



(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

리엔목특허법인

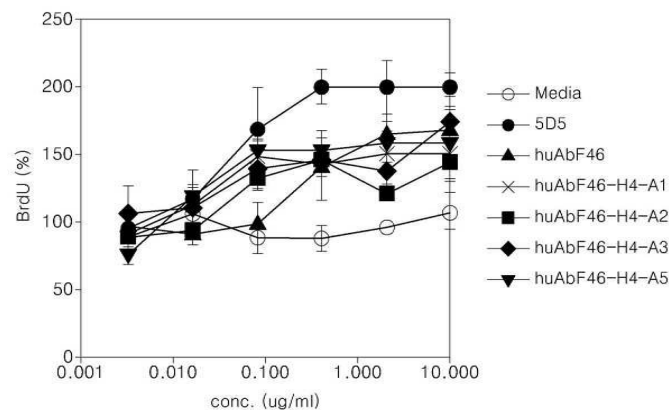
전체 청구항 수 : 총 20 항

(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.

대표도 - 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

Xaa₁-Xaa₂-Tyr-Tyr-Met-Ser (서열번호 4)

일반식 II

Arg-Asn-Xaa₃-Xaa₄-Asn-Gly-Xaa₅-Thr (서열번호 5)

일반식 III

Asp-Asn-Trp-Leu-Xaa₆-Tyr (서열번호 6)

일반식 IV

Lys-Ser-Ser-Xaa₇-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa₈-Xaa₉-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7)

일반식 V

Trp-Xaa₁₀-Ser-Xaa₁₁-Arg-Val-Xaa₁₂ (서열번호 8)

일반식 VI

Xaa₁₃-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa₁₄-Pro-Xaa₁₅-Thr (서열번호 9)

상기 일반식 I 에서, Xaa₁은 Pro 또는 Ser이고, Xaa₂는 Glu 또는 Asp이며,

상기 일반식 II에서, Xaa₃은 Asn 또는 Lys이며, Xaa₄는 Ala 또는 Val이고, Xaa₅는 Asn 또는 Thr이며,

상기 일반식 III에서, Xaa₆은 Ser 또는 Thr이고,

상기 일반식 IV에서, Xaa₇은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa₈은 His 또는 Gln이며, Xaa₉는 Lys 또는 Asn이고,

상기 일반식 V에서, Xaa₁₀은 Ala 또는 Gly이며, Xaa₁₁은 Thr 또는 Lys이고, Xaa₁₂는 Ser 또는 Pro이며,

상기 일반식 VI에서, Xaa₁₃은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa₁₄는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa₁₅는 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-Xaa₇-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa₈-Xaa₉-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7)

일반식 V

Trp-Xaa₁₀-Ser-Xaa₁₁-Arg-Val-Xaa₁₂ (서열번호 8)

일반식 VI

Xaa₁₃-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa₁₄-Pro-Xaa₁₅-Thr (서열번호 9)

상기 일반식 IV에서, Xaa₇은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa₈은 His 또는 Gln이며, Xaa₉는 Lys 또는 Asn이고,

상기 일반식 V에서, Xaa₁₀은 Ala 또는 Gly이며, Xaa₁₁은 Thr 또는 Lys이고, Xaa₁₂는 Ser 또는 Pro이며,

상기 일반식 VI에서, Xaa₁₃은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa₁₄는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa₁₅는 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 키메라 항체 또는 인간화 항체인 것인 항 c-Met 항체.

청구항 15

제1항 또는 제8항에 있어서, 상기 항체는 scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' 및 F(ab')₂로 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 길항제(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 종양세포에서 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 얼비투스(Erbix) 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 약물들에 대한 내성이 있는 환자 중, c-Met 단백질의 과발현 등으로 항암제의 작용을 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

[0013] Xaa₁-Xaa₂-Tyr-Tyr-Met-Ser (서열번호 4)

- [0014] 일반식 II
- [0015] Arg-Asn-Xaa₃-Xaa₄-Asn-Gly-Xaa₅-Thr (서열번호 5)
- [0016] 일반식 III
- [0017] Asp-Asn-Trp-Leu-Xaa₆-Tyr (서열번호 6)
- [0018] 일반식 IV
- [0019] Lys-Ser-Ser-Xaa₇-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa₈-Xaa₉-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7)
- [0020] 일반식 V
- [0021] Trp-Xaa₁₀-Ser-Xaa₁₁-Arg-Val-Xaa₁₂ (서열번호 8)
- [0022] 일반식 VI
- [0023] Xaa₁₃-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa₁₄-Pro-Xaa₁₅-Thr (서열번호 9)
- [0024] 상기 일반식 I에서, Xaa₁은 Pro 또는 Ser이고, Xaa₂는 Glu 또는 Asp이며,
- [0025] 상기 일반식 II에서, Xaa₃은 Asn 또는 Lys이며, Xaa₄는 Ala 또는 Val이고, Xaa₅는 Asn 또는 Thr이며,
- [0026] 상기 일반식 III에서, Xaa₆은 Ser 또는 Thr이고,
- [0027] 상기 일반식 IV에서, Xaa₇은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa₈은 His 또는 Gln이며, Xaa₉는 Lys 또는 Asn이고,
- [0028] 상기 일반식 V에서, Xaa₁₀은 Ala 또는 Gly이며, Xaa₁₁은 Thr 또는 Lys이고, Xaa₁₂는 Ser 또는 Pro이며,
- [0029] 상기 일반식 VI에서, Xaa₁₃은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa₁₄는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa₁₅는 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-Xaa₇-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa₈-Xaa₉-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7)
- [0036] 일반식 V
- [0037] Trp-Xaa₁₀-Ser-Xaa₁₁-Arg-Val-Xaa₁₂ (서열번호 8)
- [0038] 일반식 VI

- [0039] Xaa₁₃-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa₁₄-Pro-Xaa₁₅-Thr (서열번호 9)
- [0040] 상기 일반식 IV에서, Xaa₇은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa₈은 His 또는 Gln이며, Xaa₉는 Lys 또는 Asn이고,
- [0041] 상기 일반식 V에서, Xaa₁₀은 Ala 또는 Gly이며, Xaa₁₁은 Thr 또는 Lys이고, Xaa₁₂는 Ser 또는 Pro이며,
- [0042] 상기 일반식 VI에서, Xaa₁₃은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa₁₄는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa₁₅는 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 키메라 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메라 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메라 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 키메라 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 것이며, 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 키메라 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(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 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 힌지(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_L을 포

합하는 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)₂, Fab, Fab' 및 F(ab')₂로 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)₂, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂일 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_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 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 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 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, 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 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, 현탁제, 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 펩타이드는 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. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 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 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 면역 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물로서 역상 증발법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교체 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다. 독소루비신과 같은 화학치료제가 추가로 리포솜 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 상호작용을 완전히 단절시키거나, 수용체의 3차 구조의 변화, 또는 감소 조절(down regulation)에 의해 상기 상호작용을 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 기재 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 증합효소

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 비로 항암 효능 분석을 이중 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 비로 항암 효능 분석을 이중 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, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 발명의 범위가 이들 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 μ g의 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]

[0077] (2) 세포 융합 및 하이브리도마의 제조

[0078] 세포융합 실험 3일 전에 50 μ g의 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 현탁액을 만들었다. 상기 현탁액을 원심분리하여 세포층을 회수하였다. 상기 얻어진 비장세포 1×10^8 개와 골수종세포(Sp2/0) 1×10^8 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

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

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

[0080] 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.

