



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월16일
 (11) 등록번호 10-1938698
 (24) 등록일자 2019년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 G01N 33/68 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
 G01N 33/53 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0102395
 (22) 출원일자 2012년09월14일
 심사청구일자 2017년03월22일
 (65) 공개번호 10-2014-0013872
 (43) 공개일자 2014년02월05일
 (30) 우선권주장
 1020120080145 2012년07월23일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 2007, Vol. 27, pp 1934-1946.*
 Ther Adv Med Oncol., 2011, Vol. 3, pp S21-S35.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 삼성전자주식회사
 경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)
 (72) 발명자
 이지민
 서울 금천구 시흥대로 165, 213동 1902호 (시흥동, 남서울힐스테이트아파트)
 김경아
 경기 성남시 분당구 정자일로 121, 101동 803호 (정자동, 더샵스타파크)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 팬코리아특허법인

전체 청구항 수 : 총 28 항

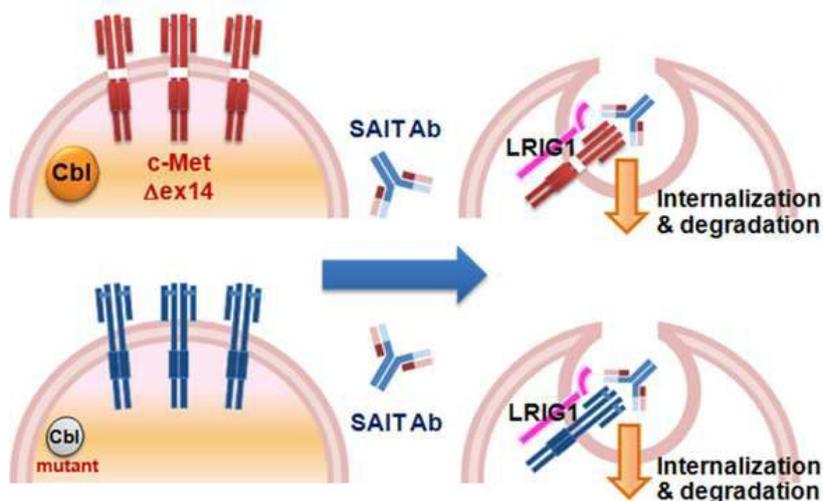
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 CBL의 항 C-MET 항체 적용 대상 환자 선별을 위한 바이오마커로서의 용도

(57) 요약

항 c-Met 항체 적용 대상 환자 선별을 위한 바이오마커, 환자의 종양세포의 Cbl 농도, Cbl 변이 여부, 및/또는 c-Met 의 Cbl 결합 부위 변이 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 항 c-Met 항체 적용 대상 환자를 선별하는 방법, 및 상기 선별된 환자에게 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

김보규

서울 강남구 봉은사로47길 54, (논현동)

오영미

서울 금천구 금하로 816, 522동 1306호 (시흥동,
벽산5단지아파트)

이셋별

서울 마포구 독막로 227-6, 201호 (신수동)

정윤주

경기 안양시 동안구 학의로 390, 103동 1204호 (평
촌동, 푸른마을대우아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 세포 시료의 Cbl 농도, Cbl 변이 여부, 또는 c-Met 의 Cbl과의 상호작용 부위의 변이 여부를 확인하는 단계; 및

(2) 상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우, Cbl 변이가 존재하는 경우, 또는 c-Met 의 Cbl과의 상호작용 부위의 변이가 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 항 c-Met 항체 적용 대상으로 결정하는 단계

를 포함하고,

상기 항 c-Met 항체는 c-Met 단백질의 SEMA 도메인 내의 연속하는 5개 이상의 아미노산으로 이루어진 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편이고, 서열번호 71의 아미노산 서열 내의 서열번호 73의 아미노산 서열(EEPSQ)을 포함하는 연속하는 5 내지 19개의 아미노산으로 이루어진 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우는 상기 Cbl 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cbl 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Cbl 변이는 GenBank Accession Number NM_005188에 제공된 뉴클레오타이드 서열 중의 1169부터 1414까지의 영역 내의 연속하는 51개 이상의 뉴클레오타이드가 결실되거나, 상이한 뉴클레오타이드로 치환되거나, 또는 GenBank Accession Number NP_005199의 아미노산 서열 중의 343부터 424까지의 영역 내의 연속하는 17개 이상의 아미노산이 결실되거나 상이한 아미노산으로 치환된 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 c-Met 의 변이는 c-Met의 1003번째 아미노산 잔기인 타이로신(Y1003)이 결실 또는 상이한 아미노산으로 치환되거나, c-Met 유전자의 엑손 14 중 연속하는 141개 이상의 뉴클레오타이드가 결실 또는 상이한 뉴클레오타이드로 치환되거나, 상기 엑손 14에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드 부위 중 연속하는 46개 이상의 아미노산이 결실 또는 상이한 아미노산으로 치환된 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계를 추가로 포함하는,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 LRIG1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 항 c-Met 항체 적용 대상으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

(1) 세포 시료의 Cb1 농도, Cb1 변이 여부, 또는 c-Met 의 Cb1과의 상호작용 부위의 변이 여부를 확인하는 단계;

(1-1) 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계; 및

(2) 상기 Cb1 농도가 저농도이거나 Cb1이 존재하지 않는 경우, Cb1 변이가 존재하거나, 또는 c-Met 의 Cb1과의 상호작용 부위의 변이가 존재하고, LRIG1이 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체 적용 대상으로 결정하는 단계

를 포함하고,

상기 Cb1 농도가 저농도이거나 Cb1이 존재하지 않는 경우는 상기 세포 시료의 Cb1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cb1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우이고,

상기 LRIG1이 존재하는 경우는 상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 항 c-Met 항체는 서열번호 71, 서열번호 72, 또는 서열번호 73의 아미노산 서열을 갖는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항 c-Met 항체는,

서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 5의 아미노산 서열, 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 내의 2번째부터 10번째까지의 아미노산을 포함하는 연속하는 8 내지 19개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2, 및 서열번호 6의 아미노산 서열, 서열번호 85의 아미노산 서열, 또는 서열번호 85의 아미노산 서열 내의 1번째부터 6번째까지의 아미노산을 포함하는 연속하는 6 내지 13개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 7의 아미노산 서열 또는 서열번호 86의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2, 및 서열번호 9, 서열번호 15, 또는 서열번호 89의 아미노산 서열 내의 1번째부터 9번째까지의 아미노산을 포함하는 9 내지 17개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하고,

상기 서열번호 4 내지 서열번호 9는 각각 하기 일반식 I 내지 일반식 VI으로 표시되는 아미노산 서열인 항체 또는 항원 결합 단편인, 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법:

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 I에서, Xaa₁은 존재하지 않거나 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 11

제10항에 있어서,

상기 CDR-H1은 서열번호 1, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 CDR-H2는 서열번호 2, 서열번호 25, 및 서열번호 26으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 CDR-H3는 서열번호 3, 서열번호 27, 서열번호 28, 및 서열번호 85로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 CDR-L1은 서열번호 10, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32 및 서열번호 33으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 CDR-L2는 서열번호 11, 서열번호 34, 서열번호 35, 및 서열번호 36으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 16

제10항에 있어서,

상기 CDR-L3는 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 37, 서열번호 86, 및 서열번호 89로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 17

제10항에 있어서,

상기 항 c-Met 항체는 서열번호 1, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H1), 서열번호 2, 서열번호 25, 및 서열번호 26으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H2), 및 서열번호 3, 서열번호 27, 서열번호 28, 및 서열번호 85으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H3)를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32 및 서열번호 33으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L1), 서열번호 11, 서열번호 34, 서열번호 35, 및 서열번호 36으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L2), 및 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 37, 서열번호 86, 및 서열번호 89로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L3)를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 18

제10항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 17, 서열번호 74, 서열번호 87, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93 또는 서열번호 94의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 75, 서열번호 88, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98 또는 서열번호 99의 아미노산 서열로 이루어진 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 19

제10항에 있어서,

상기 항 c-Met 항체는 서열번호 62, 서열번호 64, 및 서열번호 66으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68 또는 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 20

제10항에 있어서, 상기 항 c-Met 항체는 수탁번호 KCLRF-BP-00220인 하이브리도마 세포에서 생산되는 것인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 21

제1항, 및 제9항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항 c-Met 항체는 단일클론항체인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 22

제1항, 및 제9항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항 c-Met 항체는 마우스 유래 항체, 마우스-인간 키메라 항체 또는 인간화 항체인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 23

제1항, 및 제9항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항 c-Met 항체는 scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' 및 F(ab')₂로 이루어진 군에서 선택되는 항원 결합 단편인,

항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법.

청구항 24

Cb1 농도 확인을 위한 Cb1 검출 물질, Cb1 변이 여부 검출 물질, 및 c-Met 의 변이 여부 검출 물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는,

c-Met에 작용하여 세포내이동 및 분해를 유도하는 항 c-Met 항체의 적용 대상 선별용 조성물로서, 상기 항 c-Met 항체는 서열번호 71의 아미노산 서열 내의 서열번호 73의 아미노산 서열(EEPSQ)을 포함하는, 연속하는 5 내지 19개의 아미노산으로 이루어진 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편인, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 Cb1 농도 측정을 위한 Cb1 검출 물질은 Cb1와 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인,

항 c-Met 항체 적용 대상 선별용 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서,

상기 Cb1 변이 여부 검출 물질은 변이된 Cb1 유전자의 뉴클레오타이드 서열 중 연속하는 10 내지 50개 서열 또는 이에 상보적인 서열, 및 변이된 Cb1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,

항 c-Met 항체 적용 대상 선별용 조성물.

청구항 27

제24항에 있어서,

상기 c-Met 의 변이 여부 검출 물질은 변이된 c-Met 유전자의 뉴클레오타이드 서열 중 연속하는 10 내지 50개 서열 또는 이에 상보적인 서열, 및 변이된 c-Met에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,

항 c-Met 항체 적용 대상 선별용 조성물.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

LRIG1 농도 확인을 위한 LRIG1 검출 물질을 추가로 포함하는,

항 c-Met 항체 적용 대상 선별용 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 LRIG1 농도 확인을 위한 LRIG1 검출 물질은 LRIG1과 특이적으로 결합하는 항체 및 압타머로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,

항 c-Met 항체 적용 대상 선별용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항 c-Met 항체 적용 대상 환자 선별을 위한 바이오마커, 환자의 종양세포의 Cbl 농도, Cbl 변이 여부, 및/또는 c-Met 의 Cbl 결합 부위 변이 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 항 c-Met 항체 적용 대상 환자를 선별하는 방법, 및 상기 선별된 환자에게 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, c-Met 억제 방법 및/또는 c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] c-Met은 간세포 성장 인자 (hepatocyte growth factor, HGF)의 수용체이며, HGF는 c-Met 수용체 티로신 키나제의 세포의 부위에 결합하여 다양한 정상세포와 종 양세포에서 분열, 운동, 형태발생, 혈관형성을 유발하는 사이토카인의 일종이다. c-Met은 세포 표면에 존재하는 대표적인 수용체 티로신 키나제(receptor tyrosine kinase)로, 그 자체가 암유발 유전자이며, 때로는 리간드인 HGF와 상관 없이도 암발생, 암전이, 암세포 이동, 암세포 침습, 신생혈관 생성 등과 같은 종양과 관련된 여러 가지 기작에 관여하기 때문에 최근 항암 치료의 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(Erbitux) 또는 타세바(Tarceva)와 같은 약물은 암 발생 기작과 관련된 신호 전달을 차단함으로써 작동한다. 또한 유방암 치료제로 잘 알려진 허셉틴(Herceptin)은 ERBB2 (HER2)를 표적으로 세포의 증식에 필요한 신호 전달을 차단함으로써 작동한다. 그러나 상기 약물에 대한 내성이 있는 환자 중, c-Met 단백질의 과발현 등으로 항암제의 작동을 피해 세포의 증식을 유도하는 다른 신호 전달 기작이 활성화된다는 연구들이 최근 발표되고 있다. 이러한 이유로 인해, c-Met은 항암제와 관련하여 다수의 제약사들이 주목하고 있는 표적 분자가 되고 있으며, c-Met의 작용을 저해하는 항체 치료제의 개발이 진행되고 있다.

[0004] 개발된 항체 중에서, 항체가 원래의 구조를 갖는 경우 c-Met의 리간드인 HGF c-Met에 결합하지 못하도록 저해하는 기능은 있으나, 항체 자체의 결합에 의해 리간드와 상관없이 c-Met을 이량체화(dimerization)시켜 오히려 암을 유발하는 신호가 전달되도록 하는 효능제(agonist)로 작용하는 부작용이 발견 되었다. 이와 같은 c-Met의 이량체화를 방지하기 위하여, 양팔 항체 (two-armed antibody)를 유전자 재조합 방식으로 변형시킨 c-Met에 대한 한팔 길항(one-armed antagonistic) 항체가 개발되었으나, 이 항체의 경우 화학요법과 병용치료일 경우에만 효과를 보이며, 항체를 단독으로 처리하는 경우에는 항암 효과가 크지 않은 것으로 확인되었다.

- [0005] 또한, 기존의 연구에 따르면, c-Met를 분해하여 양을 감소시키는 과정에 관여하는 대표적인 주 효소로 Cbl(E3 ligase)이 알려져 있으며, 많은c-Met 억제제가 Cbl을 매개하여 c-Met를 분해하는 활성을 갖는다. 따라서, 이러한 Cbl 매개c-Met 분해 활성을 갖는 c-Met 억제제들은 Cbl이 변이 또는 양적으로 감소되어 있거나, c-Met 단백질이 변이되어 Cbl과 결합하지 못하는 환자 또는 이러한 종류의 암세포에는 소망하는 효과를 얻지 못하는 한계를 갖게 된다.
- [0006] 또한, Cbl 효소가 c-Met에 결합시, c-Met이 리간드인 HGF에 의해서 활성화되면 Y1003 아미노산의 인산화가 유도되고 이를 통하여 Cbl과의 결합이 가능해진다. 즉, Cbl 효소가 c-Met에 결합하기 위해서는 c-Met의 활성화가 필수적으로 전제되어야 한다. 따라서, Cbl에 의한 c-Met분해 및 이를 매개로 하는 항암 치료는 c-Met의 활성화를 필수적 전제 요건으로 하기 때문에, 이에 따른 부작용(agonism)이 필수적으로 수반된다는 문제점이 있다.
- [0007] 따라서, 암 종류 및/또는 개개의 환자의 특성 따라서 c-Met의 작용을 효과적으로 저해하면서도, 부작용이 경감된 새로운 c-Met 저해 기술의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 일 예는 항 c-Met 항체 적용 대상 암세포 및/또는 환자를 선별하기 위한 바이오마커를 제공한다.
- [0009] 또 다른 예는 상기 바이오마커의 측정 수단을 포함하는 항 c-Met 항체 적용 대상 선별용 조성물 및 키트를 제공한다.
- [0010] 또 다른 예는 상기 바이오마커를 측정하여 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법을 제공한다.
- [0011] 또 다른 예는 상기 선별된 항 c-Met 항체 적용 대상에게 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, c-Met 억제 방법을 제공한다.
- [0012] 또 다른 예는 상기 선별된 항 c-Met 항체 적용 대상에게 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자들은 Cbl 효소가 저농도로 존재하거나, 또는 Cbl 및/또는 c-Met의 변이 등으로 인하여 Cbl 효소가 정상적으로 c-Met과 상호작용을 하지 못하는 경우에는 기존의 항 c-Met 항체가 c-Met 분해 활성을 나타내지 못하여 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 발휘하지 못하는 반면, 본 발명에서 제공되는 항 c-Met 항체(이하, 특별한 언급이 없는 한, "고유 항 c-Met 항체"로 기재함)의 경우에는 Cbl 효소가 정상적으로 c-Met과 상호작용을 하지 못하는 경우에도 c-Met 분해 활성이 유지되어 우수한 c-Met 관련 질병 치료 효과를 발휘할 수 있음을 확인하고, Cbl 비의존적 c-Met 관련 질병의 치료 기술을 개발하여 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 따라서, 본 발명의 일 예는 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하기 위한 바이오마커를 제공한다. 구체적으로, 상기 바이오마커는 Cbl 단백질, 이를 암호화하는 Cbl 유전자, Cbl 유전자로부터 유래하는 mRNA, 및 c-Met의 Cbl과의 상호작용 부위로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 항 c-Met 항체 적용 대상은 세포 및/또는 상기 세포가 유래한 환자일 수 있으며, 구체적으로 암세포 및/또는 암세포를 갖는 환자일 수 있다.
- [0015] "Cbl", "Cbl 단백질", 또는 "Cbl 효소"는 E3 라이게이즈 (E3 ligase)라고도 하며, 세포 신호 및 단백질 유비퀴틴화에 수반되는 단백질로서, 암세포의 세포막에 위치하는 c-Met 단백을 세포 안으로 내재화(internalization) 시켜서 분해하는 역할을 하는 물질이다. 상기 단백질은 GenBank Accession Number (NM_005188, NM_007619, NM_170662 또는 NM_001033238)에 제공된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 또는 GenBank Accession Number (NP_005199, NP_031645, NP_733762 또는 NP_001028410)의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다.
- [0016] "c-Met" 또는 "c-Met 단백질"은 간세포 성장 인자와 결합하는 수용체 티로신 키나제를 의미한다. 상기 단백질은 예컨대, GenBank Accession Number NM_000245 에 제공된 뉴클레오타이드 서열(mRNA)에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 또는 그의 세포의 도메인을 포함한다. GenBank Accession Number NP_000236의 아미노산 서열을 갖는

폴리펩타이드일 수 있다. 수용체 티로신 키나제 c-Met은 예컨대, 암발생, 암전이, 암세포 이동, 암세포 침투, 신생혈관 생성 과정 등의 여러 가지 기작에 관여한다.

- [0017] 일 구체예에 따르면, 상기 Cbl 및 c-Met은 각각 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유류로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0018] "c-Met의 Cbl과의 상호작용 부위"는 c-Met의 구조 중에서 Cbl이 인식하고 작용하는 부위로, Cbl에 의한 c-Met의 세포내 이동 및 분해가 가능하도록 하는 부위이다. 대표적인 c-Met의 Cbl과의 상호작용 부위로서 Cbl과의 결합 부위인 1003번째 아미노산 잔기인 타이로신(Y1003), 또는 이를 포함하는 c-Met 유전자의 엑손(exon) 14가 암호화하는 부위를 들 수 있다. 상기 c-Met 유전자의 엑손 14 부위는 NM_000245의 전장 뉴클레오타이드 서열 중에서 3075부터 3215까지의 부위, 또는 NP_000236의 전장 아미노산 서열 중에서 964부터 1009까지의 부위일 수 있다.
- [0019] 지금까지 개발된 항 c-Met 항체의 대부분은 Cbl과 c-Met과의 상호작용에 의한 c-Met의 세포내 분해를 유도하는 메커니즘으로 작용한다. 따라서, 세포 내에 Cbl이 존재하지 않거나 낮은 농도로 존재하거나, Cbl에 기능적 변이가 생겨서 c-Met의 세포내 분해 작용을 하지 못하거나, c-Met의 Cbl과의 상호 작용 부위 (예컨대, 결합부위)가 변이된 경우에는 기존의 항 c-Met 항체는 c-Met 분해 효과를 발휘하지 못하여, 항 c-Met 항체 치료 요법의 효과를 거두지 못하게 된다.
- [0020] 반면, 상기 고유 항 c-Met 항체는 Cbl과 c-Met과의 상호작용 여부와 무관하게 c-Met의 분해 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 바이오마커의 농도 및/또는 변이 여부를 측정하여, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별함으로써, 기존의 항체 치료로 효과를 거두지 못하던 대상에서도 우수한 c-Met 분해 효과 및 이로 인한 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 얻을 수 있는 기술이 제공된다.
- [0021] 이에, 또 다른 예는 세포 시료의 Cbl 농도, Cbl 변이 여부, 및/또는 c-Met의 Cbl과의 상호작용 부위의 변이 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별(진단에 정보를 제공)하는 방법을 제공한다.
- [0022] 구체적으로, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은,
- [0023] 세포 시료의 Cbl 농도, Cbl 변이 여부, 및/또는 c-Met의 Cbl과의 상호작용 부위의 변이 여부를 확인하는 단계를 포함하고,
- [0024] 상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우, Cbl 변이가 존재하는 경우, 및/또는 c-Met의 Cbl과의 상호작용 부위의 변이가 존재하는 경우, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체 적용 대상으로 결정하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 "확인하는 단계"는 확인하고자 하는 인자를 측정하거나, 및/또는 측정된 결과로부터 평가하는 단계를 의미한다.
- [0026] 상기 세포 시료는 인위적으로 제작된 세포, 환자로부터 분리된 세포, 상기 세포의 배양물, 상기 세포의 분쇄물, 상기 세포의 추출물; 또는 상기 세포, 세포 배양물, 세포 분쇄물, 또는 세포 추출물로부터 추출한 단백질, DNA, 또는 RNA 등일 수 있다. 구체적으로 상기 세포는 암세포(종양 세포)일 수 있다. 예컨대, 상기 암세포는 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, 두경부암 등으로 이루어진 군에서 선택된 암세포일 수 있다.
- [0027] 구체예에서, 상기 방법은 상기 세포 등에서 추출한 매우 미량의 단백질, DNA, 또는 RNA로 수행할 수 있는 것을 특징으로 한다. 예컨대, 상기 방법은 0.1 내지 100ug, 구체적으로 0.5 내지 50ug, 보다 구체적으로 1 내지 10ug, 예컨대 약 3 내지 7 ug의 단백질, 및/또는 0.1 내지 50ug, 구체적으로 0.3 내지 30ug, 보다 구체적으로 0.5 내지 5ug, 예컨대 약 0.8 내지 1.2ug의 DNA 또는 RNA로도 수행이 가능하다.
- [0028] 상기 환자는 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유류, 구체적으로 인간일 수 있으며, 예컨대, 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, 두경부암 등으로 이루어진 군에서 선택된 암환자일 수 있다.

- [0029] 또 다른 예는 Cbl 농도 확인을 위한 Cbl 검출 물질, Cbl 변이 여부 검출 물질, 및 c-Met 의 변이 여부 검출 물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 고유 항 c-Met 항체 적용 대상 선별(진단)용 조성물을 제공한다.
- [0030] 또 다른 예는 Cbl 농도 확인을 위한 Cbl 검출 물질, Cbl 변이 여부 검출 물질, 및 c-Met 의 변이 여부 검출 물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 검출 물질 및 검출 수단을 포함하는 고유 항 c-Met 항체 적용 대상 선별(진단)용 키트를 제공한다.
- [0031] 상기 Cbl 농도의 확인은 통상의 단백질 정량 분석 수단에 의하여 측정하거나, 및/또는 측정된 결과를 평가하여 수행될 수 있다. 예컨대, Cbl 농도는 Cbl와 특이적으로 결합하는 항체, 압타머 등을 이용하는 통상적인 효소 반응, 형광, 발광 및/또는 방사선 검출을 통하여 하여 측정될 수 있으며, 구체적으로, 면역크로마토그래피 (Immunochromatography), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry), 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Cbl 농도 측정을 위한 Cbl 검출 물질은 Cbl와 특이적으로 결합하는 항 Cbl 항체, 압타머 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0032] 암세포 내의 Cbl 농도가 저농도 이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우에, 기존의 항 c-Met 항체가 c-Met 분해 활성을 발휘하지 못하여 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 보기 어려운 반면, 상기 고유 항 c-Met 항체의 경우에는 Cbl 비의존적 활성을 나타내므로, Cbl이 존재하지 않거나 낮은 농도로 존재하는 경우에도 우수한 c-Met 분해 및 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 얻을 수 있다. 세포 시료 내의 단백질 측정시 실질적으로 정량적 분석이 어려우므로, 정성적 분석으로 세포 농도를 같음할 수 있다. 예컨대, 목적 단백질의 농도를 이에 대한 항체를 사용하는 면역조직화학염색법으로 시험하는 경우, 염색 강도에 따라서 '-', '+1', '+2', 또는 '+3'의 결과가 얻어지는데, 이 중에서 '-'와 '+1'의 결과가 얻어지는 경우에 상기 목적 단백질이 중간 이하의 비교적 저농도로 존재하거나 존재하지 않는 것으로 결정할 수 있고, '+2', 또는 '+3'의 결과가 얻어지는 경우에는 상기 목적 단백질이 중간 이상의 비교적 고농도로 존재하는 것으로 결정할 수 있다. 따라서, 본 발명에서의 'Cbl 농도가 저농도 이거나 존재하지 않는 경우'는 세포 시료를 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cbl 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'로 측정되는 경우, 또는 다른 단백질 농도 분석법으로 분석한 경우라도 상기 결과와 동등한 정도에 해당하는 것으로 인정될 수 있는 경우로 정의할 수 있다.
- [0033] 따라서, 세포 시료 내의 Cbl 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cbl 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'인 것에 해당하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정할 수 있다.
- [0034] 한 구체예에서, 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은,
- [0035] (1') 세포 시료 내의 Cbl 농도를 확인하는 단계; 및
- [0036] (2') Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계를 포함하고,
- [0037] 이 때, 상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우는 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cbl 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우인 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0038] 상기 Cbl 변이는 c-Met과의 상호작용 (예컨대, 결합) 및/또는 c-Met의 세포 내재화 및/또는 c-Met의 분해와 관련된 기능의 상실을 야기하는 모든 Cbl 유전자의 변이 및/또는 Cbl 단백질의 서열상 또는 구조상의 변이일 수 있다. 구체예에서, 상기 Cbl 변이는 GenBank Accession Number NM_005188에 제공된 뉴클레오타이드 서열 중의 1169부터 1414까지의 영역 내의 연속하는 51개 이상, 예컨대 연속하는 51개 내지 200개의 뉴클레오타이드가 결실되거나, 상이한 뉴클레오타이드로 치환되거나, 또는 GenBank Accession Number NP_005179의 아미노산 서열 중의 343부터 424까지의 영역 내의 연속하는 17개 이상, 예컨대 연속하는 17 내지 100개의 아미노산이 결실되거나 상이한 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이러한 변이는 Cbl의 RING Finger Motif의 변형을 유도하여 E3 ligase 효소로서의 기능을 상실하게 한다. 즉, 다른 단백질을 분해시키는 능력이 뉴클레오타이드나 아미노산의

변이로 인해 사라진다.

