



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0037153  
(43) 공개일자 2013년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0074691  
(22) 출원일자 2012년07월09일  
심사청구일자 없음  
(30) 우선권주장  
1020110101293 2011년10월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
삼성전자주식회사  
경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)

(72) 발명자  
이승현  
경기도 수원시 영통구 망포동 하우빌 206호  
최윤아  
부산광역시 수영구 남천동 남천비치아파트  
206-1201  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
리앤목특허법인

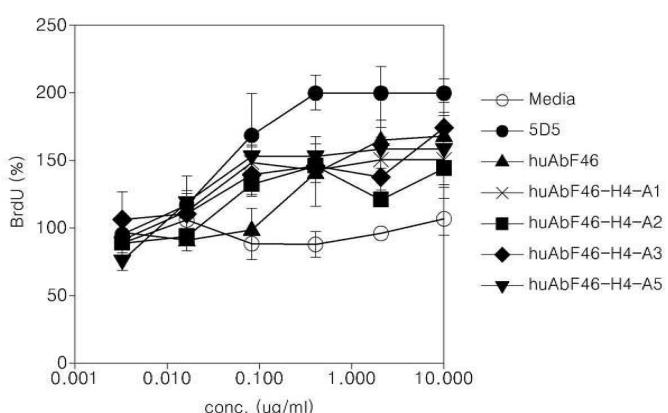
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 항 c-Met 항체 및 그의 용도

### (57) 요약

항 c-Met 항체 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 일 구체예에 따른 항 c-Met 항체 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 의하면, 암을 효율적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

**대 표 도** - 도2



(72) 발명자

김경아

경기도 성남시 분당구 정자동 더샵스타파크  
101-803

송호영

경기도 성남시 분당구 정자동 아이파크분당  
102-2902

---

정광호

서울특별시 강남구 도곡2동 아카데미스위트 A-02호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3의 중쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서, 상기 서열번호 4 내지 서열번호 9는 각각 하기 일반식 I 내지 일반식 VI으로 표시되는 아미노산 서열인 것인 항 c-Met 항체:

일반식 I

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Tyr-Tyr-Met-Ser (서열번호 4)

일반식 II

Arg-Asn-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Asn-Gly-Xaa<sub>5</sub>-Thr (서열번호 5)

일반식 III

Asp-Asn-Trp-Leu-Xaa<sub>6</sub>-Tyr (서열번호 6)

일반식 IV

Lys-Ser-Ser-Xaa<sub>7</sub>-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7)

일반식 V

Trp-Xaa<sub>10</sub>-Ser-Xaa<sub>11</sub>-Arg-Val-Xaa<sub>12</sub> (서열번호 8)

일반식 VI

Xaa<sub>13</sub>-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa<sub>14</sub>-Pro-Xaa<sub>15</sub>-Thr (서열번호 9)

상기 일반식 I에서, Xaa<sub>1</sub>은 Pro 또는 Ser이고, Xaa<sub>2</sub>는 Glu 또는 Asp이며,

상기 일반식 II에서, Xaa<sub>3</sub>은 Asn 또는 Lys이며, Xaa<sub>4</sub>는 Ala 또는 Val이고, Xaa<sub>5</sub>는 Asn 또는 Thr이며,

상기 일반식 III에서, Xaa<sub>6</sub>은 Ser 또는 Thr이고,

상기 일반식 IV에서, Xaa<sub>7</sub>은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa<sub>8</sub>은 His 또는 Gln이며, Xaa<sub>9</sub>는 Lys 또는 Asn이며,

상기 일반식 V에서, Xaa<sub>10</sub>은 Ala 또는 Gly이며, Xaa<sub>11</sub>은 Thr 또는 Lys이고, Xaa<sub>12</sub>는 Ser 또는 Pro이며,

상기 일반식 VI에서, Xaa<sub>13</sub>은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa<sub>14</sub>는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa<sub>15</sub>는 Leu, Tyr, Phe 또는 Met이다.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CDR-H1은 서열번호 22 내지 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드인 것인 항 c-Met 항체.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CDR-H2는 서열번호 25 또는 서열번호 26의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드인 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 CDR-H3는 서열번호 27 또는 서열번호 28의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드인 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 CDR-L1은 서열번호 29 내지 서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드인 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 CDR-L2는 서열번호 34 내지 서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드인 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 CDR-L3는 서열번호 13 내지 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드 또는 서열번호 37의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드인 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 8**

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3의 중쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서, 상기 서열번호 7 내지 서열번호 9는 각각 하기 일반식 IV 내지 일반식 VI으로 표시되는 아미노산 서열인 것인 항 c-Met 항체:

일반식 IV

Lys-Ser-Ser-Xaa<sub>7</sub>-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7)

일반식 V

Trp-Xaa<sub>10</sub>-Ser-Xaa<sub>11</sub>-Arg-Val-Xaa<sub>12</sub> (서열번호 8)

일반식 VI

Xaa<sub>13</sub>-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa<sub>14</sub>-Pro-Xaa<sub>15</sub>-Thr (서열번호 9)

상기 일반식 IV에서, Xaa<sub>7</sub>은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa<sub>8</sub>은 His 또는 Gln이며, Xaa<sub>9</sub>는 Lys 또는 Asn이고,

상기 일반식 V에서, Xaa<sub>10</sub>은 Ala 또는 Gly이며, Xaa<sub>11</sub>은 Thr 또는 Lys이고, Xaa<sub>12</sub>는 Ser 또는 Pro이며,

상기 일반식 VI에서, Xaa<sub>13</sub>은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa<sub>14</sub>는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa<sub>15</sub>는 Leu, Tyr, Phe 또는 Met이다.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 13 내지 서열번호 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 10**

제8항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 11**

제8항에 있어서, 상기 항 c-Met 항체는 서열번호 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체, 서열번호 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체 또는 서열번호 66의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체인 것인 항 c-Met 항체

**청구항 12**

제8항에 있어서, 상기 항 c-Met 항체는 서열번호 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체, 서열번호 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체 또는 서열번호 66의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체인 것인 항 c-Met 항체

**청구항 13**

제1항 또는 제8항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체인 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 14**

제1항 또는 제8항에 있어서, 상기 항체는 마우스 유래 항체, 마우스-인간 키메릭 항체 또는 인간화 항체인 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 15**

제1항 또는 제8항에 있어서, 상기 항체는 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항원 결합 단편인 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 16**

제1항 또는 제8항에 있어서, 상기 c-Met 단백질은 인간, 원숭이, 마우스, 및 래트로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질로부터 유래된 것인 항 c-Met 항체.

**청구항 17**

제1항 또는 제8항의 항 c-Met 항체의 약학적 유효량; 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 암은 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.

**청구항 19**

제17항에 있어서, 상기 항체는 c-Met 단백질의 길항체(antagonist) 작용을 하는 것인 약학적 조성물.

**청구항 20**

제1항 또는 제8항의 항 c-Met 항체의 약학적 유효량; 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

**명세서****기술분야**

[0001] 항 c-Met 항체 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] c-Met은 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor, HGF)의 수용체이며, HGF는 c-Met 수용체 티로신 키나제의 세포외 부위에 결합하여 다양한 정상세포와 종 양세포에서 분열, 운동, 형태발생, 혈관형성을 유발하는 사이토카인의 일종이다. c-Met은 세포 표면에 존재하는 대표적인 수용체 티로신 키나제(receptor tyrosine kinase)로 그 자체가 암유발 유전자이며 때로는 리간드인 HGF와 상관 없이도 암발생, 암전이, 암세포 이동, 암세포 침습, 신생혈관 생성 등과 같은 종양과 관련된 여러 가지 기작에 관여하기 때문에 최근 항암 타겟으로 주목받는 단백질이다.

[0003] 특히 c-Met은 기존에 알려진 항암제의 작용 기작에서 약물 내성에 관여됨이 알려지면서 더욱 더 개인맞춤형 치료에 중요성이 인식되고 있다. EGFR (ERBB1)을 표적으로 하는 대표적인 항암 치료제인 엘비툭스(Erbitux) 또는 타세바(Tarceva)와 같은 약물은 암 발생 기작과 관련된 신호 전달을 차단함으로써 작동한다. 또한 유방암 치료제로 잘 알려진 허셉틴(Herceptin)은 ERBB2 (HER2)를 표적으로 세포의 증식에 필요한 신호 전달을 차단함으로써 작동한다. 그러나 상기 약물에 대한 내성이 있는 환자 중, c-Met 단백질의 과발현 등으로 항암제의 작동을 피해 세포의 증식을 유도하는 다른 신호 전달 기작이 활성화된다는 연구들이 최근 발표되고 있다. 이러한 이유로 인해, c-Met은 항암제와 관련하여 다수의 제약사들이 주목하고 있는 표적 분자가 되고 있다.

[0004] 관련 기술은 c-Met의 작용을 저해하는 항체 치료제를 개시하고 있다. 그러나, 상기 관련 기술은, 항체가 원래의 구조를 가진 경우 c-Met 분자들이 이량체화(dimerization)가 되도록 유발함으로써, 암을 유발하는 문제점이 발견되었다.

[0005] c-Met의 작용을 저해하는 항체 치료제를 개시하는 다른 관련 기술은 c-Met의 리간드인 HGF c-Met에 결합하지 못하도록 저해하는 기능은 있으나, 항체 자체의 결합에 의해 리간드와 상관없이 c-Met을 이량체화시켜 오히려 암을 유발하는 신호가 전달되도록 하는 효능제(agonist)로 작용하는 부작용이 발견이 되었다.

[0006] 또 다른 관련 기술은 c-Met의 이량체화를 방지하기 위해 원래는 효능제 (agonist)인 양팔 항체 (two-armed antibody)를 유전자 재조합 방식으로 변형시킨 c-Met에 대한 한팔 길항(one-armed antagonistic) 항체를 개시하고 있으며, 현재 이에 대한 임상시험 단계의 제품 개발이 진행되고 있다. 그러나 상기 관련 기술에서도 상기 항체는 화학요법과 병용치료일 경우에만 효과를 보이며, 항체를 단독으로 처리하는 경우에는 항암 효과가 크지 않은 것으로 확인되었다.

[0007] 따라서, 종래 기술에 의하더라도, c-Met의 작용을 저해하는 새로운 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 개발이 여전히 요구되고 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 항 c-Met 항체를 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 항 c-Met 항체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3의 중쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0011] 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서, 상기 서열번호 4 내지 서열번호 9는 각각 하기 일반식 I 내지 일반식 VI으로 표시되는 아미노산 서열인 것인 항 c-Met 항체를 제공한다.

[0012] 일반식 I

Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Tyr-Tyr-Met-Ser (서열번호 4)

- [0014] 일반식 II
- [0015] Arg-Asn-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Asn-Gly-Xaa<sub>5</sub>-Thr (서열번호 5)
- [0016] 일반식 III
- [0017] Asp-Asn-Trp-Leu-Xaa<sub>6</sub>-Tyr (서열번호 6)
- [0018] 일반식 IV
- [0019] Lys-Ser-Ser-Xaa<sub>7</sub>-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7)
- [0020] 일반식 V
- [0021] Trp-Xaa<sub>10</sub>-Ser-Xaa<sub>11</sub>-Arg-Val-Xaa<sub>12</sub> (서열번호 8)
- [0022] 일반식 VI
- [0023] Xaa<sub>13</sub>-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa<sub>14</sub>-Pro-Xaa<sub>15</sub>-Thr (서열번호 9)
- [0024] 상기 일반식 I에서, Xaa<sub>1</sub>은 Pro 또는 Ser이고, Xaa<sub>2</sub>는 Glu 또는 Asp이며,
- [0025] 상기 일반식 II에서, Xaa<sub>3</sub>은 Asn 또는 Lys이며, Xaa<sub>4</sub>는 Ala 또는 Val이고, Xaa<sub>5</sub>는 Asn 또는 Thr이며,
- [0026] 상기 일반식 III에서, Xaa<sub>6</sub>은 Ser 또는 Thr이고,
- [0027] 상기 일반식 IV에서, Xaa<sub>7</sub>은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa<sub>8</sub>은 His 또는 Gln이며, Xaa<sub>9</sub>는 Lys 또는 Asn이고,
- [0028] 상기 일반식 V에서, Xaa<sub>10</sub>은 Ala 또는 Gly이며, Xaa<sub>11</sub>은 Thr 또는 Lys이고, Xaa<sub>12</sub>는 Ser 또는 Pro이며,
- [0029] 상기 일반식 VI에서, Xaa<sub>13</sub>은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa<sub>14</sub>는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa<sub>15</sub>는 Leu, Tyr, Phe 또는 Met이다.
- [0030] 일 구체예에 따르면, 상기 CDR-H1은 서열번호 22 내지 서열번호 24의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드일 수 있고, 상기 CDR-H2는 서열번호 25 또는 서열번호 26의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드일 수 있으며, 상기 CDR-H3는 서열번호 27 또는 서열번호 28의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0031] 일 구체예에 따르면, 상기 CDR-L1은 서열번호 29 내지 서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드일 수 있고, 상기 CDR-L2는 서열번호 34 내지 서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드일 수 있으며, 상기 CDR-L3는 서열번호 13 내지 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드 또는 서열번호 37의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0032] 다른 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3의 중쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0033] 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체로서, 상기 서열번호 7 내지 서열번호 9는 각각 하기 일반식 IV 내지 일반식 VI으로 표시되는 아미노산 서열인 것인 항 c-Met 항체를 제공한다.
- [0034] 일반식 IV
- [0035] Lys-Ser-Ser-Xaa<sub>7</sub>-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa<sub>8</sub>-Xaa<sub>9</sub>-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7)
- [0036] 일반식 V
- [0037] Trp-Xaa<sub>10</sub>-Ser-Xaa<sub>11</sub>-Arg-Val-Xaa<sub>12</sub> (서열번호 8)
- [0038] 일반식 VI

- [0039] Xaa<sub>13</sub>-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa<sub>14</sub>-Pro-Xaa<sub>15</sub>-Thr (서열번호 9)
- [0040] 상기 일반식 IV에서, Xaa<sub>7</sub>은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa<sub>8</sub>은 His 또는 Gln이며, Xaa<sub>9</sub>는 Lys 또는 Asn이고,
- [0041] 상기 일반식 V에서, Xaa<sub>10</sub>은 Ala 또는 Gly이며, Xaa<sub>11</sub>은 Thr 또는 Lys이고, Xaa<sub>12</sub>는 Ser 또는 Pro이며,
- [0042] 상기 일반식 VI에서, Xaa<sub>13</sub>은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa<sub>14</sub>는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa<sub>15</sub>는 Leu, Tyr, Phe 또는 Met이다.
- [0043] 일 구체예에 따르면, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 13 내지 서열번호 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0044] 일 구체예에 따르면, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 18 내지 서열번호 21로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0045] 용어, "c-Met" 또는 "c-Met 단백질"은 간세포 성장 인자와 결합하는 수용체 티로신 키나제를 의미한다. 상기 단백질은 예를 들면, GenBank Accession Number NM\_000245에 제공된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드, 또는 GenBank Accession Number NM\_000236에 제공된 폴리펩티드 서열에 의해 암호화된 단백질, 또는 그의 세포외 도메인을 포함한다. 수용체 티로신 키나제 c-Met은 예를 들면, 암발생, 암전이, 암세포 이동, 암세포 침투, 신생혈관 생성 과정 등의 여러 가지 기작에 관여한다.
- [0046] 일 구체예에 따르면, 상기 c-Met은 인간, 원숭이, 마우스, 및 래트로 이루어진 군으로부터 선택되는 c-Met으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0047] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여 시 면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메릭 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메릭 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메릭 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 영역에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체이다. 이는 키메릭 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.
- [0048] 인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이다, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.
- [0049] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 마우스 유래 항체, 마우스-인간 키메릭 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.
- [0050] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 단일클론항체일 수 있다.
- [0051] 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 및 앱실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1( $\gamma 1$ ), 감마2( $\gamma 2$ ), 감마3( $\gamma 3$ ), 감마4( $\gamma 4$ ), 알파1( $\alpha 1$ ) 및 알파2( $\alpha 2$ )를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다.
- [0052] 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인  $V_H$  및 3개의 불변 영역 도메인  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ 과 힙지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인  $V_L$  및 불변 영역 도메인  $C_L$ 을 포

함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

[0053] 용어, “CDR(complementarity determining region)”은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다(CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다. 한편, 용어, “특이적으로 결합” 또는 “특이적으로 인식”은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.

