

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-515263

(P2020-515263A)

(43) 公表日 令和2年5月28日(2020.5.28)

|                                   |                     |             |
|-----------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                      | F I                 | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b>    | C 1 2 N 15/13 Z N A | 4 B 0 6 4   |
| <b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>    | C 1 2 N 15/63 Z     | 4 B 0 6 5   |
| <b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>     | C 1 2 N 1/15        | 4 C 0 8 5   |
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>     | C 1 2 N 1/19        | 4 H 0 4 5   |
| <b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>     | C 1 2 N 1/21        |             |
| 審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く |                     |             |

(21) 出願番号 特願2019-553434 (P2019-553434)  
 (86) (22) 出願日 平成30年3月27日 (2018. 3. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月21日 (2019. 11. 21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2018/003594  
 (87) 国際公開番号 WO2018/182284  
 (87) 国際公開日 平成30年10月4日 (2018. 10. 4)  
 (31) 優先権主張番号 10-2017-0038775  
 (32) 優先日 平成29年3月27日 (2017. 3. 27)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 韓国 (KR)  
 (31) 優先権主張番号 10-2017-0118890  
 (32) 優先日 平成29年9月15日 (2017. 9. 15)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 韓国 (KR)

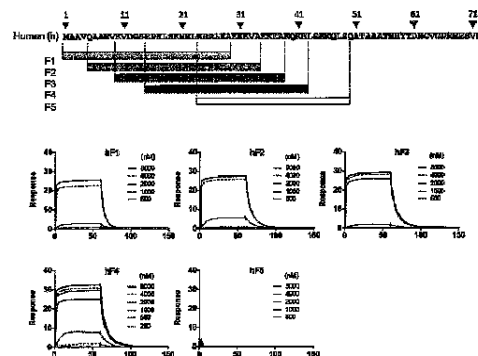
(71) 出願人 514070937  
 メディシナル バイオコンバージェンス  
 リサーチ センター  
 大韓民国 443-270 キョンギド  
 スウォンシ ヨントング クァンギ  
 ヨーロ 145 アドバンスド インステ  
 イチューツ オブ コンバージェンス テ  
 クノロジー ビードン 8階 (イウイ  
 ドン)  
 (74) 代理人 110002354  
 特許業務法人平和国際特許事務所  
 (72) 発明者 キム、スンファン  
 大韓民国 06269 ソウル、カンナム  
 -グ、365-ギル ナンプスンファン  
 -ロ、42、#4-1005  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞外膜に露出されるリシル- tRNA合成酵素N-末端領域に特異的に結合する抗体

## (57) 【要約】

本発明は、細胞外膜に露出されたリシル-tRNA合成酵素N-末端領域に特異的に結合する抗体とその利用に関するもので、より詳細には、本明細書で記載する特定のCD R (相補性決定部位) 配列を有し、リシル-tRNA合成酵素 (KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端の、配列番号97の配列を含むエピトープ (epitope) に特異的に結合する抗体又はその断片と、前記抗体又は断片のがん転移抑制用途、がんの診断用途及び免疫細胞の移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物に対するものである。

本発明に係る抗体又はその断片は、細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域への特異的結合能力が極めて優れているため、がん診断に効果があり、抗がん及びがん転移抑制効果があって、免疫細胞の移動関連疾患を予防及び治療について極めて有用に利用することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

リシル-tRNA合成酵素 (KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端の、配列番号97の配列を含むエピトープ (epitope) に特異的に結合する、抗体又はその断片。

## 【請求項 2】

前記エピトープは、配列番号75、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号113及び配列番号114からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 記載の抗体又はその断片。

## 【請求項 3】

前記抗体又はその断片は、配列番号1、配列番号13、配列番号25及び配列番号37からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1 (CDR1) と；配列番号3、配列番号15、配列番号27及び配列番号39からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2 (CDR2) と；配列番号5、配列番号17、配列番号29及び配列番号41からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3 (CDR3) とを含む重鎖可変領域 (VH)、及び

配列番号7、配列番号19、配列番号31及び配列番号43からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1 (CDR1) と；配列番号9、配列番号21、配列番号33及び配列番号45からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2 (CDR2) と；配列番号11、配列番号23、配列番号35及び配列番号47からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3 (CDR3) とを含む軽鎖可変領域 (VL)

を含む、細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素 (KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端領域に特異的に結合することを特徴とする、請求項 1 記載の抗体又はその断片。

## 【請求項 4】

前記抗体又はその断片は、配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1、配列番号3で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2及び配列番号5で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3を含む重鎖可変領域と、配列番号7で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1、配列番号9で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2及び配列番号11で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3を含む軽鎖可変領域；

配列番号13で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1、配列番号15で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2及び配列番号17で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3を含む重鎖可変領域と、配列番号19で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1、配列番号21で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2及び配列番号23で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3を含む軽鎖可変領域；

配列番号25で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1、配列番号27で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2及び配列番号29で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3を含む重鎖可変領域と、配列番号31で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1、配列番号33で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2及び配列番号35で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3を含む軽鎖可変領域；及び

配列番号37で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1、配列番号39で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2及び配列番号41で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3を含む重鎖可変領域と、配列番号43で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1、配列番号45で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2及び配列番号47で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3を含む軽鎖可変領域；

からなる群から選択された重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むことを特徴とする、請求項 3 記載の抗体又はその断片。

10

20

30

40

50

## 【請求項 5】

前記重鎖可変領域は、配列番号49、配列番号53、配列番号57及び配列番号61からなる群から選択されたアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域は、配列番号51、配列番号55、配列番号59及び配列番号63からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項 3 記載の抗体又はその断片。

## 【請求項 6】

前記抗体は、IgG、IgA、IgM、IgE及びIgDからなる群から選択され、前記断片は、ディアボディ、Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、Fv及びscFvからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 3 記載の抗体又はその断片。

## 【請求項 7】

前記scFvは、配列番号67、配列番号69、配列番号71及び配列番号73からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 6 記載の抗体又はその断片。

## 【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の抗体又はその断片を符号化するポリヌクレオチド。

## 【請求項 9】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

## 【請求項 10】

請求項 9 記載の組換え発現ベクターで形質転換された細胞。

## 【請求項 11】

(a) 請求項 9 記載の組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換する段階；  
(b) 形質転換された宿主細胞を培養して抗体又はその断片を生産する段階；及び  
(c) 宿主細胞から生産された抗体又はその断片を収得する段階を含む、細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素 (KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端に特異的に結合する抗体又はその断片を製造する方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 記載の抗体又はその断片を試料と接触させる段階、及び前記抗体又はその断片を検出する段階を含む、細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素 (KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端の特異的検出方法。

## 【請求項 13】

請求項 1 記載の抗体又はその断片を有効成分として含む、がん転移抑制用薬学的組成物。

## 【請求項 14】

前記がんは、乳癌、大腸癌、肺癌、小細胞肺癌、胃癌、肝臓癌、血液癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部又は頸部癌、皮膚又は眼球内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門癌、結腸癌、乳癌、卵管癌、子宮内膜癌腫、子宮頸部癌、膣癌、陰門癌腫、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性又は急性白血病、リンパ球リンパ腫、膀胱癌、腎臓又は尿道管癌、腎細胞癌腫、腎臓骨盤癌腫、CNS腫瘍、一次CNSリンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫及び脳下垂体腺腫からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 13 記載の組成物。

## 【請求項 15】

前記がんは、乳癌又は肺癌であることを特徴とする、請求項 13 記載の組成物。

## 【請求項 16】

請求項 1 記載の抗体又はその断片を有効成分として含む、がん診断用組成物。

## 【請求項 17】

請求項 1 記載の抗体又はその断片を有効成分として含む、免疫細胞の移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物。

## 【請求項 18】

前記免疫細胞の移動関連疾患は、心血管疾患、線維化疾患、慢性炎症性疾患及びアルポート症候群 (Alport syndrome) からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 17 記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 19】

前記心血管疾患は、肺動脈高血圧、粥状動脈硬化、狭心症、心筋梗塞症、虚血性脳血管疾患、細動脈硬化及び中膜硬化からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 18 記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記線維化疾患は、硬皮症、関節リウマチ (rheumatoid arthritis)、クローン病 (Crohn's disease)、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis)、骨髄線維症 (myelofibrosis)、肺線維症 (pulmonary fibrosis)、肝臓線維症 (hepatic fibrosis)、肝硬変症 (liver cirrhosis)、腎臓線維症 (kidney fibrosis)、筋線維症 (myofibrosis)、心臓線維症、全身性紅斑性ループス (systemic lupus erythematosus)、遺伝性線維症、感染性線維症、刺激性線維症、慢性自己免疫による線維症、臓器移植時の抗原不適合による線維症、高脂血症による線維症、肥満による線維症、糖尿病性線維症、高血圧による線維症及びステント挿入時線維化による閉塞からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 18 記載の組成物。

## 【請求項 21】

前記慢性炎症性疾患は、喘息、アトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬症、骨関節炎、痛風、乾癬性関節炎、肝硬変、無アルコール性脂肪肝炎、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎不全、糖尿病性神経病変及び多発性硬化症からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 18 記載の組成物。

## 【請求項 22】

がん転移抑制用製剤を製造するための、請求項 1 記載の抗体又はその断片の使用。

## 【請求項 23】

請求項 1 記載の抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とする、がん転移抑制方法。

## 【請求項 24】

がん診断用製剤を製造するための、請求項 1 記載の抗体又はその断片の使用。

## 【請求項 25】

請求項 1 記載の抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とする、がんの診断方法。

## 【請求項 26】

免疫細胞の移動関連疾患の治療用製剤を製造するための、請求項 1 記載の抗体又はその断片の使用。

## 【請求項 27】

請求項 1 記載の抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とする、免疫細胞の移動関連疾患の治療方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2017年3月27日に出願された韓国特許出願第10-2017-0038775号、2017年9月15日に出願された韓国特許出願第10-2017-0118890号及び第10-2017-0118917号に基づく優先権を主張し、前記明細書全体は参照により本出願に援用する。

## 【0002】

本発明は、細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素N-末端領域に特異的に結合する抗体とその使用に関するもので、より詳細には、本明細書で記載する特定のCDR (相補性決定部位) 配列を有し、リシル-tRNA合成酵素 (KRS, Lysyl-tRNA synthetase) N-末端の、配列番号97の配列を含むエピトープ (epitope) に特異的に結合する抗体又はその断片と、前記抗体又は断片のがん転移抑制用途、がん診断用途及び免疫細胞移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物に対するものである。

## 【背景技術】

## 【0003】

最近の研究を通じて、一般的に細胞質 (cytosol) に存在するヒトのKRS (lysyl-tRNA synthetase) が原形質膜 (細胞膜) に移動されて、原形質膜に存在する67LR (67kDaラミニン受容体) と相互作用することにより、腫瘍 (又はがん) 細胞の移動を促進してがんの転移 (metastasis) に影響を与えることが究明された (非特許文献 1 ~ 2)。ヒトのKRS (Genbank AccessionNo. NP\_005539.1等) は、N-末端延長 (N-terminal extension、1-72)、アンチコドン結合ドメイン (anticodon-binding domain、73-209) 及び触媒ドメイン (catalytic domain、220-597) を含む。ヒトのKRSは、タンパク質の合成に必須的な酵素であり、一般的に細胞質から多重tRNA合成酵素複合体 (multi-tRNA synthetase complex、MSC) 内に存在する。しかし、ラミニン (laminin) シグナルの後、p38 MAPKは、T52残基においてKRSをリン酸化させ、KRSは細胞膜に移動して、ユビキチン媒介分解から67LRを保護する。また、細胞膜に移動されたKRSは、がん転移と関連付けられている67LRを安定化させ、これと相互作用をすることにより、がん転移 (cancer metastasis) を促進することが報告された。

10

## 【0004】

一方、免疫細胞は、体内の一次防御網でもあるが、最近、過度な免疫細胞の活性化が重要な発症メカニズムのうちの一つであることが報告されている。炎症性免疫細胞の活性化の際に、一般的に免疫細胞の移動性の増加が観察されるが、具体的には次のような疾病において、これらの免疫細胞の移動及び浸潤が、疾病の病理と密接な関連があることが報告されている。

20

## 【0005】

一例として、心血管系疾患は心臓と主要動脈に発生する疾患で、粥状動脈硬化症と冠動脈疾患等が含まれる (非特許文献 3 ~ 5)。粥状動脈硬化症は、コレステロールによる炎症性疾患であり、動脈の内側の膜に沈着したコレステロールと、血液から動脈の内側に移動した免疫細胞で構成された粥腫により発症する。つまり、コレステロール酸化物が炎症を起こしている部位で、単核球のような免疫細胞が移動しながら粥腫が形成される。粥腫が形成される場合、血管の内面はごつごつになり、壁は厚くなりながら、血液が流れる内部の径が狭くなり、血液循環に障害が生じる。粥腫の周りを取り巻く線維性膜が破裂すると血管内に血栓が発生し、粥腫内に出血が起こり、血管内径が急激に狭くなったり、塞がったりするようになる。主に心臓に血液を供給する血管、脳に血液を供給する血管、腎臓に血液を供給する血管及び末梢血管に発生して、虚血性心臓疾患、虚血性脳血管疾患 (脳卒中)、腎不全、四肢虚血性動脈疾患を起こす。従来、これらの心血管系疾患の発生及び発達には、単核球の移動を誘導することにより、炎症反応を引き起こすCCL2 (CCChemokine ligand 2、MCP-1) が重要な役割を果たしていることが知られ、CCL2の作用及びこれに伴う単核球の移動を抑制することにより、前記のような心血管系疾患を治療する方法が新たに提示された (非特許文献 6 ~ 10)。

30

## 【0006】

また、肺動脈高血圧 (Pulmonary Arterial Hypertension、PAH) は、世界保健機構 (WHO) の肺高血圧臨床分類システム (ESC Guidelines、European Heart Journal 2015) のGroup 1に分類され、呼吸困難、平均肺動脈圧 (mean pulmonary artery pressure、mPAP) の上昇 (mPAP > 25mmHg) 及び右心室の機能不全を共通の臨床特徴とする稀な疾患である。これらの肺動脈高血圧は、遺伝、感染、関連疾患等、さまざまな先制要因が関与するが、血管損傷 (endothelial cell injury) による免疫反応が核心病理的要因として作用することが知られている (非特許文献 11)。このような現象には、免疫細胞の浸潤と機能障害 (dysfunction) に伴う一連の過程が、病理現象と深く関連付けられていることが知られており、特にPAHにおいて、免疫細胞と血管内皮細胞の相互作用が重要であることが分かった。のみならず、近年、アルポート症候群 (Alport syndrome) においても、単核球、大食細胞の浸潤が前記疾病の進行を促進させるとの報告があった。

40

## 【0007】

50

一方、線維化 (fibrosis) 関連疾病において、継続的な (慢性的な) 炎症反応が傷の治癒プログラム (wound-healing program) を活性化させるようになるが、これが線維症 (fibrosis) につながるようになる。組織の損傷後、単核球 / 大食細胞や好中性白血球、好酸白血球、肥満細胞等の炎症性免疫細胞が、損傷部位に急速に浸透しながら活性化され、複数のサイトカインを分泌するようになり、これらは周囲の線維芽細胞や上皮細胞、平滑筋細胞を再び活性化させ、これらを筋芽細胞型の細胞で活性化させるが、この筋芽細胞型の細胞は、多量の細胞外基質タンパク質を生産分泌させて、最終的に組織に細胞外基質タンパク質の多量蓄積を招いて傷を残し、また組織の線維化や肥大化を誘導することになる (非特許文献 12)。この病理メカニズムは、創傷、火傷、褥瘡等による皮膚の傷が発生する時、皮膚組織内の傷痕形成や、肝臓、腎臓、血管、肺等の組織の硬化性線維化現象の根本的な原因の一つである。また、慢性自己免疫疾患である硬皮症 (scleroderma)、リウマチ性関節炎 (rheumatoid arthritis)、クローン病 (Crohn's disease)、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis)、骨髄線維症 (myelofibrosis)、全身性紅斑性ループス (systemic lupus erythematosus) においても、線維化は主な病理的特性で現れる。また、アトピー性疾患、喘息疾患、COPD、乾癬症、ケロイド、増殖性網膜症等でも炎症性免疫細胞の活性化が病理現象に寄与すると知られている。

#### 【0008】

特に、前記創傷治癒プログラム (wound-healing program) において、筋芽細胞型の細胞で活性化された線維芽細胞を筋線維芽細胞 (myofibroblast) と称す。筋線維芽細胞は線維化 (fibrosis) に関連した全ての疾患病理の中心にあるので、筋線維芽細胞の活性を誘導する分子生物学的、若しくは免疫学的メカニズムを除去することが、疾患の治療の核心要素となる。多くの先天的 (innate immunity) 又は後天的 (adaptive immunity) 免疫が、線維芽細胞 (fibroblast) の活性と分化に重要である事実は広く知られており、これに傷部位からの炎症反応を除去することが、線維化への組織再構築 (tissue remodeling) を中断させ、正常な組織形態を維持する核心的要素となる。しかし、实际的に炎症反応の除去が容易に行われないため、先天的、後天的免疫のメカニズムを理解して核心媒介体 (mediator) を見つけることが、線維化を遅らせることが重要である。

#### 【0009】

単核球、大食細胞等は創傷治癒にも寄与する部分があるが、活性酸素 (reactive oxygen)、窒素 (nitrogen) 等を分泌するので、周囲の細胞に有害な影響を及ぼすことになる。従って、単核球、大食細胞を速やかに除去しなければ組織の損傷をさらに誘発するようになり、線維化をもたらすことになる。従って、前記疾病の初期に最初に反応する単核球、大食細胞を制限することは、様々な慢性炎症及び線維化関連疾患において、一つの治療的戦略と思われる。

#### 【0010】

前記創傷治癒メカニズムが線維化反応を誘発させるとき、血球凝集に関連した PDGF (platelet-derived growth factor) は、他の炎症反応、免疫細胞を傷部位に引き寄せて、TGF- $\beta$ 1 は、局所線維芽細胞から細胞外基質合成を促進させることが知られている。しかし、前記の血球凝集反応に関連した要素は、これらが欠乏した場合にも線維化を誘導する結果を示すことが報告された。

#### 【0011】

一方、N-末端延長 (N-ext) の末端残基 40 個が欠失した Myc-KRS41-597 ( $\Delta$ N) が原形質膜に局在化 (localize) されないことは、KRS の N-ext 領域が、KRS が細胞膜に移動 (translocation) するにおいて、必須的な領域であることを示す。また、癌転移と関連して、67LR との相互作用において、具体的に KRS の N-ext 領域がこれらの結合に関与することが知られた。このような事実を治療又は診断目的に利用するためには、KRS タンパク質を構成する複数のドメイン領域の特性によって、タンパク質内の目的とする特定の位置 (特に、KRS N-ext) を特異的に標的化することが必要な実情である。

#### 【0012】

しかし、KRS をはじめとする ARS (aminoacyl tRNA synthetase) に対するバイオマーカ

ーとしての重要性にもかかわらず、ARSは、タンパク質構成上類似点が多く、動物から免疫反応により得られる抗体は、他のARSにも結合する交差反応を示し、最初から高感度の抗体が生成されない場合が多い。

#### 【0013】

また、前記のように、過度な免疫細胞の活性化が問題となる疾患において、従来の免疫細胞の移動（及び浸潤）を防ぐための標的因子（target factor）が提示されていて、これらを対象に疾病の治療方法を考案する試みがなされているが、それぞれの限界点が報告されているのが実情であり、これにより、効果的な疾病治療のために依然として、免疫細胞の移動において、重要な媒介体（mediator）が何なのか、これを制御する戦略は何なのかを見出すことが重要な解決課題として要求されているのが実情である。

10

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0014】

【非特許文献1】Dae Gyu Kim et al., Chemical inhibition of prometastatic lysyl-tRNA synthetase/aminin receptor interaction, Nat Chem Biol. 2014 Jan; 10(1): 2934

【非特許文献2】Dae Gye Kim et.al, Interaction of two translational components, lysyl-tRNA synthetase and p40/37LRP, in plasma membrane promotes laminin-dependent cell migration, FASEB J. (2012) 26, 4142-4159

【非特許文献3】Ross R et al., New Engl J Med, 1999; 340(2): 115-26

【非特許文献4】Poli G et al., Redox Biol 2013;1(1): 125-30

20

【非特許文献5】Libby P et al., Circulation 2002; 105(9): 1135-43

【非特許文献6】Gu L et al., Mol Cell, 1998;2(2): 275-81

【非特許文献7】Aiello RJ et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19(6): 1518-25

【非特許文献8】Gosling J1 et al., Clin Invest 1999; 103(6): 773-8

【非特許文献9】Harrington JR et al., Stem Cells 2000; 18(1): 65-6

【非特許文献10】Ikeda U et al., Clin Cardiol 2002; 25(4): 143-7

【非特許文献11】Huertas et al., Circulation, 129: 1332-1340, 2014

【非特許文献12】Gurtner GC et al., Trends Cell Biol. 15: 599-607, 2005

#### 【発明の概要】

30

#### 【0015】

#### [発明の詳細な説明]

#### [技術課題]

そこで、本発明者らは、細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に特異的に結合する抗体作製の研究を進めていた中、本明細書で記載する特定のCDR（相補性決定部位）配列を有する抗体が、KRS N-末端領域に極めて高い結合特異性（specificity）及び結合親和力（affinity）を示すだけでなく、in vivo上でのがん転移を抑制することを確認した。また、免疫細胞（単核球/大食細胞）の細胞膜領域にKRS水準が増加する現象が、免疫細胞の移動及び浸潤に関連した疾患に対して重要な病理現象であることを確認し、これはラミニン（特に、ラミニン亜型（サブタイプ） $\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$ ）と特別な関連性を有して、本発明で提供

40

#### 【0016】

したがって、本発明の目的は、リシル-tRNA合成酵素（KRS、lysyl-tRNA synthetase）のN-末端の、配列番号97の配列を含むエピトープ（epitope）に特異的に結合する、抗体又はその断片を提供することである。

#### 【0017】

本発明の他の目的は、前記本発明に係る抗体又はその断片を符号化するポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター及び前記組換え発現ベクターで形質

50

転換された細胞を提供することである。

【0018】

本発明のさらに他の目的は、(a)前記組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換する段階；(b)形質転換された宿主細胞を培養して抗体又はその断片を生産する段階；及び(c)宿主細胞で生産された抗体又はその断片を収得する段階を含む、細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素(KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端に特異的に結合する抗体又はその断片を製造する方法を提供することである。