[0081] 마이크로타이터 플레이트에 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질을 한 웰당 각각 50 μl (2 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 웰에 50 μl 씩을 가하여 1 시간 동안 반응시킨 후 인산 완충용액-트윈 20(TBST) 용액으로 충분히 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스래디쉬 퍼옥시다제(goat anti-mouse IgG-HRP)를 가하여 1 시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, TBST 용액으로 충분히 세척하였다. 이어서 퍼옥시다제의 기질용액(OPD)을 가하여 반응시키고, 그 반응정도는 엘리자 해독기(ELISA Reader)로 450 nm에서 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 세포주들을 제한 희석(limiting dilution)하여 단일클론 항체를 생산하는 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

[0083] 상기 (3)에서 얻은 하이브리도마 세포를 무혈청 배지에서 배양하고 배양액으로부터 단일클론 항체를 생산 정제하였다.

[0084] 먼저 10% FBS이 포함된 배양배지(DMEM) 배지 50 ml에서 배양된 상기 하이브리도마 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 20 ml PBS로 2회 이상 세척하여 FBS가 제거된 상태에서 배양배지(DMEM) 배지 50 ml을 세포 침전물에 재현탁시킨 후 3일 동안 37℃ 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 이후 원심분리를 통해 항체를 생산하는 세포를 제거하고 항체들이 분비된 배양액을 분리하여 4℃에 보관하거나 바로 모아서 50 ml 내지 300 ml의 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 상층액을 치환하여 정제된 항체를 보관하고, 이후의 실험에 사용하였다.

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

[0086] 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 키메라 항체 chAbF46을 제작하였다.

[0087] 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™ 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(서열번호 39)을 각각 EcoRI(NEB, R0101S)과 XhoI(NEB, R0146S) 제한 효소를 사용하여, 클로닝함으로써, 키메라 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(2.5×10^7)에 2M CaCl_2 를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO_2 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 Kit 에 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(2.5×10^7)에 2M CaCl_2 를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO_2 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 'GLGGLGGGSGGGSGGSSGVGS'(서열번호 54)의 아미노산 서열을 가지도록 디자인하였다. 이렇게 디자인된 huAbF46 항체의 scFv를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 55)를 바이오키타에 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

[0109]

CDR	아미노산 서열
CDR-H1	DYYMS(서열번호 1)
CDR-H2	FIRNKANGYTTEYSASVKG(서열번호 2)
CDR-H3	DNWFAY(서열번호 3)
CDR-L1	KSSQSLASGNQNNYLA(서열번호 10)
CDR-L2	WASTRVS(서열번호 11)
CDR-L3	QQSYSAPLT(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	KSSRSLSSGNHKNYLA(서열번호 30)
L1-4	CDR-L1	KSSKSLASGNQNNYLA(서열번호 31)
L1-12	CDR-L1	KSSRSLASGNQNNYLA(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	AQSYSHFPS(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 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 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(2.5×10^7)에 2M CaCl_2 를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO_2 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]

[0124] 실시예 8: 선별된 항체의 결합 친화도 분석

[0125] 상기 실시예 7에서 제작된 4종의 항체 의 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_{on} 값과 k_{off} 값을 구하고, 이로부터 K_D 값을 계산하였다. huAbF46은 c-Met 항원에 대하여 약 2.19 nM의 결합력을 보였으며, 친화도가 개선된 4종의 항체는 0.06 nM 내지 0.50 nM범위의 결합력을 보였다(표 3). 이는 scFv 형태에서 친화도가 개선된 항체들이 IgG 변환 후에도 최소 5배에서 최대 약 37배까지 친화도가 향상되었음을 보여준다.

표 3

[0126]

항체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
huAbF46	3.29×10^5	7.23×10^{-4}	2.19
huAbF46-H4-A1	7.39×10^5	4.53×10^{-5}	0.06
huAbF46-H4-A2	5.02×10^5	2.53×10^{-4}	0.50
huAbF46-H4-A3	4.19×10^5	1.43×10^{-4}	0.34
huAbF46-H4-A5	5.72×10^5	2.40×10^{-4}	0.42

[0127] 실시예 9: 선별된 친화도 개선 항체의 인 비트로(in vitro) 생물학적 활성 분석

[0128] (1) BrdU assay

[0129] 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 2×10^5 세포/ml로 현탁하여 현탁액을 100 ul씩 96-well tissue culture plate (Corning, Lowell, MA) 에 분주하였다. 24시간 동안 37°C에서 5% CO_2 의 조건으로 배양하고, 배지를 완전히 제거한 후에 항체를 희석한 RPMI 1640 배지로 교체하였다. 21시간 동안 37°C에서 5% CO_2 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.

[0130] 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 1×10^4 개의 MKN45 세포를 50 μ l의 5% FBS/DMEM 배양액과 분주하고, 상기 제작된 항체 4종을 처리하지 않거나, 0.008, 0.04, 0.2 또는 1 μ g/ml의 농도로 50 μ l를 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 μ g/ml에서 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 μ g/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] 2×10^5 세포/ml의 Caki-1 세포를 96-웰 플레이트에 분주한 후, 24시간 후에 무혈청 상태에서 각각 5 μ g/ml의 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 측정 한 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-Met양의 증감을 파악하여 항체의 효능을 검사하는 것이다.

[0142] 2×10^5 cells/ml MKN45 세포와 5 μ g/ml의 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

[0145] 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 이중 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 5×10^6 개의 U87MG 뇌암 세포 또는 MKN45 위암 세포 $50 \mu\text{l}$ 를 6주령의 웅성 BALB/C 누드 마우스(㈜ 오리엔트 바이오)에 피하주사하여 1주 경과 후에 암이 발생하는 마우스를 각 그룹당 12마리씩을 무작위 선별하여 실험에 사용하였다. 4종의 친화도 개선 항체는 암세포가 생성되고 정맥주사에 의해 10 mg/kg의 농도만 큼 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

[0149] 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-HC7힌지 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(2.5×10^7)에 2M CaCl_2 를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37℃, 5% CO_2 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 힌지영역이 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 1×10^4 개의 MKN45 세포를 50 μ l의 5% FBS/DMEM 배양액과 분주하고, 상기 제작된 항체 3종을 처리하지 않거나, 0.008, 0.04, 0.2 또는 1 μ g/ml의 농도로 50 μ l를 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.

