

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043381**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.22

(21) Номер заявки
201992747

(22) Дата подачи заявки
2018.06.27

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К FAM19A5 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/525,635; 62/582,887**

(32) **2017.06.27; 2017.11.07**

(33) **US**

(43) **2020.04.21**

(86) **PCT/IB2018/054785**

(87) **WO 2019/003165 2019.01.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НЬЮРАКЛ САЙЕНС КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
**Ким Пончол, Ли Чэ-Кын, Ким Тон
Сик, Чон Чонхо, Чин Чонён (KR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) US-A1-20150118230
Product Datasheet: TAFAs/FAM19A5
Antibody NBP2-31879 [online], novusbio, 12 January
2017. Retrieved from the Internet: <URL: <https://www.novusbio.com/PDFs2/NBP2-31879.pdf>>, See the
entire document

US-A1-20160060705

WO-A1-2015015000

TANG, Y. TOM et al., "TAFAs: a novel secreted
family with conserved cysteine residues and restricted
expression in the brain", Genomics, 2004, Vol. 83, p.
727-734, See the entire document

GenBank: AAF32220.1: scFV antibody V
region, partial [synthetic construct] (26 July 2016), See
the entire document

GenBank: AJQ23617.1: immunoglobulin light
chain variable region, partial [Gallus gallus] (31
December 2016), See the entire document

(57) Изобретение предусматривает антитела, которые специфически связываются с человеческим FAM19A5, и композиции, содержащие такие антитела. Также в данном документе предусмотрены способы для лечения фиброза или опухоли с использованием антитела к FAM19A5.

B1

043381

**043381
B1**

Ссылка на перечень последовательностей представлен в электронном виде

Содержание перечня последовательностей, представленного в электронном виде в текстовом файле ASCII (название: 3763.005PC02_SeqListing_ST25.txt; размер: 166 889 байт и дата создания: 26 июня 2018 г.), поданного в заявке на данное изобретение, включено посредством ссылки в полном объеме.

Область техники

Настоящее изобретение предусматривает антитела, которые специфически связываются с членом A5 семейства со сходством последовательностей 19 (FAM19A5), композиции, содержащие такие антитела, и способ применения таких антител для предотвращения или лечения нарушений или заболеваний, таких как фиброз и/или рак (например, опухоль головного мозга, например глиобластома) у субъекта.

Уровень техники

FAM19A5 является членом подсемейства белков TAFA, которое состоит из пяти очень гомологичных малых белков. Tang T.Y. et al., Genomics, 83(4):727-34 (2004). Эти белки содержат консервативные остатки цистеина в фиксированных положениях и отдаленно связаны с макрофагальным белком воспаления 1-альфа (MIP-1-альфа), членом семейства CC-хемокинов. Белки TAFA преимущественно экспрессируются в определенных областях головного и спинного мозга. Считается, что эти белки образуются и секретируются зрелыми нейрональными стволовыми клетками в процессах нейрогенеза.

FAM19A5 преимущественно экспрессируется в головном мозге позвоночных и считается, что FAM19A5 играет важную роль в развитии, дифференциации, формировании полноценной центральной нервной системы, и может быть использован для профилактики или лечения повреждений и/или заболеваний центральной нервной системы. Публикация патента США № 2015/0118230.

В дополнение к регуляции нервной системы, FAM19A5 также может играть роль в регуляции иммунных клеток. Фиброз является общей проблемой со здоровьем, часто возникающей при различных патологических процессах, для которой характерна инфильтрация мононуклеарных иммунных клеток, выделяющих цитокины, которые стимулируют фибробласты к изменению соединительной ткани. Соответственно, существует необходимость в разработке антител, которые специфически связываются с FAM19A5 и которые способны модулировать активность FAM19A5.

Раскрытие изобретения

В данном документе предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое специфически связывается с белком A5, членом семейства со сходством последовательностей 19 ("FAM19A5") человека ("антитело к FAM19A5") и которое за связывание с эпитопом FAM19A5 человека конкурирует с эталонным антителом, содержащим CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где:

(i) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(ii) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или

(iii) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Также в данном документе предусмотрены выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое специфически связывается с белком A5, членом семейства со сходством последовательностей 19 ("FAM19A5") человека ("антитело к FAM19A5"), и которое связывается с тем же эпитопом FAM19A5 человека, что и эталонное антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где:

(i) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и

CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(ii) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или

(iii) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 по настоящему изобретению связывается по меньшей мере с эпитопом FAM19A5, представленным как SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления антитело к FAM19A5 связывается с эпитопом FAM19A5, представленным как SEQ ID NO: 6, к одной или нескольким аминокислотам соответственно аминокислотными остатками (i) 46-51 (т.е. DSSQPR), (ii) 46, 50 и 52 (т.е. D---P-R) или (iii) 46, 47, 48 и 50 (т.е. DSS-P). В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 связывается по меньшей мере с эпитопом FAM19A5, представленным как SEQ ID NO: 9. В определенных вариантах осуществления антитело к FAM19A5 связывается по меньшей мере с одним эпитопом FAM19A5, определенным как EP2, EP4 и/или EP8, где EP2 содержит аминокислоты DSSQP (SEQ ID NO: 66), где EP4 содержит аминокислоты ARCACRK (SEQ ID NO: 68) и где EP8 содержит аминокислоты TCTQPGGR (SEQ ID NO: 72).

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5, описанное в данном документе, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где:

- (i) CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 20;
- (ii) CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 21;
- (iii) CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 22;
- (iv) CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 32;
- (v) CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 33; и/или
- (vi) CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 содержит (i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 35, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 39; (ii) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 36, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 40; или (iii) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 38, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, и/или где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 содержит (i) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 60; и (ii) легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 по настоящему изобретению является химерным антителом, человеческим антителом или гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 имеет одно или несколько из следующих свойств:

- (a) уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает фиброз;
- (b) уменьшает образование избыточного внеклеточного матрикса (ECM);
- (c) задерживает рост или прогрессирующее опухоль;
- (d) связывается с растворимым человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью иммуноферментного анализа (ELISA);
- (e) связывается с мембраносвязанным человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью ELISA;

- (f) уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает развитие реактивного глиоза;
- (g) подавляет избыточную пролиферацию реактивных астроцитов;
- (h) уменьшает экспрессию протеогликанов хондроитинсульфата, включая нейрокан и нейрон-глиальный антиген 2 (NG2);
- (j) увеличивает экспрессию c-fos и pERK в ядре нейронов;
- (k) способствует выживанию нейронов;
- (l) увеличивает экспрессию GAP43 в нейронах и
- (m) способствует отрастанию аксона.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает эпитоп члена A5 со сходством последовательностей 19 (FAM19A5), состоящий практически или состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной к SEQ ID NO: 5, 6, 9 или 10, где эпитоп способен быть специфически связанным с эталонным антителом, содержащим (i) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, и (ii) переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 42.

Также в данном документе представлена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к FAM19A5 или эпитоп FAM19A5, описанные в данном документе. Также предусмотрена композиция, содержащая антитело к FAM19A5 или эпитоп FAM19A5 по настоящему изобретению.

В некоторых аспектах настоящее изобретение также предусматривает антитело к FAM19A5 для лечения опухоли мозга.

В других аспектах настоящее изобретение предусматривает способ постановки диагноза субъекту, нуждающемуся в этом, включающий контакт биологического образца субъекта с антителом к FAM19A5, описанным в данном документе.

Варианты воплощения изобретения

Вариант воплощения 1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое специфически связывается с членом A5 семейства со сходством последовательностей 19 человека (FAM19A5) и проявляет одно или несколько из следующих свойств:

- (a) уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает фиброз;
- (b) уменьшает образование избыточного внеклеточного матрикса (ECM);
- (c) задерживает рост или прогрессирование опухоли.

Вариант воплощения 2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 1, которое дополнительно содержит одно или несколько из следующих свойств:

- (d) связывается с растворимым человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью иммуферментного анализа (ELISA);
- (e) связывается с мембраносвязанным человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью ELISA;

- (f) уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает развитие реактивного глиоза;
- (g) подавляет избыточную пролиферацию реактивных астроцитов;
- (h) уменьшает экспрессию протеогликанов хондроитинсульфата, включая нейрокан и нейрон-глиальный антиген 2 (NG2);
- (j) увеличивает экспрессию c-fos и pERK в ядре нейронов;
- (k) способствует выживанию нейронов;
- (l) увеличивает экспрессию GAP43 в нейронах;
- (m) способствует отрастанию аксона.

Вариант воплощения 3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 1 или 2, которое конкурирует за связывание с эпитопом FAM19A5 человека с (i) эталонным антителом, содержащим CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (ii) с эталонным антителом, содержащим CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или (iii) с эталонным антителом, содержащим CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 тяжелой цепи содер-

жит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Вариант воплощения 4. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 1 или 2, которое связывается с тем же самым эпитопом FAM19A5, что и (i) эталонное антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; (ii) как эталонное антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или (iii) как эталонное антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Вариант воплощения 5. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 3 или 4, которое связывается по меньшей мере с одним эпитопом FAM19A5, который является SEQ ID NO: 6.

Вариант воплощения 6. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 2-5, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть связывается только с FAM19A5, который является SEQ ID NO: 6.

Вариант воплощения 7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 2-5, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть дополнительно связывается с дополнительным эпитопом FAM19A5.

Вариант воплощения 8. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 7, где дополнительный эпитоп FAM19A5 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и любой их комбинации.

Вариант воплощения 9. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 1-8, которое содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи.

Вариант воплощения 10. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 9, где CDR1 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 20.

Вариант воплощения 11. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 9 или 10, где CDR2 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 21.

Вариант воплощения 12. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 9-11, где CDR3 тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 22.

Вариант воплощения 13. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 9-12, где CDR1 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 32.

Вариант воплощения 14. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 9-13, где CDR2 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 33.

Вариант воплощения 15. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 9-14, где CDR3 легкой цепи содержит SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 34.

Вариант воплощения 16. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому

из вариантов воплощения 1-15, которое содержит (i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, и (ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 42.

Вариант воплощения 17. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 1-16, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38.

Вариант воплощения 18. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 1-17, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, или SEQ ID NO: 42.

Вариант воплощения 19. Моноклональное антитело, по любому из вариантов воплощения 1-18, где моноклональное антитело является однодоменным антителом.

Вариант воплощения 20. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 1-19, где моноклональное антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, их варианта или их комбинации.

Вариант воплощения 21. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 20, где моноклональное антитело является человеческим антителом IgG1.

Вариант воплощения 22. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту воплощения 20, где моноклональное антитело содержит изотип человеческого антитела IgG2 или IgG4.

Вариант воплощения 23. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 1-22, дополнительно содержащее константную область без функции Fc.

Вариант воплощения 24. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 1-23, которое является химерным антителом, человеческим антителом или гуманизированным антителом.

Вариант воплощения 25. Моноклональное антитело по любому из вариантов воплощения 1-24, где моноклональное антитело содержит (i) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 60; и (ii) легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 64.

Вариант воплощения 26. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 1-25, где его антигенсвязывающая часть является Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одной цепью Fv (scFv).

Вариант воплощения 27. Биспецифическая молекула, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов воплощения 1-26, которое связано с молекулой, имеющей второй связывающий фрагмент.

Вариант воплощения 28. Эпитоп члена A5 семейства со сходством последовательностей 19 человека (FAM19A5), состоящий практически из, или состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной к SEQ ID NO: 5, 6, 9 или 10, где эпитоп способен быть специфически связанным с эталонным антителом, содержащим (i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, и (ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 42.

Вариант воплощения 29. Нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из вариантов воплощения 1-26, биспецифическая молекула по варианту воплощения 27 или эпитоп по варианту воплощения 28.

Вариант воплощения 30. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту воплощения 29.

Вариант воплощения 31. Вектор по варианту воплощения 30 для использования в генной терапии.

Вариант воплощения 32. Клетка, трансформированная с экспрессирующим вектором по варианту воплощения 30.

Вариант воплощения 33. Иммуноконъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из вариантов воплощения 1-26, или биспецифическая молекула по

варианту воплощения 27, связанная с агентом.

Вариант воплощения 34. Композиция, содержащая (i) моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из вариантов воплощения 1-26, биспецифическую молекулу по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгат по варианту воплощения 33 и (ii) носитель.

Вариант воплощения 35. Набор, содержащий (i) моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из вариантов воплощения 1-26, биспецифическую молекулу по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгат по варианту воплощения 33 и (ii) инструкции по использованию.

Вариант воплощения 36. Способ подготовки антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, включающий иммунизацию животного, не являющегося человеком, эпитопом по варианту воплощения 28, и продукцию антитела или его антигенсвязывающей части.

Вариант воплощения 37. Способ получения антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, включающий культивирование клетки по варианту воплощения 32, в подходящих условиях и выделение антитела или его антигенсвязывающей части.

Вариант воплощения 38. Способ уменьшения, устранения и/или предотвращения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из вариантов воплощения 1-26, биспецифической молекулы по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгата по варианту воплощения 33, таким образом, что задерживается развитие фиброза.

Вариант воплощения 39. Способ уменьшения образования избыточного внеклеточного матрикса (ЕСМ) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из вариантов воплощения 1-26, биспецифической молекулы по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгата по варианту воплощения 33, где образование избытка ЕСМ уменьшается.

Вариант воплощения 40. Способ профилактики, уменьшения интенсивности или лечения рака печени, рака легких, рака почки, рака молочной железы и/или рака поджелудочной железы у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из вариантов воплощения 1-26, биспецифической молекулы по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгата по варианту воплощения 33.

Вариант воплощения 41. Способ по варианту воплощения 40, где рак печени является гепатоцеллюлярной карциномой.

Вариант воплощения 42. Способ профилактики, уменьшения интенсивности или лечения рака печени, рака легких, рака почки, рака молочной железы и/или рака поджелудочной железы, ассоциированного с фиброзом у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из вариантов воплощения 1-26, биспецифической молекулы по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгата по варианту воплощения 33.

Вариант воплощения 43. Способ по варианту воплощения 38 или 42, где фиброз включает фиброз печени, фиброз легких, почечный фиброз, миофиброз, фиброз поджелудочной железы, фиброз кожи, фиброз миокарда, фиброз артерий, артрофиброз, фиброз молочных желез, мышечный фиброз, забрюшинный фиброз, фиброз щитовидной железы, фиброз лимфатических узлов, фиброз мочевого пузыря и/или фиброз плевры.

Вариант воплощения 44. Способ по любому из вариантов воплощения 38-43, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть вводят внутривенно, перорально, парентерально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, легочно, подкожно или интравентрикулярно.

Вариант воплощения 45. Способ по любому из вариантов воплощения 38-44, где субъект является человеком.

Вариант воплощения 46. Способ измерения уровня FAM19A5 в образце от субъекта, нуждающегося в этом, включающий контакт моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из вариантов осуществления 1-26, биспецифической молекулы по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгата по варианту воплощения 33 с образцом, полученным от субъекта.

Вариант воплощения 47. Способ по варианту воплощения 46, где уровень FAM19A5 увеличенный в образце субъекта по сравнению с контрольным образцом.

Вариант воплощения 48. Способ диагностики фиброза у субъекта, нуждающегося в этом, включающий контакт моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из вариантов воплощения 1-26, биспецифической молекулы по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгата по варианту воплощения 33 с образцом, полученным от субъекта.

Вариант воплощения 49. Способ по варианту воплощения 48, где фиброз является фиброзом легкого или печени.

Вариант воплощения 50. Способ по варианту воплощения 48 или 49, где уровень FAM19A5 увеличенный в образце субъекта по сравнению с уровнем FAM19A5 в контрольном образце субъекта без фиброза.

Вариант воплощения 51. Способ диагностики опухоли с фиброзом у субъекта, нуждающегося в этом, включающий контакт моноклонального антитела или его антигенсвязывающей части по любому из

вариантов воплощения 1-26, биспецифической молекулы по варианту воплощения 27 или иммуноконъюгата по варианту воплощения 33 с образцом, полученным от субъекта.

Вариант воплощения 52. Способ по варианту воплощения 51, где уровень FAM19A5 увеличенный в образце субъекта по сравнению с уровнем FAM19A5 в контрольном образце субъекта без опухоли.

Вариант воплощения 53. Способ по любому из вариантов воплощения 46-52, где образец является кровью, сывороткой, плазмой, спинномозговой жидкостью, тканевой биопсией, биопсией органа или их комбинацией.

Вариант воплощения 54. Способ по любому из вариантов воплощения 46-52, где образец является свежим образцом опухоли, замороженным образцом опухоли или образцом, зафиксированным в формалине и залитым парафином.

Вариант воплощения 55. Способ по любому из вариантов воплощения 46-52, где контакт включает проведение анализа.

Вариант воплощения 56. Способ по варианту воплощения 54, где анализ включает вестерн-блот анализ, слот-блот анализ, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), иммунофлуоресцентный анализ на основе проточной цитометрии (FACS), масс-спектрометрию, поверхностный плазмонный резонанс (SPR) или их комбинацию.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 демонстрирует аминокислотные последовательности эпитопов F1-F6 (конъюгированных с BSA) и их расположение на человеческом полипептиде FAM19A5. Размеры различных фрагментов эпитопа указаны в скобках.

Фиг. 2 демонстрирует результаты ELISA для связывания антител к FAM19A5 1-65, 2-13 и 3-2. Для антитела 3-2 продемонстрировано два разных изотипа: человеческий IgG1 ("h3-2") и мышинный IgG1 ("m3-2"). Для каждого из антител 1-, 2-, 3-, 4-, 5- и 6-й столбцы (начиная слева) отображают связывание с фрагментами эпитопов F1, F2, F3, F4, F5 и F6 соответственно.

Самый крайний столбец справа отображает позитивный контроль (т.е. белок FAM19A5, меченный His). Точные значения O.D. указаны на вершине каждого столбца.

Фиг. 3А-3С демонстрируют результаты ELISA для связывания антител к FAM19A5 3-2 и 1-28 с тринадцатью разными мутантными пептидами фрагмента F2 эпитопа FAM19A5: (i) F2-01-BSA (# 1), (ii) F2-02-BSA (# 2), (iii) F2-03-BSA (# 3), (iv) F2-04-BSA (# 4), (v) F2-05-BSA (# 5), (vi) F2-06-BSA (# 6), (vii) F2-07-BSA (# 7), (viii) F2-08-BSA (# 8), (ix) F2-09-BSA (# 9), (x) F2-10-BSA (# 10), (xi) F2-11-BSA (# 11), (xii) F2-12-BSA (# 12) и (xiii) F2-13-BSA (# 13).

Фиг. 3А демонстрирует результаты для антитела 3-2 с человеческим изотипом IgG1.

Фиг. 3В демонстрирует результаты для антитела 3-2 с мышинным изотипом IgG1.

Фиг. 3С демонстрирует результаты для антитела 1-28.

Точные значения OD указаны на вершине каждого столбца.

Фиг. 4 демонстрирует выравнивание аминокислотных последовательностей разных членов семейства FAM19A (т.е. FAM19A1-5). Области с наибольшим аминокислотным разнообразием среди членов обозначены рамками и показаны как EP1-EP8. Антитело IgG ("только IgG") показано как контроль. Ось Y предусматривает значение OD

Фиг. 5 демонстрирует результаты ELISA для связывания антител к FAM19A5 1-65, 1-28, 2-13 и 3-2 с мутантами FAM19A5 M1-M8. Для каждого из антител восемь столбцов соответствуют мутантам M1-M8 (двигаясь слева направо).

Фиг. 6А демонстрирует принципиальную схему сэндвич ELISA анализа с двумя сайтами, который используется для оценки конкурентности среди разных антител к FAM19A5.

Фиг. 6В демонстрирует результаты анализа конкурентности для шести разных антител к FAM19A5: 1-65, P2-A03, P2-F11, 13B4, 2-13 и 3-2. Термин "S/N" относится к соотношению сигнала к шуму, которое измерено следующим образом: [OD 10 нг/мл антигена]/[OD 0 нг/мл антигена]. Серые прямоугольники демонстрируют конкурентность (т.е. соотношение S/N ниже чем 2).

Фиг. 7А и 7В демонстрируют результаты ELISA для связывания нескольких антител к FAM19A5 с FAM19A5. Показаны результаты для следующих антител: 1-65, 13B4, 13F7, 1-28, 2-13, 3-2, P1-A03, P1-A08, P1-D03, P1-F02, P1-G09, P2-A01, P2-A03, P2-C12, P2-F07 и P2-F11 (двигаясь слева направо).

Фиг. 7А демонстрирует результаты, как диаграмму, в виде столбцов для различных концентраций антител к FAM19A5.

Фиг. 7В демонстрирует Kd (нМ) для разных антител к FAM19A5.

Фиг. 8 демонстрирует сравнение уровня белка FAM19A5 в сыворотке крыс (n=5) с фиброзом печени, индуцированным перевязкой желчного протока (BDL) ("модель заболевания"), против здоровых крыс ("норма") (n=3). Уровень белка FAM19A5 показан как кратное изменение по сравнению с уровнем, наблюдаемым у нормальных контрольных животных. "*" Обозначает статистически значимую разницу (p<0,005) по сравнению с нормальными контрольными животными.

Фиг. 9 демонстрирует сравнение уровня белка FAM19A5 в сыворотке крыс (n=5) с идиопатическим фиброзом легких, индуцированным интратрахеальной инъекцией 3 мг/кг блеомицина ("модель заболевания"), против здоровых крыс ("норма") (n=5). Уровень белка FAM19A5 показан как кратное изменение

по сравнению с уровнем, наблюдаемым у нормальных контрольных животных. "*" Обозначает статистически значимую разницу ($p < 0,005$) по сравнению с нормальными контрольными животными.

Фиг. 10 демонстрирует кратное изменение в уровне белка FAM19A5 в сыворотке как пациентов с подтвержденным фиброзом печени, например циррозом, (пациент # 1-10), так и здоровых индивидуумов (норма # 1-3). Конкретное значение, указанное над каждым столбцом гистограммы, обозначает кратное изменение средней концентрации белка FAM19A5, обнаруженной в сыворотке здоровых индивидуумов.

Фиг. 11 демонстрирует сравнение окрашенной Н&Е (гематоксилином и еозином) ткани левого желудочка у животных с индуцированным инфарктом миокарда, обработанных контрольным антителом ("NHI") или антителом к FAM19A5 ("1-65", "3-2" и "1-28"). Здоровые животные (т.е. без индуцированного инфаркта миокарда, "наивные") использовались как дополнительный контроль.

Фиг. 12А и 12В демонстрируют сравнение накопления коллагена в ткани левого желудочка у животных с индуцированным инфарктом миокарда. Животные с индуцированным инфарктом миокарда получали либо контрольное антитело ("NHI"), либо антитело к FAM19A5 ("1-65", "3-2" и "1-28"). Здоровые животные (т.е. без индуцированного инфаркта миокарда, "наивные") снова использовались как дополнительный контроль.

Фиг. 12А демонстрирует накопление коллагена с использованием трихромного окрашивания по Массону.

Фиг. 12В демонстрирует накопление коллагена (т.е. область фиброза) как соотношение области фиброза к области всего левого желудочка. Данные выражены как среднее арифметическое \pm S.D ($n=5-8$ на группу). "***/**" Над столбцами обозначает статистически значимую разницу ($p < 0,001$, $p < 0,05$ соответственно) по сравнению с группой "наивных" (здоровые животные). "#" над столбцами обозначает статистически значимую разницу ($p < 0,05$) по сравнению с группой "NHI" (индуцированный инфаркт миокарда + контрольное антитело).

Фиг. 13 демонстрирует иммуногистохимический анализ экспрессии белка FAM19A5 в биопсиях печени у трех разных пациентов с раком печени. Как указано, у каждого из пациентов была различная степень фиброза: (i) стадия # 0 (левая колонка), (ii) стадия # 2 (средняя колонка) и (iii) стадия # 4 (правая колонка). Нижний ряд демонстрирует большее увеличение обозначенной рамкой области от верхнего ряда. Стрелками указаны примеры FAM19A5-позитивных звездчатых клеток печени.

Фиг. 14А демонстрирует массу тела (грамм) животных как функцию от времени (недели после инокуляции). Некоторых животных инокулировали только клетками Нер3В и обрабатывали нормальным человеческим иммуноглобулином (кружок, группа: "Нер3В + NHI", $n=3$) или антителом к FAM19A5 (сплошной прямоугольник, группа: "Нер3В + FAM19A5 Ab", $n=3$). Других животных инокулировали как Нер3В клетками, так и звездчатыми клетками печени человека (HHSteC) и обрабатывали нормальным человеческим иммуноглобулином (ромб, группа: "Нер3В + HHSteC + NHI", $n=3$) или антителом к FAM19A5 (прямоугольник без заливки, группа: "Нер3В + HHSteC + FAM19A5 Ab", $n=3$). Данные выражены как среднее арифметическое \pm S.D.

Фиг. 14В демонстрирует средний объем опухоли, наблюдаемой у животных из разных групп, как функцию от времени (недели после инокуляции). Указанные группы такие же, как описано на фиг. 14А. Объем опухоли подсчитывали согласно следующей формуле: $0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2 = \text{объем опухоли (мм}^3\text{)}$. Данные выражены как среднее арифметическое \pm S.D.

Фиг. 14С и 14D демонстрируют фотоизображение и вес (грамм) соответственно опухолей, выделенных из животных, как описано на фиг. 14А, на 42 день после инокуляции.

На фиг. 14С, (i) вверху слева продемонстрированы опухоли из группы "Нер3В + NHI" ($n=2$); (ii) вверху справа продемонстрированы опухоли из группы "Нер3В + HHSteC+NHI" ($n=2$); (iii) внизу слева продемонстрированы опухоли из группы "Нер3В + FAM19A5 Ab" ($n=3$) и (iv) внизу справа продемонстрированы опухоли из группы "Нер3В + HHSteC + FAM19A5 Ab" ($n=3$).

Фиг. 14D демонстрирует средний вес (г) опухолей, выделенных из разных групп.

Фиг. 15А и 15В демонстрируют эффект антител к FAM19A5 на реактивный глиоз после черепно-мозговой травмы.

Фиг. 15А предоставляет репрезентативные иммуногистохимические изображения поврежденной области тканей мозга животных, обработанных различными антителами к FAM19A5: (i) 1-65 (2/4) (1-й ряд); (ii) 1-28 (2-й ряд); (iii) 2-13 (3-й ряд) и (iv) 3-2 (4-й ряд). Срезы ткани мозга окрашивали на GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок, зеленым) и нестин (красным), которые, как известно, индуцируются в реактивных астроцитах после травмы головного мозга. Пунктирная линия (белым) обозначает границу повреждения после воздействия ЧМТ.

Фиг. 15В предоставляет среднее расстояние GFAP- и/или нестин-позитивных астроцитов от центра очага поражения ЧМТ у животных, обработанных 1-65, 1-28, 2-13 и 3-2 антителами к FAM19A5.

Фиг. 16А предоставляет как схему введения антител, так и принципиальную схему, демонстрирующую внутрочерепную инъекцию раковых клеток глиобластомы, мышам.

Фиг. 16В демонстрирует противоопухолевый эффект антитела к FAM19A5 на животных моделях глиобластомы с использованием CLARITY, который оценивает прозрачность образца ткани. Области

опухоли, которые выглядят непрозрачными, обозначены пунктирными линиями у животных, у которых собирали мозговую ткань, обработанную либо контрольным человеческим антителом IgG (слева), либо антителом к FAM19A5 (справа).

Фиг. 17А и 17В демонстрируют противоопухолевый эффект антитела к FAM19A5 на животных моделях глиобластомы с использованием окрашивания гематоксилином и еозином (H&E).

Фиг. 17А предусматривает четыре репрезентативных изображения H&E окрашивания срезов ткани мозга животных, обработанных либо контрольным человеческим антителом IgG (верхний ряд), либо антителом к FAM19A5 (нижний ряд). Глиобластома соответствует затемненным областям на изображениях.

Фиг. 17В представляет данные, показанные на фиг. 17А, в количественной форме, предоставляя данные в процентах контроля. Черные столбцы соответствуют контрольной группе (обработанные человеческим антителом IgG). Серые столбцы соответствуют группе, обработанной антителом к FAM19A5. Числа вдоль оси x соответствуют репрезентативному изображению, показанному на фиг. 17А.

Фиг. 18А-18D демонстрируют противоопухолевый эффект антитела к FAM19A5 на животной модели глиобластомы с использованием Хёхст окрашивания ядра.

Фиг. 18А демонстрирует изображение четырех репрезентативных срезов ткани мозга животных, обработанных контрольным человеческим антителом IgG (верхний ряд) или антителом к FAM19A5 (нижний ряд). Области, показанные светло-серым цветом, соответствуют опухолям на каждом из изображений.

Фиг. 18В представляет таблицу, демонстрирующую числовые значения для числа клеток в опухоли (Хёхст-позитивное окрашивание) ("К-во пятен") и объема опухоли ("Об."), измеренные в четырех репрезентативных срезах ткани мозга на фиг. 18А.

Фиг. 18С (число клеток) и 18D (объем опухоли) являются графическими изображениями данных, показанных на фиг. 18В. Как на фиг. 18С, так и на фиг. 18D, данные представлены как % соответствующего значения, наблюдаемого у контрольных животных. Числа вдоль оси x соответствуют репрезентативному срезу ткани мозга фиг. 18А. Черные столбцы соответствуют животным, обработанным контрольным человеческим антителом IgG. Серые столбцы соответствуют животным, обработанным антителом к FAM19A5.

Фиг. 19А и 19В демонстрируют эффект антитела к FAM19A5 на нормализацию кровеносных сосудов на мышинной модели глиобластомы.

Фиг. 19А представляет иммуногистохимический анализ экспрессии CD31 (маркер кровеносного сосуда) в сопоставимых областях мозга, выделенных от животных, обработанных контрольным человеческим антителом IgG (левое изображение) или антителом к FAM19A5 (правое изображение). Пунктирные белые линии на фиг. 19А представляют внешнюю границу глиобластомы.

Фиг. 19В представляет увеличенный вид репрезентативной области из фиг. 19А.

Фиг. 20А и 20В демонстрируют эффект антитела к FAM19A5 на инфильтрацию макрофагов в опухоли на мышинной модели глиобластомы.

Фиг. 20А представляет иммуногистохимическое изображение экспрессии Iba1 (маркер для макрофагов) в глиобластоме у мышей, обработанных контрольным антителом IgG (верхнее изображение) или антителом к FAM19A5 (нижнее изображение).

Фиг. 20В сравнивает объем макрофагов, наблюдаемых на изображениях, показанных на фиг. 20А.

Фиг. 21 демонстрирует сканированные изображения МРТ головного мозга крысиных моделей глиомы, обработанных либо контрольным человеческим антителом IgG (верхний ряд), либо антителом к FAM19A5 (нижний ряд). Изображения демонстрируют различные свойства опухолей: (i) T2 - морфологический анализ; (ii) R2 - морфологический анализ; (iii) CBV - объем церебральной крови; (iv) EnhRate (скорость расширения) и IAUC30 (начальная площадь под кривой через 30 с) - проницаемость ткани. Опухоль обозначена на изображениях черными пунктирными метками.

Фиг. 22 демонстрирует эффект антитела к FAM19A5 на выживание в мышинной модели опухоли головного мозга. Черные кружки представляют животных, обработанных контрольным человеческим антителом IgG. Белые кружки представляют животных, обработанных антителом к FAM19A5.

Подробное описание изобретения

Описанное в данном документе выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с членом А5 семейства со сходством последовательностей 19 человека (FAM19A5) и проявляет одно или несколько свойств, описанных в данном документе, например, уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает фиброз; уменьшает образование избыточного внеклеточного матрикса (ECM); задерживает рост или прогрессирующее опухоль; связывается с растворимым человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью иммуноферментного анализа (ELISA); связывается с мембраносвязанным человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью ELISA; уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает развитие реактивного глиоза; подавляет избыточную пролиферацию реактивных астроцитов; уменьшает экспрессию протеогликанов хондроитинсульфата, включая нейрокан и нейрон-глиальный антиген 2 (NG2); увеличивает экспрессию c-fos и pERK в ядре нейронов; способствует выживанию нейронов; увеличивает экс-

прессию GAP43 в нейронах; и/или способствует отрастанию аксона.

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, определяется ряд терминов и фраз. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

I. Определения.

Во всем объеме данного описания термин в форме единственного числа объекта относится к одному или нескольким таким объектам; например "антитело" понимают как одно или несколько антител. Как таковые, термины в форме единственного числа, "одно или несколько" и "по меньшей мере одно" могут быть использованы взаимозаменяемо в данном документе. Кроме того, "и/или" в том смысле, в котором они используются в данном документе, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом предполагается, что термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А и/или В", в данном документе включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Также предполагается, что термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно). Понятно, что везде, где аспекты описаны в данном документе с формулировкой "содержащий", в других случаях также предусмотрены аналогичные аспекты, описанные в терминах "состоящий из" и/или "состоящий практически из".

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как общедоступное обычному специалисту в области техники, к которой относится данное описание изобретения. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, предоставляют специалисту общий словарь многих терминов, используемых в данном описании.

Единицы, префиксы и символы обозначаются в принятой форме Международной системы единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности пишутся слева направо в аминокислотно-ориентации. Заголовки, предусмотренные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов описания, которые могут быть получены со ссылкой на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание во всей его полноте.

Термин "приблизительно" используется в данном документе для обозначения около, ориентировочно, примерно или в области. Когда термин "приблизительно" используется в сочетании с числовым диапазоном, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже изложенных числовых значений. Как правило, термин "приблизительно" может изменять числовое значение выше и ниже заявленного значения с отклонением, например, на 10%, вверх или вниз (выше или ниже).

Термин "член А5 семейства со сходством последовательностей 19" или "FAM19A5" относится к белку, который принадлежит семейству ТАФА (также известному как семейство FAM19) из пяти высокоомологичных белков и преимущественно экспрессируется в головном и спинном мозге. FAM19A5 также известен как ТАФА5 или хемокин-подобный белок ТАФА-5. У людей ген, кодирующий FAM19A5, находится на хромосоме 22.

