

(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2017-502672

(P2017-502672A)

(43) 公表日 平成29年1月26日(2017.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B064
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B065
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4H045
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-544138 (P2016-544138)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月29日 (2014.12.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月16日 (2016.8.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/012980
 (87) 国際公開番号 W02015/102341
 (87) 国際公開日 平成27年7月9日 (2015.7.9)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0166791
 (32) 優先日 平成25年12月30日 (2013.12.30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

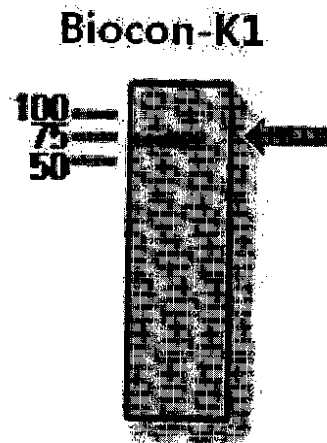
(71) 出願人 514070937
 メディシナル バイオコンバージェンス
 リサーチ センター
 大韓民国 443-270 キョンギード
 スウォン-シ ヨントン-グ クァンギ
 ヨーロ 145 アドバンスド インステ
 イチューツ オブ コンバージェンス テ
 クノロジー ビードン 8階 (イウイ
 ドン)
 (74) 代理人 110002354
 特許業務法人平和国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗KRSモノクロナル抗体及びこれの用途

(57) 【要約】

本発明はKRS(Lysyl-tRNA synthetase)に選択的に結合する抗KRS抗体及びこれの用途に関するもので、具体的にはヒトKRSに結合する抗体又はその断片、これの生産方法及びこれを含むガン又は自己免疫疾患及び炎症性疾患診断用組成物に関する。本発明の抗体又はその断片はヒトKRSに特異的に結合して同一なARS familyを含む他のタンパク質と交差反応性がなく、KRS検出及び抑制可能であるのでKRS検出及びKRSが関連した疾患のガン又は自己免疫疾患及び炎症性疾患診断目的に使用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L1、配列番号 2 で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L2、及び配列番号 3 で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L3を含む抗体軽鎖可変領域(VL)及び配列番号 4 で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H1、配列番号 5 で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H2、配列番号 6 で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H3を含む抗体重鎖可変領域(VH)を含むヒトKRSに結合する抗体又はその断片。

【請求項 2】

前記抗体は軽鎖可変領域で配列番号13の137番目乃至246番目アミノ酸配列を含み、重鎖可変領域で配列番号13の1番目乃至121番目アミノ酸配列を含む抗体であることを特徴とするヒトKRSに結合する請求項 1 記載の抗体又はその断片。

【請求項 3】

前記抗体は配列番号13で表示されるアミノ酸配列を含む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】

前記断片はdiabody、Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv及びscFvからなる群より選ばれた断片であ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 5】

請求項 1 の抗体又はその断片を符号化するポリペプチド。

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドは配列番号 7 乃至12で表示されるポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 5 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 5 のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8】

請求項 7 のベクターを含む細胞。

【請求項 9】

請求項 8 の細胞をポリヌクレオチドが発現される条件下で培養して、軽鎖及び重鎖可変領域を含むポリペプチドを生産する段階及び前記細胞又はこれを培養した培養培地から前記ポリペプチドを回収する段階を含むヒトKRSに結合する抗体又はその断片の生産方法。

【請求項 10】

請求項 1 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KRS特異的検出方法。

【請求項 11】

請求項 1 の抗体又はその断片を有効成分として含むガン診断用組成物。

【請求項 12】

請求項 1 の抗体又はその断片のガン診断用製剤製造のための用途。

【請求項 13】

下記の段階でなされる個体のガン診断方法：

(a) 個体から生物学的試料を収得する段階；

(b) 請求項 1 の抗体又はその断片を利用して前記生物学的試料内KRSタンパク質水準を測定する段階；及び

(c) 前記KRSタンパク質水準を正常個体のKRSタンパク質水準と比較する段階。

【請求項 14】

請求項 1 の抗体又はその断片を有効成分として含む自己免疫疾患診断用組成物。

【請求項 15】

請求項 1 の抗体又はその断片の自己免疫疾患診断用製剤製造のための使用。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

下記の段階でなされる個体の自己免疫疾患診断方法：

(a) 個体から生物学的試料を取得する段階；

(b) 請求項 1 の抗体又はその断片を利用して前記生物学的試料内KRSタンパク質水準を測定する段階；及び

(c) 前記KRSタンパク質水準を正常個体のKRSタンパク質水準と比較する段階。

【請求項 1 7】

請求項 1 の抗体又はその断片を有効成分として含む炎症性疾患診断用組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 の抗体又はその断片の炎症性疾患診断用製剤製造のための使用。

【請求項 1 9】

下記の段階でなされる個体の炎症性疾患診断方法：

(a) 個体から生物学的試料を取得する段階；

(b) 請求項 1 の抗体又はその断片を利用して前記生物学的試料内KRSタンパク質水準を測定する段階；及び

(c) 前記KRSタンパク質水準を正常個体のKRSタンパク質水準と比較する段階。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は2013年12月30日に出願された大韓民国特許出願第10-2013-0166791号を優先権主張し、前記明細書全体は本出願の参考文献である。

【0002】

本発明はKRS(Lysyl-tRNA synthetase)に選択的に結合する抗KRS抗体及びこれの用途に関するもので、より具体的にはヒトのKRSに結合する抗体又はその断片、これの生産方法及びこれを含むガン又は自己免疫疾患及び炎症性疾患の診断用組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

Aminoacyl-tRNA synthetase(ARS)は特定アミノ酸をその該当するtRNAに結合する役割をする酵素であって、高等生物の場合、アミノ酸の種類による20個の酵素の他にAIMP1(p43)、AIMP2(p38)、AIMP3(p18)などmultisynthetase complex形成に参与する3種類を含み23種の酵素で構成されていて、multisynthetase complexに参与する酵素の他に幾つかはfree form形態でも存在する。しかし、最近では基本的な機能の他に特定環境下で多様な異なる活性機能を有していることが報告されているがKRS(Lysyl-tRNA synthetase)がその内の一つである。KRSはmacrophage活性化を通じて免疫反応を誘導するものであることが明らかになり、TNF- α によって細胞外に分泌促進されたKRSはp38 mitogen activivat ed kinaseなどによる信号伝達によりmacrophage細胞のTNF- α による活性を増加させたり、又は細胞のmigrationを促進するものと報告された。KRS又、多様な疾患に関与するものと最近明らかになっている。炎症性筋肉疾患患者からKRSに対する自己抗体が存在することが報告され、ルーゲリック病の原因になるSOD1遺伝子変異患者からKRSがこの酵素に結合して関与することが報告され、最近ではガン細胞からリン酸化したKRSがLaminin受容体の安定化に寄与するのでガン細胞の転移を促進することが報告された。このような結果からKRSは自己免疫疾患及びガン患者の血清内に存在することができ、重要な診断バイオマーカーに使用できることを示した。

【0004】

しかしながら、KRSを始めとしたARSなど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らはタンパク質構造上類似した点が多く、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、高強度の抗体が生成されない場合が多い。本発明の抗体は優れた感度とARS間交差反応がない点で研究用ばかりでなく診断用及び産業上利用可能性が高い抗体と予想される。

10

20

30

40

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明者らは、KRSに特異的に結合する抗体を研究中、ファージディスプレイ方法で製造されたライブラリーからKRSに特異的に結合する断片らを探し出してこれの配列及び結合特異性を明らかにして本発明を完成した。

【0006】

従って、本発明の目的はヒトのKRSに結合する抗体又はその断片を提供することである。

【0007】

本発明の他の目的は前記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ことである。

本発明の他の目的は前記ポリヌクレオチドを含むベクターを提供することである。

本発明の他の目的は前記ベクターを含む細胞を提供することである。

本発明の他の目的はヒトのKRSに結合する抗体又はその断片の生産方法を提供することである。

本発明の他の目的は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KRS特異的検出方法を提供することである。

本発明の他の目的は前記抗体又はその断片を有効成分として含むガン診断用組成物を提供することである。

本発明の他の目的は前記抗体又はその断片を有効成分として含む自己免疫疾患診断用組成物を提供することである。

本発明の他の目的は前記抗体又はその断片を有効成分として含む炎症性疾患診断用組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

前記の目的を達成するため本発明は配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L1、配列番号2で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L2及び配列番号3で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L3を含む抗体軽鎖可変領域(VL)及び配列番号4で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H1、配列番号5で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H2及び配列番号6で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H3を含む抗体重鎖可変領域(VH)を含むヒトのKRSに結合する抗体又はその断片を提供する。

【0009】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記抗体又は断片を符号化するポリヌクレオチドを提供する。

【0010】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0011】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記ベクターを含むベクターを含む細胞を提供する。

【0012】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記細胞をポリヌクレオチドが発現する条件下で培養し、軽鎖及び重鎖可変領域を含むポリペプチドを生産する段階及び前記細胞又はこれを培養した培養培地から前記ポリペプチドを回収する段階を含むヒトのKRSに結合する抗体又は断片の生産方法を提供する。

【0013】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は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断片を検出する段階を含むKRS特異的検出方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0014】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記抗体又はその断片を有効成分として含むガン診断用組成物を提供する。

【0015】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記抗体又はその断片のガン診断用製剤製造のための用途を提供する。

【0016】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は(a)個体から生物学的試料を取得する段階、(b)第1項の抗体又はその断片を利用して前記生物学的試料内のKRSタンパク質水準を測定する段階及び(c)前記KRSタンパク質水準を正常個体のKRSタンパク質水準と比較する段階でなされた個体のガン診断方法を提供する。

10

【0017】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記抗体又はその断片を有効成分として含む自己免疫疾患診断用組成物を提供する。

【0018】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記抗体又はその断片の自己免疫疾患診断用製剤製造のための用途を提供する。

【0019】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は(a)個体から生物学的試料を取得する段階、(b)第1項の抗体又はその断片を利用して前記生物学的試料内のKRSタンパク質水準を測定する段階及び(c)前記KRSタンパク質水準を正常個体のKRSタンパク質水準と比較する段階でなされた個体の自己免疫疾患診断方法を提供する。

