

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 7월 9일 (09.07.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/102341 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/012980
- (22) 국제출원일: 2014년 12월 29일 (29.12.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0166791 2013년 12월 30일 (30.12.2013) KR
- (71) 출원인: 재단법인 의약바이오컨버전스연구단 (MEDICINAL BIOCONVERGENCE RESEARCH CENTER) [KR/KR]; 443-270 경기 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술연구원내 B동 8층 (이의동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김성훈 (KIM, Sunghoon); 135-859 서울특별시 강남구 남부순환로 365길 42, 4-1005 (도곡동, 도곡한신아파트), Seoul (KR). 최연식 (CHOI, Yon-Sik); 137-907 서울특별시 서초구 나루터로 4길 70-5 (잠원동, 한신타운아파트) 1004호, Seoul (KR). 심현보 (SHIM, Hyunbo); 135-789 서울특별시 강남구 압구정로 29길 23 (압구정동, 현대아파트) 201-702, Seoul (KR). 이남주 (LEE, Nam Ju); 472-956 경기도 남양주시 별내 4로 8

(별내동, 한화꿈에그린아파트) 4609-1101, Gyeonggi-do (KR). 박민화 (PARK, Min Hwa); 130-860 서울특별시 동대문구 안암로 20길 24(제기동), Seoul (KR).

(74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 135-915 서울특별시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원 국제특허법률사무소, Seoul (KR).

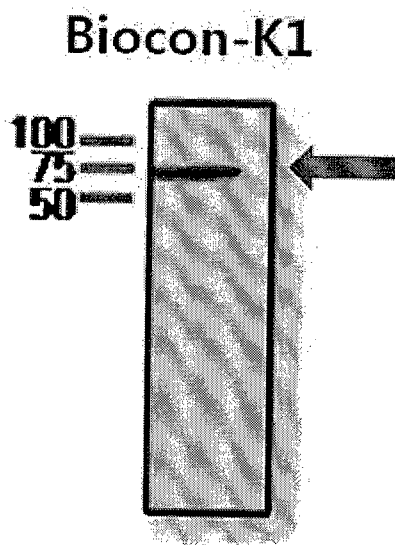
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (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),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTI-KRS MONOCLONAL ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 항 KRS 모노클로날 항체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to an anti-lysyl-tRNA synthetase (KRS) antibody selectively binding to KRS, and a use thereof and, more specifically, to an antibody binding to human KRS or a fragment thereof, a method for producing the same, and a composition containing the same for diagnosing cancer or autoimmune diseases and inflammatory diseases. The antibody or fragment thereof of the present invention specifically binds to human KRS, and enables KRS detection and inhibition due to the absence of cross-linkage reactivity with the other proteins including the same ARS family, and thus the antibody or fragment thereof can be used to detect KRS and diagnose KRS-related diseases or autoimmune diseases and inflammatory diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 KRS(Lysyl-tRNA synthetase)에 선택적으로 결합하는 항 KRS 항체 및 이의 용도에 관한 것으로 보다 구체적으로는 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편, 이의 생산방법 및 이를 포함하는 암 또는 자가면역질환 및 염증성질환 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항체 또는 그 단편은 인간 KRS에 특이적으로 결합하며, 동일한 ARS family를 포함한 다른 단백질과 교차반응성이 없어 KRS 검출 및 억제에 가능하므로 KRS 검출 및 KRS가 관련된 질환인 암 또는 자가면역질환 및 염증성질환의 진단 목적으로 사용될 수 있다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】**【발명의 명칭】**

항 KRS 모노클로날 항체 및 이의 용도

【기술분야】

본 출원은 2013년 12월 30일에 출원된 대한민국 특허출원 제 10-2013-0166791호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

본 발명은 KRS(Lysyl-tRNA synthetase)에 선택적으로 결합하는 항 KRS 항체 및 이의 용도에 관한 것으로 보다 구체적으로는 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편, 이의 생산방법 및 이를 포함하는 암 또는 자가면역질환 및 염증성질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

Aminoacyl-tRNA synthetase(ARS)는 특정 아미노산을 그 해당하는 tRNA에 붙여주는 역할을 하는 효소이며, 고등생물의 경우 아미노산 종류에 따른 20 개의 효소 외에 AIMP1(p43), (AIMP2)p38, (AIMP3)p18 등 multisynthetase complex 형성에 관여하는 3종류를 포함하여 23종의 효소로 구성되어 있으며 multisynthetase complex에 참여하는 효소 외에 몇몇은 free form 형태로도 존재한다. 그러나 최근에 들어 기본적인 기능 외에 특정 환경에서 다양한 다른 활성기능을 가지고 있음이 보고 되었는데 KRS (Lysyl-tRNA synthetase)가 그중의 하나이다. KRS는 macrophage활성화를 통해 면역반응을 유도하는 것으로 밝혀졌는데 TNF- α 에 의하여 세포 밖으로 분비 촉진된 KRS는 p38 mitogen activated kinase 등에 의한 신호전달에 의하여 macrophage 세포의 TNF- α 에 의한 활성을 증가시키거나 세포의 migration을 촉진시키는 것으로 보고되었다. KRS는 또한 다양한 질환에서 관여하는 것으로 최근 밝혀지고 있다. 염증성 근육질환환자에서 KRS에 대한 자가항체가 존재함이 보고되었고, 루게릭병의 원인이 되는 SOD1 유전자 변이환자에서 KRS가 이 효소에 결합하여 관여함이, 또한 최근에는 암세포에서 인산화된 KRS가 Laminin 수용체의 안정화에 기여함으로 암세포의 전이를 촉진함이 보고되었다. 이와 같은 결과로 KRS는 자가면역질환 및 암 환자의 혈청내에 존재 할 수 있으며 중요한 진단 바이오마커로 사용될 수 있음을 보여준다.

하지만 KRS를 비롯한 ARS들에 대한 바이오마커로서의 중요성에도 불구하고

ARS들은 단백질 구조상 유사한 점이 많아 동물로부터 면역반응으로 얻어지는 항체는 다른 ARS에도 결합하는 교차 반응을 보이고 아예 고 감도의 항체가 생성되지 않은 경우가 많다. 본 발명의 항체는 우수한 감도와 ARS간 교차반응이 없는 점에서 연구용 뿐만 아니라 진단용 및 산업상 이용가능성이 높은 항체라 예상된다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명자들은 KRS에 특이적으로 결합하는 항체를 연구하던 중, 파지디스플레이 방법으로 만들어진 라이브러리에서 KRS에 특이적으로 결합하는 단편들을 찾아내고, 이의 서열 및 결합특이성을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 목적은 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편의 생산방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 항체 또는 그 단편을 시료와 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 그 단편을 검출하는 단계를 포함하는 KRS 특이적 검출 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3을 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3을 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 세포를 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건하에서 배양하여, 경쇄 및 중쇄가변영역을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하는 단계 및 상기 세포 또는 이를 배양한 배양 배지로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편의 생산방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 항체 또는 그 단편을 치료

와 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 그 단편을 검출하는 단계를 포함하는 KRS 특이적 검출 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편의 암 진단용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 (a) 개체로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계, (b) 제1항의 항체 또는 그 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 KRS 단백질 수준을 측정하는 단계 및 (c) 상기 KRS 단백질 수준을 정상 개체의 KRS 단백질 수준과 비교하는 단계로 이루어진 개체의 암 진단방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편의 자가면역질환 진단용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 (a) 개체로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계, (b) 제1항의 항체 또는 그 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 KRS 단백질 수준을 측정하는 단계 및 (c) 상기 KRS 단백질 수준을 정상 개체의 KRS 단백질 수준과 비교하는 단계로 이루어진 개체의 자가면역질환 진단방법을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증성질환 진단용 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편의 염증성질환 진단용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 (a) 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계, (b) 제1항의 항체 또는 그 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 KRS 단백질 수준을 측정하는 단계 및 (c) 상기 KRS 단백질 수준을 정상 개체의 KRS 단백질 수준과 비교하는 단계로 이루어진 개체의 염증성질환 진단방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3을 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3을 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편을 제공한다.

라이실-tRNA 합성효소(KRS, Lysyl-tRNA synthetase)는 라이신(Lys)과 tRNA의 결합을 촉진시키는 효소로 ARS(Aminoacyl-tRNA synthetase)의 일종이다. 본 발명의 KRS는 일반적으로 천연형 또는 재조합 인간 KRS, 및 인간 KRS의 비-인간 동족체를 나타낸다.

"항체", "항 KRS 항체", "인간화 항 KRS 항체" 및 "변형 인간화 항 KRS 항체", "anti-KRS antibody"라는 용어는 본 발명에서 가장 광의의 의미로 사용되며, 구체적으로 단일클론 항체(모노클로날 항체, 완전 길이 단일클론 항체 포함), 다클론 항체(폴리클로날 항체), 다중특이 항체(예를 들어 이중특이 항체), 및 항체 단편(예를 들어 가변 영역 및 목적하는 생물 활성(예를 들어 KRS와의 결합)을 나타내는 항체의 다른 부분)을 포함한다.

본 발명의 항체는 KRS와 선택적으로 결합할 수 있도록 특정 아미노산 서열이 경쇄 및 중쇄 CDR에 포함되어 있는 항체로 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체를

모두 포함하며, 바람직하게는 모노클로날 항체일 수 있다. 또한 본 발명의 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간항체를 모두 포함하며 바람직하게는 인간항체 일 수 있다.

본 발명의 모노클로날 항체는 실질적으로 동질 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 나타내며, 즉, 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연적으로 존재하는 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 에피토프에 매우 특이적으로 결합한다.

"모노클로날"이라는 말은 항체가 실질적인 상동성 집단으로부터 수득되는 것과 같이 항체의 특성을 나타내는 말이며, 반드시 항체를 특정 방법에 의해 생산해야 한다는 것은 아니다.

예를 들어, 본 발명의 모노클로날 항체는 문헌[참조: Kohler et al. (1975) Nature 256: 495]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법(참조: 미국 특허 제4,816,567호)에 의해 제조할 수 있다. 또한, 예를 들어, 문헌[참조: Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628 및 Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597 및 Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731]에 기술된 기술을 사용하여 파아지 항체 라이브러리로부터 분리할 수 있다.

*본 발명의 항체는 구체적으로 키메라 항체를 포함하며, 이 경우 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종으로부터 기원하거나 또는 특정 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성을 보이지만, 나머지 부분은 본 발명의 항체가 바람직한 생물학적 활성(예를 들어 KRS와의 선택적 결합)을 나타내는 한, 다른 종으로부터 기원하거나 또는 다른 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성을 나타내는 것이어도 무방하다[참조: 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855].

인간화된 항체는 인간 및 비-인간(예: 쥐, 랫트) 항체의 서열을 모두 포함하는 항체로 일반적으로, 에피토프와 결합하는 부위(CDR)을 제외한 나머지 부분은 인간 항체의 것이며, 에피토프와 결합하는 부위(CDR)는 비-인간 유래의 서열을 포함할 수 있다.

