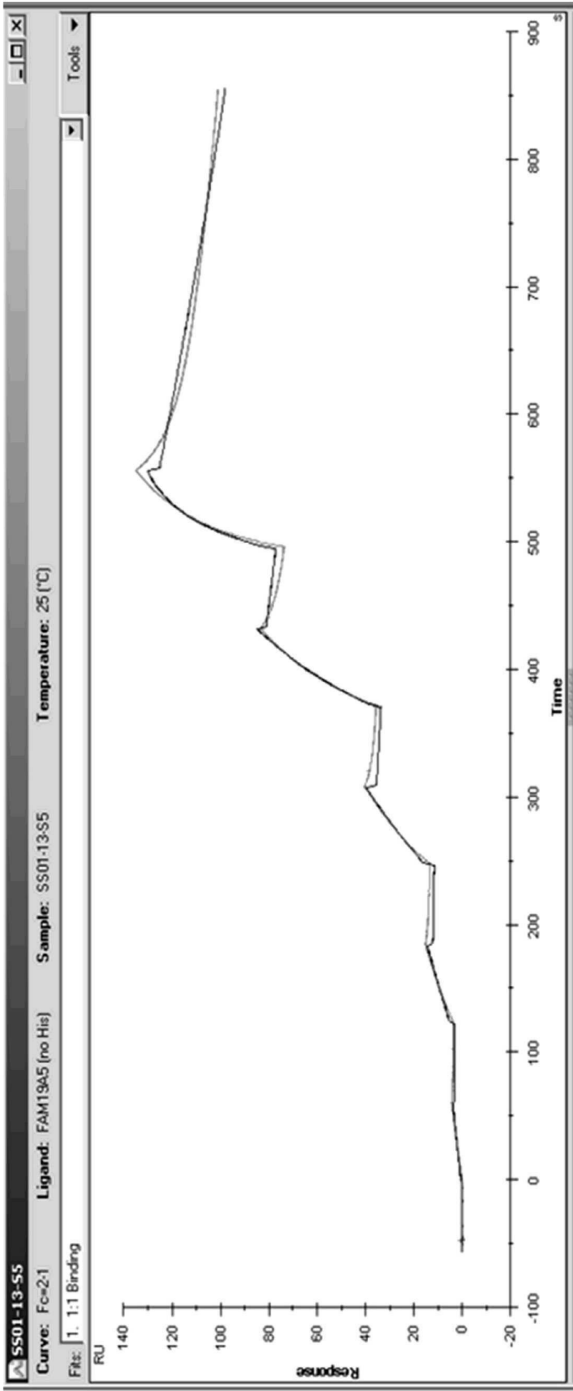


도면5a



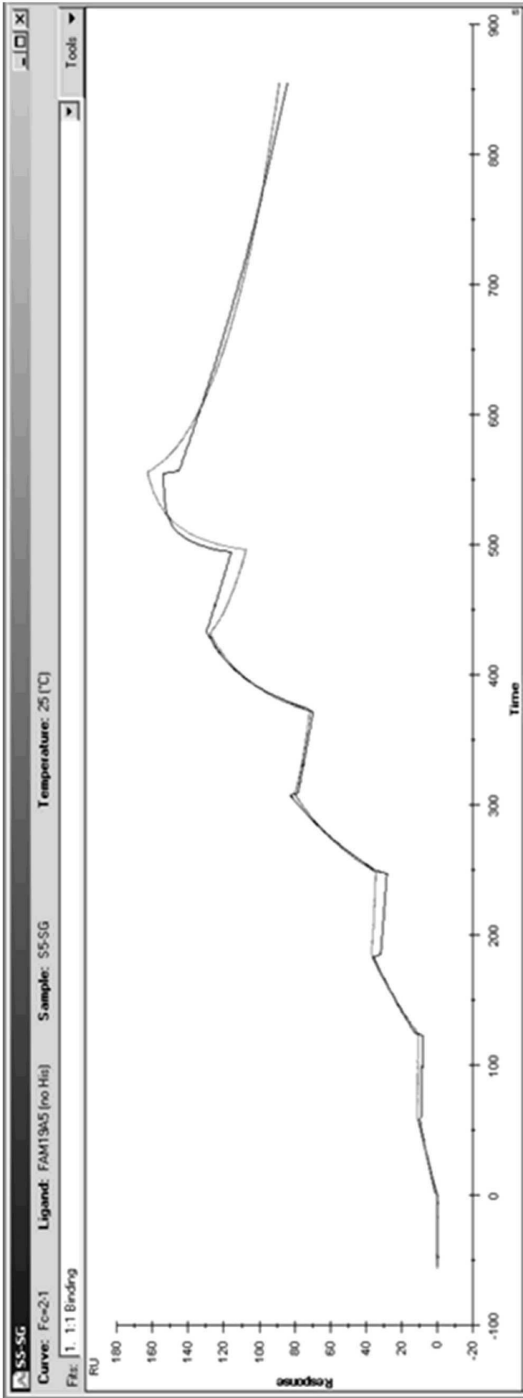
ka (1/Ms)	kd (1/s)	Kd (M)	Rmax (RU)
1.641 x 10 ⁶	5.667 x 10 ⁻⁴	3.45 x 10 ⁻¹⁰	200.2