[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 μ g/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] 2×10^5 세포/ml의 Caki-1 세포를 96-웰 플레이트에 분주한 후, 24시간 후에 무혈청 상태에서 각각 5 μ g/ml의 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 측정 한 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. 2×10^5 cells/ml MKN45 세포와 5 μ g/ml의 항체를 96-웰 플레이트에 동시에 뿌려준 후, 24시간 동안 배양하였다. 이후, 항체가 처리된 세포를 용해시키고 Human total HGF R/c-MET ELISA KIT (R&D systems, DY358)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 힌지영역이 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 5×10^6 개의 U87MG 뇌암 세포 또는 MKN45 위암 세포 50 μ l를 6주령의 웅성 BALB/C 누드 마

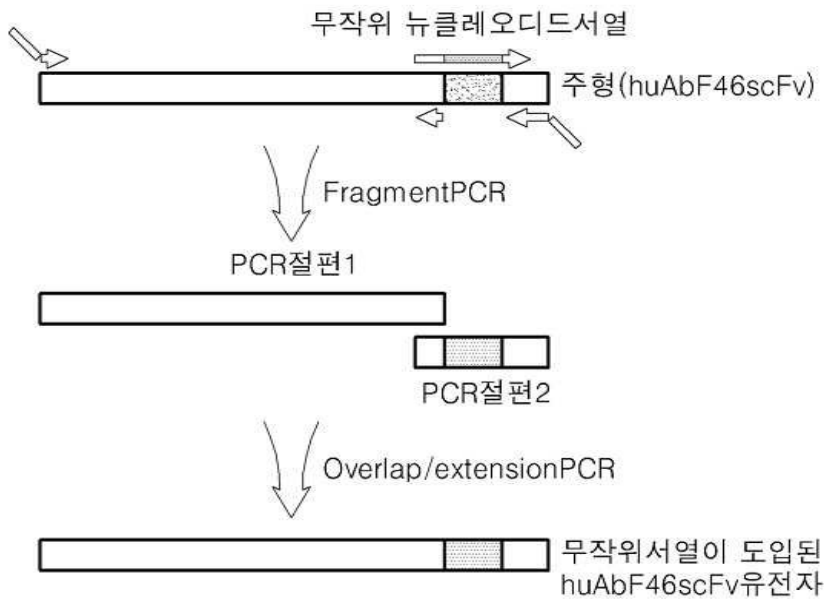
우스(쫘 오리엔트 바이오)에 피하주사하여 1주 경과 후에 암이 발생하는 마우스를 각 그룹당 12마리씩을 무작위 선별하여 실험에 사용하였다. 3종 항체는 암세포가 생성되고 정맥주사에 의해 10 mg/kg의 농도만큼 주 1회 마우스에 투여하였다. 또한, 대조군으로 마우스 AbF46 항체는 복강주사에 의해 10 mg/kg과 20 mg/kg의 농도로 주 2회 투여하였다.

[0169]

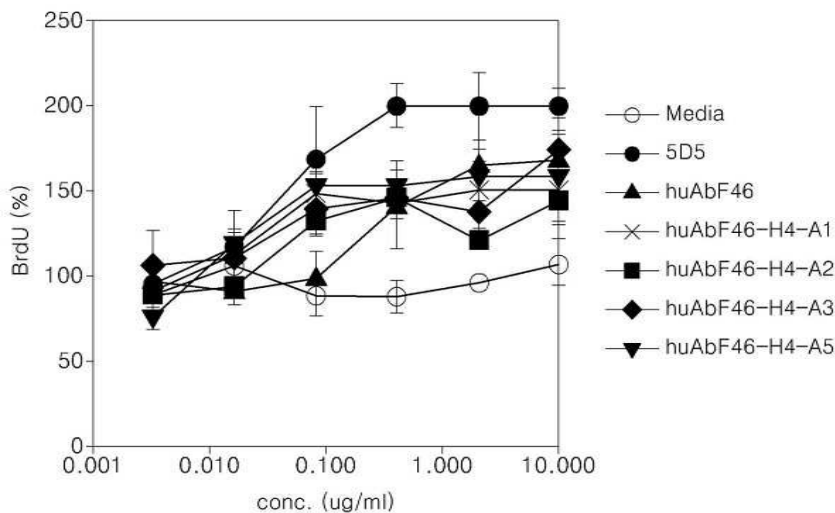
도 10a 및 도 10b에서 나타낸 바와 같이, U87MG 뇌암 또는 MKN45 위암 마우스 동물 모델에서 두 항체 모두 확연한 종양 성장 억제 효능을 보였으며, 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

