

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-52664

(P2023-52664A)

(43)公開日 令和5年4月11日(2023.4.11)

(51)国際特許分類 F I
 C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 16/18
 C 1 2 N 15/13 (2006.01) C 1 2 N 15/13

審査請求 有 請求項の数 44 O L (全122頁)

(21)出願番号	特願2023-10422(P2023-10422)	(71)出願人	518156428
(22)出願日	令和5年1月26日(2023.1.26)		ニューラクル サイエンス カンパニー リミテッド
(62)分割の表示	特願2021-523498(P2021-523498))の分割		大韓民国 0 2 8 4 1 ソウル ソンブク - ク アナム - ロ 1 4 5 サンハクァン 7 0 2 - 2
原出願日	令和1年12月31日(2019.12.31)	(74)代理人	110000338
(31)優先権主張番号	62/787,711		弁理士法人 HARAKENZO WOR LD PATENT & TRADEMA RK
(32)優先日	平成31年1月2日(2019.1.2)	(72)発明者	キム, ボンチョル
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		大韓民国, 1 3 5 2 5 キョンギ - ド, ソンナム - シ, ブンダン - グ, ドンバン ギョ - ロ, 1 5 5, 7 0 4 - 1 6 0 2
(31)優先権主張番号	62/838,190	(72)発明者	キム, ウォンキュム
(32)優先日	平成31年4月24日(2019.4.24)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

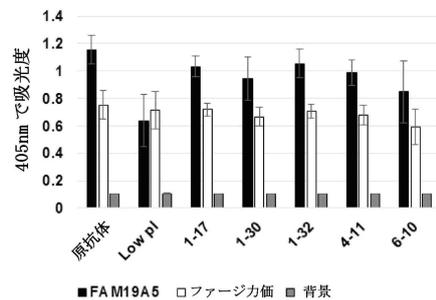
(54)【発明の名称】 抗配列類似性 1 9 を持つファミリー、メンバー A 5 抗体及びその使用方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 F A M 1 9 A 5 に特異的に結合し、 F A M 1 9 A 5 活性を調節できる抗体、特に、副作用無しでヒト対象に使用できる抗体を提供する。

【解決手段】 重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、特定のアミノ酸配列を含み、前記配列のそれぞれは、場合によって 1、2 又は 3 個の突然変異を含み、前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、特定のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の少なくとも一つは、1、2 又は 3 個の突然変異を含み、前記抗体は、特定のアミノ酸配列からなる V H 及び特定のアミノ酸配列からなる V L を含む基準抗体に比べて、ヒトにおいて減少した免疫原性及びヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質に対してより高い結合親和度を有する、分離された抗体又はその抗原結合部を提供する。

【選択図】 図 1 3 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列類似性 19 を持つヒトファミリー、メンバー A 5 (F A M 1 9 A 5) タンパク質に特異的に結合し、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含む分離された抗体 (“ 抗 F A M 1 9 A 5 抗体 ”) 又はその抗原結合部分であって、

前記重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、配列番号 16、17 及び 18 に示したアミノ酸配列を含み、前記配列のそれぞれは、場合によって 1、2 又は 3 個の突然変異を含み、

前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、配列番号 30、31 及び 32 に示したアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の少なくとも一つは、1、2 又は 3 個の突然変異を含み、

前記抗体は、配列番号 35 に示した V H 及び配列番号 45 に示した V L を含む基準抗体に比べて、ヒトにおいて減少した免疫原性及びヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質に対してより高い結合親和度を有する、分離された抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 2】

前記重鎖 C D R 3 が配列番号 18、128 又は 129 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記重鎖 C D R 1 が配列番号 16 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記重鎖 C D R 1 が配列番号 19 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記重鎖 C D R 2 が配列番号 17 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 6】

前記軽鎖 C D R 3 が配列番号 32 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 7】

前記軽鎖 C D R 2 が配列番号 31 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 8】

前記軽鎖 C D R 1 が一つの突然変異を持つ、配列番号 30 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 9】

前記突然変異が配列番号 30 のアミノ酸 4 においてセリンの脂肪族アミノ酸への置換を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記脂肪族アミノ酸がバリンを含む、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含み、前記 V H は、配列番号 35 に示したアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 又は約 100% 同ジアミノ酸配列を含み、及び / 又は前記 V L は、配列番号 45 に示したアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 又は約 100% 同ジアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 1 2】

前記抗体が重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含む基準抗体と交差競合し、前記VHは、配列番号36に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む、請求項1～11のいずれかに記載の抗体。

【請求項 1 3】

前記抗体が重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含む基準抗体と交差競合し、前記VHは、配列番号37に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む、請求項1～11のいずれかに記載の抗体。

【請求項 1 4】

前記抗体が重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含む基準抗体と交差競合し、前記VHは、配列番号130に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む、請求項1～11のいずれかに記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記抗体が重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含む基準抗体と交差競合し、前記VHは、配列番号131に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む、請求項1～11のいずれかに記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔技術分野〕

関連出願に関する相互参照事項

本PCT出願は、2019年1月2日付に出願された米国仮出願第62/787,711号及び2019年4月24日付に出願された第62/838,190号の優先権を主張し、これらはそれぞれ、その全文が本明細書に参照によって組み込まれる。

電子提出された配列目録に関する参照事項

本出願と共に提出されたASCIIテキストファイル（名：3763__016PC02__SeqListing__ST25.txt；サイズ：90,231バイト；及び、生成日：2019年12月30日）の電子提出された配列目録の内容は、その全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

政府支援の陳述

本研究は、大韓民国産業通商資源部（MOTIE）の産業技術革新事業（10081300、虚血性脳卒中に対する神経膠傷痕形成の阻害機序を用いた治療用単クローン性抗体新薬開発）の研究費支援を受けて行われた。

【0002】

本開示内容は、配列類似性19を持つファミリー、メンバーA5（FAM19A5）に特異的に結合する抗体（例えば、脱免疫化又は親和度成熟した抗体）、当該抗体を含む組成物、及び対象の中枢神経系損傷に起因した障害又は疾患のような障害又は疾患を予防又は治療するために前記抗体を使用する方法を提供する。

【0003】

〔背景技術〕

FAM19A5は、5個の相同性が高い小さなタンパク質で構成されているタンパク質のTAFASubファミリーに属する一種である。Tang T.Y. et al., Genomics 83(4):727-34(2004)を参照されたい。これらのタンパク質は、所定位置に保存されたシステイン残基を含有し、CC-ケモカインファミリーに属する一種である大食細胞炎症タンパク質1-アルファ（MIP-1-アルファ）とくずかに関連がある。前記TAFASubタンパク質は脳と脊髄の特定領域で主に発現する。これらのタンパク質神経発生過程で成体神経幹細胞によって生成及び分泌されるものとされている。

【0004】

FAM19A5は、脊椎動物の脳で主に発現し、完全な中枢神経系の発生、分化、形成に重要であり、中枢神経系損傷及び/又は疾患の予防又は治療に用いられ得る。米国特許

10

20

30

40

50

公開番号 2015/0118230 を参照する。

【0005】

[発明の概要]

[発明が解決しようとする課題]

FAM19A5 阻害は、中枢神経系を治療するのに重要な役割を担うことができるが、FAM19A5 に特異的に結合し、FAM19A5 活性を調節できる抗体、特に、副作用無しでヒト対象に使用できる抗体を開発する必要が依然としてある。

【0006】

[課題を解決するための手段]

本明細書は、配列類似性 19 を持つヒトファミリー、メンバー A5 (FAM19A5) タンパク質に特異的に結合し、重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 並びに軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含む分離された抗体 (“抗 FAM19A5 抗体”) 又はその抗原結合部分であって、前記重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 はそれぞれ、配列番号 5、6 及び 7 に示したアミノ酸配列を含み、前記配列のそれぞれは、場合によって 1、2、3、4 又は 5 個の突然変異を含み、前記軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 はそれぞれ、配列番号 8、9 及び 10 に示したアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 の少なくとも一つは、1、2、3、4 又は 5 個の突然変異を含み、前記抗体は、配列番号 11 に示した VH 及び配列番号 12 に示した VL を含む基準抗体に比べて、ヒトにおいて減少した免疫原性を有する分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【0007】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 FAM19A5 抗体の重鎖 CDR3 は、配列番号 7 に示したアミノ酸配列を含む。

【0008】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 FAM19A5 抗体の重鎖 CDR1 は、1 又は 2 個の突然変異を持つ配列番号 5 に示したアミノ酸配列を含む。特定具現例で、前記突然変異は、配列番号 5 のアミノ酸 3 においてトレオニンの酸性アミノ酸への置換を含む。他の具現例において、前記突然変異は、配列番号 5 のアミノ酸 5 においてセリンの酸性アミノ酸への置換を含む。特定の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含む。

【0009】

一部の具現例において、抗 FAM19A5 抗体の重鎖 CDR2 は、1、2、3、4 又は 5 個の突然変異を持つ、配列番号 6 に示したアミノ酸配列を含む。一部の具現例において、前記突然変異は、配列番号 6 のアミノ酸 16 においてアルギニンの塩基性アミノ酸への置換を含む。特定の具現例において、前記塩基性アミノ酸は、リシン (lysine) を含む。他の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：(a) 配列番号 6 のアミノ酸 6 においてグリシンの酸性アミノ酸への置換；(b) 配列番号 6 のアミノ酸 7 においてセリンの酸性アミノ酸への置換；(c) 配列番号 6 のアミノ酸 8 においてセリンの酸性アミノ酸への置換；(d) 配列番号 6 のアミノ酸 9 においてトレオニンの酸性アミノ酸への置換；及び (e) 配列番号 6 のアミノ酸 16 においてアルギニンの塩基性アミノ酸への置換。特定の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含む。特定の具現例において、前記塩基性アミノ酸は、リシンを含む。

【0010】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 FAM19A5 抗体の軽鎖 CDR3 は、1、2、3、4 又は 5 個の突然変異を持つ、配列番号 10 に示したアミノ酸配列を含む。一部の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：(a) 配列番号 10 のアミノ酸 6 においてセリンの酸性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸への置換；(b) 配列番号 10 のアミノ酸 7 においてアスパラギンの酸性アミノ酸又はヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸への置換；(c) 配列番号 10 のアミノ酸 8 においてグリシンの酸性アミノ酸又はヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸への置換；(d) 配列番号 10 のアミノ酸 9 においてグリシンの酸性アミノ酸又はヒドロキシル又は硫黄/セレ

10

20

30

40

50

ニウム含有アミノ酸への置換；及び（e）配列番号10のアミノ酸10においてイソロイシンの塩基性アミノ酸への置換。特定の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含む。一部の具現例において、前記ヒドロキシル又は硫黄/セレニウム含有アミノ酸は、セリンを含む。他の具現例において、前記塩基性アミノ酸は、ヒスチジンを含む。

【0011】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体の軽鎖CDR1は、1、2、3又は4個の突然変異を持つ、配列番号8に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：（a）配列番号8のアミノ酸6においてチロシンの酸性アミノ酸への置換；（b）配列番号8のアミノ酸7においてアルギニンの酸性アミノ酸への置換；（c）配列番号8のアミノ酸8においてグリシンの酸性アミノ酸への置換；及び（d）配列番号8のアミノ酸9においてセリンの酸性アミノ酸への置換。一部の具現例において、前記酸性アミノ酸は、グルタミン酸又はグルタミンを含む。

10

【0012】

一部の具現例において、前記軽鎖CDR2は、1、2、3又は4個の突然変異を持つ、配列番号9に示したアミノ酸配列を含む。一部の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：（a）配列番号9のアミノ酸1においてグルタミン酸の酸性アミノ酸への置換；（b）配列番号9のアミノ酸2においてセリンの酸性アミノ酸への置換；（c）配列番号9のアミノ酸3においてアスパラギンの酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸への置換；及び（d）配列番号9のアミノ酸4においてリシンの酸性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸への置換。特定の具現例において、前記酸性アミノ酸は、グルタミン、アスパラギン、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含む。一部の具現例において、前記塩基性アミノ酸は、ヒスチジンを含む。他の具現例において、前記脂肪族アミノ酸は、ロイシンを含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号9のアミノ酸2においてセリンの酸性アミノ酸への置換を含む。一部の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパルテート、グルタメート、アスパラギン、グルタミン又はこれらの組合せを含む。特定の具現例において、前記酸性アミノ酸はアスパラギンである。

20

【0013】

本明細書はまた、ヒトFAM19A5タンパク質に特異的に結合し、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分であって、（i）前記重鎖CDR1は、配列番号5に示したアミノ酸配列を含み；（ii）前記重鎖CDR2は、配列番号13に示したアミノ酸配列を含み；（iii）前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；（iv）前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；（v）前記軽鎖CDR2は、配列番号20に示したアミノ酸配列を含み；（vi）前記軽鎖CDR3は、配列番号10に示したアミノ酸配列を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

30

【0014】

本明細書は、ヒトFAM19A5タンパク質に特異的に結合し、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分であって、（i）前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；（ii）前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；（iii）前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；（iv）前記軽鎖CDR1は、配列番号21に示したアミノ酸配列を含み；（v）前記軽鎖CDR2は、配列番号22に示したアミノ酸配列を含み；（vi）前記軽鎖CDR3は、配列番号23に示したアミノ酸配列を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

40

【0015】

本明細書は、ヒトFAM19A5タンパク質に特異的に結合し、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分であって、（i）前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸

50

配列を含み；(i i)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(i i i)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(i v)前記軽鎖CDR1は、配列番号21に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号24に示したアミノ酸配列を含み；(v i)前記軽鎖CDR3は、配列番号23に示したアミノ酸配列を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【0016】

本明細書は、ヒトFAM19A5タンパク質に特異的に結合し、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分であって、(i)前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；(i i)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(i i i)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(i v)前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号25に示したアミノ酸配列を含み；(v i)前記軽鎖CDR3は、配列番号23に示したアミノ酸配列を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

10

【0017】

本明細書は、ヒトFAM19A5タンパク質に特異的に結合し、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分であって、(i)前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；(i i)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(i i i)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(i v)前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号24に示したアミノ酸配列を含み；(v i)前記軽鎖CDR3は、配列番号23に示したアミノ酸配列を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

20

【0018】

本明細書は、ヒトFAM19A5タンパク質に特異的に結合し、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分であって、(i)前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；(i i)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(i i i)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(i v)前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号26に示したアミノ酸配列を含み；(v i)前記軽鎖CDR3は、配列番号27に示したアミノ酸配列を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

30

【0019】

本明細書は、ヒトFAM19A5タンパク質に特異的に結合し、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分であって、(i)前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；(i i)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(i i i)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(i v)前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号28に示したアミノ酸配列を含み；(v i)前記軽鎖CDR3は、配列番号29に示したアミノ酸配列を含む、分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

40

【0020】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含み、前記VHは、配列番号11に示したアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%同じアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号12に示したアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%同じアミノ酸配列を含む。

50

【 0 0 2 1 】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む基準抗体と交差競合し、(a) 前記 V H は、配列番号 3 3 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 3 8 に示したアミノ酸配列を含むか；(b) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 3 9 に示したアミノ酸配列を含むか；(c) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 1 に示したアミノ酸配列を含むか；(d) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 0 に示したアミノ酸配列を含むか；(e) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 2 に示したアミノ酸配列を含むか；(f) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 3 に示したアミノ酸配列を含むか；又は(g) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 4 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 2 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む基準抗体と同じヒト F A M 1 9 A 5 エピトープに結合し、(a) 前記 V H は、配列番号 3 3 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 3 8 に示したアミノ酸配列を含むか；(b) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 3 9 に示したアミノ酸配列を含むか；(c) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 1 に示したアミノ酸配列を含むか；(d) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 0 に示したアミノ酸配列を含むか；(e) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 2 に示したアミノ酸配列を含むか；(f) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 3 に示したアミノ酸配列を含むか；又は(g) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 4 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 3 】

一部の具現例において、前記ヒト F A M 1 9 A 5 エピトープは、配列番号 9 0、9 1 又は 9 2 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 4 】

本開示内容はまた、配列類似性 1 9 を持つヒトファミリー、メンバー A 5 (F A M 1 9 A 5) タンパク質に特異的に結合し、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含む分離された抗体 (“ 抗 F A M 1 9 A 5 抗体 ”) 又はその抗原結合部分であって、前記重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、配列番号 1 6、1 7 及び 1 8 に示したアミノ酸配列を含み、前記配列のそれぞれは、場合によって 1、2 又は 3 個の突然変異を含み、前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、配列番号 3 0、3 1 及び 3 2 に示したアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の少なくとも一つは、1、2 又は 3 個の突然変異を含み、前記抗体は、配列番号 3 5 に示した V H 及び配列番号 4 5 に示した V L を含む基準抗体に比べて、ヒトにおいて減少した免疫原性及びヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質に対してより高い結合親和度を有する、分離された抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【 0 0 2 5 】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体の重鎖 C D R 3 は、配列番号 1 8、1 2 8 又は 1 2 9 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 6 】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体の重鎖 C D R 1 は、配列番号 1 6 に示したアミノ酸配列を含む。他の具現例において、前記重鎖 C D R 1 は、配列番号 1 9 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 7 】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体の重鎖 C D R 2 は、配列番号 1 8 に示し

たアミノ酸配列を含む。

【0028】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体の軽鎖CDR3は、配列番号32に示したアミノ酸配列を含む。

【0029】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体の軽鎖CDR2は、配列番号31に示したアミノ酸配列を含む。

【0030】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体の軽鎖CDR1は、一つの突然変異を持つ、配列番号30に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号30のアミノ酸4においてセリンの脂肪族アミノ酸への置換を含む。一部の具現例において、前記脂肪族アミノ酸はバリンを含む。

10

【0031】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含み、前記VHは、配列番号35に示したアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%同じアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号45に示したアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%同じアミノ酸配列を含む。

20

【0032】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含む基準抗体と交差競合し、前記VHは、配列番号36に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む。他の具現例において、抗FAM19A5抗体は、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含む基準抗体と交差競合し、前記VHは、配列番号37に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む。他の具現例において、抗FAM19A5抗体は、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含む基準抗体と交差競合し、前記VHは、配列番号130に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む。一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含む基準抗体と交差競合し、前記VHは、配列番号131に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む。

30

【0033】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、これらの変異体及びこれらの任意の組合せからなる群から選ばれる。特定の具現例において、抗FAM19A5抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体又はヒト化抗体である。一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv又は単鎖Fv(scFv)を含む。

40

【0034】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は、scFvである。特定の具現例において、前記scFvはVH及びVLを含み：(a)前記VHは、配列番号33に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号38に示したアミノ酸配列を含むか；(b)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号39に示したアミノ酸配列を含むか；(c)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号41に示したアミノ酸配列を含むか；(d)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号40に示したアミノ酸配列を含むか；(e)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号42に示したアミノ酸配列を含むか；(f)前記VHは、配列番号

50

号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 3 に示したアミノ酸配列を含むか；(g) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 4 に示したアミノ酸配列を含むか；(h) 前記 V H は、配列番号 3 6 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含むか；(i) 前記 V H は、配列番号 3 7 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含むか；(j) 前記 V H は、配列番号 1 3 0 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含むか；又は(k) 前記 V H は、配列番号 1 3 1 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 5 】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、次の特性のいずれか一つ以上を示す：(a) 酵素結合免疫吸着分析法 (E L I S A) によって測定したとき、K D が 1 0 n M 以下である可溶性ヒト F A M 1 9 A 5 に結合する特性；(b) E L I S A によって測定したとき、K D が 1 0 n M 以下である膜結合ヒト F A M 1 9 A 5 に結合する特性；(c) 反応性神経膠症の発病を減少、反転、遅延及び/又は予防する特性；(d) 反応性星状細胞の過剰増殖を抑制する特性；(e) ニューロカン及び神経膠抗原 2 (N G 2) を含むコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現を減少させる特性；(f) 神経細胞の核内 c - f o s 及び p E R K の発現を増加させる特性；(g) 神経細胞の生存を促進する特性；(h) 神経細胞内 G A P 4 3 の発現を増加させる特性；(i) 軸索の再成長を促進する特性；(j) 例えば、腫瘍内血管の正常化を誘導する特性；(k) 腫瘍の成長を抑制する特性；(l) 免疫細胞の腫瘍内浸潤を増大させる特性；(m) 神経細胞の腫瘍内浸潤を増大させる特性；(n) 大食細胞又は小膠細胞の食細胞活性を増進させる特性；(o) 大食細胞又は小膠細胞のミトコンドリア膜電位を増加させる特性；(p) 腫瘍に対する骨髄由来抑制細胞 (M D S C) の動員 (r e c r u i t m e n t) を減少させる特性；(q) 腫瘍において壊死と浮腫を減少させる特性；(r) 腫瘍の組織透過性を減少させる特性；及び(s) 腫瘍において血流速度を増加させる特性。

【 0 0 3 6 】

本明細書はまた、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体をコードする核酸、前記核酸を含むベクター、前記ベクターを含む細胞及び本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体を含む免疫接合体 (i m m u n o c o n j u g a t e) を提供する。本明細書はまた、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体及び担体を含む組成物を開示する。本開示内容はまた、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体及び使用説明書を含むキットを提供する。

【 0 0 3 7 】

本明細書はまた、ヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質に特異的に結合する抗体を生産する方法であって、本明細書に開示の細胞を適切な条件で培養し、前記抗体を分離することを含む方法を提供する。

【 0 0 3 8 】

本開示内容はまた、必要とする対象で疾患又は症状を治療する方法であって、前記対象に、本明細書に記載の抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体を投与することを含む方法を提供する。一部の具現例において、前記疾患又は症状は、腫瘍、線維症、緑内障、感情障害、網膜病症、老化関連黄斑変性又は神経病性疼痛を含む。特定の具現例において、前記疾患又は症状は腫瘍である。

【 0 0 3 9 】

一部の具現例において、前記腫瘍は、黒色腫、膀胱癌、神経膠腫、乳癌、リンパ腫、肺癌、腎臓癌、前立腺癌、線維肉腫、結腸腺癌腫、肝癌又は卵巣癌を含む。特定の具現例において、前記神経膠腫は、多形成膠芽細胞腫 (G B M) である。

【 0 0 4 0 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、血管の正常化を誘導する。特定の具現例において、前記血管の正常化は

10

20

30

40

50

、連結性 (connectivity) 増加、壁厚増加、血管径減少、より規則的な血管方向及び分布パターン、血管数増加、漏れ及び透過性減少、血管上で血管周囲細胞カバレッジ及び近接性増加、酸素供給増加又はこれらの組合せを含む血管の特性変化を伴う。

【0041】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、腫瘍の成長を抑制する。

【0042】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、免疫細胞の腫瘍内浸潤を増大させる。特定の具現例において、前記免疫細胞は、大食細胞、樹状細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、自然殺害 (NK) 細胞又はこれらの組合せを含む。一部の具現例において、前記免疫細胞はさらに肥大 (hyper trophy) を示す。一部の具現例において、前記免疫細胞の腫瘍内増大した浸潤は、神経細胞の腫瘍内浸潤増加を伴う。特定の具現例において、前記神経細胞は、星状細胞、膠細胞又はこれらの組合せを含む。

10

【0043】

一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、大食細胞又は小膠細胞の食細胞活性を増進させる。一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、大食細胞又は小膠細胞のミトコンドリア膜電位を増加させる。

【0044】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、腫瘍に対する骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の動員を減少させる。一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、腫瘍において壊死と浮腫を減少させる。一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、腫瘍の組織透過性を減少させる。一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体、核酸、ベクター、細胞又は免疫接合体は、腫瘍において血流速度を増加させる。

20

【0045】

一部の具現例において、前記疾患又は障害を治療する方法は、追加の治療剤を投与することをさらに含む。特定の具現例において、前記追加の治療剤は、化学療法、免疫療法、放射線療法又はこれらの組合せを含む。

30

【0046】

[図面の簡単な説明]

図 1 A ~ 図 1 C は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する個別 s c F v クローンの結合を分析して提供している。405 nm で吸光度を測定した。X 軸にはクローン番号が提供されている。図 1 A ~ 図 1 C はそれぞれ、4 次、5 次又は 6 次バイオパンニングによって第 1 ニワトリ、第 2 ニワトリ及び第 3 ニワトリから由来した 96 個クローンの分析を示している。図 1 A ~ 図 1 C に示すそれぞれのクローンに対して、垂直棒は、F A M 1 9 A 5 タンパク質、陰性対照群タンパク質、血球凝集素タンパク質及び B S A (左から右の順に) に該当する。図 1 A、図 1 B 及び図 1 C のそれぞれにおいて、ボックス中のクローンは、追加分析のために選別された 8 個のクローンである (実施例 4 参照)。

40

【0047】

図 2 A 及び図 2 B はそれぞれ、異なる抗 F A M 1 9 A 5 s c F v の概略サイズ及び結合能を提供している。抗体のサイズは S D S - P a g e を用いて示し、結合能は E L I S A を用いて測定した。示されている抗体は (左から右へ) : 1 - 2 8、1 - 8 5、2 - 1 3、2 - 1 4、2 - 2 0、2 - 2 9、3 - 2 及び 3 - 2 6 を含む。図 2 B において、示されている各抗体に対して左側の棒は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する抗体の結合を表す。右側の棒は、陰性対照群を表す (プロッキング緩衝液が単独で存在、すなわち、組換え F A M 1 9 A 5 タンパク質がない状態で測定した結合)。“2ⁿ d o n l y ” と表示された列は、前記分析法の背景レベルを示すさらに他の陰性対照群を表す (1 次抗 F A M 1

50

9 A 5 抗体がない状態で測定した結合)。

【 0 0 4 8 】

図 3 A 及び図 3 B はそれぞれ、マウス及びヒト膠細胞において F A M 1 9 A 5 発現を中和させる異なる抗 F A M 1 9 A 5 抗体の能力を比較して提供している。中和は、平均蛍光強度 (M F I) として示す F A M 1 9 A 5 発現の減少率として示す。減少率は、次の式を用いて計算できる： $100\% - [((F A M 1 9 A 5 \text{の} M F I + \text{抗} F A M 1 9 A 5 \text{抗体}) / (F A M 1 9 A 5 \text{の} M F I + \text{対照抗体})) \times 100]$ 。各抗体に対する減少率は、括弧中に示した。

【 0 0 4 9 】

図 4 は、エピトープ F 1 - F 6 (B S A に接合された) のアミノ酸配列及びヒト F A M 1 9 A 5 ポリペプチドにおいてそれらの位置を提供している。示されている上端のアミノ酸配列は、野生型 F A M 1 9 A 5 アイソ型 2 (信号ペプチド無し) である。示されている 2 番目のアミノ酸配列は、同じ配列であるが、ペプチド合成中に、非特異的活性を減らすためにシステイン残基がセリンに突然変異されている。

【 0 0 5 0 】

図 5 は、エピトープ断片 F 1 ~ F 6 に対する 3 - 2 抗体の結合に対する E L I S A 結果を提供している。最左列 (“ F A M 1 9 A 5 ”) は、陽性対照群を表し、全体 F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する 3 - 2 抗 F A M 1 9 A 5 抗体の結合を示している。“無関連タンパク質”及び“ブロッキング単独”(すなわち、ブロッキング緩衝液単独、すなわち F A M 1 9 A 5 タンパク質無し)群は、陰性対照群を表す。それぞれの群に対して左側の棒はアイソ型対照群に該当し、右側の棒は 3 - 2 抗体に該当する。

【 0 0 5 1 】

図 6 A ~ 図 6 J は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する様々な 3 - 2 抗体変異体の結合に重要なエピトープ F 2 断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。図 6 A ~ 図 6 D はそれぞれ、H E K 2 9 3 F 細胞で生成された (A) 野生型 3 - 2 抗体、(B) 1 - 3 0 抗体、(C) 1 - 3 2 抗体及び (D) 6 - 1 0 抗体に対する結果を示している。図 6 E ~ 図 6 J はそれぞれ、C H O 細胞で生成された (E) 1 - 1 7 抗体、(F) 1 - 3 0 抗体、(G) 1 - 3 2 抗体、(H) 4 - 1 1 抗体、(I) 6 - 1 0 抗体及び (J) 低 P I 抗体に対する結果を示している。実施例 7 で論議されるように、エピトープ断片 F 2 内単一アミノ酸残基においてそれぞれアラニン置換を持つ突然変異体ペプチドが生成された。前記異なる突然変異体ペプチドに対する抗体の結合は、E L I S A を用いて測定した。

【 0 0 5 2 】

図 7 は、3 - 2 抗体の軽鎖可変領域 (V L) (上の 3 行) 及び重鎖可変領域 (V H) (下の 3 行) において潜在的免疫原性部位を識別している。前記 V L は配列番号 1 2 に該当し、前記 V H は配列番号 1 1 に該当する。3 - 2 抗体のフレームワーク領域に対して使用されたヒト生殖系に対する配列も示されている：V L = 免疫グロブリンラムダ可変 1 - 5 1 (I G L V 1 - 5 1 * 0 2) 及び免疫グロブリンラムダ結合 2 (I G L J 2 * 0 1) ; V H = 免疫グロブリン重鎖可変 3 - 6 4 (I G H V 3 - 6 4 * 0 4) 及び免疫グロブリン重鎖結合 1 (I G H J 1 * 0 1) 。使用したヒト生殖系は、3 - 2 クローンに対して最も相同性であるヒト生殖系 (I g B L A S T 、 N C B I) であった。I T O P E ^{T M} 分析によって決定したとき、高い免疫原性潜在力及び中間の免疫原性潜在力を持つ無差別 (p r o m i s c u o u s) M H C クラス I I 結合ペプチドが示されている。具体的に、前記高い免疫原性潜在力を持つ M H C I I 結合ペプチドは、次の通りである：(i) ペプチド # 3 : 配列番号 1 2 の残基 8 5 - 9 3 (I Y Y C G S W D S) ; (i i) ペプチド # 9 : 配列番号 1 1 の残基 6 4 - 7 2 (V R G R A T I S R) ; 及び (i i i) ペプチド # 1 0 : 配列番号 1 1 の残基 7 9 - 8 7 (V R L Q L N N P G) 。前記中間の免疫原性潜在力を持つ M H C I I 結合ペプチドは、次の通りである：(i) 配列番号 1 2 の残基 1 6 - 2 4 (V K I T C S G G G) ; (i i) ペプチド # 2 : 配列番号 1 2 の残基 4 8 - 5 6 (I Y E S N K R P S) ; (i i i) ペプチド # 4 : 配列番号 1 1 の残基 1 8 - 2 6 (L S L V C

K A S G) ; (i v) ペプチド # 5 : 配列番号 1 1 の残基 1 9 - 2 7 (S L V C K A S G F) ; (v) ペプチド # 6 : 配列番号 1 1 の残基 3 2 - 4 0 (F N M F W V R Q A) ; (v i) ペプチド # 7 : 配列番号 1 1 の残基 4 5 - 5 3 (L E Y V A Q I S S) ; (v i i) ペプチド # 8 : 配列番号 1 1 の残基 4 8 - 5 6 (V A Q I S S S G S) ; 及び (v i i i) ペプチド # 1 1 : 配列番号 1 1 の残基 8 1 - 8 9 (L Q L N N P G A E) 。 T 細胞エピトープデータベースからの相同性ペプチドは、次の通りである : ペプチド # 5 、 ペプチド # 6 及びペプチド # 9 。 総 1 1 個の結合ペプチドが同定され、これらはペプチド # 1 ~ # 1 1 と表示されている。前記結合ペプチドそれぞれに対して “ P 1 ” は一番目のアンカー位置を示す。

【 0 0 5 3 】

図 8 は、2 - 1 3 抗体の軽鎖可変領域 (V L) (上の 3 行) 及び重鎖可変領域 (V H) (下の 3 行) において潜在的免疫原性部位を識別している。前記 V L は配列番号 4 5 に該当し、前記 V H は配列番号 3 5 に該当する。2 - 1 3 抗体のフレームワーク領域に対して使用されたヒト生殖系に対する配列も示されている : V L = 免疫グロブリンラムダ可変 3 - 2 7 (I G L V 3 - 2 7 * 0 1) 及び免疫グロブリンラムダ結合 2 (I G L J 2 * 0 1) ; V H = 免疫グロブリン重鎖可変 3 - 6 4 (I G H V 3 - 6 4 * 0 4) 及び免疫グロブリン重鎖結合 1 (I G H J 1 * 0 1) 。使用したヒト生殖系は、2 - 1 3 クローンに対して最も相同性であるヒト生殖系 (I g B L A S T 、 N C B I) であった。I T O P E T M 分析によって決定したとき、高い免疫原性潜在力及び中間の免疫原性潜在力を持つ無差別 M H C クラス I I 結合ペプチドが示されている。具体的に、前記高い免疫原性潜在力を持つ M H C I I 結合ペプチドは、次の通りである : (i) ペプチド # 1 : 配列番号 4 5 の残基 1 6 - 2 4 (V K I T C S G G S) ; (i i) ペプチド # 2 : 配列番号 4 5 の残基 8 0 - 8 8 (V Y F C G T E D I) ; 及び (i i i) ペプチド # 8 : 配列番号 3 5 の残基 7 9 - 8 7 (V R L Q L N N L R) 。中間の免疫原性潜在力を持つ M H C I I 結合ペプチドは次の通りである : (i) ペプチド # 3 : 配列番号 3 5 の残基 1 8 - 2 6 (L S L V C K A S G) ; (i i) ペプチド # 4 : 配列番号 3 5 の残基 2 0 - 2 8 (L V C K A S G F T) ; (i i i) ペプチド # 5 : 配列番号 3 5 の残基 3 6 - 4 4 (W V R Q T P G K G) ; (i v) ペプチド # 6 : 配列番号 3 5 の残基 4 7 - 5 5 (Y V A E I T N D G) ; (v) ペプチド # 7 : 配列番号 3 5 の残基 6 4 - 7 2 (V K G R A T I S R) ; (v i) ペプチド # 9 : 配列番号 3 5 の残基 8 1 - 8 9 (L Q L N N L R A E) ; 及び (v i i) ペプチド # 1 0 : 配列番号 3 5 の残基 8 6 - 9 4 (L R A E D T G T Y) 。 T 細胞エピトープデータベースからの相同性ペプチドは、次の通りである : ペプチド # 4 及びペプチド # 5 。 総 1 0 個の結合ペプチドが同定され、これらはペプチド # 1 - # 1 0 と表示されている。前記結合ペプチドのそれぞれに対して “ P 1 ” は一番目のアンカー位置を示す。

【 0 0 5 4 】

図 9 A ~ 図 9 C は、脱免疫化された 3 - 2 抗体の結合を分析して提供している。図 9 A は、3 - 2 抗体を脱免疫化するために異なるアミノ酸突然変異が作られた位置を示す概略図を提供している。図 9 B は、(i) 野生型 3 - 2 抗体 (“ クローン 3 - 2 ”) 、 (i i) 完全に脱免疫化された 3 - 2 抗体 (“ 完全脱免疫化されたクローン 3 - 2 ”) 及び (i i i) 重鎖 C D R 2 内一つのアミノ酸を除いて脱免疫化された抗体 (“ 脱免疫化されたクローン 3 - 2 ”) の中で軽鎖可変領域 (V L) 及び重鎖可変領域 (V H) の配列を比較して提供している。I T O P E T M 分析によって決定したとき、高い免疫原性潜在力及び中間の免疫原性潜在力を持つアミノ酸残基はボックスで表示されており、それぞれ “ 1 ” 及び “ 2 ” と表示されている。図 9 C は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する (i) 野生型 3 - 2 抗体、(i i) 完全脱免疫化された 3 - 2 抗体及び (i i i) 一つのアミノ酸を除いて重鎖 C D R 2 によって脱免疫化された抗体 (“ 脱免疫化されたクローン - 3 - 2 ”) の結合を E L I S A で測定して比較している。ファージ (p h a g e) をディスプレイするそれぞれの単鎖可変断片 (s c F v) を、F A M 1 9 A 5 (黒塗り四角) 又は抗 H A 抗体 () でコートした微細力価プレートのウェルに添加した。B S A でコートした対照群ウェルに S U 背景信号を測定した。ウェルを H R P 接合抗 M 1 3 抗体でプローブした。4 0 5 n m で

10

20

30

40

50

吸光度を測定した。結果は、4回繰り返し行った実験から得た平均 ± S Dとして示した。

【0055】

図10A及び図10Bは、2個の異なる脱免疫化された2-13抗体である(i)完全脱免疫化された2-13抗体、及び(ii)重鎖CDR2内一のつのアミノ酸を除いて脱免疫化された抗体(“脱免疫化されたクローン2-13”)に対する分析を提供している。図10Aは、野生型2-13抗体(“クローン2-13”)対比2個の脱免疫化された2-13抗体に対する軽鎖可変領域(VL)(上の3行)及び重鎖可変領域(VH)(下の3行)を比較して提供している。I T O P E^{T M}分析によって決定した時、高い免疫原性潜在力及び中間の免疫原性潜在力を持つアミノ酸残基は、ボックスで表示されており、それぞれ“1”及び“2”と表示されている。図10Bは、F A M 1 9 A 5タンパク質に対する(i)野生型2-13抗体、(ii)完全に脱免疫化された2-13抗体、及び(iii)一つのアミノ酸を除いて重鎖CDR2によって脱免疫化された抗体(脱免疫化されたクローン2-13)抗体の結合を、E L I S Aで測定して比較している。ファージ(phage)をディスプレイするそれぞれの単鎖可変断片(scFv)を、F A M 1 9 A 5(黒塗り四角)又は抗HA抗体()でコートした微細力価プレートのウェルに添加した。B S Aでコートした対照群ウェルから背景信号を測定した。ウェルをH R P接合抗M13抗体でプローブした。405nmで吸光度を測定した。結果は、4回繰り返し行った実験から得た平均 ± S Dとして示した。

【0056】

図11は、異なる脱免疫化されたクローン2-13変異体の結合能を比較して提供している。異なる変異体抗体の正体はx軸に沿って提供されている。C D R L 1、C D R L 2、C D R L 3、C D R H 1及びC D R H 2のそれぞれのアミノ酸残基をグルタミン酸及びアスパラギン酸に置換した。70個の変異体抗体の反応性は、ファージ酵素免疫分析法によって分析した。ファージをディスプレイしたそれぞれのscFvは、F A M 1 9 A 5(黒塗り四角)又は抗HA抗体()でコートした微細力価プレートのウェルに添加した。B S Aでコートした対照群ウェルから背景信号を測定した。ウェルをH R P接合抗M13抗体でプローブした。405nmで吸光度を測定した。結果は、4回繰り返し行った実験から得た平均 ± S Dとして示した。

【0057】

図12は、向上した物理化学的特性を持つ脱免疫化された抗F A M 1 9 A 5抗体を生成するために用いた方法の概略図を提供している。

【0058】

図13A及び図13Bは、野生型(すなわち、脱免疫化されていない)3-2抗体(“原抗体”)対比いくつかの脱免疫化された3-2変異体の物理化学的特性を比較して提供している。示されている変異体抗体は:(i)等電点の低い抗体(“Low_P I”),(ii)1-17、(iii)1-30、(iv)1-32、(v)4-11、及び(vi)6-10を含む。図13Aは、F A M 1 9 A 5タンパク質に対する前記抗体の結合を分析して示している。結果は、平均 ± S Dと表示した。図13Bは、溶解度(C a m S o l点数)及び疎水性(G R A V Y点数)データを示している。

【0059】

図14A及び図14Bは、異なる脱免疫化された3-2抗体変異体に対する重鎖可変領域(図14A)及び軽鎖可変領域(図14B)の配列整列を提供している。提示された脱免疫化された変異体抗体は、ヒトを対象に投与時に前記抗体が免疫原性を減少させるために脱免疫化された以外は、前記抗体が3-2抗体と同一であるという点で3-2抗体と関連がある。I T O P E^{T M}分析によって決定した時、高い免疫原性潜在力及び中間の免疫原性潜在力を持つアミノ酸残基は、ボックスで表示されており、それぞれ“1”及び“2”と表示されている。他の関心あるアミノ酸残基も表示されている:“3”=最も近接したヒト生殖系配列の差異;“4”=潜在的アルギニン又はリシンメチル化;“5”=潜在的トリプトファン又はメチオニン酸化;“6”=潜在的アスパラギン脱アミド化;“7”=潜在的アスパルテート異性質化;“8”=希アミノ酸挿入;及び“9”=遊離システイン又は非標準(n o 50

n - c a n o n i c a l) シス테인対。このようなアミノ酸残基は、自然細胞処理及び分解反応中に産物変異体として現れ得る。

【 0 0 6 0 】

図 1 5 は、異なる脱免疫化され及び / 又は親和度成熟した 2 - 1 3 抗体変異体に対する軽鎖可変領域 (上の 3 行) 及び重鎖可変領域 (下の 3 行) の配列整列を提供している。これらの変異体抗体は、それらが脱免疫化及び / 又は親和度成熟を経た以外は 2 - 1 3 抗体と同一であるという点で 2 - 1 3 抗体と関連がある。I T O P E ^TM 分析によって決定した時、高い免疫原性潜在力及び中間の免疫原性潜在力を持つアミノ酸残基は、ボックスで表示されており、それぞれ “ 1 ” 及び “ 2 ” と表示されている。他の関心あるアミノ酸残基も表示されている : “ 3 ” = 潜在的アルギニン又はリシンメチル化 ; “ 4 ” = 潜在的トリプトファン又はメチオニン酸化 ; “ 5 ” = 潜在的アスパラギン脱アミド化 ; “ 6 ” = 潜在的アスパルテート異性質化 ; “ 7 ” = 希アミノ酸挿入 ; 及び “ 8 ” = 遊離シス테인又は非標準シス테인対。このようなアミノ酸残基は、自然細胞処理及び分解反応中に産物変異体として現れ得る。

【 0 0 6 1 】

図 1 6 A ~ 図 1 6 C は、脱免疫化された 2 - 1 3 D - 3 7 抗体の 2 個の変異体 (2 - 1 3 D - 3 7 - 1 . 5 W - 4 1 及び 2 - 1 3 D - 3 7 - 3 W - 1 6) の発現レベルを、S D S - P A G E 及びウェスタンブロッティングで測定して提供している。図 1 6 A 及び図 1 6 B は、培養された培地及び精製されたタンパク質からの抗体に対して S D S - P A G E を用いた結果を示している。図 1 6 C は、ウェスタンブロットを用いた結果を示している 20。図 1 6 A ~ 図 1 6 C のそれぞれにおいて、レーン “ 1 ” 及び “ 2 ” はそれぞれ、抗体 2 - 1 3 D - 3 7 - 1 . 5 W - 4 1 及び 2 - 1 3 D - 3 7 - 3 W - 1 6 に該当する。レーン “ 1 ” 及び “ 2 ” において “ A ” 及び “ B ” はそれぞれ、遠心分離前と遠心分離後に該当する。図 1 6 B で、左パネルは還元 S D S - P A G E を示し、右パネルは非還元 S D S - P A G E を示している。

【 0 0 6 2 】

図 1 7 A 及び図 1 7 B は、親和度成熟によって生成された脱免疫化された 2 - 1 3 D - 3 7 抗体の 2 個の変異体 (2 - 1 3 D - 3 7 - 1 . 5 W - 4 1 及び 2 - 1 3 D - 3 7 - 3 W - 1 6) を分析して提供している。図 1 7 A は、次のような抗体に対する軽鎖可変領域 (上の 3 つのボックス) 及び重鎖可変領域 (下の 3 つのボックス) のアミノ酸配列整列を 30 示している : 脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 D - 3 7 、脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 D - 3 7 - 1 . 5 W - 4 1 及び脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 D - 3 7 - 3 W - 1 6 。 I T O P E ^TM 分析によって決定した時、高い免疫原性潜在力及び中間の免疫原性潜在力を持つアミノ酸残基は、ボックスで表示され、それぞれ “ 1 ” 及び “ 2 ” と表示されている。他の関心あるアミノ酸残基も表示されている。 “ 3 ” = 潜在的トリプトファン又はメチオニン酸化 ; “ 4 ” = 潜在的アスパラギン脱アミド化 ; “ 5 ” = 潜在的アスパルテート異性質化 ; 及び “ 6 ” = 非標準シス테인対。このようなアミノ酸残基は、自然細胞処理及び分解反応中に産物変異体として現れ得る。図 1 7 B は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 D - 3 7 、脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 D - 3 7 - 1 . 5 W - 4 1 及び脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 D - 3 7 - 3 W - 1 6 の結合を分析して 40 示している。ファージをディスプレイするそれぞれの単鎖可変断片 (s c F v) を、F A M 1 9 A 5 (黒塗り四角) 又は抗 H A 抗体 () でコートした微細力価プレートのウェルに添加した。B S A でコートした対照群ウェルから背景信号を測定した。ウェルを H R P 接合抗 M 1 3 抗体でプローブした。4 0 5 n m で吸光度を測定した。結果は、4 回繰り返し行った実験から得た平均 ± S D として示した。

【 0 0 6 3 】

図 1 8 は、実施例 1 1 で用いた H D X - M S 分析法の全体的なワークフローの概略図を提供している。

【 0 0 6 4 】

図 1 9 は、実施例 1 1 に記載された H D X - M S 分析法に対して試験した、異なる実験 50

条件で達成されたカバレッジ率を要約した表を提供している。次のようなパラメータのいずれか一つ以上を調整した：(i) 試料濃度、(ii) クエンチング条件、(iii) ペプシン濃度及び/又は分解期間、及び(v) クエンチング維持時間(分)。前記分析によって、図19に示しているように、オンライン(on)又はオフライン(off)分解と共にC18又はC8ペプシン固定カラムを使用した。

【0065】

図20A及び図20Bは、実施例11に記載された最適化された条件を用いてFAM19A5タンパク質のペプシン分解結果を提供している。図20Aは、成熟したFAM19A5タンパク質(配列番号101、すなわち、配列番号2から最初の25個アミノ酸に該当する信号ペプチドを引いた配列番号)対比同定された44個ペプチドのカバレッジ率及び重複率を示している。水平棒はそれぞれ、個別ペプチドを示す。図20Bは、配列番号101対比開始及び末端部位を含む44個ペプチドのアミノ酸配列、単一イオン質量(MHP)及び滞留時間(RT)を提供している。

10

【0066】

図21は、実施例11に記載されているように、重水素標識後にFAM19A5タンパク質のペプシン分解で同定された22個ペプチドのカバレッジ率及び重複率を示している。水平棒のそれぞれは、個別ペプチドを示す。

【0067】

図22A~図22Eは、時間関数として単一(抗原単独、“1”)及び抗原-抗体(2-13)複合体(“2”)間の重水素吸収率を比較して提供している。y軸は、最大重水素吸収率を示す(ペプチドにプロリンが含まれた場合、最大値は[(アミノ酸数-1)-(プロリン数)])。x軸は、重水素標識期間を提供する。図22Aは、次のようなペプチドに対するデータを提供している：(i) FLKEGQL(配列番号102)(左上端グラフ)、(ii) FLKEGQLAAGTCE(配列番号103)(右上端グラフ)、(iii) LKEGQLAAG(配列番号104)(左中間グラフ)、(iv) LKEGQLAAGTCEI(配列番号105)(右中間グラフ)、(v) LKEGQLAAGTCEIVTL(配列番号106)(左下端グラフ)、及び(vi) AAGTCEI(配列番号107)(右下端グラフ)。図22Bは、次のようなペプチドに対するデータを提供している：(i) RDSSQPRTIARQTARCAAC(配列番号108)(左上端グラフ)、(ii) QPPRTIARQTA(配列番号109)(右上端グラフ)、(iii) ACRKGQIAGTTRARPAC(配列番号110)(左中間グラフ)、(iv) ACRKGQIAGTTRARPACVD(配列番号111)(右中間グラフ)、(v) ACRKGQIAGTTRARPACVDA(配列番号112)(左下端グラフ)、及び(vi) ARIIKTKQWC(配列番号113)(右下端グラフ)。図22Cは、次のようなペプチドに対するデータを提供している：(i) ARIIKTKQWC DM(配列番号114)(左上端グラフ)、(ii) ARIIKTKQWC DML(配列番号115)(右上端グラフ)、(iii) ARIIKTKQWC DMLPCL(配列番号116)(左中間グラフ)、(iv) RIIKTKQWC DM(配列番号117)(右中間グラフ)、(v) RIIKTKQWC DML(配列番号118)(左下端グラフ)及び(vi) WC DMLPCL(配列番号119)(右下端グラフ)。図22Dは、次のようなペプチドに対するデータを提供している：(i) LPCLEGG(配列番号120)(左上端グラフ)、(ii) PCLEGG(配列番号121)(右上端グラフ)、(iii) PCLEGGCD(配列番号122)(左中間グラフ)、(iv) PCLEGGCDL(配列番号123)(右中間グラフ)、(v) EGGCDL(配列番号124)(左下端グラフ)、及び(vi) EGGCDLL(配列番号125)(右下端グラフ)。図22Eは、次のようなペプチドに対するデータを提供している：(i) LLINRS GW TCTQP GGR IKT TT(配列番号126)(左グラフ)及び(ii) LLINRS GW TCTQP GGR IKT TT(配列番号127)(右グラフ)。前記グラフのそれぞれにおいて、ペプチドに関する追加情報(すなわち、開始及び末端部位(配列番号101、すなわち、配列番号2から最初の25個アミノ酸に該当する信号ペプチドを引いた配列番号

20

30

40

50

の)及びサイズ)が各グラフの上端隅に提供されている。

【0068】

図23A~図23Cは、FAM19A5タンパク質に沿って単一及び複合試料間に有意の重水素吸収率差(すなわち、 $\pm 0.5 Da$ 超過)がある主要アミノ酸残基を示している。図23Aは、単一(抗原単独、上グラフ)及び抗原-抗体(2-13)複合体(下グラフ)の重水素吸収率に対するバタフライマップ(Butterfly map)分析を提供している。図23Bは、単一及び複合試料間の重水素吸収率差のプロットを提供している。図23Cは、データを $1.5 Da$ 未満の重水素吸収率差の和として示している。図23A~図23Cで、それぞれの線は、異なる重水素標識期間を示す:(i)“1”(0.3分又は20秒)、(ii)“2”(10分)、(iii)“3”(60分)及び(iv)“10”4”(240分)。また、それぞれの地点は個別ペプチドに該当する。図23B及び23Cで、単一(抗原単独)及び抗原-ペプチド複合体間に $\pm 0.5 Da$ を越える重水素吸収率差があるペプチドの(配列番号101の)開始及び末端部位が示されている。図23B及び図23Cにおいて破線で描いたボックスは、 $\pm 0.5 Da$ 未満の重水素吸収率差を示している。