완전한 인간항체는 사람 면역글로불린 단백질 서열만을 포함하는 항체를 말하며, 마우스, 마우스 세포, 또는 마우스 세포로부터 기원한 하이브리도마에서 생

산하거나, 파지 디스플레이 방법으로 생산할 수 있다.

생체에서 생산되는 천연 항체는 통상적으로, 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종-사량체성 당단백질이다. 각 경쇄는 1개의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄와 연결되지만, 디설파이드 연쇄수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄들 간에 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 규칙적으로 이격된 쇠내 디설파이드 브릿지를 또한 갖고 있다. 각 중쇄는 한 말단에 가변 도메인(VH)에 이어 수 많은 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인(VL)을 갖고, 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는데; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특별한 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 간에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄의 가변 영역은 "VH" 또는 "VH"로 기재하며, 경쇄의 가변 영역은 "VL" 또는 "VL"로 기재한다. 이들 도메인은 일반적으로, 항체의 가장 가변 부분이고, 항원 결합 부위를 포함한다.

"초가변성 (hypervariable)"이란 용어는 상기 가변 영역 내의 몇몇 서열들이 항체들간 서열에 있어서 광범위하게 상이하며 그의 특이적인 항원 결정인자들에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 직접적으로 관련되는 잔기들을 포함한다는 사실을 지칭한다.

경쇄 및 중쇄 가변 영역 모두에 있어서 초가변성은 상보성 결정부위(CDR) 또는 초가변성 루프(HVL)로서 공지된 3 개의 분절들에 집중된다. CDR은 문헌 [Kabat 등, 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.]에서의 서열 비교에 의해 한정되는 반면, HVL은 문헌 [Chothia and Le나 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917]에 개시된 바와 같이, 상기 가변 영역의 3 차원 구조에 따라 구조적으로 한정된다. 카바트 (Kabat)에 의해 한정된 바와 같이, CDR-L1은 경쇄 가변 영역에서 대략 잔기 24-34에, CDR-L2는 대략 잔기 50-56에, CDRL3은 대략 잔기 89-97에 위치하며; CDR-H1은 중쇄 가변 영역에서 대략 잔기 31-35에, CDR-H2는 대략 잔기 50-65에, CDR-H3은 대략 잔기 95-102에 위치한다.

상기 중쇄 및 경쇄 각각 내의 3 개의 CDR들은 틀 부위 (FR)에 의해 분리되

며, 상기 부위는 덜 가변적인 경향이 있는 서열들을 포함한다. 상기 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에서부터 카복시 말단까지, 상기 FR 및 CDR은 하기의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 상기 FR의 큰 β 시트 배치는 상기 각각의 쇠 내부의 CDR을 서로뿐만 아니라 다른 쇠로부터의 CDR에 가깝게 한다. 생성되는 형태는 항원 결합 부위에 기여하지만 (Kabat 등, 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669 참조), 모든 CDR 잔기들이 항원 결합에 직접 관여할 필요는 없다.

본 발명의 항체는 경쇄 및 중쇄 가변영역에 속하는 각 CDR이 각각 특정 서열을 포함하여, KRS와 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하며, 구체적으로 본 발명의 항체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3을 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3을 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체일 수 있다.

본 발명의 항체는 바람직하게는 특정 경쇄가변영역 및 중쇄가변영역을 포함할 수 있으며, 구체적으로 경쇄가변영역으로 서열번호 13의 137 번째 내지 246 번째 아미노산 서열을 포함하며, 중쇄가변영역으로 서열번호 13의 1 번째 내지 121 번째 아미노산 서열을 포함하는 항체일 수 있다.

본 발명의 항체는 가장 바람직하게는 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체일 수 있다.

본 발명의 항체 단편, 단편 또는 “그 단편”은 모 항체의 결합 특이성의 적어도 일부를 보유하는, 전형적으로 적어도 모 항체의 항원 결합의 일부 또는 가변영역(예를 들어, 하나 이상의 CDR)를 포함하는 항체의 단편 또는 유도체를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 일본쇄(single-chain) 항체 분자, 예를 들어, sc-Fv; 및 항체 단편으로부터 형성된 다특이적 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 전형적으로, 항체 단편 또는 유

도체는 해당 활성이 물 기준으로 표현되는 경우 이의 KRS 결합 활성의 10% 이상을 보유한다. 바람직하게는, 항체 단편 또는 유도체는 모 항체로서의 KRS 결합 친화도의 적어도 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 또는 그 이상을 보유한다. 또한, KRS 항체 단편은 이의 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않는 보존적 아미노산 치환(항체의 보존적 변이체라고 함)을 포함할 수 있다. 본 발명의 "결합 화합물"은 항체 및 그 단편 둘 다를 나타낸다.

Fab는 하나의 경쇄, 및 하나의 중쇄의 CH1(제1 불변 도메인) 및 가변 영역으로 이루어진다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 디설파이드 결합을 형성할 수 없다.

Fc 영역은 항체의 CH1 및 CH2 도메인을 포함하는 두 개의 중쇄 단편을 함유한다. 두 개의 중쇄 단편은 두 개 이상의 디설파이드 결합에 의해 및 CH3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 함께 유지된다.

Fab'은 하나의 경쇄, 및 VH 도메인과 CH1 도메인 및 CH1과 CH2 도메인 사이의 영역을 함유하여 쇠내디설파이드 결합이 두 개의 Fab' 단편의 두 개의 중쇄 사이에 형성되어 F(ab')₂ 분자를 형성하도록 하는 하나의 중쇄의 일부를 함유한다.

F(ab')₂는 두 개의 경쇄, 및 쇠내 디설파이드 결합이 두 개의 중쇄 사이에 형성되도록 CH1 및 CH2 도메인 사이의 고정 영역의 일부를 함유하는 두 개의 중쇄를 함유한다. 따라서, F(ab')₂ 단편은 두 개의 중쇄 사이의 디설파이드 결합에 의해 함께 유지되는 두 개의 Fab' 단편으로 이루어진다.

Fv는 중쇄와 경쇄 가변 영역을 모두 포함하지만, 고정 영역이 결여되어 있는 항체 단편이다.

일본쇄(single-chain) Fv 또는 scFv는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 단편을 나타내며, 여기서, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇠내에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위해 바람직한 구조를 형성하도록 하는, VH 및 VL 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 개요에 대해서는 문헌[참조: Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315]을 참조한다. 또한, 국제 특허 공개공보 제WO 88/01649호 및 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,260,203호를 참조한다.

디아바디는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미하며, 여기서 단편은 동일한 폴리펩타이드쇄에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH) (VH-VL)을 포함한다. 동일 쇠 상의 2개 도메인 사이에 페어링을 허용하

지 않는 짧은 링커를 사용하여, 도메인을 다른 쇠의 상보성 도메인과 강제로 페어링시켜 2개의 항원-결합 부위를 생성시킨다. 디아바디는, 예를 들어 유럽 특허 제 404,097호; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다.

선형 항체는 한 쌍의 항원 결합 부위를 형성하는 한 쌍의 직렬 Fd 단편 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 항체를 지칭한다. 선형 항체는 예를 들어 문헌 [Zapata 등 1995, Protein Eng. 8 (10):1057-1062]에 개시된 바와 같이 이중특이적 또는 단일 특이적일 수 있다.

"도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 면역 기능성 면역글로불린 단편이다.

몇몇 예에서, 두 개 이상의 VH 영역은 펩타이드 링커와 공유결합하여 2가 도메인 항체를 생성한다. 2가 도메인 항체의 두 개의 VH 영역은 동일하거나 상이한 항원을 표적화할 수 있다.

2가 항체는 두 개의 항원 결합 영역을 포함한다. 몇몇 예에서, 두 개의 결합 영역은 동일한 항원 특이성을 갖는다. 그러나, 2가 항체는 이특이적(bispecific)일 수 있다.

본 발명의 항체 또는 그 단편은 당업계에 알려져 있는 방법, 예를 들어, 파지 디스플레이 방법 또는 효모 세포 표면 발현 시스템을 사용하여 생성될 수 있다. scFv를 제조하는 방법으로는 미국특허 제 4,946,778호 및 제 5,258,498호에 기재된 방법이 사용될 수 있으며, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합적으로 생성하기 위한 방법으로는 WO 92/22324 등에 기재된 방법이 사용될 수 있다.

본 발명의 항체는 인간을 포함하는 포유동물, 조류 등을 포함한 임의의 동물로부터 유래한 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 항체는 인간, 생쥐, 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니피그, 낙타, 말 또는 닭의 항체일 수 있다.

인간 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 가진 항체로서, 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 분리된 항체 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대하여 형질 이식되고 내재적 면역글로불린은 발현하지 않는 동물로부터 분리된 항체가 포함된다(미국특허 제 5,939,598호 참조).

본 발명의 항체는 효소, 형광 물질, 방사선 물질 및 단백질 등과 접합된 것

일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 항체에 상기 물질을 접합하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

본 발명은 또한 상기한 바와 같은 본 발명에 따른 항체 또는 그 단편을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

폴리뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 또는 핵산으로 기재될 수도 있으며, DNA분자들(예를 들어, cDNA 또는 유전체(genomic DNA), RNA 분자들(예를 들어, mRNA), 뉴클레오티드 유사체들을 사용하여 생성된 상기 DNA 또는 RNA의 유사체들(예를 들어, 펩티드 핵산들 및 비-자연적으로 발생하는 뉴클레오티드 유사체들) 및 이들의 하이브리드들이 포함된다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥(single-stranded) 또는 이중-가닥(double-stranded)이 될 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체 또는 그 단편을 암호화하는 것이면, 그 서열이 특별히 제한되지 아니하나 바람직하게는 서열번호 7 내지 12로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

본 발명의 항체 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 당업계에 잘 알려진 방법에 의하여 얻어질 수 있다. 예를 들어, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄의 일부 또는 전부를 코딩하는 DNA 서열 또는 해당 아미노산 서열에 근거하여, 당분야에 잘 알려진 올리고뉴클레오타이드 합성기법, 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR)법 등을 사용하여 합성할 수 있다.

또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

본 발명의 벡터는 본 발명의 항체 또는 그 단편의 재조합 생산을 위하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 복제 또는 발현의 목적으로 이용되며, 일반적으로 시그널 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함한다.

본 발명의 벡터는 바람직하게는 발현벡터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 조절시퀀스, 예를 들어 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터일 수 있다.

벡터의 일종인 플라스미드(plasmid)는 외부의 폴리뉴클레오티드 단편들이 결합될 수 있는 선형 또는 원형의 이중 나선의 DNA 분자를 의미한다. 벡터의 다른 형태는 바이러스성 벡터(viral vector ; 예를 들어, 복제-결핍 레트로바이러스

(replication defective retroviruses), 아데노바이러스들 및 아데노-연관 바이러스들(adenoassociated viruses))이며, 여기에서 부가의 DNA 단편들은 상기 바이러스성 게놈(viral genome) 내로 도입될 수 있다. 특정의 벡터들은 그 안으로 이들이 도입되는 숙주세포(예를 들어, 박테리아 유래(bacterial origin) 및 에피솜의 포유류 벡터(episomal mammalian vectors)를 포함하는 박테리아성 벡터들(bacterial vectors)) 내에서의 자가복제(autonomous replication)를 할 수 있다. 다른 벡터들(예를 들어, 비-에피솜의 포유동물 벡터들(non-episomal mammalian vectors))이 숙주세포 내로의 도입에 의한 숙주세포의 게놈 내로 통합(integrated)되고 그리고 그에 의하여 상기 숙주 게놈과 함께 복제된다.

