

ANTICUERPO ANTI-FGF23 Y FRAGMENTO DE DICHO ANTICUERPO

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-FGF23 o a un fragmento de anticuerpo del mismo.

TÉCNICA ANTECEDENTE

10 Los factores de crecimiento de fibroblastos (en lo sucesivo en el presente documento, "FGF", por sus siglas en inglés) forman una familia de polipéptidos estructuralmente similares, y se ha publicado que tienen diversos efectos, incluyendo no sólo la actividad de proliferación de fibroblastos, sino también la proliferación del mesodermo y el neuroectodermo, la angiogénesis y la formación de las yemas de las extremidades durante el desarrollo. En adultos, los factores de crecimiento de fibroblastos también actúan como factor homeostático para el

15 mantenimiento, la reparación, la regeneración, el metabolismo de los tejidos y similares (Bibliografía no de patente 1).

20 En mamíferos, se conocen 22 tipos de proteínas que pertenecen a la familia de FGF. En los seres humanos, se han identificado 22 tipos de FGF, de FGF1 a FGF23, excluyendo FGF15. La familia de FGF humanos se compone de aproximadamente 150 a 300 aminoácidos, y aproximadamente 120 aminoácidos de la secuencia central son idénticos en una proporción de aproximadamente el 30 % al 60 %. La familia de FGF se clasifica en una familia expresada como proteína secretora y que actúa sobre una tirosina cinasa receptora, y una familia expresada como proteína intracelular y que actúa sobre un canal de sodio dependiente de

25 potencial u otras moléculas (Bibliografía no de patente 2).

El FGF23 es una proteína secretora identificada a partir de ratones mediante el uso de una búsqueda en bases de datos y un método de PCR utilizando homología con FGF15 y posteriormente identificada mediante una búsqueda de homología. Se sabe que el FGF23 humano se compone de un polipéptido que tiene
5 251 restos de aminoácidos, actuando 24 restos en el extremo N-terminal como señal secretora y escindiéndose en el proceso de maduración de una proteína (Bibliografía no de patente 3).

Se conocen enfermedades hipofosfatémicas provocadas por una producción excesiva de FGF23, y se clasifican a grandes rasgos en enfermedades con genes
10 causales identificados y enfermedades adquiridas (Literatura no de patente 4). Entre las enfermedades hipofosfatémicas relacionadas con FGF23 con genes causales identificados, la más frecuente es el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (en lo sucesivo en el presente documento, denominado XLH, por sus siglas en inglés) provocado por mutaciones del homólogo de endopeptidasa
15 regulador de fosfato ligado al cromosoma X (PHEX), y hasta la fecha se han publicado muchas mutaciones del gen de PHEX (Bibliografía no de patente 5).

Se sabe que PHEX es una proteína de membrana de paso único y que se expresa en grandes cantidades en el cartílago, blastos óseos y blastos dentinarios (Bibliografías no de patente 6 y 7), y se dice que el XLH se desarrolla en
20 20000 personas con una frecuencia de una persona (Bibliografía no de patente 8). Un ejemplo de la enfermedad adquirida es la osteomalacia inducida por tumores (TIO, por sus siglas en inglés).

En la técnica relacionada, se han utilizado preparaciones activas de vitamina D3 y preparaciones orales de fósforo como tratamientos sintomáticos para estas
25 enfermedades hipofosfatémicas relacionadas con el FGF23. Sin embargo, la

administración a largo plazo puede provocar complicaciones tales como hipercalcemia e hipercalciuria, nefrocalcinosis y hiperparatiroidismo persistente (Bibliografías no de patente 9 y 10).

Se conoce burosumab, un anticuerpo neutralizante de FGF23, como agente terapéutico para las enfermedades descritas anteriormente que se considera que están provocadas por una producción excesiva de FGF23.

También se conoce un anticuerpo descrito en la Bibliografía de Patente 1 como anticuerpo neutralizante de FGF23 humano.

LISTA DE CITAS

10 BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES

Bibliografía de patente 1: WO2008/099969

BIBLIOGRAFÍA NO DE PATENTE

Bibliografía no de patente 1: *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* Mayo-Junio de 2015; 4(3): 215-66

15 Bibliografía no de patente 2: *J Biochem.* Febrero de 2011; 149(2): 121-30

Bibliografía no de patente 3: *Biochem Biophys Res Commun.* 22 de octubre de 2000; 277(2): 494-8

Bibliografía no de patente 4: *Endocrinology.* Enero de 2011; 152(1): 4-10

Bibliografía no de patente 5: *Hum Mutat.* 2000; 16(1): 1-6.

20 Bibliografía no de patente 6: *J Clin Invest.* 1 de febrero de 2008; 118(2): 722-734

Bibliografía no de patente 7: *J Clin Invest.* 15 de marzo de 1997; 99(6): 1200-1209.

Bibliografía no de patente 8: *Orphanet J Rare Dis.* 2019; 14: 58

25 Bibliografía no de patente 9: *Lancet.* 15 de junio de 2019; 393(10189): 2416-

2427

Bibliografía no de patente 10: *J Bone Miner Res*. Julio de 2011; 26(7): 1381-

8

SUMARIO DE LA INVENCION

5 PROBLEMA TÉCNICO

Como resultado de intensos estudios sobre las propiedades físicas del anticuerpo anti-FGF23 humano descrito en el documento WO2008/099969, los presentes inventores han descubierto que el anticuerpo disminuye su estabilidad y se degrada a un pH bajo, y que la degradación está provocada por la escisión entre
10 D en la posición 99 e I en la posición 100 en la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada del anticuerpo. Generalmente, se sabe que los anticuerpos son propensos a la agregación cuando se concentra una formulación de anticuerpos, y cuando se aumenta el valor absoluto de la carga de las proteínas en una solución proteica, la posibilidad de agregación de las proteínas puede
15 reducirse (*Arch Pharm Res* Vol 35, N.º 11, 1871-1886, 2012). Por lo tanto, cuando se concentra una formulación de anticuerpos, un método para suprimir la agregación de anticuerpos es bajar el pH de la formulación. En consecuencia, cuando sea necesario bajar el pH de una formulación de anticuerpos, es más deseable un anticuerpo que pueda someterse a ensayo en un amplio intervalo de
20 pH.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-FGF23 novedoso en el que la degradación del anticuerpo a un pH inferior se suprime en comparación con el anticuerpo anti-FGF23 humano descrito en el documento WO2008/099969.