Существует три человеческие изоформы FAM19A5 (UniProt: Q7Z5A7), которые предположительно образуются путем альтернативного сплайсинга: изоформа 1 (UniProt: Q7Z5A7-1), которая состоит из 132 аминокислот; изоформа 2 (UniProt: Q7Z5A7-2), которая состоит из 125 аминокислот; и изоформа 3 (UniProt: Q7Z5A7-3), которая состоит из 53 аминокислот. Предполагают, что человеческий белок FAM19A5 существует в виде как мембраносвязанных, так и в растворимых (секретируемых) формах. Предполагают, что изоформа 1 является мембраносвязанным белком с одной трансмембранной областью. Изоформа 2, о которой сообщалось в Tang T.Y. et al., Genomics, 83(4):727-34 (2004) в виде секретируемого белка (растворимого), содержит сигнальный пептид в положениях аминокислот 1-25. Изоформа 3 спрогнозирована на основе данных EST. Ниже приведены аминокислотные последовательности трех известных человеческих изоформ FAM19A5.

(I) Изоформа 1 (UniProt: Q7Z5A7-1, трансмембранный белок): эта изоформа была выбрана в качестве канонической последовательности:

```
MAPSPRTGSR QDALPSMS STFWAFMILA SLLIAYCSQL AAGTCEIVTL
DRDSSQPRRT IARQTARCAC RKGQIAGTTR ARPACVDARI
IKTKQWCDML PCLEGECDL LINRSGWTCT QPGRIKTTT VS (SEQ ID
NO: 1)
```

(II) Изоформа 2 (UniProt: Q7Z5A7-2, растворимый белок):

```
MQLLKALWAL AGAALCCFLV LVIHAQFLKE GQLAAGTCEI
VTLDRDSSQPRRTIARQTAR CACRKGQIAG TTRARPACVD ARIIKTKQWC
DMLPCLEGECDLLINRSGW TCTQPGRIK TTTVS (SEQ ID NO: 2)
```

(III) Изоформа 3 (UniProt: Q7Z5A7-3):

MYHHREWPAR IIKTKQWCDM LPCLEGECD LLINRSWTC
TQPGGRIKTT TVS (SEQ ID NO: 3)

Термин "FAM19A5" включает любые варианты или изоформы FAM19A5, которые в естественных условиях экспрессируются клетками. Соответственно, антитела, описанные в данном документе, могут перекрестно реагировать с разными изоформами одного и того же вида (например, разные изоформы человеческого FAM19A5) или перекрестно реагировать с FAM19A5 видов, отличных от человека (например, мышиный FAM19A5). В качестве альтернативы антитела могут быть специфичными для человеческого FAM19A5 и не могут проявлять перекрестную реактивность с другими видами. FAM19A5 или любые варианты и его изоформы могут быть выделены из клеток или тканей, которые их экспрессируют в естественных условиях, или могут быть получены рекомбинантно. Полинуклеотид, кодирующий человеческий FAM19A5, имеет номер доступа GenBank BC039396 и следующую последовательность (табл 1А).

Таблица 1А

Полинуклеотидная последовательность человеческого FAM19A5

	Полинуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 4)
FAM19A5 (Номер доступа GenBank BC039396)	ggccggcgag gatggcgcgc gcggggcccg cacgtggagg ccggcgcggg ggccggcgca gggccggcgt ctgagacgcg ctgctgcccc ccgcccggcg gcccgcgctt caatggcgcc atgccccagg accggcagcc ggcaagatgc gaccgcccctg cccagcatgt cctcaacttt ctggcgcttc atgatcctgg ccagcctgct catgcctac tgcagtcagc tggccggccg cacctgtgag attgtgacct tggaccggga cagcagccag cctcggagga cgatgcccc gcagaccgcc cgctgtgctg gtagaaagg gcagatgcc gccaccacga gagcccgcc cgcctgtgtg gacgcaaga tcatcaagac caagcagtg tgtgacatgc ttccgtgtct ggagggggaa ggctgcgact tgtaataca ccggtcaggc tggacgtgca cgcagcccg cgggaggata aagaccacca cggctcctcg acaaacacag cccctgaggg ggccccggga gtggcctfgg ctccctggag agcccacgtc tcagccacag ttctccactc gcctcggact tcaccgttc tctgccccc gccactccg ttccctgtg gtccgtgaag gacggcctca ggccctggca tctgagctt cggctgtcc agccgaccg aggaggcccg actcagacac ataggcgggg ggccgcacct ggcatcagca ataccagtc tgtgggagcc cggccgcgcc cagccccgc caccgtggc gttggccctg ctgtcctcag aggaggagga ggaggaggca gctccggcag ccacagaagg ctgcagcca gccgcctga gacacgacgc ctgccccagg ggactgtcag gcacagaagc ggcctcctcc cgtgccccag actgtccgaa ttgttttat ttcttatac ttctagata ctccatagac caaagagcaa aatctatctg aacctggacg caccctact gtcagggtcc ctgggtcgc ttgtgcgggc gggagggcaa tgggtgcaga gacatgctgg tggccccggc ggagcggaga gggcggccgt ggtggaggcc tccaccag gagcaccgc cacaccctg gaggacggc ttcggctgcg cggaggccgt ggcacacct cgggaggcag cgaccgccc cagcagacg ccgggaacgc aggcctgtt atctctgt acttagatca actgaccgt actaaaatcc cttctgtt taaccagta aacatgcctc ttctacagct ccattttga tagttgata atccagtac tgccaagagc atgtgggtc tcccgtgact gctgcctcat cgataccca tttagctca gaaagcaaag aaaactcag taacactgt tgaagaga tcattaatg tattttgca agcccaaaa aaaaaaaaa a

Термины "антитело" и "антитела" являются терминами данного уровня техники и могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо и относятся к молекуле с антигенсвязывающим сайтом, который специфически связывает антиген. Используемые в данном документе термины включают цельные антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т.е. "антигенсвязывающие части") или их от-

дельные цепи. "Антитело" в одном варианте осуществления относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. В другом варианте осуществления "антитело" относится к отдельной цепи антитела, содержащей единственный переменный домен, например домен VH. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно в данном документе как VH) и константную область тяжелой цепи. В некоторых антителах природного происхождения константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. В некоторых антителах природного происхождения каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно в данном документе как VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL.

Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин "нумерация по Кабату" и подобные термины известны в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в переменных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающей части. В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации по Кабату (см., например, Kabat E.A. & Wutt (1971), *Ann NY Acad. Sci.* 190:382-391 and Kabat E.A. et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Используя систему нумерации по Кабату, CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот 31-35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие за 35 (упоминается в схеме нумерации по Кабату как 35A и 35B) (CDR1), положениях аминокислот 50-65 (CDR2) и положениях аминокислот 95-102 (CDR3). Используя систему нумерации по Кабату, CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот 24-34 (CDR1), положениях аминокислот 50-56 (CDR2) и положениях аминокислот 89-97 (CDR3). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанных в данном документе, были определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

Фразы "нумерация аминокислотных положений, как по Кабату", "положение по Кабату" и их грамматические варианты относятся к системе нумерации, используемой для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи компиляции антител в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Используя эту систему нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке FW или CDR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a по Кабату) после остатка 52 из H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. по Кабату) после остатка 82 тяжелой цепи FW. См. табл. 1B.

Таблица 1B

Петля	Кабат	AbM	Cothia
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
		<u>(Нумерация по Кабату)</u>	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		<u>(Нумерация по Cothia)</u>	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H65
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

Нумерация остатков по Кабату может быть определена для данного антитела путем выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" нумерацией по Кабату. Вместо этого Chothia ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia считается, когда при нумеровании с использованием соглашения о нумерации по Кабату, варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации по Кабату размещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствуют, то петля заканчивается на 32, если присутствует только 35A, то петля заканчивается на 33; если

присутствуют как 35A, так и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные области AbM представляют компромисс между CDR по Кабату и структурными петлями по Chothia и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. IMGT (ImMunoGeneTics) также предусматривает систему нумерации переменных областей иммуноглобулина, включая CDR. См., например, Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.* 27:55-77(2003), что включено в данный документ в качестве ссылки. Система нумерации IMGT была основана на выравнивании более 5000 последовательностей, структурных данных и характеристики гипервариабельных петель и позволяет легко сравнивать переменные области и области CDR для всех видов.

Согласно схеме нумерации IMGT VH-CDR1 находится в положениях 26-35, VH-CDR2 находится в положениях 51-57, VH-CDR3 находится в положениях 93-102, VL-CDR1 находится в положениях 27-32, VL-CDR2 является в положениях 50-52 и VL-CDR3 находится в положениях 89-97. Для всех положений аминокислот константной области тяжелой цепи, обсуждаемых в настоящем описании, нумерация соответствует индексу EU, впервые описанному в Edelman et al., 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63(1):78-85, который описывает аминокислотную последовательность белка миеломы EU, являющегося первым человеческим отсеквенированным IgG1. EU индекс по Edelman et al. также изложен в Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda. Таким образом, фразы "индекс EU, как изложено по Кабату" или "индекс EU по Кабату" и "позиция ... в соответствии с индексом EU, как изложено по Кабату" и их грамматические варианты относятся к системе нумерации остатков на основе человеческого антитела IgG1 EU по Edelman et al., как изложено в Kabat 1991.

Система нумерации, используемая для переменных доменов (как тяжелой цепи, так и легкой цепи) и аминокислотной последовательности константной области легкой цепи, представлена в Kabat 1991. Антитела могут быть молекулой иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgD, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 или IgA2) или любого подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей). Иммуноглобулины, например IgG1, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. Антитело, описанное в данном документе, может быть из любого из широко известных изотипов, классов, подклассов или аллотилов. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, являются антителами субкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или любым их гибридом. В определенных вариантах осуществления антитела являются антителами подкласса человеческих IgG1, или человеческих IgG2, или человеческих IgG4.

Термин "антитело" охватывает в качестве примера как антитело природного происхождения, так и не природного происхождения; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и не человеческие антитела; полностью синтетические антитела; одноцепочечные антитела; моноспецифические антитела; мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела); тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи; мономер легкой цепи антитела; мономер тяжелой цепи антитела; димер легкой цепи антитела; димер тяжелой цепи антитела; пара легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела; внутриклеточные антитела; гетероконъюгатные антитела; моновалентные антитела; верблюжьи антитела; аффитела; антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела) и однодоменные антитела (sdAb), которые содержат молекулы связывания, состоящие из одного мономерного переменного домена антитела, которые полностью способны связываться с антигеном (например, домен VH или домен VL). Hargen M.M. and Haard H.J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(1):13-22 (2007)).

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела, используемый в данном документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, человеческое FAM19A5). Такие "фрагменты" составляют, например, между приблизительно 8 и приблизительно 1500 аминокислот в длину, подходящим образом между приблизительно 8 и приблизительно 745 аминокислот в длину, подходящим образом приблизительно от 8 до приблизительно 300, например приблизительно от 8 до приблизительно 200 аминокислот или приблизительно от 10 до приблизительно 50 или 100 аминокислот в длину. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть реализована фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, например антитела к FAM19A5, описанного в данном документе, включают (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, доменов CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, и дисульфид-связанные Fv (sdFv); (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989), *Nature*, 341:544-546), который состоит из домена VH; и (vi) выделенная область, определяющая комплементарность (CDR), или (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с использованием рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH объединяются в

пару с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv)); см., например, Bird et al. (1988), Science, 242:423-426; и Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также рассматриваются как охваченные термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием общепринятых техник, известных специалистам в данной области техники, и проверяют их пригодность таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Используемые в данном документе термины "вариабельная область" или "вариабельный домен" использованы взаимозаменяемо и являются общими в данной области техники. Вариабельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой или тяжелой цепи, обычно к аминоконцу от 110 до 120 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от приблизительно 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности конкретного антитела для его конкретного антигена. Вариабельность в последовательности сконцентрирована в тех областях, которые называются областями, определяющими комплементарность (CDR), в то время как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Не желая быть связанными каким-либо конкретным механизмом или теорией, полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей главным образом ответственны за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных вариантах осуществления вариабельная область является человеческой вариабельной областью. В определенных вариантах осуществления вариабельная область содержит CDR грызунов или мыши и человеческие каркасные области (FR). В конкретных вариантах осуществления вариабельная область является вариабельной областью примата (например, примата, не являющегося человеком). В определенных вариантах осуществления вариабельная область содержит CDR грызунов или мыши и каркасные области (FR) примата (например, примата, не являющегося человеком).

Используемый в данном документе термин "тяжелая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ) на основе аминокислотной последовательности константного домена, которая присуща антителам классов IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Используемый в данном документе термин "легкая цепь" при использовании в отношении антитела может относиться к любому другому типу, например каппа (κ) или лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления легкая цепь является человеческой легкой цепью.

Термины "VL" и "домен VL" использованы взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "домен VH" использованы взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области тяжелой цепи антитела.

Используемые в данном документе термины "константная область" или "константный домен" взаимозаменяемы и имеют общее значение в данной области техники. Константная область является частью антитела, например карбоксильной концевой частью легкой и/или тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно вариабельного домена иммуноглобулина.

"Область Fc" (фрагмент кристаллизуемой области) или "домен Fc" или "Fc" относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с Fc рецепторами, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках) или на первом компоненте (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, область Fc содержит константную область антитела, исключая первую константную область домена иммуноглобулина (например, CH1 или CL). В изотипах антител IgG, IgA и IgD область Fc содержит два идентичных фрагмента белка, полученных из второго (CH2) и третьего (CH3) константных доменов двух тяжелых цепей антитела; области Fc IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены CH2-4) в каждой полипептидной цепи. Для IgG область Fc содержит домены иммуноглобулина C γ 2 и C γ 3 и шарнир между C γ 1 и C γ 2. Таким образом, границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, область Fc тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяется как протяженность от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты между этими двумя аминокислотами) до карбокси-конца тяжелой цепи, где нумерация соответствует индексу EU, как по Кабату Домен CH2 области Fc человеческого IgG простирается от приблизительно 231 аминокислоты до примерно 340 аминокислоты, тогда как домен CH3 расположен на C-концевой стороне домена CH2 в области Fc, т.е. он простирается от приблизительно 341 аминокислоты

до 447 аминокислоты IgG. Используемый в данном документе область Fc может быть нативной последовательностью Fc, включая любой аллотипичный вариант или вариант Fc (например, Fc не природного происхождения). Fc также может относиться к этой области изолированно или в контексте Fc-содержащего полипептида белка, такого как "связывающий белок, содержащий область Fc", также называемого "Fc слитый белок" (например, антитело или иммуноадгезия).

"Область Fc с нативной последовательностью" или "Fc с нативной последовательностью" включает аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности области Fc, встречающейся в природе. Нативные последовательности Fc областей включают нативную последовательность области Fc человеческого IgG1; нативную последовательность области Fc человеческого IgG2; нативную последовательность области Fc человеческого IgG3 и нативную последовательность области Fc человеческого IgG4, а также ее варианты природного происхождения. Нативная последовательность Fc включает различные аллотипы Fes (см., например, Jefferis et al. (2009), mAbs 1:1; Vidarsson G. et al., *Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.)).

"Fc-рецептор" или "FcR" является рецептором, который связывается с областью Fc иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, включают рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих Fc-рецепторов и вызывает самые сильные эффекторные функции Fc. Он считается эквивалентным мышечному IgG2a в отношении типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается. С другой стороны, человеческий IgG4 вызывает наименьшие Fc-эффекторные функции. Vidarsson G. et al., *Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.).

Константной областью можно манипулировать, например, с помощью рекомбинантной технологии, чтобы устранить одну или несколько эффекторных функций. "Эффекторная функция" относится к взаимодействию области Fc антитела с Fc-рецептором или лигандом или к биохимическому событию, которое возникает в результате этого. Типичные "эффекторные функции" включают связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), и подавляющую регуляцию рецептора на клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR). Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы область Fc была объединена со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела). Соответственно, термин "константная область без Fc функции" включает константные области со сниженными или без одной или нескольких эффекторных функций, опосредованных областью Fc.

Эффекторные функции антитела можно снизить или избежать их с помощью разных подходов. Эффекторные функции антитела можно снизить или избежать, используя фрагменты антитела без области Fc (например, такие как Fab, F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv) или sdAb, состоящий из мономерного домена VH или VL). В качестве альтернативы так называемые агликозилированные антитела могут быть получены путем удаления сахаров, которые связаны с конкретными остатками в области Fc, для снижения эффекторных функций антитела при сохранении других ценных признаков области Fc (например, продолжительного периода полужизни и гетеродимеризации). Агликозилированные антитела могут быть получены, например, путем удаления или изменения остатка, к которому присоединен сахар, ферментативного удаления сахаров, образования антител в клетках, культивируемых в присутствии ингибитора гликозилирования или путем экспрессии антител в клетках, неспособных к гликозилированию белков (например, бактериальных клетках-хозяевах). См., например, публикацию патента США № 20120100140. Другой подход заключается в использовании областей Fc из подкласса IgG, которые имеют пониженную эффекторную функцию, например антитела IgG2 и IgG4 характеризуются более низким уровнем эффекторных функций Fc, чем IgG1 и IgG3. Остатки, наиболее проксимальные к шарнирной области, в домене CH2 области Fc отвечают за эффекторные функции антител, поскольку он содержит в значительной степени перекрывающийся сайт связывания для C1q (комплемента) и рецепторов Fc IgG (FcγR) на эффекторных клетках врожденной иммунной системы. Vidarsson G. et al., *Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.). Соответственно, антитела со сниженными или без Fc-эффекторных функций могут быть получены путем создания, например, химерной области Fc, которая содержит домен CH2 из антитела IgG изотипа IgG4 и домен CH3 из антитела IgG изотипа IgG1, или химерной области Fc, которая содержит шарнирную область из IgG2 и область CH2 из IgG4 (см., например, Lau C. et al., *J. Immunol.* 191:4769-4777 (2013)), или области Fc с мутациями, которые приводят в результате к измененным Fc-эффекторным функциям, например сниженным или отсутствующим Fc-функциям. Такие области Fc с мутациями известны в данной области техники. См., например, публикацию патента США № 20120100140 и РСТ заявки на патент США, процитированные там, и An et al., mAbs 1:6, 572-579 (2009); описание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

"Шарнир", "шарнирный домен", "шарнирная область" или "шарнирная область антитела" используются взаимозаменяемо и относятся к домену константной области тяжелой цепи, которая соединяет

домен СН1 с доменом СН2 и включает верхнюю, среднюю и нижнюю части шарнира (Roux et al., J. Immunol. 1998, 161:4083). Шарнир обеспечивает различные уровни гибкости между связывающими и эффекторными областями антитела, а также обеспечивает сайты межмолекулярной дисульфидной связи между двумя константными областями тяжелой цепи. Как здесь используется, шарнир начинается у Glu216 и заканчивается у Gly237 для всех изоформ IgGA Используемый в данном документе шарнир начинается на Glu216 и заканчивается на Gly237 для всех изоформ IgG (Roux et al., 1998, J. Immunol. 161:4083). Последовательности шарниров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа известны в данной области техники. См., например, Kabat E.A. et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Vidarsson G. et al., Front Immunol. 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.).

Термин "домен СН1" относится к константной области тяжелой цепи, связывающей переменный домен с шарниром в константной области тяжелой цепи. Используемый в данном документе домен СН1 начинается на A118 и заканчивается на V215. Термин "домен СН1" включает домены СН1 дикого типа, а также существующие в природе их варианты (например, аллотипы). В данной области техники известны последовательности домена СН1 IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (включая дикий тип и аллотипы). См., например, Kabat EA et al. (1991), выше и Vidarsson G. et al., Front Immunol. 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.). Типичные домены СН1 включают домены СН1 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, например период полураспада, например, описанный в публикации патента США. № 20120100140, и патентах, и публикациях США, и публикациях РСТ, цитируемых там.

Термин "домен СН2" относится к константной области тяжелой цепи, связывающей шарнир с доменом СН3 в константном домене тяжелой цепи. Используемый в данном документе домен СН2 начинается на R238 и заканчивается на K340. Термин "домен СН2" включает домены СН2 дикого типа, а также их существующие в природе варианты (например, аллотипы). В данной области техники известны последовательности домена СН2 IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (включая дикий тип и аллотипы). См., например, Kabat EA et al. (1991) выше и Vidarsson G. et al., Front Immunol. 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.). Типичные домены СН2 включают домены СН2 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, например период полураспада, и/или снижают Fc-эффекторную функцию, например, описанные в публикации патента США. № 20120100140, и патентах, и публикациях США, и публикациях РСТ, цитируемых там.

Термин "домен СН3" относится к константной области тяжелой цепи, которая является С-концевой по отношению к домену СН2 в константном домене тяжелой цепи. Используемый в данном документе домен СН3 начинается на G341 и заканчивается на K447. Термин "домен СН3" включает домены СН3 дикого типа, а также их существующие в природе варианты (например, аллотипы). В данной области техники известны последовательности домена СН3 IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (включая дикий тип и аллотипы). См., например, Kabat EA et al. (1991) выше и Vidarsson G. et al., Front Immunol. 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.). Типичные домены СН3 включают домены СН3 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, например период полураспада, например, описанный в публикации патента США. № 20120100140, и патентах, и публикациях США, и публикациях РСТ, цитируемых там.

Используемый в данном документе "изоформ" относится к классу антител (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи.

"Аллотип" относится к вариантам природного происхождения в пределах определенной группы изоформ, причем эти варианты отличаются по нескольким аминокислотам (см., например, Jefferis et al. (2009), mAbs 1:1). Антитела, описанные в данном документе, могут быть любого аллотипа. В данной области техники известны аллотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. См., например, Kabat E.A. et al. (1991) выше; Vidarsson G. et al., Front Immunol. 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.) и Lefranc M.P., mAbs 1:4, 1-7 (2009).

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное к антигену" в данном документе используются взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

"Выделенное антитело", при использовании в данном документе, предназначено для обозначения антитела, которое, по существу, не содержит других антител, имеющих различные антигенные специфичности (например, изолированное антитело, которое специфически связывается с FАM19A5, практически не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от FАM19A5). Выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом FАM19A5, может иметь перекрестную реактивность с другими белками FАM19A5 из разных видов.

"Аффинность связывания" обычно относится к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и ее связывающим партнером (например, антигеном). Если не указано иное, как используется в данном документе, "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X для ее

партнера Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена несколькими способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, константу равновесной диссоциации (K_D) и константу равновесной ассоциации (K_A). K_D рассчитывается по коэффициенту k_{off}/k_{on} и выражается как молярная концентрация (M), тогда как K_A рассчитывается по коэффициенту k_{on}/k_{off} . k_{on} и k_{off} относятся к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а k_{off} относится к диссоциации, например, антитела от антигена. k_{on} и k_{off} могут быть определены методами, известными специалисту в данной области техники, такими как иммуноанализы (например, иммуноферментный анализ (ELISA)), BIACORE® или анализ кинетического исключения (KINEXA®).

Используемые в данном документе термины "специфически связывает", "специфически распознает", "специфическое связывание", "селективное связывание" и "селективно связывает" являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам (например, антителам), которые связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом), так как такое связывание понятно специалисту в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, как определено, например, с помощью иммуноанализов, BIACORE®, прибора KINEXA® 3000 (Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо) или других анализов, известных в данной области техники. В конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с антигеном с K_A , которая по меньшей мере составляет 2 логарифма, 2,5 логарифма, 3 логарифма, 4 логарифма или более, чем K_A , когда молекулы связываются с другим антигеном.

Антитела обычно специфически связываются со своим родственным антигеном с высокой аффинностью, отражаемой константой диссоциации (K_D) от 10^{-5} до 10^{-11} M или менее. Обычно считается, что любой K_D , превышающий 10^{-4} M, указывает на неспецифическое связывание. Используемое в данном документе антитело, которое "специфически связывается" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и практически идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает, что K_D составляет 10^{-7} M или менее, предпочтительно 10^{-8} M или меньше, даже более предпочтительно 10^{-9} M или менее и наиболее предпочтительно между 10^{-8} и 10^{-10} M или менее, когда определяется, например, с помощью иммуноанализов (например, ELISA) или технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE™ 2000, используя заранее определенный антиген, но который не связывается с высоким сродством с неродственными антигенами.

Используемый в данном документе термин "антиген" относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антигеном может быть FAM19A5 или его фрагмент.

Используемый в данном документе "эпитоп" является термином в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой антитело может специфически связываться. Эпитоп может быть, например, смежными аминокислотами полипептида (линейный или непрерывный эпитоп) или эпитоп может, например, объединяться из двух или нескольких несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой обычно разрушаются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 20 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связаны с данным антителом (т.е. картирование эпитопов), хорошо известны в данной области техники и включают, например, анализы иммуноблоттинг и иммунопреципитацию, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из FAM19A5) тестируют на реактивность с данным антителом (например, антителом к FAM19A5). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методы в данной области техники и методы, описанные в данном документе, например рентгеновская кристаллография, 2-мерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)). В определенных вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов ELISA, масс-спектрометрией водородно-дейтериевого обмена (например, масс-спектрометрией с жидкостной хроматографией с электрораспылением), сканирующего анализа олигопептидов на основе массива и/или картирования мутагенеза (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области техники способов (например, Giege R. et al. (1994), Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 50(Pt 4):339-350; McPherson A. (1990), Eur. J. Biochem. 189:1-23; Chayen N.E. (1997), Structure, 5:1269-1274; McPherson A. (1976), J. Biol. Chem 251:6300-6303). Кристаллы антитело:антиген могут быть изучены с использованием хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей и могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяемого в Molecular Simulations, Inc.;

см., например, *Meth. Enzymol.* (1985), volumes 114 & 115, eds Wyckoff H.W. et al.; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G. (1993), *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 49(Pt 1):37-60; Bricogne G. (1997), *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, ed Carter C.W.; Roversi P. et al. (2000), *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56(Pt 10):1316-1323). Исследования картирования мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого метода, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M. et al. (1995), *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 and Cunningham B.C. & Wells J.A. (1989), *Science*, 244:1081-1085 для описания методов мутагенеза, включая методы мутагенеза путем аланинового сканирования.

Термин "картирование эпитопа" относится к процессу идентификации молекулярных детерминант для распознавания антитело-антигена.

Термин "связывается с одним и тем же эпитопом" со ссылкой на два или несколько антител означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом аминокислотных остатков, как определено данным способом. Методы определения того, связываются ли антитела с "тем же эпитопом на FAM19A5", что и антитела, описанные в данном документе, включают, например, методы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурный анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомное разделение эпитопа, и масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Другие способы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания из-за модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считается показателем эпитопного компонента. Кроме того, для картирования эпитопов также могут быть использованы вычислительные комбинаторные способы. Эти способы основаны на способности антитела, представляющего интерес, по аффинности отделять специфические короткие пептиды из комбинаторных библиотек пептидных фаговых дисплеев. Предполагается, что антитела, имеющие одинаковые VH и VL или одинаковые последовательности CDR1, 2 и 3, будут связываться с одним и тем же эпитопом.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью и в какой степени одно антитело ингибирует связывание другого антитела с мишенью, можно определить с помощью известных конкурентных экспериментов. В определенных вариантах осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует связывание другого антитела с мишенью по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может быть различным в зависимости от того, какое антитело является "блокирующим антителом" (т.е. холодным антителом, которое сначала инкубируется с мишенью). Анализы конкуренции могут проводиться, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, *Cold Spring Harb Protoc*; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 "Using Antibodies" от Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или смежными эпитопами (например, о чем свидетельствует стерическое несоответствие).

Другие конкурентные анализы связывания включают твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), сэндвич анализ конкуренции (см. Stahl et al., *Methods in Enzymology*, 9:242 (1983)); твердофазный прямой EIA с биотин-авидином (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный прямой анализ с меткой, твердофазный прямой сэндвич анализ с меткой (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный прямой RIA анализ с меткой с использованием метки 1-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой EIA анализ с биотин-авидином (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)) и прямой RIA анализ с меткой (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

"Биспецифичное" или "бифункциональное антитело" является искусственным гибридным антителом, имеющим две разные пары тяжелой/легкой цепи и два разных сайта связывания. Биспецифичные антитела могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или объединение фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Термин "моноклональное антитело", используемый в данном документе, относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность и аффинность связывания для конкретного эпитопа, или композиции антител, в которой все антитела проявляют единственную специфичность и аффинность связывания для конкретного эпитопа. Соответственно, термин "человеческое моноклональное антитело" относится к антителу или композиции антител, которые проявляют единственную специфичность связывания и которые имеют переменные и необязательные константные области, производные от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления моноклональные антитела человека продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, не являющегося человеком, например трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованными клетками.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело", используемый в данном документе, включает все

человеческие антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных способов, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для генов человеческого иммуноглобулина, или гибридомы, полученной из них, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, в которых используются определенные последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, которые кодируются генами зародышевой линии, но включают последующие реаранжировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антитела. Как известно в данной области техники (см., например, Lonberg (2005), *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые реаранжируются с образованием антитела, специфичного к чужеродному антигену. В дополнение к реаранжировке переменная область может быть дополнительно модифицирована путем множественных изменений одной аминокислоты (называемых соматической мутацией или гипермутацией) для увеличения аффинности антитела к чужеродному антигену. Константная область будет изменяться при дополнительном ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Следовательно, реаранжированные и соматически мутированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, не могут иметь идентичность последовательности с исходными молекулами нуклеиновой кислоты, но вместо этого будут практически идентичными или сходными (т.е. иметь по меньшей мере 80% идентичности).

"Человеческое антитело" (HuMAb) относится к антителу, имеющему переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-области происходят от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела, описанные в данном документе, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело", как используется в данном документе, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были пересажены на каркасные последовательности человека. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются как синонимы.

"Гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR не человеческого антитела заменены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. В одном варианте осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR были заменены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в одной или нескольких областях CDR являются неизменными. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот допустимы, если они не отменяют способность антитела связываться с конкретным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, сходную со специфичностью исходного антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные области получены из одного вида, а константные области получены из другого вида, такого как антитело, в котором переменные области получены от мышинового антитела, а константные области получены от человеческого антитела.

Термин "перекрестная реакция", используемый в данном документе, относится к способности антитела, описанного в данном документе, связываться с FAM19A5 от другого вида. Например, антитело, описанное в данном документе, которое связывается с человеческим FAM19A5, также может связываться с FAM19A5 других видов (например, мышинным FAM19A5). Как используется в данном документе, перекрестная реактивность может быть измерена путем определения специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или связывания с или иного функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими FAM19A5. Способы определения перекрестной реактивности включают стандартные анализы связывания, как описано в данном документе, например, с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) от BIACORE®, используя прибор BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Упсала, Швеция), или методов точной цитометрии.

Термин "природного происхождения" применительно к объекту в данном документе относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории, имеет природное происхождение.

"Полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных

аминокислотных остатка, без верхнего предела длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как, но не ограничиваясь этим, гликозилирование, фосфорилирование или образование дисульфидной связи. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Предполагается, что термин "молекула нуклеиновой кислоты" в данном документе включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может быть кДНК.

Термин "вектор", используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора является "плазмидой", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они вводятся (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы упоминаются в данном документе как "рекомбинантные векторы экспрессии" (или просто "векторы экспрессии"). В целом, векторы экспрессии с полезными свойствами в методах рекомбинантной ДНК часто являются в форме плазмид. В данном описании "плазида" и "вектор" могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее широко используемой формой вектора. Однако также включены другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, репликационные дефектные ретровирусы, лентивирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин"), используемый в данном документе, предназначен для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, не природно присутствующую в клетке, и может быть клеткой, в которую встроены рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации происходят в последующих поколениях из-за мутаций или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, по сути, быть идентичным родительской клетке, но все еще включено в сферу действия термина "клетка-хозяин", используемого в данном документе.

Используемый в данном документе термин "связанный" относится к соединению двух или нескольких молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. рекомбинантным слиянием). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого разнообразия известных в данной области техники методов, таких как химическое конъюгирование и получение рекомбинантного белка.

Используемый в данном документе термин "введение" относится к физическому введению терапевтического агента или композиции, содержащей терапевтический агент, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Предпочтительные пути введения антител, описанные в данном документе, включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии.

Фраза "парентеральное введение", используемая в данном документе, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутрижелудочковую, интравитреальную, эпидуральную и интрастеральную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В качестве альтернативы антителу, описанное в данном документе, может быть введено непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный путь или путь введения через слизистую, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов.

Термины "лечить", "лечение" и "терапия", используемые в данном документе, относятся к любому типу вмешательства или выполняемого процесса или вводимого активного агента субъекту с целью устранить, облегчить, улучшить, ингибировать, или замедлить, или предотвратить прогрессирование, развитие, тяжесть или рецидив симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Лечение может быть лечением субъекта, имеющего заболевание, или субъекта, у которого нет заболевания (например, для профилактики).

Используемый в данном документе термин "субъект" включает как человека, так и животного, не являющегося человеком.

Термин "животное, не являющееся человеком" включает всех позвоночных животных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, не являющиеся человеком, овцы, собаки, коровы, цыплята, земноводные, рептилии и т.д.

Используемый в данном документе термин "развитие глиоза" или "развитие реактивного глиоза" включает начало или инициацию глиоза. Глиоз является неспецифическим реактивным изменением глиальных клеток в центральной нервной системе (ЦНС, например, в головном и/или спинном мозге) в ответ на травму или повреждение, например в результате травмы, повреждения спинного мозга, опухоли головного мозга, инфекции, ишемии, инсульта, аутоиммунных реакций и/или нейродегенеративных заболеваний, и включает пролиферацию или гипертрофию нескольких различных типов глиальных клеток, включая астроциты, микроглию и олигодендроциты. Развитие глиоза может привести к образованию рубцов, которые препятствуют регенерации аксонов в той части ЦНС, которая была травмирована или повреждена. Пагубные эффекты развития глиоза включают необратимое или постоянное повреждение нейронов и/или предотвращение восстановления окружающих нейронов. Соответственно, термины "задерживать развитие глиоза" и "задерживать развитие реактивного глиоза" включают ингибирование, замедление, подавление или предотвращение начала или инициации глиоза и связанных с ним пагубных эффектов на ЦНС.