- [0039] 상기 Cb1의 기능 상실을 야기하는 Cb1 변이 여부의 확인은 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열의 직접적인 분석, RT-PCR 또는 DNA 서열 시퀀싱 등의 방법에 의하여 측정하거나, 및/또는 측정된 결과를 평가하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 또한, Cb1 변이 여부 검출 물질로 상기와 같은 변이를 검출할 수 있는 프라이머, 및 변이된 Cb1에 특이적으로 결합하는 항 Cb1 항체, 압타머 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Cb1 변이를 검출할 수 있는 프라이머는 변이된 Cb1 유전자의 뉴클레오타이드 서열 중 변이 부위를 포함하는 연속하는 20 내지 50개 서열 및/또는 이에 상보적인 서열이거나, 이들과 혼성화 가능하도록 이들 서열과 80% 이상, 구체적으로 90% 이상, 보다 구체적으로 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열일 수 있다.
- [0041] 이와 같이 Cb1의 c-Met과의 상호작용 및/또는 c-Met의 세포 내재화 및/또는 c-Met의 분해 기능이 상실된 세포에서는 기존의 항 c-Met 항체가 c-Met 분해 활성을 발휘하지 못하여 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 보기 어려운 반면, 고유 항 c-Met 항체의 경우에는 Cb1 비의존적 활성을 나타내므로, 이와 같은 Cb1 기능 상실의 경우에도 우수한 c-Met 분해 및 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 얻을 수 있다.
- [0042] 따라서, 세포 시료 내의 Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자가 위와 같은 변이를 갖는 경우, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정할 수 있다.
- [0043] 한 구체예에서, 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은,
- [0044] (1'') 세포 시료 내의 Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 변이 여부를 확인하는 단계; 및
- [0045] (2'') Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 변이가 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계
- [0046] 를 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 c-Met의 변이는 c-Met의 Cb1이 인식 및/또는 결합하는 부위에 발생한 변이를 의미하는 것으로, Cb1이 양적으로 충분히 존재하거나 기능 상실 변이가 발생하지 않은 경우에도 Cb1이 c-Met과 상호작용 (예컨대, 결합)하지 못하도록 하는 변이를 의미한다.
- [0048] "c-Met의 Cb1과의 상호작용 부위"는 c-Met의 구조 중에서 Cb1이 인식하고 작용하는 부위로, Cb1에 의한 c-Met의 세포내 이동 및 분해가 가능하도록 하는 부위이다. 대표적인 c-Met이 Cb1과 상호작용하는 부위로서 Cb1과의 결합부위인 1003번째 아미노산 잔기인 타이로신(Y1003) 또는 c-Met 유전자의 엑손(exon) 14가 암호화하는 부위를 들 수 있다. 상기 c-Met 유전자의 엑손 14 구간은 NM_000245의 전장 뉴클레오타이드 서열 중에서 3075부터 3215까지의 부위, 또는 NP_000236의 전장 아미노산 서열 중에서 964부터 1009까지의 부위일 수 있다. 상기 c-Met의 변이는 c-Met의 1003번째 아미노산 잔기인 타이로신(Y1003)이 결실되거나 다른 아미노산(예컨대, 알라닌, 이소류신, 류신, 케티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 발린, 아스파라긴, 시스테인, 글루타민, 글라이신, 세린, 트레오닌, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌, 히스티딘, 및 라이신으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산, 구체적으로 페닐알라닌)으로 치환된 것, 또는 상기 c-Met 유전자의 엑손 14 구간 중 연속하는 141개 이상, 예컨대 연속하는 141개 내지 300개의 뉴클레오타이드가 결실되거나 다른 뉴클레오타이드로 치환된 것, 및/또는 상기 엑손 14 구간에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드 부위 중 연속하는 46개 이상, 예컨대, 연속하는 46개 내지 100개의 아미노산이 결실되거나 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 구체예에서, 상기 c-Met의 변이는 c-Met의 1003번째 아미노산 잔기인 타이로신(Y1003)의 결실 또는 페닐알라닌으로의 치환 (즉, Y1003F 등), 또는 c-Met 유전자의 상기 엑손 14 구간 결실 또는 c-Met 단백질의 상기 엑손 14 구간에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드 결실일 수 있다.
- [0049] 상기 c-Met의 변이 여부의 확인은 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열의 직접적인 분석, RT-PCR 실험, 또는 DNA 서열 시퀀싱 등의 방법에 의하여 측정하거나, 및/또는 측정된 결과를 평가하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, c-Met의 변이 여부 검출 물질로 상기와 같은 변이를 검출할 수 있는 프라이머 (변이된 c-Met 유전자의 뉴클레오타이드 서열 중 변이 부위를 포함하는 연속하는 20 내지 50개 서열 및/또는 이에 상보적인 서열 및/또는 이들 서열과 혼성화 가능하도록 상기 서열과 80% 이상, 구체적으로 90% 이상, 보다 구체적으로 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열), 변이된 c-Met에 특이적으로 결합하는 항체, 압타머 등을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 이와 같이 c-Met의 Cb1이 인식 및/또는 결합하는 부위에서 변이가 발생한 세포에서는 기존의 항 c-Met 항체의

Cbl을 매개하는 c-Met 분해가 일어나지 못하여 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 보기 어려운 반면, 고유 항 c-Met 항체의 경우에는 Cbl 비의존적 활성을 나타내므로, 이와 같은 c-Met 변이의 경우에도 우수한 c-Met 분해 및 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 얻을 수 있다.

- [0051] 따라서, 세포 시료 내의 c-Met 단백질 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자가 위와 같은 변이를 갖는 경우, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정할 수 있다.
- [0052] 한 구체예에서, 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은,
- [0053] (1''') 세포 시료 내의 c-Met 단백질의 Cbl과의 상호작용 부위 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이 여부를 확인하는 단계; 및
- [0054] (2''') c-Met 단백질의 Cbl과의 상호작용 부위 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이가 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계
- [0055] 를 포함할 수 있다.
- [0056] 이와 같이, 기존의 항 c-Met 항체와 달리, 고유 항 c-Met 항체가 Cbl 비의존적으로 c-Met 분해 활성을 나타낼 수 있는 것은 이 항체가 LRIG1(Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1)과 c-Met의 결합을 유도하여, LRIG1-c-Met 결합체가 세포 내로 이동(internalization)하여 분해되기 때문이다. 따라서, 고유 항 c-Met 항체는 세포 내 LRIG1가 존재하는 경우, 특히 세포 내 LRIG1의 발현량이 높은 경우에 적용되면 보다 우수한 c-Met 분해 활성을 보일 수 있다.
- [0057] "LRIG1(Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1)"은 EGFR-계통, MET 및 RET 단백질 등의 수용체 티로신 카이네이즈와 상호작용하는 막통과 단백질(transmembrane protein)이다. 상기 LRIG1는 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 래트, 마우스 등을 포함하는 설치류 등을 포함하는 포유류로부터 유래하는 것일 수 있으며, 구체적으로 인간의 LRIG1(Accession No. NM_015541 또는 NP_056356)일 수 있다.
- [0058] 상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인은 통상의 단백질 정량 분석 수단에 의하여 측정하거나, 및/또는 측정된 결과를 평가하여 수행할 수 있다. 예컨대, LRIG1 농도는 LRIG1와 특이적으로 결합하는 항체, 압타머 등을 이용하는 통상적인 효소 반응, 형광, 발광 및/또는 방사선 검출을 통하여 하여 측정될 수 있으며, 구체적으로, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 면역조직화학염색, 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 구체예에서, 상기 세포 내 LRIG1가 존재하는 경우, 특히 세포 내 LRIG1의 발현량이 높은 경우는 면역조직화학염색으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3으로 판정되는 경우, 또는 다른 단백질 농도 분석법으로 분석한 경우라도 상기 결과와 동등한 정도에 해당하는 것으로 인정될 수 있는 경우로 정의할 수 있다
- [0060] 따라서, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은, 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은, 상기 결정 단계 (2), (2'), (2'') 또는 (2''') 이전에 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계 (1-1), (1-1'), (1-1'') 또는 (1-1''')를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 방법은 상기 LRIG1 가 존재하는 경우에 고유 항 c-Met 항체 적용 대상으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이 때, 상기 LRIG1 가 존재하는 경우는 세포 시료 내의 LRIG1의 농도가 면역조직화학염색으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우일 수 있다.
- [0061] 보다 구체적으로, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은,
- [0062] (1) 세포 시료의 Cbl 농도, Cbl 변이 여부, 및/또는 c-Met 의 Cbl과의 상호작용 부위의 변이 여부를 확인하는 단계;
- [0063] (1-1) 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계; 및
- [0064] (2) 상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우(예컨대 상기 세포 시료의 Cbl 농도가 면역조직화학염색으로 사용 가능한 항 Cbl 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우),

Cb1 변이가 존재하거나, 및/또는 c-Met 의 Cb1과의 상호작용 부위의 변이가 존재하고, LRIG1이 존재하는 경우 (예컨대, 상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우)에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체 적용 대상으로 결정하는 단계

- [0065] 를 포함할 수 있다.
- [0066] 다른 구체예에서, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은,
- [0067] (1') 세포 시료 내의 Cb1 농도를 확인하는 단계;
- [0068] (1-1') 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계; 및
- [0069] (2') Cb1 농도가 저농도이거나 Cb1이 존재하지 않고, LRIG1이 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계
- [0070] 를 포함하고,
- [0071] 이 때, 상기 Cb1 농도가 저농도이거나 Cb1이 존재하지 않는 경우는 상기 세포 시료의 Cb1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cb1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우이고, 상기 LRIG1이 존재하는 경우는 상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우일 수 있다.
- [0072] 또 다른 구체예에서, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은,
- [0073] (1'') 세포 시료 내의 Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 변이 여부를 확인하는 단계;
- [0074] (1-1'') 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계; 및
- [0075] (2'') Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 변이가 존재하고, LRIG1이 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계
- [0076] 를 포함하고,
- [0077] 이 때, 상기 LRIG1이 존재하는 경우는 상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우일 수 있다.
- [0078] 또 다른 구체예에서, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법은,
- [0079] (1''') 세포 시료 내의 c-Met 단백질의 Cb1과의 상호작용 부위 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이 여부를 확인하는 단계;
- [0080] (1-1''') 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계; 및
- [0081] (2''') c-Met 단백질의 Cb1과의 상호작용 부위 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이가 존재하고, LRIG1이 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계
- [0082] 를 포함하고,
- [0083] 이 때, 상기 LRIG1이 존재하는 경우는 상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우일 수 있다.
- [0084] 또한, 구체예에서, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상 선별용 조성물은 Cb1 농도 확인을 위한 Cb1 검출 물질, Cb1 변이 여부 검출 물질, 및 c-Met 의 변이 여부 검출 물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 더하여, LRIG1 농도 확인을 위한 LRIG1 검출 물질을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 Cb1 농도 확인을 위한 Cb1 검출 물질, Cb1 변이 여부 검출 물질, 및 c-Met 의 변이 여부 검출 물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 및 LRIG1 농도 확인을 위한 LRIG1 검출 물질을 포함하는 것일 수 있다.
- [0085] 또 다른 구체예에서, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상 선별용 키트는 상기 검출 물질로서 LRIG1 농도 확인을 위한 LRIG1 검출 물질을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 키트는
- [0086] Cb1 농도 확인을 위한 Cb1 검출 물질, Cb1 변이 여부 검출 물질, 및 c-Met 의 변이 여부 검출 물질로 이루어진

군에서 선택된 1종 이상의 검출 물질,

- [0087] LRIG1 농도 확인을 위한 LRIG1 검출 물질, 및
- [0088] 검출 수단
- [0089] 을 포함하는 것일 수 있다.
- [0090] 상기 LRIG1 농도 확인을 위한 LRIG1 검출 물질은 LRIG1과 특이적으로 결합하는 항 LRIG1 항체, 압타머 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0091] 상기 키트에 포함되는 검출 수단은 상기한 바와 같은 Cbl 농도, Cbl 변이 여부, c-Met 의 변이 여부, 및/또는 LRIG1 농도 측정 방법에 통상적으로 사용되는 검출 수단일 수 있으며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자라면 측정 방법에 따라 적절한 검출 수단을 용이하게 선택하여 사용할 수 있다.
- [0092] 또 다른 예는 상기 선별된 고유 항 c-Met 항체 적용 대상에게 항 c-Met 항체의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, c-Met 억제 방법을 제공한다.
- [0093] 또 다른 예는 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상으로 선별된 세포 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 항 c-Met 항체의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.
- [0094] 상기 c-Met 억제 방법 및/또는 c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법은 상기 투여 단계 이전에 고유 항 c-Met 항체 적용 대상으로 선별된 세포 또는 상기 세포가 유래한 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0095] 상기 확인 단계는 앞서 설명한 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법에 의하여 선별된 세포 또는 환자를 확인하는 단계로서, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법에서 설명된 단계를 수행함으로써 수행되거나, 상기 고유 항 c-Met 항체 적용 대상을 선별하는 방법에 의하여 선별된 세포 또는 환자임을 확인하는 단계에 의하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0096] 한 구체예에서, 상기 c-Met 억제 방법 또는 c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법은,
- [0097] 고유 항 c-Met 항체 적용 대상으로 선별된 세포 또는 상기 세포가 유래한 환자를 확인하는 단계; 및
- [0098] 상기 세포 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계
- [0099] 를 포함할 수 있다.
- [0100] 다른 구체예에서, 상기 c-Met 억제 방법 또는 c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법은,
- [0101] (1) 세포 시료의 Cbl 농도, Cbl 변이 여부, 및/또는 c-Met 의 Cbl과의 상호작용 부위의 변이 여부를 확인하는 단계; 및
- [0102] (2) 상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우, Cbl 변이가 존재하는 경우, 및/또는 c-Met 의 Cbl과의 상호작용 부위의 변이가 존재하는 경우, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체 적용 대상으로 결정하는 단계; 및
- [0103] (3) 상기 세포 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 고유 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계
- [0104] 를 포함하고,
- [0105] 상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우는 상기 세포 시료의 Cbl 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cbl 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+' 또는 '-'에 해당하는 경우일 수 있다.
- [0106] 또 다른 구체예에서, 상기 c-Met 억제 방법 또는 c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법은,
- [0107] (1') 세포 시료 내의 Cbl 농도를 확인하는 단계;
- [0108] (2'') 상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계; 및
- [0109] (3) 상기 세포 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 고유 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계
- [0110] 를 포함하고,
- [0111] 상기 Cbl 농도가 저농도이거나 Cbl이 존재하지 않는 경우는 상기 세포 시료의 Cbl 농도가 면역조직화학염색용으로

로 사용 가능한 항 Cb1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우일 수 있다.

- [0112] 또 다른 구체예에서, 상기 c-Met 억제 방법 또는 c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법은,
- [0113] (1'') 세포 시료 내의 Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 변이 여부를 확인하는 단계;
- [0114] (2'') Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 변이가 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계; 및
- [0115] (3) 상기 세포 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 고유 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계
- [0116] 를 포함할 수 있다.
- [0117] 또 다른 구체예에서, 상기 c-Met 억제 방법 또는 c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법은,
- [0118] (1''') 세포 시료 내의 c-Met 단백질 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이 여부를 확인하는 단계;
- [0119] (2''') c-Met 단백질 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이가 존재하는 경우에, 상기 세포 또는 상기 세포가 유래된 환자를 고유 항 c-Met 항체의 적용 대상으로 결정하는 단계; 및
- [0120] (3) 상기 세포 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 고유 항 c-Met 항체의 유효량을 투여하는 단계
- [0121] 를 포함할 수 있다.
- [0122] 앞서 설명한 바와 같이, 상기 c-Met 관련 질병의 예방 및/또는 치료 방법은 단계 (2), (2'), (2'') 또는 (2''') 이전에 세포 시료 내의 LRIG1 농도를 확인하는 단계 (1-1), (1-1'), (1-1'') 또는 (1-1''')를 추가로 포함할 수 있다.
- [0123] 또 다른 예에서, 고유 항 c-Met 항체의 상기 선별된 고유 항 c-Met 항체 적용 대상에 적용하기 위한 용도가 제공된다. 구체적으로, Cb1이 존재하지 않거나 저농도로 존재(예컨대, 상기 세포 시료의 Cb1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cb1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우)하거나, 및/또는 Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 기능적 변이가 존재하거나, 및/또는 c-Met 단백질의 Cb1과의 상호작용 부위 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이가 존재하는 세포에 적용하거나 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 투여하여 c-Met를 억제하거나 c-Met 관련 질병을 치료하는데 사용하기 위한 고유 항 c-Met 항체의 용도가 제공된다. 상기 c-Met 관련 질병은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0124] 구체예에서, 상기 용도는 Cb1이 존재하지 않거나 저농도로 존재(예컨대, 상기 세포 시료의 Cb1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cb1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우)하거나, 및/또는 Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 기능적 변이가 존재하거나, 및/또는 c-Met 단백질의 Cb1과의 상호작용 부위 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이가 존재하고; LRIG1이 존재하는 경우 (예컨대, 상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우)에 상기 세포에 적용하거나 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 투여하여 c-Met를 억제하거나 c-Met 관련 질병을 치료하기 위한 고유 항 c-Met 항체의 용도일 수 있다.
- [0125] 다른 예에서, Cb1이 존재하지 않거나 저농도로 존재(예컨대 상기 세포 시료의 Cb1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cb1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우)하거나, 및/또는 Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 기능적 변이가 존재하거나, 및/또는 c-Met 단백질의 Cb1과의 상호작용 부위 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이가 존재하는 세포에 적용하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 고유 항 c-Met 항체의 용도가 제공된다. 상기 약제는 c-Met를 억제제 및/또는 c-Met 관련 질병의 치료제일 수 있다.
- [0126] 구체예에서, 상기 용도는 Cb1이 존재하지 않거나 저농도로 존재(예컨대 상기 세포 시료의 Cb1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 Cb1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 '+1' 또는 '-'에 해당하는 경우)하거나, 및/또는 Cb1 단백질 또는 이를 암호화하는 Cb1 유전자의 기능적 변이가 존재하거나, 및/또는 c-Met 단백질의 Cb1과의 상호작용 부위 또는 이를 암호화하는 c-Met 유전자의 변이가 존재하고; LRIG1이 존재하는 경우 (예컨대, 상기 세포 시료 내의 LRIG1 농도가 면역조직화학염색용으로 사용 가능한 항 LRIG1 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 할 때 +2 또는 +3에 해당하는 경우)에, 상기 세포에 적용하거나, 또는 상기 세포가 유래한 환자에게 투여하기 위한 c-Met 억제제 및/또는 c-Met 관련 질병 치료제를 제조하는데 사용하기 위한 고유 항

c-Met 항체의 용도일 수 있다.

- [0127] 상기 c-Met 관련 질병은 c-Met 발현 또는 과발현에 의하여 유발되는 모든 질병을 의미하는 것으로, 대표적으로 암을 들 수 있다. 상기 암은, 이에 제한되지 않지만, 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, 두경부암 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 암 이외에도 c-Met 관련 질병으로 임신성 당뇨 등을 들 수 있다.
- [0128] 상기 약학적 유효량은 목적하는 효과, 예컨대 c-Met 억제 (분해) 효과, c-Met 관련 질병의 예방 또는 치료 효과를 얻기 위하여 필요한 투여량을 의미하는 것으로, 목적하는 효과, 질병 또는 증상의 종류 및 경중, 환자의 상태, 투여 경로, 제형 형태 등에 따라서 적절하게 처방될 수 있다.
- [0129] 본 명세서에서, 별도의 언급이 없는 한, 본 발명에서 제공되는 고유 항 c-Met 항체는 항체 또는 항원 결합 단편을 의미하는 것으로 사용된다. 상기 고유 항 c-Met 항체는 c-Met의 특정 부위, 예컨대 SEMA 도메인 내의 특정 부위를 에피토프로 인식하는 것일 수 있으며, c-Met에 작용하여 세포내이동(internalization) 및 분해(degradation)를 유도하는 모든 항체 또는 그 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0130] HGF(Hepatocyte growth factor)의 수용체인 c-Met은 세포의 부위, 막투과 부위, 세포내 부위의 세 부분으로 구분되며, 세포의 부위의 경우, 이황화 결합에 의해 α -소단위체와 β -소단위체가 연결된 형태로 HGF 결합 도메인인 SEMA 도메인, PSI 도메인(plexin-semaphorins-integrin homology domain) 및 IPT 도메인(immunoglobulin-like fold shared by plexins and transcriptional factors domain)으로 이루어진다. c-Met 단백질의 SEMA 도메인은 서열번호 79의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으며, c-Met의 세포의 부위에 존재하는 도메인으로서, HGF가 결합하는 부위에 해당한다. SEMA 도메인 중에서 특정 부위, 예컨대, 106번째부터 124번째까지에 해당하는 서열번호 71의 아미노산 서열을 갖는 영역은 c-Met 단백질의 SEMA 도메인 내의 에피토프 중 2번과 3번 프로펠러 도메인 사이의 루프(loop) 부위에 해당하며, 본 발명에서 제안되는 고유 항 c-Met 항체의 에피토프로 작용할 수 있다.
- [0131] 용어, "에피토프(epitope)"는 항원 결정 부위(antigenic determinant)로서, 항체에 의해 인지되는 항원의 일부분을 의미하는 것으로 해석된다. 일 구체예에 따르면, 상기 에피토프는 c-Met 단백질의 SEMA 도메인(서열번호 79) 내의 연속하는 5개 이상의 아미노산을 포함하는 부위, 예컨대, c-Met 단백질의 SEMA 도메인(서열번호 79) 내의 106번째부터 124번째까지에 해당하는 서열번호 71 내에 위치하는 연속하는 5개 내지 19개의 아미노산을 포함하는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 에피토프는 서열번호 71의 아미노산 서열 중 서열번호 73(EEPSQ)을 포함하여 연속하는 5 내지 19개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있으며, 예컨대, 서열번호 71, 서열번호 72 또는 서열번호 73의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0132] 상기 서열번호 72의 아미노산 서열을 갖는 에피토프는 c-Met 단백질의 SEMA 도메인 내의 2번과 3번 프로펠러 구조의 도메인 사이의 루프 부위 중 가장 바깥으로 위치한 부위에 해당하며, 상기 서열번호 73의 아미노산 서열을 갖는 에피토프는 일 구체예에 따른 항체 또는 항원 결합 단편이 가장 특이적으로 결합하는 부위이다.
- [0133] 따라서, 고유 항 c-Met 항체는 서열번호 서열번호 71의 아미노산 서열 중 서열번호 73(EEPSQ)을 포함하는 연속하는 5 내지 19개의 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으며, 예컨대, 서열번호 71, 서열번호 72, 또는 서열번호 73의 아미노산 서열을 갖는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0134] 일 구체예에 따르면, 상기 항 c-Met 항체는,
- [0135] 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열번호 5의 아미노산 서열, 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 내의 2번째부터 10번째까지의 아미노산을 포함하는 연속하는 8 내지 19개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2, 및 서열번호 6의 아미노산 서열, 서열번호 85의 아미노산 서열 또는 서열번호 85의 아미노산 서열 내의 1번째부터 6번째까지의 아미노산을 포함하는 연속하는 6 내지 13개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0136] 서열번호 7의 아미노산 서열 또는 서열번호 86의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열번호 9 또는 서열번호 89의 아미노산 서열 내의 1번째부터 9번째까지의 아미노산을 포함하

는 9 내지 17개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

- [0137] 을 포함하고,
- [0138] 상기 서열번호 4 내지 서열번호 9는 각각 하기 일반식 I 내지 일반식 VI으로 표시되는 아미노산 서열인 항체 또는 항원 결합 단편일 수 있다:
- [0139] 일반식 I
- [0140] Xaa₁-Xaa₂-Tyr-Tyr-Met-Ser (서열번호 4),
- [0141] 일반식 II
- [0142] Arg-Asn-Xaa₃-Xaa₄-Asn-Gly-Xaa₅-Thr (서열번호 5),
- [0143] 일반식 III
- [0144] Asp-Asn-Trp-Leu-Xaa₆-Tyr (서열번호 6),
- [0145] 일반식 IV
- [0146] Lys-Ser-Ser-Xaa₇-Ser-Leu-Leu-Ala-Ser-Gly-Asn-Xaa₈-Xaa₉-Asn-Tyr-Leu-Ala (서열번호 7),
- [0147] 일반식 V
- [0148] Trp-Xaa₁₀-Ser-Xaa₁₁-Arg-Val-Xaa₁₂ (서열번호 8),
- [0149] 일반식 VI
- [0150] Xaa₁₃-Gln-Ser-Tyr-Ser-Xaa₁₄-Pro-Xaa₁₅-Thr (서열번호 9),
- [0151] 상기 일반식 I에서, Xaa₁은 존재하지 않거나 Pro 또는 Ser이고, Xaa₂는 Glu 또는 Asp이며,
- [0152] 상기 일반식 II에서, Xaa₃은 Asn 또는 Lys이며, Xaa₄는 Ala 또는 Val이고, Xaa₅는 Asn 또는 Thr이며,
- [0153] 상기 일반식 III에서, Xaa₆은 Ser 또는 Thr이고,
- [0154] 상기 일반식 IV에서, Xaa₇은 His, Arg, Gln 또는 Lys이고, Xaa₈은 His 또는 Gln이며, Xaa₉는 Lys 또는 Asn이고,
- [0155] 상기 일반식 V에서, Xaa₁₀은 Ala 또는 Gly이며, Xaa₁₁은 Thr 또는 Lys이고, Xaa₁₂는 Ser 또는 Pro이며,
- [0156] 상기 일반식 VI에서, Xaa₁₃은 Gly, Ala 또는 Gln이고, Xaa₁₄는 Arg, His, Ser, Ala, Gly 또는 Lys이며, Xaa₁₅는 Leu, Tyr, Phe 또는 Met이다.
- [0157] 일 구체예에서, 상기 CDR-H1은 서열번호 1, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 CDR-H2는 서열번호 2, 서열번호 25, 및 서열번호 26으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 CDR-H3는 서열번호 3, 서열번호 27, 서열번호 28, 및 서열번호 85로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0158] 상기 CDR-L1은 서열번호 10, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32 및 서열번호 33으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 CDR-L2는 서열번호 11, 서열번호 34, 서열번호 35, 및 서열번호 36으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 CDR-L3은 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 37, 서열번호 86, 및 서열번호 89로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0159] 일 구체예에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 1, 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H1), 서열번호 2, 서열번호 25, 및 서열번호 26으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H2), 및 서열번호 3, 서열번호 27, 서열번호 28, 및 서열번호 85으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-H3)를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32 및 서열번호 33으로 이

루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L1), 서열번호 11, 서열번호 34, 서열번호 35, 및 서열번호 36으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L2), 및 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 37, 서열번호 86, 및 서열번호 89로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드(CDR-L3)를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것일 수 있다.

[0160] 앞서 설명한 바와 같이, "c-Met" 또는 "c-Met 단백질"은 간세포 성장 인자와 결합하는 수용체 티로신 키나제를 의미한다. 상기 c-Met은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트 등의 설치류 등을 포함하는 포유류로부터 유래된 것일 수 있다. 상기 단백질은 예컨대, GenBank Accession Number NM_000245에 제공된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 또는 GenBank Accession Number NP_000236에 제공된 폴리펩타이드 서열에 의해 암호화된 단백질, 또는 그의 세포의 도메인을 포함한다. 수용체 티로신 키나제 c-Met은 예컨대, 암발생, 암전이, 암세포 이동, 암세포 침투, 신생혈관 생성 과정 등의 여러 가지 기작에 관여한다.