[0054] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원 결합 단편일 수 있다.

[0055] 용어, “항원 결합 단편”은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 의미한다. 예를 들어, scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 또는 F(ab')<sub>2</sub>일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C<sub>H1</sub>)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C<sub>H1</sub> 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')<sub>2</sub> 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 웨타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이를 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 웨신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0056] 일 구체예에 따르면, 상기 항 c-Met 항체는 서열번호 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체, 서열번호 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체 또는 서열번호 66의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체인 것일 수 있다.

[0057] 다른 구체예에 따르면, 상기 항 c-Met 항체는 서열번호 62의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체, 서열번호 64의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체 또는 서열번호 66의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체인 것일 수 있다.

[0058] 한편, 상기 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 인간의 카파 불변영역으로 이루어진 경쇄이며, 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 상기 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에서 36번 히스티딘(histidine)이 티로신(tyrosine)으로 치환된 형태의 폴리펩티드이다. 상기 치환으로 인하여, 일 구체예에 따른 항체의 생산량이 증가될 수 있다.

[0059] 다른 양상은 상기 항 c-Met 항체의 약학적 유효량; 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0060] 일 구체예에 따르면, 상기 암은 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 폐부암, 폐부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0061] 상기 조성물이 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 제조되는 경우, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴,

규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 혼탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 웨타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0063] 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 상기 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다. 용어 "약학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데, 또는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0064] 상기 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 혼탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 한편, 상기 조성물은 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하므로, 면역 리포좀으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포좀은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 면역 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물로서 역상 증발법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교체 반응을 통해 리포좀에 접합될 수 있다. 독소루비신과 같은 화학치료제가 추가로 리포좀 내에 포함될 수 있다.

[0065] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 c-Met 단백질의 길항제(antagonist) 작용을 하는 것일 수 있다.

[0066] 용어 "길항제(antagonist)"는 표적물 (예를 들어, c-Met)의 생물학적 활성 중 하나 이상을 부분적으로나 완전히 차단, 억제 또는 중화시키는 모든 분자를 포함하는 개념으로 해석된다. 예를 들어, "길항제" 항체는 항체가 결합하는 항원 (예를 들어, c-Met)의 생물학적 활성을 억제시키거나 감소시키는 항체를 의미한다. 길항제는 리간드에 대한 수용체의 결합에 의해, 수용체 인산화(phosphorylation)를 감소시키거나, 리간드에 의해 활성화되었던 세포를 무능력화시키거나, 또는 사멸시키는 작용을 할 수 있다. 또한, 길항제는 수용체-리간드 사이의 상호 작용을 완전히 단절시키거나, 수용체의 3차 구조의 변화, 또는 감소 조절(down regulation)에 의해 상기 상호 작용을 실질적으로 감소시킬 수 있다.

[0067] 또 다른 양상은 상기 항 c-Met 항체의 약학적 유효량; 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

[0068] 상기 암 치료 방법에 사용되는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0069] 한편, 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 투여할 수 있는 개체는 모든 동물을 포함한다. 예를 들어, 인간 또는 개, 고양이, 마우스와 같은 인간을 제외한 동물일 수 있다.

### 발명의 효과

[0070] 일 구체예에 따른 항 c-Met 항체 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 의하면, 암을 효율적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 원하는 CDR만 돌연변이된 huAbF46 항체의 scFv 라이브러리 유전자를 확보하기 위한 중복 확장 중합효소

연쇄반응(overlap extension PCR) 방법의 예시를 나타낸 것이다.

도 2는 BrdU assay를 통해 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1, huAbF46-H4-A2, huAbF46-H4-A3, huAbF46-H4-A5 항체의 작용성 부작용 정도를 확인한 결과이다.

도 3은 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1, huAbF46-H4-A2, huAbF46-H4-A3, huAbF46-H4-A5 항체의 인 비트로 세포증식 분석을 수행한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 Akt의 인산화 정도를 측정하여 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1, huAbF46-H4-A2, huAbF46-H4-A3, huAbF46-H4-A5 항체의 작용성 부작용 정도를 확인한 결과이다.

도 5는 c-Met의 분해 정도를 측정하여 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1, huAbF46-H4-A2, huAbF46-H4-A3, huAbF46-H4-A5 항체의 항암 효능을 확인한 결과이다.

도 6a 및 6b는 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1, huAbF46-H4-A2, huAbF46-H4-A3, huAbF46-H4-A5 항체의 인 비보 항암 효능 분석을 이종 이식 U87MG 뇌암 또는 MKN45 위암 마우스 동물 모델을 대상으로 수행한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1(U6-HC7), huAbF46-H4-A1(IgG2 hinge) 및 huAbF46-H4-A1(IgG2 Fc) 항체의 인 비트로 세포증식 분석을 수행한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 Akt의 인산화 정도를 측정하여 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1(U6-HC7), huAbF46-H4-A1(IgG2 hinge) 및 huAbF46-H4-A1(IgG2 Fc) 항체의 작용성 부작용 정도를 확인한 결과이다.

도 9는 c-Met의 분해 정도를 측정하여 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1(U6-HC7), huAbF46-H4-A1(IgG2 hinge) 및 huAbF46-H4-A1(IgG2 Fc) 항체의 항암 효능을 확인한 결과이다.

도 10a 및 도 10b는 일 구체예에 따른 huAbF46-H4-A1(U6-HC7), huAbF46-H4-A1(IgG2 hinge) 및 huAbF46-H4-A1(IgG2 Fc) 항체의 인 비보 항암 효능 분석을 이종 이식 U87MG 뇌암 또는 MKN45 위암 마우스 동물 모델을 대상으로 수행한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072]

이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이를 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 발명의 범위가 이를 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073]

실시예 1: c-Met에 대한 마우스 항체 AbF46의 생산

[0074]

(1) 마우스의 면역화

[0075]

하이브리도마 세포주의 개발에 필요한 면역화 된 마우스를 얻기 위하여, 5마리의 쥐에 한마리당 100 µg의 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질(R&D Systems)과 동량의 완전 프로인드 어주번트(Freund's adjuvant)를 혼합하여 4-6 주된 BALB/c 마우스(Japan SLC, Inc.)의 복강 내에 주사하였다. 2주 후에 상기와 동일한 방법으로 항원(먼저 주사한 양의 절반)을 불완전 프로인드 어주번트(incomplete Freund's adjuvant)와 혼합하여 마우스의 복강 내에 주사하였다. 일주일 후 마지막 부스팅(boosting)이 수행되고 3일 후에 상기 마우스의 꼬리에서 채혈하여 혈청을 얻은 뒤 1/1000로 PBS에 희석하여 ELISA로 c-Met을 인지하는 항체의 역가가 증가됨을 확인하였다. 상기의 결과로 항체의 양이 충분하게 얻어지는 마우스를 선별하여 세포융합과정을 수행하였다.

[0076]

(2) 세포 융합 및 하이브리도마의 제조

[0077]

세포융합 실험 3일 전에 50 µg의 PBS에 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질 혼합물을 복강 내에 주사하고, 면역화 된 마우스를 마취한 후 몸통의 좌측에 위치한 비장(spleen)을 적출하였다. 적출한 비장을 메쉬로 갈아서 세포를 분리하고, 배양배지(DMEM)와 혼합하여 비장세포 혼탁액을 만들었다. 상기 혼탁액을 원심분리하여 세포층을 회수하였다. 상기 얻어진 비장세포  $1 \times 10^8$  개와 골수종세포(Sp2/0)  $1 \times 10^8$  개를 혼합한 다음 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 원심분리된 침전물을 천천히 분산시키고, 배양배지(DMEM)에 들어있는 45 % 폴리에틸렌 글리콜(PEG)(1 ml)을 처리하고, 37 °C에서 1분 동안 유지시킨 후, 배양배지(DMEM) 1 ml을 첨가하였다. 이후 배양배지(DMEM) 10

$\text{ml}$ 을 1분 동안 첨가하고,  $37^{\circ}\text{C}$ 의 물에서 5분 동안 방치한 후  $50 \text{ ml}$ 로 맞추어 다시 원심분리하였다. 세포 침전물을 분리배지(HAT 배지)에  $1\sim2\times10^5/\text{ml}$  정도로 재현탁시키고, 96-웰(well) 플레이트에  $0.1 \text{ ml}$ 씩 분주한 후  $37^{\circ}\text{C}$  이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

### [0079] (3) c-Met 단백질에 대한 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 선별

상기 (2)에서 제조된 하이브리도마 세포군 중에서 c-Met 단백질에만 특이적으로 반응하는 하이브리도마 세포를 선별하기 위하여 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질과 인간의 Fc 단백질을 항원으로 이용한 ELISA 분석 방법을 통하여 스크리닝하였다.

マイクロロタイターフォートレイト에 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질을 한 웨일당 각각  $50 \mu\text{l}$  ( $2 \text{ ug/ml}$ )씩 가하여 플레이트 표면에 부착시키고, 반응하지 않은 항원은 세척하여 제거하였다. c-Met이 아닌 Fc에 결합되는 항체를 선별하여 제외시키기 위하여 인간의 Fc 단백질을 위와 동일한 방법으로 플레이트 표면에 부착시켰다. 하이브리도마 세포의 배양액을 각각 웨일에  $50 \mu\text{l}$ 씩을 가하여 1시간 동안 반응시킨 후 인산 완충용액-트윈 20(TBST) 용액으로 충분히 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스래디쉬 페옥시다제(goat anti-mouse IgG-HRP)를 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, TBST 용액으로 충분히 세척하였다. 이어서 페옥시다제의 기질용액(OPD)을 가하여 반응시키고, 그 반응정도는 엘리자 해독기(ELISA Reader)로  $450 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하여 인간의 Fc에는 결합되지 않고, 인간의 c-Met 단백질에만 특이적으로 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주들을 반복하여 선별하였다. 반복 선별을 통해 얻은 하이브리도마 세포주를 제한 회석(limiting dilution)하여 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주 1개의 클론을 최종적으로 얻었다. 최종 선별된 단일클론 항체 생산 하이브리도마를 한국 세포주 은행에 기탁하여 수탁번호 KCLRF-BP-00220를 부여받았다.

### [0082] (4) 단일클론 항체의 생산 및 정제

상기 (3)에서 얻은 하이브리도마 세포를 무혈청 배지에서 배양하고 배양액으로부터 단일클론 항체를 생산 정제하였다.

먼저 10% FBS이 포함된 배양배지(DMEM) 배지  $50 \text{ ml}$ 에서 배양된 상기 하이브리도마 세포를 원심분리하여 세포 침전물을  $20 \text{ ml}$  PBS로 2회 이상 세척하여 FBS가 제거된 상태에서 배양배지(DMEM) 배지  $50 \text{ ml}$ 을 세포 침전물에 재현탁시킨 후 3일 동안  $37^{\circ}\text{C}$  이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 이후 원심분리를 통해 항체를 생산하는 세포를 제거하고 항체들이 분비된 배양액을 분리하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에 보관하거나 바로 모아서  $50 \text{ ml}$  내지  $300 \text{ ml}$ 의 배양액으로부터 친화성 칼럼(Protein G agarose column; Pharmacia, USA)을 장착한 AKTA 정제 기기(GE Healthcare)를 이용하여 항체를 순수 정제한 후 단백질 응집용 필터(Amicon)를 사용하여 PBS로 상증액을 치환하여 정제된 항체를 보관하고, 이후의 실험에 사용하였다.

### [0085] 실시예 2: c-Met에 대한 키메릭 항체 chAbF46의 제작

일반적으로 마우스 항체는 치료 목적으로 인간에게 주입되었을 때 면역거부반응(immunogenicity)을 보일 가능성이 높으므로, 이를 해결하기 위하여, 상기 실시예 1에서 제작된 마우스 항체 AbF46으로부터, 항원 결합에 관련된 변이 영역(variable region)을 제외한 불변 영역(constant region)을 인간 IgG1 항체의 서열로 치환하는 키메릭 항체 chAbF46을 제작하였다.

중쇄에 해당하는 염기 서열은 'EcoRI-signal sequence-VH-NheI-CH-TGA-XhoI'(서열번호 38)로, 경쇄에 해당하는 염기 서열은 'EcoRI-signal sequence-VL- BsiWI-CL-TGA-XhoI'(서열번호 39)로 구성되도록 각각 디자인하여 유전자를 합성하였다. 이후, Invitrogen 사의 OptiCHO<sup>TM</sup> Antibody Express Kit (Cat no. 12762-019)에 포함되어 있는 pOptiVEC<sup>TM</sup>-TOPO TA Cloning Kit에 상기 중쇄에 해당하는 염기서열을 갖는 DNA 절편(서열번호 38)을, pcDNA<sup>TM</sup> 3.3-TOPO TA Cloning Kit(Cat no. 8300-01)에 상기 경쇄에 해당하는 염기서열을 갖는 DNA 절편(서열번호 39)을 각각 EcoRI(NEB, R0101S)과 XhoI(NEB, R0146S) 제한 효소를 사용하여, 클로닝함으로써, 키메릭 항체의 발현을 위한 벡터를 구축하였다.

- [0088] 상기 구축된 벡터는 각각 Qiagen Maxiprep kit (Cat no. 12662)을 이용하여 증폭되었으며, 상기 중쇄를 포함하는 벡터 및 경쇄를 포함하는 벡터는 4:1의 비율(80 ug:20 ug)로 293T 세포( $2.5 \times 10^7$ )에 2M CaCl<sub>2</sub>를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.
- [0089] 상기 배양된 세포를 원심분리하여 상등액 각 100 ml을 취하고, AKTA Prime (GE healthcare)를 이용하여 정제하였다. AKTA Prime에 Protein A 컬럼(GE healthcare, 17-0405-03)을 설치하고 배양액을 5 ml/min의 유속으로 흘려준 후, IgG elution buffer(Thermo Scientific, 21004)로 용출하였다. 이를 PBS buffer로 교환하여 최종적으로 키메릭 항체 AbF46(이하, chAbF46로 명명함)을 정제하였다.
- [0090]
- [0091] 실시예 3: 키메릭 항체 chAbF46으로부터 인간화 항체 huAbF46의 제작
- [0092] (1) 중쇄의 인간화(Heavy chain humanization)
- [0093] H1-heavy 및 H3-heavy 2종의 디자인을 위하여, 우선 Ig Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)를 통하여 마우스 항체 AbF46의 VH 유전자와 가장 상동성이 높은 인간의 생식선(germline) 유전자를 분석하였다. 그 결과, VH3-71이 아미노산 레벨에서 83%의 상동성을 가짐을 확인하였으며, 마우스 항체 AbF46의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3를 Kabat numbering으로 정의하고, 마우스 항체 AbF46의 CDR 부분이 VH3-71의 골격(framework)에 도입되도록 디자인하였다. 이때, 30번(S→T), 48번(V→L), 73번(D→N), 78번(T→L) 아미노산은 원래 마우스 AbF46 항체의 아미노산 서열로 back-mutation 하였다. 이후, H1은 추가로 83번(R→K)과 84번(A→T) 아미노산에 돌연변이를 주어 최종적으로 H1-heavy(서열번호 40)와 H3-heavy(서열번호 41)를 구축하였다.
- [0094] H4-heavy의 디자인을 위하여 인간항체의 골격(framework) 서열을 찾아 본 결과, AbF46 항체의 마우스 골격 서열과 서열이 매우 유사함과 동시에, 기존의 가장 안정하다고 알려진 VH3 subtype을 사용하여 Kabat numbering으로 정의된 마우스 항체 AbF46의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3를 도입하였다. 이를 통하여 H4-heavy (서열번호 42)를 구축하였다.
- [0095] (2) 경쇄의 인간화(Light chain humanization)
- [0096] H1-light(서열번호 43) 및 H2-light(서열번호 44) 2종의 디자인을 위하여, Ig Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)를 통하여, 마우스 항체 AbF46의 VL 유전자와 가장 상동성이 높은 인간 생식선 유전자를 분석하였다. 그 결과, VK4-1이 아미노산 레벨에서 75%의 상동성을 가짐을 확인하였으며, 마우스 항체 AbF46의 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3를 Kabat numbering으로 정의하고, 마우스 항체 AbF46의 CDR부분이 VK4-1의 골격에 도입되도록 디자인하였다. 이때, H1-light는 36번(Y→H), 46번(L→M), 49번(Y→I) 3개의 아미노산을 back-mutation 하였으며, H2-light는 49번 아미노산(Y→I) 1개만을 back-mutation 하여 구축하였다.
- [0097] H3-light(서열번호 45)의 디자인을 위하여, Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)를 통하여 마우스 항체 AbF46의 VL 유전자와 가장 상동성이 높은 인간 생식선 유전자를 분석한 결과 중, 상기 VK4-1 이외에 VK2-40을 선정하였다. 마우스 항체 AbF46 VL과 VK2-40은 아미노산 레벨에서 61%의 상동성을 가짐을 확인하였으며, 마우스 항체 AbF46의 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3를 Kabat numbering으로 정의하고, 마우스 항체 AbF46의 CDR부분이 VK4-1의 골격에 도입되도록 디자인하였다. 이때, H3-light는 36번(Y→H), 46번(L→M), 49번(Y→I) 3개의 아미노산을 back-mutation 하여 구축하였다.
- [0098] H4-light(서열번호 46)의 디자인을 위하여, 인간항체의 골격(framework) 서열을 찾아 본 결과, 기존의 가장 안정하다고 알려진 Vk1 subtype을 사용하여 Kabat numbering으로 정의된 마우스 항체 AbF46의 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3를 도입하였다. 이때, H4-light는 36번(Y→H), 46번(L→M), 49번(Y→I) 3개의 아미노산을 추가로 back-mutation 하여 구축하였다.
- [0099] 이후, Invitrogen 사의 OptiCHO™ Antibody Express Kit (Cat no. 12762-019)에 포함되어 있는 pOptiVEC™-TOPO TA Cloning Kit에 상기 중쇄에 해당하는 염기서열을 갖는 DNA 절편(H1-heavy; 서열번호 47, H3-heavy; 서열번호 48, H4-heavy; 서열번호 49)을 pcDNA™ 3.3-TOPO TA Cloning Kit에 상기 경쇄에 해당하는 염기서열을 갖는 DNA 절편(H1-light; 서열번호 50, H2-light; 서열번호 51, H3-light; 서열번호 52, H4-light; 서열번호 53)을