발현벡터(expression vector)는 선택된 폴리뉴클레오티드의 발현할 수 있는 벡터의 한 형태이다. 하나의 폴리뉴클레오티드 시퀀스는, 조절 시퀀스가 상기 폴리뉴클레오티드 시퀀스의 발현(예를 들어, 수준, 타이밍 또는 발현의 위치)에 영향을 주는 경우, 상기 조절 시퀀스(regulatory sequence)에 "작동가능하게 연결"된다. 상기 조절 시퀀스는 그것이 작동가능하게 연결되는 핵산의 발현(예를 들어, 수준, 타이밍 또는 발현의 위치)에 영향을 주는 서열이다. 상기 조절 시퀀스는, 예를 들어, 조절된 핵산에 직접적으로 또는 하나 또는 그 이상의 다른 분자들(예를 들어, 상기 조절 시퀀스 및/또는 상기 핵산에 결합하는 폴리펩티드들)의 작용을 통하여 그의 영향이 미치도록 할 수 있다. 상기 조절 시퀀스에는 프로모터(promoters), 인핸서(enhancers) 및 다른 발현 조절 요소들이 포함된다. 본 발명의 벡터는 바람직하게는 SfiI site에 scFv Insert가 포함된 pCom3x (phagmid) vector일 수 있다.

한편 본 발명은 본 발명의 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

본 발명의 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하는데 사용될 수 있는 세포면 그 종류는 특별히 제한되지 아니한다.

본 발명의 세포는 숙주세포는 원핵생물(예를 들어 대장균), 진핵생물(예를 들어 효모 또는 다른 균류), 식물 세포(예를 들어 담배 또는 토마토 식물 세포), 동물 세포(예를 들어 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터(hamster) 세포, 집쥐 세포(rat cell), 생쥐 세포(mouse cell) 또는 곤충 세포) 또는 하이브리도마가 될 수 있다.

본 목적에 적합한 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세 (Enterobacteriaceae), 예를 들어 에스케리치아 (Escherichia),

예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터 (*Enterobacter*), 에르위니아 (*Erwinia*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 살모넬라 (*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 티피무름 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아 (*Serratia*), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스 (*Serratia marcescans*) 및 시겔라 (*Shigella*), 및 바실리 (*Bacilli*), 예를 들어, 비. 섭틸리스 (*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스 (*B. licheniformis*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 예를 들어 피. 애루기노사 (*P. aeruginosa*) 및 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)를 포함한다. 본 발명의 세포는 본 발명의 벡터를 발현가능 한 것이면, 특별히 제한되지 아니하나, 바람직하게는 이. 콜라이, 이에 한정되지 아니하나 예를 들어, 이. 콜라이 ER2537, 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325) 또는 LacZ가 발현 가능한 이. 콜라이일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 이. 콜라이 ER2537일 수 있다.

본 발명의 세포로서 진핵생물은 사카로마이세스 세레비지아에 (*Saccharomyces cerevisiae*)가 가장 흔히 사용된다. 그러나, 많은 다른 속, 종 및 균주, 이에 한정되지 아니하나, 예를 들어 쉬조사카로마이세스폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 클루이베로마이세스 속주, 예를 들어 케이. 락티스 (*K. lactis*), 케이. 프라길리스 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위커라미 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티 (*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸 (*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906), 케이. 테르모톨레란스 ((*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스 (*K. marxianus*); 야로위아 (*Yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다 (*Candida*); 트리코데르마 레에시아 (*Trichoderma reesia* (EP 244,234)); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 쉬바니오마이세스 (*Schwanniomyces*), 예를 들어 쉬바니오마이세스 옥시덴탈리스 (*occidentalis*); 및 필라멘트성 진균, 예를 들어 뉴로스포라, 페니실리움 (*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*) 및 아스퍼질러스 (*Aspergillus*) 속주, 예를 들어 에이. 니들란스 (*nidulans*) 및 에이. 니거 (*niger*)가 사용가능 하다.

한편 본 발명의 세포는 동물세포 특히 척추동물 세포일 수 있다. 배양 (조직 배양)에서 척추동물 세포의 증식은 일상적인 방법이 되었고 기술들이 폭넓게 이용 가능하다. 이에 제한되지 아니하나, 유용한 포유동물 숙주 세포의 예는 SV40에 의

해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인 (COS-7, ATCC CRL 1651), 인간 배아 신장 라이 (현탁 배양으로부터 서브클로닝된 293 또는 293 세포[Graham 등, 1977, J Gen Virol. 36: 59]), 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL10), 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR" (CHO, Urlaub 등, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; 예를 들어, DG44), 마우스 세르톨리 세포 (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587), 인간 경부 암세포 (HELA, ATCC CCL 2), 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34), 버팔로 랫트 간세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442), 인간 폐세포 (W138, ATCC CCL 75), 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065), 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51), TRI 세포(Mather 등, 1982, Annals NY. Acad. Sci. 383: 44-68), MRC 5 세포, FS4 세포, 인간 간암 세포주 (Hep G2), HEK 293 cell(human embryonic kidney cell) 및 Expi293FTM cell일 수 있으며, 바람직하게는 CHO cell, HEK 293 cell(human embryonic kidney cell) 또는 Expi293FTM cell일 수 있다.

본 발명의 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 벡터로 형질전환되거나 또는 형질감염(transfected)될 수 있는 배양된 세포이고, 이는 계속해서 상기 숙주세포 내에서 발현될 수 있다. 재조합 세포는 발현되어야 할 폴리뉴클레오티드로 형질전환되거나 또는 형질감염된 세포를 말한다. 본 발명의 세포는 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하나, 조절 시퀀스가 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되도록 상기 세포 내로 도입되지 않는 한 이를 원하는 수준으로 발현하지 않는 세포가 될 수 있다.

본 발명의 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예컨대 햄 (Ham's) F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 최소 필수 배지(MEM, Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), 및 돌베코 (Dulbecco's) 개질 이글 (Eagle's) 배지 (DMEM, Sigma-Aldrich Co.)가 세포를 배양하기에 적합하다. 상기 배지는 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자, 염, 완충액, 뉴클레오티드, 항생제, 미량 원소 및 글루코스 또는 동등 에너지원이 추가될 수 있다.

본 발명의 배지는 바람직하게는 SB (Bactotryptone 30g, yeast extract 20g, MOPS buffer 10g/L) Medium, FreeStyle™ 293 Medium 또는 Expi293™ Medium일 수 있다.

한편 본 발명은 상기 세포를 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건하에서 배양하여, 경쇄 및 중쇄가변영역을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하는 단계 및 상기 세포 또는 이를 배양한 배양 배지로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편의 생산방법을 제공한다.

본 발명 생산방법의 세포에 대하여는 상기 기술한 바와 같으며, 본 발명의 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 있다.

본 발명 생산방법의 폴리펩타이드는 본 발명의 항체 또는 그 단편 그 자체일 수 있으며, 본 발명의 항체 또는 그 단편 외 다른 아미노산서열이 추가로 결합된 것일 수 있다. 이 경우 본 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 본 발명의 항체 또는 그 단편으로부터 제거할 수 있다.

상기 배양은 상기 세포의 종류에 따라 배지조성 및 배양 조건이 달라질 수 있으며, 이는 본 기술분야의 통상의 기술자가 적절히 선택 및 조절할 수 있다.

상기 항체 분자는 세포의 세포질 내에 축적되거나, 세포로부터 분비되거나, 적절한 신호 서열에 의하여 페리플라즈م 또는 세포외 배지 (supernatant)로 표적화 (targeted)될 수 있으며, 페리플라즈م 또는 세포외 배지로 표적화되는 것이 바람직하다. 또한, 생산된 항체 분자를 본 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 리폴딩 (refolding)시키고 기능적 형태 (conformation)를 갖도록 하는 것이 바람직하다.

상기 폴리펩타이드의 회수는 생산된 폴리펩타이드의 특성 및 세포의 특성에 따라 달라질 수 있으며, 이는 본 기술분야의 통상의 지식을 가진자가 적절히 선택 및 조절할 수 있다.

상기 폴리펩타이드는 세포내, 주변 세포질 공간에 생산되거나 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 만약 폴리펩타이드가 세포 내에서 생산되면, 이 세포는 제1 단계로서 단백질을 방출하기 위하여 파괴될 수 있다. 입자형 파편, 숙주 세포 또는 용해된 단편은 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상등액을 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛을 사용하여 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위하여 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF가 임의의 선행 단계에 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위하여 항생제가 포함될 수 있다.

세포로부터 제조된 항체는 예를 들어 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있고, 본 발명의 항체는 바람직하게는 친화도 크로마토그래피를 통하여 정제할 수 있다.

본 발명의 항체 또는 그 단편은 KRS와 특이적으로 결합하므로 예를 들어, 특정 세포, 조직, 또는 혈청 내 KRS 발현을 검출하는, KRS 단백질을 검출하고 정량하기 위한 진단 분석에 유용하다.

따라서 본 발명은 제1항의 항체 또는 그 단편을 시료와 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 그 단편을 검출하는 단계를 포함하는 KRS 특이적 검출 방법을 제공한다.

상기 항체 또는 그 단편을 '검출'하기 위하여, 항체 또는 그 단편은 일반적으로 검출가능 모이어티로 표지될 수 있다.

예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, 1991, Coligen 등, Ed. Wiley-Interscience, New York, N. Y., Pubs]에 기술된 기술을 이용하여, 방사성 동위원소 또는 형광표지로 표지될 수 있다. 방사능은, 예를 들어, 신틸레이션 계수(scintillation counting)에 의해 측정될 수 있으며, 형광은 형광계를 이용하여 정량될 수 있다.

또는 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하며, 상기 효소적 표지의 예는 초파리 루시페라제 및 세균 루시페라제 (미국 특허 제4,737,456호)와 같은 루시페라제, 루시페린 (luciferin), 2,3-다이하이드로프탈라진디오네스, 말레이트 디하이드로게나제, 유라제 (urase), 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRPO)와 같은 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 라이소자임, 사카라이드 옥시다제 (예를 들어 글루코스옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나제), 헤테로사이클릭 옥시다제 (예를 들어 유리카제 및 잔틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다. 항체에 효소를 접합시키는 기술은 예를 들어, 문헌 [O'Sullivan 등, 1981, Methods for the Preparation of Enzyme-항체 Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N. Y., 73: 147-166]에 기술되어 있다.