20

【0020】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記抗体又はその断片を有効成分として含む炎症性疾患診断用組成物を提供する。

【0021】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は前記抗体又はその断片の炎症性疾患診断用製剤製造のための用途を提供する。

【0022】

本発明の他の目的を達成するため、本発明は(a)個体から生物学的試料を取得する段階、(b)第1項の抗体又はその断片を利用して前記生物学的試料内のKRSタンパク質水準を測定する段階及び(c)前記KRSタンパク質水準を正常個体のKRSタンパク質水準と比較する段階でなされた個体の炎症性疾患診断方法を提供する。

30

【0023】

以下本発明を詳細に説明する。

【0024】

本発明は配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L1、配列番号2で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L2及び配列番号3で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L3を含む抗体軽鎖可変領域(VL)及び配列番号4で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H1、配列番号5で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H2及び配列番号6で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H3を含む抗体重鎖可変領域(VH)を含むヒトKRSに結合する抗体又はその断片を提供する。

40

【0025】

ライシル-tRNA合成酵素(KRS Lysyl-tRNA synthetase)はライシン(Lys)とtRNAの結合を促進させる酵素でARS(aminoacyl tRNA synthetase)の一種である。本発明のKRSは一般的に、天然型又は再組合わせヒトKRS及びヒトKRSの非人間同族体を示す。

【0026】

“抗体”、“抗KRS抗体”、“人間化抗KRS抗体”及び“変形人間化抗KRS抗体”、“anti-KRS antibody”と言う用語は本明細書で最も広義の意味で用いられ具体的に単一クロ

50

ン抗体（モノクローナル抗体、完全長単一クローン抗体含む）、多クローン抗体（ポリクローナル抗体）、多重特異抗体（例えば、二重特異抗体）、及び抗体断片（例えば、可変領域及び目的とする生物活性（例えば、KRSとの結合）を示す抗体の他の部分）を含む。

【0027】

本発明の抗体はKRSと選択的に結合できるように特定アミノ酸配列が軽鎖及び重鎖CDRに含まれている抗体でモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を全て含み、好ましくはモノクローナル抗体でもある。さらに、本発明の抗体はキメラ抗体、人間化された抗体、人間抗体を全て含み、好ましくは人間抗体でもある。

【0028】

本発明のモノクローナル抗体は実質的に同質抗体の集団から取得した抗体を示し、つまり、集団を構成する個々の抗体は少量で存在可能な天然的に存在する突然変異を除いては同一である。モノクローナル抗体は単一抗原エピトープに極めて特異的に結合する。

10

【0029】

“モノクローナル”という用語は抗体が実質的な相同性集団から取得できるのと同じく抗体の特性を表わす言葉であって、必ずしも抗体を特定方法によって生産することではない。

【0030】

例えば、本発明のモノクローナル抗体は文献[参照：Kohler et al.(1975)Nature 256: 495]に初めて記載されたハイブリドマ方法により製造できるか、又は再組合わせDNA方法（参照：米国特許第4,816,567号）により製造できる。さらに、例えば、文献[参照：Clackson et al.(1991)Nature 352:624-628及びMarks et al.(1991)J.Mol.Biol.222:581-597及びPresta(2005)J.Allergy Clin.Immunol.116:731]に記述された技術を利用してファージ抗体ライブラリーから分離できる。

20

【0031】

本発明の抗体は具体的にキメラ抗体を含み、この場合、重鎖及び/又は軽鎖の一部は特定種から起源するか、又は特定抗体の相応する配列と同一であるか又は相同性を示すものの、残りの部分は本発明の抗体が好ましい生物学的活性（例えば、KRSとの選択的結合）を示す限り他の種から起源するか又は他の抗体の相応する配列と同一であるか又は相同性を示すものであっても拘りない[参照：米国特許第4,816,567号；及びMorrison et al.,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855]。

30

【0032】

人間化した抗体はヒト及び非ヒト（例：マウス、ラット）抗体の配列を全て含む抗体であって、一般的に、エピトープと結合する部位(CDR)を除いた残りの部分はヒト抗体のものであって、エピトープと結合する部位は非ヒト由来の配列を含むことができる。

【0033】

完全なヒト抗体はヒトの免疫グロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を指し、マウス、マウス細胞、又はマウス細胞から起源したハイブリドマから生産するか又はファージディスプレイ方法で生産できる。

【0034】

生体から生産される天然抗体は通常的に2個の同一な軽鎖と2個の同一な重鎖で構成された約150,000ダルトンの異種四量体性糖タンパク質である。各軽鎖は1個の共有ジスルフィド結合により重鎖と連結されるものの、ジスルフィド連鎖数は異なる免疫グロブリンisoformの重鎖ら間で多様である。各重鎖及び軽鎖は規則的に離隔された鎖内ジスルフィドブリッジを有している。各重鎖は一つの末端に可変ドメイン(VH)に引続き数多くの不変ドメインを有する。各軽鎖は一つの末端に可変ドメイン(VL)を有し、他の末端には不変ドメインを有するが；軽鎖の不変ドメインは重鎖の第1不変ドメインと整列され、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列される。特別なアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖の可変ドメイン間に界面を形成するものと考えられる。

40

【0035】

抗体の“可変領域”又は“可変ドメイン”は抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメイン

50

を指称する。重鎖の可変領域は“VH”又は“V_H”で記載し、軽鎖の可変領域は“VL”又は“V_L”で記載する。これらドメインは一般的に、抗体の最も可変部分であって抗原結合部位を含む。

【0036】

“超可変性(hypervariable)”とは、前記可変領域内の幾つかの配列などが抗体ら間の配列において広範囲に相異し、その特異的な抗原結晶因子らに対するそれぞれの特定抗体の結合及び特異性に直接的に関連する残基らを含む事実を指称する。

【0037】

軽鎖及び重鎖可変領域全てにおいて超可変性は相補性結晶部位又は超可変性ループ(HVL)であって、公知された3個の文節などに集中される。CDRは文献[Kabatなど、1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service > National Institutes of Health, Bethesda, MD.]における配列比較により限定される反面、HVLは文献[Chothia and Lesch 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917]に揭示された通り、前記可変領域の3次元構造によって構造的に限定される。カバト(Kabat)により限定されたように、CDR-L1は軽鎖可変領域で略残基24-34に、CDR-L2は略残基50-56に、CDR-L3は略残基89-97に位置し；CDR-H1は重鎖可変領域で略残基31-35に、CDR-H2は略残基50-65に、CDR-H3は略残基95-102に位置する。

10

【0038】

前記重鎖及び軽鎖それぞれ内の3個のCDRなどは枠部位(FR)により分離され、前記部位は不足しがちな可变的傾向がある配列などを含む。前記重鎖及び軽鎖は可変領域のアミノ末端からカルボキシ末端まで前記FR及びCDRは下記の順で配列される：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3及びFR4。前記FRの大きいシート配置は前記それぞれの鎖内部のCDRを相互だけでなく他の鎖からのCDRに近接させる。生成される形態は抗原結合部位に寄与するものの(Kabatなど、1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. 1, pages 647-669 参照)、全てのCDR残基などが抗原結合に直接関与する必要はない。

20

【0039】

本発明の抗体は軽鎖及び重鎖可変領域に属する各CDRがそれぞれ特定配列を含み、KRSの特異的に結合することを特徴とし、具体的に本発明の抗体は配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L1、配列番号2で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L2及び配列番号3で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)L3を含む抗体軽鎖可変領域(vL)及び配列番号4で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H1、配列番号5で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H2及び配列番号6で表示されるアミノ酸配列を含む相補性結晶部位(CDR)H3を含む抗体重鎖可変領域(VH)を含む抗体でもある。

30

【0040】

本発明の抗体は好ましくは特定軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含むことができ、具体的な軽鎖可変領域で配列番号13の137番目乃至246番目アミノ酸配列を含み、重鎖可変領域で配列番号13の1番目乃至121番目アミノ酸配列を含む抗体でもある。

【0041】

本発明の抗体は最も好ましくは配列番号13で表示されるアミノ酸配列を含む抗体でもある。

40

【0042】

本発明の抗体断片、断片又は“その断片”は母抗体の結合特異性の少なくとも一部を保有する、典型的に少なくとも母抗体の抗原結合の一部又は可変領域(例えば、一つ以上のCDR)を含む抗体の断片又は誘導体を含む。抗体断片の例はFab, Fab', F(ab')₂及びFv断片；ディアパディ；線形抗体；一本鎖(single-chain)抗体分子、例えば、sc-Fv；及び抗体断片から形成された多特異的抗体を含むものの、これに制限はされない。典型的に抗体断片又は誘導体は該当活性がモル基準で表現される場合、これのKRS結合活性の10%以上を保有する。好ましくは抗体断片又は誘導体は母抗体としてのKRS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。さらに、KRS抗体断片はこれの

50

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称す）を含む。本発明の“結合化合物”は抗体及びその断片など全てを示す。

【0043】

Fabは一つの軽鎖及び一つの重鎖のCH1(第1不変ドメイン)及び可変領域でなされる。Fab分子の重鎖は他の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。

【0044】

Fc領域は抗体のCH1及びCH2ドメインを含む二つの重鎖断片を含有する。二つの重鎖断片は二つ以上のジスルフィド結合によりCH3ドメインの疎水性相互作用により維持される。

【0045】

Fab'は一つの軽鎖及びVHドメインとCH1ドメイン及びCH1とCH2ドメイン間の領域を含有し、鎖内ジスルフィド結合が二つのFab'断片の二つの重鎖間に形成されF(ab')₂分子を形成するようにする一つの重鎖の一部を含有する。

10

【0046】

F(ab')₂は二つの軽鎖、及び鎖内ジスルフィド結合が二つの重鎖間に形成されるようにCH1及びCH2ドメイン間の固定領域の一部を含む二つの重鎖を含有する。従って、F(ab')₂断片を二つの重鎖間のジスルフィド結合により共に維持される二つのFab'断片でなされる。