Используемый в данном документе термин "избыточная пролиферация реактивных астроцитов" включает аномальное увеличение числа астроцитов из-за разрушения соседних нейронов, например, вследствие повреждения ЦНС, травмы, поражения, повреждения спинномозгового мозга, опухоли головного мозга, инфекции, ишемии, инсульта, аутоиммунных ответов и/или нейродегенеративных заболеваний. Избыточная пролиферация реактивных астроцитов может привести к пагубным эффектам на ЦНС, включая образование рубцов, которые ингибируют регенерацию аксонов в части ЦНС, которая была травмирована или повреждена, обострение воспаления, выработку и высвобождение нейротоксических уровней активных форм кислорода, высвобождение потенциально эксайтотоксичного глутамата, потенциальный вклад в патогенез судорог, нарушение функции гематоэнцефалического барьера, цитотоксический отек во время травмы и инсульта, потенциальную активацию хронических цитокинов астроцитами, что способствует хронической боли, и вторичную дегенерацию после повреждения ЦНС. Sofroniew, Michael V. (2009), *Trends in Neurosciences*, 32(12):638-47; McGraw, J. et al. (2001), *Journal of Neuroscience Research*, 63(2):109-15; и Sofroniew, M.V. (2005), *The Neuroscientist*, 11(5):400-7. Соответственно, термин "подавлять избыточную пролиферацию реактивных астроцитов" включает ингибирование, замедление, подавление, ограничение или предотвращение избыточной или ненормальной пролиферации реактивных астроцитов и связанных с ней пагубных эффектов на ЦНС.

Используемый в данном документе термин "протеогликаны хондроитинсульфата" включает протеогликаны, состоящие из белкового ядра и хондроитинсульфата. Протеогликаны хондроитинсульфата, также известные как CSPG, являются молекулами внеклеточного матрикса, широко экспрессируемыми в развивающейся и взрослой ЦНС. CSGP играют ключевую роль в развитии нервной системы и формировании глиального рубца, а также они ингибируют регенерацию аксонов после повреждения в ЦНС. Известные CSPG включают агрекан (CSPG1), версикан (CSPG2), нейрокан (CSPG3), CSPG4 (или нейрон-глиальный антиген 2 (NG2)), CSPG5, SMC3 (CSPG6, структурное поддержание хромосом 3), бревикан (CSPG7) и CD44 (CSPG8, кластер дифференциации 44), фосфаканнейрокан (CSPG3). Rhodes, K.E. and Fawcett, J.W. (2004), *Journal of Anatom.* 204(1):33-48. Таким образом, термин "снижение экспрессии протеогликанов хондроитинсульфата" включает уменьшение, ингибирование, снижение уровня одного или нескольких CSGP или уменьшение активности или превращение одного или нескольких CSGP в неактивные. В некоторых вариантах осуществления этот термин включает уменьшение, ингибирование, снижение уровня нейрокана, NG2 или обоих или снижение активности или превращение неактивного нейрокана, NG2 или обоих.

Используемый в данном документе термин "нейрон" включает электрически возбудимые клетки, которые обрабатывают и передают информацию посредством электрических и химических сигналов. Нейроны являются основными компонентами головного и спинного мозга ЦНС и ганглиев периферической нервной системы (ПНС) и могут соединяться друг с другом, образуя нейронные сети. Типичный нейрон состоит из клеточного тела (сома), дендритов и аксона. Сомы (клеточное тело) нейрона содержат ядро. Дендриты нейрона являются клеточными удлинением со многими разветвлениями, где возникает большая часть входящей информации в нейрон. Аксон является более тонким, подобным кабелю, удлинением, простирающимся от сомы и переносящим нервные сигналы от сомы и некоторые виды информации обратно в сому. Термин "способствовать отращиванию нейрона" включает стимулирование, способствование, увеличение или активацию роста нейронов, предпочтительно после травмы или повреждения.

Используемый в данном документе термин "c-fos" включает протоонкоген c-fos, который быстро индуцируется стимуляцией нейротрансмиттера. c-fos существует у многих видов, включая мышь и человека. Ген и белок c-fos известны и охарактеризованы. См. Curran, T., *The c-fos proto-oncogene*, p. 307-327 (*The Oncogene Handbook*, Reddy EP et al. (eds.) Elsevier) (1988). Экспрессия c-fos может быть определена способами, известными в данной области техники, например нозерн-блоттингом, количественной ПЦР или иммуногистохимией. Термин "увеличивает экспрессию c-fos" включает повышение уровня мРНК

c-fos, белка c-fos или активности белка c-fos.

Используемый в данном документе термин "pERK" включает фосфорилированную внеклеточную регулируемую сигналом киназу. Внеклеточная регулируемая сигналом киназа или ERK, включающая ERK1 и ERK2, является членом семейства митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК). ERK активируется посредством фосфорилирования его вышестоящей киназой с образованием pERK, который затем активирует нижестоящие мишени. ERK участвует в нервной и синаптической пластичности, лежащей в основе обучения, а также гиперчувствительности памяти и боли. Ji R.R. et al., *Nat. Neurosci.* (1999), 2:1114-1119. Ген, белок, фосфорилирование и активация ERK известны и охарактеризованы, а экспрессия ERK и pERK может быть определена способами, известными в данной области техники (например, нозерн-блоттингом, количественной ПЦР или иммуногистохимией). См. Gao Y.J. и Ji R.R., *Open Pain J.* (2009), 2:11-17. Термин "увеличение экспрессии pERK" включает повышение уровня мРНК ERK, белка ERK или активности ERK.

Используемый в данном документе термин "GAP43", также известный как "ассоциированный с ростом белок 43" является белком, специфичным для нервной ткани, который способствует образованию, регенерации и пластичности нейритов. 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. GAP43 человека кодируется геном GAP43. Полипептидная последовательность человеческого GAP43 (UniProt: KB - P17677) и последовательность кДНК, кодирующая полипептид, известны в данной области техники. Kosik K.S. et al. (1988), *Neuron*, 1(2):127-32; Ng S.C. et al. (1988), *Neuron*, 1(2):133-9. Экспрессия GAP43 может быть определена способами, известными в данной области техники (например, нозерн-блоттингом, количественной ПЦР или иммуногистохимией).

Термин "увеличение GAP43 в нейронах" включает повышение или увеличение уровня мРНК GAP43, белка GAP43 или увеличение активности белка GAP43.

Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом, эффективным для "лечения" заболевания или нарушения у субъекта, или уменьшения риска, потенциала, возможности, или возникновения заболевания, или нарушения (например, повреждения центральной нервной системы). "Терапевтически эффективное количество" включает количество лекарственного средства или терапевтического агента, которое обеспечивает некоторое улучшение или пользу субъекту, имеющему или подверженному риску иметь заболевание или нарушение (например, повреждение центральной нервной системы, такое как черепно-мозговая травма или другое заболевание, описанное в данном документе). Таким образом, "терапевтически эффективное" количество является количеством, которое уменьшает риск, потенциал, вероятность или возникновение заболевания или предусматривает облегчение, смягчение нарушения, или подобного состояния, и/или уменьшает по меньшей мере один показатель (например, развитие глиоза), и/или уменьшает по меньшей мере один клинический симптом заболевания или нарушения.

II. Антитела к FAM19A5.

В данном документе описаны антитела, например моноклональные антитела, которые характеризуются определенными функциональными особенностями или свойствами. Например, антитела специфически связывают человеческий FAM19A5, включая растворимый FAM19A5 и мембраносвязанный FAM19A5. В дополнение к специфическому связыванию с растворимым и/или мембраносвязанным FAM19A5, антитела, описанные в данном документе, проявляют одно или несколько из следующих свойств:

- (a) уменьшают, устраняют, задерживают и/или предотвращают фиброз;
- (b) уменьшают образование избыточного внеклеточного матрикса (ECM);
- (c) задерживают рост или прогрессирование опухоли;
- (d) связываются с растворимым человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью иммуноферментного анализа (ELISA);
- (e) связываются с мембраносвязанным человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью ELISA;
- (f) уменьшают, устраняют, задерживают и/или предотвращают развитие реактивного глиоза;
- (g) подавляют избыточную пролиферацию реактивных астроцитов;
- (h) уменьшают экспрессию протеогликанов хондроитинсульфата, включая нейрокан и нейрон-глиальный антиген 2 (NG2);
- (j) увеличивают экспрессию c-fos и pERK в ядре нейронов;
- (k) способствуют выживанию нейронов;
- (l) увеличивают экспрессию GAP43 в нейронах;
- (m) способствуют отращиванию аксона.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с растворимым человеческим или мембраносвязанным человеческим FAM19A5 с высокой аффинностью, например, с K_D 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М (0,1 нМ) или менее, 10^{-11} М или менее, или 10^{-12} М (1 пМ) или менее, например,

10^{-12} - 10^{-7} М, 10^{-11} - 10^{-7} М, 10^{-10} - 10^{-7} М или 10^{-9} - 10^{-7} М, например, 10^{-12} М, 5×10^{-12} М, 10^{-11} М, 5×10^{-11} М, 10^{-10} М, 5×10^{-10} М, 10^{-9} М, 5×10^{-9} М, 10^{-8} М, 5×10^{-8} М, 10^{-7} М или 5×10^{-7} М. Стандартные анализы для оценки способности антитела связываться с человеческим FAM19A5 различных видов известны в данной области, включая, например, ELISA, вестерн-блоты и RIA. Подходящие анализы подробно описаны в примерах. Кинетика связывания (например, аффинность связывания) антител также может быть оценена с помощью стандартных анализов, известных в данной области, таких как ELISA, анализ BIACORE® или KINEXA®. Анализы для оценки влияния антител на функциональные свойства FAM19A5 (например, связывание лиганда) более подробно описаны ниже и в примерах. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть связывается с растворимым человеческим FAM19A5 с K_D , например, как определено с помощью ELISA, 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М (10 нМ) или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, 10^{-12} - 10^{-7} М, 10^{-11} - 10^{-7} М, 10^{-10} - 10^{-7} М, 10^{-9} - 10^{-7} М или 10^{-8} - 10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть связывается с растворимым FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, например, между 0,1 и 10 нМ, между 0,1 и 5 нМ, между 0,1 и 1 нМ, между 0,5 и 10 нМ, между 0,5 и 5 нМ, между 0,5 и 1 нМ, между 1 и 10 нМ, между 1 и 5 нМ или между 5 и 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с растворимым человеческим FAM19A5 с K_D приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 пМ, или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 нМ, или приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 нМ, как определено с помощью ELISA.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть связывается с мембраносвязанным человеческим FAM19A5 с K_D , например, как определено с помощью ELISA, 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М (10 нМ) или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, 10^{-12} - 10^{-7} М, 10^{-11} - 10^{-7} М, 10^{-10} - 10^{-7} М, 10^{-9} - 10^{-7} М или 10^{-8} - 10^{-7} М. В определенных вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с мембраносвязанным человеческим FAM19A5 с K_D 10 нМ или менее, как определено с помощью ELISA, например, между 0,1 и 10 нМ, между 0,1 и 5 нМ, между 0,1 и 1 нМ, между 0,5 и 10 нМ, между 0,5 и 5 нМ, между 0,5 и 1 нМ, между 1 и 10 нМ, между 1 и 5 нМ или между 5 и 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть связывается с мембраносвязанным человеческим FAM19A5 с K_D приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 пМ, или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 нМ, или приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 нМ, как определено с помощью ELISA.

Антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению может уменьшать, предотвращать, устранять, задерживать и/или ингибировать развитие реактивного глиоза, например задерживать, замедлять или подавлять неспецифическое реактивное изменение глиальных клеток в центральной нервной системе (ЦНС, например, в головном и/или спинном мозге) в ответ на травму или повреждение, например в результате травмы, повреждения спинного мозга, опухоли головного мозга, инфекции, ишемии, инсульта, аутоиммунных реакций и/или нейродегенеративных заболеваний.

Антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению могут задерживать, ингибировать, замедлять, подавлять, ограничивать или предотвращать избыточную или ненормальную пролиферацию реактивных астроцитов и связанные с этим пагубные эффекты на ЦНС. Например, антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению могут ингибировать или предотвращать аномальное увеличение числа астроцитов из-за разрушения нейронов вследствие, например, повреждения ЦНС, травмы, поражения, повреждения спинномозгового мозга, опухоли головного мозга, инфекции, ишемии, инсульта, аутоиммунных ответов и/или нейродегенеративных заболеваний, ингибировать или предотвращать формирование рубцов в ЦНС, ингибировать или снижать высвобождение нейротоксических уровней активных форм кислорода или высвобождение потенциально эксайтотоксичного глутамата, снижать или ингибировать судороги, боль и/или вторичную дегенерацию после повреждения ЦНС. Антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению могут способствовать, стимулировать, увеличивать или активировать отрастание нейронов и/или аксона, предпочтительно после травмы или повреждения ЦНС.

Антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению может ингибировать экспрессию протеогликанов хондроитинсульфата, включая протеогликаны, состоящие из белкового ядра и хондроитинсульфата (CSGP), такие как агрекан (CSPG1), версикан (CSPG2), нейрокан (CSPG3), CSPG4 (или нейрон-глиальный антиген 2 (NG2)), CSPG5, SMC3 (CSPG6, структурное поддержание хромосом 3), бревикан (CSPG7), CD44 (CSPG8, кластер дифференциации 44), фосфаканнейрокан (CSPG3) или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению ингибирует, уменьшает или снижает уровень нейрокана и/или NG2 или активности нейрокана и/или NG2.

Антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению могут повышать экспрессию c-fos и pERK в ядрах нейронов, например повышать mPHK, белок и/или активность белка c-fos и pERK. Антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобрете-

нию также могут повышать или усиливать уровень экспрессии мРНК GAP43, белка GAP43 или повышать или усиливать активности белка GAP43.

В определенных вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению конкурируют за связывание (или ингибирует связывание) человеческого эпитопа FAM19A5 с антителом к FAM19A5, содержащим CDR или вариабельные области, описанные в данном документе, (например, 2-13, 3-2 или 1-28). В определенных вариантах осуществления антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающие части ингибируют связывание с эталонным антителом, содержащим CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где:

(i) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 эталонного антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 соответственно и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи эталонного антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 соответственно;

(ii) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или

(iii) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело содержит (i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, и (ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 42.

В определенных вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть ингибирует связывание такого эталонного антитела с человеческим FAM19A5 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или смежными эпитопами (например, о чем свидетельствует стерическое несоответствие). Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, можно определить с помощью экспериментов по конкуренции, известных в данной области техники, таких как RIA и EIA.

В определенных вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или их антигенсвязывающие части связываются с одним и тем же эпитопом FAM19A5, что и эталонное антитело, описанное в данном документе, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где:

(i) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 и CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(ii) CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или

(iii) где CDR1 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное антитело содержит (i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, и (ii) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 42.

Методы определения того, связываются ли два антитела с одним и тем же эпитопом, включают, например, методы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурный анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомное разрешение эпитопа, и масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS), способы мониторинга связывания антитела с фрагментами антигена или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считается показателем эпитопного компонента,

вычислительные комбинаторные методы для картирования эпитопов.

Антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению может связываться, по меньшей мере с одним эпитопом зрелого человеческого FAM19A5, как определено, например, с помощью связывания антител с фрагментами человеческого FAM19A5. В некоторых вариантах осуществления, антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающие части связываются по меньшей мере с одним эпитопом, который имеет аминокислотную последовательность TLDRDSSQPRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 6 или аминокислотные остатки 42-61 SEQ ID NO: 2), или связываются с фрагментом, расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, например, эпитопом, имеющим по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть связываются с одной или несколькими аминокислотами, соответствующими аминокислотным остаткам 46-51 (т.е. DSSQPR), например аминокислотным остаткам 46, 50 и 52 (т.е. D--P-R), например аминокислотным остаткам 46, 47, 48 и 50 (т.е. DSS-P) SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающие части связываются с фрагментом, расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, например, эпитопом, имеющим по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один эпитоп имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной к SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один эпитоп имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной к SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть связываются только с человеческим эпитопом FAM19A5, который является SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 или 10, или фрагментом, расположенным в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 или 10, например эпитопом, имеющим 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению связываются с SEQ ID NO: 6 или его фрагментом в его нативной конформации (т.е. не денатурированным). В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению связываются с SEQ ID NO: 9 или его фрагментом в его нативной конформации (т.е. не денатурированным). В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть связываются как с гликозилированным, так и негликозилированным человеческим FAM19A5.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть дополнительно связываются с одним или несколькими дополнительными эпитопами FAM19A5. Таким образом, определенные антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающие части связываются с эпитопом SEQ ID NO: 6 и дополнительным эпитопом или эпитопом SEQ ID NO: 9 и дополнительным эпитопом. Другие антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающие части могут связываться с эпитопом SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9 и дополнительным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающие части связываются с эпитопом SEQ ID NO: 6, эпитопом SEQ ID NO: 10 и дополнительным эпитопом.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных эпитопов FAM19A5 выбраны из QLAAGTCEIVTLDR (SEQ ID NO: 5, эпитоп F1), TLDRDSSQPRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 6, эпитоп F2), TARCACRKGQIAGTTRARPA (SEQ ID NO: 7, эпитоп F3), ARPACVDARIKTKQWCDML (SEQ ID NO: 8, эпитоп F4), CDMLPCLEGEGCDLLINRSG (SEQ ID NO: 9, эпитоп F5) или NRSQWTCTQPGGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 10, эпитоп F6) или фрагмента, расположенного в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10 или любой их комбинации. Фрагмент, расположенный в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, включает фрагмент, имеющий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот любой SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных эпитопов FAM19A5 выбраны из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или фрагмента, расположенного в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 или 10, например фрагмента, имеющего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению связывается с любым одним или несколькими дополнительными эпитопами в

их нативной конформации (т.е. не денатурированными). В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть связывается как с гликозилированными, так и негликозилированными одним или несколькими дополнительными эпитопами FAM19A5. В некоторых вариантах осуществления антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающие части связываются по меньшей мере с одним эпитопом FAM19A5, определенным как EP2, EP4 и/или EP8, где EP2 содержит, практически состоит из или состоит из аминокислот DSSQP (SEQ ID NO: 66), где EP4 содержит, практически состоит из или состоит из аминокислот ARCACRK (SEQ ID NO: 68) и где EP8 содержит, практически состоит из или состоит из аминокислот TCTQPGGR (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один эпитоп имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или приблизительно 100% идентичной к EP2, EP4 или EP8. В некоторых вариантах осуществления антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающая часть связываются только с EP2. В некоторых вариантах осуществления антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающая часть связываются с EP4 и EP8. В некоторых вариантах осуществления, антитела к FAM19A5 или их антигенсвязывающая часть связываются с одним или несколькими эпитопами FAM19A5, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65 [[EP1 - IVTLD]], SEQ ID NO: 67 [[EP3 - RTIAR]], SEQ ID NO: 69 [[EP5 - ARPA]], SEQ ID NO: 70 [[EP6 - KTKQWCDML]] и SEQ ID NO: 71 [[EP7 - GCDLLINR]] и любой их комбинации.

В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело или его антигенсвязывающая часть, которая связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5) с аффинностью 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или выше, чем другим белком семейства FAM19A, как измерено с помощью, например, иммуноанализа (например, ELISA), поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В конкретном варианте осуществления в данном документе предусмотрено антитело или его антигенсвязывающая часть, которая связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5) без перекрестной реактивности с другим белком, как измерено с помощью, например, иммуноанализа.

В определенных вариантах осуществления антитела к FAM19A5 не являются нативными антителами или антителами природного происхождения. Например, антитела к FAM19A5 имеют посттрансляционные модификации, которые отличаются от антител природного происхождения, такие как наличие больше, меньше посттрансляционной модификации или посттрансляционной модификации другого типа.

III. Типичные антитела к FAM19A5.

Конкретными антителами, которые можно использовать в способах, описанных в данном документе, являются антитела, например моноклональные антитела, имеющие последовательности CDR и/или варибельной области антител 2-13, 3-2, 1-65 и 1-28, выделенных в примере 1, а также антитела, имеющие по меньшей мере 80% идентичности (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности) к их варибельной области или последовательностям CDR. Аминокислотные последовательности VH 2-13, 3-2, 1-65 и 1-28 представлены в SEQ ID NO: 35-38. Аминокислотные последовательности VL 2-13, 3-2, 1-65 и 1-28 представлены в SEQ ID NO: 39-42.

Таблица 2
Аминокислотные последовательности варибельных CDR тяжелой цепи (по системе Кабата)

Антитело	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Anti-FAM19A5 («2-13»)	SHGMF (SEQ ID NO: 11)	EITNDGSGTNYGS AVKG (SEQ ID NO: 12)	STYECPPGGFSCWGD TGQIDA (SEQ ID NO: 13)
Anti-FAM19A5 («3-2»)	SFNMF (SEQ ID NO: 14)	QISSGSSTNYAP AVRG (SEQ ID NO: 15)	SSYDCPYGHCSSGVDSAGEIDA (SEQ ID NO: 16)
Anti-FAM19A5 («1-28»)	GDFDSD YG (SEQ ID NO: 20)	IRSDG SNP (SEQ ID NO: 21)	AKDNGYCALDAYRSGGYSCG VYPG SIDA (SEQ ID NO: 22)

Таблица 3

**Аминокислотные последовательности переменных
CDR легкой цепи (по системе Кабата)**

Антитело	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Anti-FAM19A5 («2-13»)	SGGSYSYG (SEQ ID NO: 23)	WDDERPS (SEQ ID NO: 24)	GTEDISGTAGV (SEQ ID NO: 25)
Anti-FAM19A5 («3-2»)	SGGGSYAGSYYYG (SEQ ID NO: 26)	ESNKRPS (SEQ ID NO: 27)	GSWDSSNGGI (SEQ ID NO: 28)
Anti-FAM19A5 («1-28»)	GYGYG (SEQ ID NO: 32)	QND (SEQ ID NO: 33)	GSEDSSTLAGI (SEQ ID NO: 34)

Таблица 4

**Варибельная аминокислотная последовательность
тяжелой цепи**

Антитело	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 («2-13»)	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSHGMFVWRQTPGKGLEYYVAEITNDGSGTNYGSAVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTGT YFCARSTYECPGGFSCWGD TGQIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 35)
Anti-FAM19A5 («3-2»)	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSFNMFWVRQAPGKGLEYYVAQISSGSSSTNYAPAVRGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTGT YFCARSTYECPGGFSCWGD TGQIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 36)
Anti-FAM19A5 («1-28»)	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGDFSDYGMGWVRQA PGKGLEWVAAIRSDGSNPSYGS AVKGRATISKDN GRSTVRLQLNNLRAEDTATYYCAKDGNGYCALDAYRSGGYSCGVYPG SIDAWGHGTEVIVSS (SEQ ID NO: 38)

Таблица 5

**Варибельная аминокислотная последовательность
легкой цепи**

Антитело	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 («2-13»)	ALTPSSVSANPGETVKITCSGGYSYSGWFQKSPGSALVTVIYWDDERPSDIPSRFSGALSGSTNTLTITGVQADDEAVYFCGTEDISGTAGVFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 39)
Anti-FAM19A5 («3-2»)	ALTPSSVSANPGETVKITCSGGYSYAGSYYYGWYQKAPGSAPVTLIYESNKRPSDIPSRFSGSTSGSTATLTITGVQADDEAIYCGSWDSSNGGIFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 40)
Anti-FAM19A5 («1-28»)	ALTPSSVSANLEGTVEITCSGSGYGYGWYQKSPGSAPVTVIYQNDKRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQVEDEAVYCGSEDSSTLAGIFGAGTTLTVL (SEQ ID NO: 42)

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть, которое специфически связывается с человеческим FAM19A5, содержит:

- (a) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и/или
- (b) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и/или
- (c) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит одну, две или все три VL CDR, указанных выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть по настоящему изобретению, которое специфически связывается с человеческим FAM19A5, содержит:

- (a) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и/или
- (b) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и/или
- (c) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит одну, две или все три VH CDR, указанных выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть, которое специфически связывается с человеческим FAM19A5, содержит:

- (a) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и/или
- (b) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и/или
- (c) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит одну, две или все три VL CDR, указанных выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть, которое специфически связывается с человеческим FAM19A5, содержит:

- (a) VH CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
- (b) VH CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;
- (c) VH CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
- (d) VL CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;
- (e) VL CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и/или
- (f) VL CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В конкретных вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, указанных выше.

Домен VH или одна или несколько его CDR, описанные в данном документе, могут быть связаны с константным доменом для образования тяжелой цепи, например, тяжелой цепи полной длины. Аналогичным образом, домен VL или одна или несколько его CDR, описанные в данном документе, могут быть связаны с константным доменом для образования легкой цепи, например, легкой цепи полной длины. Тяжелая цепь полной длины и легкая цепь полной длины объединяются для формирования полно-размерного антитела.

Соответственно, в конкретных вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь антитела, например отдельную легкую цепь и тяжелую цепь.

Что касается легкой цепи, в конкретном варианте осуществления легкая цепь антитела, описанного в данном документе, является легкой цепью каппа. В другом конкретном варианте осуществления легкая цепь антитела, описанного в данном документе, является легкой цепью лямбда. В еще одном конкретном варианте осуществления легкая цепь антитела, описанного в данном документе, является легкой цепью каппа или легкой цепью лямбда. В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с полипептидом FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), содержит легкую цепь, которая содержит любые аминокислотные последовательности VL или VL CDR, описанные в данном документе, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность человеческой константной области легкой цепи каппа. В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с полипептидом FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5) содержит легкую цепь, которая содержит аминокислотные последовательности VL или VL CDR, описанные в данном документе, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность человеческой константной области легкой цепи лямбда. Неограничивающие примеры последовательностей человеческой константной области были описаны в данной области техники, например, см. патент США № 5693780 и Kabat E.A. et al. (1991) выше.

Что касается тяжелой цепи, в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, может быть тяжелой цепью альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В другом конкретном варианте осуществления тяжелая цепь описанного антитела может включать человеческую тяжелую цепь альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В одном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с

FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), содержит тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность VH или VH CDR, описанную в данном документе, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность человеческой константной области тяжелой цепи гамма (γ). В другом варианте осуществления, антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5) содержит тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность VH или VH CDR, описанную в данном документе, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность человеческой тяжелой цепи, описанной в данном документе или известной в данной области техники. Неограничивающие примеры последовательностей человеческой константной области были описаны в данной области техники, например, см. патент США № 5693780 и Kabat E.A. et al. (1991) выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), содержит домен VL и домен VH, содержащие VH или VH CDR и VL и VL CDR, описанные в данном документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или человеческой молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, или IgY. В другом конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, которое специфически связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), содержит домен VL и домен VH, содержащие любые аминокислотные последовательности, описанные в данном документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY, любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей человеческих IgG природного происхождения, включают подклассы (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и аллотипы (например, G1m, G2m, G3m и nG4m) и их варианты. См., например, Vidarsson G. et al., *Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.) и Jefferis R. and Lefranc M.P., *mAbs* 1:4, 1-7(2009). В некоторых вариантах осуществления константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей человеческих IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианты.

В определенных вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть, описанное в данном документе, не имеет Fc-эффекторных функций, например комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и/или антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP). Эффекторные функции опосредованы Fc-областью и остатки, наиболее проксимальные к шарнирной области, в домене CH2 области Fc отвечают за эффекторные функции антител, поскольку он содержит в значительной степени перекрывающийся сайт связывания для C1q (комплемента) и рецепторов Fc IgG (Fc γ R) на эффекторных клетках врожденной иммунной системы. Также IgG2 и IgG4 антитела имеют более низкие уровни эффекторных функций Fc, чем антитела IgG1 и IgG3. Эффекторные функции антитела можно уменьшить или избежать с помощью различных подходов, известных в данной области техники, включая (1) использование фрагментов антител, не имеющих области Fc (например, таких как Fab, F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv) или sdAb, состоящий из мономерного домена VH или VL); (2) генерирование агликозилированных антител, которые могут быть получены, например, путем удаления или изменения остатка, к которому присоединен сахар, ферментативного удаления сахаров, продуцирования антитела в клетках, культивируемых в присутствии ингибитора гликозилирования, или путем экспрессии антитела в клетках, неспособных гликозилировать белки (например, бактериальные клетки-хозяева, см., например, публикацию патента США № 20120100140); (3) использование областей Fc из подкласса IgG, которые имеют сниженную эффекторную функцию (например, область Fc из антител IgG2 или IgG4 или химерная область Fc, содержащая домен CH2 из антител IgG2 или IgG4, см., например, публикацию США № 20120100140 и Lau C. et al., *J. Immunol.* 191:4769-4777 (2013)); и (4) получение Fc-области с мутациями, которые приводят в результате к сниженным или отсутствующим Fc-функциям. См., например, публикацию патента США № 20120100140 и PCT заявки на патент США, процитированные там, и An et al., *mAbs* 1:6, 572-579 (2009).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть, описанное в данном документе, является Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечным Fv (scFv) или sdAb, состоящим из мономерного домена VH или VL. Такие фрагменты антител хорошо известны в данной области техники и описаны выше. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающая часть, описанное в данном документе, содержит область Fc со сниженной Fc-функцией или ее отсутствием. В некоторых вариантах осуществления константные области содержат аминокислотные последовательности области Fc человеческих IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 является изотипом IgG2/IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 содержит химерную область Fc, которая содержит домен CH2 из антитела IgG изотипа IgG4 и домен CH3 из антитела IgG изотипа IgG1, или химерную область Fc, которая содержит шарнирную область из IgG2 и область CH2 из IgG4, или область Fc с мутациями, которые приводят в результате к сниженным или отсутствующим Fc-функциям. Fc области со сниженной Fc-функцией или

ее отсутствием включают те, которые известны в данной области техники. См., например, Lau C. et al., J. Immunol. 191:4769-4777 (2013); An et al., mAbs 1:6, 572-579 (2009); и публикацию США № 20120100140, и патенты, и публикации США, и публикации РСТ, цитируемые там. Также Fc области со сниженной Fc-функцией или ее отсутствием может быть легко изготовлены специалистом в данной области техники.

IV. Молекулы нуклеиновой кислоты.

Другой аспект, описанный в данном документе, относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют любое одно из антител или их антигенсвязывающих частей, описанных в данном документе. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "приведенной в состояние практически чистой", когда она очищена от других клеточных компонентов или других загрязняющих веществ, например других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе), или белков стандартными методами, включая обработку щелочью/SDS, разделение в CsCl, колоночную хроматографию, ферменты рестрикции, электрофорез в агарозном геле и других методов, хорошо известных в данной области техники. См., F. Ausubel, et al., ed. (1987), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, может быть, например, ДНК или РНК и может или не может содержать интронные последовательности. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является ДНК.

Нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, могут быть получены, используя стандартные методы молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридами (например, гибридами, полученными от трансгенных мышей, имеющих гены человеческого иммуноглобулина, как описано далее ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, полученные гибридомой, можно получить стандартными методами ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулина (например, с использованием методов фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно извлечь из библиотеки.

Определенные молекулы нуклеиновых кислот, описанные в данном документе, являются молекулами, кодирующими последовательности VH и VL моноклональных антител 2-13, 3-2, 1-65 и 1-28. Типичные последовательности ДНК, кодирующие последовательность VH 2-13, 3-2, 1-65 и 1-28, приведены в SEQ ID NO: 43, 44, 45 и 46 соответственно. Типичные последовательности ДНК, кодирующие последовательности VL 2-13, 3-2, 1-65 и 1-28, приведены в SEQ ID NO: 47, 48, 49 и 50 соответственно.

Таблица 6

Вариабельная полинуклеотидная последовательность тяжелой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 (2-13)	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGGCGGCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCAGCCTC GTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCCATGGCATGTTCTGGGTGCGACAGCG CCCGGCAAGGGGTTGGAATATGTCGCTGAAATACCAATGATGGTAGTGGCACAACACTAC GGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGG CTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTCTGCGCCAGATCTACT TATGAATGTCCTGGTGGTTTTAGTTGTTGGGGTGATACTGGTCAAATAGACGCATGGGGC CACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCA (SEQ ID NO: 43)
Anti-FAM19A5 (3-2)	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGGCGGCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCAGCCTC GTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGCTTCAACATGTTCTGGGTGCGACAGCGG CCCGGCAAGGGGTTGGAATACGTCGCTCAAATTAGCAGCAGTGGTAGTAGCACAACACTAC GCACCCGCGGTGAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGG CTGCAGCTGAACAACCCCGGGGCTGAAGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGTAGT TATGACTGTCCTTACGGTCATGTAGTAGTGGTGTGATAGTGTGGTGGATCGACGCA TGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCA (SEQ ID NO: 44)
Anti-FAM19A5 (1-28)	GCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGGCGGCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCAGCCTC GTCTGCAAGGCCTCCGGGTTCCGACTTCAGCGATTATGGCATGGGTTGGGTGCGACAGGCT CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCTGCTATTAGAAAGTGGTAGTAACCCATCATA GGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAAGGACAACGGGCGAAGCACAGTGAGG CTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAGGATGGT AATGGTACTGTGCTCTCGATGCTTATCGTAGTGGTGGTTATAGTTGTGGTGTTCCT GGTAGCATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 46)

Таблица 7

Вариабельная полинуклеотидная последовательность легкой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
Anti-FAM19A5 (2-13)	GGCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATAACCTG CTCCGGGGGTAGCTATAGCTATGGCTGGTTCACGACAGAGTCTCCTGGCAGTGGCCSTTGT CACTGTGATCTACTGGGATGATGAGAGACCCCTGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTGC CCTATCCGGCTCCACAACACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGACGAGGCTGT CTATTCTGTGGGACTGAAGACATCAGCGCACTGCTGGTGTATTTGGGGCCGGGACAAC CCTGACCGTCTGGG (SEQ ID NO: 47)
Anti-FAM19A5 (3-2)	GGCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTG CTCCGGGGGTGGCAGCTATGCTGGAAGTACTATATATGGCTGGTACCAGCAGAAGGCACC TGGCAGTGGCCCTGTCACTCTGATCTATGAAAGCAACAAGAGACCCCTCGGACATCCCTTC ACGATTCTCCGGTCCACATCTGGCTCCACAGCCACACTAACCATCACTGGGGTCCAAGC CGATGACGAGGCTATCTATTACTGTGGGAGCTGGGACAGTAGCAATGGTGTATATTTGG GGCCGGGACAACCTGACCGTCTTAGG (SEQ ID NO: 48)
Anti-FAM19A5 (1-28)	GCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGAAGGAACCGTCCGAGATCACCTGC TCCGGGAGTGGCTATGGTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGGCCSTTGT ACTGTGATCTATCAGAACGACAAGAGACCCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTC AAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGTCCGAGGACGAGGCTGT TATTACTGTGGGAGTGAAGACAGCAGCACTCTGCTGGTATATTTGGGGCCGGGACAAC CTGACCGTCTTA (SEQ ID NO: 50)

Способ получения антитела к FAM19A5, описанный в данном документе, может включать экспрессию тяжелой цепи и легких цепей в клеточной линии, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи, с сигнальным пептидом, например, SEQ ID NO: 43 и 47, SEQ ID NO: 44 и 48, SEQ ID NO: 46 и 50 соответственно. Клетки-хозяева, содержащие эти нуклеотидные последовательности, включены в настоящий документ.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты VH и VL, этими фрагментами ДНК можно дополнительно манипулировать с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов вариабельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv. В этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий VL или VH, функционально связан с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, таким как константная область антитела или гибкий линкер. Термин "функционально связанный", используемый в данном контексте, предназначен для обозначения того, что два фрагмента ДНК объединены так, что аминокислотные последовательности, кодируемые этими двумя фрагментами ДНК, остаются в рамке.