각각 EcoRI(NEB, R0101S)과 XhoI(NEB, R0146S) 제한 효소를 사용하여, 클로닝함으로써, 인간화 항체의 발현을 위한 벡터를 구축하였다.

[0100] 상기 구축된 벡터는 각각 Qiagen Maxiprep kit (Cat no. 12662)을 이용하여 증폭되었으며, 상기 중쇄를 포함하는 벡터 및 경쇄를 포함하는 벡터는 4:1의 비율(80 ug:20 ug)로 293T 세포( $2.5 \times 10^7$ )에 2M CaCl<sub>2</sub>를 360 uL 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

[0101] 상기 배양된 세포를 원심분리하여 상등액 각 100 mL을 취하고, AKTA Prime (GE healthcare)를 이용하여 정제하였다. AKTA Prime에 Protein A 컬럼(GE healthcare, 17-0405-03)을 설치하고 배양액을 5 mL/min의 유속으로 흘려준 후, IgG elution buffer(Thermo Scientific, 21004)로 용출하였다. 이를 PBS buffer로 교환하여 최종적으로 인간화 항체 AbF46(이하, huAbF46로 명명함)을 정제하였다. 한편, 이후 실시예에서 사용한 인간화 항체 huAbF46의 중쇄, 경쇄 조합은 H4-heavy 및 H4-light이었다.

#### [0102] 실시예 4: huAbF46 항체의 scFv 라이브러리 제작

[0103] huAbF46 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 이용하여 huAbF46 항체의 scFv를 제작하기 위한 유전자를 디자인하였다. 각각의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 'VH-링커-VL'의 형태가 되도록 하고, 상기 링커는 'GLGGLGGGGSGGGSGGVGS' (서열번호 54)의 아미노산 서열을 가지고 디자인하였다. 이렇게 디자인된 huAbF46 항체의 scFv를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 55)를 바이오니아에 의뢰하여 합성하였으며, 이를 발현시키기 위한 벡터를 서열번호 56에 나타내었다.

[0104] 이후, 상기 벡터로부터 발현된 결과물을 분석하여, c-Met에 특이적인 결합력을 보임을 확인하였다.

[0105]

#### [0106] 실시예 5: 친화도 성숙(affinity maturation)을 위한 라이브러리 유전자의 제작

##### [0107] (1) 표적 CDR의 선정 및 프라이머 제작

[0108] huAbF46 항체의 친화도 성숙(affinity maturation)을 위하여 6개의 상보성 결정 부위(complementary determining region, CDR)을 상기 제작된 마우스 항체 AbF46으로부터 'Kabat numbering'에 의하여 정의하였으며, 각각의 CDR은 하기 표 1과 같다.

**표 1**

CDR	아미노산 서열
CDR-H1	DYYMS(서열번호 1)
CDR-H2	FIRNKANGYTTEYSASVKG(서열번호 2)
CDR-H3	DNWFAY(서열번호 3)
CDR-L1	KSSSQSLLASGNQNNYLA(서열번호 10)
CDR-L2	WASTRVS(서열번호 11)
CDR-L3	Q0SYSAPLT(서열번호 12)

[0110] 항체 CDR의 무작위 서열 도입을 위하여 다음과 같이 프라이머를 제작하였다. 기존의 무작위 서열 도입 방식은 돌연변이를 주고자 하는 부위에 동일한 비율의 염기 (25% A, 25% G, 25% C, 25% T)가 도입되도록 N 코돈을 이용하였으나, 본 실시예에서는 huAbF46 항체의 CDR에 무작위 염기를 도입하기 위하여, 각 CDR의 아미노산을 코딩하는 3개의 야생형(wild-type) 뉴클레오티드 중 첫번째와 두번째 뉴클레오티드의 85%는 그대로 보존하고, 나머지 3개의 염기를 각각 5%씩 도입하는 방식을 취하였다. 또한, 세 번째 뉴클레오티드는 동일하게(33% G, 33% C, 33% T)가 도입되도록 프라이머를 디자인하였다.

[0111]

##### [0112] (2) huAbF46 항체의 라이브러리 제작 및 c-Met에 대한 결합력 확인

[0113] CDR의 무작위 서열 도입을 통한 항체 라이브러리 유전자의 구축은 상기 (1)과 같은 방법으로 제작된 프라이머를

이용하여 수행되었다. 주형으로 huAbF46 항체의 scFv를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여, 도 1에 나타낸 방법과 같이 2개의 PCR 절편을 제작하고, 이를 중복 확장 중합효소연쇄반응(overlap extension PCR) 방법을 통하여, 원하는 CDR만 각각 돌연변이된 huAbF46 항체의 scFv 라이브러리 유전자를 확보하여 제작된 6개의 CDR을 각각 표적으로 하는 라이브러리들을 구축하였다.

[0114] 이렇게 제작된 라이브러리는 야생형과 각 라이브러리의 c-Met에 대한 결합력을 확인하였으며, 각각의 라이브러리는 야생형에 비하여 c-Met에 대한 결합력이 대부분 낮아지는 경향을 보였으나, 일부 c-Met에 대한 결합력이 유지되는 돌연변이들을 확인하였다.

#### [0115] 실시예 6: 제작된 라이브러리로부터 친화도가 개선된 항체의 선별

[0116] 상기 구축된 라이브러리로부터 c-Met에 대한 라이브러리의 결합력을 향상시킨 후, 각각의 개별 클론로부터 scFv의 유전자 서열을 분석하였다. 확보된 유전자 서열은 각각 하기 표 2와 같으며, 이를 IgG 형태로 변환하였다. 하기 클론 중에서, L3-1, L3-2, L3-3, L3-5으로부터 생산된 4종의 항체를 선별하여 후속 실험을 수행하였다.

### 표 2

클론 이름	도출된 라이브러리	CDR 서열
H11-4	CDR-H1	PEYYMS(서열번호 22)
YC151	CDR-H1	PDYYMS(서열번호 23)
YC193	CDR-H1	SDYYMS(서열번호 24)
YC244	CDR-H2	RNNANGNT(서열번호 25)
YC321	CDR-H2	RNKVNGYT(서열번호 26)
YC354	CDR-H3	DNWLSY(서열번호 27)
YC374	CDR-H3	DNWLTY(서열번호 28)
L1-1	CDR-L1	KSSHSLASGNQNNYLA(서열번호 29)
L1-3	CDR-L1	KSSRSLLSSGNHKNYLA(서열번호 30)
L1-4	CDR-L1	KSSKSLLASGNQNNYLA(서열번호 31)
L1-12	CDR-L1	KSSRSLLASGNQNNYLA(서열번호 32)
L1-22	CDR-L1	KSSHSLASGNQNNYLA(서열번호 33)
L2-9	CDR-L2	WASKRVS(서열번호 34)
L2-12	CDR-L2	WGSTRVS(서열번호 35)
L2-16	CDR-L2	WGSTRVP(서열번호 36)
L3-1	CDR-L3	QQSYSRPYT(서열번호 13)
L3-2	CDR-L3	GQSYSRPLT(서열번호 14)
L3-3	CDR-L3	AQSYSHPFS(서열번호 15)
L3-5	CDR-L3	QQSYSRPFT(서열번호 16)
L3-32	CDR-L3	QQSYSKPFT(서열번호 37)

#### [0118]

#### [0119] 실시예 7: 선별된 항체의 IgG로의 변환

[0120] 선별된 4종의 항체의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 'EcoRI-signal sequence-VH-NheI-CH-XhoI'(서열번호 38)로 구성되며, 중쇄의 경우 친화도 성숙 후에 항체의 아미노산이 변경되지 않았으므로, huAbF46 항체의 중쇄를 그대로 사용하였다. 다만, 힌지 영역(hinge region)은 인간 IgG1의 힌지가 아닌 U6-HC7 힌지(서열번호 57)로 치환하였다. 경쇄는 'EcoRI-signal sequence-VL-BsiWI-CL-XhoI'로 구성되도록 각각 디자인하여 유전자를 합성하였으며, 친화도 성숙 후에 선별된 상기 4종 항체의 경쇄 가변영역을 포함하여 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 58 내지 서열번호 61)를 바이오나이아에 의뢰하여 합성하였다. 이후, Invitrogen 사의 OptiCHO™ Antibody Express Kit (Cat no. 12762-019)에 포함되어 있는 pOptiVEC™-TOPO TA Cloning Kit에 상기 중쇄에 해당하는 염기서열을 갖는 DNA 절편(서열번호 38)을, pcDNA™ 3.3-TOPO TA Cloning Kit(Cat no. 8300-01)에 상기 경쇄에 해당하는 염기서열을 갖는 DNA 절편(L3-1 유래 CDR-L3를 포함하는 DNA 절편: 서열번호 58, L3-2 유래 CDR-L3를 포함하는 DNA 절편: 서열번호 59, L3-3 유래 CDR-L3를 포함하는 DNA 절편: 서열번호 60, L3-5 유래

CDR-L3를 포함하는 DNA 절편: 서열번호 61)을 각각 EcoRI(NEB, R0101S)과 XhoI(NEB, R0146S) 제한 효소를 사용하여, 클로닝함으로써, 친화력 성숙된 항체의 발현을 위한 벡터를 구축하였다.

[0121] 상기 구축된 벡터는 각각 Qiagen Maxiprep kit (Cat no. 12662)을 이용하여 증폭되었으며, 상기 중쇄를 포함하는 벡터 및 경쇄를 포함하는 벡터는 4:1의 비율(80 ug:20 ug)로 293T 세포( $2.5 \times 10^7$ )에 2M CaCl<sub>2</sub>를 360 uL 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

[0122] 상기 배양된 세포를 원심분리하여 상등액 각 100 mL을 취하고, AKTA Prime (GE healthcare)를 이용하여 정제하였다. AKTA Prime에 Protein A 컬럼(GE healthcare, 17-0405-03)을 설치하고 배양액을 5 mL/min의 유속으로 흘려준 후, IgG elution buffer(Thermo Scientific, 21004)로 용출하였다. 이를 PBS buffer로 교환하여 최종적으로 친화력 성숙된 4종의 항체(이하, huAbF46-H4-A1, huAbF46-H4-A2, huAbF46-H4-A3, huAbF46-H4-A5로 명명함)를 정제하였다.

[0123]

#### 실시예 8: 선별된 항체의 결합 친화도 분석

[0125] 상기 실시예 7에서 제작된 4종의 항체의 c-Met 항원에 대한 친화력을 Biacore(GE healthcare)를 사용하여 측정하였다. CM5 칩 상에 각각의 항체를 약 80~110RU만큼 고정시킨 후, 항원인 인간 c-Met 단백질을 100 nM부터 0.39 nM까지의 농도 범위 내에서 서로 다른 9개의 농도로 30 uL/min의 속도로 주입하여, 하기 표 3과 같이 k<sub>on</sub> 값과 k<sub>off</sub> 값을 구하고, 이로부터 K<sub>D</sub> 값을 계산하였다. huAbF46은 c-Met 항원에 대하여 약 2.19 nM의 결합력을 보였으며, 친화도가 개선된 4종의 항체는 0.06 nM 내지 0.50 nM 범위의 결합력을 보였다(표 3). 이는 scFv 형태에서 친화도가 개선된 항체들이 IgG 변환 후에도 최소 5배에서 최대 약 37배까지 친화도가 향상되었음을 보여준다.

#### 표 3

항체	k <sub>on</sub> (1/Ms)	k <sub>off</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (nM)
huAbF46	$3.29 \times 10^5$	$7.23 \times 10^{-4}$	2.19
huAbF46-H4-A1	$7.39 \times 10^5$	$4.53 \times 10^{-5}$	0.06
huAbF46-H4-A2	$5.02 \times 10^5$	$2.53 \times 10^{-4}$	0.50
huAbF46-H4-A3	$4.19 \times 10^5$	$1.43 \times 10^{-4}$	0.34
huAbF46-H4-A5	$5.72 \times 10^5$	$2.40 \times 10^{-4}$	0.42

[0126]

#### 실시예 9: 선별된 친화도 개선 항체의 인 비트로(in vitro) 생물학적 활성 분석

##### (1) BrdU assay

[0127] 친화도가 개선된 항체들에 있어서 안전성에 취약점이 있는지 여부를 확인하기 위해 BrdU assay를 수행하였다. 인간 폐암 세포인 NCI-H441 세포(ATCC Cat.# HTB-174)를 RPMI 1640 배지(Gibco)에  $2 \times 10^5$  세포/mL로 혼탁하여 혼탁액을 100 uL씩 96-well tissue culture plate (Corning, Lowell, MA)에 분주하였다. 24시간 동안 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양하고, 배지를 완전히 제거한 후에 항체를 희석한 RPMI 1640 배지로 교체하였다. 21시간 동안 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양한 후, 5-브로모-2'-디옥시우리딘(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)을 첨가하고 3시간을 추가로 배양한 뒤에 BrdU assay (Roche, Indianapolis, IN)를 수행하였다. 세포를 플레이트 상에서 denaturation/fixation한 후에 항-BrdU 항체를 넣고 1시간 후에 기질을 첨가하여 370 nm에서 ELISA spectraMax reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 발색반응을 측정하였다. 비교 대상은 마우스 AbF46 항체의 작용성을 기준으로 하였다. 음성 대조군으로는 마우스의 IgG를 사용하였으며, 작용제(agonist)로 잘 알려진 5D5 항체(ATCC Cat. # HB11895 하이브리도마 세포에서 분리 정제)를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0128]

[0129] 그 결과, 도 2에서 보는 바와 같이, 상기 제작된 4종의 친화도 개선 항체 중 3종에서 작용성(agonism)의 부작용이 감소되는 것으로 나타나, 안전성이 개선된 것으로 나타났다(10 ug/mL의 처리 농도에서 각각 huAbF46-H4-A1

25%, huAbF46-H4-A2 28%, huAbF46-H4-A3 13%, huAbF46-H4-A5 21% 개선됨).