도면

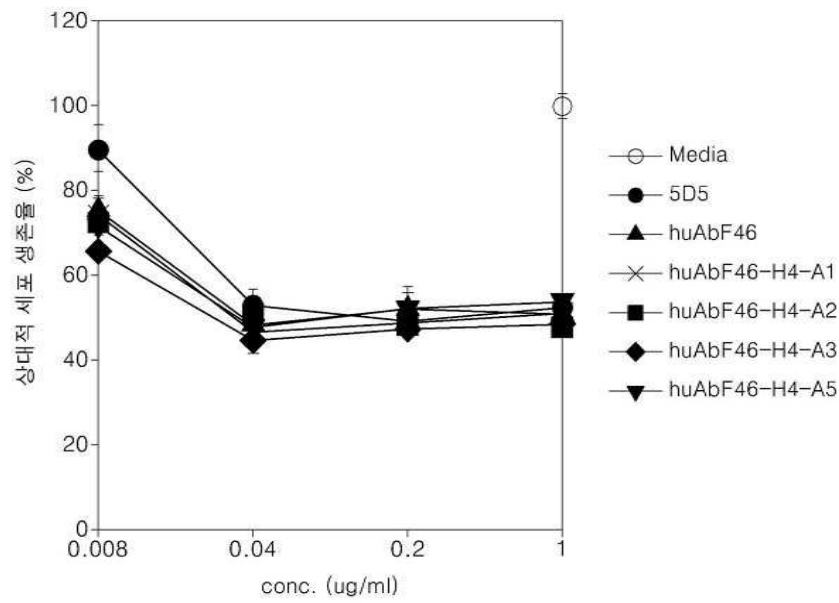
도면1



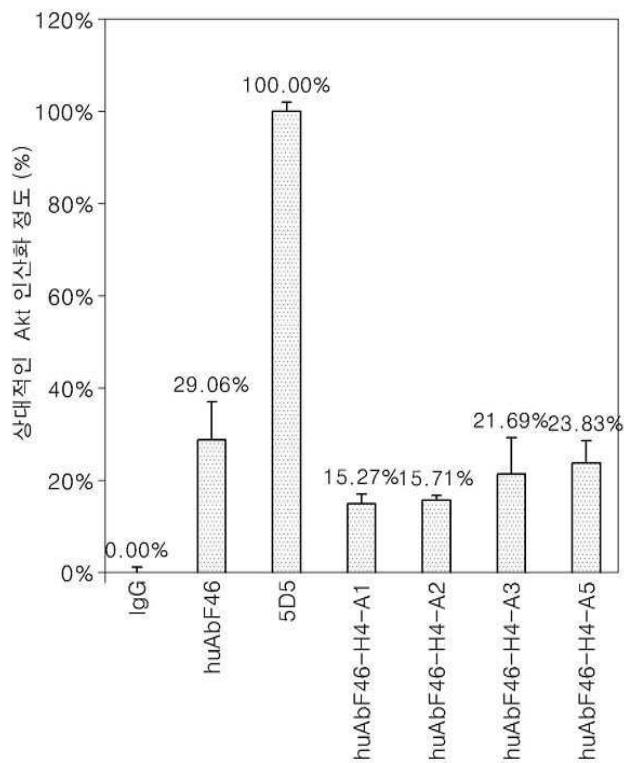
도면2



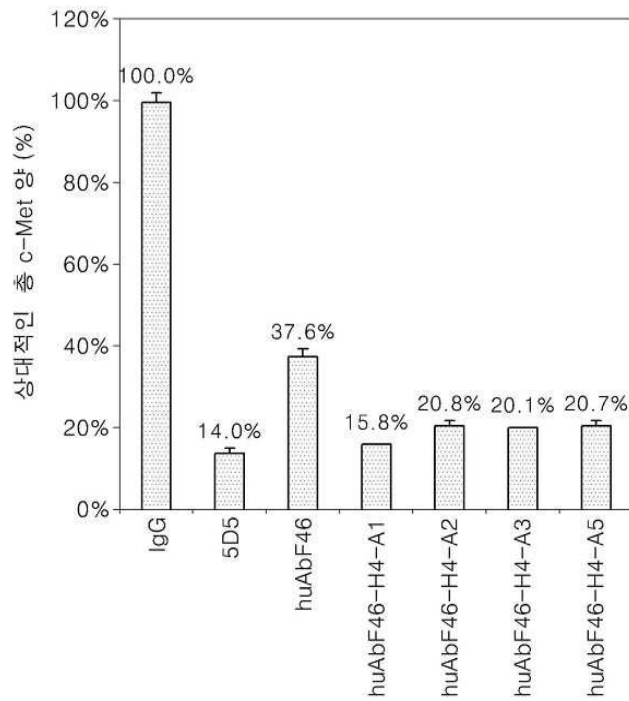
도면3



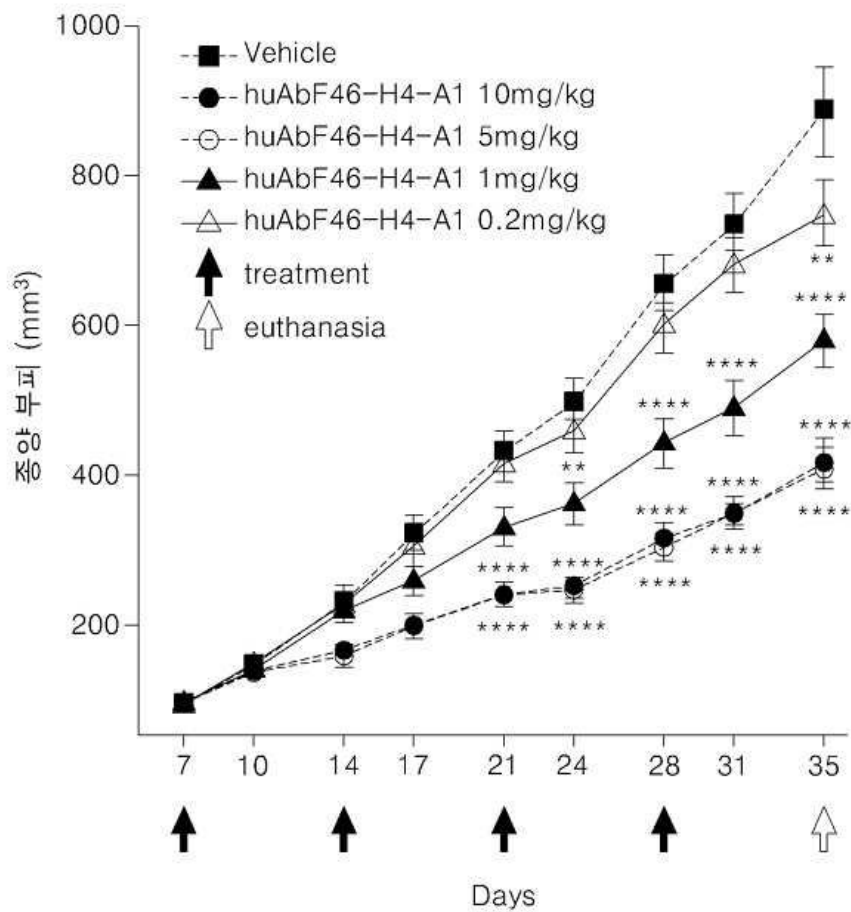
도면4



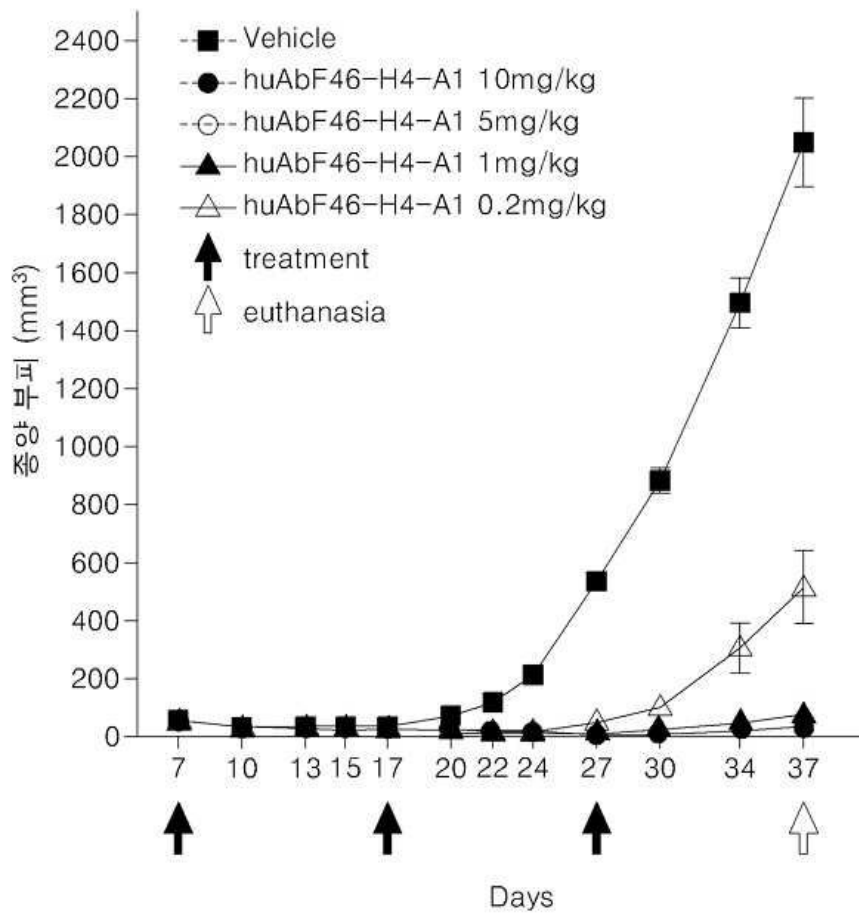
도면5



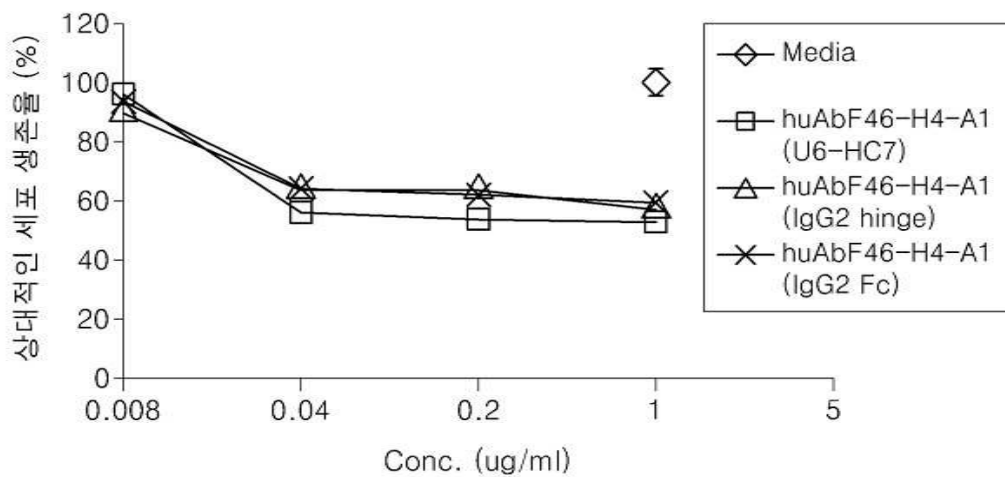
도면6a



