(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0093502
(43) 공개일자 2016년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0014616
(22) 출원일자 2015년01월29일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
재단법인 의약바이오컨버전스연구단
경기 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술연구원내 B동 8층 (이의동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김성훈
서울특별시 강남구 남부순환로365길 42, 역삼한신아파트 4-1005 (도곡동)
최연식
서울특별시 서초구 나루터로4길 70-5, 1004호 (잠원동, 한신타운아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

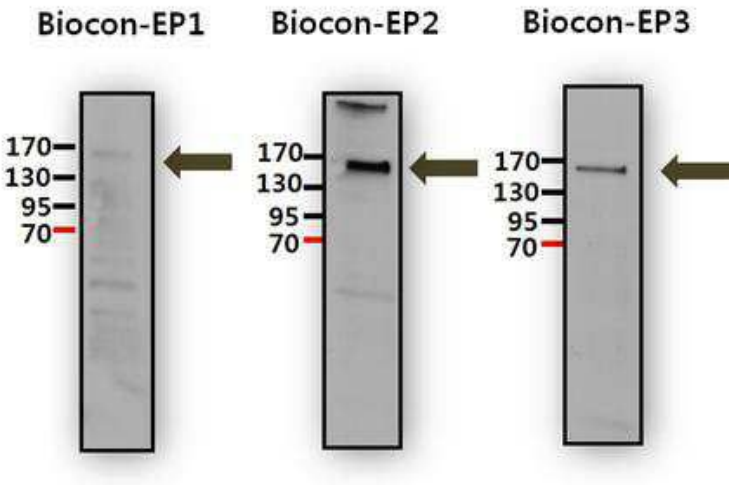
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **항 EPRS 모노클로날 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 EPRS(Glycyl-tRNA synthetase)에 선택적으로 결합하는 항 EPRS 항체에 관한 것으로 보다 구체적으로는 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편, 이의 생산방법 및 이를 포함하는 암, 염증질환 또는 면역질환 진단용 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항체 또는 그 단편은 인간 EPRS에 특이적으로 결합하며, 동일한 ARS family를 포함한 다른 단백질과 교차반응성이 없어 EPRS 검출 및 억제가 가능하므로 EPRS 검출 및 EPRS가 관련된 질환인 암, 염증질환 또는 면역질환 진단 및 치료 목적으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Y 601/01015 (2013.01)
C12Y 601/01017 (2013.01)
G01N 33/573 (2013.01)
C07K 2317/50 (2013.01)
(72) 발명자
심현보
서울특별시 강남구 압구정로 321, 3동 1206호 (압구정동, 한양아파트)
이남주
경기도 남양주시 별내4로 8, 4609동 1101호(별내동, 한화꿈에그린아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0029785
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업
연구과제명 중앙연계실용화사업
기 여 율 1/2
주관기관 (재)의약바이오컨버젼스연구단
연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013M3A6A4044991
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업-글로벌프론티어사업
연구과제명 도전적 표적 분자에 대한 고효율 항체 도출 기술
기 여 율 1/2
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

i) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 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)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체;

ii) 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체; 및

iii) 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 31로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 32로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체;

로 이루어지는 군에서 선택된 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는

i) 경쇄가변영역으로 서열번호 13의 132 번째 내지 241 번째 아미노산 서열을 포함하며, 중쇄가변영역으로 서열번호 13의 1 번째 내지 116 번째 아미노산 서열을 포함하는 항체;

ii) 경쇄가변영역으로 서열번호 27의 132 번째 내지 241 번째 아미노산 서열을 포함하며, 중쇄가변영역으로 서열번호 27의 1 번째 내지 116 번째 아미노산 서열을 포함하는 항체; 및

iii) 경쇄가변영역으로 서열번호 41의 132 번째 내지 241 번째 아미노산 서열을 포함하며, 중쇄가변영역으로 서열번호 41의 1 번째 내지 116 번째 아미노산 서열을 포함하는 항체;

로 이루어진 군에서 선택된 항체인 것을 특징으로 하는 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 13, 서열번호 27, 서열번호 41로 이루어진 군에서 선택된 서열번호로 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

i) 서열번호 7 내지 12로 표시되는 폴리뉴클레오티드;

ii) 서열번호 21 내지 26으로 표시되는 폴리뉴클레오티드; 및

iii) 서열번호 35 내지 40으로 표시되는 폴리뉴클레오티드;

로 이루어진 군에서 선택된 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 EPRS에 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 EPRS 특이적 검출 방법.

청구항 11

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 13

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 면역질환 진단용 조성물.

청구항 15

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제1항의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증질환 진단용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 EPRS(glutamyl-prolyl tRNA synthetase)에 선택적으로 결합하는 항 EPRS 항체에 관한 것으로 보다 구체적으로는 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편, 이의 생산방법 및 이를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] Aminoacyl-tRNA synthetase(ARS)는 특정 아미노산을 그 해당하는 tRNA에 붙여주는 역할을 하는 효소이며. 고등생물의 경우 아미노산 종류에 따른 20 개의 효소외에 AIMP1(p43), (AIMP2)p38, (AIMP3)p18 등 multisynthetase complex 형성에 관여하는 3종류를 포함하여 23종의 효소로 구성되어 있으며 multisynthetase complex에 참여하는 효소외에 몇몇은 free form 형태로도 존재한다. 그러나 최근 들어 기본적인 기능외에 특정 환경에서 다양한 다른 활성기능을 가지고 있음이 보고 되었는데 EPRS(glutamyl-prolyl tRNA synthetase)가 그중의 하나이다. EPRS는 두가지 효소 활성 도메인(domain)이 링커(linker)로 연결되어 있는 형태이며 이 링커는 WHEP이라는 도메인이 3개가 반복된 형태로 되어있다. 이 WHEP 도메인 이라는 구조는 WRS, HRS, GRS, MRS 등과 같은 몇몇 ARSs 효소에도 유사한 구조가 있으나 EPRS와는 달리 반복된 구조를 가지고 있지는 않다. EPRS와 질환과의 관련성으로는 인터페론 감마(IFN-γ)에 의해 EPRS는 여러 조절 단백질의 mRNA의 3-UTR 부분에 결합하여 복합체 (GAIT, gamma-interferon-activated inhibitor of translation complex)를 형성함으로 인해 여러 염증반응 및 면역반응에 관여하는 조절인자의 전사 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Sampath, P. et al. Noncanonical function of glutamylprolyltRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. Cell 119, 195?208 (2004)). 또한 혈관신생(angiogenesis)에 중요한 인자로 알려진 VEGFA (Vascular endothelial growth factor A)의 단백질 합성과정도 EPRS에 의해 조절되는 것으로 밝혀졌다 (Ray, P. S. et al. A stress-responsive RNA switch regulates VEGFA expression. Nature 457, 915?919 (2009)). 따라서 EPRS는 암과 면역질환 및 염증질환 관련 유전자 발현에 있어 중요한 조절자로 관여할 수 있으며 중요한 진단 바이오마커로 사용될 가능성이 있다.