도면5b



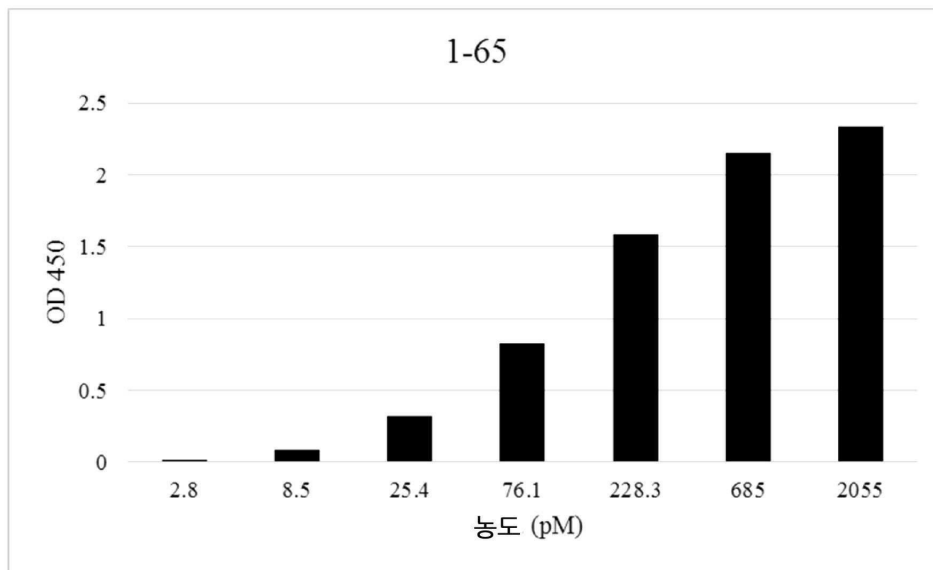
Ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
3.734 x 10 ⁵	8.216 x 10 ⁻⁴	2.201 x 10 ⁻⁹	135.6

도면5c

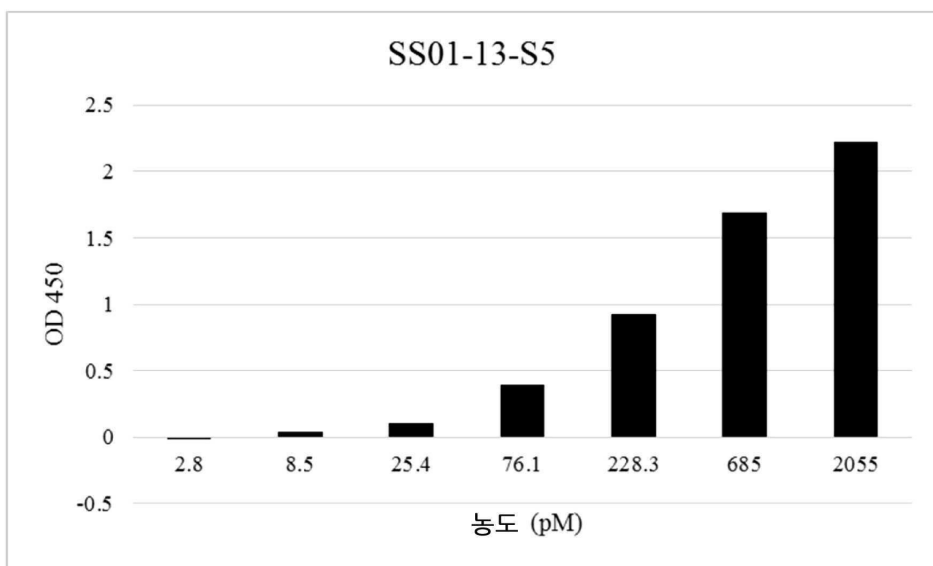


Ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
1.016 x 10 ⁶	1.826 x 10 ⁻³	1.797 x 10 ⁻⁹	148.0