25 SOLUCIÓN AL PROBLEMA

Como resultado de estudios exhaustivos sobre los problemas anteriores, los presentes inventores han descubierto que los problemas anteriores pueden resolverse mediante un anticuerpo anti-FGF23 en el que se sustituye el resto de aminoácido en la posición 100 o el resto de aminoácido en la posición 105 en una
5 VH del anticuerpo anti-FGF23 descrito en el documento WO2008/099969, y han completado la presente invención.

1. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (en lo sucesivo en el presente documento, descrita como VH) que comprende la
10 secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (en lo sucesivo en el presente documento, descrita como VL) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, y en el que al menos el resto de aminoácido en la posición 100 o el resto de aminoácido en la posición 105 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1
15 en la VH se sustituye por otro resto de aminoácido.

2. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con el punto anterior 1, en el que el resto de aminoácido en la posición 100 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH se sustituye por un
20 resto de aminoácido seleccionado de un resto de alanina, un resto de asparagina, un resto de glicina, un resto de tirosina, un resto de arginina, un resto de ácido aspártico, un resto de histidina, un resto de triptófano y un resto de metionina.

3. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con el punto anterior 1 o 2, en el que el resto de aminoácido en la posición 100 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH se sustituye
25 por un resto de alanina o un resto de tirosina.

4. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 3, en el que el resto de aminoácido en la posición 105 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH se sustituye por un resto de aminoácido seleccionado de un resto de alanina, un resto de fenilalanina, un resto de glicina, un resto de histidina, un resto de isoleucina, un resto de lisina, un resto de leucina, un resto de metionina, un resto de prolina, un resto de glutamina, un resto de arginina, un resto de valina, un resto de triptófano, un resto de tirosina, un resto de treonina, un resto de asparagina y un resto de serina.

10 5. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 4, en el que el anticuerpo comprende además una sustitución seleccionada de los siguientes puntos (a1) a (a4):

(a1) al menos una sustitución seleccionada de la sustitución del resto de aminoácido en la posición 50 por un resto de leucina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 54 por un resto de triptófano, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 55 por un resto de histidina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 57 por un resto de treonina y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 58 por un resto de fenilalanina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH,

20 (a2) al menos una sustitución seleccionada de la sustitución del resto de aminoácido en la posición 91 por un resto de metionina o un resto de leucina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 92 por un resto de tirosina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 94 por un resto de ácido aspártico y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 96 por un resto de asparagina
25 o un resto de ácido aspártico en la secuencia de aminoácidos representada por la

SEQ ID NO: 2 en la VL,

(a3) al menos una sustitución seleccionada de la sustitución del resto de aminoácido en la posición 28 por un resto de ácido aspártico, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 29 por un resto de valina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 31 por un resto de treonina y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 34 por un resto de leucina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la VL, y

(a4) al menos una sustitución seleccionada de la sustitución del resto de aminoácido en la posición 92 por un resto de tirosina o un resto de triptófano, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 94 por un resto de ácido aspártico y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 96 por un resto de ácido aspártico en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la VL.

6. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 5, en el que el anticuerpo es uno seleccionado de los siguientes puntos (c1) a (c10):

(c1) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2,

(c2) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 47 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2,

(c3) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 44,

(c4) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 44,

5 (c5) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 45,

(c6) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 45,

10 (c7) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46,

(c8) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende la
15 secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46,

(c9) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58, y

(c10) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de
20 aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 59.

7. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 6, en el que una subclase del anticuerpo es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

25 8. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno

cualquiera de los puntos anteriores 1 a 7, en el que una región Fc del anticuerpo es una seleccionada de los siguientes puntos (d1) a (d5):

(d1) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 252 por un resto de tirosina, la sustitución del resto de aminoácido en la
5 posición 254 por un resto de treonina y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 256 por un resto de ácido glutámico de acuerdo con el índice EU,

(d2) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 428 por un resto de leucina y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 434 por un resto de serina de acuerdo con el índice EU,

10 (d3) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 308 por un resto de prolina de acuerdo con el índice EU,

(d4) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 250 por un resto de glutamina y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 428 por un resto de leucina de acuerdo con el índice EU, y

15 (d5) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 434 por un resto de alanina de acuerdo con el índice EU.

9. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 8, en el que una región constante de cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la
20 SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 o 52.

10. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 9, en el que el fragmento de anticuerpo es uno seleccionado de Fab, Fab', (Fab')₂, scFv, diacuerpo, dsFv y un péptido que comprende CDR.

25 11. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que

codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 10.

12. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con el punto anterior 11.

5 13. Una célula transformante que comprende el vector de acuerdo con el punto anterior 12.

14. Un método para producir el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 10, incluyendo:

10 cultivar la célula transformante de acuerdo con la reivindicación 13 en un medio y

recoger el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de un cultivo.

15. Una composición que contiene:
el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 10.

15 16. Un agente terapéutico para una enfermedad asociada al FGF23 humano, que contiene:
el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 10.

20 17. Un método terapéutico para una enfermedad asociada al FGF23 humano, incluyendo:

el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores 1 a 10.

EFFECTOS VENTAJOSOS DE LA INVENCION

25 El anticuerpo anti-FGF23 de la presente invención puede suprimir su la degradación y presenta una excelente estabilidad a un pH bajo en comparación con

el anticuerpo anti-FGF23 descrito en el documento WO2008/099969. De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse un anticuerpo anti-FGF23 o un fragmento de anticuerpo del mismo, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo
 5 del mismo, un vector que comprende el ácido nucleico, una célula transformante que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo y una composición que contiene el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

10 La presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al factor de crecimiento de fibroblastos 23 (en lo sucesivo en el presente documento, denominado FGF23) descrito en el documento WO2008/099969 (denominado anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (en lo sucesivo en el presente documento, descrita como VH) que
 15 comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (en lo sucesivo en el presente documento, descrita como VL) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2), en la que al menos el resto de aminoácido en la posición 100 o el resto de aminoácido en la posición 105 de la secuencia de aminoácidos representada por la
 20 SEQ ID NO: 1 en la VH se sustituye por otro resto de aminoácido (en lo sucesivo en el presente documento, denominado anticuerpo de la presente invención).