【0019】

本発明のさらに他の目的は、本発明に係る抗体又はその断片を有効成分として含む、がん転移抑制用薬学的組成物を提供することである。

10

【0020】

また、本発明のさらに他の目的は、本発明に係る抗体又はその断片からなるがん転移抑制用薬学的組成物を提供することである。

【0021】

また、本発明のさらに他の目的は、本質的に、本発明に係る抗体又はその断片からなるがん転移抑制用薬学的組成物を提供することである。

【0022】

本発明のさらに他の目的は、本発明に係る抗体又はその断片を有効成分として含むがん診断用組成物を提供することである。

【0023】

20

また、本発明のさらに他の目的は、発明に係る抗体又はその断片からなるがん診断用組成物を提供することである。

【0024】

また、本発明のさらに他の目的は、本質的に、本発明に係る抗体又はその断片からなるがん診断用組成物を提供することである。

【0025】

本発明のさらに他の目的は、本発明に係る抗体又はその断片を有効成分として含む免疫細胞移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供することである。

【0026】

また、本発明のさらに他の目的は、本発明に係る抗体又はその断片からなる免疫細胞移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供することである。

30

【0027】

また、本発明のさらに他の目的は、本質的に、本発明に係る抗体又はその断片からなる免疫細胞移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供することである。

【0028】

本発明のさらに他の目的は、がん転移抑制用製剤を製造するための本発明に係る抗体又はその断片の使用を提供することである。

【0029】

本発明のさらに他の目的は、本発明に係る抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがん転移抑制方法を提供することである。

40

【0030】

本発明のさらに他の目的は、がん診断用製剤を製造するための、本発明による抗体又はその断片の使用を提供することである。

【0031】

本発明のさらに他の目的は、本発明に係る抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがんの診断方法を提供することである。

【0032】

本発明のさらに他の目的は、免疫細胞の移動関連疾患の治療用製剤を製造するための、本発明による抗体又はその断片の使用を提供することである。

【0033】

50

本発明のさらに他の目的は、本発明に係る抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とする免疫細胞の移動関連疾患の治療方法を提供することである。

【0034】

[ 技術的解決方法 ]

前記のような目的を達成するために、本発明はリシル-tRNA合成酵素 (KRS、Lysyl-tRNA synthetase) のN-末端の、配列番号97の配列を含むエピトープ (epitope) に特異的に結合する抗体又はその断片を提供する。

【0035】

本発明の他の目的を達成するために、本発明は、前記本発明に係る抗体又はその断片を符号化するポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター及び前記組換え発現ベクターで形質転換された細胞を提供する。

10

【0036】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、(a) 前記組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換する段階；(b) 形質転換された宿主細胞を培養して抗体又はその断片を生産する段階；及び(c) 宿主細胞で生産された抗体又はその断片を収得する段階を含む、細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素 (KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端に特異的に結合する抗体又はその断片を製造する方法を提供する。

【0037】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片を有効成分として含むがん転移抑制用薬学的組成物を提供する。

20

【0038】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片からなるがん転移抑制用薬学的組成物を提供する。

【0039】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本質的に、本発明は、前記抗体又はその断片からなるがん転移抑制用薬学的組成物を提供する。

【0040】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片を有効成分として含むがん診断用組成物を提供する。

30

【0041】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片からなるがん診断用組成物を提供する。

【0042】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、本質的に、前記抗体又はその断片からなるがん診断用組成物を提供する。

【0043】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片を有効成分として含む免疫細胞移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【0044】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片からなる免疫細胞移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

40

【0045】

また、本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、本質的に、前記抗体又はその断片からなる免疫細胞移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【0046】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、がん転移抑制用製剤を製造するための、前記の抗体又はその断片の使用を提供する。

【0047】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片の有効量

50

を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがん転移抑制方法を提供する。

【0048】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、がん診断用製剤を製造するための前記の抗体又はその断片の使用を提供する。

【0049】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがん診断方法を提供する。

【0050】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、免疫細胞の移動関連疾患の治療用製剤を製造するための前記抗体又はその断片の使用を提供する。

10

【0051】

本発明のさらに他の目的を達成するために、本発明は、前記抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とする免疫細胞の移動関連疾患の治療方法を提供する。

【0052】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0053】

本発明で、“細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素(KRS)N-末端領域”とは、細胞内で生成されたKRSが移動して細胞膜(又は、原形質膜)に局在化される時、細胞外(extracellular)の領域で、又は細胞膜表面に露出される特定の配列を意味するものであり、通常、KRS N-末端の1乃至72個のアミノ酸領域の一部又は全長配列を意味するものであってよい。また、KRS N-末端領域は、種間配列類似性が存在し、特に配列番号97で表示されるアミノ酸配列を含むことを特徴とすることができる。好ましくは、ヒトでは配列番号75で表示される配列を含み、マウス(mouse)では配列番号113で表示される配列を含み、ラット(rat)では配列番号114で表示される配列を含む。

20

【0054】

本発明で、“KRS”は、リシル-tRNA合成酵素として知られている全長ポリペプチド又はN-末端延長(N-terminal extention)を含む任意のKRS断片配列を意味する。本発明に係る抗体又はその断片は、前述した通り、細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域を特異的に検出するので、前述したKRS全長ポリペプチド又はN-末端延長を含む任意のKRS断片配列も検出することができる。前記KRSの具体的な配列は、配列番号75で表示されるポリペプチドを含むものであって、当業界にリシル-tRNA合成酵素として知られているものであれば特に制限されず、一例として本発明のKRSは、ヒト(homo sapiens)から由来したものであって、NCBI(Genbank)Accession No. NP\_005539.1等で公知されたものを含み、マウス(Mus musculus)由来のものであってNCBI(Genbank)Accession No. NP\_444322.1等で公知されたものを含めて、ラット(Rattus norvegicus)由来のものであってNCBI(Genbank)Accession No. XP\_006255692.1等で公知されたものを含み、この他にも下記の配列情報を参照することができるが、これに限定されない: XP\_005004655.1(guinea-pig: Cavia porcellus)、XP\_021503253.1(gerbil, Meriones unguiculatus)、XP\_002711778.1(rabbit, Oryctolagus cuniculus)、XP\_536777.2(dog, Canis lupus familiaris)、XP\_003126904.2(swine, Sus scrofa)、XP\_011755768.1(monkey, Macaca nemestrina)、XP\_008984479.1(marmoset, Callithrix jacchus)、XP\_019834275.1(cow, Bos indicus)、XP\_511115.2(chimpanzee, Pan troglodytes)。最も好ましくは、配列番号76(Genbank Accession No. NP\_005539.1)で表示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであってよい。

30

40

【0055】

本発明で抗体(antibody)とは、免疫グロブリン(immunoglobulin、Ig)とも称され、抗原に選択的に作用して、生体の免疫に関与するタンパク質の総称である。自然の中で発見された全体の抗体(whole antibody)は一般的に、複数のドメインからなるポリペプチドである軽鎖(light chain、LC)及び重鎖(heavy chain、HC)の二つのペアで構成され

50

、これらのHC/LCの二つのペアで構成された構造を基本単位とする。哺乳類の抗体を構成する重鎖の種類は、ギリシャ文字の $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、及び $\mu$ で表示される5種の類型があり、重鎖の種類によって、それぞれIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM等の他の種類の抗体を構成するようになる。哺乳類の抗体を構成する軽鎖の種類は、 $\lambda$ 及び $\kappa$ で表示される二つの種類が存在する。

【0056】

抗体の重鎖と軽鎖は、構造的にアミノ酸配列の可変性により可変領域と不変領域に区分される。重鎖の不変領域は抗体の種類によってCH1、CH2及びCH3（IgA、IgD及びIgG抗体）及びCH4（IgE及びIgM抗体）等の3つ又は4つの重鎖不変領域で構成されていて、軽鎖は一つの可変領域あるCLで構成されている。重鎖と軽鎖の可変領域は、それぞれ重鎖可変領域（VH）又は軽鎖可変領域（VL）のいずれかのドメインで構成されている。軽鎖と重鎖は、それぞれの可変領域と不変領域が並んで配置され、一つのジスルフィド結合（disulfide bond）により連結され、軽鎖と結合した二分子の重鎖は、二つのジスルフィド結合を通じて連結されて、全体抗体の形態を形成する。全体の抗体は、重鎖及び軽鎖の可変領域を通じて抗原に特異的に結合し、全体の抗体は、二つの重鎖及び軽鎖のペア（HC/LC）で構成されているので、一つの分子の全体の抗体は、二つの可変領域を通じて、同一な二つの抗原に結合する2価の単一特異性を有するようになる。

10

【0057】

抗体が抗原に結合する部位を含む可変領域は、配列可変性が少ない骨格部位（framework region、FR）と配列可変性が高い超可変性部位（hypervariable region）である相補性決定部位（complementary determining region、CDR）に細分される。VHとVLは、それぞれ三つのCDR及び四つのFRが、N-末端からC-末端の方向にFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順に配列されている。抗体の可変領域の中でも、配列可変性が最も高いCDRが抗原と直接結合する部位で、抗体の抗原特異性に最も重要である。

20

【0058】

本発明は、リシル-tRNA合成酵素（KRS、Lysyl-tRNA synthetase）N-末端のうち、配列番号97の配列を含むエピトープ（epitope）に特異的に結合する抗体又はその断片を提供する。

【0059】

本発明で“エピトープ（epitope）”とは、抗体に特異的に結合できるタンパク質決定因子を意味する。エピトープは、概してアミノ酸又は糖側鎖のような分子の表面基で構成されて、一般的に特異的な3次元構造特性及び特異的電荷特性を有する。立体形状的及び非立体形状のエピトープは、変性溶媒の存在下で立体形状のエピトープに対する結合は失われるが、非立体形状のエピトープに対しては失われない点で区別される。エピトープは、結合に直接関連するアミノ酸残基（エピトープの免疫原性成分とも称される）及び結合に直接関連していない他のアミノ酸残基、例えば、特異的抗原結合ペプチドによって効果的にブロックされるアミノ酸残基（すなわち、アミノ酸残基が特異的抗原結合ペプチドのフットプリント（footprint）内に存在する）を含むことができる。

30

【0060】

好ましくは、KRS N-末端配列に由来する本発明のN3モノクローナル抗体が結合する部位であり、配列番号97で表示されるアミノ酸（KLSKNELKRRLKA）を含む連続する領域であれば、その具体的配列が特に制限されず、通常配列番号97のアミノ酸配列を含み13乃至52個、より好ましくは13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、又は42個のアミノ酸配列からなるものであってよい。

40

【0061】

好ましくは、本発明の前記エピトープは、ヒトのKRS N-末端に由来したものである配列番号75、配列番号98、配列番号99、配列番号100及び配列番号101で表示されるアミノ酸配列でもあって、マウスKRS N-末端に由来したものである配列番号113、配列番号103、配列番号104、配列番号105及び配列番号106で表示されるアミノ酸配列でもあって、ラットKRS

50

N-末端に由来したものである配列番号114、配列番号108、配列番号109、配列番号110及び配列番号111で表示されるアミノ酸配列であってよい。より好ましくは、配列番号75で表示されるヒトのKRS N-末端領域の15乃至29のアミノ酸配列を含む配列（配列番号75、配列番号98、配列番号99、配列番号100乃至配列番号101）でもあって、最も好ましくは、配列番号75で表示されるヒトのKRS N-末端領域の15乃至42のアミノ酸配列（配列番号101）であってよい。

#### 【0062】

本発明で提供する“細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に特異的に結合する抗体又はその断片”は

配列番号1、配列番号13、配列番号25及び配列番号37からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1（CDR1）と；配列番号3、配列番号15、配列番号27及び配列番号39からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2（CDR2）と；配列番号5、配列番号17、配列番号29及び配列番号41からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3（CDR3）とを含む重鎖可変領域（VH）及び

配列番号7、配列番号19、配列番号31及び配列番号43からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1（CDR1）と；配列番号9、配列番号21、配列番号33及び配列番号45からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2（CDR2）と；配列番号11、配列番号23、配列番号35及び配列番号47からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3（CDR3）とを含む軽鎖可変領域（VL）；を含むことを特徴とする。

#### 【0063】

前記CDR配列で構成された抗体は、細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に特異的に結合する能力が優れる。これは本発明の明細書実施例に良く表れている。本発明の実施例では、細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に特異的に結合するscFvを製作するために、scFvファージライブラリ（phage library）スクリーニングを通じた一次選別を始めとして、間接（indirect）ELISA（二次選別）、ウエスタンブロット（三次選別）、免疫沈降（四次選別）、免疫蛍光染色（五次選別）の全5段階の実験を経てKRS N-末端結合において高い結合特異性及び結合親和力を示すscFv断片を選別した。scFvファージライブラリスクリーニングを通じた一次選別の時、合計1920個のscFvクローンが選別されたが、前記の5段階の選別を経ながら、最終的に最も特異性の高いN3 scFv、N5 scFv、N7 scFv、N9 scFv断片の4種を選別した。また、前記scFvをIgGに転換してN3 IgG、N5 IgG、N7 IgG、N9 IgGの抗体を製作し、前記の抗体又はKRS N-末端結合において高い結合特異性を示すことを確認した。

#### 【0064】

本発明に係る細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に特異的に結合する抗体又はその断片は、好ましくは下記のような重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のCDR構成を含む抗体として下記（i）、（ii）、（iii）及び（iv）は、それぞれ実施例のN3、N5、N7及びN9抗体のCDRの組合わせを示す：

（i）配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1、配列番号3で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2及び配列番号5で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3を含む重鎖可変領域と、配列番号7で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1、配列番号9で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2及び配列番号11で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3を含む軽鎖可変領域；

（ii）配列番号13で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1、配列番号15で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2及び配列番号17で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3を含む重鎖可変領域と、配列番号19で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1、配列番号21で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2及び配列番号23で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3を含む軽鎖可変領域；

(iii) 配列番号25で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1、配列番号27で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2及び配列番号29で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3を含む重鎖可変領域と、配列番号31で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1、配列番号33で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2及び配列番号35で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3を含む軽鎖可変領域；及び

(iv) 配列番号37で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位1、配列番号39で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位2及び配列番号41で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位3を含む重鎖可変領域と、配列番号43で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位1、配列番号45で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位2及び配列番号47で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定部位3を含む軽鎖可変領域；

からなる群から選択された重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むことを特徴とする抗体又はその断片。

#### 【0065】

最も好ましくは、本発明に係る前記抗体又はその断片は、下記のような重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むことを特徴とする：前記抗体又はその断片において、前記重鎖可変領域は、配列番号49 (N3 VH)、配列番号53 (N5 VH)、配列番号57 (N7 VH) 及び配列番号61 (N9 VH) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域は、配列番号51 (N3 VL)、配列番号55 (N5 VL)、配列番号59 (N7 VL) 及び配列番号63 (N9 VL) からなる群から選択されたアミノ酸配列。

#### 【0066】

前記重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体は、具体的には配列番号77、配列番号81、配列番号85及び配列番号89からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号79、配列番号83、配列番号87及び配列番号91からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖からなることを特徴とする抗体であってよい。

#### 【0067】

最も好ましくは、配列番号77で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号79で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖；配列番号81で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号83で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖；配列番号85で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号87で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖；配列番号89で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号91で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体である。

#### 【0068】

本発明に係る“細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に特異的に結合する抗体”とは、前記のCDR組合わせや、VH及びVLの組合わせを有するものであれば、その種類が制限されない。具体的な一例として前記抗体は、IgG、IgA、IgM、IgE及びIgDからなる群から選択されることでもあって、好ましくはIgG抗体であってよい。

#### 【0069】

本発明の抗体は、KRS N-末端領域に特異的に結合する前記のCDRの組合わせや、VH及びVLの組合わせを有するものであれば、モノクローナル (monoclonal) 抗体でも、ポリクローナル (polyclonal) 抗体でもよいが、抗体の重鎖と軽鎖のアミノ酸配列が実質的に同一な抗体の集団であるモノクローナル抗体であることが好ましい。

#### 【0070】

本発明の抗体は、ヒトを含む哺乳動物、鳥類等を含む任意の動物から由来したものであっても、好ましくはヒトから由来したものであるか、ヒトから由来した抗体の部分と他の種の動物から由来した抗体の部分を含むキメラ (chimeric) 抗体であってもよい。つまり、本発明はキメラ抗体、ヒト化された抗体、ヒトの抗体を全て含み、好ましくはヒトの抗体である。

#### 【0071】

また、本発明で抗体の断片は、全体抗体の抗原特異的結合力を維持している抗体の断片を意味し、好ましくは、前記断片は、母抗体のKRS N-末端結合親和度の少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、95%又は100%又はそれ以上を保有する。具体的にはFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ディアボディ(diabody)、scFv等の形態であってよい。

【0072】

Fab(fragment antigen-binding)は、抗体の抗原結合断片であって、重鎖と軽鎖それぞれの一つの可変ドメインと不変ドメインで構成されている。F(ab')<sub>2</sub>は、抗体をペプシンで加水分解させて生成される断片で、二つのFabが重鎖ヒンジ(hinge)で、ジスルフィド結合(disulfide bond)で連結された形態をしている。F(ab')は、F(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド結合を還元して分離させた、Fabの重鎖ヒンジが付加された形態の単量体抗体断片である。Fv(variable fragment)は、重鎖と軽鎖それぞれの可変領域だけで構成された抗体断片である。scFv(single chain variable fragment)は、重鎖可変領域(VH)と軽鎖可変領域(VL)が柔軟なペプチドリンカーで連結されている組換え抗体断片である。ディアボディ(diabody)は、scFvのVHとVLが極めて短いリンカーで連結されて互いに結合できず、同じ形態の他のscFvのVLとVHとそれぞれ結合して二量体を形成している形態の断片を意味する。

【0073】

本発明の目的上、抗体の断片は、細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に対する結合特異性を維持しているのであれば構造や形態の制限をされないが、好ましくはscFvであってよい。本発明に係るscFvは、前記のKRS N-末端領域に特異的なCDR構成、又はVHとVLの構成を有するものであってVHのC-末端とVLのN-末端がリンカーを介して連結されたものであれば、その配列が別に制限されない。前記リンカーは、当業界にscFvに適用されるリンカーとして知られたものであれば、その種類は特に制限されないが、好ましくは配列番号65で表示されるアミノ酸配列を含むペプチドであってよい。これにより、本発明のscFvは、具体的に配列番号67(N3 scFv)、配列番号69(N5 scFv)、配列番号71(N7 scFv)及び配列番号73(N9 scFv)からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むものであってよい。

【0074】

本発明の抗体又はその断片は、その生物学的活性を実質的に変更しない保存的アミノ酸置換(抗体の保存的変異体という)を含むことができる。

【0075】

また、前述した本発明の抗体又はその断片は、酵素、蛍光物質、放射性物質及びタンパク質等と接合されたものであってよいが、これに限定はされない。また、抗体に前記物質を接合する方法は当業界によく知られている。

【0076】

また、本発明は前述した本発明に係る抗体又はその断片を符号化するポリヌクレオチドを提供する。

【0077】

本明細書でポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド又は核酸に記載されることもあり、DNA分子(例えば、cDNA又は遺伝体(genomic DNA))、RNA分子(例えば、mRNA)、ヌクレオチド類似体を使用して生成された前記DNA又はRNAの類似体(例えば、ペプチド核酸及び非自然的に発生するヌクレオチド類似体)及びこれらのハイブリッドが含まれる。前記のポリヌクレオチドは、単一鎖(single-stranded)又は二重鎖(double stranded)になることもある。

【0078】

前記ポリヌクレオチドは、前記のKRS N-末端領域に特異的なCDRの構成、又はVHとVLの構成を有する重鎖及び軽鎖からなる抗体を符号化する塩基配列を意味する。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体又はその断片を符号化するものであれば、その配列が特に制限されないものであって、前述した本発明に係る抗体で前述したCDR配列を符号化するポリヌクレオチドは、その配列が特に制限はされないが、好ましくは配列番号2(重鎖CDR

1)、配列番号4(重鎖CDR2)、配列番号6(重鎖CDR3)、配列番号8(軽鎖CDR1)、配列番号10(軽鎖CDR2)、配列番号12(軽鎖CDR3)、配列番号14(重鎖CDR1)、配列番号16(重鎖CDR2)、配列番号18(重鎖CDR3)、配列番号20(軽鎖CDR1)、配列番号22(軽鎖CDR2)、配列番号24(軽鎖CDR3)、配列番号26(重鎖CDR1)、配列番号28(重鎖CDR2)、配列番号30(重鎖CDR3)、配列番号32(軽鎖CDR1)、配列番号34(軽鎖CDR2)、配列番号36(軽鎖CDR3)、配列番号38(重鎖CDR1)、配列番号40(重鎖CDR2)、配列番号42(重鎖CDR3)、配列番号44(軽鎖CDR1)、配列番号46(軽鎖CDR2)又は配列番号48(軽鎖CDR3)で表示される塩基配列を含むものであってよい。

【0079】

また、本発明に係る抗体で、前述したVHとVLを符号化するポリヌクレオチドは、その配列が特に制限はされないが、好ましくは配列番号50(VH)、配列番号52(VL)、配列番号54(VH)、配列番号56(VL)、配列番号58(VH)、配列番号60(VL)、配列番号62(VH)又は配列番号64(VL)で表示される塩基配列を含むものであってよい。

10

【0080】

また、前記抗体の断片を符号化するポリヌクレオチドは、好ましくは本発明に係るscFvを符号化する配列番号68、配列番号70、配列番号72、及び配列番号74からなる群から選択されるいずれか一つの塩基配列を含むものであってよい。

【0081】

本発明の抗体又はその断片を符号化するポリヌクレオチドは、当業界で公知の方法により得ることができる。例えば、前記抗体の重鎖及び軽鎖の一部又は全部を符号化するDNA配列又は該当アミノ酸配列に基づいて、当分野で公知のオリゴヌクレオチド合成技法、例えば、重合酵素連鎖反応法等を使用して合成することができる。

20

【0082】

本発明は、本発明に係る抗体又はその断片を符号化するポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。

【0083】

本発明で組換え(recombinant)とは、“遺伝子操作(genetic manipulation)”と互換して使用することができ、遺伝子に変形を加えて切断して連結する等、分子のクローニング(molecular cloning)実験技法を利用して、自然の状態では存在しない形態の遺伝子を製造することを意味する。

30

【0084】

本発明で“発現(expression)”とは、細胞からタンパク質又は核酸が生成されることを意味する。

【0085】

本発明で組換え発現ベクターとは、適切な宿主細胞(host cell)から目的とするタンパク質又は核酸(RNA)を発現することができるベクターとして、ポリヌクレオチド(遺伝子)挿入物が発現されるように作動可能に連結された必須的な調節要素を含む遺伝子製物を意味する。作動可能に連結される(operably linked)とは、一般的な機能を行うように核酸発現調節配列と、目的とするタンパク質又はRNAを符号化する核酸配列が機能的に連結(functional linkage)されているもので、発現調節配列によって遺伝子が発現されるように連結されたことを意味する。前記発現調節配列(expression control sequence)とは、特定の宿主細胞において、作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現を調節するDNA配列を意味する。そのような調節配列は、転写を実施するためのプロモーター、転写を調節するための任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位を符号化する配列、転写及び解読の終結を調節する配列、開始コドン、終結コドン、ポリアダニル化シグナル及びエンハンサー等を含む。

40

【0086】

本発明で組換え発現ベクターは、クローニングの分野で通常的に使用されるベクターであれば、その種類は特に制限されず、その例としてはプラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター及びウイルスベクター等を含むが、これらに制限され