【0047】

Fvは重鎖と軽鎖可変領域を全て含むものの、固定領域が欠如されている抗体断片である。

20

【0048】

一本鎖Fv又はscFvは抗体のVH及びVLドメインを含む抗体断片を示し、ここで、これらドメインは単一ポリペプチド鎖内に存在する。一般的に、FvポリペプチドはscFvが抗原結合のため、好ましい構造を形成するようにするVH及びVLドメイン間のポリペプチドリンカーを追加して含む。scFvの概要に対しては文献[参照:Pluckthun(1994)THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES.vol.113.Rosenburg and Moore eds.Springer-Verlag, New York,pp.269-315]を参照する。さらに、国際特許公開公報第WO88/01649号及び米国特許第4,946,778号及び第5,260,203号を参照する。

【0049】

ジアパディは二つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片を意味し、ここで断片は同一なポリペプチド鎖から軽鎖可変ドメイン(VL)に連結された重鎖可変ドメイン(VH)(VH-VL)を含む。同一鎖上の二つのドメイン間にフェアリングを許容しない短いリンカーを用い、ドメインを他の鎖の相補性ドメインと強制してフェアリングさせ二つの抗原結合部位を生成させる。ジアパディは例えば、ヨーロッパ特許第404,097号;WO93/11161;及び文献[Hollinger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)]により詳細に記載されている。

30

【0050】

線形抗体は一对の抗原結合部位を形成する一对の直列Fd断片(VH-CH1-VH-CH1)を含む抗体を指称する。線形抗体は例えば、文献[Zapataなど1995,Protein Eng.8(10):1057-1062]に開示された通り、二重特異的又は単一特異的でもあり得る。

40

【0051】

“ドメイン抗体”は重鎖の可変領域又は軽鎖の可変領域だけを含有する免疫機能性免疫グロブリン断片である。

【0052】

幾つかの例から二つ以上のVH領域はペプチドリンカーと共有結合して2価ドメイン抗体を生成する。2価ドメイン抗体の二つのVH領域は同一であるか又は相異した抗原を標的化することができる。

【0053】

2価抗体は二つの抗原結合領域を含む。幾つかの例から二つの結合領域は同一な抗原特異性を有する。しかしながら、2価抗体は二特異的(bispecific)でもある。

50

【0054】

本発明の抗体又はその断片は当業界に公知された方法、例えば、ファージディスプレイ方法又は酵母細胞表面発現システムを用いて生成することができる。scFvを製造する方法には米国特許第 4,946,778号及び第 5,258,498号に記載された方法が用いられ、Fab.Fa b'及びF(ab')₂断片をを再組合せ的に生成するための方法にはW092/22324などに記載された方法が用いられる。

【0055】

本発明の抗体はヒトを含む哺乳動物、鳥類などを含む任意の動物から由来したものである。好ましくは前記抗体はヒト、マウス、ロバ、羊、兎、山羊、ギニピグ、ラクダ、馬又は鶏の抗体でもある。

10

【0056】

ヒトの抗体はヒトの免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体であって、ヒトの免疫グロブリンライブラリーから分離された抗体又は一つ以上のヒトの免疫グロブリンに対して形質移植され、内在的免疫グロブリンは発現しない動物から分離された抗体が含まれる。(米国特許第5,939,598号参照)。

【0057】

本発明の抗体は酵素、蛍光物質、放射線物質及びタンパク質などと接合されたものでもあり得るが、これに限定はされない。さらに、抗体に前記物質を接合する方法は当業界に公知されている。

【0058】

本発明は前記のような本発明によ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。

20

【0059】

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って、DNA分子など(例えば、cDNA又は遺伝体(genomic DNA)、RNA分子など(例えば、mRNA)、ヌクレオチド類似体などを用いて生成された前記DNA又はRNAの類似体(例えば、ペプチド核酸など及び非自然的に発生するヌクレオチド類似体など)及びこれらのハイブリッドなどが含まれる。前記ポリヌクレオチドは単一ストランド(single-stranded)又は二重ストランド(double-stranded)にもなり得る。

【0060】

本発明のポリヌクレオチドは本発明の抗体又は断片を符号化するものであれば、その配列が特に制限はされないが、好ましくは配列番号7乃至12で表示されるポリヌクレオチドを含むものでもあり得る。

30

【0061】

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に公知された方法によって得られる。例えば、前記抗体の重鎖及び軽鎖の一部又は全部をコーティングするDNA配列又は当該アミノ酸配列に基づいて当分野に公知されたオリゴヌクレオチド合成技法、例えば、重合酵素連鎖反応(PCR)法などを用いて合成することができる。

【0062】

さらに、本発明は前記ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

40

【0063】

本発明のベクターは本発明の抗体又はその断片の再組合せ生産のために本発明のポリヌクレオチドの複製又は発現の目的で利用され、一般的に、シグナル配列、複製起源、一つ以上のマーカー遺伝子、インハンサー要素、プロモーター及び転写終結配列中一つ以上を含む。

【0064】

本発明のベクターは好ましくは発現ベクターでもあって、より好ましくは調節シーケンス、例えば、プロモーターに作動可能に連結された本発明のポリヌクレオチドを含むベクターでもある。

【0065】

50

ベクターの一種であるプラスミド(plasmid)は外部のポリヌクレオチド断片らが結合できる線形又は円形の二重螺旋のDNA分子を意味する。ベクターの他の形態はウイルス性ベクター(viral vector;例えば、複製-欠乏レトロウイルス(replication defective retroviruses)アデノウイルスなど及びアデノ連関ウイルスなど(adenovirus associated viruses))、であって、ここで付加するDNA断片などは前記ウイルス性ゲノム内に導入できる。特定のベクターらはその中にこれらが導入できる宿主細胞(例えば、バクテリア由来及びエピソームの哺乳類ベクターを含むバクテリア性ベクターらの中での自己複製をすることができる。他のベクターら(例えば、非エピソームの哺乳動物ベクターらが宿主細胞内への導入による宿主細胞のゲノム内に統合され、さらに、それにより前記宿主ゲノムと共に複製される。

10

【0066】

発現ベクターは選択されたポリヌクレオチドの発現可能なベクターの一つの形態である。一つのポリヌクレオチドシーケンスは、調節シーケンスが前記ポリヌクレオチドシーケンスの発現(例えば、水準、タイミング又は発現の位置)に影響を与える場合、前記調節シーケンスに“作動可能に連結”される。前記調節シーケンスはそれが作動可能に連結された核酸の発現(例えば、水準、タイミング又は発現の位置)に影響を与える配列である。前記調節シーケンスは例えば、調節された核酸に直接的に又は一つ又はそれ以上の他の分子ら(例えば、前記調節シーケンス及び/又は前記核酸に結合するポリペプチドら)の作用を通じてその影響が及ぶようにすることができる。前記調節シーケンスにはプロモーター、インハンサー及び他の発現調節要素らが含まれる。本発明のベクターは好ましくは SfiI siteにscFv Insertが含まれたpCom3x(phagemid)vectorでもある。

20

【0067】

一方、本発明は本発明のベクターを含む細胞を提供する。

【0068】

本発明の細胞は本発明のポリヌクレオチドを発現する際に用いられる細胞であればその種類は特に制限されない。

【0069】

本発明の細胞/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、煙草又はトマト植物細胞)、動物細胞(例えば、人間細胞、猿の細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞又は昆虫細胞)又はハイブリッドマにもなれる。

30

【0070】

本発明の目的に適合した原核生物はグラム陰性又はグラム陽性遺棄体、例えば、エンテロバクテリアセ(Enterobacteriaceae)、例えば、エスケリチア(Escherichia)、例えば、大腸菌、エンテロバクター属(Enterobacter)、エルウィニア属(Erwinia)、クレブシエラ属(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ属(Salmonella)、例えば、サルモネラチフィムリウム(Salmonella typhimurium)、セラチア(Serratia)、例えば、セラチアマルセスカンス(Serratia marcescans)及びシゼラ(Shigella)、及びバシリ(Bacilli)、例えば、ピ、サブチリス(B.subtilis)及びピ、リケニホルミス(B.licheniformis)、ストモナス(Pseudomonas)、例えば、ピ、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、好ましくは大腸菌、これに限定はされないが、例えば、大腸菌ER2537、大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31,537)、大腸菌W3110(ATCC27,325)又はLacZが発現可能な大腸菌、でもあって、より好ましくは大腸菌ER2537でもある。

40

【0071】

本発明の細胞として真核生物はサカロマイセスセレビジアエ(Saccharomyces cerevisiae)が最も広く用いられる。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、シゾサカロマイセスポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クロイペロマイセス宿主、例えば、ケイ、ラクチス(K.lactis)、ケイ、フラジリス(K.fragilis)(ATCC12,424)、ケイ、ブルガリクス(K.bulgaricus)(ATCC16,045)、ケイ、ウィカラミ(K.wickeramii)

50

(ATCC24,178)、ケイ、ワルチ(K,waltii)(ATCC56,500)、ケイ、ドロソフィラリウム(K,drosophilarum)(ATCC36,906)、ケイ、テルモトレランス(K,athermotolerans)及びケイ、マルシアヌス(K,marxianus)；ヤロウィア(yarrowia)(EP402,226)；ピキアパストリス(Pichia pastoris)(EP183,070)；カンジダ(Candida)；トリコテロマレエシア(Trichoderma reesia)(EP244,234)；ニュロスポラクリサ(Neurospora crassa)；シュバニオマイセス(Schwannomyces)、例えば、シュバニオマイセスオキシデンタリス(occidentalis)；及びフィラメント性真菌、例えば、ニュロスポラ、ペニシリウム(Penicillium)、トリポクラジウム(Toryocladium)及びアスパラギルス(Aspergillus)宿主、例えば、エイ、ニドランス(nidulans)及びエイ、ニガー(niger)が使用可能である。