[0003] 하지만 EPRS를 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 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 EPRS에 특이적으로 결합하는 항체를 연구하던 중, 파지디스플레이 방법으로 만들어진 라이브러리에서 EPRS에 특이적으로 결합하는 단편들을 찾아내고, 이의 서열 및 결합특이성을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

[0005] 따라서 본 발명의 목적은 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 항체 또는 그 단편을 시료와 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 그 단편을 검출하는 단계를 포함하는 EPRS 특이적 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 면역질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 i) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 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)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체;

[0018] ii) 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체; 및

[0019] iii) 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 31로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 32로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체;

[0020] 로 이루어지는 군에서 선택된 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편을 제공한다.

[0021] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0022] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0023] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0024] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 세포를 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건하에서 배양하

여, 경쇄 및 중쇄가변영역을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하는 단계 및 상기 세포 또는 이를 배양한 배양 배지로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편의 생산방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 항체 또는 그 단편을 시료와 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 그 단편을 검출하는 단계를 포함하는 EPRS 특이적 검출 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 면역질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0032] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0033] 본 발명은 i) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 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)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체;

[0034] ii) 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체; 및

[0035] iii) 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 31로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 32로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체;로 이루어지는 군에서 선택된 인간 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편을 제공한다.

[0036] 글루타밀-프로릴-tRNA 합성효소(EPRS, Glutamyl-prolyl tRNA synthetase)는 글리타밀(Glutamyl) 및 프로릴(glycyl)의 tRNA의 결합을 촉진시키는 효소로 ARS(Aminoacyl-tRNA synthetase)의 일종이다. 본 발명의 EPRS는 일반적으로 천연형 또는 재조합 인간 EPRS, 및 인간 EPRS의 비-인간 동족체를 나타낸다.

[0037] "항체", "항 EPRS 항체", "인간화 항 EPRS 항체" 및 "변형 인간화 항 EPRS 항체", "anti-EPRS 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 EPRS와의 결합)을 나타내는 항체의 다른 부분)을 포함한다.

[0038] 본 발명의 항체는 EPRS와 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. 또

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

[0039] 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.

[0040] "모노클로날"이라는 말은 항체가 실질적인 상동성 집단으로부터 수득되는 것과 같이 항체의 특성을 나타내는 말이며, 반드시 항체를 특정 방법에 의해 생산해야 한다는 것은 아니다.

[0041] 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.

[0042] 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 EPRS와의 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].

[0043] 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.

[0044] 완전한 인간항체는 사람 면역글로불린 단백질 서열만을 포함하는 항체를 말하며, 마우스, 마우스 세포, 또는 마우스 세포로부터 기원한 하이브리도마에서 생산하거나, 파지 디스플레이 방법으로 생산할 수 있다.

[0045] 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 쇄내 디설파이드 브릿지를 또한 갖고 있다. 각 중쇄는 한 말단에 가변 도메인(VH)에 이어 수많은 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.

[0046] 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.

[0047] "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.

[0048] 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.

[0049] 상기 중쇄 및 경쇄 각각 내의 3 개의 CDR들은 틀 부위 (FR)에 의해 분리되며, 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 쇄 내부의 CDR을 서로뿐만 아니라 다른 쇄로부터의 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.

[0050] 본 발명의 항체는 경쇄 및 중쇄 가변영역에 속하는 각 CDR이 각각 특정 서열을 포함하여, EPRS와 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하며, 구체적으로 본 발명의 항체는 i) 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 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)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체;

[0051] ii) 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체; 및

[0052] iii) 서열번호 29로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L1, 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L2, 서열번호 31로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)L3를 포함하는 항체 경쇄가변영역(VL) 및 서열번호 32로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H1, 서열번호 33으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H2, 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정부위(CDR)H3를 포함하는 항체 중쇄가변영역(VH)을 포함하는 항체로 이루어진 군에서 선택된 항체일 수 있다.

[0053] 본 발명의 항체는 바람직하게는 특정 경쇄가변영역 및 중쇄가변영역을 포함할 수 있으며, 구체적으로

[0054] i) 경쇄가변영역으로 서열번호 13의 132 번째 내지 241 번째 아미노산 서열을 포함하며, 중쇄가변영역으로 서열번호 13의 1 번째 내지 116 번째 아미노산 서열을 포함하는 항체;

[0055] ii) 경쇄가변영역으로 서열번호 27의 132 번째 내지 241 번째 아미노산 서열을 포함하며, 중쇄가변영역으로 서열번호 27의 1 번째 내지 116 번째 아미노산 서열을 포함하는 항체; 및

[0056] iii) 경쇄가변영역으로 서열번호 41의 132 번째 내지 241 번째 아미노산 서열을 포함하며, 중쇄가변영역으로 서열번호 41의 1 번째 내지 116 번째 아미노산 서열을 포함하는 항체;

[0057] 로 이루어진 군에서 선택된 항체일 수 있다.

[0058] 본 발명의 항체는 가장 바람직하게는 서열번호 13, 서열번호 27 및 서열번호 41로 이루어진 군에서 선택된 서열번호로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체일 수 있다.

[0059] 본 발명의 항체 단편, 단편 또는 “그 단편”은 모 항체의 결합 특이성의 적어도 일부를 보유하는, 전형적으로 적어도 모 항체의 항원 결합의 일부 또는 가변 영역(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 유도체는 해당 활성이 몰 기준으로 표현되는 경우 이의 EPRS 결합 활성의 10% 이상을 보유한다. 바람직하게는, 항체 단편 또는 유도체는 모 항체로서의 EPRS 결합 친화도의 적어도 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 또는 그 이상을 보유한다. 또한, EPRS 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.

[0060] 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.

[0061] 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.

[0062] Fab'은 하나의 경쇄, 및 VH 도메인과 CH1 도메인 및 CH1과 CH2 도메인 사이의 영역을 함유하여 쇄내디설파이드 결합이 두 개의 Fab' 단편의 두 개의 중쇄 사이에 형성되어 F(ab')2 분자를 형성하도록 하는 하나의 중쇄의 일부를 함유한다.

[0063] F(ab')2는 두 개의 경쇄, 및 쇄내 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.

[0064] Fv는 중쇄와 경쇄 가변 영역을 모두 포함하지만, 고정 영역이 결여되어 있는 항체 단편이다.

[0065] 일본쇄(single-chain) Fv 또는 scFv는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 단편을 나타내며, 여기서, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇄내에 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.

[0066] 디아바디는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미하며, 여기서 단편은 동일한 폴리펩티드쇄에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH) (VH-VL)을 포함한다. 동일 쇄 상의 2개 도메인 사이에 페어링을 허용하지 않는 짧은 링커를 사용하여, 도메인을 다른 쇄의 상보성 도메인과 강제로 페어링시켜 2개의 항원-결합 부위를 생성시킨다. 디아바디는, 예를 들어 유럽 특허 제404,097호; WO 93/11161; 및 문헌[Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0067] 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 단일특이적일 수 있다.

[0068] "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 면역 기능성 면역글로불린 단편이다.

[0069] 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.

[0070] 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.

[0071] 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.

[0072] 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.

[0073] 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).

[0074] 본 발명의 항체는 효소, 형광 물질, 방사선 물질 및 단백질 등과 접합된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 항체에 상기 물질을 접합하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0075] 본 발명은 또한 상기한 바와 같은 본 발명에 따른 항체 또는 그 단편을 암호화 하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0076] 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.