표지는 다양한 공지된 기술을 이용하여 항체에 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체는 바이오틴에 접합될 수 있고 상기에 언급된 3종의 광범위한 카테

고리에 속하는 임의의 표지들이 아비딘과, 또는 그 반대로 접합될 수 있다. 바이오 틴은 아비딘에 선택적으로 결합하고, 따라서 이 표지는 이러한 간접적 방식으로 항체에 접합될 수 있다. 또는, 항체에 표지의 간접적 접합을 달성하기 위하여, 항체는 작은 합텐 (hapten) (예를 들어, 디옥신 [digoxin])과 접합될 수 있고 상기에 언급된 서로 다른 유형의 표지들의 하나가 항-합텐 항체에 접합될 수 있다 (예컨대, 항-디옥신 항체). 따라서, 항체에 대한 표지의 간접적 접합이 달성될 수 있다.

본 발명의 항체 또는 그 단편은 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석, 및 면역침전 분석과 같은 임의의 공지된 분석 방법에 사용될 수 있다.

본 발명의 항체 또는 그 단편은 진단 키트 즉, 진단 분석을 수행하기 위한 진단 키트, 즉 사용설명서와 함께 미리 지정된 양으로 시약들의 포장된 조합에 사용될 수 있다. 항체가 효소로 표지된 경우에, 키트는 기질 및 발색단 또는 형광단을 제공하는 기질 전구체로서 효소에 의해 요구되는 보조인자 (cofactor)를 포함할 수 있다. 또한, 안정화제, 완충액 (예를 들어, 차단 완충액 또는 용해 완충액) 등과 같은 다른 첨가제들이 포함될 수 있다. 다양한 시약들의 상대적인 양은 분석의 민감도를 충분히 최적화시키는 시약의 용액 내 농도를 제공하기 위해 폭넓게 변화될 수 있다. 시약은 용해 시 적절한 농도를 갖는 시약 용액을 제공하게 될 부형제를 포함하는, 일반적으로 동결건조된, 건조 분말로서 제공될 수 있다.

본 발명의 항체에 의해 검출되는 KRS는 TNF- α 에 의하여 세포 밖으로 분비가 촉진되면 분비된 KRS는 macrophage 세포에 결합하여 활성화 시켜 면역반응을 유도하는 것으로 밝혀졌는데 결합된 KRS가 p38 mitogen activated kinase 등에 의한 신호전달에 의하여 macrophage 세포의 TNF- α 에 의한 활성을 증가시키거나 세포의 migration을 촉진시키는 것으로 보고되었다.(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. Natl. Acad. Sci. 102(18), 6356-6361) KRS는 또한 다양한 질환에서 관여하는 것으로 최근 밝혀지고 있다. 염증성 근육질환 환자에서 KRS에 대한 자가항체가 존재함이 보고(Gelpi, C., Kanterewicz, E., Gratacos, J., Targoff, I. N. & Rodriguez-Sanchez, J. L. Coexistence of two antisynthetases in a patient with the antisynthetase syndrome (1996) Arthritis Rheum. 39, 692-697)되었으며 루게릭병의 원인이 되는 SOD1 유전자 변이환자에서 KRS가 이 효소에 결합하여 관여함이

(Kunst, C. B., Mezey, E., Brownstein, M. J. & Patterson, D. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions (1997) Nat. Genet. 15, 91-94.), 또한 최근에는 암세포에서 인산화된 KRS가 Laminin 수용체의 안정화에 기여함으로써 암세포의 전이를 촉진함(Kim, DG et al Chemical inhibition of prometastatic lysyl-tRNA synthetase laminin receptor interaction.(2013) Nat Chem. Biol.)이 보고되었다.

따라서, KRS는 검출을 통해 특정 암 또는 자가면역질환 및 염증성질환의 진단, 병의 진행 상태 및 치료전후의 예후의 평가를 위한 진단 마커로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 암 또는 자가면역질환 및 염증성질환의 진단 및 예후 평가는 생물학적 시료 중에서 KRS 단백질을 검출함으로써 수행될 수 있다.

따라서 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 본 발명의 항체를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 진단용 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 본 발명의 항체를 유효성분으로 포함하는 염증성질환 진단용 조성물을 제공한다.

따라서 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그 단편의 암 진단용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다. 또한 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그 단편의 자가면역질환 진단용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다. 또한 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그 단편의 염증성질환 진단용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다.

따라서 본 발명은 (a) 개체로부터 생물학적 시료를 획득하는 단계, (b) 제1항의 항체 또는 그 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 KRS 단백질 수준을 측정하는 단계 및 (c) 상기 KRS 단백질 수준을 정상 개체의 KRS 단백질 수준과 비교하는 단계로 이루어진 암, 자가면역질환 또는 염증성질환 진단방법을 제공한다.

상기 생물학적 시료는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료, 생검 표본, 조직 배양과 같은 고형 조직 시료 또는 이로부터 유래된 세포가 포함된다. 보다 구체적으로 예를 들면 이에 한정되지는 않으나 조직, 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액, 복막액 등일 수 있다. 상기 시료는 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터 획득될 수 있다. 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료로부터 핵산 및 단백질을 분리하여 검출에 사용할 수 있다.

상기 검출에 관하여는 앞서 설명한 바와 같다.

본 발명의 진단방법은, 정상개체의 생물학적 시료 내 KRS 단백질 수준을 암, 자가면역질환 또는 염증성질환 의심 개체의 생물학적 시료 내 단백질 발현 수준과 비교함으로써 실제 질환 발병 여부를 진단할 수 있다. 즉, 암, 자가면역질환 또는 염증성질환으로 추정되는 생물학적 시료로부터 본 발명의 항체 또는 그 단편을 이용해 KRS 단백질의 수준을 측정하고, 정상개체의 생물학적 시료로부터 본 발명의 항체 또는 그 단편을 이용해 KRS 단백질의 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 질환 의심개체의 KRS 단백질 발현 수준이 정상개체의 것보다 더 높으면 이를 해당 질환으로 진단할 수 있다.

상기 암은 그 종류가 특별히 제한되지 아니하며, 예를 들어 유방암, 대장암, 폐암, 소세포폐암, 위암, 간암, 혈액암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암, 질암, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체 선종 일 수 있으며, 바람직하게는 Laminin receptor에 작용하여 전이를 촉진하는 암종, 예를 들어 폐암 또는 췌장암 일 수 있다.

상기 자가면역질환은 예를 들어 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨, 루게릭병, 염증성 근육질환(예를들어, 다발성 근염(polymyositis), 피부근염(dermatomyositis)), 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 및 궤양성 대장염으로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 류마티스 관절염, 루게릭병, 다발성 근염 또는 피부근염일 수 있다.

상기 염증성 질환은 이에 제한되지는 않으나, 부종 등과 같은 일반적인 염증

증상을 포함하여 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease; 또는 'charcot joint'이라고도 함), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-셴라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever), 베체트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia), 제2형 당뇨병, 동맥 경화, 알츠하이머성 치매, 가족성 한랭 자가염증 증후군(familial cold autoinflammatory syndrome), 머클-웰스 증후군(Muckle-Wells syndrome), 신생아발병다발염증성질환(neonatal multisystem inflammatory disease), 만성유아신경피부관절증후군(chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome), 성인발증형 스틸병(adult-onset Still's disease), 접촉성 피부염, 포상기태(hydatidiform mole), PAPA 증후군(syndrome of pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne), 고면역글로불린 D 증후군(hyperimmunoglobulin D syndrome) 및 크리오피린 관련 주기적 증후군(cryopyrin-associated periodic syndromes)등을 포함할 수 있다.

암, 자가면역질환 및 염증성질환을 진단하는 방법은 본 발명의 항 KRS 항체 또는 그 단편 및 이와 특이적으로 결합하는 KRS 단백질 간에 항체-항원 반응을 통하여 달성될 수 있는데, 본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란 암, 자가면역질환 및 염증성질환의 마커인 KRS와 이에 특이적인 본원발명의 항 KRS 항체를 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해

서 정량적으로 측정 가능하다.

이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 (microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소의 예로는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 형광물의 예로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 리간드의 예로는 바이오틴 유도체 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 발광물의 예로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 미소입자의 예로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 레독스 분자의 예로는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[Mo(CN)_8]^{4-}$ 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소의 예로는 ^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 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.

본 발명의 일실시예에서는 인간의 VH3-23/VL1g 유전자를 골격으로 하고 CDR 에 무작위 서열을 삽입하는 라이브러리를 구축하고, KRS와 선택적으로 결합하는 파지를 선별하여 항체를 분리, 정제 하고 염기서열을 분석하였다.

본 발명의 다른 일실시예에서는 정제한 항체가 KRS와 결합하는지 western blot 방법으로 확인하였다. 그 결과 본 발명의 항체는 KRS와 결합하는 것을 확인하였다.

본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 항 KRS scFv 항체와 KRS의 친화도를 표면공명분석방법으로 측정하였다. 그 결과 본 발명의 항체는 평형해리상수

100nM 값을 가져 비교적 높은 친화도를 나타내는 것을 확인하였다.

본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 항 KRS scFv 항체의 교차반응성을 측정하였다. Luminex bead를 이용하여 본 발명의 항체와 KRS를 포함한 8종의 유사 단백질과의 반응성을 측정한 결과 본 발명의 항체는 KRS를 제외한 다른 ARS 단백질에는 결합하지 않는 것을 확인하였다.

본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 항 KRS scFv 항체의 진단용 항체로서의 유용성 여부를 실험하였다. 본 발명의 항체로 코팅된 plate를 제작한 후, KRS 표준물질을 농도별로 희석하여 반응시키고, 결합여부를 ELISA로 측정하였다. 그 결과 KRS 표준물질에 대하여 농도 의존적으로 항체 결합이 측정되는 것을 확인하여, 본 발명의 항체가 암 또는 자가면역질환 및 염증성질환 진단용으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 항 KRS 항체를 이용하여 개발된 ELISA 키트를 사용하여 췌장암 환자의 혈액을 분석하여 본 결과 췌장암의 가장 대표적인 바이오마커인 CA19-9와 동등한 정도로 KRS가 발현되어 있음을 확인하여, KRS가 암 진단용 바이오마커로 사용될 수 있으며, 본 발명의 항체가 유용함을 확인하였다.

또한 췌장암의 여러 다른 바이오마커 후보들과 비교 분석하기 위해 multiplex bead Assay 키트를 사용하여 다른 바이오마커 후보들을 분석하여 종합적으로 비교 분석하여 본 결과 다른 바이오 마커에 비해서 KRS가 CA 19-9과 함께 대표적인 암 바이오마커로 사용될 수 있으며 본 발명의 항체가 유용함을 확인하였다.

【유리한 효과】

따라서, 본 발명의 항체 또는 그 단편은 인간 KRS에 특이적으로 결합하며, 동일한 ARS family를 포함한 다른 단백질과 교차반응성이 없어 KRS 검출 및 억제 가능성이므로 KRS 검출 및 KRS가 관련된 질환인 암 또는 자가면역질환 및 염증성질환의 진단에 효과적이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 항체가 목적단백질인 KRS에 결합하는지를 확인한 western blot 실험 결과이다.