"FGF23" es un tipo de factor de crecimiento de fibroblastos y una hormona derivada de células óseas. El FGF humano es una proteína que consiste en 251 aminoácidos que comprenden una señal secretora de 24 aminoácidos en el extremo
 25 N-terminal y la señal secretora se escinde durante el proceso de maduración de la

proteína. Los ejemplos de la función del FGF23 incluyen la supresión de la reabsorción de fósforo y la activación de la vitamina D en el riñón, principalmente a través de un complejo receptor de FGF 1 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado FGFR1)/ α -Klotho en las células del túbulo proximal renal en el riñón.

En la presente invención, los ejemplos del FGF23 humano incluyen un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del Número de registro del NCBI: NP_065689, un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, se sustituyen o se añaden uno o más aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos del Número de registro del NCBI: NP_065689 y que tiene una función del FGF23 humano, y un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60 % o más, preferentemente del 80 % o más, además, preferentemente del 90 % o más y mucho más preferentemente del 95 % o más con la secuencia de aminoácidos del Número de registro del NCBI: NP_065689 y que tiene una función del FGF23 humano.

El polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, se sustituyen o se añaden uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por el Número de registro del NCBI: NP_065689 puede obtenerse introduciendo una mutagénesis específica de sitio en un ADN que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por el Número de registro del NCBI: NP_065689, por ejemplo, usando un método de mutagénesis específica de sitio [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987-1997), *Nucleic Acids Research*, 10, 6487 (1982),

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), *Gene*, 34, 315 (1985), *Nucleic Acids Research*, 13, 4431 (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 488 (1985)].

El número de aminoácidos que se han de suprimir, sustituir o añadir no se limita particularmente y es preferentemente de 1 a varias decenas de aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 20 aminoácidos, y más preferentemente de 1 a varios aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 5 aminoácidos.

Los ejemplos de un gen que codifica el FGF23 humano incluyen la secuencia de nucleótidos del Número de registro del NCBI: NM_020638. El gen que codifica el FGF23 humano de la presente invención también incluye un gen que comprende un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos en la que se suprimen, se sustituyen o se añaden una o más bases en la secuencia de nucleótidos de NM_020638 y que codifica un polipéptido que tiene la función del FGF23 humano, un gen que comprende un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 60 % o más, preferentemente una secuencia de nucleótidos que tiene una homología del 80 % o más, más preferentemente una secuencia de nucleótidos que tiene una homología del 90 % o más y mucho más preferentemente una secuencia de nucleótidos que tiene una homología del 95 % o más con la secuencia de nucleótidos de NM_020638, y que codifica un polipéptido que tiene la función del FGF23 humano, o un gen que consiste en un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de NM_020638 y que codifica un polipéptido que tiene la función del FGF23 humano.

El ADN que se hibrida en condiciones rigurosas se refiere a un ADN hibridable obtenido mediante un método de hibridación en colonia, un método de hibridación en placa, un método de hibridación por transferencia Southern, un método de

micromatrices de ADN o similar usando un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de NM_020638 como sonda.

Los ejemplos específicos del mismo incluyen un ADN que puede identificarse realizando una hibridación [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987-1997), *DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach*, Segunda edición, Oxford University (1995)] a 65 °C en presencia de cloruro de sodio de 0,7 mol/l a 1,0 mol/l usando un filtro o un portaobjetos de vidrio en el que se inmoviliza un ADN derivado de una placa o colonia hibridada, o un producto de PCR o un oligo ADN que tiene la secuencia, y después lavando el filtro o el portaobjetos de vidrio en condiciones de 65 °C usando una solución de SSC de 0,1x a 2x (una composición de la solución SSC 1x consiste en cloruro de sodio 150 mmol/l y citrato de sodio 15 mmol/l).

Los ejemplos del ADN hibridable incluyen un ADN que tiene una homología de al menos el 60 % o más, preferentemente un ADN que tiene una homología del 80 % o más y además preferentemente un ADN que tiene una homología del 95 % o más con la secuencia de nucleótidos de NM_020638.

Con frecuencia se observan polimorfismos genéticos en las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican proteínas eucariotas. El gen que codifica el FGF23 humano de la presente invención también incluye genes utilizados en la presente invención que tienen mutaciones a pequeña escala en las secuencias de nucleótidos de los mismos debido a dichos polimorfismos.

A menos que se especifique otra cosa, un valor numérico de homología en la presente invención puede ser un valor numérico calculado usando un programa de búsqueda de homología conocido por los expertos en la materia. Los ejemplos del

valor numérico de homología para la secuencia de nucleótidos incluyen valores numéricos calculados usando parámetros por defecto en BLAST [*J. Mol. Biol.*, 215, 403 (1990)] y los ejemplos del valor numérico de homología para la secuencia de aminoácidos incluyen valores numéricos calculados usando parámetros por defecto en BLAST2 [*Nucleic Acids Res*, 25, 3389 (1997), *Genome Res.*, 7, 649 (1997)].

Como parámetros por defecto, G (Coste para abrir hueco) es de 5 para secuencias de nucleótidos y 11 para secuencias de aminoácidos, -E (Coste para extender el hueco) es de 2 para secuencias de nucleótidos y de 1 para secuencias de aminoácidos, -q (Penalización por emparejamiento erróneo de nucleótidos) es de -3, -r (recompensa por emparejamiento de nucleótidos) es de 1, -e (valor esperado) es de 10, -W (tamaño de palabra) es de 11 restos para secuencias de nucleótidos y de 3 restos para secuencias de aminoácidos, -y [Reducción (X) para extensiones blast en bits] es de 20 para blastn y de 7 para programas distintos de blastn, -X (valor de reducción de X para la alineación con huecos en bits) es de 15 y -Z (valor de reducción de X final para la alineación con huecos en bits) es de 50 para blastn y de 25 para programas distintos de blastn.