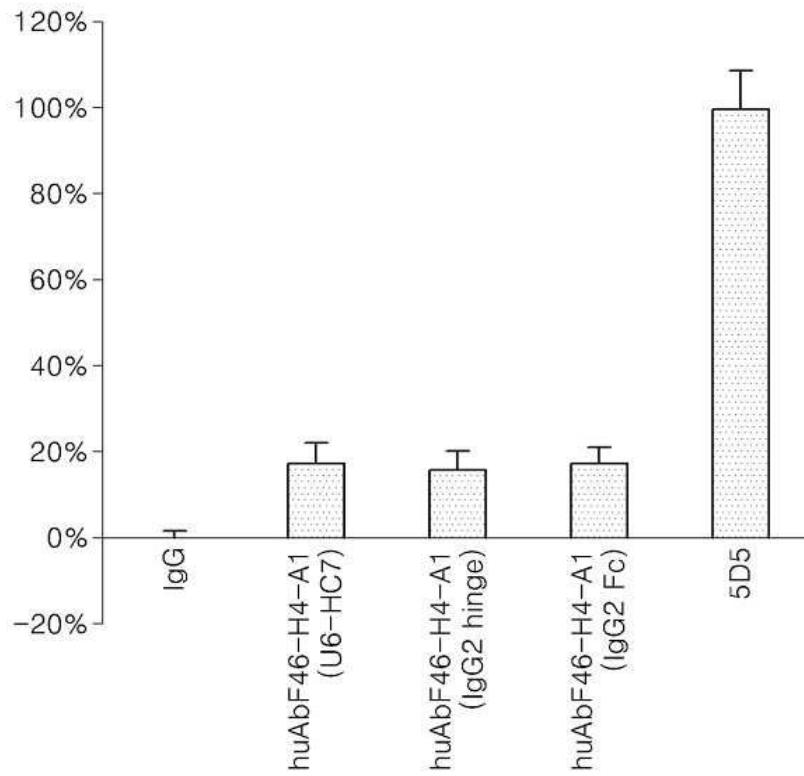
도면6b



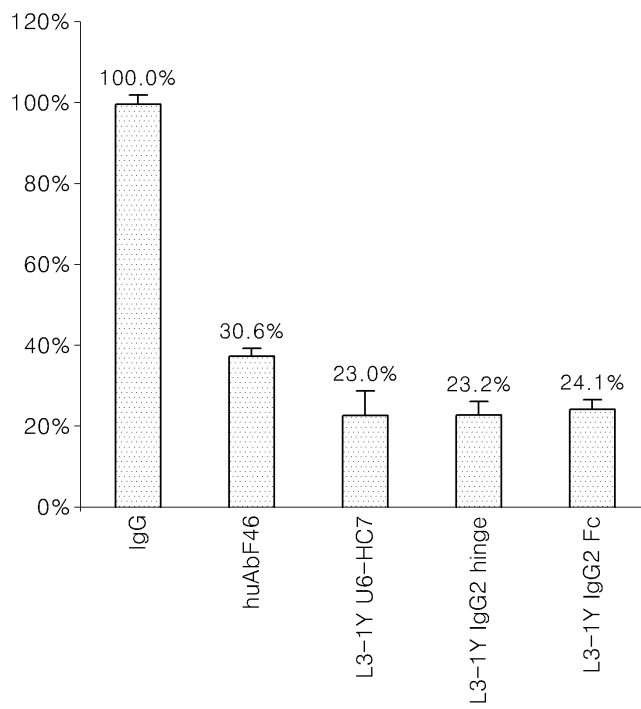
도면7



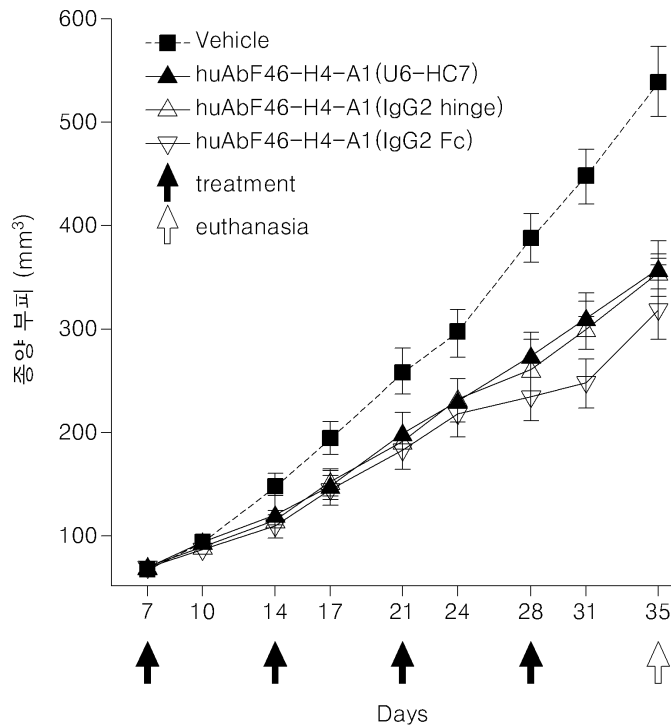
도면8



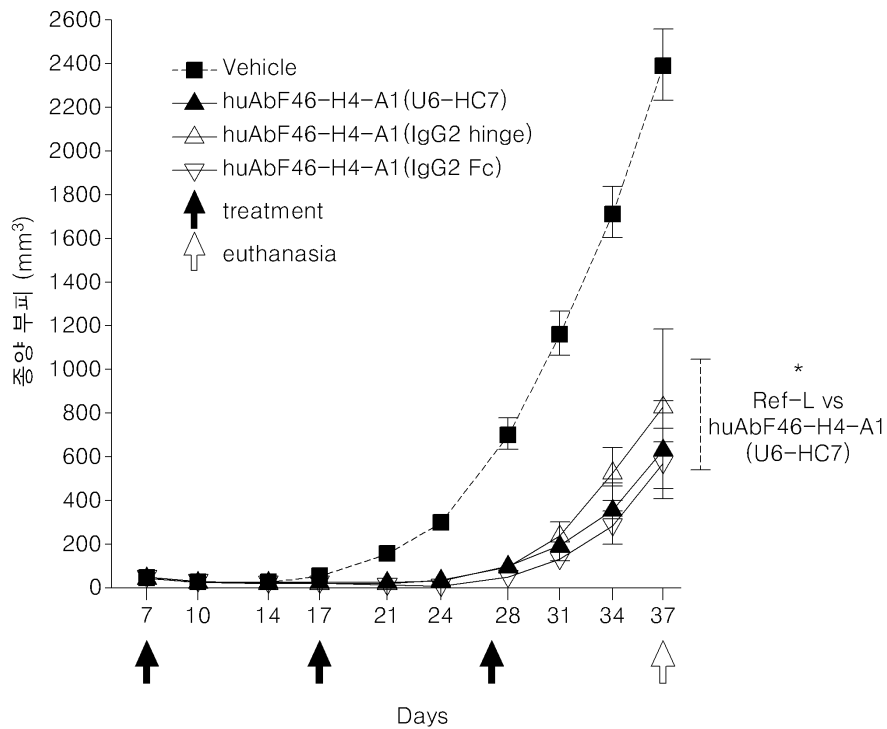
도면9



도면10a



도면10b



서열목록

<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 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