도 2는 본 발명의 항체인 anti-KRS scFv Biocon-K1의 결합친화도를 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 측정한 결과 그래프이다(K_d : 평형해리상수, 가로축 : 시간(초), 세로축 : response unit(RU)).

도 3은 본 발명의 항체인 anti-KRS scFv Biocon-K1의 교차반응성(cross activity)을 Luminex Multiplex Assay 방법으로 측정한 결과 그래프이다(세로축 (FI) : 형광강도(fluorescent intensity), WRS : 트립토판닐-tRNA 합성효소(Tryptophanyl-tRNA synthetase), HRS : 히스티딜-tRNA 합성효소(Histidyl-tRNA synthetase), NRS : 아스파라기닐-tRNA 합성효소(Asparaginyl-tRNA synthetase), KRS : 리실-tRNA 합성효소(Lysyl-tRNA synthetase), SRS : 세릴-tRNA 합성효소(Seryl-tRNA synthetase), YRS : 타이로실-tRNA 합성효소(Tyrosyl-tRNA synthetase), GRS : 글리실-tRNA 합성효소(Glycyl-tRNA synthetase), AIMP1 : ARS 결합 다기능 단백질(Aminoacyl-tRNA-synthetase-interacting multifunctional protein 1)).

도 4는 본 발명의 항체가 KRS를 detection 할 수 있는지를 확인하기 위한 ELISA 실험 결과이다(세로축 : 450nm 흡광도, 가로축 : KRS 표준물질의 농도 (ng/ml)).

도 5는 본 발명의 항체를 사용하여 정상인 및 암 환자에 있어 혈중 KRS양의 검출 및 상호 비교를 확인하기 위해 본 발명의 항체가 포함된 ELISA 방법으로 정상인 및 췌장암 환자의 혈청에서 측정한 결과이다. (A: 혈중 KRS 농도, B: 혈중 CA19-9 농도).

도 6은 본 발명의 항체를 이용한 KRS 바이오마커 측정이 췌장암 진단용 주요 바이오마커로 유용성이 있는지 알아보기 위해 여러 바이오마커 후보 군을 ELISA 및 multiplex bead assay 방법으로 측정한 바이오마커 정량값들을 종합적으로 비교 분석한 결과이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

scFv 라이브러리 구축 및 항 KRS scFv 선별

<1-1> scFv 라이브러리 구축

scFv 라이브러리는 대한민국특허 10-0961392호에 나온 방법에 따라 구축하였다.

인간의 VH3-23/VL1g 유전자를 골격으로 하고 상보성 결정부위 (complementarity determining regions, CDR)에 무작위 서열을 삽입하는 것으로 라이브러리를 설계하고, 베타락타메이즈 유전자를 선택마커(selection marker)로 가지는 플라스미드 벡터에서 베타락타메이즈 유전자의 리더서열 직후에 제한효소 절단서열들을 도입하여 pFDV 플라스미드 벡터를 제조하고 scFv 유전자 라이브러리를 삽입한 후, 대장균에 형질감염 시킨 후 이를 배양하여 라이브러리를 구축하였다. 이 과정을 통하여 라이브러리 내에서 비정상적인 정지코돈 혹은 프레임시프트(frameshift)를 가지는 scFv 유전자 서열을 대부분 제거하여 라이브러리의 품질을 향상시키는 것이 가능하다. 배양된 라이브러리로부터 오류가 제거된 서열들을 중합효소 연쇄반응으로 증폭한 후 이로부터 scFv 유전자 라이브러리를 재조합하여 pComb3X 파아지미드 벡터에 삽입하고, 이.콜라이 ER2537 스트레인의 대장균을 형질감염하여 최종 라이브러리를 획득하였다. 라이브러리를 카르베니실린을 함유하는 SB(Super broth) 배지 400 mL에 배양하고, 600 나노미터에서의 흡광도가 0.5가 되었을 때 1013 CFU의 VCSM13 보조파아지를 가하여 80 rpm에서 교반하며 1시간동안 섭씨 37도에서 감염시켰다. 여기에 최종 70 ug/mL의 카나마이신 항생제를 넣고 섭씨 30도, 200 rpm에서 교반하며 밤새 배양하여 scFv가 표면제시된 파지를 생산하였다. 다음날 아침에 배양액을 원심분리하고, 배양액 속의 파지를 4%의 폴리에틸렌글리콜-8000과 3%의 염화소듐을 가하여 침전시켰다. 침전된 파지를 50 mL의 PBS 완충용액에 녹이고, 위와 같은 방식으로 재차 침전하여 최종적으로 2 mL의 PBS 완충용액에 녹였다. 이를 원심분리하여 이물질을 제거함으로써 파지 scFv 라이브러리를 얻었으며 일반적으로 최종 파지 라이브러리에는 1013 CFU/mL 이상의 파지 입자가 포함된다..

<1-2> 항 KRS scFv 선별

면역시험관(immunotube)에 10 ug/ml 농도의 KRS를 첨가하여 1시간동안 시험관 표면에 단백질을 흡착시킨 후 분말우유 3% 용액을 시험관에 첨가하여 KRS가 흡

착되지 않은 표면을 보호하였다. 시험관을 비운 후 여기에 분말우유 3% 용액에 분산된 1012 CFU의 항체파지 라이브러리를 넣어 항원과 결합시켰다. 비특이적으로 결합한 파지를 TBST (tris buffered saline - tween20) 용액으로 3회 씻어낸 후, 남아있는 항원특이적 파지 항체를 100 mM 트리에틸아민 용액을 이용하여 용리하였다.

용리된 파지를 1.0M 농도의 Tris-HCl 버퍼 (pH 7.8)로 중화시킨 후 ER2537 대장균에 37°C에서 1시간 감염시키고, 감염된 대장균을 카르베니실린을 함유하는 LB(Luria-Bertani) 한천배지에 도포하여 37°C에서 배양하였다. 다음날 배양된 대장균을 3 mL의 SB (super broth) - 카르베니실린 배양액에 현탁하고 15% 글리세롤을 첨가하여 일부는 -80°C에 보관하고, 나머지 중 50마이크로리터를 20 mL의 SB-카르베니실린-2% 포도당 용액에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 배양액의 600 나노미터 광선의 흡광도가 0.5가 되면 원심분리하여 박테리아만을 분리하고, 이를 다시 20 mL의 SB-카르베니실린 배양액에 현탁한 후 1012PFU (플라크 형성단위)의 VCSM13 보조파지를 넣고 서서히 교반하며 37°C에서 배양하였다.

1시간 후 카나마이신 70ug/ml을 첨가하고 30°C에서 빠르게 교반하며 (250 rpm) 밤새 배양하였다. 다음날 배양액을 원심분리한 후, 파지 입자를 포함하는 상층액 1 mL을 라이브러리로 사용하여 위의 패닝 과정을 반복함으로써 항원특이적 클론을 농축시켰다.

<실시예 2>

항 KRS scFv 항체 발현 및 정제

3-4회 정도의 반복적인 패닝 후 항체유전자를 포함하는 대장균을 카르베니실린을 함유하는 LB 한천배지에 도포, 배양하여 단일 콜로니들을 얻고, 이를 200 uL SB-카르베니실린 용액에 접종, 배양한 후 IPTG로 유도하여 scFv 단백질을 대장균의 페리플라즈마(periplasm)에서 발현하였다. 대장균을 40 uL의 1X TES (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 20% Sucrose, pH 8.0) 용액에 현탁한 후 여기에 0.2X TES 용액 60 uL를 가하고 섞어서 섭씨 4도에서 30분 이상 처리하고 원심분리하여 상층액으로 페리플라즈마를 추출하였다.

<2-1> KRS에 대해 선별된 scFv 항체 발현

선별된 KRS에 대한 scFv 양성 단일 콜로니 클론을 카르베니실린을 함유하는

SB 배지(Bactotrytone 30g, yeast extract 20g, MOPS buffer 10g/L)에 5 ml에 배양하여 seed culture를 시작하여 overnight 배양후 500ml 카네니실린 함유 SB배지에 옮겨 OD 600 = 0.5 정도 되었을때 IPTG를 1mM되게 넣어 30도에서 overnight 배양하여 scFv 단백질을 대장균의 페리플라즘(periplasm)에서 발현하였다. 다음날 원심분리하여 수득한 대장균을 1X TES buffer에 (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 20% Sucrose, pH 8.0) 현탁한 후 0.2 X TES를 1.5배 첨가하여 섞어주고 원심분리하여 페리플라즘을 추출하였다.

<2-2> 선별된 scFv 항체 정제

페리플라즘에서 추출한 scFv 항체에 최종 5 mM MgSO₄를 가하고 이를 미리 PBS에 평형시킨 Ni-NTA bead 와 섞어 1시간 동안 냉장에서 교반하여 Ni-bead에 결합시킨후 친화도 크로마토그래피를 수행하여 결합하지 않은 단백질을 PBS로 충분히 씻어내었다. 5 mM Imidazole이 함유된 buffer로 더 충분히 씻어 준 다음 결합한 scFv 항체는 200 mM Imidazole buffer를 이용하여 용출하였다. 용출된 항체는 투석하여 전기이동을 통해 순도를 확인하고 BCA 방법으로 단백질 정량을 하여 정제된 항체양을 기록후 일정량을 분주하여 냉동 보관하였다.

<2-3> 면역블롯 및 sequencing

페리플라즘에서 추출한 scFv 항체는 면역블롯(western blot) 기법을 사용하여 human 세포에서 원래 발현된 KRS에 scFv 항체가 결합하는지 여부를 확인하는데 사용하였다. 50ug의 Hela cell lysate를 SDS PAGE를 통해 전기이동한 후 Wet transfer 방법으로 Nitrocellulos membrane에 옮겨 3% skim milk로 blocking 한후 추출한 scFv 항체를 첨가하여 결합시켰다. 검출을 위해 결합한 scFv에 HRP(horseradish peroxidase)가 연결된 Anti-HA 이차항체를 반응시킨후 기질로 ECL reagent를 이용하여 암실에서 필름 감광하였다. 감광된 띠는 표준 분자 마커와 비교하여 KRS의 사이즈에 해당하는 띠를 확인하였다.

이로부터 확인된 항원특이적 항체 클론은 카네니실린이 함유된 SB 배지 10ml에 overnight 배양하여 plasmid miniprep kit를 사용하여 plasmid DNA를 추출하여 Capillary sequencing service (Macrogen Co) 를 통해 염기서열을 분석하고 Kabat protein sequence database와 IMGT(the international ImMunoGeneTics information system) 분석방법에 근거하여 CDR 서열을 분석하였다.

그 결과 KRS 항원과 결합한 scFv의 개수는 총 1 건이며, 이들의 염기서열은 서열번호 14인 것으로 확인되었다.

<실시예 3>

항 KRS scFv 항체의 친화도 측정

KRS 항원에 대한 본 발명 항체의 결합 친화도를 ProteOnTMXPR36 SPR (surface plasmon resonance) 바이오센서 (Bio-Rad 사)를 이용하여 측정하였다.