50

ない。前記プラスミドには、大腸菌由来のプラスミド（pBR322、pBR325、pUC118及びpUC19、pET-22b(+)）、バチルス・サブチリス由来のプラスミド（pUB110及びpTP5）及び酵母由来のプラスミド（Yep13、Yep24及びYCp50）等があり、前記ウイルスはレトロウイルス、アデノウイルス、又はワクシニアウイルスのような物ウイルス、パキユロウイルスのような昆虫ウイルス等も使用できる。

【0087】

従って、本発明に係る組換え発現ベクターは、KRS N-末端領域に特異的に結合できる前述したCDR、又はVHとVLの構成を有する重鎖及び軽鎖からなる抗体又はその断片を符号化するポリヌクレオチドが適切な宿主細胞から発現されるように作動可能に連結された遺伝子作製物を意味する。

10

【0088】

本発明に係る抗体の重鎖と軽鎖を符号化するポリヌクレオチドは、それぞれ別々の組換え発現ベクターに含まれることもあって、一つの組換え発現ベクターに含まれていることもある。

【0089】

本発明は、前述した組換え発現ベクターで形質転換された細胞を提供する。

【0090】

本発明の細胞は、本発明の組換え発現ベクターに含まれた抗体、又はその断片を符号化するポリヌクレオチドを発現するために使用することができる細胞であれば、その種類は特に制限されない。本発明に係る組換え発現ベクターで形質転換された細胞（宿主細胞）は、原核生物（例えば、大腸菌）、真核生物（例えば、酵母又は他の菌類）、植物細胞（例えば、タバコ又はトマト植物細胞）、動物細胞（例えば、人間細胞、猿細胞、ハムスター（hamster）細胞、ラット細胞（rat cell）、マウス細胞（mouse cell）、昆虫細胞、又はこれらに由来したハイブリドーマであってよい。好ましくは、ヒトを含む哺乳類から由来した細胞であってよい。

20

【0091】

この目的に適した原核生物は、グラム陰性又はグラム陽性有機体、例えばエンテロバクテリアーセ（Enterobacteriaceae）、例えばエスケリチア（Escherichia）、例えば、エスケリチア・コライ、エンテロバクター（Enterobacter）、エルウィニア（Erwinia）、クレブシエラ（Klebsiella）、プロテウス（Proteus）、サルモネラ（Salmonella）、例えば、サルモネラ・ティフィムリウム（Salmonella typhimurium）、セラチア（Serratia）、例えば、セラチア・マルセッセンズ（Serratia marcescans）及び赤痢菌属（Shigella）、及びバシリー（Bacilli）、例えば、バチルス・サブチリス（B. subtilis）及びバチルス・リケニボルミス（B. licheniformis）、シュードモナス（Pseudomonas）、例えば、シュードモナス・エルギノサ（P. aeruginosa）及びストレプトマイセス（Streptomyces）を含む。本発明の細胞は、本発明のベクターを発現可能なものであれば、特に制限はされないが好ましくはエスケリチア・コライであってよい。

30

【0092】

本発明の細胞として真核生物は、サッカロマイセス・セレビヰジアエ（Saccharomyces cerevisiae）が最も一般的に使用される。しかし、多くの他の属、種及び菌株、これに限定はされないが、例えば、シゾサッカロマイセス・ボンベ（Schizosaccharomyces pombe）、クルイペロマイセス宿主、例えばクルイペロマイセス・ラクティス（K. lactis）、クルイペロマイセス・フラギリウス（K. fragilis）（ATCC 12424）、クルイペロマイセス・ブルガリクス（K. bulgaricus）（ATCC 16045）、クルイペロマイセス・ウィッカーラミー（K. wickerhamii）（ATCC 24178）、クルイペロマイセス・ワルチ（K. waltii）（ATCC 56500）、クルイペロマイセス・ドロソフィラルム（K. drosophilum）（ATCC 36906）、クルイペロマイセス・テルモトレランス（K. thermotolerans）及びクルイペロマイセス・マルシアヌス（K. marxianus）；ヤロウィア（Yarrowia）（EP 402226）；ピキア・パストリス（Pichia pastoris）（EP 183070）；カンジダ（Candida）；トリコデルマ・レシア（Trichoderma reesia）（EP 244234）；ニューロスボラ・クラサ（Neurospora crassa）

40

50

pora crassa) ; シュバーニオマイセス (Schwanniomyces) 、例えばシュバーニオマイセス・オクシデンタルレス (occidentalis) ; 及びフィラメント性真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニーシリウム (Penicillium) 、トーリボクラジウム (Tolypocladium) 及びアスペルギルス (Aspergillus) 宿主、例えばアスペルギルス・ニデュランス (A. nidulans) 及びアスペルギルス・ニガー (A. niger) が使用可能である。

【0093】

前記用語“形質転換 (transformation)”とは、外来性ポリヌクレオチドが導入されたことによる宿主細胞の遺伝子型の変形を意味し、その形質転換に使用された方法とは関係無く、外来性ポリヌクレオチドが宿主細胞内に導入されたことを意味する。宿主細胞内に導入された外来性ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム内に統合されて維持されるか、又は統合されずに維持されることがあるが本発明は両者全てを含む。

10

【0094】

本発明に係るKRS N-末端領域に特異的に結合する抗体又はその断片を発現することができる組換え発現ベクターは、当業界に公知された方法、例えば、これに限定はされないが、一過性形質感染 (transient transfection) 、マイクロインジェクション、形質導入 (transduction) 、細胞融合、カルシウムホスフェート沈殿法、リポソーム媒介された形質感染 (liposome-mediated transfection) 、DEAEデキストラン媒介された形質感染 (DEAE dextran-mediated transfection) 、ポリブレン媒介された形質感染 (polybrene-mediated transfection) 、電気穿孔法 (electroporation) 、遺伝子銃 (gene gun) 及び細胞内に核酸を流入させるための公知の方法により、抗体又はその断片を生産するための細胞内部に導入して形質転換することができる。

20

【0095】

本発明は、(a) 前記組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換する段階；

(b) 形質転換された宿主細胞を培養して抗体又はその断片を生産する段階；及び

(c) 宿主細胞で生産された抗体又はその断片を収得する段階を含む、細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素 (KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端に特異的に結合する抗体又はその断片を製造する方法を提供する。

【0096】

(a) 段階は、本発明による抗体又はその断片を生産するために、宿主細胞を前記抗体又はその断片を符号化するポリヌクレオチドが作動可能に連結された組換え発現ベクターで形質転換する段階である。

30

【0097】

通常の技術者は、選択された宿主細胞と組換え発現ベクターにより前述した通り、適切な形質転換方法を選択して本段階を実施することができる。重鎖と軽鎖の塩基配列を含む組換え発現ベクターは、同じ宿主細胞に共同形質転換して重鎖と軽鎖が一つの細胞で発現されるようにすることもでき、重鎖と軽鎖の塩基配列を含む組換え発現ベクターをそれぞれ別個の宿主細胞に形質転換して重鎖と軽鎖が別々に発現されるようにすることもできる。

【0098】

(b) 段階は、前記形質転換された宿主細胞を培養して、宿主細胞に導入された組換え発現ベクターから本発明に係る抗体の重鎖、軽鎖又は抗体断片のポリペプチドが生産されるようにする段階である。

40

【0099】

前記宿主細胞を培養するための培地組成と培養条件、培養時間等は、当業界で通常使用される方法により適宜選択することができる。宿主細胞で生産される抗体分子は、細胞の細胞質内に蓄積されるか、又は適切なシグナル序列によって細胞外部又は培養培地に分泌され、ペリプラズム等で標的化 (targeted) されるようにすることができる。また、本発明に係る抗体が、KRS N-末端に対する結合特異性を維持するように、当業界に公知されている方法を利用してタンパク質リフォールディング (refolding) させて機能性構造 (conformation) を有するようにすることが望ましい。また、IgGの形態の抗体を生産する場合

50

、重鎖と軽鎖は別々の細胞で発現させて、別の段階で重鎖と軽鎖を接触させて完全な抗体を構成するように製造することもでき、重鎖と軽鎖を同じ細胞で発現されるようにして細胞内で完全な抗体を形成するようにすることもできる。

【0100】

(c) 段階は、宿主細胞で生産された抗体又はその断片を取得する段階である。

【0101】

宿主細胞で生産された抗体又はその断片ポリペプチドの特性、宿主細胞の特性、発現方式又はポリペプチドの標的化をするか否か等を考慮して、通常の技術者は、取得方法を適切に選択及び調節することができる。例えば、培養培地に分泌された抗体又はその断片は、宿主細胞を培養した培地を取得し、遠心分離して不純物を除去する等の方法で抗体を回収することができる。必要により細胞内の特定小器官や細胞質に存在する抗体を細胞外に放出して回収するために、抗体又はその断片の機能的構造に影響を及ぼさない範囲で、細胞を溶解することもできる。また、取得した抗体はクロマトグラフィ、フィルタ等による濾過、透析等の方法により、不純物をさらに除去して濃縮する過程を追加して経ることができる。

10

【0102】

本発明の製造(生産)方法のポリペプチドは、本発明の抗体又はその断片そのものであってよく、本発明の抗体又はその断片以外の他のアミノ酸配列が追加して結合されたものであってもよい。この場合、本技術分野の通常の技術者に公知の方法を利用して、本発明の抗体又はその断片から除去することができる。

20

【0103】

本発明の抗体又はその断片は、KRS N-末端と特異的に結合するので、例えば、特定の細胞、組織、又は血清中のKRSタンパク質を検出して定量するための診断分析に有用である。特に細胞を溶解させることなく、細胞外膜に露出されたKRS N-末端を特異的に検出可能である。従って、本発明は前記抗体又はその断片を試料と接触させる段階；及び前記抗体又はその断片を検出する段階を含む、細胞外膜に露出されるリシル-tRNA合成酵素(KRS、Lysyl-tRNA synthetase) N-末端の特異的検出方法を提供する。

【0104】

本発明の前記検出方法は、本発明に係る抗体又はその断片を試料と接触させる前に、本発明に係る抗体又はその断片を利用して、KRS(又は細胞外膜で露出したKRS N-末端ペプチド)の有無と濃度を測定するための試料を準備する段階((1)段階)を含むことができる。

30

【0105】

通常の技術者は、抗体を利用してタンパク質を検出する公知の方法を適宜選択し、選択された方法に適した試料を準備することができる。また、試料は、がん(特に、乳癌又は肺癌)又はがん転移の有無を診断しようとする被検体から採取された生検等で得られた細胞や組織、血液、全血、血清、血漿、唾液、脳脊髄液等であってよい。前記抗体を利用してタンパク質を検出する方法とは、これに制限されるものではない、例えばウエスタンブロット、免疫ブロット、ドットブロット、免疫組織化学染色(immunohistochemistry)、酵素免疫分析(ELISA)、放射能免疫検定法(radioimmunoassay)、競争的結合分析、免疫沈降等がある。例えばウエスタンブロットを実施するためには、試料又は細胞の溶解物に電気泳動に適したバッファを添加して煮沸する等の方法で準備することができ、免疫組織化学染色のためには、細胞や組織の切片を固定してブロックング(blocking)する等の前処理を行うことができる。

40

【0106】

次に、本発明に係る抗体又はその断片を、前述した段階で準備した試料と接触させる段階((2)段階)を遂行する。

【0107】

本発明に係る抗体は、前述したCDR、又はVHとVLの構成を有し、KRS N-末端に特異的に結合する抗体又はその断片であって、その具体的な種類と配列の構成については、前述し

50

た通りである。

【0108】

前記抗体又はその断片はその“検出”のために、一般的に検出可能な部分(moiety)で標識することができる。たとえば、文献[Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, 1991, Coligen et. al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs]に記述された技術を利用して、放射性同位元素又は蛍光標識で標識することができる。又は様々な酵素基質標識が利用可能であり、前記酵素的標識の例は、ショウジョウバエルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4737456号)のようなルシフェラーゼ、ルシフェリン(luciferin)、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ(urease)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRPO)のようなペルオキシダーゼ、アルカリンホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-ホスフェートジヒドロゲナーゼ)、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ等を含む。抗体に酵素を接合させる技術は、例えば、文献[O'Sullivan et. al., 1981, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166]に記載されている。標識は、様々な公知の技術を利用して、抗体に直接又は間接的に接合することができる。例えば、抗体は、ビオチン(biotin)に接合することができ、前述した3種の広範囲なカテゴリに属する任意の標識がアビジンと接合するか、又はその逆に接合することができる。ビオチンはアビジン(avidin)に選択的に結合し、従って、この標識はこのような間接的方法で抗体に接合することができる。又は、抗体の標識の間接的接合を達成するために、抗体は小さいハプテン(hapten)(例えば、ジゴキシン(digoxin))と接合することができ、前述した相異した種類の標識の一つが抗ハプテン抗体に接合することができる(例えば、抗-ジゴキシン抗体)。こうして抗体に対する標識の間接的接合が達成できる。

10

20

30

40

50

【0109】

本発明の“接触(contacting)”とは、これの一般的な意味で使用されるものであり、二つの以上の物質を混合、結合、又は互いに当接することを意味する。前記接触は、試験管内(in vitro)又は別のコンテナ(container)で遂行することができ、また、インシチュ(in situ)、生体内、個体内、組織内、細胞内で行われる。

【0110】

次には、前記(2)段階遂行後の試料において、本発明に係る抗体又はその断片を検出する段階((3)段階)を行う。

【0111】

前記“検出”とは、試料内で形成された本発明に係る抗体又はその断片と抗原の複合体を対象とするものであり、KRS N-末端領域のペプチド(又はこれを含むタンパク質例えば、KRS)の存在の有無の感知又は前記ペプチドの水準を測定(定性的又は定量的測定をすべて含む)することを意味する。従って、前記(2)段階遂行後、後述する検出段階((3)段階)の前に、KRS N-末端領域と複合体を形成していない余分の抗体又はその断片を除去する段階が追加して含まれる。

【0112】

前述した(2)段階で使用された抗体又はその断片が蛍光、放射性同位元素、酵素等で直接標識される等の検出可能な部分を含んでいる場合には、該当部分を検出する当業界に公知された方法により検出を行うことができる。一例として放射能は、例えば、シンチレーション計数(scintillation counting)によって測定することができ、蛍光は、蛍光計を利用して定量することができる。

【0113】

また、前述した(2)段階で使用された抗体又はその断片自体が前述した検出部分を含まない場合には、当業界で知られているように、蛍光、放射能、酵素等で標識された二次

抗体を利用して間接的に感知することができる。前記二次抗体は、本発明による抗体又はその断片（一次抗体）に結合する。

【0114】

最近の研究を通じて、一般的に細胞質（cytosol）に存在するヒトのKRS（リシル-tRNA合成酵素、lysyl-tRNA synthetase）が原形質膜に移動されて原形質膜（細胞膜）に存在する67LR（67kDaラミニン受容体）と相互作用することにより、腫瘍（又はがん）細胞の移動を促進してがんの転移（metastasis）に影響を与えることが究明された（Dae Gyu Kim et al., Chemical inhibition of prometastatic lysyl-tRNA synthetase/aminin receptor interaction, Nat Chem Biol. 2014 Jan; 10(1): 2934）。この時、KRS N-末端延長（N-ext）領域が、KRSが細胞膜に移動（translocation）する際に、必須的なものであることがわかった。また、がん転移と関連して67LRとの相互作用において、具体的にKRS N-ext領域がこれらの結合に関与することがわかった。

10

【0115】

本発明に係る抗体及びその断片は、前記KRS N-ext領域に特異的に結合する能力が優れ、実際のKRS N-ext領域に結合されることによって、ラミニン受容体との結合（相互作用）を阻害し、がんの転移を抑制する能力が優れている。これは、本発明の明細書の実施例によく現れている。本明細書の実施例では、がんを誘発したin vivoがん転移のマウスモデルについて、本発明に係る抗体を投与した結果、濃度依存的に優れたがん転移効果を示すことを確認した。特に従来のラミニン受容体（67LR）とKRSの相互作用を阻害してがん転移を抑制することが知られているYH16899化合物と比較しても、がん転移抑制効率が極めて優れていることが分かった。

20

【0116】

したがって、本発明は、前述した本発明の抗体又はその断片を有効成分として含むがん転移抑制用薬学的組成物、及びがん診断用組成物を提供する。

【0117】

また、本発明は、前述した本発明の抗体又はその断片からなるがん転移抑制用薬学的組成物、及びがん診断用組成物を提供する。

【0118】

また、本発明は、本質的に、前述した本発明の抗体又はその断片からなるがん転移抑制用薬学的組成物、及びがん診断用組成物を提供する。

30

【0119】

前記がんは、当業界に悪性腫瘍として知られているものあれば、その種類は特に制限されないが、乳癌、大腸癌、肺癌、小細胞肺癌、胃癌、肝臓癌、血液癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部又は頸部癌、皮膚又は眼球内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門癌、結腸癌、ラッパ管癌腫、子宮内膜癌腫、子宮頸部癌、膣癌、陰門癌腫、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性又は急性白血病、リンパ球リンパ腫、膀胱癌、腎臓又は輸尿管癌、腎臓細胞癌腫、腎臓骨盤癌腫、CNS腫瘍、一次CNSリンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫及び脳下垂体腺腫からなる群から選択されるものであってよい。好ましくは本発明で前記がんは、乳癌又は肺癌であってよい。

40

【0120】

本発明は、前述した本発明の抗体又はその断片を有効成分として含む免疫細胞の移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【0121】

また、本発明は、前述した本発明の抗体又はその断片からなる免疫細胞の移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【0122】

また、本発明は、本質的に、前述した本発明の抗体又はその断片からなる免疫細胞の移動関連疾患の予防又は治療用薬学的組成物を提供する。

【0123】

50

本発明で前記用語“免疫細胞”とは、好ましくは単核球又は大食細胞を意味する。

【0124】

本発明で、用語“免疫細胞の移動関連疾患”とは、当業界に過度な免疫細胞の移動（及び浸潤）が主な発症メカニズムであることが公知されているものであれば、その具体的な種類が特に制限されない、例えば、心血管疾患、線維化疾患、慢性炎症性疾患及びアルポート症候群（Alport syndrome）からなる群から選択されるものであってよい。

【0125】

前記心血管疾患は、その具体的な種類は特に制限されないが、例えば肺動脈高血圧、粥状動脈硬化、狭心症、心筋梗塞症、虚血性脳血管疾患、細動脈硬化及び中膜硬化からなる群から選択されるものであってよい。

10

【0126】

前記線維化疾患は、その具体的な種類が特に制限されない、例えば、硬皮症（scleroderma）、リウマチ関節炎（rheumatoid arthritis）、クローン病（Crohn's disease）、潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis）、骨髄線維症（myelofibrosis）、肺線維症（pulmonary fibrosis）、肝臓線維症（hepatic fibrosis）、肝臓硬変症（liver cirrhosis）、腎臓線維症（kidney fibrosis）、筋線維症（myofibrosis）、心臓線維症、全身性紅斑性ループス（systemic lupus erythematosus）、遺伝性線維症、感染性線維症（特に、持続的感染による線維症）、刺激性線維症（タバコ、毒性物質等の刺激性物質に対する反復曝露による線維症）、慢性自己免疫による線維症、臓器移植時の抗原不適合による線維症、高脂血症による線維症、肥満による線維症、糖尿病性線維症、高血圧による線維症及びステント挿入時線維化による閉塞からなる群から選択されるものであってよい。

20

【0127】

前記慢性炎症疾患は、喘息、アトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬症、骨関節炎、痛風、乾癬性関節炎、肝硬変、非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis）、慢性閉塞性肺疾患、鼻炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎不全症、糖尿病性神経障害及び多発性硬化症からなる群から選択されるものであってよい。

【0128】

本発明に係る薬学的組成物は、本発明の抗体又はその断片を単独で含むか、一つ以上の薬学的に許容される担体をさらに含むことができる。前記で“薬学的に許容される”とは、生理学的に許容されてヒトに投与されるとき、活性成分の作用を阻害せず、通常的に胃腸障害、めまいのようなアレルギー反応又は類似した反応を起こさない非毒性の組成物を意味する。

30

【0129】

本発明に係る薬学的組成物において、前記抗体又はその断片は、臨床投与時に経口及び非経口のさまざまな剤形で投与されることがあるが、製剤化する場合には、通常使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩解剤、界面活性剤等の希釈剤又は賦形剤を使用して製造することができる。経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤等が含まれ、これらの固形製剤は一つ以上の本発明の前記化学式1のアリール誘導体、又はその薬学的に許容可能な塩に少なくとも一つ以上の賦形剤、例えば、澱粉、炭酸カルシウム、スクロース（sucrose）又はラクトース（lactose）又はゼラチン等を混ぜて調剤することができる。また、単純な賦形剤以外にステアリン酸マグネシウム、タルク等の潤滑剤も使用することができる。経口投与のための液状製剤には、懸濁剤、内用液剤、乳剤又はシロップ剤等が該当するが、よく使用される単純希釈剤である水、リキッドパラフィン以外にさまざまな賦形剤、例えば湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤等が含まれる。

40

【0130】

非経口投与のための製剤には、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁溶剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤が含まれる。本発明の治療用組成物を、任意の生理学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤（Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co. (Easton, PA: 1995)）と好ましい純度を有

50

する抗体を混合して、貯蔵するために凍結乾燥されたケーキ又は水溶液の形態で製造することができる。許容可能な担体、賦形剤又は安定剤は、使用された投与量及び濃度で需要者に無毒で、緩衝溶液、例えばリン酸、クエン酸及び他の有機酸；アスコルビン酸をはじめとする抗酸化剤；低分子量（約10個未満の残基）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性重合体、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；単糖類、二糖類及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを始めとする他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖アルコール、例えばマンニトール又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；及び（又は）非イオン性界面活性剤、例えばツイン、ブルニック又はポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。

10

#### 【0131】

本発明の抗体は、がん闘病中の個体又は免疫細胞の移動関連疾患闘病中の個体に薬学的に有効な量で投与することができる。前記“薬学的に有効な量”とは、陰性対照群に比べてそれ以上の反応を示す量を意味し、好ましくはがんの治療に十分な量又はがん転移の抑制に十分な量及び免疫細胞の移動関連疾患治療に十分な量を意味する。本発明の抗体又はその断片の総有効量は、単一投与量（single dose）で患者に投与することができ、多重投与量（multiple dose）で長期間投与される分割治療方法（fractionated treatment protocol）により投与することができる。本発明の抗体又はその断片の人体に対する投与量は、一般的に0.01～100 mg/kg/weekであり、好ましくは0.1～20 mg/kg/weekであり、さらに好ましくは5～10 mg/kg/weekであってよい。しかし、前記本発明の抗体又はその断片の容量は、薬学的組成物の投与経路及び治療回数だけでなく、患者の年齢、体重、健康状態、性別、疾患の重症度、食餌及び排泄率等、さまざまな要因を考慮して患者に対する有効投与量が決定されるので、これらの点を考慮すると、当分野の通常の知識を有する者であれば、前記本発明の抗体又はその断片について、がん転移抑制剤としての特定の用途に応じた適切な有効投与量を決定することができる。本発明に係る薬学的組成物は、本発明の効果を示す限りその剤形、投与経路及び投与方法に特に制限はされない。