<210> 18

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

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

<210> 21
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 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 sodon
 <220><221> misc_feature
 <222> (1411)..(1416)
 <223> XhoI restriction site

<400>	38	
gaattcgccg ccacatgga atggagctgg gttttctcg taacactttt aaatggatc	60	
cagtgtgagg tgaagctggt ggagtctgga ggaggcttgg tacagcctgg gggttctctg	120	
agactctcct gtgcaacttc tgggttcacc ttacttgatt actacatgag ctgggtccgc	180	
cagcctccag gaaaggcact tgagtgggtg ggttttatta gaaacaaagc taatggttac	240	
acaacagagt acagtgcac tgtgaagggt cggttcacca tctccagaga taattcccaa	300	
agcatcctct atcttcaaat ggacaccttg agagctgagg acagtgccac ttattactgt	360	
gcaagagata actggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgcagct	420	
agcaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	480	
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	540	
aactcaggcg cctgaccag cggtcgtcac accttcccg ctgtcctaca gtctcagga	600	
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac	660	
atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa	720	
tcttgtgaca aaactcacat atgcccaccg tggcagcac ctgaactcct ggggggaccg	780	
tcagtcttc ttttcccc aaacccaag gacacctca tgatctccg gacctctgag	840	
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac	900	
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960	
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020	
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1080	
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg	1140	
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatgcc	1200	
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccagcc tcccgtgctg	1260	
gactccgacg gctcttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1320	
cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgagctc tgcacaacca ctacacgag	1380	
aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga ctcgag	1416	
<210>	39	
<211>	759	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	nucleotide sequence of light chain of chAbF46	
<220><221>	misc_difference	
<222>	(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 aggccccaggt cctcatgttg 60

ctgctgctat cggatatctgg tacctgtgga gacattttga tgaccacagtc tccatcctcc 120

ctgactgtgt cagcaggaga gaaggtcact atgagctgca agtccagtca gagtctttta 180

gctagtggca accaaaataa ctacttggcc tggcaccagc agaaaccagg acgatctcct 240

aaaatgctga taatttgggc atccactagg gtatctggag tccctgatcg cttecataggc 300

agtggatctg ggacggattt cactctgacc atcaacagtg tgcaggctga agatctggct 360

gtttattact gtcagcagtc ctacagcgct ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg 420

gagctgaaac gtacggtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 480

ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc 540

aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca 600

gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca 660

gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc 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 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

<210> 41

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 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 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
 <210> 42
 <211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 42

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 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
 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
 <210> 43
 <211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 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 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

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcact gactactaca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gttgggcttt attagaaaca aagctaacgg ttacaccaca 180

gaatacagtg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagataattc aaagaactca 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 300
gataactggt ttgcttactg gggtaagga accctgggtc ccgtctctc ggctagcacc 360
aagggcccat cgtctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggtg gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 540
tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtggtca gcgtctctac cgtctctcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggtaa atgactcgag 1350

<210> 48
<211> 1350
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 48

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttact gactactaca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gttgggcttt attagaaaca aagctaacgg ttacaccaca 180
gaatacagtg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagataatc aaagaactca 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 300
gataactggt ttgcttactg gggtaagga accctggta ccgtctctc ggctagcacc 360

aagggcccat cgtcttccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg ggccacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactactc ccgaaccgg tgacggtgct gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac 540
tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccga caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acatgccc accgtgcca gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc 720
ttctcttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatc cccggacccc tgaggtcaca 780

tgctggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgaggagg agcagtaca cagcagctac 900
cgtgtggtca gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctcccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggtaa atgactcgag	1350
<210> 49	
<211> 1350	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence of H4-heavy	
<400> 49	
gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg	60
tcctgtgcag ctcttggtt caccctcact gattactaca tgagctgggt gcgtcaggcc	120
ccgggtaagg gcctggaatg gttgggtttt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca	180
gagtacagtg catctgtgaa gggtcgtttc actataagca gagataattc caaaaacaca	240
ctgtacctgc agatgaacag cctgcgtgct gaggacactg ccgtctatta ttgtgctaga	300
gataactggt ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ccgtctctc ggctagcacc	360
aaggggcccat cggctcttccc cctggcaccc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca	480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac	540
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc	600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
gacaaaaact acacatgcc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	720
tctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
cgtgtgtgca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960
tgcaaggctt ccaacaaagc cctccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctcccccat cccgggagga gatgaccaag	1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc	1200
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggtaa atgactcgag	1350

<210> 50

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 50

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	60
atcaactgca agtcagcca gagtctttta gctagcggca accaaaataa ctacttagct	120
tggcaccagc agaaaccagg acagcctcct aagatgtcga ttatttgggc atctacccgg	180
glatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc	240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaatc ctatagtgt	300
cctctcacgt tcggaggcgg taccaagggtg gagatcaaac gtacgggtggc tgcaccatct	360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc	420
ctgtgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc	480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gacgaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtcaacc atcagggcct gagctgcgcc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt	660
tgactcgag	669

<210> 51

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of H2-light

<400> 51

gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgccgtca cccctggaga gccggcctcc	60
atctctgca agtcagtcga gagtctttta gctagtggca accaaaataa ctacttgcc	120
tggcacctgc agaagccagg gcagctcca cagatgtga tcatttgggc atccactagg	180
gtatctggag tcccagacag gttcagtggc agtgggtcag gcactgattt cacttgaaa	240
atcagcaggg tggaggctga ggatgttga gtttattact gccagcagtc ctacagcgt	300
ccgtcacgt tcggacaggg taccaagctg gagctcaaac gtacgggtggc tgcaccatct	360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc	420
ctgtgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc	480

caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gaggcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
tgactcgag 669

<210> 52

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 52

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtcagcca gagtctttta gctagcggca accaaaataa ctacttagct 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttatttgggc atctaccggg 180
glatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaatc ctatagtgt 300

cctctcacgt tcggaggcgg taccaaggtg gagatcaaac gtacggtggc tgcaccatct 360
gtcttcacgt tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gaggcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
tgactcgag 669

<210> 53

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 53

gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc 60
atcacctgca agtcacgtca gagtctttta gctagtggca accaaaataa ctacttggcc 120
tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg aaaatgctga ttatttgggc atccactagg 180
glatctggag tcccttctcg cttctctgga tccgggtctg ggacggattt cactctgacc 240

atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca acttattact gtcagcagtc ctacagcgct 300

ccgctcacgt tcggacaggg taccaaggtg gagatcaaac gtacggtggc tgcaccatct 360

gtcttcacgt tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420

ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480

caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gacgaggaca gcaaggacag cacctacagc 540

ctcagcagca cctgacgct 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 Gly Ser Gly 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