【0069】

図24は、単一(抗原単独)及び抗原-抗体(2-13)複合体試料間に有意の重水素吸収率差があるFAM19A5タンパク質の領域を示すヒートマップ分析を提供している。赤色の破線で囲まれた残基は、主要アミノ酸残基を示す:(i)CRKGQIAGTTRAR(配列番号101のアミノ酸残基38-50又は配列番号2のアミノ酸残基63-75)、及び(ii)PACVDARIKTKQW(配列番号101のアミノ酸残基51-64又は配列番号2のアミノ酸残基76-85)。

【0070】

図25は、FAM19A5タンパク質の3次元構造及び2-13抗体に対する主要結合エピトープの位置を提供している。

【0071】

[発明を実施するための形態]

本明細書は、配列類似性19を持つヒトファミリー、メンバーA5(FAM19A5)タンパク質に特異的に結合して本明細書に開示の特性のいずれか一つ以上を示す分離された単クローン性抗体(“抗FAM19A5抗体”)又はその抗原結合部分を開示する。具体的に、前記抗FAM19A5抗体は、ヒト対象において免疫原性を減少させるために脱免疫化された。

【0072】

本明細書に開示された開示内容の理解を容易にするために、多数の用語及び語句を定義する。追加の定義は、詳細な説明全般にわたって記載されている。

【0073】

[I. 定義]

本開示内容全般にわたって、用語“一つの”又は“ある”実体は、その実体の一つ以上をいうもので、例えば、“一つの抗体”は一つ以上の抗体を表すものと理解される。このように、用語“一つ”(又は“ある”)、“一つ以上の”及び“少なくとも一つの”は、本明細書で同じ意味で使われる。

【0074】

また、本明細書で使う“及び/又は”は、2個の特定された特徴又は構成要素のそれぞれ一つを、もう一つの特徴又は構成要素と共に又は単独で具体的に開示するものと見なされるべきである。したがって、本明細書で“A及び/又はB”のような語句において使われる用語“及び/又は”は、“A及びB”、“A又はB”、“A”(単独)及び“B”(単独)を含むものとして意図される。同様に、“A、B及び/又はC”のような語句において使われる用語“及び/又は”は、次のような態様のそれぞれを含むものとして意図される:A、B及びC; A、B又はC; A又はC; A又はB; B又はC; A及びC; A及びB; B及びC; A(単独); B(単独); 及びC(単独)。

【0075】

本明細書において、態様を、用語“含む”で記載すれば、“なる”及び/又は“本質的になる”の観点で記載された他の類似の態様も提供されるものと理解される。

【0076】

特に定義しない限り、本明細書で使われる全ての技術及び科学用語は、本開示内容と関連した技術分野における通常の技術者にとって通常理解されるのと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei - Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed, 1999, Academic Press; 及び Oxford Dictionary Of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press は、当業者に、本開示内容で使われている用語の多数を提供している。 10

【0077】

単位、接頭辞及び記号は、これらの Systeme International de Unites (SI) で認められた形態で表示される。数値範囲は、当該範囲を限定する数字を含む。特に表示されない限り、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシに向かって左側から右側に書かれる。本明細書で提供された表題は、開示内容の様々な態様の制限ではなく、それらは全体的に明細書を参照したものであり得る。したがって、次に定義された用語は、明細書全般を参照してより完全に定義される。 20

【0078】

本明細書において用語“約”は、ほぼ、概略、程度又はその領域内を意味するものとして使われる。用語“約”が数値範囲と共に使われる場合、記載されている数値の上と下へ境界を拡張して当該範囲を変更する。一般に、用語“約”は、明示された値の上と下の数値を、例えば、上又は下の(より高いかより低い)10%の変化量だけ変更可能である。

【0079】

用語“配列類似性19を持つファミリー、メンバーA5”又は“FAM19A5”は、相同性の高い5個のタンパク質のTAF Aファミリー(FAM19ファミリーとも知られている)に属し、主に脳と脊髄で発現するタンパク質を指す。FAM19A5は、TAF A 又はケモカイン様タンパク質TAF A - 5とも知られている。 30

【0080】

ヒトにおいてFAM19A5をコードする遺伝子は、染色体22に位置している。選択的スプライシングによって生産されるとみられる、次のような複数のヒトFAM19A5(UniProt: Q7Z5A7)アイソ型がある: 132個のアミノ酸からなるアイソ型1(UniProt: Q7Z5A7-1)、125個のアミノ酸からなるアイソ型2(UniProt: Q7Z5A7-2)及び53個のアミノ酸からなるアイソ型3(UniProt: Q7Z5A7-3)。ヒトFAM19A5タンパク質は、膜結合及び可溶性(分泌)の形態で存在するとされる。アイソ型1は、一つの膜貫通領域を持つ膜であるとされる。Tang T. Y. et al., Genomics 83(4): 727-34 (2004)に、分泌されたタンパク質(可溶性)として報告されたアイソ型2は、アミノ酸位置1-25番に信号ペプチドを含有している。アイソ型1は、膜タンパク質であるとされ、ESTデータに基づいて予測される。下記は、3個の公知されたヒトFAM19A5アイソ型のアミノ酸配列である。 40

【0081】

(I)アイソ型1(UniProt: Q7Z5A7-1、膜貫通タンパク質): このアイソ型を標準配列として選定した。

【0082】

MAPSPRTGSR QDATA LPSMS STFWAFMILA SLLIAY
CSQL AAGTCEIVTL DRDSSQPRRT IARQTARCAC RK 50

G Q I A G T T R A R P A C V D A R I I K T K Q W C D M L P C L E G E G C D
L L I N R S G W T C T Q P G G R I K T T T V S (配列番号 1)

(I I) アイソ型 2 (U n i P r o t : Q 7 Z 5 A 7 - 2、可溶性タンパク質) :

M Q L L K A L W A L A G A A L C C F L V L V I H A Q F L K E G Q L A A G
T C E I V T L D R D S S Q P R R T I A R Q T A R C A C R K G Q I A G T T
R A R P A C V D A R I I K T K Q W C D M L P C L E G E G C D L L I N R S G
W T C T Q P G G R I K T T T V S (配列番号 2)

(I I I) アイソ型 3 (U n i P r o t : Q 7 Z 5 A 7 - 3) :

M Y H H R E W P A R I I K T K Q W C D M L P C L E G E G C D L L I N R S
G W T C T Q P G G R I K T T T V S (配列番号 3)

10

用語 “ F A M 1 9 A 5 ” は、細胞によって自然的に発現する F A M 1 9 A 5 の任意の変異体又はアイソ型を含む。したがって、本明細書に記載された抗体は、同一種内の異なるアイソ型（例えば、ヒト F A M 1 9 A 5 の異なるアイソ型）と交差反応したり、或いはヒト以外の種の F A M 1 9 A 5（例えば、マウス F A M 1 9 A 5）と交差反応し得る。これと違い、前記抗体は、ヒト F A M 1 9 A 5 に特異的であり得、異なる種とはいかなる交差反応も示さないことがある。F A M 1 9 A 5 又はその任意の変異体及びアイソ型は、これらを自然的に発現させる細胞又は組織から分離されたり、或いは組換えによって生産され得る。ヒト F A M 1 9 A 5 をコードするポリヌクレオチドは、G e n B a n k 受託番号 B C 0 3 9 3 9 6、及び次のような配列を有する：

20

【 0 0 8 3 】

30

40

50

【表 1 A】

表 1 A ヒトFAM19A5のポリヌクレオチド配列

	ポリヌクレオチド配列 (配列番号4)				
FAM19A5 (GenBank 受託番号 BC039396)	ggcggcggag	gatggcgcgc	gcggggcccg	cacgtggagg	ccggcgcggg
	ggcgcgggca	gggcccggctg	ctgagacgcg	ctgctgcccc	ccgcgcgggc
	gccgcggctt	caatggcgc	atcgcccagg	accggcagcc	ggcaagatgc
	gaccgccctg	cccagcatgt	cctcaacttt	ctgggcgttc	atgatcctgg
	ccagcctgct	catcgcctac	tgcagtcagc	tggccgcgg	cacctgtgag
	attgtgacct	tggaccggga	cagcagccag	cctcggagga	cgatcgcgg
	gcagaccgcc	cgctgtgcgt	gtagaaagg	gcagatcgcc	ggcaccacga
	gagcccggcc	cgctgtgtg	gacgcaagaa	tcatcaagac	caagcagtgg
	tgtgacatgc	ttccgtgtct	ggagggggaa	ggctgcgact	tgtaatacaa

10

ccggtcaggc	tggacgtgca	cgcagcccgg	cgggaggata	aagaccacca
cggtctcctg	acaaacacag	cccctgaggg	ggccccggga	gtggccttgg
ctccctggag	agcccacgtc	tcagccacag	ttctccactc	gcctcggact
tcacccgctc	tctgccgccc	gccactccg	tttccctgtg	gtccgtgaag
gacggcctca	ggccttggca	tcctgagctt	cggtctgtcc	agccgaccgg
aggaggccgg	actcagacac	ataggcgggg	ggcggcacct	ggcatcagca
atacgcagtc	tgtgggagcc	cggccgcgcc	cagccccgc	cgaccgtggc
gttggccctg	ctgtcctcag	aggaggagga	ggaggaggca	gctccggcag
ccacagaagg	ctgcagccca	gcccgcctga	gacacgacgc	ctgccccagg
ggactgtcag	gcacagaagc	ggcctcctcc	cgtgccccag	actgtccgaa
ttgcttttat	tttcttatac	tttcagtata	ctccatagac	caaagagcaa
aatctatctg	aacctggacg	caccctcaact	gtcagggtcc	ctggggctgc
ttgtgcgggc	gggagggcaa	tgggtggcaga	gacatgctgg	tggccccggc
ggagcggaga	gggcggccgt	ggtggaggcc	tccaccccag	gagcaccccg
cacaccctcg	gaggacgggc	ttcggctgcg	cggaggccgt	ggcacacctg
cgggaggcag	cgacggcccc	cacgcagacg	ccgggaacgc	aggccgcttt
attcctctgt	acttagatca	acttgaccgt	actaaaatcc	ctttctgttt
taaccagtta	aacatgcctc	ttctacagct	ccatttttga	tagttggata
atccagtatc	tgccaagagc	atggtgggtc	tcccgtagct	gctgcctcat
cgatacccca	tttagctcca	gaaagcaaag	aaaactcgag	taacacttgt
ttgaaagaga	tcattaaatg	tattttgcaa	agccccaaaa	aaaaaaaaa a

20

30

【0084】

40

用語“抗体 (a n t i b o d y) ”及び“抗体 (a n t i b o d i e s) ”は、当業界の用語であり、本明細書で互換して使用可能であり、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を持つ分子を指す。本明細書で使う用語は、全抗体及びこれらの任意の抗原結合断片（すなわち、“抗原結合部分”）又は単鎖を含む。一具現例において、“抗体”は、二硫化結合によって互いに連結された少なくとも2個の重（H）鎖及び2個の軽（L）鎖を含む糖タンパク質又はその抗原結合部分を指す。さらに他の具現例において、“抗体”は、単一可変ドメイン、例えばVHHドメインを含む単鎖抗体を指す。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略す。）及び重鎖定常領域からなっている。特定の自然発生抗体において、前記重鎖定常領域は3個のドメインCH1、CH2及びCH3からなっている。特定の自然発生抗体においてそれぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略す。

50

)及び軽鎖定常領域からなっている。前記軽鎖定常領域は、一つのドメインCLからなっている。

【0085】

前記VH及びVL領域は、フレームワーク領域(FR)と称する、より保存された領域が散在している、相補性決定領域(CDR)と称する超可変性領域にさらに細分化できる。VH及びVLのそれぞれは、アミノ末端からカルボキシ末端まで次のような順序で配置されている3個のCDR及び4個のFRからなっている:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4。前記重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。前記抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、効果器細胞)及び古典的補体系の第1成分(C1q)をはじめとする宿主組織又は因子に免疫グロブリンが結合することを媒介できる。

10

【0086】

用語“Kabab番号表記(Kabab numbering)”及び類似の用語は、当業界で認定されており、抗体又はその抗原結合部分の重鎖及び軽鎖可変領域においてアミノ酸残基の番号を表記する体系のことを指す。特定の態様において、抗体のCDRはKabab番号表記体系にしたがって決定され得る(例えば、Kabab EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190:382-391 and Kabab 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 参照)。Kabab番号表記体系を用いると、抗体重鎖分子内CDRは、典型的に、アミノ酸位置31~35番(CDR1)(場合によっては35番以降に1個又は2個の追加アミノ酸を含んでもよい(Kabab番号表記方式では35A及び35Bと称する。))、アミノ酸位置50~65番(CDR2)及びアミノ酸位置95~102番(CDR3)に存在する。Kabab番号表記体系を用いると、抗体軽鎖分子内CDRは、典型的に、アミノ酸位置24~34番(CDR1)、アミノ酸位置50~56番(CDR2)及びアミノ酸位置89~97番(CDR3)に存在する。特定の具現例において、本明細書に記載の抗体のCDRは、Kabab番号表記方式によって決定している。

20

【0087】

語句“Kababにおける同じアミノ酸位置番号表記”、“Kabab位置”及びこれらの文法的変形は、Kabab et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)において抗体コンプレクションの重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインに対して使われる番号表記体系のことを指す。この番号表記体系を用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFW又はCDRの短縮又はこれに挿入することに該当するものに該当する追加アミノ酸を含有することができる。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52番以降に挿入された単一アミノ酸(Kababによれば、残基52a番)及び重鎖FW残基82番以降に挿入された残基(例えば、Kababによれば、残基82a番、82b番及び82c番など)を含むことができる。表1Bを参照されたい。

30

40

【0088】

【表 1 B】

表 1 B

ループ	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番号表記)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Chothia番号表記)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

10

【0089】

所定の抗体に対する残基の Kabat 番号表記は、“標準” Kabat 番号表記された配列と前記抗体の配列の相同性の領域において整列によって決定され得る。代わりに、Chothia は、構造ループの位置のことを指す (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。Kabat 番号表記慣例を用いて番号表記した時、Chothia CDR-H1ループの末端は、ループの長さによって H32~H34の間で変わる (これは、Kabat 番号表記方式が H35AとH35Bで挿入 (insertions) を置くためである; 35Aも35Bもないと、ループは32で終わる; 35Aだけあると、ループは33で終わる; 35Aと35Bの両方があると、ループは34で終わる)。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループ間の折衝を代弁するもので、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって用いられる。

20

【0090】

IMGT (ImMunoGeneTics) も、CDRを含む免疫グロブリン可変領域に対する番号表記体系を提供する。例えば、本明細書に参考として含まれる Lefranc, M. P. et al., Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77 (2003) を参照されたい。IMGT番号表記体系は、5,000個を超える配列の整列、構造データ及び超可変ループの特性分析に基づくものであり、全ての種に対して可変及びCDR領域の比較を容易にする。IMGT番号表記スキーマによれば、VH-CDR1は26番~35番位置にあり、VH-CDR2は位置51番~57番位置にあり、VH-CDR3は93番~102番位置にあり、VL-CDR1は27番~32番位置にあり、VL-CDR2は50番~52番位置にあり、VL-CDR3は89番~97番位置にある。

30

【0091】

本開示内容で論議される全ての重鎖定常領域アミノ酸位置に対して、番号表記は、配列分析された最初のヒトIgG1である骨髄腫タンパク質EUのアミノ酸配列を記載した Edelman et al., 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1): 78-85) に最初に記載されたEUインデックスに従う。Edelman et al. のEUインデックスはまた、Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesdaに提示されている。これによって、語句“Kabatに提示されたEUインデックス”又は“KabatのEUインデックス”及び“Kabatに提示されたEUインデックスに従う位置...”及びこれらの文法的変形は、Kabat 1991に

40

50

提示された Edelman et al. のヒト IgG1E U 抗体に基づく残基番号表記体系のことを指す。

【0092】

可変ドメイン（重鎖及び軽鎖両方）及び軽鎖定常領域アミノ酸配列に用いられた番号表記体系は、Kabatt 1991に提示されているものである。

【0093】

抗体は、免疫グロブリン分子の任意の種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA又はIgY）、任意の種類（例えば、IgD、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1又はIgA2）、又は任意の亜型（例えば、ヒトにおいてIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4；及びマウスにおいてIgG1、IgG2a、IgG2b及びIgG3）を有することができる。免疫グロブリン、例えば、IgG1は、最大限でいくつかのアミノ酸において互いに異なる様々な同種異因子型（allotype）で存在する。本明細書に開示の抗体は、通常知られたアイソ型、種類、亜型又は同種異因子型のいずれかからなり得る。特定の具現例において、本明細書に記載の抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4亜型又はこれらの任意の混成型である。特定の具現例において、前記抗体は、IgG2、IgG又はIgG2/IgG4亜型を有する。

10

【0094】

“抗体”は、例えば、自然発生及び非自然発生抗体；単クローン性及び多クローン性抗体；キメラ及びヒト化抗体；ヒト及び非ヒト抗体、全合成抗体；単鎖抗体；単一特異的抗体；多重特異的抗体（二重特異的抗体を含む）；2個の重鎖と2個の軽鎖分子を含むテトラマー抗体；抗体軽鎖モノマー；抗体重鎖モノマー；抗体軽鎖ダイマー；抗体重鎖ダイマー；抗体軽鎖-抗体重鎖対；細胞内抗体（intrabody）；ヘテロコンジュゲート（heteroconjugate）抗体；1価抗体；単鎖抗体；ラクダ化（camelized）抗体；アフイボディ（affibody）；抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、抗抗Id抗体を含む）、及び完全に抗原結合可能な単一モノマー可変抗体ドメイン（例えば、VHドメイン又はVLドメイン）からなる結合分子を含む単一ドメイン抗体（sdAb）を含む（Harmen M. M. and Haard H. J. Appl Microbiol Biotechnol. 77(1): 13-22(2007)）。

20

【0095】

本明細書で使う用語、抗体の“抗原結合部分”は、抗原（例えば、ヒトFAM19A5）に特異的に結合する能力を保有した抗体の1つ以上の断片のことを指す。このような“断片”は、例えば、約8～約1500個のアミノ酸長であり、好適には、約8～約745個アミノ酸長、好適には約8～約300個、例えば、約8～約200個アミノ酸又は約10個～約50個又は100個アミノ酸長である。抗体の抗原結合機能は全長抗体の断片によって行われ得るということが明らかにされた。抗体、例えば、本明細書に記載の抗FAM19A5抗体の“抗原結合部分”という用語に含まれる結合断片の例は、(i) VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる1価断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域で二硫化連結部によって連結された2個のFab断片を含む2価断片であるF(ab')₂断片；(iii) VH及びCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一腕のVL及びVHドメイン及び二硫化連結されたFvs(sdFv)からなるFv断片；(v) VHドメインからなるdAb断片（Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546）；及び(vi) 分離された相補性決定領域(CDR)又は(vii) 場合によって合成リンカーによって接合され得る2個以上の分離されたCDRの組合せを含む。また、Fv断片の2個のドメインであるVLとVHは、別個の遺伝子によってコードされるが、これらは、組換え方法を用いてこれらをVLとVH領域が対をなして1価分子を形成する単一タンパク質鎖（単鎖Fv(scFv)として知られている）として作り得る合成リンカーによって接合され得る；例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426；及びHouston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883参照。このような単鎖抗体はまた、抗体の“抗原結合部分”という用語内に含まれるもの

40

50

と意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、前記断片は、無損傷抗体と同じ方式で有用性に対してスクリーニングされる。抗原結合部分は、組換えDNA技術によって又は無損傷免疫グロブリンの酵素的又は化学的切断によって生成され得る。

【0096】

本明細書で使われる用語“可変領域”と“可変ドメイン”は互換され、当業界において普遍的である。前記可変領域とは、典型的に抗体の一部、一般に軽鎖又は重鎖の一部を指すものであり、典型的に、前記成熟した重鎖内には約アミノ末端110～120個のアミノ酸があり、前記成熟した軽鎖内には約90～115個のアミノ酸があり、これらは、抗体間において配列が広範囲に異なり、特定抗体の特定抗原に対する結合と特異性において使用される。前記配列可変性は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる領域に集中するが、前記可変ドメインにおいてより高度に保存された領域はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。

10

【0097】

特定機転又は理論に限定されるわけではないが、前記軽鎖及び重鎖のCDRは、抗原と抗体の相互作用及び特異性を主に担当するものとみられる。特定の具現例において、前記可変領域は、ヒト可変領域である。特定の具現例において、前記可変領域は、齧歯類又はネズミ科のCDRとヒトフレームワーク領域(FR)を含む。特定の具現例において、前記可変領域は、霊長類(例えば、非ヒト霊長類)可変領域である。特定の具現例において、前記可変領域は、齧歯類又はネズミ科のCDRと霊長類(例えば、非ヒト霊長類)フレームワーク領域(FR)を含む。

20

【0098】

本明細書で使う用語“重鎖(HC)”は、抗体と関連して用いたとき、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてIgGの亜型、例えば、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含み、それぞれ抗体のIgA、IgD、IgE、IgG及びIgM類型を発生させる任意の別個のタイプ、例えば、アルファ()、デルタ()、エプシロン()、ガンマ()及びミュー(μ)を指すことができる。

【0099】

本明細書で使う用語“軽鎖(LC)”は、抗体と関連して用いたとき、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて任意の別個のタイプ、例えば、カッパ()及びラムダ()のことを指すことができる。軽鎖アミノ酸配列は、当業界によく公知されている。特定の具現例において、前記軽鎖は、ヒト軽鎖である。

30

【0100】

用語“VL”及び“VLドメイン”は、抗体の軽鎖可変領域のことを指すために互換的に使われる。

【0101】

用語“VH”及び“VHドメイン”は、抗体の重鎖可変領域のことを指すために互換的に使われる。

【0102】

本明細書で使う用語“定常領域”又は“定常ドメイン”は互換的であり、当業界における通常の意味を有する。前記定常ドメインは、抗体部分、例えば、抗原に対する抗体の結合に直接関与することはないが、Fc受容体との相互作用のような様々な効果器機能を示し得る軽鎖及び/又は重鎖のカルボキシ末端部分である。免疫グロブリン分子の定常領域は一般に、免疫グロブリン可変ドメインに比べてより保存されたアミノ酸配列を有する。

【0103】

“Fc領域”(断片結晶化可能な領域)又は“Fcドメイン”又は“Fc”は、免疫系の様々な細胞(例えば、効果器細胞)上に位置しているFc受容体又は古典的補体系の第1成分(C1q)に対する結合を含み、宿主組織又は因子に免疫グロブリンが結合することを媒介する抗体の重鎖のC末端領域のことを指す。これによって、Fc領域は、第1定常領域免疫グロブリンドメイン(例えば、CH1又はCL)を除く抗体の定常領域を含む。Ig

50

G、IgA及びIgD抗体アイソ型において、Fc領域は、抗体の2個の重鎖の第2(CH2)及び第3(CH3)定常ドメインから由来した2個の同じタンパク質断片を含み；IgM及びIgE Fc領域は、それぞれのポリペプチド鎖にある3個の重鎖定常ドメイン(CHドメイン2～4)を含む。IgGの場合、Fc領域は免疫グロブリンドメインC2とC3との間及びC1とC2との間のヒンジを含む。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変わり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は一般に、C226番又はP230番の位置にあるアミノ酸残基(又は、これら2個のアミノ酸の間のアミノ酸)から重鎖のカルボキシ末端まで伸長されるものに限定されるが、番号表記は、Kabataにおけると同様にEUIンデックスに従う。ヒトIgG Fc領域のCH2ドメインは、約アミノ酸231番から約アミノ酸340番に延長されており、CH3ドメインは、Fc領域においてCmドメインのC末端側に位置しているところ、すなわち、IgGの約アミノ酸341番から約アミノ酸447番に延長されている。本明細書で使うFc領域は、任意の同種異因子型変異体を含む天然配列Fc、又は変異体Fc(例えば、非自然発生Fc)であり得る。Fcはまた、この領域が分離状態にあるか、又は“Fc融合タンパク質”(例えば、抗体又は免疫癒着(immunoadhesion))とも呼ばれる“Fc領域を含む結合タンパク質”のようなFc含有タンパク質ポリペプチドと関連して意味するものであり得る。

【0104】

“天然配列Fc領域”又は“天然配列Fc”は、自然から発見されたFc領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトFc領域は、天然配列ヒトIgG1 Fc領域；天然配列ヒトIgG2 Fc領域；天然配列ヒトIgG3 Fc領域；及び天然配列ヒトIgG4 Fc領域だけでなく、これらの自然発生変異体も含む。天然配列Fcは、Fcの様々な同種異因子型を含む(例えば、Jefferys et al. (2009) mAbs 1:1；Vidarsson G. et al. Front Immunol. 5:520 (2014年10月20日オンライン公開)参照)。

【0105】

“Fc受容体”又は“FcR”は、免疫グロブリンのFc領域に結合する受容体である。IgG抗体に結合するFcRは、FcRファミリーの受容体とこれら受容体の対立遺伝子変異体及び他の方式でスプライシングされた形態を含む。前記FcRファミリーは、3個の活性化受容体(マウスのFcRI、FcRII及びFcRIV；ヒトのFcRIA、FcRIIA及びFcRIIA)と一つの阻害受容体(FcRIIB)からなっている。ヒトIgG1は、大部分のヒトFc受容体と結合し、最も強いFc効果器機能を導き出す。ヒトIgG1は、それが結合する活性化Fc受容体のタイプと関連してネズミのIgG2aと同等なものを見出すことができる。逆に、ヒトIgG4は、最小のFc効果器機能を導き出す(Vidarsson G. et al. Front Immunol. 5:520 (2014年10月20日オンライン公開)参照)。

【0106】

前記定常領域は、1つ以上の効果器機能を除去するために、例えば組換え技術によって操作され得る。“効果器機能”は、抗体Fc領域とFc受容体又はリガンドの相互作用又はそれから生じる生化学的反応を指す。例示的な“効果器機能”は、C1q結合、補体依存性細胞毒性(CDC)、Fc受容体結合、ADCC及び抗体依存性細胞媒介食作用(ADCP)のようなFcR媒介効果器機能及び細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体；BCR)の下向き調節を含む。このような効果器機能は一般に、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせられることを必要とする。したがって、用語“Fc機能のない定常領域”は、Fc領域によって媒介された1つ以上の効果器機能が減少したり又は存在しない定常領域を含む。

【0107】

抗体の効果器機能は、互いに異なる接近法によって減少又は回避され得る。抗体の効果器機能は、Fc領域が欠如している抗体断片(例えば、Fab、F(ab')₂、単鎖Fv(scFv)又はモノマーVH又はVLドメインからなるsdAbのような)を使用す

ることによって減少又は回避され得る。これと違い、Fc領域の他の価値ある特性（例えば、長い半減期及びヘテロダイマー化）は保有しながらFc領域において特定残基に連結されている糖を除去して抗体の効果器機能を減少させることによって、いわゆる無糖化（*aglycosylated*）抗体が生成され得る。無糖化抗体は、例えば、糖が付着している残基を欠失又は変更することによって、糖を酵素的に除去することによって、グリコシル化阻害剤の存在の下に培養された細胞に抗体を生産することによって、又はタンパク質をグリコシル化できない細胞（例えば、バクテリア宿主細胞）において抗体を発現させることによって生成され得る。例えば、米国特許公開番号20120100140を参照する。他の接近法は、効果器機能が減少したIgG亜型のFc領域を利用することであり、例えば、IgG2及びIgG4抗体は、IgG1及びIgG3に比べてより低いレベルのFc効果器機能を有することを特徴とする。Fc部分のCH2ドメインにおいてヒンジ領域の最も近くにある残基が抗体の効果器機能を担当するが、先天免疫系の効果器細胞上でC1q（補体）及びIgG-Fc受容体（FcR）に対して大きく重なった結合部位を含有しているわけである（Vidarsson G. et al. *Front Immunol.* 5:520（2014年10月20日オンライン公開））。したがって、Fc効果器機能が減少したり或いは存在しない抗体は、例えば、IgG4アイソ型のIgG抗体のCH2ドメインとIgG1アイソ型のIgG抗体のCH3ドメインを含むキメラFc領域、又はIgG2のヒンジ領域とIgG4のCH2領域を含むキメラFc領域（例えば、Lau C. et al. *J. Immunol.* 191:4769-4777（2013）参照）、又はFc効果器機能を変更、例えばFc機能を減少させたり或いはなくす突然変異を持つFc領域を生成させることによって製造され得る。突然変異があるこのようなFc領域は、当業界に公知されている。例えば、開示内容が全体的に本明細書に参考として含まれる米国特許公開番号20120100140とそこに引用されている米国出願とPCT出願及びAn et al., *mAbs* 1:6, 572-579（2009）を参照する。

【0108】

“ヒンジ”、“ヒンジドメイン”又は“ヒンジ領域”又は“抗体ヒンジ領域”は、CH1ドメインをCH2ドメインと接合させてヒンジの上、中及び下部を含む重鎖定常領域のドメインのことを指す（Roux et al., *J. Immunol.* 1998 161:4083）。前記ヒンジは抗体の結合及び効果器領域間の可撓性のレベル変化を提供し、また2個の重鎖定常領域間の分子間二硫化結合のための部位を提供する。本明細書で用いられるヒンジは、全てのIgGアイソ型に対してGlu216から始まってGly237で終わる（Roux et al., 1998 *J. Immunol.* 161:4083）。野生型IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4ヒンジの配列は当業界に知られている。例えば、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（2014年10月20日オンライン公開）を参照する。

【0109】

用語“CH1ドメイン”は、重鎖定常ドメインにおいてヒンジに可変ドメインを連結する重鎖定常領域のことを指す。本明細書で使うCH1ドメインは、A118から始まってV215で終わる。用語“CH1ドメイン”は、野生型CH1ドメインだけでなく、その自然に存在する変異体（例えば、同種異因子型）を含む。IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4（野生型及び同種異因子型を含む）のCH1ドメイン配列は、当業界に公知されている（例えば、上のKabat EA et al., (1991)及びVidarsson G. et al., *Front Immunol.* 5:520（2014年10月20日オンライン公開参照））。例示的なCH1ドメインは、例えば、米国特許公開第20120100140号及びそこに引用されている米国特許、公開公報及びPCT公報に

記載されている抗体の生物学的活性、例えば、半減期を変更する突然変異を持つCH1ドメインを含む。

【0110】

用語“CH2ドメイン”は、重鎖定常ドメインでCH3ドメインにヒンジを連結する重鎖定常領域のことを指す。本明細書で使うCH2ドメインは、P238から始まってK340で終わる。用語“CH2ドメイン”は、野生型CH2ドメインだけでなく、その自然に存在する変異体（例えば、同種異因子型）を含む。IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4（野生型及び同種異因子型を含む）のCH2ドメイン配列は、当業界に公知されている（例えば、上のKabata EA et al., (1991)及びVidarsson G. et al., Front Immunol. 5:520 (2014年10月20日オンライン公開参照)）。例示的なCH2ドメインは、例えば、米国特許公開第20120100140号及びそこに引用されている米国特許、公開公報及びPCT公報に記載されている抗体の生物学的活性、例えば、半減期及び/又は減少したFc効果器機能を変更する突然変異を持つCH2ドメインを含む。

10

【0111】

用語“CH3ドメイン”は、重鎖定常ドメインにおいてCH2ドメインに対してC末端である重鎖定常領域のことを指す。本明細書で使うCH3ドメインは、G341から始まってK447で終わる。用語“CH3ドメイン”は、野生型CH3ドメインだけでなく、その自然に存在する変異体（例えば、同種異因子型）を含む。IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4（野生型及び同種異因子型を含む）のCH3ドメイン配列は、当業界に公知されている（例えば、上のKabata EA et al., (1991)及びVidarsson G. et al., Front Immunol. 5:520 (2014年10月20日オンライン公開参照)）。例示的なCH3ドメインは、例えば、米国特許公開第20120100140号及びそこに引用されている米国特許、公開公報及びPCT公報に記載されている抗体の生物学的活性、例えば半減期を変更する突然変異を持つCH3ドメインを含む。

20

【0112】

本明細書で使う“アイソ型”は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体類型（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、及びIgE抗体）のことを指す。

30

【0113】

“同種異因子型”は、いくつかのアミノ酸を異にする特定アイソ型グループ内自然発生変異体のことを指す（例えば、Jefferys et al., (2009) mAbs 1:1参照）。本明細書に記載されている抗体は、任意の同種異因子型を有することができる。IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4の同種異因子型は、当業界に公知されている。例えば、上のKabata EA et al., (1991); Vidarsson G. et al., Front Immunol. 5:520 (2014年10月20日オンライン公開); 及びLefranc MP, mAbs 1:4, 1-7 (2009)を参照する。

【0114】

語句“抗原を認識する抗体”及び“抗原に特異的な抗体”は、用語“抗原に特異的に結合する抗体”と本明細書で互換して使われる。

40

【0115】

本明細書で使う“分離された抗体”は、互いに異なる抗原特異性を持つ他の抗体が実質的にない抗体を意味する（例えば、FAM19A5に特異的に結合する分離された抗体は、FAM19A5以外の抗原に特異的に結合する抗体が実質的にない）。しかし、FAM19A5のエピトープに特異的に結合する分離された抗体は、互いに異なる種の他のFAM19A5タンパク質に交差反応性を有することができる。

【0116】

“結合親和性”は、一般に、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー 50

(例えば、抗原)間の非共有相互作用の総和の強度を意味する。別段の提示がない限り、本明細書で使う“結合親和性”は、結合対のメンバー(例えば、抗体と抗原)間1:1相互作用を反映した固有結合親和性を意味する。パートナーYに対する分子Xの親和性は、一般に、解離定数(K_D)によって表現され得る。親和性は、平衡解離定数(K_D)と平衡結合定数(K_A)を含むが、これに限定されない当業界に公知の多数の方法で測定及び/又は表示され得る。前記 K_D は、 k_{off}/k_{on} の商から計算され、モル濃度(M)で表示され、 K_A は k_{on}/k_{off} の商から計算される。 k_{on} は、例えば、抗原に対する抗体の結合速度定数を意味し、 k_{off} は、例えば、抗原に対する抗体の解離を意味する。 k_{on} 及び k_{off} は、免疫分析(例えば、酵素結合免疫吸着分析(ELISA))、BIA CORE(登録商標)又は力学的排除分析(KinExA)のように当業者に公知の技術によって決定され得る。 10

【0117】

本明細書で使う用語“特異的に結合”、“特異的に認識”、“特異的結合”、“選択的結合”及び“選択的に結合”は、抗体と関連して類似の用語であり、抗原(例えば、エピトープ又は免疫複合体)に結合する分子(例えば、抗体)のことを指し、結合は、当業者によって理解されるものである。例えば、抗原に特異的に結合する分子は、例えば免疫分析、BIA CORE(登録商標)、KinExA 3000機器(Sapidyne Instruments, Boise, ID)又は当業界に公知されている他の分析法によって決定したとき、通常、より低い親和度を持つ他のペプチド又はポリペプチドに結合し得る。特定の具現例において、抗原に特異的に結合する分子は、この分子が他の抗原に結合するとき、 K_A に比べて、少なくとも $2 \log s$ 、 $2.5 \log s$ 、 $3 \log s$ 、 $4 \log s$ 以上さらに大きい K_A で前記抗原に結合する。 20

【0118】

抗体は典型的に、 $10^{-5} \sim 10^{-11} M$ 以下の解離定数(K_D)によって反映される高い親和度でこれらの同族抗原(cognate antigen)に特異的に結合する。約 $10^{-4} M$ を超える任意の K_D は一般に、非特異的結合を意味すると見なされる。本明細書で使う抗原に“特異的に結合する”抗体は、高い親和度で抗原及び実質的に同じ抗原に結合する抗体のことを指し、これは、例えば、前記所定の抗原を使用するBIA CORE(登録商標)2000機器で免疫分析(例えば、ELISA)又は表面プラズマ共鳴(SPR)技術によって決定したとき、 $10^{-7} M$ 以下、好ましくは $10^{-8} M$ 以下、より好ましくは $10^{-9} M$ 以下、最も好ましくは $10^{-8} M \sim 10^{-10} M$ 以下の K_D を有することを意味するが、この抗体は、関連のない抗原には高い親和度で結合しない。 30

【0119】

本明細書で使う“抗原”は、タンパク質、ペプチド又はハプテン(hapten)のような任意の天然又は合成免疫原性物質のことを指す。抗原は、FAM19A5又はその断片であり得る。

【0120】

本明細書で使う“エピトープ”は、当業界の用語で、抗体が特異的に結合できる抗原の局在化された領域を指す。エピトープは、例えばポリペプチドの隣接アミノ酸(線形又は隣接エピトープ)であるか、又はエピトープは、例えばポリペプチド又はポリペプチドの2個以上の隣接しない領域が集合したもの(立体形態、非線形、不連続又は非隣接エピトープ)であり得る。隣接アミノ酸から形成されたエピトープは、いつもではないが、典型的に変性(denaturing)溶媒に露出時に維持されるのに対し、3次フォルディングによって形成されたエピトープは、典型的に変性溶媒で処理時に喪失される。エピトープは典型的に、特有の空間的立体形態内に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は20個のアミノ酸を含む。所定の抗体によってどのエピトープが結合するかを決定するための方法(すなわち、エピトープマッピング)は、当業界によく公知されており、例えば(例えば、FMA19A5の)重複又は隣接ペプチドを所定の抗体(例えば、抗FAM19A5抗体)との反応性に対して試験する免疫ロットと免疫沈殿分析を含む。エピトープの空間的立体形態を決定する方法は、当業界にお 40 50

ける技術及び本明細書に記載の技術、例えばx線結晶学、2次元核磁気共鳴及びHDX-MSを含む(例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)参照)。

【0121】

特定の具現例において、前記抗体が結合するエピトープは、例えば、NMR分光法、X線回折結晶学研究、ELISA分析、質量分光分析と結合した水素/重水素交換(例えば、液体クロマトグラフィー電子噴霧質量分光分析)、アレイベースのオリゴペプチドスキニング分析及び/又は突然変異誘発マッピング(例えば、部位指向突然変異誘発マッピング)によって決定され得る。X線結晶学の場合、結晶化は当業界に公知の方法のいずれかを用いて達成され得る(例えば、Giege Ret 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: 6300-6303参照)。抗体: 抗原結晶は、周知のX線回折技術を用いて研究でき、X-PLOR (Yale University, 1992, Molecular Simulations, Inc. によって配布; 例えば、Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff H.W. et al., ; U.S. 2004/0014194参考)及び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)のようなコンピュータソフトウェアを用いて精製(refine)され得る。突然変異誘発マッピング研究は、当業者に公知された任意の方法を用いて行うことができる。アラニンスキニング突然変異誘発技術を含む突然変異誘発技術の記載については、例えば、Champe M. et al., (1995) J Biol Chem 270: 1388-1394及びCunningham B.C. & Wells J.A. (1989) Science 244: 1081-1085を参考する。

【0122】

用語“エピトープマッピング”は、抗体抗原認識に対する分子決定要因の同定過程を指す。

【0123】

2個以上の抗体と関連して用語“同一エピトープに結合”は、所定の方法によって決定するとき、抗体がアミノ酸残基の同一セグメントに結合するということを意味する。抗体が本明細書に記載の抗体と“FAM19A5上の同一エピトープ”に結合するか否かを決定するための技術は、エピトープマッピング方法、例えばエピトープの原子分解能を提供する抗原: 抗体複合体の結晶のx線分析及び水素/重水素交換質量分光分析(HDX-MS)を含む。他の方法は、抗原断片又は抗原の突然変異した変異体に対する抗体の結合をモニタリングすることであり、ここで、前記抗原配列内のアミノ酸残基の変形による結合損失は、だいてい、エピトープ成分の表示として見なされる。また、エピトープマッピングのための電算組合せ法も利用可能である。これらの方法は、組合せファージディスプレイペプチドライブラリーから特定の短いペプチドを親和性分離する関心抗体の能力に依存する。同じVH及びVL又は同じCDR1、2及び3配列を有する抗体は、同じエピトープに結合すると予想される。

【0124】

“標的との結合に対して他の抗体と競合”する抗体は、前記他の抗体の標的結合を(部分的に又は完全に)阻害する抗体を指す。2個の抗体が標的との結合に対して互いに競合す

るか否か、すなわち一つの抗体が他の抗体の標的結合を阻害するか否か、及び阻害する程度は、公知の競合実験を用いて決定することができる。特定の具現例において、一つの抗体は他の抗体の標的結合において競合し、この結合を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%まで阻害する。阻害又は競合レベルは、抗体が“遮断抗体”(すなわち、標的とまず培養される低温抗体)であるかどうかによって異なり得る。競合分析は、例えば、Ed. Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot.4277又はEd. Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999による“Using Antibodies”の第11章に記載されたとおりに実施できる。競合抗体は、同一エピトープ、重複エピトープ又は隣接エピトープ(例えば、立体障害で立証される)に結合する。

10

【0125】

他の競合結合分析としては、固相直接又は間接放射性免疫分析(RIA)、固相直接又は間接酵素免疫分析(EIA)、サンドウィッチ競合分析(Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242(1983)参照);固相直接ビオチン-アビジンEIA(Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614(1986)参照);固相直接標識化分析、固相直接標識化サンドウィッチ分析(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press(1988)参照);1-125標識を使用する固相直接標識RIA(Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7(1988)参照);固相直接ビオチン-アビジンEIA(Cheung et al., Virology 176:546(1990)参照);及び直接標識化RIA(Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77(1990)参照)を含む。

20

【0126】

“二重特異的”又は“二重機能性抗体”は、2個の異なる重鎖/軽鎖対が2個の異なる結合部位を持つ人工混成抗体である。二重特異的抗体は、ハイブリドーマの融合又はFab'断片の連結を含む様々な方法によって生産され得る。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321(1990);Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553(1992)を参照する。

30

【0127】

本明細書で使う“単クローン性抗体”は、特定エピトープに対して単一結合特異性と親和性を示す抗体であるか、又は全ての抗体が特定エピトープに対して単一結合特異性と親和性を示す抗体組成のことを指す。したがって、用語“ヒト単クローン性抗体”は、単一結合特異性を示し、ヒト生殖系(germline)免疫グロブリン配列から由来した可変及び選択的定常領域を有する抗体又は抗体組成のことを指す。一部の具現例において、ヒト単クローン性抗体は、例えば、不滅化細胞に融合されたヒト重鎖転移遺伝子と軽鎖転移遺伝子を含むゲノムを持つ遺伝子導入(transgenic)非ヒト動物、例えば遺伝子導入マウスから得たB細胞を含むハイブリドーマによって生産される。

40

【0128】

本明細書で使う用語“組換えヒト抗体”は、(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子に対して遺伝子導入又は染色体導入(transchromosomal)動物(例えば、マウス)から分離された抗体又はそれから製造されたハイブリドーマ、(b)抗体を発現させるために形質転換された宿主細胞から、例えばトランスフェクターマ(transfectoma)から分離された抗体、(c)組換え組合せヒト抗体ライブラリーから分離された抗体、及び(d)他のDNA配列にヒト免疫グロブリン遺伝子配列をスプライシングすることを伴う任意の他の手段によって製造、発現、生成又は分離された抗体、のような組換え

50

手段によって製造、発現、生成又は分離された全てのヒト抗体を含む。このような組換えヒト抗体は、生殖系遺伝子によってコードされる特定のヒト生殖系免疫グロブリン配列を用いるが、例えば、抗体成熟化中に起こる後続再配列と突然変異を含む可変及び定常領域を含む。当業界に公知された通り（例えば、Lonberg (2005) Nature Biotech. 23 (9) : 1117 - 1125 参照）、前記可変領域は、外来抗原に対して特異的な抗体を形成するように再配列される様々な遺伝子によってコードされる抗原結合ドメインを含有する。再配列の他にも、前記可変領域は、外来抗原に対する抗体の親和性を増加させるために多数の単一アミノ酸変化（体細胞突然変異又は超突然変異という）によってさらに変形され得る。前記定常領域は、抗原に対する追加反応にしたがって変わるだろう（すなわち、アイソ型変化）。したがって、抗原に反応して軽鎖及び重鎖免疫グロブリンポリペプチドをコードする、再配列され体細胞突然変異した核酸分子は、本来の核酸分子と配列同一性を有することはできないが、その代わりに、実質的に同一又は類似するであろう（すなわち、少なくとも80%同一性を有する）。

10

20

30

40

50

【0129】

“ヒト”抗体（HuMAb）は、フレームワークとCDR領域が両方ともヒト生殖系免疫グロブリン配列から由来した可変領域を有する抗体のことを指す。また、前記抗体が定常領域を含有すると、前記定常領域もヒト生殖系免疫グロブリン配列から由来する。本明細書に記載の抗体は、ヒト生殖系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、試験管内無作為又は部位特異的突然変異誘発によって又は生体内体細胞突然変異によって導入された突然変異）を含むことができる。しかし、本明細書で使用する用語“ヒト抗体”は、マウスのような他の哺乳類種の生殖系から由来したCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含まないものではない。用語“ヒト”抗体と“完全なヒト”抗体は同じ意味で使われる。

【0130】

“ヒト化”抗体は、非ヒト抗体のCDRドメイン外部のアミノ酸の一部、大部分又は全部が、ヒト免疫グロブリンから由来した相応するアミノ酸に置換された抗体のことを指す。抗体のヒト化された形態の一部の具現例において、CDRドメイン外部のアミノ酸の一部、大部分又は全部がヒト免疫グロブリンのアミノ酸に置換されており、1つ以上のCDR領域内部のアミノ酸の一部、大部分又は全部は変わらずに残っている。アミノ酸の小さい添加、欠失、挿入、置換又は変形は、これらが特定抗原に結合する抗体の能力をなくさない限り、許容可能である。“ヒト化”抗体は、原抗体の抗原特異性に類似する抗原特異性を維持する。

【0131】

本明細書で使う用語“脱免疫化された”又は“脱免疫化”とは、抗体又はその抗原結合部分が、例えばヒト対象においてその免疫原性を減少させるために変形される過程のことを指す。例えば、原抗体の重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）配列を分析することができ、それぞれのV領域から前記配列内相補性決定領域（CDR）及び他の主要残基に対してエピトープの位置を示すヒトT細胞エピトープ“マップ”を生成することができる。最終抗体の活性を変化させる恐れが少ない代替アミノ酸置換を同定するために、T細胞エピトープマップから個別T細胞エピトープを分析する。アミノ酸置換の組合せを含む様々な代替VH及びVL配列を設計し、続いて、これらの配列を本明細書に開示の診断及び治療方法に使用するために、広範なFAM19A5特異的抗体又はその抗原結合部分に導入した後、機能について試験する。次に、変形されたV及びヒトC領域を含む完全な重鎖及び軽鎖遺伝子を、発現ベクター及び全抗体（whole antibody）生産のために細胞株に導入された後続プラスミドにクローニングする。次に、前記抗体を適切な生化学及び生物学的分析法で比較し、最適の変異体を同定する。抗体は、本明細書に記載の方法又は当業界に公知の任意の他の方法によって脱免疫化れ得る。例えば、WO98/52976又はWO00/34317を参照する。

【0132】

“キメラ抗体”は、マウス抗体から可変領域が由来し、ヒト抗体から定常領域が由来した

抗体のように、一つの種から可変領域が由来し、他の種から定常領域が由来した抗体のことを指す。

【0133】

本明細書で使う用語“交差反応”は、異なる種のFAM19A5に結合する本明細書に記載の抗体の能力を指す。例えば、ヒトFAM19A5に結合する本明細書に記載の抗体は、他の種のFAM19A5（例えば、マウスFAM19A5）にも結合できる。本明細書で使う交差反応性は、結合分析（例えば、SPR、ELISA）で精製された抗原との特異的反応性を検出することによって又はFAM19A5を生理学的に発現する細胞に結合したり又はそれとも前記細胞と機能的に相互作用することによって測定され得る。交差反応性を決定するための方法は、本明細書に記載されている標準結合分析、例えば、BIACORE（登録商標）2000 SPR機器（Biacore AB, Uppsala, スウェーデン）を用いたBIACORE（登録商標）表面プラズマ共鳴（SPR）分析、又は流細胞計数技術を含む。

10

【0134】

本明細書で使う用語“自然発生”を対象に適用時に、対象体が自然から発見され得るという事実を意味する。例えば、自然のソースから分離可能であり、実験室で人によって意図的に変形されない有機体（ウイルスを含む）内に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は自然発生である。

【0135】

“ポリペプチド”は、少なくとも2個の連続連結されたアミノ酸残基を含む鎖のことを指し、前記鎖の長さには上限はない。タンパク質内の1つ以上のアミノ酸残基は、グリコシル化、ホスホリル化又は二硫化結合形成のような変形を含有できるが、これに限定されるものではない。“タンパク質”は、1つ以上のポリペプチドを含むことができる。

20

【0136】

本発明で使用する用語“核酸分子”は、DNA分子及びRNA分子を含むものと意図される。核酸分子は、単鎖又は二重鎖であり得、cDNAであり得る。

【0137】

本明細書で使う用語“ベクター”は、連結されたさらに他の核酸を輸送できる核酸分子を意味しようとするものである。ベクターの一類型は、追加DNA片が結紮され得る円形の二重鎖DNAループを指す“プラスミド”である。ベクターのさらに他の類型は、追加DNA片がウイルスゲノムに結紮され得るウイルスベクターである。特定ベクターは、それらが導入される宿主細胞で自己複製できる（例えば、バクテリア性複製起源を持つバクテリアベクター及びエピソーマル（episomal）哺乳類動物）。他のベクター（例えば、非エピソーマル哺乳類ベクター）は、宿主細胞に導入時に宿主細胞のゲノムに統合されてよく、これによって宿主ゲノムに沿って複製される。さらに、特定ベクターは、それらが作動的に連結された遺伝子の発現を指示できる。このようなベクターを本明細書では“組換え発現ベクター”（又は単に“発現ベクター”）という。一般に、組換えDNA技術において活用性がある発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、“プラスミド”と“ベクター”は、プラスミドがベクターの最も普遍的に使用される形態であるので、互換して使用可能である。しかし、等価の機能を行う他の形態の発現ベクター、例えば、ウイルスベクター（例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルス）も含まれる。

30

40

【0138】

本発明で使用する用語“組換え宿主細胞”（又は、簡単に“宿主細胞”）は、細胞内自然的に存在しない核酸を含む細胞のことを指し、組換え発現ベクターが導入された細胞であり得る。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫のことも指すものとして理解すべきである。突然変異や環境的な影響によって次の世代には特定の変形が起き得る点から、このような子孫は実際に親細胞と同一であるとはいえないが、本明細書で使う用語“宿主細胞”の範囲内に依然として含まれる。