#### [0131] (2) 인 비트로(*in vitro*) 세포증식 분석법

[0132] 상기 실시예 5에서 제작된 4종의 친화도 개선 항체의 암세포 증식 억제에 의한 항암 효과를 확인하기 위하여, c-Met 분자를 세포 표면에 발현하는 MKN45 위암 세포(일본 암연구 세포주 은행, Japanese Cancer Research Bank, JCRB, Tokyo, Japan)를 이용한 인 비트로(*in vitro*) 세포증식 분석법을 수행하였다.

[0133] 96-웰 플레이트에 웰당  $1 \times 10^4$ 개의 MKN45 세포를  $50 \mu\text{l}$ 의 5% FBS/DMEM 배양액과 분주하고, 상기 제작된 항체 4종을 처리하지 않거나, 0.008, 0.04, 0.2 또는  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로  $50 \mu\text{l}$ 를 처리한 후, 72시간 동안 배양한 다음, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega, G7570)를 사용하여 luminometer (PerkinElmer, 2104 Multilabel reader)로 세포의 수를 정량하였다.

[0134] 도 3에 나타난 바와 같이, 실험 농도 중 최저 농도인  $0.008 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 친화도 개선 전 항체(huAbF46)의 상대적 세포 생존률이 77%이며, 친화도가 개선된 항체 huAbF46-H4-A1, huAbF46-H4-A2, 및 huAbF46-H4-A5는 각각 74, 73, 72%로 효능이 비슷하며, huAbF46-H4-A3는 66%로 효능이 확연히 증대됨을 관찰하였다. 또한, 최대 효능을 보이는  $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 상기 항체 4종 모두가 5D5 항체의 생존률인 53% 이하의 수치를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 친화도 개선 결과, 대조군에 비해 효능과 안전성에서 확연히 개선됨을 확인할 수 있었다.

#### [0135] (3) Akt 인산화

[0136] Akt에 의해 조절되는 세포 작용들은 세포 증식, 세포 생존, 세포 크기 조절, 가용 영양분에 대한 반응성, 중간 대사과정, 혈관신생(angiogenesis), 조직침해(tissue invasion) 등을 포함한다. 이 모든 과정들은 암의 특징을 대표하는 것으로 수 많은 종양 발생 단백질(oncoprotein)과 종양 발생 억제물질(tumor suppressor)은 Akt 경로 상에서 상호 교차적으로 영향을 미치며, 신호전달과 고전적인 대사조절의 연결점에서 세포의 작용을 미세하게 조절하는 기능을 수행한다. 따라서, 이 Akt의 활성형인 인산화된 Akt의 정도가 높을수록 암세포가 더욱 활성형인 것으로 판단할 수 있다. 본 실시예에서는 친화도가 개선된 4종의 항체가 Akt의 인산화를 얼마나 저해할 수 있는지를 실험하였다.

[0137] 상기 실시예 5에서 제작된 4종의 친화도 개선 항체의 작용성(agonism) 정도를 비교하기 위하여, Caki-1 세포(한국 세포주 은행)를 사용하여, Akt 단백질의 인산화 정도를 확인하였다. 음성 대조군으로는 마우스의 IgG를 사용하였으며, 작용제(agonist)로 잘 알려진 5D5 항체를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0138]  $2 \times 10^5$  세포/ $\text{ml}$ 의 Caki-1 세포를 96-웰 플레이트에 분주한 후, 24시간 후에 무혈청 상태에서 각각  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체를 30분 동안 처리하였다. 항체가 처리된 세포를 용해(lysis)시키고 PathScan phospho-AKT1 (Ser473) chemiluminescent Sandwich ELISA kit (Cell Signaling, cat.no #7134S)를 이용하여 Akt 인산화 정도를 측정한 후 분석하였다.

[0139] 도 4에서 보는 바와 같이, 4종의 항체 모두 친화도 개선 전보다 Akt의 인산화를 더욱 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, huAbF46-H4-A1, huAbF46-H4-A2는 친화도 개선 전의 49%의 저해도를 보이는 것으로 나타나, 안전성 측면에서 확연히 개선된 것을 확인할 수 있었다.

#### [0140] (4) c-Met의 분해 정도 확인

[0141] 상기 실시예 5에서 제작된 4종의 친화도 개선 항체의 항암 효능을 확인하기 위하여, 항체와 결합된 c-Met 단백질의 분해 정도를 확인하였다. 이는 상대적인 총 c-Met량은 항체가 c-Met에 결합하여 내재화를 일으켜 c-Met의 분해(degradation)가 일어나는 것을 이용하여, 총 c-Met 양의 증감을 파악하여 항체의 효능을 검사하는 것이다.

[0142]  $2 \times 10^5$  cells/ $\text{ml}$  MKN45 세포와  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체를 96-웰 플레이트에 동시에 뿌려준 후, 24시간 동안 배양하였다. 이후, 항체가 처리된 세포를 용해(lysis)시키고 Human total HGF R/c-MET ELISA KIT (R&D systems, DYC358)를 이용하여 총 c-Met 양의 변화를 측정한 후 분석하였다.

[0143] 그 결과, 도 5에서 보는 바와 같이, 4종의 친화도 개선 항체는 모두 huAbF46 항체에 비하여 c-Met 분해 정도가

증가함을 확인할 수 있었다. huAbF46-H4-A1는 huAbF46에 비하여 약 37% 정도 c-Met 분해 정도가 증가하였으며, huAbF46-H4-A2, huAbF46-H4-A3 및 huAbF46-H4-A5는 약 28% 정도 c-Met 분해 정도가 증가한 것을 확인하였다.

[0144] **실시예 10: 선별된 친화도 개선 항체의 인 비보(*in vivo*) 생물학적 활성 분석**

상기 실시예 5에서 제작된 4종의 친화도 개선 항체의 항암 효능 개선 여부를 확인하기 위하여, U87MG 뇌암 세포(한국 세포주 은행) 또는 MKN45 위암 세포(일본 암연구 세포주 은행, Japanese Cancer Research Bank, JCRB, Tokyo, Japan)를 투여한 이종 이식 뇌암 또는 위암 마우스 동물 모델을 대상으로 인 비보(*in vivo*)에서 4종의 친화도 개선 항체의 투여에 의하여 종양의 크기가 감소되는지 여부를 확인하였다.

[0146] 마우스 동물 모델은  $5 \times 10^6$  개의 U87MG 뇌암 세포 또는 MKN45 위암 세포  $50 \mu\text{l}$ 를 6주령의 웅성 BALB/C 누드 마우스(주) 오리엔트 바이오)에 피하주사하여 1주 경과 후에 암이 발생되는 마우스를 각 그룹당 12마리씩을 무작위 선별하여 실험에 사용하였다. 4종의 친화도 개선 항체는 암세포가 생성되고 정맥주사에 의해 10 mg/kg의 농도만큼 주 1회 마우스에 투여하였다. 또한, 대조군으로 마우스 AbF46 항체는 복강주사에 의해 10 mg/kg과 20 mg/kg의 농도로 주 2회 투여하였다.

[0147] 도 6a 및 도 6b에서 나타낸 바와 같이, U87MG 뇌암 또는 MKN45 위암 마우스 동물 모델에서 두 항체 모두 확연한 종양 성장 억제 효능을 보였으며, 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

[0148] **실시예 11: 불변영역 및/또는 힌지영역이 치환된 huAbF46-H4-A1의 제조**

선별된 4종의 항체 중에서, c-Met과의 결합친화도가 가장 높고, Akt 인산화 및 c-Met 분해 정도가 가장 낮은 것으로 측정된 huAbF46-H4-A1을 대상으로, 힌지영역 또는 불변영역 및 힌지영역이 치환된 항체를 제작하였다.

[0150] huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, U6-HC7 힌지 및 인간의 IgG1 불변영역으로 이루어진 중쇄 및 huAbF46-H4-A1의 경쇄 가변영역 및 인간의 카파(kappa) 불변영역으로 이루어진 경쇄로 이루어진 항체를 huAbF46-H4-A1(U6-HC7)으로, huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, 인간의 IgG2 힌지 및 인간의 IgG1 불변영역으로 이루어진 중쇄 및 huAbF46-H4-A1의 경쇄 가변영역 및 인간의 카파 불변영역으로 이루어진 경쇄로 이루어진 항체를 huAbF46-H4-A1(IgG2 hinge)로, huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, 인간의 IgG2 힌지 및 인간의 IgG2 불변영역으로 이루어진 중쇄 및 huAbF46-H4-A1의 경쇄 가변영역 및 인간의 카파 불변영역으로 이루어진 경쇄로 이루어진 항체를 huAbF46-H4-A1(IgG2 Fc)로 명명하였다. 또한, 한편, 상기 3종의 항체는 생산량 증대를 위하여 인간의 카파 불변영역으로 이루어진 경쇄의 36번 히스티딘(histidine)을 모두 티로신(tyrosine)으로 치환하였다.

[0151] 상기 3종 항체를 제작하기 위해, huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, U6-HC7 힌지 및 인간의 IgG1 불변영역으로 이루어진 폴리펩티드(서열번호 62)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 63), huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, 인간의 IgG2 힌지 및 인간의 IgG1 불변영역으로 이루어진 폴리펩티드(서열번호 64)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 65), huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, 인간의 IgG2 힌지 및 인간의 IgG2 불변영역으로 이루어진 폴리펩티드(서열번호 66)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 67), 36번 히스티딘이 티로신으로 치환된 huAbF46-H4-A1의 경쇄 가변영역 및 인간의 카파 불변영역으로 이루어진 폴리펩티드(서열번호 68)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 69)를 바이오니아에 의뢰하여 합성하였다. 이후, Invitrogen 사의 OptiCHO™ Antibody Express Kit (Cat no. 12762-019)에 포함되어 있는 pOptiVEC™-TOPO TA Cloning Kit에 상기 중쇄에 해당하는 염기서열을 갖는 DNA 절편을, pcDNA™3.3-TOPO TA Cloning Kit(Cat no. 8300-01)에 상기 경쇄에 해당하는 염기서열을 갖는 DNA 절편을 삽입하여, 상기 항체의 발현을 위한 벡터를 구축하였다.

[0152] 상기 구축된 벡터는 각각 Qiagen Maxiprep kit (Cat no. 12662)을 이용하여 증폭되었으며, 상기 중쇄를 포함하는 벡터 및 경쇄를 포함하는 벡터는 4:1의 비율(80 ug:20 ug)로 293T 세포( $2.5 \times 10^7$ )에 2M CaCl<sub>2</sub>를 360 uL 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

[0153] 상기 배양된 세포를 원심분리하여 상등액 각 100 mL을 취하고, AKTA Prime (GE healthcare)를 이용하여 정제하였다. AKTA Prime에 Protein A 컬럼(GE healthcare, 17-0405-03)을 설치하고 배양액을 5 mL/min의 유속으로 흘

려준 후, IgG elution buffer(Thermo Scientific, 21004)로 용출하였다. 이를 PBS buffer로 교환하여 최종적으로 3종의 항체(huAbF46-H4-A1(U6-HC7), huAbF46-H4-A1(IgG2 hinge), huAbF46-H4-A1(IgG2 Fc))를 정제하였다.

[0154] 실시예 12: 불변영역 및/또는 헌지영역이 치환된 huAbF46-H4-A1의 인 비트로(*in vitro*) 생물학적 활성 분석

#### [0155] (1) 인 비트로(*in vitro*) 세포증식 분석법

[0156] 상기 실시예 11에서 제작된 3종 항체의 암세포 증식 억제에 의한 항암 효과를 확인하기 위하여, c-Met 분자를 세포 표면에 발현하는 MKN45 위암 세포(일본 암연구 세포주 은행, Japanese Cancer Research Bank, JCRB, Tokyo, Japan)를 이용한 인 비트로(*in vitro*) 세포증식 분석법을 수행하였다.

[0157] 96-웰 플레이트에 웰당  $1 \times 10^4$ 개의 MKN45 세포를  $50 \mu\text{l}$ 의 5% FBS/DMEM 배양액과 분주하고, 상기 제작된 항체 3종을 처리하지 않거나, 0.008, 0.04, 0.2 또는  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로  $50 \mu\text{l}$ 를 처리한 후, 72시간 동안 배양한 다음, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega, G7570)를 사용하여 luminescrometer (PerkinElmer, 2104 Multilabel reader)로 세포의 수를 정량하였다.

[0158] 도 7에 나타난 바와 같이, 상기 3종의 항체 huAbF46-H4-A1(U6-HC7), huAbF46-H4-A1(IgG2 hinge), huAbF46-H4-A1(IgG2 Fc)는  $0.04 \mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도로 처리하였을 때, 약 60% 정도의 수치를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

#### [0159] (2) Akt 인산화

[0160] 상기 실시예 11에서 제작된 3종의 친화도 개선 항체의 작용성 정도를 비교하기 위하여, Caki-1 세포(한국 세포주 은행)를 사용하여, Akt 단백질의 인산화 정도를 확인하였다. 음성 대조군으로는 마우스의 IgG를 사용하였으며, 작용제(agonist)로 잘 알려진 5D5 항체를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0161]  $2 \times 10^5$  세포/ $\text{ml}$ 의 Caki-1 세포를 96-웰 플레이트에 분주한 후, 24시간 후에 무혈청 상태에서 각각  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체를 30분 동안 처리하였다. 항체가 처리된 세포를 용해시키고 PathScan phospho-AKT1 (Ser473) chemiluminescent Sandwich ELISA kit (Cell Signaling, cat.no #7134S)를 이용하여 Akt 인산화 정도를 측정한 후 분석하였다.

[0162] 도 8에서 보는 바와 같이, 3종의 항체 모두 18% 이하의 저해도를 보이는 것으로 나타나, 안전성 측면에서 확연히 개선된 것을 확인할 수 있었다.

#### [0163] (3) c-Met의 분해 정도 확인

[0164] 상기 실시예 11에서 제작된 3종의 친화도 개선 항체의 항암 효능을 확인하기 위하여, 항체와 결합된 c-Met 단백질의 분해 정도를 확인하였다.  $2 \times 10^5$  cells/ $\text{ml}$  MKN45 세포와  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체를 96-웰 플레이트에 동시에 뿐 려준 후, 24시간 동안 배양하였다. 이후, 항체가 처리된 세포를 용해시키고 Human total HGF R/c-MET ELISA KIT (R&D systems, DYC358)를 이용하여 총 c-Met 양의 변화를 측정한 후 분석하였다.

[0165] 그 결과, 도 9에서 보는 바와 같이, 3종의 항체는 모두 huAbF46 항체에 비하여 c-Met 분해 정도가 증가함을 확인할 수 있었다.

[0166] 실시예 13: 불변영역 및/또는 헌지영역이 치환된 huAbF46-H4-A1의 인 비보(*in vivo*) 생물학적 활성 분석

[0167] 상기 실시예 11에서 제작된 3종 항체의 항암 효능 개선 여부를 확인하기 위하여, U87MG 뇌암 세포(한국 세포주 은행) 또는 MKN45 위암 세포(일본 암연구 세포주 은행, Japanese Cancer Research Bank, JCRB, Tokyo, Japan)를 투여한 이종 이식 뇌암 또는 위암 마우스 동물 모델을 대상으로 인 비보(*in vivo*)에서 3종 항체의 투여에 의하여 종양의 크기가 감소되는지 여부를 확인하였다.