El polipéptido que comprende una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos del Número de registro del NCBI: NP_065689 puede producirse mediante un método conocido por los expertos en la materia. Específicamente, el polipéptido puede prepararse suprimiendo una parte del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de NP_065689 y cultivando un transformante introducido con un vector de expresión que comprende el ADN. Mediante un método igual al descrito anteriormente, puede obtenerse un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, se sustituyen o se añaden uno o más aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos del Número de registro del NCBI:

NP_065689. Además, también puede producirse un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos del Número de registro del NCBI: NP_065689, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, se sustituyen o se añaden uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del Número de registro del NCBI: NP_065689 mediante métodos de síntesis química tales como un método de fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) y un método de t-butiloxycarbonilo (tBoc).

En la presente invención, la supresión, la sustitución, la adición y similares de aminoácidos también se denominan modificación de aminoácidos.

El anticuerpo de la presente invención incluye cualquiera de un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo oligoclinal. El anticuerpo policlonal se refiere a una población de moléculas de anticuerpos secretadas por células productoras de anticuerpos de diferentes clones. El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo secretado por un único clon de una célula productora de anticuerpos, que reconoce un solo epítipo (también llamado un determinante antigénico) y tiene una secuencia de aminoácidos uniforme (secuencia primaria) que constituye el anticuerpo monoclonal. El anticuerpo oligoclinal se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que es una mezcla de una pluralidad de anticuerpos monoclonales diferentes.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede incluir un anticuerpo producido por un hibridoma y un anticuerpo recombinante producido por un transformante transformado con un vector de expresión que comprende un gen de anticuerpo.

Los ejemplos del epítipo incluyen una única secuencia de aminoácidos, una conformación compuesta por una secuencia de aminoácidos, una secuencia de

aminoácidos modificada mediante modificación postraducciona l y una conformación compuesta por la secuencia de aminoácidos, cada una de las cuales es reconocida por el anticuerpo monoclonal que se une a las mismas.

Los ejemplos de la secuencia de aminoácidos modificada mediante modificación postraducciona l incluyen una secuencia de aminoácidos a la que se une un glicano ligado a O en el que un glicano se une a Tyr y Ser teniendo cada una un sustituyente OH, un glicano ligado a N en el que un glicano se une a Gln y Asn teniendo cada una un sustituyente NH₂, y un grupo sulfato en el que una molécula de ácido sulfúrico se une a Tyr y Ser que tienen un sustituyente OH, o uniones similares.

La unión del anticuerpo de la presente invención al FGF23 humano puede confirmarse midiendo la capacidad de unión del anticuerpo de la presente invención al FGF23 humano usando ELISA o un método de resonancia de plasmón superficial. La confirmación también puede realizarse en combinación con un método inmunológico de detección bien conocido [*Monoclonal Antibodies - Principles and Practice*, Tercera edición, Academic Press (1996), *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), *Monoclonal Antibody Laboratory Manual*, Kodansha Scientific (1987)], y similares.

El resto de aminoácido o epítipo del FGF23 humano al que se une el anticuerpo de la presente invención puede determinarse realizando un experimento de unión de anticuerpos usando un defecto en el que se suprime una parte de un dominio del FGF23 humano, un mutante sustituido por un dominio derivado de otra proteína, un fragmento peptídico parcial del FGF23 humano o similares.

El resto de aminoácido o epítipo del FGF23 humano al que se une el anticuerpo de la presente invención también puede determinarse añadiendo el

anticuerpo de la presente invención a un fragmento peptídico del FGF23 humano digerido con una proteasa y realizando un mapeo epitópico usando espectrometría de masas conocida.

Una molécula de anticuerpo también se denomina inmunoglobulina (en lo sucesivo en el presente documento, Ig) y el anticuerpo humano se clasifica en los isotipos IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM de acuerdo con una diferencia en la estructura molecular. IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que tienen una homología de secuencia de aminoácidos relativamente alta también se denominan colectivamente IgG.

La molécula de anticuerpo se compone de polipéptidos llamados una cadena pesada (en lo sucesivo en el presente documento, denominada cadena H) y una cadena ligera (en lo sucesivo en el presente documento, denominada cadena L). La cadena H se compone de una VH y una región constante de cadena H (también abreviada como CH) desde el lado N-terminal, y la cadena L se compone de una VL y una región constante de cadena L (también abreviada como CL) desde el lado N-terminal. En cuanto a una CH, se conocen las cadenas α , δ , ϵ , γ y μ para cada subclase. La CH se compone además de un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 desde el lado N-terminal. El dominio se refiere a una unidad estructural funcional que constituye cada polipéptido de la molécula de anticuerpo. El dominio CH2 y el dominio CH3 se denominan colectivamente una región Fc o simplemente Fc. Una cadena C _{λ} y una cadena C _{κ} se conocen como la CL.

El dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y la región Fc en la presente invención pueden especificarse por el número del resto de aminoácido desde el extremo N-terminal mediante el índice EU [Kabat *et al.*,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU. (1991)] (en lo sucesivo en el presente documento, denominado simplemente índice EU). Específicamente, el CH1 puede identificarse como la secuencia de aminoácidos en las posiciones 118 a 215 de acuerdo con el índice EU, la bisagra puede identificarse como la secuencia de aminoácidos en la posición 216 a 230 de acuerdo con el índice EU, el CH2 puede identificarse como la secuencia de aminoácidos en la posición 231 a 340 de acuerdo con el índice EU y el CH3 puede identificarse como la secuencia de aminoácidos en la posición 341 a 447 de acuerdo con el índice EU.