[0161] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여 시면역거부반응이 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 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메라 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.

[0162] 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.

[0163] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 마우스 유래 항체, 마우스-인간 키메라 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.

[0164] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 단일클론항체일 수 있다. 상기 단일클론항체는 수탁번호 KCLRF-BP-00220의 하이브리도마로부터 얻어진 것일 수 있다.

[0165] 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($\gamma 1$), 감마2($\gamma 2$), 감마3($\gamma 3$), 감마4($\gamma 4$), 알파1($\alpha 1$) 및 알파2($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[0166] 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_L 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.

[0167] 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, 본 명세서에 있어서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.

[0168] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' 및 F(ab')₂로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원 결합 단편일 수 있다.

- [0169] 용어, "항원 결합 단편"은 번역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 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.
- [0170] Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다.
- [0171] 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.
- [0172] 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.
- [0173] 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.
- [0174] 용어 "힌지 영역(hunge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, CH1 및 CH2 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)를 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다.
- [0175] 동물 유래 항체가 키메라화(chimerization) 과정을 거치게 되면, 동물 유래의 IgG1 힌지는 인간 IgG1 힌지로 치환되지만, 동물 유래 IgG1 힌지는 인간 IgG1 힌지에 비하여 그 길이가 짧고, 두 개의 중쇄 사이의 이황화결합(disulfide bond)이 3개에서 2개로 감소하여 힌지의 경직성(rigidity)이 서로 상이한 효과를 보이게 된다. 따라서, 힌지 영역의 변형(modification)은 인간화 항체의 항원 결합 효율성을 증가시킬 수 있다. 상기 힌지 영역의 아미노산 서열을 변형시키기 위한 아미노산의 결실, 부가 또는 치환 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0176] 이에, 본 발명의 일 구체예에서, 항원 결합 효율성을 증진시키기 위하여, 상기 고유 항 c-Met 항체 또는 항원 결합 단편은 하나 이상의 아미노산이 결실, 부가 또는 치환되어 아미노산 서열이 변형된 힌지 영역을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 서열번호 100, 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103 또는 서열번호 104의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [0177] 일 구체예에 따르면, 고유 항 c-Met 항체 또는 항원 결합 단편에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 17, 서열번호 74, 서열번호 87, 서열번호 90, 서열번호 91, 서열번호 92, 서열번호 93 또는 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 75, 서열번호 88, 서열번호 95, 서열번호 96, 서열번호 97, 서열번호 98 또는 서열번호 99의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0178] 일 구체예에서, 고유 항 c-Met 항체는 수탁번호 KCLRF-BP-00220인 하이브리도마 세포에서 생산되는, c-Met 단백질의 세포외 부위(extracellular region)에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체일 수 있다 (대한민국 공개특허 제2011-0017698호 참조; 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 포함됨).
- [0179] 상기의 고유 항 c-Met 항체는 대한민국 공개특허 제2011-0017698호에 정의된 항체를 모두 포함할 수 있다.
- [0180] 일 구체예에서, 상기 고유 항 c-Met 항체는 서열번호 62, 서열번호 64, 및 서열번호 66으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68 또는 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체일 수 있다.
- [0181] 예컨대, 상기 고유 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. 또는, 상기 고유 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.

- [0182] 한편, 상기 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드는 서열번호 13의 CDR-L3 중쇄 가변 영역과 인간의 카파 불변영역을 포함하는 경쇄이며, 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드는 상기 서열번호 70의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드에서 36번 히스티딘 (histidine)이 티로신 (tyrosine)으로 치환된 형태의 폴리펩타이드다. 상기 치환으로 인하여, 일 구체예에 따른 항체의 생산량이 증가될 수 있다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 상기 고유 고유 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 항체일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 66의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는 경쇄로 이루어진 항체일 수 있다.
- [0183] 다른 예에서, 상기 항 고유 c-Met 항체 또는 항원 결합 단편은 이의 약학적 유효량과, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 및/또는 부형제 등과 함께 약학 조성물 형태로 제공될 수 있다.
- [0184] 상기 항 c-Met 항체가 약학적 조성물로 제조되는 경우, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는, 항체의 제제화에 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, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용되는 희석제, 부형제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0185] 상기 항 c-Met 항체 또는 이의 약학적 유효량을 포함하는 약학 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.
- [0186] 상기 항 c-Met 항체 또는 이의 약학적 유효량을 포함하는 약학 조성물의 적절한 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.
- [0187] 상기 항 c-Met 항체 또는 이의 약학적 유효량을 포함하는 약학 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.
- [0188] 또한, 상기 항 c-Met 항체 또는 이의 약학적 유효량을 포함하는 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0189] 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.
- [0190] 일 구체예에 따르면, 상기 항체는 c-Met 단백질의 길항제(antagonist) 작용을 하는 것일 수 있다.
- [0191] 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 감소시키거나, 리간드에 의해 활성화되었던 세포를 무능력화시키거나, 또는 사멸시키는 작용을 할 수 있다. 또한, 길항제는 수용체-리간드 사이의 상호

작용을 완전히 단절시키거나, 수용체의 3차 구조의 변화, 또는 감소 조절(down regulation)에 의해 상기 상호작용을 실질적으로 감소시킬 수 있다.

발명의 효과

[0192] 본 발명은 상기 고유 항 c-Met 항체 투여 범위를 확장하기 위한 것으로, 기존의 항 c-Met 항체가 c-Met 분해 활성을 나타내지 못하는 Cbl의 양적 감소 또는 변이 또는 c-Met의 변이가 존재하는 세포(암세포) 또는 이를 포함하는 환자에게 상기 고유 항 c-Met 항체 투여 범위를 확장하여, 보다 효과적으로 Cbl 비의존적으로 c-Met 분해 및/또는 c-Met 관련 질병의 치료 효과를 얻을 수 있도록 한다. 본 발명에 의하면, 각 세포 또는 각 환자의 세포 특성에 따라 적절한 맞춤 치료가 가능하다.

[0193] 또한 Cbl이 매개하는 항암제의 경우 c-Met이 오히려 활성화되는 부작용을 가져올 수 있으나, 본 발명에서 제안되는 바와 같이 Cbl-비의존적으로 작동할 경우, c-Met의 활성화 없이도 c-Met을 표적화하는 것이 가능하므로, agonism으로 인한 부작용을 줄일 수 있다.

[0194] 또한, 매우 미량의 단백질 또는 RNA를 사용하여 효과적인 항 c-Met 항체 투여 대상을 선별함으로써, 항암 치료의 비용, 시간 및 효능면에서의 효율을 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0195] 도 1a 내지 1d는 c-Met을 표적으로 하는 항체 종류에 따른 c-Met에 대한 *in vitro*에서의 효능 차이를 보여주는 것으로,

1a는 NCI-H441 세포에 항 c-Met 항체를 처리한 후 24시간동안 배양한 후, ELISA를 통하여 측정된 잔존하는 c-Met 농도를 대조군(IgG 처리군, 100%)에 대한 상대값으로 보여주는 그래프이다,

1b는 NCI-H441 (왼쪽) 및 Caki-1 (오른쪽) 세포에서의 c-Met 다운스트림 인산화효소의 인산화 정도를 웨스턴블라팅으로 측정된 결과를 보여주는 사진이고,

1c는 MKN45 세포를 항 c-Met 항체로 처리하고 24시간동안 배양 후, ELISA를 통하여 측정된 잔존하는 c-Met 농도를 대조군 (IgG 처리군, 100%)에 대한 상대값으로 보여주는 그래프이며,

1d는 MKN45 세포를 다양한 농도의 IgG (○) 또는 c-Met 항체 L3-1Y (◆)로 72시간동안 처리한 후 CCK-8 에세이를 통하여 측정된 세포 생존률(%)을 대조군 (항체 미처리군, 100%)에 대한 상대값으로 나타낸 그래프이다(mean ± SD).

도 2a 내지 2d는 c-Met 시그널링 및 Cbl-매개 분해를 보여주는 것으로,

2a는 항 c-Met 항체를 이용한 공-면역침전(Co-immunoprecipitation) 실험 결과를 보여주는 사진이고,

2b는 EBC-1 및 NCI-H441 세포를 항 c-Met 항체로 처리하고 4시간동안 배양한 후 ELISA를 통하여 측정된 잔존하는 c-Met 농도를 대조군(배지)에 대한 상대값으로 보여주는 그래프이며,

2c는 EBC-1 및 NCI-H441 세포에서의 Cbl 단백질 농도를 웨스턴 블라팅으로 측정된 결과를 보여주는 그래프이고,

2d는 c-Met의 활성화를 억제하는 억제제 PHA-665752 (Selleck Chemicals)를 처리한 이후에 L3-1Y와 5D5가 c-Met의 양적 감소를 유도하는지를 확인하는 것으로 L3-1Y는 5D5와 달리 c-Met의 활성화가 억제되더라도 c-Met의 양적 감소를 유도할 수 있음을 확인하였다. 2e는 EBC-1 세포를 다양한 농도의 항체 5D5 (○) 또는 항체 L3-1Y (◆)를 72시간 동안 처리한 후 CCK-8 에세이에 의하여 측정된 세포 생존률(%)을 대조군 (항체 무처리군, 100%)에 대한 상대값으로 보여주는 그래프이다.

도 3a 내지 3f는 항체 L3-1Y가 Cbl 비의존적인 메커니즘으로 c-Met 분해를 유도함을 보여주는 것으로,

3a 및 3b는 EBC-1 세포 (3a) 및 NCI-H441 세포 (3b)로부터 얻어진 단백질 추출물을 항체 L3-1Y 또는 5D5 항체와 함께 배양하고, 항-Ub 항체를 사용하여 면역블라팅하여 얻어진 사진이고,

3c는 Cbl siRNAs 형질전환된 EBC-1 세포를 항 c-Met 항체로 처리한 처리군 에서의 잔존하는 c-Met 농도를

ELISA로 측정된 결과를 대조군(IgG 처리군, 100%)에 대한 상대값으로 보여주는 그래프이며,

3d는 EBC-1 세포를 항 c-Met 항체와, DMSO 또는 MG132로 처리한 후 ELISA를 통하여 측정된 잔존하는 c-Met 농도를 대조군 (IgG 처리군, 100%)에 대한 상대값으로 나타낸 그래프이고,

3e는 HS746T 세포를 다양한 농도의 항체 5D5 (○) 또는 항체 L3-1Y (◆)로 처리한 후 CCK-8 에세이에 의하여 측정된 세포의 상대적 생존률(%)을 보여주는 그래프이며,

3f는 HS746T 세포를 다양한 농도의 IgG (○), 항체 L3-1Y (◆), 및 5D5 (▲)로 처리 후 세포 자멸사 (apoptosis) 비율을 Caspase 3/7 Glo 에세이를 통하여 측정된 결과를 보여주는 그래프이고,

3g는 EBC-1 세포를 다양한 농도의 항체 L3-1Y, 및 5D5로 처리 후 세포 자멸사(apoptosis) 비율을 Caspase 3/7 Glo 에세이를 통하여 측정된 결과를 보여주는 그래프이다.

도 4a 내지 4g는 LRIG1가 c-Met 항체 L3-1Y 유도 c-Met 분해를 매개함을 보여주는 것으로,

4a는 EBC-1 세포에 항체 L3-1Y를 처리하고 얻어진 세포 용해물을 항 c-Met 항체 컨쥬게이트된 비드로 면역침전시킨 후, 항-LRIG1 항체에 대한 면역블라팅 분석을 수행한 결과를 보여주는 사진으로, 항체 L3-1Y가 체내 수준 농도(endogenous level)에서 c-Met 및 LRIG1 간의 결합을 유도함을 보여주고,

4b는 HEK-293T 세포에 항체 L3-1Y 또는 5D5 항체를 120분동안 처리한 후, LRIG1와 c-Met와의 공면역침전 분석 결과를 보여주는 사진이고,

4c는 EBC-1세포에서 5D5와 비교하여 L3-1Y에 의한 세포 사멸유도를 FACS 실험기법으로 분석하여 도출한 그래프이다.

4d는 EBC-1 세포를 다양한 농도의 항체 L3-1Y (◆) 또는 5D5 (○)로 72시간 동안 처리한 후, Caspase 3/7 Glo 에세이로 측정된 세포자멸사 비율을 보여주는 그래프이고,

4e는 LRIG1이 녹다운된 EBC-1 세포의 항체 L3-1Y (◆) 처리에 따른 세포자멸사 비율을 보여주는 그래프이며,

4f는 EBC-1 세포를 항 c-Met 항체와, DMSO 또는 콘카나마이신으로 처리한 후, ELISA를 통하여 측정된 잔존하는 c-Met 농도를 대조군 (IgG 처리군, 100%)와 비교하여 보여주는 그래프이고,

4g는 EBC-1(왼쪽) 및 MKN45(오른쪽) 세포에서 L3-1Y항체와 lysosome의 co-localization을 본 면역형광 이미지 사진이다.

도 5a 내지 5d는 생체내(*in vivo*)에서 Cb1 돌연변이 종양 또는 Cb1 음성 종양에서도 LRIG-1이 c-Met 분해 및 종양 성장 억제를 매개함을 보여주는 결과로서,

5a 및 5b는 EBC-1 세포 (5c) 또는 HS746T 세포 (5d)의 세포 이동 능력의 변화를 보여주는 그래프이다.

5c 및 5d는 EBC-1 세포 (5c) 또는 HS746T 세포 (5d)의 시간에 따른 종양 부피 성장을 보여주는 그래프 (n=15)이다.

도 6은 항체 L3-1Y의 EGFR 표적 치료 요법에 내성이 있는 종양에서의 치료 효과를 보여주는 것으로,

6a는 HCC827, HCC827 ER10, 및 HCC827 ER15 세포에서의 p-c-Met, c-Met, EGFR, Cb1, LRIG1, 및 GAPDH 발현을 각각의 항체를 사용한 면역블라팅으로 분석한 결과를 보여주는 사진이고,

6b는 HCC827 ER15 세포를 Erlotinib 및/또는 항체 L3-1Y로 72시간 동안 처리한 후 CTG 에세이에 의하여 측정된 상대적 세포 생존률을 보여주는 그래프며,

6c는 HCC827 ER15 세포를 항 c-Met 항체 및 100nM Erlotinib로 처리하고, 24시간 동안 배양 후, ELISA를 통하여 잔존하는 c-Met 농도를 대조군 (IgG 처리군, 100%)와 비교한 상대값으로 측정된 결과를 보여주는 그래프로, c-Met 분해 효율을 나타내고,

6d는 EGFR, Cb1, 및 로딩 대조물질 GAPDH를 환자로부터 얻은 LXF 1422, LXFA 526, 및 LXFA 1647 샘플에서 웨스턴 블라팅으로 분석한 결과를 보여주는 사진이며,

6e는 LXF 1422, LXFA 526, 및 LXFA 1647 샘플로부터 얻은 c-Met 유전자의 엑손 14를 포함하는 RT-PCR 산물의 아가로오스 젤 전기영동 사진이고,

6f는 LXF 1422, LXFA 526, 및 LXFA 1647 샘플에 항체 L3-1Y를 처리한 경우의 클론형성능(clonogenicity)을 항

체 무처리군과 비교하여 나타낸 결과이다.

도 7은 erlotinib 내성 군주에서의 내성 생성 여부를 확인 결과를 보여주는 그래프이다.

도 8은 항체 L3-1Y 유도 Cbl-비의존적 c-Met 분해 가설을 보여주는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0196] 본 발명은 Cbl-비의존적이거나 부분적으로 의존적인 경우에도 확대 적용 가능한 특성을 가지는 고유 항 c-Met 항체의 대한 것이다. 구체적으로, 증대되어 있는 c-Met의 양을 줄이는 기존의 치료제는 Cbl에만 의존적이므로 Cbl에 문제가 생겨 c-Met이 비정상적으로 많아진 경우에는 전혀 작용을 할 수 없게 된다. 그러나 본 발명에서 제공되는 고유 항 c-Met 항체는 이와 같이 Cbl에 문제가 생겨 c-Met이 비정상적으로 많아진 경우에도 치료가 가능하다. 이를 통하여, c-Met이 Cbl과 결합을 못하거나 Cbl이 비정상적으로 작동함을 분자적으로 미리 진단하여 고유 항 c-Met 항체에 효능을 보일 수 있는 환자 집단을 선별해낼 수 있다.
- [0197] 본 발명에서 제공되는 고유 항 c-Met 항체의 특유한 Cbl-비의존적 c-Met 양적 감소 기작을 통하여, 이 항체의 작용 범위를 Cbl의 유무 또는 상태와 상관없이 다양한 암종으로 확대 가능함을 제안한다.
- [0198] 기존의 항 c-Met 항체의 경우 c-Met의 양을 감소시키는 과정에서 Cbl 효소 (E3 ligase)에만 의존하여 작용하기 때문에 Cbl이 비정상적인 경우 항암효과를 보이지 못한다. 폐암 세포주 중 EBC-1에는 같은 폐암 세포주인 H441과 비교하였을 때 매우 낮은 Cbl 단백질 발현량을 보임을 실험으로 확인하였다(도 2c 참조). 따라서, EBC-1 폐암 세포주에서는 c-Met 단백질의 Cbl에 의한 양적 감소가 일어나지 못해 c-Met 단백질 양이 비정상적으로 증가되어 있다. 이러한 EBC-1 폐암 세포주 환경에서 Cbl-비의존적으로 c-Met 타겟이 가능한 고유 항 c-Met 항체의 경우 항체 농도에 따라 세포 증식을 감소시킬 수 있으나 기존 항체인 5D5는 오히려 세포의 증식을 증가시킴을 실험으로 확인하였다 (도 2e 참조). 또한, c-Met의 자연적인 mutation에 의하여 암 세포 내 존재하는 모든 c-Met이 Cbl과의 결합 부위가 잘려져 있는 위암 세포주 HS746T에서도 고유 항 c-Met 항체는 항암 효능을 보였으나 5D5의 처리는 오히려 암세포 증식의 결과를 나타내었다 (3 2e 참조).
- [0199] 또한, c-Met이 Cbl의 의해서 양적 감소를 보이지 못하여 암세포 증식이 더욱 촉진되어 있는 경우에 세포 사멸과정이 정상적으로 기능하지 않는 것 역시 암 진행의 원인이 될 수 있다. 따라서 고유 항 c-Met 항체가 Cbl의 유무에 상관없이 c-Met을 감소시켜 항암효과를 가져온다는 것을 증명하기 위해서는 세포사멸 유도여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 기존의 항 c-Met 항체인 5D5와 비교 실험해보았을 때 고유 항 c-Met 항체가 EBC-1 폐암세포주에서 세포 사멸을 항체 농도에 따라 증가시킴을 실험적으로 증명할 수 있었다 (도 3g 참조).
- [0200] 또한, Cbl에 대한 siRNA로 Cbl의 양을 조절거나 Cbl 기능 억제제를 사용하며 Cbl의 유무와 기능에 상관없이 고유 항 c-Met 항체의 항암효과가 유지됨을 증명하였다.
- [0201] Cbl에 대한 siRNA를 세포에 도입(transfection)하는 실험을 할 경우, 암 세포주에서 Cbl의 RNA양 뿐 아니라 단백질 양까지도 줄일 수 있다. 이에 따라 Cbl의 siRNA를 사용한다면 Cbl의 존재 유무에 따른 항 c-Met 항체의 항암효과와 변화를 측정하여 항체의 Cbl 의존도를 판단할 수 있다. 고유 항 c-Met 항체의 c-Met 양을 감소시키는 항암효과는 Cbl의 양이 줄어도 거의 변화가 없으나 5D5의 경우 Cbl 의존적이기 때문에 Cbl의 knock-down에 의하여 c-Met의 양을 전혀 감소시키지 못하는 것으로 나타났다(도 3c 참조).
- [0202] 프로테아좀 경로를 경유하는 단백질 양의 감소를 억제하는 억제제로 잘 알려진MG132라는 물질이다. Cbl을 포함한 E3 ligase 효소들은 프로테아좀 경로를 매개하여서만 단백질의 양을 감소시킨다. MG132를 처리한 이후에도 고유 항 c-Met 항체는 여전히 c-Met의 양을 감소시켜 항암효과를 보이는 것을 실험으로 확인하였고 (도 3d 참조), 고유 항 c-Met 항체의 Cbl 비의존성을 다시 한 번 입증하였다.
- [0203] 또한, 고유 항 c-Met 항체의 부작용의 감소를 확인하였다. 기존의 치료용 항 c-Met 항체인 5D5는 c-Met의 활성화 (단백질 C-terminus Y1234 혹은 Y1235 인산화)를 유도한다. 이에 따라 c-Met활성화의 downstream인 Akt 및 Erk oncogene의 인산화가 발생하여 약물의 부작용(agonism)을 유도한다. 인산화된 Akt와 Erk를 측정하는 것은 agonism을 판단하는 마커로 알려져 있다. NCI-H441 폐암 세포주와 Caki-1 신장암 세포주에서 5D5와 고유 항 c-Met 항체를 처리한 이후에 agonism marker를 본 경우, 5D5는 부작용이 상당히 높은 반면 고유 항 c-Met 항체는 미미하거나 거의 없음을 확인하였다 (도 1b 참조). 이 결과를 통하여 Cbl 비의존적으로 c-Met을 타겟하는 항 c-Met 항체의 경우 약물의 부작용을 줄이면서 항암효과를 높일 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0204] 또한, 마우스 Tumor xenograft 실험과 Cell migration assay를 이용하여 위암 및 폐암에서 항 c-Met 항체의

Cbl 비의존성 증명하였다 (실시예 5 참조). 누드 마우스 표피 아래에 암 세포를 삽입하여 암 조직을 형성한 다음 약물의 처리에 따라 암의 크기를 관찰하는 Tumor xenograft 실험을 할 경우, 처리하는 항 c-Met 항체의 항암 효과를 in vivo로 관찰이 가능하다. Cbl의 농도가 낮았던 EBC-1 폐암 세포주와 c-Met에 자체적 mutation으로 Cbl과의 결합에 결함이 생긴 HS746T 위암 세포주의 경우에서 Tumor xenograft 실험을 진행하였을 때, 항체 5D5는 대조군과 거의 차이가 없을 정도로 암의 진행을 억제하지 못하였다. 그러나, 고유 항 c-Met 항체의 경우 Cbl에 비의존적으로 작용하기 때문에 Tumor xenograft를 통한 in vivo 모델에서도 항암 기전을 효과적으로 가진다는 것을 다시 한 번 증명하였다 (도 5c 및 5d 참조).

[0205] 암 세포는 암이 진행됨에 따라 혈관을 따라 세포 이동을 할 수 있는 능력을 획득하고 이는 암의 전이를 유도한다. 이러한 세포 이동 능력을 in vitro에서 관찰할 수 있는 실험으로는 Cell migration assay가 있다. Cbl의 비의존도를 측정 가능한 EBC-1 폐암 세포주, HS746T 위암 세포주를 이용하여 실험한 결과, 기존의 5D5가 아닌 고유 항 c-Met 항체만이 폐암 및 위암 세포주의 암 세포 이동을 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (도 5a 및 5b 참조).

[0206]

[0207] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0208] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0209]

[0210] **참고예 1: 항 c-Met 항체의 제작**

[0211] **1.1. c-Met에 대한 마우스 항체 'AbF46'의 생산**

[0212] **1.1.1. 마우스의 면역화**

[0213] 하이브리도마 세포주의 개발에 필요한 면역화 된 마우스를 얻기 위하여, 5마리의 마우스에 한 마리당 100 µg의 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질(R&D Systems)과 동량의 완전 프로인드 어주번트(Freund's adjuvant)를 혼합하여 4-6 주된 BALB/c 마우스(Japan SLC, Inc.)의 복강 내에 주사하였다. 2주 후에 상기와 동일한 방법으로 상기 항원으로 사용된 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질을 앞서 주사한 양의 절반인 50 µg을 동량의 불완전 프로인드 어주번트(incomplete Freund's adjuvant)과 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 하기의 세포융합과정을 수행하였다.

[0214]

[0215] **1.1.2. 세포 융합 및 하이브리도마의 제조**

[0216] 세포융합 실험 3일 전에 50 µg의 PBS에 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질 혼합물을 BALB/c 마우스(Japan SLC, Inc.)의 복강 내에 주사하고, 면역화 된 마우스를 마취한 후 몸통의 좌측에 위치한 비장(spleen)을 적출하였다. 적출한 비장을 메쉬로 갈아서 세포를 분리하고, 배양 배지(DMEM, GIBCO, Invitrogen)와 혼합하여 비장세포 현탁액을 만들었다. 상기 현탁액을 원심분리하여 세포층을 회수하였다. 상기 얻어진 비장세포 1×10^8 개와 골수종 세포(Sp2/0) 1×10^8 개를 혼합한 다음, 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 상기 원심분리된 침전물을 천천히 분산시키고, 배양 배지(DMEM)에 들어있는 45% 폴리에틸렌글리콜(PEG)(1 ml)을 처리하고, 37 °C에서 1분 동안 유지시킨 후, 배양 배지(DMEM) 1 ml을 첨가하였다. 이후 배양배지(DMEM) 10 ml을 1분 동안 첨가하고, 37°C의 물에서 5분 동안 방치한 후 50 ml로 맞추어 다시 원심분리하였다. 세포 침전물을 분리 배지(HAT 배지)에 $1 \sim 2 \times 10^5$ / ml 정도로 재현탁시키고, 96-웰(well) 플레이트에 0.1 ml씩 분주한 후 37°C 이산화탄소 배양기에서 배양하여 하이브리도마 세포군을 제작하였다.

[0217] **1.1.3. c-Met 단백질에 대한 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 선별**

[0218] 상기 참고예 1.1.2에서 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 방

법을 통하여 스크리닝하였다.

[0219] 마이크로타이터 플레이트에 인간의 c-Met/Fc 융합 단백질을 한 웰당 각각 50 μ l (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.

[0220] 상기 참고예 1.1.2에서 얻어진 하이브리도마 세포의 배양액을 상기 준비된 각각 웰에 50 μ l씩을 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 반응 정도는 ELISA Reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

[0221] 위와 같은 반응 정도 확인에 의하여, 인간의 Fc에는 결합되지 않고, 인간의 c-Met 단백질에만 특이적으로 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주들을 반복하여 선별하였다. 반복 선별을 통해 얻은 하이브리도마 세포주를 제한 희석(limiting dilution)하여 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주 1개의 클론을 최종적으로 얻었다. 최종 선별된 단일클론 항체 생산 하이브리도마를 2009년 10월 9일자로 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 대한민국 서울 종로구 연건동에 소재하는 한국 세포주연구재단에 기탁하여 수탁번호 KCLRF-BP-00220를 부여받았다 (한국 공개특허 제2011-0047698 참조).