구체적으로, 약 10 ug/ml의 KRS 항원을 제조사의 설명서에 따라 GLC 칩 (Bio-Rad 6 X 6 sensor chip, Compact capacity amine coupling for protein-protein interactions)에 약 2,000 내지 4,000 반응 단위 (response unit)로 고정화시킨 후, PBS를 이용하여 다양한 농도로 희석한 본 발명의 정제된 scFv 항체 (500-30nM) 30ul씩을 25℃에서 50 ul/min의 속도로 칩에 주입하여 항원과의 상호작용을 정량하였다. 칩의 표면은 0.85% phosphoric acid로 재생하였으며, ProteOn Manager 소프트웨어를 이용하여 연합 속도와 해리속도를 계산하였고, 평형 해리 상수 (KD)는 해리속도/연합속도 비로서 계산하였다

그 결과 [도 2]에서 보는 바와 같이, 본 발명의 항체는 최대 KD 100nM 값을 가져 비교적 높은 KRS 친화도를 가지는 것을 확인하였다.

<실시예 4>

항 KRS scFv 항체 교차 반응성(cross activity) 측정

scFv 항체가 다른 항원과 반응성이 있는지 판단하기 위하여 Luminex bead를 이용하여 본 발명의 항체와 KRS 및 다른 ARS family protein과의 교차 반응성을 측정하였다.

<4-1> 각각의 protein이 결합된 Luminex bead 제조

Code No가 다른 각각의 bead에 protein의 amine 잔기를 결합시키기 위해 Bio-rad사의 Amine coupling kit의 실험과정에 따라 coupling을 수행하였다. 먼저

1 x10⁶ 에 해당하는 각각의 bead를 96well filter plate로 옮겨 activation buffer로 vacuum manifold를 이용하여 세척 후 50 mg/ml S-NHS(N-hydroxysulfosuccinimide)와 50 mg/ml EDAC(1-ethy-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide)를 첨가하여 상온에서 20 분 활성화시켰다. 활성화된 각각의 bead는 PBS로 세척 후 순도 90%이상의 정제된 각각의 재조합 ARS 항원 즉 WRS, HRS, NRS, KRS, SRS, YRS, GRS, AIMP1(p43) 10 ug를 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 각각의 ARS에 연결된 bead는 PBS로 2번 세척 후 Blocking buffer를 첨가하여 30분간 상온에서 반응시켜 결합하지 않은 잔기를 blocking 시킨 후 PBS로 2번 세척 후 100ul PBS에 다시 현탁하고 빛이 차단된 tube에 보관하였다. 결합된 bead의 수는 hemocytometer로 측정하여 기록하였다.

<4-2> Multiplex Assay를 이용한 Cross activity 측정

페리플라즈م에서 추출된 본 발명의 항체를 검체 희석액 (PBST + 2% BSA)에 1:400농도로 우선 희석한 다음 96 well filter 플레이트에 검체 희석액으로 순차적으로 2배씩 희석하여 50ul 씩 분주하였고 항체가 없는 Blank well에는 검체 희석액만을 첨가하였다. ARS가 결합된 각각의 bead는 well 당 2000 개 bead가 되도록 bead mix tube에 각각 넣고 검체 희석액을 각 well당 50 ul 씩 분주 할 수 있는 부피만큼 넣어주었다. bead mix용액을 잘 섞은 후 각 well에 분주하여 암실에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 vacuum manifold를 이용하여 PBS (200 ul/well)로 3번 세척 후 50 ul Anti-(HA)-biotin 이차 항체를 첨가하여 암실에서 1시간동안 추가로 반응시켰다. 이차 항체와 결합한 bead는 PBS로 3번 세척후 형광 표지를 위해 SA-PE (Streptavidin- Phycoerythrin)을 2 ug/ml 되게 첨가하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 PBS 3번 세척과정을 거쳐 PBS 100ul에 다시 현탁하였다. 형광 표지된 bead는 Bio-Plex (Luminex) 200 장비와 Bio-Plex manager 프로그램을 이용하여 형광 세기를 측정한 결과 값을 분석하여 각각의 ARS에 대한 항체의 결합 여부를 확인하였다.

그 결과 [도 3]에서 보는 바와 같이, 본 발명의 항체는 모든 농도에서 KRS를 제외한 다른 ARS family protein과 반응하지 않는 것을 확인하였다.

따라서 본 발명의 항체는 다른 단백질과 교차 반응성이 없는 것을 확인하였다.

<실시예 5>

정제된 항-KRS scFv 항체를 이용한 sandwich ELISA pairing test

본 발명의 항체가 진단용 항체로의 유용성 여부를 알아보기 위해 KRS sandwich ELISA pairing test를 수행하였다. ELISA 구성중 capture 항체를 본 발명의 항체로 사용하고 detection 항체를 기존 제품의 rabbit 폴리클로날 항체로 pairing test를 해보아 KRS 표준물질에 대한 정량 곡선이 만들어지는 지를 확인하였다.

먼저 본 발명의 정제된 항체를 coating buffer (0.1M sodium carbonate pH 9.0)에 희석하여 well 당 100 - 400ng 되게 ELISA plate에 100ul 씩 분주한 후 상온에서 3시간 방치하였다. PBST로 3번 세척후 2% BSA를 함유한 PBST 350 ul를 첨가하여 상온에서 1시간 blocking한후 PBST로 3번 세척하였다. 항체를 coating한 plate well에 정제된 재조합 KRS 표준물질을 농도별로 검체 희석액에 2배씩 희석하여 100 ul씩 넣고 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응후 plate는 PBST로 3번 세척후 희석된 detection 항체 (4 ug/ml) 100 ul 첨가하여 추가로 상온에서 1시간 반응하였다. 검출을 위해 plate를 PBST 3번 세척후 HRP가 연결된 anti-rabbit IgG를 넣어 상온에서 1시간 반응시켜 결합시켰다. HRP에 의한 발색반응을 보고자 plate를 PBST로 3번 세척후 HRP 기질인 TMB solution 50 ul를 첨가하여 10분 동안 발색반응을 보고 2N 황산 50 ul 첨가하여 발색반응을 멈춘후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

그 결과 [도 4]에서 보는 바와 같이 재조합 KRS 표준물질에 대해 ng/ml 농도에 해당하는 표준 직선이 그려짐을 확인 할 수 있었다. 이로서 본 발명의 항체가 암 진단용으로 사용 될 수 있는 것을 확인하였다.

<실시예 6>

항 KRS 항체를 이용한 췌장암 환자의 혈중 KRS 바이오마커 비교 분석

새로 개발한 KRS 항체를 이용하여 연구용 ELISA 키트 제품개발을 완료하고 이 키트 제품을 이용하여 혈중 KRS 단백질의 췌장암에 대한 바이오 마커로서의 유용성을 검증하고, 환자 혈청의 바이오 마커측정에 개발된 ELISA 키트가 유용하게 쓰일 수 있는지를 확인하기 위해 정상인과 췌장암 환자의 혈청을 받아 실험을 진행하였다.

한국의 질병관리본부 한국인체자원은행 네트워크로부터 IRB 심의 통과를 얻고 경북대학교병원으로부터 정상인(N=8)과 췌장암 환자(N=16)의 혈청을 받아 실험을 수행하였다. 혈중 KRS 단백질의 췌장암에 대한 바이오마커로서의 유용성을 검증하기 위해 기존의 췌장암 바이오마커인 CA19-9의 혈중농도와 비교하여 실험하였다.

본 출원인이 개발한 KRS ELISA 키트 시제품과 상업화 된 CA19-9 ELISA 키트는 제조자의 지시에 따라 진행하였다. 구체적으로, 항체가 코팅된 96-well 플레이트에 검체 희석액을 첨가하고 1시간 동안 상온에서 방치한 후 세 번 이상 워싱버퍼로 워싱하였다. 디텍션 안티바디를 각 well에 첨가한 후 1시간 동안 상온에서 방치한 후 세 번 이상 워싱 버퍼로 워싱하였다. 2nd 안티바디를 첨가한 후 1시간 동안 상온에서 방치한 후 워싱 버퍼로 세 번 이상 워싱하였다. TMB substrate를 각 well에 넣은 후 빛이 없는 상온조건에서 15분간 방치하고 2N 황산을 첨가하여 발색반응을 중단한 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[도 5]에서 보는 바와 같이, 정상인군과 비교해 췌장암 환자군에서 KRS가 통계적으로 유의성 있게($p=0.003$) 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 췌장암의 단일 바이오마커로 대표적인 CA19-9의 측정값($p=0.002$)과 비교해 볼 때 KRS가 췌장암에 대한 진단 바이오마커로서 이용 가능성이 크다는 것을 알 수 있으며, 본 출원인이 개발한 항 KRS 항체가 췌장암의 진단용 항체로서 우수한 효과를 나타낸다는 것을 검증할 수 있었다.

또한 췌장암의 진단에 있어 KRS가 바이오마커로서의 중요성 및 유용성을 살펴보기 위해 다른 후보 바이오마커들의 측정값과 함께 비교 분석하기 위해 여러 후보 바이오마커들을 상업화된 ELISA 키트 및 multiplex bead assay 키트들을 구입하여 측정해 보았다 측정한 바이오마커들은 모두 KRS, WRS, AIMP1, CA19-9, CA125, IL-8, CEA, TNF- α , 및 CEACAM-1이며 실험결과는 heatmap 형식으로 표현하였다.

상업용 ELISA kit와 multiplex assay 키트의 경우는 제조사의 지시에 따라 진행하며 multiplex assay는 구체적으로, 각각의 바이오마커 안티바디 비드를 2000 비드에 해당하는 용량을 취해 최종용량 3 ml로 맞춘 후 각 well에 25 ul씩 첨가하고, 25 ul의 검체를 각 well에 첨가하였다. 4도씨에서 교반하며 overnight 방치하였다. 각 well을 워싱한 후 25 ul의 디텍션 안티바디를 첨가하고 1시간 30분동안 상온에서 방치하였다. 25 ul의 streptavidin-phycoerythrin을 각 well에 첨가하고 30분간 상온에서 방치한 후 워싱하였다. 플레이트를 Luminex instrument(Bio-plex 200)으로 측정한 후 Median Fluorescent Intensity 자료로 분석하였다.

[도 6]에서 볼 수 있듯이, 정상인군과 비교해 췌장암 환자군에서 KRS와 췌장

암의 단일 바이오마커로 대표적인 CA 19-9이 통계적 유의성으로 증가되어 있음을 알 수 있었다. 또한 다른 후보 바이오마커 측정값들과 비교 해 볼 때 KRS가 췌장암에 대한 진단 바이오마커로서 이용 가능성이 매우 크다는 것을 알 수 있으며, 본 출원인이 개발한 항 KRS 항체가 췌장암의 진단용 항체로서 우수한 효과를 나타낸다는 것을 검증할 수 있었다.