20

#### 【0132】

本発明の組成物の投与経路は、公知の抗体投与方法、例えば静脈内、腹腔内、脳内、皮下、筋肉内、眼内、動脈内、脳脊髄内、又は病変内経路による注射又は注入、又は下記記載された徐放性（sustained release）システムによる注射又は注入であってもよく、これに限定されない。一例として、本発明の抗体は、全身に又は局部的に投与することができる。

30

#### 【0133】

本発明の薬学的組成物は、がんの予防又は治療のために単独で、又は手術、ホルモン療法、化学療法及び生物学的反応調節剤を使用する方法と併用して使用することができる。

また、本発明の薬学的組成物は、免疫細胞の移動関連疾患の予防又は治療のために単独で、又は手術、ホルモン療法、化学療法及び生物学的反応調節剤を使用する方法と併用して使用することができる。

#### 【0134】

本発明に係るがん（又はがん転移）の診断及び予後の評価は、生物学的試料中でKRSタンパク質（特に、細胞外膜に露出されたKRS N-末端領域）を検出することにより行うことができ、本発明に係る免疫細胞の移動関連疾患の診断及び予後の評価は、生物学的試料中でKRSタンパク質（特に、細胞外膜に露出されたKRS N-末端領域）を検出することにより行うことができる。

40

#### 【0135】

本発明において、用語“診断”とは、病理状態の存在又は特徴を確認することを意味する。本発明で前記診断は、がん又は／及びがん転移、免疫細胞の移動関連疾患の発症の可否、発症の可能性（危険性）を確認することである。

#### 【0136】

“検出”に対しては前述した通りであり、前記生物学的試料は、血液及び生物学的起源

50

のその他の液状試料、生検標本、組織培養のような固形組織試料又はそこから由来した細胞が含まれる。より具体的には例えば、これに限定はされないが、組織、抽出物、細胞溶解物、全血、血漿、血清、唾液、眼球液、脳脊髄液、汗、尿、乳、腹水液、滑液、腹膜液等であってよい。前記試料は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトから収得することができる。前記試料は、検出に使用する前に前処理することができる。例えば、濾過、蒸留、抽出、濃縮、妨害成分の不活性化、試薬の添加等を含むことができる。また、前記試料から核酸及びタンパク質を分離して検出することができる。

【0137】

本発明に係る抗体又はその断片は、診断キットとして提供することができ、前記キットは、当業界に抗体又は特定の結合ドメインを有するペプチドを構成成分として提供する分析キットとして知られたものであれば、その種類は特に制限はされないが、例えば、ウエスタンブロット、ELISA、放射性免疫分析法、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈降分析法、補体固定分析法、FACS又はタンパク質チップ用キット等を含む。

10

【0138】

本発明の抗体又はその断片は、前記のキット、すなわち診断、分析を実行するための診断キットで使用説明書と共に、あらかじめ指定された量で試薬の包装された組合わせに使用することができる。抗体が酵素に標識された場合に、キットは基質及び発色団又は蛍光団を提供する基質前駆体として酵素によって要求される補助因子 (cofactor) を含むことができる。また、安定化剤、緩衝液 (例えば、遮断緩衝液又は溶解緩衝液) 等のような他の添加剤が含まれることもある。様々な試薬の相対的な量は、分析の感度を十分に最適化させる試薬の溶液内濃度を提供するために幅広く変化することができる。試薬は、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む、一般的に凍結乾燥された乾燥粉末として提供される。

20

【0139】

本発明は、がん転移抑制用製剤を製造するための前述した本発明の抗体又はその断片の使用を提供する。

【0140】

本発明は、前述した本発明の抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがん転移抑制方法を提供する。

30

【0141】

本発明は、がん診断用製剤を製造するための前述した本発明の抗体又はその断片の使用を提供する。

【0142】

本発明は、前述した本発明の抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とするがんの診断方法を提供する。

【0143】

本発明は、免疫細胞の移動に関連疾患の治療用製剤を製造するための前述した本発明の抗体又はその断片の使用を提供する。

【0144】

本発明は、前述した抗体又はその断片の有効量を、これを必要とする個体に投与することを特徴とする免疫細胞の移動関連疾患の治療方法を提供する。

40

【0145】

本発明の“有効量”とは、個体に投与したとき、がんの改善、治療、予防、検出、診断、又はがん転移抑制又は減少効果を示す量を意味し、免疫細胞の移動関連疾患の改善、治療、予防、検出、診断、効果を示す量を意味する。前記の“個体”とは、動物、好ましくは哺乳動物、特にヒトを含む動物でもあって、動物から由来した細胞、組織、器官等であってよい。前記の個体は前記の効果が必要な患者 (patient) であってよい。

【0146】

本発明の前記“治療”とは、がん又はがん関連疾患、免疫細胞の移動関連疾患の症状を

50

改善させることを包括的に指称し、これはこれらの疾患を治癒したり、実質的に予防したり、又は状態を改善させることを含むことができ、がん又はがん関連疾患から始まった一つの症状又は大部分の症状を緩和させたり、治癒したり予防することを含むが、これに制限されるものではない。

【 0 1 4 7 】

本発明の用語“～を含む (comprising)”とは、“含有する”又は“特徴とする”と同じく使用され、組成物又は方法において、言及されていない追加的な成分要素又は方法段階等を排除しない。用語“～からなる (consisting of)”とは、別に記載されていない追加的な要素、段階又は成分等を除外することを意味する。用語“本質的に～からなる (essentially consisting of)”とは、組成物又は方法の範囲において、記載された成分要素又は段階と共にその基本的な特性に実質的に影響を及ぼさない成分要素又は段階等を含むことを意味する。

10

【 0 1 4 8 】

[ 有利な効果 ]

本発明に係る抗体又はその断片は、本明細書で記載する特定のCDR (相補性決定部位) 配列を有し、細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に特異的に結合する能力が極めて優れている。また、in vivo上でもKRS N-末端領域に特異的に標的化されるため、ラミニン受容体とKRS N-末端領域の相互作用を抑制してがん転移を抑制する効果が優れて、免疫細胞の移動を調節することができ、免疫細胞移動と関連した疾患の予防、改善及び治療等に極めて顕著な効果を示す。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 4 9 】

【 図 1 】 図1は、ウエスタンブロット (WB) を通じてKRS全長配列又はKRS N-末端断片に結合するscFvファージクローン (phage clone) を選別した結果を示す。

【 図 2 】 図2は、免疫沈降法 (IP) を通じてKRS全長配列又はKRS N-末端断片に結合するscFvファージクローン (phage clone) を選別した結果を示す。

【 図 3 a 】 図 3 a は、myc-KRS T52D (活性変異体 (active mutant)) の発現を通じて、細胞膜にKRS N-末端領域を露出された細胞を作製し、それぞれN3、N5、N7及びN9のscFvクローン (clone) が前記露出領域に結合するかを確認した結果を示す (KRS : myc-KRS T52D を意味する)。

30

【 図 3 b 】 図 3 b は、不活性変異体 (inactive mutant) (myc-KRS T52A) 又はWT-KRS (ラミニン未処理 (laminin untreated)) 発現群では、細胞膜にKRS N-末端領域の露出が起きないので、N3、N5、N7及びN9のscFvクローン (clone) を処理しても検出シグナルが表示されないことを示す。

【 図 3 c 】 図 3 c は、mycが標識されたWT-KRS、T52D、T52Aで形質転換させた細胞にラミニンを処理し、scFvを染色したとき、WT-KRSのラミニンによる膜局在 (membrane localization) とT52D変異体 (mutant) が類似した位置に染色がなされ、形質転換されたmycも同じ位置に染色がされたが、T52Aでは染色されていないことを示す (scFv : 緑色、myc : 赤色)。

【 図 4 】 図 4 は、全長 (Full length) KRS (Fで表示、配列番号76)、N末端の1~71番目のアミノ酸が欠失したKRS断片 (1で表示)、及びN末端の1~200番目のアミノ酸からなるKRS断片 (2で表示) を使用して、N3、N5、N7及びN9のscFvクローン (clone) がKRS N-末端 (N-terminus) に特異的に結合するか否かをウエスタンブロットで確認した結果を示す。

40

【 図 5 a 】 図 5 a は、本発明の抗体のうち、代表的にN3 IgG及びN5 IgGのKRSに対する結合能をウエスタンブロットで確認した結果を示す。

【 図 5 b 】 図 5 b は、本発明の抗体のうち、代表的にN3 IgG及びN5 IgGのKRSに対する結合能を免疫沈降で確認した結果を示す。

【 図 6 a 】 図 6 a は、SPR法を通じてN3 IgGのKRS N-末端に対する結合力を定量的に確認した結果を示す。

【 図 6 b 】 図 6 b は、SPR法を通じてN5 IgGのKRS N-末端に対する結合力を定量的に確認

50

した結果を示す。

【図 7 a】図 7 a は、WT-KRS を発現するように形質転換した細胞にラミニンを処理して KRS の N-末端領域が細胞外膜に露出されるようした後、本発明の抗体 N3 IgG を処理して前記露出領域に対する結合を免疫蛍光染色法で確認した結果を示す。

【図 7 b】図 7 b は、T52D-KRS (active mutant、myc tagged KRS) 発現を通じて細胞膜に KRS N-末端領域を露出した細胞を製作し、本発明の抗体 N3 IgG を処理して前記露出領域に対する結合を免疫蛍光染色法で確認した結果を示す。また、細胞膜に透過性を付与した実験では、本発明の抗体が細胞内に入り、細胞内に存在する KRS タンパク質とも結合可能であることを確認した。

【図 7 c】図 7 c は、WT-KRS を発現するように形質転換した細胞にラミニンを処理して KRS の N-末端領域が細胞外膜に露出されるようした後、本発明の抗体 N5 IgG を処理して前記露出領域の結合に対する免疫蛍光染色法で確認した結果を示す (N5 IgG : 緑色)。

【図 8】図 8 は、本発明の抗体 N3 IgG が、細胞毒性がないことを MTT アッセイ (assay) の方法で確認した結果を示す。

【図 9 a】図 9 a は、本発明の抗体 N3 IgG 処理によって細胞移動 (cell migration) が抑制されたことを確認した結果を示す。

【図 9 b】図 9 b は、本発明の抗体 N3 IgG が濃度依存的に顕著に細胞移動 (cell migration) を抑制させることを確認した結果を示す。

【図 10】図 10 は、in vivo がん転移モデルを利用した実験で、マウスのがん転移モデルの製作と治療物質 (抗体又は YH16899) の投与日程及び前記マウスモデルから肺転移を観察する実験日程を図式的に示す。

【図 11】図 11 は、in vivo がん転移モデルから本発明の抗体 N3 IgG の投与によってがんの肺転移が顕著に抑制されたことを確認できるマウスの肺標本を示す。肺試料に示される結節の数及び状態等であがん転移の進行度及び深刻度を評価することができる。

【図 12】図 12 は、in vivo がん転移モデルでは、本発明の抗体 N3 IgG の投与によって、対照群対比肺結節の生成が顕著に抑制 (すなわち、がんの肺転移が著しく抑制される) されたことを確認した結果を示す。

【図 13】図 13 は、対照群と N3 IgG の処理群での肺組織を対照的に示し、対照群では本発明の抗体処理群に比べてラミニン受容体が転移された結節部位に極めて多く発現されたことを確認した。

【図 14】図 14 は、それぞれ対照群、YH16899 処理群、N3 IgG の処理群での肺標本を示したもので、YH16899 処理群及び N3 IgG の処理群で対照群対比肺結節の生成が顕著に抑制された結果を示す。

【図 15】図 15 は、YH16899 処理群、N3 IgG の処理群において、前記がん転移抑制剤物質の処理濃度による肺転移抑制率 (肺結節生成抑制率) を示す。

【図 16】図 16 は、SPR 法を通じて N3 IgG のヒトの (human、h) KRS N-末端のペプチド断片 (F1、F2、F3、F4、F5) に対する結合力を定量的に確認した結果を示す (序列下段の灰色の棒は該当領域 (F1 ないし F5) に対する N3 抗体の結合力を示すもので、棒の色が濃いほど高い結合強度を示すことを表示する)。

【図 17】図 17 は、SPR 法を通じて N3 IgG のヒト (human、h)、マウス (mouse、m)、ラット (rat、r) KRS N-末端のペプチド断片 (F1、F3、F5) の結合力を定量的に確認した結果を示す (序列下段の灰色の棒は該当領域 (F1 ないし F5) に対する N3 抗体の結合力を示すもので、棒の色が濃いほど高い結合強度を示すことを表示する)。

【図 18 a】図 18 a は、免疫細胞 (単核球 / 大食細胞) の移動に対するコラーゲン (collagen)、ファイブロネクチン (fibronectin) 及びラミニン (laminin) の効果を、トランスウェル細胞移動アッセイ (transwell migration assay) で比較した結果として、移動細胞 (migrating cell) の顕微鏡イメージを示す。

【図 18 b】図 18 b は、前記図 18 a の顕微鏡イメージから細胞数を測定 (定量) して、グラフで表示したものである。

【図 19 a】図 19 a は、免疫細胞 (単核球 / 大食細胞) の移動に対する、様々なラミニ

ン垂型 (LN111、LN211、LN221、LN411、LN421、LN511、LN521) の効果を、トランスウェル細胞移動アッセイで比較した結果として細胞移動 (migrating cell) に対する顕微鏡イメージを示す。

【図 19b】図 19b は、図 19a の顕微鏡イメージで細胞数を測定 (定量) してそのグラフで表示したものである。

【図 19c】図 19c はLN421処理によって単核球 / 大食細胞膜でKRSが増加することをウエスタンブロットで確認した結果を示す。

【図 20a】図 20a はLN421に特異的な単核球 / 大食細胞の移動に対する、本発明の抗体N3 IgGの移動抑制効果をトランスウェル細胞移動アッセイ (transwell migration assay) で比較した結果として、移動細胞 (migrating cell) に対する顕微鏡イメージを示す。

10

【図 20b】図 20b は、図 20a の顕微鏡イメージで細胞数を測定 (定量) してグラフで表示したものである。

【図 20c】図 20c はLN421処理により単核球 / 大食細胞の膜で増加されたKRS水準が、本発明の抗体N3 IgG処理によって減少されることをウエスタンブロットで確認した結果を示す。

【図 21a】図 21a は、本発明の抗体N3 IgG投与による肺動脈高血圧 (PAH) モデルの右心室収縮期末圧力 (right ventricular end-systolic pressure; RVESP) の変化を示す (Mock IgG: 陰性対照群、Ab 1mpk: N3抗体 1mpk、Ab 10mpk: N3 抗体 10mpk、sildenafil: 両性対照群)。

20

【図 21b】図 21b は、本発明の抗体N3 IgG投与による肺動脈高血圧モデルの左心室収縮期末圧力 (left ventricular end-systolic pressure; LVESP) の変化を示す (Mock IgG: 陰性対照群、Ab 1mpk: N3 IgG 1mpk、Ab 10mpk: N3 IgG 10mpk、sildenafil: 両性対照群)。

【図 22】図 22 は、肺動脈高血圧 (PAH) モデルから、本発明の抗体N3 IgG投与により免疫細胞の移動及び浸潤が減少したことをIHC染色で確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0150】

以下、本発明を詳細に説明する。

但し、下記の実施例は、本発明を例示するものであり、本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

30

【0151】

< 実施例 1 >

scFvライブラリ (library) スクリーニング

< 1 - 1 > scFvファージ (phage) 選別 \_\_ 一次選別

KRS全長配列 (配列番号76) の中で、ラミネシグナルにより細胞膜に移動されたときに、細胞外膜に露出されるKRS N-末端 (配列番号75) 領域のみに特異的に結合するscFvを選別するために、HAタグ (tag) で標識されたヒトのB細胞に由来するscFvファージライブラリ (phage library) を利用したファージディスプレイパニング (phage display panning) 実験を実施した。本実験に使用したscFvディスプレイファージライブラリ (display phage library) (Library size: app.  $7.6 \times 10^9$  Library produced by prof. Hyunbo Shim) については、韓国登録特許10-0961392号に記載されている。下記表1に示した通り、KRS全長配列及びN-末端領域の異なる特定の領域のKRS断片がファージディスプレイパニング (phage display panning) 実験のための抗原タンパク質として使用された。

40

【0152】

1mlの1X PBS溶液を含むイムノチューブ (immuno tube) に1~10  $\mu$ gの抗原タンパク質を添加し、37 °C、200rpmで1時間反応させ、チューブの内側表面に抗原をコーティングした。抗原溶液を取出し、水道水で1回洗浄して符号化されていない抗原を除去した。抗原タンパク質とファージ間の非特異的結合を防ぐためにイムノチューブとscFvライブラリをそれぞれ3%脱脂乳が含まれた1X PBST (0.05% tween20を含むPBS) で、1時間常温で反応さ

50

せた。イムノチューブから脱脂乳を除去した後、scFvライブラリを添加して、37℃、150rpmで1時間反応させ、抗原にscFvファージが結合するようにした。scFvファージをチューブで反応させた後、1X PBSTで2～5回洗浄して結合していないscFvファージを除去した。

#### 【0153】

それぞれのKRS抗原に特異的に結合したscFvファージは常温でトリエチルアミン (triethylamine) (100mM) 1mlを添加して、10分以内に分離してTris (1M、pH 7.4) で中和させた。濾過したファージscFvをOD < 1で培養したER2537 E.coliに添加し、37℃、120rpmで1時間30分間培養しながら感染させた。ファージに感染されたE.coliは、遠心分離して培養上澄み液を一部除去した後、再分散してアンピシリンとグルコース (2%) を含む直径15cmのアガロースプレートに塗布した。翌日5ml SB培地を塗布してプレートで育った細胞を全て収得して、グリセロール (glycerol) (50%) を全体積の0.5倍になるように添加して混合し、1mlずつ分注して-80℃に保管した (scFvパニングストック (scFv panning stock))。上前記製造したストック20μlを20ml SB溶液に接種して培養し、ヘルパーファージ (helper phage) を利用して次の段階のファージパニングのためのscFvファージライブラリ (1ml) で製作した。抗原に特異的なscFvを発現するファージを分離するための前記過程を2～3回繰返した。

#### 【0154】

< 1 - 2 > ELISAを通じた結合特異的scFv抗体を選別\_\_二次選別

実施例< 1 - 1 >で選別されたファージが発現するscFvが、前述したKRS全長又はN-末端断片に結合するか否かを、間接 (indirect) ELISAを実施して調査した。

#### 【0155】

パニング (panning) を3回繰返して得たscFv結果物を希釈して、直径10cmのアガロースプレートに塗布して、翌日それぞれのコロニー (colony) を選別して、200μlのSB培地が含まれた96ウェル (well) プレートでそれぞれ培養した。全体的に増殖がよくできたことを確認し、IPTG (1mM) を添加して、30℃で16時間培養してscFvの生産を誘導した。翌日96ウェルプレートを遠心分離して細胞細胞だけを分離した後、TES溶液を利用して、細胞を溶解させ、再度遠心分離して上澄み液のみを分離した。収得した上澄み液で間接ELISAを実施して、前記抗原に特異的に結合するscFvを選別した。前記KRS全長又はN-末端断片の抗原別にそれぞれのプレートを符号化して、scFvを含む培養上澄み液を反応させた後、二次抗体で抗HA-HRP抗体 (Roche Applied Science) と反応させた。テトラメチルベンジジン (Tetramethylbenzidine) (TMB、Thermo scientific) を利用して発色反応した後、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) を利用して、発色反応を停止させ、ELISAリーダーで450nmにおいて吸光度を測定した。コントロール (Control) (ブランク (blank)) と前述した抗原 (Ag) に対して同時にELISAを遂行して、ポジティブ (positive) 値を得たコロニーだけ選別する作業を行った。ELISAに遂行されたコロニーは合計1920個、その中で、ポジティブで選別されたのは93個である (表1参照)。

#### 【0156】

##### 【表1】

|        | 抗原 (KRS断片) |      |       |       |      |      |       |       |       | 計    |
|--------|------------|------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|------|
|        | 全長         | 1-20 | 13-36 | 31-46 | 1-29 | 5-34 | 10-38 | 15-42 | 24-49 |      |
| パニング結果 | 288        | 384  | 384   | 192   | 192  | 192  | 96    | 96    | 96    | 1920 |
| ヒット    | 51         | 8    | 20    | 2     | 1    | 1    | 0     | 8     | 2     | 93   |

#### 【0157】

< 1 - 3 > 配列分析

前記実施例< 1 - 2 >でELISAスクリーニング (screening) を通じて選別された93個の

コロニーの中で重複したCDR配列を有する同一Abをフィルタリングするために、配列を分析した。具体的に配列分析は次のような方法で行われた：scFvクローン（clone）を保有しているE.coliを培養した後、ミニプレップ（miniprep）でファージミド（phagemid）を確保した。これにOmpプライマー（primer）（Hye young Yang、et. al.、2009、Mol. Cells 27、225-235）を使用して配列を確認した。このように確保された配列を、Bioeditプログラムを使用してファージミドのCDR領域の配列を確認した。このうち、重複したCDR配列を有するクローンを除去して、それぞれ独立したCDR配列のscFvクローンを確認した。

【 0 1 5 8 】

【表 2】

|         | 抗原（KRS断片） |      |       |       |      |      |       |       |       |    |
|---------|-----------|------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|----|
|         | 全長        | 1-20 | 13-36 | 31-46 | 1-29 | 5-34 | 10-38 | 15-42 | 24-49 | 計  |
| ヒット     | 51        | 8    | 20    | 2     | 1    | 1    | 0     | 8     | 2     | 93 |
| 異なるクローン | 10        | 8    | 11    | 1     | 1    | 1    | 0     | 4     | 2     | 38 |

10

【 0 1 5 9 】

配列分析により、重複されたCDR配列の抗体を選別した結果、前記の表 2 に示した通り、それぞれ異なるCDR配列のscFvクローンは38個であった。

20

【 0 1 6 0 】

< 1 - 4 > ウェスタンブロット（western blot）を通じた結合特異的scFv抗体選別 \_\_ 三次選別

前記実施例 < 1 - 3 > で分離した38個のscFvクローンを対象に、これらがKRSと特異的に結合するか否かをウェスタンブロットで確認した。

【 0 1 6 1 】

前記scFv陽性単一コロニークローンを、カナマイシンを含有するSB培地（Bactotrytone 30g、yeast extract 20g、MOPS buffer 10g/L）5 mlに培養して、種培養（seed culture）を開始して一晩（overnight）培養後、500mlカナマイシン含有SB培地に移してOD600 = 0.5程度になったときに、IPTGを1mMになるように入れて、30 で一晩培養してscFvタンパク質を大腸菌のペリプラズム（periplasm）で発現した。翌日、遠心分離して収得した大腸菌を1X TESバッファ（50 mM Tris、1 mM EDTA、20% Sucrose、pH 8.0）に懸濁した後、0.2 X TESを1.5倍添加して混合し、遠心分離して上澄み液を取ることで、ペリプラズムを抽出した。