El anticuerpo de la presente invención también incluye un anticuerpo recombinante tal como un anticuerpo recombinante de ratón, un anticuerpo recombinante de rata, un anticuerpo recombinante de conejo, un anticuerpo quimérico humano (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado simplemente anticuerpo quimérico), un anticuerpo humanizado (también denominado anticuerpo humanizado injertado con región determinante de la complementariedad CDR) y un anticuerpo humano, que se producen mediante ingeniería genética. El anticuerpo de la presente invención también incluye un anticuerpo recombinante producido recombinando una cadena H (o VH) y una cadena L (o VL) derivadas de dos tipos diferentes de anticuerpos. Los dos tipos diferentes de anticuerpos pueden ser cualquiera de un anticuerpo monoclonal derivado de hibridoma, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Además, el anticuerpo de la presente invención también incluye un anticuerpo recombinante en el que se sustituye un resto de aminoácido apropiado al preparar el anticuerpo recombinante descrito anteriormente.

El anticuerpo quimérico indica un anticuerpo que consiste en una VH y una

VL de un anticuerpo de un animal distinto del ser humano (animal no humano) y una CH y una CL de un anticuerpo humano. Puede usarse cualquier animal no humano siempre que puedan prepararse hibridomas, tales como ratones, ratas, hámsteres y conejos.

5 El hibridoma se refiere a una célula que produce un anticuerpo monoclonal con la especificidad antigénica deseada, que se obtiene mediante la fusión de una célula B obtenida mediante inmunización de un animal no humano con un antígeno y una célula de mieloma derivada de un ratón o similar. En consecuencia, la región variable del anticuerpo producido por el hibridoma consiste en la secuencia de
10 aminoácidos de un anticuerpo de animal no humano.

El anticuerpo quimérico puede producirse obteniendo ADNc que codifican cada uno una VH y una VL del anticuerpo monoclonal a partir de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales derivados de células de animales no humanos, insertando los ADNc en un vector de expresión de célula animal que
15 comprende ADN que codifican cada uno una CH y una CL de un anticuerpo humano, respectivamente, para construir un vector de expresión de anticuerpos quiméricos humanos, e introduciendo el vector de expresión de anticuerpos quiméricos en una célula animal para expresar el anticuerpo quimérico.

El anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo obtenido injertando
20 secuencias de aminoácidos de CDR de una VH y una VL de un anticuerpo de animal no humano en CDR correspondientes de una VH y una VL de un anticuerpo humano. Una región distinta de las CDR de una VH y una VL se denomina región marco conservada (en lo sucesivo en el presente documento, FR).

El anticuerpo humanizado puede producirse construyendo un ADNc que
25 codifica una secuencia de aminoácidos de una VH que consiste en una secuencia

de aminoácidos de CDR de una VH de un anticuerpo de animal no humano y una secuencia de aminoácidos de una FR de una VH de cualquier anticuerpo humano, y un ADNc que codifica una secuencia de aminoácidos de una VL que consiste en una secuencia de aminoácidos de CDR de una VL de un anticuerpo de animal no humano y una secuencia de aminoácidos de una FR de una VL de cualquier anticuerpo humano, insertando los ADNc en un vector de expresión de célula animal que comprende ADN que codifican cada uno una CH y una CL de un anticuerpo humano, respectivamente, para construir un vector de expresión de anticuerpos humanizados, e introduciendo el vector de expresión de anticuerpos humanizados en una célula animal para expresar el anticuerpo humanizado.

El anticuerpo humano se refiere originariamente a un anticuerpo de origen natural en el cuerpo humano y también incluye un anticuerpo obtenido a partir de una fagoteca de anticuerpos humanos preparada mediante avances recientes en tecnologías de ingeniería genética, ingeniería celular e ingeniería del desarrollo, y animales transgénicos productores de anticuerpos humanos.

El anticuerpo humano puede obtenerse inmunizando un ratón que porta un gen de inmunoglobulina humana (Tomizuka K. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 722-7, 2000) con un antígeno deseado. Además, usando una biblioteca de visualización en fase obtenida amplificando un gen de anticuerpo a partir de células B derivadas de ser humano, se selecciona un anticuerpo humano que tiene una actividad de unión deseada y, por lo tanto, el anticuerpo humano puede obtenerse sin inmunización (Winter G. *et al.*, *Annu Rev Immunol.* 12:433-55. 1994). Además, inmortalizando células B humanas usando virus EB, pueden producirse células que producen un anticuerpo humano que tiene una actividad de unión deseada y puede obtenerse un anticuerpo humano (Rosen A. *et al.*, *Nature* 267, 52-54. 1977).

Para el anticuerpo presente en el cuerpo humano, por ejemplo, los linfocitos que producen el anticuerpo pueden obtenerse inmortalizando linfocitos aislados de sangre periférica humana con virus EB o similares y después clonándolos, y el anticuerpo puede purificarse a partir de un cultivo de los linfocitos.

5 La fagoteca de anticuerpos humanos es una fagoteca a partir de la que se expresa un fragmento de anticuerpo tal como Fab o scFv en una superficie mediante la inserción de un gen de anticuerpo preparado a partir de una célula B humana en un gen fágico. De la biblioteca, un fago que expresa un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígeno deseada puede recogerse usando la
10 actividad de unión a un sustrato inmovilizado con un antígeno como indicador. El fragmento de anticuerpo también puede convertirse en una molécula de anticuerpo humano que consiste en dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante un método de ingeniería genética.

El animal transgénico productor de anticuerpos humanos se refiere a un
15 animal obtenido mediante la incorporación de un gen de anticuerpo humano en un cromosoma de un animal hospedador. Específicamente, el animal transgénico productor de anticuerpos humanos puede producirse introduciendo un gen de anticuerpo humano en una célula ES de ratón, e injertando la célula ES en un embrión temprano de otro ratón para producir un individuo. Como método para
20 producir un anticuerpo humano a partir del animal transgénico productor de anticuerpos humanos, se obtiene un hibridoma productor de anticuerpos humanos mediante un método de producción de hibridomas realizado en un mamífero distinto de un ser humano normal, y se cultiva para producir y acumular un anticuerpo humano en un cultivo.

25 Las secuencias de aminoácidos de la VH y la VL del anticuerpo de la presente

invención pueden ser cualquiera de las secuencias de aminoácidos de una VH y una VL de un anticuerpo humano, un anticuerpo de animal no humano o un anticuerpo humanizado.