【산업상 이용가능성】

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 그 단편은 인간 KRS에 특이적으로 결합하며, 동일한 ARS family를 포함한 다른 단백질과 교차반응성이 없어 KRS 검출 및 억제가 가능하므로 KRS 검출 및 KRS가 관련된 질환인 암 또는 자가면역질환 및 염증성질환의 진단 목적으로 사용될 수 있어 산업상 이용가능성이 높다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3을 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3을 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 항체는 경쇄가변영역으로 서열번호 13의 137 번째 내지 246 번째 아미노산 서열을 포함하며, 중쇄가변영역으로 서열번호 13의 1 번째 내지 121 번째 아미노산 서열을 포함하는 항체인 것을 특징으로 하는 인간 KRS에 결합하는 항체 또는 그 단편.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 13으로 표시되는 아미노산서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그 단편.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv 및 scFv로 이루어진 군에서 선택되는 단편인 것을 특징으로 하는 항체 또는 그 단편.

【청구항 5】

제1항의 항체 또는 그 단편을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 7 내지 12로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 7】

제5항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

【청구항 8】

제7항의 벡터를 포함하는 세포.

【청구항 9】

제8항의 세포를 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건하에서 배양하여, 경쇄 및 중쇄가변영역을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하는 단계 및 상기 세포 또는 이를 배양한 배양 배지로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 인간 KRS 에 결합하는 항체 또는 그 단편의 생산방법.

【청구항 10】

제1항의 항체 또는 그 단편을 시료와 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 그 단편을 검출하는 단계를 포함하는 KRS 특이적 검출 방법.

【청구항 11】

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물.

【청구항 12】

제1항의 항체 또는 그 단편의 암 진단용 제제 제조를 위한 용도.

【청구항 13】

하기의 단계로 이루어진, 개체의 암 진단방법:

- (a) 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;
- (b) 제1항의 항체 또는 그 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 KRS 단백질 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 KRS 단백질 수준을 정상 개체의 KRS 단백질 수준과 비교하는 단계.

【청구항 14】

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 진단용 조성물.

【청구항 15】

제1항의 항체 또는 그 단편의 자가면역질환 진단용 제제 제조를 위한 용도.

【청구항 16】

하기의 단계로 이루어진, 개체의 자가면역질환 진단방법:

- (a) 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;
- (b) 제1항의 항체 또는 그 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 KRS 단백질 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 KRS 단백질 수준을 정상 개체의 KRS 단백질 수준과 비교하는 단계.

【청구항 17】

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 진단용 조성물.

【청구항 18】

제1항의 항체 또는 그 단편의 염증성 질환 진단용 제제 제조를 위한 용도.

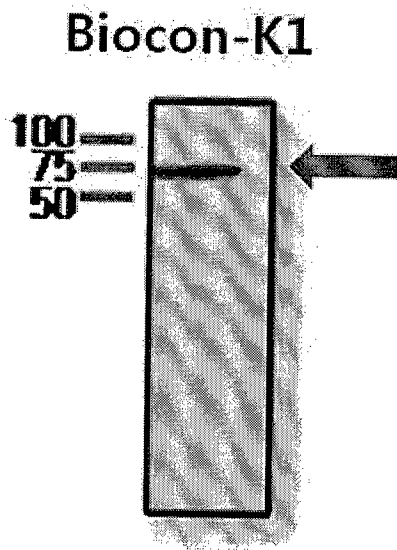
【청구항 19】

하기의 단계로 이루어진, 개체의 염증성 질환 진단방법:

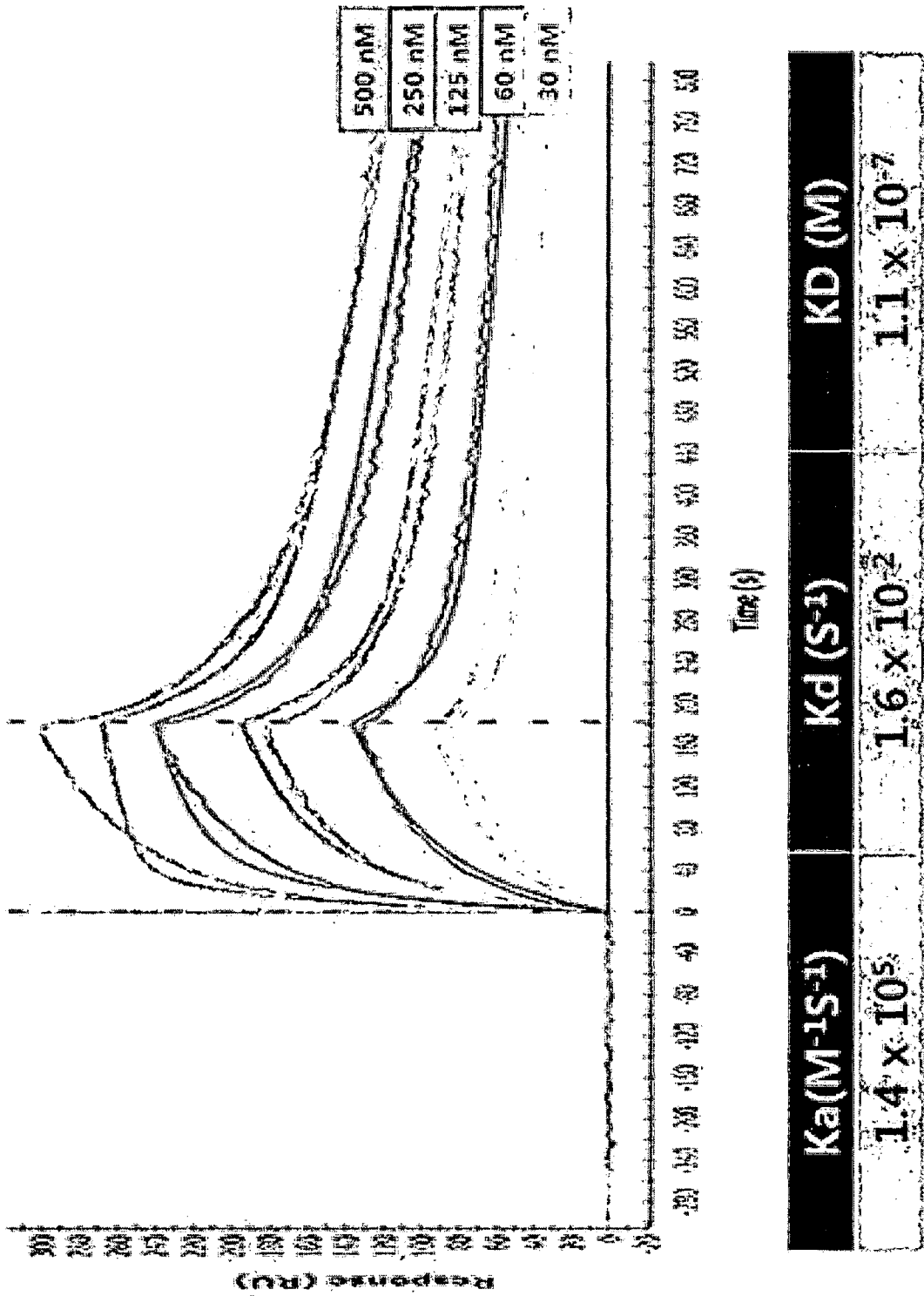
- (a) 개체로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계;
- (b) 제1항의 항체 또는 그 단편을 이용하여 상기 생물학적 시료 내 KRS 단백질 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 KRS 단백질 수준을 정상 개체의 KRS 단백질 수준과 비교하는 단계.