30

【 0 1 6 2 】

ペリプラズムから抽出したscFv抗体に、最終濃度5mMでMgSO4を加えて、これを予めPBSに平衡させたNi-NTAビーズと混合し、1時間冷蔵で攪拌してNi-NTAビーズに結合させた後、アフィニティクロマトグラフィを行い、結合していないタンパク質をPBSで十分洗浄した。5 mMイミダゾール（Imidazole）が含有されたバッファにより十分に洗い流した後、結合したscFv抗体は、200 mMイミダゾールバッファを利用して溶出した。溶出された抗体は、透析して、電気泳動を通じて純度を確認して、BCA法でタンパク質定量をして、精製された抗体の量を記録した後、一定量を分注して冷凍保管した。

40

【 0 1 6 3 】

前述した通り、ペリプラズムから抽出したscFv抗体は、ウェスタンブロット（western blot）法で、KRS全長又はそれぞれのKRS N-末端断片にscFv抗体が結合するか否かを確認するために使用した。30 µgのHCT116細胞溶解物をSDS-PAGEを通じて電気泳動した後、PVD F膜に移し、3%スキムミルク（skim milk）でブロッキング（blocking）した後、抽出したscFv抗体を1.0 µg / µlずつ添加して1時間結合させた。結合していないscFv抗体を除去し、検出のために、抗原と結合したscFvにHRP（horseradish peroxidase）が連結された

50

抗-HA二次抗体を反応させた後、基質としてECL試薬を利用して、暗室でフィルム感光した。感光されたバンドは、標準分子マーカと比較してKRS全長及びそれぞれの断片のサイズに該当するバンドを確認した。

#### 【0164】

前記ウエスタンブロットを行って弱すぎるバンド (faint band)、非特異的バンド (double band) 等の結果を得たscFvクローンを除去した。このように選別されたscFvクローンは13個であり、これらの結果を図1に示す。

#### 【0165】

##### < 1 - 5 > 免疫沈降を通じた結合特異的scFv抗体選別\_\_四次選別

前記実施例< 1 - 4 >で選別されたscFvクローンが、実際の天然KRSに結合するか否かを確認するために免疫沈降 (immunoprecipitation) を行った。精製されたscFvクローンを、HCT116細胞溶解物とAg-Ab結合反応させ、scFvのHA-タグを活用して免疫沈降を行った。

10

#### 【0166】

具体的には、HCT116細胞を150mM NaCl、0.5% トライトンX-100、0.1% SDS及びタンパク質分解酵素阻害剤を含む20mM Tris-HClバッファ (pH 7.4、溶解バッファ) で溶解した。500 µgのHCT116細胞溶解物に、それぞれのscFvを5 µgずつ添加した後、4℃で一晩培養した。抗-HAアガロースビーズ30 µlを添加して、4℃で4時間培養した。遠心分離を通じて上澄み液を除去した。このように収得した沈殿物を、SDS-サンプルバッファに溶解して7分間煮沸する過程を2回繰り返した。

20

#### 【0167】

前述した過程を通じて、用意された免疫沈降試料をそれぞれSDS-PAGEを通じて電気泳動した後、PVDF膜に移し、3% スキムミルクでブロッキングした後、KRSポリクローナル抗体 (rabbit、Neomics、Co. Ltd. #NMS-01-0005) 抗体を添加して1時間結合させた。結合していない抗体を除去し、抗-ウサギ二次抗体 (ThermoFisher Scientific、#31460) を添加して反応させた。二次抗体を反応させた後、基質としてECL試薬を利用して、暗室でフィルム感光した。感光されたバンドは、標準的な分子マーカと比較してKRS全長及びそれぞれの断片のサイズに該当するバンドを確認した。

#### 【0168】

このように選別されたscFvクローンは12個であり、これらの結果を図2に示す。

30

#### 【0169】

##### < 1 - 6 > 免疫蛍光法を通じた結合特異的scFv抗体選別\_\_五次選別

前記実施例< 1 - 5 >で選別されたscFvクローンが実際細胞膜 (cell membrane) に露出されたKRS N-末端領域に結合するか否かを確認するために、免疫蛍光染色 (immunofluorescence) を行った。この時、KRSが膜に露出する現象を作るためにKRS-T52D変異体 (active mutant) を使用した。具体的にはガラスカバースリット (glass coverslip) にA549細胞を分注した後 ( $1 \times 10^5$  cell、12 well plate基準)、24時間後、それぞれmyc-KRS WT/myc-KRS T52D (active mutant) /myc-KRS T52A (inactive mutant) を過発現させた。その後、24時間培養し、無血清培地 (RPMI 1640 media) を利用して、37℃で1時間培養した。その後、10 µg/ml ラミニン (L2020; Sigma) を処理して、37℃で1時間放置して、サンプルを準備した。それぞれのmyc-KRS T52D (active mutant) 及びmyc-KRS T52A (inactive mutant) ベクターは、pcDNA3-myc-KRS WTベクターを骨格 (backbone) にして部位特異的突然変異 (site-directed mutagenesis) (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit、Agilent、#200523) を通じて製作した。

40

#### 【0170】

前記準備されたサンプルをPBS (4℃) で洗浄した後、10分間、4% パラホルムアルデヒド処理して固定させて洗浄した。10分間CASブロックを行い、前記scFv及びMyc抗体を2時間処理した。その後、非結合抗体を除去し、暗室で1時間 二次抗体と反応させた。DAPI染色を10分間遂行してマウンティングした。

#### 【0171】

50

実験結果、図3に示した通り、不活性変異体 (inactive mutant) (T52A) とWT-KRS (I aminin untreated) には結合せず、活性変異体 (active mutant) の細胞のみに結合する scFv クロームは合計4個 (N3、N5、N7及びN9) 選別された。また、WT-KRSの膜局在を誘導するためにラミニンを処理したあと、scFvを染色したとき、T52D変異体と類似した場所に染色されることを確認した。

#### 【0172】

これらクロームは細胞の表面 (tip) で特異的に結合されていることを確認した。

#### 【0173】

< 1 - 7 > KRS N-末端に対する特異的結合能の確認

前記実施例< 1 - 6 >を通じて最終選別されたscFvクローム (N3、N5、N7及びN9) が、実際のKRS N-末端に結合するか否かを確認するために、全長KRS (Fで表示、配列番号76)、N-末端の1~71番目のアミノ酸が欠失されたKRS断片 (1で表示)、及びN-末端の1~200番目のアミノ酸からなるKRS断片 (2で表示) を使用してウエスタンブロットを行った。

10

#### 【0174】

前記全長KRSとKRS断片を符号化するポリヌクレオチドを利用して、前記実施例< 1 - 6 >に記載されたのと同じ方法で、それぞれA549細胞を形質転換した。その後、細胞を溶解させて前記実施例< 1 - 4 >に記載されたのと同じ方法でウエスタンブロットを行った。

#### 【0175】

その結果、図4に示した通り、選別されたscFvクローム (N3、N5、N7及びN9) は全て、N-末端1~72アミノ酸がない断片1 (fragment 1) ではバンドを示さず、KRS 1~200アミノ酸を有する断片でのみバンドを示すことを確認した。これによりN3、N5、N7とN9及びscFvクロームは全てKRS N-末端に特異的に結合することを確認した。

20

#### 【0176】

< 1 - 8 > KRS N-末端結合特異的scFvクロームの配列分析

前記実施例< 1 - 6 >を通じて最終選別されたscFvクローム (N3、N5、N7及びN9) に対して、これらのCDRの構成及びVHとVL配列分析が行われた。配列分析は前述した実施例< 1 - 3 >と同様な方法で行われた。

#### 【0177】

配列分析の結果、N3 scFvは、配列番号67で表示されるアミノ酸配列で構成されており、前記配列は、中間に配列番号65のリンカー配列を含んでいた。これにより、N3のVHは、配列番号49で表示されるアミノ酸配列で構成されており、N3のVLは、配列番号51で表示されるアミノ酸配列で構成されていた。前記N3のVH及びVLに含まれたそれぞれのCDR配列を分析した結果、前記N3のVHは、配列番号1で表示される重鎖CDR1、配列番号3で表示される重鎖CDR2及び配列番号5で表示される重鎖CDR3を含み、前記N3のVLは、配列番号7で表示される軽鎖CDR1、配列番号9で表示される軽鎖CDR2及び配列番号11で表示される軽鎖CDR3を含んでいた。

30

#### 【0178】

N5 scFvは、配列番号69で表示されるアミノ酸配列で構成されており、前記配列は、中間に配列番号65のリンカー配列を含んでいた。これにより、N5のVHは配列番号53で表示されるアミノ酸配列で構成されており、前述N5のVLは配列番号55で表示されるアミノ酸配列で構成されていた。前記N5のVHは、配列番号13で表示される重鎖CDR1、配列番号15で表示される重鎖CDR2及び配列番号17で表示される重鎖CDR3を含み、N5のVLは、配列番号19で表示される軽鎖CDR1、配列番号21で表示される軽鎖CDR2及び配列番号23で表示される軽鎖CDR3を含んでいた。

40

#### 【0179】

N7 scFvは配列番号71で表示されるアミノ酸配列から構成されており、前記配列は、中間に配列番号65のリンカー配列を含んでいた。これにより、N7のVHは配列番号57で表示されるアミノ酸配列で構成されており、N7のVLは配列番号59で表示されるアミノ酸配列で構成されていた。前記N7のVHは、配列番号25で表示される重鎖CDR1、配列番号27で表示される重鎖CDR2及び配列番号29で表示される重鎖CDR3を含み、N7のVLは、配列番号31で表示

50

される軽鎖CDR1、配列番号33で表示される軽鎖CDR2及び配列番号35で表示される軽鎖CDR3を含んでいた。

#### 【0180】

N9 scFvは、配列番号73で表示されるアミノ酸配列から構成されており、前記配列は中間に配列番号65のリンカー配列を含んでいた。これにより、N9のVHは配列番号61で表示されるアミノ酸配列で構成されており、N9のVLは配列番号63で表示されるアミノ酸配列で構成されていた。前記N9のVHは、配列番号37で表示される重鎖CDR1、配列番号39で表示される重鎖CDR2及び配列番号41で表示される重鎖CDR3を含み、N9のVLは、配列番号43で表示される軽鎖CDR1、配列番号45で表示される軽鎖CDR2及び配列番号47で表示される軽鎖CDR3を含んでいた。

10

#### 【0181】

##### < 実施例 2 >

##### scFv抗体のIgGへの転換及び特異的結合力の評価

##### < 2 - 1 > scFv抗体のIgGへの転換

先ずクローンN3、N5、N7及びN9ファージの遺伝体からscFvを符号化するポリヌクレオチドをPCRで増幅した。前記scFvのVH領域の遺伝子の増幅に使用したプライマーの塩基配列は、下記の通りである：Forward (AGA GAG TGT ACA CTC C CA GGC GGC CGA GGT GCA G、配列番号93)、Reverse (CGC CGC TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GCT CAC GGT GAC CAG、配列番号94)。scFvのVL領域の遺伝子の増幅に使用したプライマーの塩基配列は、以下の通りである：Forward (AAG CGG CCG CCA CCA TGG GAT GGA GCT GTA TCA TCC TCT TCT TGG TAG CAA CAG CTA CAG GTG TAC ACT CCC AGT CTG TGC TGA CTC AG、配列番号95)、Reverse (CGC CGC CGT ACG TAG GAC CGT CAG CTT GGT、配列番号96)。

20

それぞれのファージDNAを鋳型として前記プライマー（それぞれ10pmol）を利用して、95 /3min；95 /30sec、60 /30sec、72 /30sec、30サイクル；72 /5minの条件でPCRを行い、N3、N5、N7、又はN9 scFvのVH又はVL遺伝子を増幅した。PCR産物は、制限酵素を利用して、IgGの生産に使用されるベクターのpcDNA3.4ベクターに挿入した。IgGの重鎖（heavy chain）と軽鎖（light chain）のタンパク質は、別のプラスミドで個別的に発現されるようにした。

#### 【0182】

前記で製造された、scFvの可変領域を含むIgG（以下、それぞれN3 IgG、N5 IgG、N7 IgG、N9 IgGをいう）の軽鎖と重鎖を符号化するDNAを含むベクターは、一過発現性（FreeStyle）293F細胞に共形質転換させて、軽鎖と重鎖が細胞内で一緒に発現されるようにした。形質転換された293F細胞を、37℃、8%CO<sub>2</sub>の条件で7日間培養して上澄み液を得た。上澄み液はセルロースアセテートメンブレンフィルター（pore size 0.22 µm、Corning）で濾過してCaptiva（商標）PriMAB protein Aカラム（Repligen、USA）を使用して精製した。収得した抗体の濃度はBCAキット（Pierce、23225）を利用して測定し、Bioanalyzer（Agilent 2100 Bioanalyzer）を利用して、還元と非還元条件で生産されたIgG抗体タンパク質を分析した。

30

#### 【0183】

##### < 2 - 2 > 転換されたIgGのKRS結合能力検証\_\_ウエスタンブロット及び免疫沈降

40

前記実施例< 2 - 1 >で製作されたIgGのKRSに対する結合能力を、ウエスタンブロット（WB）及び免疫沈降方法（IP）で検証した。前記実施例< 1 - 4 >に記載されたのと同じ方法でウエスタンブロットを行い、前記実施例< 1 - 5 >に記載されたのと同じ方法で免疫沈降を行った。

#### 【0184】

その結果、本発明で製作されたIgGは、KRSに結合することを検証し、図5ではこれらの結果を、N3 IgG及びN5 IgGを代表として示す。

#### 【0185】

##### < 2 - 3 > 転換されたIgGのKRS N-末端特異的結合力の検証\_\_SPR

精製した抗体タンパク質（N3 IgG 及び N5 IgG）と抗原（KRS 1-207aa）に対する定量

50

的な結合力を、Biacore 2000 SPR (Surface Plasmon Resonance、表面プラズモン共鳴) (GE healthcare、米国) バイオセンサーを利用して測定した。KRSをセンサーチップ (sensor chip CM5) (GE healthcare、米国) に固定させた後、HES緩衝溶液 (10 mM HEPES、pH7.4 150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% surfactant P20) に順次的に希釈した抗体タンパク質 (6.25 ~ 100 nM) を3分間、30  $\mu$ l/minの速度で流して、1M NaCl/20mM NaOHを3分間、30  $\mu$ l/minの速度で流すことにより、抗原に結合されたタンパク質の解離を誘導した。対照群としてモック (mock) IgGを使用した。具体的な実験条件は下記の通りである。

Immobilized Antigen: KRS

Immobilized level: 185 RU

Antibody: N3 IgG、N5 IgG

Running buffer: HBS-N buffer

Regeneration: 2 M NaCl、20 mM NaOH (flow 30  $\mu$ l/min 1 min)

10

【0186】

【表3】

|        | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | KD (M)   |
|--------|--------------|-------------|----------|
| N3 IgG | 1.09E+05     | 0.009055    | 8.34E-08 |
| N5 IgG | 3.13E+06     | 0.003282    | 1.05E-09 |

20

【0187】

前記表3は、Biacore 2000 SPRを利用して測定したN3 IgG、N5 IgGの運動速度定数と平衡解離定数を示したものである。BIA evaluation ver.3.2ソフトウェアを利用して、親和度を運動速度定数 ( $k_a$  及び  $k_d$ ) と平衡解離定数 (KD) で得た。図6は、それぞれN3 IgG、N5 IgGのSPRグラフ結果を示す。図6及び表3から、本発明のN3 IgG、N5 IgGは、KRS N-末端領域に特異的に高い結合力を有することを確認した。対照群のモックIgGでは結合シグナル (binding signal) がなかった。

【0188】

< 2 - 4 > 転換されたIgGのKRS N-末端特異的結合力の検証\_\_免疫蛍光染色

本発明で製作したIgGが、実際の細胞膜に露出されたKRS領域に結合するか否かを確認するために、免疫蛍光染色 (immunofluorescence) を行った。代表的にN3 IgGとN5 IgGを使用して、前記実施例< 1 - 6 >に記載されたのと同じ方法で免疫蛍光染色を行った。

30

【0189】

その結果、図7aに示した通り、ラミニンを処理してWT-KRSの膜局在を誘導した場合において、N3 IgGが細胞外膜に露出されたKRS N-末端部分に特異的に結合したことを確認した。図7bに示した通り、T52D-KRS (active mutant、myc tagged KRS) を利用した実験でも、本発明の抗体は、細胞外膜に露出されたKRS N-末端部分に特異的によく結合し、実験細胞に細胞膜透過性を付加したとき細胞内に存在するKRSタンパク質を高感度で検出した。また、図7cに示した通り、ラミニンを処理してWT-KRSの膜局在を誘導した場合にN5 IgGが細胞外膜に露出されたKRS N-末端部分に特異的に結合したことを確認した。

40

【0190】

これにより、本発明で提供する抗体は、細胞外膜に露出されたKRS N-末端部分に結合特異性が高いことを確認した。

【0191】

< 実施例3 >

がん転移抑制効能確認

< 3 - 1 > 細胞毒性の評価

代表的にN3 IgGを利用してMTTアッセイを行った。A549細胞 (5000 cell/well) を96ウェルプレートに分注して培養した。無血清培地を使用して前記細胞を洗浄した後、ヒトモックIgGとN3 IgGをそれぞれ0、50、100、500nMの濃度 (in serum free media) で処理し

50

た。24時間培養した後、MTT溶液を50  $\mu$ g/wellずつ添加して4時間処理した。MTT溶液を除去した後、DMSO 100  $\mu$ lを処理して、570nmでの吸光度を測定した。

【0192】

実験の結果、図8に示した通り、本発明の抗体は細胞毒性を示さないことを確認した。

【0193】

<3-2>細胞移動 (cell migration) 分析

細胞移動は、先行文献 (Park, S.G. et al. Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger pro-inflammatory response, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 6356-6361 (2005)) に記載した通り、ポリカーボネート膜 (8.0  $\mu$ m 空隙サイズ、Costar) を有する24ウェルトランスウェルチャンバで測定した。前記トランスウェルチャンバで下側ウェル (lower well) を10  $\mu$ g ラミニン (in gelatin) で符号化し、UVで乾燥した。その後、A549細胞を無血清 (serumfree) RPMI 培地に懸濁した後、次の各ウェル当たり $1 \times 10^5$ 細胞の濃度で上側チャンバに入れた。N3 IgG又はヒトモック (human mock) IgG (対照群) を100 nM又は500nMで前記チャンバに処理し、24時間培養した。その後、PBSで2回洗浄し、70% MeOH (in PBS) を30分間処理した。再びPBSで2回洗浄してヘマトキシリン (Hematoxylin) 溶液を30分間処理した。前記チャンバをDWで3回洗浄して、チャンバ内の膜 (membrane) を切断してスライドガラス (slide glass) の上にマウンティングした。

10

【0194】

実験の結果、図9aに示した通り、N3 IgGはA549細胞の移動を顕著に抑制する効果を示した。また、これらの細胞の移動抑制効果は濃度依存的であることを示した (図9b参照)。

20

【0195】

<3-3> in vivoがん転移モデルで、がん転移抑制効果の評価

KRSががん転移に関連した67LRを通じて細胞移動を促進することができるので、肺転移が良くなされるマウス乳がん4T-1細胞 (韓国セルバンク) を使用して、腫瘍動物モデルを製作した。7週齢のBALB/cAnCrマウス (ツヨルバイオテック) 6匹に $4 \times 10^4$  cellsの4T1細胞を、マウスの脂肪パッド (fat pad) に注入して同所性移植乳がんの動物モデル (orthotopic model) を製作した。

【0196】

乳房脂肪パッド (mammary fat pad) にがんを注入して10日後 (day 10)、脂肪パッドからがん組織を除去した。1日後 (day 11)、N3 IgGを3日間隔、週2回、2週間 (計4回、day 11、14、18、21)、10 mg/kgずつ、尾血管静脈注射 (tail vein i.v. injection) 方法で投与し、対照群モック (control mock) IgG (Thermo #31154) も同じ容量で投与した。全ての抗体投与の日程終了一週間後、がんを注入して28日後にマウスを犠牲にして肺組織を得た。肺組織解剖時、気管支に注射器を利用して生理食塩水を注入、肺を膨らませた後、採取してブアン液 (Bouin's solution) (Sigma #HT10132) に24時間保管した。以後顕微鏡を通じて肺の各葉から転移した結節 (metastasis nodule) の数を確認した。

30

【0197】

実験の結果、図11及び図12に示した通り、対照群ではがん転移により肺に多くの結節が生じたことを確認することができ、N3 IgGの処理群ではこれらの結節が著しく抑制されたことを確認した。図13は、対照群とN3 IgGの処理群での肺組織を対照的に示し、対照群では本発明の抗体処理群に比べて、転移した結節部位でラミニン受容体が極めて多く発現されたことを確認した。

40

【0198】

<3-4> in vivoがん転移モデルにおける抗がん転移化合物 (YH16899) との効能の比較

従来の "Dae Gyu Kim et al., (2014)" の文献で、YH16899の化合物が67LRとKRSの相互作用を抑制して、がん転移抑制に効果があることが知られていた。ここで、YH16899と、本発明の抗体N3 IgGのがん転移抑制効能を比較した。in vivo腫瘍モデルの製作と肺転移の状態の観察は、前記実施例<3-3>と同様な方法で行われた。YH16899は100mpkずつ

50

毎日経口投与された。N3 IgGは、それぞれ濃度別（1mpk、10mpk）にマウスの尻尾を通じて静脈内注射された。

#### 【0199】

実験結果を図14及び図15に示した通り、N3 IgG処理群で濃度依存的に肺結節の数が著しく減少していることを確認し、YH16899 100mpk処理群と比較して1mpkの容量でN3 IgGを処理するだけでもがん転移が著しく抑制されることを確認した。

#### 【0200】

##### <実施例4>

##### KRS抗体の結合位置確認

##### <4-1> KRSモノクローナル抗体のヒトのKRSに結合する位置

前記で製造したKRS抗体のうち、N3 IgGがヒトのKRSに結合する位置を確認するために、次のようにSPR（Surface Plasmon Resonance）実験を実施した。

#### 【0201】

まず、アミンカップリングキット（GE Healthcare）を利用して、N3 IgG抗体をSeries Sセンサーチップ CM5（GE Healthcare）が装着されたBiacore T200（GE Healthcare）に固定した。その次に、表4に記載されたペプチドをPBS溶液に該当濃度で溶かし、60秒間流した。その後の5分間、PBSを流した。その後、Biacore T200 Evaluationソフトウェアv2.0（GE Healthcare）で結合力を分析した。