[0222] **1.1.4. 단일클론 항체의 생산 및 정제**

[0223] 상기 참고예 1.1.3에서 얻은 하이브리도마 세포를 무혈청 배지에서 배양하고 배양액으로부터 단일클론 항체를 생산 정제하였다.

[0224] 먼저 10%(v/v) FBS가 포함된 배양 배지(DMEM) 배지 50 ml에서 배양된 상기 하이브리도마 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 20 ml PBS로 2회 이상 세척하여 FBS가 제거된 상태에서, 상기 세포 침전물을 배양 배지(DMEM) 배지 50 ml에 재현탁시킨 후, 3일 동안 37°C 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

[0225] 이후, 원심분리하여, 항체를 생산하는 세포를 제거하고 항체들이 분비된 배양액을 분리하여, 4°C에 보관하거나 바로 모아서 항체의 분리 정제에 사용하였다. 친화성 칼럼(Protein G agarose column; Pharmacia, USA)을 장착한 AKTA 정제 기기(GE Healthcare)를 이용하여 상기 준비된 배양액 50 ml 내지 300 ml로부터 항체를 순수 정제한 후, 단백질 응집용 필터(Amicon)를 사용하여 PBS로 상층액을 치환하여 정제된 항체를 보관하고, 이후의 실시예에 사용하였다.

[0226] **1.2. c-Met에 대한 키메릭 항체 chAbF46의 제작**

[0227] 일반적으로 마우스 항체는 치료 목적으로 인간에게 주입되었을 때 면역거부반응(immunogenicity)을 보일 가능성이 높으므로, 이를 해결하기 위하여, 상기 실시예 1에서 제작된 마우스 항체 AbF46으로부터, 항원 결합에 관련된 변이 영역(variable region)을 제외한 불변 영역(constant region)을 인간 IgG1 항체의 서열로 치환하는 키메릭 항체 chAbF46을 제작하였다.

[0228] 중쇄에 해당하는 뉴클레오타이드 서열은 'EcoRI-signal sequence-VH-NheI-CH-TGA-XhoI'(서열번호 38)로, 경쇄에 해당하는 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA 절편(서열번호 38)을, pcDNA™ 3.3-TOPO TA Cloning Kit(Cat no. 8300-01)에 상기 경쇄에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA 절편(서열번호 39)을 각각 EcoRI(NEB, R0101S)과 XhoI(NEB, R0146S) 제한 효소를 사용하여 클로닝함으로써, 키메릭 항체의 발현을 위한 중쇄를 포함하는 벡터 및 경쇄를 포함하는 벡터를 각각 구축하였다.

[0229] 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)를 트랜스펙션

(transfection)하였으며, 이 때 상기 293T 세포(2.5×10^7)에 2M CaCl_2 를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션을 수행하였다.

[0230] 이후, 10%(v/v) 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.

[0231] 상기 배양된 세포를 원심분리하여 상등액을 각각 100 ml 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 용출시켰다. 얻어진 용출물을 PBS 버퍼로 교환하여 최종적으로 키메릭 항체 AbF46(이하, chAbF46로 명명함)을 정제하였다.

[0232]

[0233] **1.3. 키메릭 항체 chAbF46으로부터 인간화 항체 huAbF46의 제작**

[0234] **1.3.1. 중쇄의 인간화(Heavy chain humanization)**

[0235] H1-heavy 및 H3-heavy 2종의 디자인을 위하여, 우선 Ig Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)를 통하여 상기 참고예 1.2에서 정제된 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.

[0236] 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.

[0237] **1.3.2. 경쇄의 인간화(Light chain humanization)**

[0238] 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 CDR 부분이 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.

[0239] 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 CDR 부분이 VK4-1의 골격에 도입되도록 디자인하였다. 이때, H3-light는 36번(Y→H), 46번(L→M), 49번(Y→I) 3개의 아미노산을 back-mutation 하여 구축하였다.

[0240] 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.

[0241] 이후, Invitrogen 사의 OptiCHO™ Antibody Express Kit (Cat no. 12762-019)에 포함되어 있는 pOptiVEC™-TOPO TA Cloning Kit에 상기 중쇄에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA 절편(H1-heavy; 서열번호 47,

H3-heavy; 서열번호 48, H4-heavy; 서열번호 49)을 pcDNATM 3.3-TOPO TA Cloning Kit 에 상기 경쇄에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 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.

[0242] 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 사용되어 293T 세포(2.5 x 10⁷)를 트랜스펙션시켰으며, 이 때, 293T 세포(2.5 x 10⁷)에 2M CaCl₂를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션을 수행하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

[0243] 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 (서열번호 42) 및 H4-light(서열번호 46)이다.

[0244] **1.4. huAbF46 항체의 scFv 라이브러리 제작**

[0245] 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 폴리뉴클레오타이드(서열번호 55)를 바이오니아에 의뢰하여 합성하였으며, 이를 발현시키기 위한 벡터를 서열번호 56에 나타내었다.

[0246] 이후, 상기 벡터로부터 발현된 결과물을 분석하여, c-Met에 특이적인 결합력을 보임을 확인하였다.

[0247]

[0248] **1.5. 친화도 성숙(affinity maturation)을 위한 라이브러리 유전자의 제작**

[0249] **1.5.1. 표적 CDR의 선정 및 프라이머 제작**

[0250] huAbF46 항체의 친화도 성숙(affinity maturation)을 위하여 6개의 상보성 결정 부위(complementary determining region, CDR)를 상기 제작된 마우스 항체 AbF46으로부터 'Kabat numbering'에 의하여 정의하였으며, 각각의 CDR은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0251]

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)

[0252] 항체 CDR의 무작위 서열 도입을 위하여 다음과 같이 프라이머를 제작하였다. 기존의 무작위 서열 도입 방식은 돌연변이를 주코자 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) 뉴클레오타이드 중 첫번째와 두번째 뉴클레오타이드의 85%는 그대로 보존하고, 나머지 3개의 염기를 각각 5%씩 도입하는 방식을 취하였다. 또한, 세 번째 뉴클레오타이드는 동일하게(33% G, 33% C, 33% T)가 도입되도록 프라이머를 디자인하였다.

[0253]

[0254] **1.5.2. huAbF46 항체의 라이브러리 제작 및 c-Met에 대한 결합력 확인**

[0255] CDR의 무작위 서열 도입을 통한 항체 라이브러리 유전자의 구축은 상기 참고예 1.5.1과 같은 방법으로 제작된 프라이머를 이용하여 수행하였다. 주형으로 huAbF46 항체의 scFv를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 이용하여, 도 1에 나타난 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.

[0256] 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.

[0257]

[0258] **1.6. 제작된 라이브러리로부터 친화도가 개선된 항체의 선별**

[0259] 상기 구축된 라이브러리로부터 c-Met에 대한 라이브러리의 결합력을 향상시킨 후, 각각의 개별 클론으로부터 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

[0260]

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	DNWLT(서열번호 28)
L1-1	CDR-L1	KSSHLLASGNQNNYLA(서열번호 29)
L1-3	CDR-L1	KSSRLLSSGNHKNYLA(서열번호 30)
L1-4	CDR-L1	KSSKLLASGNQNNYLA(서열번호 31)
L1-12	CDR-L1	KSSRLLASGNQNNYLA(서열번호 32)
L1-22	CDR-L1	KSSHLLASGNQNNYLA(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	QSYSRPYT(서열번호 13)
L3-2	CDR-L3	QSYSRPLT(서열번호 14)
L3-3	CDR-L3	AQSYSHPF(서열번호 15)
L3-5	CDR-L3	QSYSRPFT(서열번호 16)
L3-32	CDR-L3	QSYSKPFT(서열번호 37)

[0261]

[0262] **1.7. 선별된 항체의 IgG로의 변환**

[0263] 선별된 4종의 항체의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 '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 폴리뉴클레오타이드(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 상

기 중쇄에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA 절편(서열번호 38)을, pcDNA™3.3-TOPO TA Cloning Kit(Cat no. 8300-01)에 상기 경쇄에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 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.

[0264] 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 CaCl₂를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

[0265] 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(L3-1 유래), huAbF46-H4-A2 (L3-2 유래), huAbF46-H4-A3 (L3-3 유래), 및 huAbF46-H4-A5(L3-5 유래)로 명명함)를 정제하였다.

[0266] **1.8. 불변영역 및/또는 힌지영역이 치환된 huAbF46-H4-A1의 제조**

[0267] 상기 참고예 1.7에서 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.

[0268] 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 각각 명명하였다. 또한, 한편, 상기 3종의 항체는 생산량 증대를 위하여 인간의 카파 불변영역으로 이루어진 경쇄의 36번 히스티딘(histidine)을 모두 티로신(tyrosine)으로 치환하였다.

[0269] 상기 3종 항체를 제작하기 위해, huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, U6-HC7힌지 및 인간의 IgG1 불변영역으로 이루어진 폴리펩티드(서열번호 62)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 63), huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, 인간의 IgG2 힌지 및 인간의 IgG1 불변영역으로 이루어진 폴리펩티드(서열번호 64)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 65), huAbF46-H4-A1의 중쇄 가변영역, 인간의 IgG2 힌지 및 인간의 IgG2 불변영역으로 이루어진 폴리펩티드(서열번호 66)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 67), 36번 히스티딘이 티로신으로 치환된 huAbF46-H4-A1의 경쇄 가변영역 및 인간의 카파 불변영역으로 이루어진 폴리펩티드(서열번호 68)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드(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.

[0270] 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 CaCl₂를 360 ul 첨가하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 이후, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 5시간 동안 배양한 다음, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

[0271] 상기 배양된 세포를 원심분리하여 상등액 각 100 ml을 취하고, AKTA Prime (GE healthcare)를 이용하여 정제하

였다. 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 3종의 항체(huAbF46-H4-A1(U6-HC7), huAbF46-H4-A1(IgG2 hinge), huAbF46-H4-A1(IgG2 Fc))를 정제하였다. 이 중에서 본 발명에 따른 항 c-Met 항체를 대표하여 huAbF46-H4-A1(U6-HC7)을 선택하여 하기의 실시예에 사용하였으며, 편의상 상기 항체를 항 c-Met 항체 L3-1Y로 명명하였다.

[0272] **참고예 2: 세포주 준비 및 세포 배양**

[0273] 하기 실시예에 사용되는 인간 위암 세포주 MKN45 (JCRB0254)와 EBC-1 (JCRB0820)는 Health Science Research Resource Bank (Shinjuku, Japan)로부터 구입하였으며, Caki-1 신장암 세포주 (HTB-46), HS746T 위암 세포주 (HTB-135), 및 NCI-H441 인간 폐선암 세포주 (HTB-174)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) 로부터 입수하였다.

[0274] MKN45, EBC-1, 및 NCI-H441 세포는 RPMI1640 배지(GIBCO)에서 배양하고, HS746T 및 Caki-1 세포는 10%(v/v) fetal bovine serum (FBS, GIBCO) 및 1%(v/v) penicillin/streptomycin (GIBCO)를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 상기 세포 배양은 37℃ 및 5% CO₂를 포함하는 가습 환경(humidified atmosphere) 하에서 수행되었으며, confluence가 되기 전에 계대배양(subculture)하였다. 세포수는 CEDEX Analyzer (Roche Diagnostics)를 사용하여 계수하였다.

[0275] **실시예 1: 항 c-Met 항체 종류에 따른 c-Met에 대한 효과 시험**

[0276] **1.1. NCI-H441 세포에서의 c-Met의 분해 정도**

[0277] IgG(음성 대조군, eBioscience), 상기 참고예 1에서 준비된 항 c-Met 항체 L3-1Y, 및 기존에 작용제(agonist)로 잘 알려진 항 c-Met 항체 5D5 (American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) 로부터 입수한 ATCC Cat. # HB-11895 하이브로도마 세포로부터 분리 정제)(양성 대조군)의 c-Met 단백질의 분해 정도를 확인하였다. 이는 상대적인 총 c-Met량은 항체가 세포 표면에 발현한 c-Met에 결합하여 세포 내로 내재화(internalization)를 일으켜 c-Met의 분해(degradation)가 일어나는 것을 이용하여, 총 c-Met양의 증감을 파악하여 항체의 효능을 검사하기 위한 것이다.

[0278] NCI-H441 세포 2 x 10⁵ cells/ml와 상기 각각의 항체 5 ug/ml를 96-웰 플레이트에 동시에 뿌려준 후, 24시간 동안 배양한 후, 용해 버퍼를 이용하여 상기 항체가 처리된 세포를 용해(lysis)시켰다. 사용한 용해 버퍼는 Complete lysis-M (Roche, 04719956001)을 이용하였다. 상기 얻어진 세포 용해물에 대하여 Human total HGF R/c-MET ELISA KIT (R&D systems, DYC358)를 이용하여 제조사 사용지침서에 따라서 샌드위치 ELISA를 수행하여, 전체 c-Met 양의 변화를 측정하였다.

[0279] 실험은 3회 반복 수행하였으며, 얻어진 수치를 평균하여 도 1a에 나타내었다 (mean±SD). 도 1a는 상기와 같이 NCI-H441 세포에 항 c-Met 항체를 처리한 후 c-Met 농도를 측정하여 얻어진 값을 IgG 처리군을 100%으로 한 상대값으로 환산하여 얻어진 수치를 보여주는 것으로, c-Met 분해 정도를 나타낸다.

[0280] 도 1a에서 보는 바와 같이, NCI-H441 세포에서는 IgG를 처리한 경우와 비교하여 항 c-Met 항체 L3-1Y 및 5D5를 처리한 경우에 c-Met 분해 정도가 증가하는 것으로 확인되었다. Cbl의 농도가 높은 NCI-H441 세포에서 24hr 처리 이후에 c-Met의 단백질 양은 5D5에 의해서도 L3-1Y와 비교하여 비슷한 정도로 감소하나 이 현상이 세포 증식 감소로 이어지는 않는다.

[0281] **1.2. c-Met 다운스트림 인산화에 대한 효과**

[0282] 기존의 치료용 항 c-Met 항체인 5D5는 c-Met의 활성화 (단백질 C-terminus Y1234 혹은 Y1235 인산화)를 유도한다. 이에 따라 c-Met활성화의 downstream인 Akt 및 Erk oncogene의 인산화가 발생하여 약물의 부작용(agonism)을 유도한다. 인산화된 Akt와 Erk를 측정하는 것은 agonism을 판단하는 마커로 알려져 있다.

[0283] Agonism에 의한 부작용 판단을 위하여 상기 실시예 1.1에서와 동일한 항체를 사용하여, NCI-H441 세포 및 Caki-1 세포에서의 c-Met 다운스트림 인산화효소들의 인산화 정도를 확인하였다.

[0284] NCI-H441 세포 및 Caki-1 세포를 각각 2×10^5 세포/ml의 양으로 96-웰 플레이트에 분주하고, 24시간 후에 무혈청 상태에서 상기 준비된 각각의 항체를 5 ug/ml의 양으로 30분 동안 처리한 후, 인산화효소들의 인산화를 웨스턴 블라팅으로 인산화효소의 인산화 정도를 측정하였다.

[0285] 상기 얻어진 결과를 도 1b에 나타내었다. 도 1b에서 보여지는 바와 같이, MKN45 세포 및 Caki-1 신장암 세포주 모두에서 항체 L3-1Y가 다른 항체들과 비교하여 인산화효소의 인산화를 현저하게 저해하는 것으로 나타났으며, 이는 항체 L3-1Y가 c-Met의 시그널링을 효과적으로 저해함을 보여주는 것이다. 즉, NCI-H441 폐암 세포주와 Caki-1 신장암 세포주에서 5D5는 부작용이 상당히 높은 반면 L3-1Y는 미미하거나 거의 없음을 의미한다. 이 결과를 통하여 Cbl 비의존적으로 c-Met을 타겟하는 항 c-Met 항체의 경우 약물의 부작용을 줄이면서 항암효과를 높일 수 있음을 확인할 수 있다.

[0286] **1.3. MKN45 세포에서의 c-Met의 분해 정도**

[0287] 상기 실시예 1.1의 방법에 기초하여 ELISA법으로 MKN45 세포에서의 항체 처리에 따른 총 c-Met양의 변화를 측정하여, 도 1c에 나타내었다. 도 1c에서 보여지는 바와 같이, 항체 L3-1Y는 음성 대조군인 IgG는 물론이고 양성 대조군인 5D5보다도 현저하게 c-Met 양이 감소한 것을 확인하였으며, 이를 통하여, 항체 L3-1Y의 c-Met 분해 정도가 현저하게 우수함을 알 수 있다.

[0288] **1.4. 세포 생존률 (cell viability) - MKN45 세포**

[0289] 항체 처리에 따른 종양 세포(MKN45 세포) 생존력을 세포 증식(proliferation) 분석법을 통하여 측정하였다. 세포 증식 분석은 CCK-8 (Dojindo Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 제조사 사용설명서에 따라서 측정하였다.

[0290] 96-웰 플레이트에 웰당 1×10^4 cells/ml의 MKN45 세포를 분주하고, IgG와 L3-1Y를 처리하지 않거나, 다양한 농도(0.0032, 0.016, 0.008, 0.4, 2, 및 10 ug/ml)로 처리하여 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 이후, CCK-8 용액을 well당 10 µl씩 분주한 다음 37°C에서 1시간 더 배양한 다음 상기 각 웰의 배양물의 450 nm에서의 흡광도를 자동 ELISA reader(Molecular Devices)로 정량하고, 항체 미처리군을 100%로 하여 항체 처리에 따른 세포 생존률(%)를 측정하였다.

[0291] 상기 얻어진 결과를 도 1d에 나타내었다. 도 1d에 나타낸 바와 같이, IgG(○)와 비교하여 항체 L3-1Y(◆) 처리 시 종양 세포 생존률이 현저하게 감소함을 알 수 있다.

[0292] **실시예 2: Cbl-의존적 c-Met 분해 여부 확인 1**

[0293] **2.1. Cbl 및 c-Met 간의 결합 유도 확인**

[0294] 100mm 플레이트에 웰당 2×10^5 cells/ml의 NCI-H441 세포를 분주하고, 항 c-Met 항체 L3-1Y 또는 5D5를 각각 5 ug/ml의 농도로 처리하고, 37°C에서 30분 동안 무혈청 상태의 배지에서 배양하였다. 배양된 세포를 용해 버퍼 Complete lysis-M (Roche, 04719956001)에서 protease mix tablet (Roche)를 사용하여 용해시키고, 4°C에서 면역 침강 항체(immunoprecipitating antibody) 컨주게이트된 A/G 아가로오스 비드(Pierce)와 함께 배양하였다. 상기 비드를 용해 버퍼로 4회 세척하였다. 결합된 단백질을 샘플링 버퍼(Invitrogen)로 용출시키고, 면역블라트 분석을 수행하였다.

[0295] 상기 얻어진 결과를 도 2a에 나타내었다. 도 2a에서 보여지는 바와 같이, Cbl 및 c-Met 간의 결합은 항체 5D5에 의하여 유도되지만, 항체 L3-1Y에 의해서는 유도되지 않음을 알 수 있다. Cbl은 c-Met의 주요한 E3 ligase로 c-Met의 양적 감소를 유도하는 주효소인 하나 c-Met이 활성화된 이후에만 Cbl과의 결합이 유도되므로 부작용(agonism)을 가져올 확률이 높다. 따라서, Cbl 및 c-Met 간의 결합을 유도하는 항체 5D5과 비교하여, 이들 간의 결합을 유도하지 않는 항체 L3-1Y이 부작용이 적을 것임이 확인되었다.

[0296] **2.2. EBC-1 및 NCI-H441 세포에서의 c-Met의 분해 정도**

[0297] EBC-1 세포 또는 NCI-H441 세포 2×10^5 cells/ml와 항 c-Met 항체 L3-1Y 또는 5D5 5 ug/ml를 96-웰 플레이트에 동시에 뿌려준 후, 4시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 1.1에 기재된 방법에 기초하여 ELISA법으로 c-Met의 분해 정도를 측정하였다.

[0298] 얻어진 결과를 도 2b에 나타내었다. 도 2b에서와 같이, 항체 L3-1Y는 두 세포 모두에서 c-Met 총량의 50% 이상을 분해하는 것으로 나타났으나, 항체 5D5는 NCI-H441 세포에서는 항체 L3-1Y와 동등 정도의 c-Met 분해 활성을 나타내지만, EBC-1 세포에서는 c-Met 분해 활성을 거의 나타내지 못하는 것으로 나타났다.

[0299] 이와 같은 결과의 원인을 확인하기 위하여, Cbl 항체(Cell Signaling)를 이용하여 EBC-1 세포 및 NCI-H441 세포에서의 Cbl 단백질 수준을 웨스턴 블라팅으로 측정하여 도 2c 상단에 나타내었다. 또한, 도 2c에서 알 수 있는 바와 같이, NCI-H441 세포에는 Cbl 단백질이 비교적 높은 수준으로 존재하지만, EBC-1 세포에는 Cbl 단백질이 거의 존재하지 않았다. 따라서, 항체 5D5가 EBC-1 세포에서 c-Met 분해 활성을 거의 나타내지 못한 원인은 EBC-1 세포에 Cbl 단백질이 존재하지 않기 때문이며, 항체 L3-1Y는 Cbl-비의존적으로 c-Met 분해 활성을 나타냄을 확인할 수 있다. 따라서, 항체 L3-1Y는 기존의 항 c-Met 항체(예컨대, 5D5) 처리에 의하여 충분한 항암 효과를 얻지 못하던 EBC-1 세포 관련 종양에도 우수한 항암 효과를 나타낼 수 있어서, 항 c-Met 항체 치료의 적용 대상 암 종류를 확장시킬 수 있다는 점에서 의의를 갖는다.

[0300] 또한, 폐암 환자(n=14, Oncotest사에서 보유하고 있는 비소세포폐암(NSCLC))로부터 얻은 폐암 조직에 대하여 상기와 동일한 방법으로 Cbl 항체(Cell Signaling)를 이용하여 Cbl 단백질 수준을 웨스턴 블라팅으로 측정하여 도 2c 하단에 나타내었다. 도 2c에서 확인되는 바와 같이, 환자에 따라서 Cbl 농도에 차이가 있으며, 이는 동일한 종류의 암을 앓는 환자라고 하더라도, 환자 개개인의 생물학적 특성에 따라서 Cbl 단백질 수준이 낮은 환자의 경우에는 기존의 항 c-Met 항체(예컨대, 5D5) 치료가 효과를 보지 못하는 경우가 있을 수 있음을 의미하는 것이다. 따라서, Cbl 단백질 수준을 측정함으로써 환자 개개인의 생물학적 특성에 맞는 항체를 처리하여 보다 효과적으로 맞춤 치료가 가능할 수 있다.

[0301] **2.3. c-Met활성 억제제를 이용하여 c-Met 분해능의 차이 비교: MKN45 세포**

[0302] MKN45 세포 2×10^5 cells/ml와 항 c-Met 항체 L3-1Y 또는 5D5 5 ug/ml를 도 2d에 나와있는 농도로 96-웰 플레이트에 동시에 뿌려준 후, 4시간 동안 배양한 후 (PHA-665752 (Selleck Chemical)을 1μl씩 각 well에 첨가하였다. 억제제를 처리하지 않은 대조군에는 DMSO를 1μl씩 첨가하였다.), 상기 실시예 1.1에 기재된 방법에 기초하여 ELISA법으로 c-Met의 분해 정도를 측정하였다. 이를 통하여 c-Met의 활성화 여부와 상관없이 L3-1Y는 c-Met의 분해능을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

[0303] **2.4. 세포 생존률 - EBC-1 세포**

[0304] 96-웰 플레이트에 웰당 2×10^5 cells/ml의 EBC-1 세포를 분주하고, 항체 5D5 또는 L3-1Y를 다양한 농도(0.0032, 0.016, 0.008, 0.4, 2, 및 10 μg/ml)로 처리하고 72시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 1.4의 방법에 기초하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0305] 얻어진 결과를 도 2e에 나타내었다. 도 2e에 나타낸 바와 같이, 항체 5D5 (○)와 비교하여 항체 L3-1Y (◆) 처리시 중앙 세포 생존률이 현저하게 감소함을 알 수 있다.

[0306] **실시예 3: Cbl-의존적 c-Met 분해 여부 확인 2: 분해 경로 확인**

[0307] **3.1. 항 c-Met 항체의 c-Met 분해 메커니즘 확인 1: 유비퀴틴화 분석법(ubiquitination assay)**

[0308] 항 c-Met 항체에 의한 c-Met 분해가 라이소좀 경로(lysosomal pathway)와 Cbl을 포함한 E3 라이게이즈 효소들이 매개하는 프로테아좀 경로(proteasome pathway) 중 어떠한 경로로 일어나는지 확인하기 위하여, 유비퀴틴화 분석법을 수행하여 프로테아좀 경로에 수반되는 poly-ubiquitination 여부를 확인하였다.

[0309] 100mm plate에 2×10^5 cell/ml로 뿌린 뒤 24 시간이 지난 EBC-1 세포 및 NCI-H441 세포를 항체 L3-1Y 또는 5D5 5ug/ml와 함께 37°C에서 30, 60 또는 120분 동안 배양하고, 세포를 분리해내어 용해 버퍼 Complete lysis-

M (Roche, 04719956001)를 사용하여 단백질 추출물을 얻어내었다. 세포를 분리해내기 전에 MG132 (C₂₆H₄₁N₃O₅, Merck)와 concanamycin (Merck)를 처리하여 프로테아좀 경로와 라이소좀 경로를 억제하여 단백질 양이 증대되게 하였다. 이 추출물 500 µg을 c-Met 항체 컨주게이트된 A/G 아가로오스 비드(Pierce)와 함께 풀-다운 (pull-down)시키고, 항-Ub 항체(Santa cruz)를 사용하여 면역블라팅하여 c-Met의 내재적 유비퀴틴화(endogenous ubiquitination)를 조사하였다.

[0310] 상기 얻어진 면역 블라팅 사진을 도 3a 및 3b에 나타내었다 (3a: EBC-1 세포에서의 결과, 3b: NCI-H441 세포에서의 결과도 3a 및 3b에서 알 수 있는 바와 같이, 두 세포 모두에서 항체 5D5 처리시에는 c-Met의 poly-ubiquitination이 관찰되는 반면, 항체 L3-1Y를 처리시에는 c-Met의 poly-ubiquitination이 관찰되지 않았다. 즉, 항체 5D5는 c-Met의 poly-ubiquitination을 유도하지만 항체 L3-1Y는 유도하지 못하며, 이는 항체 L3-1Y는 프로테아좀 경로가 아닌 다른 경로, 즉 라이소좀 경로로 c-Met 단백질의 분해에 관여함을 의미하는 것이다.