【도면】

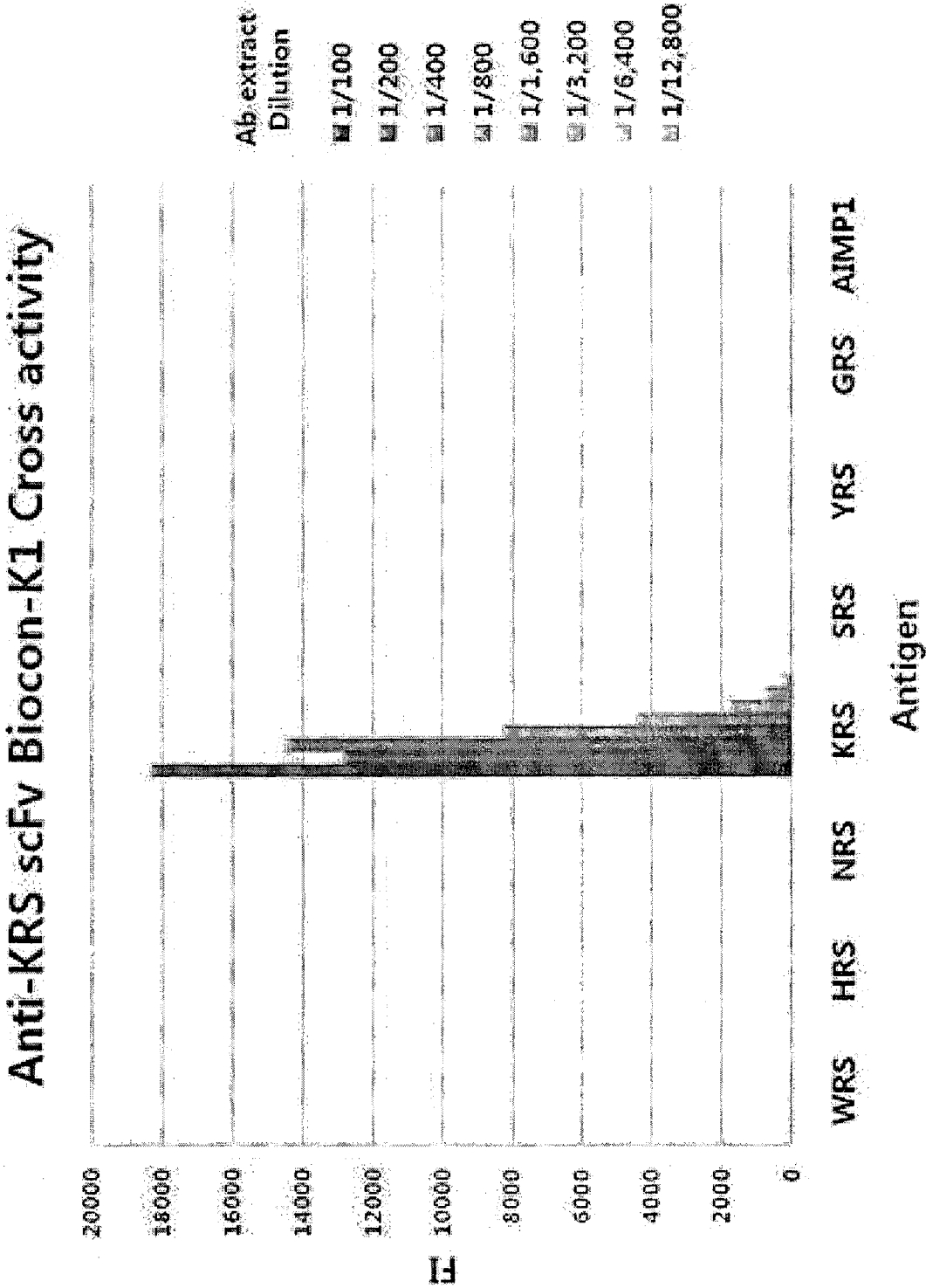
【도 1】



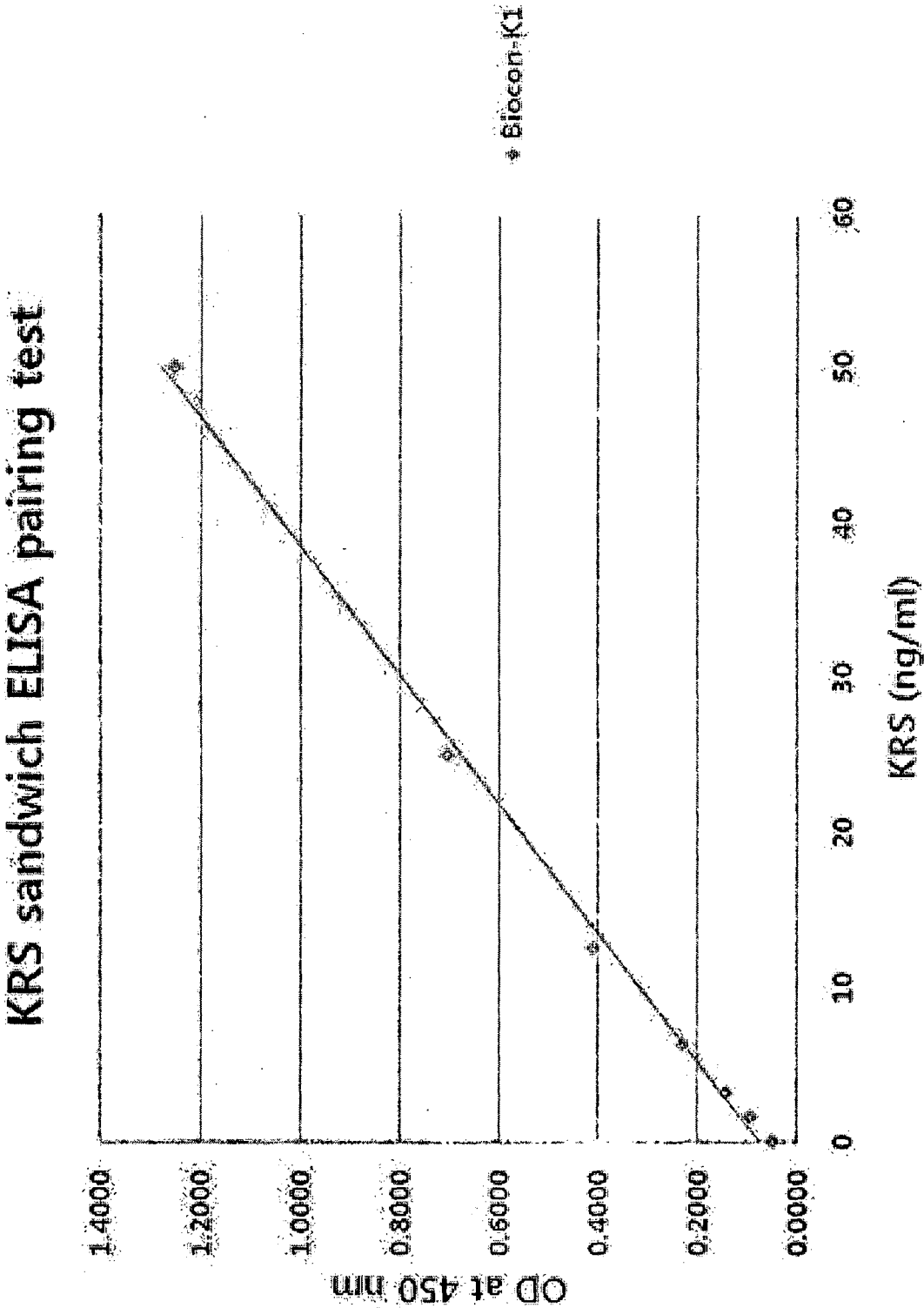
【도 2】



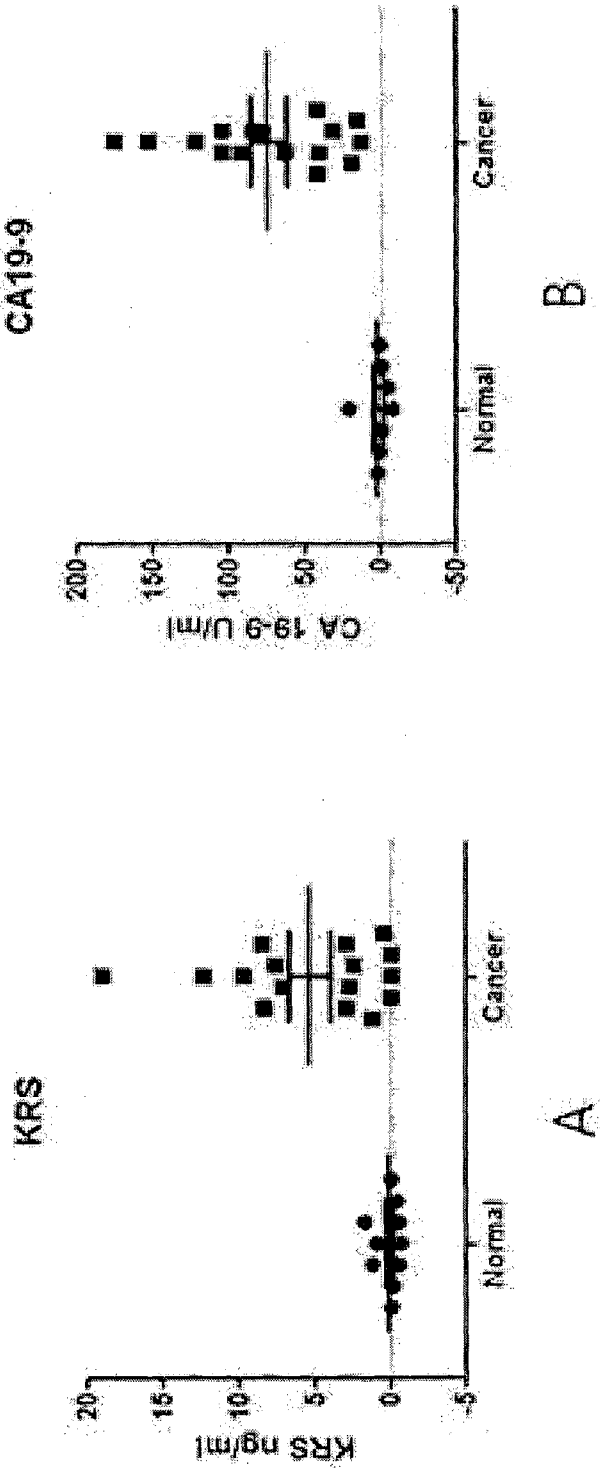
【도 3】



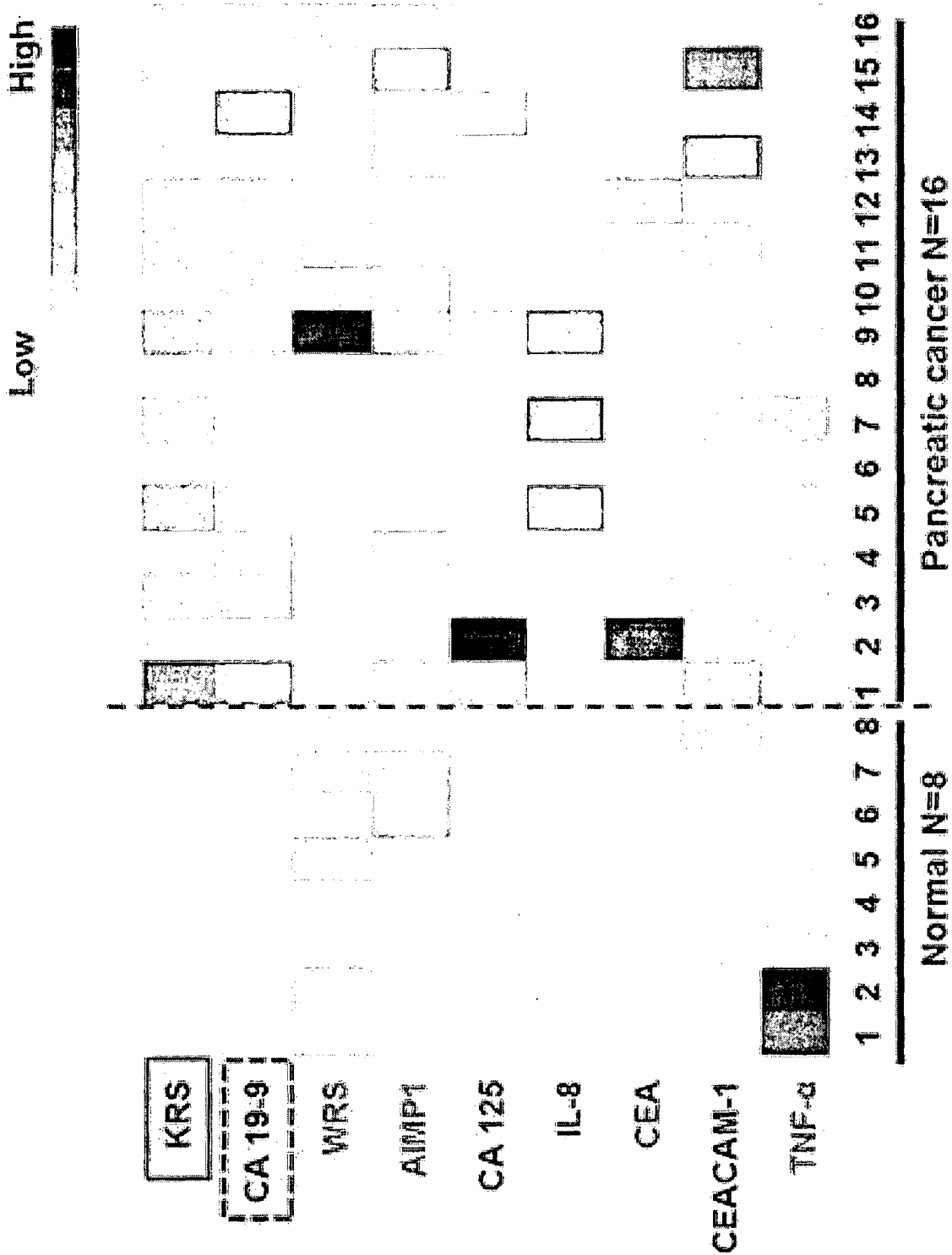
【도 4】



【도 5】



【도 6】



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: antilysyl-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



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" 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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

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 Seonsa-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

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))

eKOMPASS(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

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 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



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.

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

2013/01/17

CA 2800281 A1

2011/12/08

CN 103118694 A

2013/05/22

EP 2575857 A2

2013/04/10

EP 2575857 A4

2014/01/01

JP 2013-532965 A

2013/08/22

WO 2011-153277 A2

2011/12/08

WO 2011-153277 A3

2012/05/24