#### 【0202】

##### 【表4】

##### ペプチド情報

| 名称          | 配列情報                           | Species | MW   | 配列番号 |
|-------------|--------------------------------|---------|------|------|
| F1 (1-29)   | MAAVQAAEVKVDGSEPKLSKNELKRRLKA  | H       | 3168 | 97   |
| F2 (5-34)   | QAAEVKVDGSEPKLSKNELKRRLKAEKKVA | H       | 3351 | 98   |
| F3 (10-38)  | KVDGSEPKLSKNELKRRLKAEKKVAEKEA  | H       | 3310 | 99   |
| F4 (15-42)  | EPKLSKNELKRRLKAEKKVAEKEAKQKE   | H       | 3337 | 100  |
| F5 (24-49)  | KRRLKAEKKVAEKEAKQKELSEKQLS     | H       | 3084 | 101  |
| mF1 (1-28)  | MATLQESEVKVDGEQKLSKNELKRRLKA   | M       | 3230 | 102  |
| mF2 (3-34)  | QESEVKVDGEQKLSKNELKRRLKAEKKLA  | M       | 3383 | 103  |
| mF3 (10-37) | KVDGEQKLSKNELKRRLKAEKKLAEKEA   | M       | 3268 | 104  |
| mF4 (15-41) | QKLSKNELKRRLKAEKKLAEKEAKQKE    | M       | 3253 | 105  |
| mF5 (24-48) | RRLKAEKKLAEKEAKQKELSEKQLN      | M       | 2997 | 106  |
| rF1 (1-28)  | MATLREGEVKLDGEPKLSKNELKRRLKA   | R       | 3211 | 107  |
| rF2 (3-34)  | REGEVKLDGEPKLSKNELKRRLKAEKKLA  | R       | 3364 | 108  |
| rF3 (10-37) | KLDGEPKLSKNELKRRLKAEKKLAEKEA   | R       | 3251 | 109  |
| rF4 (15-41) | PKLSKNELKRRLKAEKKLAEKEAKQKE    | R       | 3222 | 110  |
| rF5 (24-48) | RRLKAEKKLAEKEAKQKELSEKQLN      | R       | 2997 | 111  |

#### 【0203】

その結果、図16に示した通り、エピトープF1、F2、F3、F4では、N3 IgG抗体が結合することが示されたが、F5では、N3 IgG抗体が結合していないことが分かった。また、エピトープF4の場合に結合力が最も強く現れ、F3、F2、F1の順で結合力が強く表れた。

#### 【0204】

これを通じて、N3 IgG抗体が主に結合する位置は、KRS N-末端領域の15乃至29アミノ酸の部位であることが確認できた。

#### 【0205】

##### <4-2> KRSポリクローナル抗体の他の種間交差反応性（cross activity）

前記の実施例では、KRS抗体であるN3 IgGがヒトのKRSに結合する位置を確認し、N3 IgGが他の種であるマウス（m）、ラット（r）と交差反応性を示すかを確認するために、次の

ようにSPR (Surface Plasmon Resonance) 実験を行った。

【0206】

前記実施例<4-1>に記載されている実験方法と同じく、アミンカップリングキット (GE Healthcare) を利用して、N3 IgG抗体をチップに固定し、前記の表4に記載されたペプチドをPBS溶液に該当濃度で溶かし、60秒間流した後、次の5分間PBSを流した。その次にBiacore T200 Evaluationソフトウェアv2.0 (GE Healthcare) で結合力を分析した。

【0207】

その結果、図17に示した通り、N3 IgG抗体がヒト(h)、マウス(m)、ラット(r)のエピトープF1、F2、F3、F4と結合し、F5とは結合していないことが分かった。また、エピトープF3がF1に比べて結合力が強いことも、ヒト、マウス、ラットで同じく示された (F2、F4 データ図示せず)。

10

【0208】

これにより、N3 IgG抗体について種間の交差反応が可能であることが確認できた。

【0209】

<実施例5>

免疫細胞の移動及び浸潤において、ラミニンシグナルの役割確認

血管を構成している複数の細胞外基質の中で、どれが単核球/大食細胞の移動及び浸潤を促進するかを確認した。細胞外基質として、コラーゲン (collagen)、フィブロネクチン (fibronectin) 及びラミニン (laminin) を使用して、トランスウェル細胞移動アッセイ (transwell migration assay) を行った、具体的な実験方法は次の通りである。トランスウェル (Transwell) (Corning、#3421-5mm) をゼラチン (gelatin) (0.5mg/ml) でコーティングした後、RAW 264.7細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/well) を上側チャンバに分注した。ラミニン、フィブロネクチン、又はコラーゲンをそれぞれ含む無血清 (serum free) DMEM (500  $\mu$ l) を下側チャンバに入れた。24時間後に膜の上部に存在する非移動 (non-migrating) 細胞を綿棒で除去した。下側チャンバの細胞を70%メタノールで30分処理して固定した後、50%ヘマトキシリンで30分間染色した。染色後、膜をとり、スライドにマウンティングして膜の下面に存在する移動細胞 (migrating cell) を高倍率顕微鏡で観察して定量した。

20

【0210】

実験の結果、図18a及び図18bに示した通り、多くの細胞外基質の中でラミニンが最も強く単核球/大食細胞の移動を促進することを確認した。

30

【0211】

<実施例6>

ラミニン亜型 (subtype) 別免疫細胞の移動及び浸潤効果

免疫細胞の移動及び浸潤において、ラミニン亜型による効果を評価した。様々なラミニン亜型タンパク質 (Biolaminaから購入) としてLN111、LN211、LN221、LN411、LN421、LN511、LN521を10  $\mu$ g/mlずつ使用して、実施例5と同じ方法でトランスウェル細胞移動アッセイを行った。前記ラミニン亜型の具体的な配列は、各ラミニン亜型を構成している鎖に沿って配列番号115の $\alpha$ 4鎖、配列番号121の $\alpha$ 2鎖、配列番号122の $\alpha$ 5鎖、配列番号117の $\beta$ 2鎖、配列番号123の $\beta$ 1鎖、配列番号119の $\gamma$ 1鎖を参照にすることができる。

40

【0212】

また、RAW 264.7細胞 ( $2 \times 10^6$  cell) 18hr培養後無血清DMEM培地にラミニン亜型をそれぞれ1  $\mu$ g/mlで処理後、0h、12h、24hに収得した。ProteoExtractSubcellular Proteome Extraction Kit (Calbiotech、cat# 539790) を使用して、RAW 264.7細胞タンパク質を細胞質 (cytosol) と膜 (membrane) の分画 (fraction) に分離した。得られたタンパク質を電気泳動した後、PVDF膜 (Milipore) に移して3%スキムミルクでブロッキングした。その後、KRSポリクローナル抗体 (rabbit、Neomics、Co. Ltd. #NMS-01-0005) を添加して1時間結合させた。結合していない抗体を除去し、抗-ウサギ二次抗体 (ThermoFisher Scientific、#31460) を添加して反応させた。二次抗体を反応させた後、基質としてECL試薬を利用して、暗室でフィルム感光した。感光されたバンドは、標準分子マーカーと比較し

50

てKRSのサイズに該当するバンドを確認した。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Abcam) とチューブリン (tubulin) 抗体をそれぞれ原形質膜 (plasma membrane) とサイトゾルマーカ―確認用に使用した。

#### 【0213】

実験の結果、図19a及び図19bに示した通り、単核球/大食細胞はラミニンの中でも $\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$ 亜型に特異的に反応して移動することを確認した。つまり、単核球/大食細胞は、LN421に特異的に移動及び浸潤することを確認した。また、図19cに示した通り、単核球/大食細胞にLN421を処理する場合、細胞質領域でKRS検出量が一部減少されるのとは比べて、細胞膜領域にKRS検出量が増加することを確認した。これらの結果は、単核球/大食細胞が細胞内で発現され、一般的に細胞質領域に存在しているKRSがLN421処理によってサイトゾル (cytosol) の領域に移動することを示唆し、免疫細胞膜領域でKRSが増加する現象は、免疫細胞の移動及び浸潤に関連した疾患に対して重要な病理現象であると考えられた。

#### 【0214】

##### <実施例7>

##### 細胞膜KRS水準減少のための抗体製作及び免疫細胞の移動/浸潤制御効果確認

前記実施例1で製作した抗体のうち、代表的にN3 IgG抗体を利用して、免疫細胞の移動及び浸潤に対する効果を確認した。具体的な実験方法は以下の通りである。トランスウェル (Transwell) (Corning#3421-5mm) をゼラチン (gelatin) (0.5mg/ml) 標的化して、その後RAW 264.7細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/well) を上側チャンバに分注 (seeding) した。ラミニン421 (1  $\mu$ g/ml) を含む無血清DMEM (500  $\mu$ l) を下側チャンバに入れた。各抗体は、上側チャンバに100 nMの濃度で処理した。24時間後に70%メタノールで30分間固定させた後、50%ヘマトキシリンで30分間染色した。膜の上部に存在する非移動 (non-migrating) 細胞を綿棒で除去した後、膜をとり、スライドにマウンティングした。膜の下面に存在する移動細胞を高倍率顕微鏡で観察して (図20a) 収得された画像から細胞数を測定してグラフで表示した (図20b)。

#### 【0215】

また、RAW 264.7細胞にラミニン421 (1  $\mu$ g/ml) 及び抗体 (100 nM) を処理して、24時間培養して収得し、その後、ProteoExtract subcellular proteom extraction kit (Calbiochem) を使用して膜とサイトゾル画分に分けてサンプリングした後、KRSに対してウェスタンブロットを行った。具体的な方法は実施例6で記載した通りである。

#### 【0216】

実験の結果、図20a及び図20bに示した通り、本発明の抗体が特異的に、LN421依存的な単核球/大食細胞の移動を効果的に阻害することを確認した。また、図20cに示した通り、LN421処理は、単核球/大食細胞細胞膜のKRS水準を増加させ、N3 IgG抗体処理により細胞膜のKRS水準が効果的に減少したことを確認した。だけでなく、N3 IgG抗体処理群では、細胞のKRS水準も減少したことが確認された。

#### 【0217】

これにより、本発明の抗体は、単核球/大食細胞のような免疫細胞の移動が問題となる疾患に対する新たな治療剤としての可能性を確認した。

#### 【0218】

##### <実施例8>

##### 免疫細胞の移動関連疾患のin vivoモデルで効能確認

前記実施例のように、本発明の抗体のうち代表的にN3 IgG抗体を利用して、次のように実験を実施した。

#### 【0219】

##### [実験方法]

##### 1. 肺高血圧 (PAH) 症モデル製作及び試験物質投与

7週齢のSDラットにPAHを誘導するために、MCT (monocrotaline) 60 mpkを皮下注射した。以降4つの群に分けて (各群当たり5匹で実験)、それぞれヒトモックIgG (Thermo Fi

10

20

30

40

50

sher Scientific、音声対照群) 1mpk、N3 IgG 1mpk、N3 IgG 10mpk、シルデナフィル (sildenafil) (両性対照群) 25 mpkを3週間投与した。全ての抗体は週 2回iv注射し、sildenafilは毎日経口投与した。

#### 【0220】

##### 2. 血流及び血圧測定

3週間後、ラットをイソフルランで麻酔し、動物用超精密空圧測定システム (MPVS Cardiovascular Pressure and Volume system、モデル名: MPVS Ultra、製造会社名: Millar Instruments) を利用して血流と圧力を測定した。右心室収縮気圧 (RVESP) 及び弛緩気圧、左心室収縮気圧及び弛緩気圧は、専用カテーテル (Mikro-Tipratpressurecatheter、製造会社名: Millar Instruments) を利用して測定した。心拍出量は、血管周囲 (perivascular) 血流プローブ (TransonicFlowprobes、製造会社名: Millar Instruments) を利用して測定し、これに対する実験技法は下記文献に記載されたのと同じ方法で実行された: Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai Sm Kass DA; Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. Nat Protoc 2008; 3(9): 1422-34.

10

#### 【0221】

##### 3. 免疫組織化学染色 (immunohistochemistry、IHC)

採取した肺を通常的な過程に従ってPFA (paraformaldehyde) に固定させた後、水洗、脱水、透明過程を経てパラフィン浸透させて包埋した。ラットの肺組織パラフィンブロックを6µmの厚さで薄切してスライドを製作した。その後、次のように染色を行った。まず、5分間、3回キシレン処理後、100%エタノール、95%エタノール、90%エタノール、70%エタノール、DWの順に2分間処理してPBSで 5分間洗浄した。0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の処理後、サンプルをPBSで5分間、2回洗浄した。0.01Mクエン酸バッファに浸して加熱した後、PBS-T (0.03% tween 20) で洗浄した。以後30分間室温でブロッキング (2% BSA & 2% goat serum in PBS) した。抗-CD68抗体 (1: 200、ED1 clone、Abcam) で、4℃で一晩染色した。PBS-Tで5分間、3回洗浄した後、ポリマー-HRP抗 - マウス可視化キット (DAKO) で、4℃で1時間処理した。PBS-Tで3回洗浄した後、DAB基質バッファ及びDAB色原体 (chromogen) 20を処理して発色させた。染色された組織を1分間マイヤーヘマトキシリン (Mayer's hematoxylin) (Sigma) で処理した後、70%エタノール、90%エタノール、95%エタノール、100%エタノールの順でそれぞれ2分間、2回処理した。最後に、5分間、3回キシレン (xylene) 処理した後、光学顕微鏡で観察した。

20

30

#### 【0222】

##### [ 実験結果 ]

##### < 8 - 1 > 血圧及び心拍出量の変化確認

免疫細胞の浸潤が病理現象と深く関係した疾患であるPAHモデルに、N3 IgG抗体を1 mpk又は10 mpkで3週間処理した後 (iv、週2回)、右心室収縮終期圧 (right ventricular end-systolic pressure; RVESP)、右心室拡張終期圧 (right ventricular end-diastolic pressure; RVEDP)、左心室収縮終期圧 (left ventricular end-systolic pressure; LVE SP)、左心室拡張終期圧 (left ventricular end-diastolic pressure; LVEDP) 及び心拍出量 (cardiac output; CO) を測定して、その結果を表5に示す。

40

#### 【0223】

【表 5】

|              | MCT + mock IgG<br>(n = 4) | MCT + N3 Ab 1 mpk<br>(n = 5) | MCT + N3 Ab 10 mpk<br>(n = 5) | MCT + Sildenafil<br>(n = 5) |
|--------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| RVESP (mmHg) | 62.5 ?5.7                 | 45.0 ?8.1                    | 41.2 ?7.7                     | 48.4 ?9.6                   |
| RVEDP (mmHg) | 2.8 ?1.5                  | 1.4 ?2.2                     | 3.8 ?1.3                      | 2.6 ?1.3                    |
| LVESP (mmHg) | 81.5 ?11.4                | 95.8 ?4.8                    | 93.4 ?11.3                    | 83.2 ?4.7                   |
| LVEDP (mmHg) | 1.0 ?0.8                  | 2.6 ?1.9                     | 4.6 ?3.9                      | 3.6 ?2.3                    |
| CO (ml/min)  | 58 ?4.7 (n = 4)           | 74.0 ?10.9 (n = 5)           | 59.8 ?12.9 (n = 5)            | 49.6 ?17.7 (n = 4)          |

(MCT + mock IgG処理群 1匹は麻酔死した。Sildenafil処理群 1匹は、手術中に斃死してCO測定できなかった。)

10

## 【0224】

肺動脈高血圧は、肺動脈が狭くなることにより右心室の圧力が上昇し、結果的に右心室不全をもたらす。また、継続的な高血圧によりその補償メカニズムが破壊されると、右心室肥大に続いて右心室拡張が起きようになる。これは心室中隔の移動に因る左心室の圧迫をもたらすことになり、左心室の拡張終期容積及び心拍出量の減少をもたらすことになる (Korean Circulation J 2007; 37: 265-270)。結果的に肺動脈高血圧は、主に右心室と関係するが、左心室の機能とも関連付けられる。

## 【0225】

PAH患者ではRVESPが増加され、これは、本実験のPAH動物モデルでも確認された。これに対して図 2 1 a に示した通り、N3抗体は両方の濃度の全てから有意にRVESPを減少させ、特に陽性対照群の薬物であるシルデナフィルより優れてRVESPを減少させた。

20

## 【0226】

また、N3 IgG抗体の投与による左心室収縮終期圧 (LVESP) 減少は観察されず、むしろ本発明の抗体を投与した群では、図 2 1 b に示した通り、LVESPが有意に増加する結果を示した。これは、従来の肺動脈高血圧症の治療剤として使われているシルデナフィルの場合、肺動脈の拡張だけでなく、全身動脈の拡張も誘発して、全身血圧 (systemic blood pressure) を低下させる危険性があるのに対比されるものである。

## 【0227】

すなわち、本発明の抗体はシルデナフィルと比較して、全身動脈圧 (systemic artery pressure) に及ぼす影響が低い傾向を示すことを確認し、これらの効果は臨床現場でシルデナフィル投与時低血圧のリスクを懸念している状況があることを考慮したとき、治療薬剤の有利な特性になるものと思われた。だけではなく、肺動脈高血圧症が甚だしい場合、収縮期右心室不全 (systolic RV failure) が発生することにより、低心拍出量 (cardiac output) 及び全身低血圧 (systemic hypotension) が伴われることがある。

30

## 【0228】

これに対して、本発明の抗体による肺動脈高血圧症を好転させる治療によって心拍出量 (cardiac output) と全身血圧 (systemic blood pressure) が上昇して、血圧が正常化される効果が予想される。

## 【0229】

総合して、これにより、本発明の抗体を投与することは、従来の治療薬物の副作用の可能性を改善してPAHの症状緩和及び治療効果を示すことを確認した。

40

## 【0230】

## &lt; 8 - 2 &gt; 心超音波検査 (Echocardiography)

右心室の圧力の過負荷を示唆するD字型左心室 (D-shaped left ventricle) 所見は、MCT単独投与群 (つまり、実験物質非投与PAHモデル) で3匹、MCT+シルデナフィル投与した群の3匹からそれぞれ観察され、治療抗体を投与した群では観察されなかった。

## 【0231】

だけでなく、下記表 6 に示した通り、各群の体重は、ほぼ似通った同程度に増加して有意的な差がなかった。つまり、治療抗体の投与を通じた非正常的な体重減少をはじめとす

50

る異常兆候を示唆する所見は観察されなかった。

【 0 2 3 2 】

【 表 6 】

|          | MCT + mock IgG<br>(n = 4) | MCT + Ab 1 mpk<br>(n = 5) | MCT + Ab 10 mpk<br>(n = 5) | MCT + Sildenafil<br>(n = 5) |
|----------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 絶対変化(g)  | 101.4 ?14.2               | 113.5 ?14.6               | 104.1 ?12.3                | 104.1 ?26.4                 |
| 相対変化 (%) | 48.8 ?7.8                 | 43.6 ?5.2                 | 40.7 ?5.0                  | 49.8 ?10.5                  |

10

【 0 2 3 3 】

< 8 - 3 > 単核球 / 大食細胞の移動及び浸潤程度確認

各実験群の肺組織を利用して、単核球 / 大食細胞マーカーのCD68のIHC染色を行った。実験結果図 2 2 に示した通り、本発明のN3 IgG抗体処理群は、単核球 / 大食細胞の肺組織浸潤を明確に減少させたことを確認し、これらの効果はシルデナフィルより著しく優れたことを確認した。

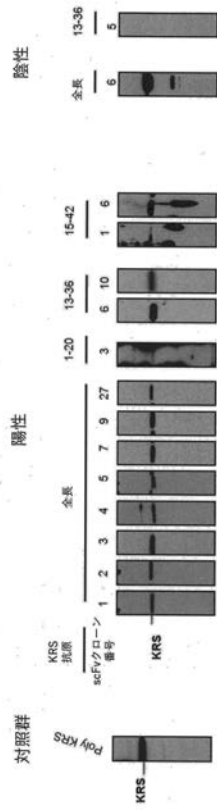
【 産業上の利用可能性 】

【 0 2 3 4 】

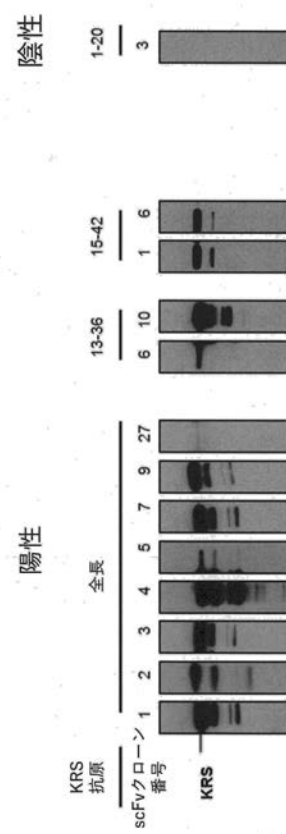
以上察した通り、本発明に係る抗体又はその断片は、本明細書で記載する特定のCDR (相補性決定部位) 配列を有し、細胞外膜に露出されるKRS N-末端領域に対する特異的結合能力が極めて優れているため、KRSの特異的形態を伴う疾病 (例えば、がん) として知られている疾病の診断に利用可能である。また、in vivo上でもKRS N-末端領域に特異的に標的化されるため、ラミニン受容体とKRS N-末端領域の相互作用を抑制して、がん転移を抑制する効果が優れているので、治療剤として利用することができ、免疫細胞の移動を調節することができて、免疫細胞の移動と関連した疾患の予防、改善及び治療等に極めて有用に使用することができるので、産業上の利用可能性が大きい。