Выделенная ДНК, кодирующая область VH, может быть превращена в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания ДНК, кодирующей VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, известные в данной области техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены с помощью стандартной амплификации ПЦР. Константная область тяжелой цепи может быть константной областью IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например константной областью IgG2 и/или IgG4. Для гена Fab-фрагмента тяжелой цепи ДНК, кодирующая VH, может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область CH1 тяжелой цепи.

Выделенная ДНК, кодирующая область VL, может быть преобразована в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген Fab легкой цепи) путем функционального связывания VL-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, CL. Последовательности генов константной области легкой цепи человека, известные в данной области техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены с помощью стандартной амплификации ПЦР. Константная область легкой цепи может быть константной областью каппа или лямбда.

Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, функционально связаны с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser3), так, что последовательности VH и VL могут быть экспрессированы как непрерывный одноцепочечный белок с областями VL и VH, соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988), Science, 242:423-426; Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883; McCafferty et al. (1990), Nature, 348:552-554).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающую часть. В других вариантах осуществления векторы могут быть использованы для генной терапии.

Подходящие векторы для настоящего изобретения включают векторы экспрессии, вирусные векторы и плазмидные векторы. В одном варианте осуществления вектор является вирусным вектором.

Используемый в данном документе экспрессирующий вектор относится к любой конструкции нук-

леиновой кислоты, которая содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции кодирующей последовательности интереса или, в случае вирусного РНК вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции, при введении в соответствующую клетку-хозяина. Векторы экспрессии могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

Векторы экспрессии по настоящему изобретению могут включать полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающую часть, описанные в данном документе. В одном варианте осуществления кодирующие последовательности для антитела или его антигенсвязывающей части функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии. Используемые в данном документе две нуклеотидные последовательности являются функционально связанными, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы позволить каждой составляющей последовательности нуклеиновой кислоты сохранить свою функциональность. Кодирующая последовательность и последовательность контроля экспрессии генов являются так называемыми функционально связанными, когда они ковалентно связаны таким образом, что экспрессию или транскрипцию и/или трансляцию кодирующей последовательности можно поместить под влияние или контроль последовательности контроля экспрессии генов. Две последовательности ДНК являются так называемыми функционально связанными, если индукция промотора последовательности экспрессии генов на 5' приводит в результате к транскрипции кодирующей последовательности и если характер связи между двумя последовательностями ДНК (1) не приводит к введению мутации со сдвигом рамки, (2) не препятствует способности промоторного участка направлять транскрипцию кодирующей последовательности или (3) не препятствует способности соответствующего РНК-транскрипта транслироваться в белок. Таким образом, последовательность экспрессии гена была бы функционально связана с кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, если бы последовательность экспрессии гена была способна осуществлять транскрипцию этой кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что полученный транскрипт транслировался в желаемое антитело или его антигенсвязывающую часть.

Вирусные векторы включают, но не ограничиваются ими, последовательности нуклеиновых кислот следующих вирусов: ретровирус, такой как вирус мышинового лейкоза Молони, вирус мышинной саркомы Харви, вирус опухоли молочной железы мыши и вирус саркомы Рауса; лентивирус; аденовирус; аденоассоциированный вирус; вирусы типа SV40; полиомавирусы; вирусы Эпштейна-Барра; вирусы папилломы; вирус герпеса; вирус коровьей оспы; вирус полиомиелита и РНК-вирус, такой как ретровирус. Можно легко использовать другие векторы, хорошо известные в данной области техники. Некоторые вирусные векторы основаны на нецитопатических эукариотических вирусах, в которых несущественные гены заменены представляющим интерес геном. Нецитопатические вирусы включают ретровирусы, жизненный цикл которых включает обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК с последующей провирусной интеграцией в клеточную ДНК хозяина. Ретровирусы были одобрены для испытаний генной терапии человека. Наиболее полезными являются те ретровирусы, которые имеют дефект репликации (т.е. способны направлять синтез желаемых белков, но не способны производить инфекционную частицу). Такие генетически измененные ретровирусные экспрессирующие векторы полезны, в общем, для высокой эффективности трансдукции генов *in vivo*. Стандартные протоколы для получения дефектных по репликации ретровирусов (включая этапы включения экзогенного генетического материала в плазмиду, трансфекции пакующей клеточной линии плазмидой, получения рекомбинантных ретровирусов пакующей клеточной линией, сбора вирусных частиц из сред для тканевых культур, и заражение клеток-мишеней вирусными частицами) представлены в Kriegler, M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, WH Freeman Co., New York (1990) и Murry, E.J., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

В одном варианте осуществления вирус является аденоассоциированным вирусом, двухцепочечным ДНК-вирусом. Аденоассоциированный вирус может быть сконструирован так, чтобы быть дефицитным по репликации и способным инфицировать широкий спектр типов клеток и видов. Кроме того, он имеет такие преимущества, как устойчивость к нагреванию и липидным растворителям; высокую частоту трансдукции в клетках разных линий, в том числе кровяных и отсутствие ингибирования суперинфекции, что позволяет проводить несколько серий трансдукции. Согласно последним данным, аденоассоциированный вирус может интегрироваться в клеточную ДНК человека сайт-специфическим образом, минимизируя тем самым возможность инсерционного мутагенеза и варибельность экспрессии встроеного гена, характерную для ретровирусной инфекции. Кроме того, в культуре ткани наблюдали аденоассоциированные вирусные инфекции дикого типа в течение более 100 пассажей в отсутствие селективного давления, это означает, что геномная интеграция аденоассоциированного вируса является относительно стабильным событием. Аденоассоциированный вирус также может функционировать внехромосомно.

В других вариантах осуществления вектор получен из лентивируса. В определенных вариантах осуществления вектор является вектором рекомбинантного лентивируса, способного инфицировать неделящиеся клетки.

Лентивирусный геном и провирусная ДНК обычно имеют три гена, обнаруженных в ретровирусах: *gag*, *pol* и *env*, которые фланкированы двумя последовательностями длинного концевой повтора (LTR). Ген *gag* кодирует внутренние структурные (матрикс, капсид и нуклеокапсид) белки; ген *pol* кодирует

РНК-направленную ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу), протеазу и интегразу; и ген *env* кодирует гликопротеины вирусной оболочки. 5' и 3' LTR служат для стимуляции транскрипции и полиаденилирования вирионных РНК. LTR содержит все другие цис-действующие последовательности, необходимые для репликации вируса. Лентивирусы имеют дополнительные гены, включая *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpr*, *vpr*, *vpr* и *vpr* (у ВИЧ-1, ВИЧ-2 и/или SIV).

Рядом с 5'-LTR находятся последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (сайт связывания праймера тРНК) и для эффективной инкапсуляции вирусной РНК в частицы (сайт Psi). Если в вирусном геноме отсутствуют последовательности, необходимые для инкапсулирования (или упаковки ретровирусной РНК в инфекционные вирионы), цис-дефект предотвращает инкапсуляцию геномной РНК. Однако полученный мутант остается способным направлять синтез всех белков вириона. Настоящее изобретение предусматривает способ получения рекомбинантного лентивируса, способного инфицировать неделящиеся клетки, включающий трансфекцию подходящей клетки-хозяина двумя или более векторами, несущими упаковочные функции, а именно *gag*, *pol* и *env*, а также *rev* и *tat*. Как будет описано в данном документе ниже, векторы, в которых отсутствует функциональный ген *tat*, являются желательными для определенных применений. Таким образом, например, первый вектор может обеспечить нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусный ген *gag* и вирусный ген *pol*, а другой вектор может обеспечить нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусный ген *env*, для получения пакующей клетки. Введение вектора, обеспечивающего гетерологичный ген, обозначенный в данном документе как переносимый вектор, в эту пакующую клетку дает клетку-производитель, которая высвобождает инфекционные вирусные частицы, несущие интересующий чужеродный ген. В соответствии с указанной выше конфигурацией векторов и чужеродных генов, второй вектор может обеспечивать нуклеиновую кислоту, кодирующую ген вирусной оболочки (*env*). Ген *env* может быть получен практически из любого подходящего вируса, включая ретровирусы. В некоторых вариантах осуществления белок *env* является белком амфотропной оболочки, который позволяет трансдуцировать клетки человека и других видов.

Примеры генов *env*, полученных из ретровирусов, включают, но не ограничиваются, вирус мышиного лейкоза Молони (MoMuLV или MMLV), вирус мышиной саркомы Харви (HaMuSV или HSV), вирус опухоли молочной железы мыши (MuMTV или MMTV), вирус лейкемии гиббоновых обезьян (GaLV или GALV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирус саркомы Рауса (BCP). Также могут быть использованы другие гены *env*, такие как белок G вируса везикулярного стоматита (VSV) (VSV G), вируса гепатита и гриппа. Вектор, обеспечивающий последовательность нуклеиновой кислоты вирусного *env*, функционально связан с регуляторными последовательностями, описанными в данном документе в другом месте. В определенных вариантах осуществления вектор включает лентивирусный вектор, в котором гены вирулентности ВИЧ *env*, *vif*, *vpr*, *vpr* и *vpr* были удалены без ущерба для способности вектора трансдуцировать неделящиеся клетки.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает лентивирусный вектор, который содержит делецию области U3 3'-LTR. Делеция области U3 может быть полной или частичной делецией. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность FVIII, описанную в данном документе, может быть трансфицирован в клетку с (а) первой нуклеотидной последовательностью, содержащей гены *gag*, *pol* или *gag* и *pol*, и (б) второй нуклеотидной последовательностью, содержащей гетерологичный ген *env*; где у лентивирусного вектора отсутствует функциональный ген *tat*. В других вариантах осуществления клетка дополнительно трансфицируется четвертой нуклеотидной последовательностью, содержащей ген *rev*. В определенных вариантах осуществления в лентивирусном векторе отсутствуют функциональные гены, выбранные из *vif*, *vpr*, *vpr*, *vpr* и *vpr* или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок *gag*, элемент Rev-ответа, центральный полипуриновый тракт (сРРТ) или любую их комбинацию.

Примеры лентивирусных векторов описаны в WO 99/31251, WO 97/12622, WO 98/17815, WO 98/17816 и WO 98/18934, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Другие векторы включают плазмидные векторы. Плазмидные векторы были широко описаны в данной области техники и хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. В последние несколько лет было обнаружено, что плазмидные векторы особенно полезны для доставки генов в клетки *in vivo* из-за их неспособности реплицироваться внутри генома хозяина и интегрироваться в него. Однако эти плазмиды, имеющие промотор, совместимый с клеткой-хозяином, могут экспрессировать пептид из гена, функционально кодируемого в плазмиде. Некоторые, обычно используемые плазмиды, доступные от коммерческих поставщиков, включают pBR322, pUC18, pUC19, различные плазмиды pcDNA, pRC/CMV, различные плазмиды pCMV, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры конкретных плазмид включают pcDNA3.1, номер по каталогу V79020; pcDNA3.1/hygro, номер по каталогу V87020; pcDNA4/mys-His, номер по каталогу V86320; и pBudCE4.1, номер по каталогу V53220, все от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Другие плазмиды хорошо известны специалистам в данной области техники. Кроме того, плазмиды могут быть изготовлены на заказ с использованием стандартных методов молекулярной биологии для удаления и/или добавления специфиче-

ских фрагментов ДНК.

V. Получение антител.

Антитела или их фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, для синтеза антител, например химическим синтезом или методами рекомбинантной экспрессии. Способы, описанные в данном документе, задействуют, если не указано иное, общепринятые методы в области молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей. Эти методики описаны, например, в ссылках, цитируемых в данном документе, и полностью объяснены в литературе. См., например, 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 F.M. 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.

В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, является антителом (например, рекомбинантным антителом), полученным, экспрессированным, созданным или выделенным любым способом, который включает создание, например, посредством синтеза, генной инженерии, последовательностей ДНК. В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые в природе не существуют в репертуаре зародышевой линии антитела животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

В определенном аспекте в данном документе представлен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который иммуноспецифически связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанное в данном документе. В определенном аспекте в данном документе представлен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который иммуноспецифически связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе (например, клетка или клетка-хозяин, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в данном документе). В конкретном варианте осуществления клетка является выделенной клеткой. В конкретном варианте осуществления экзогенные полинуклеотиды были введены в клетку. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию очистки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученного из клетки или клетки-хозяина. Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, Главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th Ed., Ausubel F.M. et al., eds., John Wiley and Sons, New York). Моноклональные антитела могут быть получены с использованием широкого спектра методик, известных в данной области техники, включая использование технологии гибридом, рекомбинантной и технологии фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомных методов, включая те, которые известны в данной области техники и содержат информацию о них, например, в Harlow E. & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling G.J. et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981).

Термин "моноклональное антитело", используемый в данном документе, не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Например, моноклональные антитела могут быть получены рекомбинантно из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в данном документе, или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

В конкретных вариантах осуществления "моноклональное антитело", как используется в данном документе, является антителом, продуцируемым одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), где антитело иммуноспецифично связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), как определено, например, с помощью ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области или в приведенных в примерах в данном документе. В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело может быть химерным или гуманизированным антителом. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело является моновалентным или мультивалентным (например, двухвалентным) антителом. В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело является иммуноспецифическим или мультиспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом). Моноклональные антитела, описанные в данном документе, могут, например, быть получены гибридомным способом, как описано в Kohler G. & Milstein C. (1975), *Nature*, 256:495, или могут быть, например, выде-

лены из фаговых библиотек, например, с использованием описанных в данном документе методик. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области (см., например, главу 11 в: *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th Ed., Ausubel F.M. et al., выше). Способы получения и скрининга специфических антител с использованием гибридомной технологии являются обычными и хорошо известны в данной области техники. Например, в гибридном способе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как овца, коза, кролик, крыса, хомяк или макака, иммунизируют для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с белком (например, человеческим FAM19A5), используемым для иммунизации. В качестве альтернативы лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с использованием подходящего сливающего агента, такого как полиэтиленгликоль, для образования клетки гибридомы (Goding J.W. (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Academic Press, 1986)). Кроме того, для иммунизации животного может быть использована методика RIMMS (многократная повторная иммунизация) (Kilpatrick K.E. et al. (1997), *Hybridoma*, 16:381-9, полностью включенная в качестве ссылки). В некоторых вариантах осуществления мыши (или другие животные, такие как цыплята, крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) могут быть иммунизированы антигеном (например, FAM19A5, таким как человеческий FAM19A5), и, если обнаружен иммунный ответ, например обнаружены антитела, специфичные для антигена, в сыворотке мыши, селезенку мыши собирают и выделяют спленоциты. Спленоциты затем сливают хорошо известными способами с любыми подходящими клетками миеломы, например клетками линии клеток SP20, доступными из Американской коллекции типовых культур (ATCC) (Манассас, Вирджиния), для образования гибридом. Гибридомы отбирают и клонируют путем ограниченного разведения. В некоторых вариантах осуществления лимфатические узлы иммунизированных мышей собирают и сливают с клетками миеломы NSO.

Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание не слитых клеток родительской миеломы. Например, если в родительских миеломных клетках отсутствует фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом обычно включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые предотвращают рост клеток с дефицитом HGPRT. В конкретных вариантах осуществления используют клетки миеломы, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильную продукцию антител на высоком уровне выбранными антителопродуцирующими клетками и чувствительны к среде, такой как среда HAT. Среди этих линий клеток миеломы имеются линии мышинной миеломы, такие как линии клеток NSO или линии, полученные из опухолей мышей MOPC-21 и MPC-11, доступные в Центре распределения клеток Salk Institute, Сан-Диего, Калифорния, США, и SP-2 или X63, клетки Ag8.653, доступные из Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мериленд, США. Также были описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor D. (1984), *J. Immunol.* 133:3001-5; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, анализируют на продуцирование моноклональных антител, направленных к FAM19A5 (например, человеческого FAM19A5). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют способами, известными в данной области техники, например иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или иммуноферментный анализ (ELISA). После того, как будут идентифицированы клетки гибридомы, которые продуцируют антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут быть субклонированы путем ограничения процедур разведения и выращены стандартными методами (Goding J.W. (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, выше). Подходящие культуральные среды для этой цели включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью традиционных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, хроматография с гидроксипатитом, гелеэлектрофорез, диализ или аффинная хроматография. Антитела, описанные в данном документе, включают фрагменты антител, которые распознают специфический FAM19A5 (например, человеческий FAM19A5), и могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники. Например, описанные в данном документе фрагменты Fab и F(ab')₂ могут быть получены протеолитическим расщеплением молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы антитела и содержит полную легкую цепь в паре с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')₂ содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, связанных дисульфидными связями в шарнирной области.

Кроме того, антитела, описанные в данном документе, или их антигенсвязывающие фрагменты также могут быть получены с использованием различных способов фагового дисплея, известных в дан-

ной области техники. В способах фагового дисплея функциональные домены антител отображаются на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, из кДНК мышинных или куриных библиотек пораженных тканей человека или не человека). ДНК, кодирующие домены VH и VL, рекомбинируют вместе с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор электропорирован в *E.coli*, а *E.coli* инфицируется фагом-помощником. Фаг, используемый в этих способах, обычно является нитевидным фагом, включая fd и M13, и домены VH и VL обычно рекомбинантно сливаются с геном фага III или геном VIII. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с конкретным антигеном, может быть отобран или идентифицирован с антигеном, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры способов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител, описанных в данном документе, включают способы, описанные в Brinkman U. et al. (1995), *J. Immunol. Methods*, 182:41-50; Ames R.S. et al. (1995), *J. Immunol. Methods*, 184:177-186; Kettleborough C.A. et al. (1994), *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic L. et al. (1997), *Gene* 187:9-18; Burton D.R. & Barbas C.F. (1994), *Advan. Immunol.* 57:191-280; публикации PCT № PCT/GB91/001134; международной публикации № WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844 и патентах США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

Как описано в приведенных выше ссылках, после отбора фага кодирующие области антитела из фага могут быть выделены и использованы для создания целых антител, включая антитела человека или любой другой желательный антигенсвязывающий фрагмент, и экспрессированы в любом желаемом хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, как описано ниже. Методы рекомбинантного получения фрагментов антител, таких как фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂, также могут быть использованы с задействованием методов, известных в данной области, таких как описанные в публикации PCT № WO 92/22324; Mullinax R.L. et al. (1992), *BioTechniques*, 12(6):864-9; Sawai H. et al. (1995), *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:26-34 и Better M. et al. (1988), *Science*, 240:1041-1043.

В одном аспекте для создания целых антител можно использовать праймеры ПЦР, включающие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL из матрицы, например клонов scFv. Используя методы клонирования, известные специалистам в данной области техники, амплифицированные домены VH с помощью ПЦР могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область VH, и амплифицированные домены VL с помощью ПЦР могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область VL, например, человеческие константные регионы каппа или лямбда. Домены VH и VL также могут быть клонированы в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи совместно трансфицируют в клеточные линии, чтобы создать стабильные или временные клеточные линии, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области.

Химерное антитело является молекулой, в которой разные части антитела получены из разных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать переменную область моноклонального антитела животного, не являющегося человеком (например, мыши, крысы или курицы), слитого с константной областью антитела человека. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, Morrison S.L. (1985), *Science*, 229:1202-7; Oi V.T. & Morrison S.L. (1986), *BioTechniques*, 4:214-221; Gillies S.D. et al. (1989), *J. Immunol. Methods*, 125:191-202 и патенты США № 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415.

Гуманизированное антитело способно связываться с заранее определенным антигеном и содержит каркасный участок, имеющий, по существу, аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и CDR, имеющие, по существу, аминокислотную последовательность не человеческого иммуноглобулина (например, мышинный или куриный иммуноглобулин). В конкретных вариантах осуществления, гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно такой, которая является частью иммуноглобулина человека. Антитело также может включать области тяжелой цепи CH1, шарнир, CH2, CH3 и CH4. Гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Гуманизированные антитела могут быть получены с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая, но без ограничения, присоединение CDR (европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967 и патенты США № 5225539, 5530101 и 5585089), венирование или изменение поверхности (европейские патенты № EP 592106 и EP 519596; Padlan E.A. (1991), *Mol. Immunol.* 28(4/5):489-498; Studnicka G.M. et al. (1994), *Prot. Engineering*, 7(6):805-814 и Roguska M.A. et al. (1994), *PNAS*, 91:969-973), перестановку цепей (патент США № 5565332) и методы, описанные, например, в патентах США № 6407213, 5766886, междуна-

родной публикации № WO 93/17105; Tan P. et al. (2002), *J. Immunol.* 169:1119-25; Caldas C. et al. (2000), *Protein Eng.* 13(5):353-60; Morea V. et al. (2000), *Methods*, 20(3):267-79; Baca M. et al. (1997), *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84; Roguska M.A. et al. (1996), *Protein Eng.* 9(10):895-904; Couto J.R. et al. (1995), *Cancer Res.* 55(23 Supp):5973-5977; Couto J.R. et al. (1995), *Cancer Res.* 55(8):1717-22; Sandhu J.S. (1994), *Gene* 150(2):409-10 и Pedersen J.T. et al. (1994), *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73. См. также публикацию заявки США № 2005/0042664 A1 (Feb. 24, 2005), которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Способы получения мультиспецифических (например, биспецифичных, антител были описаны. См., например, патенты США № 7951917; 7183076; 8227577; 5837242; 5989830; 5869620; 6132992 и 8586713. Однодоменные антитела, например антитела, лишенные легких цепей, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники. См. Riechmann L. & Muyldermans S. (1999), *J. Immunol.* 231:25-38; Nuttall S.D. et al. (2000), *Curr Pharm. Biotechnol.* 1(3):253-263; Muyldermans S., (2001), *J. Biotechnol.* 74(4):277-302; патент США № 6005079 и международные публикации № WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301. Кроме того, антитела, которые иммуноспецифически связываются с антигеном FAM19A5, могут, в свою очередь, использоваться для создания антиидиотипических антител, которые "имитируют" антиген, используя методы, хорошо известные специалистам в данной области техники. (См., например, Greenspan N.S. & Bona C.A. (1989), *FASEB J.* 7(5):437-444 и Nissinoff A. (1991), *J. Immunol.* 147(8):2429-2438).

В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, которое связывается с тем же эпитопом FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), что и антитело к FAM19A5, описанное в данном документе, является антителом человека или его антигенсвязывающим фрагментом. В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, которое конкурентно блокирует (например, зависимым от дозы способом) антитела, описанные в данном документе (например, 2-13 и 3-2), от связывания с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), является человеческим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Человеческие антитела могут быть получены с использованием любого метода, известного в данной области техники. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулина человека. В частности, генные комплексы тяжелой и легкой цепей человеческих иммуноглобулинов могут быть введены случайным образом или путем гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. В качестве альтернативы варибельная область человека, константная область и область разнообразия могут быть введены в эмбриональные стволовые клетки мыши в дополнение к генам тяжелой и легкой цепей человека. Гены иммуноглобулинов тяжелой и легкой цепей мышей могут стать нефункциональными по отдельности или одновременно с введением локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция области JH предотвращает выработку эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножаются и подвергаются микроинъекции в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем химерных мышей разводят для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например всем или частью антигена (например, FAM19A5). Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с использованием обычной технологии гибридомы. Трансгены иммуноглобулина человека, которые переносятся трансгенными мышами, реаранжируются во время дифференцировки В-клеток и впоследствии подвергаются переключению классов и соматическим мутациям. Таким образом, используя такую методику, можно получить терапевтически полезные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Для обзора этой технологии для производства человеческих антител см. Lonberg N. & Huszar D. (1995), *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93. Для подробного обсуждения этой технологии получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител и протоколов получения таких антител, см., например, международные публикации № WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735 и патенты США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc.; патенты США № 6075181 и 6150184), HUAB-MOUSE™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; патенты США № 5545806 и 5569825), TRANS CHROMO MOUSE™ (Kirin) и KM MOUSE™ (Medarex/Kirin).

Человеческие антитела, которые специфически связываются с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, включая способы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулина человека. См. также патенты США № 4444887, 4716111 и 5885793 и международные публикации № WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

В некоторых вариантах осуществления человеческие антитела могут быть получены с использованием гибридом мыши-человека. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформиро-

ванные вирусом Эпштейна-Барра (EBV), могут быть слиты с клетками миеломы мыши для получения гибридомы мыши-человека, секретирующих человеческие моноклональные антитела, и эти гибридомы мыши-человека могут быть подвергнуты скринингу для определения тех, которые секретируют моноклональные человеческие антитела, которые иммуноспецифично связываются с антигеном-мишенью (например, FAM19A5, таким как человеческий FAM19A5)). Такие способы известны и описаны в данной области техники, см., например, Shinmoto H. et al. (2004), *Cytotechnology*, 46:19-23; Naganawa Y. et al. (2005), *Human Antibodies*, 14:27-31.

VI. Способы конструирования антител.

Как обсуждалось выше, антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающую часть, имеющую последовательности VH и VL, описанные в данном документе, можно использовать для создания нового антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части путем модификации последовательностей VH и/или VL или константного региона(ов), прилагающегося к нему. Таким образом, в другом аспекте, описанном в данном документе, структурные признаки антитела к FAM19A5, описанного в данном документе, например 2-13 и 3-2, используются для создания структурно родственного антитела к FAM19A5, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител, описанное в данном документе, такое как связывание с человеческим FAM19A5. Например, исходным материалом для способа разработки являются последовательности VH и/или VL, представленные в данном документе, или одна, или несколько областей CDR. Чтобы создать сконструированное антитело, нет необходимости фактически получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или несколько последовательностей VH и/или VL, представленных в данном документе, или одну или несколько его областей CDR. Скорее, информация, содержащаяся в последовательности(ях), используется в качестве исходного материала для создания последовательности(ей) "второго поколения", полученной из исходной(ых) последовательности(ей), и затем готовится последовательность(и) "второго поколения" и экспрессируется в виде белка.

Соответственно, в данном документе предусмотрены способы получения антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, включающие:

(a) обеспечение (i) последовательности варибельной области тяжелой цепи, содержащей последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3, как указано в табл. 2, или CDR1, CDR2 и/или CDR3 варибельной области тяжелой цепи, как указано в табл. 4; и (ii) последовательности варибельной области легкой цепи, содержащей последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3, как указано в табл. 3, или CDR1, CDR2 и/или CDR3 варибельной области легкой цепи, как указано в табл. 5;

(b) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в последовательности варибельной области тяжелой цепи и/или последовательности варибельной области легкой цепи для создания по меньшей мере одной измененной последовательности антитела или антигенсвязывающей части; и

(c) экспрессию измененной последовательности антитела или антигенсвязывающей части в виде белка.

Стандартные методы молекулярной биологии могут быть использованы для получения и экспрессии измененной последовательности антитела или его антигенсвязывающей части.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, кодируемое измененной последовательностью (последовательностями) антитела или антигенсвязывающей части, является последовательностью, которая сохраняет одно, некоторые или все функциональные свойства антител к FAM19A5, описанных в данном документе, которые подразумевают, что антитело:

(1) связывается с растворимым человеческим FAM19A5, например, с K_D 10 нМ или менее (например, 0,01-10 нМ), например, как измерено с помощью Biacore;

(2) связывается с мембраносвязанным человеческим FAM19A5, например, с K_D 1 нМ или менее (например, 0,01-1 нМ), например, как измерено с помощью ELISA;

(3) связывается с мембраносвязанным человеческим FAM19A5, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, 0,01-1 нМ), например, как измерено с помощью ELISA;

(4) уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает развитие реактивного глиоза;

(5) подавляет избыточную пролиферацию реактивных астроцитов;

(6) уменьшает экспрессию протеогликанов хондроитинсульфата, включая нейрокан и нейрон-глиальный антиген 2 (NG2);

(7) увеличивает экспрессию c-fos и pERK в ядре нейронов;

(8) способствует выживанию нейронов;

(9) увеличивает экспрессию GAP43 в нейронах;

(10) способствует отрастанию аксона;

(11) конкурирует в любом направлении или в обоих направлениях за связывание с человеческим FAM19A5 с 2-13, 3-2 или 1-28.

Измененное антитело или его антигенсвязывающая часть могут демонстрировать одно или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более или все функциональные свойства, указанные выше как (1)-(11). Функциональные свойства измененных антител или их антигенсвязывающих частей могут быть

оценены с использованием стандартных анализов, доступных в данной области техники и/или описанных в данном документе, таких как те, что изложены в примерах (например, ELISA, FACS).

В определенных вариантах осуществления способов конструирования антител, описанных в данном документе, мутации могут быть введены случайным образом или избирательно по всей или по части кодирующей последовательности антитела к FAM19A5, и полученные в результате модифицированные антитела к FAM19A5 могут быть подвергнуты скринингу на активность связывания и/или другие функциональные свойства, как описано в данном документе. Мутационные методы были описаны в области техники. Например, в публикации PCT № WO 02/092780 от Short описаны способы создания и скрининга мутаций антител с использованием мутагенеза с насыщением, синтетической лигированной сборки или их комбинации. В качестве альтернативы в публикации PCT № WO 03/074679 от Lazar et al. описаны методы использования методов компьютерного скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

VII. Клетки и векторы.

В определенных аспектах в данном документе предусмотрены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) антитела, описанные в данном документе (или их антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5) и родственными полинуклеотидами, и векторы экспрессии. В данном документе представлены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к FAM19A5 или фрагмент для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, например в клетках млекопитающих. Также в данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител к FAM19A5, описанных в данном документе (например, человеческого или гуманизированного антитела). В конкретном аспекте в данном документе представлены способы получения антитела, описанного в данном документе, включающие экспрессию такого антитела из клетки-хозяина.

Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в данном документе (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или антитела с одной цепью, описанного в данном документе), которое специфически связывается с FAM19A5 (например, человеческим FAM19A5), включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело. Как только получен полинуклеотид, кодирующий молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или его фрагмент (например, переменные домены тяжелой и/или легкой цепи), описанный в данном документе, вектор для получения молекулы антитела может быть продуцирован с помощью технологии рекомбинантных ДНК с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь). Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предусмотрены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанную в данном документе, тяжелую или легкую цепь антитела, переменный домен тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмента или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036 и патент США № 5122464), а переменные домены антитела могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии всей тяжелой цепи, всей легкой цепи или как всей тяжелой, так и легкой цепей.

Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) обычными методами, и полученные в результате клетки могут быть затем культивированы традиционными методами для получения антитела, описанного в данном документе (например, антитела, содержащего VH и/или VL, или одно или несколько CDR VH и/или VL, 2-13, 3-2 или 1-28), или его фрагмента. Таким образом, в данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в данном документе, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь, или его фрагмент, или одноцепочечное антитело, описанное в данном документе, функционально связанные с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В определенных вариантах осуществления для экспрессии антител с двойной цепью векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи, по отдельности, могут совместно экспрессироваться в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент. В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит два разных вектора: первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фраг-

мент, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент. В других вариантах осуществления первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент, и вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в данном документе. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь/переменная область тяжелой цепи экспрессируется первой клеткой, ассоциированной с легкой цепью/переменной областью легкой цепи второй клетки, для формирования антитела к FAM19A5, описанного в данном документе, или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления в данном документе представлена популяция клеток-хозяев, включающая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

В конкретном варианте осуществления в данном документе представлена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/переменную область легкой цепи антитела к FAM19A5, описанного в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/переменную область тяжелой цепи антитела к FAM19A5, описанного в данном документе. Для экспрессии молекул антител, описанных в данном документе, можно использовать множество векторных систем экспрессии хозяина. Такие системы экспрессии хозяина являются носителями, с помощью которых интересующие кодирующие последовательности могут быть получены и впоследствии очищены, но также являются клетками, которые могут при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями экспрессировать молекулу антитела, описанную в данном документе *in situ*. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E.coli* и *B.subtilis*), трансформированные рекомбинантными бактериофаговыми ДНК, плазмидными ДНК или векторами экспрессии космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности антител; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими кодирующие последовательности антител; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирус), содержащими кодирующие последовательности антител; системы растительных клеток (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом мозаики табака, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, плазмиды Ti), содержащими последовательности, кодирующие антитела; или клеточные системы млекопитающих (например, COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK293T, HepG2, SP210 R1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса, промотор вируса коровьей оспы 7.5K). В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии антител, описанных в данном документе, или антигенсвязывающего фрагмента являются клетками CHO, например клетками CHO из CHO GS SYSTEM™ (Lonza). В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии антител, описанные в данном документе, являются клетками человека, например линиями клеток человека. В конкретном варианте осуществления вектор экспрессии млекопитающего является POPTIVEC™ или pcDNA3.3. В конкретном варианте осуществления бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии молекулы всего рекомбинантного антитела, используют для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промежуточный ранний промоторный элемент гена из цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии антител (Foecking M.K. & Hofstetter H. (1986), *Gene*, 45:101-5 и Cockett M.I. et al. (1990), *Biotechnology*, 8(7):662-7). В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, продуцируются клетками CHO или клетками NSO. В конкретном варианте осуществления экспрессия описанных в данном документе нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, которые иммуноспецифически связывают FAM19A5 (например, человеческий FAM19A5), регулируется конститутивным промотором, индуцибельным промотором или тканеспецифичным промотором.