[0168] 마우스 동물 모델은  $5 \times 10^6$ 개의 U87MG 뇌암 세포 또는 MKN45 위암 세포  $50 \mu\text{l}$ 를 6주령의 웅성 BALB/C 누드 마

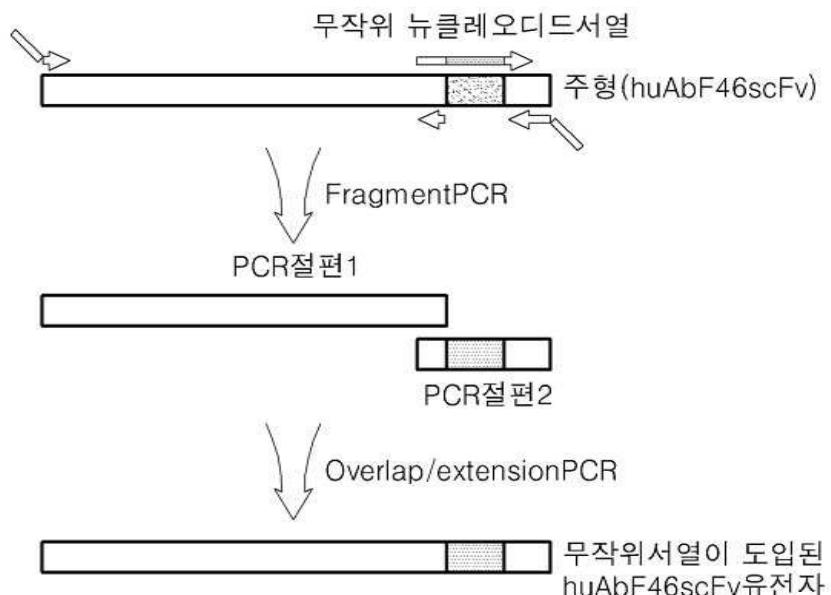
우스(주) 오리엔트 바이오)에 피하주사하여 1주 경과 후에 암이 발생되는 마우스를 각 그룹당 12마리씩을 무작위 선별하여 실험에 사용하였다. 3종 항체는 암세포가 생성되고 정맥주사에 의해 10 mg/kg의 농도만큼 주 1회 마우스에 투여하였다. 또한, 대조군으로 마우스 AbF46 항체는 복강주사에 의해 10 mg/kg과 20 mg/kg의 농도로 주 2회 투여하였다.

[0169]

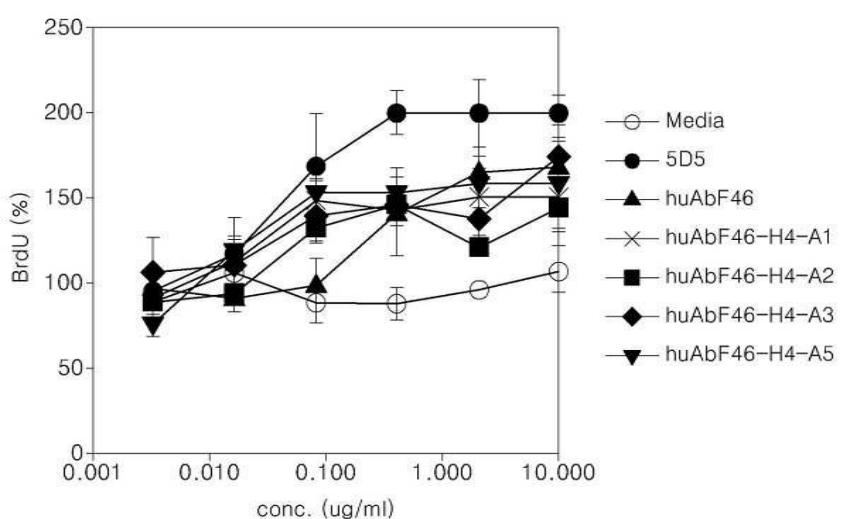
도 10a 및 도 10b에서 나타낸 바와 같이, U87MG 뇌암 또는 MKN45 위암 마우스 동물 모델에서 두 항체 모두 확인한 종양 성장 억제 효능을 보였으며, 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