20

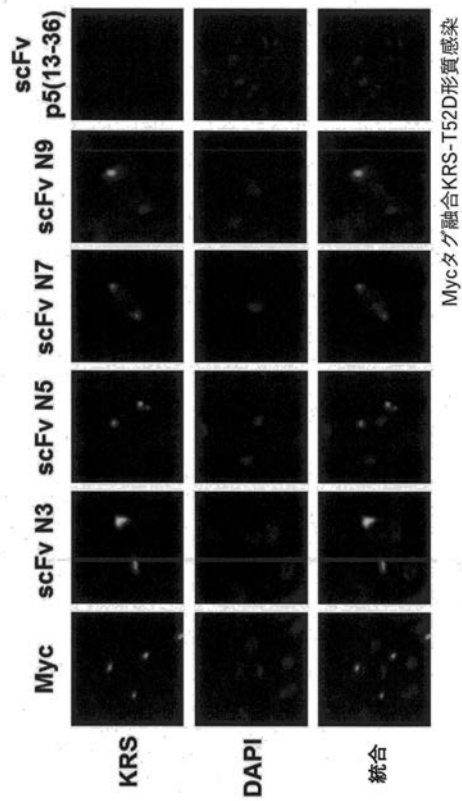
【図 1】



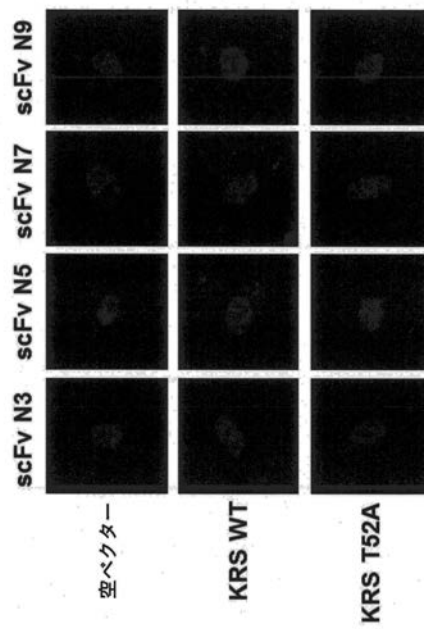
【図 2】



【図 3 a】

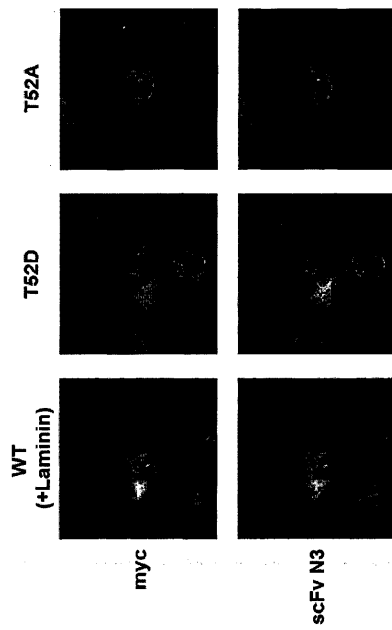


【図 3 b】

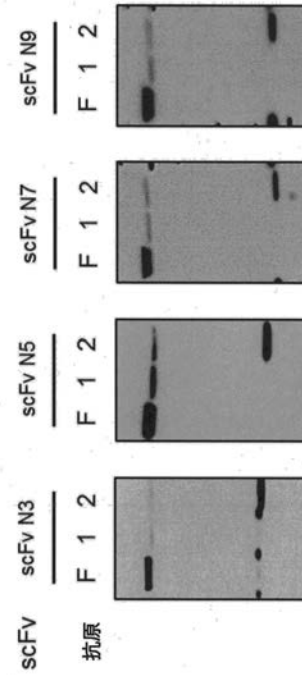


【 図 3 c 】

【 図 3c 】

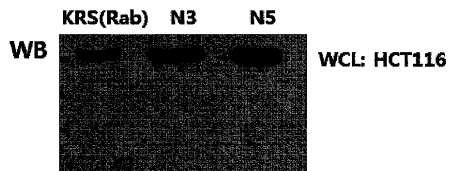


【 図 4 】



【 図 5 a 】

【 図 5a 】

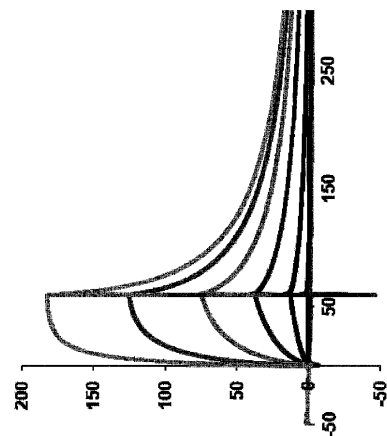
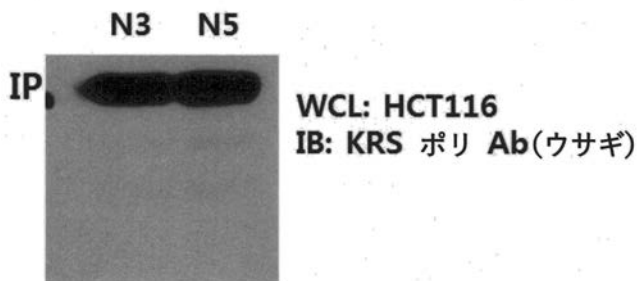


【 図 6 a 】

【 図 6a 】

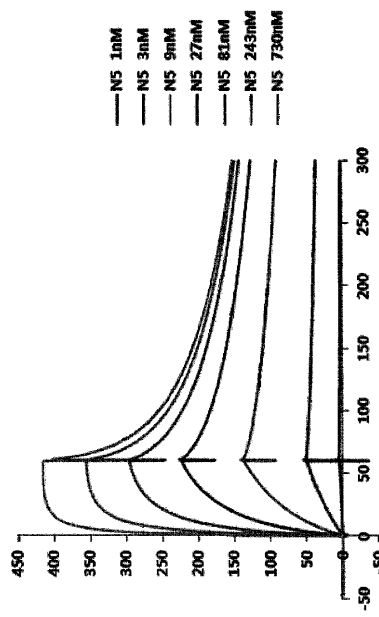


【 図 5 b 】

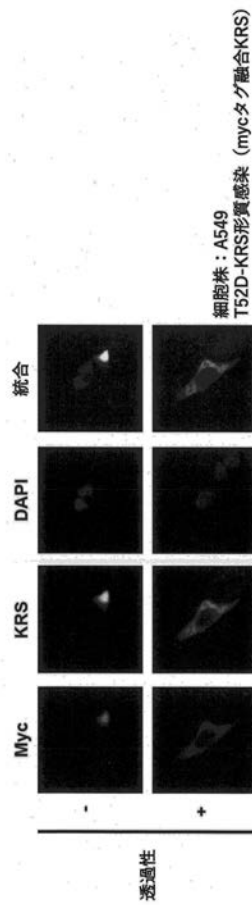


【図 6 b】

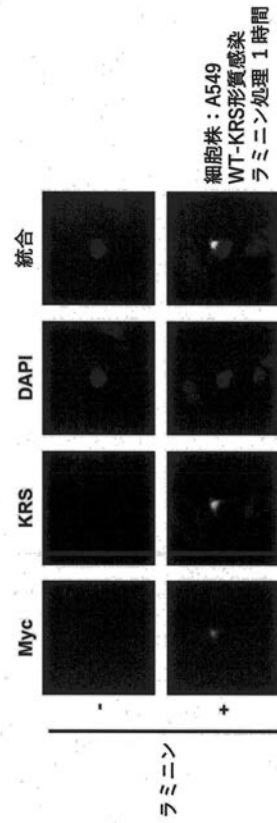
【 6b】



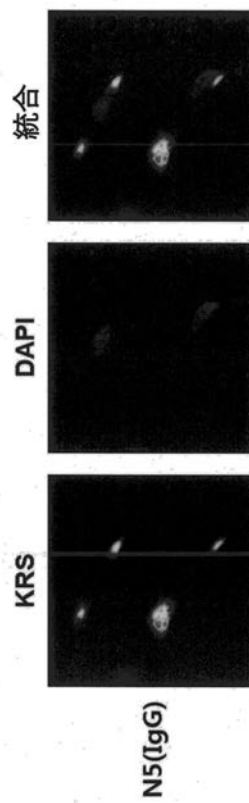
【図 7 b】



【図 7 a】

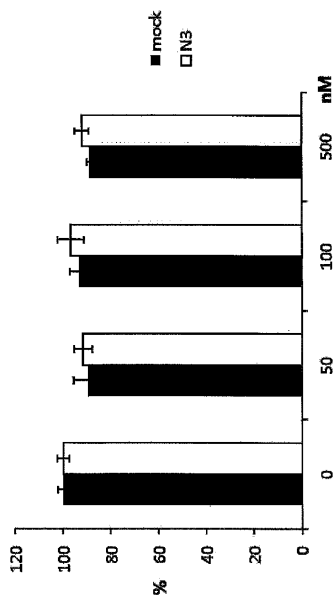


【図 7 c】

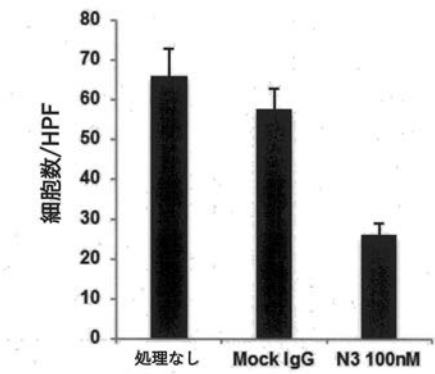


【 図 8 】

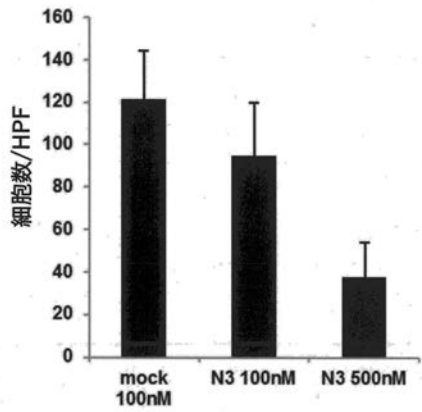
【 図 8 】



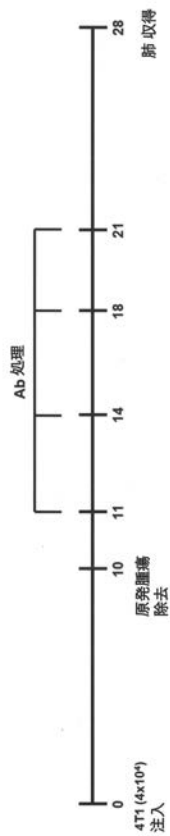
【 図 9 a 】



【 図 9 b 】

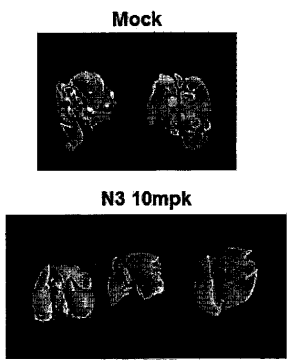


【 図 1 0 】

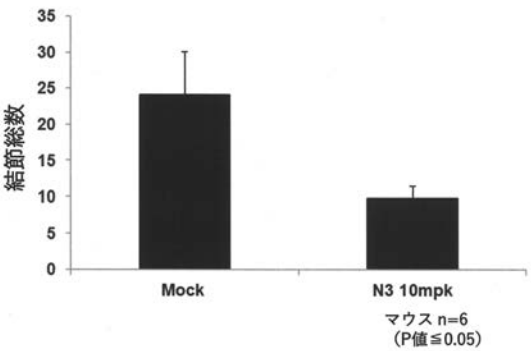


【 図 1 1 】

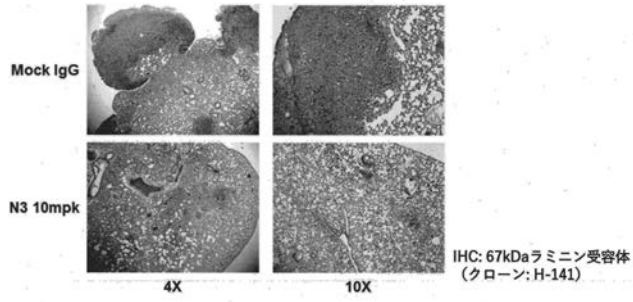
【 図 11 】



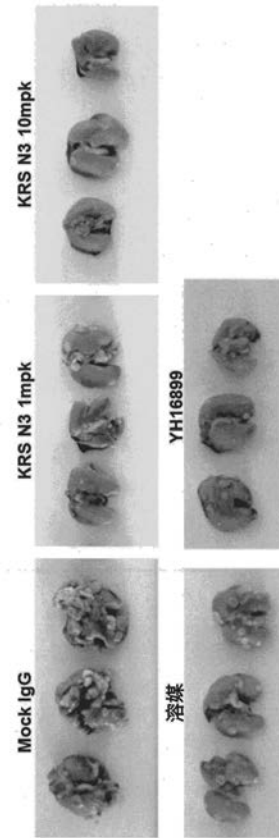
【 図 1 2 】



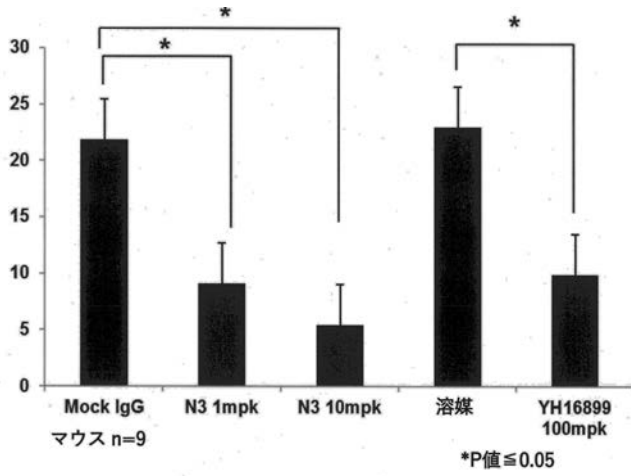
【図 13】



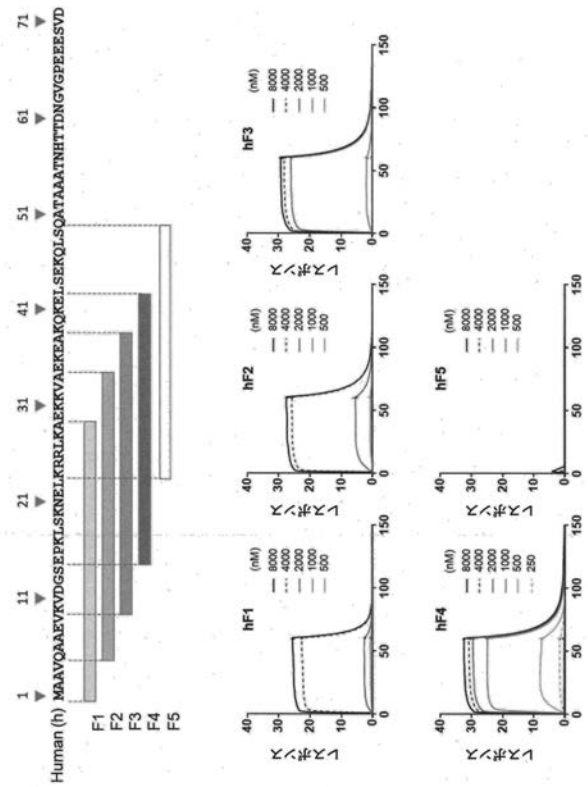
【図 14】



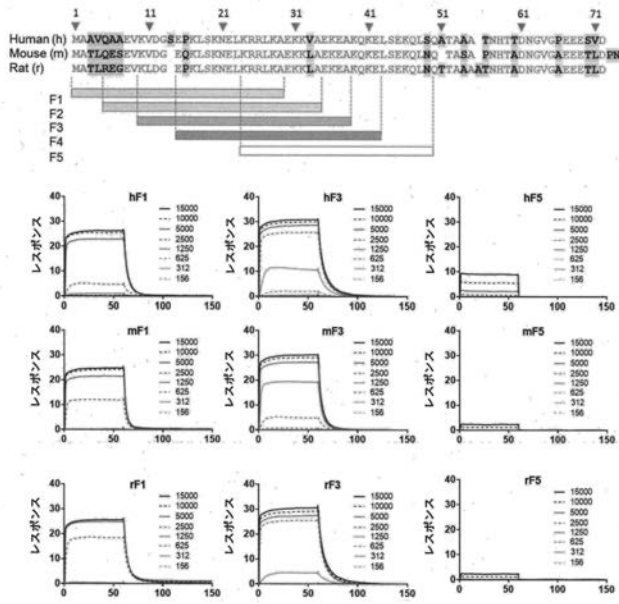
【図 15】



【図 16】

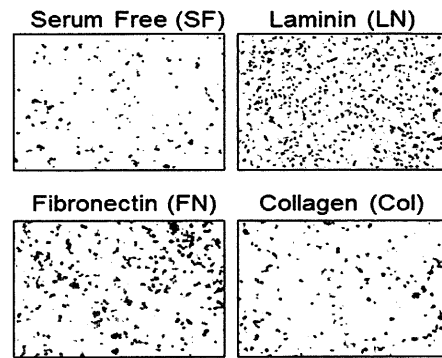


【図 17】



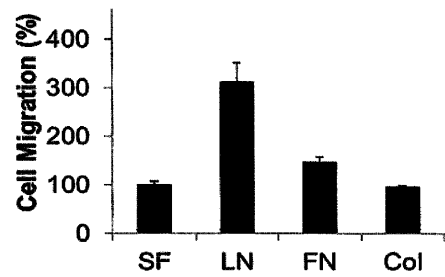
【図 18 a】

【図 18a】



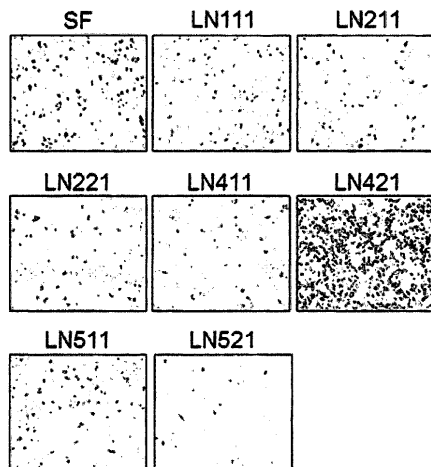
【図 18 b】

【図 18b】



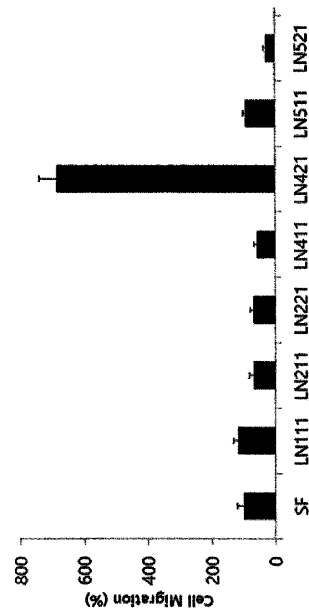
【図 19 a】

【図 19a】

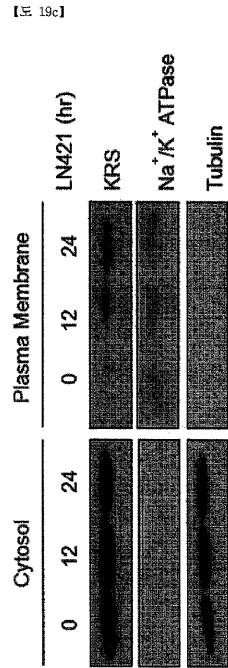


【図 19 b】

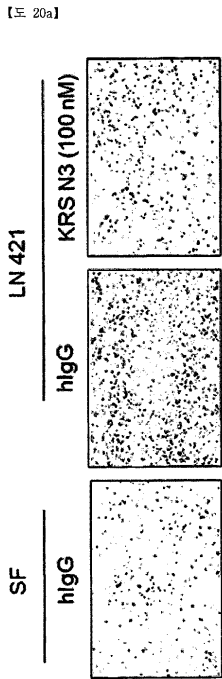
【図 19b】



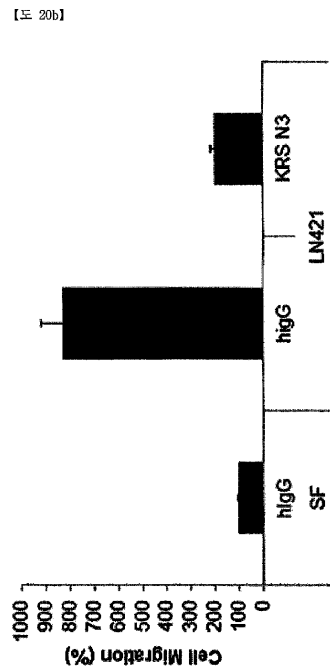
【 図 1 9 c 】



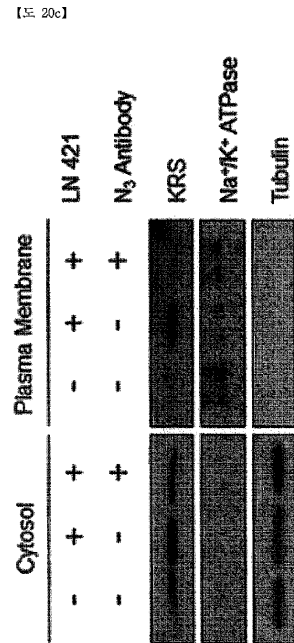
【 図 2 0 a 】



【 図 2 0 b 】

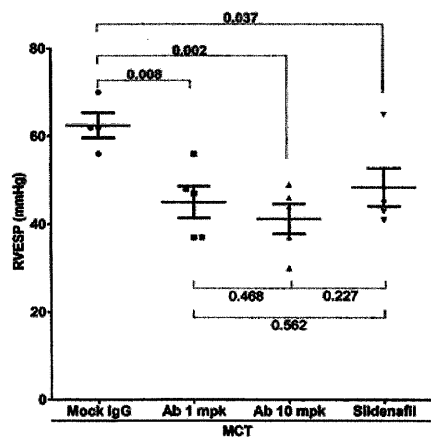


【 図 2 0 c 】



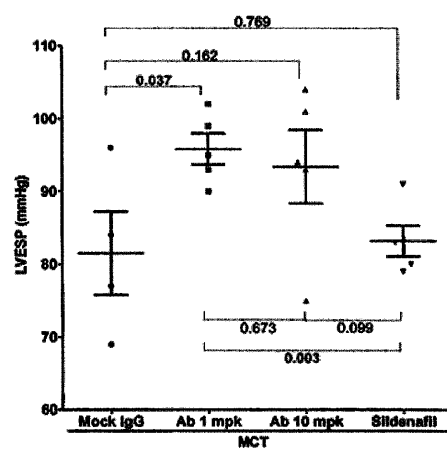
【図 2 1 a】

【図 21a】

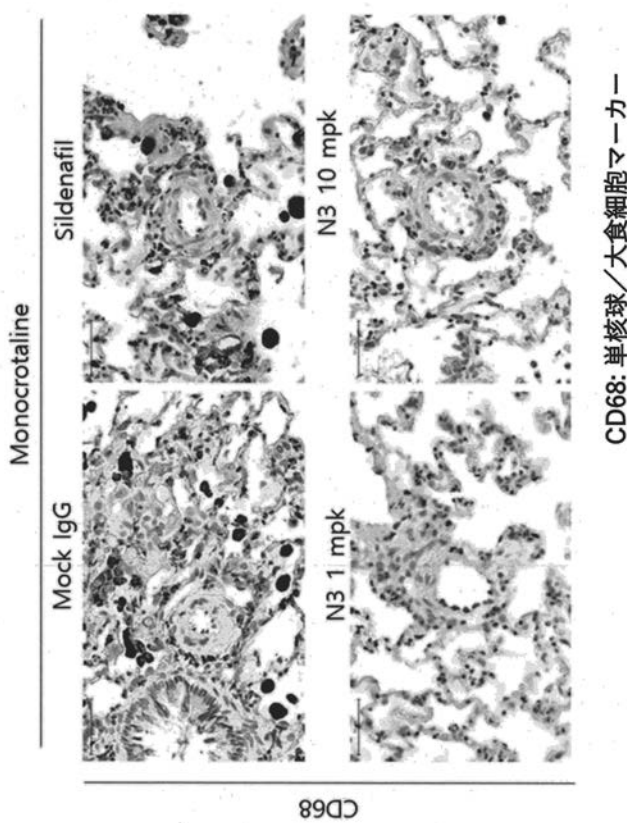


【図 2 1 b】

【図 21b】



【図 2 2】



## 【配列表】

2020515263000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】令和2年1月17日(2020.1.17)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0129