[0077] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체 또는 그 단편을 암호화하는 것이면, 그 서열이 특별히 제한되지 아니하나 바람직하게는

[0078] i) 서열번호 7 내지 12로 표시되는 폴리뉴클레오티드;

[0079] ii) 서열번호 21 내지 26으로 표시되는 폴리뉴클레오티드; 및

[0080] iii) 서열번호 35 내지 40으로 표시되는 폴리뉴클레오티드; 로 이루어진 군에서 선택된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

[0081] 본 발명의 항체 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 당업계에 잘 알려진 방법에 의하여 얻어질 수 있다. 예를 들어, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄의 일부분 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.

[0082] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0083] 본 발명의 벡터는 본 발명의 항체 또는 그 단편의 재조합 생산을 위하여 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 복제 또는 발현의 목적으로 이용되며, 일반적으로 시그날 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0084] 본 발명의 벡터는 바람직하게는 발현벡터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 조절시퀀스, 예를 들어 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터일 수 있다.

[0085] 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 에피좀의 포유류 벡터(episomal mammalian vectors)를 포함하는 박테리아성 벡터들(bacterial vectors)) 내에서의 자가복제(autonomous replication)를 할 수 있다. 다른 벡터들(예를 들어, 비-에피좀의 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.

[0086] 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.

[0087] 한편 본 발명은 본 발명의 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0088] 본 발명의 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하는데 사용될 수 있는 세포면 그 종류는 특별히 제한되지 아니한다.

[0089] 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.

[0090] 본 목적에 적합한 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아새(Enterobacteriaceae), 예를 들어 에스케리치아 (Escherichia), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아 (Erwinia), 클렙시엘라 (Klebsiella), 프로테우스 (Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어, 살모넬라 티피무륨 (Salmonella typhimurium), 세라티아 (Serratia), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스 (Serratia marcescans) 및 시겔라 (Shigella), 및 바실리 (Bacilli), 예를 들어, 비. 섭

틸리스 (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.

[0091]

[0092] 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 숙주, 예를 들어 케이. 락티스(K.lactis), 케이. 프라길리스 (K. fragilis) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스 (K. bulgaricus) (ATCC 16,045), 케이. 위커라미 (K. wickeramii) (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) 숙주, 예를 들어 에이. 니둘란스 (nidulans) 및 에이. 니거 (niger)가 사용가능 하다.

[0093] 한편 본 발명의 세포는 동물세포 특히 척추동물 세포일 수 있다. 배양 (조직 배양)에서 척추동물 세포의 증식은 일상적인 방법이 되었고 기술들이 폭넓게 이용가능하다. 이에 제한되지 아니하나, 유용한 포유동물 숙주 세포의 예는 SV40에 의해 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.

[0094] 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.

[0095] 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 둘베코 (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.

[0096] 본 발명의 배지는 바람직하게는 SB (Bactotrytone 30g, yeast extract 20g, MOPS buffer 10g/L) Medium, FreeStyleTM 293 Medium 또는 Expi293TM Medium일 수 있다.

[0097] 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 EPRS에 결합하는 항체 또는 그 단편의 생산방법을 제공한다.

[0098] 본 발명 생산방법의 세포에 대하여는 상기 기술한 바와 같으며, 본 발명의 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 있다.

[0099] 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.

[0100] 상기 배양은 상기 세포의 종류에 따라 배지조성 및 배양 조건이 달라질 수 있으며, 이는 본 기술분야의 통상의 기술자가 적절히 선택 및 조절할 수 있다.

[0101] 상기 항체 분자는 세포의 세포질 내에 축적되거나, 세포로부터 분비되거나, 적절한 신호 서열에 의하여 페리플라즘 또는 세포외 배지 (supernatant)로 표적화 (targeted)될 수 있으며, 페리플라즘 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.

[0102] 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.

[0103] 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. 단백분해를 억제하기 위하여 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF가 임의의 선행 단계에 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위하여 항생제가 포함될 수 있다.

[0104] 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.

[0105] 본 발명의 항체 또는 그 단편은 EPRS와 특이적으로 결합하므로 예를 들어, 특정 세포, 조직, 또는 혈청 내 EPRS 발현을 검출하는, EPRS 단백질을 검출하고 정량하기 위한 진단 분석에 유용하다.

[0106] 따라서 본 발명은 상기 항체 또는 그 단편을 시료와 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 그 단편을 검출하는 단계를 포함하는 EPRS 특이적 검출 방법을 제공한다.

[0107] 상기 항체 또는 그 단편을 '검출'하기 위하여, 항체 또는 그 단편은 일반적으로 검출가능 모이어티로 표지될 수 있다.

[0108] 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.

[0109] 또는 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하며, 상기 효소적 표지의 예는 초파리 루시러파제 및 세균 루시퍼라제 (미국 특허 제4,737,456호)와 같은 루시퍼라제, 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.

[0110] 표지는 다양한 공지된 기술을 이용하여 항체에 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체는 바이오틴에 접합될 수 있고 상기에 언급된 3종의 광범위한 카테고리에 속하는 임의의 표지들이 아비딘과, 또는 그 반대로 접합될 수 있다. 바이오틴은 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, 딕옥신 [digoxin])과 접합될 수 있고 상기에 언급된 서로 다른 유형의 표지들의 하나가 항-합텐 항체에 접합될 수 있다 (예컨대, 항-딕옥신 항체). 따라서, 항체에 대한 표지의 간접적 접합이 달성될 수 있다.

[0111] 본 발명의 항체 또는 그 단편은 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석, 및 면역침전 분석과 같은 임의

의 공지된 분석 방법에 사용될 수 있다.

[0112] 본 발명의 항체 또는 그 단편은 진단 킷트 즉, 진단 분석을 수행하기 위한 진단 킷트, 즉 사용설명서와 함께 미리 지정된 양으로 시약들의 포장된 조합에 사용될 수 있다. 항체가 효소로 표지된 경우에, 킷트는 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.

[0113] 진단용 바이오마커로서의 EPRS의 가능성을 살펴보면 인터페론 감마(IFN-γ)에 의해 EPRS가 여러 조절 단백질의 mRNA의 3-UTR 부분에 결합하여 복합체를 형성함으로 인해 여러 염증반응 및 면역반응에 관여하는 조절인자의 전사 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Sampath, P. et al. Noncanonical function of glutamylprolyltRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. Cell 119, 195?208 (2004)). 또한 혈관신생(angiogenesis)에 중요한 인자로 알려진 VEGFA (Vascular endothelial growth factor A)의 단백질 합성과정도 EPRS에 의해 조절되는 것으로 밝혀졌다 (Ray, P. S. et al. A stress-responsive RNA switch regulates VEGFA expression. Nature 457, 915?919 (2009)).

[0114] 따라서, EPRS는 검출을 통해 특정 암, 염증성 질환 및 면역질환의 진단, 병의 진행 상태 및 치료전후의 예후의 평가를 위한 진단 마커로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 암, 염증성 질환 및 면역질환의 진단 및 예후 평가는 생물학적 시료 중에서 EPRS 단백질을 검출함으로써 수행될 수 있다. 따라서 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암, 염증성 질환 또는 면역질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0115] 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 수득될 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.