[0311] **3.2. Cbl siRNAs 형질전환된 세포에서의 c-Met 분해: Cbl 녀다운**

[0312] 항 c-Met 항체의 c-Met 분해에 있어서의 Cbl 의존성을 확인하기 위하여, EBC-1 세포에 Cbl siRNAs를 형질전환시켜 Cbl을 녀다운시키고, 항체를 처리하여 c-Met 분해 정도를 시험하였다.

[0313] Cbl siRNAs (dharmacon) 형질전환된 EBC-1 세포 2 x 10⁵ cells/ml에 항 c-Met 항체 L3-1Y 5ug/ml를 처리하여 37 °C에서 24 시간동안 배양하고, 실시예 1.1에 기재된 방법에 기초하여 ELISA법으로 c-Met의 분해 정도를 측정하였다. 대조군으로는 IgG 5ug/ml를 처리한 군을 사용하였다.

[0314] 상기 얻어진 결과를 도 3c에 나타내었다. sict1은 siCbl에 대한 대조군으로 dharmacon에서 파는 control siRNA를 의미한다. 도 3c에서 확인되는 바와 같이, Cbl siRNAs 형질전환된 EBC-1 세포에 항체 L3-1Y를 처리한 경우, c-Met의 총량이 대조군인 IgG를 처리한 경우의 약 30% 정도에 지나지 않아서, c-Met 분해효율이 약 70% 정도에 달하는 것으로 나타났다.

[0315] **3.3. 항 c-Met 항체의 c-Met 분해 메커니즘 확인 2 - MG132 처리**

[0316] 실시예 3.1에 추가하여, 항 c-Met 항체에 의한 c-Met 분해 메커니즘을 확인하기 위하여, 프로테아좀 억제제인 MG132(C₂₆H₄₁N₃O₅, Merck))를 사용하여 프로테아좀 경로가 차단된 경우의 c-Met 분해 정도를 시험하였다.

[0317] 96-웰 플레이트에서 EBC-1 세포 2 x 10⁵ cells/ml를 항 c-Met 항체 L3-1Y 5ug/ml + DMSO 1 µL, 또는 항체 L3-1Y 5ug/ml + MG132 1 µL (10 µM) 로 처리하고, 37°C에서 4시간동안 배양하고, 실시예 1.1에 기재된 방법에 기초하여 ELISA법으로 c-Met의 분해 정도를 측정하였다. 대조군으로 IgG 5ug/ml + DMSO 1 µL, 또는 IgG 5ug/ml + MG132 1 µL이 처리된 군을 사용하였다.

[0318] 상기 얻어진 결과를 도 3d에 나타내었다. 도 3d에 나타낸 바와 같이, 항체 L3-1Y는 프로테아좀 억제제인 MG132가 처리되지 않은 경우 약 70% 정도의 c-Met 분해 활성을 나타내는 한편, MG132가 처리된 경우에도 약 50% 정도의 c-Met 분해 활성을 나타내어, MG132 처리 여부에 c-Met 분해 활성에 유의미한 정도의 영향을 받지 않는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 항체 L3-1Y의 c-Met 분해가 Cbl이 매개하는 프로테아좀 경로에 의한 것이 아니고, 따라서 Cbl-비의존적 c-Met 분해 활성을 가짐을 다시 한번 입증하는 것이다.

[0319] **3.4. 세포 생존률 - HS746T 세포**

[0320] 96-웰 플레이트에 웰당 5 x 10⁴ cells/ml의 HS746T 세포를 분주하고, 항체 5D5 또는 L3-1Y를 다양한 농도 (0.0032, 0.016, 0.008, 0.4, 2, 및 10 µg/ml)로 처리하고 37°C에서 72시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 1.4의 방법에 기초하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0321] HS746T 세포는 c-Met의 자연적인 mutation에 의하여 암 세포 내 존재하는 모든 c-Met이 Cbl과의 결합 부위가 잘려져 있는 위암 세포주이다.

[0322] 얻어진 결과를 도 3e에 나타내었다. 도 3e에 보여지는 바와 같이, 항체 5D5 (○)와 비교하여 항체 L3-1Y (◆)

처리시 종양 세포 생존률이 현저하게 감소함을 알 수 있다.

[0323] **3.5. 세포 자멸사 (apoptosis) 유도 시험**

[0324] 항 c-Met 항체 처리에 따른 세포 자멸사를 시험하였다.

[0325] 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^4 cells/ml의 HS746T 세포에 IgG(대조군), 항체 L3-1Y, 및 5D5를 각각 다양한 농도로 처리 후, 세포 자멸사(apoptosis) 비율을 Caspase 3/7 Glo[®] 발광 에세이를 통하여 *in vitro*로 측정하였다.

[0326] 약술하면, FBS 10%(v/v) RPMI1640 배지 내의 EBC-1 세포와 FBS 10%(v/v) DMSO 배지 내의 HS746T 세포를 각각 블랙 96-웰 플레이트(Corning Incorporated) 상에 각 웰당 5×10^3 cells의 밀도로 플레이팅한 후, 10%(v/v) FBS 함유 배지에 희석된 IgG, 항체 L3-1Y, 또는 5D5를 다양한 농도(0.0032, 0.016, 0.008, 0.4, 및 2 μ g/ml)로 처리하였다. 상기 처리된 세포를 37°C에서 72시간 동안 배양 후, Caspase 3/7 Glo[®] 용액 (Promega) 100 μ L를 각 웰에 첨가한 후, 실온에서 30분간 배양하였다. 발광 신호는 Envision 2104 Multi-label Reader (Perkin Elmer)를 사용하여 기록하였다. 세포 자멸사 비율은 CCK-8 에세이 수치로 표준화하여 도 3f에 나타내었다.

[0327] 도 3f에 나타난 바와 같이, 항체 L3-1Y (◆)는 가장 우수한 세포 자멸사 비율을 보인 반면, 5D5 (▲)는 대조군인 IgG (○)보다도 세포 자멸사 비율이 낮은 것으로 나타났다.

[0328] 상기와 동일한 방법으로 EBC-1 폐암세포주에 대하여 항체 L3-1Y와 항체 5D5의 세포 자멸사 유도 효과를 측정하여 도 3g에 나타내었다. 도 3g에 나타난 바와 같이, 기존의 항 c-Met항체인 5D5와 비교할 때, 항체 L3-1Y은 Cb1 농도가 낮은 EBC-1 폐암세포주에서도 항체 농도에 비례하여 세포 사멸 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0329] **실시예 4: LRIG1 매개 c-Met 분해 시험**

[0330] **4.1. 항 c-Met 항체의 LRIG1와 c-Met 간 결합 유도 확인: EBC-1 세포**

[0331] EBC-1 세포에서의 항 c-Met 항체의 LRIG1와 c-Met 간 결합 유도 여부를 확인하기 위하여, 공면역침전(co-immunoprecipitation)에 의하여 LRIG1-c-Met 결합 단백질을 분리 정제하여 면역블라팅으로 정량하였다. 항체를 도 4a에 표시된 시간 동안 처리한 후 세포를 분리해내어 용해 버퍼 Complete lysis-M (Roche, 04719956001)를 사용하여 단백질 추출물을 얻어내었다. 이 추출물 500 μ g을 c-Met 항체 컨주게이트된 A/G 아가로오스 비드 (Pierce)와 함께 풀-다운 (pull-down)시키고, 항-LRIG1 항체(Abcam)를 사용하여 면역블라팅하여 c-Met과 LRIG1의 결합을 확인하였다. 이 결과를 통하여 L3-1Y 항체를 처리할 경우 2 시간 이후에 c-Met과 LRIG1의 결합이 유도된다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0332] **4.2. 항 c-Met 항체의 LRIG1와 c-Met 간 결합 유도 확인: HEK293 세포**

[0333] HEK293 세포에서의 항 c-Met 항체의 LRIG1와 c-Met 간 결합 유도 여부를 확인하기 위하여, 공면역침전(co-immunoprecipitation)에 의하여 LRIG1-c-Met 결합 단백질을 분리 정제하여 면역블라팅으로 정량하였다. 항체를 2 시간 동안 처리한 후 세포를 분리해내어 용해 버퍼 Complete lysis-M (Roche, 04719956001)를 사용하여 단백질 추출물을 얻어내었다. 이 추출물 500 μ g을 c-Met 항체 컨주게이트된 A/G 아가로오스 비드(Pierce)와 함께 풀-다운 (pull-down)시키고, 항-LRIG1 항체(Abcam)를 사용하여 면역블라팅하여 c-Met과 LRIG1의 결합을 확인하였다.

[0334] 상기 정제된 LRIG1-c-Met 결합 단백질을 면역블라팅하여 얻은 결과를 도 4b에 나타내었다. 도 4b에 나타낸 바와 같이, 항체 5D5는 LRIG1와 c-Met 단백질의 결합을 유도하지 못하지만, 항체 L3-1Y는 LRIG1-c-Met 결합 단백질 형성을 유도하는 것으로 확인되었다.

[0335] **4.3. 항 c-Met 항체의 세포 자멸사 유도 시험 1**

[0336] EBC-1 세포에 1 μ g/ml의 농도로 L3-1Y와 5D5를 72 시간동안 처리한 후 세포를 분리하여 튜브에 옮겨담아 원심분리로 1200rpm, 4°C에서 3분간 돌렸다. 5 μ l의 AnnexinV (BD pharmingen)와 2 μ l의 PI (Propidium Iodide,

50g/μl)로 15분동안 암 조건에서 염색한 후 FACS CantoII flow cytometer (Bectron-Dickinson) 기로 분석하였다. AnnexinV(+)/PI(-) 그룹의 세포는 초기 세포사멸이 진행된 것이고 AnnexinV(+)/PI(+) 그룹의 세포는 말기 세포사멸이 진행된 것이다. 상기 얻어진 결과를 도 4c에 나타내었다. 5D5를 처리했을 때와 비교하여 L3-1Y를 처리한 경우 초기와 말기 세포사멸 모두가 증가했음을 도 4c를 통해 확인할 수 있다.

[0337] **4.4. 항 c-Met 항체의 세포 자멸사 유도 시험 2**

[0338] 상기 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^4 cells/ml의 EBC-1 세포에 항체 L3-1Y, 및 5D5를 각각 다양한 농도(0.0032, 0.016, 0.008, 0.4, 2, 및 10 μg/ml)로 처리 후, 상기 실시예 3.5의 방법에 기초하여 세포 자멸사(apoptosis) 비율을 Caspase 3/7 Glo[®] 발광 에세이를 통하여 *in vitro*로 측정하였다.

[0339] 상기 얻어진 세포 자멸사 비율을 도 4d에 나타내었다. 도 4d에 나타낸 바와 같이, 동일 용량에서의 항체 L3-1Y (◆)의 EBC-1 세포 자멸사 유도 효과는 5D5(○)와 비교하여 현저하게 높은 것을 확인할 수 있다.

[0340] **4.5. 항 c-Met 항체의 세포 자멸사 유도 시험 3**

[0341] 상기 실시예 4.4에서와 같은 항체 L3-1Y의 EBC-1 세포 자멸사 효과와 LRIG1와의 관련성을 시험하기 위하여, LRIG1에 대한 siRNAs (dharmacon) 로 24시간 동안 역 트랜스펙션(reverse-transfection)시킨 EBC-1 세포를 사용하여 상기 실시예 4.4의 방법에 따른 세포 자멸사 유도 시험을 수행하였다. 대조군으로 sict1군을 사용하였다. sict1은 dharmacon에서 대조군으로 판매하는 siRNA이다.

[0342] 상기 얻어진 세포 자멸사 비율을 도 4e에 나타내었다. 도 4e에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여, LRIG1이 녹다운된 EBC-1 세포에서는 항체 L3-1Y (◆)의 EBC-1 세포 자멸사 유도 효과가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 실시예 4.4에서 확인된 L3-1Y의 EBC-1 세포 자멸사 유도 효과가 LRIG1-c-Met 결합 단백질 형성에 기인하는 것임을 입증하는 것이다.

[0343] **4.6. 항 c-Met 항체에 의한 c-Met 분해 메커니즘 확인**

[0344] EBC-1 세포에서의 항 c-Met 항체에 의한 c-Met 분해 메커니즘을 확인하기 위하여, 라이소좀 경로 억제제인 콘카나마이신(concanamycin, Merck)을 처리하여 라이소좀 경로가 차단된 경우의 c-Met 분해 정도를 시험하였다.

[0345] EBC-1 세포 2×10^5 cells/ml를 항 c-Met 항체 L3-1Y 5ug/ml + DMSO 1μL, 항체 L3-1Y 5ug/ml + 콘카나마이신 1μL, 항체 5D5 5ug/ml + DMSO 1μL, 또는 항체 5D5 5ug/ml + 콘카나마이신 1μL로 처리하고, 37°C에서 4시간 동안 배양하고, 실시예 1.1에 기재된 방법에 기초하여 ELISA법으로 c-Met의 분해 정도를 측정하였다. 대조군으로 IgG 5ug/ml + DMSO 1μL, 또는 IgG 5ug/ml + MG132 1μL이 처리된 군을 사용하였다.

[0346] 상기 얻어진 결과를 도 4f에 나타내었다. 도 4f에 나타낸 바와 같이, 항체 5D5의 경우 c-Met 분해 효과는 대조군과 동등 정도이고, 콘카나마이신 처리시보다 DMSO 처리시 c-Met 분해 효과가 다소 증가하지만 그 정도가 10% 내외로 미미하였다. 한편, 항체 L3-1Y의 경우, 콘카나마이신 처리시에는 c-Met 분해 효과를 거의 보이지 않은 반면, DMSO 처리시에는 60% 이상의 c-Met 분해 효과를 보이는 것으로 나타났다. 이는 항체 L3-1Y에 의한 c-Met 분해가 라이소좀 경로에 의한 것임을 입증하는 것이다.

[0347] **4.7. 면역 세포화학 시험(Immunocytochemistry)**

[0348] 면역세포화학법에 의하여 항체 매개 c-Met 및 라이소좀 동일위치화(co-localization)을 분석하였다. 세포주 MKN45 또는 EBC-1 2×10^5 cells/ml를 각각 1 μg/ml의 c-Met 항체 L3-1Y와 함께 4시간 동안 배양하였다. 배양된 세포들을 2%(w/v) 파라포름알데하이드로 고정시키고, PBS-T (0.1%(v/v) Triton X-100 in PBS)에 용해된 5%(v/v) 염소혈청 (Jackson ImmunoResearch)으로 30분간 블라킹시켰다. 세포들을 Alexa 488-컨쥬게이트된 항-마우스 IgG (Invitrogen)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBC (Gibco)로 수 차례 세척한 후, DAPI (4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride; Vector lab)로 형광 마운팅 배지에 마운팅시켰다. 면역형광 이미지는 형광현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 얻었으며, 도 4g에 나타내었다. L3-1Y-APC는

항체에 Tag을 붙여 이를 관찰할 수 있도록 만든 것이다. 도 4g 결과를 통해 항체 L3-1Y가 lysosome에서 관찰되는 것으로 보아 L3-1Y에 의한 c-Met 분해유도 과정에 lysosome이 관련함을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

[0349] 실시예 5: 항 c-Met 항체의 종양 치료 효과(*in vivo*)

[0350] 5.1. 종양 이종이식(xenograft) 모델에서의 종양 치료 효과

[0351] c-Met 항체의 종양 성장에 대한 *in vivo* 효과를 확인하기 위하여, 5-6주령 수컷 BALB/c 누드 마우스 (Pharmalegacy, China에서 모든 실험 진행)에 대한 종양 이종이식 실험을 수행하였다. 마우스를 종양 접종 받기 전에 적어도 1주일 동안 순응시켰다.

[0352] 그 후, 마우스를 1-2% 이소플란으로 마취시키고, 오른쪽 옆구리 부위에 EBC-1 및 HS746T 세포를 각각 5×10^6 cell의 양으로 피하 주입하였다. 7일 후, 평균 종양 크기가 50 mm^3 이상일 때, 각 마우스를 다음의 처리군으로 분류하였다: 항체 5D5 (5 mg/kg I.V. 1회/1주일) 처리군, 항체 L3-1Y (5 mg/kg I.V. 1회/1주일) 처리군, 및 비히클 (PBS 0.2 ml I.V. 1회/1주일) 처리군(대조군). 각 처리군은 15마리 마우스로 구성하였다.

[0353] 총 5주의 시험 기간 동안 1주일에 203회 종양 부피와 체중을 측정하였다. 종양 부피(V)는 다음과 같이 산출하였다:

[0354]
$$V(\text{mm}^3) = \{ \text{장축 길이}(\text{mm}) \times (\text{단축 길이}(\text{mm}))^2 \} / 2.$$

[0355] 상기 얻어진 결과를 도 5c 및 표 3(EBC-1 세포)과, 도 5d 및 표 4(HS746T 세포)에 나타내었다

표 3

EBC1	At d28: TV
Vehicle	0.0
L3-1Y (1)	84.6
L3-1Y (2)	87.0
5D5	23.3

[0356]

표 4

HS746T	At d24 : TV
Vehicle	0.0
L3-1Y (1)	Regression
L3-1Y (2)	Regression
5D5	56.4

[0357]

[0358] L3-1Y (1)는 hinge가 Th7이고 hIgG1을 가지는 항체 (통상적으로 L3-1Y라고 기재)이고 L3-1Y (2)는 동일 epitope을 가지지만 hIgG2 backbone을 가지는 항체이다. 도 5c 및 5d는 EBC-1 세포 (5c) 및 HS746T 세포 (5d)의 시간에 따른 종양 부피 성장을 보여주는 그래프 (n=15)이고 (비교를 위해 CPT-11이라는 c-Met의 small molecule 억제제와 경쟁사 항체 (Reference L)를 사용하였다.), 표 3 및 표 4는 EBC-1 세포 (표 3) 및 HS746T

세포 (표 4)의 처리 28일째의 종양 크기를 비히클 처리군(억제율 0%)과 비교한 비율로서 나타낸 각 항체의 종양 억제율(%)을 보여주는 것이다.

[0359] 도 5c-5d 및 표 3-4에서와 같이, 항체 L3-1Y는 다른 항체와 비교하여 생체 내에서 현저한 종양 억제 효과를 보이는 것을 확인할 수 있다.

[0360] **5.2. 세포 이동 에세이(Cell migration assay)**

[0361] xCelligence DP 시스템으로 CIM-plate (Roche)를 이용하여 세포 이동이 관찰되었다. Upper chamber에 5×10^4 cells을 100 μ l의 무혈청 배지에 섞어 넣어준다. CIM-plate 16의 lower part는 10%의 혈청이 들어가는 배지로 채워준다 (chemo-attractant로 이용). HGF를 사용할 경우에는 200ng/ml의 HGF를 10% 혈청이 있는 배지에 함께 넣어주었다. 세포 이동은 8- μ m pore membrane을 통과한 것만 impedance signal이 측정되고 이를 통하여 이동능력을 평가할 수 있다. EBC1 (도 5a)의 경우, 5D5에 의해서는 세포 이동능력이 10%정도 증가함을 확인할 수 있는 반면, L3-1Y는 90% 이상 세포 이동능력을 억제함을 확인하였다. 또한, HS746T (도 5b)의 경우에서도 HGF 처리 유무와 관련 없이 모든 경우에서 L3-1Y만 세포 이동능력 감소효과를 보임을 확인할 수 있었다.

[0362] **실시예 6: 항 c-Met 항체의 EGFR 표적 치료 내성 종양에서의 항종양 효과**

[0363] **6.1. EGFR 표적 치료 내성 종양 제작**

[0364] HCC827 인간 폐암 세포주에 EGFR antagonist인 erlotinib을 일정 기간 동안 in vitro 처리하여 HCC827 ER (HCC827 erlotinib-resistant) 세포주를 확립하였다. 보다 구체적으로, HCC827 인간 폐암 세포주 (ATCC) 2×10^5 cells/ml에 EGFR 길항제인 erlotinib (Selleck Chemical)을 in vitro에서 5nM에서 10 μ M로 5개월간 점진적으로 농도를 증가시키며 처리하여, erlotinib 내성 균주(Erlotinib resistant cell; ER 세포)인 HCC827 ER10, 및 HCC827 ER15 세포를 제작하였다.

[0365] erlotinib 내성 생성 여부를 확인하기 위하여, 세포 생존률 시험을 수행하여 그 결과를 도 7에 나타내었다. 모 세포인 HCC827의 경우 erlotinib이나 BIBW2992 (Selleck Chemical)을 처리할 경우 세포 생존률이 줄어드는 것을 확인할 수 있으나 HCC287-ER (Erlotinib 내성이 생긴 세포)의 경우에는 erlotinib을 처리했을 때에는 전혀 세포 생존률 감소를 볼 수 없고 또다른 EGFR 길항제인 BIBW2992를 처리하였을 때도 고농도를 제외하고는 (세포 사멸이 일어난 것으로 판단) 세포사멸이 유도되지 않음을 확인할 수 있다. 도 7에서와 같이, ER세포주는 erlotinib뿐만아니라 또 다른 EGFR 길항제인 BIBW2992에 대해서도 내성이 생긴 것을 확인할 수 있었다. 이는 다른 EGFR 길항제에도 내성이 생겼을 가능성이 있음을 보여 준다.

[0366] 한편, HCC827, HCC827 ER10, 및 HCC827 ER15 세포에서의 p-c-Met, c-Met, EGFR, Cbl, LRIG1, 및 GAPDH 발현을 각각의 항체를 사용한 면역블라팅으로 분석하였다. 이 때, p-c-Met, c-Met, Cbl, EGFR 및 GAPDH (14C10)에 대한 항체는 Cell Signaling社로부터 구입하여 사용하였으며, LRIG1에 대한 항체는 AbCam社로부터 구입하여 사용하였다.

[0367] 상기 얻어진 면역블라팅 분석 결과를 도 6a에 나타내었다. 도 6a에 나타낸 바와 같이, 모든 ER 세포에서 c-Met의 유전자 레벨이 비내성 세포 HCC827보다 3배 정도 증가된 것을 확인할 수 있고, 이는 EGFR inhibitor에 의한 지속적인 노출이 c-Met level을 높이고 이를 통해 내성이 생길 수 있음을 말해준다

[0368] **6.2. 항 c-Met 항체와 EGFR 길항제의 병용투여에 따른 종양 세포 사멸 효과**

[0369] 상기 실시예 6.1에서 c-Met level은 높은 반면 Cbl 레벨은 비교적 낮은 ER 세포인 HCC827 ER15를 사용하여 병용투여에 따른 종양 세포 사멸을 시험하였다.

[0370] 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^4 cells/ml의 HCC827 ER15를 분주하고, L3-1Y 0.14 μ g/ml, erlotinib 10 nM, 및 L3-1Y 0.14 μ g/ml + erlotinib 10 nM를 처리하고 37°C에서 72시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 1.4의 방법에 기초하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0371] 상기 얻어진 결과를 항 c-Met 항체와 EGFR 길항제가 모두 처리되지 않은 균의 세포 생존률(100%)과 비교하여 상

대적인 값으로 환산하여 도 6b에 나타내었다. 도 6b에 나타난 바와 같이, EGFR 길항제 내성 세포에 항 c-Met 항체 L3-1Y와 EGFR 길항제 erlotinib를 각각 투여하는 경우에 종양 세포 사멸 효과가 거의 나타나지 않은 반면, 항체 L3-1Y와 erlotinib을 병용투여하는 경우에는 세포 생존률이 약 65% 정도로 줄어서, 약 35%의 종양 세포 사멸 효과를 보이는 것으로 확인되었다.

[0372] **6.3. 항 c-Met 항체와 EGFR 길항제의 병용투여에 따른 c-Met 분해 정도**

[0373] HCC827 ER15 세포에서의 항 c-Met 항체와 EGFR 길항제의 병용투여에 따른 c-Met 분해 정도를 시험하기 위하여, HCC827 ER15 세포에 Erlotinib과 항체 L3-1Y 또는 5D5를 병용 처리한 후 잔존하는 c-Met 단백질 농도를 측정하여, c-Met 항체에 따른 c-Met 분해 효율을 시험하였다.

[0374] 96-웰 플레이트에 웰당 2 X 10⁵ cells/ml의 HCC827 ER15에 항체 L3-1Y 0.2 ug/ml + erlotinib 100 nM, L3-1Y 1.0 ug/ml + erlotinib 100 nM, 5D5 0.2 ug/ml+ erlotinib 100 nM 또는 5D5 0.1 ug/ml+ erlotinib 100 nM을 처리하고, 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 1.1의 방법에 기초하여 세포 생존률을 측정하였다. 대조군으로, erlotinib 100 nM만을 처리한 군을 사용하였다.

[0375] ELISA를 통하여 잔존하는 c-Met 농도를 대조군(erlotinib 단독 처리군, 100%)과 비교한 상대값으로 측정하여 도 6c에 나타내었다. 도 6c에 나타난 바와 같이, erlotinib 내성 균주인 HCC827 ER15에 erlotinib와 항체 L3-1Y를 병용 처리시 항체의 처리 용량에 비례하여 c-Met 분해 효과를 발휘하는 것으로 나타났으며, 5D5와 병용 처리시와 비교하여, 동일 용량에서 현저한 c-Met 분해 효과를 보이는 것이 확인되었다.

[0376] **6.4. EGFR 표적 치료 내성 시료에서의 Cb1 비의존적 암세포 억제 효과**

[0377] 폐암 환자(LXFE1422, LXFA526, LXFA1647; Oncotest사에서 제공, c-Met small molecule 억제제로 효능을 본 sample) 유래 세포주(비소세포폐암 (NSCLC))의 3D 배양(RPMI (GIBCO) 배지 이용, 배양온도 37°C)을 통해 키워진 콜로니에 항 c-Met 항체를 처리하며 항암효과를 입증하는 실험을 진행하였다.

[0378] 상기 폐암 환자 중, LXFE1422 환자의 경우 cetuximab이라는 EGFR을 타겟하는 항암치료제에 저항성이 없으나 LXFA526과 LXFA1647 환자의 경우 저항성을 가져 cetuximab으로는 치료가 불가능하였다.

[0379] 상기 환자로부터 유래한 폐암 조직에서 용해 버퍼 Complete lysis-M (Roche, 04719956001)를 사용하여 단백질을 추출하고, 웨스턴 블랏팅하여 얻어진 결과를 도 6d에 나타내었다. 도 6d에서 알 수 있는 바와 같이, cetuximab에 저항성을 갖는 LXFA526과 LXFA1647 환자에서는 EGFR과 Cb1 농도가 낮아져 있음을 확인할 수 있다.