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0129】

本発明に係る薬学的組成物において、前記抗体又はその断片は、臨床投与時に経口及び非経口のさまざまな剤形で投与されることがあるが、製剤化する場合には、通常使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩解剤、界面活性剤等の希釈剤又は賦形剤を使用して製造することができる。経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤等が含まれ、これらの固形製剤は一つ以上の本発明の抗体又はその断片、又はその薬学的に許容可能な塩に少なくとも一つ以上の賦形剤、例えば、澱粉、炭酸カルシウム、スクロース(sucrose)又はラクトース(lactose)又はゼラチン等を混ぜて調剤することができる。また、単純な賦形剤以外にステアリン酸マグネシウム、タルク等の潤滑剤も使用することができる。経口投与のための液状製剤には、懸濁剤、内用液剤、乳剤又はシロップ剤等が該当するが、よく使用される単純希釈剤である水、リキッドパラフィン以外にさまざまな賦形剤、例えば湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤等が含まれる。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0171

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0171】

実験の結果、図3a～図3cに示した通り、不活性変異体(inactive mutant)(T52A)とWT-KRS(laminin untreated)には結合せず、活性変異体(active mutant)の細胞のみに結合するscFvクローンは合計4個(N3、N5、N7及びN9)選別された。また、WT-KRSの膜局在を誘導するためにラミニンを処理したあと、scFvを染色したとき、T52D変異体と類似した場所に染色されることを確認した。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0184

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0184】

その結果、本発明で製作されたIgGは、KRSに結合することを検証し、図5a～図5bではこれらの結果を、N3 IgG及びN5 IgGを代表として示す。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0187

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0187】

前記表 3 は、Biacore 2000 SPRを利用して測定したN3 IgG、N5 IgGの運動速度定数と平衡解離定数を示したものである。BIA evaluation ver.3.2ソフトウェアを利用して、親和度を運動速度定数 (ka 及び kd) と平衡解離定数 (KD) で得た。図 6 a ~ 図 6 b は、それぞれN3 IgG、N5 IgGのSPRグラフ結果を示す。図 6 a ~ 図 6 b 及び表 3 から、本発明のN3 IgG、N5 IgGは、KRS N-末端領域に特異的に高い結合力を有することを確認した。対照群のモックIgGでは結合シグナル (binding signal) がなかった。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 1 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 1 6】

実験の結果、図 2 0 a 及び図 2 0 b に示した通り、本発明の抗体が特異的に、LN421依存的な単核球 / 大食細胞の移動を効果的に阻害することを確認した。また、図 2 0 c に示した通り、LN421処理は、単核球 / 大食細胞細胞膜のKRS水準を増加させ、N3 IgG抗体処理により細胞膜のKRS水準が効果的に減少したことを確認した。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 2 3】

【表 5】

|              | MCT + mock IgG<br>(n = 4) | MCT + N3 Ab 1 mpk<br>(n = 5) | MCT + N3 Ab 10 mpk<br>(n = 5) | MCT + Sildenafil<br>(n = 5) |
|--------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| RVESP (mmHg) | 62.5 ± 5.7                | 45.0 ± 8.1                   | 41.2 ± 7.7                    | 48.4 ± 9.6                  |
| RVEDP (mmHg) | 2.8 ± 1.5                 | 1.4 ± 2.2                    | 3.8 ± 1.3                     | 2.6 ± 1.3                   |
| LVESP (mmHg) | 81.5 ± 11.4               | 95.8 ± 4.8                   | 93.4 ± 11.3                   | 83.2 ± 4.7                  |
| LVEDP (mmHg) | 1.0 ± 0.8                 | 2.6 ± 1.9                    | 4.6 ± 3.9                     | 3.6 ± 2.3                   |
| CO (ml/min)  | 58 ± 4.7 (n = 4)          | 74.0 ± 10.9 (n = 5)          | 59.8 ± 12.9 (n = 5)           | 49.6 ± 17.7 (n = 4)         |

(MCT + mock IgG処理群 1匹は麻酔死した。Sildenafil処理群 1匹は、手術中に斃死してCO測定できなかった。)

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 3 2】

【表 6】

|         | MCT + mock IgG<br>(n = 4) | MCT + Ab 1 mpk<br>(n = 5) | MCT + Ab 10 mpk<br>(n = 5) | MCT + Sildenafil<br>(n = 5) |
|---------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 絶対変化(g) | 101.4 ± 14.2              | 113.5 ± 14.6              | 104.1 ± 12.3               | 104.1 ± 26.4                |
| 相対変化(%) | 48.8 ± 7.8                | 43.6 ± 5.2                | 40.7 ± 5.0                 | 49.8 ± 10.5                 |

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/003594

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><i>A61K 39/395(2006.01)i, C07K 16/40(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i</i><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>A61K 39/395; A61K 38/08; G01N 33/567; G01N 33/53; A61K 38/16; C07K 16/40; G01N 33/574; A61K 39/00<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above<br>Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>eKOMPASS (KIPRO internal) & Keywords: lysyl-tRNA synthetase, antibody, epitope, cancer                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                   |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No.                                                             |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2011-153277 A2 (ATYR PHARMA, INC. et al.) 08 December 2011<br>See claims 1-19, 61-79; pages 6-14, 98, 99, 163-170, 210; table 1A-table 3.                                                                                                                        | 1-2,8-22,24,26                                                                    |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                     | 3-7                                                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | KR 10-2015-0079476 A (MEDICINAL BIOCONVERGENCE RESEARCH CENTER et al.) 08 July 2015<br>See claims 1 and 6-10.                                                                                                                                                       | 1-22,24,26                                                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2005-0277157 A1 (ROSE, Marlene Lydia et al.) 15 December 2005<br>See claims 15 and 17.                                                                                                                                                                           | 1-22,24,26                                                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | PARK, S. G. et al., "Human Lysyl-tRNA Synthetase Is Secreted to Trigger Proinflammatory Response", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 03 May 2005, vol. 102, no. 18, pages 6356-6361<br>See the entire document.      | 1-22,24,26                                                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | YOSHIFUJI, H. et al., "Anti-aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies in Clinical Course Prediction of Interstitial Lung Disease Complicated with Idiopathic Inflammatory Myopathies", Autoimmunity, May 2006, vol. 39, no. 3, pages 233-241<br>See the entire document. | 1-22,24,26                                                                        |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                   |
| Date of the actual completion of the international search<br>20 AUGUST 2018 (20.08.2018)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                     | Date of mailing of the international search report<br>22 AUGUST 2018 (22.08.2018) |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br><br>Korean Intellectual Property Office<br>Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,<br>Daejeon, 35208, Republic of Korea<br>Facsimile No. +82-42-481-8578                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                     | Authorized officer<br><br>Telephone No.                                           |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/003594

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **23, 25, 27**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 23, 25 and 27 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2018/003594**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| WO 2011-153277 A2                         | 08/12/2011          | AU 2011-261486 A1       | 17/01/2013          |
|                                           |                     | AU 2011-261486 B2       | 23/02/2017          |
|                                           |                     | CA 2800281 A1           | 08/12/2011          |
|                                           |                     | CN 103118694 A          | 22/05/2013          |
|                                           |                     | CN 103118694 B          | 03/08/2016          |
|                                           |                     | EP 2575857 A2           | 10/04/2013          |
|                                           |                     | EP 2575857 B1           | 24/01/2018          |
|                                           |                     | JP 2013-532965 A        | 22/08/2013          |
|                                           |                     | JP 2016-000758 A        | 07/01/2016          |
|                                           |                     | JP 5906237 B2           | 20/04/2016          |
|                                           |                     | US 2013-0243745 A1      | 19/09/2013          |
|                                           |                     | US 2015-0252347 A1      | 10/09/2015          |
|                                           |                     | US 2017-008973 A1       | 12/01/2017          |
|                                           |                     | US 8962560 B2           | 24/02/2015          |
|                                           |                     | US 9322009 B2           | 26/04/2016          |
|                                           |                     | WO 2011-153277 A3       | 24/05/2012          |
| KR 10-2015-0079476 A                      | 08/07/2015          | CN 106062005 A          | 26/10/2016          |
|                                           |                     | JP 2017-502672 A        | 26/01/2017          |
|                                           |                     | KR 10-1658625 B1        | 22/09/2016          |
|                                           |                     | US 2016-0377619 A1      | 29/12/2016          |
|                                           |                     | US 9945859 B2           | 17/04/2018          |
|                                           |                     | WO 2015-102341 A1       | 09/07/2015          |
| US 2005-0277157 A1                        | 15/12/2005          | AT 352563 T             | 15/02/2007          |
|                                           |                     | AU 1717301 A            | 12/06/2001          |
|                                           |                     | AU 780041 B2            | 24/02/2005          |
|                                           |                     | CA 2390778 A1           | 07/06/2001          |
|                                           |                     | CA 2390778 C            | 15/06/2010          |
|                                           |                     | DE 60033183 T2          | 08/11/2007          |
|                                           |                     | DK 1242450 T3           | 29/05/2007          |
|                                           |                     | EP 1242450 A2           | 25/09/2002          |
|                                           |                     | EP 1242450 B1           | 24/01/2007          |
|                                           |                     | ES 2281364 T3           | 01/10/2007          |
|                                           |                     | US 7132245 B2           | 07/11/2006          |
|                                           |                     | WO 01-40302 A2          | 07/06/2001          |
|                                           |                     | WO 01-40302 A3          | 21/03/2002          |

| 국제조사보고서                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                          | 국제출원번호<br><b>PCT/KR2018/003594</b>        |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------|----------------------------|--------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---|--|-----|---|---------------------------------------------------------------------------|--------------|---|--------------------------------------------------------------------------|--------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b><br><b>A61K 39/395(2006.01)i, C07K 16/40(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                          |                                           |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| <b>B. 조사된 분야</b><br>조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)<br>A61K 39/395; A61K 38/08; G01N 33/567; G01N 33/53; A61K 38/16; C07K 16/40; G01N 33/574; A61K 39/00<br>조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 라이실-tRNA 합성효소, 항체, 에피토프, 암                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                          |                                           |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| <b>C. 관련 문헌</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2011-153277 A2 (ATYR PHARMA, INC. 등) 2011.12.08<br/>청구항 1-19, 61-79; 페이지 6-14, 98, 99, 163-170, 210; 표 1A-표 3 참조.</td> <td>1-2, 8-22, 24, 26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>3-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2015-0079476 A (제단법인 의약바이오컨버전스연구단 등) 2015.07.08<br/>청구항 1 및 6-10 참조.</td> <td>1-22, 24, 26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2005-0277157 A1 (ROSE, MARLENE LYDIA 등) 2005.12.15<br/>청구항 15 및 17 참조.</td> <td>1-22, 24, 26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PARK, S. G. 등, 'Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005.05.03, 제102권, 제18호, 6356-6361 페이지<br/>전체 문헌 참조.</td> <td>1-22, 24, 26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>YOSHIFUJI, H. 등, 'Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies', Autoimmunity, 2006. 05, 제39권, 제3호, 233-241 페이지<br/>전체 문헌 참조.</td> <td>1-22, 24, 26</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                                                                                                                                                          |                                           | 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 | X | WO 2011-153277 A2 (ATYR PHARMA, INC. 등) 2011.12.08<br>청구항 1-19, 61-79; 페이지 6-14, 98, 99, 163-170, 210; 표 1A-표 3 참조. | 1-2, 8-22, 24, 26 | A |  | 3-7 | A | KR 10-2015-0079476 A (제단법인 의약바이오컨버전스연구단 등) 2015.07.08<br>청구항 1 및 6-10 참조. | 1-22, 24, 26 | A | US 2005-0277157 A1 (ROSE, MARLENE LYDIA 등) 2005.12.15<br>청구항 15 및 17 참조. | 1-22, 24, 26 | A | PARK, S. G. 등, 'Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005.05.03, 제102권, 제18호, 6356-6361 페이지<br>전체 문헌 참조. | 1-22, 24, 26 | A | YOSHIFUJI, H. 등, 'Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies', Autoimmunity, 2006. 05, 제39권, 제3호, 233-241 페이지<br>전체 문헌 참조. | 1-22, 24, 26 |
| 카테고리*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                               | 관련 청구항                                    |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | WO 2011-153277 A2 (ATYR PHARMA, INC. 등) 2011.12.08<br>청구항 1-19, 61-79; 페이지 6-14, 98, 99, 163-170, 210; 표 1A-표 3 참조.                                                                                                                      | 1-2, 8-22, 24, 26                         |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                          | 3-7                                       |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | KR 10-2015-0079476 A (제단법인 의약바이오컨버전스연구단 등) 2015.07.08<br>청구항 1 및 6-10 참조.                                                                                                                                                                | 1-22, 24, 26                              |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | US 2005-0277157 A1 (ROSE, MARLENE LYDIA 등) 2005.12.15<br>청구항 15 및 17 참조.                                                                                                                                                                 | 1-22, 24, 26                              |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | PARK, S. G. 등, 'Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005.05.03, 제102권, 제18호, 6356-6361 페이지<br>전체 문헌 참조.       | 1-22, 24, 26                              |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | YOSHIFUJI, H. 등, 'Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies', Autoimmunity, 2006. 05, 제39권, 제3호, 233-241 페이지<br>전체 문헌 참조. | 1-22, 24, 26                              |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| <input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                          |                                           |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| * 인용된 문헌의 특별 카테고리:<br>"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌<br>"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌<br>"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌<br>"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌<br>"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌<br>"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌<br>"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.<br>"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.<br>"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                          |                                           |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| 국제조사의 실제 완료일<br>2018년 08월 20일 (20.08.2018)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                          | 국제조사보고서 발송일<br>2018년 08월 22일 (22.08.2018) |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br>대한민국 특허청<br>(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,<br>4동 (둔산동, 정부대전청사)<br>팩스 번호 +82-42-481-8578                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                          | 심사관<br>감유림<br>전화번호 +82-42-481-3516        |       |                            |        |   |                                                                                                                     |                   |   |  |     |   |                                                                           |              |   |                                                                          |              |   |                                                                                                                                                                                                                                    |              |   |                                                                                                                                                                                                                                          |              |

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

## 국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2018/003594

## 제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 23, 25, 27  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 23, 25 및 27은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사를 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

## 제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호  
**PCT/KR2018/003594**

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 공개일                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 2011-153277 A2     | 2011/12/08 | AU 2011-261486 A1<br>AU 2011-261486 B2<br>CA 2800281 A1<br>CN 103118694 A<br>CN 103118694 B<br>EP 2575857 A2<br>EP 2575857 B1<br>JP 2013-532965 A<br>JP 2016-000758 A<br>JP 5906237 B2<br>US 2013-0243745 A1<br>US 2015-0252347 A1<br>US 2017-008973 A1<br>US 8962560 B2<br>US 9322009 B2<br>WO 2011-153277 A3 | 2013/01/17<br>2017/02/23<br>2011/12/08<br>2013/05/22<br>2016/08/03<br>2013/04/10<br>2018/01/24<br>2013/08/22<br>2016/01/07<br>2016/04/20<br>2013/09/19<br>2015/09/10<br>2017/01/12<br>2015/02/24<br>2016/04/26<br>2012/05/24 |
| KR 10-2015-0079476 A  | 2015/07/08 | CN 106062005 A<br>JP 2017-502672 A<br>KR 10-1658625 B1<br>US 2016-0377619 A1<br>US 9945859 B2<br>WO 2015-102341 A1                                                                                                                                                                                             | 2016/10/26<br>2017/01/26<br>2016/09/22<br>2016/12/29<br>2018/04/17<br>2015/07/09                                                                                                                                             |
| US 2005-0277157 A1    | 2005/12/15 | AT 352563 T<br>AU 1717301 A<br>AU 780041 B2<br>CA 2390778 A1<br>CA 2390778 C<br>DE 60033183 T2<br>DK 1242450 T3<br>EP 1242450 A2<br>EP 1242450 B1<br>ES 2281364 T3<br>US 7132245 B2<br>WO 01-40302 A2<br>WO 01-40302 A3                                                                                        | 2007/02/15<br>2001/06/12<br>2005/02/24<br>2001/06/07<br>2010/06/15<br>2007/11/08<br>2007/05/29<br>2002/09/25<br>2007/01/24<br>2007/10/01<br>2006/11/07<br>2001/06/07<br>2002/03/21                                           |

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl. |        |           | F I     |        | テーマコード (参考) |  |
|--------------|--------|-----------|---------|--------|-------------|--|
| C 1 2 N      | 5/10   | (2006.01) | C 1 2 N | 5/10   |             |  |
| C 0 7 K      | 16/40  | (2006.01) | C 0 7 K | 16/40  |             |  |
| C 1 2 P      | 21/08  | (2006.01) | C 1 2 P | 21/08  |             |  |
| A 6 1 P      | 35/04  | (2006.01) | A 6 1 P | 35/04  |             |  |
| A 6 1 P      | 9/00   | (2006.01) | A 6 1 P | 9/00   |             |  |
| A 6 1 P      | 43/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00  | 1 0 5       |  |
| A 6 1 P      | 29/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 29/00  |             |  |
| A 6 1 P      | 11/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 11/00  |             |  |
| A 6 1 P      | 9/12   | (2006.01) | A 6 1 P | 9/12   |             |  |
| A 6 1 P      | 9/10   | (2006.01) | A 6 1 P | 9/10   | 1 0 1       |  |
| A 6 1 P      | 1/04   | (2006.01) | A 6 1 P | 9/10   |             |  |
| A 6 1 P      | 19/02  | (2006.01) | A 6 1 P | 1/04   |             |  |
| A 6 1 P      | 7/00   | (2006.01) | A 6 1 P | 29/00  | 1 0 1       |  |
| A 6 1 P      | 1/16   | (2006.01) | A 6 1 P | 19/02  |             |  |
| A 6 1 P      | 13/12  | (2006.01) | A 6 1 P | 7/00   |             |  |
| A 6 1 P      | 21/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 1/16   |             |  |
| A 6 1 P      | 11/06  | (2006.01) | A 6 1 P | 13/12  |             |  |
| A 6 1 P      | 17/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 21/00  |             |  |
| A 6 1 P      | 37/08  | (2006.01) | A 6 1 P | 11/06  |             |  |
| A 6 1 P      | 17/06  | (2006.01) | A 6 1 P | 17/00  |             |  |
| A 6 1 P      | 19/08  | (2006.01) | A 6 1 P | 37/08  |             |  |
| A 6 1 P      | 11/02  | (2006.01) | A 6 1 P | 17/06  |             |  |
| A 6 1 P      | 25/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 19/08  |             |  |
| A 6 1 K      | 39/395 | (2006.01) | A 6 1 P | 11/02  |             |  |
| A 6 1 K      | 49/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 25/00  |             |  |
| G 0 1 N      | 33/53  | (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | D           |  |
|              |        |           | A 6 1 K | 39/395 | P           |  |
|              |        |           | A 6 1 K | 39/395 | E           |  |
|              |        |           | A 6 1 K | 39/395 | T           |  |
|              |        |           | A 6 1 K | 49/00  |             |  |
|              |        |           | G 0 1 N | 33/53  | D           |  |

(31)優先権主張番号 10-2017-0118917

(32)優先日 平成29年9月15日(2017.9.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
韓国(KR)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. ブルロニック

2. TWEEN

3. トライトン

(72)発明者 シム、ヒュン ボ

大韓民国 02831 ソウル、ソンプク - グ、4 - ギル ソンプク - ロ、52、#109 - 1004

(72)発明者 クォン、ナム フン

大韓民国 16941 キョンギ - ド、ヨンジン - シ、スジ - グ、ポプジョ - ロ、251、#4611 - 1304

(72)発明者 ハン、テ ヨン

大韓民国 16229 キョンギ - ド、スウォン - シ、ヨントン - グ、クァンギョ - ロ 145、アドバンスド インスティテューツ オブ コンバージェンス テクノロジー、ビー - ドン 8階

F ターム(参考) 4B064 AG26 AG27 BJ12 CA01 CA02 CA05 CA08 CA09 CA10 CA11

CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AB01 AC14 BA01 BA02 CA24

CA25 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 BB22 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41

BB43 CC03 CC31 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06

GG08 KA03 KA04 KB82 LL18

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 DA89 EA20 FA74

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 特异性结合暴露在细胞外膜上的赖氨酰-tRNA合酶N端区域的抗体                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2020515263A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 公开(公告)日 | 2020-05-28 |
| 申请号            | JP2019553434                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 申请日     | 2018-03-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 医药生命融合研究团                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 医药生物融合研究中心                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| [标]发明人         | キムスンフン<br>クォナムフン                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 发明人            | キム、スンフン<br>シム、ヒュン ボ<br>クォン、ナム フン<br>ハン、テ ヨン                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/40 C12P21/08 A61P35/04 A61P9/00 A61P43/00 A61P29/00 A61P11/00 A61P9/12 A61P9/10 A61P1/04 A61P19/02 A61P7/00 A61P1/16 A61P13/12 A61P21/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P37/08 A61P17/06 A61P19/08 A61P11/02 A61P25/00 A61K39/395 A61K49/00 G01N33/53                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| CPC分类号         | A61K39/0011 A61K39/395 A61K2039/505 A61K2039/545 C07K16/40 C07K2317/33 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/574 C12N15/52                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| FI分类号          | C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/40 C12P21/08 A61P35/04 A61P9/00 A61P43/00.105 A61P29/00 A61P11/00 A61P9/12 A61P9/10.101 A61P9/10 A61P1/04 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P7/00 A61P1/16 A61P13/12 A61P21/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P37/08 A61P17/06 A61P19/08 A61P11/02 A61P25/00 A61K39/395.D A61K39/395.P A61K39/395.E A61K39/395.T A61K49/00 G01N33/53.D                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA08 4B064/CA09 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA83X 4B065/AA86X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB22 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC03 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/FA74 |         |            |
| 优先权            | 1020170038775 2017-03-27 KR<br>1020170118890 2017-09-15 KR<br>1020170118917 2017-09-15 KR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及与暴露在细胞外膜上的赖氨酰-tRNA合成酶的N-末端区域特异性结合的抗体及其用途，更具体地说，涉及本说明书中描述的特定CDR（互补区域）。性别确定位点），其序列具有赖氨酰-tRNA合成酶（KRS，赖氨酰-tRNA合成酶）N端，特异性结合包含SEQ ID NO：97序列的表位（表位）的抗体或其片段，本发明涉及用于抑制上述抗体或片段的癌症转移，用于诊断癌症以及用于预防或治疗与免疫细胞迁移有关的疾病的药物组合物。根据本发明的抗体或其片段与暴露于细胞外膜上的KRS N末端区域具有极优异的特异性结合能力，因此对于癌症诊断是有效的，并且具有抗癌和癌症转移。它具有抑制作用，可以非常有效地用于预防和/或治疗与免疫细胞迁移有关的疾病。