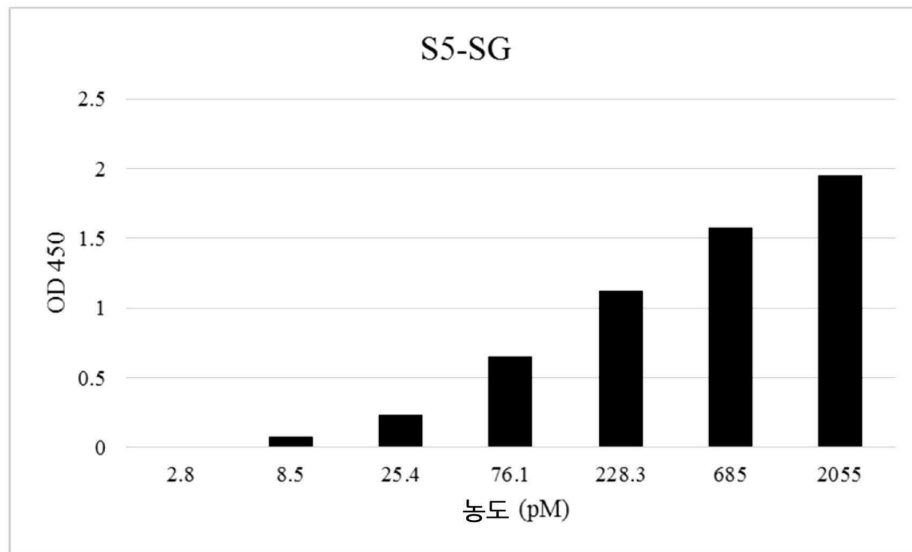
도면6a



도면6b



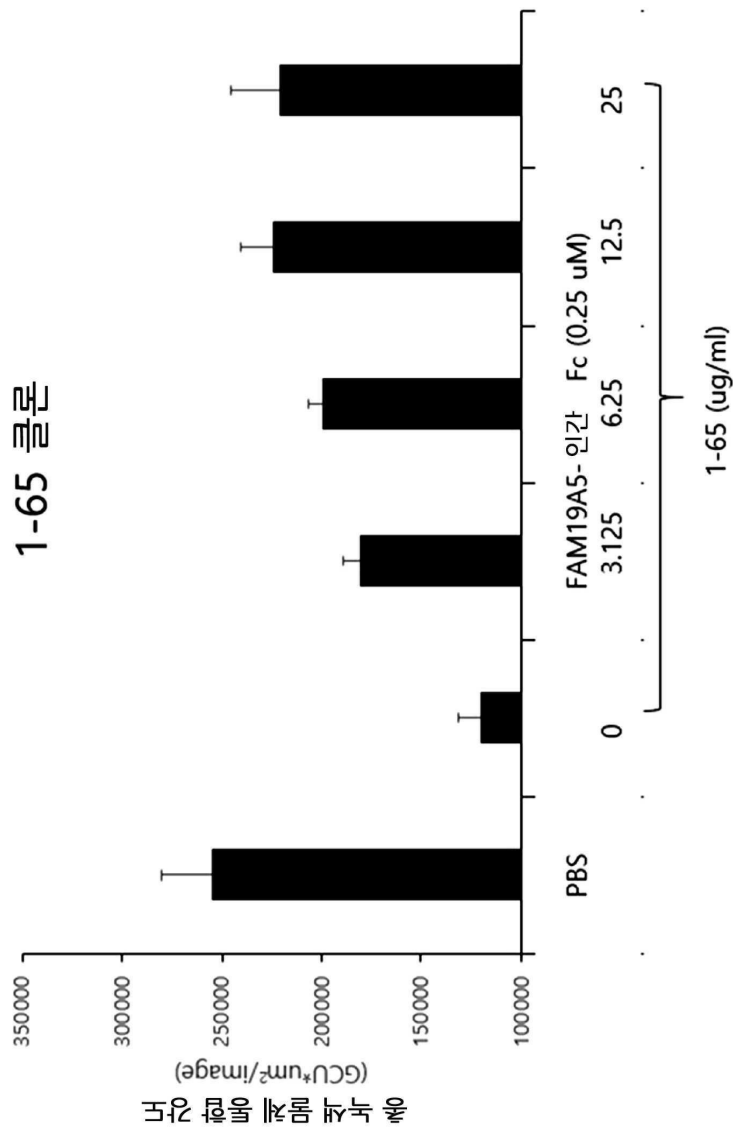
도면6c



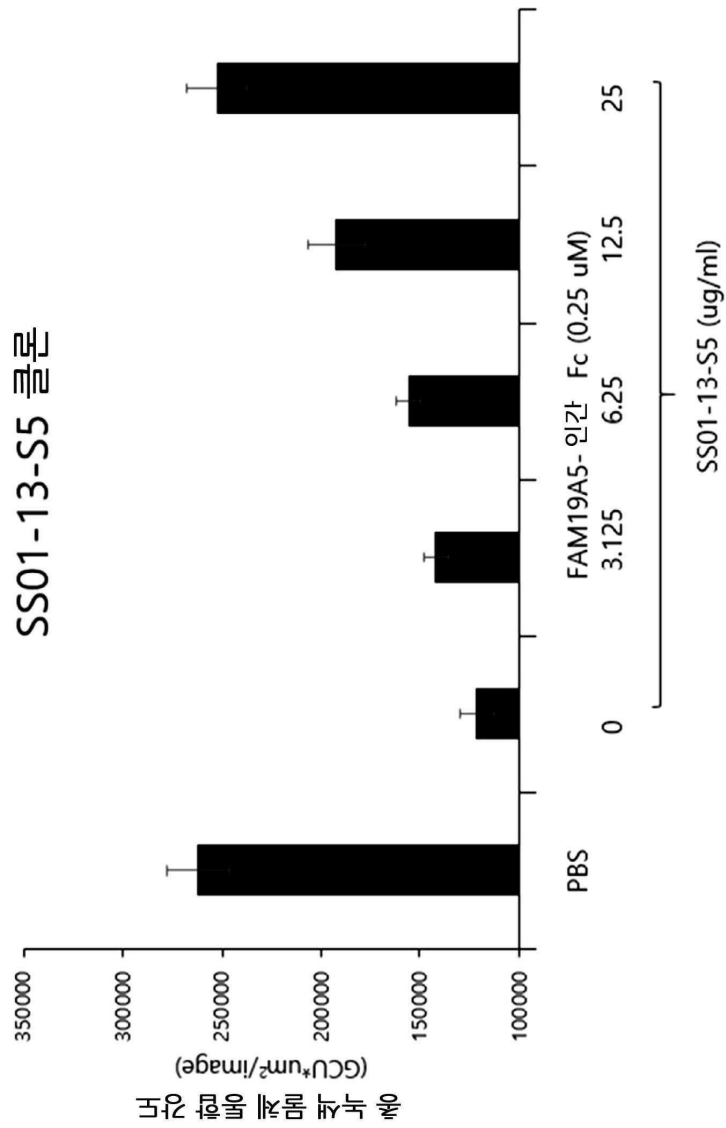
도면6d

FAM19A5-rFc	1-65	SS01-13-S5	S5-SG
EC50 (nM)	0.13	0.38	0.21
R ²	1.000	1.000	0.999

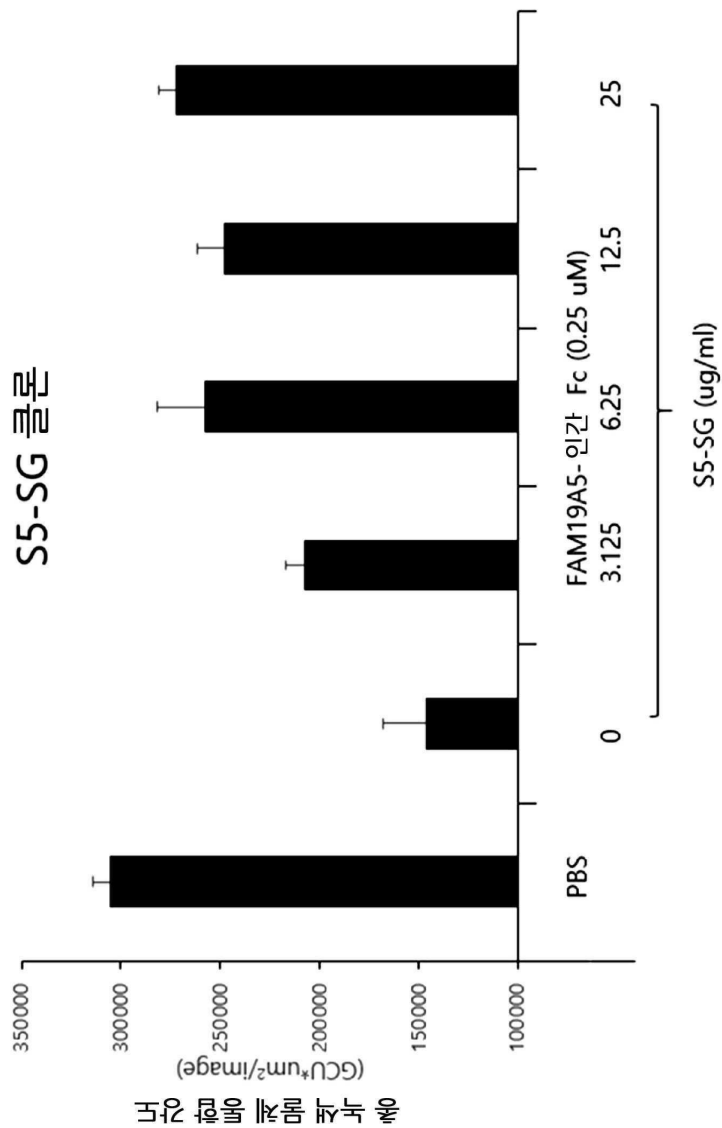
도면7a



도면7b



도면7c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NEURACLE SCIENCE CO., LTD.

SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION

<120> ANTI-FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 19, MEMBER A5 ANTIBODIES AND
METHOD OF USE THEREOF

<130> 3763.011PC02/C-K/DKC

<150> US 62/669,648

<151> 2018-05-10

<150> US 62/838,187

<151> 2019-04-24

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human FAM19A5 Isoform 1

<400> 1

Met Ala Pro Ser Pro Arg Thr Gly Ser Arg Gln Asp Ala Thr Ala Leu

1 5 10 15
Pro Ser Met Ser Ser Thr Phe Trp Ala Phe Met Ile Leu Ala Ser Leu