В бактериальных системах ряд векторов экспрессии можно преимущественно выбирать в зависимости от применения, предназначенного для экспрессируемой молекулы антитела. Например, когда необходимо получить большое количество такого антитела для создания фармацевтических композиций молекулы антитела, могут быть желательны векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней продуктов слитого белка, которые легко очищаются. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, вектор экспрессии *E.coli* pUR278 (Ruether U. & Mueller-Hill B. (1983), *EMBO J.* 2:1791-1794), в котором кодирующая последовательность антитела может быть лигирована индивидуально в вектор в рамке с кодирующей областью *lac Z*, так что образуется слитый белок; векторы pIN (Inouye S. & Inouye M.

(1985), *Nuc. Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke G. & Schuster S.M. (1989), *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); и т.п. Например, векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде белков слияния с глутатион-S-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки растворимы и могут быть легко очищены от лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матричными гранулами глутатион-агарозы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX конструируют так, чтобы они включали сайты расщепления протеазой тромбина или фактора Ха, чтобы клонированный продукт гена-мишени мог высвободиться из фрагмента GST. В системе насекомых вирус ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV), например, может использоваться в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Последовательность, кодирующая антитело, может быть индивидуально клонирована в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть использован ряд вирусных систем экспрессии. В случаях, когда аденовирус используется в качестве вектора экспрессии, представляющая интерес кодирующая последовательность антитела может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, поздней промоторной и трехсторонней лидерной последовательностью. Этот химерный ген затем может быть вставлен в геном аденовируса путем рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах (например, см. Logan J. & Shenk T. (1984). *PNAS*, 81(12):3655-9). Специфические сигналы инициации также могут потребоваться для эффективной трансляции кодирующих последовательностей встроенных антител. Эти сигналы включают иницирующий кодон ATG и смежные последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен находиться в фазе с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Эти экзогенные трансляционные контрольные сигналы и иницирующие кодоны могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии может быть повышена путем включения соответствующих элементов энхансера транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (См., например, Bitter G. et al. (1987), *Methods Enzymol.* 153:516-544). Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и обрабатывает продукт гена определенным желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы для посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Подходящие клеточные линии или системы-хозяева могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка. С этой целью могут быть использованы эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильной обработки первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NSO (клеточная линия мышины миеломы, которая неэндогенно продуцирует любые цепи иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS 1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK293T, HepG2, SP210, R1.1, клетки BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В определенных вариантах осуществления антитела к FAM19A5, описанные в данном документе, продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO. В конкретном варианте осуществления антитела, описанные здесь, или их антигенсвязывающие части имеют пониженное содержание фукозы или полное отсутствие фукозы. Такие антитела могут быть получены с использованием методик, известных специалисту в данной области техники. Например, антитела могут быть экспрессированы в клетках, дефицитных по способности или не обладающих способностью фукозилировать. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей 1,6-фукозилтрансферазы могут быть использованы для получения антител или их антигенсвязывающих частей с пониженным содержанием фукозы. Система POTELLIGENT® (Lonza) является примером такой системы, которая может использоваться для получения антител или их антигенсвязывающих частей с пониженным содержанием фукозы.

Для длительного получения рекомбинантных белков с высоким выходом могут быть получены клетки стабильной экспрессии. Например, могут быть сконструированы клеточные линии, которые стабильно экспрессируют антитело к FAM19A5, описанное в данном документе, его антигенсвязывающую часть. В конкретных вариантах осуществления клетка, предусмотренная в данном документе, стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельный домен легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный домен тяжелой цепи, которые связываются с образованием антитела, описанного в данном документе, или его антигенсвязывающей части.

В определенных аспектах вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные сайты инициации репликации, клетки-хозяева можно трансформировать с ДНК, контролируемой соот-

ветствующими элементами контроля экспрессии (например, промотором, энхансером, последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.) и селективным маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки могут расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем переключаются на селективную среду. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти, образуя очаги, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены в клеточные линии. Этот способ может преимущественно использоваться для конструирования клеточных линий, которые экспрессируют антитело к FAM19A5, описанное в данном документе, или его антигенсвязывающую часть. Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно полезны при скрининге и оценке композиций, которые прямо или косвенно взаимодействуют с молекулой антитела.

Ряд систем отбора может быть использован, включая, но не ограничиваясь ими, гены тимидинкиназы (Wigler M. et al. (1977), *Cell*, 11(1):223-32), гипоксантигуанин фосфорибозилтрансферазы (Szybalska E.H. & Szybalski W. (1962), *PNAS*, 48(12):2026-2034) и аденинфосфорибозилтрансферазы вируса простого герпеса (Lowy I. et al. (1980), *Cell*, 22(3):817-23), которые могут быть задействованы в tk-, hgprt- или aprt-клетках соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам может быть использована в качестве основы для отбора следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M. et al. (1980), *PNAS*, 77(6):3567-70; O'Hare K. et al. (1981), *PNAS*, 78:1527-31); gpt, который придает устойчивость к микофенольной кислоте (Mulligan R.C. & Berg P. (1981), *PNAS*, 78(4):2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu G.Y. & Wu C.H. (1991), *Biotherapy*, 3:87-95; Tolstoshev P. (1993), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan R.C. (1993), *Science*, 260:926-932 и Morgan R.A. & Anderson W.F. (1993), *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; Nabel G.J. & Feigner P.L. (1993), *Trends Biotechnol.* 11(5):211-5); и hygro, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre R.F. et al. (1984), *Gene*, 30(1-3):147-56).

Способы, общеизвестные в области техники рекомбинантных ДНК, могут обычно применяться для выбора желаемого рекомбинантного клона, и такие способы описаны, например, в Ausubel F.M. et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglner M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); и в главах 12 и 13, Dracopoli N.C. 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, которые включены посредством ссылки в данный документ во всей своей полноте. Уровни экспрессии молекулы антитела могут быть увеличены с помощью амплификации вектора (для обзора см. Bebbington C.R. & Hentschel C.C.G., *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)).

Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, приведет к увеличению количества копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, продукция антитела также будет увеличиваться (Crouse G.F. et al. (1983), *Mol. Cell Biol.* 3:257-66).

Клетка-хозяин может быть совместно трансфицирована двумя или более векторами экспрессии, описанными в данном документе: первый вектор, кодирующий полипептид, полученный из тяжелой цепи, и второй вектор, кодирующий полипептид, полученный из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепей. Клетки-хозяева можно совместно трансфицировать различными количествами двух или более векторов экспрессии. Например, клетки-хозяева могут быть трансфицированы любым из следующих соотношений первого вектора экспрессии и второго вектора экспрессии: 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 или 1:50.

В качестве альтернативы можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях легкая цепь должна располагаться перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot N.J. (1986), *Nature*, 322:562-565 и Kohler G. (1980), *PNAS*, 77:2197-2199). Кодированные последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Вектор экспрессии может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более или в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать в следующем порядке промотор, первый ген (например, тяжелую цепь антитела, описанного в данном документе) и второй ген (например, легкую цепь антитела, описанного в данном документе). В таком векторе экспрессии транскрипция обоих генов может управляться промотором, тогда как трансляция мРНК из первого гена может осуществляться с помощью кэп-зависимого механизма сканирования, а трансляция мРНК из второго гена может осуществляться кэп-независимым механизмом, например IRES. Как только молекула антитела, описанная в данном документе, получена путем рекомбинантной экспрессии, она может быть очищена любым способом, известным в данной области техники, для очистки молекулы иммуноглобулина, например хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в частности аффинной к конкретному антигену после белка А, и колоночной хроматографией), центрифугированием, диффе-

рениальной растворимостью или любым другим стандартным способом очистки белков. Дополнительно, антитела, описанные в данном документе, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе, или другими способами, известными в данной области техники, для облегчения очистки.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, описанную в данном документе, выделяют или очищают. Обычно выделенное антитело является антителом, которое практически не содержит других антител с антигенной специфичностью, отличных от выделенного антитела. Например, в конкретном варианте осуществления препарат антитела, описанного в данном документе, практически не содержит клеточного материала и/или химических предшественников. Формулировка "практически не содержит клеточного материала" включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно выделено или рекомбинантно продуцировано. Таким образом, антитело, которое практически не содержит клеточного материала, включает препараты антитела, имеющие менее чем приблизительно 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (по сухой массе) гетерологичного белка (также называемого в данном документе "загрязняющим белком") и/или варианты антитела, например различные посттрансляционные модифицированные формы антитела или другие различные варианты антитела (или антигенсвязывающие части). Когда антитело получают рекомбинантным способом, оно также обычно практически не содержит культуральной среды, т.е. культуральная среда составляет менее чем примерно, 20, 10, 2, 1, 0,5 или 0,1% от объема белкового препарата. Когда антитело получают путем химического синтеза, оно, как правило, практически не содержит химических предшественников или других химических веществ, т.е. оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые участвуют в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела содержат менее чем приблизительно 30, 20, 10 или 5% (по сухой массе) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. В конкретном варианте осуществления антитела, описанные в данном документе, являются выделенными или очищенными.

VIII. Анализы.

Антитела, описанные в данном документе, могут быть протестированы на связывание с FAM19A5 с помощью, например, стандартного ELISA. Вкратце, планшеты для микротитрования покрывают очищенным FAM19A5 в концентрации 1-2 мкг/мл в PBS, а затем блокируют 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Разведения антител (например, разведения плазмы от мышей, иммунизированных FAM19A5) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты промывают PBS/Tween и затем инкубируют со вторичным реагентом (например, для антител человека, Fc-специфическим поликлональным реагентом коза-анти-человеческий IgG), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты обрабатывают субстратом ABTS (Moss Inc, product: ABTS-1000) и анализируются с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Затем сыворотки от иммунизированных мышей далее подвергают скринингу с помощью проточной цитометрии на связывание с клеточной линией, экспрессирующей человеческий FAM19A5, но не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует FAM19A5. Вкратце, связывание антител к FAM19A5 оценивают путем инкубации экспрессирующих FAM19A5 клеток CHO с антителом к FAM19A5 в разведении 1:20. Клетки промывают и детектируют связывание с меченым PE античеловеческим IgG Ab. Анализы проточной цитометрии выполняются с использованием проточной цитометрии FACS (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния). Предпочтительно мыши, которые развивают самые высокие титры, будут использоваться для слияний.

ELISA-анализ, как описано выше, можно использовать для скрининга антител и, таким образом, гибридом, которые продуцируют антитела, которые демонстрируют положительную реактивность с иммуногеном FAM19A5. Гибридомы, которые продуцируют антитела, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с FAM19A5, затем могут быть субклонированы и дополнительно охарактеризованы. Один клон из каждой гибридомы, который сохраняет реактивность родительских клеток (с помощью ELISA), затем может быть выбран для создания банка клеток и для очистки антител.

Для очистки антител к FAM19A5 выбранные гибридомы могут быть выращены в двухлитровых колбах для очистки моноклональных антител. Надсадочные жидкости могут быть отфильтрованы и сконцентрированы перед аффинной хроматографией с белком А-сефарозой (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG может быть проверен гель-электрофорезом и высокоэффективной жидкостной хроматографией для обеспечения чистоты. Буферный раствор может быть заменен на PBS, а концентрация может быть определена по OD 280 с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно аликвотировать и хранить при -80°C.

Чтобы определить, связываются ли выбранные моноклональные антитела к FAM19A5 с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Связывание биотинилированного МАb можно обнаружить с помощью меченого стрептавидинового зонда. Исследования конкуренции с использованием немеченных моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно проводить с использованием планшетов для ELISA с покрытием FAM19A5, как описано выше.

Для определения изотипа очищенных антител можно проводить ELISA изотипа с использованием

реагентов, специфичных для антител определенного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела лунки планшетов для микротитрования можно покрыть 1 мкг/мл античеловеческого иммуноглобулина в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% BSA планшеты подвергаются реакции с 1 мкг/мл или менее тестируемых моноклональных антител или очищенных контрольных изотипа при температуре окружающей среды в течение 1-2 ч. Затем лунки могут подвергаться реакции либо с человеческими IgG1, либо с человеческими IgM-специфическими конъюгированными со щелочной фосфатазой зондами. Пластины обрабатываются и анализируются, как описано выше.

Чтобы проверить связывание моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими FAM19A5, можно использовать проточную цитометрию, как описано в примерах. Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие мембраносвязанный FAM19A5 (выращенный в стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA, при 4°C в течение 1 ч. После промывания клетки реагируют с меченым флуоресцеином анти-IgG-антителом в тех же условиях, что и окрашивание первичного антитела. Образцы могут быть проанализированы прибором FACScan с использованием свойств светового и бокового рассеяния для локализации отдельных клеток и определения связывания меченых антител. В качестве альтернативного анализа с использованием флуоресцентной микроскопии может быть использован (в дополнение или вместо) анализ проточной цитометрии. Клетки можно окрашивать точно так же, как описано выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот метод позволяет визуализировать отдельные клетки, но может иметь пониженную чувствительность в зависимости от плотности антигена.

Антитела к FAM19A5 могут быть дополнительно протестированы на реактивность с антигеном FAM19A5 с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих FAM19A5, можно получить и подвергнуть электрофорезу в додецилсульфате натрия в полиакриламидном геле. После электрофореза отделенные антигены будут перенесены на нитроцеллюлозные мембраны, заблокированы 20% мышьиной сывороткой и исследованы с тестируемыми моноклональными антителами. Связывание IgG может быть обнаружено с использованием щелочной фосфатазы к IgG и обработано с использованием субстратных таблеток BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., Сент-Луис, Миссури).

Способы анализа аффинности связывания, перекрестная реактивность и кинетика связывания различных антител к FAM19A5 включают стандартные анализы, известные в данной области техники, например BIACORE™ анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора BIACORE™ 2000 SPR (Biacore AB, Упсала, Швеция).

В одном варианте осуществления антитело специфически связывается с растворимой формой человеческого FAM19A5. В другом варианте осуществления антитело специфически связывается с мембраносвязанной формой человеческого FAM19A5. Антитело может специфически связываться с конкретным эпитопом FAM19A5 (например, SEQ ID NO: 6 или фрагментом в пределах SEQ ID NO: 6). В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий FAM19A5, предпочтительно с высокой аффинностью, и не реагирует перекрестно с другими членами подсемейства белков FAM19.

IX. Биспецифические молекулы.

Антитела, описанные в данном документе, могут быть использованы для образования биспецифичных молекул. Антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающие части могут быть дериватизированы или связаны с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора), чтобы создать биспецифическую молекулу, которая связывается по меньшей мере с двумя разными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Цитокины, такие как IL-6, CNTF, LIF, EGF и TGF α , участвуют в качестве триггеров развития глиоза и/или реактивного астроглиоза (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)) путем активации белкового передатчика сигнала и активатора транскрипции 3 (STAT3), который затем регулирует многие аспекты реактивного астроглиоза после повреждения ЦНС. Herrmann J.E. et al., J. Neurosci. 28(28):7231-7243 (2008). Например, отсутствие или снижение STAT3 приводит к ослабленной повышающей регуляции глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), недостаточности гипертрофии астроцитов и увеличению распространения воспаления, увеличению объема поражения и частичному ослаблению моторного восстановления после повреждения ЦНС. Herrmann J.E. et al., J. Neurosci. 28(28):7231-7243 (2008). Таким образом, например, антитело к FAM19A5 может быть связано с антителом или scFv, которое специфически связывается с любым белком, который участвует в ингибировании развития глиоза и/или избыточной пролиферации реактивного астроглиоза для комбинированного лечения, например, антител к IL-6, CNTF, LIF, EGF или TGF α .

Кроме того, антитело к FAM19A5 может быть связано с антителом или scFv, которое лечит заболевание или нарушение, включая повреждение центральной нервной системы (например, черепно-мозговую травму, повреждение спинного мозга, инсульт или опухоль головного мозга), повреждение спинномозговой системы, дегенеративное нарушение головного мозга (например, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, ALS), дегенеративное цереброспинальное или нервное нарушение или невропатическую боль у субъекта (см. заболевания или нарушения в

разделе XIII ниже). Например, антитело к FAM19A5 может быть связано с антителом или scFv, например Natalizumab (Tysabri) или Alemtuzumab (Lemtrada), которое лечит рассеянный склероз.

Описанное в данном документе антитело может быть на самом деле дериватизировано или связано с более чем одной другой функциональной молекулой для создания мультиспецифических молекул, которые связываются с более чем двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; предполагается, что такие мультиспецифические молекулы также охватываются термином "биспецифическая молекула", как используется в данном документе. Чтобы создать описанную в данном документе биспецифическую молекулу, антитело, описанное в данном документе, может быть функционально связано (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной связи или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, его антигенсвязывающая часть, пептид или связывающий миметик, таким образом, что получается биспецифическая молекула. В одном варианте осуществления, биспецифическая молекула связывается с FAM19A5 и VEGF. В другом варианте осуществления, биспецифическая молекула связывается с FAM19A5 и EGF.

Соответственно, в данном документе предусмотрены биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую специфичность связывания для FAM19A5 и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. В варианте осуществления, описанном в данном документе, в котором биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания.

В одном варианте осуществления биспецифические молекулы, описанные в данном документе, содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающую часть, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (ScFv). Антитело также может быть димером легкой цепи или тяжелой цепи или любым их минимальным фрагментом, таким как Fv или одноцепочечной конструкцией, как описано в Ladner et al. патенте США № 4946778, содержание которого прямо включено в данный документ посредством ссылки.

При том, что человеческие моноклональные антитела являются предпочтительными, другие антитела, которые можно использовать в описанных в данном документе биспецифических молекулах, являются мышинными, химерными и гуманизированными моноклональными антителами.

Описанные в данном документе биспецифические молекулы могут быть получены путем конъюгирования специфичностей связывания компонентов с использованием способов, известных в данной области техники. Например, каждую специфичность связывания биспецифической молекулы можно создавать отдельно и затем конъюгировать друг с другом. Когда специфичностями связывания являются белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать различные связывающие или сшивающие агенты. Примеры сшивающих агентов включают белок А, карбодииимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Кагровский et al. (1984), J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M.A. et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:8648). Другие способы включают те, которые описаны в Paulus (1985), Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985), Science, 229:81-83) и Glennie et al. (1987), J. Immunol. 139:2367-2375). Предпочтительными конъюгирующими агентами являются SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс).

Когда специфичностями связывания являются антитела, они могут быть конъюгированы посредством сульфгидрильного связывания С-конца шарнирных областей двух тяжелых цепей. В особенно предпочтительном варианте осуществления шарнирную область модифицируют так, чтобы она содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков для конъюгации, предпочтительно один. Альтернативно, обе специфичности связывания могут быть закодированы в одном и том же векторе и экспрессированы и собраны в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ особенно полезен, когда биспецифическая молекула является слитым белком mAb×mAb, mAb×Fab, mAb×(scFv)₂, Fab×F(ab')₂ или лигандом×Fab. Биспецифическое антитело может содержать антитело, содержащее scFv на С-конце каждой тяжелой цепи. Описанная в данном документе биспецифическая молекула может быть одноцепочечной молекулой, содержащей одноцепочечное антитело и детерминант связывания, или одноцепочечной биспецифической молекулой, содержащей две детерминанты связывания. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы для получения биспецифических молекул описаны, например, в патентах США № 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их конкретными мишенями может быть подтверждено с использованием известных в данной области методов, таких как иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), анализ FACS, биоанализ (например, ингибирование роста) или анализ Western Blot. Каждый из этих анализов обычно обнаруживает присутствие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, с использованием меченого реагента (например, антитела), специфичного для представляющего интерес комплекса.

Х. Диагностика.

В одном варианте осуществления фрагмент, присоединенный к антителу к FAM19A5, выбран из группы, состоящей из связывающего фрагмента, фрагмента мечения и биологически активного фрагмента. Описанные в данном документе антитела могут быть использованы для диагностических целей, включая анализ образцов и визуализацию *in vivo*, и для этой цели антитело (или его связывающую часть) может быть конъюгировано с подходящим детектируемым агентом для образования иммуноконъюгата. Для диагностических целей подходящими агентами являются детектируемые метки, которые включают радиоизотопы, для визуализации всего тела, и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие метки антител для тестирования образцов. Детектируемые метки могут быть любого из различных типов, используемых в настоящее время в области диагностики *in vitro*, включая метки в виде частиц, включая золи металлов, такие как коллоидное золото, изотопы, такие как I^{125} или Tc^{99} представленные, например, с пептидным хелатирующим агентом N2S2, N3S или N4 типа, хромофоры, включая флуоресцентные маркеры, люминесцентные маркеры, фосфоресцентные маркеры и т.п., а также ферментные метки, которые превращают данный субстрат в детектируемый маркер, и полинуклеотидные метки, которые обнаруживаются после амплификации, такой как полимеразная цепная реакция. Подходящие ферментные метки включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.п. Например, меткой может быть фермент щелочная фосфатаза, определяемая путем измерения наличия или образования хемилюминесценции после превращения 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантилметоксифосфорилноксифенилдиоксетан (AMPPD), динатрий-3-(4-метоксиспиро{1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло{3.3.1.1.3.7}декан}-4-ил)фенилфосфат (CSPD), а также CDP и CDP-STAR® или другие люминесцентные субстраты, хорошо известные специалистам в данной области, например хелаты подходящих лантаноидов, такие как тербий(III) и европий(III). Средство детекции определяется выбранной меткой. Проявление метки или продуктов ее реакции может быть замечено невооруженным глазом в случае, когда метка крупнодисперсная и накапливается на соответствующих уровнях, или с использованием таких приборов, как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т.п., все в соответствии стандартной практике.

Антитела, описанные в данном документе, также могут быть конъюгированы с терапевтическим агентом для образования иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC).

Подходящие терапевтические агенты включают агенты, модулирующие развитие глиоза и/или реактивного астроглиоза и/или лечащие дегенеративные нарушения головного мозга, повреждения центральной нервной системы или невропатическую боль. Терапевтические средства для лечения дегенеративных заболеваний головного мозга включают лекарственные средства для лечения болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза и амиотрофического бокового склероза (ALS). Это включает лекарственные средства, обычно используемые для лечения таких дегенеративных заболеваний головного мозга, например лекарственные средства, описанные ниже в разделе XII.

Имуноконъюгаты могут быть получены способами, известными в данной области техники. Предпочтительно способы конъюгации приводят в результате к образованию связей, которые являются практически (или почти) неиммуногенными, например пептидными (т.е. амидными), сульфидными, (стерически затрудненными), дисульфидными, гидразоновыми и эфирными связями. Эти связи являются почти неиммуногенными и демонстрируют приемлемую стабильность в сыворотке (см., например, Senter, P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009), 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886).

В зависимости от биохимической природы фрагмента и антитела, могут использоваться разные стратегии конъюгации. В случае, если фрагмент природного происхождения или рекомбинант из 50-500 аминокислот, существуют стандартные процедуры в пособиях, описывающие технологию синтеза белковых конъюгатов, которая может быть легко выполнена специалистом в данной области (см., например, Hackenberger, C.P.R. и Schwarzer D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008), 10030-10074). В одном варианте осуществления используется реакция малеинимидного фрагмента с остатком цистеина в антителе или фрагменте. Это особенно подходящая технология связывания в том случае, если, например, используется Fab или Fab'-фрагмент антитела. Альтернативно, в одном варианте воплощения осуществляют соединение с С-концевым концом антитела или фрагмента. С-концевая модификация белка, например, Fab-фрагмента, например, может быть выполнена, как описано (Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009), 3361-3371).

Обычно сайт-специфическая реакция и ковалентное связывание основаны на превращении природной аминокислоты в аминокислоту с реакционной способностью, которая независима от реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в контексте редкой последовательности может быть ферментативно превращен в альдегид (см. Frese, M.A., and Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009), 425-427). Также можно получить желаемую аминокислотную модификацию, используя специфическую ферментативную реактивность определенных ферментов с природной аминокислотой в данном контексте последовательности (см., например, Taki, M. et al., *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004), 119-126; Gautier, A. et al., *Chem. Biol.* 15 (2008), 128-136; и катализируемое протеазой обра-

зование связей C-N, используемое в Bordusa F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004), 389-403).

Сайт-специфическая реакция и ковалентное связывание также могут быть достигнуты путем селективной реакции концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реагентами. Реакционная способность N-концевого цистеина с бензонитрилами (см. Ren, H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009), 9658-9662) может быть использована для достижения сайт-специфического ковалентного связывания. Нативное химическое лигирование может также основываться на C-концевых остатках цистеина (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (*Protein Engineering*), 65-96).

В EP 014453 описан способ конъюгации, который основан на более быстрой реакции цистеина в пределах участка отрицательно заряженных аминокислот с цистеином, расположенным в участке положительно заряженных аминокислот.

Фрагмент также может быть синтетическим пептидом или имитатором пептида. В случае, если полипептид химически синтезирован, во время такого синтеза могут быть встроены аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью (см., например, de Graaf, A.J. et al., *Bioconjug. Chem.* 20 (2009), 1281-1295). Поскольку речь идет о большом разнообразии ортогональных функциональных групп и они могут быть встроены в синтетический пептид, конъюгирование такого пептида с линкером является стандартной технологией.

Чтобы получить моно меченый полипептид, конъюгат со стехиометрией 1:1 можно отделить хроматографией от других побочных продуктов конъюгации. Эту процедуру можно облегчить, используя член связывающей пары, меченный красителем, и заряженный линкер. Используя этот тип меченого и сильно отрицательно заряженного члена связывающей пары, моноконъюгированные полипептиды легко отделяются от немеченных полипептидов и полипептидов, которые несут более одного линкера, поскольку различие в заряде и молекулярной массе можно использовать для разделения. Флуоресцентный краситель может быть полезен для очистки комплекса от несвязанных компонентов, таких как меченое одновалентное связующее.

XI. Фармацевтические композиции.

В данном документе представлены композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающую часть, описанные в данном документе, имеющие желаемую степень чистоты в физиологически приемлемом носителе, наполнителе или стабилизаторе (Remington's *Pharmaceutical Sciences* (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат антитело или его антигенсвязывающую часть, описанную в данном документе биспецифическую молекулу или иммуноконъюгат и, необязательно, один или несколько дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество антитела или его антигенсвязывающей части, описанной в данном документе, и, необязательно, одну или несколько дополнительных профилактических терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления антитело является единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть полезны для усиления, индукции или активации активности FAM19A5 и лечения состояния, такого как повреждение центральной нервной системы, дегенеративное нарушение головного мозга или невропатическая боль.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, антимикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, изолирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают инъекцию хлорида натрия, инъекцию Рингера, инъекцию изотонической декстрозы, инъекцию стерильной воды, инъекцию декстрозы и лактата Рингера. Неводные парентеральные носители включают жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Противомикробные агенты в бактериостатических или фунгиста-

тических концентрациях могут быть добавлены к парентеральным препаратам, упакованным в контейнеры с несколькими дозами, которые включают фенолы или крезолы, ртутные соединения, бензиловый спирт, эфиры хлорбутанола, метил и пропил п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают гидрoхлорид прокаина. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают Полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвестрирующий или хелатообразующий агент ионов металлов включает ЭДТА. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой носителей и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

Фармацевтическая композиция может быть составлена для любого пути введения субъекту. Конкретные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, парентеральный, интратекальный, интрацеребровентрикулярный, легочный, подкожный или интравентрикулярный. Парентеральное введение, характеризующееся либо подкожной, внутримышечной, либо внутривенной инъекцией, также рассматривается в данном документе. Инъецируемые препараты могут быть приготовлены в обычных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для раствора или суспензии в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Инъецируемые вещества, растворы и эмульсии также содержат один или несколько наполнителей. Подходящими наполнителями являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, при желании, фармацевтические композиции для введения могут также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие агенты, такие как, например, натрий ацетат, сорбитанмонолаурат, триэтаноламин олеат и циклодекстрины.

Препараты для парентерального введения антитела включают стерильные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к объединению с растворителем непосредственно перед использованием, включая таблетки для подкожных инъекций, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к использованию вместе с носителем непосредственно перед использованием и стерильными эмульсиями. Растворы могут быть водными или неводными.

При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический солевой раствор или физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS) и растворы, содержащие загущающие и солюбилизующие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, и их смеси.

Смеси для местного применения, содержащие антитело, получают, как описано для местного и системного введения. Полученная смесь может быть раствором, суспензией, эмульсией или т.п. и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, средств для орошения, спреев, суппозиторий, повязок, кожных пластырей или любых других составов, подходящих для местного применения. Антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в данном документе, могут быть приготовлены в виде аэрозоля для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США № 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описаны аэрозоли для доставки стероида, который используется для лечения воспалительных заболеваний, в частности астмы). Эти составы для введения в дыхательные пути могут быть в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или в виде мелкодисперсного порошка для инсуффляций, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы препарата в одном варианте осуществления имеют диаметры менее 50 мкм, в одном варианте осуществления менее 10 мкм.

Антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в данном документе, могут быть составлены для локального или местного применения, такого как местное нанесение на кожу и слизистые оболочки, такие как в глазу, в форме гелей, кремов и лосьонов и для применения для глаз или для внутрицистернального или внутриспинального применения. Местное введение предусматривается для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или слизистую оболочку или для ингаляционной терапии. Также могут вводиться назальные растворы антитела отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми наполнителями.

Трансдермальные пластыри, включая ионофоретические и электрофоретические устройства, хорошо известны специалистам в данной области и могут использоваться для введения антитела. Например, такие пластыри описаны в патентах США № 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5860957.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть, описанную в данном документе, является лиофилизированным порошком, который может быть восстановлен для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Он также может быть восстановлен и сформирован в виде твердых веществ или гелей. Лиофилизированный порошок получают путем растворения антитела или его антигенсвязывающей части, описанной в данном документе, или его фармацевтически приемлемого производного, в подходящем растворителе. В

некоторых вариантах осуществления лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать наполнитель, который улучшает стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, приготовленного из порошка. Вспомогательные вещества, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия, или другой такой буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном варианте осуществления, с приблизительно нейтральным pH. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области, дает желаемый состав. В одном варианте осуществления полученный раствор будет распределен во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лиофилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, например при температуре от приблизительно 4°C до комнатной температуры.

Восстановление этого лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает состав для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляется в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено опытным путем.

Антитела или их антигенсвязывающие части, биспецифическая молекула или иммуноконъюгат, описанные в данном документе, и другие композиции, представленные в данном документе, также могут быть составлены для нацеливания на конкретную ткань, рецептор или другую область тела субъекта, подлежащего лечению. Многие такие способы нацеливания хорошо известны специалистам в данной области. Все такие способы нацеливания рассматриваются в данном документе для использования в быстрорастворимых композициях. Для неограничивающих примеров способов нацеливания, см., например, патенты США № 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874. В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в данном документе, нацелены на лечение повреждения центральной нервной системы, дегенеративного заболевания головного мозга или невропатической боли.

Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации, например, через стерильные фильтрующие мембраны.

XII. Наборы.

В данном документе предусмотрены наборы, содержащие одно или несколько антител, описанных в данном документе, или их антигенсвязывающие части, биспецифических молекул или их иммуноконъюгатов. В конкретном варианте осуществления в данном документе предусмотрена фармацевтическая упаковка или набор, включающий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одно или несколько антител, предусмотренные в данном документе, или их антигенсвязывающая часть, обязательно инструкция для использования. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и любой профилактический или терапевтический агент, такой как описанные в данном документе.

XIII. Терапевтические применения и способы.

В одном аспекте в данном документе представлены способы смягчения травмы или повреждения ЦНС у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композиции.

В одном варианте осуществления в данном документе представлены способы для ингибирования, замедления, подавления, ограничения, уменьшения, устранения или предотвращения начала или инициации глиоза и связанных с ним пагубных эффектов на ЦНС у субъекта, включающие введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композиции. В одном варианте осуществления в данном документе представлены способы для ингибирования, замедления, подавления, ограничения, уменьшения, устранения или предотвращения избыточной или ненормальной пролиферации реактивных астроцитов и связанных с ним пагубных эффектов на ЦНС у субъекта, включающие введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композиции. В одном варианте осуществления в данном документе представлены способы для снижения, ингибирования или уменьшения экспрессии протеогликанов хондроитинсульфата (включая уровень нейрокана, NG2 или обоих) или уменьшения активности или приведения в состояние инактивации нейрокана, NG2 или обоих у субъекта, включающие введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композиции. В одном варианте осуществления в данном документе представлены способы для стимулирования, способствования, увеличения или активации роста нейронов, предпочтительно после травмы или повреждения у субъекта, включающие введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молеку-

лы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композиции. В одном варианте осуществления в данном документе представлены способы для повышения уровня мРНК c-fos, белка c-fos или активности белка c-fos и повышения уровня мРНК ERK, белка ERK или активности pERK, предпочтительно в ядрах нейронов, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композиции. В одном варианте осуществления, в данном документе представлены способы для повышения или увеличения уровня мРНК GAP43, белка GAP43 или увеличения активности белка GAP43, предпочтительно в нейронах у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композиции. В одном варианте осуществления в данном документе представлены способы для повышения или способствования выживанию нейронов и/или способствования отрастанию аксона у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композиции. В одном варианте осуществления субъект является человеком, предпочтительно человеком с травмой или повреждением нейрона, например, из повреждения ЦНС, травмы, поражения, повреждения спинномозгового мозга, опухоли головного мозга, инфекции, ишемии, инсульта, аутоиммунных ответов и/или нейродегенеративных заболеваний.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены способы для лечения заболевания или нарушения, включая повреждение центральной нервной системы, повреждение спинномозговой системы, дегенеративное нарушение головного мозга, дегенеративное цереброспинальное или нервное нарушение или невропатическую боль у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композицию. В одном варианте осуществления повреждением центральной нервной системы является черепно-мозговая травма, повреждение спинного мозга, инсульт, опухоль головного мозга (например, глиома или глиобластома) или их комбинация. В одном варианте осуществления дегенеративным нарушением головного мозга является болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз (ALS) или их комбинации. Таким образом, в одном варианте осуществления в данном документе описан способ для лечения черепно-мозговой травмы, повреждения спинного мозга, инсульта, опухоли головного мозга (например, глиомы или глиобластомы) или их комбинации у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композицию.