【0139】

50

本発明で使用する用語“連結された”は、2個以上の分子の会合を指す。前記連結は、共有連結又は非共有連結であり得る。前記連結はまた、遺伝子連結（すなわち、組換えによる融合）であり得る。このような連結は、化学的コンジュゲーション及び組換えタンパク質生産のような、当業界で認める様々な技術を用いて達成され得る。

【0140】

本明細書で使われる“投与”とは、当業者に公知の様々な方法と伝達系の任意のものを用いて対象に治療剤又は治療剤を含む組成物を物理的に導入することを指す。本明細書に記載の抗体に対する好ましい投与経路は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、脊椎、又は例えば注射又は注入による他の非経口投与経路を含む。本明細書で使われる語句“非経口投与”とは、一般に注射による腸内及び局所投与以外の投与方式を意味し、これに制限されないが、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、脊髄腔内、リンパ内、病変内、被膜内、眼窩内、心臓内、血内、経気管、皮下、表皮下、関節内、皮膜下、蜘蛛膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内注射及び注入の他、生体内電気穿孔も含む。これと違い、本明細書に記載の抗体は、非経口経路、例えば、局所、表皮又は粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、経口、膈内、職場、舌下又は局所投与され得る。投与はまた、例えば、1回、複数回、及び/又は1回以上の延長された期間にわたって行われ得る。

【0141】

本明細書で使われる用語“治療する (treat)”、“治療する (treating)”及び“治療 (treatment)”とは、疾患関連症候群、合併症、症状又は生化学的徴候の進行、発達、重症度又は再発を反転、緩和、改善、阻害又は遅延又は予防しようとする目的で、対象に対して行われた任意の種類の介入若しくは過程、又は対象に活性剤を投与することを指す。治療は、疾患がある対象又は疾患がない対象（例えば、予防用）に対して行われ得る。

【0142】

本明細書で使われる用語“対象”は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。用語“非ヒト動物”は、あらゆる脊椎動物、例えば、哺乳類及び非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両棲類、爬虫類などのような非哺乳類を含む。

【0143】

本明細書で使われる用語“神経膠症の発病”又は“反応性神経膠症の発病”は、神経膠症の始まり又は開始を含む。神経膠症は、例えば、外傷、脳脊髄損傷、脳腫瘍、感染、虚血、脳卒中、反応及び/又は神経退行性疾患から傷害又は損傷による中枢神経系 (CNS、例えば、脳及び/又は脊髄) 内膠細胞の非特異的反応性変化であり、星状細胞、小膠細胞及び稀突起膠細胞を含む異なる様々な種類の膠細胞の増殖又は肥大を含む。神経膠症の発病は、外傷又は損傷を受けたCNSの一部で軸索再生を阻害する傷痕が形成されることがある。神経膠症の発病の有害な影響には、非可逆的又は永久的神経細胞の損傷及び/又は周辺神経細胞の回復妨害を含む。したがって、用語“神経膠症の発病遅延”及び“反応性神経膠症の発病遅延”は、神経膠症の始まり又は開始及びこれに関連したCNSの有害な影響の阻害、遅延、抑制又は予防を含む。

【0144】

本明細書で使われる用語“反応性星状細胞の過剰増殖”は、例えば、CNS損傷、外傷、傷害、脳脊髄損傷、脳腫瘍、感染、虚血、脳卒中、反応及び/又は神経退行性疾患から周辺神経細胞の破壊による星状細胞の数が異常増加することを含む。反応性星状細胞の過剰増殖は、外傷又は損傷を受けたCNSの一部で軸索再生を阻害する傷痕の形成、炎症の悪化、神経毒性レベルの活性酸素種の生成及び放出、潜在的に興奮毒性であるグルタミンートの放出、発作発生に対する潜在的寄与、血液-脳障壁機能の損傷、外傷及び脳卒中における細胞毒性浮腫、慢性疼痛に寄与する星状細胞の慢性サイトカイン活性化可能性及びCNS損傷後2次変性を含め、CNSに有害な影響を及ぼすことがある。Sofroniew, Michael V. (2009) Trends in Neurosciences, 32(12): 638-47; McGraw, J. et al. (2001) Journal of Neuroscience Research 63(2): 109-1

5 ; 及び Sofroniew, M. V. (2005) *The Neuroscientist* 11 (5) : 400 - 7 . したがって、用語 “ 反応性星状細胞の過剰増殖抑制 ” は、反応性星状細胞の過剰又は異常増殖及びこれに関連した CNS の有害な影響を阻害、遅延、抑制、制限又は防止することを含む。

【 0 1 4 5 】

本明細書で使われる用語 “ コンドロイチン硫酸プロテオグリカン ” は、タンパク質コア及びコンドロイチン硫酸で構成されたプロテオグリカンを含む。CSPGとも知られているコンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、成長期及び成人 CNS 全般にわたって広範に発現した細胞外基質分子である。CSGPは、神経発達及び神経膠傷痕形成に重要な役割をし、それらは CNS において損傷後軸索再生を阻害する。知られたCSPGには、アグレカ 10
 カン (CSPG1)、パーシカン (CSPG2)、ニューロカン (CSPG3)、CSPG4 (又は、神経細胞膠抗原2 (NG2))、CSPG5、SMC3 (CSPG6、染色体3の構造維持)、プレビカン (CSPG7) 及びCD44 (CSPG8、分化クラスター44)、ホスファカンニューロカン (CSPG3) が含まれる。Rhodes, K. E. and Fawcett, J. W. (2004) *Journal of Anatomy* . 204 (1) : 33 - 48 . これによって、用語 “ コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現減少 ” は、一つ以上のCSGPのレベルを減少、阻害、抑制したり、又は一つ以上のCSGPの活性を減少させたり、又は一つ以上のCSGPを不活性化することを含む。特定の具現例において、前記用語は、ニューロカン、NG2又は両者のレベルを減少、阻害、抑制したり、又はニューロカン、NG2又は両者の活性を減少させたり、又はニュー 20
 ーロカン、NG2又は両者を不活性化させることを含む。

【 0 1 4 6 】

本明細書で使われる用語 “ 神経細胞 ” は、電気及び化学的信号によって情報を処理し伝達する電気興奮性細胞を含む。神経細胞は、CNSの脳と脊髄、末梢神経系 (PNS) の神経節の主要構成要素であり、相互に連結されて神経網を形成することができる。典型的な神経細胞は、体細胞 (細胞体)、樹状突起及び軸索で構成されている。神経細胞の体細胞 (細胞体) は、核を含む。神経細胞の樹状突起は、神経細胞入力の大部分が起きる枝の多い細胞延長部である。軸索は、体細胞から延長されている相対的に微細なケーブル形状の突出部であり、神経信号を体細胞から遠くまで伝達し、特定種類の情報を体細胞にさらに伝達する。用語 “ 神経細胞の再成長促進 ” は、好ましくは、傷害又は損傷後に神経細胞の成 30
 長を刺激、促進、増加又は活性化させることを含む。

【 0 1 4 7 】

本明細書で使われる用語 “ c - fos ” は、神経伝達物質の刺激によって速く誘導される原腫瘍遺伝子 (protooncogene) c - fosを含む。c - fosは、マウスとヒトを含む多くの種に存在する。前記c - fos遺伝子とタンパク質は公知されており、特性が分析されている。Curran, T, *The c - fos proto - oncogene*, pp 307 - 327 (*The Oncogene Handbook*, Reddy EP et al., (eds.) Elsevier) (1988) を参照する。c - fosの発現は、当業界に公知の方法、例えば、ノーザンプロット、定量的PCR又は免疫組織化学的方法によって決定されてよい。用語 “ c - fosの発現増加 ” は、c 40
 - fos mRNA、c - fosタンパク質又はc - fosタンパク質活性レベルの増加を含む。

【 0 1 4 8 】

本明細書で使われる用語 “ pERK ” は、リン酸化された細胞外信号 - 調節キナーゼを含む。細胞外信号 - 調節キナーゼ、又はERK1及びERK2を含むERKは、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 系的一种である。ERKは、その上流 (upstream) キナーゼによるリン酸化によって活性化されてpERKを形成した後、下流 (downstream) 標的を活性化する。ERKは、学習、記憶及び疼痛感受性の基礎となる神経及びシナプス可塑性に關与する。Ji R. R. et al., *Nat Neurosci* (1999) 2 : 1114 - 1119 . 前記ERK遺伝子、タンパク 50

質、リン酸化及び活性化は公知されており、特性が分析されており、ERK及びpERKの発現は当業界に公知の方法（例えば、ノーザンブロット、定量的PCR又は免疫組織化学的方法）によって決定され得る。Gao Y. J. and Ji R. R., *Open Pain J.* (2009) 2: 11 - 17を参照する。用語“pERK発現増加”は、ERK mRNA、ERKタンパク質又はpERK活性レベルの増加を含む。

【0149】

本明細書で使われる用語“GAP43”は、“成長関連タンパク質43”とも知られており、神経突起の形成、再生及び可塑性を促進する神経組織特異的タンパク質である。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を参照する。ヒトGAP43は、GAP43遺伝子によってコードされる。ヒトGAP43ポリペプチド配列(UniProt: KB - P17677)及び前記ポリペプチドをコードするcDNA配列は、当業界に公知されている。Kosik K. S. et al., (1988) *Neuron* 1(2): 127 - 32; Ng S. C. et al., (1988) *Neuron* 1(2): 133 - 9. GAP43の発現は、当業界に公知の方法（例えば、ノーザンブロット、定量的PCR又は免疫組織化学的方法）によって決定され得る。用語“神経細胞においてGAP43増加”は、GAP43 mRNA、GAP43タンパク質のレベル増進又は増加又はGAP43タンパク質の活性増加を含む。

【0150】

本明細書で使われる用語“治療有効量”は、対象の疾患又は障害を“治療”したり、或いは疾患又は障害（例えば、中枢神経系損傷）の危険、潜在性、可能性又は発生を減少させるのに効果的な薬物単独又は別の治療剤と組み合わせた薬物の量を指す。“治療有効量”は、疾患又は障害（例えば、外傷性脳損傷のような中枢神経系損傷又は本明細書に開示の他の疾患）を有するか或いは有する危険がある対象に、一部の改善又は実益を提供する薬物又は治療剤の量を含む。これによって、“治療有効量”は、疾患又は障害の危険、潜在性、可能性又は発生を減少させたり或いは一部の緩和、軽減を提供し、及び/又は少なくとも一つの指標（例えば、反応性神経膠症の発病）を減少させ、及び/又は疾患又は障害の少なくとも一つの臨床症状を減少させる量である。

【0151】

[I I . 抗 F A M 1 9 A 5 抗体]

本明細書は、特定機能的特徴又は特性を特徴とする抗体、例えば、単クローン性抗体を開示する。例えば、ヒトFAM19A5に特異的に結合する前記抗体は、ヒトにおいて高度に免疫原性である領域又は残基を除去及び/又は変形することによって突然変異（例えば、置換又は欠失）されている（すなわち、脱免疫化されている）。したがって、本明細書に開示の抗体、すなわち、抗FAM19A5抗体は、基準抗体（例えば、脱免疫化されていない対応抗体、例えば、3 - 2又は2 - 13抗体）に比べて、ヒトを対象に投与時に免疫原性が減少する。

【0152】

また、本明細書に記載の抗体は、次の機能的特性のいずれか一つ以上を示す：

- (a) K_D が 10 nM 以下である可溶性ヒトFAM19A5に結合する特性；
- (b) K_D が 10 nM 以下である膜結合ヒトFAM19A5に結合する特性；
- (c) 反応性神経膠症の発病を減少、反転、遅延及び/又は予防する特性；
- (d) 反応性星状細胞の過剰増殖を抑制する特性；
- (e) ニューロカン及び神経膠抗原2 (NG2) を含むコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現を減少させる特性；
- (f) 神経細胞の核内c-fos及びpERKの発現を増加させる特性；
- (g) 神経細胞の生存を促進する特性；
- (h) 神経細胞内GAP43の発現を増加させる特性；及び

10

20

30

40

50

(i) 軸索の再成長を促進する特性。

【 0 1 5 3 】

一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、ヒトを対象に投与時に、基準抗体（例えば、脱免疫化されていない対応抗体、例えば、抗体 3 - 2 又は 2 - 1 3 ）に比べて抗体が少なく免疫原性となるように脱免疫化された。一部の具現例において、前記抗体の免疫原性は、基準抗体（例えば、脱免疫化されていない対応抗体、例えば、抗体 3 - 2 又は 2 - 1 3 ）に比べて、少なくとも約 5 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 % 又は少なくとも約 1 0 0 % 減少した。一部の具現例において、前記脱免疫化過程は抗体の結合親和性を変化させない。

【 0 1 5 4 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、基準抗体（例えば、親和度成熟を経ていない対応抗体、例えば、抗体 2 - 1 3 ）に比べて、抗体がより大きい親和度で F A M 1 9 A 5 タンパク質に結合するように親和度成熟を経た。特定の具現例において、前記抗体の結合親和度は、基準抗体（例えば、親和度成熟を経ていない対応抗体、例えば、抗体 2 - 1 3 ）に比べて、少なくとも約 5 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 1 0 0 % 増加した。一部の具現例において、前記親和度成熟過程は、抗体の免疫原性を変化させない。

【 0 1 5 5 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、ヒトを対象に投与時に、基準抗体（例えば、脱免疫化されていない対応抗体、例えば、抗体 3 - 2 又は 2 - 1 3 ）に比べて少ない免疫原性を有する他、より大きい親和度で F A M 1 9 A 5 タンパク質に結合するように脱免疫化及び親和度成熟を全て経た。一部の具現例において、前記抗体の免疫原性は、基準抗体に比べて少なくとも約 5 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 % 又は少なくとも約 1 0 0 % 減少した。一部の具現例において、前記抗体の結合親和度は、基準抗体に比べて少なくとも約 5 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、又は少なくとも 1 0 0 % 以上増加した。

【 0 1 5 6 】

一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、高い親和度、例えば、 K_D が $10^{-7} M$ 以下、 $10^{-8} M$ ($10 nM$) 以下、 $10^{-9} M$ ($1 nM$) 以下、 $10^{-10} M$ ($0.1 nM$) 以下、 $10^{-11} M$ 以下又は $10^{-12} M$ 以下、例えば $10^{-12} M \sim 10^{-7} M$ 、 $10^{-11} M \sim 10^{-7} M$ 、 $10^{-10} M \sim 10^{-7} M$ 又は $10^{-9} M \sim 10^{-7} M$ 、例えば $10^{-12} M$ 、 $5 \times 10^{-12} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $5 \times 10^{-11} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、 $10^{-7} M$ 又は $5 \times 10^{-7} M$ である可溶性ヒト F A M 1 9 A 5 又は膜結合ヒト F A M 1 9 A 5 に特異的に結合する。多様な種のヒト F A M 1 9 A 5 に対する抗体の結合能を評価するための標準分析法は、例えば、E L I S A、ウェスタンブロット及び R I A を含め、当業界に公知されている。適切な分析法は、実施例欄に詳細に記載されている。前記抗体の結合動力学（例えば、結合親和度）は、E L I S A、B I A C O R E（登録商標）分析又は K i n E x A のような当業界に公知の標準分析法によって評価され得る。F A M 1 9 A

5の機能的特性(例えば、リガンド結合)に対する抗体の効果を評価するための分析法は、下記及び実施例欄にさらに詳細に記載されている。

【0157】

一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、例えばELISAによって決定したとき、 K_D が 10^{-7} M以下、 10^{-8} M(10nM)以下、 10^{-9} M(1nM)以下、 10^{-10} M以下、 10^{-12} M~ 10^{-7} M、 10^{-11} M~ 10^{-7} M、 10^{-10} M~ 10^{-7} M、 10^{-9} M~ 10^{-7} M、又は 10^{-8} M~ 10^{-7} Mである可溶性ヒトFAM19A5に結合する。一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、 K_D が10nM以下、例えば0.1~10nM、0.1~5nM、0.1~1nM、0.5~10nM、0.5~5nM、0.5~1nM、1~10nM、1~5nM又は5~10nMである可溶性FAM19A5に結合する。一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、ELISAによって決定したとき、 K_D が約1pM、約2pM、約3pM、約4pM、約5pM、約6pM、約7pM、約8pM、約9pM、約10pM、約20pM、約30pM、約40pM、約50pM、約60pM、約70pM、約80pM、約90pM、約100pM、約200pM、約300pM、約400pM、約500pM、約600pM、約700pM、約800pM又は約900pM、又は約1nM、約2nM、約3nM、約4nM、約5nM、約6nM、約7nM、約8nM又は約9nM又は約10nM、約20nM、約30nM、約40nM、約50nM、約60nM、約70nM、約80nM又は約90nMである可溶性ヒトFAM19A5に特異的に結合する。

【0158】

一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、 K_D が、例えばELISAによって決定したとき、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M(10nM)以下、 10^{-9} M(1nM)以下、 10^{-10} M以下、 10^{-12} M~ 10^{-7} M、 10^{-11} M~ 10^{-7} M、 10^{-10} M~ 10^{-7} M、 10^{-9} M~ 10^{-7} M又は 10^{-8} M~ 10^{-7} Mである膜結合ヒトFAM19A5に結合する。特定の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、ELISAによって決定したとき、 K_D が10nM以下、例えば、0.1~10nM、0.1~5nM、0.1~1nM、0.5~10nM、0.5~5nM、0.5~1nM、1~10nM、1~5nM又は5~10nMである膜結合ヒトFAM19A5に特異的に結合する。一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、ELISAによって決定したとき、 K_D が約1pM、約2pM、約3pM、約4pM、約5pM、約6pM、約7pM、約8pM、約9pM、約10pM、約20pM、約30pM、約40pM、約50pM、約60pM、約70pM、約80pM、約90pM、約100pM、約200pM、約300pM、約400pM、約500pM、約600pM、約700pM、約800pM又は約900pM、又は約1nM、約2nM、約3nM、約4nM、約5nM、約6nM、約7nM、約8nM又は約9nM、又は約10nM、約20nM、約30nM、約40nM、約50nM、約60nM、約70nM、約80nM又は約90nMである膜結合ヒトFAM19A5に結合する。

【0159】

本開示内容の抗FAM19A5抗体は、神経膠症の発病を遅延又は阻害、例えば、外傷、脳脊髄損傷、脳腫瘍、感染、虚血、脳卒中、反応及び/又は神経退行性疾患による傷害又は損傷による中枢神経系(CNS、例えば、脳及び/又は脊髄)において膠細胞の非特異的反応性変化の始まり又は開始を遅延、減速又は阻害できる。

【0160】

本開示内容の抗FAM19A5抗体は、反応性星状細胞の過剰又は異常増殖及びこれに関連したCNSの有害な効果を遅延、阻害、減速、抑制、制限又は予防できる。例えば、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、例えば、CNS損傷、外傷、傷害、脳脊髄損傷、脳腫瘍、感染、虚血、脳卒中、反応及び/又は神経退行性疾患から神経細胞の破壊による星状細胞数の異常増加を阻害又は予防し、CNSにおいて傷痕形成を阻害又は予防し、神経毒性レベルの活性酸素種の放出又は潜在的に興奮毒性であるグルタメートの放出を阻害又は減少させ、CNS損傷後発作、疼痛及び/又は2次変性を減少又は阻害させることが

できる。本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、好ましくは、C N S 傷害又は損傷後に神経細胞及び / 又は軸索の再成長を促進、刺激、増加又は活性化させることができる。

【 0 1 6 1 】

本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、タンパク質コア及びコンドロイチン硫酸で構成されたプロテオグリカン (C S G P)、例えば、アグレカン (C S P G 1)、パーシカン (C S P G 2)、ニューロカン (C S P G 3)、C S P G 4 (又は、神経細胞膠抗原 2 (N G 2))、C S P G 5、S M C 3 (C S P G 6、染色体 3 の構造維持)、プレビカン (C S P G 7)、C D 4 4 (C S P G 8、分化クラスター 4 4) 及びホスファカンニューロカン (C S P G 3) の発現を阻害できる。一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、ニューロカン及び / 又は N G 2 のレベル、又はニューロカン及び / 又は N G 2 の活性を阻害、減少又は低下させる。

10

【 0 1 6 2 】

本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、神経細胞の核において c - f o s 及び p E R K の発現を増加させ得るところ、例えば、c - f o s 及び p E R K の m R N A、タンパク質及び / 又はタンパク質活性を増加させることができる。本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体はまた、G A P 4 3 m R N A、G A P 4 3 タンパク質の発現レベルを増加又は増進させたり、或いは G A P 4 3 タンパク質活性を増加又は増進させることができる。

【 0 1 6 3 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み、前記重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、配列番号 5、6 及び 7 に示したアミノ酸配列を含み、前記配列のそれぞれは、場合によって 1 個、2 個、3 個、4 個又は 5 個の突然変異を含む前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、配列番号 8、9 及び 1 0 に示したアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の少なくとも一つは、1 個、2 個、3 個、4 個又は 5 個の突然変異を含み、前記抗体は、配列番号 1 1 に示した V H 及び配列番号 1 2 に示した V L を含む基準抗体に比べて、ヒトにおいて減少した免疫原性を有する。

20

【 0 1 6 4 】

一部の具現例において、前記抗体に含まれる突然変異は、置換、欠失及び / 又は挿入である。一具現例において、前記突然変異は、置換、例えば保存的置換である。本明細書で使われる “ 保存的置換 ” (保存的代替ともいう。) は、所定のアミノ酸を類似の生化学的特性 (例えば、電荷、疎水性及びサイズ) を持つ他のアミノ酸に変化させるアミノ酸代替を意味する。アミノ酸を分類する方法は、多くの方法があるが、これらはその構造及びその R 基の一般の化学的特性に基づいて 6 個の主要群に分類される場合が多い。

30

【 0 1 6 5 】

【 表 2 】

表 2 アミノ酸類型

類型	アミノ酸
脂肪族	グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン
ヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有	セリン、システイン、セレノシステイン、トレオニン、メチオニン
環形	プロリン
芳香族	フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン
塩基性	ヒスチジン、リシン、アルギニン
酸性及びそれらのアミド	アスパルテート、グルタメート、アスパラギン、グルタミン

40

【 0 1 6 6 】

逆に、ラジカル代替又はラジカル置換は、初期アミノ酸を、異なる物理化学的特性を持

50

つ最終アミノ酸に交換するアミノ酸代替である。特定の具現例において、前記 F A M 1 9 A 5 抗体において、アミノ酸突然変異はラジカル置換である。他の具現例において、前記 F A M 1 9 A 5 抗体において、アミノ酸突然変異は保存的置換及びラジカル置換の組合せである。

【 0 1 6 7 】

一部の具現例において、前記重鎖 C D R 3 は、配列番号 7 に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記重鎖 C D R 3 は、1 個、2 個又は 3 個の突然変異を持つ、配列番号 7 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 1 6 8 】

一部の具現例において、前記重鎖 C D R 1 は、場合によって、1 個又は 2 個の突然変異を持つ、配列番号 5 に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号 5 のアミノ酸 3 においてトレオニンの酸性アミノ酸への置換を含む。他の具現例において、前記突然変異は、配列番号 5 のアミノ酸 5 においてセリンの酸性アミノ酸への置換を含む。一部の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含む。

10

【 0 1 6 9 】

一部の具現例において、前記重鎖 C D R 2 は、場合によって、1 個、2 個、3 個、4 個又は 5 個の突然変異を持つ、配列番号 6 に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号 6 のアミノ酸 1 6 においてアルギニンの塩基性アミノ酸への置換を含む。一部の具現例において、前記塩基性アミノ酸は、リシンを含む。一部の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：

20

- (a) 配列番号 6 のアミノ酸 6 においてグリシンの酸性アミノ酸への置換；
- (b) 配列番号 6 のアミノ酸 7 においてセリンの酸性アミノ酸への置換；
- (c) 配列番号 6 のアミノ酸 8 においてセリンの酸性アミノ酸への置換；
- (d) 配列番号 6 のアミノ酸 9 においてトレオニンの酸性アミノ酸への置換；及び
- (e) 配列番号 6 のアミノ酸 1 6 においてアルギニンの塩基性アミノ酸への置換。

【 0 1 7 0 】

特定の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含む。一部の具現例において、前記塩基性アミノ酸は、リシンを含む。

【 0 1 7 1 】

一部の具現例において、前記軽鎖 C D R 3 は、場合によって、1、2、3、4 又は 5 個の突然変異を持つ、配列番号 1 0 に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：

30

- (a) 配列番号 1 0 のアミノ酸 6 においてセリンの酸性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸への置換；
- (b) 配列番号 1 0 のアミノ酸 7 においてアスパラギンの酸性アミノ酸又はヒドロキシル又は硫黄 / セレニウム含有アミノ酸への置換；
- (c) 配列番号 1 0 のアミノ酸 8 においてグリシンの酸性アミノ酸又はヒドロキシル又は硫黄 / セレニウム含有アミノ酸への置換；
- (d) 配列番号 1 0 のアミノ酸 9 においてグリシンの酸性アミノ酸又はヒドロキシル又は硫黄 / セレニウム含有アミノ酸への置換；及び
- (e) 配列番号 1 0 のアミノ酸 1 0 においてイソロイシンの塩基性アミノ酸への置換。

40

【 0 1 7 2 】

一部の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含む。特定の具現例において、前記ヒドロキシル又は硫黄 / セレニウム含有アミノ酸は、セリンを含む。他の具現例において、前記塩基性アミノ酸は、ヒスチジンを含む。

【 0 1 7 3 】

一部の具現例において、前記軽鎖 C D R 1 は、1 個、2 個、3 個又は 4 個の突然変異を持つ、配列番号 8 に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：

50

- (a) 配列番号 8 のアミノ酸 6 においてチロシンの酸性アミノ酸への置換；
- (b) 配列番号 8 のアミノ酸 7 においてアルギニンの酸性アミノ酸への置換；
- (c) 配列番号 8 のアミノ酸 8 においてグリシンの酸性アミノ酸への置換；及び
- (d) 配列番号 8 のアミノ酸 9 においてセリンの酸性アミノ酸への置換。

【 0 1 7 4 】

一部の具現例において、前記酸性アミノ酸は、グルタミン酸又はグルタミンを含む。

【 0 1 7 5 】

一部の具現例において、前記軽鎖 C D R 2 は、1 個、2 個、3 個又は 4 個の突然変異を持つ、配列番号 9 に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：

10

- (a) 配列番号 9 のアミノ酸 1 においてグルタミン酸の酸性アミノ酸への置換；
- (b) 配列番号 9 のアミノ酸 2 においてセリンの酸性アミノ酸への置換；
- (c) 配列番号 9 のアミノ酸 3 においてアスパラギンの酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸への置換；及び
- (d) 配列番号 9 のアミノ酸 4 においてリシンの酸性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸への置換。

【 0 1 7 6 】

一部の具現例において、前記酸性アミノ酸は、グルタミン、アスパラギン、アスパラギン酸又はグルタミン酸を含む。特定の具現例において、前記塩基性アミノ酸は、ヒスチジンを含む。他の具現例において、前記脂肪族アミノ酸は、ロイシンを含む。

20

【 0 1 7 7 】

一部の具現例において、前記突然変異は、配列番号 9 のアミノ酸 2 においてセリンの酸性アミノ酸への置換を含む。特定の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパルテート、グルタメート、アスパラギン、グルタミン又はこれらの組合せを含む。他の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギンである。

【 0 1 7 8 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み：(i) 前記重鎖 C D R 1 は、配列番号 5 に示したアミノ酸配列を含み；(i i) 前記重鎖 C D R 2 は、配列番号 1 3 に示したアミノ酸配列を含み；(i i i) 前記重鎖 C D R 3 は、配列番号 7 に示したアミノ酸配列を含み；(i v) 前記軽鎖 C D R 1 は、配列番号 8 に示したアミノ酸配列を含み；(v) 前記軽鎖 C D R 2 は、配列番号 2 0 に示したアミノ酸配列を含み；(v i) 前記軽鎖 C D R 3 は、配列番号 1 0 に示したアミノ酸配列を含む。

30

【 0 1 7 9 】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み：(i) 前記重鎖 C D R 1 は、配列番号 1 4 に示したアミノ酸配列を含み；(i i) 前記重鎖 C D R 2 は、配列番号 1 5 に示したアミノ酸配列を含み；(i i i) 前記重鎖 C D R 3 は、配列番号 7 に示したアミノ酸配列を含み；(i v) 前記軽鎖 C D R 1 は、配列番号 2 1 に示したアミノ酸配列を含み；(v) 前記軽鎖 C D R 2 は、配列番号 2 2 に示したアミノ酸配列を含み；(v i) 前記軽鎖 C D R 3 は、配列番号 2 3 に示したアミノ酸配列を含む。

40

【 0 1 8 0 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み：(i) 前記重鎖 C D R 1 は、配列番号 1 4 に示したアミノ酸配列を含み；(i i) 前記重鎖 C D R 2 は、配列番号 1 5 に示したアミノ酸配列を含み；(i i i) 前記重鎖 C D R 3 は、配列番号 7 に示したアミノ酸配列を含み；(i v) 前記軽鎖 C D R 1 は、配列番号 2 1 に示したアミノ酸配列を含み；(v) 前記軽鎖 C D R 2 は、配列番号 2 4 に示したアミノ酸配列を含み；(v i) 前記軽鎖 C D R 3 は、配列番号 2 3 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 1 8 1 】

50

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み：(i)前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；(ii)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(iii)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(iv)前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号25に示したアミノ酸配列を含み；(vi)前記軽鎖CDR3は、配列番号23に示したアミノ酸配列を含む。

【0182】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み：(i)前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；(ii)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(iii)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(iv)前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号24に示したアミノ酸配列を含み；(vi)前記軽鎖CDR3は、配列番号23に示したアミノ酸配列を含む。

10

【0183】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み：(i)前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；(ii)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(iii)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(iv)前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号26に示したアミノ酸配列を含み；(vi)前記軽鎖CDR3は、配列番号27に示したアミノ酸配列を含む。

20

【0184】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み：(i)前記重鎖CDR1は、配列番号14に示したアミノ酸配列を含み；(ii)前記重鎖CDR2は、配列番号15に示したアミノ酸配列を含み；(iii)前記重鎖CDR3は、配列番号7に示したアミノ酸配列を含み；(iv)前記軽鎖CDR1は、配列番号8に示したアミノ酸配列を含み；(v)前記軽鎖CDR2は、配列番号28に示したアミノ酸配列を含み；(vi)前記軽鎖CDR3は、配列番号29に示したアミノ酸配列を含む。

30

【0185】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、ヒト化される。他の具現例において、前記ヒト化抗FAM19A5は、ヒト抗体のフレームワーク領域を含む。特定の具現例において、抗FAM19A5抗体は、フレームワーク領域（すなわち、VHのFR1、FR2、FR3及びFR4及び/又はVLのFR1、FR2、FR3及びFR4）内の一つ以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7個以上の）突然変異を含む。

【0186】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、VHのFR1内に突然変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号11の残基19においてアミノ酸置換（例えば、セリンの塩基性アミノ酸、例えばアルギニンへの置換）及び/又は残基21においてアミノ酸置換（例えば、パリンのヒドロキシル又は硫黄/セレニウム含有アミノ酸、例えばセリンへの置換）を含む。

40

【0187】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は、VHのFR2内に突然変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号11の残基49においてアミノ酸置換（例えば、アラニンのヒドロキシル又は硫黄/セレニウム含有アミノ酸、例えばセリンへの置換）を含む。

【0188】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、VHのFR3内に突然

50

変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号 11 の残基 79 においてアミノ酸置換（例えば、パリンの脂肪族アミノ酸、例えばロイシンへの置換）、残基 80 においてアミノ酸置換（例えば、アルギニンの芳香族アミノ酸、例えばチロシンへの置換）、残基 83 においてアミノ酸置換（例えば、ロイシンのヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸、例えばメチオニンへの置換）、残基 85 においてアミノ酸置換（例えば、アスパラギンのヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸、例えばセリンへの置換）、残基 86 においてアミノ酸置換（例えば、プロリンの脂肪族アミノ酸、例えばロイシンへの置換）及び/又は残基 87 においてアミノ酸置換（例えば、グリシンの塩基性アミノ酸、例えばアルギニンへの置換）を含む。

【0189】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V L の F R 2 内に突然変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号 12 のアミノ酸残基 39 の欠失を含む。

【0190】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V L の F R 3 内に突然変異を含む。一部の具現例において、前記突然変異は、配列番号 12 の残基 81 においてアミノ酸置換（例えば、アスパラギン酸の脂肪族アミノ酸、例えばグリシンへの置換）及び/又は残基 85 においてアミノ酸置換（例えば、イソロイシンの酸性アミノ酸、例えばアスパラギン酸への置換）を含む。

【0191】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖可変領域（V H）及び軽鎖可変領域（V L）を含み、前記 V H は、配列番号 11 に示したアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 又は約 100% 同ジアミノ酸配列を含み、及び/又は前記 V L は、配列番号 12 に示したアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 又は約 100% 同ジアミノ酸配列を含み、前記抗体は、配列番号 11 に示した V H 及び配列番号 12 に示した V L を含む基準抗体に比べて減少した免疫原性を有する。

【0192】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖可変領域（V H）及び軽鎖可変領域（V L）を含む基準抗体と交差競合し、

（a）前記 V H は、配列番号 33 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 38 に示したアミノ酸配列を含むか；

（b）前記 V H は、配列番号 34 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 39 に示したアミノ酸配列を含むか；

（c）前記 V H は、配列番号 34 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 41 に示したアミノ酸配列を含むか；

（d）前記 V H は、配列番号 34 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 40 に示したアミノ酸配列を含むか；

（e）前記 V H は、配列番号 34 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 42 に示したアミノ酸配列を含むか；

（f）前記 V H は、配列番号 34 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 43 に示したアミノ酸配列を含むか；又は

（g）前記 V H は、配列番号 34 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 44 に示したアミノ酸配列を含む。

【0193】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖可変領域（V H）及び軽鎖可変領域（V L）を含む基準抗体と同じヒト F A M 1 9 A 5 エピトープに結合し；

（a）前記 V H は、配列番号 33 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号

10

20

30

40

50

38に示したアミノ酸配列を含むか；

(b)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号39に示したアミノ酸配列を含むか；

(c)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号41に示したアミノ酸配列を含むか；

(d)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号40に示したアミノ酸配列を含むか；

(e)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号42に示したアミノ酸配列を含むか；

(f)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号43に示したアミノ酸配列を含むか；又は

(g)前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号44に示したアミノ酸配列を含む。

【0194】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3並びに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、前記重鎖CDR1、CDR2及びCDR3はそれぞれ、配列番号16、17及び18に示したアミノ酸配列を含み、前記配列のそれぞれは、場合によって1個、2個又は3個の突然変異を含み、前記軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3はそれぞれ、配列番号30、31及び32に示したアミノ酸配列を含み、前記軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3の少なくとも一つは、1個、2個又は3個の突然変異を含み、前記抗体は、配列番号35に示したVH及び配列番号45に示したVLを含む基準抗体に比べて、ヒトにおいて減少した免疫原性及び/又はヒトFAM19A5タンパク質に対するより高い結合親和度を有する。

【0195】

一部の具現例において、前記重鎖CDR3は、配列番号18に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記重鎖CDR3は、場合によって、一つ又は2個の突然変異を持つ、配列番号18に示したアミノ酸配列を含む。一部の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：(a)配列番号18のアミノ酸2においてトレオニンのヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸への置換；及び(b)配列番号18のアミノ酸4においてグルタミン酸の脂肪族アミノ酸への置換。特定の具現例において、前記ヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸は、セリンを含む。一部の具現例において、前記脂肪族アミノ酸は、バリンを含む。一部の具現例において、前記突然変異は、次のいずれか一つ以上を含む：(a)配列番号18のアミノ酸2においてトレオニンの酸性アミノ酸への置換；及び(b)配列番号18のアミノ酸4においてグルタミン酸の脂肪族アミノ酸への置換。特定の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギンを含む。特定の具現例において、前記脂肪族アミノ酸は、アラニンを含む。

【0196】

一部の具現例において、前記重鎖CDR1は、配列番号16に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記重鎖CDR1は、場合によって、一つの突然変異を持つ、配列番号16に示したアミノ酸配列を含む。一部の具現例において、前記突然変異は、配列番号16のアミノ酸3においてトレオニンの酸性アミノ酸への置換を含む。特定の具現例において、前記酸性アミノ酸は、アスパラギン酸を含む。

【0197】

一部の具現例において、前記重鎖CDR2は、配列番号17に示したアミノ酸配列を含む。

【0198】

一部の具現例において、前記軽鎖CDR3は、配列番号32に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記軽鎖CDR2は、配列番号31に示したアミノ酸配列を含む。一部の具現例において、前記軽鎖CDR2は、1個、2個又は3個の突然変異を持つ、配列番号31に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 1 9 9 】

他の具現例において、前記軽鎖 C D R 1 は、場合によって、一つの突然変異を持つ、配列番号 3 0 に示したアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号 3 0 のアミノ酸 4 においてセリンの脂肪族アミノ酸への置換を含む。一部の具現例において、前記脂肪族アミノ酸は、バリンを含む。

【 0 2 0 0 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み：(i) 前記重鎖 C D R 1 は、配列番号 1 6 に示したアミノ酸配列を含み；(i i) 前記重鎖 C D R 2 は、配列番号 1 7 に示したアミノ酸配列を含み；(i i i) 前記重鎖 C D R 3 は、配列番号 1 8 に示したアミノ酸配列を含み；(i v) 前記軽鎖 C D R 1 は、配列番号 8 0 に示したアミノ酸配列を含み；(v) 前記軽鎖 C D R 2 は、配列番号 3 1 に示したアミノ酸配列を含み；(v i) 前記軽鎖 C D R 3 は、配列番号 3 2 に示したアミノ酸配列を含む。

10

【 0 2 0 1 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み：(i) 前記重鎖 C D R 1 は、配列番号 1 9 に示したアミノ酸配列を含み；(i i) 前記重鎖 C D R 2 は、配列番号 1 7 に示したアミノ酸配列を含み；(i i i) 前記重鎖 C D R 3 は、配列番号 1 8 に示したアミノ酸配列を含み；(i v) 前記軽鎖 C D R 1 は、配列番号 8 0 に示したアミノ酸配列を含み；(v) 前記軽鎖 C D R 2 は、配列番号 3 1 に示したアミノ酸配列を含み；(v i) 前記軽鎖 C D R 3 は、配列番号 3 2 に示したアミノ酸配列を含む。

20

【 0 2 0 2 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み：(i) 前記重鎖 C D R 1 は、配列番号 1 9 に示したアミノ酸配列を含み；(i i) 前記重鎖 C D R 2 は、配列番号 1 7 に示したアミノ酸配列を含み；(i i i) 前記重鎖 C D R 3 は、配列番号 1 2 8 に示したアミノ酸配列を含み；(i v) 前記軽鎖 C D R 1 は、配列番号 8 0 に示したアミノ酸配列を含み；(v) 前記軽鎖 C D R 2 は、配列番号 3 1 に示したアミノ酸配列を含み；(v i) 前記軽鎖 C D R 3 は、配列番号 3 2 に示したアミノ酸配列を含む。

30

【 0 2 0 3 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み：(i) 前記重鎖 C D R 1 は、配列番号 1 9 に示したアミノ酸配列を含み；(i i) 前記重鎖 C D R 2 は、配列番号 1 7 に示したアミノ酸配列を含み；(i i i) 前記重鎖 C D R 3 は、配列番号 1 2 9 に示したアミノ酸配列を含み；(i v) 前記軽鎖 C D R 1 は、配列番号 8 0 に示したアミノ酸配列を含み；(v) 前記軽鎖 C D R 2 は、配列番号 3 1 に示したアミノ酸配列を含み；(v i) 前記軽鎖 C D R 3 は、配列番号 3 2 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 2 0 4 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、ヒト化される。他の具現例において、前記ヒト化抗 F A M 1 9 A 5 は、ヒト抗体のフレームワーク領域を含む。特定の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、前記抗体のフレームワーク領域（すなわち、V H の F R 1、F R 2、F R 3 及び F R 4 及び / 又は V L の F R 1、F R 2、F R 3 及び F R 4）内に一つ以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7 個以上の）突然変異を含む。

40

【 0 2 0 5 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V H の F R 1 内に突然変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号 3 5 の残基 1 9 においてアミノ酸置換（例えば、セリンの塩基性アミノ酸、例えばアルギニンへの置換）、残基 2 1 においてアミノ酸置換（例えば、バリンのヒドロキシル又は硫黄 / セレニウム含有アミノ酸、例えばセリンへの置換）及び / 又は残基 2 3 においてアミノ酸置換（例えば、

50

リシンのヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸、例えばセリンへの置換)を含む。

【0206】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、VHのFR2内に突然変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号35の残基40においてアミノ酸置換(例えば、チロシンの脂肪族アミノ酸、例えばアラニンへの置換)及び/又は残基49においてアミノ酸置換(例えば、アラニンのヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸、例えばセリンへの置換)を含む。

【0207】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、VHのFR3内に突然変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号35の残基79においてアミノ酸置換(例えば、バリンの脂肪族アミノ酸、例えばロイシンへの置換)、残基80においてアミノ酸置換(例えば、アルギニンの芳香族アミノ酸、例えばチロシンへの置換)、残基83においてアミノ酸置換(例えば、ロイシンのヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸、例えばメチオニンへの置換)及び/又は残基85においてアミノ酸置換(例えば、アスパラギンのヒドロキシル又は硫黄/セレンウム含有アミノ酸、例えばセリンへの置換)を含む。

10

【0208】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、VLのFR1内に突然変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号45の残基16においてアミノ酸置換(例えば、バリンの脂肪族アミノ酸、例えばアラニンへの置換)を含む。

20

【0209】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、VLのFR2内に突然変異を含む。特定の具現例において、前記突然変異は、配列番号45のアミノ酸残基34の欠失を含む。

【0210】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は、VLのFR3内に突然変異を含む。一部の具現例において、前記突然変異は、配列番号45の残基76においてアミノ酸置換(例えば、アスパラギン酸の酸性アミノ酸、例えばグルタミン酸への置換)、残基80においてアミノ酸置換(例えば、バリンの酸性アミノ酸、例えばアスパラギン酸への置換)及び/又は残基82においてアミノ酸置換(例えば、フェニルアラニンの芳香族アミノ酸、例えばチロシンへの置換)を含む。

30

【0211】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含み、前記VHは、配列番号35に示したアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%同じアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VHは、配列番号45に示したアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%同じアミノ酸配列を含む。

40

【0212】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含む基準抗体と交差競合し、(i)前記VHは、配列番号36に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含むか；(ii)前記VHは、配列番号37に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含むか；(iii)前記VHは、配列番号130に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含むか；又は(iv)前記VHは、配列番号131に示したアミノ酸配列を含み、前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む。

50

【 0 2 1 3 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む基準抗体と同じヒト F A M 1 9 A 5 エピトープに結合し、(i) 前記 V H は、配列番号 3 6 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含むか；(i i) 前記 V H は、配列番号 3 7 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含むか；(i i i) 前記 V H は、配列番号 1 3 0 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含むか；又は(i v) 前記 V H は、配列番号 1 3 1 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 2 1 4 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、基準抗体 (例えば、3 - 2 又は 2 - 1 3 抗体) とヒト F A M 1 9 A 5 エピトープに対する結合に対して交差競合する (又は、結合を阻害する) 。

【 0 2 1 5 】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、ヒト F A M 1 9 A 5 に対するこのような基準抗体 (例えば、3 - 2 又は 2 - 1 3 抗体) の結合を、少なくとも約 1 0 % 、少なくとも約 2 0 % 、少なくとも約 3 0 % 、少なくとも約 4 0 % 、少なくとも約 5 0 % 、少なくとも約 6 0 % 、少なくとも約 7 0 % 、少なくとも約 8 0 % 、少なくとも約 9 0 % 又は少なくとも約 1 0 0 % 阻害する。競合抗体は、同一エピトープ、重複エピトープ又は隣接エピトープに結合する (例えば、立体障害によって立証される) 。 2 個の抗体が標的に対する結合のために互いに競合するか否かは、R I A 及び E I A のような当業界に公知の競合実験を用いて決定できる。

【 0 2 1 6 】

2 個の抗体が同一のエピトープに結合するか否かを決定するための技術は、例えば、エピトープの原子分解能を提供する抗原：抗体複合体の結晶の x 線分析及び水素 / 重水素交換質量分光分析 (H D X - M S) のようなエピトープマッピング方法、抗原配列内アミノ酸残基の変形による結合損失を一般にエピトープ成分の表示として見なす抗原断片又は抗原の突然変異された変異体に対する抗体の結合をモニタリングする方法、エピトープマッピングのためのコンビナトリアル計算法を含む。

【 0 2 1 7 】

本明細書に開示の方法に有用な抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、例えば、ヒト F A M 1 9 A 5 の断片に対する抗体の結合によって決定されたように、成熟したヒト F A M 1 9 A 5 の少なくとも一つのエピトープに結合し得る。一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、T L D R D S S Q P R R T I A R Q T A R C (配列番号 9 0 又は配列番号 2 のアミノ酸残基 4 2 ~ 6 1) のアミノ酸配列を持つ少なくとも一つのエピトープに結合したり又は、配列番号 9 0 のアミノ酸配列内位置している断片、例えば配列番号 9 0 の少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 又は 2 0 個のアミノ酸を持つエピトープに結合する。一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、配列番号 2 のアミノ酸残基 4 4 ~ 5 2 (すなわち、D R D S S Q P R R) 、例えばアミノ酸残基 4 5 、 4 6 、 5 0 、 5 1 及び 5 2 (すなわち、R D - - - P R R) 、例えばアミノ酸残基 4 5 、 5 0 、 5 1 及び 5 2 (すなわち、R - - - - P R R) 、アミノ酸残基 4 5 、 5 0 及び 5 1 (すなわち、R - - - - P R) に該当する一つ以上のアミノ酸に結合する。

【 0 2 1 8 】

一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、T A R C A C R K G Q I A G T T R A R P A (配列番号 9 1 又は、配列番号 2 のアミノ酸残基 5 8 ~ 7 7) のアミノ酸配列を持つ少なくとも一つのエピトープに結合したり、又は配列番号 9 1 のアミノ酸配列内位置している断片、例えば配列番号 9 1 の少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 又は 2 0 個のアミノ酸を持つエピトープに結合する。一部の具現例において、抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、配列番号

10

20

30

40

50

2のアミノ酸残基63~75(すなわち、CRKGQIAGTTRAR)に該当する一つ以上のアミノ酸において結合する。一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、ARPACVDARIITKQWCDML(配列番号92又は配列番号2のアミノ酸残基74~93)のアミノ酸配列を持つ一つ以上のエピトープに結合したり、又は配列番号92のアミノ酸配列内に位置している断片、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のアミノ酸を持つエピトープに結合する。一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、配列番号2のアミノ酸残基76~89(すなわち、PACVDARIITKQW)に該当する一つ以上のアミノ酸において結合する。

【0219】

10

一部の具現例において、前記少なくとも一つのエピトープは、配列番号90、91又は92と少なくとも90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%同じアミノ酸配列を有する。

【0220】

一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体又はその抗原結合部分は、配列番号89、90、91、92、93又は94であるヒトFAM19A5エピトープ、又は配列番号89、90、91、92、93又は94のアミノ酸配列内に位置している断片、例えば、配列番号89、90、91、92、93又は94の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のアミノ酸を持つエピトープにのみ結合する。

20

【0221】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、配列番号90又は天然立体形態(すなわち、未変性)のその断片に結合する。一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体又はその抗原結合部分は、グリコシル化及び非グリコシル化したヒトFAM19A5の両方に結合する。

【0222】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、一つ以上の追加FAM19A5エピトープに結合する。一部の具現例において、前記一つ以上の追加FAM19A5エピトープは、QLAAGTCEIVTLDR(配列番号89、エピトープF1)、TLDRDS S Q P R R T I A R Q T A R C(配列番号90、エピトープF2)、T A R C A C R K G Q I A G T T R A R P A(配列番号91、エピトープF3)、A R P A C V D A R I I K T K Q W C D M L(配列番号92、エピトープF4)、C D M L P C L E G E G C D L L I N R S G(配列番号93、エピトープF5)又はN R S G W T C T Q P G G R I K T T T V S(配列番号94、エピトープF6)。或いは、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93又は配列番号94のアミノ酸配列内に位置している断片、又はこれらの任意の組合せから選択される。配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93又は配列番号94のアミノ酸配列内に位置している断片は、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93又は配列番号94のうち一部の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個アミノ酸を持つ断片を含む。一部の具現例において、前記一つ以上の追加FAM19A5エピトープは、配列番号89、90、91、92、93又は94、又は配列番号89、90、91、92、93又は94のアミノ酸配列内に位置している断片、例えば、配列番号89、90、91、92、93又は94の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のアミノ酸配列を持つ断片、又はこれらの組合せから選択される。一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体又はその抗原結合部分は、天然立体形態(すなわち、未変性)の前記一つ以上の追加エピトープのうち一部に結合する。一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体又はその抗原結合部分は、前記グリコシル化及び非グリコシル化した一つ以上の追加FAM19A5エピトー

30

40

50

ブの両方に結合する。

【0223】

一部の具現例において、本明細書は、例えば、免疫分析（例えば、ELISA）、表面プラズマ共鳴又は力学的排除分析によって測定したとき、FAM19Aファミリー内の他のタンパク質に比べて20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又はより高い親和度でFAM19A5（例えば、ヒトFAM19A5）に結合する抗体又はその抗原結合断片を提供する。特定の具現例において、前記抗FAM19A5抗体又はその抗原結合断片は、例えば免疫分析によって測定したとき、FAM19Aファミリー内の他のタンパク質との交差反応性無しでFAM19A5（例えば、ヒトFAM19A5）に結合する。

10

【0224】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、天然抗体でないか或いは自然発生抗体でない。例えば、一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、より多い、より少ない或いは異なる種類の翻訳後変形を有することによって、自然発生抗体とは異なる翻訳後変形を有する。

【0225】

本開示内容の例示的な抗体のVH及びVL CDRのアミノ酸配列がそれぞれ、表3及び4に提供されている。前記VH及びVLアミノ酸配列はそれぞれ、表5及び6に提供されている。

【0226】

20

30

40

50

【表 3】

表 3 可変重鎖 CDR アミノ酸配列 (IMG T を用いて同定する)