## 도면

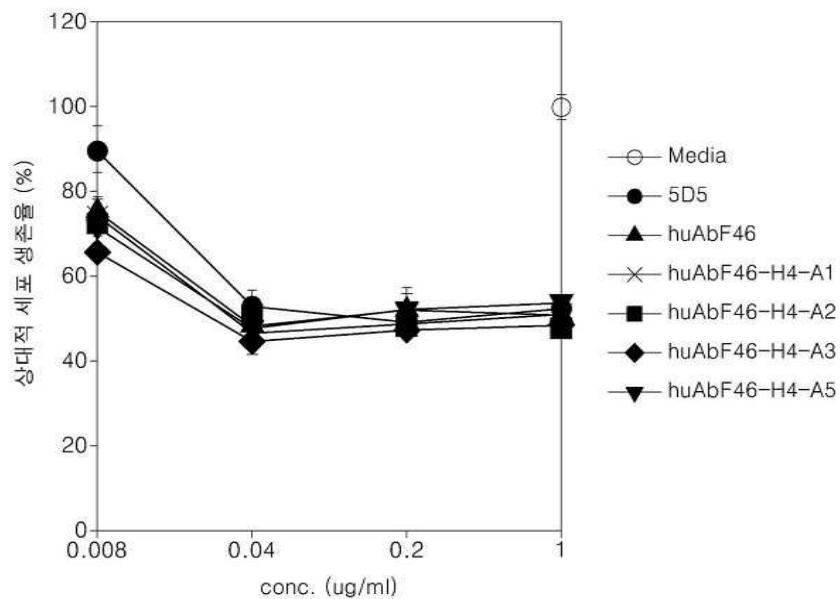
### 도면1



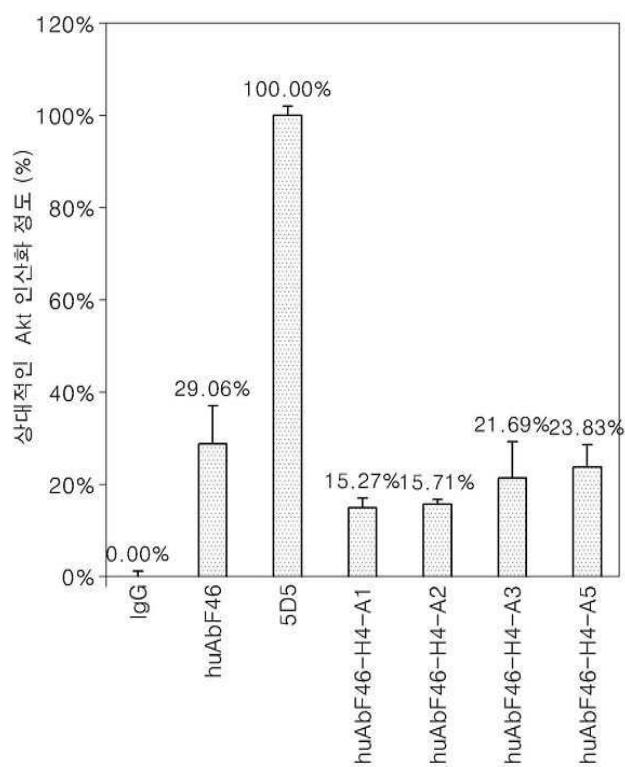
### 도면2



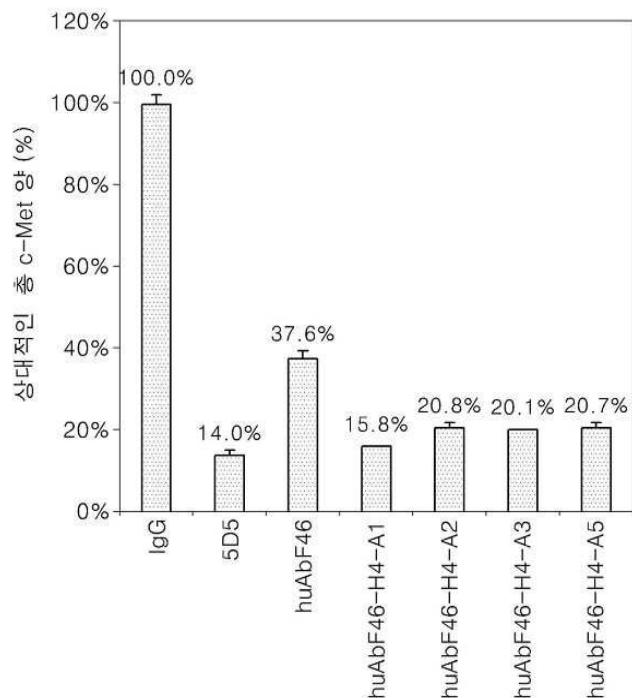
도면3



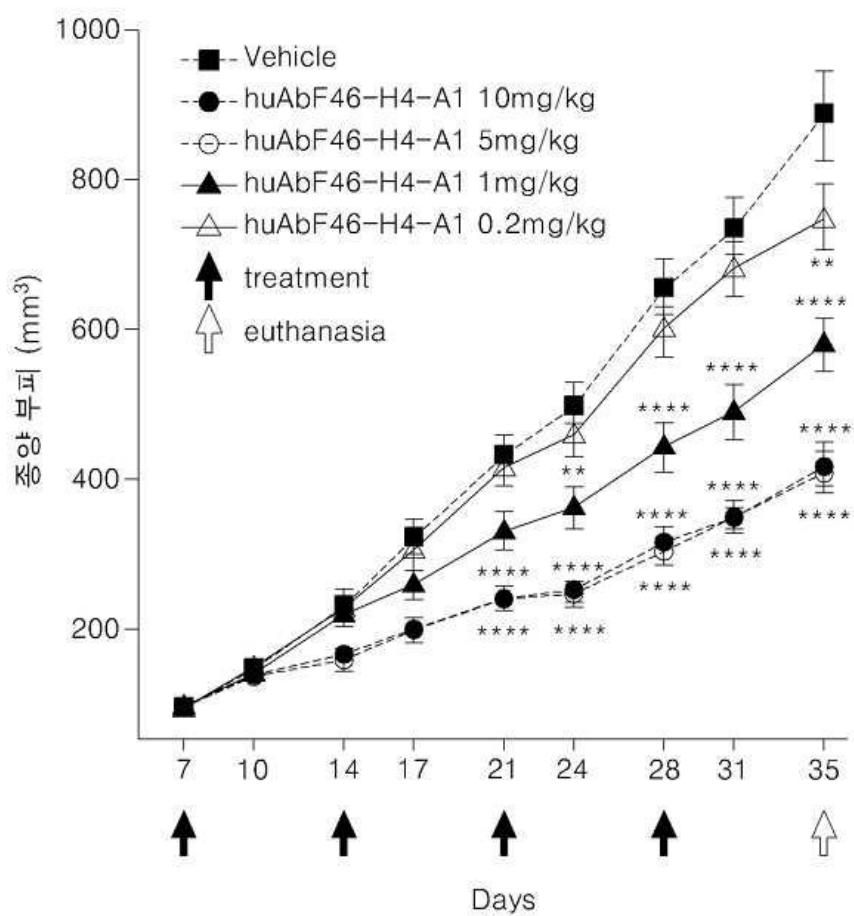
도면4



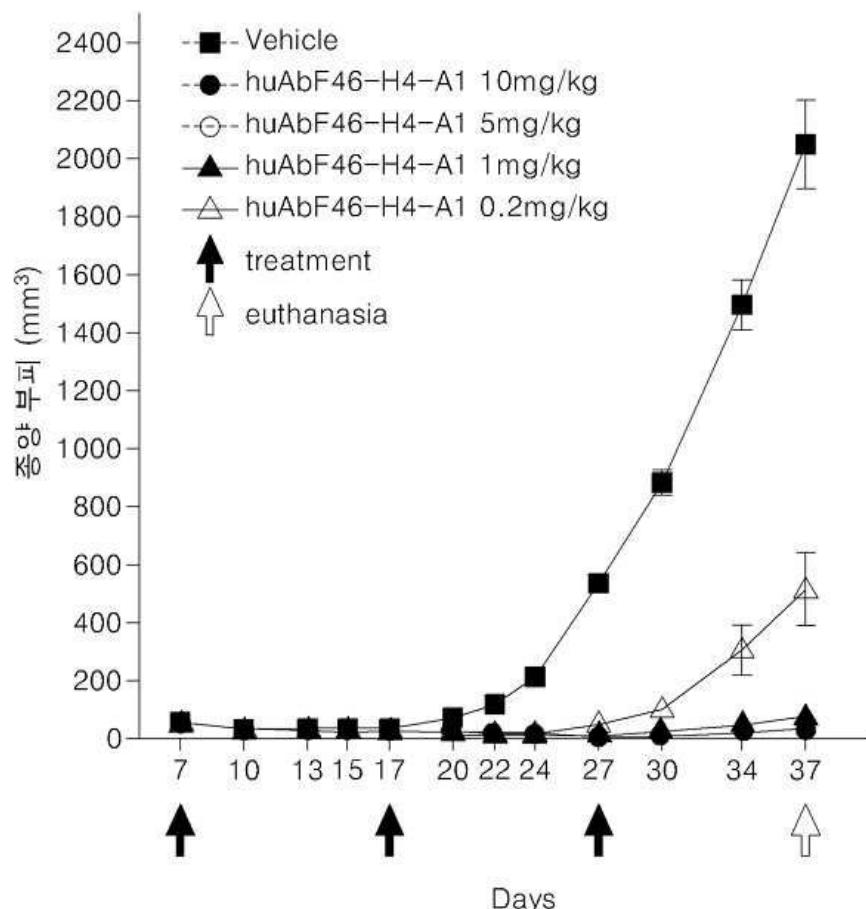
도면5



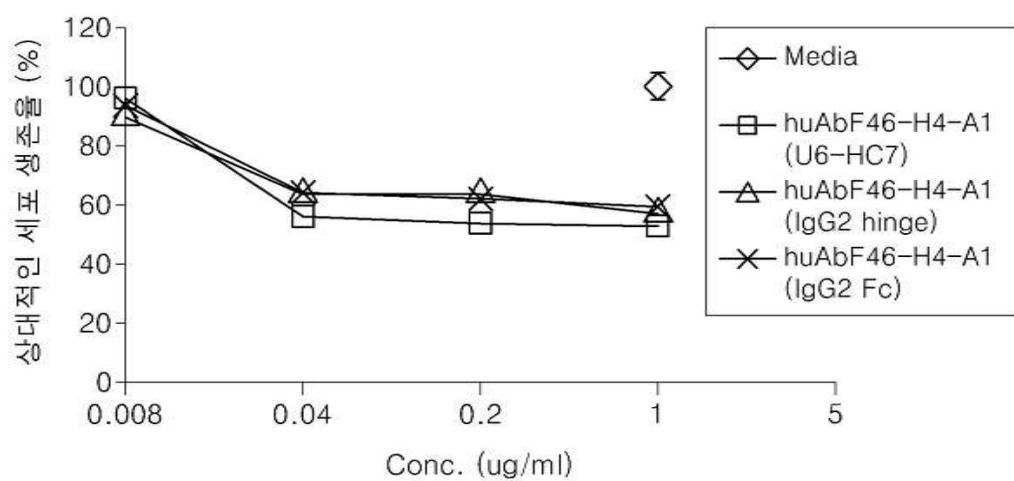
도면6a



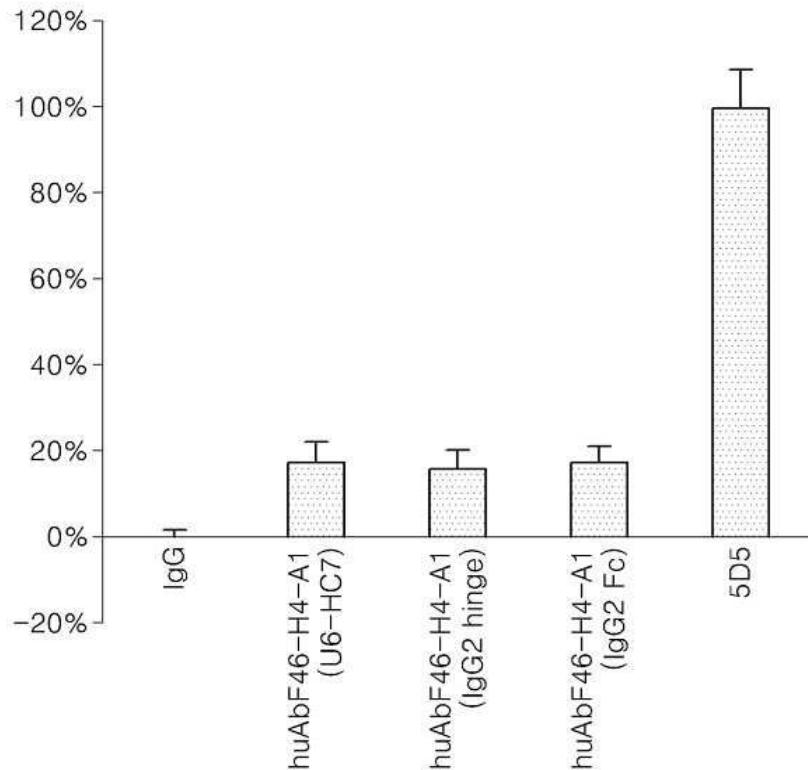
도면6b



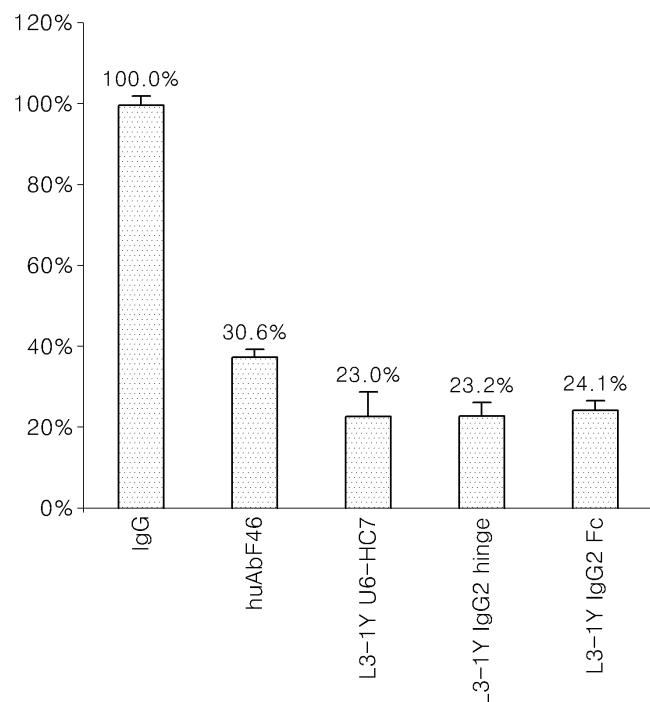
도면7



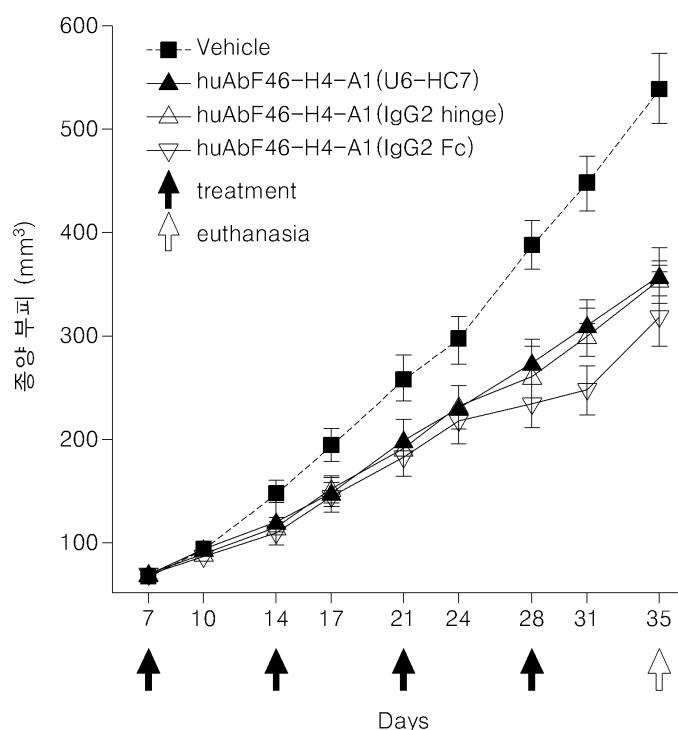
## 도면8



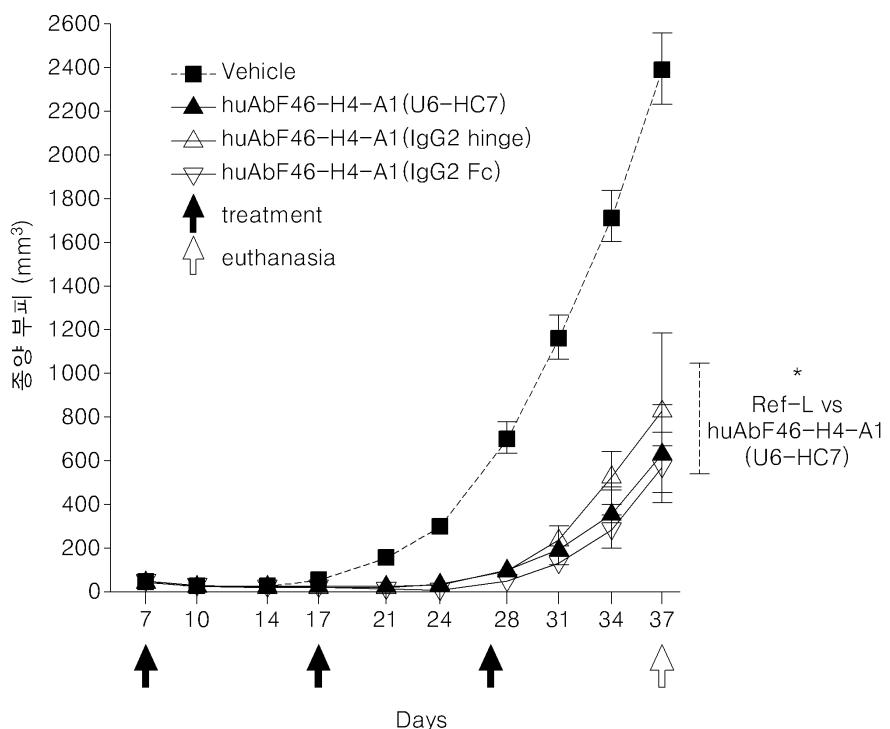
## 도면9



도면10a



도면10b



## 서 열 목 록

- <110> Samsung Electronics Co. Ltd  
 <120> Anti c-Met antibody and uses thereof  
 <130> PN096419

<150> KR2011-101293

<151> 2011-10-05

<160> 70

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain CDR1 of AbF46

<400> 1

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain CDR2 of AbF46

<400> 2

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain CDR3 of AbF46

<400> 3

Asp Asn Trp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain CDR1 of c-Met antibody

<220><221> UNSURE

<222> (1)

<223> X is Pro or Ser

<220><221> UNSURE

<222> (2)

<223> X is Glu or Asp

<400> 4

Xaa Xaa Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain CDR2 of c-Met antibody

<220><221> UNSURE

<222> (3)

<223> X is Asn or Lys

<220><221> UNSURE

<222> (4)

<223> X is Ala or Val

<220><221> UNSURE

<222> (7)

<223> X is Asn or Thr

<400> 5

Ala Asn Xaa Xaa Asn Gly Xaa Thr

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain CDR3 of c-Met antibody

<220><221> UNSURE

<222> (5)

<223> X is Ser or Thr

<400> 6

Asp Asn Trp Leu Xaa Tyr

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain CDR1 of c-Met antibody

<220><221> UNSURE

<222> (4)

<223> X is His, Arg, Gln or Lys

<220><221> UNSURE

<222> (12)

<223> X is His or Gln

<220><221> UNSURE

<222> (13)

<223> X is Lys or Asn

<

400> 7

Lys Ser Ser Xaa Ser Leu Leu Ala Ser Gly Asn Xaa Xaa Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain CDR2 of c-Met antibody

<220><221> UNSURE

<222> (2)

<223> X is Ala or Gly

<220><221> UNSURE

<222> (4)

<223> X is Thr or Lys

<220><221> UNSURE

<222> (7)

<223> X is Ser or Pro

<400> 8

Trp Xaa Ser Xaa Arg Val Xaa

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain CDR3 of c-Met antibody

<220><221> UNSURE

<222> (1)

<223> X is Gly, Ala or Gln

<220><221> UNSURE

<222> (6)

<223> X is Arg, His, Ser, Ala, Gly or Lys

<220><221> UNSURE

<222> (8)

<223> X is Leu, Tyr, Phe or Met

<400> 9

Xaa Gln Ser Tyr Ser Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain CDR1 of AbF46

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> light chain CDR2 of AbF46  
<400> 11

Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser

1	5
---	---

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> light chain CDR3 of AbF46

<400> 12  
Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Leu Thr

1	5
---	---

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 derived from L3-1 clone  
<400> 13

Gln Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Tyr Thr

1	5
---	---

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 derived from L3-2 clone  
<400> 14

Gly Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Leu Thr

1	5
---	---

<210

> 15

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR-L3 derived from L3-3 clone  
<400> 15

Ala Gln Ser Tyr Ser His Pro Phe Ser

1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR-L3 derived from L3-5 clone  
<400> 16

Gln Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Phe Thr

1 5

<210> 17  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> heavy chain variable region of anti c-Met humanized

antibody(huAbF46-H4)

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val 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 Thr Asp Tyr  
20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Glu Tyr Ser Ala  
50 55 60

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

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

85	90	95
Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
100	105	110
Val Thr Val Ser Ser		

115	118	121
<210> 18	<211> 114	<212> PRT
<213> Artificial Sequence		

&lt;220&gt;&lt;223&gt;

light chain variable region of anti c-Met humanized  
antibody(huAbF46-H4)

<400> 18	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser		
20 25 30		
Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Lys		
35 40 45		
Ala Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val		

50 55 60	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
85 90 95		
Ser Tyr Ser Arg Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile		
100 105 110		
Lys Arg		

<210> 19	<211> 114	<212> PRT
<213> Artificial Sequence		

<220><223> light chain variable region of anti c-Met humanized antibody(huAbF46-H4)

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser

20	25	30
----	----	----

Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35	40	45
----	----	----

Ala Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val

50	55	60
----	----	----

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln

85	90	95
----	----	----

Ser Tyr Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100	105	110
-----	-----	-----

Lys Arg

<210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region of anti c-Met humanized antibody(huAbF46-H4)

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser

20	25	30
----	----	----

Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35	40	45
----	----	----

Ala Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val

50	55	60	
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln			
85	90	95	
Ser Tyr Ser His Pro Phe Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
100	105	110	
Lys Arg			

<code>&lt;210&gt;</code>	21	
<code>&lt;211&gt;</code>	114	
<code>&lt;212&gt;</code>	PRT	
<code>&lt;213&gt;</code>	Artificial Sequence	

`<220><223>` light chain variable region of anti c-Met humanized

antibody(huAbF46-H4)

<code>&lt;400&gt;</code>	21		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser			
20	25	30	
Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Lys			
35	40	45	
Ala Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val			

50	55	60	
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
85	90	95	
Ser Tyr Ser Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
100	105	110	
Lys Arg			

<210> 22  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 derived from H11-4 clone

<400> 22  
Pro Glu Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 23  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 derived from YC151 clone

<400> 23  
Pro Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 24  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 derived from YC193 clone

<400> 24  
Ser Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 25  
<211> 8

<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 derived from YC244 clone

<400> 25  
Arg Asn Asn Ala Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 26  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR-H2 derived from YC321 clone  
<400> 26

Arg Asn Lys Val Asn Gly Tyr Thr

1	5
---	---

<210> 27  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR-H3 derived from YC354 clone  
<400> 27

Asp Asn Trp Leu Ser Tyr

1	5
---	---

<210> 28  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR-H3 derived from YC374 clone  
<400> 28

Asp Asn Trp Leu Thr Tyr

1	5
---	---

<210> 29  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR-L1 derived from L1-1 clone  
<400> 29

Lys Ser Ser His Ser Leu Leu Ala Ser Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 30  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 derived from L1-3 clone

<400> 30

Lys Ser Ser Arg Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn His Lys Asn Tyr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 31  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 derived from L1-4 clone

<400> 31

Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu Ala Ser Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 32  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 derived from L1-12 clone

<400> 32

Lys Ser Ser Arg Ser Leu Leu Ala Ser Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 33  
<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 derived from L1-22 clone

<400> 33

Lys Ser Ser His Ser Leu Leu Ala Ser Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2 derived from L2-9 clone

<400> 34

Trp Ala Ser Lys Arg Val Ser

1	5		
---	---	--	--

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2 derived from L2-12 clone

<400> 35

Trp Gly Ser Thr Arg Val Ser

1	5		
---	---	--	--

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2 derived from L2-16 clone

<400> 36

Trp Gly Ser Thr Arg Val Pro

1	5		
---	---	--	--

<210> 37

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR-L3 derived from L3-32 clone  
<400> 37

Gln Gln Ser Tyr Ser Lys Pro Phe Thr

1 5

<210> 38  
<211> 1416  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of heavy chain of chAbF46

<220><221> misc\_feature  
<222> (1)..(6)  
<223> EcoRI restriction site

<220><221>

> misc\_feature  
<222> (7)..(66)  
<223> signal sequence

<220><221> misc\_feature  
<222> (67)..(417)

<223> VH - heavy chain variable region  
<220><221> misc\_feature

<222> (418)..(423)  
<223> NdeI restriction site

<220><221> misc\_feature  
<222> (418)..(1407)

<223> CH - heavy chain constant region

<220><221> misc\_feature  
<222> (1408)..(1410)  
<223> TGA - stop codon  
<220><221> misc\_feature  
<222> (1411)..(1416)  
<223> XhoI restriction site

&lt;400&gt; 38

gaattcgccg ccaccatgga atggagctgg gttttctcg taacacttt aaatggtac	60
cagtgtgagg tgaagctggt ggagtctgga ggaggcttgg tacagcctgg gggttctctg	120
agactctcct gtgcaacttc tgggttcacc ttcaactgatt actacatgag ctgggtccgc	180
cagcctccag gaaaggcact tgagtggtg ggtttattta gaaacaaagc taatggttac	240
acaacagagt acagtgcata tgtgaagggt cggtcacca tctccagaga taattccaa	300
agcatcctct atcttcaa at ggacaccctg agagctgagg acagtgccac ttattactgt	360
gcaagagata actggttgc ttactgggc caagggactc tggtaactgt ctctgcagct	420

agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctggggc	480
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcggt	540
aactcagggcg ccctgaccag cggcgtgeac accttcccg ctgtccata gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	660
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagaaaat tgagccaaa	720
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccagcac ctgaactctt gggggaccg	780
tcagtcttcc tttcccccc aaaacccaag gacaccctca tggtaactt gaccctgag	840

gtcacatgct tgggtgggaa cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggta	900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020
tacaagt gca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaa	1080
gccaaaagggc agcccccaga accacagggtg tacaccctgc cccatcccg ggaggagatg	1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc	1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1260

gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccc tggacaagag caggtggcag	1320
cagggaaacg tcttctcatg ctccgtgtatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1380
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga ctgcag	1416

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 759

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; nucleotide sequence of light chain of chAbF46

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_difference

&lt;222&gt; (1)..(6)

<223> EcoRI restriction site

<220><221> misc\_difference

<222> (7)..(90)

<223> signal sequence

<220><221> misc\_difference

<222> (91)..(432)

<223> VL - light chain variable region

<220><221> misc\_difference

<222> (430)..(435)

<223> BsiWI restriction site

<220><221> misc\_difference

<222> (433)..(750)

<223> CL - light chain constant region

<220><221> misc\_difference

<222> (751)..(753)

<223> stop codon

<220><221> misc\_difference

<222> (754)..(759)