[0380] 상기 환자 샘플에서 c-Met 유전자의 juxtamembrane 도메인을 코딩하는 엑손 14를 one-step 역전사 (RT)-PCR 키트에서 다음의 프라이머를 사용하여 증폭시켰다:

[0381] 프라이머 F: 5'-TGAAATGACAGCGACTAAAT-3' (서열번호 106); 및

[0382] 프라이머 R: 5'- TTGAAATGCACAATCAGGCTAC-3' (서열번호 107).

[0383] RT-PCR 조건은 다음과 같다:

[0384] 50°C 30분, 95°C 15분 1 사이클,

[0385] 94°C 40초, 62°C 40초, 및

[0386] 72°C 1분 45 사이클, 및 72°C 10분 1 사이클.

[0387] 상기 c-Met 유전자의 엑손 14를 포함하는 RT-PCR 산물의 아가로오스 젤 전기영동 사진을 도 6e에 나타내었다. 이 실험을 통하여 c-Met 자체의 splice mutation은 세 환자 모두에서 발견되지 않음을 확인할 수 있었다.

[0388] EGFR과 Cb1 농도가 낮아져 있는 환자 샘플에 항 c-Met 항체 L3-1Y가 항암효능을 보임을 실험으로 증명하였다. 상기 환자 유래 암세포를 Oncotest사에 의뢰하여 3D culture를 진행하여 colony생성능력을 평가하였고, L3-1Y 100 ug/ml를 처리한 후, 콜로니 형성 효과를 대조군(100 ug/ml 처리군, 100%)에 대한 상대적 상대적 비율로 도 6f에 나타내었다. 도 6f에 나타난 바와 같이, LXFE1422환자에서는 아무런 효과가 없었고, LXFA526과 LXFA1647 환자에서는 각각 44%(콜로니 형성을 56%), 33%(콜로니 형성을 67%)의 암 억제 효과를 관찰할 수 있었다.

수탁번호

[0389]

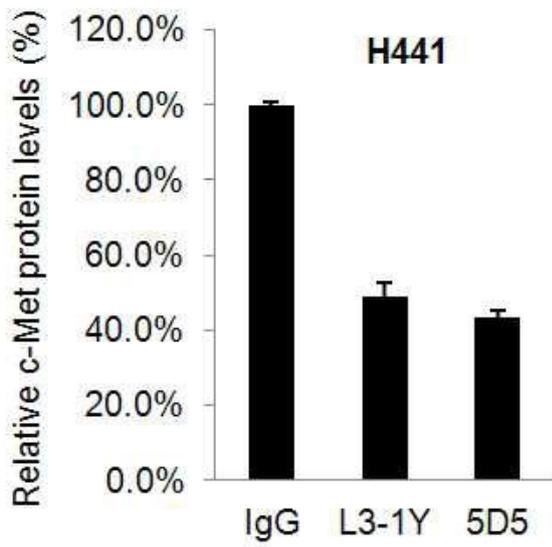
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00220

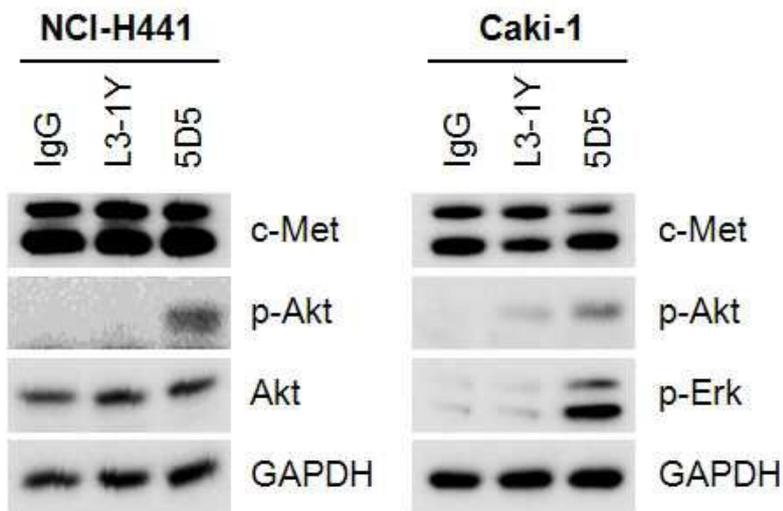
수탁일자 : 20091006

도면

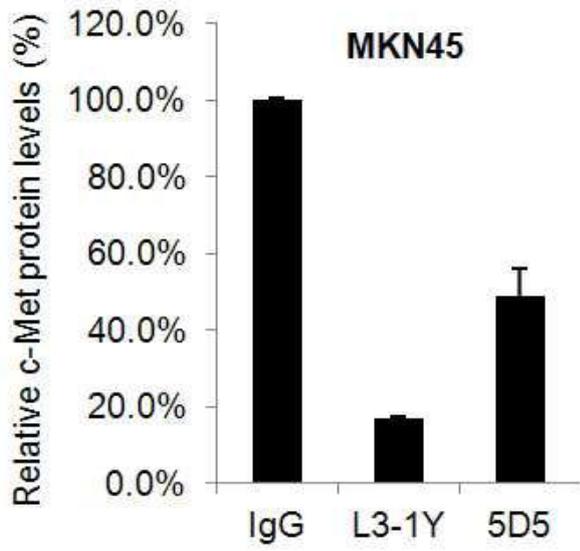
도면1a



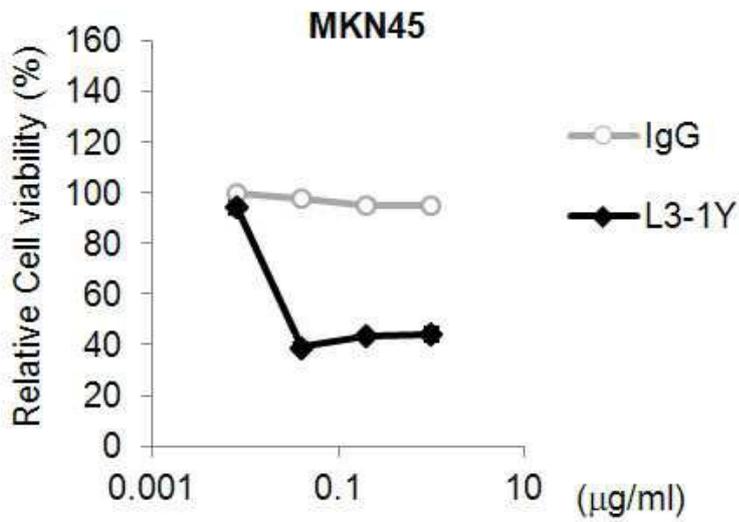
도면1b



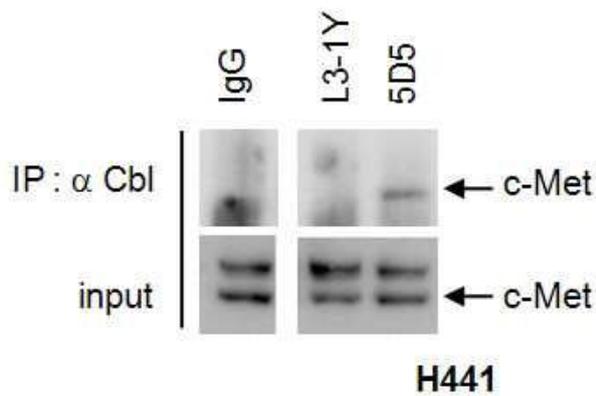
도면1c



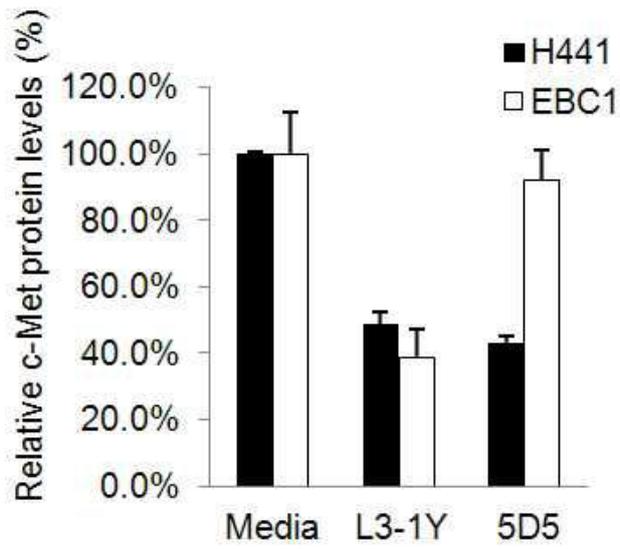
도면1d



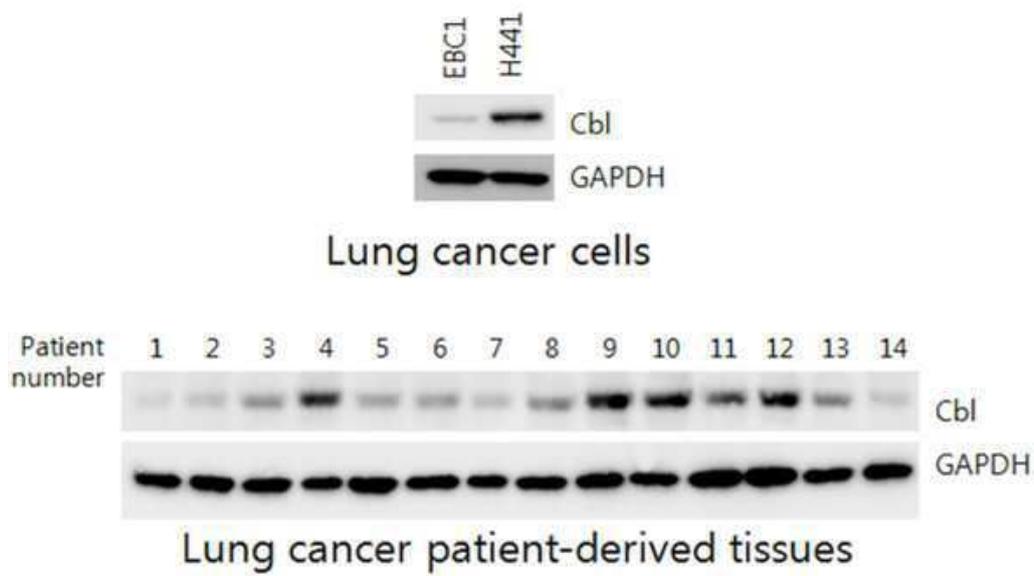
도면2a



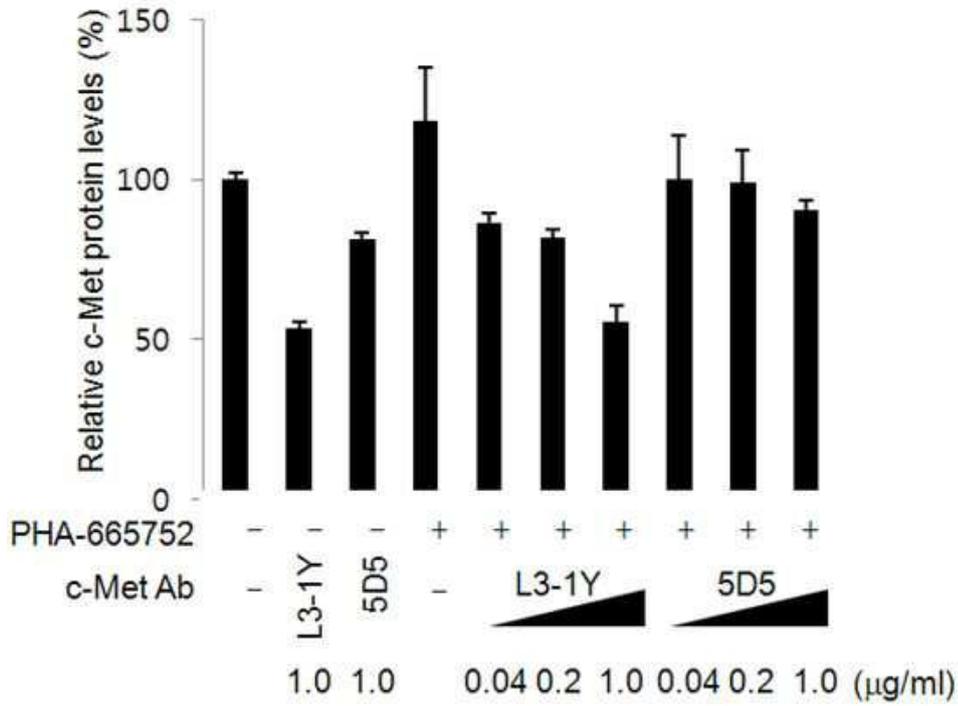
도면2b



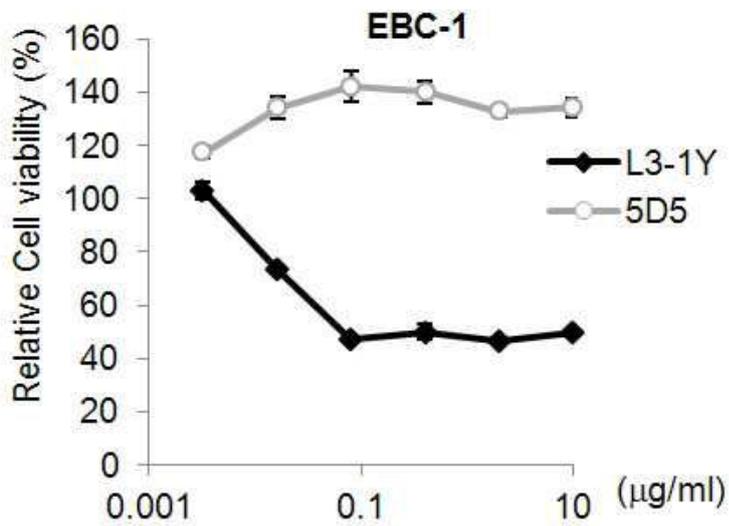
도면2c



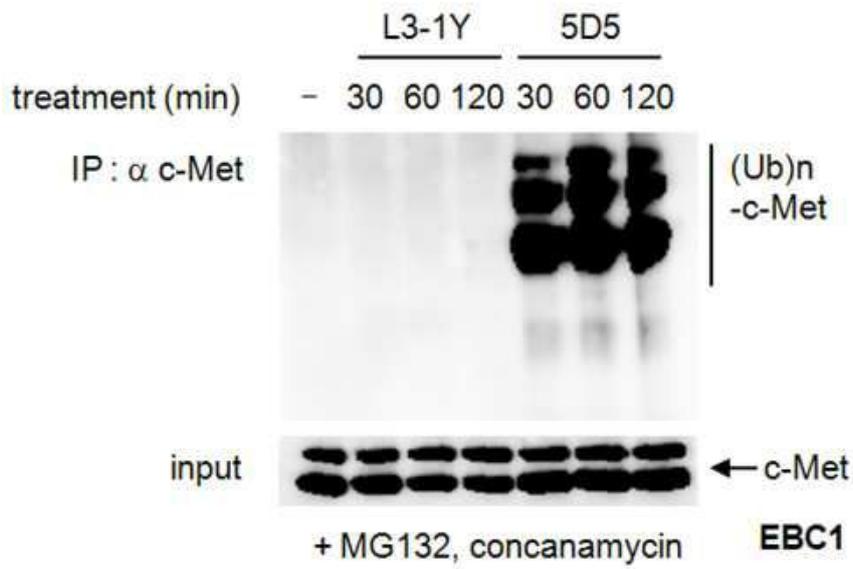
도면2d



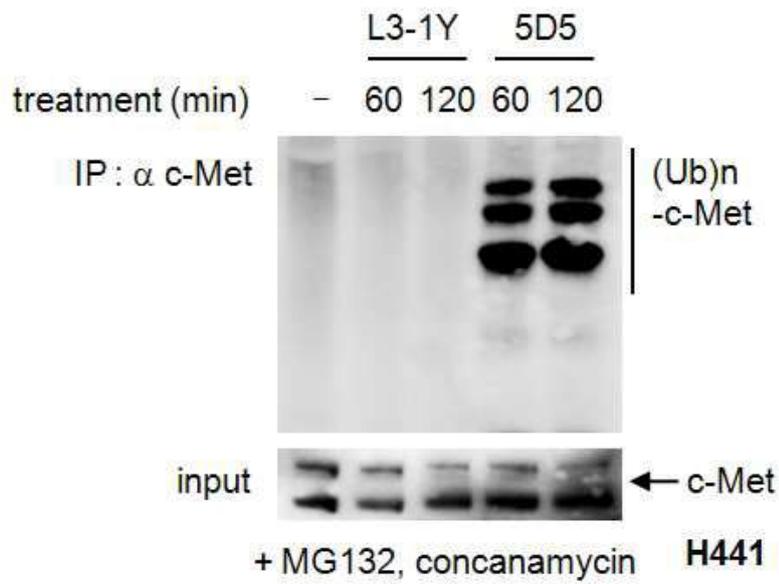
도면2e



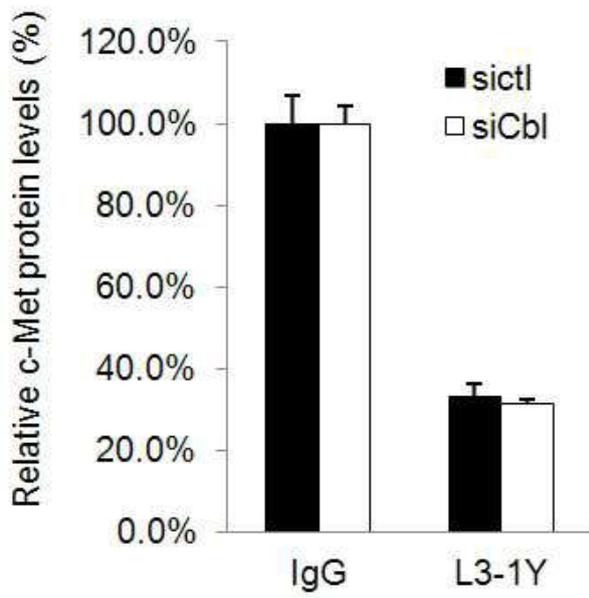
도면3a



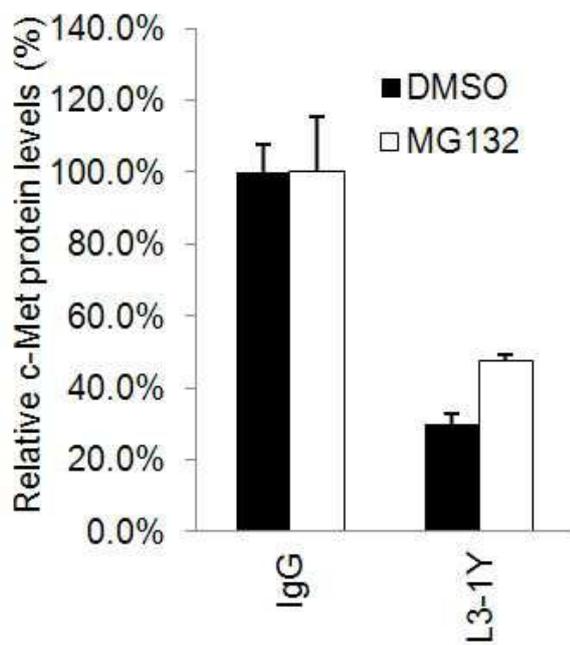
도면3b



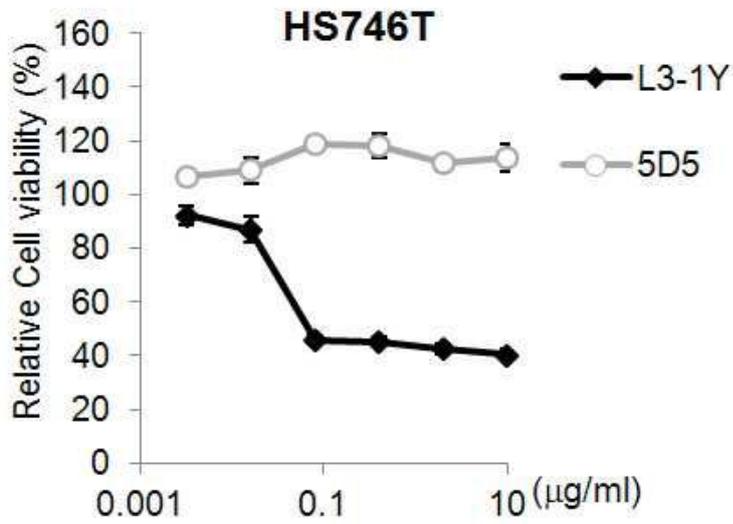
도면3c



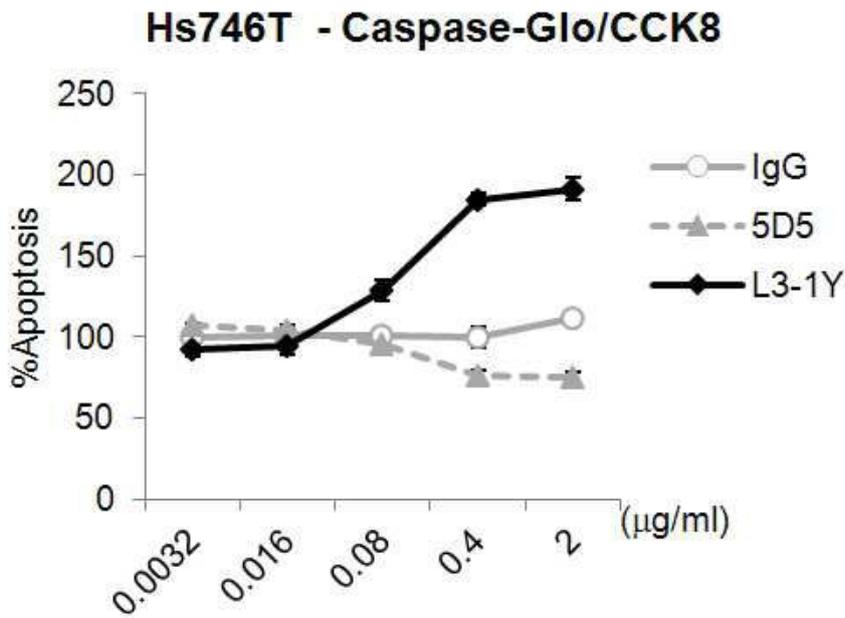
도면3d



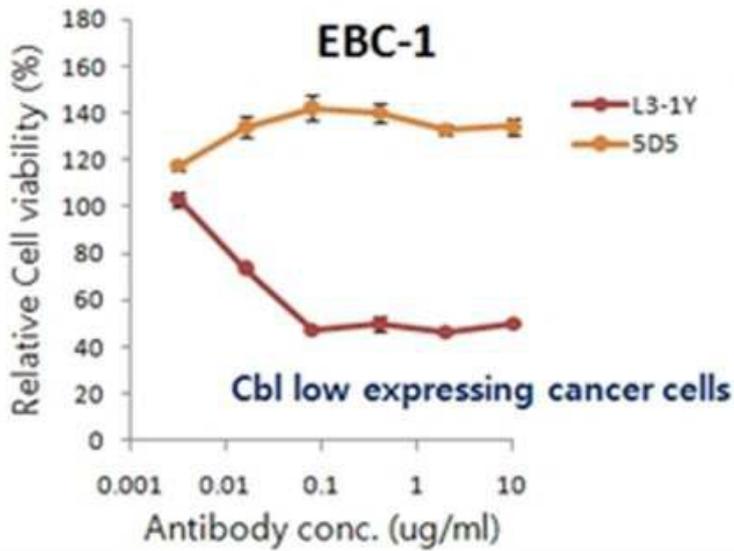
도면3e



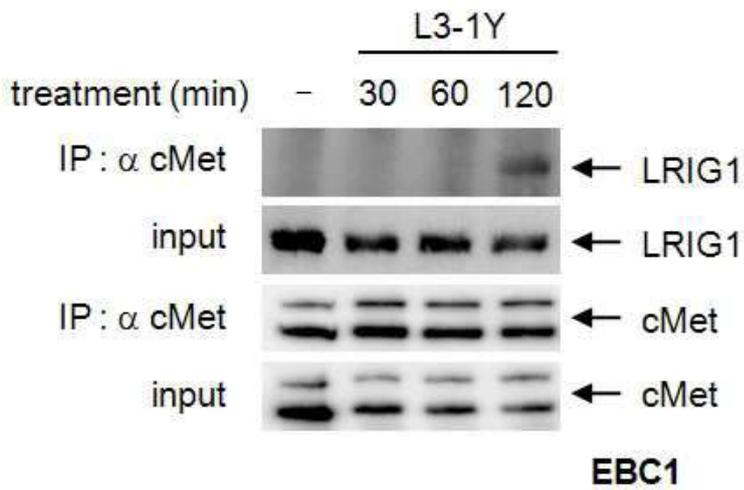
도면3f



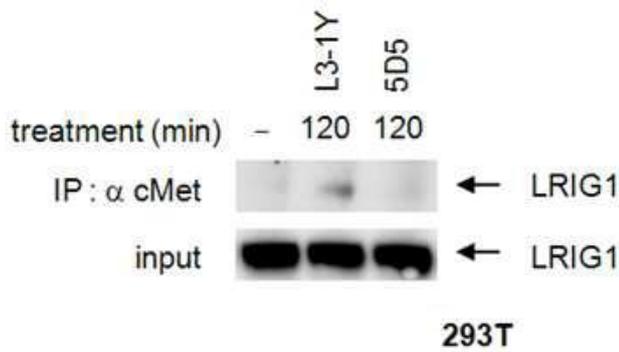
도면3g



도면4a

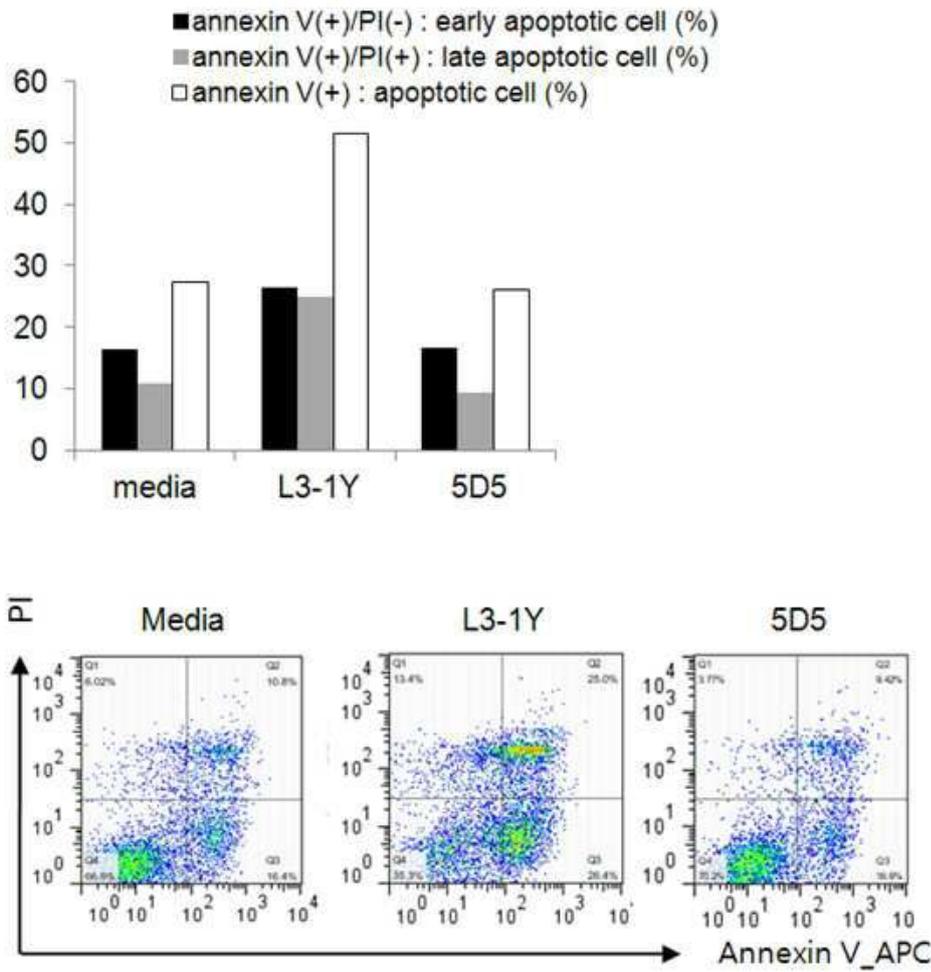


도면4b

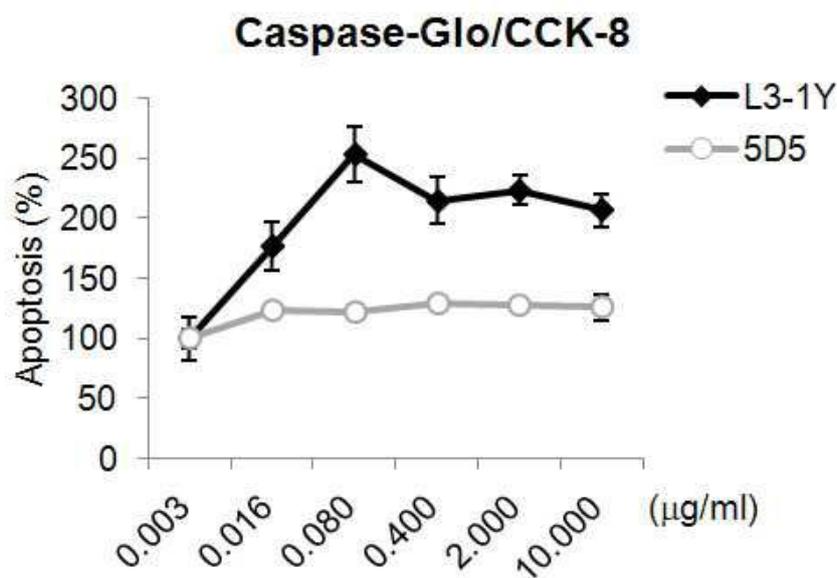


LRIG1-complex purification using 293 systems
In vitro binding (domain mapping) between c-Met and LRIG1