[0116] 상기 검출에 관하여는 앞서 설명한 바와 같다.

[0117] 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 전이가 일어나는 암종일 수 있다.

[0118] 따라서 본 발명은 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0119] 또한, 본 발명은 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0120] 또한, 본 발명은 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 염증잘환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0121] 본 발명의 조성물은 본 발명의 항체 또는 그 단편을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0122] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 항체 또는 그 단편을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 “약학적으로 유효한 양”이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 암을 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0123] 상기에서 “약학적으로 허용되는” 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.

[0124] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 항체 또는 그 단편은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지

제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조될 수 있다.

[0125] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 상기 화학식 1의 아릴 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들어, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0126] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다.

[0127] 본 발명의 치료용 조성물을 임의의 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co.(Easton, PA: 1995))와 바람직한 순도를 갖는 항체를 혼합하여 저장하기 위해 동결건조된 케이크 또는 수용액의 형태로 제조할 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충용액, 예를 들어 인산, 시트르산 및 다른 유기산; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 당 알콜, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 및(또는) 비이온성 계면활성제, 예를 들어 트윈, 플루로닉스 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다.

[0128] 또한, 본 발명의 항체 또는 그 단편의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 0.01 - 100 mg/kg/week이며, 바람직하게는 0.1 - 20 mg/kg/week이며, 더욱 바람직하게는 5 - 10 mg/kg/week일 수 있다. 또한 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 간격으로 분할 투여할 수도 있다.

[0129] 본 발명의 조성물의 투여 경로는 공지된 방법, 예를 들어 정맥내, 복강내, 뇌내, 피하, 근육내, 안내, 동맥내, 뇌척수내, 또는 병변내 경로에 의한 주사 또는 주입, 또는 하기 기재된 서방성 (sustained release) 시스템에 의한 주사 또는 주입이다. 바람직하게는 항체는 전신으로 투여될 수 있다.

[0130] 본 발명의 약학적 조성물은 암 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0131] 본 발명의 일실시예에서는 인간의 VH3-23/VL1g 유전자를 골격으로 하고 CDR에 무작위 서열을 삽입하는 라이브러리를 구축하고, EPRS와 선택적으로 결합하는 파지를 선별하여 항체를 분리, 정제 하고 염기서열을 분석하였다.

[0132] 본 발명의 다른 일실시예에서는 정제한 항체가 EPRS와 결합하는지 western blot 방법으로 확인하였다. 그 결과 본 발명의 항체는 EPRS와 결합하는 것을 확인하였다.

[0133] 본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 항 EPRS scFv 항체와 EPRS의 친화도를 표면공명분석방법으로 측정하였다. 그 결과 본 발명의 항체는 평형해리상수 약 100- 300nM 값을 가져 비교적 높은 친화도를 나타내는 것을 확인하였다.

[0134] 본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 항 EPRS scFv 항체의 교차반응성을 측정하였다. Luminex bead를 이용하여 본 발명의 항체와 EPRS를 포함한 7종의 유사 단백질과의 반응성을 측정한 결과 본 발명의 항체는 EPRS를 제외한 다른 ARS들히 WHEP domain을 가지고 있는 WRS, HRS에도 결합하지 않는 것으로 보아 매우 특이적임을 확인하였다.

[0135] 본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 항 EPRS scFv 항체의 진단용 항체로의 유용성 여부를 실험하였다. 본 발명의 항체로 코팅된 plate를 제작한 후, EPRS WHEP domains 표준물질을 농도별로 희석하여 반응시키고, 결합여부를 ELISA로 측정하였다. 그 결과 EPRS WHEP domains 표준물질에 대하여 농도 의존적으로 항체 결합이 측정되는 것을 확인하여, 본 발명의 항체가 암, 염증질환 또는 면역질환 진단용으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

[0136] 따라서, 본 발명의 항체 또는 그 단편은 인간 EPRS에 특이적으로 결합하며, 동일한 ARS family를 포함한 다른 단백질과 교차반응성이 없어 EPRS 검출 및 억제가 가능하므로 EPRS 검출 및 EPRS가 관련된 질환인 암, 염증질환 또는 면역질환 진단 및 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0137] 도 1은 본 발명의 항체가 목적단백질인 EPRS에 결합하는지를 확인한 western blot 실험 결과이다.

도 2는 본 발명의 항체인 anti-EPRS scFv Biocon-EP1의 결합친화도를 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 측정한 결과 그래프이다(Kd : 평형해리상수, 가로축 : 시간(초), 세로축 : response unit(RU)).

도 3은 본 발명의 항체인 anti-EPRS scFv Biocon-EP2의 결합친화도를 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 측정한 결과 그래프이다(Kd : 평형해리상수, 가로축 : 시간(초), 세로축 : response unit(RU)).

도 4는 본 발명의 항체인 anti-EPRS scFv Biocon-EP3의 결합친화도를 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 측정한 결과 그래프이다(Kd : 평형해리상수, 가로축 : 시간(초), 세로축 : response unit(RU)).

도 5는 본 발명의 항체인 anti-EPRS scFv Biocon-EP1의 교차반응성(cross activity)을 Luminex Multiplex Assay 방법으로 측정한 결과 그래프이다(세로축(FI) : 형광강도(fluorescent intensity), CRS: 시스테닐-tRNA 합성효소(Cysteinyl-tRNA synthetase), DRS: 아스파틸-tRNA 합성효소(Aspartyl-tRNA synthetase), EPRS: 글루타밀-프로릴-tRNA 합성효소(Glutamyl-prolyl tRNA synthetase), HRS : 히스티딜-tRNA 합성효소(Histidyl-tRNA synthetase), WRS : 트립토파닐-tRNA 합성효소(Tryptophanyl-tRNA synthetase), AIMP1 : ARS 결합 다기능 단백질 1 (Aminoacyl-tRNA-synthetase-interacting multifunctional protein 1)), AIMP3: ARS 결합 다기능 단백질 3 (Aminoacyl-tRNA-synthetase-interacting multifunctional protein 3)).

도 6은 본 발명의 항체인 anti-EPRS scFv Biocon-EP2의 교차반응성(cross activity)을 Luminex Multiplex Assay 방법으로 측정한 결과 그래프이다(세로축(FI) : 형광강도(fluorescent intensity), CRS: 시스테닐-tRNA 합성효소(Cysteinyl-tRNA synthetase), DRS: 아스파틸-tRNA 합성효소(Aspartyl-tRNA synthetase), EPRS: 글루타밀-프로릴-tRNA 합성효소(Glutamyl-prolyl tRNA synthetase), HRS : 히스티딜-tRNA 합성효소(Histidyl-tRNA synthetase), WRS : 트립토파닐-tRNA 합성효소(Tryptophanyl-tRNA synthetase), AIMP1 : ARS 결합 다기능 단백질 1 (Aminoacyl-tRNA-synthetase-interacting multifunctional protein 1)), AIMP3: ARS 결합 다기능 단백질 3 (Aminoacyl-tRNA-synthetase-interacting multifunctional protein 3)).