В одном варианте осуществления в данном документе описан способ для лечения болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза, ALS у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, или их композицию. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения опухоли мозга, где способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела к FAM19A5 (например, того, которое описано в данном документе). В определенных вариантах осуществления опухоль мозга является глиомой или глиобластомой.

В некоторых вариантах осуществления введение антитела к FAM19A5 уменьшает рост опухоли (например, глиобластомы) по сравнению с контрольным состоянием (например, соответствующим значением у субъекта, который не получил антитело к FAM19A5). В определенных вариантах осуществления рост опухоли (например, объем опухоли или вес) уменьшен по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90 или 100% по сравнению с контрольным состоянием (например, соответствующим значением у субъекта, который не получил антитело к FAM19A5).

В некоторых вариантах осуществления введение антитела к FAM19A5 способствует нормализации кровеносных сосудов в опухоли (например, глиобластома). В определенных вариантах осуществления нормализация кровеносных сосудов включает (i) увеличенное количество кровеносных сосудов, (ii) улучшенную структуру кровеносных сосудов, (iii) пониженную проницаемость кровеносных сосудов, (iv) увеличенную скорость кровотока или (v) любые их комбинации. В определенных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, увеличивают количество кровеносных сосудов (с увеличенной толщиной и улучшенным сообщением), которые распространяются в опухоли, по меньшей мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% или более.

В некоторых вариантах осуществления введение антитела к FAM19A5 увеличивает инфильтрацию иммунной клетки в опухоль (например, глиобластома). В некоторых вариантах осуществления инфильтрация иммунных клеток в опухоль увеличивается по меньшей мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% или более по сравнению с контрольным состоянием (например, количество иммунных клеток,

присутствующих в опухоли, которая не подвергалась воздействию антитела к FAM19A5). В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки включают макрофаги, дендритные клетки, микроглию и Т-лимфоциты. В дополнительных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, увеличивают клеточный объем иммунных клеток, присутствующих в опухоли. В некоторых вариантах осуществления клеточный объем иммунных клеток увеличивается по меньшей мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% или более по сравнению с контрольным состоянием (например, объем иммунных клеток, присутствующих в опухоли, которая не подвергалась воздействию антитела к FAM19A5).

В некоторых вариантах осуществления введение антитела к FAM19A5 (например, описанных в данном документе) увеличивает выживаемость субъекта с опухолью (например, опухоль головного мозга). В некоторых вариантах осуществления выживаемость увеличивается по меньшей мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% или более по сравнению с контрольным состоянием (например, соответствующим значением у субъекта, который не получил антитело к FAM19A5). В некоторых вариантах осуществления выживание увеличивается, по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней, 2, 3, 4 недели, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев, 2, 3, 4 года или 5 лет или более.

В некоторых вариантах осуществления опухоль головного мозга (например, глиобластома), которую можно лечить с помощью настоящих способов, может быть метастатической, неоперабельной, невосприимчивой к предшествующей раковой терапии. В определенных вариантах осуществления предшествующая раковая терапия включает химиотерапию. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает терапию на основе платины. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе платины включает противоопухолевый препарат на основе платины, выбранный из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, недаплатина, тетранитрата триплатина, фенантриплатина, пикоплатина, сатраплатина и любой их комбинации. В определенных вариантах осуществления терапия на основе платины включает цисплатин. В дополнительных вариантах осуществления терапия на основе платины включает карбоплатин. В некоторых вариантах осуществления предшествующая терапия рака включает иммунотерапию (например, антитело к PD-1).

В некоторых вариантах осуществления антитела к FAM19A5, подходящие для предлагаемых способов (например, для лечения опухоли головного мозга, например, глиобластомы), можно вводить в комбинации с другими соединениями, лекарственными средствами и/или агентами, используемыми для лечения рака. Такие соединения, лекарственные средства и/или агенты могут включать, например, химиотерапевтические лекарственные средства, низкомолекулярные лекарственные средства или антитела, которые стимулируют иммунный ответ на данный рак. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, используются в комбинации со стандартным лечением (например, хирургическим вмешательством, облучением и химиотерапией). В других вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, используются в качестве поддерживающей терапии, например терапии, предназначенной для предотвращения возникновения или рецидива опухолей.

В некоторых вариантах осуществления антитела к FAM19A5, используемые для настоящего изобретения, могут быть объединены более чем с одним иммуноонкологическим агентом и могут быть, например, объединены с комбинаторным подходом, который нацелен на множественные элементы иммунного пути, такие как один или несколько из следующих: терапия, которая усиливает презентацию опухолевого антигена (например, вакцина из дендритных клеток, клеточные вакцины, секретирующие GM-CSF, олигонуклеотиды CpG, имиквимод); терапия, которая ингибирует отрицательную иммунную регуляцию, например, путем ингибирования пути CTLA-4 и/или PD1/PD-L1/PD-L2 и/или истощения или блокирования Tregs или других иммуносупрессирующих клеток (например, миелоидных клеток-супрессоров); терапия, которая стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, с помощью агонистов, которые стимулируют путь CD-137, OX-40 и/или CD40 или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; терапия, которая системно увеличивает частоту противоопухолевых Т-клеток; терапия, которая истощает или ингибирует Tregs, такие как Tregs в опухоли, например, с использованием антагониста CD25 (например, даклизумаба) или путем истощения анти-CD25 гранул *ex vivo*; терапия, которая влияет на функцию супрессорных миелоидных клеток в опухоли; терапия, которая усиливает иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины); перенос адоптивных Т-клеток или НК-клеток, включая генетически модифицированные клетки, например клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами (терапия CAR-T); терапия, которая ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтетаза оксида азота; терапия, которая устраняет/предотвращает энергию или истощение Т-клеток; терапия, которая вызывает врожденную иммунную активацию и/или воспаление в месте опухоли; введение иммуностимулирующих цитокинов или блокирование иммуно репрессивных цитокинов. В некоторых случаях дополнительный противораковый агент, который можно комбинировать с антителами к FAM19A5, которые используются для описания, может включать, но не ограничивается этим, одно или несколько антител к CTLA-4, антител к PD-1, антител к PD-L1, антител к OX40 (также известное как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGPI1), антител к CD137, антител к LAG-3, антител к GITR или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления антитела к FAM19A5, описанные в данном документе,

могут лечить, уменьшать, устранять, предотвращать, ослаблять, контролировать или ингибировать фиброз у субъекта, нуждающегося в этом, включая антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающую часть. В одном варианте осуществления фиброз является доброкачественным (т.е. не вызывает симптомов). В другом варианте осуществления фиброз связан с патологическим состоянием, которое может быть или не быть обратимым. В некоторых вариантах осуществления фиброз выбран из группы, состоящей из фиброза печени, фиброза легких, почечного фиброза, миелофиброза, фиброза поджелудочной железы, фиброза кожи, фиброза миокарда, фиброза артерий, артрофиброза, фиброза молочных желез, мышечного фиброза, забрюшинного фиброза, фиброза щитовидной железы, фиброза лимфатических узлов, фиброза мочевого пузыря и фиброза плевры. В одном варианте осуществления фиброз является фиброзом печени или фиброзом легких. В другом варианте осуществления фиброз связан с опухолью, вызванной раком, таким как рак печени, рак легких, рак почек, рак молочной железы, рак головного мозга и/или рак поджелудочной железы. В одном варианте осуществления способ уменьшает, устраняет, облегчает, улучшает, ингибирует, или замедляет, или предотвращает фиброз, симптом, связанный с фиброзом, выраженную причину фиброза или их комбинацию.

В других вариантах осуществления антитела к FAM19A5, описанные в данном документе, могут лечить, уменьшать, устранять, предотвращать, ослаблять, контролировать или ингибировать заболевание или нарушение, связанное с фиброзом, у субъекта, нуждающегося в этом, включая антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающую часть.

Термин "фиброз, связанный с заболеванием или нарушением" относится к фиброзу, который сопровождает заболевание или нарушение или вызван или возникающий вследствие заболевания или нарушения. Термин включает фиброз, возникающий вследствие или вызванный заболеванием или нарушением, описанным выше, или фиброз, сопровождающий заболевание или нарушение.

В еще других вариантах осуществления антитела к FAM19A5, описанные в данном документе, могут лечить, уменьшать, устранять, предотвращать, задерживать, улучшать, контролировать или ингибировать рак печени, рак легких, рак почек, рак молочной железы, рак головного мозга (например, глиому или глиобластому) и/или рак поджелудочной железы у субъекта, нуждающегося в этом, включая введение субъекту антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части. В некоторых вариантах осуществления рак печени, рак легких, рак почек, рак молочной железы, рак головного мозга и/или рак поджелудочной железы связан с или вызван фиброзом. В некоторых вариантах осуществления опухоль мозга является глиомой или глиобластомой.

В некоторых вариантах осуществления вводят терапевтически эффективное количество антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающую часть, биспецифическую молекулу или иммуноконъюгат, описанные в данном документе. При лечении субъекта (например, человека) терапевтически эффективное количество антитела к FAM19A5 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе, зависит от таких факторов, как возраст, пол, степень заболевания. Обычно антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающую часть, биспецифическую молекулу или иммуноконъюгат, описанные в данном документе, вводят в дозе между 0,01 мкг и 1000 мг в день.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающую часть, биспецифическую молекулу или иммуноконъюгат или их композицию, описанные в данном документе, вводят внутривенно, перорально, парентерально, трансстекально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, легочно, подкожно или интравентрикулярно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающую часть или его композицию можно вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными агентами для лечения фиброза (например, пирфенидоном (ESBRIET®) или нинтеданибом (OFEV®) для идиопатического фиброза легких). Доза и введение одного или нескольких дополнительных терапевтических лекарственных средств известны в данной области, например, как указано на этикетке соответствующего лекарственного средства.

В некоторых вариантах осуществления антитело к FAM19A5 или его антигенсвязывающую часть или их композицию могут вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными агентами для лечения повреждения центральной нервной системы (например, черепно-мозговой травмы, повреждения спинного мозга, инсульта или опухоли головного мозга (например, глиомы или глиобластомы)), повреждения спинномозговой системы, дегенеративного нарушения головного мозга (например, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза, ALS), дегенеративного цереброспинального или нервного нарушения или невропатической боли. Например, неограничивающие типичные агенты для лечения болезни Хантингтона включают тетрабеназин (XENAZINE®), антипсихотические лекарственные средства, такие как галоперидол (HALDOL®), хлорпромазин, рисперидон (RISPERDAL®) и кветиапин (SEROQUEL®).

Неограничивающие типичные агенты для лечения болезни Паркинсона включают леводопу (с или без карбидопы), агонисты допамина, такие как прамипексол (MIRAPEX®), ропинирол (REQUIP®), и ротиготин (NEUPRO®), и апоморфин (APOKYN®), селегилин ELDEPRYL® и ZELAPAR®, разагилин

(AZILECT®), энтакапон (COMTAN®), бензтропин (COGENTIN®), тригексифенидил и амантадин.

Неограничивающие типичные агенты для лечения болезни Альцгеймера включают донепезил (ARICEPT®), галантамин (RAZADYNE®) и ривастигмин (EXELON®).

Неограничивающие типичные агенты для лечения рассеянного склероза включают ацетат глатирамера (COPAXONE®), диметилфумарат (TECFIDERA®), финголимод (GILENYA®), терифлуномид (AUBAGIO®), натализумаб (TYSABRI®), алемтузумаб (LEMTREMA®) и митоксантрон.

Неограничивающие типичные агенты для лечения ALS включают рилузол (RILUTEK®).

Доза и введение одного или нескольких дополнительных терапевтических лекарственных средств известны в данной области, например, как указано на этикетке продукта соответствующего лекарственного средства.

Следующие примеры предложены в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

Примеры

Экспериментальные методы и детали приведены в следующих примерах.

Пример 1. Экспрессия и очистка человеческого белка FAM19A5.

Был получен и очищен рекомбинантный человеческий белок FAM19A5, и очищенный белок был использован в скрининговом анализе антител, основанном на анализе аффинности связывания. Сначала плазмиду LPS-hT, содержащую ген FAM19A5, трансформировали в бактерии и индуцировали избыточную экспрессию белка. После получения белок FAM19A5 очищали с использованием аффинной хроматографии Ni-NTA (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США). Используя постепенно более высокую концентрацию имидазола, удалили His-меченый белок FAM19A5 из Ni-колонок. Экспрессию белка в растворе измеряли с использованием красителя Кумасси бриллиантовый синий R-250. Взяв только раствор, содержащий имидазол FAM19A5, сконцентрировали белок FAM19A5, используя PBS. Когда концентрация была доведена, чистоту и концентрацию белка FAM19A5 измеряли с использованием вестерн-блот анализа. Затем концентрированный белок использовали для скрининга антител, специфичных к FAM19A5.

Пример 2. Получение библиотек антитела FAM19A5.

Компоненты клеточной стенки TDW и CWS, содержащие эмульсионный адъювант типа вода-в-масле (адъювант RIBI+MPL+TDM+ CWS, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США), эмульгировали, затем подкожно инъецировали трем цыплятам. Цыплят иммунизировали в целом три раза с интервалом приблизительно 2-3 недели между иммунизацией. Титр антител, полученных от иммунизированных цыплят, измеряли иммуноблоттингом с использованием лизатов клеток НЕК293Т, которые сверхэкспрессировали белок FAM19A5.

Библиотека одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) была получена из иммунизированного цыпленка с использованием реагента TRI (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), экстрагировали РНК из селезенки, костного мозга и синовиального мешка иммунизированных цыплят, описанных выше. Для синтеза первой цепи кДНК использовали праймеры Oligo-dT и систему синтеза первой цепи SUPERSCRIPT™ III (Invitrogen). Для кДНК, полученной из иммунной системы цыплят, использовали Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Systems, Индиана, США) для получения библиотеки одноцепочечных варибельных областей. В каждой реакции 1 мкл кДНК, 60 пмоль каждого праймера, 10 мкл 10× реакционного буферного раствора, 8 мкл 2,5 мМ dNTP (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) и 0,5 мкл ДНК-полимеразы Taq смешивали с водой. Конечный объем составлял 100 мкл. Реакцию ПЦР проводили с использованием следующих условий: 30 циклов: (i) 15 с при 94°C, (ii) 30 с при 56°C и (iii) 90 с при 72°C с последующим окончательным удлинением в течение 10 мин при 72°C. Продукты ПЦР, содержащие фрагмент длиной приблизительно 350 п.н., загружали в 1,5% агарозный гель и после электрофореза использовали QIAGEN Gel II Extraction Kit (QIAGEN, Валенсия, Калифорния, США) для очистки нуклеотидного фрагмента. Очищенный продукт ПЦР определяли количественно, считывая при OD 260 нм (1 единица OD = 50 мкг/мл).

Два первых продукта VH и VL из второй ПЦР были случайным образом связаны с помощью ПЦР с перекрывающимся удлинением цепи (Overlap extension PCR). Каждую реакцию ПЦР смешивали с 100 нг очищенных продуктов VL и VH, 60 пмоль каждого праймера, 10 мкл 10× реакционного буфера, 8 мкл 2,5 мМ dNTP, 0,5 мкл Taq ДНК-полимеразы и воду в конечном объеме 100 мкл. ПЦР проводили с использованием следующих условий: 25 циклов: (i) 15 с при 94°C, (ii) 30 с при 56°C и (iii) 2 мин при 72°C с последующим окончательным удлинением в течение 10 мин при 72°C. Продукты ПЦР, содержащие фрагмент одноцепочечной варибельной области длиной приблизительно 700 п.н., загружали в 1,5% агарозный гель и после электрофореза использовали QIAGEN Gel II Extraction Kit (QIAGEN) для очистки нуклеотидного фрагмента. Очищенный продукт ПЦР определяли количественно, считывая при OD 260 нм (1 единица OD = 50 мкг/мл).

Фрагмент scFv продукта ПЦР и вектор pComb3X-SS (The Scripps Research Institute, Калифорния, США) расщепляли рестриктазой Sfi. 10 мкг очищенного перекрывающегося продукта ПЦР смешивали с 360 единицами Sfi I (1 мкг ДНК на 16 единиц, Roche Molecular Systems, Плезантон, Калифорния, США), 20 мкл 10× реакционного буфера и водой до конечного объема 200 мкл. 20 мкг вектора pComb3X-SS смешивали с 120 единицами Sfi I (1 мкг ДНК на 6 единиц), 20 мкл 10× реакционного буферного раствора

и водой до конечного объема 200 мкл. Смесь подвергали расщеплению при 50°C в течение 8 ч. После этого расщепленный продукт, содержащий фрагмент scFv (приблизительно 700 п.н.) и вектор (приблизительно 3400 п.н.), загружали в 1% агарозный гель и очищали с использованием QIAGEN Gel II Extraction Kit (QIAGEN, Валенсия, Калифорния, США). 1400 нг Sfi-рестриктированного вектора pComb3X и 700 нг расщепленных фрагментов scFv смешивали с 5-кратным лигазным буфером, 10 мкл ДНК-лигазы T4 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) и водой до конечного объема 200 мкл. Смесь инкубировали при 16°C в течение 16 ч для осуществления лигирования.

После осаждения этанолом осадок ДНК растворяли в 15 мкл воды. Для получения библиотеки образец лигирования трансформировали в штамм E.coli ER2738 (New England Biolabs Inc, Хитчин, Хартфордшир, SG4 ОТУ, Англия, Великобритания) посредством электропорации с использованием вибратора для генов (Gene pulser: Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США). Клетки смешивали в 5 мл среды Super Broth (SB) и инкубировали при перемешивании со скоростью 250 об/мин в течение 1 ч при 37°C. Затем 3 мкл канамицина концентрацией 100 мг/мл добавляли к 10 мл среды SB. Для определения размера библиотеки 0,1, 1 и 10 мкл образцов культуры намазывали на чашки с агаром Luria Broth (LB), содержащие 50 мкг/мл канамицина. После перемешивания в течение 1 ч к культуре LB добавляли 4,5 мкл 100 мг/мл канамицина и дополнительно перемешивали в течение дополнительного 1 ч. Затем к среде LB добавляли 2 мл фага-помощника VCM13 в воде ($>10^{11}$ КОЕ/мл) вместе с предварительно нагретым LB (183 мл), содержащим 92,5 мкл 100 мг/мл канамицина. Эту смесь перемешивали при 250 об/мин при 37°C в течение дополнительных 2 ч. Затем к культуре добавляли 280 мкл (50 мг/мл) канамицина и перемешивали в течение ночи при 37°C. На следующий день осадок бактерий центрифугировали с использованием высокоскоростной центрифуги (Beckman, ротор JA-10) при 3000g, 4°C. После этого бактериальный осадок использовали для экстракции фагмидной ДНК, а супернатант переносили в стерильные флаконы для центрифугирования. Затем 8 г полиэтиленгликоля-8000 (PEG-8000, Sigma) и 6 г хлорида натрия (NaCl, Merck) добавляли к супернатанту и затем выдерживали в течение 30 мин на льду. После этого супернатант центрифугировали 15 мин при 15000g, 4°C. Супернатант затем отбрасывали, а осадок фага с Tris, содержащим 1% BSA - репродукцию, суспендировали в забуференном солевом растворе (TBS).

Пример 3. Библиотека панорамирования (биопаннинг) на иммобилизованном антигене.

Биопаннинг проводили с использованием магнитных гранул (Dynabeads M - 270 Epoxy, Invitrogen). При комнатной температуре приблизительно 1×10^7 гранул покрывали 5 мкг рекомбинантного белка FAM19A5 путем перемешивания при вращении гранул и белка вместе в течение 20 ч при комнатной температуре. После нанесения покрытия гранулы промывали 4 раза физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) и блокировали в течение 1 ч в PBS, содержащем 3% BSA, при комнатной температуре. Затем покрытые гранулы культивировали в течение 2 ч при комнатной температуре с scFv после фагового дисплея как описано выше. Для удаления любого фага, который не был связан с покрытыми антигеном гранулами, гранулы промывали 0,05% Tween20/PBS. Затем связанные фаги элюировали с 50 мкл 0,1 М глицина/хлористого водорода (0,1 М глицин-HCl, pH 2,2) и нейтрализовали с 3 мкл 2 М Tris с хлористым водородом (Tris-HCl, pH 9,1). Эти супернатанты, содержащие фаг, использовали для инфицирования клеток E.coli ER2738, а фаг-помощник VCSM13 использовали для амплификации и восстановления в течение ночи. Кроме того, блоттингом культур, зараженных фагом, на чашках с LB-агаром, содержащих 50 мкг/мл канамицина, определяли ввод (ввод) и продуцирование (выход) титрами фагов из культур, зараженных фагом. На следующий день для осаждения фагов, которые впоследствии использовались для биопаннинга, применяли PEG-8000 и NaCl. Биопаннинг выполняли в целом до пяти раз, повторяя вышеописанный процесс. При каждой амплификации фаги подвергали скринингу и отбирали на высокое сродство к белку FAM19A5.

Пример 4. Отбор клона с помощью фагового ELISA.

Чтобы проанализировать клоны, выбранные из биопаннинга, случайным образом отобрали отдельные клоны из scFv после фагового дисплея и подтвердили с помощью ELISA, что клоны связываются с рекомбинантным белком FAM19A5. Рекомбинантный белок FAM19A5 разводили в 0,1 М NaHCO₃ буфере и 100 нг/лунку белка использовали для покрытия 96-луночных планшетов для микротитрования при 4°C в течение 16 ч. На следующий день планшеты блокировали 3% BSA/PBS при 37°C в течение 1 ч. Затем супернатант фага смешивали с 6% BSA/PBS и культивировали в течение 2 ч при 37°C. Планшеты, содержащие супернатант, затем промывали 0,05% Tween20/PBS. HRP-конъюгированное антитело M13 (a-M13-HRP, Pierce Chemical Co, Рокфорд, Иллинойс, США) разбавляли до 1/5000. 50 мкл разведенного антитела добавляли в планшеты и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После инкубации и промывания в планшеты добавляли 0,05 М цитратного буферного раствора, 1 мкг/мл 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS, Amresco, Солон, Огайо, США) и 0,1% H₂O₂ для формирования цвета. Поглощение для каждой лунки измеряли при 405 нм.

Затем были проанализированы 24 клона, которые связываются с рекомбинантным белком FAM19A5 и демонстрируют высокую абсорбцию, а из них были получены 13 клонов scFv, имеющих уникальные последовательности. После дальнейшего отбора были получены клоны 2-13, 1-28 и 3-2.

Пример 5. Получение антитела к FAM19A5-IgG2/4.

Анти-FAM19A5 scFv субклонировали в вектор экспрессии млекопитающего. В последовательности гена scFv FAM19A5 ген С_к человека был присоединен к варибельному домену легкой цепи, а изотип иммуноглобулина человека IgG2/4 генов С_{H1}, С_{H2} и С_{H3} был связан с варибельной областью тяжелой цепи. Антитело, имеющее каждую легкую цепь и каждую тяжелую цепь, синтезировали путем добавления сайтов рестрикции (Genscript, США). Синтезированный ген встраивали в вектор экспрессии клеток млекопитающих, имеющий модифицированный сайт рестрикции для облегчения клонирования. Сначала ген легкой цепи встраивали в вектор с использованием рестрикционных ферментов Hind III и Xba I (New England Biolabs, Великобритания), а затем добавляли ген тяжелой цепи к вектору с использованием рестрикционных ферментов NheI и BamHI (New England Biolabs, Великобритания).

Для экспрессии и очистки антитела к FAM19A5-IgG2/4 использовали инъекционную систему для трансфекции и сверхэкспрессии в клетках млекопитающих. Смешали 2 мкг/мл вектора экспрессии млекопитающих с 4 мкг полиэтиленimina (PEI, Polysciences, Уоррингтон, Пенсильвания, США) в 150 мМ хлорида натрия (NaCl, Merck), что соответствует 1/10 объема клеточной культуры. Смесь оставляли на 15 мин при комнатной температуре. Смесь добавляли к клеткам HEK293F (2×10⁶ клеток/мл, Invitrogen), которые затем инкубировали в культуральной среде для экспрессии FREESTYLE™ 293, содержащей 100U/мл пенициллина и стрептомицина (Invitrogen) при 7% CO₂ и 37°C и при перемешивании 135 об/мин в течение шести дней. Чтобы очистить экспрессированные антитела к FAM19A5 IgG2/4 от супернатанта клеточной культуры использовали аффинную гель-хроматографию на гранулах белка А (RepliGen, Уолтем, Массачусетс, США). Хроматографию на белке А проводили с помощью гель-электрофореза с градиентом Bis-Tris 4-12%. Размер и выход белка были подтверждены окрашиванием кумасси бриллиантовым синим.

Пример 6. Анализ картирования эпитопа с использованием фрагментов эпитопа FAM19A5 F1-F6.

Перекрывающиеся пептидные фрагменты (F1-F6, см. фиг. 1) белка FAM19A5 человека синтезировали и конъюгировали с BSA. Связывание различных антител к FAM19A5 с BSA-конъюгированными пептидными фрагментами F1-F6 определяли анализом ELISA. Вкратце, фрагмент FAM19A5 F1-F6 (разбавленный до 1 мкг/мл в 50 мМ карбонатном буфере (Biosesang) или до 20 мкг/мл для анализа с высокой концентрацией) использовали для покрытия лунок 96-луночных иммунопланшетов (Thermo Scientific) (100 мкл/лунку) в течение ночи при 4°C, а затем дважды промывали в 1× PBS. Затем планшеты блокировали блокирующим буфером (100 мкл/лунку) в течение 1 ч при комнатной температуре. В течение 1-часовой инкубации соответствующие антитела к FAM19A5 разводили до 1 мкг/мл (или 20 мкг/мл для анализа высокой концентрации) в буфере для разбавителя. После того, как планшеты были промыты (2× с использованием 1× PBS), разбавленные антитела к FAM19A5 были добавлены в соответствующие лунки, и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем планшеты промывали в целом пять раз, используя промывочный буфер. Затем субстрат ODP (полученный путем растворения одной таблетки ODP (дигидрохлорида О-фенилендиамина, Thermo) в 9 мл стерилизованной деионизированной воды и 1 мл 10× стабильного буфера, устойчивого к перекиси (Thermo)), добавляли в каждую из лунок и реакции изменения цвета позволяли происходить в течение 10 мин. Эту реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2н. H₂SO₄ (Daejung) в лунки. Величину поглощения каждой из лунок определяли при 492 нм с использованием 96-луночного ридера для микропланшетов (Molecular Device).

Как показано на фиг. 2, антитело к FAM19A5 3-2 сильно связывалось с эпитопным фрагментом F2 с минимальным связыванием с другими фрагментами. Это также было верно для антитела к FAM19A5 1-28 (данные не показаны). Напротив, антитело 1-65 сильно связывается только с эпитопным фрагментом F5. Интересно, что антитело к FAM19A5 2-13, по-видимому, не связывалось ни с одним из фрагментов эпитопов F1-F6.

Затем, чтобы идентифицировать специфические аминокислотные остатки во фрагменте эпитопа F2, с которыми связываются антитела 3-2 и 1-28, различные аминокислотные остатки фрагмента F2 были заменены на аланин или валин, как показано в табл. 8. Мутированные остатки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Аффинность связывания указанных антител к FAM19A5 измеряли с использованием анализа ELISA, как описано выше.

Таблица 8

Мутантный пептид (#)	Последовательности
Дикий тип	TLDRDSSQPRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 6)
F2-01-BSA (#1)	T <u>A</u> DRDSSQPRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 73)
F2-02-BSA (#2)	TL <u>A</u> DRDSSQPRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 74)
F2-03-BSA (#3)	TLDR <u>A</u> SSQPRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 75)
F2-04-BSA (#4)	TLDRD <u>A</u> SQPRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 76)
F2-05-BSA (#5)	TLDRDS <u>A</u> QPRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 77)

F2-06-BSA (#6)	TLDRDSS <u>A</u> PRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 78)
F2-07-BSA (#7)	TLDRDSSQ <u>A</u> RRRTIARQTARC (SEQ ID NO: 79)
F2-08-BSA (#8)	TLDRDSSQPR <u>A</u> TIARQTARC (SEQ ID NO: 80)
F2-09-BSA (#9)	TLDRDSSQPRR <u>A</u> IARQTARC (SEQ ID NO: 81)
F2-10-BSA (#10)	TLDRDSSQPRRT <u>A</u> ARQTARC (SEQ ID NO: 82)
F2-11-BSA (#11)	TLDRDSSQPRRTI <u>R</u> RQTARC (SEQ ID NO: 83)
F2-12-BSA (#12)	TLDRDSSQPRRTIA <u>A</u> QTARC (SEQ ID NO: 84)
F2-13-BSA (#13)	TLDRDSSQPRRTIARQT <u>V</u> RC (SEQ ID NO: 85)

Как показано на фиг. 3А и 3В, антитело 3-2 сильно связывается с мутантными пептидными фрагментами F2 # 1,2, 4-6 и 9-13 с уменьшенным связыванием с фрагментами # 3, 7 и 8. Эти последние три мутантных пептидных фрагмента F2 содержат замену аланина в аминокислотных остатках D5, P9 и R11 (нумерация согласно SEQ ID NO: 6 в табл. 8) соответственно, предполагая, что антитело 3-2 связывается с FAM19A5 в основном с этими аминокислотными остатками.

Что касается антитела 1-28, оно сильно связывалось с мутантными пептидными фрагментами F2 # 1, 2, 6 и 8-13, тогда как с пептидными фрагментами # 3, 4, 5 и 7 антитело 1-28 демонстрировало значительное снижение связывания. См. фиг. 3С. Эти данные свидетельствуют о том, что антитело к FAM19A5 1-28 связывается с FAM19A5 преимущественно в аминокислотных остатках D5, S6, S7 и P9 (нумерация согласно SEQ ID NO: 6 в табл. 8) в пределах фрагмента эпитопа F2.

Пример 7. Анализ картирования эпитопа с использованием мутантов FAM19A5M1-M8.

Чтобы дополнительно охарактеризовать эпитопы связывания антител к FAM19A5, описанных в данном документе, аминокислотные последовательности для различных членов семейства FAM19 (т.е. FAM19A1-5) были выровнены, как показано на фиг. 4. На основе этого выравнивания были идентифицированы восемь областей, где аминокислотные последовательности белка FAM19A5 наиболее значительно отличались от других членов семейства FAM19A (т.е. FAM19A1-4) (M1-M8). Аминокислотные последовательности этих областей были заменены консенсусной последовательностью соответствующих областей для белков FAM19A1-4. См. табл. 8 (мутированные аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты).

Мутантные FAM19A5-экспрессирующие фаги получали следующим образом. Для приготовления среды для культивирования фагов 55,6 мл 2 М глюкозы (D-(+)-глюкоза, Sigma), 5 мл 1 М MgCl₂ (хлорид магния, Junsei) 1 мл 34 мг/мл хлорамфеникола (Sigma) добавляли к среде 2xYT. Колонии, полученные с помощью монофагового ELISA, отбирали и помещали в 5 мл подготовленной среды (2xYT-GMC) для культивирования в течение 16 ч при 37°C в инкубаторе со встряхиванием (VS-8480, Vision). 100 мкл каждой культуры переносили в 10 мл 2xYT-GMC по отдельности, которые культивировали при 37°C в инкубаторе до момента, когда значения обнаружения при OD 600 нм достигало 0,5. Как только значение обнаружения достигло 0,5 при OD 600 нм, 5 мл каждой культуры получали в качестве образцов для заражения. После приготовления образцов к отдельным образцам добавляли 50 мкл фага-помощника M1, затем инкубировали при 37°C без встряхивания в течение 30 мин и со встряхиванием в течение дополнительных 30 мин. Отдельные культуры центрифугировали в течение 15 мин при 3850 об/мин с использованием микроцентрифуги (Micro12, Hanil). Супернатанты центрифугированных культур удаляли для разделения и заменяли 5 мл среды 2xYT, содержащей 1 мл 1 М IPTG (AG Scientific), 5 мл 1 М MgCl₂, 1 мл 70 мкг/мл канамицина (Biopure) и 1 мл хлорамфеникола. Полученный осадок тщательно диспергировали во вновь добавленной среде с последующей инкубацией при 30°C в течение 16 ч при перемешивании.

Таблица 9

FA M19 A5	Последовательности
Дик ий тип	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GRIKTTTVS (SEQ ID NO: 86)
M1	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TTRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 87)
M2	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TTRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 88)
M3	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GRIKTTTVS (SEQ ID NO: 51)
M4	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GRIKTTTVS (SEQ ID NO: 52)
M5	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GRIKTTTVS (SEQ ID NO: 53)
M6	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 54)
M7	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 55)
M8	QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARACACRKGQIAGT TRARPACVDARIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCTQPG GGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 56)

Как показано на фиг. 5, антителам к FAM19A5 1-28 и 3-2 не удалось связаться с мутантом FAM19A5 M2. Как показано в табл. 8, мутант M2 имеет замены в аминокислотных остатках 21-25 (т.е. эпитоп EP2), которые соответствуют области внутри фрагмента эпитопа F2 FAM19A5. Это согласуется с более ранними данными из примера 7 и подтверждает важность фрагмента эпитопа F2 для связывания антител 1-28 и 3-2 с FAM19A5.