【 0 0 7 2 】

一方、本発明の細胞は動物細胞特に脊椎動物細胞でもある。培養（組織培養）において脊椎動物細胞の増殖は日常的な方法となり、技術らが幅広く利用可能である。これに制限はされないが、有用な哺乳動物宿主細胞の例はSV40により形質転換された猿の腎臓CV1ライン(COS-7,ATCC CRL1651)、ヒトの胚芽腎臓ライン（懸濁培養からサブクローニングされた293又は293細胞[Grahamなど、1977,J Genvirol.36;59]）、若いハムスタの腎臓細胞(BHK,ATCC CCL10)、チャニスハムスタ卵巣細胞/-DHFR"(CHO,Urlaubなど、1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216;例えば、DG44)、マウスセルロリ細胞(TM4,Mather,1980, Biol.Reprod 23:243-251)、猿の腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70)、アフリカ緑色猿の腎臓細胞(VERO-76,ATCC CRL-1587)、ヒトの頸部ガン細胞(HELA,ATCC.CCL 2)、犬の腎臓細胞(MDCK,ATCC CCL 34)、パファロラット肝細胞(BRL3A ATCC CRL 1442)、ヒトの肺細胞(W138,ATCC CCL 75)、ヒトの肝細胞(Hep G2.HB 8065)、マウス乳房腫瘍(MMT,060562,ATCC CCL51),TR1細胞(Matherなど、1982,Annals NY,Acad,Sci.383:44-68)、MRC5細胞、FS4細胞、ヒトの肝ガン細胞株(HepG2)、HEK293cell(human embryonic kidney cell)及びExpi293FTMcellでもあって、好ましくはCHO cell、HEK293 cell(human embryonic kidney cell)又はExpi293FTM cellでもある。

【 0 0 7 3 】

本発明の細胞は本発明のポリヌクレオチド又はこれを含むベクターで形質転換するか又は形質感染され得る培養された細胞であって、これは継続して前記宿主細胞内で発現できる。再組合わせ細胞は発現されるべきポリヌクレオチドに形質転換するか又は形質感染された細胞を指す。本発明の細胞はさらに、本発明のポリヌクレオチドを含むものの、調節シーケンスが前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されるよう前記細胞内に導入されない限りこれを望む水準に発現しない細胞にもなれる。

【 0 0 7 4 】

本発明の細胞は多様な培地で培養できる。産業的に利用可能な培地、例えば、ハム(Ham's)F10(Sigma-Aldrich Co.,St.Louis.MO)、最小必須培地(MEM、Sigma-Aldrich Co.)RPMI-1640(Sigma-Aldrich Co)、及びドルベコス(Dulbecco's)改質イーグル(Eagle's)培地(DMEM,Sigma-Aldrich Co.)が細胞培養に適合している。前記培地は必要に応じてホルモン及び/又は他の成長因子、塩、緩衝液。ヌクレオチド、抗生剤、微量元素及びグルコース又は同等エネルギー原が追加できる。

【 0 0 7 5 】

本発明の培地は好ましくはSB(Bactotrytone 30g,yeast extract 20g,MOPS buffer 10g/L)medium,FreeStyleTM 293 Medium又はExpi293TM Mediumでもある。

【 0 0 7 6 】

一方、本発明は前記細胞をポリヌクレオチドが発現される条件下で培養して軽鎖及び重鎖可変領域を含むポリペプチドを生産する段階及び前記細胞又はこれを培養した培養培地から前記ポリペプチドを回収する段階を含むヒトKRSに結合する抗体又はその断片の生産方法を提供する。

【 0 0 7 7 】

本発明の生産方法の細胞に対しては前記記述した通りであって、本発明の抗体を符号化するポリヌクレオチドを含めている。

10

20

30

40

50

【0078】

本発明の生産方法のポリペプチドは本発明の抗体又はその断片自体でもあって、本発明の抗体又は断片の他に別のアミノ酸配列が追加して結合されたものでもある。この場合、本技術分野の通常の技術者に公知されている方法を利用して本発明の抗体又はその断片から取除くことができる。

【0079】

前記培養は前記細胞の種類によって培地組成及び条件が異なることもあって、これは本技術分野の通常の技術者が適切に選択及び調節することができる。

【0080】

前記抗体分子は細胞の細胞質内に蓄積されるか又は細胞から分泌されるか適切な信号配列によりペリプラズム又は細胞の培地で標的化されることもあって、ペリプラズム又は細胞の培地で標的化されることが好ましい。さらに、生産された抗体分子を、本技術分野の通常の技術者に公知されている方法を利用してリフォルディング(refolding)させ、機能的形態を有することが好ましい。

10

【0081】

前記ポリペプチドの回収は生産されたポリペプチドの特性及び細胞の特性によって異なることもあって、これは本技術分野の通常の知識を有する者が適切に選択及び調節できる。

【0082】

前記ポリペプチドは細胞内、周辺の細胞質空間に生産されるか又は培地内に適切に分泌できる。若し、ポリペプチドが細胞内で生産されるとこの細胞は第1段階としてタンパク質を放出するために破壊されることもある。粒子型破片、宿主細胞又は溶解された断片は例えば、遠心分離又は限外濾過により除去される。抗体が培地内に分泌される場合、このような発現システムからの上澄液を一般的に、先ず商業的に利用可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amicon又はMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて濃縮させる。タンパク分解を抑制するために、プロテアーゼ抑制剤、例えば、PMSFが任意の先行段階に含まれることもあって、偶発的な汚染物の成長を防止するため抗生剤が含まれることもある。

20

【0083】

細胞から製造された抗体は例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析及び親和度クロマトグラフィーを用いて精製でき、本発明の抗体は好ましくは親和度クロマトグラフィーを通じて精製できる。

30

【0084】

本発明の抗体又はその断片はKRSと特異的に結合するので、例えば、特定細胞、組織、又は血清内KRS発現を検出する、KRSタンパク質を検出して定量化するための診断分析に有用である。

【0085】

従って、本発明は第1項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KRS特異的検出方法を提供する。

【0086】

前記抗体又はその断片を“検出”するため抗体又はその断片は一般的に、検出可能moiety標識できる。

40

【0087】

例えば、文献[Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, 1991, Coliganなど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表示で表示できる。放射能は例えば、シンチレーション係数(scintillation counting)により測定でき、蛍光は蛍光系を利用して定量できる。

【0088】

又は多様な酵素-基質表示が利用可能で前記酵素的標識の例は猩々蠅ルシラファーゼ及び細菌ルシラファーゼ(米国特許第4,737,456号)のようなルシラファーゼ、ルシフェリ

50

ン(luciferin)、2,3-ジヒドロフタラジンディオネス、マレートジヒドロゲナーゼ、ウラゼ(urase)、ホスレディシーファオキシダーゼ(HRPO)のようなファオキシダーゼ、アルカラインホスアターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、ライソザイム、サ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(例えば、ユリカゼ及びザンチンオキシダーゼ)、ラクトファーオキシダーゼ、マイクロファーオキシダーゼなどを含む。抗体に酵素を結合させる技術は例えば、文献[O'Sullivanなど、1981,Methods for the Preparation of Enzyme-抗体Conjugates for use in Enzyme Immunoassay,in Methods in Enzyme.(J.Langone & H.Van Vunakis, eds), Academic press,N.Y.,73;147-166]に記述されている。

10

【0089】

標識は多様な公知された技術を利用して抗体に間接的に接合できる。例えば、抗体はバイオチンに接合でき、前記で言及した3種の広範囲なカテゴリーに属する任意の標識らがアビジンと、又はその反対に接合できる。バイオチンはアビジンに選択的に結合し、従って、この標識はこのような間接的方式で抗体に結合できる。又は抗体に標識の間接的結合を達成するため、抗体は小さいハプテン(hapten)(例えば、ジゴキシンと結合でき、前記にて言及した相異なる種類の標識らの一つが抗ハプテン抗体に接合できる。(例えば、抗ジゴキシン抗体)従って、抗体に対する標識の間接的接合が達成できる。本発明の抗体又はその断片を競争的結合分析、直接及び間接サンドイッチ分析及び免疫沈殿分析のような任意の公知された分析方法に用いられる。

20

【0090】

本発明の抗体又はその断片は診断キットつまり、診断分析を行うための診断キットつまり、使用説明書と共に予め指定された量で試薬らの包装された組合わせに使用できる。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り要求される補助因子を含むことができる。さらに、安定化剤、緩衝液(例えば、遮断緩衝液又は溶解緩衝液)などのような他の添加剤らが含まれ得る。多様な試薬ら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、幅広く変化できる。試薬は溶解の際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出できる。

30

【0091】

本発明の抗体により検出されるKRSはTNE- α により細胞の外に分泌が促進されると分泌されたKRSはmacrophage細胞に結合して活性化させ、免疫反応を誘導するものと明らかにされ、結合したKRSがp38mitogen activivated kinaseなどによる信号伝達によりmacrophage細胞のTNF- α による活性を増加させるか又は細胞のmigrationを促進させるものと報告された。(Park,S.G.,et al kim,H.J.,Min,Y.H.,choi,E.C.,Shin,Y.K.,Park,B.J.,Lee,S.W.and Kim,S.2005 Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response 2005 proc.Nati.Acad.Sci.102(18),6356-6361)KRSはさらに、多様な疾患に関与するものと最近明らかになった。炎症性筋肉疾患患者からKRSに対する自己抗体が存在することが報告(Geipi,C.,Kanterewicz,E.,Gratacos,J.,Targoff,I.N.&Rodriguez-Sanchez,J.L.Coexistence of two antisynthetases is a patient with the antisynthetase syndrome(1996)Arthritis Rheum,39,692-697)されており、ルーゲリック病の原因になるSOD1遺伝子変異患者からKRSがこの酵素に結合して関与することが(Kunst,C.B.,Mezey,E.,Brownstein,M,J,& Paierson,D.Mutations in SOD1 associated with amyotrophic laateral sclerosis cause novel protein interactions(1997)Nat.Genet.15,91-94.);さらに、最近ではガン細胞からリン酸化されたKRSがLaminin受容体の安定化に寄与するのでガン細胞の転移を促進する(Kim,DG et al Chemical inhibition of prometastatic lysyl-tRNA synthetaselaminin receptor interaction.(2013)Nat Chem.Biol.)ことが報告された。

40

【0092】

従って、KRSは検出を通じて特定ガン又は自己免疫疾患及び炎症性疾患の診断、病気の

50

進行状態及び治療前後の予後の評価のための診断マーカーとして使用できる。本発明によるガン又は自己免疫疾患及び炎症性疾患の診断、及び予後の評価は生物学的試料の中からKRSタンパク質を検出することにより行える。

【0093】

従って、本発明は本発明の抗体又はその断片を有効成分として含むガン診断用組成物を提供する。さらに、本発明は本発明の抗体を有効成分として含む自己免疫疾患診断用組成物を提供する。さらに、本発明は本発明の抗体を有効成分として含む炎症性疾患診断用組成物を提供する。