20 25 30
Leu Ile Ala Tyr Cys Ser Gln Leu Ala Ala Gly Thr Cys Glu Ile Val

35 40 45
Thr Leu Asp Arg Asp Ser Ser Gln Pro Arg Arg Thr Ile Ala Arg Gln

50 55 60
Thr Ala Arg Cys Ala Cys Arg Lys Gly Gln Ile Ala Gly Thr Thr Arg

65 70 75 80
Ala Arg Pro Ala Cys Val Asp Ala Arg Ile Ile Lys Thr Lys Gln Trp

85 90 95
Cys Asp Met Leu Pro Cys Leu Glu Gly Glu Gly Cys Asp Leu Leu Ile

100 105 110
Asn Arg Ser Gly Trp Thr Cys Thr Gln Pro Gly Gly Arg Ile Lys Thr

115 120 125
Thr Thr Val Ser

130

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human FAM19A5 Isoform 2

<400> 2

Met Gln Leu Leu Lys Ala Leu Trp Ala Leu Ala Gly Ala Ala Leu Cys
 1 5 10 15
 Cys Phe Leu Val Leu Val Ile His Ala Gln Phe Leu Lys Glu Gly Gln
 20 25 30
 Leu Ala Ala Gly Thr Cys Glu Ile Val Thr Leu Asp Arg Asp Ser Ser
 35 40 45
 Gln Pro Arg Arg Thr Ile Ala Arg Gln Thr Ala Arg Cys Ala Cys Arg