gctagcgttt tagcagaagt tcaattgggt gaatctgggt gtggtttggt tcaaccaggt 60

ggttctttga gattgtcttg tgctgcttct ggttttactt tcaccgatta ttacatgtcc 120

tgggttagac aagctccagg taaaggtttg gaatgggttg gtttcattag aaacaaggct 180

aacggttaca ctaccgaata ttctgcttct gttaagggtg gattcacat ttctagagac 240

aactctaaga acaccttgta cttgcaaatg aactcctga gagctgaaga tactgctgtt 300

tattactgcg ctagagataa ttggtttgct tatitggggtc aaggtacttt ggttactgtt 360

tcttttgccc tcgggggcct cggaggagga gtagtggcg gaggaggctc cgggtgatcc 420

agcgggtgtgg gticcgatat tcaaatgacc caatctccat cttctttgtc tgcttcagtt 480

ggatgatagag ttaccattac ttgtaagtcc tccaatctt tgttggttc tgtaaatcag 540

aacaattact tggttggca tcaacaaaaa ccaggtaaag ctccaaagat gttgattatt 600

tgggcttcta ccagagtffc tgggtttcca tctagatttt ctggttctgg ttccggtact 660

gattttactt tgaccatttc atccttgcaa ccagaagatt tcgctactta ctactgtcaa 720

caatcttact ctgtccatt gacttttggc caaggtacaa aggtcgaaat caagagagaa 780

ttcggtaagc ctatccctaa ccctctctc ggtctcgatt ctacgggtgg tgggtgatct 840

ggtggtggtg gttctggtgg tgggtgttct caggaaactga caactatatg cgagcaaadc 900

ccctcaccaa ctttagaatc gacgccgtac tctttgtcaa cgactactat ttggccaac 960

gggaaggcaa tgcaaggagt ttttgaatat tacaatcag taacgtttgt cagtaattgc 1020

ggtttctacc cctcaacaac tagcaaaggc agccccataa 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 cctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt 60

cctcgtcttc accggtcgag ttctgaaac gcagatgtgc ctgcgcgcgc actgctccga 120

acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac 180

ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga 240

ttagtttttt agccttatit ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt ttgatctat 300

taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc 360

ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatac 420

ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac cccggatcgg actactagca gctgtaatac 480

gactcactat agggaaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt 540

tacttcgctg tttttcaata ttttctgtta ttgctagcgt tttagcagaa gttcaattgg 600

ttgaatctgg tgggtggttg gttcaaccag gtggttcttt gagattgtct tgtgctgctt 660

ctggttttac tttaccgat tattacatgt cctgggttag acaagctcca ggtaaagggt 720

tggaatggtt gggtttcatt agaaacaagg ctaacggtta cactaccgaa tattctgctt 780

ctgttaaggg tagattcacc atttctagag acaactctaa gaacaccttg tacttgcaaa 840

tgaactcctt gagagctgaa gatactgctg tttattactg cgctagagat aattggtttg 900

cttattgggg tcaaggtact ttggttactg tttcttctgg cctcgggggc ctcgaggag	960
gaggtagtgg cggaggaggc tccggtggat ccagcgggtg gggttccgat attcaaatga	1020
cccaatctcc atcttctttg tctgtttcag ttggtgatag agttaccatt acttgtaagt	1080
cctcccaatc ttgtttggct tctggtaatc agaacaatta cttggcttgg catcaacaaa	1140
aaccaggtaa agctccaaag atgttgatta ttggggcttc taccagagtt tctggtgttc	1200
catctagatt ttctggttct gggttccggtc ctgattttac ttgaccatt tcatecttgc	1260
aaccagaaga ttctgtact tactactgtc aacaatctta ctctgtcca ttgacttttg	1320
gtcaaggtac aaaggtcgaa atcaagagag aattcggtaa gcctatccct aacctctcc	1380
tcggtctcga ttctacgggt ggtggtggat ctggtggtgg tggttctggt ggtggtggtt	1440
ctcaggaact gacaactata tgcgagcaaa tccctcacc aactttagaa tcgacgccgt	1500
actctttgtc aacgactact attttggcca acgggaaggc aatgcaagga gtttttgaat	1560
attacaaatc agtaacgttt gtcagtaatt gcggtttctc cccctcaaca actagcaaag	1620
gcagcccat aaacacacag tatgtttttt gagtttaaac ccgtgatct gataacaaca	1680
gtgtagatgt acaaaaatcg actttgttcc cactgtactt ttagctcgta caaaatacaa	1740
tatacttttc atttctccgt aaacaacatg ttttcccatg taatatectt ttctatttt	1800
cgttccgtta ccaactttac acatacttta tatagctatt cacttctata cactaaaaaa	1860
ctaagacaat tttaattttg ctgcctgcca tatttcaatt tgttataaat tcctataatt	1920
tatectatta gtagctaaaa aaagatgaat gtgaatcgaa tcctaagaga attgggcaag	1980
tgcacaaaca atacttaaat aaatactact cagtaataac ctatttctta gcatttttga	2040
cgaaatttgc tattttgtta gagtctttta caccatttgt ctccacacct ccgcttacct	2100
caacaccaat aacgccattt aatctaagcg catcaccaac attttctggc gtcagtccac	2160
cagctaacat aaaatgtaag ctctcggggc tctcttgccct tccaaccag tcagaaatcg	2220
agttccaatc caaaagtcca cctgtccac ctgcttctga atcaacaag ggaataaacg	2280
aatgaggttt ctgtgaagct gcactgagta gtatgttgca gtcttttga aatacgagtc	2340
ttttaataac tggcaaaccg aggaactctt ggtattcttg ccacgactca tctccgtgca	2400
gttgacgat atcaatgccg taatcattga ccagagccaa aacatcctcc ttaggttgat	2460
tacgaaacac gccaaaccaag tatttcggag tgctgaact atttttatat gcttttacia	2520
gacttgaaat tticcttgca ataaccgggt caattgttct ctttctattg ggcacacata	2580
taataccag caagtcagca tcggaatcta gagcacattc tgcggcctct gtgctctgca	2640

agccgcaaac tticaccaat ggaccagaac tacctgtgaa attaataaca gacatactcc	2700
aagctgcctt tgtgtgctta atcacgtata ctacagtgt caatagtcac caatgccctc	2760
cctcttggcc ctctcctttt cttttttcga ccgaatttct tgaagacgaa agggcctcgt	2820
gatacgcccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttagg acggatcgct	2880
tgctgtaac ttacacgcgc ctctgtatctt ttaatgatgg aataatttgg gaatttactc	2940
tgtgtttatt tatttttatg ttttgtattt ggattttaga aagtaaataa agaaggtaga	3000
agagttacgg aatgaagaaa aaaaaataaa caaaggttta aaaaatttca acaaaaagcg	3060
tactttacat atatatttat tagacaagaa aagcagatta aatagatata cattcgatta	3120
acgataagta aaatgtaaaa tcacaggatt ttcgtgtgtg gtcttctaca cagacaagat	3180
gaaacaattc ggcattaata cctgagagca ggaagagcaa gataaaaggt agtatttgtt	3240
ggcgatcccc ctagagtctt ttacatcttc ggaaaacaaa aactattttt tctttaattt	3300
ctttttttac ttctattttt taatttataat atttataatta aaaaatttaa attataatta	3360
tttttatagc acgtgatgaa aaggaccag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa	3420
cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgtcatg agacaataac	3480
cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg	3540
tcgcccttat tccttttttt gcggcatttt gccttctgt ttttgtcac ccagaaacgc	3600
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaaactgg	3660
atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga	3720
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcggt tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc	3780
aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttgggt tgagtactca ccagtacag	3840
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga	3900
gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg	3960
cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga	4020
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt	4080
tgcgcaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact	4140
ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg gctggctggt	4200
ttattgtgta taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg	4260
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacgggcagt caggcaacta	4320
tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag catttgtaac	4380

tgtagacca agtttactca tatatacttt agattgatth aaaacttcat ttttaattta	4440
aaaggatcta ggtagagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt	4500
tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt	4560
ttttctgcg cgtaaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt	4620
gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc	4680
agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg	4740
tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tctgtttacc agtggctgct gccagtggcg	4800
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag ggcagcgggt	4860
cggtctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac	4920
tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgt tcccgaagg agaaaggcgg	4980
acaggtatcc ggtagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg	5040
ggaacgcctg gtatctttat agtctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat	5100
ttttgtgatg ctctcaggg gggccgagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt	5160
tacggttect ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttctgcg ttatccctg	5220
attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgtcgc gcgagccgaa	5280
cgaccgagcg cagcgagta gtgagcgagg aagcggaaga gcgccaata cgcaaaccgc	5340
ctctccccgc ggttggccg attcatat gtagctggca cgacaggttt cccgactgga	5400
aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcacccagg	5460
ctttacatt tatgttccg gctctatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc	5520
acacaggaag cagctatgac catgattacg ccaagctcgg aattaaccct cactaaaggg	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