抗体	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
基準抗-FAM19A5 抗体("3-2")	GFTFSSFNMF (SEQ ID NO: 5)	QISSSGSSTNYAPAVRG (SEQ ID NO: 6)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 7)
1-7A-IT	GFTFSSFNMF (SEQ ID NO: 5)	QISSSGSSTNYAPAVKG (SEQ ID NO: 13)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 7)
Low-PI	GDFEFNMF (SEQ ID NO: 14)	QISSSEEDENYAPAVKG (SEQ ID NO: 15)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 7)
1-30	GDFEFNMF (SEQ ID NO: 14)	QISSSEEDENYAPAVKG (SEQ ID NO: 15)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 7)
1-17	GDFEFNMF (SEQ ID NO: 14)	QISSSEEDENYAPAVKG (SEQ ID NO: 15)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 7)
1-32	GDFEFNMF (SEQ ID NO: 14)	QISSSEEDENYAPAVKG (SEQ ID NO: 15)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 7)
4-11	GDFEFNMF (SEQ ID NO: 14)	QISSSEEDENYAPAVKG (SEQ ID NO: 15)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 7)
6-10	GDFEFNMF (SEQ ID NO: 14)	QISSSEEDENYAPAVKG (SEQ ID NO: 15)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 7)
基準抗-FAM19A5 抗体("2-13")	GFTFSSHGMF (SEQ ID NO: 16)	EITNDGSGTNYGSAVKG (SEQ ID NO: 17)	STYECPPGGFSCWGDTGQIDA (SEQ ID NO: 18)
2-13D	GFTFSSHGMF (SEQ ID NO: 16)	EITNDGSGTNYGSAVKG (SEQ ID NO: 17)	STYECPPGGFSCWGDTGQIDA (SEQ ID NO: 18)
2-13D-37	GDFFSSHGMF (SEQ ID NO: 19)	EITNDGSGTNYGSAVKG (SEQ ID NO: 17)	STYECPPGGFSCWGDTGQIDA (SEQ ID NO: 18)
2-13D-37- 1.5W-41	GDFFSSHGMF (SEQ ID NO: 19)	EITNDGSGTNYGSAVKG (SEQ ID NO: 17)	SSYVCPGGFSCWGDTGQIDA (SEQ ID NO: 128)
2-13D-37-3W- 16	GDFFSSHGMF (SEQ ID NO: 19)	EITNDGSGTNYGSAVKG (SEQ ID NO: 17)	SNYACPPGGFSCWGDTGQIDA (SEQ ID NO: 129)

10

20

30

40

【 0 2 2 7 】

50

【表 4】

表 4 可変軽鎖 CDR アミノ酸配列 (IMG T を用いて同定する)

抗体	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
基準抗-FAM19A5 抗体	SGGGSYAGSYYYG (SEQ ID NO: 8)	ESNKRPS (SEQ ID NO: 9)	GSWDSSNGGI (SEQ ID NO: 10)

("3-2")			
1-7A-IT	SGGGSYAGSYYYG (SEQ ID NO: 8)	ENNKRPS (SEQ ID NO: 20)	GSWDSSNGGI (SEQ ID NO: 10)
Low-PI	SGGGSEEEQYYYG (SEQ ID NO: 21)	EDEERPS (SEQ ID NO: 22)	GSWDESEDEDH (SEQ ID NO: 23)
1-30	SGGGSEEEQYYYG (SEQ ID NO: 21)	QDEERPS (SEQ ID NO: 24)	GSWDESEDEDH (SEQ ID NO: 23)
1-17	SGGGSYAGSYYYG (SEQ ID NO: 8)	EDEQRPS (SEQ ID NO: 25)	GSWDESEDEDH (SEQ ID NO: 23)
1-32	SGGGSYAGSYYYG (SEQ ID NO: 8)	QDEERPS (SEQ ID NO: 24)	GSWDESEDEDH (SEQ ID NO: 23)
4-11	SGGGSYAGSYYYG (SEQ ID NO: 8)	EDHERPS (SEQ ID NO: 26)	GSWDSSDEDH (SEQ ID NO: 27)
6-10	SGGGSYAGSYYYG (SEQ ID NO: 8)	QDLLRPS (SEQ ID NO: 28)	GSWDSLSSSH (SEQ ID NO: 29)
基準抗-FAM19A5 抗体 ("2-13")	SGGSYSYG (SEQ ID NO: 30)	WDDERPS (SEQ ID NO: 31)	GTEDISGTAGV (SEQ ID NO: 32)
2-13D	SGGVYSYG (SEQ ID NO: 80)	WDDERPS (SEQ ID NO: 31)	GTEDISGTAGV (SEQ ID NO: 32)
2-13D-37	SGGVYSYG (SEQ ID NO: 80)	WDDERPS (SEQ ID NO: 31)	GTEDISGTAGV (SEQ ID NO: 32)
2-13D-37- 1.5W-41	SGGVYSYG (SEQ ID NO: 80)	WDDERPS (SEQ ID NO: 31)	GTEDISGTAGV (SEQ ID NO: 32)
2-13D-37-3W- 16	SGGVYSYG (SEQ ID NO: 80)	WDDERPS (SEQ ID NO: 31)	GTEDISGTAGV (SEQ ID NO: 32)

10

20

30

40

【 0 2 2 8 】

50

【表 5】

表5 可変重鎖アミノ酸配列

抗体	VHアミノ酸配列 (配列番号)
基準抗-FAM19A5	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSFNMFWRQAPGKGLYVAQISSSGSSTNY APAVRGRATISRDNQSTVRLQLNNGAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGVSAGEIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 11)

抗体("3-2")		10
1-7A-IT	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFTFSSFNMFWRQAPGKGLYVSQISSSGSSTNY APAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGVSAGEIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 33)	
Low-PI	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFDFFESFNMFWRQAPGKGLYVSQISSSEEDENY APAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGVSAGEIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 34)	
1-30	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFDFFESFNMFWRQAPGKGLYVSQISSSEEDENY APAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGVSAGEIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 34)	
1-17	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFDFFESFNMFWRQAPGKGLYVSQISSSEEDENY APAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGVSAGEIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 34)	20
1-32	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFDFFESFNMFWRQAPGKGLYVSQISSSEEDENY APAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGVSAGEIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 34)	20
4-11	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFDFFESFNMFWRQAPGKGLYVSQISSSEEDENY APAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGVSAGEIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 34)	
6-10	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFDFFESFNMFWRQAPGKGLYVSQISSSEEDENY APAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGVSAGEIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 34)	
基準抗-FAM19A5 抗体("2-13")	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSHGMFWRQTPGKGLYVAEITNDGSGTNY GSAVKGRATISRDNQSTVRLQLNLSRAEDTGTYYFCARSTYECPPGFSCWGDGTGQIDAWG HGTEVIVSS (SEQ ID NO: 35)	30
2-13D	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCSASGFTFSSHGMFWRQAPGKGLYVSEITNDGSGTNY GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYFCARSTYECPPGFSCWGDGTGQIDAWG HGTEVIVSS (SEQ ID NO: 36)	
2-13D-37	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCSASGFDFFSSHGMFWRQAPGKGLYVSEITNDGSGTNY GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYFCARSTYECPPGFSCWGDGTGQIDAWG HGTEVIVSS (SEQ ID NO: 37)	
2-13D-37- 1.5W-41	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCSASGFDFFSSHGMFWRQAPGKGLYVSEITNDGSGTNY GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYFCARSSYVCPGGFSCWGDGTGQIDAWG HGTEVIVSS (SEQ ID NO: 130)	
2-13D-37- 3W-16	AVTLDESGGGLQTPGGALRLSCSASGFDFFSSHGMFWRQAPGKGLYVSEITNDGSGTNY GSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYFCARSNYACPPGFSCWGDGTGQIDAWG HGTEVIVSS (SEQ ID NO: 131)	40

【 0 2 2 9 】

【表 6】

表 6 可変軽鎖アミノ酸配列

抗体	VL アミノ酸配列 (配列番号)
基準抗-FAM19A5 抗体("3-2")	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKPGSAPVTLIYESNKRPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQADDEAIYYCGSWDSSNGGIFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 12)
1-7A-IT	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKPGSAPVTLIYENNKRPSDIPSR

10

	FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSSNGGIFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 38)
Low-PI	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGGSEEEQYYYGWYQQKPGSAPVTLIYEDEERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 39)
1-30	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGGSEEEQYYYGWYQQKPGSAPVTLIYQDEERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 40)
1-17	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKPGSAPVTLIYEDEQRPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 41)
1-32	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKPGSAPVTLIYQDEERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 42)
4-11	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKPGSAPVTLIYEDHERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSSDEDHFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 43)
6-10	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKPGSAPVTLIYQDLLRPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSLSSSHFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 44)
基準抗-FAM19A5 抗体("2-13")	ALTQPSSVSNPGETVKITCSGGSYSGWFQKSPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGA LSGSTNTLTITGVQADDEAVYFCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 45)
2-13D	ALTQPSSVSNPGETAKITCSGGVSYSGWFQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGAL SGSTNTLTITGVQAEDEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 46)
2-13D-37	ALTQPSSVSNPGETAKITCSGGVSYSGWFQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGAL SGSTNTLTITGVQAEDEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 46)
2-13D-37- 1.5W-41	ALTQPSSVSNPGETAKITCSGGVSYSGWFQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGAL SGSTNTLTITGVQAEDEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 46)
2-13D-37- 3W-16	ALTQPSSVSNPGETAKITCSGGVSYSGWFQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGAL SGSTNTLTITGVQAEDEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 46)

20

30

40

【0230】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域(VH)は、配列番号33の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域(VL)は、配列番号38の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、VH及びVLを含み、前記VHは、配列番号33に示したアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号38に示したアミノ酸配列を含む。

【0231】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域

50

を含み、前記重鎖可変領域（VH）は、配列番号34の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域（VL）は、配列番号39の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、VH及びVLを含み、前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号39に示したアミノ酸配列を含む。

【0232】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域（VH）は、配列番号34の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域（VL）は、配列番号41の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、VH及びVLを含み、前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号41に示したアミノ酸配列を含む。

10

【0233】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域（VH）は、配列番号34の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域（VL）は、配列番号40の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、VH及びVLを含み、前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号40に示したアミノ酸配列を含む。

【0234】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域（VH）は、配列番号34の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域（VL）は、配列番号42の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、VH及びVLを含み、前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号42に示したアミノ酸配列を含む。

20

【0235】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域（VH）は、配列番号34の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域（VL）は、配列番号43の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、VH及びVLを含み、前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号43に示したアミノ酸配列を含む。

30

【0236】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域（VH）は、配列番号34の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域（VL）は、配列番号44の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、VH及びVLを含み、前記VHは、配列番号34に示したアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号44に示したアミノ酸配列を含む。

40

【0237】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域（VH）は、配列番号36の重鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域（VL）は、配列番号46の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、VH及びVLを含み、前記VHは、配列番号36に示したアミノ酸配列を含み、及び/又は前記VLは、配列番号46に示したアミノ酸配列を含む。

【0238】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域（VH）は、配列番号37の重鎖CDR1、CDR2及びCD

50

R 3 を含み、及び / 又は前記軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 4 6 の軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含む。他の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V H 及び V L を含み、前記 V H は、配列番号 3 7 に示したアミノ酸配列を含み、及び / 又は前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 2 3 9 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域 (V H) は、配列番号 1 3 0 の重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み、及び / 又は前記軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 4 6 の軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含む。他の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V H 及び V L を含み、前記 V H は、配列番号 3 7 に示したアミノ酸配列を含み、及び / 又は前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含む。

10

【 0 2 4 0 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、重鎖及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域 (V H) は、配列番号 1 3 1 の重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含み、及び / 又は前記軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 4 6 の軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 を含む。他の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V H 及び V L を含み、前記 V H は、配列番号 3 7 に示したアミノ酸配列を含み、及び / 又は前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含む。

【 0 2 4 1 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V H 及び V L を含み、前記 V H は、配列番号 3 3、3 4、3 6、3 7、1 3 0 又は 1 3 1 に示したアミノ酸配列と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % 又は約 1 0 0 % 同ジアミノ酸配列を含む。

20

【 0 2 4 2 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V H 及び V L を含み、前記 V L は、配列番号 3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4 又は 4 6 に示したアミノ酸配列と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % 又は約 1 0 0 % 同ジアミノ酸配列を含む。

30

【 0 2 4 3 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、V H 及び V L を含み：
 (a) 前記 V H は、配列番号 3 3 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 3 8 に示したアミノ酸配列を含むか；
 (b) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 3 9 に示したアミノ酸配列を含むか；
 (c) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 1 に示したアミノ酸配列を含むか；
 (d) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 0 に示したアミノ酸配列を含むか；
 (e) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 2 に示したアミノ酸配列を含むか；
 (f) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 3 に示したアミノ酸配列を含むか；
 (g) 前記 V H は、配列番号 3 4 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 4 に示したアミノ酸配列を含むか；
 (h) 前記 V H は、配列番号 3 6 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含むか；
 (i) 前記 V H は、配列番号 3 7 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 4 6 に示したアミノ酸配列を含むか；

40

50

(j) 前記 V H は、配列番号 130 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 46 に示したアミノ酸配列を含むか；又は

(k) 前記 V H は、配列番号 131 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 46 に示したアミノ酸配列を含む。

【0244】

本明細書に記載の V H ドメイン又はその一つ以上の C D R は、重鎖、例えば全長 (full length) 重鎖を形成するための定常ドメインに連結され得る。類似に、本明細書に記載の V L ドメイン又はその一つ以上の C D R は、軽鎖、例えば全長軽鎖を形成するための定常ドメインに連結され得る。全長重鎖及び全長軽鎖は組み合わせて全長抗体を生成する。

【0245】

したがって、特定の具現例において、本明細書は、抗体軽鎖及び重鎖、例えば、別個の軽鎖及び重鎖を含む抗体を提供する。前記軽鎖と関連して、特定の具現例において、本明細書に記載の抗体の軽鎖は、カッパ (kappa) 軽鎖である。他の特定の具現例において、本明細書に記載の抗体の軽鎖は、ラムダ (lambda) 軽鎖である。さらに他の特定の具現例において、本明細書に記載の抗体の軽鎖は、ヒトカッパ軽鎖又はヒトラムダ軽鎖である。特定の具現例において、F A M 19 A 5 ポリペプチド (例えば、ヒト F A M 19 A 5) に特異的に結合する本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載された任意の V L 又は V L C D R アミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記軽鎖の定常領域は、ヒトカッパ軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。特定の具現例において、F A M 19 A 5 ポリペプチド (例えば、ヒト F A M 19 A 5) に特異的に結合する本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載された V L 又は V L C D R アミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記軽鎖の定常領域は、ヒトラムダ軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。ヒト定常領域配列の非制限的な例は、当業界に記載されている。例えば、米国特許番号 5,693,780 及び上の K a b a t E A e t a l, (1991) を参照されたい。

【0246】

前記重鎖と関連して一部の具現例において、本明細書に記載の抗体の重鎖は、アルファ ()、デルタ ()、エプシロン ()、ガンマ () 又はミュー (μ) 重鎖であり得る。他の特定の具現例において、記載された抗体の重鎖は、ヒトアルファ ()、デルタ ()、エプシロン ()、ガンマ () 又はミュー (μ) 重鎖を含むことができる。一部の具現例において、F A M 19 A 5 (例えば、ヒト F A M 19 A 5) に特異的に結合する本明細書に開示の抗体は、本明細書に記載された V H 又は V H C D R アミノ酸配列を含む重鎖を含み、前記重鎖の定常領域は、ヒトガンマ () 重鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。さらに他の具現例において、F A M 19 A 5 (例えば、ヒト F A M 19 A 5) に特異的に結合する本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載された V H 又は V H C D R アミノ酸配列を含む重鎖を含み、前記重鎖の定常領域は、本明細書に記載又は当業界に公知のヒト重鎖のアミノ酸を含む。ヒト定常領域配列の非制限的な例は、当業界に記載されている。例えば、米国特許番号 5,693,780 及び上の K a b a t E A e t a l, (1991) を参照されたい。

【0247】

一部の具現例において、F A M 19 A 5 (例えば、ヒト F A M 19 A 5) に特異的に結合する本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載された V H 又は V H C D R と V L 及び V L C D R を含む V L ドメイン及び V H ドメインを含み、前記定常領域は、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A 又は I g Y 免疫グロブリン分子又はヒト I g G、I g E、I g M、I g D、I g A 又は I g Y 免疫グロブリン分子の定常領域のアミノ酸配列を含む。他の特定の具現例において、F A M 19 A 5 (例えば、ヒト F A M 19 A 5) に特異的に結合する本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載された任意のアミノ酸配列を含む V L ドメイン及び V H ドメインを含み、前記定常領域は、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A 又は I g Y 免疫グロブリン分子、任意の亜型の免疫グロブリン分子 (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 及び I g A 2) の定常領域のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含む。一部の具現例において、前記定常領域は、亜型（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4）及び同種異因子型（例えば、G 1 m、G 2 m、G 3 m 及び n G 4 m）及びこれらの変種を含む天然ヒト I g G の定常領域のアミノ酸配列を含む。例えば、Vidarsson G. et al. Front Immunol. 5: 520 (2014年10月20日オンライン公開) 及び Jefferis R. and Lefranc MP, mAbs 1: 4, 1-7 (2009) を参照されたい。一部の具現例において、前記定常領域は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 又はこれらの変種の定常領域のアミノ酸配列を含む。

【0248】

特定の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、F c 効果器機能、
 10 例え、補体依存性細胞毒性 (C D C) 及び / 又は抗体依存性細胞性食菌作用 (A D C P) を持たない。効果器機能は、F c 領域によって媒介され、前記 F c 領域の C H 2 ドメインにおいてヒンジ領域に最も近接した残基は、先天性免疫系の効果器細胞上で C 1 q (補体) 及び I g G - F c 受容体 (F c R) に対して大きく重なる結合部位を含むので、抗体の効果器機能を担当する。また、I g G 2 及び I g G 4 抗体は、I g G 1 及び I g G 3 抗体よりも低いレベルの F c 効果器機能を有する。抗体の効果器機能は、(1) F c 領域が欠如している抗体断片（例えば、F a b、F (a b ')₂、単鎖 F v (s c F v) 又はモノマー V H 又は V L ドメインからなる s d A b のような) を用い; (2) 例え、糖が付着している残基を欠失又は変更することによって、糖を酵素的に除去することによって
 20 、グリコシル化阻害剤の存在の下に培養された細胞において抗体を生成することによって、又はタンパク質をグリコシル化できない細胞（例えば、バクテリア宿主細胞、例え、米国特許公開第 2 0 1 2 0 1 0 0 1 4 0 号参照）において抗体を発現させることによって、無糖化抗体を生成し; (3) 効果器機能が減少した I g G 亜型の F c 領域を用い（例え、I g G 2 及び I g G 4 抗体の F c 領域又は I g G 2 又は I g G 4 抗体の C H 2 ドメインを含むキメラ F c 領域、例え、米国特許公開第 2 0 1 2 0 1 0 0 1 4 0 号及び L a u C . et al. J. Immunol. 191: 4769 - 4777 (2013) 参照); 及び (4) F c 機能を減少させたり或いはなくす突然変異を持つ F c 領域を生成させることを含めて当業界に公知の異なる接近法によって減少又は回避され得る。例え、米国特許公開第 2 0 1 2 0 1 0 0 1 4 0 号及びそこに引用されている米国及び P C T 出願及び A n e t a l , m A b s 1 : 6 , 5 7 2 - 5 7 9 (2 0 0 9) を参照されたい。
 30

【0249】

これによって、一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、F a b、F a b '、F (a b ')₂、F v、単鎖 F v (s c F v) 又は単量体 V H 又は V L ドメインからなる s d A b である。このような抗体断片は当業界によく知られており、上に記載されている。

【0250】

一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、単鎖 F v である。例示的な抗 F A M 1 9 A 5 s c F v のアミノ酸配列が、下記表 7 に提供されている。

【0251】

40

50

【表 7】

表 7 抗FAM19A5 s c F v のアミノ酸配列

ScFv 抗体	VLアミノ酸配列(配列番号)
基準抗-FAM19A5 抗体("3-2")	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYESNKRPSDIPSR RFGSTSGSTATLTITGVQADDEAIYYCGSWDSSNGGIFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSS SGGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSFNMFWVRQAPGKLEYVAQISSS GSSTNYAPAVRGRATISRDNQSTVRLQLNNPGAEDTGTYYYCAKSSYDCPYGHCSSGVDS AGEIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 47)
1-7A-IT	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKPGSAPVTLIYENNKRPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSSNGGIFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSS GGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGFTFSSFNMFWVRQAPGKLEYVVSQISSG SSTNYAPAVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTGTYYYCAKSSYDCPYGHCSSGVDSA GEIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 48)
Low-PI	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSEEEQYYYGWYQQKPGSAPVTLIYEDEERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSS GGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGDFEFSSFNMFWVRQAPGKLEYVVSQISSSE EDENYAPAVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTGTYYYCAKSSYDCPYGHCSSGVDSA GEIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 49)
1-30	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSEEEQYYYGWYQQKPGSAPVTLIYQDEERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSS GGGGSAVTLDESGGGLQTPGGALRLSCKASGDFEFSSFNMFWVRQAPGKLEYVVSQISSSE EDENYAPAVKGRATISRDNQSTLYLQMNSLRAEDTGTYYYCAKSSYDCPYGHCSSGVDSA

10

20

【 0 2 5 2 】

30

40

50

	GEIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 50)
1-17	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQKPGSAPVTLIYEDERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSS GGGSAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESFNMFWVRQAPGKLEYVVSQISSSE EDENYAPAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGSDVSA GEIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 51)
1-32	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQKPGSAPVTLIYQDEERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSS GGGSAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESFNMFWVRQAPGKLEYVVSQISSSE EDENYAPAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGSDVSA GEIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 52)
4-11	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQKPGSAPVTLIYEDHERPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSEDEDHFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSS GGGSAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESFNMFWVRQAPGKLEYVVSQISSSE EDENYAPAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGSDVSA GEIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 53)
6-10	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQKPGSAPVTLIYQDLLRPSDIPSR FSGSTSGSTATLTITGVQAGDEADYYCGSWDSLSSSHFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSS GGGSAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESFNMFWVRQAPGKLEYVVSQISSSE EDENYAPAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYCAKSSYDCPYGHCSGSDVSA GEIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 54)
基準抗-FAM19A5 抗体("2-13")	ALTQPSSVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGA LSGSTNTLTITGVQADEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGG GSAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESSHGMFWVRQAPGKLEYVVAEITNDGSGT NYGSAVKGRATISRDNQSTVRLQLNLSRAEDTGTYYFCARSTYECPPGFCWGDGTGQIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 55)
2-13D	ALTQPSSVSANPGETAKITCSGGVSYGWYQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGAL SGSTNTLTITGVQAEDEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGG SAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESSHGMFWVRQAPGKLEYVSEITNDGSGTN YGSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYFCARSTYECPPGFCWGDGTGQIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 56)
2-13D-37	ALTQPSSVSANPGETAKITCSGGVSYGWYQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGAL SGSTNTLTITGVQAEDEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGG SAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESSHGMFWVRQAPGKLEYVSEITNDGSGTN YGSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYFCARSTYECPPGFCWGDGTGQIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 57)
2-13D-37- 1.5W-41	ALTQPSSVSANPGETAKITCSGGVSYGWYQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGAL SGSTNTLTITGVQAEDEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGG SAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESSHGMFWVRQAPGKLEYVSEITNDGSGTN YGSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYFCARSSVYCPGFCWGDGTGQIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 132)
2-13D-37- 3W-16	ALTQPSSVSANPGETAKITCSGGVSYGWYQKPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGAL SGSTNTLTITGVQAEDEADYYCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVLGQSSRSSGGGGSSGGGG SAVTLDES GGLQTPGGALRLSCKASGFDFESSHGMFWVRQAPGKLEYVSEITNDGSGTN YGSAVKGRATISRDNQSTLYLQMNLSRAEDTGTYYFCARSNYACPPGFCWGDGTGQIDA WGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 133)

10

20

30

40

50

【 0 2 5 3 】

一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、F c 効果器機能が減少したり或いは存在しない F c 領域を含む。一部の具現例において、前記定常領域は、ヒト I g G 2 又は I g G 4 の F c 領域のアミノ酸配列を含み、一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、I g G 2 / I g G 4 アイソ型を有する。一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、I g G 4 アイソ型の I g G 抗体の C H 2 ドメイン及び I g G 1 アイソ型の I g G 抗体の C H 3 ドメインを含むキメラ F c 領域、又は I g G 2 のヒンジ領域と I g G 4 の C H 2 領域を含むキメラ F c 領域、又は F c 効果器機能が減少したり或いは存在しない突然変異を持つ F c 領域を含む。F c 効果器機能が減少したり或いは存在しない F c 領域は、当業界に公知されたものを含む。例えば、L a u C . e t a l , J . I m m u n o l . 1 9 1 : 4 7 6 9 - 4 7 7 7 (2 0 1 3) ; A n e t a l , m A b s 1 : 6 , 5 7 2 - 5 7 9 (2 0 0 9) ; 及び米国特許公開番号 2 0 1 2 0 1 0 0 1 4 0 及びそこに引用されている米国特許及び公開公報及び P C T 公開公報を参照されたい。また、F c 効果器機能が減少したり或いは存在しない F c 領域は、当業者であ

れば容易に作ることができる。

【0254】

[I I I . 核酸分子]

本明細書に記載のさらに他の態様は、本明細書に記載の抗体のいずれか一つをコードする一つ以上の核酸分子に関する。前記核酸は、全細胞、細胞溶解物、又は部分的に精製されたり或いは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、他の細胞成分又は他の汚染物質、例えば他の細胞核酸（例えば、他の染色体DNA、例えば、自然で分離されたDNAに連結された染色体DNA）又はタンパク質からアルカリ/SDS処理、CsClバンディング（banding）、カラムクロマトグラフィー、制限酵素、アガロースゲル電気泳動及び当業界によく知られたその他の技術を含む標準技術によって精製される時、“分離” 10
されたり或いは“実質的に純粋になる”。F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照する。本明細書に記載の核酸は、例えば、DNA又はRNAであり、イントロン配列を含有しても含有しなくてもよい。特定の具現例において、前記核酸は、cDNA分子である。

【0255】

本明細書に記載の核酸は、標準分子生物学技術を用いて得ることができる。ハイブリドーマ（例えば、下にさらに記載されているように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有している遺伝子導入マウスから製造されたハイブリドーマ）によって発現した抗体の場合、ハイブリドーマによって製造された抗体の軽鎖及び重鎖をコードするcDNAは、標準PCR増幅又はcDNAクローニング技術によって得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから得た抗体の場合に（例えば、ファージディスプレイ技術を利用）、抗体をコードする核酸を前記ライブラリーから回収することができる。 20

【0256】

本明細書に記載の特定核酸分子は、本開示内容の様々な抗FAM19A5抗体のVH及びVL配列をコードするものである。これらの抗体のVH及びVL配列をコードする例示的なDNA配列がそれぞれ表8及び表9に示されている。

【0257】

30

40

50

【表 8】

表 8 可変重鎖ポリヌクレオチド配列

抗体	可変重鎖ポリヌクレオチド配列(配列番号)
基準抗-FAM19A5 抗体("3-2")	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTC GTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCTCGCAGATTAGCAGCAGTGGTAGTAGCACAACACTAC GCACCCGCGGTGAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGTAGG CTGCAGCTGAACAACCCCGGGGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATTGTAGTAGTGGTGTGATAGTGTGGTGTGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 58)
1-7A-IT	GCCGTGACGTTGGATGAATCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC AGCTGCAAGGCCTCTGGGTTACCTTCAGCAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCTCGCAGATTAGCAGCAGTGGTAGTAGCACAACACTAC GCACCCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATTGTAGTAGTGGTGTGATAGTGTGGTGTGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 59)
Low-PI	GCCGTGACGTTGGATGAATCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC AGCTGCAAGGCCTCTGGGTTACCTTCAGCAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCTCGCAGATTAGCAGCAGTGGTAGTAGCACAACACTAC GCACCCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATTGTAGTAGTGGTGTGATAGTGTGGTGTGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 60)
1-30	GCCGTGACGTTGGATGAATCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC AGCTGCAAGGCCTCTGGCTTTGATTTTGAAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCTCGCAGATTAGCAGCAGTGAAGAAGATGAAAACACTAC GCACCCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATTGTAGTAGTGGTGTGATAGTGTGGTGTGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 61)
1-17	GCCGTGACGTTGGATGAATCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC AGCTGCAAGGCCTCTGGCTTTGATTTTGAAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCTCGCAGATTAGCAGCAGTGAAGAAGATGAAAACACTAC GCACCCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATTGTAGTAGTGGTGTGATAGTGTGGTGTGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 62)
1-32	GCCGTGACGTTGGATGAATCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC AGCTGCAAGGCCTCTGGCTTTGATTTTGAAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCTCGCAGATTAGCAGCAGTGAAGAAGATGAAAACACTAC GCACCCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATTGTAGTAGTGGTGTGATAGTGTGGTGTGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 63)
4-11	GCCGTGACGTTGGATGAATCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC AGCTGCAAGGCCTCTGGCTTTGATTTTGAAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGCTGGAATACGTCTCGCAGATTAGCAGCAGTGAAGAAGATGAAAACACTAC GCACCCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATTGTAGTAGTGGTGTGATAGTGTGGTGTGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 64)

10

20

30

40

【 0 2 5 8 】

50

6-10	GCCGTGACGTTGGATGAATCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTC AGCTGCAAGGCCTCTGGCTTTGATTTTGAAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGTGGAATACGTCTCGCAGATTAGCAGCAGTGAAGAAGATGAAAACCTAC GCACCCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATTGTAGTAGTGGTGTGATAGTGCTGGTGAGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 65)
基準抗 -FAM19A5 抗体 ("2-13")	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTC GTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCACTTCAGCAGCCATGGCATGTTCTGGGTGCGACAGACG CCCGGCAAGGGGTGGAATATGTCTCGCTGAAATTACCAATGATGGTAGTGGCACAACCTAC GGGTGCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGG CTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTTCTGCGCCAGATCTACT TATGAATGTCCTGGTGGTTTTAGTTGTTGGGGTGATACTGGTCAAATAGACGCATGGGGC CACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 66)
2-13D	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTT AGCTGACAGCGCCTCCGGGTTCACTTCAGCAGCCATGGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGTGGAATATGTCTCGGAGATTACCAATGATGGTAGTGGCACAACCTAC GGGTGCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTTCTGCGCCAGATCTACT TATGAATGTCCTGGTGGTTTTAGTTGTTGGGGTGATACTGGTCAAATAGACGCATGGGGC CACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 67)
2-13D-37	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTT AGCTGACAGCGCCTCCGGGTTCACTTCAGCAGCCATGGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGTGGAATATGTCTCGGAGATTACCAATGATGGTAGTGGCACAACCTAC GGGTGCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTTCTGCGCCAGATCTACT TATGAATGTCCTGGTGGTTTTAGTTGTTGGGGTGATACTGGTCAAATAGACGCATGGGGC CACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 68)
2-13D-37-1.5W- 41	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTT AGCTGACAGCGCCTCCGGGTTCACTTCAGCAGCCATGGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGTGGAATATGTCTCGGAGATTACCAATGATGGTAGTGGCACAACCTAC GGGTGCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTTCTGCGCCAGATCTTCT TATGTTTGTCTGGTGGTTTTAGTTGTTGGGGTGATACTGGTCAAATAGACGCATGGGGC CACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 134)
2-13D-37-3W-16	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCCGCCTT AGCTGACAGCGCCTCCGGGTTCACTTCAGCAGCCATGGCATGTTCTGGGTGCGACAGGCG CCCGGCAAGGGGTGGAATATGTCTCGGAGATTACCAATGATGGTAGTGGCACAACCTAC GGGTGCGCGGTGAAAGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACACTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTTCTGCGCCAGATCTAAT TATGCTTGTCTGGTGGTTTTAGTTGTTGGGGTGATACTGGTCAAATAGACGCATGGGGC CACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 135)

10

20

30

40

50

【 0 2 5 9 】

【表 9】

表 9 可変軽鎖ポリヌクレオチド配列

抗体	可変軽鎖ポリヌクレオチド配列(配列番号)
基準抗 -FAM19A5 抗体 ("3-2")	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTTACTATTATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACCT GGCAGTCCCCTGTCACTCTGATCTATGAAAGCAACAAGAGACCCCTCGGACATCCCTTCA CGATTCCTCCGGTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCC GATGACGAGGCTATCTATTAAGTGTGGAGCTGGGACAGTAGCAATGGTGGTATATTTGGG GCCGGACAACCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 69)
1-7A-IT	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTTACTATTATGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCTGGC AGTGCCCTGTCACTCTGATCTATGAAACAACAAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGA

	TTCTCCGTTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGGC GACGAGGCTGATTATTACTGTGGAGCTGGGACAGTAGCAATGGTGGTATATTTGGGGCC GGGACAACCCGTACCGTCCTA (SEQ ID NO: 70)	10
Low-PI	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTTACTATTATGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCTGGC AGTGCCCTGTCACTCTGATCTATGAAACAACAAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGA TTCTCCGTTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGGC GACGAGGCTGATTATTACTGTGGAGCTGGGACAGTAGCAATGGTGGTATATTTGGGGCC GGGACAACCCGTACCGTCCTA (SEQ ID NO: 71)	
1-30	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGTGGCAGCGAAGAAGAACAGTACTATTATGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCTGGC AGTGCCCTGTCACTCTGATCTATGAAACAACAAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGA TTCTCCGTTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGGC GACGAGGCTGATTATTACTGTGGAGCTGGGACAGTAGAAGATGAAGATCATTTTGGGGCC GGGACAACCCGTACCGTCCTA (SEQ ID NO: 72)	
1-17	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTTACTATTATGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCTGGC AGTGCCCTGTCACTCTGATCTATGAAAGTGAACAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGA TTCTCCGTTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGGC GACGAGGCTGATTATTACTGTGGAGCTGGGACAGTAGAAGTGAAGATCATTTTGGGGCC GGGACAACCCGTACCGTCCTA (SEQ ID NO: 73)	20
1-32	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTTACTATTATGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCTGGC AGTGCCCTGTCACTCTGATCTATGAAAGTGAACAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGA TTCTCCGTTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGGC GACGAGGCTGATTATTACTGTGGAGCTGGGACAGTAGAAGTGAAGATCATTTTGGGGCC GGGACAACCCGTACCGTCCTA (SEQ ID NO: 74)	
4-11	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTTACTATTATGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCTGGC AGTGCCCTGTCACTCTGATCTATGAAAGTGAACAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGA TTCTCCGTTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGGC GACGAGGCTGATTATTACTGTGGAGCTGGGACAGTAGCGATGAAGATCATTTTGGGGCC GGGACAACCCGTACCGTCCTA (SEQ ID NO: 75)	
6-10	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGC TCCGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTTACTATTATGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCTGGC AGTGCCCTGTCACTCTGATCTATGAAAGTGAACAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGA TTCTCCGTTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGGC GACGAGGCTGATTATTACTGTGGAGCTGGGACAGTAGCAGCAGCCATTTTGGGGCC GGGACAACCCGTACCGTCCTA (SEQ ID NO: 76)	30
基準抗 -FAM19A5 抗体 ("2-13")	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATAACCTGC TCCGGGGTAGCTATAGCTATGGCTGGTCCAGCAGAAGTCTCTGGCAGTGCCTTTGTC ACTGTGATCTACTGGGATGATGAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGATTTCTCCGGTGCC CTATCCGGTCCACAACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGACGACGAGGCTGTC TATTTCTGTGGGACTGAAGACATCAGCGGCACTGCTGGTGTATTTGGGGCCGGACAACC CTGACCGTCCTG (SEQ ID NO: 77)	
2-13D	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGGCAAGATAACCTGC TCCGGGGTGTGTATAGCTATGGCTGGTCCAGCAGAAGCCCTGGCAGTGCCTTTGTC GTGATCTACTGGGATGATGAGAGACCCCTCGGACATCCCTTACGATTTCTCCGGTGCCCTA TCCGGCTCCACAACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGACGAGGCTGATTAT TATTTGGGACTGAAGACATCAGCGGCACTGCTGGTGTATTTGGGGCCGGACAACCCCTG ACCGTCCTG (SEQ ID NO: 78)	
2-13D-37	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGGCAAGATAACCTGC TCCGGGGTGTGTATAGCTATGGCTGGTCCAGCAGAAGCCCTGGCAGTGCCTTTGTC ACT	40

【 0 2 6 0 】

	GTGATCTACTGGGATGATGAGAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTGCCCTA TCCGGCTCCACAAACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAAGACGAGGCTGATTAT TATTGTGGGACTGAAGACATCAGCGGCACTGCTGGTGTATTTGGGGCCGGGACAACCCCTG ACCGTCCTG (SEQ ID NO: 79)
2-13D-37-1.5W-41	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGCGAAGATAACCTGC TCCGGGGGTGTGTATAGCTATGGCTGGTTCAGCAGAAGCCTGGCAGTGCCCTTGTCAC GTGATCTACTGGGATGATGAGAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTGCCCTA TCCGGCTCCACAAACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAAGACGAGGCTGATTAT TATTGTGGGACTGAAGACATCAGCGGCACTGCTGGTGTATTTGGGGCCGGGACAACCCCTG ACCGTCCTG (SEQ ID NO: 136)
2-13D-37-3W-16	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGCGAAGATAACCTGC TCCGGGGGTGTGTATAGCTATGGCTGGTTCAGCAGAAGCCTGGCAGTGCCCTTGTCAC GTGATCTACTGGGATGATGAGAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTGCCCTA TCCGGCTCCACAAACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAAGACGAGGCTGATTAT TATTGTGGGACTGAAGACATCAGCGGCACTGCTGGTGTATTTGGGGCCGGGACAACCCCTG ACCGTCCTG (SEQ ID NO: 137)

10

【0261】

本明細書に開示の抗FAM19A5抗体を製造するための方法は、前記重鎖及び軽鎖を信号ペプチドと共に、前記重鎖及び軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む細胞株において発現させることを含むことができる。これらのヌクレオチド配列を含む宿主細胞は、本明細書に含まれる。

【0262】

VH及びVLセグメントをコードするDNA断片が得られると、これらのDNA断片は、標準組換えDNA技術によってさらに操作し、例えば、可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子又はscFv遺伝子に変換できる。これらの操作においてVL又はVH-コーディングDNA断片は、抗体定常領域又は可撓性リンカーのようなさらに他のタンパク質をコードするさらに他のDNA断片に作動的に連結される。これと関連して使われた用語“作動的に連結”は、2個のDNA断片が接合して前記2個のDNA断片によってコードされたアミノ酸配列がフレーム内残っていることを意味するよう意図される。

20

【0263】

前記VH領域をコードする分離されたDNAは、VH-コーディングDNAを重鎖定常領域（ヒンジ、CH1、CH2及び/又はCH3）をコードするさらに他のDNA分子に作動的に連結することによって、全長重鎖遺伝子に転換可能である。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当業界に公知であり（例えば、Kabata, EA, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 参考）、これらの領域を含むDNA断片は、標準PCR増幅によって得ることができる。前記重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM又はIgD定常領域、例えばIgG2及び/又はIgG4定常領域であり得る。Fab断片重鎖遺伝子の場合、前記VH-コーディングDNAは、重鎖CH1定常領域だけをコードするさらに他のDNA分子に作動的に連結され得る。

30

【0264】

前記VL領域をコードする分離されたDNAは、VL-コーディングDNAを軽鎖定常領域（CL）をコードするさらに他のDNA分子に作動的に連結することによって、全長軽鎖遺伝子（のみならず、Fab軽鎖遺伝子）に転換可能である。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当業界に公知であり（例えば、Kabata, EA, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242）、これらの領域を含むDNA断片は、標準PCR増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパ又はラムダ定常領域であり得る。

40

【0265】

50

s c F v 抗体を生成するために、前記 V H - 及び V L - コーディング D N A 断片は、可撓性リンカー、例えばアミノ酸配列 (G l y 4 - S e r) 3 をコードするさらに他の断片に作動的に連結され、前記 V H 及び V L 配列が、V L 及び V H 領域が可撓性リンカーによって接合された隣接単鎖タンパク質として発現し得る (例 えば、B i r d e t a l . , (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6 ; H u s t o n e t a l . , (1 9 8 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3 ; M c C a f f e r t y e t a l . , (1 9 9 0) N a t u r e 3 4 8 : 5 5 2 - 5 5 4 参 照) 。 例 示 的 な 抗 F A M 1 9 A 5 s c F v の ア ミ ノ 酸 配 列 が 表 7 に 提 供 さ れ て い る。

【 0 2 6 6 】

一部の具現例において、本開示内容は、抗体をコードするヌクレオチド配列を含む分離された核酸分子を含むベクターを提供する。他の具現例において、前記ベクターは、遺伝子治療のために用いることができる。

【 0 2 6 7 】

本開示内容に適するベクターは、発現ベクター、ウイルスベクター及びプラスミドベクターを含む。一具現例において、前記ベクターは、ウイルスベクターである。

【 0 2 6 8 】

本明細書で用いる発現ベクターとは、挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳に必要な要素を含む任意の核酸構造体のことを指すか、或いは R N A ウィルスベクターでは、適切な宿主細胞への導入時、複製と翻訳に必要な要素のことを指す。発現ベクターは、プラスミド、ファージミド、ウイルス及びこれらの誘導体を含むことができる。

【 0 2 6 9 】

本開示内容の発現ベクターは、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。一具現例において、前記抗体をコードする配列は、発現調節配列に作動可能に連結される。本明細書で用いる 2 個の核酸配列は、各成分核酸配列がその機能性を維持するように許容する方式で共有結合される時に作動可能に連結される。コーディング配列及び遺伝子発現調節配列は、コーディング配列の発現又は転写及び / 又は翻訳を遺伝子発現調節配列の影響又は制御の下にあるように共有結合される時に作動可能に連結されているとする。5 ' 遺伝子発現配列においてプロモーターの誘導がコーディング配列の転写を起し、2 個の D N A 配列間の結合特性が、(1) フレーム - 移動 (f r a m e - s h i f t) 突然変異の導入を起ささいか、(2) コーディング配列の転写を指示するプロモーター領域の能力を妨害しないか、又は (3) タンパク質に翻訳される相応する R N A 転写体の能力を妨害しない場合に、2 個の D N A 配列が作動可能に連結されているとする。これによって、遺伝子発現配列がコーディング核酸配列の転写に影響を及ぼし得る場合、前記遺伝子発現配列は、コーディング核酸配列に作動可能に連結されて生成された転写体が所望の抗体に翻訳される。

【 0 2 7 0 】

ウイルスベクターは、次のようなウイルスの核酸配列を含むが、これに限定されるものではない：レトロウイルス、例えば、モロニー (M o l o n e y) ネズミ白血球ウイルス、ハーベイ (H a r v e y) ネズミ肉腫ウイルス、ネズミ乳癌ウイルス及びラウス (R o u s) 肉腫ウイルス；レンチウイルス；アデノウイルス；アデノ関連ウイルス；S V 4 0 型ウイルス；ポリオーマウイルス；エプスタインバー (E p s t e i n - B a r r) ウィルス；乳頭腫ウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；小児麻痺ウイルス；及びレトロウイルスのような R N A ウィルス。当業界に公知の他のベクターを容易に用いることができる。特定ウイルスベクターは、非必須遺伝子が関心遺伝子に代替された非細胞病性真核ウイルスに基づく。非細胞病性ウイルスには、ライフサイクルがゲノムウイルス R N A を D N A に逆転写した後、続いて宿主細胞 D N A にプロウイルス統合することを伴うレトロウイルスが含まれる。レトロウイルスは、ヒト遺伝子治療試験のために承認された。最も有用なのは、複製欠陥のあるレトロウイルスである (すなわち、所望のタンパク質の合成を指示できるが、感染性粒子は生成できない。) 。このような遺伝的に変形さ

10

20

30

40

50

れたレトロウイルス発現ベクターは、生体内で遺伝子の高効率形質導入において一般的に有用である。複製欠陥のあるレトロウイルスの生産のための標準プロトコル（外因性遺伝物質をプラスミドに混入する段階、プラスミドを用いてパッケージ細胞株を形質注入させる段階、パッケージ細胞株によって組換えレトロウイルスを生産する段階、組織培養培地からウイルス粒子を回収する段階、及びウイルス粒子に標的細胞を感染させる段階を含む。）は、Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W. H. Freeman Co., New York (1990) and Murry, E. T., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N. J. (1991) に提供されている。

10

【0271】

一具現例において、前記ウイルスは、二重鎖DNAウイルスであるアデノ関連ウイルスである。アデノ関連ウイルスは、複製欠陥があるように操作されてよく、広範囲な細胞類型及び種を感染させることができる。また、熱及び脂質溶媒安定性；造血細胞を含む様々な系統の細胞で高い形質導入頻度；重複感染阻害が欠如し、様々な一連の形質導入が可能であるという長所がある。報告によれば、アデノ関連ウイルスは、部位特異的方式でヒト細胞DNAに統合され得るので、挿入突然変異の誘発可能性とレトロウイルス感染の挿入された遺伝子発現特性の可変性を最小化できる。また、野生型アデノ関連ウイルス感染は、選択的圧力がない状態で100回も超える継代中に組織培養で追跡され、これは、アデノ関連ウイルスゲノム統合が比較的安定した反応であることを意味する。アデノ関連ウイルスは、染色体外方式で作用してもよい。

20

【0272】

他の具現例において、前記ベクターは、レンチウイルスから由来する。特定の具現例において、前記ベクターは、非分裂細胞を感染させ得る組換えレンチウイルスのベクターである。

【0273】

レンチウイルスゲノムとプロウイルスDNAは一般に、レトロウイルスから発見する2個の長い末端反復(LTR)配列が両側にある3個の遺伝子であるgag、pol及びenvを有する。前記gag遺伝子は、内部構造(マトリックス、カプシド及びヌクレオカプシド)タンパク質をコードし；前記pol遺伝子は、RNA-指向DNA重合酵素(逆転写酵素)、プロテアーゼ及びインテグラーゼをコードし；前記env遺伝子は、ウイルス外皮糖タンパク質をコードする。5'及び3'LTRは、ビリオンRNAの転写及びポリアダニル化を促進する役割を担う。LTRは、ウイルス複製に必要な他の全てのシス-作用(cis-acting)配列を含む。レンチウイルスは、vif、vpr、tat、rev、vpu、nef及びvpx(HIV-1、HIV-2及び/又はSIVにおいて)を含む追加遺伝子を持っている。

30

【0274】

前記ゲノム(tRNAプライマー結合部位)の逆転写及びウイルスRNAを粒子(Psi部位)に効率的に封入するために必要な配列が5'LTRに隣接している。封入(又は、レトロウイルスRNAを感染性ビリオンにパッケージング)に必要な配列がウイルスゲノムから欠落している場合、シス欠陥(cis defect)はゲノムRNAの封入を防ぐ。

40

【0275】

しかし、その結果、得られた突然変異体は、全てのビリオンタンパク質の合成を指示できる状態で残っている。本開示内容は、パッケージ機能を保有している2個以上のベクター、すなわち、gag、pol及びenvだけでなく、rev及びtatを用いて好適な宿主細胞を形質注入させることを含む、非分裂細胞を感染させ得る組換えレンチウイルスを生産する方法を提供する。下に開示されるように、機能性tat遺伝子が欠如したベクターは、特定用途に好適である。これによって、例えば、第1ベクターは、ウイルスgag及びウイルスpolをコードする核酸を提供でき、さらに他のベクターは、パッケ

50

ーシング細胞を生産するためにウイルスenvをコードする核酸を提供できる。本明細書において、伝達ベクターとして同定された異種遺伝子を提供するベクターをパッケージング細胞に導入すれば、関心外来遺伝子を運搬する感染性ウイルス粒子を放出するプロデューサー細胞(producer cell)が得られる。

【0276】

上に述べたベクター及び外来遺伝子の構成によれば、第2ベクターは、ウイルス外皮(env)遺伝子をコードする核酸を提供することができる。前記env遺伝子は、レトロウイルスを含む略全ての好適なウイルスから由来し得る。一部の具現例において、前記envタンパク質は、ヒト及び他の種の細胞の形質導入を可能にする両種性外皮タンパク質である。

10

【0277】

レトロウイルス由来のenv遺伝子の例は、次を含むが、これに限定されない：モロニーネズミ白血病ウイルス(MoMuLV又はMMLV)、ハーベイネズミ肉腫ウイルス(HaMuSV又はHSV)、ネズミ乳癌ウイルス(MuMTV又はMMTV)、テナガザル白血病ウイルス(Gibbon Ape Leukemia Virus)、ヒト免疫欠乏ウイルス(HIV)、及びラウス肉腫ウイルス。水疱性口内炎(Vesicular stomatitis)ウイルス(VSV)タンパク質G(VSV G)のような他のenv遺伝子、肝炎ウイルス及びインフルエンザの遺伝子も用いられ得る。

【0278】

ウイルスenv核酸配列を提供するベクターは、本明細書の他の箇所に記載されている調節配列と作動可能に関連される。

20

【0279】

特定の具現例において、前記ベクターは、ベクターが非分裂細胞を形質導入させる能力を損傷させずにHIV毒性遺伝子env、vif、vpr、vpu及びnefが欠失されたレンチウイルスベクターを含む。

【0280】

一部の具現例において、前記ベクターは、3'LTRのU3領域の欠失を含むレンチウイルスベクターを含む。U3領域の欠失は、全体欠失又は部分欠失であり得る。

【0281】

一部の具現例において、本明細書に記載のFVII核酸配列を含む本開示内容のレンチウイルスベクターは、(a) gag、pol又はgag及びpol遺伝子を含む第1核酸配列、及び(b)異種env遺伝子を含む第2核酸配列を用いて形質注入されてよく；このとき、前記レンチウイルスベクターは、機能性tat遺伝子が欠如している。他の具現例において、前記細胞は、rev遺伝子を含む第4核酸配列を用いてさらに形質注入される。特定の具現例において、前記レンチウイルスベクターは、vif、vpr、vpu、vpx及びnef又はこれらの組合せから選択される機能性遺伝子が欠如している。

30

【0282】

特定の具現例において、レンチウイルスベクターは、gagタンパク質、Rev反応要素、中心ポリプリントラック(cPPT)、又はこれらの任意の組合せをコードする1つ以上の核酸配列を含む。

40

【0283】

レンチウイルスベクターの例は、W09931251、W09712622、W09817815、W09817816及びW09818934に開示されており、これらはその全文が本明細書に参考として含まれる。

【0284】

他のベクターは、プラスミドベクターを含む。プラスミドベクターは、当業界に広範囲に記述されており、本技術分野の当業者には周知である。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor La