<223> XhoI restriction site

<400> 39

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac agggccaggt cctcatgttg	60
---	----

ctgctgctat cgttatctgg tacctgtgga gacatttga tgaccaggc tccatcctcc	120
---	-----

ctgactgtgt cagcaggaga gaaggtcaat atgagctgca agtccagtca gagtctttta	180
---	-----

gcttagtgca accaaaataa ctacttggcc tggcaccagg agaaaccagg acgatctcct	240
---	-----

aaaatgtga taatttgggc atccactagg gtatctggag tccctgatcg cttcataggc	300
--	-----

agtggatctg ggacggattt cactctgacc atcaacagtg tgcaggctga agatctggct	360
---	-----

gtttattact gtcagcagtc ctacagcgt ccgctcacgt tcgggtctgg gaccaagctg	420
--	-----

gagctgaaac gtacggtggc tgcaccatct gtcttcatct tccggccatc tgcgtggcag	480
---	-----

ttgaaatctg gaactgcctc ttttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc	540
---	-----

aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc caatcggtta actcccagga gagtgcaca	600
---	-----

gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca	660
---	-----

gactacgaga aacacaaagt ctacgcgtgc gaagtccaccc atcaggccct gagctgcggcc	720
---	-----

gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt tgactcgag 759

<210> 40

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of H1-heavy

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Thr Asp Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala

50	55	60
----	----	----

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85	90	95
----	----	----

Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130	135	140
-----	-----	-----

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180	185	190
-----	-----	-----

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195

200

205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210

215

220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245

250

255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260

265

270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275

280

285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290

295

300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325

330

335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340

345

350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355

360

365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370

375

380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405

410

415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420

425

430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

445

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; amino acid sequence of H3-heavy

&lt;400&gt; 41

Glu Val Gln Leu Val 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 Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 210 215 220  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255  
  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
  
 325 330 335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 375 380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 <210> 42  
 <211> 447

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; amino acid sequence of H4-heavy

&lt;400&gt; 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210	215	220
225	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210>	43	
<211>	220	

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; amino acid sequence of H1-light

&lt;400&gt; 43

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Ser Tyr Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 44  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> amino acid sequence of H2-light  
 <400> 44  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser  
 20 25 30  
 Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp His Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Ser Pro Gln Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Ser Tyr Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125  
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130 135 140  
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 165 170 175  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 180 185 190  
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 45

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of H3-light

<400> 45

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Ser Tyr Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 46

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of H4-light

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

Ala Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Ser Tyr Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu

210 215

<210> 47

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of H1-heavy

<400> 47

gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctggagggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaact gactactaca tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggaaagg ggctggagggt gttggcgtt attagaaaca aagctaaccgg ttacaccaca	180

gaatacagtgcgtgtgaa aggccaggattc accatctcaa gagataattc aaagaactca	240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtattt ctgtgctaga	300
gataactgggtt tgcttactg gggtaagga accctggta ccgtctccctc ggctagcacc	360
aaggccccat cggtttccccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420
gcctgggtt gcctggtaaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggttc gtggactca	480
ggcccccgttga ccagccggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac	540
tccctcagca gctgggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcacccagac ctacatctgc	600

aacgtgaatc acaagccccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
gacaaaactc acacatgcccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	720
ttccctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	780
tgcgtgggtt tggacgttag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
cgtgtggtaa gctccctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagttacaag	960
tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccaagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaa	1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccggggagga gatgaccaag	1080
aaccaggtaa gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca	cgctccgt gctggactcc	1200
gacggctcct ttttcctcta cagcaagctc accgtggaca	agagcaggtg gcagcagggg	1260
aacgtttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca	accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccggtaa atgactcgag		1350
<210> 48		
<211> 1350		
<212> DNA		

## &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; nucleotide sequence of H3-heavy

&lt;400&gt; 48

gagggtgcagc tggggaggc ttgggtccaggc ctggagggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttact gactactaca	tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggagg ggctggaggc gttggctt attagaaaca	aagctaaccgg ttacaccaca	180
gaatacagtg cgtctgtgaa aggagattc accatctcaa	gagataattc aaagaactca	240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgtc	gaggacacgg ccgtgttata ctgtgctaga	300
gataactggc ttgcttactg gggtaagga accctggta	ccgtctccctc ggctagcacc	360

aaggccccat cggctttccc cctggcaccc tcctccaaga	gcacctctgg gggcacagcg	420
gcccctggct gcctggtaa ggactacttc cccgaacccgg	tgacgggtgc gtggactca	480
ggcccccctga ccagcggcgt gcacaccttc	ccggctgtcc tacagtccctc aggactctac	540
tccctcagca gctgtggtgc acgcgttgg	gcacccagac ctacatctgc	600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag	gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc	gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	720
ttcctttcc cccaaaacc caaggacacc	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	780

tgcgtggcgg tggacgtgag ccacgaagac	cctgaggtca agtcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc	caagacaaag ccgcggggagg	900
cgtgtggta	cggtcctcac cgtcctgcac	960
tgcaagggtct	caggactggc tgaatggcaa	1020
gggcagcccc	ggagtacaag cctccctatc	1080
aaccaggta	ccacatcgaga aaaccatctc	1140
tgggagagca	caaagccaa ggtgtacacc	1200

gacggctcct ttttcctcta cagcaagctc accgtggaca	agagcaggtg gcagcagggg	1260
---	-----------------------	------

aacgtttct catgctccgt gatgcata gatgcatacaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccggtaa atgactcgag	1350
<210> 49	
<211> 1350	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence of H4-heavy	
<400> 49	
gagggttcagc tgggtggagtc tggcggtggc ctgggtcagc cagggggctc actccgttg	60
tcctgtcgag ctctggctt cacccactt gattactaca tgagctgggt gcgtcaggcc	120
ccgggttaagg gcctggaaatg gttgggtttt attagaaaca aagctaattt ttacacaaca	180
gagtagtgcgatc catctgtgaa gggcggtttc actataagca gagataattt caaaaacaca	240
ctgtacactgc agatgaacag cctgcgtgct gaggacactg ccgtcttattt ttgtgctaga	300
gataacttgtt ttgttactg gggccaagggg actctggtca ccgtctcctc ggctagcacc	360
aaggccccat cggtttcccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420
gccctggct gcctggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgcc gtggactca	480
ggcgcctgta ccagcggcgt gcacacccctt ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac	540
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcacccagac ctacatctgc	600
aacgtgaatc acaagcccgaaaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	720
ttccctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct ccggacccccc tgaggtcaca	780
tgcgtggtg tgacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcatatatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
cgtgtggtaa gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960
tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccgagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag	1080
aaccaggtaa gcctgacccgt cctggtaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc	1200
gacggctct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggta gcaacgggg	1260
aacgtttct catgctccgt gatgcata gatgcatacaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccggtaa atgactcgag	1350

<210> 50  
<211> 669  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> nucleotide sequence of H1-light  
<400> 50

gacatcgta tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggcga gagggccacc	60
atcaactgca agtccagcca gagtctttta gctagcggca accaaaataa ctacttagct	120
tggcaccaggc agaaaccagg acagcctcct aagatgctca ttatttggc atctacccgg	180
gtatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc	240
atcagcagcc tcgaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaatc ctatagtgtc	300
cctctcacgt tcggaggcgg taccaagggtg gagatcaaac gtacggtgcc tgccatct	360
gtcttcatct tccgcacatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgggtgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc	480
caatcggta actcccaggaa gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtccatcc atcaggccct gagctcgccc gtcacaaga gttcaacag gggagagtgt	660
tgactcgag	669
gatattgtga tgacccagac tccactctcc ctgccgtca cccctggaga gccggctcc	60
atctctgca agtccagtca gagtctttta gctagtgcc accaaaataa ctacttgcc	120
tggcacctgc agaagccagg gcagtcctca cagatgctga tcatttggc atccactagg	180
gtatctggag tcccagacag gttcagtggc agtgggtcag gcactgattt cacactgaaa	240
atcagcaggg tggaggctga ggtatgtggaa gtttattact gccagcagtc ctacagcgt	300
ccgctcacgt tcggacaggg taccaagctg gagctcaaacc gtacggtgcc tgccatct	360
gtcttcatct tccgcacatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgggtgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc	480

caatcggtta actcccgagga gagtgcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtccaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gttcaacag gggagagtgt	660
tgactcgag	669

<210> 52  
<211> 669  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of H3-light

<400> 52	
gacatcgta tgaccaggc tccagactcc ctggctgtgt ctctggcga gagggccacc	60
atcaactgca agtccagcca gagtctttta gctagcggca accaaaataa ctacttagct	120
tggtaaccagg agaaaccagg acagcctctt aagctgctca ttatttggc atctaccgg	180
gtatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctacc	240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaatc ctatagtgt	300

cctctcacgt tcggaggcgg taccagggtg gagatcaaac gtacggtggc tgccatct	360
gtcttcatct tccggccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgggtgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc	480
caatcggtta actcccgagga gagtgcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtccaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gttcaacag gggagagtgt	660
tgactcgag	669

<210> 53  
<211> 669  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of H4-light

<400> 53	
gatatccaga tgaccaggc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtggcga tagggtcacc	60
atcacctgca agtccagtca gagtctttta gctagtgcc accaaaataa ctacttgcc	120
tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg aaaatgctga ttatttggc atccactagg	180
gtatctggag tccctctcg cttctctggc tccgggtctg ggacggattt cactctgacc	240

atcagcagtc tgccggca agacttcgca acttattact gtcagcagtc ctacagcgct 300

ccgctcacgt tcggacaggg taccaagggtg gagatcaaac gtacggtggc tgcaccatct 360  
 gtcttcatct tccggccatc tcatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tttgtgtgc 420  
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480  
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540  
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600  
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660  
 tgactcgag 669

<210> 54

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker between VH and VL

<400> 54

Gly Leu Gly Gly Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Ser Ser Gly Val Gly Ser

20

<210> 55

<211> 1088

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding scFv of huAbF46 antibody

<400> 55

gcttagcgtt tagcagaagt tcaattgggtt gaatctggtg gtggtttgtt tcaaccaggt 60

ggttcttga gattgtcttg tgctgcttct ggtttactt tcaccgatta ttacatgtcc 120  
 tgggttagac aagctccagg taaagggttg gaatgggtgg gtttcattag aaacaaggct 180  
 aacggttaca ctaccgaata ttctgcttct gttaagggtt gattcaccat ttcttagagac 240  
 aactctaaga acaccttgta ctggcaaatg aactccttga gagctgaaga tactgctgtt 300  
 tattactgctg ctagagataa ttgggttgct tattgggtc aaggtacttt gtttactgtt 360  
 tcttctggcc tcggggcctt cgaggaggagga ggttagtggcg gaggaggctc cggtggatcc 420

agcggtgtgg gttccgatata caaatgacc caatctccat cttcttgtc tgcttcagtt	480
ggtgatagag ttaccattac ttgttaagtcc tcccaatctt tggtggcttc tggttaatcag	540
aacaattact tggcttggca tcaacaaaaa ccaggtaaag ctccaaagat gttgattatt	600
tgggcttcta ccagagtttc tgggtttcca tctagattt ctgggtctgg ttccggtaact	660
gattttactt tgaccatttc atccttgc当地 ccagaagatt tcgctactta ctactgtcaa	720
caatcttact ctgctccatt gacttttggt caaggtacaa aggtcgaaat caagagagaa	780
ttcggttaaggc ctatccctaa ccctctccctc ggtctcgatt ctacgggtgg tgggtggatct	840
ggtggtggtg gttctggtg tggtggtct caggaactga caactatatg cgagcaaatc	900
ccctcaccaa ctttagaatc gacgccgtac tctttgtcaa cgactactat tttggccaaac	960
gggaaggcaa tgcaggatgttttgaatatacataatcag taacgtttgt cagtaattgc	1020
ggttctcacc cctcaacaac tagcaaaggc agccccataaa acacacagta tgtttttga	1080
gtttaaac	1088
<210> 56	
<211> 5597	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> expression vector including polynucleotide encoding scFv of	
huAbF46 antibody	
<220><221> misc_difference	
<222> (573)..(578)	
<223> NheI restriction site	
<220><221> misc_difference	
<222> (588)..(938)	
<223> huAbF46 VH	
<220><221> misc_difference	
<222> (939)..(1007)	
<223> linker	
<220><221> misc_difference	
<222> (1008)..(1349)	
<223> huAbF46 VL	
<220><221> misc_difference	
<222> (1350)..(1355)	

<223> EcoRI restriction site

<220><221> misc\_difference

<222> (1356)..(1397)

<223> V5 epitope

<220><221> misc\_difference

<222> (1398)..(1442)

<223> (G4S)3 linker

<220><221> misc\_difference

<222> (1443)..(1649)

<223> Aga2

<220><221> misc\_difference

<222> (1650)..(1652)

<223> TGA(stop codon)

<220><221> misc\_difference

<222> (1653)..(1660)

<223> PmeI restriction site

<400> 56

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt	60
---	----

cctcgcttc accggtcgct ttcctgaaac gcagatgtgc ctgcgcgc actgctccga	120
--	-----

acaataaaga ttctacaata ctagcttta tggttatgaa gagaaaaat tggcagtaac	180
---	-----

ctggccccac aaacctcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
--	-----

ttagttttt agccttattt ctgggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat	300
---	-----

taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accacttaa ctaatacttt caacatttc	360
---	-----

ggttgttatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca aaaaaaatt gttaatatac	420
--	-----

ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac cccggatcgg actactagca gctgtaatac	480
---	-----

gactcactat aggaaatatt aagctaattc tactcatac atttcaatt aagatgcagt	540
---	-----

tacttcgctg ttttcaata tttctgtta ttgctagcgt ttttagcagaa gttcaattgg	600
--	-----

ttgaatctgg tggtggttg gttcaaccag gtggttctt gagattgtct tgtgctgctt	660
---	-----

ctggtttac ttccaccgat tattacatgt cctgggttag acaagctcca ggttaaaggtt	720
---	-----

tggaatggtt gggttcatt agaaacaagg ctaacggta cactaccga tattctgctt	780
--	-----

ctgttaaggg tagattcacc atttctagag acaactctaa gaacacccgt tacttgaaa	840
--	-----

tgaactcctt gagagctgaa gatactgctg tttattactg cgctagagat aattggtttgc	900
--	-----

cttattgggg tcaaggtact ttggttactg tttcttctgg cctcgaaaaa ctcggaggag	960
gaggttagtgg cgaggaggagc tccgggtggat ccagcggtgt gggttccgat attcaaatga	1020
ccaaatctcc atcttcttg tctgcttcag ttggtgatag agttaccatt acttgtaagt	1080
cctcccaatc ttgttggtct tctggtaatc agaacaatata ctggcttgg catcaacaaa	1140
aaccaggtaa agctccaaag atgttgatata ttgggcttc taccagagt tctgggtttc	1200
catctagatt ttctgggtct ggttccggta ctgatttac ttgaccatt tcacccctgc	1260
aaccagaaga tttcgctact tactactgtc aacaatctta ctctgctcca ttgacttttgc	1320
gtcaaggtac aaaggctgaa atcaagagag aattcgtaa gcctatccct aaccctctcc	1380
tcgggtctcga ttctacgggt ggtgggtggat ctgggtgggg tggtctggat ggtgggttt	1440
ctcaggaact gacaactata tgcgagcaaa tcccctcacc aacttttagaa tcgacgccgt	1500
actctttgtc aacgactact atttggcca acgggaaggc aatgcaagga gttttgaat	1560
attacaaatc agtaacgttt gtcaatgttgcatt gcgggtctca cccctcaaca actagcaag	1620
gcagccccat aaacacacag tatgtttttt gagtttaaac ccgctgtatct gataacaaca	1680
gtgttagatgt aacaatcg actttgtcc cactgtactt ttagctcgta caaaatcaa	1740
tatactttc atttctccgt aaacaacatg tttcccatg taatatcctt ttctat	1800
cgttccgtta ccaactttac acatactta tatagttatt cacttctata cactaaaaaa	1860
ctaagacaat tttaattttg ctgcctgcca tatttcaatt tggtaataat tcctataatt	1920
tatccatttta gtagctaaaa aaagatgaat gtgaatcgaa tcctaagaga attggcaag	1980
tgcacaaaca atacttaat aaatactact cagtaataac ctatttctta gcattttga	2040
cggaaatttgc tattttgtta gagtcttttta caccatttgt ctccacacct ccgcttacat	2100
caacaccaat aacgcccattt aatctaagcg catcaccaac atttctggc gtcagtcac	2160
cagctaacat aaaatgtaa ctctcgaaaa tctcttgcc tccaaacccag tcagaaatcg	2220
atgttccaaatc caaaatgttca cctgtcccac ctgttctga atcaacaag ggaataaaacg	2280
aatgagggttt ctgtgaagct gcactgagta gtatgtgca gtctttggaa aatacgagtc	2340
tttttaataac tggcaaaccg aggaactctt ggtattcttgc ccacgactca tctccgtgca	2400
gttggacgat atcaatgccc taatcatgttgc ccagagccaa aacatctcc tttagttgat	2460
tacgaaacac gccaaaccaag tatttcggag tgcctgaact attttatat gctttacaa	2520
gactgttataat ttcccttgca ataaccgggtt caattgttctt ctttcttattt ggcacacata	2580
taatacccaatc caagtcagca tcgaaatcta gagcacattc tgccgcctt ctgttctgca	2640