50 55 60
 Lys Gly Gln Ile Ala Gly Thr Thr Arg Ala Arg Pro Ala Cys Val Asp
 65 70 75 80
 Ala Arg Ile Ile Lys Thr Lys Gln Trp Cys Asp Met Leu Pro Cys Leu
 85 90 95
 Glu Gly Glu Gly Cys Asp Leu Leu Ile Asn Arg Ser Gly Trp Thr Cys
 100 105 110
 Thr Gln Pro Gly Gly Arg Ile Lys Thr Thr Thr Val Ser

115 120 125

<210> 3

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human FAM19A5 Isoform 3

<400> 3

Met Tyr His His Arg Glu Trp Pro Ala Arg Ile Ile Lys Thr Lys Gln
 1 5 10 15
 Trp Cys Asp Met Leu Pro Cys Leu Glu Gly Glu Gly Cys Asp Leu Leu
 20 25 30
 Ile Asn Arg Ser Gly Trp Thr Cys Thr Gln Pro Gly Gly Arg Ile Lys
 35 40 45

Thr Thr Thr Val Ser

50

<210> 4

<211> 1501

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human FAM19A5

<400> 4

ggcggcggag gatggcgcgc gcggggcccg cacgtggagg ccggcgcggg ggcgcgggca	60
gggccggctg ctgagacgcg ctgctgcccc ccgcgcgggc gccgcggctt caatggcgcc	120
atcgcccagg accggcagcc ggcaaatgc gaccgccttg cccagcatgt cctcaacttt	180
ctgggcgttc atgatcctgg ccagcctgct catgcctac tgcagtcagc tggccgccgg	240
cacctgtgag attgtgacct tggaccggga cagcagccag cctcggagga cgatgccccg	300
gcagaccgcc cgctgtgcgt gtagaaaggg gcagatcgcc ggaccacga gagcccgccc	360
cgctgtgtg gacgaagaa tcatcaagac caagcagtgg tgtgacatgc ttccgtgtct	420
ggagggggaa ggctgcgact tgttaataca ccggtcaggc tggacgtgca cgcagcccgg	480
cgggaggata aagaccacca cggctcctg acaaacacag cccctgaggg ggcgccggga	540
gtggccttgg ctccctggag agcccacgtc tcagccacag ttctccactc gcctcggact	600
tcaccgttc tctgccccc gccactccg ttccctgtg gtccgtgaag gacggcctca	660
ggccttggca tctgtagctt cggctgtgcc agccgacccg aggaggccgg actcagacac	720
ataggcgggg ggcggcacct ggcatcagca atacgcagtc tgtgggagcc cggccgcgcc	780
cagccccgcg cgaccgtggc gttggccctg ctgtcctcag aggaggagga ggaggaggca	840
gctccggcag ccacagaagg ctgcagccca gccgcctga gacacgacgc ctgccccagg	900
ggactgtcag gcacagaagc ggctcctcc cgtgccccag actgtccgaa ttgcttttat	960
tttcttatac ttccagtata ctccatagac caaagagcaa aatctatctg aacctggacg	1020
cacctcaact gtcagggtcc ctggggtcgc ttgtgcgggc gggaggggcaa tgggtgcaga	1080
gacatgctgg tggccccggc ggagcggaga gggcggccgt ggtggaggcc tccaccccag	1140
gagcaccccc cacaccctcg gaggacgggc ttcggttgcg cggaggccgt ggcacacctg	1200
cgggaggcag cgacggcccc cagcagacg ccgggaacgc aggcgcgttt attcctctgt	1260
acttagatca acttgaccgt actaaatcc ctttctgttt taaccagtta aacatgcctc	1320
ttctacagct ccatttttga tagttggata atccagtatc tgccaagagc atgttgggtc	1380
tccegtgact gctgcctcat cgatacccca tttagctcca gaaagcaaag aaaactcgag	1440
taacacttgt ttgaaagaga tcattaaatg tattttgcaa agcccaaaaa aaaaaaaaaa	1500
a	1501

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 and SS01-13 Antibody VH-CDR1

<400> 5

Ser Tyr Gln Met Gly

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 and SS01-13 Antibody VH-CDR2

<400> 6

Val Ile Asn Lys Ser Gly Ser Asp Thr Ser

1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 and SS01-13 Antibody VH-CDR3

<400> 7

Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 Antibody VL-CDR1

<400> 8

Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 Antibody VL-CDR2

<400> 9

Trp Asn Asp Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 and SS01-13 Antibody VL-CDR3

<400> 10

Gly Asn Asp Asp Tyr Ser Ser Asp Ser Gly Tyr Val Gly Val

1 5 10

<210> 11

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 Antibody VH

<400> 11

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gln Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Ile Asn Lys Ser Gly Ser Asp Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Lys Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala Trp

100 105 110
 Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
 115 120
 <210> 12
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1-65 Antibody VL
 <400> 12
 Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
 1 5 10 15
 Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Trp
 20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Ser Pro Ser Ser Ala Pro Leu Thr Val Ile Tyr Trp
 35 40 45
 Asn Asp Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys
 50 55 60
 Ser Gly Ser Thr His Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Asn Asp Asp Tyr Ser Ser Asp Ser Gly
 85 90 95

Tyr Val Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SS01-13 Antibody VL-CDR1
 <400> 13

Ser Gly Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly
 1 5 10

<210> 14
 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13 Antibody VL-CDR2