【0094】

従って、本発明は本発明の抗体又はその断片のガン診断用製剤製造のための用途を提供する。さらに、本発明は本発明の抗体又はその断片の自己免疫疾患診断用製剤製造のための用途を提供する。さらに、本発明は本発明の抗体又はその断片の炎症性疾患の診断用製剤製造のための用途を提供する。

10

【0095】

従って、本発明は(a)個体かから生物学的試料を収得する段階、(b)第1項の抗体又はその断片を利用して生物学的試料内KRSタンパク質水準を測定する段階及び(c)前記KRSタンパク質水準を正常個体のKRSタンパク質水準と比較する段階でなされたガン、自己免疫疾患又は炎症性疾患診断方法を提供する。

【0096】

前記生物学的試料は血液及び生物学的起源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これより由来した細胞が含まれる。より具体的に例をあげれ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、眼球液、脳脊髄液、汗、尿、乳、腹水液、滑液、腹膜液などでもある。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、試薬の添加などを含むことができる。さらに、前記試料から核酸及びタンパク質を分離して検出に使用できる。

20

【0097】

前記検出に関しては前述の通りである。

【0098】

本発明の診断方法は正常個体の生物学的試料内KRSタンパク質水準をガン、自己免疫疾患又は炎症性疾患が疑われる個体の生物学的試料内タンパク質発現水準と比較することにより、実際の疾患発病の可否を診断することができる。つまり、ガン、自己免疫疾患又は炎症性疾患に推定される生物学的試料から本発明の抗体又はその断片を利用してKRSタンパク質水準を推定し、正常個体の生物学的試料から本発明の抗体又はその断片を利用してKRSタンパク質水準を推定して両者を比較した後、疾患が疑わしい個体のKRSタンパク質水準が正常個体のものより高いとこれを当該疾患に診断できる。

30

【0099】

前記ガンはその種類が特に制限はされず、例えば、乳房ガン、大腸癌、肺癌、小細胞肺癌、胃癌、肝臓癌、血液癌、骨癌、膵臓癌、皮膚ガン、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、肛門付近癌、結腸癌、ラッパ管癌腫、子宮内膜癌症、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、脳間神経膠症及び脳下垂体腺腫でもあって、好ましくはLaminin receptorに作用して転移を促進するガン腫、例えば、肺癌又は膵臓癌でもある。

40

【0100】

前記自己免疫疾患は例えば、クローン氏病、紅斑病、アトピー、リウマチ、関節炎、橋本甲状腺炎、悪性貧血、エジソン氏病、第1型糖尿、ルーゲリック病、炎症性筋肉疾患(例えば、多発性筋炎、皮膚筋炎、ルプス、慢性疲労症候群、繊維筋肉痛、甲状腺機能低下

50

症と昂進症、経皮症、ベーチェット病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、メニエル症候群、ギリアンバレー症候群、ショーグレン症候群、乾癬、白斑症、全身性経皮症、喘息及び潰瘍性大腸炎で構成された群より選ばれるものでもあって、好ましくはリウマチ関節炎、ルゲリック病、多発性筋炎又は皮膚筋炎でもある。

【0101】

前記炎症性疾患はこれに制限はされないが、浮腫などのような一般的な炎症症状を含み炎症性腸疾患、腹膜炎、骨髄炎、蜂巣炎、膵臓炎、外傷誘発ショック、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、嚢胞性繊維症、急性気管支炎、慢性気管支炎、急性細気管支炎、慢性細気管支炎、骨関節炎、通風、脊椎関節病、強直性脊椎炎、ライター症候群、乾癬性関節病、腸疾患脊椎炎、年少者性強直性脊椎炎、反応性関節病、感染性関節炎、後一感染性関節炎、淋菌性関節炎、結核性関節炎、ウイルス性関節炎、真菌性関節炎、梅毒性関節炎、ライム病、“血管炎症候群”と関連した関節炎、結節性多発動脈炎、過敏性血管炎、ルゲリック肉芽腫症、リウマチ性多発性筋肉痛、関節細胞動脈炎、カルシウム結晶沈着関節病、仮性通風、非関節リウマチズム、精液嚢炎、腱鞘炎、瘦果炎(ペニスエルポー)、神経病性関節疾患(neuropathic joint disease;又は“charcot joint”とも称す)、出血性関節症、Henoch-schoenlein紫斑病、肥厚性骨関節病、多中心性細網組織球腫、脊柱側湾症(scoliosis)、血色素症、血色素血症、高脂蛋白血症、低減マグロブリン血症、家族性地中海熱、ベーチェット病、全身性紅斑性ループス、再帰熱、多発性硬化症、敗血症、敗血性ショック、急性呼吸困難症候群、多発性臓器不全、慢性閉鎖性肺疾患、リウマチ性関節炎、急性肺損傷、気管支肺形成損傷、第2型糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー性痴呆、家族性寒冷自己炎症症候群、マークルウェルス症候群(Muckle Wells syndrome)、新生児発病多発炎症性疾患、慢性乳児神経皮膚関節症候群、成人発症型ステール病、接触性皮膚炎、胞状奇胎、PAPA症候群、高免疫グロブリンD症候群、及びクリオピリン関連周期的症候群などを含む。

10

20

【0102】

ガン、自己免疫疾患及び炎症性疾患を診断する方法は本発明の抗KRS抗体又はその断片及びこれと特異的に結合するKRSタンパク質間に抗体-抗原反応を通じて達成できるが、本発明で用語“抗原-抗体複合体”とは、ガン自己免疫疾患及び炎症性疾患のマーカーであるKRSとこれに特異的な本願発明の抗KRS抗体を意味し、抗原-抗体複合体の形成量は検出ラベルのシグナルの大きさを通じて定量的に測定可能である。

30

【0103】

このような検出ラベルは酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子、レドックス分子量及び放射性同位元素からなるグループの中で選択できるが、必ずしもこれに制限はされない。検出ラベルとして酵素が使用される場合、利用可能な酵素の例には グロブリンダーゼ、 α -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、ファーオキシダーゼ又はアルカラインホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヘキソキナーゼとGDPase, RNase, グルコースオキシダーゼとルシフェラーゼ、ホスホラクタキナーゼ、ホスホエノルピルベートカーボキシラーゼ、アスパルテートアミノトランフェラーゼ、ホスフェノールピルベートデカボキシラーゼ、 α -ラタマーゼなどがあるが、これに制限はされない。蛍光物の例にはフルオレシン、イソチオシアネート、ロダミン、ピコエリテリン、ピコシアニン、アロピコシアニン、 β -ブラデヒド、フルオレスカミンなどがあるが、これに制限はされない。リガンドの例にはビオチン誘導体などがあるが、これに制限はされない。発光物の例にはアクリジニウムエステル、ルシフェリン、ルシファラーゼなどがあるが、これに制限はされない。微小粒子の例にはコロイド金、着色されたラテックスなどがあるが、これに制限はされない。レドックスの分子の例にはアエロセン、ルテニウム着化合物、バイオロゲン、キノン、Tiイオン、ジイミド、1,4-ベンゾキノン、ヒドロキノン、 $K_4 [W(CN)_8] \cdot 4H_2O$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(BPY)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ などが含まれるが、これに制限はされない。放射線同位元素の例には 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re などが含まれるが、これに制限はされない。

40

【0104】

50

本発明の一実施例ではヒトのVK3-23/VL1g遺伝子を骨格とし、CDRに無作為配列を挿入するライブラリーを構築してKRSと選択的に結合するファージを選別して抗体を分離、精製して塩基配列を分析した。

【0105】

本発明の一実施例で精製した抗体がKRSと結合するかウエスタンブロット法で確認した。その結果、本発明の抗体はKRSと結合することを確認した。

【0106】

本発明の他の一実施例では本発明の抗KRSscFv抗体とKRSの親和度を表面共鳴分析方法で測定した。その結果、本発明の抗体は平衡解離定数100nM値を有し、比較的高い親和度を示したことを確認した。

10

【0107】

本発明の他の一実施例では本発明の抗KRSscFv抗体の交叉反応性を測定した。Luminex beadを利用して本発明の抗体とKRSを含む8種の類似タンパク質との反応性を測定した結果、本発明の抗体はKRSを除いた他のKRSタンパク質には結合しないことを確認した。

【0108】

本発明の他の一実施例では本発明の抗KRSscFv抗体の診断用抗体への有用性可否を実験した。本発明の抗体でコーティングされたplateを製作してKRS標準物質を濃度別に希釈して反応させ、結合可否をELISAで測定した。その結果、KRS標準物質に対して濃度依存的に抗体結合が測定されることを確認して本発明の抗体がガン又は自己免疫疾患及び炎症性疾患診断用に使用できることを確認した。

20

【0109】

本発明の他の一実施例では本発明の抗KRS抗体を利用して開発されたELISAキットを使用して膵臓ガン患者の血液を分析した結果、膵臓ガンの最も代表的なバイオマーカーであるCA19-9と同等な程度のKRSが発現されていることを確認し、KRSが両診断用バイオマーカーとして使用することができ、本発明の抗体が有用であることを確認した。

【0110】

さらに、膵臓ガンの多くのバイオマーカーの候補らと比較分析するため、multiplex bead Assayキットを使用して他のバイオマーカーの候補らを分析し、総合的に比較分析した結果、他のバイオマーカーに比べてKRSがCA 19-9と共に代表的なガンバイオマーカーとして使用することができ、本発明の抗体が有用であることを確認した。

30

【発明の効果】

【0111】

従って、本発明の抗体又はその断片はヒトのKRSに特異的に結合して同一なARS familyを含む他のタンパク質と交叉反応性がなく、KRS検出及び抑制が可能であるのでKRS検出及びKRSが関連した疾患であるガン又は自己免疫疾患及び炎症性疾患の診断に効果的である。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】図1は本発明の抗体が目的タンパク質のKRSに結合するかを確認したウエスタンブロット実験結果である。

40

【図2】図2は本発明の抗体であるanti-KRSscFv Biocon-K1の結合親和度を表面プラズモン共鳴(SPR)で測定した結果グラフである(Kd:平衡解離定数、横軸:時間(秒)、縦軸:response unit(RU))。