La secuencia de aminoácidos de la CL en el anticuerpo de la presente
5 invención puede ser una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano o una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de animal no humano, y se prefiere C_κ o C_λ de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humano.

La CH del anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier
10 inmunoglobulina y es preferentemente de las subclases γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3) y γ4 (IgG4) que pertenecen a la clase de IgG.

El anticuerpo de la presente invención también incluye una proteína de fusión de Fc obtenida mediante la unión de Fc y un fragmento de anticuerpo entre sí, una proteína de fusión de Fc obtenida mediante la unión de Fc y un ligando de origen natural o un receptor entre sí (también denominada inmunoadesina), una proteína
15 de fusión de Fc obtenida mediante fusión de una pluralidad de regiones Fc, y similares.

El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención también incluye un anticuerpo que incluye cualquier resto de aminoácido modificado postraduccionalmente, o un fragmento de anticuerpo del mismo. Los
20 ejemplos de la modificación postraducciona incluyen la supresión de un resto de lisina de una cadena H en el extremo C-terminal (recorte de lisina) y la sustitución de un resto de glutamina del polipéptido por piroglutamina (piroGlu) en el extremo N-terminal [Beck *et al.*, *Analytical Chemistry*, 85, 715-736 (2013)].

En la presente invención, el fragmento de anticuerpo es un fragmento de
25 anticuerpo que se une al FGF23 humano y que suprime su degradación a un pH

bajo en comparación con un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2. Los ejemplos del fragmento de anticuerpo en la presente invención incluyen Fab, Fab',
5 F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario (scFv), una región V dimerizada (diacuerpo), una región V estabilizada por disulfuro (dsFv) y un péptido que comprende una pluralidad de CDR. Fab es un fragmento de anticuerpo obtenido tratando un anticuerpo IgG con una enzima proteolítica papaína (obtenida mediante escisión en un resto de aminoácido en la posición 224 en una cadena H) y que tiene un peso
10 molecular de aproximadamente 50000 y una actividad de unión a antígeno, en la que aproximadamente la mitad de la cadena H en un lado N-terminal y toda una cadena L se unen entre sí mediante un enlace disulfuro (enlace S-S).

El F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo obtenido tratando un anticuerpo IgG con una enzima proteolítica pepsina (obtenida mediante escisión en un resto de
15 aminoácido en la posición 234 en una cadena H) y que tiene un peso molecular de aproximadamente 100000 y una actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el de Fab unido a través de un enlace S-S en una región bisagra. El Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido escindiendo el enlace S-S en la región bisagra del F(ab')₂ y que tiene un peso molecular de aproximadamente 50000 y una
20 actividad de unión a antígeno.

El scFv es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH obtenido mediante la unión de una VH y una VL por un enlazador peptídico adecuado (P) tal como un péptido enlazador en el que se conecta cualquier número de enlazadores (G4S) que consisten en 4 restos de Gly y 1 de Ser, y es un fragmento de anticuerpo que tiene
25 una actividad de unión a antígeno.

El Diacuerpo es un fragmento de anticuerpo obtenido mediante la formación de un dímero con scFv que tienen la misma o diferente especificidad de unión a antígeno, y es un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígeno divalente al mismo antígeno o una actividad de unión a antígeno específica a antígenos diferentes.

El dsFv se refiere a un polipéptido en el que un resto de aminoácido de cada una de las VH y VL se sustituye por un resto de cisteína, que se unen a través de un enlace S-S entre los restos de cisteína.

El péptido que comprende la CDR incluye al menos una región de una CDR de una VH o una VL. En el péptido que comprende una pluralidad de CDR, las CDR pueden unirse directamente o a través de un enlazador peptídico adecuado. El péptido que comprende CDR puede producirse construyendo ADN que codifiquen cada uno CDR de una VH y una VL del anticuerpo modificado de la presente invención, insertando los ADN en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota, e introduciendo el vector de expresión en procariotas o eucariotas para expresar el péptido que comprende CDR. El péptido que comprende CDR también puede producirse mediante un método de síntesis química tal como un método de Fmoc o un método de tBoc.

Los ejemplos de un aspecto del anticuerpo de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos (i) y (ii) o fragmentos de los mismos:

(i) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23, en el que el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, y en el que al menos el resto de aminoácido en la posición 100 de la secuencia de aminoácidos

representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH se sustituye por un resto de aminoácido seleccionado de un resto de alanina, un resto de asparagina, un resto de glicina, un resto de tirosina, un resto de arginina, un resto de ácido aspártico, un resto de histidina, un resto de triptófano y un resto de metionina, y

- 5 (ii) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23, en el que el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, y en el que al menos el resto de aminoácido en la posición 105 de la secuencia de aminoácidos
- 10 representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH se sustituye por un resto de aminoácido seleccionado de un resto de alanina, un resto de fenilalanina, un resto de glicina, un resto de histidina, un resto de isoleucina, un resto de lisina, un resto de leucina, un resto de metionina, un resto de prolina, un resto de glutamina, un resto de arginina, un resto de valina, un resto de triptófano, un resto de tirosina, un resto de treonina,
- 15 un resto de asparagina y un resto de serina.

- En el anticuerpo, la estabilidad es alta y la degradación del anticuerpo puede suprimirse a un pH bajo en comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID
- 20 NO: 2. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo que se une al FGF23, en el que el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, y en el que al menos el resto de aminoácido en la posición 100 de la secuencia de aminoácidos representada por la
- 25 SEQ ID NO: 1 en la VH se sustituye por un resto de alanina o un resto de tirosina.

En la presente invención, el pH bajo se refiere a un pH débilmente ácido o ácido inferior a 6, y los ejemplos del mismo incluyen, pero sin limitación particular, pH 5, pH 4,5 y pH 4.