50

boratory Press, 1989 参照。ここ数年間、プラスミドベクターは宿主ゲノム内で複製して宿主ゲノムに統合できないことから、生体内で細胞に遺伝子を伝達するのに特に有利なものとして明らかになった。しかし、宿主細胞と相溶性であるプロモーターを有するこれらのプラスミドは、プラスミド内に作動可能にコードされた遺伝子からペプチドを発現することができる。商業用供給社から入手でき、一般的に用いられる一部のプラスミドは、pBR322、pLTC18、pLTC19、様々なpcDNAプラスミド、pRC/CMV、様々なpCMVプラスミド、pSV40及びpBlueScriptを含む。特定プラスミドの追加例は、pcDNA3.1、カタログ番号V79020; pcDNA3.1/hygro、カタログ番号V87020; pcDNA4/myc-His、カタログ番号V86320; 及びpBudCE4.1、カタログ番号V53220 (いずれも、Invitrogen (Carlsbad, CA) 社製) である。他のプラスミドは当業者によく知られている。さらに、プラスミドはDNAの特定断片を除去及び/又は追加するために標準分子生物学技術を用いてカスタマイズ設計され得る。

【0285】

[VI. 抗体生産]

FAM19A5 (例えば、ヒトFAM19A5) に免疫特異的に結合する抗体又はその断片は、抗体の合成のために当業界に公知の任意の方法、例えば化学的合成又は組換え発現技術によって生成され得る。本明細書に開示された方法は、特に言及がない限り、分子生物学、微生物学、遺伝子分析、組換えDNA、有機化学、生化学、PCR、オリゴヌクレオチド合成及び変形、核酸混成化、及び当業界の関連技術分野における従来 of 技術を利用する。これらの技術は、例えば、本明細書で援用された参考文献に完全に説明されている。例えば、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 を参考されたい。

【0286】

特定の具現例において、本明細書に記載の抗体は、例えば、合成、DNA配列の遺伝子操作を用いた生成を伴う任意の手段によって製造、発現、生成又は分離した抗体 (例えば、組換え抗体) である。特定の実施形態において、このような抗体は、生体内動物又は哺乳類 (例えば、ヒト) の抗体ジャームライン (germline) レパートリー内に自然的に存在しない配列 (例えば、DNA配列又はアミノ酸配列) を含む。一部の具現例において、本明細書に開示の抗FAM19A5抗体は脱免疫化された。

【0287】

実施例欄 (例えば、実施例2) に記載されているように、前記抗FAM19A5抗体は

まず、合成 F A M 1 9 A 5 ペプチドでニワトリを免疫化することによって生成した。したがって、ヒトを対象に投与時に免疫原性の危険を最小化するために、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体（例えば、3 - 2 及び 2 - 1 3）をヒト抗体の免疫原性配列とより近似するように変形させた。一部の具現例において、本明細書に開示の脱免疫化された抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、脱免疫化されていないそれらの対応する相対抗体に比べてヒト F A M 1 9 A 5 に対して類似の結合親和度を有する。一部の具現例において、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体はまた、親和度成熟を経た。抗体を脱免疫化するための方法は、本明細書に開示されており、且つ当業界に公知されている。

【0288】

特定の態様において、本明細書は、本明細書に記載の細胞又は宿主細胞を培養することを含む、F A M 1 9 A 5（例えば、ヒト F A M 1 9 A 5）に免疫特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を製造する方法を提供する。特定の態様において、本明細書は、F A M 1 9 A 5（例えば、ヒト F A M 1 9 A 5）に免疫特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を製造する方法であって、前記抗体又はその抗原結合断片を本明細書に記載の細胞又は宿主細胞（例えば、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む細胞又は宿主細胞）を用いて発現（例えば、組換えによって発現）させる段階を含む方法を提供する。特定の具現例において、前記細胞は、分離された細胞である。特定の具現例において、前記細胞に外因性ポリヌクレオチドを導入した。特定の具現例において、前記方法は、細胞又は宿主細胞から得た抗体又はその抗原結合断片を精製する段階をさらに含む。

【0289】

多クローン性抗体を生産するための方法は、当業界に公知されている（例えば、Chapter 11 in: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, New York 参照）。

【0290】

単クローン性抗体は、ハイブリドーマ、組換え及びファージディスプレイ技術、又はこれらの組合せの使用を含め、当業界に公知の様々な技術を用いて製造できる。例えば、単クローン性抗体は当業界に公知されており、例えば、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 563681 (Elsevier, N.Y., 1981) に教示されている技術を含め、ハイブリドーマ技術を用いて生産できる。本明細書で使われる用語“単クローン性抗体”は、ハイブリドーマ技術によって生産された抗体に制限されない。例えば、単クローン性抗体は、本明細書に記載の抗体又はその断片、例えばそれら抗体の軽鎖及び/又は重鎖を外因的に発現させる宿主細胞から組換えによって生産できる。

【0291】

特定の具現例において、本明細書で使われる“単クローン性抗体”は、単一細胞（例えば、組換え抗体を生産するハイブリドーマ又は宿主細胞）によって生産される抗体であり、前記抗体は、例えば、ELISA、又は当業界に公知されているか或いは本明細書に提供されている実施例欄に記載されている他の抗原結合又は競合的結合分析法によって決定されたように、F A M 1 9 A 5（例えば、ヒト F A M 1 9 A 5）に免疫特異的に結合する。特定の具現例において、単クローン性抗体はキメラ抗体又はヒト化抗体でよい。特定の具現例において、単クローン性抗体は、1価抗体又は多価（例えば、2価）抗体である。特定の具現例において、単クローン性抗体は、単一特異的又は多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）である。本明細書に記載の単クローン性抗体は、例えば、Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495 に記載されたとおり、ハイブリドーマ方法によって作ってもよく、例えば、本明細書に記載の技術を用いてファージライブラリーから分離されてもよい。クローン細胞株及びこれによって発

現する単クローン性抗体を製造するための他の方法は、当業界によく知られている（例えば、上の Chapter 11 in: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al. を参照）。

【0292】

ハイブリドーマ技術を用いて特定抗体を生産及びスクリーニングするための方法は通常のものであり、当業界によく知られている。例えば、ハイブリドーマ方法では、マウス、又はヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラット、ハムスター又はマカクサルのような他の適切な宿主動物を免疫化し、免疫化のために使用したタンパク質（例えば、ヒト F A M 1 9 A 5）に特異的に結合する抗体を生産する又は生産できるリンパ球を誘導する。これと違い、リンパ球は、試験管内免疫化できる。次いで、リンパ球は、ポリエチレングリコールのような適切な融合剤により骨髓腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞を形成する（Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986)）。さらに、RIMMS（反復免疫多重部位）技術を用いて動物を免疫化できる（Kilpatrick KE et al., (1997) Hybridoma 16: 381 - 9、その全体が参照として含まれる）。

10

【0293】

一部の具現例において、マウス（又は、その他ニワトリ、ラット、サル、ロバ、ブタ、ヒツジ、ハムスター又はイヌのような動物）は、抗原（例えば、ヒト F A M 1 9 A 5 のような F A M 1 9 A 5）で免疫化でき、免疫反応が検出されると、例えば、抗原に特異的な抗体がマウス血清から検出されると、マウス脾臓を回収して脾臓細胞を分離する。その後、前記脾臓細胞を任意の適切な骨髓腫細胞、例えば、American Type Culture Collection (ATCC (登録商標)) (Manassas, VA) から入手できる細胞株 SP 2 0 の細胞に周知の技術によって融合してハイブリドーマを形成する。ハイブリドーマは、希釈を制限して選別及びクローニングする。特定の具現例において、免疫化されたマウスのリンパ節を回収し、NSO 骨髓腫細胞と融合させる。

20

【0294】

このように製造したハイブリドーマ細胞を、好ましくは、融合していない親骨髓腫細胞の成長又は生存を阻害する一つ以上の物質を含有した適切な培養培地で接種及び成長させる。例えば、親骨髓腫細胞に酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT 又は HPRT) が欠如している場合に、ハイブリドーマ用培養培地は、典型的に、HGPRT 欠乏細胞の成長を妨害する物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン (HAT 培地) を含むだろう。

30

【0295】

特定の具現例は、効率的に融合し、選別された抗体生産細胞によって抗体の安定した高レベルの生産に一助し、HAT 培地のような培地に感受性がある骨髓腫細胞を使用する。これらの骨髓腫細胞株には、NSO 細胞株、又は Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA から入手可能な MOPC - 2 1 及び MPC - 1 1 マウス腫瘍、及び American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA から入手可能な SP - 2 又は X 6 3 - Ag 8 . 6 5 3 細胞から由来したもののようなネズミ骨髓腫細胞株がある。ヒト骨髓腫及びマウス - ヒト異種骨髓腫細胞株も、ヒト単クローン性抗体生産について記述されている (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))。

40

【0296】

ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地を F A M 1 9 A 5（例えば、ヒト F A M 1 9 A

50

5) に対して指向された単クローン性抗体の生産について分析する。ハイブリドーマ細胞によって生産された単クローン性抗体の結合特異性は、当業界に公知の方法、例えば免疫沈殿又は試験管内結合分析法、例えば放射性免疫分析 (RIA) 又は酵素結合免疫吸着分析 (ELISA) によって決定される。

【0297】

所望の特異性、親和性及び/又は活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンは、希釈手順を制限してサブクローニング (subcloning) でき、標準方法 (上の Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* 参照) によって成長させることができる。このような目的に適する培養培地は、例えば、D-MEM 又は RPMI 1640 培地を含む。また、ハイブリドーマ細胞は、動物において複数腫瘍として生体内成長され得る。

【0298】

サブクローンによって分泌された単クローン性抗体を、例えばタンパク質 A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又は親和性クロマトグラフィーのような従来免疫グロブリン精製手順によって培養培地、腹水液又は血清から適切に分離する。

【0299】

本明細書に記載の抗体は、特定 F A M 1 9 A 5 (例えば、ヒト F A M 1 9 A 5) を認識し、当業者に公知の任意の技術によって生成可能な抗体断片を含む。例えば、本明細書に記載の F a b 及び F (a b ')₂ 断片は、パパイン (F a b 断片を生成するための) 又はペプシン (F (a b ')₂ 断片を生成するための) のような酵素を用いて免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって生成できる。F a b 断片は、抗体分子の 2 個の同じアーム (arm) の一つに該当し、重鎖の V H 及び C H 1 ドメインと対なす完全な軽鎖を含む。F (a b ')₂ 断片は、ヒンジ領域で二硫化結合によって連結された抗体分子の 2 個の抗原結合アームを含む。

【0300】

また、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片は、当業界に公知の様々なファージディスプレイ方法を用いて生成してもよい。ファージディスプレイ方法において、機能性抗体ドメインは、それをコードするポリヌクレオチド配列を運搬するファージ粒子の表面に表示される。特に、V H 及び V L ドメインをコードする DNA 配列は、動物 c DNA ライブラリー (例えば、ヒト c DNA ライブラリー又は感染された組織のネズミ又はニワトリ c DNA ライブラリーのような非ヒト c DNA ライブラリー) から増幅される。前記 V H 及び V L ドメインをコードする DNA は、PCR によって s c F v リンカーとともに組み換えられ、ファージミドベクターにクローニングされる。前記ベクターは、E. coli で電気穿孔され、前記 E. coli はヘルパーファージによって感染される。これらの方法に使用されるファージは、典型的に、f d 及び M 1 3 を含む糸状ファージ (filamentous phage) であり、前記 V H 及び V L ドメインは、一般に、ファージ遺伝子 I I I 又は遺伝子 V I I I に組換えによって融合する。特定の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現させるファージは、抗原、例えば標識された抗原又は固体表面又はビーズに結合又は捕獲された抗原を用いて選別又は同定できる。本明細書に記載の抗体を製造するために利用可能なファージディスプレイ方法の例は、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 出願番号 PCT/GB91/001134; 国際公開番号 WO90/02809、WO91/10737、WO92/01047、WO92/18619、WO93/11236、WO9

10

20

30

40

50

5 / 1 5 9 8 2、W O 9 5 / 2 0 4 0 1 及び W O 9 7 / 1 3 8 4 4 ; 米 国 特 許 番 号 第 5 , 6 9 8 , 4 2 6 号、第 5 , 2 2 3 , 4 0 9 号、第 5 , 4 0 3 , 4 8 4 号、第 5 , 5 8 0 , 7 1 7 号、第 5 , 4 2 7 , 9 0 8 号、第 5 , 7 5 0 , 7 5 3 号、第 5 , 8 2 1 , 0 4 7 号、第 5 , 5 7 1 , 6 9 8 号、第 5 , 4 2 7 , 9 0 8 号、第 5 , 5 1 6 , 6 3 7 号、第 5 , 7 8 0 , 2 2 5 号、第 5 , 6 5 8 , 7 2 7 号、第 5 , 7 3 3 , 7 4 3 号 及 び 第 5 , 9 6 9 , 1 0 8 号 に 開 示 さ れ て い る も の を 含 む。

【 0 3 0 1 】

前記参考文献に記載されているように、ファージ選択後に前記ファージの抗体コーディング領域を分離及び使用して、ヒト抗体を含めて全抗体又は任意の他の所望の抗原結合断片を生成でき、例えば、下に記載されているように、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及びバクテリアを含む任意の所望の宿主で発現し得る。P C T 公 開 番 号 W O 9 2 / 2 2 3 2 4 ; M u l l i n a x R L e t a l . , (1 9 9 2) B i o T e c h n i q u e s 1 2 (6) : 8 6 4 - 9 ; S a w a i H e t a l . , (1 9 9 5) A m J R e p r o d I m m u n o l 3 4 : 2 6 - 3 4 ; 及 び B e t t e r M e t a l . , (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 0 : 1 0 4 1 - 1 0 4 3 に 開 示 さ れ て い る よ う に、当業界に公知の方法を用いてFab、Fab'及びF(ab')₂断片のような抗体断片を組換えによって生産するための技術を採用することもできる。

【 0 3 0 2 】

一態様において、全抗体を生成するためにVH又はVLヌクレオチド配列、制限部位及び制限部位を保護するための側面配列を含むPCRプライマーを使用して鋳型、例えば、scFvクローンから前記VH又はVL配列を増幅させることができる。当業者に公知のクローニング技術を用いて、前記PCR増幅されたVHドメインをVH定常領域を発現させるベクターにクローニングでき、前記PCR増幅されたVLドメインをVL定常領域を発現させるベクター、例えばヒトカップ又はラムダ定常領域にクローニングできる。前記VH及びVLドメインは、必要な定常領域を発現させる一つのベクターにクローニングできる。次いで、前記重鎖変換ベクター及び軽鎖変換ベクターを当業者に公知の技術を用いて細胞株に共-形質注入させ、全長抗体、例えば、IgGを発現させる安定した又は一時的な細胞株を生成する。

【 0 3 0 3 】

キメラ抗体は、前記抗体の異なる各部分が異なる各免疫グロブリン分子から由来した分子である。例えば、キメラ抗体は、ヒト抗体の定常領域に融合した非ヒト動物（例えば、マウス、ラット又はニワトリ）単クローン性抗体の可変領域を含むことができる。キメラ抗体を生産するための方法は、当業界に知られている。例えば、M o r r i s o n S L (1 9 8 5) S c i e n c e 2 2 9 : 1 2 0 2 - 7 ; O i V T & M o r r i s o n S L (1 9 8 6) B i o T e c h n i q u e s 4 : 2 1 4 - 2 2 1 ; G i l l i e s S D e t a l . , (1 9 8 9) J I m m u n o l M e t h o d s 1 2 5 : 1 9 1 - 2 0 2 ; 及 び 米 国 特 許 番 号 第 5 , 8 0 7 , 7 1 5 号、第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号、第 4 , 8 1 6 , 3 9 7 号 及 び 第 6 , 3 3 1 , 4 1 5 号 を 参 照 す る。

【 0 3 0 4 】

ヒト化抗体は、所定の抗原に結合でき、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域及び非ヒト免疫グロブリン（例えば、ネズミ又はニワトリ免疫グロブリン）のアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む。特定の具現例において、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含む。前記抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3及びCH4領域を含むことができる。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含む全ての種類の免疫グロブリン及びIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む任意のアイソ型から選択され得る。ヒト化抗体は、次を含む当業界に公知の様々な技術を用いて生産できるが、これらの技術に限定されるものではない：CDR-グラフィング（ヨーロッパ特許番号EP239400；国際公開番号WO91/09967；及び米国特許番号第5,225,539号、第5,530,101号及び第5,585,089号

)、ベニヤリング (veneer ing) 又はリサーフェシング (resurfacing) (ヨーロッパ特許番号 EP 5 9 2 1 0 6 及び EP 5 1 9 5 9 6 ; Padlan EA (1991) Mol Immunol 28 (4/5) : 489 - 498 ; Studnicka GM et al. , (1994) Prot Engineering 7 (6) : 805 - 814 ; 及び Roguska MA et al. , (1994) PNAS 91 : 969 - 973)、チェーンシャッフリング (米国特許番号 5, 565, 332) 及び例えば米国特許番号 6, 407, 213、米国特許番号 5, 766, 886、国際公開番号 WO 93 / 17105 ; Tan P et al. , (2002) J Immunol 169 : 1119 - 25 ; Caldas C et al. , (2000) Protein Eng. 13 (5) : 353 - 60 ; Moreau 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 及び Pedersen JT et al. , (1994) J Mol Biol 235 (3) : 959 - 73 に開示された技術。また、米国出願公開番号 US 2005 / 0042664 A 1 (2005年2月24日) を参照する。

10

20

【0305】

多重特異的 (例えば、二重特異的抗体) を製造するための方法が記載されている (例えば、米国特許番号第 7, 951, 917号 ; 第 7, 183, 076号 ; 第 8, 227, 577号 ; 第 5, 837, 242号 ; 第 5, 989, 830号 ; 第 5, 869, 620号 ; 第 6, 132, 992号 及び 第 8, 586, 713号 参照)。

【0306】

単一ドメイン抗体、例えば、軽鎖が欠如した抗体は、当業界によく知られた方法によって生産できる。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 ; 米国特許番号第 6, 005, 079号 ; 及び国際公開番号 WO 94 / 04678、WO 94 / 25591 及び WO 01 / 44301 を参照する。

30

【0307】

また、FAM19A5 抗原に免疫特異的に結合する抗体も、当業者によく知られた技術を用いて、抗原を“模倣”する抗遺伝子型抗体を生成するのに用いることができる (例えば、Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7 (5) : 437 - 444 ; 及び Nissinoff A (1991) J Immunol 147 (8) : 2429 - 2438 参照)。

【0308】

特定の具現例において、本明細書に記載の抗 FAM19A5 抗体と同じ FAM19A5 (例えば、ヒト FAM19A5) のエピトープに結合する本明細書に記載の抗体は、ヒト抗体又はその抗原結合断片である。特定の具現例において、本明細書に記載の抗体が FAM19A5 (例えば、ヒト FAM19A5) に結合することを競合的に遮断 (例えば、投与量依存的方式で) する本明細書に記載の抗体は、ヒト抗体又はその抗原結合断片である。

40

【0309】

ヒト抗体は、当業界に公知された任意の方法を用いて生産できる。例えば、機能的内因性免疫グロブリンは発現できないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子は発現できる遺伝子導入マウスを使用することができる。特に、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は

50

無作為に又は相同性組換えによってマウス胚幹細胞に導入され得る。これと違い、前記ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子の他にも、ヒト可変領域、定常領域及び多様性領域をマウス胚幹細胞に導入することができる。前記マウス重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同性組換えによってヒト免疫グロブリン遺伝子座 (loci) の導入と別個に又は同時に非機能的になり得る。特に、JH領域の同型接合 (homozygous) 欠失は、内因性抗体生産を不可能にする。前記変形された胚幹細胞を拡張し、胚盤胞 (blastocyst) に微細注射してキメラマウスを生成する。前記キメラマウスを飼育してヒト抗体を発現させる同型接合子孫を生成する。前記遺伝子導入マウスは、選択された抗原、例えば抗原 (例えば、FAM19A5) の全部又は一部によって正常な方式で免疫化する。抗原に対して指向された単クローン性抗体は、従来ハイブリドーマ技術を用いて免疫化された遺伝子導入マウスから得ることができる。前記遺伝子導入マウスの保有しているヒト免疫グロブリン転移遺伝子は、B細胞分化中に再配列され、続いて、類型変換 (class switching) 及び体細胞突然変異を経る。これによって、このような技術を用いれば、治療的に有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体が生産できる。ヒト抗体生産のための当該技術に関する概要についてLonberg N & Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13: 65-93を参照する。ヒト抗体及びヒト単クローン性抗体を生産するための当該技術及び当該抗体を生産するためのプロトコルに関する詳細な議論については、例えば、国際公開番号WO98/24893、WO96/34096及びWO96/33735;及び米国特許番号第5,413,923号、5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号及び第5,939,598号を参照する。ヒト抗体を生産できるマウスの例としては、XENOMOUSETM (Abgenix, Inc.; 米国特許番号第6,075,181号及び第6,150,184号)、HUAB-MOUSETM (Mederex, Inc./GenPharm; 米国特許番号第5,545,806号及び第5,569,825号)、TRANSCROMOUSETM (Kirin) 及びKM-MOUSETM (Medarex/Kirin)を参照する。

【0310】

FAM19A5 (例えば、ヒトFAM19A5) に特異的に結合するヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列から由来した抗体ライブラリーを用いて、上述のファージディスプレイ方法を含む当業界に公知の様々な方法によって作ることができる。また、米国特許番号第4,444,887号、第4,716,111号及び第5,885,793号;及び国際公開番号WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735及びWO91/10741を参照する。

【0311】

一部の具現例において、ヒト抗体は、マウス-ヒトハイブリドーマを用いて生産することができる。例えば、エプスタインバールウイルス (EBV) で形質転換されたヒト末梢血液リンパ球は、マウス骨髄腫細胞と融合し、ヒト単クローン性抗体を分泌するマウス-ヒトハイブリドーマを生産でき、これらのマウス-ヒトハイブリドーマをスクリーニングして、標的抗原 (例えば、ヒトFAM19A5のようなFAM19A5) に免疫特異的に結合するヒト単クローン性抗体を分泌するものを決定することができる。これらの方法は公知されており、当業界に記載されている (例えば、Shinmoto H et al., (2004) Cytotechnology 46: 19-23; Naganawa Y et al., (2005) Human Antibodies 14: 27-31参照)。

【0312】

[V. 抗体を操作する方法]

上で議論したとおり、本明細書に開示のVH及びVL配列を持つ抗FAM19A5抗体は、VH及び/又はVL配列又はこれに付着した定常領域を変形させることによって新し

い抗 F A M 1 9 A 5 抗体を生成するために使用することができる。これによって、本明細書に記載のさらに他の態様では、本明細書に記載の抗 F A M 1 9 A 5 抗体の構造的特徴は、ヒト F A M 1 9 A 5 に対する結合のように本明細書に記載の抗体の少なくとも一つの機能的特性を保有する構造的に関連した抗 F A M 1 9 A 5 抗体を生成するために用いられる。例えば、前記操作方法のための出発物質は、本明細書に提供された V H 及び / 又は V L 配列又はその一つ以上の C D R 領域である。前記操作された抗体を生成するために、本明細書に提供された一つ以上の V H 及び / 又は V L 配列又はその一つ以上の C D R 領域を持つ抗体を実際に製造（すなわち、タンパク質として発現）する必要がない。その代わりに、前記配列に含まれた情報を出発物質として使用し、本来の配列から派生した“2世代”配列を生成した後、“2世代”配列を製造し、タンパク質として発現させる。

10

【0313】

したがって、本明細書には、

(a) (i) 表 3 に示した C D R 1、C D R 2 及び / 又は C D R 3 配列又は表 5 に示した重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 及び / 又は C D R 3 を含む重鎖可変領域配列；及び (i i) 表 4 に示した C D R 1、C D R 2 及び / 又は C D R 3 配列又は表 6 に示した重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 及び / 又は C D R 3 を含む軽鎖可変領域配列を提供し；

(b) 前記重鎖可変領域配列及び / 又は軽鎖可変領域配列内の少なくとも一つのアミノ酸残基を変形して少なくとも一つの変形された抗体配列を生成し；

(c) 前記変形された抗体配列をタンパク質として発現させることを含む、抗 F A M 1 9 A 5 抗体を製造するための方法が提供される。

20

【0314】

標準分子生物学技術を用いて変形された抗体配列を製造及び発現させることができる。

【0315】

一部の具現例において、前記変形された抗体配列によってコードされた抗体は、次を含む本明細書に記載の抗 F A M 1 9 A 5 抗体の機能的特性の一つ、一部又は全部を保有する抗体である：

(1) ヒト対象で減少した免疫原性；

(2) 例えば、B i a c o r e によって測定したとき、 K_D が 1 0 n M 以下（例えば、0 . 0 1 n M ~ 1 0 n M ）である可溶性ヒト F A M 1 9 A 5 に結合；

(3) 例えば、E L I S A によって測定したとき、 K_D が 1 0 n M 以下（例えば、0 . 0 1 n M ~ 1 n M ）である膜結合ヒト F A M 1 9 A 5 に結合；

(4) 例えば、E L I S A によって測定したとき、 $E C_{50}$ が 1 n M 以下（例えば、0 . 0 1 n M ~ 1 n M ）である膜結合ヒト F A M 1 9 A 5 に結合；

(5) 反応性神経膠症の発病を減少、反転、遅延及び / 又は予防；

(6) 反応性星状細胞の過剰増殖抑制；

(7) ニューロカン及び神経細胞膠抗原 2 (N G 2) を含むコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現減少；

(8) 神経細胞の核において c - f o s 及び p E R K の発現増加；

(9) 神経細胞の生存促進；

(1 0) 神経細胞において G A P 4 3 の発現増加；

40

(1 1) 軸索の再成長促進；及び

(1 2) ヒト F A M 1 9 A 5 に結合に対していずれか一方向又は両方向に本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体と競合。

【0316】

前記変形された抗体は、上の (1) ~ (1 2) に示した全ての機能的特性のうち 1 個以上、2 個以上、3 個以上、4 個以上、5 個以上、6 個以上、7 個以上、8 個以上、9 個以上、1 0 個以上、1 1 個又は全部を示すことができる。前記変形された抗体の機能的特性は、実施例欄に示されているのと同様に、当業界で利用可能であり及び / 又は本明細書に記載された標準分析法（例えば、E L I S A、F A C S）を用いて評価できる。

【0317】

50

本明細書に記載の抗体を操作する方法の特定の具現例において、突然変異は、抗 F A M 1 9 A 5 抗体コーディング配列の全部又は一部に沿って無作為に又は選択的に導入されてよく、その結果として得た変形された抗 F A M 1 9 A 5 抗体を、本明細書に記載の結合活性及び/又は他の機能的特性に対してスクリーニングすることができる。突然変異方法は当業界に記載されている。例えば、Short の P C T 公開 W O 0 2 / 0 9 2 7 8 0 は、飽和突然変異誘発、合成結紮アセンブリー又はこれらの組合せを用いて抗体突然変異を生成及びスクリーニングする方法を記載している。これと違い、Lazar などの P C T 公開 W O 0 3 / 0 7 4 6 7 9 は、抗体の物理化学的特性を最適化するためにコンピュータスクリーニング方法を利用する方法を記載している。

【 0 3 1 8 】

10

[V I . 細胞及びベクター]

特定の態様において、本明細書は、F A M 1 9 A 5 (例えば、ヒト F A M 1 9 A 5) 及び関連ポリヌクレオチド及び発現ベクターに特異的に結合する本明細書に記載の抗体 (又はその抗原結合断片) を発現させる (例えば、組換えによって) 細胞 (例えば、宿主細胞) を提供する。本明細書は、宿主細胞、例えば、哺乳類細胞において組換え発現のための抗 F A M 1 9 A 5 抗体又は断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むベクター (例えば、発現ベクター) を提供する。また、本明細書は、抗 F A M 1 9 A 5 抗体 (例えば、ヒト又はヒト化抗体) を組換えによって発現させるための当該ベクターを含む宿主細胞を提供する。特定の態様において、本明細書は、宿主細胞から当該抗体を発現させることを含む、本明細書に記載の抗体を生産するための方法を提供する。

20

【 0 3 1 9 】

F A M 1 9 A 5 (例えば、ヒト F A M 1 9 A 5) に特異的に結合する本明細書に記載の抗体 (例えば、本明細書に記載の全長抗体、抗体の重鎖及び/又は軽鎖又は単鎖抗体) の組換えは、前記抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの作製を伴う。本明細書に記載の抗体分子、抗体の重鎖及び/又は軽鎖又はその断片 (例えば、重鎖及び/又は軽鎖可変ドメイン) をコードするポリヌクレオチドが得られると、前記抗体分子の生産のためのベクターを、当業界によく知られた技術を用いた組換え D N A 技術によって製造できる。これによって、抗体又は抗体断片 (例えば、軽鎖又は重鎖) をコードするヌクレオチド配列を含有しているポリヌクレオチドを発現させることによってタンパク質を製造するための方法が、本明細書に記載されている。当業者によく知られている方法を用いて抗体又は抗体断片 (例えば、軽鎖又は重鎖) コーディング配列及び適切な転写及び翻訳制御信号を含有する発現ベクターを作製できる。これらの方法は、例えば、試験管内組換え D N A 技術、合成技術及び生体内遺伝子組換えを含む。また、本明細書に記載の抗体分子、抗体の重鎖又は軽鎖、抗体の重鎖又は軽鎖可変ドメイン又はその断片、又はプロモーターに作動可能に連結された重鎖又は軽鎖 C D R をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターが提供される。このようなベクターは、例えば、前記抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むことができ (例えば、国際公開番号 W O 8 6 / 0 5 8 0 7 及び W O 8 9 / 0 1 0 3 6 ; 及び米国特許番号 5 , 1 2 2 , 4 6 4 参照)、前記抗体の可変ドメインを、全体重鎖、全体軽鎖、又は全体重鎖及び軽鎖両方の発現のために当該ベクターにクローニングすることができる。

30

40

【 0 3 2 0 】

発現ベクターは、従来技術によって細胞 (例えば、宿主細胞) に伝達でき、その後、その結果として得た細胞を従来技術によって培養して、本明細書に記載の抗体 (例えば、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体の V H 及び/又は V L、又は V H 及び/又は V L C D R のいずれか一つ以上を含む抗体) 又はその断片を生産できる。したがって、本明細書は、ポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を提供することであり、前記ポリヌクレオチドは、前記宿主細胞において当該配列の発現のためのプロモーターに作動可能に連結された本明細書に記載の抗体又はその断片、又はその重鎖又は軽鎖、又はその断片、又は本明細書に記載の単鎖抗体をコードする。特定の具現例において、二重鎖抗体の発現のために個別に重鎖及び軽鎖の両方をコードするベクターは、詳細に後述されているように、全体

50

免疫グロブリン分子の発現のために宿主細胞で共発現できる。特定の具現例において、宿主細胞は、本明細書に記載の抗体の重鎖及び軽鎖の両方又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含有する。特定の具現例において、宿主細胞は、2個の異なるベクター、すなわち、本明細書に記載の抗体の重鎖又は重鎖可変領域又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む第1ベクター及び本明細書に記載の抗体の軽鎖又は軽鎖可変領域又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む第2ベクターを含有する。他の具現例において、第1宿主細胞は、本明細書に記載の抗体の重鎖又は重鎖可変領域又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む第1ベクターを含み、第2宿主細胞は、本明細書に記載の抗体の軽鎖又は軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第2ベクターを含む。特定の具現例において、第1細胞によって発現する重鎖/重鎖可変領域は第2細胞の軽鎖/軽鎖可変領域と会合して本明細書に記載の抗FAM19A5抗体又はその抗原結合断片を形成する。特定の具現例において、本明細書は、当該第1宿主細胞及び当該第2宿主細胞を含む宿主細胞の集団を提供する。

10

【0321】

特定の具現例において、本明細書は、本明細書に記載の抗FAM19A5抗体の軽鎖/軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第1ベクター及び本明細書に記載の抗FAM19A5抗体の重鎖/重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第2ベクターを含むベクター集団を提供する。

【0322】

本明細書に記載の抗体分子を発現させるために様々な宿主-発現ベクターシステムを使用することができる。該宿主-発現システムは、関心あるコーディング配列を生成し、次いで精製できる伝達体(vehic le)に該当するが、また、適切なヌクレオチドコーディング配列によって形質転換又は形質注入時に、本明細書に記載の抗体分子をインシチュ(in situ)発現させることができる細胞に該当する。これらは、抗体コーディング配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA発現ベクターによって形質転換されたバクテリア(例えば、E. coli及びB. subtilis)のような微生物;抗体コーディング配列を含有した組換え酵母発現ベクターによって形質転換された酵母(例えば、Saccharomyces Pichia);抗体コーディング配列を含有した組換えウイルス発現ベクター(例えば、baculovirus)によって感染された昆虫細胞システム;組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)によって感染されたり抗体コーディング配列を含有した組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)によって形質転換された植物細胞システム(例えば、Chlamydomonas reinhardtiiのような緑藻類);又は、哺乳類細胞のゲノムから由来したプロモーター(例えば、メタルロチオネインプロモーター)又は哺乳類ウイルスから由来したプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;牛痘ウイルス7.5Kプロモーター)を含有した組換え発現構造体を保有した哺乳類細胞システム(例えば、COS(例えば、COS1又はCOS)、CHO、BHK、MDCK、HEK293、NSO、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa及びNIH3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-40、BSC1、BSC40、YB/20及びBMT10細胞)を含むが、これに限定されない。特定の具現例において、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片を発現させるための細胞は、CHO細胞、例えばCHO GS SYSTEMTM(Lonza)のCHO細胞である。特定の具現例において、本明細書に記載の抗体を発現させるための細胞は、ヒト細胞、例えばヒト細胞株である。特定の具現例において、哺乳類発現ベクターは、POPTIVECTM又はpcDNA3.3である。特定の具現例において、特に、全体組換え抗体分子の発現のための大腸菌のようなバクテリア細胞又は真核細胞(例えば、哺乳類細胞)が、組換え抗体分子の発現のために用いられる。例えば、中国ハムスター卵巣(CHO)細胞のような哺乳類細胞は、ヒト巨大細胞ウイルスの主要中間初期遺伝子プロモーター要素のようなベクターと共に抗体に対して有効な発現システムである(Fo

20

30

40

50

e c k i n g M K & H o f s t e t t e r H (1 9 8 6) G e n e 4 5 : 1 0 1 - 5 ; 及 び C o c k e t t M I e t a l . , (1 9 9 0) B i o t e c h n o l o g y 8 (7) : 6 6 2 - 7) 。 特 定 の 具 現 例 に お い て 、 本 明 細 書 に 記 載 の 抗 体 は 、 C H O 細 胞 又 は N S O 細 胞 に よ っ て 生 産 さ れ る 。 特 定 の 具 現 例 に お い て 、 F A M 1 9 A 5 (例 え ば 、 ヒ ト F A M 1 9 A 5) に 免 疫 特 異 的 に 結 合 す る 本 明 細 書 に 記 載 の 抗 体 を コー ド す る ヌ ク レ オ チ ド 配 列 の 発 現 は 、 構 成 的 プ ロ モ ー タ ー 、 誘 導 性 プ ロ モ ー タ ー 又 は 組 織 特 異 的 プ ロ モ ー タ ー に よ っ て 調 節 さ れ る 。

【 0 3 2 3 】

バクテリアシステムにおいて、多数の発現ベクターは、発現する抗体分子に対して意図的用途によって有利に選択されてよい。例えば、当該抗体を、抗体分子の薬剤学的組成物 10
を作るために大量で生産しようとするとき、容易に精製される高レベルの融合タンパク質生成物の発現を指示するベクターが好ましいであろう。当該ベクターには、抗体コーディング配列がlac Zコーディング領域を有する構成でベクターに個別に結紮して融合タンパク質が生成されるE. coli発現ベクターpUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2 : 1791 - 1794) ; pINベクター (Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13 : 3101 - 3109 ; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24 : 5503 - 5509) ; などが含まれるが、これに制限されるものではない。例えば、グルタチオン5-トランスフェラーゼ (GST) によって融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるためにp 20
GEXベクターを使用してもよい。一般に、当該融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオンアガロースビーズに吸着及び結合した後、遊離グルタチオンが存在する状態で溶出することによって、溶解された細胞から容易に精製され得る。前記pGEXベクターは、トロンピン又は因子Xaプロテアーゼ切断部位を含むように構成され、クロニングされた標的遺伝子産物がGSTモイエティから放出され得る。

【 0 3 2 4 】

昆虫システムにおいて、例えばAutographa californica核多面体ウイルス (AcNPV) は、外来遺伝子を発現させるベクターとして用いられ得る。前記ウイルスは、ツマジロクサヨトウ (Spodoptera frugiperda) 細胞で成長する。前記抗体コーディング配列は、ウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) に個別にクロニングされ、AcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御状態にあり得る。 30

【 0 3 2 5 】

哺乳類宿主細胞では多数のウイルス系発現システムを用いることができる。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合に、関心ある抗体コーディング配列を、アデノウイルス転写 / 翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーター及び3部 (tripartite) リーダ配列に結紮させることができる。次に、このキメラ遺伝子を試験管内又は生体内組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入することができる。前記ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、領域E1又はE3) に挿入すれば、生存可能であり且つ感染された宿主において抗体分子を発現できる組換えウイルスが生成されるであろう (例えば、Lo 40
gan J & Shenk T (1984) PNAS 81 (12) : 3655 - 9 参照)。挿入された抗体コーディング配列の効率的な翻訳のために特定開始信号も必要であり得る。これらの信号は、ATG開始コドン及び隣接配列を含む。また、前記開始コドンは、全体挿入物の翻訳が可能となるように、所望のコーディング配列のリーディングフレームと互いに合わなければならない。これらの外因性翻訳制御信号及び開始コドンは、天然、合成の両方の様々な起源を有することができる。発現効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写終結因子などを含むことによって増大し得る (例えば、Bitter G et al. , (1987) Methods Enzymol. 153 : 516 - 544 参照)。

【 0 3 2 6 】

また、前記挿入された配列の発現を調節したり或いは所望の特定方式で遺伝子産物を変形及び処理する宿主細胞菌株を選別できる。タンパク質生成物の当該変形（例えば、グリコシル化）及び処理（例えば、切断）は、タンパク質の機能に重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後処理及び変形に対する特徴的且つ特異的な機序を有する。発現した外来タンパク質の正しい変形及び処理が可能となるように適切な細胞株又は宿主システムを選択できる。そのために、1次転写体の適切な処理、遺伝子産物のグリコシル化及びリン酸化に対する細胞機構を保有した真核宿主細胞を使用することができる。当該哺乳類宿主細胞は、CHO、VERO、BHK、HeLa、MDCK、HEK293、NIH3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20及びT47D、NSO（いかなる免疫グロブリン鎖も体内生成しないネズミ骨髄腫細胞株）、CRL7030、COS（例えば、COS1又はCOS）、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10及びHsS78Bst細胞を含むが、これに制限されるものではない。特定の具現例において、本明細書に記載の抗FAM19A5抗体は、CHO細胞のような哺乳類細胞で生産される。

【0327】

特定の具現例において、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分は、減少したフコース含有量を有するか或いは全くフコース含有量を有しない。当該抗体は、当業者に公知の技術を用いて生産できる。例えば、前記抗体はフコシル化能力が不足又は欠如した細胞で発現し得る。特定例において、1,6-フコシルトランスフェラーゼの2個の対立遺伝子がノックアウトされた細胞株を、フコース含有量が減少した抗体又はその抗原結合部分を生産するために使用することができる。POTELLIGENT（登録商標）システム（Lonza）は、フコース含有量が減少した抗体又はその抗原結合部分を生産するために使用できる当該システムの一例である。

【0328】

長期間に高収率で組換えタンパク質を生産するために安定した発現細胞を作ることができる。例えば、本明細書に記載の抗FAM19A5抗体又はその抗原結合部分を安定的に発現する細胞株を操作することができる。特定の具現例において、本明細書に提供された細胞は、会合して本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分を形成する軽鎖/軽鎖可変ドメイン及び重鎖/重鎖可変ドメインを安定して発現させる。

【0329】

特定の態様において、宿主細胞を、ウイルス複製起源を含有する発現ベクターを使用する代わりに、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写終結因子、ポリアデニル化部位など）によって制御されたDNA及び選択マーカーを用いて形質転換することができる。外来DNA/ポリヌクレオチドの導入後、操作された細胞を濃縮培地で1~2日間成長させることができ、その後、選択的培地に変える。組換えプラスミドにおいて選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、細胞がこれらの染色体にプラスミドを安定して統合させ成長させることによって細胞株にクローニング及び膨脹され得る焦点（foci）を形成する。この方法は、本明細書に記載の抗FAM19A5抗体又はその抗体結合部分を発現させる細胞株を操作するために有利に用いることができる。このように操作された細胞株は、抗体分子と直間接的に相互作用する組成物のスクリーニング及び評価に特に有用であり得る。

【0330】

それぞれtk-、hgprt-又はaprt-細胞で使用可能なヘルパス単純ウイルスチミジンキナーゼ（Wigler Met al., (1977) Cell 11(1): 223-32）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034）及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowy I et al., (1980) Cell 22(3): 817-23）遺伝子を含む多数の選択システムを使用できるが、これらに限定されるものではない。また、抗代謝産物

耐性は、次のような遺伝子に対する選択の土台として用いることができる：メトトレキサート耐性を付与する dhfr (Wigler M et al., (1980) PNAS 77(6):3567-70; O'Hare K et al., (1981) PNAS 78:1527-31); ミコフェノール酸耐性を付与する gpt (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4):2072-6); アミノグリコシド G-418 耐性を付与する neo (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573-596; Mulligan RC (1993) Science 260:926-932; 及び Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62:191-217; Nabel GJ & Feigner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5):211-5); 及びハイグロマイシン耐性を付与する hygro (Santerre RF et al., (1984) Gene 30(1-3):147-56)。組換え DNA 技術分野で知られた通常の方法は、所望の組換えクローンを選別するために一般に適用されてよく、当該方法は、例えばその全体が本明細書に参照によって含まれる 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); 及び 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 に記載されている。

10

20

30

40

50

【0331】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加し得る（検討のために、Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol 3 (Academic Press, New York, 1987 を参照)）。抗体を発現させるベクターシステム内マーカーが増幅可能なとき、宿主細胞培養物に存在する阻害剤のレベル増加は、マーカー遺伝子の複製数を増加させるであろう。増幅された領域は抗体遺伝子と関連しているので、抗体の生産も増加するであろう (Crouse GF et al., (1983) Mol Cell Biol 3:257-66)。

【0332】

前記宿主細胞は、本明細書に記載の 2 個以上の発現ベクターである重鎖由来ポリペプチドをコードする第 1 ベクター及び軽鎖由来ポリペプチドをコードする第 2 ベクターによって共形質注入され得る。前記 2 個のベクターは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの同一の発現を可能にする同一の選択マーカーを含有し得る。前記宿主細胞は、前記 2 個以上の発現ベクターの異なる量によって共形質注入され得る。例えば、宿主細胞は、第 1 発現ベクター及び第 2 発現ベクターの次の比のうちいずれか一つによって形質注入され得る。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 又は 1:50。

【0333】

これと違い、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードし発現できる単一ベクターを使用することができる。このような状況で、前記軽鎖は、過量の毒性遊離重鎖を防止するために重鎖前方に位置しなければならない (Proudfoot NJ (1986) Nature 322:562-565; 及び Kohler G (1980) PNAS 77:

2197 - 2199)。前記重鎖及び軽鎖をコードする配列は、cDNA又はゲノムDNAを含むことができる。前記発現ベクターは、モノシストロン性又はマルチシストロン性であり得る。マルチシストロン性核酸構造体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上、又は2～5、5～10又は10～20個範囲の遺伝子/ヌクレオチド配列をコードできる。例えば、ポリシストロン性核酸構造体は、プロモーター、第1遺伝子(例えば、本明細書に記載の抗体の重鎖)及び第2遺伝子(例えば、本明細書に記載の抗体の軽鎖)の順に含むことができる。このような発現ベクターにおいて前記2個の遺伝子の転写は、前記プロモーターによって駆動されるのに対し、第1遺伝子からmRNAの翻訳はキャップ依存的(caps-dependent)スキャニング機序によって駆動されてよく、第2遺伝子からmRNAの翻訳はキャップ-独立的機序、例えばIRESによって駆動されてよい。

【0334】

組換え発現によって本明細書に記載の抗体分子が生成されると、免疫グロブリン分子の精製のための当業界に公知された任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、親和性、特にタンパク質A以降特異的抗原に対する親和性、及びサイジング(sizing)カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解度又はタンパク質精製のための他の標準技術によって精製され得る。また、本明細書に記載の抗体を、本明細書に記載の又はその他当業界に公知の異種ポリペプチド配列に融合させて精製を容易にすることができる。

【0335】

特定の具現例において、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分は分離又は精製される。一般に、分離された抗体は、抗原特異性が前記分離された抗体と異なる他の抗体が実質的にない抗体である。例えば、特定の具現例において、本明細書に記載の抗体の製剤には、細胞物質及び/又は化学的前駆体を実質的にない。用語“細胞物質が実質的にない”とは、細胞から分離されたり又は組換えによって生産され、細胞の細胞成分から分離された抗体の製剤を含む。したがって、細胞物質が実質的にない抗体は、異種タンパク質(本明細書では“汚染タンパク質”ともいう。)及び/又は抗体の変異体、例えば、抗体の異なる翻訳後変形された形態又は抗体(又は、抗体結合部分)の他の異なる変形形態を約30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%又は0.1%(乾燥重量基準)未満で持つ抗体の製剤を含む。前記抗体を組換えによって生産するとき、前記抗体にはまた一般に培養培地が実質的にない、すなわち、培養培地がタンパク質製剤体積の約20%、10%、2%、1%、0.5%又は0.1%未満に相当する。前記抗体を化学的合成によって生産するとき、前記抗体は一般に、化学的前駆体又は他の化学物質が実質的にない、すなわちタンパク質合成に關与する化学的前駆体又は他の化学物質から分離される。したがって、このような抗体製剤は、化学前駆体又は關心ある抗体以外の化合物を約30%、20%、10%又は5%(乾燥重量基準)未満で有する。特定の具現例において、本明細書に記載の抗体は分離又は精製される。

【0336】

[VII. 分析法]

本明細書に記載の抗体は、FAM19A5に対する結合を、例えば標準ELISAによって試験できる。簡単にいえば、微細力価プレートを、PBS中1～2µg/mlの精製されたFAM19A5でコートした後、PBS中5%ウシ血清アルブミンでブロッキングする。抗体希釈液(例えば、FAM19A5-免疫化マウスの血漿希釈液)をそれぞれのウェルに添加し、37℃で1～2時間培養する。プレートをPBS/Tweenで洗浄した後、37℃で1時間セイヨウワサビ過酸化酵素(HRP)に接合された2次試薬(例えば、ヒト抗体の場合、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的多クローン試薬)と共に培養する。洗浄後、プレートをABTS基質(Moss Inc, product: ABTS-1000)で発色させ、OD₄₁₅～₄₉₅で分光光度計によって分析する。次に、ヒトFAM19A5を発現させる細胞株には結合するが、FAM19A5を発現しない対照群細胞株には結合しないものに対して免疫化されたマウスの血清を流細胞分析法によってさら

にスクリーニングする。簡単にいえば、抗FAM19A5抗体の結合を1:20希釈比で抗FAM19A5抗体と共にFAM19A5発現CHO細胞を培養することによって評価する。細胞を洗浄し、結合をPE-標識抗ヒトIgG Abによって検出する。流細胞分析は、FACSscan流細胞分析法(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて行う。好ましくは、最も高い力価を示すマウスを融合用を使用するであろう。

【0337】

抗体及びこれと関連してFAM19A5免疫源と陽性反応性を示す抗体を生産するハイブリドーマをスクリーニングするために、上に説明したELISA分析法を用いることができる。次に、好ましくは、高い親和度でFAM19A5に結合する抗体を生産するハイブリドーマをサブクローニングし、さらに特性を分析することができる。次に、親細胞の反応性を保有している(ELISAによって)ハイブリドーマのそれぞれから一つのクローンを細胞銀行を作り、抗体精製のために選別することができる。

10

【0338】

抗FAM19A5抗体を精製する目的で、単クローン性抗体精製のために2Lスピナー-フラスコで選別されたハイブリドーマを成長させることができる。タンパク質A-セファロース(Pharmacia, Piscataway, NJ)を使用した親和性クロマトグラフィー前に上澄液を濾過及び濃縮することができる。純度を確保するために、溶出されたIgGを、ゲル電気泳動及び高性能液体クロマトグラフィーで確認することができる。緩衝液はPBSに交換でき、濃度は1.43吸光係数を使用するOD₂₈₀によって決定できる。単クローン性抗体を分取して-80℃で保管できる。

20

【0339】

選別された抗FAM19A5単クローン性抗体が固有なエピトープに結合するかどうか決定するために、市販の試薬(Pierce, Rockford, IL)を用いてそれぞれの抗体をビオチン化することができる。ビオチン化されたMAb結合は、ストレプトアビジン標識されたプローブで検出できる。未標識された単クローン性抗体及びビオチン化された単クローン性抗体を使用する競合研究を、上述したようにFAM19A5コーティングELISAプレートを用いて行うことができる。

【0340】

精製された抗体のアイソ型を決定するために、特定アイソ型の抗体に特異的な試薬を用いてアイソ型ELISAを行うことができる。例えば、ヒト単クローン性抗体のアイソ型を決定するために、微細力価プレートのウェルに1µg/mlの抗ヒト免疫グロブリンを4℃で一晩コートすることができる。1%BSAでブロックした後、プレートを1µg/ml以下の試験用単クローン性抗体又は精製されたアイソ型対照群と周囲温度で1~2時間反応させる。次に、ウェルをヒトIgG1又はヒトIgM-特異的アルカリ性フォスファターゼ接合プローブと反応させることができる。プレートを上述のように発色及び分析する。

30

【0341】

FAM19A5を発現させる生細胞に対する単クローン性抗体の結合を試験するために、実施例欄に記載されているとおり、流細胞分析法を用いることができる。簡単にいえば、膜結合FAM19A5(標準成長条件で成長される)を発現させる細胞株を、4℃で1時間、0.1%BSAを含有したPBS中様々な濃度の単クローン性抗体と混合する。洗浄後、細胞を1次抗体染色と同じ条件でフルオレセイン標識抗IgG抗体と反応させる。単一細胞をゲーティングオン(gating on)する光及び側面散乱特性を用いたFACSscan機器によって試料を分析することができ、標識された抗体の結合を決定する。流細胞分析法に加えて又は代えて蛍光顕微鏡を使用する他の分析法を用いてもよい。上に記載したとおりに細胞を正確に染色し、蛍光顕微鏡によって検査できる。この方法は、個別細胞を可視化できるが、抗原の密度によって感度が減少することがある。