<400> 14

Lys Asp Asp Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope F5

<400> 15

Cys Asp Met Leu Pro Cys Leu Glu Gly Glu Gly Cys Asp Leu Leu Ile

1 5 10 15

Asn Arg Ser Gly

20

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope EP7

<400> 16

Gly Cys Asp Leu Leu Ile Asn Arg

1 5

<210> 17

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13 Antibody VH

<400> 17

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ala Leu Ser Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30
Gln Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Val Ile Asn Lys Ser Gly Ser Asp Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 109

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13 Antibody VL

<400> 18

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15
Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Trp
20 25 30
Tyr Gln Gln Lys Pro Ser Ser Ala Pro Leu Thr Val Ile Tyr Lys Asp
35 40 45
Asp Glu Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

50 55 60
Gly Ser Thr His Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu
65 70 75 80
Ala Val Tyr Phe Cys Gly Asn Asp Asp Tyr Ser Ser Asp Ser Gly Tyr
85 90 95
Val Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 19

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> 1-65 scFv

<400> 19

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val

1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Trp

20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Ser Pro Ser Ser Ala Pro Leu Thr Val Ile Tyr Trp

35 40 45

Asn Asp Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys

50 55 60

Ser Gly Ser Thr His Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp

65 70 75 80

Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Asn Asp Asp Tyr Ser Ser Asp Ser Gly

85 90 95

Tyr Val Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Ser Ser Arg Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly

130 135 140

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

145 150 155 160

Gln Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

165 170 175

Gly Val Ile Asn Lys Ser Gly Ser Asp Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val

180 185 190

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg
195 200 205

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys
210 215 220

Ala Lys Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala Trp
225 230 235 240

Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
245 250

<210> 20
<211> 249
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> SS01-13 scFv
<400> 20

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Trp
20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Pro Ser Ser Ala Pro Leu Thr Val Ile Tyr Lys Asp
35 40 45

Asp Glu Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Gly Ser Thr His Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu
65 70 75 80

Ala Val Tyr Phe Cys Gly Asn Asp Asp Tyr Ser Ser Asp Ser Gly Tyr
85 90 95

Val Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly Gln Ser
100 105 110

Ser Arg Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
115 120 125

Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly Ala
130 135 140

Leu Ser Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gln
 145 150 155 160
 Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 165 170 175
 Val Ile Asn Lys Ser Gly Ser Asp Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val Lys
 180 185 190
 Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Tyr Leu
 195 200 205
 Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 210 215 220
 Lys Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala Trp Gly
 225 230 235 240
 His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
 245

<210> 21

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13 Antibody VH

<400> 21

gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccggaggagc gctctctctc 60
 tcttgcaaag cctccgggtt caccttcagc agctatcaga tgggctgggt gcgacaggcg 120
 cccggcaagg ggctggaatg ggctcgtgtt attaacaagt ctggtagtga cacatcatac 180
 gggtcggcgg tgaagggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacactgtac 240
 ctgcagatga acaacctcag ggctgaggac accgctgttt acttctgcgc caaaggttct 300
 gctagttaca taactgctgc taccatcgac gcatggggcc acgggaccga agtcacgtc 360

tcctcc 366

<210> 22

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13 Antibody VL

<400> 22

gccctgactc agccgtcctc ggtgtcagca aaccctgggg aaactgttcg taccacctgc 60
tccgggggtg ctagcagtggt ctatggttat ggtctggtatc agcagaagcc tagcagtgcc 120
cctctcactg tgatctacaa agacgacgaa agaccctcgg acatcccttc acgattctcc 180
ggttcctctt ccggctccac acacacatta accatcactg gggccaagc cgaggacgag 240
gctgtatatt tctgtgggaa tgatgactac agcagtata gtggatatgt cgggtgtattt 300

ggggccggga caaccctgac cgtccta 327

<210> 23

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 Antibody VH

<400> 23

gccgtgacgt tggacgagtc cgggggaggc ctccagacgc ccggaggagc gctcagcctc 60
gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagc agctatcaga tgggctgggt gcgacaggcg 120
cccggcaagg ggctggaatg ggtcgggtt attaacaaga gtggtagtga cacatcatac 180
gggtcggcgg tgaagggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacagtgagg 240
ctgcagctga acaacctcag ggctgaggac accggcacct acttctgcgc caaaggttct 300

gctagttata taactgtctc taccatcgac gcatggggcc acgggaccga agtcacgtc 360

tcctcc 366

<210> 24

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 Antibody VL

<400> 24

gccctgactc agccgtcctc ggtgtcagca aaccctgggg aaactgtcaa gatcacctgc 60
tccgggggtg gtagcagtggt ctatggttat ggtctggtatc agcagaagtc acctagcagt 120
gcccctctca ctgtgatcta ctggaacgac aagagaccct cggacatccc ttcacgattc 180
tccggttcca aatccggctc cacacacaca ttaacatca ctggggcca agccgaggac 240