El anticuerpo de la presente invención puede suprimirse su degradación y
5 presenta una excelente estabilidad a un pH bajo en comparación con el anticuerpo
que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada
por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos
representada por la SEQ ID NO: 2. En la presente invención, la degradación del
anticuerpo puede medirse mediante cromatografía de exclusión por tamaño (en lo
10 sucesivo en el presente documento, SEC) o electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS (en lo sucesivo en el presente documento, SDS-PAGE), o similares.

El hecho de que, en el anticuerpo de la presente invención, la degradación
del anticuerpo puede suprimirse a un pH bajo en comparación con el anticuerpo que
comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por
15 la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos
representada por la SEQ ID NO: 2 puede confirmarse, por ejemplo, mediante un
método que incluye las siguientes etapas (I) a (III), pero la presente invención no se
limita al método.

(I) Se prepara una solución de anticuerpo reemplazando un disolvente de una
20 solución de anticuerpo que contiene el anticuerpo de la presente invención o el
anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos
representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de
aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 con un disolvente apropiado que
tiene un pH de 4, 4,5 o 5 usando una columna tal como NAP (marca comercial) 25
25 (GE Healthcare Life Science).

(II) La solución de anticuerpo preparada en el punto (I) anterior se deja reposar a 40 grados durante un mes o dos semanas, o a 25 grados durante tres meses, y después se detectan picos (%) correspondientes a un producto de degradación del anticuerpo mediante SEC.

5 Además, la solución de anticuerpo preparada en el punto (I) anterior se deja reposar a 40 grados durante un mes o dos semanas, o a 25 grados durante tres meses, y después se realiza una SDS-PAGE en condiciones de reducción para detectar una banda de aproximadamente 40 kDa (por ejemplo, de 35 kDa a 45 kDa) correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo.

10 (III) Cuando el pico (%) correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo que se detecta mediante SEC en el punto (II) anterior se reduce en el anticuerpo de la presente invención en comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos
15 representada por la SEQ ID NO: 2, o cuando una densidad de la banda a aproximadamente 40 kDa en la SDS-PAGE es inferior en el anticuerpo de la presente invención en comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:
20 2, puede confirmarse que, en el anticuerpo de la presente invención, la degradación del anticuerpo puede suprimirse a un pH bajo en comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

25 En lugar de la SDS-PAGE descrita anteriormente (II), puede usarse un

sistema de electroforesis Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) y un kit Agilent Protein 230 (Agilent Technologies, Inc.). En este momento, cuando una relación de área de pico (%) de la banda (por ejemplo, de 40 kDa a 60 kDa) correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo que se detecta en un tamaño inferior en
5 aproximadamente 10 kDa a 20 kDa que el de un pico de la longitud total de la cadena H es inferior en el anticuerpo de la presente invención en comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, puede confirmarse que, en el
10 anticuerpo de la presente invención, la degradación del anticuerpo puede suprimirse a un pH bajo en comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

15 Es decir, como un aspecto en el que el anticuerpo de la presente invención presenta estabilidad a un pH bajo, los ejemplos del mismo incluyen los siguientes.

•En comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, la
20 densidad de la banda correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 40 kDa mediante SDS-PAGE es inferior después de permanecer a un pH bajo tal como pH 4, 4,5 o 5 a 40 grados durante un mes o dos semanas, o a 25 grados durante tres meses. La densidad de la banda puede evaluarse visualmente.

•En comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende
25 la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que

comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, el pico (%) correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo que se detecta mediante SEC se reduce después de permanecer a un pH bajo tal como pH 4, 4,5 o 5 a 40 grados durante un mes o dos semanas, o a 25 grados durante tres meses.

- 5 En comparación con el anticuerpo que comprende una VH que contiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, el pico (%) se reduce preferentemente en un 5 % o más, un 10 % o más, un 20 % o más, un 30 % o más, un 40 % o más, un 50 % o más, un 60 % o más, un 70 % o más, un
- 10 80 % o más o un 90 % o más.

- En comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, la relación de área de pico (%) de la banda (por ejemplo, de 40 kDa a 60 kDa)
- 15 correspondiente al producto de degradación del anticuerpo que se detecta en un tamaño inferior en aproximadamente 10 kDa a 20 kDa al del pico de la longitud total de la cadena H se reduce en electroferogramas usando un sistema de electroforesis Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) y un kit Agilent Protein 230 (Agilent Technologies, Inc.) después de permanecer a un pH bajo tal como pH 4, 4,5 o 5 a
- 20 40 grados durante un mes o dos semanas, o a 25 grados durante tres meses. En comparación con el anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, la relación de áreas de pico (%) se reduce preferentemente en un 5 % o más, un 10 % o más, un 20 %
- 25 o más, un 30 % o más, un 40 % o más, un 50 % o más, un 60 % o más, un 70 % o

más, un 80 % o más o un 90 % o más.

Los ejemplos de un aspecto del anticuerpo de la presente invención incluyen el anticuerpo descrito anteriormente que además comprende una sustitución seleccionada de los siguientes puntos (a1) a (a4):

5 (a1) al menos una sustitución seleccionada de la sustitución del resto de aminoácido en la posición 50 por un resto de leucina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 54 por un resto de triptófano, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 55 por un resto de histidina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 57 por un resto de treonina y la sustitución del resto de
10 aminoácido en la posición 58 por un resto de fenilalanina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH,

 (a2) al menos una sustitución seleccionada de la sustitución del resto de aminoácido en la posición 91 por un resto de metionina o un resto de leucina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 92 por un resto de tirosina, la
15 sustitución del resto de aminoácido en la posición 94 por un resto de ácido aspártico y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 96 por un resto de asparagina o un resto de ácido aspártico en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la VL,

 (a3) al menos una sustitución seleccionada de la sustitución del resto de
20 aminoácido en la posición 28 por un resto de ácido aspártico, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 29 por un resto de valina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 31 por un resto de treonina y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 34 por un resto de leucina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la VL, y

25 (a4) al menos una sustitución seleccionada de la sustitución del resto de

aminoácido en la posición 92 por un resto de tirosina o un resto de triptófano, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 94 por un resto de ácido aspártico y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 96 por un resto de ácido aspártico en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la

5 VL.

El anticuerpo de la presente invención tiene preferentemente todas las sustituciones de restos de aminoácidos descritas en los puntos anteriores (a1) a (a4) respectivos.