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding CDR-L3 derived from L3-1 clone

<400> 58

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttg 60

ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc 120

ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgca agtccagtca gagtctttta 180

gctagtggca accaaaataa ctacttgcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg 240

aaaatgctga ttatttgggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga 300

tccgggtctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca 360

acttattact gtcagcagtc ctacagccgc ccgtacacgt tcggacaggg taccaaggtg 420

gagatcaaac gtacg 435

<210> 59

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding CDR-L3 derived from L3-2 clone

<400> 59

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttg 60

ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc 120

ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgca agtccagtca gagtctttta 180

gctagtggca accaaaataa ctacttgcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg 240

aaaatgctga ttatttgggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga 300

tccgggtctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca 360

acttattact gtgggcagtc ctacagccgt ccgtcacgt tcggacaggg taccaaggtg 420

gagatcaaac gtacg 435

<210> 60

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding CDR-L3 derived from L3-3 clone

<400> 60

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttg 60

ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc 120
ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgca agtcagtcga gagtctttta 180

gctagtggca accaaaataa ctacttggcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg 240
aaaatgctga ttatttgggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga 300
tccgggtctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca 360
acttattact gtgcacagtc ctacagccat ccgtttcttt tcggacaggg taccaaggtg 420
gagatcaaac gtacg 435

<210> 61

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding CDR-L3 derived from L3-5 clone

<400> 61

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttg 60
ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgacccagtc cccgagctcc 120
ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgca agtcagtcga gagtctttta 180
gctagtggca accaaaataa ctacttggcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg 240
aaaatgctga ttatttgggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga 300
tccgggtctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca 360
acttattact gtcagcagtc ctacagccgc ccgtttacgt tcggacaggg taccaaggtg 420

gagatcaaac gtacg 435

<210> 62

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide consisting of heavy chain variable region of
huAbF46-H4-A1, U6-HC7 hinge and constant region of human IgG1

<400> 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	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 gtttttctcg taacactttt aaatggtatc 60
cagtgtgagg ttacgtggt ggagctctgg ggtggcctgg tgcagccagg gggctcactc 120
cgtttgtcct gtgcagcttc tggcttcacc ttactgatt actacatgag ctgggtgcgt 180
caggccccgg gtaagggcct ggaatggttg ggttttatta gaaacaaagc taatggttac 240

acaacagagt acagtgcac tgtgaagggt cgtttcacta taagcagaga taattccaaa 300
aacacactgt acctgcagat gaacagcctg cgtgctgagg aactgccgt ctattattgt 360
gctagagata actggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcaccgt ctctcgggt 420
agcaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac 660

atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720
agctgcgatt gccactgtcc tccatgtcca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac 960
cgtgtggtca gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 1260
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa atgactcgag 1410

<210> 64

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 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 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				
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				
390																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 taacactttt aaatggtatc	60
cagtgtgagg ttcagctggt ggagctctgg ggtggcctgg tgcagccagg gggctcactc	120
cgtttgtcct gtgcagcttc tggcttcacc ttactgatt actacatgag ctgggtgcgt	180
caggccccgg gtaagggcct ggaatggttg ggttttatta gaaacaaagc taatggttac	240

acaacagagt acagtgcac tgtgaagggt cgtttcacta taagcagaga taattccaaa	300
aacacactgt acctgcagat gaacagcctg cgtgctgagg acactgccgt ctattattgt	360
gctagagata actggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcaccgt ctctcggct	420
agcaccaagg gcccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac	660

atctgcaac tgaatcaaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagaggaag	720
tgctgtgtgg agtgccccc ctgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc	900
gtggagggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	1080

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg	1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac	1260
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1320
gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1380
tcctgtctc cgggtaaatg actcgag	1407

<210> 66

<211> 460

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 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 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

<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 IgG2

<400> 67

gaattcgccg ccaccatgga atggagctgg gtttttctcg taacactttt aaatggatc 60
cagtgtgagg ttacgtggt ggagctggc ggtggcctgg tgcagccagg gggtcactc 120
cgtttgcct gtgcagcttc tggcttcacc ttactgatt actacatgag ctgggtgcgt 180
caggccccgg gtaagggcct ggaatggttg ggttttatta gaaacaaagc taatggttac 240

acaacagagt acagtgcac tgtgaagggt cgtttcacta taagcagaga taattccaaa 300
aacacactgt acctgcagat gaacagcctg cgtgctgagg aactgccgt ctattattgt 360
gctagagata actggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcaccgt ctctcggct 420
agcaccaagg gcccatcggt ctteccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac 660

acctgcaacg tagatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720
tgttgtgtcg agtgcaccac gtgccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 780
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
gtggtggacg tgagccagca agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 1020
gttccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccatgctgga ctccgacggc 1260
tccttcttcc tctacagaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgct ccgigatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
ctgtctccgg gtaaatgact cgag 1404

<210> 68

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 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 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 Tyr 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

[illegible]

variable region of huAbF46-H4-A1(H36Y) and human kappa constant region						
<400>	69					
aattcactag	tgattaattc	gccgccacca	tggattcaca	ggcccaggtc	ctcatgttgc	60
tgctgctatc	ggtatctggg	acctgtggag	atatccagat	gaccagttcc	ccgagctccc	120
tgtccgcttc	tgtgggcat	agggtcacca	tcacctgcaa	gtccagtcag	agtcttttag	180
ctagtggcaa	ccaaaataac	tacttggcct	ggtaccaaca	gaaaccagga	aaagctccga	240
aaatgctgat	tatttgggca	tccactaggg	tatctggagt	cccttctcgc	ttctctggat	300
ccgggtctgg	gacggatttc	actctgacca	tcagcagtct	gcagccggaa	gacttcgcaa	360
cttattactg	tcagcagttc	tacagccgcc	cgtacacgtt	cggacagggt	accaaggtgg	420
agatcaaacg	tacggtggct	gcaccatctg	tcttcatctt	cccgccatct	gatgagcagt	480
tgaaatctgg	aactgcctct	gttgtgtgcc	tgctgaataa	cttctatccc	agagaggcca	540
aagtacagtg	gaagggtgat	aacgccttcc	aatcgggtaa	ctcccaggag	agtgtcacag	600
agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg	agcaaagcag	660
actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	tcagggcctg	agctcgcccg	720
tcacaaagag	cttcaacagg	ggagagtgtt	gactcgag			758

<210>	70
<211>	240
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	polypeptide consisting of light chain variable region of huAbF46-H4-A1 and human kappa constant region

<400> 70

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu 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