gaggctgtat atttctgtgg gaatgatgac tacagcagtg atagtggata tgtcgggtga 300

tttggggccg ggacaacct gaccgtccta 330

<210> 25

<211> 750

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-65 scFv

<400> 25

```

gccctgactc agccgtcctc ggtgtcagca aaccctgggg aaactgtcaa gatcacctgc      60
tccgggggtg gtagcagtgg ctatggttat ggctggatc agcagaagtc acctagcagt      120
gccccctctca ctgtgatcta ctggaacgac aagagaccct cggacatccc ttcacgattc      180
tccgggtcca aatccggctc cacacacaca ttaacatca ctgggggtcca agccgaggac      240

gaggctgtat atttctgtgg gaatgatgac tacagcagtg atagtggata tgtcgggtga      300
tttggggcgg ggacaaccct gaccgtccta ggtcagtcct ctatgatttc cggcgggtgg      360
ggcagctccg gtggtggcgg ttccgccgtg acgttggacg agtccggggg cggcctccag      420
acgcccgagg gagcgtcag cctcgtctgc aaggcctccg gggttcacctt cagcagctat      480
cagatgggct ggggtgcgaca ggcccccggc aaggggctgg aatgggtcgg tgttattaac      540
aagagtggta gtgacacatc atacgggtcg gcggtgaagg gccgtgccac catctcgagg      600
gacaacgggc agagcacagt gaggtgcag ctgaacaacc tcagggtga ggacaccggc      660

acctacttct gcgcaaagg ttctgctagt tatataactg ctgctaccat cgacgcatgg      720
ggccacggga ccgaagtcac cgtctcctcc      750

```

<210> 26

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13 scFv

<400> 26

```

gccctgactc agccgtcctc ggtgtcagca aaccctgggg aaactgttcg tatcacctgc      60
tccgggggtg ctagcagtgg ctatggttat ggctggatc agcagaagcc tagcagtgcc      120
cctctcactg tgatctacaa agacgacgaa agaccctcgg acatcccttc acgattctcc      180
ggttcctctt ccggctccac acacacattt accatcactg ggggtccaagc cgaggacgag      240

gctgtatatt tctgtgggaa tgatgactac agcagtgata gtggatatgt cgggtgtattt      300
ggggccggga caaccctgac cgtcctaggt cagtcctcta gatcttccgg cgggtgtggc      360
agctccgggt gtggcgggtc cgccgtgacg ttggacgagt ccggggggcg cctccagacg      420

```

cccggaggag cgtctctctt ctcttgcaaa gcctccgggt tcaccttcag cagctatcag 480
atgggctggg tgcgacaggc gcccggaag gggctggaat gggctcgggtg tattaacaag 540
tctggtagtg acacatcata cgggtcggcg gtgaagggcc gtgccacat ctcgaggac 600
aacgggcaga gcacactgta cctgcagatg aacaacctca gggctgagga caccgctgtt 660

tacttctgcg ccaaagggtc tgctagttac ataactgctg ctaccatcga cgcattgggc 720
cacgggaccg aagtcacgt ctcctcc 747

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13-s5 VH-CDR2

<400> 27

Ala Ile Asn Lys Ser Gly Ser Asp Thr Ser

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S5-SG VH-CDR2

<400> 28

Ala Ile Asn Lys Gly Gly Ser Asp Thr Ser

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13-s5; S5-SG VL-CDR2

<400> 29

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 30

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13-s5 VH

<400> 30

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gln Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Lys Ser Gly Ser Asp Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Lys Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala Trp

100 105 110

Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser

115 120

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S5-SG VH

<400> 31

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gln Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Lys Gly Gly Ser Asp Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val

50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95
Ala Lys Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 32

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13-s5; S5-SG VL

<400> 32

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Ala
1 5 10 15

Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Trp
20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Pro Ser Ser Ala Pro Leu Thr Val Ile Tyr Lys Asp
35 40 45

Ser Glu Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Gly Ser Thr His Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu
65 70 75 80

Ala Val Tyr Phe Cys Gly Asn Asp Asp Tyr Ser Ser Asp Ser Gly Tyr
85 90 95

Val Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 33

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13-s5 scFv

<400> 33

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Trp

20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Pro Ser Ser Ala Pro Leu Thr Val Ile Tyr Lys Asp

35 40 45

Ser Glu Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

50 55 60

Gly Ser Thr His Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu

65 70 75 80

Ala Val Tyr Phe Cys Gly Asn Asp Asp Tyr Ser Ser Asp Ser Gly Tyr

85 90 95

Val Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly Gln Ser

100 105 110

Ser Arg Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala

115 120 125

Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly Ala

130 135 140

Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gln

145 150 155 160

Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

165 170 175

Ala Ile Asn Lys Ser Gly Ser Asp Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val Lys

180 185 190

Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Tyr Leu

195 200 205

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala

210 215 220

Lys Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala Trp Gly
 225 230 235 240

His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
 245

<210> 34

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S5-SG scFv

<400> 34

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Ala
 1 5 10 15

Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Trp
 20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Pro Ser Ser Ala Pro Leu Thr Val Ile Tyr Lys Asp
 35 40 45

Ser Glu Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 50 55 60

Gly Ser Thr His Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu
 65 70 75 80