Что касается антитела 2-13, то оно, по-видимому, связывается с FAM19A5 в эпитопах, которые полностью отличаются от антител 1-28, 3-2 и 1-65. Как показано на фиг. 5, антитело к FAM19A5 2-13 имело умеренное или высокое связывание с мутантами FAM19A5 M1-M3 и M5-M7, но не связывалось с мутантами M4 и M8, что указывает на важность эпитопов EP4 и EP8 в связывании антител 2-13 с FAM19A5. Принимая во внимание, что антитело 2-13, по-видимому, не связывается ни с одним из фрагментов эпитопа FAM19A5 из примера 7 (см. фиг. 2), эти данные также свидетельствуют о том, что антитело 2-13 имеет конформационный эпитоп в противовес линейному эпитопу.

Пример 8. Анализ конкурентности.

Затем использовали двухсайтовый сэндвич-ELISA, как описано ниже, чтобы оценить, конкурируют ли друг с другом разные антитела к FAM19A5 с аналогичным связыванием эпитопов, см. фиг. 6A.

Сначала указанные антитела к FAM19A5 разводили в 1× PBS до концентрации 10 мкг/мл. Разведенные антитела к FAM19A5 (10 мкг/мл в 1× PBS) ("захватывающее антитело") использовали для покрытия 96-луночных планшетов (100 мкл/лунка) при 37°C в течение приблизительно 1 ч. После инкубации планшеты промывали промывочным буфером (0,01% Tween-20/PBS; также называемый 0,01% PBST) в целом пятью промывками, блокировали блокирующим раствором (5% BSA/PBS; также называемый 5% PBSA) (250 мкл/лунку) в течение 1 ч при 37°C, а затем снова промывали. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкг/мл антигена FAM19A5 (разведенного в PBS, содержащем 5% BSA, 0,01% Tween-20; также называемого 5% PBSAT; "буфер-разбавитель"), и 96-луночные планшеты были инкубированы в течение 2 ч при 37°C. После инкубации планшеты промывали с использованием 0,01% PBST в целом пятью промывками. После последней промывки указанные биотинилированные антитела к

FAM19A5 ("детектирующее антитело") (разведенные до 1 мкг/мл в 5% PBSAT) добавляли в соответствующие лунки (объем 100 мкл) и планшеты инкубировали в течение дополнительного 1 ч при 37°C. После этого планшеты снова промывали 0,01% PBST (пять полных промываний). Затем в лунки добавляли 100 мкл разведенного (1/2000 в 5% PBSAT) стрептавидина-HRP (1 мг/мл, Sigma, США) и планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем планшеты промывали и обрабатывали 100 мкл субстрата ТМВ (3,3 чашки затем промывали и обрабатывали 100 мкл раствора, Thermo Fisher Scientific). После дополнительной 30-минутной инкубации при комнатной температуре реакцию изменения цвета индуцировали добавлением субстрата ТМВ. Эту реакцию останавливали, используя 50 мкл серной кислоты (2н. H₂SO₄) и определяли степень изменения цвета по поглощению при 450 нм с эталонной длиной волны при 620 нм с использованием ридера 96-луночных микропланшетов (Molecular Device).

Как показано на фиг. 6В, антитела к FAM19A5 1-65, P2-A03, P2-F11 и 13B4 все перекрестно конкурируют друг с другом. Подобно антителу 1-65, антитела P2-A03, P2-F11 и 13B4 все связываются с FAM19A5 в эпитопах M6, M7 и/или M8 (т.е. в пределах фрагментов эпитопа F5 и/или F6) (данные не показаны). Напротив, антитела 2-13 и 3-2 не вступали в перекрестную конкуренцию с другими антителами к FAM19A5, подтверждая более ранний анализ картирования эпитопов, который показал, что эти антитела связываются преимущественно с фрагментом эпитопа F2.

Пример 9. Анализ аффинности связывания.

Для определения аффинности связывания различных антител к FAM19A5 с FAM19A5 использовали анализ ELISA, как описано ранее (например, пример 6). Как показано на фиг. 7А и 7В, антитела 1-28, 3-2 и 1-65 связаны с FAM19A5 с аналогичной аффинностью связывания ($K_d = 0,17, 0,12$ и $0,10$ нМ соответственно). Антитело 2-13 связывалось со значением K_d приблизительно 2,77 нМ, см. фиг. 7В.

Пример 10. Анализ сыворотки при фиброзе печени.

Чтобы начать оценку *in vivo* функции антител к FAM19A5, описанных в данном документе, уровень белка FAM19A5 при фиброзе печени измеряли с использованием крысиной модели фиброза печени (т.е. индуцированного лигированием желчных протоков (BLD) фиброза печени Sprague-Dawley (SD) модель крысы). См. Kountouras et al., Br. J. Exp. Path. 65:305-311 (1984). Вкратце, животных обезболивали кетамином и ксилазином. Был сделан разрез по средней линии 1,5 см, общий желчный проток был локализован и дважды лигирован с 3-0 шелковыми лигатурами. Затем через 21 день после индукции фиброза печени у животных собирали цельную кровь и отделяли сыворотку от цельной крови.

Уровень белка FAM19A5 в сыворотке крови измеряли с помощью сэндвич-анализа FAM19A5 ELISA. 96-луночный планшет для ELISA покрывали в течение ночи 1 мкг/мл 1-65 человеческого антитела IgG1 к FAM19A5 в объеме 100 мкл. Затем планшет промывали PBS и затем блокировали 1% BSA в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшет снова промывали PBS и приблизительно 100 мкл стандарта и образец помещали в соответствующие лунки. Затем планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. После этого планшет промывали 0,05% PBS-Tween 20 (т.е. буфером для промывки) и приблизительно 100 мкл детектирующего антитела (конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела козьего а-кроличьего IgG (Santa Cruz, Cat # SC-2030), разведенного 1:5000 в 1% BSA в PBS) добавляли в лунки. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение еще 1 ч. После дополнительных промывок буфером для промывки в каждую лунку добавляли приблизительно 100 мкл субстрата О-фенилендиаминдигидрохлорида (OPD) и планшету давали проявиться при комнатной температуре. Примерно через 10 мин в лунки добавили приблизительно 100 мкл 1н. H₂SO₄ (серной кислоты), чтобы остановить реакцию. Абсорбцию сразу измеряли на длине волны 492 нм с использованием 96-луночного устройства для считывания MicroPlate (Molecular Device, Versa Max).

Как показано на фиг. 8, уровень белка FAM19A5 был более чем в 3 раза выше в сыворотке крыс SD-индуцированного фиброза печени ("модель заболевания") по сравнению с уровнем у нормальных (т.е. не индуцированных BDL) крыс.

Пример 11. Анализ сыворотки при фиброзе легких.

Чтобы оценить, увеличился ли уровень белка FAM19A5 также при фиброзе легких у 7-недельных самцов крыс SD, был вызван идиопатический легочный фиброз путем введения 3 мг/кг блеомицина посредством интратрахеальной инъекции. Через 24 дня после введения блеомицина у животных собирали цельную кровь и сыворотку отделяли от цельной крови. Уровень белка FAM19A5 в сыворотке крови измеряли с помощью сэндвич-анализа FAM19A5 ELISA, как показано в примере 10 выше. Как показано на фиг. 9, уровень белка FAM19A5 был более чем в 1,5 раза выше в сыворотке крыс SD с вызванным легочным фиброзом ("модель заболевания") по сравнению с таковым у нормальных (т.е. без идиопатического легочного фиброза) крыс.

Пример 12. Анализ сыворотки пациентов с фиброзом печени человека.

Уровни АСТ и/или АЛТ могут повышаться в сыворотке при повреждении гепатоцитов, и такое повышение часто предполагалось как повреждение печени. См. Gowda et al., Pan. Afr. Med. J. 3:17 (2009); Giannini et al., Arch. Intern. Med. 163:218-224 (2003). Однако, когда повреждение является серьезным (например, цирроз печени), уровни АСТ и АЛТ могут казаться нормальными. Поэтому, чтобы оценить, может ли экспрессия FAM19A5 быть лучшим индикатором повреждения печени, уровень белка FAM19A5

измеряли в сыворотке пациентов с подтвержденным циррозом печени с использованием сэндвич-анализа FAM19A5 ELISA.

Человеческое антитело IgG1 к FAM19A5 2-13 восстанавливали в концентрации 1 мкг/мл в 50 мМ карбонатном буфере (Bio-World, Cat. C2070-9.6, Lot. C70-9.616Z11C). Антитело к FAM19A5 затем добавляли в соотношении 1:1000 в PBS и затем использовали для покрытия 96-луночного планшета для ELISA в течение ночи. На следующий день планшет промывали PBS и затем блокировали 1% BSA в PBS при комнатной температуре в течение примерно 1 ч. После этого планшет снова промывали PBS и приблизительно 100 мкл стандартов и образцов помещали в соответствующие лунки. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. После этого планшет промывали 0,05% PBS-Tween 20 (т.е. промывочным буфером). Затем 3-2 мышинное антитело к FAM19A5 IgG2a (восстановленное в концентрации 1 мкг/мл) разводили в соотношении 1:2000 в 1% BSA в PBS. Приблизительно 100 мкл этого разбавленного антитела добавляли в каждую из лунок и планшет оставляли для инкубации в течение дополнительных 2 ч при комнатной температуре. После дополнительной промывки буфером для промывки приблизительно 100 мкл конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела IgG мыши-осла (Jackson Lab, Cat. 715-035-151, Lot. 122401) (разбавленного 1:5000 в 1% BSA в PBS) добавляли в лунки. Затем планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации планшет промывали промывочным буфером и приблизительно 100 мкл раствора субстрата 1-STEP™ Ultra TMB-ELISA (Pierce, Cat. 34028, Lot. QJ20436540) добавляли в каждую из лунок. После 10-минутной инкубации в лунки добавляли приблизительно 100 мкл 1N H₂SO₄ (серной кислоты), чтобы остановить реакцию. Абсорбцию сразу измеряли на длине волны 450 нМ с использованием 96-луночного устройства для считывания MicroPlate (Molecular Device, Versa Max).

Как показано на фиг. 10, пациенты с циррозом печени имели уровни белка FAM19A5, которые были примерно в 2-6 раз выше, чем уровни, наблюдаемые в сыворотке нормальных здоровых людей. Такие данные согласуются с исследованиями на животных, описанными выше, и указывают на то, что сывороточная концентрация белка FAM19A5 может быть идеальным диагностическим маркером цирроза печени.

Пример 13. Анализ влияния на инфаркт миокарда.

Гибель ишемических клеток, которая происходит во время инфаркта миокарда, приводит к репаративному ответу, при котором поврежденная ткань заменяется фиброзным рубцом. Затем следует ремоделирование окружающей ткани (например, истончение стенки левого желудочка и расширение камеры), что в конечном итоге приводит к нарушению сердечной функции. См. Talman et al., *Cell Tissue Res.* 365(3):563-581 (2016); Firth et al., *Cardiovasc. Drugs Ther.* 4:1363-1374 (1990). Для оценки влияния антитела к FAM19A5 на инфаркт миокарда использовали модель ишемической реперфузии у мышей. Вкратце, мышей Balb/cAnNCrljOri (6 недель, самец) (Orient Bio Inc., Сеул, Южная Корея) покупали и содержали в специфических условиях без патогенов (SPF) в течение приблизительно 1 недели. После этого мышей глубоко анестезировали Zoletil 50 (VIRBAC, Франция) и ксилазином (ROMPUN®, Bayer AG, Германия). После анестезии на мышцах проводили открытую торакотомию, чтобы обнажить коронарную артерию, и инфаркт миокарда индуцировали путем лигирования артерии с использованием шва 7-0 и трубки PE20. У мышей принудительное дыхание сохранялось путем подключения эндотрахеальной трубки к вентилятору после воздушной интубации. Ишемическое состояние поддерживалось в течение 40 мин, после чего кровь повторно перфузировали, удалив трубку PE20. Начиная с 3-го дня после индукции инфаркта миокарда, антитела к FAM19A5 (1-65, 3-2 или 1-28 антитела) вводили мышам посредством внутривенной инъекции с еженедельными интервалами в целом по три инъекции. Наивных (т.е. здоровых) и мышей НИИ использовали в качестве контролей.

На 21-й день после индукции инфаркта миокарда мышей умерщвляли и собирали их сердца. Ткани сердца фиксировали в 10% растворе формалина. Затем фиксированные ткани разрезали поперек толщиной 2 мм вокруг вершины и помещали в парафиновые блоки, которые затем разрезали на срезы по 5 мкм и устанавливали на предметные стекла для анализа. Окрашивание гематоксилином и эозином (H & E) проводили на образцах ткани сердца, чтобы оценить влияние каждого антитела к FAM19A5 (т.е. 1-65, 3-2 и 1-28 антител) на ремоделирование ткани, ассоциированное с инфарктом миокарда.

Как и ожидалось, ткани сердца из контрольной группы НИИ показали значительную дилатацию левого желудочка и истончение стенки левого желудочка, см. фиг. 11 ("НИИ"). Напротив, ткани сердца от мышей, которые получали антитела к FAM19A5, напоминали ткани сердца от наивных ("здоровых") животных (т.е. уменьшали дилатацию левого желудочка и сохраняли ткани стенки левого желудочка).

Чтобы количественно оценить этот эффект, трихром Массона, который окрашивает коллаген, был выполнен на срезах ткани сердца. Как отмечалось ранее, коллаген является основным компонентом внеклеточного матрикса (ECM), и поэтому окрашивание трихрома Массона повышенной аккумуляции коллагена в образце ткани может быть точным индикатором фиброза. Окрашенные предметные стекла фотографировали с использованием оптического микроскопа (Olympus BX53, Япония) и отношение площади фиброзной ткани к общей площади левого желудочка также рассчитывали с использованием анализатора изображения.

Как показано на фиг. 12А, мышцы, которые получали антитела к FAM19A5 (1-65, 3-2 и 1-28), имели значительно меньшее накопление коллагена по сравнению с контрольной группой NHI. В группах, обработанных антителом к FAM19A5, приблизительно 10-15% от общей площади левого желудочка составляла фиброзная ткань, см. фиг. 12В. Напротив, у мышечей из контрольной группы NHI фиброзная область составляла приблизительно 20% от общей площади левого желудочка. Среди различных антител FAM19A5 наибольшее влияние оказывало антитело 1-65.

В совокупности вышеприведенные результаты демонстрируют, что введение антител FAM19A5 вскоре после инфаркта миокарда может значительно улучшить ремоделирование ткани и образование фиброза.

Пример 14. Анализ пациентов с человеческим раком печени.

Фиброз и цирроз печени являются основными факторами риска развития рака печени. У больных человеческим раком печени часто наблюдается фиброз, сходный с циррозом печени, окружающим раковые ткани. Поэтому для оценки экспрессии FAM19A5 при раке печени экспрессию белка FAM19A5 измеряли при биопсии печени человека с использованием иммуногистохимии. Вкратце, образцы печени были получены от пациентов с раком печени с различной степенью фиброза (т.е. от стадии 0 до стадии 4). Образцы ткани иммуно окрашивали антителом к FAM19A5, а затем окрашивали гематоксилином и эозином (H & E).

Как показано на фиг. 13, было значительное увеличение экспрессии белка FAM19A5 в ткани печени у пациента со стадией 2 и 4 по сравнению с пациентом на стадии 0. Повышенная экспрессия FAM19A5 была централизована главным образом вокруг областей образования рубцов и в печеночных звездчатых клетках. Увеличение экспрессии FAM19A5 также коррелировало с прогрессированием заболевания, при этом ткань печени на стадии 4 экспрессировала гораздо более высокие уровни FAM19A5 по сравнению с тканью печени на стадии 2. В совокупности эти данные демонстрируют, что FAM19A5 также играет важную роль в раке печени человека.

Пример 15. Анализ эффективности введения антитела к FAM19A5 на модели ксенотрансплантата рака печени.

Для оценки противоопухолевой эффективности антител к FAM19A5 при раке печени человека использовали ксенотрансплантатную модель рака печени у мышечей. Вкратце, голых мышечей покупали и содержали в специфических условиях без патогенов (SPF). Примерно через неделю периода адаптации животным вводили подкожно клетки Hep3B и/или звездчатые клетки печени человека (HHStcC). Для этого клетки сначала обрабатывали трипсином для приготовления суспензии отдельных клеток. Затем клетки промывали и приблизительно 5×10^6 клеток Hep3B и/или $0,4 \times 10^6$ HHStcC ресуспендировали в 100 мкл среды DMEM. Затем клетки вводили подкожно в правый бок голых мышечей с использованием инсулинового шприца. Примерно через 3 недели после инъекции животных наблюдали за образованием опухоли.

После образования опухоли (~3 недели после инъекции) животным вводили внутривенно либо нормальный человеческий иммуноглобулин (NHI, контроль), либо 3-2 человеческих антитела IgG1 к FAM19A5 (2,5 мг/кг). Животные получали антитела один раз в неделю в течение 3 недель. Вес тела и размер опухоли оценивались каждую неделю. И через 42 дня после инокуляции животных умерщвляли и опухоли подвергали дальнейшему анализу.

Как показано на фиг. 14А, животные из всех разных групп имели одинаковую массу тела в течение всего периода экспериментов. И, как показано на фиг. 14В-14D, введение антитела к FAM19A5 имело минимальный противоопухолевый эффект у животных, инокулированных только клетками Hep3B (т.е. "Hep3B + NHI" и "Hep3B + FAM19A5 Ab"). Но у животных, инокулированных как клетками Hep3B, так и HHStcC, введение антитела к FAM19A5 приводило к значительному уменьшению размера/веса опухоли (т.е. "Hep3B + HHStcC + NHI" против "Hep3B + HHStcC + FAM19A5 Ab"). Такие данные показывают, что взаимодействие антитела к FAM19A5 с печеночно-клеточными звездчатыми клетками печени в микроокружении опухоли может лечить рак печени.

Пример 16. Эффект введения антитела к FAM19A5 после черепно-мозговой травмы.

Чтобы оценить влияние антител к FAM19A5, описанных в данном документе, на черепно-мозговую травму, использовали модель черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Вкратце, взрослых самцов мышечей C57BL/6 (в возрасте 8-9 недель) глубоко анестезировали изофлуораном. Криогенную ЧМТ выполняли, помещая железный стержень (предварительно охлажденный с использованием жидкого азота) на челюсть на 1 мин. Кожу мышечей затем ушивали и содержали таким же образом, как нормальных мышечей. Moon et al., Neuro Report. 22:304-308 (2011). Приблизительно через 1 день после индукции ЧМТ животным вводили внутривенно 100 мкг различных антител к FAM19A5 (1-65 (2/4); 1-28; 2-13 и 3-2), разведенных в фосфатно-солевом буфере. (PBS).

На 5 день после индукции ЧМТ (TBI5D) животных умерщвляли, перфузировали 4% параформальдегидом (PFA) в PBS и собирали ткани головного мозга. Собранные ткани головного мозга дополнительно фиксировали в 4% -ном растворе PFA в течение дополнительных 24 ч.

Затем ткани головного мозга подвергали цитопротекции в 30% сахарозе, последовательно рассекали на криостате (40 мкм) и хранили в 50% глицерине/50% PBS при -20°C до использования.

Для окрашивания реактивных астроцитов, связанных с глиозом (положительных для экспрессии

нестина и GFAP), срезы ткани мозга блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином (BSA) и 0,1% тритоном X-100 в PBS в течение 30 мин. Первичные антитела затем инкубировали со срезами в течение ночи при 4°C. Основными антителами, использованными в этом исследовании, были анти-нестин мышьиные (Millipore, Биллерика, Массачусетс, США) и кроличьи анти-GFAP (Dako, Карпинтерия, Калифорния, США). После нескольких промывок PBS соответствующие вторичные антитела применяли в течение 30 мин. Ядра были помечены Хёхст 33342 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Затем срезы промывали, устанавливали и наблюдали под флуоресцентным или конфокальным микроскопом (Leica, Вецлар, Германия).

Чтобы количественно оценить эффект, сначала была указана область интереса (GI)-отрицательной области для каждого изображения, а затем область (мкм², A) соответствующего ROI рассчитывали с использованием программного обеспечения LAS AF lite (Leica Microsystem CMS GmbH, Мангейм, Германия). Боковую длину (мкм, B) границы линии травмирующего ядра, контактирующей с полутенью, также измеряли с помощью того же программного обеспечения. Результат A/B обозначает среднее расстояние от ядра поражения (A/B, мкм).

Как показано на фиг. 15A и 15B, антитела 1-28, 2-13 и 3-2 к FAM19A5 аналогичным образом уменьшали, устраняли и/или предотвращали возникновение реактивного глиоза в областях полутени после черепно-мозговой травмы. Общий эффект был аналогичен действию антитела 1-65 против FAM19A5, которое ранее, как было показано, значительно ослабляет образование реактивных астроцитов после черепно-мозговой травмы. См. патент США № 9579398. Несмотря на связывание белка FAM19A5 с эпитопом, отличным от антитела 1-65, антитела 1-28, 2-13 и 3-2 были столь же эффективны при введении после черепно-мозговой травмы.

Пример 17. Оценка противоопухолевого эффекта антитела FAM19A5 в клеточной линии глиобластомы мыши раковых клеток GL-261.

Для индуцирования модели глиобластомы головы 4-недельной мыши C57BL/6 фиксировали в стереотаксическом аппарате, а клетки GL-261 (1×10^5 клеток/5 мкл) инъецировали внутрочерепно (внутричерепная инъекция: 0,2 мм спереди от брегмы, 2,2 мм латеральнее средней линии, 3,5 мм глубины от поверхности черепа до середины хвостовой части брюшной полости) для индукции глиобластомы (фиг. 16A). Человеческий IgG (отрицательный контроль) и антитело к FAM19A5 вводили внутривенно через семь дней после инокуляции GL-261 соответствующим животным. Каждая мышь получала либо контрольное антитело IgG человека, либо антитело к FAM19A5 в дозе 2,5 мг/кг один раз в неделю, три раза (фиг. 16A).

Начиная с 23 дня после инокуляции GL-261 наступала смерть и, следовательно, всех выживших мышей умерщвляли, а мозг удаляли и фиксировали фосфатно-солевым буфером, содержащим 4% параформальдегида. Чтобы измерить размер опухоли в ткани мозга, были использованы три аналитических метода: 1) осветление ткани (CLARITY) (фиг. 16B), 2) окрашивание гематоксилином и еозином (H & E) (фиг. 17A и 17B) и 3) окрашивание по Хёхсту (фиг. 18A-18D).

(1) Для прозрачности ткани аналитическую ткань сначала погружали в раствор мономера гидрогеля (A4P0) и хранили при 4°C в течение одного дня, чтобы обеспечить проникновение гидрогеля по всей ткани. После этого температуру повышали до 37°C, чтобы вызвать полимеризацию с образованием сетчатой структуры. Затем для удаления липидов из ткани использовали электрофорез для очистки тканей (ETC). Подготовленную ткань затем помещали в лайтбокс. Поверхность относительно непрозрачной ткани рассматривалась как поверхность опухоли, и приблизительная масса опухоли измерялась с помощью шкалы.

(2) Окрашивание гематоксилином и еозином (окрашивание H & E) после фиксации фосфатно-солевым буфером, содержащим 4% параформальдегида, в течение 24 ч и затем суспендирование в фосфатно-солевом буфере, содержащем 30% сахарозы, в течение еще 24 ч. Затем ткань помещали в форму для ткани головного мозга, и соединение ОКТ, содержащее 30% раствор сахара, замораживали на сухом льду, и ткань мозга тонко нарезали до 30 мкм с использованием микротом криостата (Leica). После завершения окрашивания H & E изображения подготовленного образца были получены с помощью слайд-сканера (Carl Zeiss/AxioScanZ) и граничная поверхность опухоли была произвольно определена с использованием микроскопа ZEN и программного обеспечения для визуализации (Zeiss) для получения значения площади поверхности опухоли.

(3) Тонко нарезанную ткань для окрашивания Хёхст обрабатывали фосфатным буферным раствором, содержащим Хёхст (1:2000), в течение 30 мин. Флуоресцентное изображение подготовленного образца получали с использованием конфокального микроскопа (Leica), а границу опухоли определяли с использованием программного обеспечения IMARIS 3D (Bitplane) для получения объема опухоли и количества клеток в опухоли. Как показано на фиг. 16B, 17A, 17B и 18A-18D, измерение размера опухоли у каждой мыши показало, что размер глиобластомы в группе, обработанной антителом к FAM19A5, значительно уменьшился по сравнению с группой, обработанной человеческим IgG, во всех трех экспериментальных методах.

Пример 18. Способствование нормализации сосудов после обработки антителом FAM19A5 на мышиной модели глиобластомы.

Мозг получали путем умерщвления мышинных моделей, индуцированных глиобластомой (см. пример 17), после фиксации фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 4% параформальдегида, в течение 24 ч, с последующей инфльтрацией в PBS, содержащем 30% сахарозы, в течение дополнительных 24 ч. Затем мозг помещали в форму для ткани головного мозга и замораживали на сухом льду с помощью соединения OCT, содержащего 30% раствор сахара. Затем замороженный мозг тонко нарезали до 30 мкм, используя микротом криостата. Иммуногистохимию проводили для определения характера экспрессии белка CD31 (маркера эндотелиальных клеток сосудов) в мозге мыши, индуцированной глиобластомой. Флуоресцентные изображения приготовленного образца были получены с использованием конфокального микроскопа (Leica).

Когда сопоставимые площади поверхности были исследованы (фиг. 19А, обозначенная белыми точками), в контрольной группе количество кровеносных сосудов и их связность были очень скудными (фиг. 19А, левая колонка), тогда как в группе, обработанной антителом к FAM19A5, количество кровеносных сосудов и их сообщение были относительно высокими (фиг. 19А, правая колонка). См. фиг. 19В для большего увеличения характерной области на фиг. 19А.

Вышеуказанные результаты показали, что лечение антителом против FAM19A5 может способствовать нормализации кровеносных сосудов, что может облегчить лечение глиобластомы.

Пример 19. Различия в распределении иммунных клеток после обработки антителом FAM19A5 на мышинной модели глиобластомы.

Мозг, выделенный на мышинных моделях, индуцированных глиобластомой (см. пример 17), фиксировали фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 4% параформальдегида, в течение 24 ч с последующим проникновением в PBS, содержащим 30% сахарозы, в течение еще 24 ч. Затем мозг помещали в форму для ткани головного мозга и замораживали на сухом льду с помощью соединения OCT, содержащего 30% раствор сахара. Затем замороженный мозг тонко нарезали до 30 мкм, используя микротом криостата. Распределение астроцитов и макрофагов в глиобластоме наблюдали, выполняя иммуногистохимию на GFAP (маркер астроцитов) и Iba-1 (маркер макрофагов).

В контрольной группе астроциты не наблюдались в глиобластоме, тогда как в группе, обработанной антителом FAM19A5, в опухоли остается относительно большое количество астроцитов. Ожидается, что астроциты в опухоли окажут положительное влияние на периферические нейроны или на внеклеточную среду нейронов. Кроме того, анализ уровня инфльтрации макрофагов в глиобластоме показал, что инфльтрация макрофагов резко возросла в группе, обработанной антителом против FAM19A5, по сравнению с группой, обработанной отрицательным контролем человеческого IgG (фиг. 20А и 20В).

Эти результаты показали, что обработка антителом к FAM19A5 также может способствовать инфльтрации макрофагов в глиобластому, что может затем облегчить лечение глиобластомы.

Пример 20. Оценка противораковой эффективности антитела FAM19A5 на модели глиомы крысы с использованием опухолевых клеток С6.

Для того чтобы вызвать изогенную модель глиомы крысы, $1,8 \times 10^5/1$ мкл С6 опухолевых клеток инокулировали мужским особям крыс Вистар внутречерепной инъекцией с использованием стереотаксической рамы. От 7 дня после инокуляции опухоли каждой крысы вводили внутривенно с человеческим IgG (отрицательный контроль) антитело или анти-FAM19A5, антитело в дозе 2,5 мг/кг каждые три дня в течение двух раз. Изображение МРТ-сканирования для анализа размера инокулированной опухоли, местоположения и качественных результатов каждой крысы было получено через 2-3 дня после 7-го дня после инокуляции опухолевых клеток.

T2-взвешенное сканирование изображений является базовым морфологическим анализом, который обеспечивает визуальную и качественную оценку местоположения и размера инокулированной опухоли и т.д. Картографический анализ R2, используемый в качестве индикатора содержания жидкости в опухолевой ткани, позволяет визуально подтвердить объем отека в опухоли. Визуальный аналитический метод, использованный для определения общего кровотока, использовался для определения изменения значения R2* до и после введения высокомолекулярного контрастного вещества T2 MION (размер: 20 ± 5 нм, доза: 5 мг/кг), который вычислял CBV (объем церебральной крови) посредством картирования $delR2^*$. Значение CBV (объем церебральной крови) определяли вариацией R2 и использовали для визуального анализа общего объема крови в ткани головного мозга. Скорость улучшения (EnhRate) и площадь под кривой (AUC) были репрезентативными параметрами для определения проницаемости ткани.

Как показано в результате сканирования изображения (фиг. 21) T2-взвешенное изображение показало, что введение антитела к FAM19A5 эффективно подавляло рост опухоли по сравнению с человеческим IgG-антителом (отрицательный контроль). Результат картирования R2 у животных, которым вводили анти-FAM19A5, показал уменьшение площади некроза в опухоли, что привело к уменьшению содержания воды в ядре опухоли по сравнению с животными, обработанными человеческим IgG (отрицательный контроль). Результаты анализа CBV показали относительно большой объем крови в опухолевой ткани животных, которым вводили анти-FAM19A5, по сравнению с животными, обработанными человеческим IgG (отрицательный контроль), что продемонстрировало увеличение скорости кровотока в опухолевой ткани. Наконец, оценка проницаемости опухолевой ткани показала снижение проницаемости у

животных, которым вводили антитело к FAM19A5, по сравнению с животными, обработанными человеческим IgG (отрицательный контроль). "IAUC30" обозначает начальную площадь под кривой через 30 с.

Эти результаты, полученные на модели опухолевых клеток глиомы С6 крысы, обработанной антителом против FAM19A5, по сравнению с группой отрицательного контроля, обработанной человеческим IgG, показывают уменьшение площади некроза, приводящее к ослаблению отека. Эффективное подавление роста опухоли происходило за счет снижения проницаемости опухолевых клеток и улучшения скорости кровотока.

Пример 21. Оценка противораковой эффективности антитела к FAM19A5 на модели рака мозга мыши с использованием опухолевых клеток GL261.

Для дальнейшей оценки противоопухолевого действия антитела к FAM19A5 клетки GL261 Red-FLuc были использованы для индукции рака мозга у мышей. Вкратце, клетки GL261 Red-FLuc (3×10^5) инъецировали в мозг мышей C57BL/6 (день 0). Затем через 3 дня после инъекции мышам вводили внутривенно человеческий IgG (Sigma, cat. # 14506) или антитело к FAM19A5 (3-2 клон, Lot # 171123). Антитела вводили в дозе 5 мг/кг один раз в неделю в целом в течение четырех недель. После последнего введения антител (день 24) мышей контролировали на выживаемость до тех пор, пока все животные не умерли.

Как показано на фиг. 22, в группе человеческого IgG последняя мышь умерла на 28 день после инъекции клеток GL261. Напротив, у животных, получавших антитело к FAM19A5, последняя мышь умерла через неделю (т.е. на 35 день после инъекции клеток GL261). Этот результат дополнительно подтвердил противораковую эффективность антитела к FAM19A5, продемонстрировав, что антитело к FAM19A5 может повысить выживаемость у животных с раком мозга.

Следует принимать во внимание, что раздел "Подробное описание", а не разделы "Краткое изложение" и "Реферат", предназначен для интерпретации формулы изобретения. Разделы "Краткое изложение" и "Реферат" могут излагать один или несколько, но не все примерные варианты осуществления настоящего описания, как предполагается изобретателем(ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения настоящего описания и прилагаемой формулы изобретения каким-либо образом.

Настоящее описание изобретения было описано выше с помощью функциональных строительных блоков, иллюстрирующих реализацию определенных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных строительных блоков были определены в данном документе произвольно для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены при условии, что указанные функции и их связи выполняются надлежащим образом.

Вышеприведенное описание конкретных вариантов осуществления будет настолько полно представлять общую природу описания изобретения, насколько другие могут, применяя знания в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений конкретные варианты осуществления без чрезмерного экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего описания изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы соответствовать значению и диапазону эквивалентов описанных вариантов осуществления, основываясь на представленных в данном документе инструкциях и руководствах. Следует понимать, что фразеология или терминология в данном документе предназначена для целей описания, а не ограничения, так что терминология или фразеология настоящего описания должны интерпретироваться специалистом в свете инструкций и руководств.

Широта и объем настоящего описания изобретения не должны быть ограничены каким-либо из вышеописанных примерных вариантов осуществления, но должны быть определены только в соответствии с нижеследующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

Все публикации, патенты, заявки на патенты, интернет-сайты и регистрационные номера/последовательности баз данных (включая как полинуклеотидные, так и полипептидные последовательности), процитированные в данном документе, настоящим включены в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка, интернет-сайт или номер доступа/последовательность базы данных были специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки.

Заявка РСТ на данное изобретение испрашивает приоритет из предварительной заявки США № 62/525635, поданной 27 июня 2017 г., и 62/582,887, поданной 7 ноября 2017 г., обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое специфично связывается с белком A5, членом семейства со сходством последовательностей 19 ("FAM19A5") человека ("антитело к FAM19A5"), и которое содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, причем:

а) указанная VH содержит последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 85%

идентична последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 36, и указанная VL содержит последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 40;

b) указанный CDR3 тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 16; и

c) указанное антитело к FAM19A5 способно связывать эпитоп FAM19A5, представленный в SEQ ID NO: 6.

2. Антитело к FAM19A5 по п.1, отличающееся тем, что CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 14, CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 15, CDR3 тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR1 легкой цепи содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 26, CDR2 легкой цепи содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 27, и CDR3 легкой цепи содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 28.