도 7은 본 발명의 항체인 anti-EPRS scFv Biocon-EP3의 교차반응성(cross activity)을 Luminex Multiplex Assay 방법으로 측정한 결과 그래프이다(세로축(FI) : 형광강도(fluorescent intensity), CRS: 시스테닐-tRNA 합성효소(Cysteinyl-tRNA synthetase), DRS: 아스파틸-tRNA 합성효소(Aspartyl-tRNA synthetase), EPRS: 글루타밀-프로릴-tRNA 합성효소(Glutamyl-prolyl tRNA synthetase), HRS : 히스티딜-tRNA 합성효소(Histidyl-tRNA synthetase), WRS : 트립토파닐-tRNA 합성효소(Tryptophanyl-tRNA synthetase), AIMP1 : ARS 결합 다기능 단백질 1 (Aminoacyl-tRNA-synthetase-interacting multifunctional protein 1)), AIMP3: ARS 결합 다기능 단백질 3 (Aminoacyl-tRNA-synthetase-interacting multifunctional protein 3)).

도 8은 본 발명의 항체가 EPRS를 detection 할 수 있는지를 확인하기 위한 ELISA 실험 결과이다(세로축 : 450nm 흡광도, 가로축 : EPRS WHEP domains 표준물질의 농도(ng/ml)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0138] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0139] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0140] **<실시예 1>**

[0141] **scFv 라이브러리 구축 및 항 EPRS scFv 선별**

[0142] **<1-1> scFv 라이브러리 구축**

[0143] scFv 라이브러리는 대한민국특허 10-0961392호에 나온 방법에 따라 구축하였다.

[0144] 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 μg/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..

[0145] **<1-2> 항 EPRS scFv 선별**

[0146] 면역시험관(immunotube)에 10 ug/ml 농도의 EPRS WHEP domain 항원을 첨가하여 1시간동안 시험관 표면에 단백질을 흡착시킨 후 분말우유 3% 용액을 시험관에 첨가하여 EPRS가 흡착되지 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.

[0147] 용리된 파지를 1.0M 농도의 Tris-HCl 버퍼 (pH 7.8)로 중화시킨 후 ER2537 대장균에 37℃에서 1시간 감염시키고, 감염된 대장균을 카르베니실린을 함유하는 LB(Luria-Bertani) 한천배지에 도포하여 37℃에서 배양하였다. 다음날 배양된 대장균을 3 mL의 SB (super broth) - 카르베니실린 배양액에 현탁하고 15% 글리세롤을 첨가하여 일부는 -80℃에 보관하고, 나머지 중 50마이크로리터를 20 mL의 SB-카르베니실린-2% 포도당 용액에 접종하여 37℃에서 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℃에서 배양하였다.

[0148] 1시간 후 카나마이신 70ug/ml을 첨가하고 30℃에서 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.

[0149] **<실시예 2>**

[0150] **항 EPRS scFv 항체 발현 및 정제**

[0151] 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 페리플라즘(periplasm)에서 발현하였다. 대장균을 40 μL의 1X TES (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 20% Sucrose, pH 8.0) 용액에 현탁한 후 여기에 0.2X TES 용액 60 μL를 가하고 섞어서 섭씨 4도에서 30분 이상 처리하고 원심분리하여 상층액으로 페리플라즘을 추출하였다.

[0152] **<2-1> EPRS에 대해 선별된 scFv 항체 발현**

[0153] 선별된 EPRS에 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 카네니실린함유 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.

[0154] **<2-2> 선별된 scFv 항체 정제**

[0155] 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 일정양을 분주하여 냉동 보관하였다

[0156] **<2-3> 면역블롯 및 sequencing**

[0157] 페리플라즘에서 추출한 scFv 항체는 면역블롯(western blot) 기법을 사용하여 human 세포에서 원래 발현된 EPRS에 scFv 항체가 결합하는지 여부를 확인하는 데 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 이차 항체를 반응시킨후 기질로 ECL reagent를 이용하여 암실에서 필름 감광하였다. 감광된 띄는 표준 분자 마커와 비교하여 EPRS의 사이즈에 해당하는 띠를 확인하였다.

[0158] 이로부터 확인된 항원특이적 항체 클론은 카베니실린이 함유된 SB 배지 10ml에 overnight 배양하여 plasmid miniprep kit를 사용하여 plasmid DNA를 추출하여 Capillary sequencing service (Macrogen Co) 를 통해 염기서열을 분석하고 Kabat protein seqeunce database와 IMGT®(the international ImMunoGeneTics information system®) 분석방법에 근거하여 CDR 서열을 분석하였다.

[0159] 그 결과 EPRS 항원과 결합한 scFv의 개수는 총 3 건이며, 이들의 염기서열은 서열번호 14, 28 및 42 인 것으로 확인되었다.

[0160] **<실시예 3>**

[0161] **항 EPRS scFv 항체의 친화도 측정**

[0162] EPRS WEHP domain 항원에 대한 본 발명 항체의 결합 친화도를 ProteOnTMXPR36 SPR (surface plasmon resonance) 바이오센서 (Bio-Rad 사)를 이용하여 측정하였다.

[0163] 구체적으로, 약 10 ug/ml의 EPRS 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 (250-30nM) 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

[0164] 그 결과 [도 2-4]에서 보는 바와 같이, 본 발명의 항체는 최대 KD 10nM 값을 가져 매우 높은 EPRS 친화도를 가지는 것을 확인하였다.

[0165] **<실시예 4>**

[0166] **항 EPRS scFv 항체 교차 반응성(cross activity) 측정**

[0167] scFv 항체가 다른 항원과 반응성이 있는지 판단하기 위하여 Luminex bead를 이용하여 본 발명의 항체와 EPRS 및 다른 ARS family protein과의 교차 반응성을 측정하였다.

[0168] **<4-1> 각각의 protein이 결합된 Luminex bead 제조**

[0169] 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 CRS,DRS, EPRS WHEP domain, HRS, WRS, AIMP1(p43), AIMP3(p18) 10 ug을 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 각각의 ARS에 연결된 bead는 PBS로 2번 세척 후 Blocking buffer를 첨가하여 30분간 상온에서 반응시켜 결합하지 않은 잔기를 blocking 시킨후 PBS로 2번 세척 후 100ul PBS에 다시 현탁하고 빛이 차단된 tube에 보관하였다. 결합된 bead의 수는 hemocytometer로 측정하여 기록하였다.

[0170] **<4-2> Multiplex Assay를 이용한 Cross activity 측정**

[0171] 페리플라즘에서 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 섞어 준뒤 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 결합여부를 확인하였다.

[0172] 그 결과 [도 5] 내지 [도 7]에서 보는 바와 같이, 본 발명의 항체는 모든 농도에서 EPRS를 제외한 다른 ARS family protein과 반응하지 않는 것을 확인하였다.

[0173] 따라서 본 발명의 항체는 다른 단백질과 교차 반응성이 없는 것을 확인하였다.