agccgcaaac ttccaccaat ggaccagaac tacctgtcaa attaataaca gacataactcc	2700
aagctgcctt tgggtgctta atcacgtata ctcacgtgct caatagtcac caatgccctc	2760
cctcttgccc ctctcctttt ctttttcgaa ccgaatttct tgaagacgaa agggcctcg	2820
gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttagg acggatcgct	2880
tgcctgttaac ttacacgcgc ctcgtatctt ttaatgtatgg aataatttgg gaatttactc	2940
tgtgtttattt tttttatgg tttgtatgg ggattttaga aagtaataaa agaaggtaga	3000
agagttacgg aatgaagaaa aaaaaataaa caaagggtta aaaaatttca acaaaaagcg	3060
tactttacat atatatttt tagacaagaa aagcagatta aatagatata cattcgatta	3120
acgataagta aaatgtaaaa tcacaggatt ttcgtgtgt gtcttctaca cagacaagat	3180
gaaacaattc ggcattaata cctgagagca ggaagagcaa gataaaaggt agtatttgg	3240
ggcgatcccc ctagagtctt ttacatcttc ggaaaacaaa aactatttt tcttaattt	3300
cttttttac ttcttatttt taattttat atttatatta aaaaatttta attataatta	3360
tttttatgc acgtgtatgaa aaggacccag gtggcacttt tcgggaaat gtgcgcggaa	3420
cccttatttgc ttattttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac	3480
cctgataaat gctcaataa tattgaaaaa ggaagaggtat gagtattcaa cattccgtg	3540
tgccttat tcccttttgc gggcatttt gccttcgtt tttgctcac ccagaaacgc	3600
tggtaaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggtac atcgaactgg	3660
atctcaacag cgtaagatc cttgagagtt ttgcggccga agaacgtttt ccaatgtga	3720
gcactttaa agttctgcta tggcgcgg tattatcccg tggacgccc gggcaagagc	3780
aactcggctcg ccgcatacac tattctcaga atgacttgg tgactactca ccagtcacag	3840
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga	3900
gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg	3960
ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttggaa ccggagctga	4020
atgaagecat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tggatcaatg gcaacaacgt	4080
tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact	4140
ggatggaggc ggataaaagt gcaggaccac ttctgcgcgc gggccctccg gctggctgg	4200
ttattgtga taaatctgga gccggtgac gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg	4260
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggcgtc caggcaacta	4320
tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac	4380

tgtcagacca agttactca tatatactt agattgattt aaaacttcat ttttaattt	4440
aaaggatcta ggtgaagatc cttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt	4500
tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt	4560
ttttctgcg cgtaatctgc tgcttgaaa caaaaaacc accgctacca gcggtggtt	4620
gtttgccgga tcaagagcta ccaactttt ttccgaaggt aactggctc agcagagcgc	4680
agataccaaa tactgtcctt ctagtgtac cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg	4740
tagcaccgcc tacatacaccc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg	4800

ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcgg	4860
cgggcgtgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggaa gcgaacgacc tacaccgaac	4920
tgagataacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaagg agaaaggcgg	4980
acaggtatcc ggttaaggcgc agggtcggaa caggagagcg caggaggagg cttcagggg	5040
ggaacgcctg gtagtttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat	5100
ttttgtatgt ctgcgtcaggg gggccgagcc tatggaaaaa cgccagcaac gggcccttt	5160
tacggttcct ggcctttgc tggccttttgc ctcacatgtt ctttcgtcg ttatccccctg	5220

attctgtgga taaccgtatt accgccttg agtgagctga taccgctcgc cgccggaa	5280
cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaaga gcgcacaata cgcaaccgc	5340
ctctccccgc gcgttggccg attcatatat gcagctggca cgacagggtt cccgactgga	5400
aagcggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcaccccagg	5460
ctttacactt tatgcttcg gtcctatgt tgtgtgaaat tgtgagcgga taacaatttc	5520
acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctgg aatTAACCTT cactaaagg	5580
aacaaaagct ggctagt	5597

<210> 57  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> U6-HC7 hinge  
<400> 57

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys Pro Pro Cys Pro

1	5	10
<210>	58	
<211>	435	
<212>	DNA	

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; polynucleotide encoding CDR-L3 derived from L3-1 clone

&lt;400&gt; 58

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttgc	60
ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc	120

ctgtccgcct ctgtggcgta tagggtcacc atcacctgca agtccagtca gagtctttta	180
gcttagtgcca accaaaataa ctacttggcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg	240
aaaatgctga ttatgggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga	300
tccgggtctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca	360
acttattact gtcagcagtc ctacagccgc ccgtacacgt tcggacaggg tbeccaaggtg	420
gagatcaaacc gtacg	435

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 435

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; polynucleotide encoding CDR-L3 derived from L3-2 clone

&lt;400&gt; 59

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttgc	60
ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc	120
ctgtccgcct ctgtggcgta tagggtcacc atcacctgca agtccagtca gagtctttta	180
gcttagtgcca accaaaataa ctacttggcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg	240
aaaatgctga ttatgggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga	300
tccgggtctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca	360

acttattact gtggcagtc ctacagccgt ccgtacacgt tcggacaggg tbeccaaggtg	420
gagatcaaacc gtacg	435

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 435

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; polynucleotide encoding CDR-L3 derived from L3-3 clone

&lt;400&gt; 60

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttgc	60
--	----

ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc 120  
 ctgtccgcct ctgtggcga tagggtcacc atcacctgca agtccagtca gagtcttta 180

gctagtggca accaaaataa ctacttggcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg 240  
 aaaaatgtga ttatttggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga 300  
 tccgggtctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca 360  
 acttatttact gtgcacagtc ctacagccat cggttctt tcggacaggg taccaaggta 420  
 gagatcaaac gtacg 435

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 435

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; polynucleotide encoding CDR-L3 derived from L3-5 clone

&lt;400&gt; 61

gaattcacta gtgattaatt cggcccccacc atggattcac agggccaggt cctcatgttg 60  
 ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc 120  
 ctgtccgcct ctgtggcga tagggtcacc atcacctgca agtccagtca gagtcttta 180  
 gctagtggca accaaaataa ctacttggcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg 240  
 aaaaatgtga ttatttggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga 300  
 tccgggtctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca 360  
 acttatttact gtgcagcagtc ctacagccgc cggtttagt tcggacaggg taccaaggta 420

gagatcaaac gtacg 435

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 462

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; polypeptide consisting of heavy chain variable region of

huAbF46-H4-A1, U6-HC7 hinge and constant region of human IgG1

&lt;400&gt; 62

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly Ile Gln

1 5 10 15

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

20	25	30
----	----	----

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Glu Tyr Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

195	200	205
-----	-----	-----

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

210	215	220
-----	-----	-----

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

245	250	255
-----	-----	-----

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

260	265	270
-----	-----	-----

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

275 280 285

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

305 310 315 320

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

340 345 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455 460

<210> 63

<211> 1410

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding polypeptide consisting of heavy chain

variable region of huAbF46-H4-A1, U6-HC7 hinge and constant

region of human IgG1

<400> 63

gaattcgccg ccaccatgga atggagctgg gttttctcg taacacttt aaatggtac	60
cagtgtgagg tttagctggt ggagtctggc ggtggctgg tgcagccagg gggctca	120
cgttgtcct gtgcagcttc tggcttcacc ttcaactgatt actacatgag ctgggtgcgt	180
caggccccgg gtaagggcct ggaatggttg gttttatata gaaacaaagc taatggttac	240

acaacagagt acagtgcac tggtaagggt cgtttacta taaggcaga taattccaaa	300
aacacactgt acctgcagat gaacagcctg cgtgctgagg acactgccgt ctattattgt	360
gcttagagata actgggttgc ttactgggc caagggactc tggtcacccgt ctccctcggt	420
agcaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctggggc	480
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttcccg aaccggtgac ggtgtcg	540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gttggcac ccagacactac	660

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagaagt tgagcccaa	720
agctgcgatt gccactgtcc tccatgtcca gcacctgaac tccctggggg accgtcagtc	780
tccctttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac	900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	960
cgtgtggtca ggcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	1020
tgcaaggctt ccaacaaagc cctccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1080

ggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccggagga gatgaccaag	1140
aaccaggtaa gcctgacctg cctggtaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1200
tggagagca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc	1260
gacggctct tttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1320
aacgtttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1380
ctctccctgt ctccggtaa atgactcgag	1410

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 461

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; polypeptide consisting of heavy chain variable region of

huAbF46-H4-A1, human IgG2 hinge and constant region of human IgG1

&lt;400&gt; 64

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly Ile Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp

35 40 45

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

50 55 60

Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser

65 70 75 80

Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys

225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

245	250	255
-----	-----	-----

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

260	265	270
-----	-----	-----

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

275	280	285
-----	-----	-----

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

290	295	300
-----	-----	-----

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

325	330	335
-----	-----	-----

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

340	345	350
-----	-----	-----

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

355	360	365
-----	-----	-----

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

370	375	380
-----	-----	-----

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

405	410	415
-----	-----	-----

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

420	425	430
-----	-----	-----

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

435	440	445
-----	-----	-----

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450	455	460
-----	-----	-----

<210> 65

<211> 1407

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding polypeptide consisting of heavy chain variable region of huAbF46-H4-A1, human IgG2 hinge and constant region of human IgG1

<400> 65

gaattcgccg ccaccatgga atggagctgg gttttctcg taacacttt aaatggatac	60
cagtgtgagg ttcagctggt ggagtctggc ggtggctgg tgcagccagg gggctcaactc	120
cgttgtcct gtgcagcttc tggcttacc ttcaactgatt actacatgag ctgggtgcgt	180
caggccccgg gtaagggct ggaatggttg gttttatta gaaacaaagc taatggttac	240
acaacagagt acagtgcata tgtgaagggt cgtttacta taagcagaga taattccaaa	300
aacacactgt acctgcagat gaacagcctg cgtgctgagg acactgccgt ctattattgt	360
gcttagagata actgggttgc ttactggggc caagggactc tggtcaccgt ctcctggct	420
agcaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctggggc	480
acagcggccc tggctgcct ggtcaaggac tacttcccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgcctaca gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggcac ccagacctac	660
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagaaagt tgagaggaag	720
tgctgtgtgg agtccccccc ctgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtctc	780
ctctccccca caaaacccaa ggacaccctc atgatctcc ggacctctga ggtcacatgc	840
gtgggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	900
gtggagggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	1080
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg	1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccctgtgc ggactccgac	1260
ggctcttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagccct	1380
tccctgtctc cggtaaatg actcgag	1407
<210> 66	
<211> 460	
<212> PRT	

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> polypeptide consisting of heavy chain variable region of  
huAbF46-H4-A1, human IgG2 hinge and constant region of human IgG2

&lt;400&gt; 66

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly Ile Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp

35 40 45

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

50 55 60

Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser

65 70 75 80

Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

195 200 205

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys  
 225 230 235 240  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 245 250 255  
  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 275 280 285  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 290 295 300  
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 305 310 315 320  
 Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
  
 325 330 335  
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
 340 345 350  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 355 360 365  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 370 375 380  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 385 390 395 400  
  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 405 410 415  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 420 425 430  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 435 440 445  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460  
 <210> 67  
 <211> 1404

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; polynucleotide encoding polypeptide consisting of heavy chain

variable region of huAbF46-H4-A1, human IgG2 hinge and constant  
region of human IgG2

&lt;400&gt; 67

gaattcgccg ccaccatgga atggagctgg gttttctcg taacacttt aaatggatac	60
cagtgtgagg tttagtgggt ggagtctggc ggtggctgg tgcagccagg gggctcaactc	120
cgtttgtcct gtgcagcttc tggcttcacc ttcaactgatt actacatgag ctgggtgcgt	180
caggccccgg gtaagggcct ggaatggttg gttttattt gaaacaaagc taatggttac	240
acaacagagt acagtgcata tgtgaagggt cgtttacta taagcagaga taattccaaa	300
aacacactgt acctgcagat gaacagcctg cgtgctgagg acactgccgt ctattattgt	360
gcttagagata actggtttgc ttactggggc caagggactc tggcacccgt ctcctcgct	420
agcaccaagg gcccatcggt cttcccttg gcgcctgct ccaggagcac ctccgagagc	480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttcccg aaccggtgac ggtgtcggt	540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccg tgccttaca gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac	660
acctgcaacg tagatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagacagt tgagcgc当地	720
tgttgtcgtc agtgcaccacc gtgcaccacc caacactgtgg caggaccgtc agtcttcctc	780
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg	840
gtgggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtaactt ggacggcgtg	900
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcgt tcaacagcac gttccgtgt	960
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgc当地	1020
gtctccaaca aaggcctccc agcccccattc gagaaaaacca tctccaaaac caaaggcag	1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggtt aggagatgac caagaaccag	1140
gtcagcctga cctgccttgtt caaaggcttc tacccagcg acatgcgcgt ggagtggag	1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccatgctgga ctccgacggc	1260
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgttg gacaagagca ggtggcagca gggaaacgtc	1320
ttctctatgtt ccgtgtatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1380
ctgtctccgg gtaaatgact cgag	1404

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 240

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> polypeptide consisting of light chain variable region of  
huAbF46-H4-A1(H36Y) and human kappa constant region

&lt;400&gt; 68

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Ser Val Ser

1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
20 25 30Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
35 40 45Leu Leu Ala Ser Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
50 55 60Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg  
65 70 75 80Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
85 90 95Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
130 135 140Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
145 150 155 160Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
165 170 175Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

195

200

205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

210

215

220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

240

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 758

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; polynucleotide encoding polypeptide consisting of light chain

variable region of huAbF46-H4-A1(H36Y) and human kappa constant  
region

&lt;400&gt; 69

aattcactag tgattaattc gccgccacca tggattcaca ggcccaggc ctcatgtgc	60
tgctgctatc ggtatctggt acctgtggag atatccagat gaccaggatcc ccgagctccc	120
tgtccgcctc tgtggcgat agggtcacca tcacctgcaa gtccagtcag agtcttttag	180
ctagtggcaa ccaaataac tacttgcct ggtaccaaca gaaaccagga aaagctccga	240
aatatgctgat tatttggca tccacttaggg tatctggagt cccttctcgc ttctctggat	300
ccgggtctgg gacggatttc actctgacca tcagcagtct gcagccggaa gacttcgcaa	360

cttattactg tcagcagtcc tacagccgcc cgtacacgtt cggacagggt accaagggtgg	420
agatcaaacg tacgggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccccatct gatgagcagt	480
tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa ctatctatccc agagaggcca	540
aagtacagtg gaagggtggat aacgccctcc aatcggtaa ctcccaggag agtgcacag	600
agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaaggcag	660
actacgagaa acacaaagtc tacgcctcgt aagtacccca tcagggcctg agctcgcccg	720
tcacaaagag cttaaacagg ggagagtgtt gactcgag	758

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 240

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> polypeptide consisting of light chain variable region of  
huAbF46-H4-A1 and human kappa constant region

&lt;400&gt; 70

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Ser Val Ser

1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Leu Leu Ala Ser Gly Asn Gln Asn Asn His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg

65 70 75 80

Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr

100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Arg Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235 240