3. Антитело к FAM19A5 по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанная VH содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 36, и указанная VL содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 40.

4. Антитело к FAM19A5 по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой химерное антитело, антитело человека или гуманизованное антитело.

5. Антитело к FAM19A5 по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанное антитело к FAM19A5 содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 62.

6. Антитело к FAM19A5 по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что указанное антитело имеет одно или несколько из следующих свойств:

(a) уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает фиброз;

(b) уменьшает образование избыточного внеклеточного матрикса (ECM);

(c) задерживает рост или прогрессирование опухоли;

(d) связывается с растворимым FAM19A5 человека с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью иммуноферментного анализа (ELISA);

(e) связывается с мембраносвязанным FAM19A5 человека с K_D 10 нМ или менее, как измерено с помощью ELISA;

(f) уменьшает, устраняет, задерживает и/или предотвращает развитие реактивного глиоза;

(g) подавляет избыточную пролиферацию реактивных астроцитов;

(h) уменьшает экспрессию протеогликанов хондроитинсульфата, включая нейрокан и нейрон-глиальный антиген 2 (NG2);

(i) увеличивает экспрессию c-fos и pERK в ядрах нейронов;

(j) способствует выживанию нейронов;

(k) увеличивает экспрессию GAP43 в нейронах и

(l) способствует отращиванию аксона.

7. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к FAM19A5 по любому из пп.1-6.

8. Композиция для модулирования активности FAM19A5, содержащая антитело к FAM19A5 по любому из пп.1-6 или нуклеиновую кислоту по п.7 и носитель.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к FAM19A5 по любому из пп.1-6 или нуклеиновую кислоту по п.7 и носитель.

10. Способ лечения рака головного мозга у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту антитела против FAM19A5 по любому из пп.1-6, нуклеиновой кислоты по п.7, композиции по п.8 или фармацевтической композиции по п.9.

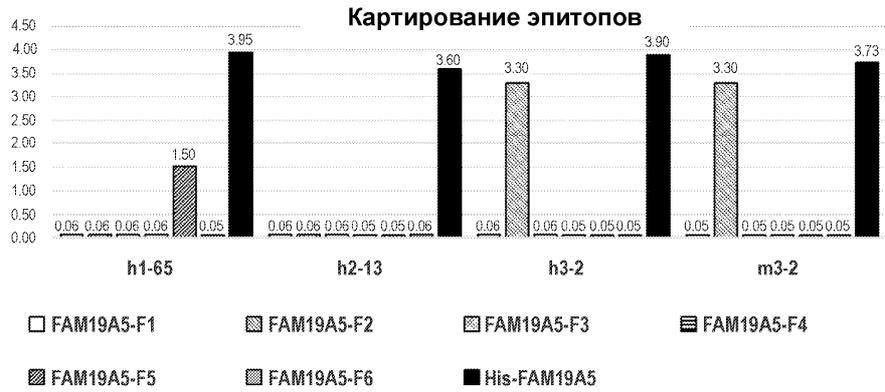
11. Способ диагностики фиброза и/или рака головного мозга у субъекта, нуждающегося в этом, включающий приведение в контакт биологического образца указанного субъекта с антителом к FAM19A5 по любому из пп.1-6, для определения уровня белка FAM19A5 в указанном биологическом образце, при этом у указанного субъекта присутствует фиброз и/или рак головного мозга или у него имеется риск развития фиброза и/или рака головного мозга, если уровень белка FAM19A5 в указанном биологическом образце выше, чем соответствующий уровень в биологическом образце от субъекта, у которого отсутствует фиброз и/или рак головного мозга и не имеется риска развития фиброза и/или рака головного мозга.

QFLKEGQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARCACRKGGIAGTTRARPACVDARIIKTKQWCDMLPCLEGECDLLINRSGWTCQPGGRIKTTTVS
 QFLKEGQLAAGTSEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARSASRKGQIAGTTRARPASVDARIIKTKQWSDMLPSLEGECDLLINRSGWTCQPGGRIKTTTVS

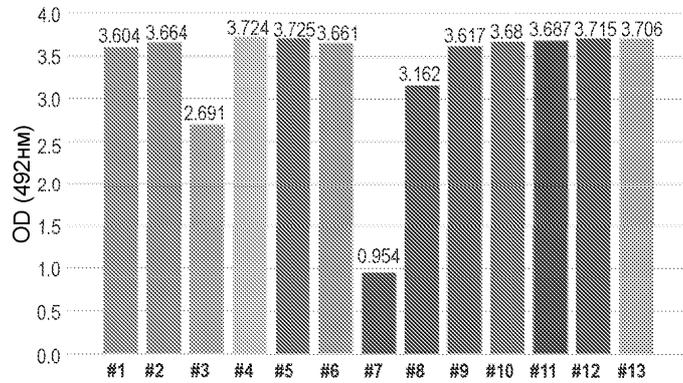
F1 F2 F3 F4 F5 F6

- F1 : QFLKEGQLAAGTSEIVTLDRGGGSC-BSA (2,54 кДа)
- F2 : TLDRDSSQPRRTIARQTARSGGGSC-BSA (2,68 кДа)
- F3 : TARSASRKGQIAGTTRARPAGGGSC-BSA (2,42 кДа)
- F4 : ARPASVDARIIKTKQWSDMLGGGSC-BSA (2,65 кДа)
- F5 : SDMLPSLEGECDLLINRSGGGGSC-BSA (2,45 кДа)
- F6 : NRSGWTCQPGGRIKTTTVSGGGGSC-BSA (2,50 кДа)

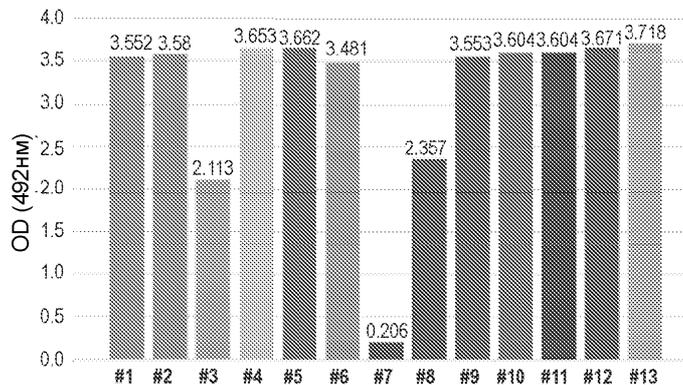
Фиг. 1



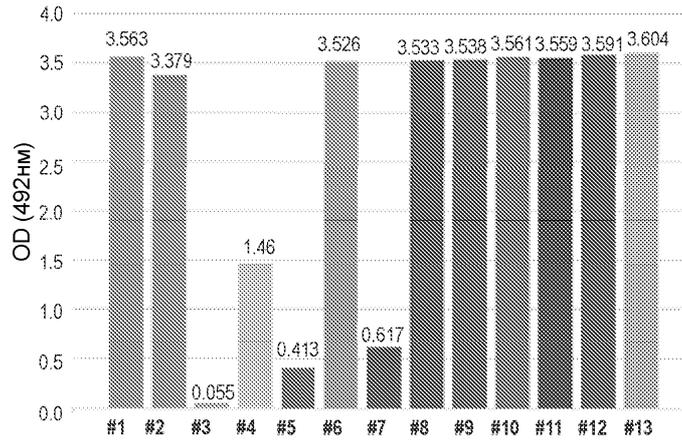
Фиг. 2



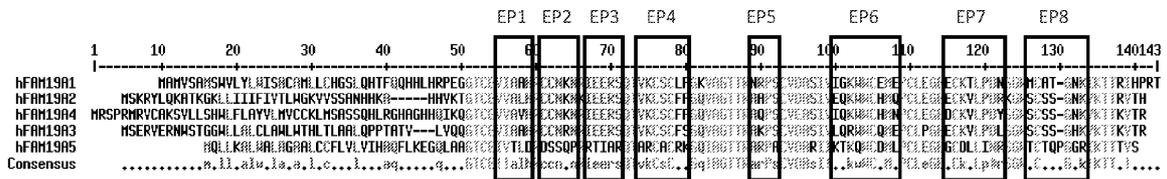
Фиг. 3А



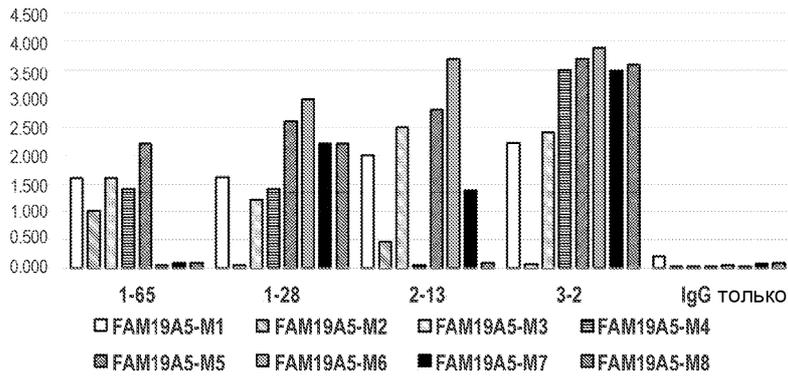
Фиг. 3В



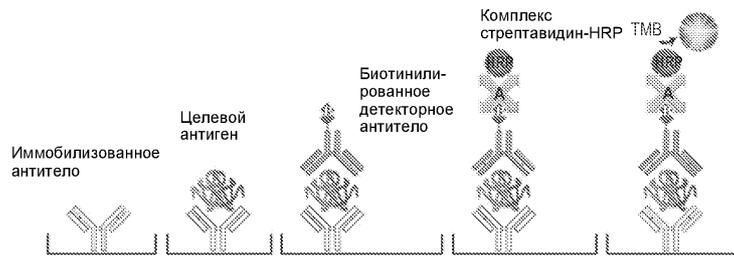
Фиг. 3С



Фиг. 4



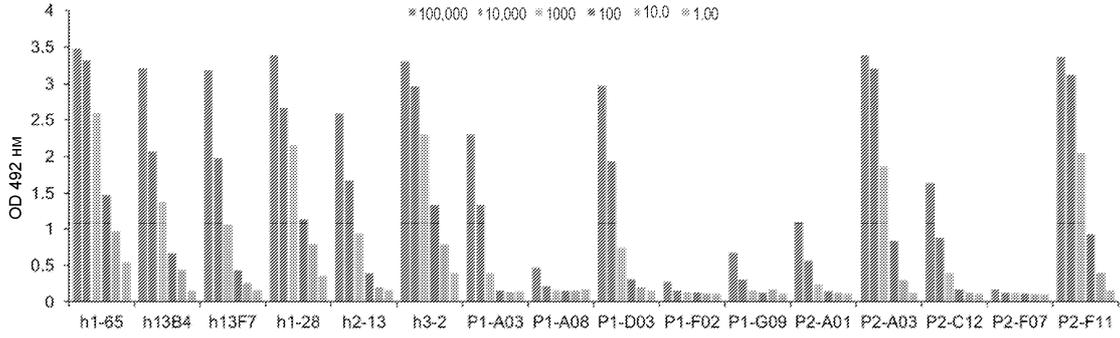
Фиг. 5



Фиг. 6А

Иммобил. антитело	1-65				P2-A03				P2-F11				13B4				2-13				3-2			
	100	10	0	S/N	100	10	0	S/N	100	10	0	S/N	100	10	0	S/N	100	10	0	S/N	100	10	0	S/N
1-65					0.16	0.11	0.1	1.1	1.61	0.33	0.19	1.7	0.19	0.15	0.15	1.0	1.73	1.81	0.55	3.3	1.98	1.83	0.28	6.5
P2-A03	0.16	0.15	0.15	1.0					0.15	0.15	0.14	1.1	0.27	0.22	0.22	1.0	1.88	1.72	0.22	7.8	1.91	1.66	0.16	10
P2-F11	1.25	0.2	0.12	1.7	0.09	0.09	0.09	1.0					0.2	0.18	0.18	1.0	1.83	2.04	0.29	7.0	2.02	1.81	0.13	13.9
13B4	0.12	0.12	0.12	1.0	0.15	0.16	0.14	1.1	0.14	0.16	0.15	1.1					1.92	0.65	0.21	3.1	1.7	0.3	0.13	2.3
2-13	2.02	1.8	0.44	4.1	1.88	1.07	0.39	2.7	1.94	1.91	0.4	4.8	1.48	0.45	0.45	1.1					2.01	1.97	0.38	5.1
3-2	1.98	1.68	0.1	16.8	1.83	1.08	0.05	21.6	2.11	1.93	0.09	21.4	1.88	0.42	0.42	4.7	2.04	2.02	0.26	7.8				

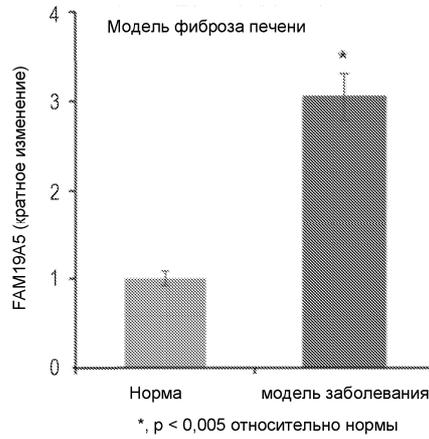
Фиг. 6В



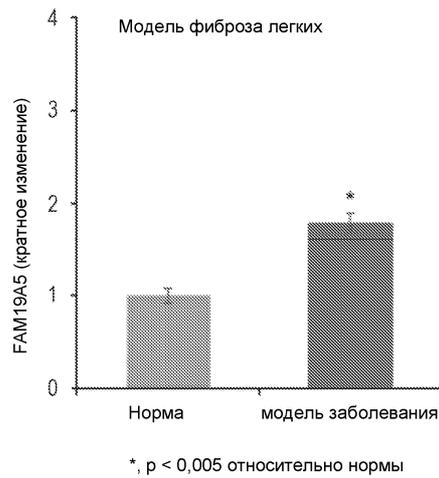
Фиг. 7А

N'-концевой His	1-65	13B4	13F7	h1-28	h2-13	h3-2	P1-A03	P1-A08	P1-D03	P1-F02	P1-G09	P2-A01	P2-A03	P2-C12	P2-F07	P2-F11
Kd (нМ)	0.10	1.06	2.77	0.17	1.96	0.12	7.50	6.95	4.29	0.00	11.05	9.09	0.61	7.64	0.00	0.41
Втаx	3.259	2.839	3.035	2.938	2.407	3.006	2.454	0.4791	3.019	0.1723	0.738	1.191	3.367	1.726	0.1343	3.259
R ²	0.8806	0.8823	0.9329	0.8703	0.9303	0.9021	0.9813	-0.2016	0.9714	0.1299	0.6802	0.9105	0.9746	0.9422	0.2002	0.9692

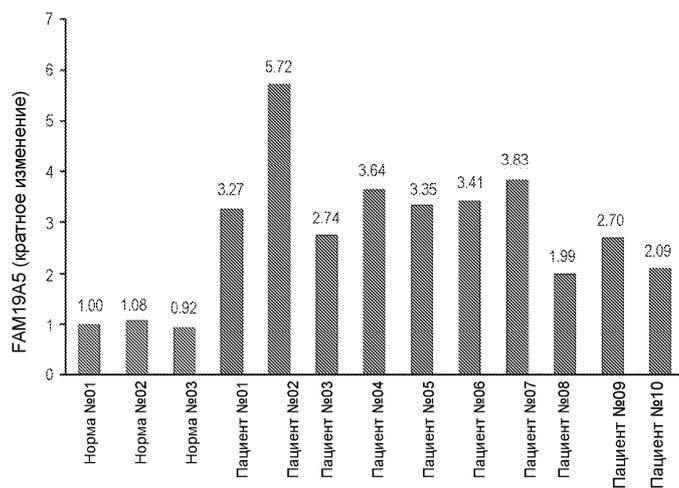
Фиг. 7В



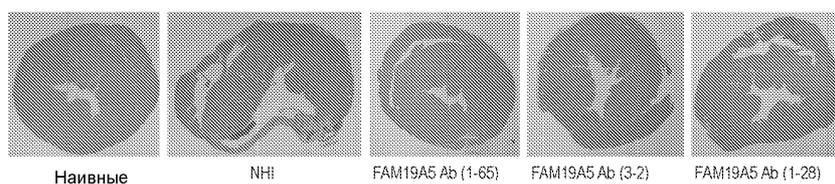
Фиг. 8



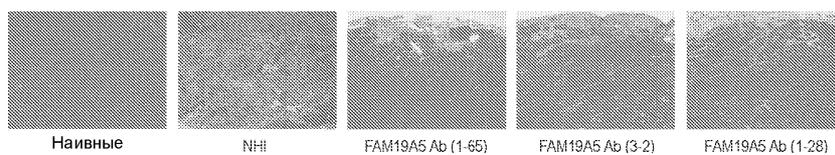
Фиг. 9



Фиг. 10

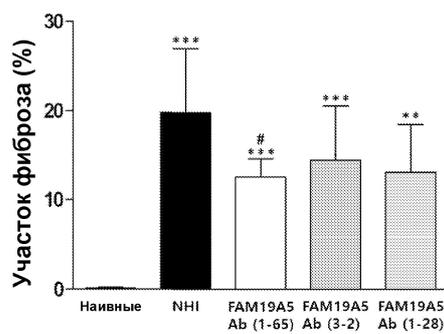


Фиг. 11

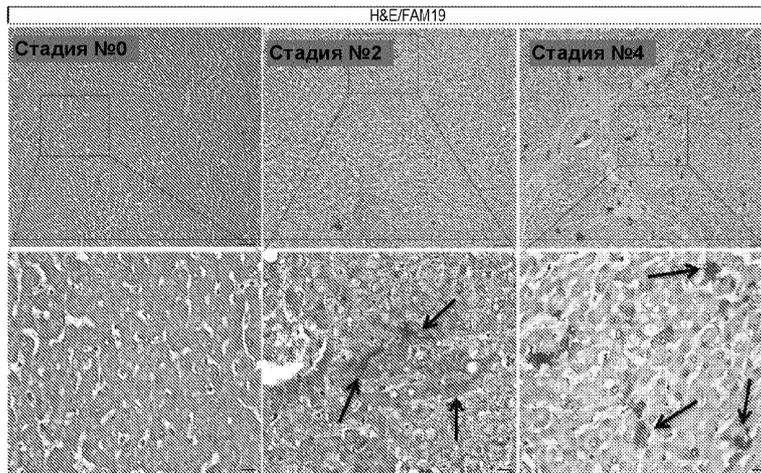


Фиг. 12А

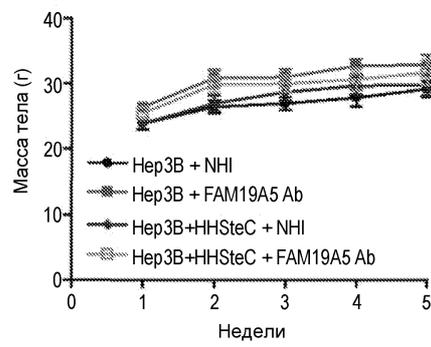
Участок фиброза



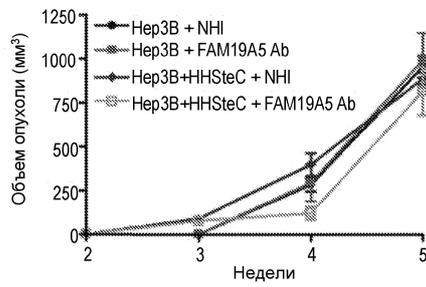
Фиг. 12В



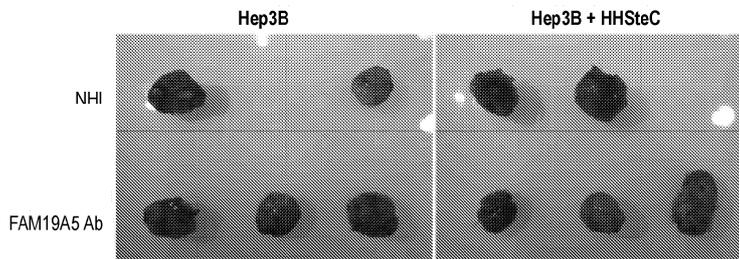
Фиг. 13



Фиг. 14А

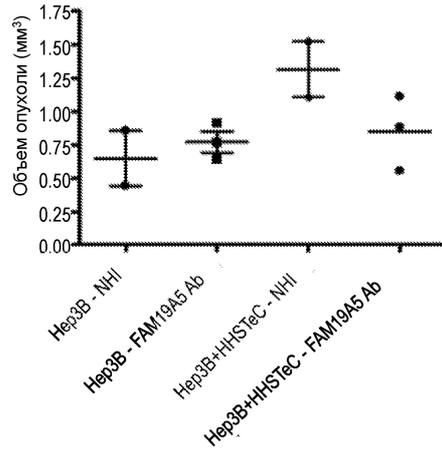


Фиг. 14В



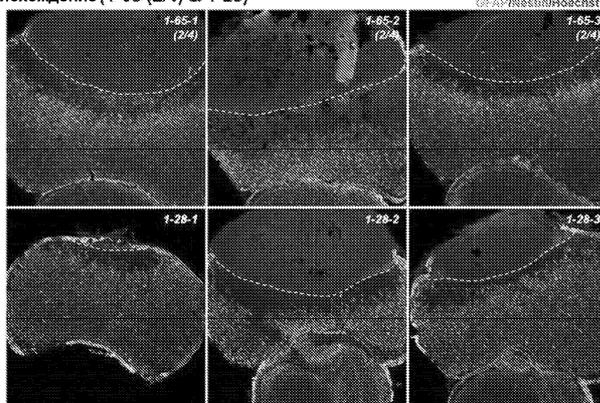
Фиг. 14С

043381

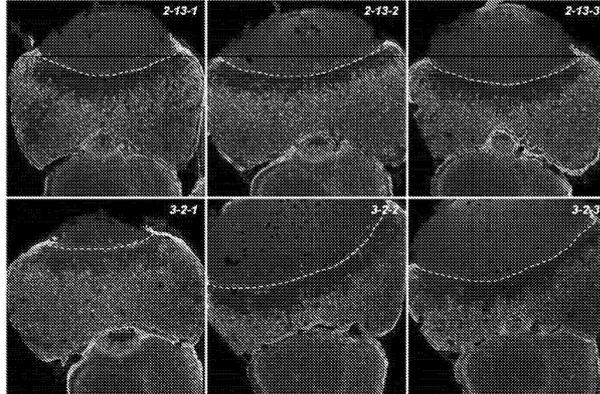


Фиг. 14D

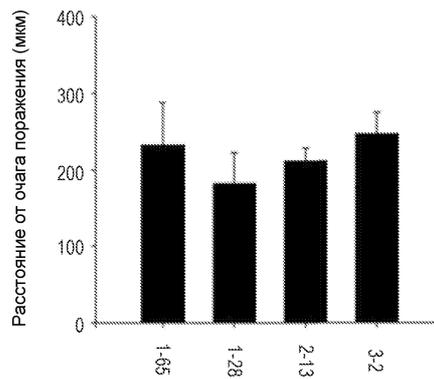
Куриное происхождение (1-65 (2/4) & 1-28)



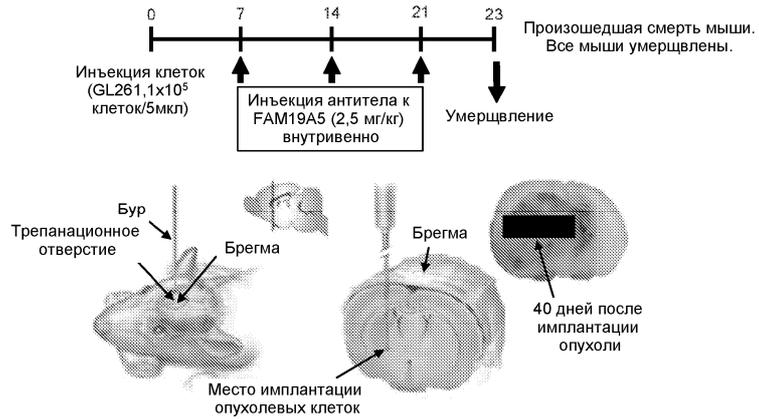
Куриное происхождение (2-13 & 3-2)



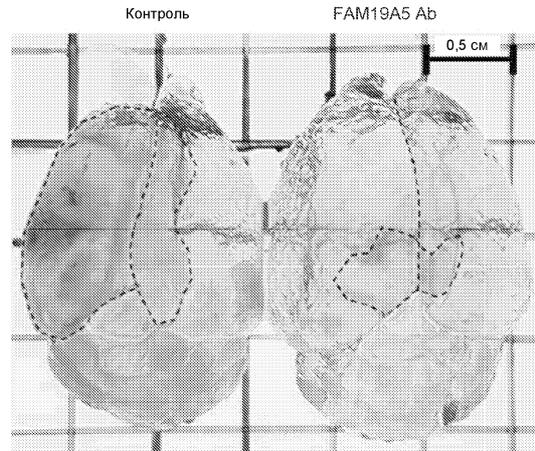
Фиг. 15А



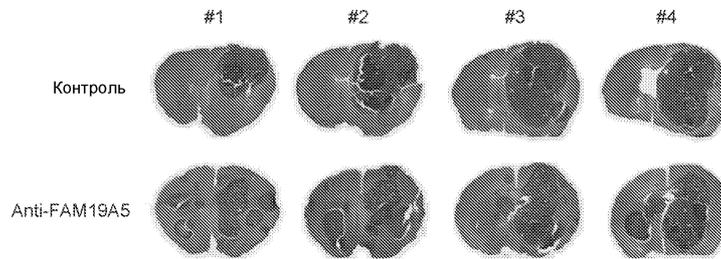
Фиг. 15В



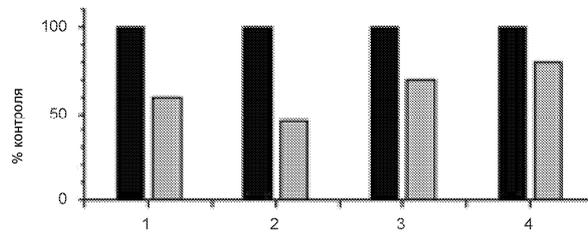
Фиг. 16А



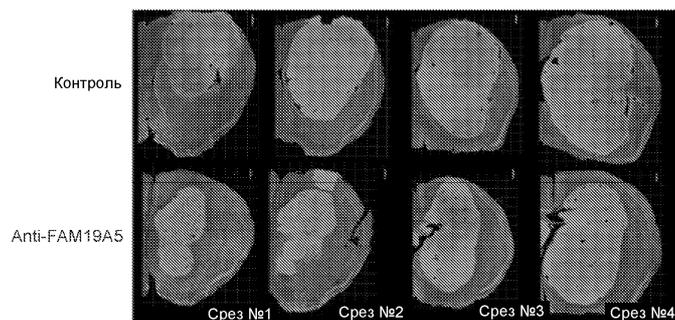
Фиг. 16В



Фиг. 17А



Фиг. 17В

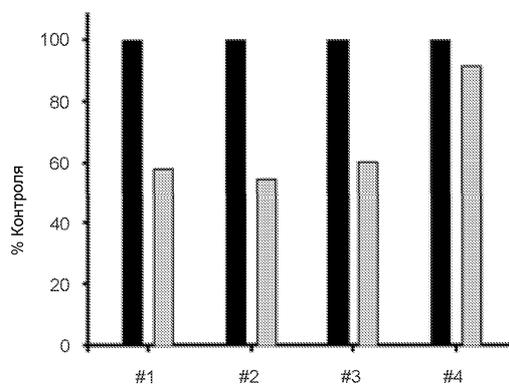


Масштабный отрезок = 500 мкм

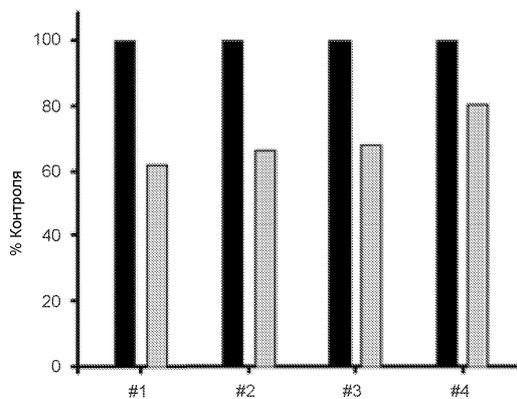
Фиг. 18А

Срез №1	Контроль	A5AB	% Контроля
К-во пятен	132166	76532.5	57.90635
Об. (мкм ³)	268000000	166100000	61.97761
Срез №2	Контроль	A5AB	% Контроля
К-во пятен	277528	151384.2	54.54736
Об. (мкм ³)	443000000	292600000	66.04966
Срез №3	Контроль	A5AB	% Контроля
К-во пятен	373561	223788.4	59.90679
Об. (мкм ³)	581000000	397100000	68.34768
Срез №4	Контроль	A5AB	% Контроля
К-во пятен	358046	326058.5	91.62468
Об. (мкм ³)	615000000	492800000	80.13008

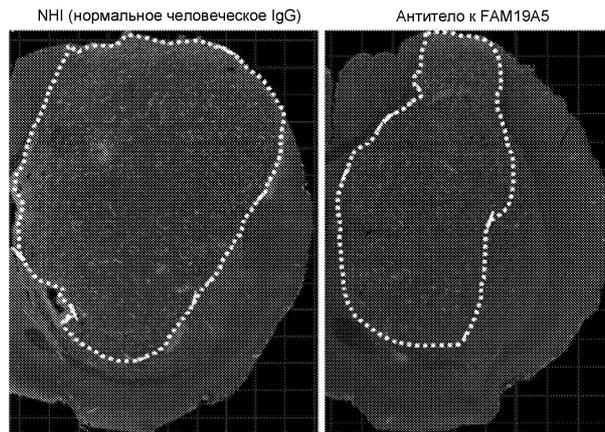
Фиг. 18В



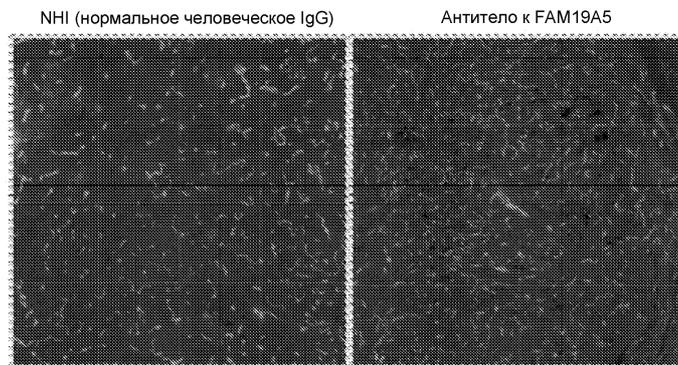
Фиг. 18С



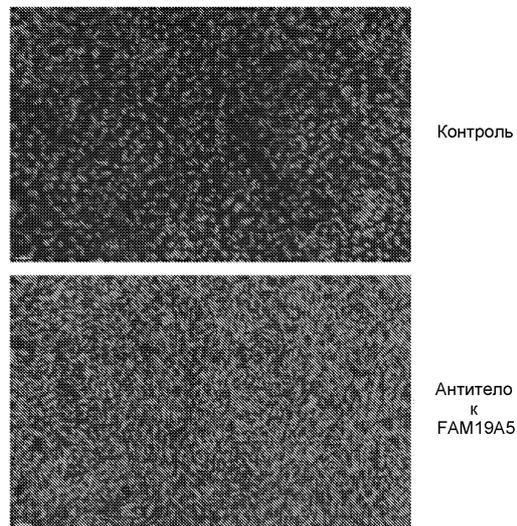
Фиг. 18D



Фиг. 19А

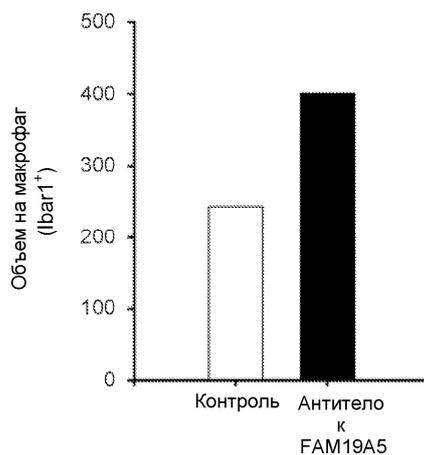


Фиг. 19В

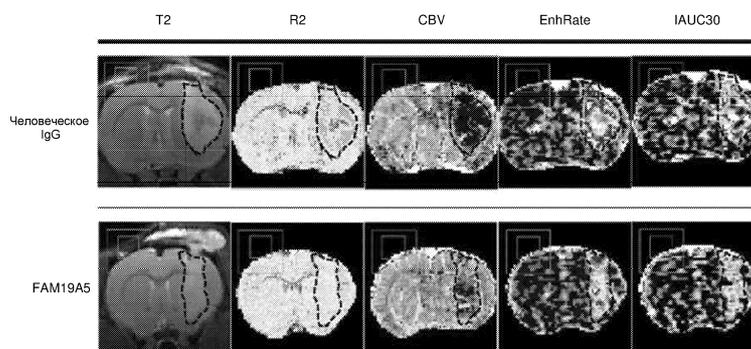


Фиг. 20А

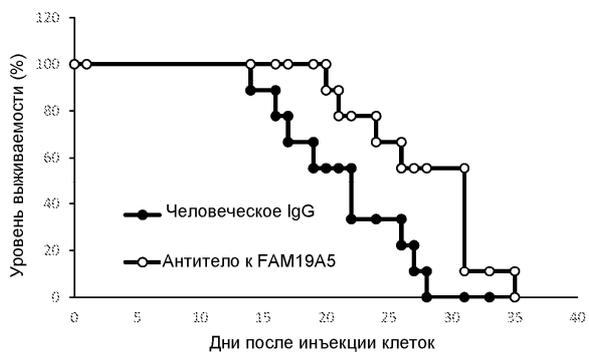
043381



Фиг. 20В



Фиг. 21



Фиг. 22