[0174] **<실시예 5>**

[0175] **정제된 항-EPRS scFv 항체를 이용한 sandwich ELISA pairing test**

[0176] 본 발명의 항체가 진단용 항체로의 유용성 여부를 알아보기 위해 EPRS sandwich ELISA pairing test를 수행하였다 ELISA 구성중 capture 항체를 본 발명의 항체로 사용하고 detection 항체를 기존 제품의 rabbit 폴리클로날 항체로 pairing test를 해보아 EPRS 표준물질에 대한 정량 곡선이 만들어 지는 지를 확인하였다.

[0177] 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 3% skim milk를 함유한 PBST 350 ul를 첨가하여 상온에서 1시간 blocking한후 PBST로 3번 세척하였다. 항체를 coating한 plate well에 정제된 재조합 EPRS 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 10분동안 발색반응을 보고 2N 황산 50 ul 첨가하여 발색반응을 멈춘후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

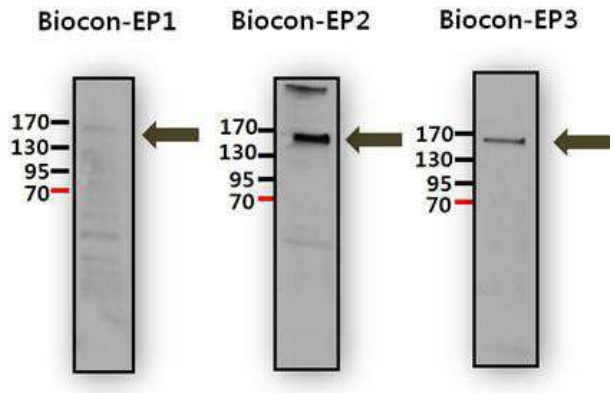
[0178] 그 결과 도 8에서 보는 바와 같이 재조합 EPRS WHEP domain 표준물질에 대해 50 ng/ml 농도이하에서부터 해당하는 표준 직선이 그려짐을 확인 할 수 있었다. 이로서 본 발명의 항체가 암 및 면역질환의 진단용으로 사용 될 수 있는 것을 확인하였다.

산업상 이용가능성

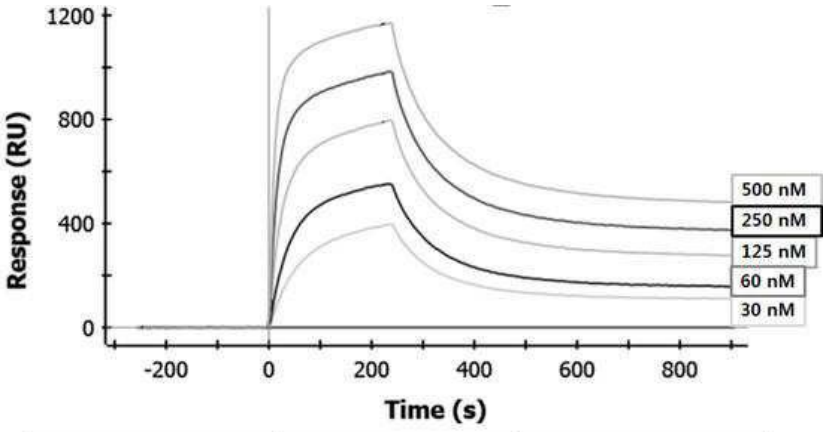
[0179] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 그 단편은 인간 EPRS에 특이적으로 결합하며, 동일한 ARS family를 포함한 다른 단백질과 교차반응성이 없어 EPRS 검출 및 억제가 가능하므로 EPRS 검출 및 EPRS가 관련된 질환인 암, 염증질환 또는 면역 질환 진단 및 치료 목적으로 사용될 수 있어 산업상 이용가능성이 높다.

도면

도면1

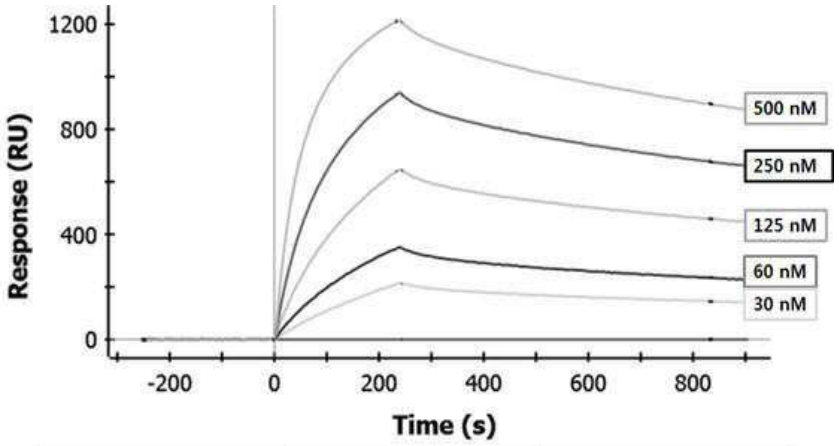


도면2



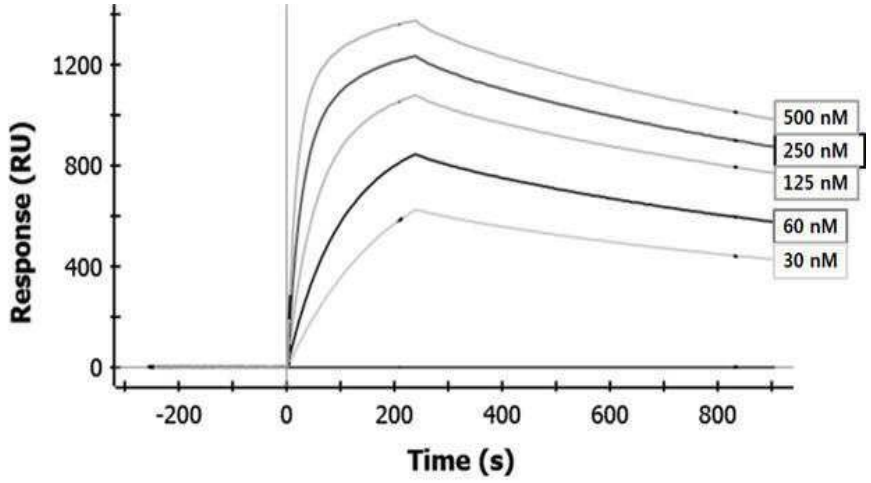
Ka($M^{-1}S^{-1}$)	Kd (S^{-1})	KD (M)
1.36×10^5	1.64×10^2	1.2×10^7