Ala Val Tyr Phe Cys Gly Asn Asp Asp Tyr Ser Ser Asp Ser Gly Tyr
 85 90 95

Val Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly Gln Ser
 100 105 110

Ser Arg Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 115 120 125

Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly Ala
 130 135 140

Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gln
 145 150 155 160

Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 165 170 175

Ala Ile Asn Lys Gly Gly Ser Asp Thr Ser Tyr Gly Ser Ala Val Lys
180 185 190

Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Tyr Leu
195 200 205

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
210 215 220

Lys Gly Ser Ala Ser Tyr Ile Thr Ala Ala Thr Ile Asp Ala Trp Gly
225 230 235 240

His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
245

<210> 35

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13-s5 VH

<400> 35

gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccggaggagc gctccgcctc 60

tcttgcaagg cctccgggtt caccttcagc agctatcaga tgggctgggt gcgacaggcg 120

cccggcaagg ggctggaatg ggtcagcgcg attaataaga gcggtagtga cacatcatac 180

gggtcggcgg tgaagggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacactgtac 240

ctgcagatga acagcctcag ggctgaggac accgtgttt acttctgcgc caaaggttct 300

gctagttaca taactgtgc taccatcgac gcatggggcc acgggaccga agtcacgtc 360

tcctcc 366

<210> 36

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S5-SG VH

<400> 36

gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccggaggagc gctccgcctc 60

tcttgcaagg cctccgggtt caccttcagc agctatcaga tgggctgggt gcgacaggcg 120

cccggcaagg ggctggaatg ggtcagcgcg attaataagg gcggtagtga cacatcatac 180

gggtcggcgg tgaagggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacactgtac 240
ctgcagatga acagcctcag ggctgaggac accgctgttt acttctgcgc caaaggttct 300
gctagttaca taactgtcgc taccatcgac gcatggggcc acgggaccga agtcacgtc 360
tcctcc 366

<210> 37

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13-s5 VL

<400> 37

gccctgactc agccgtcctc ggtgtcagca aaccctgggg aaactgcgcg tatcacctgc 60
tccggtgggtg ctagcagtgg ctatggttat ggctgggtatc agcagaagcc tagcagtgcc 120
cctctcactg tgatctacaa agactctgaa agaccctcgg acatcccttc acgattctcc 180
ggttcctctt ccggctccac acacacatta accatcagcg gggccaagc cgaggacgag 240
gctgtatatt tctgtgggaa tgatgactac agcagtata gtggatatgt cgggtgtattt 300
ggggccggga caaccctgac cgtccta 327

<210> 38

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S5-SG VL

<400> 38

gccctgactc agccgtcctc ggtgtcagca aaccctgggg aaactgcgcg tatcacctgc 60
tccggtgggtg ctagcagtgg ctatggttat ggctgggtatc agcagaagcc tagcagtgcc 120
cctctcactg tgatctacaa agactctgaa agaccctcgg acatcccttc acgattctcc 180
ggttcctctt ccggctccac acacacatta accatcagcg gggccaagc cgaggacgag 240
gctgtatatt tctgtgggaa tgatgactac agcagtata gtggatatgt cgggtgtattt 300
ggggccggga caaccctgac cgtccta 327

<210> 39

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SS01-13-S5 scFv

<400> 39

gccctgactc agccgtcctc ggtgtcagca aacctgggg aaactgcgcg tatcacctgc	60
tccggtgggt ctagcagtgg ctatggttat ggctgggtatc agcagaagcc tagcagtgcc	120
cctctcactg tgatctacaa agactctgaa agaccctcgg acatcccttc acgattctcc	180
ggttcctctt ccggctccac acacacatta accatcagcg gggccaagc cgaggacgag	240
gctgtatatt tcigtgggaa tgatgactac agcagtata gtggatatgt cgggtgtattt	300
ggggccggga caacctgac cgtcctaggt cagtctcta gatcttcgg cgggtgtgga	360
tcctctgggt gtggtgggtc cgccgtgacg ttggacgagt ccgggggcgg cctccagacg	420
cccggaggag cgctccgcct ctcttgcaag gcctccgggt tcaccttcag cagctatcag	480
atgggctggg tgcgacagcg gcccggaag gggctggaat gggtcagcg gattaataag	540
agcggtagtg acacatcata cgggtcggcg gtgaagggcc gtgccacat ctcgaggac	600
aacgggcaga gcacactgta cctgcagatg aacagcctca gggctgagga caccgtgtt	660
tacttctcgc ccaaagggtc tgctagttac ataactctg ctaccatcga cgcaggggc	720
cacgggaccg aagtcacgt ctcctcc	747

<210> 40

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S5-SG scFv

<400> 40

gccctgactc agccgtcctc ggtgtcagca aacctgggg aaactgcgcg tatcacctgc	60
tccggtgggt ctagcagtgg ctatggttat ggctgggtatc agcagaagcc tagcagtgcc	120
cctctcactg tgatctacaa agactctgaa agaccctcgg acatcccttc acgattctcc	180
ggttcctctt ccggctccac acacacatta accatcagcg gggccaagc cgaggacgag	240
gctgtatatt tcigtgggaa tgatgactac agcagtata gtggatatgt cgggtgtattt	300
ggggccggga caacctgac cgtcctaggt cagtctcta gatcttcgg cgggtgtgga	360
tcctctgggt gtggtgggtc cgccgtgacg ttggacgagt ccgggggcgg cctccagacg	420
cccggaggag cgctccgcct ctcttgcaag gcctccgggt tcaccttcag cagctatcag	480
atgggctggg tgcgacagcg gcccggaag gggctggaat gggtcagcg gattaataag	540
ggcggtagtg acacatcata cgggtcggcg gtgaagggcc gtgccacat ctcgaggac	600
aacgggcaga gcacactgta cctgcagatg aacagcctca gggctgagga caccgtgtt	660

tacttctgcg ccaaagggtc tgctagttac ataactgctg ctaccatcga cgcattggggc	720
cacgggaccg aagtcacgt ctcctcc	747