【図3】図3は本発明の抗体であるanti-KRSscFv Biocon-K1の交叉反応性をLuminex multiplex Assay方法で測定した結果のグラフである(縦軸(F1):蛍光強度(fluorescent intensity),WRS:トリプトファン-tRNA合成酵素、HRS:ヒスチジル-tRNA合成酵素、NRS:アスパラギンシル-tRNA合成酵素:リシル-tRNA合成酵素:SRS:セリル-tRNA合成酵素、YRS:タイロシル-tRNA合成酵素、GRS:グリシル-tRNA合成酵素、AIMP1:ARS結合多機能タンパク質。

【図4】図4は本発明の抗体がKRSを検出できるかを確認するためのELISA実験結果

50

である。(縦軸：450nm級光度、横軸：KRS標準物質の濃度(ng/ml))。

【図5】図5は本発明の抗体を使用して正常人及びガン患者において血中KRS量の検出及相互比較を確認するため、本発明の抗体が含まれたELISA方法で正常人及び膵臓ガン患者の血清から測定した結果である。(A：血中KRS濃度、B：血中CA19-9濃度)。

【図6】図6は本発明の抗体を利用したKRSバイオマーカー測定が膵臓ガン診断用主要バイオマーカーで有用性があるかを確認するため、多くのバイオマーカー候補群をELISA及びmultiplex bead Assay方法で測定したバイオマーカー定量値らを総合的に比較分析した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0113】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

ただし、下記実施例は本発明を例示するのみ本発明の内容が下記実施例に限定されるものではない。

【0114】

<実施例1>

scFvライブラリー構築及び抗KRS scFv

<1-1> scFvライブラリー構築

scFvライブラリーは大韓民国特許10-0961392号に掲載された方法により構築した。

【0115】

ヒトのVH3-23/VL1g遺伝子を基にして相補性結晶部位に無作為配列を挿入することでライブラリーを設計使用して、ベータラクタメイズ遺伝子を選択マーカーで有するプラスミドベクターからベータラクタメイズ遺伝子のリーダー配列直後に制限酵素切断配列らを導入してpFDVプラスミドベクターを製造し、scFv遺伝子ライブラリーを挿入後大腸菌に形質感染させた後、これを培養してライブラリーを構築した。この過程を通じてライブラリー内で非正常的な停止コドン又はフレームシフトを有するscFv遺伝子配列を大部分除去してライブラリーの品質を向上させることが可能である。培養されたライブラリーから誤謬が除去された配列などを重合酵素連鎖反応で増幅した後、これよりscFv遺伝子ライブラリーを再組合わせてpComb3Xファージプラスミドベクターに挿入して大腸菌、ER2537ストレインの大腸菌を形質感染して最終ライブラリーを獲得した。ライブラリーをカルベニシリンを含有するSB(Super broth)培地400mLに培養し、600ナノメータにおける吸光度が0.5になったとき、 10^{13} CUFのVCSM3補助ファージを加えて80rpmで撹拌して1時間37℃で感染させた。ここで最終70ug/mLのカナマイシン抗生剤を入れて30℃、200rpmで撹拌して一夜培養してscFvが表面提示されたファージを生産した。翌朝培養液を遠心分離し、培養液内のファージを4%のポリエチレングリコール8000と3%の塩化ソジウムを添加して沈殿させた。沈殿したファージを50mLのPBS緩衝溶液に溶解させ、このような方式で再度沈殿して最終的に2mLのPBS緩衝溶液に溶解させた。これを遠心分離してこの物質を除去することによりファージscFvライブラリーを得て、一般的に、最終ファージライブラリーには 10^{13} CFU/mL以上のファージ粒子が含まれる。

【0116】

<1-2>抗KRSscFv選別

免疫試験管に10ug/ml濃度のKRSを添加して1時間試験管表面にタンパク質を吸着させ、牛乳粉末3%溶液を試験管に添加してKRSが吸着されない表面を保護した。試験管を空けた後、ここに牛乳粉末3%溶液に分散された 10^{12} CFUの抗体ファージライブラリーを入れて抗原と結合させた。非特異的に結合したTBST溶液で3回洗浄後残っている抗原特異的ファージ抗体を100mMトリエチルアミン溶液を利用して溶離した。

【0117】

溶離したファージを1.0M濃度のTris-HClバッファー(pH7.8)で中和佐瀬、ER2537大腸菌に37℃で1時間感染させて感染した大腸菌をカルベニシリンを含有するLB(Luia-Bertani)寒天培地に塗布して37℃で培養した。翌日培養した大腸菌を3mLのSBカルベニシリン培養液に懸濁して15%グリセロールを添加して一部は-80℃に保管し、残りの内50マイクロリ

10

20

30

40

50

ッターを20mLのSBカルベニシリン2%ブドウ糖溶液に接種して37℃で培養した。培養液の600ナノメータ光線の吸光度が0.5になると遠心分離してバクテリアだけを分離して、これを再び20mLのSBカルベニシリン培養液に懸濁した後、1012PFU(プラグ形成単位)のVCSM13補助ファージを入れて徐々に攪拌して37℃で培養した。

【0118】

1時間後カナマイシン70ug/mlを添加して30℃で速やかに攪拌して(250rpm)一夜培養した。翌日培養液を遠心分離してファージ粒子を含む上澄液1mLをライブラリーに使用して上記のファニング過程を繰返すことにより抗原特異的クローンを濃縮させた。

【0119】

<実施例2>

抗KRSscFv抗体発現及び精製

3-4回程度の繰返しファニング後抗体遺伝子を含む大腸菌をカルベニシリンを含有するLB寒天培地に塗布、培養して単一コロニーを得て、これを200uL SBカルベニシリン溶液に接種、培養後IPTGに誘導してscFvタンパク質を大腸菌のペリプラズム(periplasm)から発現した。大腸菌を40uLの1X TES(50mM Tris, 1mM EDTA, 20%Sucrose, pH8.0)溶液に懸濁後これに0.2X TES溶液60uLを添加して攪拌し4℃で30分以上処理して遠心分離して上澄液でフェリプラゾールを抽出した。

【0120】

<2-1>KRSに対して選別されたscFv抗体発現

選別されたKRSに対するscFv陽性単一コロニークローンをカルベニシリンを含有するSB培地(Bactotrytone 30g, yeast extract 20g, MOPS buffer 10G/L)に5mlに培養してseed cultureを始めてovernight培養後500ml カネニシリン含有SB培地に移してOD600=0.5程度になったとき、IPTGを1mMほど入れて30℃でovernight培養後scFvタンパク質を大腸菌のペリプラズムで発現した。翌日遠心分離して収得した大腸菌を1X TES bufferに(50mM Tris, 1mM EDTA, 20%Sucrose, pH8.0)懸濁後0.2X TESを1.5倍添加して攪拌して遠心分離後ペリプラズムを抽出した。

【0121】

<2-2>選別されたscFv抗体精製

ペリプラズムから抽出したscFv抗体に最終5mM MgSO4を加えてこれを予めPBSに平衡させたNi-NTA beadと混合して1時間冷蔵で攪拌してNi-beadに結合させ、親和度クロマトグラフィーを行い、結合していないタンパク質をPBSで十分に洗浄した。5mM Imidazoleが含有されたバッファーでより十分に洗浄したあと、結合したscFv抗体は200mM Imidazole bufferを利用して溶出した。溶出した抗体は透析して電気移動を通じて純度を確認し、BCA方法でタンパク質を定量して精製された抗体量を記録した後、一定量を分株して冷凍保管した。

【0122】

<2-3>免疫プロット及びsequencing

ペリプラズムから抽出したscFv抗体は免疫プロット技法を使用してhuman細胞から元来発現されたKRSにscFv抗体が結合するか否かの確認に使用した。50ugのHela cell lysateをSDS PAGEを通じて電気移動した後、wet transfer方法でNitrocellulose membraneに移して3%skim milkでblockingはした後、抽出したscFv抗体を添加して結合させた。検出のため、結合したscFvにHRP(horseradish peroxidase)が連結されたAnti-HA二次抗体を反応させて、基質でECL reagentを利用して暗室でフィルム感光した感光された帯は標準分子マーカーと比べてKRSのサイズに該当する帯を確認した。

【0123】

これより確認された抗原特異的抗体クローンはカルベニシリンが含有されたSB培地10mlにovernight培養してplasmid miniprep kitを用いてplasmid DNAを抽出してCapillary sequencing service(Macrogen Co)を介して塩基配列を分析し、Kabat protwin sequence databaseとIMGT(the international ImMunoGeneTicas information system)分析方法に基づきCDR配列を分析した。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 4 】

その結果、KRS抗原と結合してscFvの個数は総 1 件であって、これらの塩基配列は培養培地14であることを確認した。

【 0 1 2 5 】

< 実施例 3 >

抗KRSscFv抗体の親和度測定

KRS抗原に対する本発明抗体の結合親和度をProteOnTMXPR36 SPR(surface plasmon resonance)バイオセンサーを利用して測定した。

【 0 1 2 6 】

具体的に約10ug/mlのKRS抗原を製造社の説明書によってGLCチップ(Bio-Red 6 X 6 sensor chip, Compact capacity amine coupling for protein-protein interactions)に約2,000乃至4,000反応単位に固定化させ、PBSを利用して多様な濃度で希釈した本発明の精製されたscFv抗体(500-30nM)30ulずつを25 で50ul/minの速度でチップに注入し、抗原との相互作用を定量した。チップの表面は0.85%phosphoric acidで再生してProteOnManagerソフトウェアを利用して連合速度と解離速度を計算し、平衡解離定数(KD)は解離速度 / 連合速度の比で計算した。

10

【 0 1 2 7 】

その結果、図 2 に示した通り、本発明の抗体は最大KD 100nM値を有し比較的高いKRS親和度を有することを確認した。

【 0 1 2 8 】

< 実施例 4 >

抗体scFv抗体交叉反応性測定

scFv抗体が他の抗原と反応性があるか否かを判断するため、Luminex beadを利用して本発明の抗体とKRS及び他のARS family proteinとの交差反応性を測定した。