40

【0342】

抗FAM19A5抗体は、FAM19A5抗原との反応性に対してウェスタンブロッテ

50

イングによってさらに試験できる。簡単にいえば、FAM19A5を発現させる細胞から細胞抽出物を製造し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことができる。電気泳動後に、分離された抗原をニトロセルロース膜に移し、20%マウス血清でブロッキングし、試験する単クローン性抗体でプローブする。IgG結合は、抗IgGアルカリフォスファターゼを用いて検出でき、BCIP/NBT基質精製(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)で発色させることができる。

【0343】

様々な抗FAM19A5抗体の結合親和度、交差反応性及び結合動力学を分析するための方法は、当業界に知られた標準分析法、例えば、BIACORE™ 2000 SPR機器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用したBIACORE™表面プラズモン共鳴(SPR)分析を含む。

10

【0344】

一具現例において、抗体は、可溶性形態のヒトFAM19A5に特異的に結合する。一具現例において、抗体は、膜結合形態のヒトFAM19A5に特異的に結合する。抗体はFAM19A5の特定エピトープ(例えば、配列番号90又は配列番号90内の断片)に特異的に結合できる。特定の具現例において、前記抗体は、好ましくは、高い親和度でヒトFAM19A5に特異的に結合し、タンパク質のFAM19サブファミリーの他のメンバーと交差反応しない。

【0345】

[VII. 二重特異的分子]

20

本明細書に記載の抗体を、二重特異的分子を形成するために使用することができる。抗FAM19A5抗体又はその抗原結合部分は誘導体化されたり、或いは別の機能性分子、例えば他のペプチド又はタンパク質(例えば、受容体に対する他の抗体又はリガンド)に連結されて少なくとも2個の異なる結合部位又は標的分子に結合する二重特異的分子を生成できる。IL-6、CNTF、LIF、EGF及びTGFのようなサイトカインは、以降、CNS損傷後反応性星状膠細胞症の多い様相を調節する転写のタンパク質信号伝達因子及び活性化因子3(STAT3)を活性化することによって神経膠症及び/又は反応性星状膠細胞症の発病促進因子として関与した(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)。Herrmann J. E. et al., J. Neurosci. 28(28): 7231-7243(2008)を参照する。例えば、STAT3が存在しないか減少すると、神経膠繊維質酸性タンパク質(GFAP)の上向き調節弱体化、星状細胞肥大の失敗及び炎症の拡散増加、病変体積の増加、CNS損傷後運動機能回復の部分的な弱体化として現れる。Herrmann J. E. et al., J. Neurosci. 28(28): 7231-7243(2008)を参照する。これによって、例えば、抗FAM19A5抗体は、例えば、IL-6、CNTF、LIF、EGF又はTGFに対する抗体のように、組合せ治療のための神経膠症の発病及び/又は反応性星状膠細胞症の過剰増殖の阻害に関与する任意のタンパク質に特異的に結合する抗体又はscFvに連結され得る。

30

40

【0346】

また、抗FAM19A5抗体は、対象の中枢神経系損傷(例えば、外傷性脳損傷、脳脊髄損傷、脳卒中又は脳腫瘍)、脳脊髄系損傷、退行性脳障害(例えば、ハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、ALS)、退行性脳脊髄又は神経障害又は神経病性疼痛を含む疾患又は障害を治療する抗体又はscFvに連結され得る(下のXII節における疾患又は障害参照)。例えば、抗FAM19A5抗体は、多発性硬化症を治療する抗体又はscFv、例えば、ナタリズマブ(TYSABRI(登録商標))、アレムツズマブ(LEMTRA(登録商標))に連結され得る。

【0347】

本明細書に記載の抗体は実際に誘導体化されたり或いは1個を超える他の機能性分子に

50

連結され、2個を超える異なる結合部位及び/又は標的分子に結合する多重特異的分子を生成でき；このような多重特異的分子はまた、本明細書で使われる用語“二重特異的分子”に含まれるものと意図される。本明細書に記載の二重特異的分子を生成するために、本明細書に記載の抗体は、他の抗体、その抗体結合部分、ペプチド又は結合模倣体のような一つ以上の他の結合分子に機能的に連結され（例えば、化学的結合、遺伝的融合、非共有会合などによって）二重特異的分子を得ることができる。一具現例において、二重特異的分子は、F A M 1 9 A 5 及び V E G F に結合する。さらに他の具現例において、二重特異的分子は、F A M 1 9 A 5 及び E G F に結合する。

【0348】

したがって、本明細書は、F A M 1 9 A 5 に対する少なくとも一つの第1結合特異体及び第2標的エピトープに対する第2結合特異体を含む二重特異的分子を提供する。前記二重特異的分子が多重特異的である本明細書に記載の具現例において、前記分子は第3結合特異体をさらに含むことができる。

【0349】

一具現例において、本明細書に記載の二重特異的分子は、結合特異体として、例えば F a b、F a b'、F (a b')₂、F v 又は単鎖 F v (s c F v) を含む少なくとも一つの抗体又はその抗体結合部分を含む。前記抗体はまた、その内容が参照によって明確に含まれる L a d n e r 等の米国特許番号 4, 9 4 6, 7 7 8 に記載されている軽鎖又は重鎖二量体、又は F v 又は単鎖構造体のようなその任意の最小断片であってもよい。

【0350】

ヒト単クローン性抗体が好ましいが、本明細書に記載の二重特異的分子に使用可能な他の抗体は、ネズミ、キメラ及びヒト化単クローン性抗体である。

【0351】

本明細書に記載の二重特異的分子は、当業界に公知の方法を用いて構成結合特異体を接合させることによって製造することができる。例えば、前記二重特異的分子のそれぞれの結合特異体を別個に生成した後、互いに接合させることができる。前記結合特異体がタンパク質又はペプチドであるとき、様々な結合剤又は架橋剤を共有接合のために使用することができる。架橋剤の例は、タンパク質 A、カルボジイミド、N-サクシニミジル-S-アセチル-チオ酢酸 (S A T A)、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (D T N B)、o-フェニレンジマレイミド (o P D M)、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (S P D P) 及びスルホサクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (s u l f o - S M C C) を含む (例えば、K a r p o v s k y e t a l . , (1 9 8 4) J . E x p . M e d . 1 6 0 : 1 6 8 6 ; L i u , M A e t a l . , (1 9 8 5) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 2 : 8 6 4 8)。他の方法としては、P a u l u s (1 9 8 5) B e h r i n g I n s . M i t t . N o . 7 8 , 1 1 8 - 1 3 2 ; B r e n n a n e t a l . , (1 9 8 5) S c i e n c e 2 2 9 : 8 1 - 8 3) 及び G l e n n i e e t a l . , (1 9 8 7) J . I m m u n o l . 1 3 9 : 2 3 6 7 - 2 3 7 5) に記載されている方法を含む。好ましい接合剤は S A T A 及び s u l f o - S M C C であり、いずれも P i e r c e C h e m i c a l C o . (R o c k f o r d , I L) から入手できる。

【0352】

前記結合特異体が抗体であるとき、これらは2個の重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフィドリル結合によって接合され得る。特に好ましい具現例において、前記ヒンジ領域は、接合前に奇数個、好ましくは1個のスルフィドリル残基を含有するように変形される。

【0353】

これと違い、2個の結合特異体が同一のベクターでコードされ、同一の宿主細胞で発現し且つ合わせられ得る。この方法は、二重特異的分子が m A b x m A b、m A b x F a b、m A b x (s c F v)₂、F a b x F (a b')₂ 又はリガンド x F a b 融合タンパク質である場合に特に有用である。二重特異的抗体は、各重鎖のC末端に s c F v を含む抗

体を含むことができる。本明細書に記載の二重特異的分子は、一つの単鎖抗体及び結合決定基を含む単鎖分子、又は2個の結合決定基を含む単鎖二重特異的分子であってよい。二重特異的分子は、少なくとも2個の単鎖分子を含むことができる。二重特異的分子を製造するための方法は、例えば、米国特許番号5,260,203；米国特許番号5,455,030；米国特許番号4,881,175；米国特許番号5,132,405；米国特許番号5,091,513；米国特許番号5,476,786；米国特許番号5,013,653；米国特許番号5,258,498；及び米国特許番号5,482,858に記載されている。

【0354】

前記二重特異的分子のその特異的標的に対する結合は、酵素 - 結合免疫吸着分析 (ELISA)、放射性免疫分析 (RIA)、FACS分析、生物分析 (例えば、成長阻害) 又はウェスタンブロット分析のような当業界で認定された方法を用いて確認することができる。これらの分析法はそれぞれ一般に、特別な関心のあるタンパク質 - 抗体複合体に特異的な標識された試薬 (例えば、抗体) を用いることによって前記複合体の存在を検出する。

【0355】

[IX. 診断]

一具現例において、抗FAM19A5抗体に付着したモイエティは、結合モイエティ、標識モイエティ及び生物学的活性モイエティからなる群から選ばれる。

【0356】

本明細書に記載の抗体は、試料テスト及び生体内映像化を含む診断目的で使用することができ、この目的のために前記抗体 (又は、その結合部分) を適切な検出可能な製剤に接合させて免疫接合体を形成することができる。診断目的のために適切な製剤は、全身映像化のための放射性同位元素及び試料テストのための放射性同位元素、酵素、蛍光標識及びその他適切な抗体タグを含む、検出可能な標識である。

【0357】

前記検出可能な標識は、コロイド性金のような金属ゾルを含む微粒子標識、例えば、N₂S₂、N₃S又はN₄タイプのペプチドキレート化剤で提示されたI¹²⁵又はTc⁹⁹のような同位元素、蛍光マーカー、発光マーカー、燐光マーカーなどを含む発色団などだけでなく、所定の基質を検出可能なマーカーに転換させる酵素標識及び例えば重合酵素連鎖反応による増幅後確認されるポリヌクレオチドタグを含め、試験管内診断分野で現在用いられている様々な種類の任意のものであってよい。適切な酵素標識にはセイヨウワサビ過酸化酵素、アルカリ性フォスファターゼなどが含まれる。例えば、前記標識は、アダマンチルメトキシホスホリルオキシフェニルジオキセタン (AMPPD)、ジソジウム3-(4-(メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ{3.3.1.1.3,7}デカン}-4-イル)フェニルホスフェート (CSPD) だけでなく、CDP及びCDP-star (登録商標) のような1,2-ジオキセタン基質又は当業者によく知られた他の発光基質、例えば、テルビウム (III) 及びユウロピウム (III) のような適切なランタン系キレートの転換後に化学発光の存在又は形成を測定して検出される酵素アルカリ性フォスファターゼであってもよい。検出手段は、選択された標識によって決定される。前記標識又はその反応生成物の外観は、前記標識が微粒子であり、適切なレベルに蓄積される場合に、肉眼を用いたり或いは分光光度計、発光計、蛍光計などのような機器を用いるが、いずれも標準施行によって得ることができる。

【0358】

本明細書に記載の抗体はまた、抗体 - 薬物接合体 (ADC) のような免疫接合体を形成するために治療剤に接合させることができる。適切な治療剤は、神経膠症及び/又は反応性星状膠細胞症の発病を調節し及び/又は退行性脳障害、中枢神経系損傷又は神経病性疼痛を治療する製剤を含む。退行性脳障害を治療するための治療剤には、ハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症及び筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療用薬物が含まれる。ここには、このような退行性脳障害を治療するために一般的に使

れる薬物、例えば、下のXII節に開示されている薬物が含まれる。

【0359】

免疫接合体は、当業界に公知の方法によって製造できる。好ましくは、接合方法の結果として、実質的に（又は、殆ど）非免疫原性である結合、例えばペプチド-（すなわち、アミド-）、スルフィド-、（立体障害）、ジスルフィド-、ヒドラゾン-及びエーテル結合が現れる。これらの結合はほとんど非免疫原性であり、血清内で相当な安定性を示す（例えば、Senter, P. D., Curr. Opin. Chem. Biol. 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886 参照）。

【0360】

前記モイエティ及び抗体の生化学的屬性によって異なる接合戦略を用いることができる。前記モイエティが自然発生であるか、50~500個アミノ酸の組換えである場合、タンパク質接合体の合成のための化学的方法を説明する標準手順が教材にあり、当業者であれば容易に従うことができる（例えば、Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47 (2008) 10030-10074）。一具現例において、前記抗体又はモイエティ内システイン残基とマレインイミドモイエティの反応を利用する。これは、例えば、抗体のFab又はFab'断片を使用する場合に特に適切なカップリング化学である。これと違い、一具現例では、前記抗体又はモイエティのC末端にカップリングを行う。タンパク質、例えばFab-断片のC末端変形は、例えば、Sunbul, M. and Yin, J., Org. Biomol. Chem. 7 (2009) 3361-3371に記載されたとおりに行うことができる。

【0361】

一般に、部位特異的反応及び共有結合は、天然アミノ酸を、存在する他の官能基の反応性と直交（orthogonal）する反応性を有するアミノ酸に変換することに基盤する。例えば、希配列コンテキスト（context）内特定システインはアルデヒドに酵素的に変換され得る（Frese, M. A. and Dierks, T., ChemBioChem. 10 (2009) 425-427 参照）。所定の配列コンテキスト内天然アミノ酸と特定酵素の特異的酵素反応性を用いて所望のアミノ酸変形を得ることもできる（例えば、Taki, M. et al., Prot. Eng. Des. Sel. 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al., Chem. Biol. 15 (2008) 128-136; and Protease-catalyzed formation of C-N bonds is used by Bordusa, F., Highlights in Bioorganic Chemistry (2004) 389-403 参照）。

【0362】

部位特異的反応及び共有結合はまた、適切な変形試薬と末端アミノ酸の選択的反応によって達成され得る。ベンゾニトリルとN末端システインの反応性（Ren, H. et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48 (2009) 9658-9662 参照）を用いて部位-特異的共有結合を得ることができる。天然化学結紮はまた、C末端システイン残基に依存し得る（Taylor, E. Vogel; Imperiali, B., Nucleic Acids and Molecular Biology (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96）。

【0363】

EP 1 074 563は、一連の正に荷電されたアミノ酸内位置したシステインと一連の負に荷電されたアミノ酸内システインのより速い反応を基盤とする接合方法を記載している。

【0364】

前記モイエティは、合成ペプチド又はペプチド模倣体であってもよい。ポリペプチドが化学的に合成される場合、このような合成中に直交する化学反応性を有するアミノ酸が導

10

20

30

40

50

入され得る（例えば、de Graaf, A. J. et al., *Bioconj. Chem.* 20 (2009) 1281-1295 参照）。非常に様々な直交する官能基は不安定であり、合成ペプチドに導入され得るので、当該ペプチドをリンカーに接合することは標準化学的方法である。

【0365】

単一標識ポリペプチドを得るために 1 : 1 化学量論比を持つ接合体を、他の接合副産物からクロマトグラフィーによって分離できる。この過程は、染料標識された結合対メンバー及び荷電されたリンカーを用いることによって容易になり得る。このような種類の標識及び高く負に荷電された結合対メンバーを使用することによって、分離のために電荷と分子量差を利用できるので、非標識ポリペプチド及び 1 個よりも多いリンカーを保有しているポリペプチドから、単一接合されたポリペプチドが容易に分離される。前記蛍光染料は、標識された 1 価結合剤のように、未結合成分から複合体を精製するのに有用できる。

10

【0366】

[X . 薬剤学的組成物]

本明細書は、生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤 (Remington's *Pharmaceutical Sciences* (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA) において所望の程度の純度を持つ、本明細書に記載された抗体又はその抗原結合部分を含む組成物を提供する。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、使用された投与量及び濃度において、受容者に非毒性であり、ホスフェート、シトレート及びその他の有機酸のような緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及び m-クレゾールのような）；低分子量（約 10 個未満の残基）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン (lysine) のようなアミノ酸；単糖類、二糖類及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA のようなキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールのような糖；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；及びノ又は TWEENTM（登録商標）、PLURONICS（登録商標）又はポリエチレングリコール (PEG) のような非イオン性界面活性剤を含む。

20

30

【0367】

特定の具現例において、薬剤学的組成物は、薬剤学的に許容される担体に、本明細書に記載された抗体又はその抗原結合部分、二重特異的分子又は免疫複合体、及び場合によって一つ以上の追加の予防剤又は治療剤を含む。特定の具現例において、薬剤学的組成物は、薬剤学的に許容される担体に、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分の有効量及び場合によって一つ以上の追加予防剤又は治療剤を含む。一部の具現例において、前記抗体は、前記薬剤学的組成物に含まれた唯一の活性成分である。本明細書に記載の薬剤学的組成物は、FAM19A5 活性を増進、誘導又は活性化し、中枢神経系損傷、退行性脳障害又は神経病性疼痛のような症状を治療するのに有用であり得る。

40

【0368】

非経口製剤において用いられる薬剤学的に許容される担体は、水性ビークル、非水性ビークル、抗微生物剤、等張化剤、緩衝剤、抗酸化剤、局所麻酔剤、懸濁及び分散剤、乳化剤、金属イオン封鎖剤又はキレート化剤及びその他の薬剤学的に許容される物質を含む。水性ビークルの例は、塩化ナトリウム注射液、点滴注射液、等張デキストロース注射液、滅菌水注射液、デキストロース及びラクテート点滴注射液を含む。非水性非経口ビークルは、植物起源の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油及びピーナッツ油を含む。静菌又は静真菌濃度の抗微生物剤がフェノール又はクレゾール、水銀含有物質、ベンジルアル

50

コール、クロロブタノール、メチル及びプロピル p - ヒドロキシベンゾ酸エステル、チメロサル、ベンザルコニウムクロリド及びベンゼトニウムクロリドを含む多回容量容器にパッケージされた非経口製剤に添加され得る。等張化剤は、塩化ナトリウム及びデキストロースを含む。緩衝剤は、ホスフェート及びシトレートを含む。抗酸化剤は、硫酸水素ナトリウムを含む。局所麻酔剤は、プロカイン塩酸塩を含む。懸濁及び分散剤は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びポリビニルピロリドンを含む。乳化剤は、Polysorbate 80 (TWEEN (登録商標) 80) を含む。金属イオンの封鎖剤又はキレート化剤は、EDTAを含む。薬剤学的担体はまた、水混和性ピークル用エチルアルコール、ポリエチレングリコール及びプロピレングリコール；及び pH 調整のための水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸又は乳酸を含む。

10

【0369】

薬剤学的組成物は、対象に対する任意の投与経路のために剤形化できる。投与経路の特定例は、鼻内、経口、非経口、脊髄腔内、脳室内、肺、皮下又は心室内を含む。本明細書では、皮下、筋肉内又は静脈内注射を特徴とする非経口投与も考慮される。注射剤は、従来の形態であり、液体溶液や懸濁液、注射前に液体中溶液又は懸濁液に適した固体形態で製造されたり又は乳化液として製造され得る。注射剤、溶液及び乳化液はまた、1つ以上の賦形剤を含有する。適切な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール又はエタノールである。また、必要な場合、投与する薬剤学的組成物はまた、少量の湿潤又は乳化剤、pH 緩衝剤、安定化剤、溶解度増進剤のような非毒性補助物質及び例えば酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレート及びシクロデキストリンのような製剤を含有できる。

20

【0370】

抗体の非経口投与用製剤は、注射用即席滅菌液、皮下注射用錠剤を含めて使用直前に溶媒と即席で調合できる凍結乾燥粉末のような滅菌乾燥可溶性製品、注射用即席滅菌懸濁液、使用直前にピークルと即席調合できる滅菌乾燥不溶性製品及び滅菌乳化液を含む。前記溶液は、水性又は非水性であり得る。

【0371】

静脈内投与の場合、適切な担体は、生理食塩水又はリン酸緩衝食塩水 (PBS) 及びグルコース、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール及びこれらの混合物のような増粘剤と可溶化剤を含有する溶液を含む。

30

【0372】

抗体を含む局所用混合物は、局所及び全身投与に対して記載の通りに製造される。その結果として得た混合物は、溶液、懸濁液、乳化液などであり得、クリーム、ゲル、軟膏、乳化液、溶液、エリキシル、ローション、懸濁液、チンキ、ペースト、フォーム、エアゾール、灌注液 (irrigation)、スプレー、坐薬、包帯、皮膚パッチ又は局所投与に適した任意の他の剤形として剤形化できる。

【0373】

本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分は、例えば、吸入による局所用エアゾールとして剤形化できる (例えば、炎症性疾患、特に、喘息治療に有用なステロイド伝達用エアゾールを記載している米国特許第 4,044,126, 4,414,209 号及び第 4,364,923 号を参照)。気道投与用のこれらの剤形は、噴霧器用エアゾール又は溶液形態であるか、吸入剤用微細粉末であり、単独又はラクトースのような非活性担体と組み合わせることができる。このような場合、剤形の粒子は、一具現例において、50 ミクロン未満の直径、一具現例では 10 ミクロン未満の直径を有する。

40

【0374】

本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分は、目におけるような皮膚と粘膜への局所塗布のように局所用又は局部用に、ゲル、クリーム及びローションの形態で、及び目に適用又は槽内 (intracasternal) 又は脊髄内適用のために剤形化できる。局所投与は、経皮伝達用にそして目や粘膜投与用又は吸入療法用にも考慮される。前記抗体の点鼻液 (nasal solution) は、単独で、或いは他の薬剤学的に許容され

50

る賦形剤との組合せで投与できる。

【0375】

イオン泳動及び電気泳動デバイスを含む経皮パッチは、当業者には周知であり、抗体を投与するために用いることができる。例えば、このようなパッチは、米国特許番号第6, 267, 983号、第6, 261, 595号、第6, 256, 533号、第6, 167, 301号、第6, 024, 975号、第6, 010, 715号、第5, 985, 317号、第5, 983, 134号、第5, 948, 433号及び第5, 860, 957号に開示されている。

【0376】

特定の具現例において、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分を含む薬剤学的組成物は、溶液、乳化液及びその他の混合物として投与用に再構成できる凍結乾燥粉末である。前記凍結乾燥粉末はまた、固体又はゲルとして再構成及び剤形化できる。前記凍結乾燥粉末は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分、又はその薬剤学的に許容される誘導体を適切な溶媒に溶解させてなる。一部の具現例において、前記凍結乾燥粉末は、滅菌性である。前記溶媒は、前記粉末又は前記粉末から製造された再構成溶液の安定性又はその他の薬理学的成分を改善する賦形剤を含有できる。使用可能な賦形剤は、デキストロース、ソルビトール、フルクトース、トウモロコシシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロース又はその他の適切な製剤を含むが、これに限定されるものではない。前記溶媒はまた、シトレート、リン酸ナトリウム又はリン酸カリウムのような緩衝剤、又は一具現例において略中性pHの周知の他の緩衝剤を含有できる。次いで、前記溶液を滅菌濾過した後、当業者に公知された標準条件で凍結乾燥させ、所望の剤形を提供する。一具現例において、前記得られた溶液は、凍結乾燥用バイアルに配分され得る。それぞれのバイアルは、前記化合物の単一投与量又は多回の投与量を含有できる。前記凍結乾燥した粉末は、約4 ~ 常温のような適切な条件で保管され得る。

【0377】

このような凍結乾燥した粉末を注射用水によって再構成し、非経口投与用に使用するための剤形を提供する。再構成のために、前記凍結乾燥した粉末を、滅菌水又は他の適切な担体に添加する。その正確な量は、選択した化合物によって異なる。このような量は、経験的に決定できる。

【0378】

本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分、二重特異的分子又は免疫複合体、及び本明細書に提供された他の組成物はまた、治療する対象の特定組織、受容体又は他の身体領域を標的にするよう剤形化されてもよい。このような標的化方法の多数が当業者によく知られている。本明細書において、このような標的化方法はいずれも、本組成物に使用することが考慮される。標的化方法の非制限的な例については、例えば、米国特許第6, 316, 652号、第6, 274, 552号、第6, 271, 359号、第6, 253, 872号、第6, 139, 865号、第6, 131, 570号、第6, 120, 751号、第6, 071, 495号、第6, 060, 082号、第6, 048, 736号、第6, 039, 975号、第6, 004, 534号、第5, 985, 307号、第5, 972, 366号、第5, 900, 252号、第5, 840, 674号、第5, 759, 542号及び第5, 709, 874号を参照する。特定の具現例において、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分は、中枢神経系損傷、退行性脳障害又は神経病性疼痛を治療するために標的化され得る。

【0379】

生体内投与のために用いられる組成物は、滅菌性であり得る。これは、例えば滅菌濾過膜を用いた濾過によって容易に行われる。

【0380】

[VIIII. キット]

本明細書は、本明細書に記載の一つ以上の抗体又はその抗原結合部分を含むキットを提供する。特定の具現例において、本明細書は、本明細書に提供された一つ以上の抗体又は

10

20

30

40

50

その抗原結合部分のような、本明細書に記載の薬剤学的組成物の成分の一つ以上が満たされた一つ以上の容器、及び場合によって使用説明書を含む、薬剤学的パック又はキットを提供する。一部の具現例において、前記キットは、本明細書に記載の薬剤学的組成物及び本明細書に記載されたような任意の予防剤又は治療剤を含有する。

【0381】

[XII. 治療用途及び方法]

本明細書はまた、必要とする対象（例えば、ヒト）にCNSに対する傷害又は損傷を軽減させるための方法として、前記対象に本明細書に記載の抗FAM19A5抗体、二重特異的分子又は免疫接合体又はその組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0382】

他の態様において、本明細書は、対象において神経膠症の始まり又は開始及びこれに関連したCNSの有害な影響を阻害、遅延、抑制、制限、減少、反転又は予防するための方法として、前記対象に本明細書に開示の抗FAM19A5抗体を投与することを含む方法を提示する。一部の具現例において、本明細書は、対象で反応性星状細胞の過度又は異常の増殖及びこれに関連したCNSの有害な影響を阻害、遅延、抑制、制限、減少、反転又は予防するための方法として、前記対象に本開示内容の抗FAM19A5抗体を投与することを含む方法を提示する。一部の具現例において、本明細書は、対象でコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ニューロカン、NG2、又はこれら両方のレベルを含む）の発現を減少、阻害又は低減するか、又はニューロカン、NG2又は両方の活性を減少させたり或いは不活性化するための方法として、前記対象に本明細書に記載の抗FAM19A5抗体を投与することを含む方法を提示する。一部の具現例において、本明細書は、対象で好ましくは傷害又は損傷後に神経細胞の成長を刺激、促進、増加又は活性化するための方法として、前記対象に本明細書に記載の抗FAM19A5抗体を投与することを含む方法を提示する。他の具現例において、本明細書は、必要とする対象でc-fos mRNA、c-fosタンパク質又はc-fosタンパク質活性のレベルを増加させ、好ましくは神経細胞の核内ERK mRNA、ERKタンパク質又はpERK活性のレベルを増加させるための方法として、前記対象に本開示内容の抗FAM19A5抗体を投与することを含む方法を提示する。特定の具現例において、本明細書は、必要とする対象でGAP43 mRNA、GAP43タンパク質のレベルを増大又は増加させるか、好ましくは神経細胞においてGAP43タンパク質の活性を増加させるための方法として、前記対象に本明細書に開示の抗FAM19A5抗体を投与することを含む方法を提示する。特定の具現例において、本明細書は、必要とする対象で神経細胞の生存を増進又は促進し及び/又は軸索の再成長を促進させるための方法として、前記対象に本明細書に開示の抗FAM19A5抗体を投与することを含む方法を提示する。一部の具現例において、前記対象はヒト、好ましくは、例えばCNS損傷、外傷、傷害、脳脊髄損傷、脳腫瘍、感染、虚血、脳卒中、反応及び/又は神経退行性疾患から神経細胞が傷害又は損傷したヒトである。

【0383】

一部の態様において、本明細書はまた、必要とする対象で疾患、障害又は症状を治療するための方法として、前記対象に本開示内容の抗FAM19A5抗体を投与することを含む方法を提示する。一部の具現例において、前記疾患、障害又は症状は、中枢神経系損傷、脳脊髄系損傷、退行性脳障害、退行性脳脊髄又は神経障害又は神経病性疼痛を含む。一部の具現例において、前記中枢神経系損傷は、外傷性脳傷害、脳脊髄損傷、脳卒中、脳腫瘍又はこれらの組合せである。一部の具現例において、前記退行性脳障害は、ハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）又はこれらの組合せである。これによって、特定の具現例において、本明細書は、必要とする対象で外傷性脳損傷、脳脊髄損傷、脳卒中、脳腫瘍又はこれらの組合せを治療するための方法として、前記対象に本明細書に開示の抗FAM19A5抗体又はその組成物を投与することを含む方法を提示する。一部の具現例において、本明細書は、必要とする対象でハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、ALSを治療するための方法として、前記対象に本明細書に開示の抗FAM19A5抗体又はその組成

10

20

30

40

50

物を投与することを含む方法を開示する。一部の具現例において、前記対象は、ヒトである。

【0384】

一部の具現例において、抗FAM19A5抗体は、中枢神経系損傷（例えば、外傷性脳損傷、脳脊髄損傷、脳卒中又は脳腫瘍）、脳脊髄系損傷、退行性脳障害（例えば、ハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、ALS）、退行性脳脊髄又は神経障害又は神経病性疼痛を治療するための一つ以上の追加製剤と組み合わせて投与され得る。

【0385】

一部の具現例において、前記疾患、障害又は症状は、腫瘍、線維症、緑内障、網膜症、老化関連黄斑変性又は気分障害を含む。特定の具現例において、前記疾患、障害又は状態は、腫瘍を含む。一部の具現例において、前記腫瘍は、黒色腫、膵癌、神経膠腫（例えば、多形成膠芽細胞腫（GBM））、乳癌、リンパ腫、肺癌、腎臓癌、前立腺癌、線維肉腫、結腸腺癌、肝癌又は卵巣癌を含む。

10

【0386】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、例えば腫瘍内で血管の正常化を誘導する。一部の具現例において、前記血管の正常化は、連結性増加、壁厚増加、血管径減少、より規則的な血管方向及び分布パターン、血管数増加、漏れ及び透過性減少、血管上で血管周囲細胞カパレッジ及び近接性増加、酸素供給増加又はこれらの組合せを含む血管の特性変化を伴う。

20

【0387】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、腫瘍の成長を抑制する。一部の具現例において、前記腫瘍の成長は、基準（例えば、抗FAM19A5抗体を非投与した対象において腫瘍の成長）に比べて少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%まで抑制される。

【0388】

一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、免疫細胞の腫瘍浸潤を増大させる。一部の具現例において、前記免疫細胞の腫瘍浸潤は、基準（例えば、抗FAM19A5抗体を非投与した癌対象）に比べて少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%増大/増加する。特定の具現例において、前記免疫細胞は、大食細胞、樹状細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、自然殺害（NK）細胞又はこれらの組合せを含む。一部の具現例において、前記免疫細胞は、肥大を表す。一部の具現例において、前記免疫細胞の腫瘍浸潤は、神経細胞の腫瘍浸潤増加を伴う。特定の具現例において、前記神経細胞は、星状細胞、膠細胞又はこれらの組合せを含む。

30

【0389】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、大食細胞又は小膠細胞の食細胞活性を増進させる。一部の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、大食細胞又は小膠細胞のミトコンドリア膜電位を増加させる。特定の具現例において、前記食細胞活性又はミトコンドリア膜電位は、基準（例えば、抗FAM19A5抗体を非投与した癌対象）に比べて少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%増進又は増加する。

40

【0390】

一部の具現例において、本開示内容の抗FAM19A5抗体は、腫瘍において壊死及び浮腫を減少させる。他の具現例において、前記抗FAM19A5抗体は、腫瘍の組織透過性を減少させる。一部の具現例において、前記腫瘍の壊死及び浮腫又は組織透過性は、基準（例えば、抗FAM19A5抗体を非投与した癌対象）に比べて少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%減少する。

【0391】

50

一部の具現例において、前記抗 F A M 1 9 A 5 抗体は、腫瘍において血流速度を増加させる。特定の具現例において、前記血流速度は、基準（例えば、抗 F A M 1 9 A 5 抗体を非投与した癌対象）に比べて少なくとも 5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 1 0 0 % 増加する。

【 0 3 9 2 】

一部の具現例において、前記腫瘍治療方法は、追加の治療剤を投与することを含む。特定の具現例において、前記追加の治療剤は、化学療法、免疫療法、放射線療法又はこれらの組合せを含む。一部の具現例において、前記免疫療法は、単クローン性抗体、キメラ抗原受容体（C A R）療法、T - 細胞療法、NK - 細胞療法、樹状細胞（D C）療法、養子細胞伝達（A C T）、免疫関門調節剤（i m m u n e c h e c k p o i n t m o d u l a t o r）、サイトカイン、癌ワクチン、補助剤、腫瘍溶解性ウイルス又はこれらの組合せを含む。一部の具現例において、前記化学療法は、テモゾロミド、ゲムシタピン、パクリタキセル、カルボプラチン、シスプラチン、エロツズマブ、レナリドマイド、デキサメタゾン、オキサリプラチン又はこれらの組合せを含む。

10

【 0 3 9 3 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体又はその組成物の治療有効量が投与される。対象（例えば、ヒト）治療時に、本明細書に開示の抗 F A M 1 9 A 5 抗体の治療有効量は、年齢、性別、疾患重症度のような因子によって変わる。

【 0 3 9 4 】

一部の具現例において、本開示内容の抗 F A M 1 9 A 5 抗体又はその組成物は、静脈内、経口、非経口、硬膜内、脊髄腔内、脳室内、肺、皮下、血内、筋肉内又は心室内投与される。

20

【 0 3 9 5 】

後述する実施例は限定されない例示として提供される。

【 0 3 9 6 】

[実施例]

[実施例 1 ヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質の発現及び精製]

下に記載の通りに組換えヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質を生産及び精製し、精製されたタンパク質を結合親和度分析に基づいて抗体スクリーニング分析に使用した。まず、F A M 1 9 A 5 遺伝子を発現させる L P S - h T プラスミドをバクテリアに形質転換させ、タンパク質過発現を誘導した。生産後、F A M 1 9 A 5 タンパク質を、Ni - N T A 親和性クロマトグラフィー（Q i a g e n , V a l e n c i a , C A , U S A）を用いて精製した。次第により高い濃度のイミダゾールを用いて H i s - 標識 F A M 1 9 A 5 タンパク質を Ni - カラムから除去した。前記溶液においてタンパク質発現は、C o o m a s s i e B r i l l i a n t B l u e R - 2 5 0 染料を用いて測定する。F A M 1 9 A 5 イミダゾール含有溶液だけを取り、P B S を用いて F A M 1 9 A 5 タンパク質を濃縮させた。濃縮が完了すれば、ウェスタンブロット分析法を用いて F A M 1 9 A 5 タンパク質の純度及び濃度を測定した。次いで、濃縮したタンパク質を用いて F A M 1 9 A 5 特異的抗体をスクリーニングした。

30

【 0 3 9 7 】

[実施例 2 抗 F A M 1 9 A 5 抗体ライブラリーの製造]

1 . 免疫化

F A M 1 9 A 5 タンパク質をホワイトレグホンニワトリの免疫化のための抗原として使用し、5 0 μ g の合成ペプチド K L H 接合体を 7 5 0 μ L のリン酸緩衝生理食塩水（P B S）で混合し、3 7 °C で 3 0 分間培養した。その後、油中水乳化補助剤（R I B I + M P L + T D M + C W S アジュバント、S i g m a , S t . L o u i s , M o , U S A）を含有する T D W 及び C W S の細胞壁成分の 2 % スクアレン耐毒素 M P L（モノホスホリルリピド A 種）及びミコバクテリア（m y c o b a c t e r i a）から毒素を除去し、乳化させた後、ニワトリに皮下注射した。免疫化中にニワトリを略 2 ~ 3 週間隔で総 4 回免疫化させた。免疫化した動物から得た抗体の力価を、F A M 1 9 A 5 タンパク質を過発現させ

40

50

たHEK293T細胞の溶解物を使用する免疫ブロッティングで測定した。

【0398】

2. 免疫化されたニワトリから単鎖可変断片(scFv)ライブラリーの製造

TRI試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて、上述の免疫化されたニワトリの脾臓、骨髄及びファブリキウス嚢からRNAを抽出した。オリゴ-dTプライマーとSUPERSCRIPT™ III First-Strand Synthesis System(Invitrogen)を用いて第1鎖cDNAを合成した。前記動物の免疫系から得たcDNAの場合、Expand High Fidelity PCRシステム(Roche Molecular Systems, IN, USA)を用いて単鎖可変領域ライブラリーを製造した。各反応において、1µLのcDNA、60pmolの各プライマー、10µLの10×反応緩衝液、8µLの2.5mM dNTP(Promega, Madison, WI, USA)及び0.5µLのTaq DNA重合酵素を水と混合した。最終体積は100µLであった。次のような条件を用いてPCR反応を行った：(i)94 で15秒、(ii)56 で30秒、(iii)72 で90秒の30サイクル後、最後に72 で10分間延長した。約350bp長さの断片を含むPCR産物を1.5%アガロースゲルにローディングし、電気泳動後にQIAGEN Gel II抽出キット(QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いてヌクレオチド断片を精製した。精製されたPCR産物をOD260nmで判読して定量化した(1単位OD=50µg/ml)。

10

【0399】

2番目のPCRで2個のVH及びVL第1産物を重複延長PCR(Overlap extension PCR)によって無作為に連結した。それぞれのPCR反応産物を、精製された100ngのVL及びVH産物、60pmolの各プライマー、10µLの10×反応緩衝液、8µLの2.5mM dNTP、0.5µLのTaq DNA重合酵素及び水と最終体積100µLで混合した。次のような条件を用いてPCR反応を行った：(i)94 で15秒、(ii)56 で30秒、(iii)72 で2分の25サイクル後、最後に72 で10分間延長した。約700bp長の単鎖可変領域断片を含むPCR産物を1.5%アガロースゲルにローディングし、電気泳動後にQIAGEN IIゲル抽出キット(QIAGEN)を用いてヌクレオチド断片を精製した。精製されたPCR産物をOD260nmで判読して定量化した(1単位OD=50µg/ml)。

20

30

【0400】

3. ライブラリー、結紮及び形質転換

前記PCR産物のscFv断片とベクターpComb3X-SS(The Scripps Research Institute, CA, USA)をSfi I制限酵素で分解した。10µgの精製された重複PCT産物を、360ユニットのSfi I(16単位当たりのDNA(µg)、Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA)、20µLの10×反応緩衝液及び水と最終体積200µLまで混合した。20µgのpComb3X-SSベクターを120ユニットのSfi I(6ユニット当たりのDNA(µg))、20µLの10×反応緩衝液及び水と最終体積200µLまで混合した。この混合物を50 で8時間分解した。その後、scFv断片(約700bp)とベクター(約3400bp)を含む分解産物を1%アガロースゲルにローディングし、Gel Extraction II QIAGEN(QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いて精製した。1400ngのSfi I-制限pComb3Xベクター及び700ngの分解されたscFv断片を5×リガーゼ緩衝液、10µLのT4DNAリガーゼ(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)及び水と最終体積200µLまで混合した。この混合物を16 で16時間培養して結紮を行った。

40

【0401】

エタノールで沈殿させた後、DNAペレットを15µLの水に溶解させた。ライブラリーを生成するために、結紮試料を、パイプレーター遺伝子(Gene pulser:B

50

io - Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用する電気穿孔によって E. coli 菌株 ER2738 (New England Biolabs Inc., Hitchin, Hertfordshire, SG4 OTY, England, UK) に形質転換した。細胞を 5 ml スーパーブロス (SB) 培地で混合し、37 で 1 時間、250 rpm で攪拌しつつ培養した。次に、3 μ L の 100 mg / mL カナマイシンを 10 mL の SB 培地に添加した。ライブラリーサイズを決定するために、0.1 μ L、1 μ L 及び 10 μ L の培養試料を、50 μ g / mL のカナマイシンが含まれているルリアブロス (LB) 寒天プレートに塗抹した。1 時間攪拌した後、4.5 μ L の 100 mg / mL カナマイシンを LB 培養物に添加し、さらに 1 時間攪拌した。次に、水中 2 mL の VCM13 ヘルパーファージ ($> 10^{11}$ cfu / mL) を、92.5 μ L の 100 mg / mL カナマイシンを含有している予熱された LB (183 mL) と共に LB 培地に添加した。この混合物をさらに 2 時間 37 で 250 rpm で攪拌した。次に、280 μ L (50 mg / mL) のカナマイシンを培養物に添加し、37 で一晩攪拌した。翌日、バクテリアペレットを高速遠心分離機 (Beckman, JA-10 rotor) を用いて 3,000 g、4 で遠心分離した。その後、バクテリアペレットを用いてファージミド DNA を抽出する一方、上澄液は滅菌遠心分離瓶に移した。次に、上澄液に 8 g のポリエチレングリコール - 8000 (PEG - 8000, Sigma) と 6 g の塩化ナトリウム (NaCl, Merck) を添加した後、30 分間氷で保管した。その後、上澄液を 15,000 g、4 で 15 分間遠心分離した。その後、上澄液を捨て、ファージペレットを、1% BSA を含有しているトリス - 緩衝食塩水 (TBS) に再懸濁した。

【0402】

〔実施例 3 固定化された抗原上でライブラリーパンニング (バイオパンニング)〕

磁気ビーズ (Dynabeads M-270 Epoxy, Invitrogen) を用いてバイオパンニングを行った。約 1×10^7 個のビーズを 5 μ g の組換え FAM19A5 タンパク質と共に 20 時間常温で回転させながら前記タンパク質でビーズを攪拌によってコートした。コーティングが完了すれば、ビーズをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 4 回洗浄し、常温で 3% BSA 含有 PBS で 1 時間ブロッキングした。次に、コートしたビーズを、上記のファージ - ディスプレイされた scFv と共に常温で 2 時間培養した。抗原コーティングされたビーズに結合していないファージを除去するために、ビーズを 0.05% Tween 20 / PBS で洗浄した。次に、結合したファージを 50 μ L の 0.1 M グリシン / 塩化水素 (0.1 M Glycine - HCl, pH 2.2) で溶出させ、塩化水素と共に 3 μ L の 2 M トリス (tris - HCl, pH 9.1) で中和させた。このファージ含有上澄液を用いて E. coli ER2738 細胞を感染させ、VCM13 ヘルパーファージを用いて一晩増幅及び救出 (rescue) した。また、50 μ g / mL のカナマイシンを含有した LB 寒天プレートでファージ - 感染培養物をプロットングし、ファージ - 感染培養物からファージ力価による投入 (input) 及び生産 (output) を決定した。翌日、PEG - 8000 と NaCl を用いてファージを沈殿させ、続いて、バイオパンニングのために使用した。上の過程を反復して総 5 回までバイオパンニングを行った。それぞれの増幅によって FAM19A5 タンパク質に対する高い親和性に対してファージをスクリーニング及び選別した。

【0403】

〔実施例 4 ファージ ELISA によるクローン選別〕

バイオパンニングから選別したクローンを分析するために、ファージ - ディスプレイ scFv から個別クローンを無作為に選別し、前記クローンが FAM19A5 組換えタンパク質に結合するか否かを ELISA で確認した。前記 FAM19A5 組換えタンパク質を 0.1 M NaHCO₃ 緩衝液に希釈し、100 ng / well のタンパク質を用いて 4 で 16 時間 96 ウェル微細力価プレートをコートした。翌日、前記プレートを 37 で 3% BSA / PBS で 1 時間ブロッキングした。その後、ファージ上澄液を 6% BSA / PBS と混合し、37 で 2 時間培養した。次に、前記上澄液を含有したプレートを

0.05% Tween-20/PBSで洗浄した。HRP接合M13抗体(a-M13-HRP, Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA)を1/5000に希釈した。50 μ lの希釈された抗体をプレートに入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。培養及び洗浄後に、発色のためにプレートに0.05Mクエン酸塩緩衝液、1 μ g/mlの2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS, Amresco, Solon, OH, USA)及び0.1% H₂O₂を添加した。各ウェルに対する吸光度を405nmで測定した。

【0404】

初期同定した96個のクローンから、固有の重鎖CDR3(HCDR3)配列及びFAM19A5タンパク質に対する高い結合を持つ8個のscFvクローンを、追加分析のために選別した。図1A~図1Cを参照する。 10

【0405】

〔実施例5 抗FAM19A5-IgG2/4抗体の生産〕

抗FAM19A5 scFvを哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。FAM19A5 scFv遺伝子配列において、ヒトC_H1遺伝子を軽鎖可変ドメインに連結し、C_H1、C_H2及びC_H3遺伝子のヒト免疫グロブリンアイソ型IgG2/4を重鎖可変領域に連結した。制限部位(Genscript, USA)を追加して各軽鎖及び各重鎖を持つ抗体を合成した。変形された制限部位を持つ哺乳類細胞発現ベクターに合成された遺伝子を挿入してクローニングを容易にさせた。まず、HindIII及びXbaI(New England Biolabs, UK)制限酵素を用いてベクターに軽鎖遺伝子を挿入した後、NheI及びBamHI(New England Biolabs, UK)制限酵素を用いてベクターに重鎖遺伝子を追加した。 20

【0406】

抗FAM19A5-IgG2/4抗体を発現及び精製するために、哺乳類細胞形質注入及び過発現注入システムを使用した。約2 μ g/mlの哺乳類発現ベクターを細胞培養体積の1/10に該当する150mM塩化ナトリウム(NaCl, Merck)で4 μ gのポリエチレンイミン(PEI, Polysciences, Warrington, PA, USA)と混合した。混合物を常温で15分間放置した。混合物をHEK293F細胞(2 \times 10⁶細胞/ml, Invitrogen)に添加した後、7% CO₂及び37 $^{\circ}$ Cと135rpmの撹拌条件で、100U/mlのペニシリン及びストレプトマイシン(Invitrogen)を含有したFREESTYLETM 293発現培養培地で6日間培養した。細胞培養上澄液から発現した抗FAM19A5-IgG2/4抗体を精製するために、タンパク質Aビーズ(Repligen, Waltham, MA, USA)親和性ゲルクロマトグラフィーを用いた。タンパク質Aクロマトグラフィーは、4~12% Bis-Tris勾配ゲル電気泳動で行った。タンパク質のサイズ及び収率は、クーマシーブリリアントブル染色によって確認した。抗体の結合能は、ELISA分析法を用いて測定した。 30

【0407】

図2Aに示すように、試験した異なる抗体(すなわち、1-28、1-85、2-13、2-14、2-20、2-29、3-2及び3-26)は、サイズが類似であった。1-85抗体の他に、試験した抗体はFAM19A5タンパク質に様々なレベルで結合できた。図2Bを参照する。 40

【0408】

〔実施例6 抗FAM19A5抗体の中和能分析〕

抗体の機能的特性をさらに評価するために、次のような方法を用いた。

【0409】

1. 組換えFAM19A5ウサギFc融合タンパク質の製造

FAM19A5発現ベクターを作製するためにヒトFAM19A5をコードする遺伝子を化学的に合成した(Genscript, Picataway, NJ, USA)。前記遺伝子を、従来に報告されたとおり、3'領域でヒトIgG1のヒンジ領域及びウサギI 50

g GのCH₂ - CH₃ドメインをコードする変形された哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。Han, J., et al., *Exp Mol Med*. 48(11): e271(2016)を参照する。

【0410】

FAM19A5ウサギFc融合体をコードする発現ベクターを、従来に報告されたとおり、25-kDa線形ポリエチレンイミン(PolyScience, Warrington, PA, USA)を用いてHEK293F細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に形質注入した。Boussif, O., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(16): 7297-301(1995)を参照する。FAM19A5ウサギ融合タンパク質は、メーカー指針に従ってタンパク質Aセファロースカラム(Repligen, Waltham, MA, USA)を用いて、一時的に形質注入されたHEK293F細胞の培養上澄液から精製した。

【0411】

2. 組換え抗FAM19A5 scFvヒトC融合タンパク質の製造

選別されたクローンの遺伝子を、従来に報告されたとおり、5'領域でCドメイン(ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常ドメイン)をコードする変形されたpCEP4ベクターにサブクローニングした。Lee, Y., et al., *Exp Mol Med*. 46: e114(2014)を参照する。抗FAM19A5 scFvヒトC融合タンパク質をコードする発現ベクターを、上述のとおりHEK293F細胞(Invitrogen)に形質注入した。scFv-hC融合タンパク質は、メーカー指針に従ってタンパク質Aセファロースカラム(Repligen, Waltham, MA, USA)を用いて、一時的に形質注入されたHEK293F細胞の培養上澄液から精製した。

【0412】

3. 膠細胞に対する抗FAM19A5抗体の中和効能

抗体の中和効能を評価するために、前述した通りに流細胞分析法によって確認した。Kim, M., et al., *PLoS One*. 7(4): e35100(2012)を参照する。マウス及びヒト膠細胞を、ウェル当たりに最終密度が 3×10^5 細胞であるv型底96ウェルプレート(Corning Inc., Corning, NY, USA)に接種した。細胞を流細胞分析緩衝液[0.05%(w/v)アジ化ナトリウムを含有したPBS中1%(w/v)BSA]で1 μ Mの組換えFAM19A5ウサギFc及び5 μ Mの抗FAM19A5 scFvヒトC融合タンパク質で37で1時間処理した。流細胞分析緩衝液で洗浄した後、細胞をAlexa Fluor 488-接合抗ウサギIgG(Fc特異的)抗体(Jackson Immuno Research Inc., PA, USA)と共に37で1時間、暗い所で培養した。同一緩衝液でさらに洗浄した後、細胞を300 μ L PBSに再懸濁し、488-nmレーザー付きFACSCANTO™ II機器(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を使用する流細胞分析法によって分析した。データは、FlowJoソフトウェア(TreeStar, Ashland, OR, USA)で分析した。

【0413】

図3Aに示すように、試験した全ての抗体(すなわち、1-28、1-85、2-13、2-14、2-20、2-29、3-2及び3-26)は、マウス1次膠細胞に対するFAM19A5の相互作用を様々なレベルに抑制できた。ヒト膠芽細胞腫細胞株において2-20抗体は細胞株に対するFAM19A5の相互作用を中和させることができなかった。図3Bを参照する。他の抗体は、程度は異なるが、FAM19A5活性を中和させることができた。1-28、2-13及び3-2抗体は、ヒト膠芽細胞腫細胞株で最大の中和効能を示した。