도면3



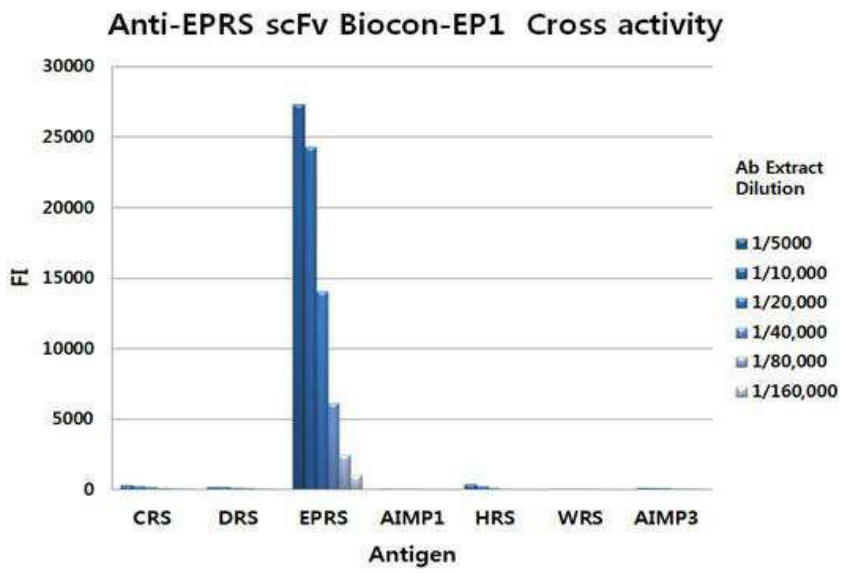
Ka($M^{-1}S^{-1}$)	Kd (S^{-1})	KD (M)
3.3×10^4	9.7×10^3	2.9×10^7

도면4

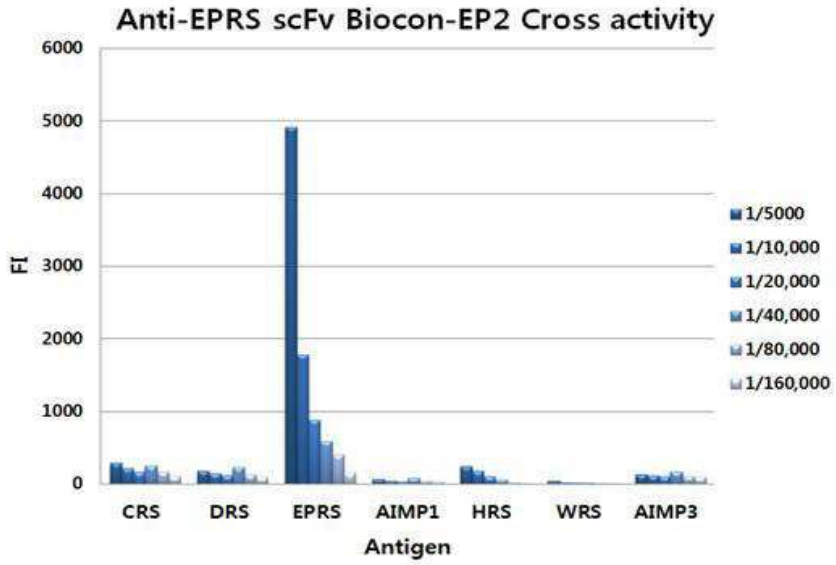


Ka($M^{-1}S^{-1}$)	Kd (S^{-1})	KD (M)
1.2×10^5	7.9×10^3	6.6×10^8

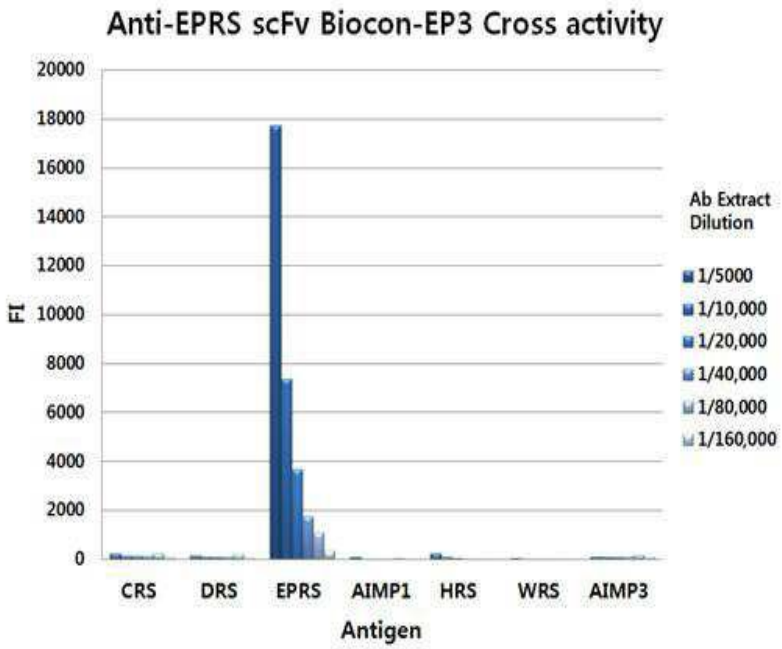
도면5


Anti-EPRS scFv Biocon-EP1 Cross activity
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
FI
CRS
DRS
EPRS
AIMP1
HRS
WRS
AIMP3
Antigen
Ab Extract Dilution
1/5000
1/10,000
1/20,000
1/40,000
1/80,000
1/160,000

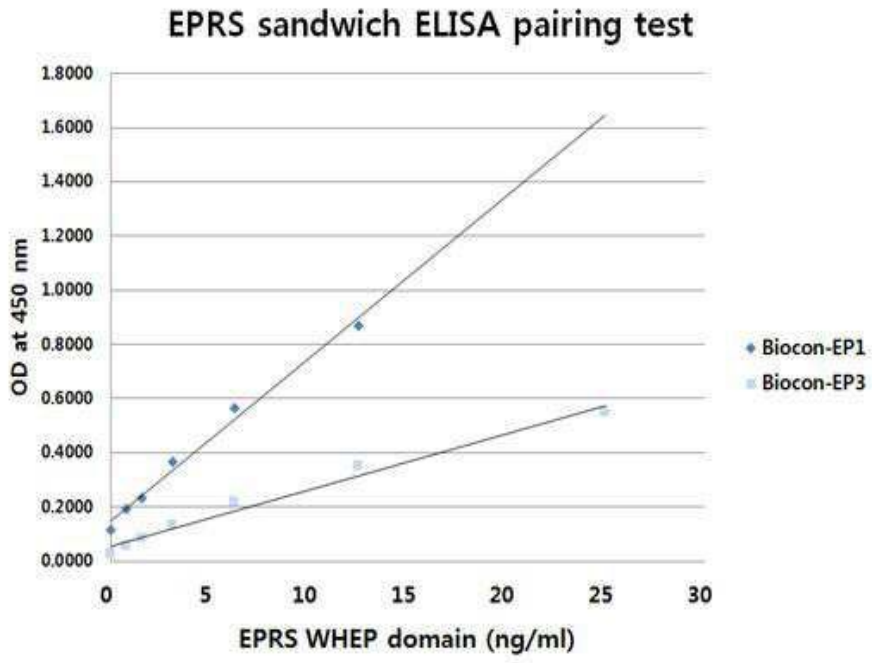
도면6


Anti-EPRS scFv Biocon-EP2 Cross activity
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
FI
CRS
DRS
EPRS
AIMP1
HRS
WRS
AIMP3
Antigen
1/5000
1/10,000
1/20,000
1/40,000
1/80,000
1/160,000