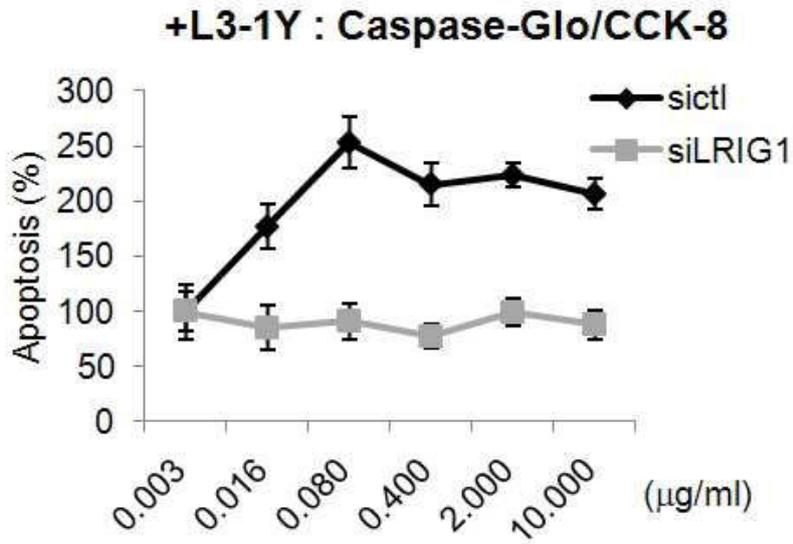
도면4c



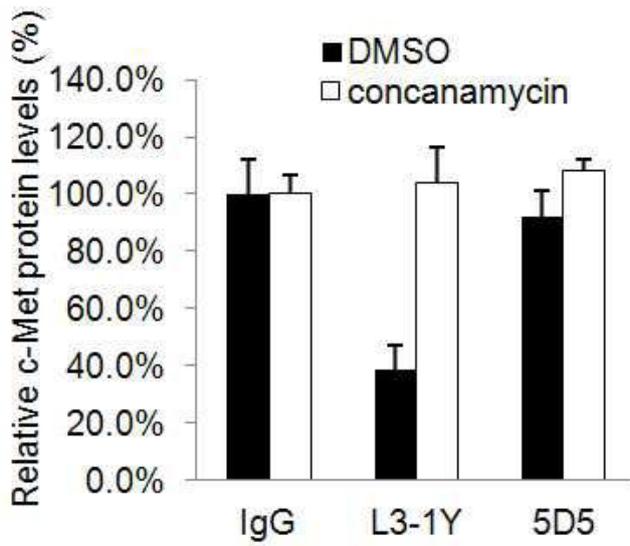
도면4d



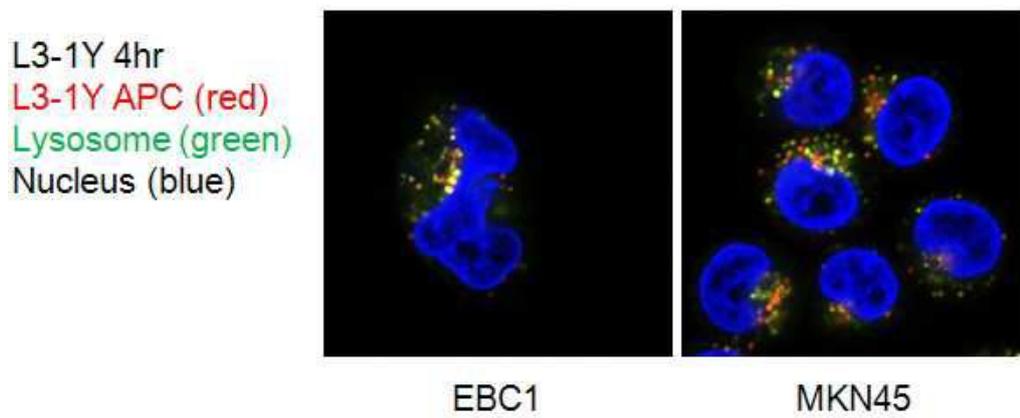
도면4e



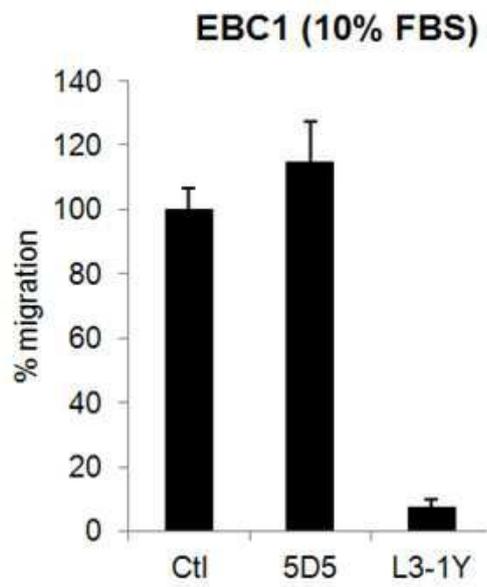
도면4f



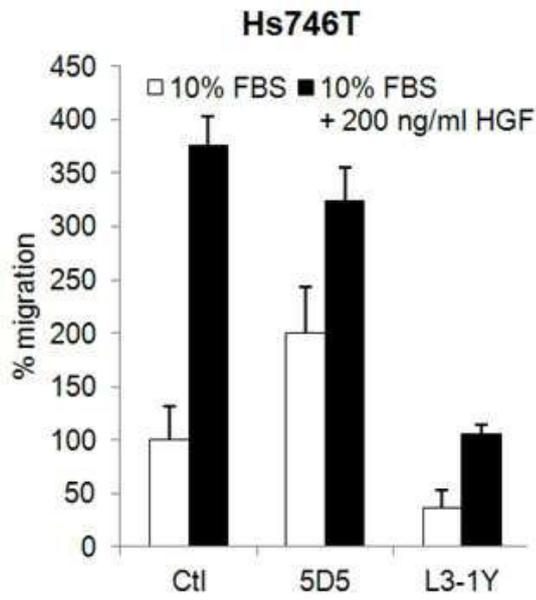
도면4g



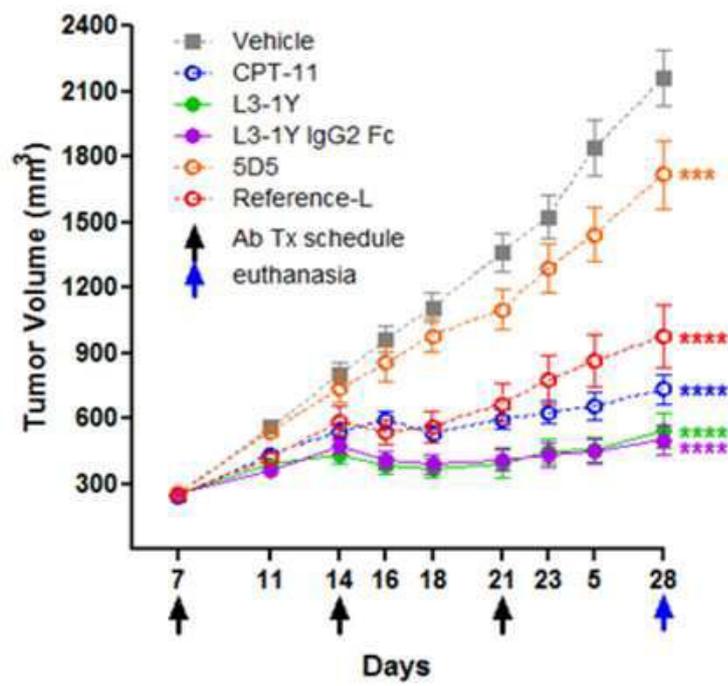
도면5a



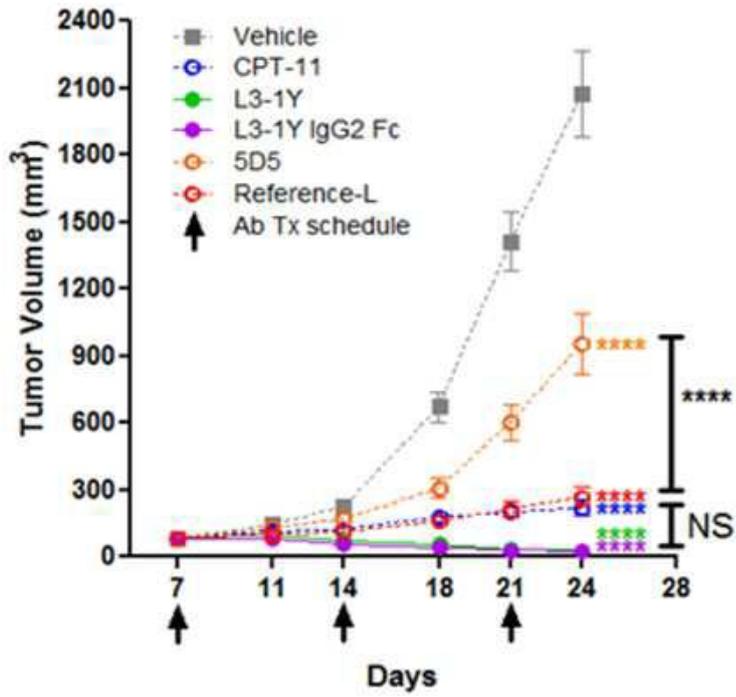
도면5b



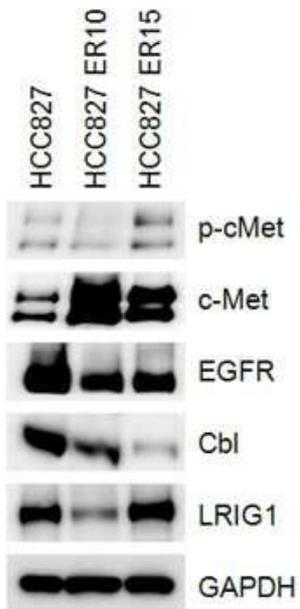
도면5c



도면5d

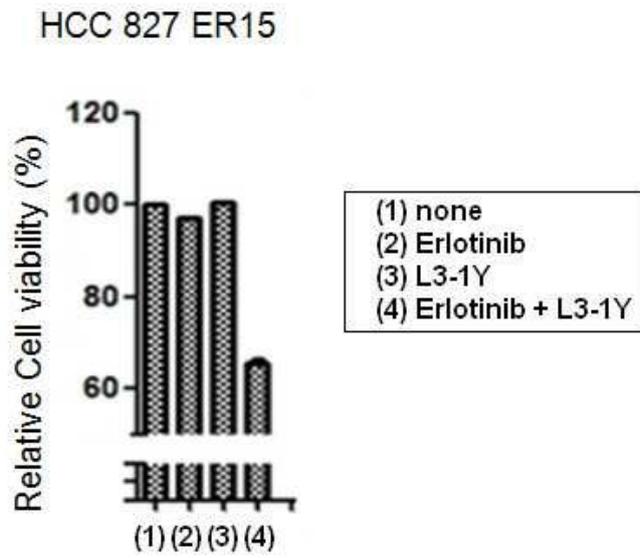


도면6a

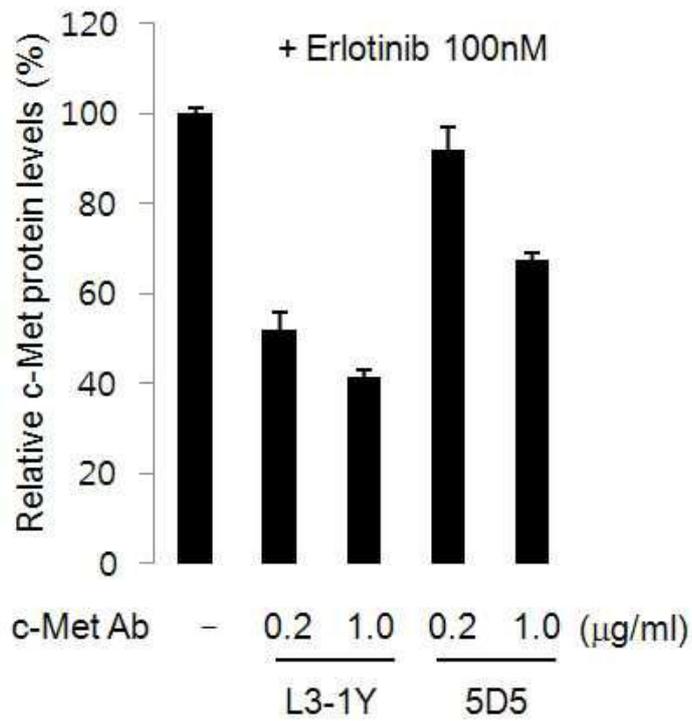


HCC827 ER : Elrotinib resistant

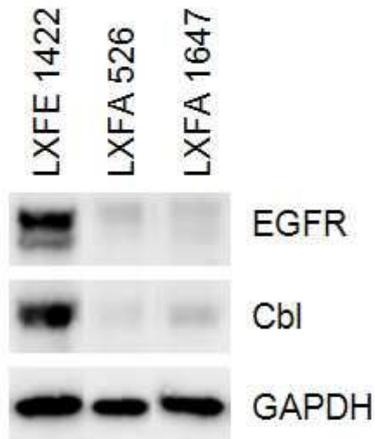
도면6b



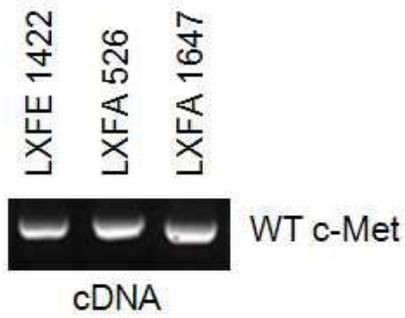
도면6c



도면6d



도면6e

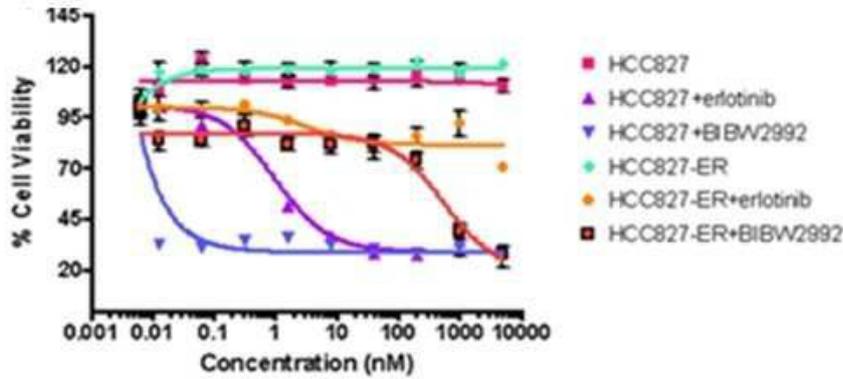


도면6f

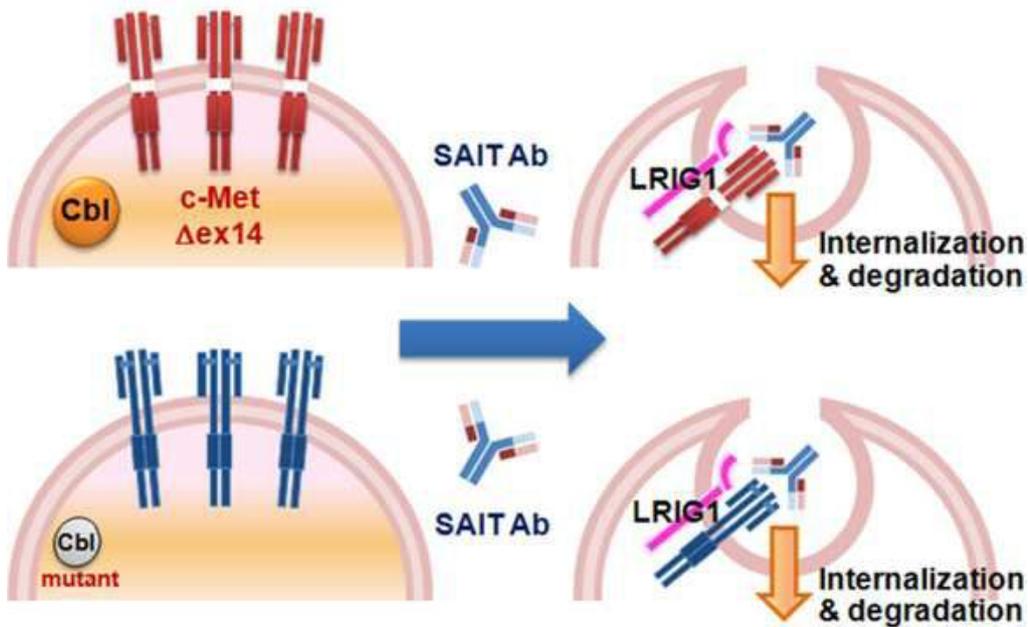
Efficacy : % of (-) ctr : Colony # at Max dose (100ug/ml)

Tumor	Efficacy (L3-1Y)
LXFE1422	no
LXFA 526	++ (56)
LXFA 1647	+ (67)

도면7



도면8



서열 목록

- <110> Samsung Electronics Co. Ltd
- <120> Use of Cbl as a biomarker for identifying a subject for application of anti-c-Met antibodies
- <130> DPP20125481KR
- <150> KR10-2012-0080145
- <151> 2012-07-23
- <160> 107
- <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

Arg 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

<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 ccaccatgga atggagctgg gtttttctcg taacactttt aaatggtatc 60

cagtgtgagg tgaagctggt ggagctgga ggaggcttgg tacagcctgg gggttctctg 120

agactctcct gtgcaacttc tgggttcacc ttcactgatt actacatgag ctgggtccgc 180

cagcctccag gaaaggcact tgagtggttg ggttttatta gaaacaaagc taatggttac 240

acaacagagt acagtgcac tgtgaagggt cggttcacca tctccagaga taattcccaa 300

agcatcctct atcttcaaat ggacaccctg agagctgagg acagtgccac ttattactgt 360

 gcaagagata actggtttgc ttactggggc caagggactc tggctactgt ctctgcagct 420
 agcaccaagg gcccatcggf ctteccctct gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
 atctgcaac tgaatcaca gccccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 720
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780

 tcagtcttc tcttcccc aaacccaag gacacctca tgatctccg gaccctgag 840
 gtcacatgcg tggigtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatccaag acaaaagccg gggaggagca gtacaacagc 960
 acgtaccgtg tggctcagct cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccg ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200

 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 1380
 aagaccctct cctgtctcc gggtaatga 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 aggcccaggt cctcatgttg 60
 ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gacattttga tgaccaggtc tccatcctcc 120
 ctgactgtgt cagcaggaga gaaggtcact atgagctgca agtccagtca gagtctttta 180
 gctagtggca accaaaataa ctacttgcc tggcaccagc agaaaccagg acgatctcct 240
 aaaatgctga taatttgggc atccactagg gtatctggag tccctgatcg cttcatagge 300
 agtggatctg ggacggattt cactctgacc atcaacagtg tgcaggctga agatctggct 360
 gtttattact gtcagcagtc ctacagcgt cgcctcacgt 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

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

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

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 48

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttact gactactaca tgagctgggt cgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg gttgggcttt attagaaaca aagctaacgg ttacaccaca 180

gaatacagtg cgictgtgaa aggcagattc accatctcaa gagataattc aaagaactca 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 300
 gataactggt ttgcttactg ggtcaagga accctggtea ccgtctctc ggctagcacc 360
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
 gccctgggct gcctggtaaa ggactactc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540
 tcctcagca gcgtggtagc cgtgcctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
 gacaaaaact acacatgcc accgtgccc gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc 720
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
 tgcgtggtag tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840
 ggctggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
 cgtgtggta gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt getggactec 1200
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
 aacgtcttct catgctcgt gatgatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
 ctctcctgt ctccgggtaa atgactcgag 1350

<210> 49

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

gaggttcagc tggtagagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
 tcctgtgcag ctcttggtt cacttcact gattactaca tgagctgggt gcgtcaggcc 120
 ccgggtaagg gcctggaatg gttgggtttt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180
 gagtacagtg catctgtgaa gggctgtttc actataagca gagataattc caaaaacaca 240
 ctgtacctgc agatgaacag cctgcgtgct gaggacactg ccgtctatta ttgtgctaga 300
 gataactggt ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ccgtctcctc ggctagcacc 360

 aagggcccat cggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
 gccctgggct gcctggtcaa ggactactc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac 540
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc 600
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
 gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac 900
 cgtgtggtca gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggtttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
 aacgtcttct catgctcctg gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
 ctctcctgt 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 agtccagcca gagtctttta gctagcggca accaaaataa ctacttagct 120

tggcaccage agaaaccagg acagectect aagatgetca ttatttgggc atctaccgg 180
glatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaatc ctatagtgt 300
cctctcacgt teggaggcgg taccaagggtg gagatcaaac gtacgggtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540

ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcacce atcagggcct gagctcgccc 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 ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctctgca agtccagtc gagtctttta gctagtggca accaaaataa ctacttgccc 120

tggcacctgc agaagccagg gcagctcca cagatgtga tcatttgggc atccactagg 180
gtatctggag tcccagacag gttcagtggc agtgggtcag gcactgattt cacactgaaa 240
atcagcaggg tggaggctga ggatgttga gtttattact gccagcagtc ctacagcgct 300
ccgctcacgt tggacaggg taccaagctg gagctcaaac gtacgggtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540

ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcacce 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 ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtctttta gctagcggca accaaaataa ctacttagct 120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtcga ttatttgggc atctaccgg 180
 gtatccgggg tccttgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaatc ctatagtgt 300
 cctctcacgt tcggaggcgg taccaagtg gagatcaaac gtacggtggc tgcacatct 360
 gtcttcactt tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gacgaggaca gcaaggacag cacctacagc 540

ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcacce atcagggcct gagctgccc 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 ctgtccgct ctgtgggcca tagggtcacc 60
 atcacctgca agtccagtc gagtctttta gctagtggca accaaaataa ctacttgccc 120

tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg aaaatgtgga ttatttgggc atccactagg 180
 gtatctggag tccttctctg cttctctgga tccgggtctg ggacggattt cactctgacc 240
 atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca acttattact gtcagcagtc ctacagcgt 300
 ccgctcacgt tcggacaggg taccaagtg gagatcaaac gtacggtggc tgcacatct 360
 gtcttcactt tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 480

caatcgggta acicccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540

ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600

gaagtcacce 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 tcaattggtt gaatctggtg gtggtttggt tcaaccaggt 60

ggttctttga gattgtcttg tgctgcttct ggttttactt tcaccgatta ttacatgtcc 120

tgggttagac aagctccagg taaaggtttg gaatggttgg gtttcattag aaacaaggct 180

aacggttaca ctaccgaata ttctgcttct gttaagggta gattcacat ttctagagac 240

aactctaaga acaccttgta cttgcaaatg aactccttga gagctgaaga tactgctgtt 300

tattactcgc ctagagataa ttggtttgct tattggggtc aaggtacttt ggttactggt 360

tcttctggcc tcgggggcct cggaggagga ggtagtggcg gaggaggctc cggtggatcc 420

agcggtgtgg gticcgatat tcaaatgacc caatctccat cttctttgtc tgcttcagtt 480

ggtgatagag ttaccattac ttgtaagtcc tccaatctt tgttggcttc tggtaatcag 540

aaacattact tggtttggca tcaacaaaaa ccaggtaaag ctccaaagat gttgattatt 600

tgggcttcta ccagagtttc tgggtttcca tctagatfff ctggttctgg ttccggtact 660

gattttactt tgaccatttc atccttgcaa ccagaagatt tcgctactta ctactgtcaa 720

caatcttact ctgctccatt gacttttggg caaggtacaa aggtcgaat caagagagaa 780

ttcggtaaage ctatccetaa ccctctctc ggtctcgatt ctacgggtgg tgggtgatct 840

ggtgggtggg gtctctgggg tgggtggttct caggaactga caactatatg cgagcaaatc 900

ccctcaccaa ctttagaate gacgccgtac tctttgtcaa cgactactat ttggccaac 960

gggaaggcaa tgcaaggagt ttttgaatat tacaatcag taacgtttgt cagtaattgc 1020

ggttctcacc 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 ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt 60

cctcgtcttc accggtcgcg ttctgaaac gcagatgtgc ctgcgccgc actgctccga 120

acaataaaga ttctacaata ctactttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac 180

ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga 240

ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat 300

taacagatat ataatgcaa 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 tgggtggtttg gttcaaccag gtggttcttt gagattgtct tgtgctgctt 660

ctggttttac tttcaccgat tattacatgt cctgggttag acaagctcca ggtaaagggt 720

tggaatggtt gggtttcatt agaaacaagg ctaacggtta cactaccgaa tattctgctt 780

ctgttaaggg tagattcacc atttctagag acaactctaa gaacaccttg tacttgcaaa 840

tgaactcctt gagagctgaa gatactgctg ttattactg cgctagagat aattggtttg 900

cttattgggg tcaaggtact ttggttactg tttcttctgg cctcgggggc ctcgaggag 960

gaggtagtgg cggaggaggc tccggtggat ccagcgggtg gggttccgat attcaaatga 1020

ccaatctcc atcttctttg tctgcttcag ttggtgatag agttaccatt acttgaagt 1080

cctccaatc tttgttggt tctggtaatc agaacaatta cttggcttgg catcaacaaa 1140

aaccaggtaa agctccaaag atgttgattia ttgggcttc taccagagtt tctgggttc 1200
catctagatt ttctggttct ggttccggtg ctgattttac ttgaccatt tcatccttgc 1260
aaccagaaga ttctgctact tactactgtc aacaatctta ctctgctcca ttgacttttg 1320

gtcaaggtac aaaggtcgaa atcaagagag aattcggtaa gcctatccct aaccctctcc 1380
tcggtctcga ttctacgggt ggtggtggat ctggtggtgg tggttctggt ggtggtggtt 1440
ctcaggaact gacaactata tgcgagcaaa tcccctcacc aactttagaa tgcagccct 1500
actctttgtc aacgactact attttggcca acgggaaggc aatgcaagga gtttttgaat 1560
attacaaatc agtaacgttt gtcagtaatt gcggttctca cccctcaaca actagcaaag 1620
gcagcccat aaacacacag tatgtttttt gagtttaaac ccgctgatct gataacaaca 1680
gtgtagatgt aacaaaatcg actttgttcc cactgtactt ttagctcgta caaaatacaa 1740

tatacttttc atttctccgt aaacaacatg ttttcccatg taatatectt ttctattttt 1800
cgttccgtta ccaactttac acatacttta tatagctatt cacttctata cactaaaaaa 1860
ctaagacaat ttaattttg ctgcctgcca tatttcaatt tgttataaat tcctataatt 1920
tatectatta gtagctaaaa aaagatgaat gtgaatcgaa tcctaagaga attgggcaag 1980
tgcacaaaca atacttaaat aaatactact cagtaataac ctatttctta gcatttttga 2040
cgaaatttgc tattttgtta gagtctttta caccatttgt ctccacacct ccgcttacet 2100
caacaccaat aacgceattt aatctaagcg catcaccaac attttctggc gtcagtccac 2160

cagctaacat aaaatgtaag ctctcggggc tctcttgect tccaaccag tcagaaatcg 2220
agttccaatc caaaagtcca cctgtcccac ctgcttctga atcaacaag ggaataaacg 2280
aatgaggttt ctgtgaagct gcactgagta gtatgttgca gtccttttga aatcagagtc 2340
ttttaataac tgcaaacgg aggaactctt ggtattcttg ccacgactca tctccgtgca 2400
gttggacgat atcaatgccg taatcattga ccagagecaa aacatcctcc ttaggttgat 2460
tacgaaacac gccaaccaag tatttcggag tgctgaact atttttatat gcttttacia 2520
gacttgaaat ttctcttga ataaccgggt caattgttct ctttctattg ggcaacata 2580

taataccag caagtcagca tcggaatcta gagcacattc tgcggcctct gtgctctgca 2640
agccgcaaac ttccaccaat ggaccagaac tacctgtgaa attaataaca gacatactcc 2700
aagctgcctt tgtgtgctta atcacgtata ctcacgtgct caatagtcac caatgcctc 2760
cctcttggcc ctctcctttt cttttttcga ccgaatttct tgaagacgaa agggcctcgt 2820
gatacgcta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttagg acggatcgct 2880
tgctgtaac ttacacgcgc ctgctatctt ttaatgatgg aataatttgg gaatttactc 2940

tgtgtttatt tatttttatg ttttgtatit ggattttaga aagtaataa 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 cttaggtctt ttacatcttc ggaaaacaaa aactatitit tctttaattt 3300
 ctttttttac ttctatitit taattatata atttatatta aaaaatttaa attataatta 3360
 tttttatagc acgtgatgaa aaggaccag gtggcactit tcggggaaat gtgcgcggaa 3420

 cccctatttg ttiatititc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 3480
 cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 3540
 tcgcccttat tccctititit gcggcattit gccttctctg ttttgctcac ccagaaacgc 3600
 tggatgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 3660
 atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaactitit ccaatgatga 3720
 gcactititaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc 3780
 aactcggctc ccgcatacac tattctcaga atgacttgggt tgagtactca ccagtacag 3840

 aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgcc ataaccatga 3900
 gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 3960
 cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tctgtgggaa ccggagctga 4020
 atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaactg 4080
 tgcgcaaact attaaactggc gaactactia ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 4140
 ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcctc ggcccttccg gctggctggt 4200
 ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg 4260

 ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacgggcagt caggcaacta 4320
 tggatgaacg aaatagacag atcgttgaga taggtgcctc actgattaag catttgtaac 4380
 tgtcagacca agtttactca tatatactit agattgattt aaaacttcat ttttaattta 4440
 aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taactgagt 4500
 tttcgttcca ctgagctga gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 4560
 tttttctgcg cgtaatctgc tgccttcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 4620
 gtttgccgga tcaagagcta ccaactctit ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 4680

agatacaaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 4740
 tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 4800
 ataagtctgt tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag ggcgacgggt 4860
 cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcaaacgacc tacaccgaac 4920
 tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgt tcccgaaggg agaaaggcgg 4980
 acaggatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg 5040
 ggaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 5100

ttttgtgatg ctgctcaggg gggccgagcc tatggaaaaa cgccagcaac gggcctttt 5160
 tacggttcct ggcttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttctgcg ttatccctg 5220
 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 5280
 cgaccgagcg cagcagatca gtgagcagg aagcgggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc 5340
 ctctccccgc gcgttgcccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga 5400
 aagcgggcag tgagcgaac gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcaccccagg 5460
 ctttacactt tatgcttccg gctcctatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 5520

acacaggaaa 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 aggcccagg cctcatgttg 60
 ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc 120

ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgca agtccagtca 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 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 cgcccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttg 60
 ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc 120
 ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgca agtccagtca gagtctttta 180
 gctagtggca accaaaataa ctacttggcc 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 cgcccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttg 60
 ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc 120
 ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgca agtccagtca 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 tgaccagtc cccgagctcc 120
ctgtccgct ctgtgggcga tagggtcacc atcacctgca agtccagtca gagtctttta 180
gctagtggca accaaaataa ctacttggcc tggcaccaac agaaaccagg aaaagctccg 240
aaaatgctga ttatttgggc atccactagg gtatctggag tcccttctcg cttctctgga 300

tccgggtctg ggacggattt cactetgacc atcagcagtc tgcagccgga agacttcgca 360
acttattact gtgcagcagtc 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

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 taacctttt aaatggtatc 60

cagtgtgagg ttcagctggt ggagctctggc ggtggcctgg tgcagccagg gggctcactc 120

cgtttgtcct gtcagcttc 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 gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgctt ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcag ccagacctac 660
 atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac 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
 ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac 960

cggtgtggtca ggcctctcac cgtctctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
 aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa ggtttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt 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

caggccccgg gtaagggcct ggaatggttg ggttttatta gaaacaaagc taatggttac 240

acaacagagt acagtgcatic tgtgaagggt cgtttcacta taagcagaga taattccaaa 300

aacacactgt acctgcagat gaacagcctg cgtgctgagg acactgccgt ctattattgt 360

gctagagata acigggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcaccgt ctctcggct 420

agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660

atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagaggaag 720

tgctgtgtgg agtgcccc cgtcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780

ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacatgc 840

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactgta cgtggacggc 900

gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960

gtggtcagcg tectcacgt cctgcaccag gactggetga atggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtctcca acaaagcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1080

cagccccgag aaccacaggt gtacacctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140

caggtcagcc tgacctgect ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1260

ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacagca 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 Leu Val Gln Pro Gly

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 aaatggtatc	60
cagtgtgagg ttcagctggt ggagctggc ggtggcctgg tgcagccagg gggctcactc	120
cgtttgtcct gtgcagcttc tggcttcacc ttcactgatt actacatgag ctgggtgcgt	180
caggccccgg gtaagggcct ggaatggttg ggttttatta gaaacaaagc taatggttac	240
acaacagagt acagtgcac tgtgaagggt cgtttcacta taagcagaga taattccaaa	300
aacacactgt acctgcagat gaacagcctg cgtgctgagg aactgccgt ctattatgt	360
gctagagata actggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcaccgt ctctcggct	420
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc	480
acagcggccc tgggctgct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac	660
acctgcaacg tagatcacia gccccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa	720
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc	780
ttcccccaaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg	840
gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg	900
gaggtgcata atccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg	960
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtcaag	1020
gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag	1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag	1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccatgctgga ctccgacggc	1260
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctcc	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 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
 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
 <210> 69
 <211> 758

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<400> 69

```

aattcactag tgattaattc gccgccacca tggattcaca ggcccaggtc ctcatgttgc      60
tgctgctatc ggtatctggt acctgtggag atatccagat gaccagtc ccgagctccc      120
tgtccgctc tgtgggcgat agggcacca tcacctgcaa gtccagtcag agtcttttag      180
ctagtggcaa ccaaaataac tacttggcct ggtaccaaca gaaaccagga aaagctccga      240
aatgctgat tatttgggca tccactaggg tatctggagt cccttctcgc ttctctggat      300
ccgggtctgg gacggatttc actctgacca tcagcagtct gcagccggaa gacttcgcaa      360

cttattactg tcagcagtc tacagccgcc cgtacacggt cggacagggt accaaggtgg      420
agatcaaacg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt      480
tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca      540
aagtacagtg gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag      600
agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag      660
actacgagaa acacaaagtc tacgctgcg aagtcacca tcagggcctg agctcgcgcc      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 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
    
```


1 5 10 15
 Ser Ala Leu

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope in SEMA domain of c-Met
 <400> 72

Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro

1 5 10
 <210> 73
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope in SEMA domain of c-Met

<400>

> 73

Glu Glu Pro Ser Gln

1 5
 <210> 74
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain variable region of anti-c-Met antibody (AbF46 or huAbF46-H1)

<400> 74

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

<210> 76
 <211> 1416
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence of heavy chain of nti-c-Met antibody (AbF46
 or huAbF46-H1)
 <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> 76
 gaattcgccg ccaccatgga atggagctgg gtttttctcg taacactttt aaatggtatc 60
 cagtgtgagg tgaagctggt ggagctgga ggaggcttgg tacagcctgg gggttctctg 120
 agactctcct gtgcaacttc tgggttcacc ttcactgatt actacatgag ctgggtccgc 180
 cagcctccag gaaaggcact tgagtggttg ggttttatta gaaacaaagc taatggttac 240
 acaacagagt acagtgcac tgtgaagggt cggttcacca tctccagaga taattcccaa 300

agcatcctct atcttcaaat ggacaccctg agagctgagg acagtgccac ttattactgt 360
 gcaagagata actggtttgc tttactggggc caagggactc tggctactgt ctctgcagct 420
 agcaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgect ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccttgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga 600

 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
 atctgcaacg tgaatcacia gccacagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag 840
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020

 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctcaaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 1380
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga ctcgag 1416

- <210> 77
- <211> 759
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> nucleotide sequence of light chain of anti-c-Met antibody (AbF46 or huAbF46-H1)
- <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> 77

gaattcacta gtgattaatt cgccgccacc atggattcac aggcccaggt cctcatgttg 60
 ctgctgctat cggtatctgg tacctgtgga gacattttga tgaccacagtc tccatcctcc 120
 ctgactgtgt cagcaggaga gaaggctcact atgagctgca agtccagtca gagtctttta 180

gctagtggca accaaaataa ctacttggcc tggcaccagc agaaaccagg acgatctcct 240
 aaaatgctga taatttgggc atccactagg gtatctggag tccctgatcg cttcataggc 300
 agtggatctg ggacggattt cactctgacc atcaacagtg tgcaggctga agatctggct 360
 gtttattact gtcagcagtc ctacagcgtc cgcctcacgt 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 ctacagcagca ccctgacgct gagcaaagca 660
 gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc 720
 gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt tgactcgag 759

<210> 78
 <211> 4170
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide encoding c-Met protein

<400> 78

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac ctgggtgcag	60
aggagcaatg gggagtgtaa agaggcacta gcaaagtcg agatgaatgt gaatatgaag	120
tatcagcttc ccaacttcac cgcgaaaca cccatccaga atgtcattct acatgagcat	180
cacattttcc ttggtgccac taactacatt tatgttttaa atgaggaaga ctttcagaag	240
gttgctgagt acaagactgg gcctgtgctg gaacaccag attgtttccc atgtcaggac	300
tcgacgacga aagccaattt atcaggaggt gtttgaaag ataacatcaa catggctcta	360
gttgtcgaca cctactatga tgatcaactc attagctgtg gcagcgtcaa cagagggacc	420
tgccagcgac atgtctttcc ccacaatcat actgtgaca tacagtcgga ggttactgc	480
atattctccc cacagataga agageccagc cagtgtcctg actgtgtggt gagcgcctg	540
ggagccaaag tcctttcatc tgtaaaggac cggttcatca acttctttgt aggcaatacc	600
ataaattctt cttatttccc agatcatcca ttgcattcga tatcagtgag aaggctaaag	660
gaaacgaaag atggttttat gtttttgacg gaccagtcct acattgatgt tttaacctgag	720
ttcagagatt cttacccat taagtatgtc catgcctttg aaagcaacaa ttttatttac	780
ttcttgacgg tccaaaggga aactctagat gctcagactt ttcacacaag aataatcagg	840
ttctgttcca taaactctgg attgcattcc tacatggaaa tgcctctgga gtgtattctc	900
acagaaaaga gaaaaaagag atccacaaag aaggaagtgt ttaatatact tcaggctgcg	960
tatgtcagca agcctggggc ccagcttctg agacaaatag gagccagcct gaatgatgac	1020
attcttttctg ggggtgttcg acaaagcaag ccagattctg ccgaaccaat ggatcgatct	1080
gccatgtgtg cattccctat caaatatgtc aacgacttct tcaacaagat cgtcaacaaa	1140
aacaatgtga gatgtctcca gcatttttac ggacceaatc atgagcactg ctttaatagg	1200
acacttctga gaaattcatc aggctgtgaa gcgcgccgtg atgaatatcg aacagagttt	1260
accacagctt tgcagcgcgt tgacttattc atgggtcaat tcagcgaagt cctcttaaca	1320
tctatatcca cttcattaa aggagacctc accatagcta atcttgggac atcagagggt	1380
cgcttcatgc aggttgtggt ttctcgtatca ggaccatcaa cccctcatgt gaattttctc	1440
ctggactccc atccagtgc tccagaagtg attgtggagc atacattaaa ccaaaatggc	1500
tacacactgg ttatcactgg gaagaagatc acgaagatcc cattgaatgg cttgggctgc	1560
agacatttcc agtcctgcag tcaatgcctc tctgccccac cctttgttca gtgtggctgg	1620
tgccacgaca aatgtgtgcg atcggaggaa tgctgagcg ggacatggac tcaacagatc	1680
tgtctgcctg caatctacaa ggttttccca aatagtgcac cccttgaagg agggacaagg	1740

ctgaccatata gtggctggga ctttggattt cggaggaata ataaatttga tttaaagaaa 1800

actagagttc tccttggaaa tgagagctgc accttgactt taagtgagag cacgatgaat 1860

acattgaaat gcacagttag tcctgccatg aataagcatt tcaatatgtc cataattatt 1920

tcaaatggcc acgggacaac acaatacagt acatttctct atgtggatcc tgaataaca 1980

agtatttcgc cgaataacgg tcctatggct ggtggcactt tacttacttt aactggaaat 2040

tacctaaaca gtgggaattc tagacacatt tcaattgggtg gaaaaacatg tactttaaaa 2100

agtgtgtcaa acagtattct tgaatgttat accccagccc aaaccatttc aactgagttt 2160

gctgttaaat tgaaaattga cttagccaac cgagagacaa gcatcttcag ttaccgtgaa 2220

gatccattg tciatgaaat tcatccaacc aaatctttta ttagtggtgg gagcacaata 2280

acagtggtg gaaaaaacct gaattcagtt agtgtcccga gaatggtcat aaatgtgcat 2340

gaagcaggaa ggaactttac agtggcatgt caacatcgct ctaattcaga gataatctgt 2400

tgtaccactc ctccctgca acagctgaat ctgcaactcc cctgaaaac caaagccttt 2460

ttcatgttag atgggatcct ttccaatac ttgatctca tttatgtaca taatcctgtg 2520

tttaagcctt ttgaaaagcc agtgatgac tcaatgggca atgaaaatgt actggaaatt 2580

aagggaatg atattgacc tgaagcagtt aaaggtgaag tgttaaaagt tggaaataag 2640

agctgtgaga atatacactt acattctgaa gccgttttat gcacggtccc caatgacctg 2700

ctgaaattga acagcgagct aaatatagag tggaagcaag caatttcttc aaccgicctt 2760

ggaaaagtaa tagttcaacc agatcagaat tcacaggat tgattgctgg tgttgtctca 2820

atatcaacag cactgttatt actacttggg tttttctgt ggctgaaaa gagaaagcaa 2880

attaaagatc tgggcagtga attagttcgc tacgatgcaa gagiacacac tcctcatttg 2940

gatagccttg taagtgcccg aagtgaagc ccaactacag aaatggtttc aaatgaatct 3000

gtagactacc gagctacttt tccagaagat cagtttecta attcatctca gaacggttca 3060

tgccgacaag tgcagtatcc tctgacagac atgtcccca tcctaactag tggggactct 3120

gatatatcca gtccattact gcaaaatact gtccacattg acctcagtgc tctaaatcca 3180

gagctggtcc aggcagtgca gcatgtagtg attgggcca gtagcctgat tgtgcatttc 3240

aatgaagtca taggaagagg gcattttggt tfgtatatc atgggacttt gttggacaat 3300

gatggcaaga aaattcactg tgctgtgaaa tccttgaaca gaatcactga cataggagaa 3360

gtttcccaat ttctgaccga gggaatcatic atgaaagatt ttagtcatcc caatgicctc 3420

tcgctcctgg gaatctgcct gcgaagtga gggctctccgc tgggtgtcct accatacatg 3480

aaacatggag atcttcgaaa tttcattcga aatgagactc ataatccaac tgtaaaagat 3540
 cttattggct ttggtcttca agtagccaaa ggcatgaaat atcttgcaag caaaaagttt 3600
 gtccacagag acttggctgc aagaaactgt atgctggatg aaaaattcac agtcaaggtt 3660
 gctgattttg gtcttgccag agacatgtat gataaagaat actatagtgt acacaacaaa 3720
 acaggtgcaa agctgccagt gaagtggatg gctttggaaa gtctgcaaac tcaaaagttt 3780
 accaccaagt cagatgtgtg gtcccttggc gtgctcctct gggagctgat gacaagagga 3840
 gccccacctt atcctgacgt aaacaccttt gatataactg tttacttggt gcaagggaga 3900

agactcctac aaccggaata ctgcccagac cccttatatg aagtaatgct aaaatgctgg 3960
 caccctaaag ccgaaatgcg cccatccttt tctgaactgg tgtcccggat atcagcgatc 4020
 ttctctactt tcattgggga gcactatgtc catgtgaacg ctacttatgt gaacgtaaaa 4080
 tgtgtcgtc cgtatccttc tctgttgta tcagaagata acgctgatga tgaggtggac 4140
 acagaccag cctccttctg ggagacatca 4170

<210> 79
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEMA domain of c-Met
 <400> 79

Leu His Glu His His Ile Phe Leu Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val
 1 5 10 15
 Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro
 20 25 30
 Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys
 35 40 45
 Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu
 50 55 60
 Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val
 65 70 75 80
 Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala
 85 90 95
 Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu
 100 105 110

Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val
 115 120 125
 Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr
 130 135 140

 Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln
 165 170 175
 Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys
 180 185 190
 Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val
 195 200 205
 Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg

 210 215 220
 Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu
 225 230 235 240
 Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu
 245 250 255
 Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln
 260 265 270
 Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly
 275 280 285

 Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser
 290 295 300
 Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys
 305 310 315 320
 Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro
 325 330 335
 Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly
 340 345 350
 Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu

tgtctgcctg caatctacaa ggttttccca aatagtgac cccttgaagg agggacaagg 240
 ctgaccatat gtggctggga ctttggattt cggaggaata ataaatttga tttaaagaaa 300
 actagagttc tccttggaaa tgagagctgc accttgactt taagtgagag cacgatgaat 360

 acattgaaat gcacagttag tcctgccatg aataagcatt tcaatatgic cataattatt 420
 tcaaatggcc acgggacaac acaatacagt acattctcct atgtggatcc tgtaataaca 480
 agtatttgcg cgaatacagg tcctatggct ggtggcactt tacttacttt aactggaaat 540
 tacctaaaca gtgggaattc tagacacatt tcaattgggtg gaaaaacatg tactttaaaa 600
 agtgtgtcaa acagtattct tgaatgttat accccagccc aaaccatttc aactgagttt 660
 gctgttaaat tgaaaattga cttagccaac cgagagacaa gcatcttcag ttaccgtgaa 720
 gatcccattg tctatgaaat tcatccaacc aaatctttta ttagtggtgg gagcacaata 780

 acagtggttg ggaaaaacct gaattcagtt agtgtcccga gaatggtcat aatgtgcat 840
 gaagcaggaa ggaactttac agtggcatgt caacatcgt ctaattcaga gataatctgt 900
 tgtaccactc cttccctgca acagctgaat ctgcaactcc ccctgaaaac caaagccttt 960
 ttcattgttag atgggatcct ttccaatac tttgatetca tttatgtaca taatcctgtg 1020
 tttaacctt ttgaaaagcc agtgatgatc tcaatgggca atgaaaatgt actggaatt 1080
 aagggaatg atattgacc tgaagcagtt aaaggtgaag tgttaaaagt tggaaataag 1140
 agctgtgaga atatacactt acattctgaa gccgttttat gcacggtccc caatgacctg 1200

 ctgaaattga acagcgagct aaatatagag tggaagcaag caatttcttc aaccgtcctt 1260
 ggaaaagtaa tagttcaacc agatcagaat ttcacagga 1299

 <210> 84
 <211> 939
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> polynucleotide encoding TyrKc domain of c-Met
 <400> 84
 gtgcatttca atgaagtc ataggaagagg cattttggtt gtgtatatca tgggactttg 60
 ttggacaatg atggcaagaa aattcactgt gctgtgaaat ccttgaacag aatcactgac 120
 ataggagaag ttcccgaatt tctgaccgag ggaatcatca tgaaagattt tagtcatccc 180

 aatgtcctct cgctcctggg aatctgcctg cgaagtgaag ggtctccgct ggtggtccta 240
 ccatacatga aacatggaga tcttcgaaat ttcattcgaa atgagactca taatccaact 300
 glaaaagatc ttattggctt tggcttcaa gtagccaaag gcatgaaata tcttgcaagc 360

aaaaagtttg tccacagaga cttggctgca agaaactgta tgctggatga aaaattcaca 420
 gtcaaggttg ctgattttgg tcttgccaga gacatgtatg ataaagaata ctatagtga 480
 cacaacaaaa caggtgcaaa gctgccagtg aagtggatgg ctttgaaag tctgcaaact 540
 caaaagttta ccaccaagtc agatgtgtgg tcctttggcg tgctcctctg ggagctgatg 600

acaagaggag cccacacctta tctgacgta aacaccttg atataactgt ttacttggtg 660
 caaggagaa gactcctaca acccgaatac tgcccagacc cttatatga agtaatgcta 720
 aaatgctggc accctaaagc cgaaatgcmc ccatcctttt ctgaactggt gtcccggata 780
 tcagcgatct tctctacttt cattggggag cactatgtcc atgtgaacgc tacttatgtg 840
 aacgtaaaat gtgtcgctcc gtatccttct ctgttgcac cagaagataa cgctgatgat 900
 gaggtggaca cacgaccagc ctccttctgg gagacatca 939

<210> 85
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 85

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

1 5 10

<210> 86
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 86

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu

1 5 10

<210> 87
 <211> 117
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><223> heavy chain variable region of monoclonal antibody AbF46

<400> 87

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala 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 Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asp Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr 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 Ala

115
 <210> 88
 <211> 114
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 88

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser 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 Arg
 35 40 45
 Ser Pro Lys Met Leu Ile Ile Trp Ala Ser Thr Arg Val Ser Gly Val

50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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> 91
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain variable region of AT-VH2
 <400> 91

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro 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 Ser Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr 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> 92
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain variable region of AT-VH3

<400> 92

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 Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro 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 Ser Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr 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> 93

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable region of AT-VH4

<400> 93

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 Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro 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

<213> Artificial Sequence

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

<400> 95

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

<210> 96

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable region of AT-Vk1

<400> 96

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met 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 Asp Arg Phe Ile 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 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<

<210> 97
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain variable region of AT-Vk2
 <400> 97

Asp Ile Leu 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 Asp Arg Phe Ile 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 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<

210> 98
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain variable region of AT-Vk3
 <400> 98
 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 Asp Arg Phe Ile 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 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<
 210> 99
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain variable region of AT-Vk4
 <400> 99
 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

<400> 102

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 103

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified hinge region(U6-HC8)

<400> 103

Glu Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified hinge region(U8-HC5)

<400> 104

Glu Lys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human hinge region

<400> 105

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

1 5 10 15

<210> 106

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for exon 14

<400> 106

tgaaattgaa cagcgagcta aat	23
<210> 107	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for exon 14	
<400> 107	
ttgaaatgca caatcaggct ac	22