【0414】

〔実施例7 FAM19A5エピトープ断片F1-F6を用いたエピトープマッピング分析〕

マウス及びヒト膠細胞の両方でFAM19A5発現を中和させる能力から、3-2抗体

をエピトープマッピング分析のために選択した。ヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質の重複ペプチド断片 (F 1 ~ F 6、図 4 参照) を合成して B S A に接合させた。B S A - 接合ペプチド断片 F 1 ~ F 6 に対する異なる抗 F A M 1 9 A 5 抗体の結合は、E L I S A 分析法によって決定した。簡単にいえば、F A M 1 9 A 5 断片 F 1 ~ F 6 (5 0 m M 炭酸緩衝液 (B i o s e s a n g) で 1 μ g / m L に希釈又は高農度分析のために 2 0 μ g / m L に希釈) を用いて 4 × 9 6 ウェル免疫プレート (T h e r m o S c i e n t i f i c) のウェルをコートし (1 0 0 μ L / ウェル)、その後、1 X P B S で 2 回洗浄した。次に、プレートを常温で 1 時間、ブロッキング緩衝液 (1 0 0 μ L / ウェル) でブロッキングした。1 時間培養中に、関連抗 F A M 1 9 A 5 抗体を希釈緩衝液で 1 μ g / m L (又は、高農度分析の場合に 2 0 μ g / m L) まで希釈した。プレートが洗浄されると (1 × P B S を用いて 2 ×)、希釈した抗 F A M 1 9 A 5 抗体を適切なウェルに添加し、プレートを常温で 1 時間培養した。次いで、プレートを洗浄緩衝液を用いて総 5 回洗浄した。次に、O D P 基質 (O D P 精製 (O - フェニレンジアミンジヒドロクロリド、T h e r m o) 1 個を 9 m L の滅菌された脱イオン水と 1 m L の 1 0 X 安定した過酸化水素安定 (P e r o x i d e S t a b l e) 緩衝液 (T h e r m o) に溶解させて準備) を各ウェルに添加し、1 0 分間変色反応がおきるようにした。この反応は、ウェルに 1 0 0 m L の 2 N H ₂ S O ₄ (D a e j u n g) を添加して中断させた。各ウェルの吸収値を 9 6 ウェルマイクロプレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e) を用いて 4 9 2 n m で検出した。

10

【 0 4 1 5 】

20

図 5 に示すように、3 - 2 抗体は、エピトープ断片 F 2 に強く結合し、他の断片には最小限で結合した。

【 0 4 1 6 】

次に、3 - 2 抗体が結合するエピトープ断片 F 2 内特定アミノ酸残基を同定するためにアラニンスキャニング分析を行った。図 6 A に示すように、アミノ酸残基 R 4、D 5、P 9、R 1 0 又は R 1 1 がアラニンに突然変異したとき、エピトープ断片 F 2 に結合する 3 - 2 抗体の能力が大きく減少した。3 - 2 抗体の複数の脱免疫化された変異体に対して類似の分析を行った (脱免疫化過程に関する細部内容については実施例 8 を参照)。図 6 B、図 6 C、図 6 D、図 6 F、図 6 G、図 6 I 及び図 6 J に示すように、アミノ酸残基 R 4、P 9、R 1 0 及び R 1 1 は、F A M 1 9 A 5 に対する抗体 1 - 3 0、1 - 3 2 及び 6 - 1 0 の結合のために重要であった。抗体 1 - 1 7 及び 4 - 1 1 の場合、アミノ酸残基 R 4、P 9 及び R 1 0 が重要であった (図 6 E 及び図 6 H 参照)。

30

【 0 4 1 7 】

[実施例 8 抗 F A M 1 9 A 5 抗体の脱免疫化]

1. 免疫原性インシリコ (i n s i l i c o) 評価

ヒトを対象に投与時に免疫原性の危険を下げるために、インシリコ分析を行って 3 - 2 及び 2 - 1 3 抗 F A M 1 9 A 5 抗体内高い免疫原性の特定領域を同定した。

【 0 4 1 8 】

無差別 M H C クラス I I ペプチドを同定するために、全体配列にわたって重複している 9 - m e r ペプチドに対する i T o p e ^{T M} (A b z e n a p l c . , U K) 分析を行った。3 4 個の異なる M H C クラス I I 対立遺伝子に対する相互作用の分析によって潜在的 T 細胞エピトープを予測した。図 7 及び図 8 にそれぞれ示すように、クローン 3 - 2 は、総 1 1 個の結合ペプチドを含有し、クローン 2 - 1 3 は、総 1 0 個の非生殖系無差別 M H C クラス I I 結合ペプチドを含有した。

40

【 0 4 1 9 】

さらに、無差別 M H C クラス I I 結合ペプチドを、1 0 0 0 0 個を超えるペプチドに対して T 細胞刺激分析法によって作製した C D 4 + T 細胞エピトープデータベースである T C E D ^{T M} (A b z e n a p l c . , U K) によって分析した。クローン 2 - 1 3 は、2 個の無差別 M H C クラス I I 結合ペプチドが、公知の T 細胞エピトープと高い相同性を有するものと示された。図 8 (緑色で強調表示) を参照する。クローン 3 - 2 は、公知

50

の T 細胞エピトープと相同性が高い 3 個の無差別 MHC クラス II 結合ペプチドを有している。図 7 (緑色で強調表示) を参照する。

【 0 4 2 0 】

2 . 複合抗体ライブラリーの作製

免疫原性と関連している CD 4 + T 細胞エピトープを回避するために、複合抗体ライブラリーを設計した。ライブラリー作製のために、最も相同的なヒト生殖系を選択するためにクローン 2 - 1 3 及びクローン 3 - 2 のフレームワークを I g B L A S T データベース (N C B I) に対して分析した。クローン 3 - 2 に対してヒト生殖系 I G L V 1 - 2 7 5 1 * 0 2 、 I G L J 2 * 0 1 、 I G H V 3 - 6 4 * 0 4 及び I G H J 1 * 0 1 遺伝子を選択した (図 9 A 及び図 9 B) 。クローン 2 - 1 3 に対してヒト生殖系 I G L V 3 - 2 7 * 0 1 、 I G L J 2 * 0 1 、 I G H V 3 - 6 4 * 0 4 及び I G H J 1 * 0 1 遺伝子を選択した (図 1 0) 。

10

【 0 4 2 1 】

クローン 2 - 1 3 及びクローン 3 - 2 の MHC クラス II 結合領域の特定の非同アミノ酸残基を、最も相同性であるヒト生殖系配列内対応アミノ酸に置換するようにライブラリーを作製した。ヒト及びニワトリアミノ酸を両方とも含む縮退性コドンコードするオリゴヌクレオチドの連続重複延長重合酵素連鎖反応 (P C R) を行い、前述した通り、部位指向突然変異誘発ライブラリーを生成した。Baek D S , Kim Y S . Biochem Biophys Res Commun . 4 6 3 (3) : 4 1 4 - 2 0 (2 0 1 5) を参照する。P C R 産物を、前述した通り、ファージ製造のためにファージミドベクターにサブクローニングし、大腸菌菌株 E R 2 7 3 8 (New England Biolabs , Ipswich , MA , USA) に形質転換した。Han , J . , et al . , Exp Mol Med . 4 8 (1 1) : e 2 7 1 (2 0 1 6) を参照する。

20

【 0 4 2 2 】

3 . バイオパンニング及びクローン選択

陽性クローンを分離するために、前述の通りにバイオパンニング及びファージ酵素免疫分析を行った (Barbás C F . , Phage display : a laboratory manual . Cold Spring Harbor , NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press ; 2 0 0 1) 。 F A M 1 9 A 5 に対する反応性を有するファージクローンを選択し、これらのヌクレオチド配列をサンガーシーケンシングによって決定した。F A M 1 9 A 5 に対する親和性を有する最も少ない数の無差別 MHC クラス II 結合エピトープを持つ s c F v クローンを最終的に選択した。

30

【 0 4 2 3 】

図 9 B に示すように、クローン 3 - 2 内 7 個の無差別 MHC クラス II 結合エピトープが、脱免疫化されたクローン 3 - 2 から除去された。図 7 から確認されたように、除去したエピトープは、結合ペプチド # 2 、 3 、 4 、 5 、 9 、 1 0 及び 1 1 に該当する。C D R H 1 内無差別 MHC クラス II 結合エピトープは除去できなかった (すなわち、図 7 において結合ペプチド # 6) 。また、C D R H 2 に位置している p 3 残基が結合活性に重要な役割を担うため、H F R 2 内無差別 MHC クラス II 結合エピトープを除去できなかった (すなわち、図 7 において結合ペプチド # 8) 。図 9 C に示すように、前記残基を全て突然変異させて 3 - 2 抗体を完全に脱免疫化したため、3 - 2 抗体が F A M 1 9 A 5 タンパク質に結合できなくなった。しかし、V H のアミノ酸残基 Q 5 0 が突然変異しなかったとき、脱免疫化された 3 - 2 抗体は、野生型 3 - 2 抗体と類似の F A M 1 9 A 5 タンパク質に結合できた。

40

【 0 4 2 4 】

図 1 0 A に示すように、クローン 2 - 1 3 内 7 個の無差別 MHC クラス II 結合エピトープが、脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 から除去された。図 8 から確認されたように、除去されたエピトープは、結合ペプチド # 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 8 及び 9 に該当する。C D R H 2 に位置している p 4 残基が結合活性に重要な役割を担うため、H F R 2 内無差別

50

MHCクラスII結合エピトープを除去できなかった(すなわち、図8において結合ペプチド#6)。3-2抗体と同様に、2-13抗体の完全な脱免疫化はFAM19A5タンパク質に対する結合にも否定的な影響を及ぼす。図10Bを参照する。

【0425】

前記結果は、抗FAM19A5抗体の免疫原性を、FAM19A5タンパク質に対するそれらの結合能に否定的な影響を与えないで減少させることができることを示唆する。

【0426】

〔実施例9 脱免疫化された2-13抗体の親和度成熟〕

抗体と抗原の結合において静電的相互作用は重要である。Lee J. Y., et al., Nat Commun. 7:13354 (2016)。脱免疫化されたクローン2-13のCDRH3を除く5個のCDR内の各アミノ酸をグルタミン酸とアスパラギン酸に置換し、人為的に負に荷電されたRグループを導入した。点突然変異したscFvをコードする総70個の遺伝子を化学的に合成し(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA)、前述した通りにファージミドベクターにサブクローニングしてファージをディスプレイする突然変異scFvを複製した。Yoon, A., et al., PLoS One. 11(1):e0146907 (2016)。

10

【0427】

ファージをディスプレイする電荷変異突然変異体scFvを救出し、前述した通りにファージ酵素免疫分析を行った(Barbas CF. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001)。図11に示すように、全てのクローンが様々なレベルにFAM19A5結合活性を示した。2個のクローン(36.H1-3TE及び37.H1-3TD)は、脱免疫化されたクローン2-13よりも高い結合親和度を示した。(i)野生型2-13抗体、(ii)脱免疫化されたクローン2-13抗体、及び(iii)脱免疫化及び親和度成熟した2-13抗体(2-13D-37)のVH及びVLの配列を比較して図15に提供した。

20

【0428】

〔実施例10 脱免疫化された2-13D-37抗体の親和度成熟〕

CDR-H3部位指向突然変異誘発ライブラリーを作製するために、脱免疫化されたクローン2-13D-37scFvをコードする遺伝子をPCR用鋳型として使用した。CDR-H3内3個の連続している残基を、前述した通り、NNK縮退コドン(N=A、T、G又はC、K=G又はT)をコードするオリゴヌクレオチドで無作為化した(Lee Y, Kim H, Chung J. Exp Mol Med. 2014; 46:e114)。無作為化されたコドンをPCRによってCDR-H3に導入した。重複延長PCRによって増幅されたscFv断片をファージミドベクターにサブクローニングし、上述の通り、ファージ製造のためにER2738(New England BioLabs)に形質転換した。総8個のCDR-H3無作為化されたライブラリーが生成された。

30

【0429】

陽性クローンを分離するために、前述の通りにバイオパンニング及びファージ酵素免疫分析法を行った(Barbas CF. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001; 及び実施例8参照)。FAM19A5に対してより高い反応性を示すファージクローンを選択し、これらのヌクレオチド配列をサンガーシーケンシングによって決定した。SDS-PAGE及びウェスタンブロッティングを用いて測定した候補クローン(すなわち、2-13D-37-1.5W-41及び2-13D-37-3W-16)のサイズ及び発現レベルが、図16B~図16Cに提供されている。脱免疫化されたクローン2-13D-37に対する候補クローン(すなわち、2-13D-37-1.5W-41及び2-13D-37-3W-16)の配列比較が、図17Aに提供されている。2-13D-37抗体と比較し

40

50

て、これらの親和度成熟した脱免疫化された抗体は、ELISAで測定したとき、FAM19A5タンパク質に、より大きい結合を示した(図17B)。

【0430】

〔実施例11 脱免疫化された3-2抗体の物理化学的特性改善〕

脱免疫化された抗FAM19A5抗体の物理化学的特性を改善するために、3-2抗体の軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3及び重鎖CDR1及びCDR2の無作為化された配列を用いてファージディスプレイライブラリーを作製した。CDR部位指向突然変異誘発ライブラリーを作製するために、脱免疫化されたクローン3-2 scFvをコードする遺伝子をPCR用鋳型として使用した。CDR内4個又は5個の連続している残基を、前述した通り、NNK縮退コドン(N=A、T、G又はC、K=G又はT)をコードするオリゴヌクレオチドで無作為化した。Lee, Y., et al., J. Exp. Mol. Med. 46: e114 (2014)。無作為コドンをPCRによってCDRH3以外の5個のCDRに導入した。重複延長PCRによって増幅されたscFv断片をファージミドベクターにサブクローニングし、上述の通りにファージ製造のためにER2738 (New England Biolabs)に形質転換した。図12を参照する。

10

【0431】

陽性クローンを分離するために、前述の通りにバイオパンニング及びファージ酵素免疫分析法を行った(Barbas CF. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001)。FAM19A5に対する反応性を有するファージクローンを選択し、それらのヌクレオチド配列をサンガーシーケンシングによって決定した。前述した通り、個別クローンの固有溶解度点数及びGRAVY点数を計算した。Sormanni, P., et al., Sci Rep. 7(1): 8200 (2017)。FAM19A5に対する類似の反応性を示すとともに溶解度が向上したクローンを選択した:(i)低い等電点を持つ抗体("Low PI")、(ii)1-17、(iii)1-30、(iv)1-32、(v)4-11、及び(vi)6-10。結果を図13A及び図13Bに示した。野生型3-2抗体に対する異なる脱免疫化された変異体3-2抗体のVH及びVLの配列を比較し、図14A及び図14Bにそれぞれ提供した。

20

【0432】

〔実施例12 2-13抗体のHDX-MXエピトープマッピング〕

クローン2-13抗FAM19A5抗体に対するヒトFAM19A5の結合エピトープをプローブするために、後述するように水素/重水素交換質量分光分析法(HDX-MS)を用いた。図18を参照する。

30

【0433】

1. 最大FAM19A5カバレッジのための条件最適化

エピトープマッピング実験前に、FAM19A5タンパク質に対する一般のペプチドの目録を作るために非重水素化実験を行った。オフライン及びオンラインペプシン分解を用いてFAM19A5タンパク質を分解した。Houde, D., et al., Methods Mol Biol 988: 269-89 (2013)。オンライン分解を利用時に、ペプシン固定カラムを使用し(~20)、流速を調整して反応効率を調節した。オフライン方法を利用時に、FAM19A5タンパク質を4で5分間ペプシンによって手動で分解した後、分析のために混合物を液体クロマトグラフィーカラムにローディングした。最大タンパク質カバレッジのための条件を確認するために、次のようなパラメータのいずれか一つ以上を調整した:リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、クエンチング維持時間、還元試薬(TCEP)、尿素濃度及びペプシン濃度。Waters PLGSソフトウェアを用いて生成された質量分光分析(MS)未加工(raw)データを分析し、最大タンパク質カバレッジを得たか否か確認した。実験の再現性を確認するために、それぞれの実験条件を少なくとも2回反復し、生成されたペプチドを確認した。図19は、使用した異なる実験条件及び得られたカバレッジ率を示している。

40

50

【0434】

次の条件を使用した時に最大カバレッジが観察された：1 M TCEP、2 M 尿素 (pH 2.66) 及びペプシン (濃度比 1 : 2)。図 20 A 及び図 20 B に示すように、これらの条件を用いて F A M 1 9 A 5 タンパク質の略 97% をカバーする 44 個のペプチド断片が同定された。

【0435】

2. F A M 1 9 A 5 エピトープマッピング

抗体 - タンパク質複合体を標識化緩衝液で 15 倍希釈する時にも、最大 (100%) 結合 ($K_D = 1 \text{ nM}$) を得るために、水素 / 重水素標識前に抗原 - 抗体複合体試料を少なくとも 3 時間培養した。標識後、平衡緩衝液を用いて試料を同一体積となるようにした。

10

【0436】

標識化反応を開始するために、1 : 15 標識化緩衝液で希釈した製造試料 (抗原単独、抗体単独、又は抗原 - 抗体複合体) 2.5 μL を D_2O 標識化溶液 (1.8 μM) と混合した。0 分 (すなわち、非重水素)、20 秒、10 分、60 分及び 240 分の異なる期間の間に反応を行った。非重水素反応のために、代わりに、製造した試料を平衡緩衝液と混合した。それぞれの標識化期間が終わるとき、反応をクエンチング緩衝液で中止させた。次に、試料をボルテックスし、液体窒素で直ちに凍結させ、分析するまで -80 で保管した。

【0437】

質量分光分析器で分析する前に、保管された冷凍試料を溶かした後、氷で約 5 分間ペプシンで分解した (すなわち、上述のオフライン方法)。得られた相対的重水素レベルを、ソフトウェアプログラム DynamX 3.0TM (Waters) を用いて交換時間対比プロットした。最終配列カバレッジ及び重複データを図 21 に示した。

20

【0438】

同定されたペプチド (図 21 参照) のそれぞれに対する重水素吸収率データ (単一抗原 / 抗体対比抗原 - 抗体複合体) の比較を、図 22 A ~ 図 22 E 及び図 23 A ~ 図 23 C に示した。図示のように、次のようなペプチド配列に対して有意の重水素吸収率が観察された：(i) A C R K G Q I A G T T R A R P A C (配列番号 101 の残基 37 ~ 53)、(ii) A C R K G Q I A G T T R A R P A C V D (配列番号 101 の残基 37 ~ 55)、(iii) A C R K G Q I A G T T R A R P A C V D A (配列番号 101 の残基 37 ~ 56)、(iv) A R I I K T K Q W C (配列番号 101 の残基 56 ~ 65)、(v) A R I I K T K Q W C D M (配列番号 101 の残基 56 ~ 67)、(vi) A R I I K T K Q W C D M L (配列番号 101 の残基 56 ~ 68)、(vii) A R I I K T K Q W C D M L P C L (配列番号 101 の残基 56 ~ 71)、(viii) R I I K T K Q W C D M (配列番号 101 の残基 57 ~ 67) 及び (ix) R I I K T K Q W C D M L (配列番号 101 の残基 57 ~ 68)。

30

【0439】

前記結果を用いて単一抗原 / 抗体試料と抗原 - 抗体複合体間の最も有意の重水素吸収率差がある F A M 1 9 A 5 タンパク質内領域を同定するためにヒートマップを作製した。図 24 に示すように、配列番号 101 のアミノ酸残基 38 ~ 50 (C R K G Q I A G T T R A R) 及び 51 ~ 64 (P A C V D A R I I K T K Q W) は、2 - 13 抗体に対する重要な結合残基として同定された。図 25 は、F A M 1 9 A 5 タンパク質の 3 次元構造内でこれらの残基の位置を示している。

40

【0440】

概要及び要約欄以外の詳細な説明欄は、特許請求の範囲を解釈するために用いられると理解されるべきである。概要及び要約欄は、発明者によって考慮される本開示内容の例示的な具現例の一つ以上を示すが、全ての例示的な具現例を示すものではないので、本開示内容と添付する特許請求の範囲をいかなる方式でも制限しようとするものではない。

【0441】

本開示内容は、特定機能及びそれらの関係の具現を説明する機能的構成要素を用いて上

50

に説明した。それらの機能的構成要素の境界は、説明の便宜のために、本明細書では任意に定義した。前記特定機能とそれらの関係が適切に行われる限り、代替境界が定義されてもよい。

【0442】

特定具現例に関する上の説明は、他人が当業界技術における知識を応用することによって、本開示内容の一般的な概念を超えない範囲で過度な実験なしで様々な応用のためにこのような特定具現例を容易に変形及び/又は調整することができるように、本開示内容の一般的な属性を完全に表すものであろう。したがって、このような調整及び変形は、本明細書に提示された教示及び指針に立って開示された具現例の均等物の意味及び範囲内にあるものと意図される。本明細書の語句又は用語は、本明細書用語又は語句が本発明の教示及び指針に照らして当業者によって解釈され得るように、制限ではなく説明しようとする目的であることが理解できよう。

10

【0443】

本開示内容の幅と範囲は、上述した例示的な具現例のいずれによっても制限されてはならず、後述する特許請求の範囲及びその等価物によってのみ定義されるべきである。

【0444】

本明細書に引用された全ての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト及び受託番号/データベース配列(ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列の両方とも)は、あたかもそれぞれの個別刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト又は受託番号/データベース配列が具体的にそして個別的に参考として含まれると表示されたのと同じ程度に、全ての目的のためにその全体が本明細書に参考として組み込まれる。

20

【図面の簡単な説明】

【0445】

【図1A】図1A~図1Cは、FAM19A5タンパク質に対する個別scFvクローンの結合を分析して提供している。

【図1B】図1A~図1Cは、FAM19A5タンパク質に対する個別scFvクローンの結合を分析して提供している。

【図1C】図1A~図1Cは、FAM19A5タンパク質に対する個別scFvクローンの結合を分析して提供している。

【図2A】図2A及び図2Bはそれぞれ、異なる抗FAM19A5 scFvの概略サイズ及び結合能を提供している。

30

【図2B】図2A及び図2Bはそれぞれ、異なる抗FAM19A5 scFvの概略サイズ及び結合能を提供している。

【図3A】図3A及び図3Bはそれぞれ、マウス及びヒト膠細胞においてFAM19A5発現を中和させる異なる抗FAM19A5抗体の能力を比較して提供している。

【図3B】図3A及び図3Bはそれぞれ、マウス及びヒト膠細胞においてFAM19A5発現を中和させる異なる抗FAM19A5抗体の能力を比較して提供している。

【図4】図4は、エピトープF1-F6(BSAに接合された)のアミノ酸配列及びヒトFAM19A5ポリペプチドにおいてそれらの位置を提供している。

【図5】図5は、エピトープ断片F1~F6に対する3-2抗体の結合に対するELISA結果を提供している。

40

【図6A】図6A~図6Jは、FAM19A5タンパク質に対する様々な3-2抗体変異体の結合に重要なエピトープF2断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。

【図6B】図6A~図6Jは、FAM19A5タンパク質に対する様々な3-2抗体変異体の結合に重要なエピトープF2断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。

【図6C】図6A~図6Jは、FAM19A5タンパク質に対する様々な3-2抗体変異体の結合に重要なエピトープF2断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。

50

【図 6 D】図 6 A ~ 図 6 J は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する様々な 3 - 2 抗体変異体の結合に重要なエピトープ F 2 断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。

【図 6 E】図 6 A ~ 図 6 J は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する様々な 3 - 2 抗体変異体の結合に重要なエピトープ F 2 断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。

【図 6 F】図 6 A ~ 図 6 J は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する様々な 3 - 2 抗体変異体の結合に重要なエピトープ F 2 断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。

【図 6 G】図 6 A ~ 図 6 J は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する様々な 3 - 2 抗体変異体の結合に重要なエピトープ F 2 断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。 10

【図 6 H】図 6 A ~ 図 6 J は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する様々な 3 - 2 抗体変異体の結合に重要なエピトープ F 2 断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。

【図 6 I】図 6 A ~ 図 6 J は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する様々な 3 - 2 抗体変異体の結合に重要なエピトープ F 2 断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。

【図 6 J】図 6 A ~ 図 6 J は、F A M 1 9 A 5 タンパク質に対する様々な 3 - 2 抗体変異体の結合に重要なエピトープ F 2 断片内特定アミノ酸残基を示すアラニンスキャニング分析結果を提供している。 20

【図 7】図 7 は、3 - 2 抗体の軽鎖可変領域 (V L) (上の 3 行) 及び重鎖可変領域 (V H) (下の 3 行) において潜在的免疫原性部位を識別している。

【図 8】図 8 は、2 - 1 3 抗体の軽鎖可変領域 (V L) (上の 3 行) 及び重鎖可変領域 (V H) (下の 3 行) において潜在的免疫原性部位を識別している。

【図 9 A】図 9 A ~ 図 9 C は、脱免疫化された 3 - 2 抗体の結合を分析して提供している。

【図 9 B】図 9 A ~ 図 9 C は、脱免疫化された 3 - 2 抗体の結合を分析して提供している。

【図 9 C】図 9 A ~ 図 9 C は、脱免疫化された 3 - 2 抗体の結合を分析して提供している。 30

【図 1 0 A】図 1 0 A 及び図 1 0 B は、2 個の異なる脱免疫化された 2 - 1 3 抗体である (i) 完全脱免疫化された 2 - 1 3 抗体、及び (i i) 重鎖 C D R 2 内一のつのアミノ酸を除いて脱免疫化された抗体 (“ 脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 ”) に対する分析を提供している。

【図 1 0 B】図 1 0 A 及び図 1 0 B は、2 個の異なる脱免疫化された 2 - 1 3 抗体である (i) 完全脱免疫化された 2 - 1 3 抗体、及び (i i) 重鎖 C D R 2 内一のつのアミノ酸を除いて脱免疫化された抗体 (“ 脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 ”) に対する分析を提供している。

【図 1 1】図 1 1 は、異なる脱免疫化されたクローン 2 - 1 3 変異体の結合能を比較して提供している。 40

【図 1 2】図 1 2 は、向上した物理化学的特性を持つ脱免疫化された抗 F A M 1 9 A 5 抗体を生成するために用いた方法の概略図を提供している。

【図 1 3 A】図 1 3 A 及び図 1 3 B は、野生型 (すなわち、脱免疫化されていない) 3 - 2 抗体 (“ 原抗体 ”) 対比いくつかの脱免疫化された 3 - 2 変異体の物理化学的特性を比較して提供している。

【図 1 3 B】図 1 3 A 及び図 1 3 B は、野生型 (すなわち、脱免疫化されていない) 3 - 2 抗体 (“ 原抗体 ”) 対比いくつかの脱免疫化された 3 - 2 変異体の物理化学的特性を比較して提供している。

【図 1 4 A】図 1 4 A 及び図 1 4 B は、異なる脱免疫化された 3 - 2 抗体変異体に対する 50

重鎖可変領域（図14A）及び軽鎖可変領域（図14B）の配列整列を提供している。

【図14B】図14A及び図14Bは、異なる脱免疫化された3-2抗体変異体に対する重鎖可変領域（図14A）及び軽鎖可変領域（図14B）の配列整列を提供している。

【図15】図15は、異なる脱免疫化され及び/又は親和度成熟した2-13抗体変異体に対する軽鎖可変領域（上の3行）及び重鎖可変領域（下の3行）の配列整列を提供している。

【図16A】図16A～図16Cは、脱免疫化された2-13D-37抗体の2個の変異体（2-13D-37-1.5W-41及び2-13D-37-3W-16）の発現レベルを、SDS-PAGE及びウェスタンブロットングで測定して提供している。

【図16B】図16A～図16Cは、脱免疫化された2-13D-37抗体の2個の変異体（2-13D-37-1.5W-41及び2-13D-37-3W-16）の発現レベルを、SDS-PAGE及びウェスタンブロットングで測定して提供している。 10

【図16C】図16A～図16Cは、脱免疫化された2-13D-37抗体の2個の変異体（2-13D-37-1.5W-41及び2-13D-37-3W-16）の発現レベルを、SDS-PAGE及びウェスタンブロットングで測定して提供している。

【図17A】図17A及び図17Bは、親和度成熟によって生成された脱免疫化された2-13D-37抗体の2個の変異体（2-13D-37-1.5W-41及び2-13D-37-3W-16）を分析して提供している。

【図17B】図17A及び図17Bは、親和度成熟によって生成された脱免疫化された2-13D-37抗体の2個の変異体（2-13D-37-1.5W-41及び2-13D-37-3W-16）を分析して提供している。 20

【図18】図18は、実施例11で用いたHDX-MS分析法の全体的なワークフローの概略図を提供している。

【図19】図19は、実施例11に記載されたHDX-MS分析法に対して試験した、異なる実験条件で達成されたカバレッジ率を要約した表を提供している。

【図20A】図20A及び図20Bは、実施例11に記載された最適化された条件を用いてFAM19A5タンパク質のペプシン分解結果を提供している。

【図20B】図20A及び図20Bは、実施例11に記載された最適化された条件を用いてFAM19A5タンパク質のペプシン分解結果を提供している。

【図21】図21は、実施例11に記載されているように、重水素標識後にFAM19A5タンパク質のペプシン分解で同定された22個ペプチドのカバレッジ率及び重複率を示している。水平棒のそれぞれは、個別ペプチドを示す。 30

【図22A】図22A～図22Eは、時間関数として単一（抗原単独、“1”）及び抗原-抗体（2-13）複合体（“2”）間の重水素吸収率を比較して提供している。

【図22B】図22A～図22Eは、時間関数として単一（抗原単独、“1”）及び抗原-抗体（2-13）複合体（“2”）間の重水素吸収率を比較して提供している。

【図22C】図22A～図22Eは、時間関数として単一（抗原単独、“1”）及び抗原-抗体（2-13）複合体（“2”）間の重水素吸収率を比較して提供している。

【図22D】図22A～図22Eは、時間関数として単一（抗原単独、“1”）及び抗原-抗体（2-13）複合体（“2”）間の重水素吸収率を比較して提供している。 40

【図22E】図22A～図22Eは、時間関数として単一（抗原単独、“1”）及び抗原-抗体（2-13）複合体（“2”）間の重水素吸収率を比較して提供している。

【図23A】図23A～図23Cは、FAM19A5タンパク質に沿って単一及び複合試料間に有意の重水素吸収率差（すなわち、 ± 0.5 Da超過）がある主要アミノ酸残基を示している。

【図23B】図23A～図23Cは、FAM19A5タンパク質に沿って単一及び複合試料間に有意の重水素吸収率差（すなわち、 ± 0.5 Da超過）がある主要アミノ酸残基を示している。

【図23C】図23A～図23Cは、FAM19A5タンパク質に沿って単一及び複合試料間に有意の重水素吸収率差（すなわち、 ± 0.5 Da超過）がある主要アミノ酸残基を 50

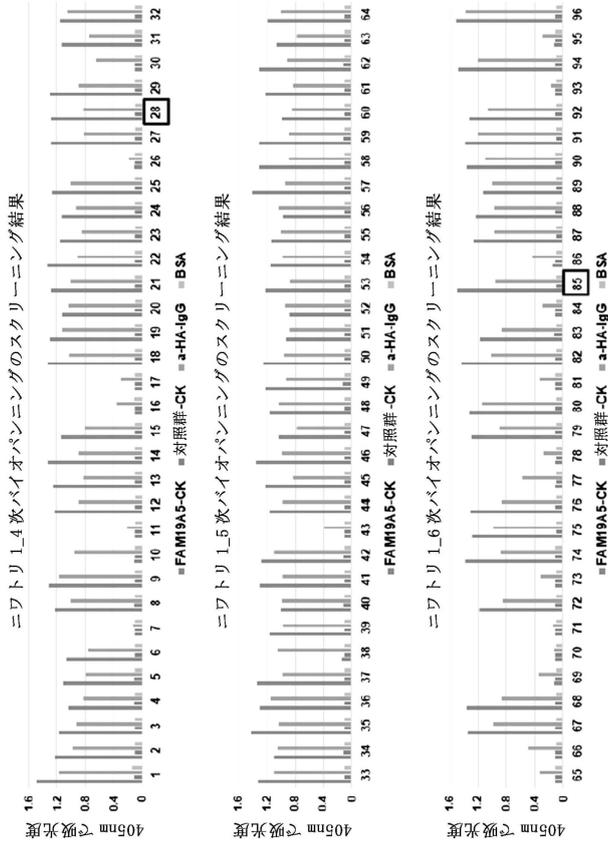
示している。

【図24】図24は、単一（抗原単独）及び抗原-抗体（2-13）複合体試料間に有意の重水素吸収率差があるFAM19A5タンパク質の領域を示すヒートマップ分析を提供している。

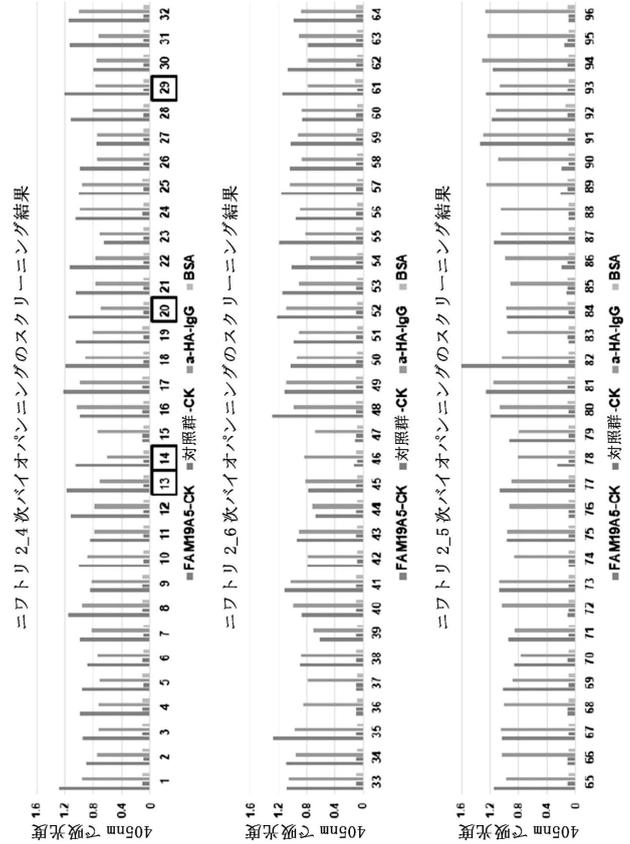
【図25】図25は、FAM19A5タンパク質の3次元構造及び2-13抗体に対する主要結合エピートプの位置を提供している。