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation

Medicinal Bioconvergence Research Center

<120> anti-EPRS monoclonal antibody and uses thereof

<130> NP14-0098

<160> 42

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR1 of Biocon EP1

<400> 1

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR2 of Biocon EP1

<400> 2

Ala Asn Ser His Arg Pro Ser

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR3 of Biocon EP1

<400> 3

Gly Thr Trp Asp Tyr Ser Leu Asn Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR1 of Biocon EP1

<400> 4

Asp Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR2 of Biocon EP1

<400> 5

Ala Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR3 of Biocon EP1

<400> 6

Asn Arg Phe Val Phe Asp Tyr
1 5

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR1 of Biocon EP1

<400> 7

agtggctctt catctaatat tggcaataat gctgtcaac 39

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR2 of Biocon EP1

<400> 8

gctaatagtc atcggccaag c 21

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR3 of Biocon EP1

<400> 9

ggtacttggg attatagcct gaatggttat gtc 33

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR1 of Biocon EP1

<400> 10

gattatgata tgagc 15

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR2 of Biocon EP1

<400> 11

gcgatctctt ctggtggtgg taatacatat tacgctgatt ctgtaaaagg t 51

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR3 of Biocon EP1

<400> 12

aatcgttttg tgttcgacta c 21

<210> 13

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv of Biocon EP1

<400> 13

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Tyr His Gly Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Arg Thr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr

130 135 140

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile

145 150 155 160

Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro

165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asn Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp

180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

195 200 205

Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp

210 215 220

Tyr Ser Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

225 230 235 240

Leu

<210> 14

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding scFv of Biocon EP1

<400> 14

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgggactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc gattatgata tgagctgggt ccgccgggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagcg atctcttctg gtggtggtaa tacatattac 180

gctgattctg taaaaggtcg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaatcgt 300

tttgtgttcg actactgggg ccagggtaca ctggtcaccg tgagctcagg tggaggcggt 360

tcaggcggag gtggatccgg cggtggcgga tcgcagtctg tgctgactca gccaccctca 420

gcgtctggga cccccgggca gagggtcacc atctcttgta gtggctcttc atctaatatt 480

ggcaataatg ctgtcaactg gtaccagcag ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc 540

tatgctaata gtcatcggcc aagcggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc 600

acctcagcct ccctggccat cagtgggctc cggtccgagg atgaggctga ttattactgt 660

ggtacttggg attatagcct gaatggttat gtcttcggcg gaggcaccaa gctgacggtc 720

cta 723

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR1 of Biocon EP2

<400> 15

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Ser

1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR2 of Biocon EP2

<400> 16

Ala Asn Ser His Arg Pro Ser

1 5

<210> 17

<

211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR3 of Biocon EP2

<400> 17

Gly Thr Trp Asp Ala Ser Leu Ser Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR1 of Biocon EP2

<400> 18

Asn Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR2 of Biocon EP2

<400> 19

Gly Ile Tyr His Gly Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR3 of Biocon EP2

<400> 20

Thr Arg Thr Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR1 of Biocon EP2

<400> 21

actggctctt catctaatat tggcaataat gctgtctcc 39

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR2 of Biocon EP2

<400> 22

gctaatagtc atcggccaag c 21

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR3 of Biocon EP2

<400> 23

ggtacttggg atgctagcct gagtggttat gtc 33

<210> 24

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR1 of Biocon EP2

<400> 24

aactatgcta tgagc 15

<210> 25

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR2 of Biocon EP2

<400> 25

gggatctatc atggtggtgg taataaatat tacgctgatt ctgtaaaagg t 51

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR3 of Biocon EP2

<400> 26

acgaggacgc ttttcgacta c 21

<210> 27

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv of Biocon EP2

<400> 27

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Tyr His Gly Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Arg Thr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr

130 135 140

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile

145 150 155 160

Gly Asn Asn Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro

165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asn Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp

180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

195 200 205

Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp

210 215 220

Ala Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

225 230 235 240

Leu

<210> 28

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding scFv of Biocon EP2

<400> 28

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc aactatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggg atctatcatg gtggtggtaa taaatattac 180

gctgattctg taaaaggtcg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaacgagg 300

acgcttttcg actactgggg ccagggtaca ctggtcaccg tgagctcagg tggaggcggt 360

tcaggcggag gtggatccgg cggtggcgga tcgcagtctg tgctgactca gccaccctca 420

gcgtctggga cccccgggca gagggtcacc atctcttgta ctggctcttc atctaatatt 480

ggcaataatg ctgtctcctg gtaccagcag ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc 540

tatgctaata gtcatcggcc aagcggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc 600

acctcagcct ccctggccat cagtgggctc cggtccgagg atgaggctga ttattactgt 660

ggtacttggg atgctagcct gagtggttat gtcttcggcg gaggcaccaa gctgacggtc 720

cta 723

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR1 of Biocon EP3

<400> 29

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR2 of Biocon EP3

<400> 30

Ser Asn Ser His Arg Pro Ser

1 5

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL-CDR3 of Biocon EP3

<400> 31

Gly Ser Trp Asp Ala Ser Leu Asn Gly Tyr Val

1 5 10

<210

> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR1 of Biocon EP3

<400> 32

Ser Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH-CDR2 of Biocon EP3

<400> 33

Leu Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> VH-CDR3 of Biocon EP3

<400> 34

Thr Gly Trp Leu Phe Asp Tyr

1 5

<210> 35

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR1 of Biocon EP3

<400> 35

agtggctctt catctaatat tggcaataat gctgtcaac 39

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR2 of Biocon EP3

<400> 36

tctaatagtc atcggccaag c 21

<210> 37

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VL-CDR3 of Biocon EP3

<400> 37

ggttcttggg atgctagcct gaatggttat gtc 33

<210> 38

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR1 of Biocon EP3

<400> 38

agttattata tgagc 15

<210> 39

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR2 of Biocon EP3

<400> 39

ttgatctctc ctggtagtgg tagtatatat tacgctgatt ctgtaaaagg t 51

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequences encoding VH-CDR3 of Biocon EP3

<400> 40

actggttggc ttttcgacta c 21

<210> 41

<211> 241

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv of Biocon EP3

<400> 41

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Leu Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr

130 135 140

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile

145 150 155 160

Gly Asn Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro

165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp

180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

195 200 205

Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Asp

210 215 220

Ala Ser Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
225 230 235 240
Leu

<210> 42
<211> 723
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA sequences encoding scFv of Biocon EP3
<400> 42
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgaggctc 60
tcctgtgcag tctctgggtt cacctttagc agttattata tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcattg atctctcctg gtagtggtag tatatattac 180

gctgattctg taaaaggtcg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaactggt 300
tggcttttcg actactgggg ccagggtaca ctggtcaccg tgaactcagg tggaggcggt 360
tcaggcggag gtggatccgg cggtggcgga tcgcagtctg tgctgactca gccaccctca 420
gcgtctggga ccccCgggca gagggtcacc atctcttgta gtggctcttc atctaatatt 480
ggcaataatg ctgtcaactg gtaccagcag ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc 540
tattctaata gtcatcggcc aagcggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc 600

acctcagcct ccctggccat cagtgggctc cggtccgagg atgaggctga ttattactgt 660
ggttcttggg atgctagcct gaatggttat gtcttcggcg gaggcaccaa gctgacggtc 720
cta 723