20

【 0 1 2 9 】

<4-1>それぞれのproteinが結合されたLuminex bead製造

Code Noが他のそれぞれのbeadにproteinのamine残基を結合させるため、Bio-rad社のAmine coupling kitの実験過程によってcouplingを行った。まず、 1×10^6 に該当するそれぞれのbeadを96well filter plateに移してactivation bufferでvacuum manifoldを利用して洗浄後50mg/ml S-NHS(N-hydroxysulfosuccinimide)と50mg/mlEDAC(1-ethy-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide)を添加して常温で20分間活性化させた。活性化されたそれぞれのbeadはPBSで洗浄後純度90%以上の精製されたそれぞれの再組合せされたARS抗原、つまり、WRS,HRS,NRS,KRS,SRS,YRS,GRS,imp1(p43)10ugを添加して常温で2時間反応させた。それぞれのARSに連結されたbeadはPBSで2回洗浄後、Blocking bufferを添加して30分間常温で反応させて結合していない残基をblockingした後、PSSで2回洗浄後100ul PSSに再び懸濁して光が遮断されたtubeに保管した。結合されたbeadの数はhemocytometerで測定して記録した。

30

【 0 1 3 0 】

<4-2>Multiplex Assayを利用したCross activity測定

ペリプラズムから抽出された本発明の抗体は検体希釈液(PBST+2%BSA)に1:400濃度で希釈後96 well filterプレートに検体希釈液で順次的に2回ずつ希釈して50ulずつ分株して抗体がないBlank wellには検体希釈液だけを添加した。ARSが結合されたそれぞれのbead well当り2000個beadになるようbead mix tubeにそれぞれ入れて検体希釈液を各well当り50ulずつ分株できる嵩ほどを入れた。bead mix溶液を混合した後、wellに分株して暗室で1時間反応させた。反応が終ってvacuum manifoldを利用してPBS(200ul/well)で3回洗浄後50ulAnti-(HA)-biotin 2次抗体を添加して暗室で1時間追加反応させた。2次抗体と結合したbeadはPBSで3回洗浄後蛍光標識のため、SA-PE(Streptavidin-Phycoerythrin)を2ug/mlになるように添加して暗室で30分間反応させ、PBSで3回洗浄過程を経てPBS 100ulに再び懸濁した。蛍光標識されたbeadはBio-Plex(Luminex)200装備とBio-Plex managerプログラムを利用して蛍光の強度を測定した結果値を分析してそれぞれのARSに

40

50

対する抗体の結合可否を確認した。

【0131】

その結果、図3に示した通り、本発明の抗体は全ての濃度においてKRSを取除いた他のARS family proteinと反応しないことを確認した。

従って、本発明の抗体は他のタンパク質と交差反応性がないことを確認した。

【0132】

<実施例5>

精製された抗KRSscFv抗体を利用したsandwich ELISA pairing test

本発明の抗体が診断用抗体への有用性可否を確認するため、KRSsandwich ELISA pairing testを行った。ELISA構成中capture抗体を本発明の抗体に使用してdetection抗体を従来製品のrabbitポレグロナル抗体でpairing testをしてKRS標準物質に対する定量曲線が描かれるかを確認した。

10

【0133】

まず、本発明の精製された抗体をcoating buffer(0.1Msodium carbonate pH9.0)に希釈してwell当り100-400ngになるようELISA plateに100ulずつ分株した後、常温で3時間放置した。PBSTで3回洗浄後2%BSAを含有したPBST350ulを添加して常温で1時間blockingした後、PBSTで3回洗浄した。抗体をcoatingしたplatewellに精製された再組合わせKRS標準物質を濃度別に検体希釈液に2倍ずつ希釈して100ulずつ入れて常温で1時間反応させた。反応後plateはPBSTで3回洗浄後希釈されたdetection抗体(4ug/ml)100ul添加して追加して常温で1時間反応した。検出のため、plateをPBSTで3回洗浄後HRPが連結されたanti-rabbit IgGを入れて常温で1時間反応させて結合させた。HRPによる発色反応を確認するため、plateをPBSTで3回洗浄後HRP基質であるTMB solution50ulを添加して10分間発色反応を確認とて2N硫酸50ul添加して発色反応を止めた後、readerを利用して450nmにおいて吸光度を測定した。

20

【0134】

その結果、図4に示した通り、再組合わせK標準物質に対してng/ml濃度に該当する標準直線が描かれることを確認した。

【0135】

<実施例6>

抗KRS抗体を利用した膵臓ガン患者の血中KRSバイオマーカー比較分析

30

【0136】

新たに開発したKRS抗体を利用して研究用ELISAキット製品開発を完了し、このキット製品を利用して血中KRSタンパク質の膵臓ガンに対するバイオマーカーとしての有用性を検証して患者血清のバイオマーカー測定に開発されたELISAキットが有用に使用できるかを確認するため、正常人と膵臓ガン患者の血清で実験を行った。

韓国の疾病管理本部韓国人体資源銀行ネットワークからIRB審議通過を得て、慶北大学病院から正常人と膵臓ガン患者の血清で実験した。血中KRSタンパク質の膵臓ガンに対するバイオマーカーとしての有用性を検証するため従来の膵臓ガンバイオマーカーであるCA19-9の血中濃度と比較して実験した。

40

【0137】

本出願人が開発したKRS ELISAキットの始製品と商業化したCA19-9 ELISAキットは製造者の指示により進行した。具体的に抗体がコーティングされた96-wellプレートに検体希釈液を添加して1時間常温で放置して3回以上ワッシングバッファーで洗浄した。ディテクションアンチボディを各wellに添加した後、1時間常温で放置して3回以上ワッシングバッファーで洗浄した。2ndアンチボディを添加してした後、1時間常温で放置して3回以上ワッシングバッファーで洗浄した。TMB substrateを各wellに入れて光がない常温条件で15分間放置して2N硫酸を添加し、発色反応を中断して450nmで吸光度を測定した。

【0138】

図5に示した通り、正常人群と比較して膵臓ガン患者群からKRSが統計的に有意性があ

50

るように増加することが分かった。このような結果は膵臓ガンの単一バイオマーカーで代表的なCA19-9の測定値と比較して見るに、KRSが膵臓ガンに対する診断バイオマーカーとして利用可能性が大きいことが分かり、本出願人が開発した抗KRS抗体が膵臓ガンの診断用抗体として優れた効果を示すことが検証できた。

【0139】

さらに、膵臓ガン診断においてKRSがバイオマーカーとしての重要性及び有用性を調べるため、他の候補バイオマーカーらの測定値と共に比較分析するため、多くの候補バイオマーカーらを産業化したELISAキット及びmultiplex bead assayキットらを購入して測定して見た。測定したバイオマーカーは全てKRS、WRS、AIMPI、CA19-9、CA125、IL-8、CEA、TNF- α 、及びCEACAM-1であり、実験結果はheatmap形式で表現した。

10

【0140】

産業用ELISAキットとmultiplex bead assayキットの場合は、製造された社の指示により進行し、multiplex assayは具体的にそれぞれのバイオマーカーアンチボディビードを2000ビードに該当する容量をもって最終容量3mlに合わせた後、wellに25ulずつ添加し、25ulの検体を各wellに添加した。4 で攪拌して一夜放置した。各wellを洗浄後25ulのディテックションアンチボディを添加して1時間30分間常温で放置した。25ulのstreptavidin-phycoerythrinを各wellに添加し、30分間常温で放置後洗浄した。プレートをLuminex instrument (Bio-plex 200)で測定した後、Merian Fluorescent Intensity試料で分析した。

【0141】

20

図6に示した通り、正常人群と比べて膵臓ガン患者群からKRS膵臓ガンの単一バイオマーカーで代表的なCA19-9が統計的有意性で増加されいることを分かった。さらに、他の候補バイオマーカー測定値らと比較するに、KRSが膵臓ガンに対する診断バイオマーカーとして利用可能性が極めて高いことが分かり、本出願人が開発したKRS抗体が膵臓ガンの診断用抗体として優れた効果を示すことを検証できた。

【産業上の利用可能性】

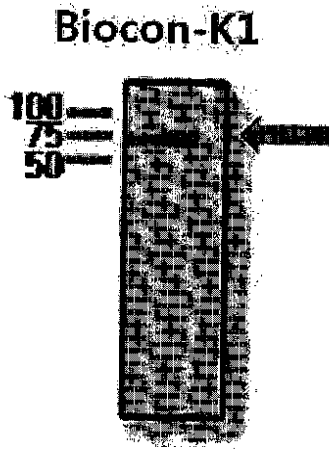
【0142】

以上察した通り、本発明の抗体又はその断片をヒトのKRSに特異的に結合して、同一なARS familyを含む他のタンパク質と交差反応性がなく、KRS検出及び抑制が可能であるのでKRS検出及びKRSが関連した疾患であるガン又は自己免疫疾患及び炎症性疾患の診断用目的に使用可能なため産業上の利用可能性が高い。