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

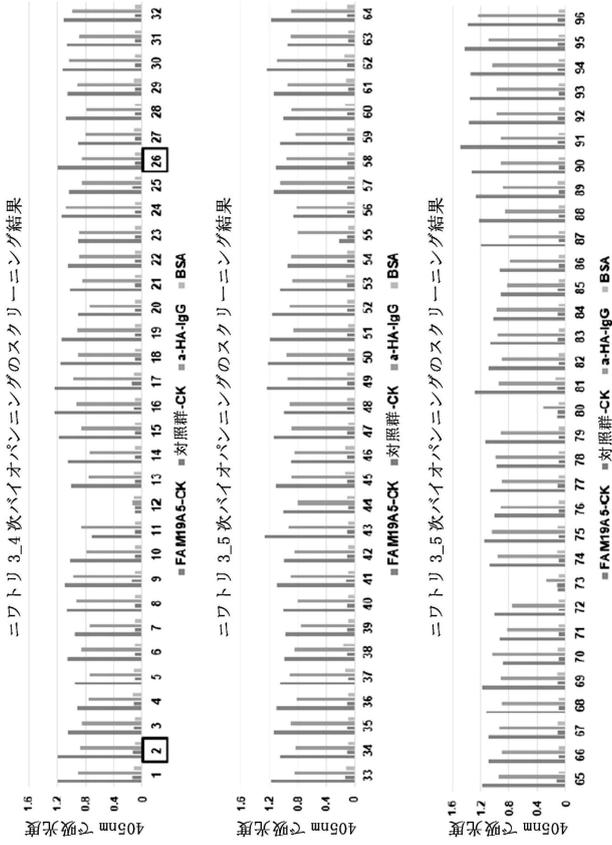
20

30

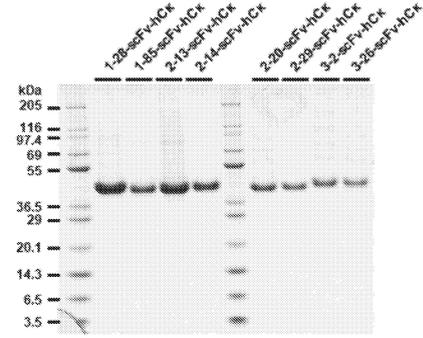
40

50

【図 1 C】



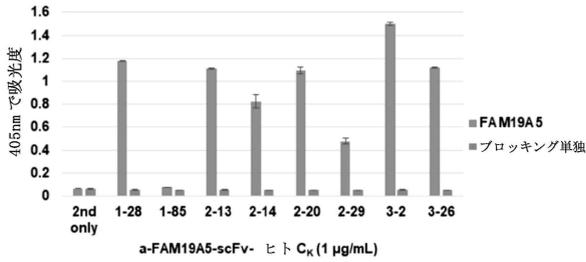
【図 2 A】



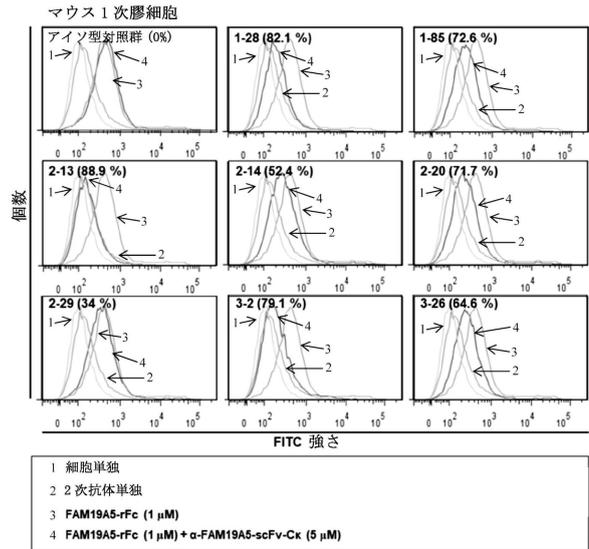
10

20

【図 2 B】



【図 3 A】

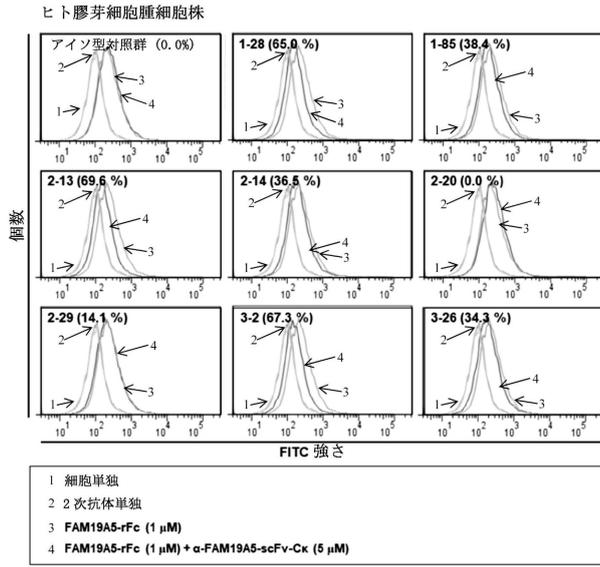


30

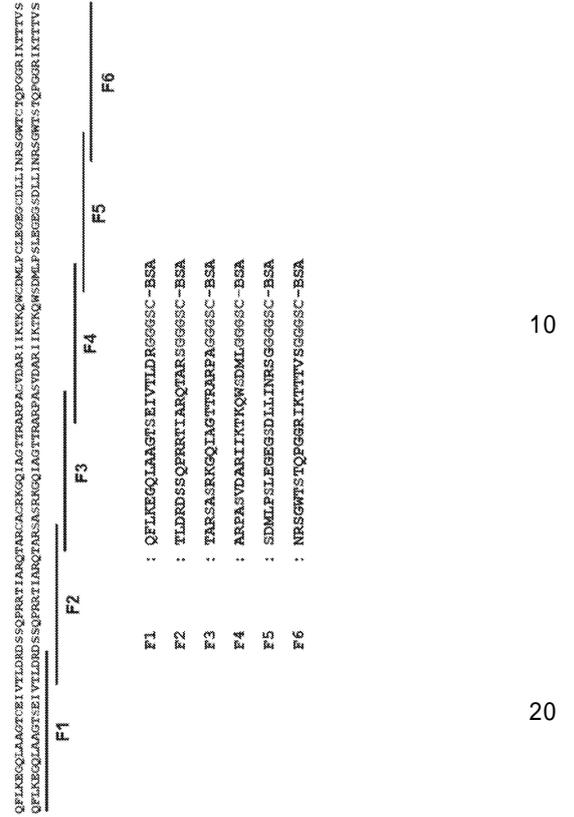
40

50

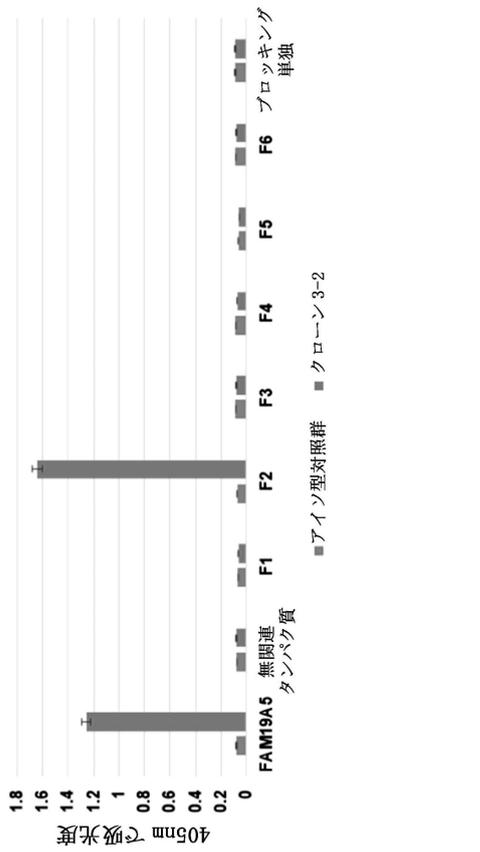
【 図 3 B 】



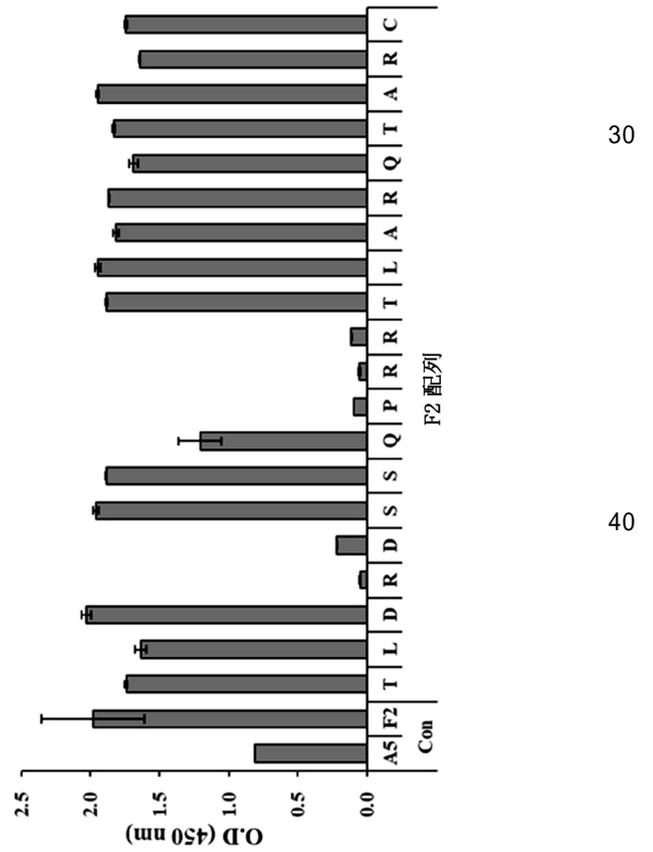
【 図 4 】



【 図 5 】

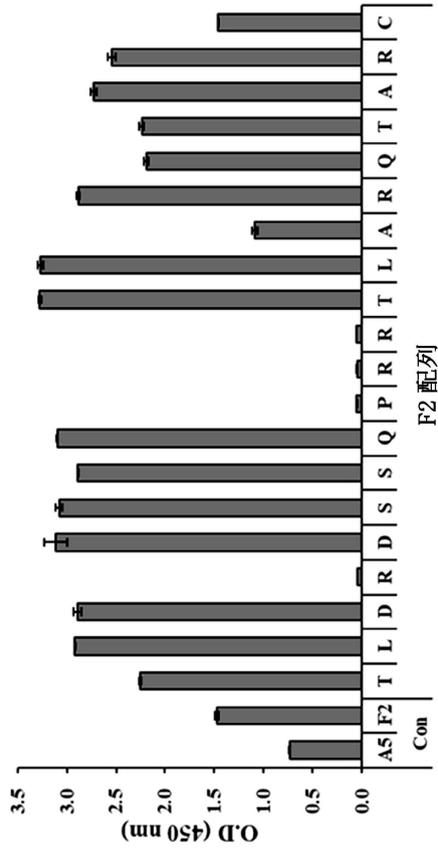


【 図 6 A 】

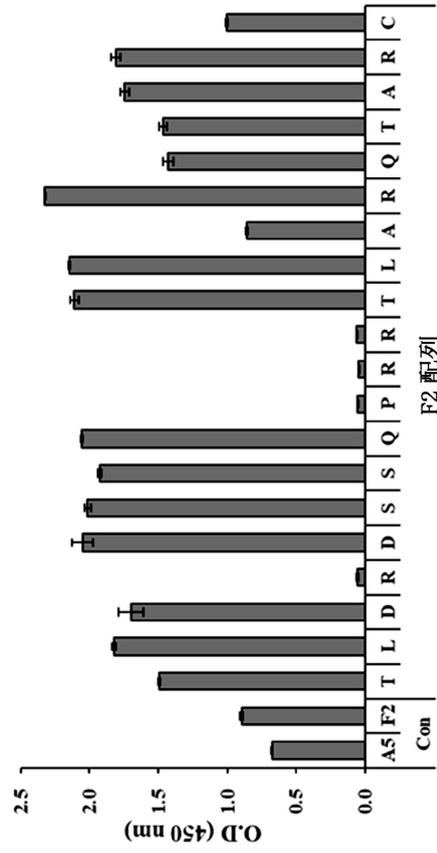


10
20
30
40
50

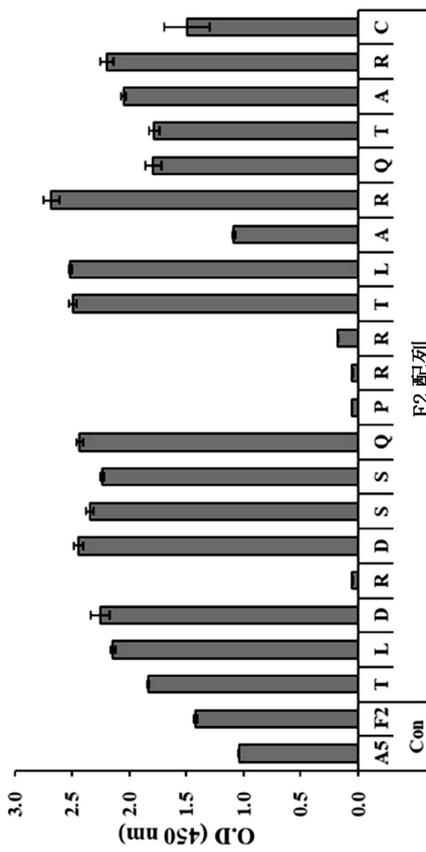
【 図 6 B 】



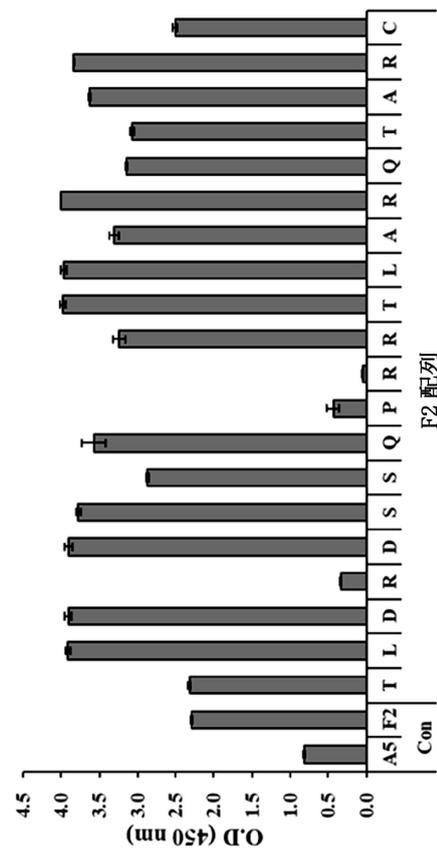
【 図 6 C 】



【 図 6 D 】



【 図 6 E 】



10

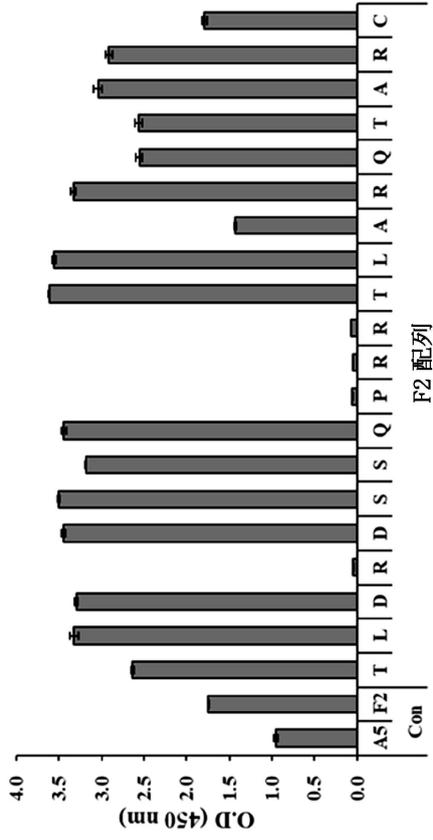
20

30

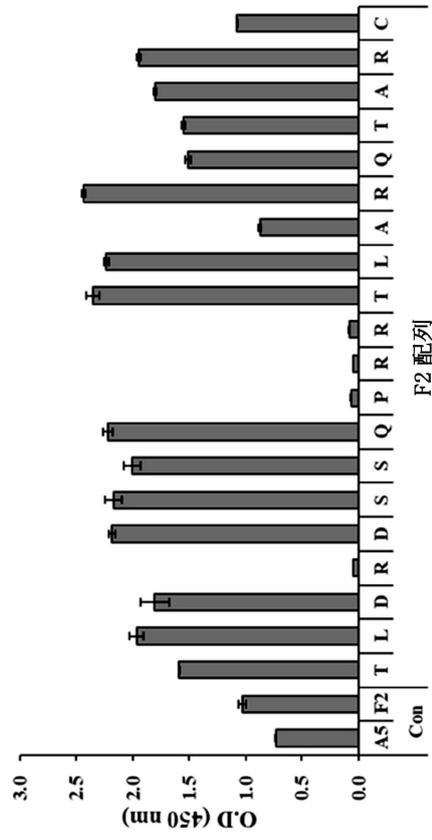
40

50

【 図 6 F 】



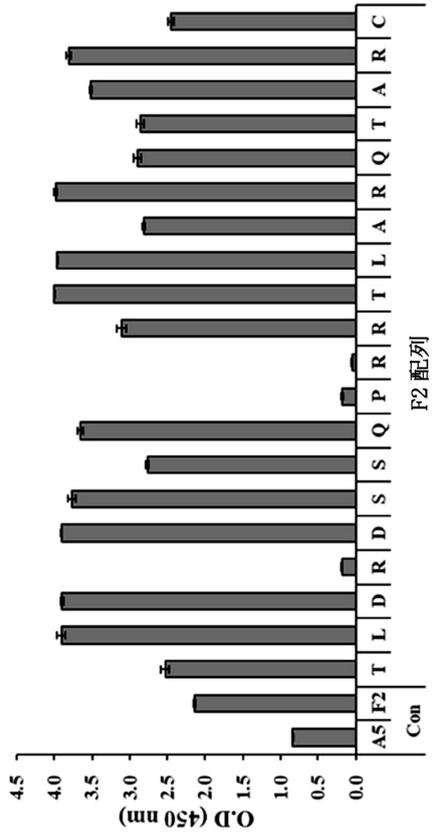
【 図 6 G 】



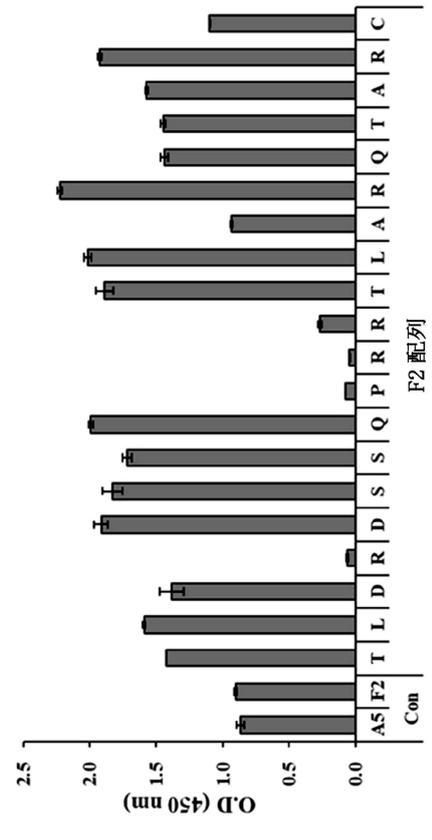
10

20

【 図 6 H 】



【 図 6 I 】

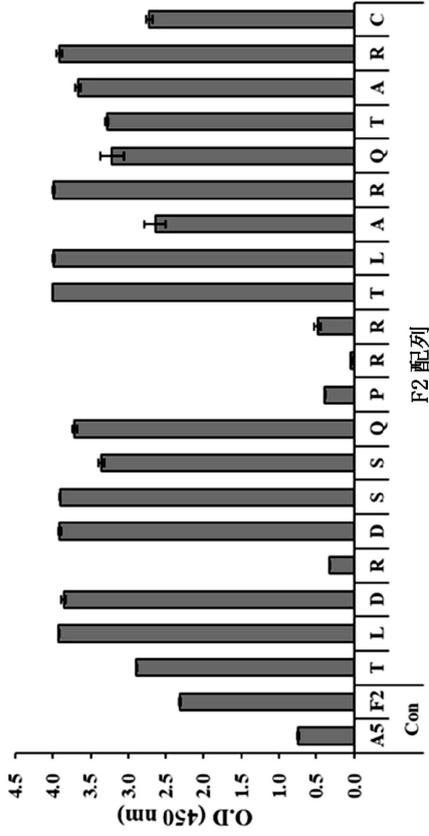


30

40

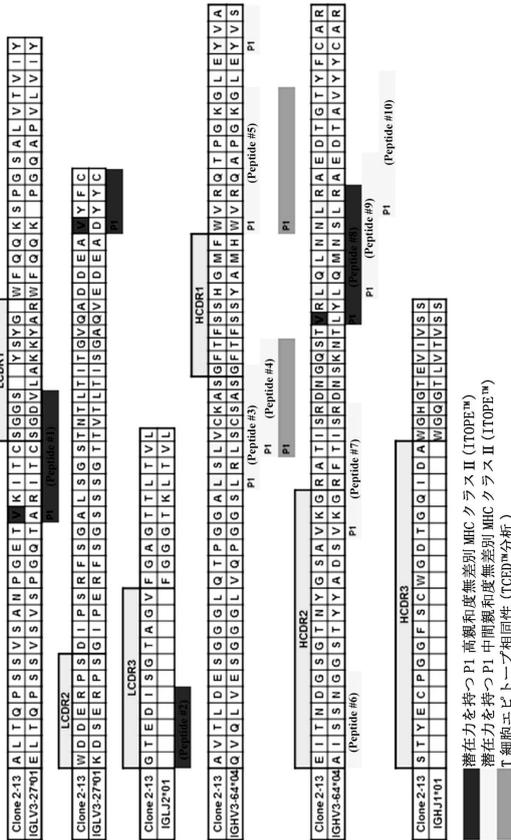
50

【 6 J 】



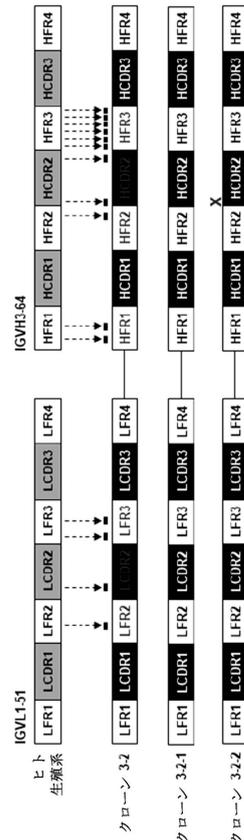
F2 配列

【 8 】

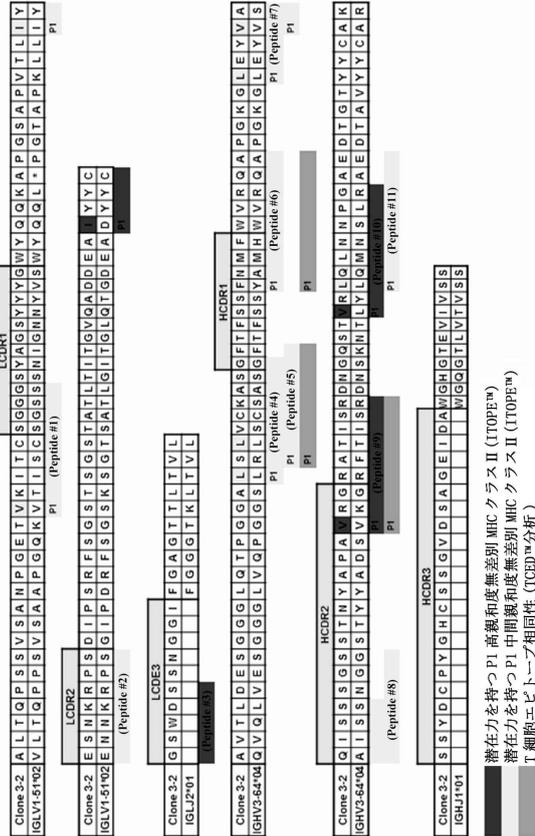


潜在力を持つ P1 高親和度無差別 MHC クラス II (ITOPE™)
 潜在力を持つ P1 中間親和度無差別 MHC クラス II (ITOPE™)
 T 細胞エピソード相同性 (TCED™分析)

【 9 A 】



【 7 】



潜在力を持つ P1 高親和度無差別 MHC クラス II (ITOPE™)
 潜在力を持つ P1 中間親和度無差別 MHC クラス II (ITOPE™)
 T 細胞エピソード相同性 (TCED™分析)

10

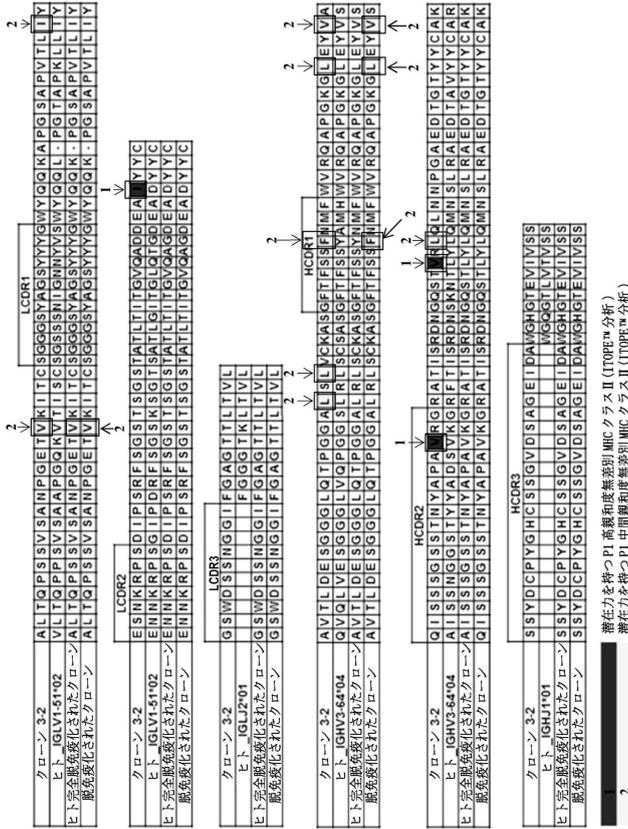
20

30

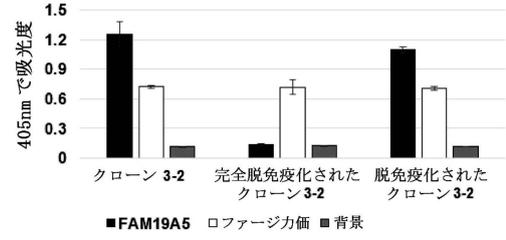
40

50

【 図 9 B 】



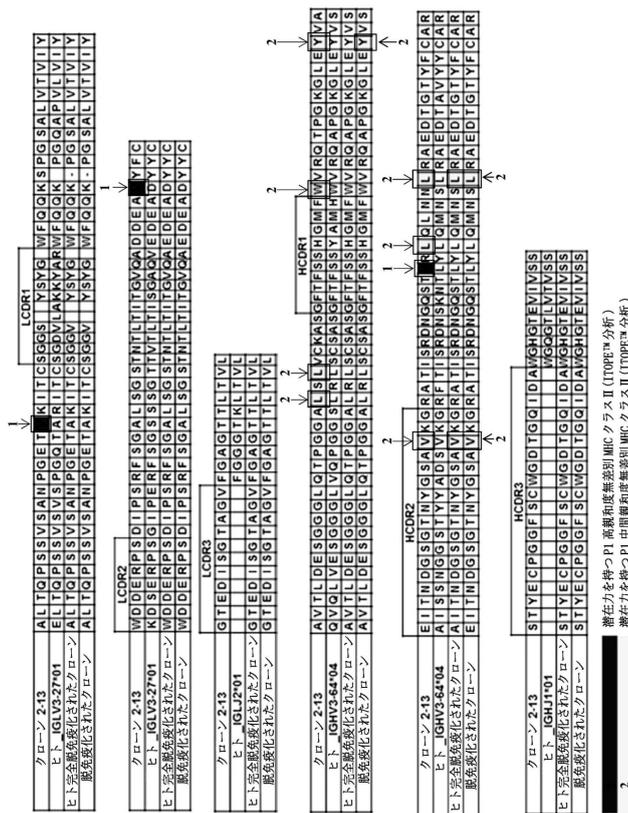
【 図 9 C 】



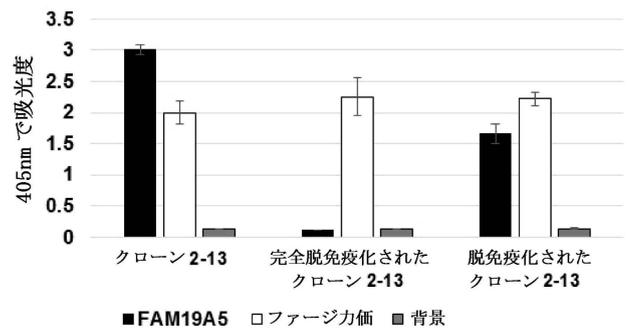
10

20

【 図 10 A 】



【 図 10 B 】

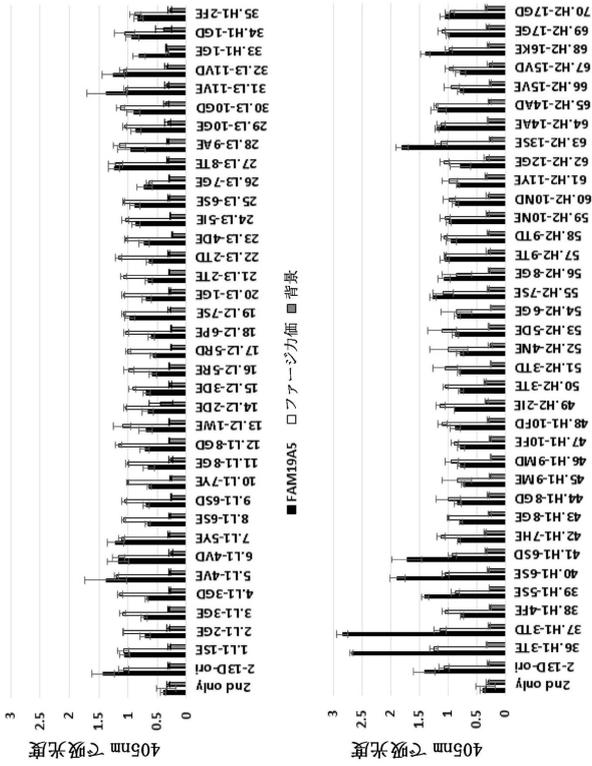


30

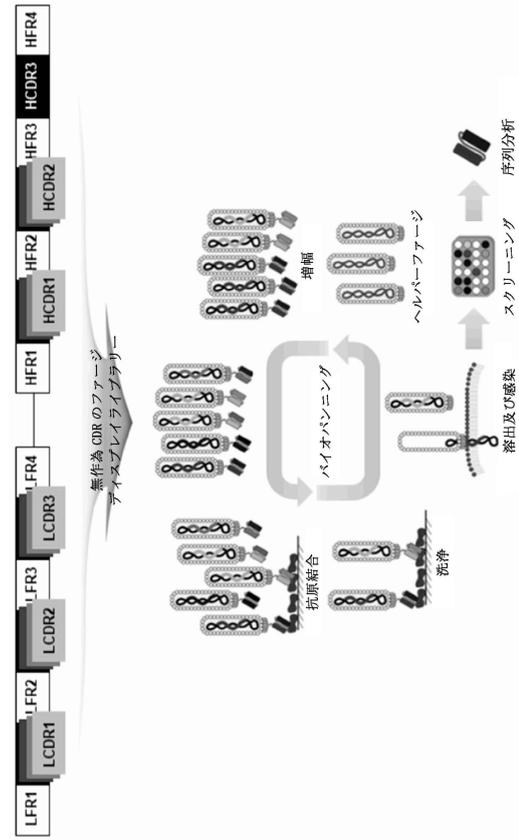
40

50

【 図 1 1 】



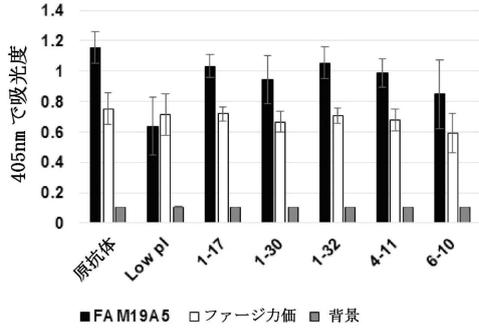
【 図 1 2 】



10

20

【 図 1 3 A 】



【 図 1 3 B 】

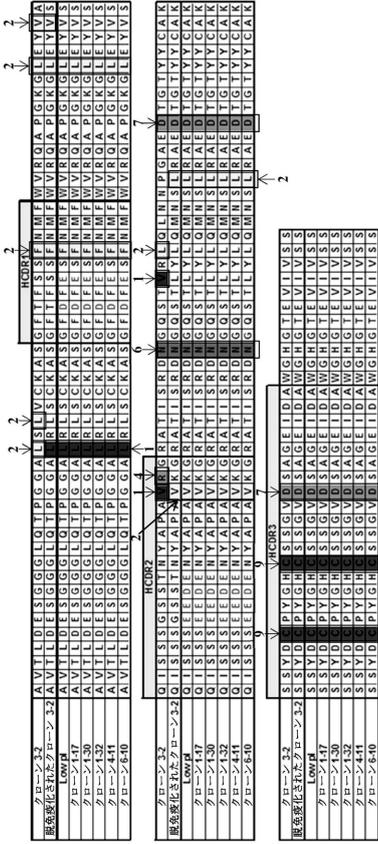
クローン	CamSol 点数	GRAVY 点数
原抗体	0.177	-0.384
Low pl	0.991	-0.465
1-17	0.734	-0.445
1-30	0.906	-0.465
1-32	0.717	-0.445
4-11	0.681	-0.441
6-10	0.378	-0.401

30

40

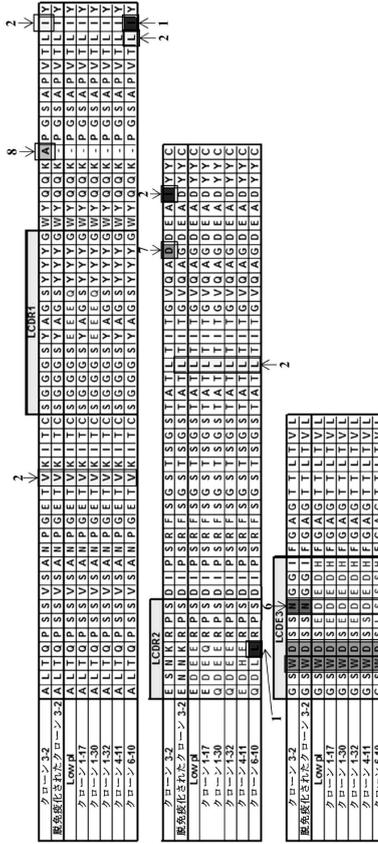
50

【 図 1 4 A 】



- 1 潜在力を持つ P1 高糖和度無差別 MIC クラス II
- 2 潜在力を持つ P1 中間糖和度無差別 MIC クラス II
- 3 最も近接したヒト生殖系配列の差異
- 4 潜在的アルギニン又はリシンメチル化
- 5 潜在的トリプトファン又はメチオニン糖化
- 6 潜在的アスパラギン酸アミド化
- 7 潜在的アスパルテート異性質化
- 8 希アミノ酸挿入
- 9 遊離システイン又は非標準システイン対

【 図 1 4 B 】

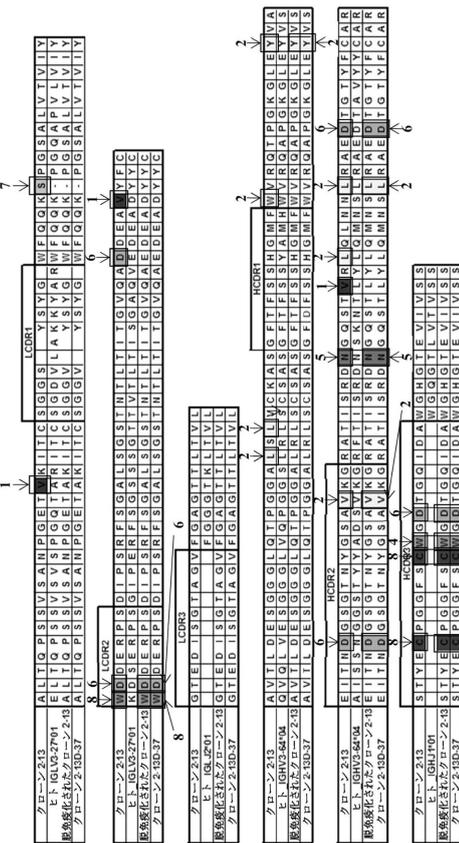


- 1 潜在力を持つ P1 高糖和度無差別 MIC クラス II
- 2 潜在力を持つ P1 中間糖和度無差別 MIC クラス II
- 3 最も近接したヒト生殖系配列の差異
- 4 潜在的アルギニン又はリシンメチル化
- 5 潜在的トリプトファン又はメチオニン糖化
- 6 潜在的アスパラギン酸アミド化
- 7 潜在的アスパルテート異性質化
- 8 希アミノ酸挿入
- 9 遊離システイン又は非標準システイン対

10

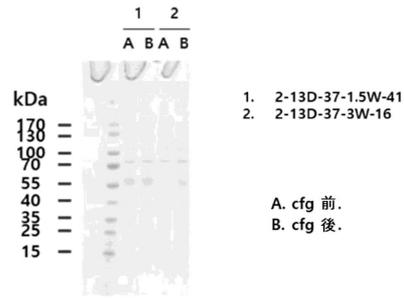
20

【 図 1 5 】



- 1 潜在力を持つ P1 高糖和度無差別 MIC クラス II (ITOPeW 分析)
- 2 潜在力を持つ P1 中間糖和度無差別 MIC クラス II (ITOPeW 分析)
- 3 潜在的アルギニン又はリシンメチル化
- 4 潜在的トリプトファン又はメチオニン糖化
- 5 潜在的アスパラギン酸アミド化
- 6 潜在的アスパルテート異性質化
- 7 希アミノ酸挿入
- 8 遊離システイン又は非標準システイン対

【 図 1 6 A 】



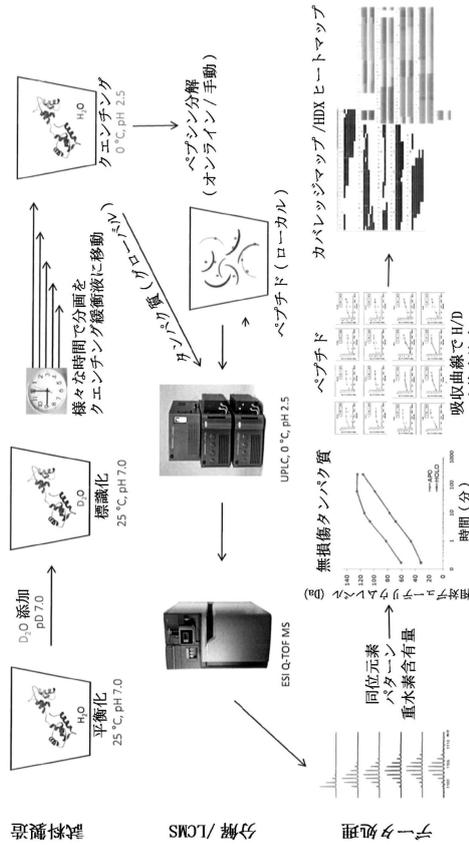
- 1. 2-13D-37-1.5W-41
 - 2. 2-13D-37-3W-16
- A. c.f.g 前.
B. c.f.g 後.

30

40

50

【 図 1 8 】



【 図 1 9 】

試料濃度	クエンチング条件	Roxy システム又は勾配型	ペプシン (μg, 5分)	クエンチング維持時間 (分)	カバレッジ率 (%)
ペプシンカラム (on), C18					
30pmol	100mM K.ホスファート pH 2.66	FG			19.1
30pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			65.0
30pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 4M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			19.5
30pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, pH 2.66	FG			65.0
40pmol	100mM K.ホスファート 250mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			43.9
40pmol	200mM Na.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			26.5
40pmol	His-tag) 100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			37.6
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		72.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5	5	72.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5	5	89.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5	5	92.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5	5	80.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5	5	72.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5	5	72.0
ペプシンカラム (on), C18, 濃縮試料					
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		90.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		92.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		72.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		76.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		77.6
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		92.0
40pmol	100mM K.ホスファート 150mM TCEP pH 2.66	FG			43.9
40pmol	200mM Na.ホスファート 750mM TCEP, 4M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			19.0
40pmol	100mM K.ホスファート 750mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			38.8
40pmol	100mM TCEP, 400mM グアニジン-HCl pH 2.66	FG			38.9
40pmol	500mM K.ホスファート 375mM TCEP, 1M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			43.9
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 1M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			84.1
40pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG			68.4
40pmol	500mM TCEP, 1M U pH 2.66	FG			48.0
40pmol	1M TCEP, 2M U pH 1.7	FG	5		95.0
40pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG			96.0
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG	5		98.0
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG		5	79.0
Waters ペプシンカラム (on), C18					
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG	1.2(5)		92.0
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG	1.2(5)		92.9
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG	1.2(5)		94.0
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG	1.2(5)		76.0
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG	1.2(5)		94.0
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG	1.2(5)		80.0
45pmol	1M TCEP, 2M U pH 2.66	FG	1.3(5)		85.0
ペプシンカラム (on), C8					
40pmol	His-tag) 100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			29.5
40pmol	His-tag) 100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		52.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG			57.0
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		79.8
ペプシンカラム (off), C8					
40pmol	100mM K.ホスファート 500mM TCEP, 2M グアニジン-HCl pH 2.66	FG	5		20.8

10

20

【 図 2 0 A 】



合計44個ペプチド、97.0%カバレッジ率、0.15重複率

【 図 2 0 B 】

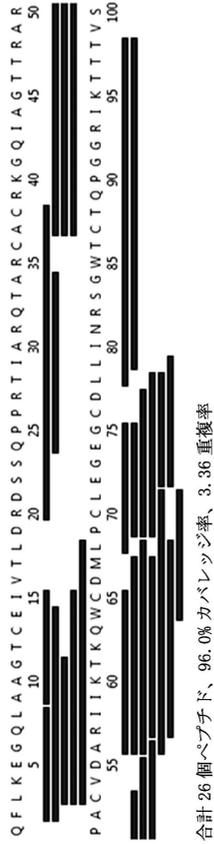
配列	開始	終了	MHP	RT
FAM19A5_HUMAN				
FLKEGQL	2	8	834.4720	6.56
FLKEGQLAAGTCE	2	14	1366.6671	6.34
LKEGQLAAG	3	11	886.4993	5.30
LKEGQLAAGTCE	3	14	1219.5987	5.69
LKEGQLAAGTCEI	3	15	1332.6828	6.83
LKEGQLAAGTCEIVTL	3	18	1645.8829	7.71
KEGQLAAGTCEVTLDRDS	4	22	2005.9859	5.04
AAGTCEI	9	15	664.2971	6.41
DRDSSQPPRTIARQTRAR	19	36	2058.0257	4.56
RDSSQPPRTIARQTRARCA	20	38	2117.0451	4.65
QPPRTIARQTA	24	34	1238.6964	6.41
PRTIARQTRARCA	26	37	1343.7325	6.38
PRTIARQTRARCA	26	40	1730.9377	4.56
TARCA	33	55	2405.2071	5.89
ARCA	34	43	1105.5717	5.45
ACRKGQIAGTTRARPAC	37	53	1759.9167	4.32
ACRKGQIAGTTRARPACVD	37	55	1974.0120	4.63
ACRKGQIAGTTRARPACVDA	37	56	2045.0491	4.77
CRKGQIAGTTRARPAC	38	53	1688.8795	4.96
RKGQIAGTTRARPACVD	39	55	1799.9657	5.77
IAGTTRARPA	43	52	1013.5851	6.21
GTTRARPACVDA	45	56	1217.6055	6.29
VDA	54	67	1706.8717	6.78
AR	56	65	1246.7089	5.65
AR	56	67	1492.7763	6.38
AR	56	68	1605.8604	7.27
AR	57	67	1919.0064	8.15
RB	57	67	1421.7392	6.37
RB	57	68	1534.8233	7.28
IK	59	68	1265.6381	7.60
WCDMLPCL	64	71	980.4038	9.97
LP	68	75	817.3760	6.85
PC	69	75	704.2920	5.73
PC	69	77	922.3281	6.05
PC	69	78	1035.4122	7.42
PC	69	93	2662.2170	8.79
EG	72	78	722.2661	6.48
EG	72	79	835.3502	7.72
LN	78	98	2303.2289	6.42
LN	79	98	2190.1448	5.90
IN	80	98	2077.0607	5.79
NR	81	98	1963.9767	5.71
TC	86	98	1363.6998	5.67
TQ	88	98	1159.6430	5.40

30

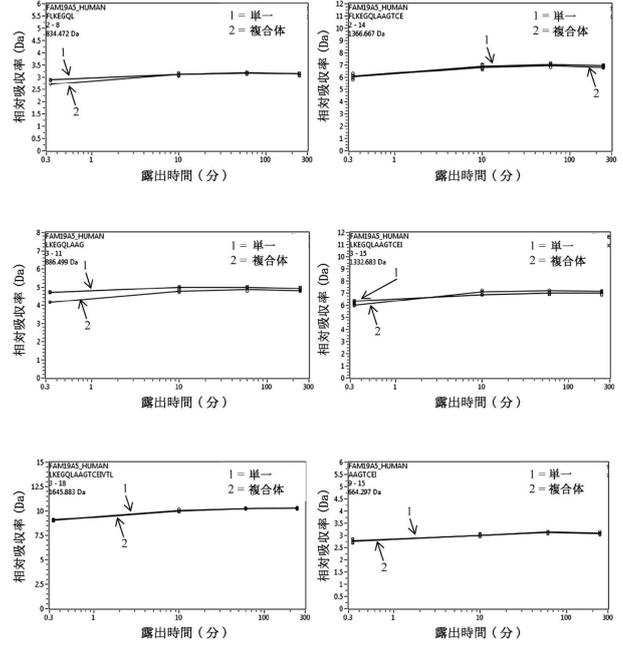
40

50

【 図 2 1 】



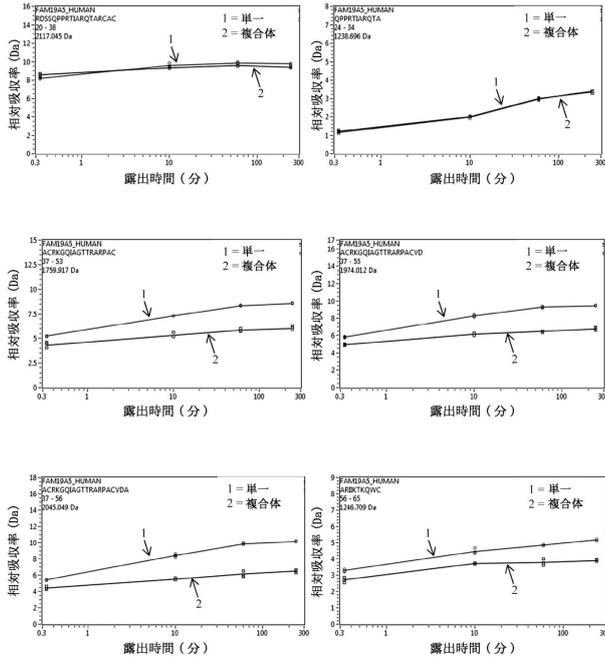
【 図 2 2 A 】



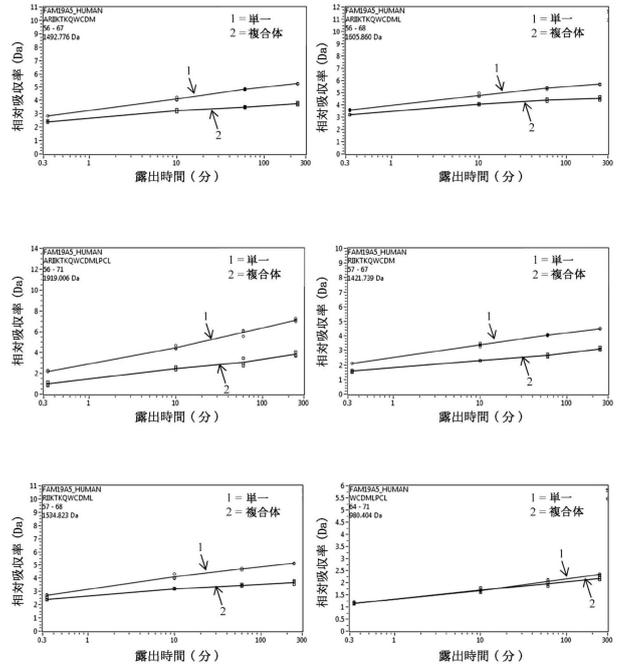
10

20

【 図 2 2 B 】



【 図 2 2 C 】

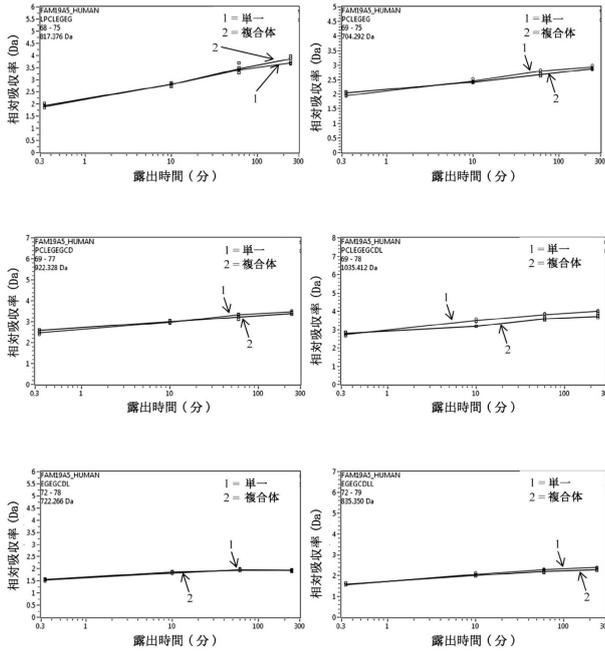


30

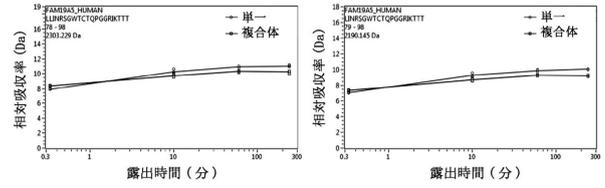
40

50

【 図 2 2 D 】



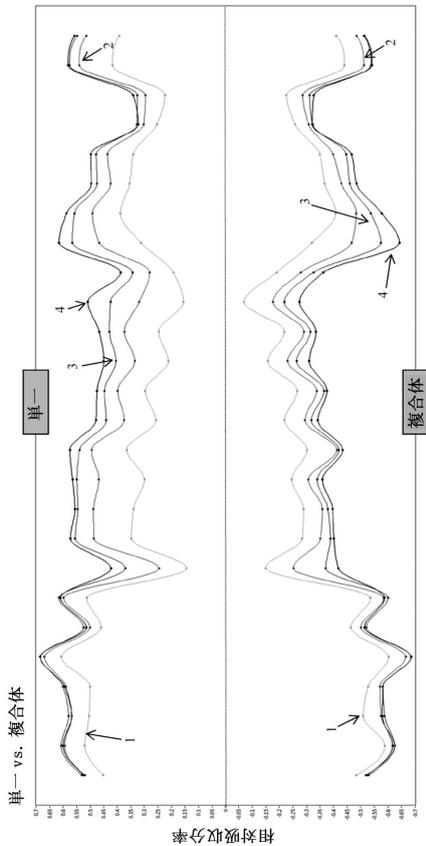
【 図 2 2 E 】



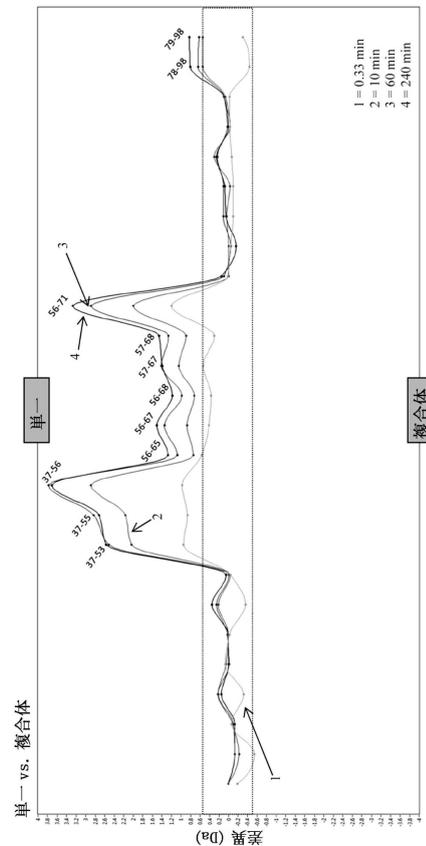
10

20

【 図 2 3 A 】



【 図 2 3 B 】

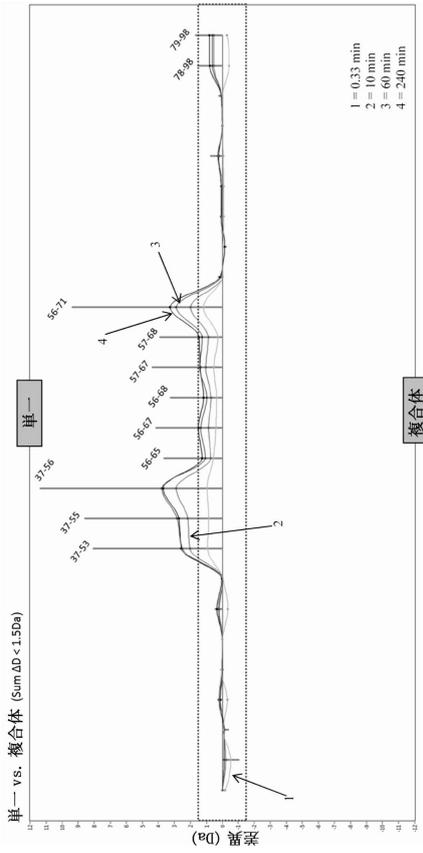


30

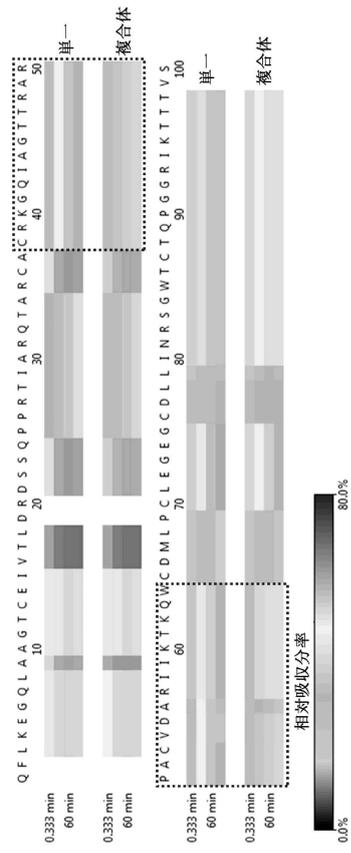
40

50

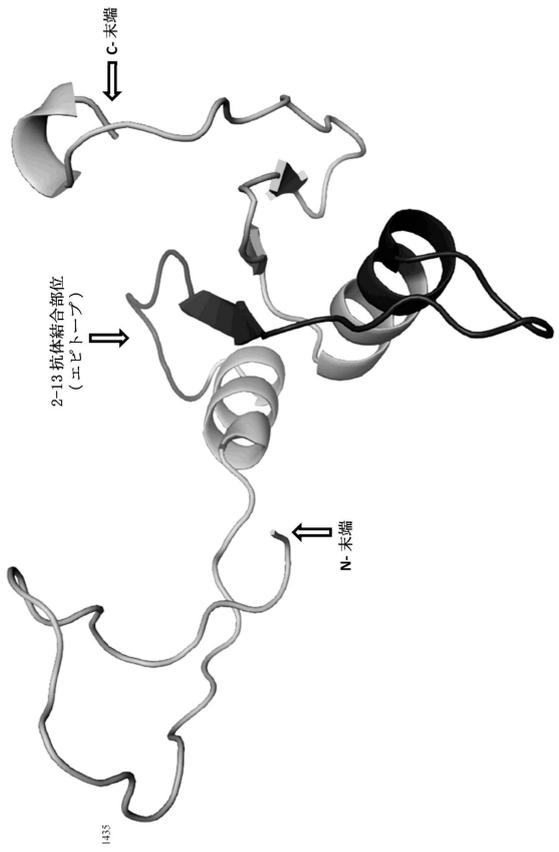
【 図 2 3 C 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023052664000001.xml

10

20

30

40

50

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和 5 年 2 月 27 日 (2 0 2 3 . 2 . 2 7)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

配列類似性 1 9 を持つヒトファミリー、メンバー A 5 (F A M 1 9 A 5) タンパク質に 10
 特異的に結合し、重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2 及
 び C D R 3 を含む分離された抗体 (“ 抗 F A M 1 9 A 5 抗体 ”) 又はその抗原結合部分であ
 って、

前記重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、配列番号 1 6、1 7 及び 1 8 に
 示したアミノ酸配列を含み、前記配列のそれぞれは、場合によって 1、2 又は 3 個の突然
 変異を含み、

前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 はそれぞれ、配列番号 3 0、3 1 及び 3 2 に
 示したアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の少なくとも一つ
 は、1、2 又は 3 個の突然変異を含み、

前記抗体は、配列番号 3 5 に示した V H 及び配列番号 4 5 に示した V L を含む基準抗体 20
 に比べて、ヒトにおいて減少した免疫原性及びヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質に対してよ
 り高い結合親和度を有する、分離された抗体又はその抗原結合部分。

【 請求項 2 】

前記重鎖 C D R 3 が配列番号 1 8、1 2 8 又は 1 2 9 に示したアミノ酸配列を含む、請
 求項 1 に記載の抗体。

【 請求項 3 】

前記重鎖 C D R 1 が配列番号 1 6 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載
 の抗体。

【 請求項 4 】

前記重鎖 C D R 1 が配列番号 1 9 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載 30
 の抗体。

【 請求項 5 】

前記重鎖 C D R 2 が配列番号 1 7 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれ
 かに記載の抗体。

【 請求項 6 】

前記軽鎖 C D R 3 が配列番号 3 2 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれ
 かに記載の抗体。

【 請求項 7 】

前記軽鎖 C D R 2 が配列番号 3 1 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれ
 かに記載の抗体。 40

【 請求項 8 】

前記軽鎖 C D R 1 が一つの突然変異を持つ、配列番号 3 0 に示したアミノ酸配列を含む
 、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の抗体。

【 請求項 9 】

前記突然変異が配列番号 3 0 のアミノ酸 4 においてセリンの脂肪族アミノ酸への置換を
 含む、請求項 8 に記載の抗体。

【 請求項 1 0 】

前記脂肪族アミノ酸がバリンを含む、請求項 9 に記載の抗体。

【 請求項 1 1 】

重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含み、前記 V H は、配列番号 3 5 に 50

示したアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 又は約 100% 同ジアミノ酸配列を含み、及び / 又は前記 V L は、配列番号 45 に示したアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 又は約 100% 同ジアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗体が重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む基準抗体と交差競合し、前記 V H は、配列番号 36 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 46 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の抗体。 10

【請求項 13】

前記抗体が重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む基準抗体と交差競合し、前記 V H は、配列番号 37 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 46 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 14】

前記抗体が重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む基準抗体と交差競合し、前記 V H は、配列番号 130 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 46 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 15】

前記抗体が重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む基準抗体と交差競合し、前記 V H は、配列番号 131 に示したアミノ酸配列を含み、前記 V L は、配列番号 46 に示したアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の抗体。 20

【請求項 16】

次の特性のいずれか一つ以上を示す、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の抗体：

(a) 酵素結合免疫吸着分析法 (E L I S A) によって測定したとき、 K_D が 10 n M 以下である可溶性ヒト F A M 1 9 A 5 に結合する特性；

(b) E L I S A によって測定したとき、 K_D が 10 n M 以下である膜結合ヒト F A M 1 9 A 5 に結合する特性；

(c) 反応性神経膠症の発病を減少、反転、遅延及び / 又は予防する特性； 30

(d) 反応性星状細胞の過剰増殖を抑制する特性；

(e) ニューロカン及び神経膠抗原 2 (N G 2) を含むコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現を減少させる特性；

(f) 神経細胞の核内 c - f o s 及び p E R K の発現を増加させる特性；

(g) 神経細胞の生存を促進する特性；

(h) 神経細胞内 G A P 4 3 の発現を増加させる特性；

(i) 軸索の再成長を促進する特性；

(j) 例えば腫瘍内血管の正常化を誘導する特性；

(k) 腫瘍の成長を抑制する特性；

(l) 免疫細胞の腫瘍内浸潤を増大させる特性； 40

(m) 神経細胞の腫瘍内浸潤を増大させる特性；

(n) 大食細胞又は小膠細胞の食細胞活性を増進させる特性；

(o) 大食細胞又は小膠細胞のミトコンドリア膜電位を増加させる特性；

(p) 腫瘍に対する骨髄由来抑制細胞 (M D S C) の動員を減少させる特性；

(q) 腫瘍において壊死及び浮腫を減少させる特性；

(r) 腫瘍の組織透過性を減少させる特性；及び

(s) 腫瘍において血流速度を増加させる特性。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項の抗体をコードする、核酸。

【請求項 18】

請求項 17 の核酸を含む、ベクター。

【請求項 19】

請求項 18 のベクターを含む、細胞。

【請求項 20】

作用剤に連結された請求項 1 ~ 16 のいずれか一項の抗体を含む、免疫接合体。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項の抗体、請求項 17 の核酸、請求項 18 のベクター、請求項 19 の細胞又は請求項 20 の免疫接合体、及び担体を含む、組成物。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項の抗体、請求項 17 の核酸、請求項 18 のベクター、請求項 19 の細胞又は請求項 20 の免疫接合体及び使用説明書を含む、キット。 10

【請求項 23】

ヒト F A M 1 9 A 5 タンパク質に特異的に結合する抗体を生産する方法であって、請求項 19 の細胞を適切な条件で培養して前記抗体を分離することを含む、方法。

【請求項 24】

前記組成物は、必要とする対象で症状を治療する薬学的組成物である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記症状が腫瘍、線維症、緑内障、感情障害、網膜病症、老化関連黄斑変性又は神経病性疼痛を含む、請求項 24 に記載の組成物。 20

【請求項 26】

前記疾患又は症状が腫瘍である、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記腫瘍が黒色腫、膀胱癌、神経膠腫、乳癌、リンパ腫、肺癌、腎臓癌、前立腺癌、線維肉腫、結腸腺癌腫、肝癌又は卵巣癌を含む、請求項 25 又は 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記神経膠腫が多形成膠芽細胞腫である、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が血管の正常化を誘導する、請求項 24 ~ 28 のいずれかに記載の組成物。 30

【請求項 30】

前記血管の正常化が連結性増加、壁厚増加、血管径減少、より規則的な血管方向及び分布パターン、血管数増加、漏れ及び透過性減少、血管上で血管周囲細胞カバレッジ及び近接性増加、酸素供給増加又はこれらの組合せを含む血管の特性変化を伴う、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が腫瘍の成長を抑制する、請求項 25 ~ 30 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 32】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が免疫細胞の腫瘍内浸潤を増大させる、請求項 25 ~ 31 のいずれかに記載の組成物。 40

【請求項 33】

前記免疫細胞が大食細胞、樹状細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、自然殺害(NK)細胞又はこれらの組合せを含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記免疫細胞がさらに肥大を示す、請求項 32 又は 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記免疫細胞の腫瘍内増大した浸潤が神経細胞の腫瘍内浸潤増加を伴う、請求項 32 ~ 34 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 36】

前記神経細胞が星状細胞、膠細胞又はこれらの組合せを含む、請求項 3 5 に記載の組成物
—

【請求項 3 7】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が、大食細胞又は小膠細胞の食細胞活性を増進させる、請求項 2 4 ~ 3 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が、大食細胞又は小膠細胞のミトコンドリア膜電位を増加させる、請求項 2 4 ~ 3 7 のいずれかに記載の組成物
—

【請求項 3 9】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が、腫瘍に対する骨髄由来抑制細胞 (M D S C) の動員を減少させる、請求項 2 5 ~ 3 7 のいずれかに記載の組成物。

10

【請求項 4 0】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が、腫瘍において壊死及び浮腫を減少させる、請求項 2 5 ~ 3 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が、腫瘍の組織透過性を減少させる、請求項 2 5 ~ 4 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記抗体、前記核酸、前記ベクター、前記細胞又は前記免疫接合体が、腫瘍において血流速度を増加させる、請求項 2 5 ~ 4 1 のいずれかに記載の組成物。

20

【請求項 4 3】

追加の治療剤を投与することを含む、請求項 2 4 ~ 4 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記追加の治療剤が化学療法、免疫療法、放射線療法又はこれらの組合せを含む、請求項 4 3 に記載の組成物。

30

40

50

フロントページの続き

- 大韓民国, 02578 ソウル, ドンデムン - グ, ヨンドウ ドン 104 - 3, ドンデムン プル
ギオシティ - , オフィステル ドン 825
- (72)発明者 キム, ドン シク
大韓民国, 08750 ソウル, ガナク - グ, ボンチョン - ロ 387, ドウサン - アpartment
114 - 1301
- (72)発明者 イ, ジェ - クン
大韓民国, 06608 ソウル, ソチョ - グ, ソアン - ロ, 197, ロッテ キャスル クラシック
アpartment 110 - 101
- (72)発明者 ヨン, ジョンウォン
大韓民国, 30064 セジョン - シ, ダルビト - ロ, 80, 1217 - 402
- (72)発明者 チョン, ジュンホ
大韓民国, 13590 キョンギ - ド, ソンナム - シ, プンリム アイワンプラス, ソヒョン - ドン
, プンダン - グ, ソヒョン - ロ 170, ティー - ドン, ルーム 1801
- (72)発明者 ジン, ジュンヨン
大韓民国, 13835 キョンギ - ド, クァチョン - シ, ウォンムン - ドン, ビョルヤン - ロ, レ
ミアン - シュル アpartment, フロア 338, ルーム 1602