30

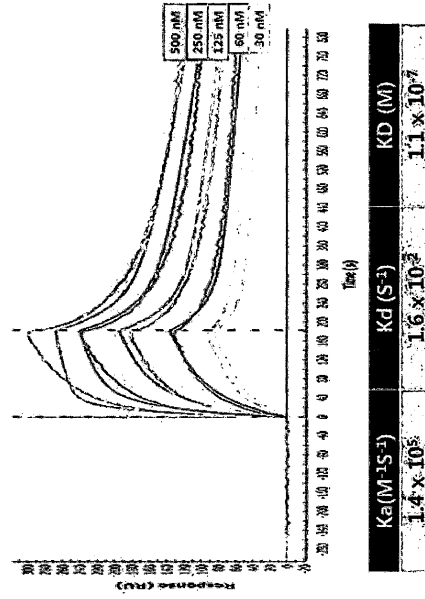
【 図 1 】

【 表 1 】



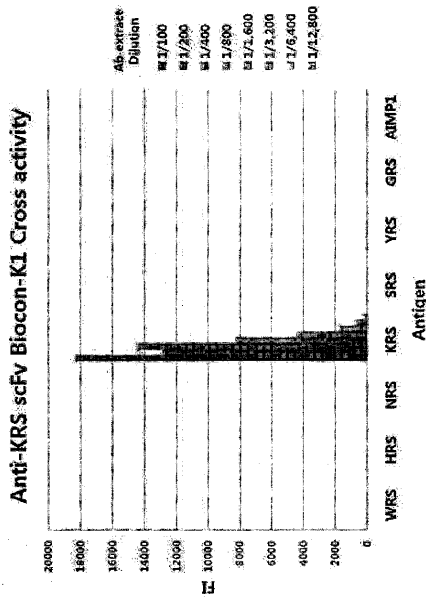
【 図 2 】

【 表 2 】



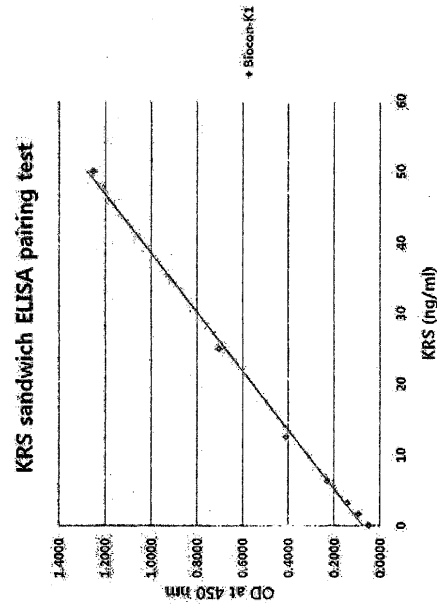
【 図 3 】

【 表 3 】

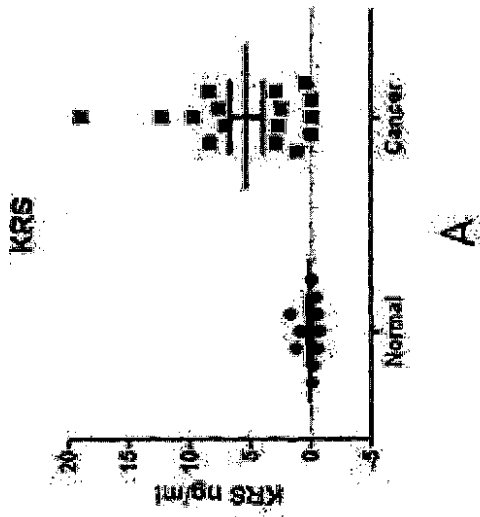


【 図 4 】

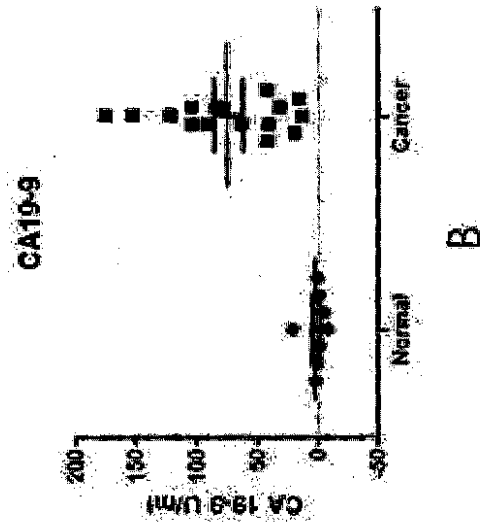
【 表 4 】



【 5 A 】

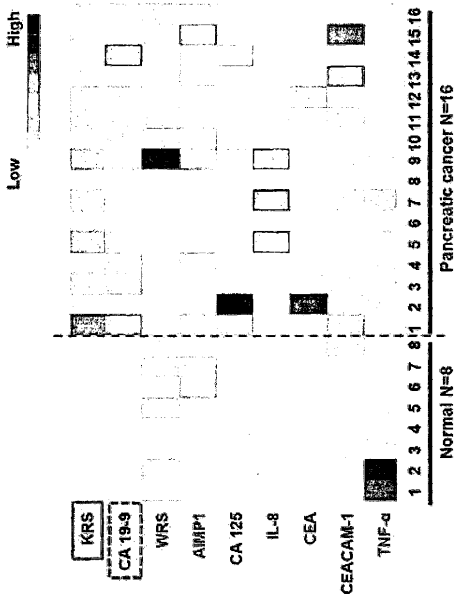


【 5 B 】



【 6 】

[6]



【配列表】

2017502672000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年9月7日(2016.9.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】


Fc領域は抗体のCH₂及びCH₃ドメインを含む二つの重鎖断片を含有する。二つの重鎖断片は二つ以上のジスルフィド結合によりCH₃ドメインの疎水性相互作用により維持される。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/012980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/40(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/40; G01N 33/53; C12N 9/00; G01N 33/574; A61K 39/395 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: antilyl-syl-tRNA synthetase antibody, cancer, immune disorder, cross-reactivity		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2010-0040583 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUND) 20 April 2010 See abstract; claims 1-7; and paragraph [0010].	1-12,14-15,17-18
A	PARK et al., "Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response" PNAS, Vol. 102, No. 18, pp. 6356-6361 (2005) See page 6356; and results.	1-12,14-15,17-18
A	US 2013-0243745 A1 (GREENE et al.) 19 September 2013 See the entire document.	1-12,14-15,17-18
A	YOSHIFUJI et al., "Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies" Autoimmunity, Vol. 39, No. 3, pp. 233-241 (2006) See the entire document.	1-12,14-15,17-18
A	MATSUSHITA et al., "Clinical evaluation of anti-aminoacyl tRNA synthetase antibodies in Japanese patients with dermatomyositis" The Journal of Rheumatology, Vol. 34, No. 5, pp. 1012 - 1018 (2007) See the entire document.	1-12,14-15,17-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" 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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 12 MARCH 2015 (12.03.2015)		Date of mailing of the international search report 13 MARCH 2015 (13.03.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seousa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/012980

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.: **13, 16, 19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13, 16 and 19 pertain to a method for diagnosis of the human body, 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/KR2014/012980

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0040583 A	20/04/2010	NONE	
US 2013-0243745 A1	19/09/2013	AU 2011-261486 A1	17/01/2013
		CA 2800281 A1	08/12/2011
		CN 103118694 A	22/05/2013
		EP 2575857 A2	10/04/2013
		EP 2575857 A4	01/01/2014
		JP 2013-532965 A	22/08/2013
		WO 2011-153277 A2	08/12/2011
		WO 2011-153277 A3	24/05/2012

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2014/012980

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/40(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/40; G01N 33/53; C12N 9/00; G01N 33/574; A61K 39/395 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eCOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항-라이실 tRNA 합성효소 항체, 암, 면역질환, 교차반응성		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2010-0040583 A (서울대학교산학협력단) 2010.04.20 요약; 청구항 1-7; 및 문단 [0010] 참조.	1-12, 14-15, 17-18
A	PARK 외, 'Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response' PNAS, Vol.102, No.18, pp.6356-6361 (2005) 페이지 6356; 및 결과 참조.	1-12, 14-15, 17-18
A	US 2013-0243745 A1 (GREENE 외) 2013.09.19 전체 문헌 참조.	1-12, 14-15, 17-18
A	YOSHIFUJI 외, 'Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies' Autoimmunity, Vol.39, No.3, pp.233-241 (2006) 전체 문헌 참조.	1-12, 14-15, 17-18
A	MATSUSHITA 외, 'Clinical evaluation of anti-aminoacyl tRNA synthetase antibodies in Japanese patients with dermatomyositis' The Journal of Rheumatology, Vol.34, No.5, pp.1012-1018 (2007) 전체 문헌 참조.	1-12, 14-15, 17-18
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2015년 03월 12일 (12.03.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 03월 13일 (13.03.2015)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 7140		심사관 김승범 전화번호 ++82-42-481-3371

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2014/012980

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: 13, 16, 19
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 13, 16 및 19는 사람의 진단방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 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/KR2014/012980

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0040583 A	2010/04/20	없음	
US 2013-0243745 A1	2013/09/19	AU 2011-261486 A1 CA 2800281 A1 CN 103118694 A EP 2575857 A2 EP 2575857 A4 JP 2013-532965 A WO 2011-153277 A2 WO 2011-153277 A3	2013/01/17 2011/12/08 2013/05/22 2013/04/10 2014/01/01 2013/08/22 2011/12/08 2012/05/24

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 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A

(81)指定国 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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, UA, UG, US, UZ

(72)発明者 キム、サンフン

大韓民国 1 3 5 8 5 9 ソウル カンナム グ 3 6 5 ギル ナムブスンハン ロ 4 2
4 1 0 0 5 (ドゴク ドン ドゴクハンシン アパート)

(72)発明者 チェ、ヨン シク

大韓民国 1 3 7 9 0 7 ソウル ソチョ グ 4 ギル ナルト ロ 7 0 5 (ハンシン
タウン アパート、チャムオン ドン) 1 0 0 4 ホ

(72)発明者 シム、ヒョンボ

大韓民国 1 3 5 7 8 9 ソウル カンナム グ 2 9 ギル アプグジョン ロ 2 3 (ヒ
ュンダイ アパート、アプグジョン ドン) 2 0 1 7 0 2

(72)発明者 イ、ナム ジュ

大韓民国 4 7 2 9 5 6 キョンギ ド ナミヤンジュ シ 4 ロ ピョルレ 8 (ハンワ
ドリーム グリーン アパート、ピョルレ ドン) 4 6 0 9 1 1 0 1

(72)発明者 パク、ミン ファ

大韓民国 1 3 0 8 6 0 ソウル トンデムン グ 2 0 ギル アナム ロ 2 4 (チェギ
ドン)

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CE12 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72 AA90X AB01 BA02 CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA50 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	抗KRS单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2017502672A	公开(公告)日	2017-01-26
申请号	JP2016544138	申请日	2014-12-29
[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	キムサンフン チェヨンシク シムヒュンボ イナムジュ パクミンファ		
发明人	キム、サンフン チェ、ヨン-シク シム、ヒュンボ イ、ナム ジュ パク、ミン ファ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/573 C07K16/40 C07K2317/33 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/92 G01N33/564 G01N33/57438 G01N33/57488 G01N2800/7095		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	1020130166791 2013-12-30 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及抗KRS的抗体和本申请中选择性结合KRS (赖氨酰-tRNA合成酶) ，特别是包括抗体或其结合人博克KRS ，方法片段和这此生产关于癌症或自身免疫疾病和炎症疾病的诊断组合物。本发明的抗体或其片段特异性结合人KRS以形成相同的ARS其他与含有家族蛋白质无交叉反应性，可用于癌症或自体免疫和炎症疾病诊断目的的疾病KRS检测和KRS物相关联，因为它是可能的N- KRS检测和抑制。