El anticuerpo de la presente invención puede tener una actividad de unión

10 mejorada a FGF23 y una actividad neutralizante de FGF23 mediante una sustitución de restos de aminoácidos seleccionada de los puntos anteriores (a1) a (a4). La actividad neutralizante de FGF23 se refiere a una actividad de inhibición de una señal generada por la unión del FGF23 a un receptor. Un ejemplo de un receptor de FGF23 es un complejo entre FGFR1 y α Klotho.

15 La actividad neutralizante de FGF23 del anticuerpo de la presente invención puede confirmarse mediante un ensayo indicador (también llamado ensayo promotor) descrito en *Nature*, 7 de diciembre de 2006; 444(7120), o similares. La actividad neutralizante de FGF23 del anticuerpo de la presente invención también puede confirmarse mediante un ensayo indicador usando células HEK293 con

20 expresión estable de α Klotho transformadas con un vector de expresión de luciferasa que tiene un promotor derivado de un gen Egr1 de ratón.

Los ejemplos específicos del anticuerpo de la presente invención incluyen un anticuerpo cualquiera seleccionado de los siguientes puntos (b1) a (b5).

(b1) Un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de

25 aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la

secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en el que el resto de aminoácido en la posición 50 se sustituye por un resto de leucina, el resto de aminoácido en la posición 54 se sustituye por un resto de triptófano, el resto de aminoácido en la posición 55 se sustituye por un resto de histidina, el resto de aminoácido en la posición 57 se sustituye por un resto de treonina, el resto de aminoácido en la posición 58 se sustituye por un resto de fenilalanina y el resto de aminoácido en la posición 100 se sustituye por un resto de alanina o un resto de tirosina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH,

10 (b2) Un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en el que el resto de aminoácido en la posición 100 se sustituye por un resto de alanina o tirosina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH, y el resto
15 de aminoácido en la posición 91 se sustituye por un resto de metionina, el resto de aminoácido en la posición 92 se sustituye por un resto de tirosina, el resto de aminoácido en la posición 94 se sustituye por un resto de ácido aspártico y el resto de aminoácido en la posición 96 se sustituye por un resto de asparagina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la VL,

20 (b3) Un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en el que el resto de aminoácido en la posición 100 se sustituye por un resto de alanina o tirosina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH, y el resto
25 de aminoácido en la posición 28 se sustituye por un resto de ácido aspártico, el resto

de aminoácido en la posición 29 se sustituye por un resto de valina, el resto de aminoácido en la posición 31 se sustituye por un resto de treonina y el resto de aminoácido en la posición 34 se sustituye por un resto de leucina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la VL,

- 5 (b4) Un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en el que el resto de aminoácido en la posición 100 se sustituye por un resto de alanina o tirosina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH, y el resto
- 10 de aminoácido en la posición 91 se sustituye por un resto de leucina, el resto de aminoácido en la posición 92 se sustituye por un resto de tirosina, el resto de aminoácido en la posición 94 se sustituye por un resto de ácido aspártico y el resto de aminoácido en la posición 96 se sustituye por un resto de ácido aspártico en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la VL, y
- 15 (b5) Un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en el que el resto de aminoácido en la posición 100 se sustituye por un resto de alanina o un resto de tirosina en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la
- 20 VH, y el resto de aminoácido en la posición 92 se sustituye por un resto de tirosina o un resto de triptófano, el resto de aminoácido en la posición 94 se sustituye por un resto de ácido aspártico y el resto de aminoácido en la posición 96 se sustituye por un resto de ácido aspártico en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la VL.

- 25 Los ejemplos específicos del anticuerpo de la presente invención incluyen

anticuerpos seleccionados de los siguientes puntos (c1) a (c10), se prefiere (c1), (c8), (c9) o (c10) y se prefiere más (c1) o (c9).

(c1) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39 y una VL que comprende la
5 secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2,

(c2) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 47 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2,

(c3) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de
10 aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 44,

(c4) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 44,

15 (c5) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 45,

(c6) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende la
20 secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 45,

(c7) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46,

25 (c8) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende la

secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46,

(c9) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58, y

5 (c10) un anticuerpo que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 59.

En el anticuerpo de la presente invención, con el fin de controlar la semivida en sangre, también puede usarse una región Fc en la que el resto de aminoácido
10 se sustituye para controlar la capacidad de unión a FcRn.

Los ejemplos de la región Fc en la que el resto de aminoácido se sustituye para mejorar la capacidad de unión del anticuerpo a FcRn incluyen la región Fc de uno cualquiera de los siguientes puntos (d1) a (d5). Entre ellos, se prefiere la región Fc de (d1).

15 (d1) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 252 por un resto de tirosina, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 254 por un resto de treonina y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 256 por un resto de ácido glutámico de acuerdo con el índice EU,

20 (d2) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 428 por un resto de leucina y la sustitución del resto de aminoácido en la posición 434 por un resto de serina de acuerdo con el índice EU,

(d3) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 308 por un resto de prolina de acuerdo con el índice EU,

25 (d4) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 250 por un resto de glutamina y la sustitución del resto de aminoácido

en la posición 428 por un resto de leucina de acuerdo con el índice EU, y

(d5) una región Fc que comprende la sustitución del resto de aminoácido en la posición 434 por un resto de alanina de acuerdo con el índice EU.

En la presente invención, los ejemplos específicos de la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada que comprende la región Fc en la que el resto de aminoácido se sustituye para mejorar la capacidad de unión del anticuerpo a FcRn incluyen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 y 52. Entre ellos, se prefiere la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 48.

El anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención incluye un derivado del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo, que se obtiene uniéndose químicamente o genéticamente un isótopo radiactivo, un fármaco de bajo peso molecular, un fármaco de alto peso molecular, una proteína o un fármaco de anticuerpo al anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano de la presente invención.

El derivado del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo puede producirse mediante unión, mediante un método químico [*Introduction to Antibody Engineering*, Chijin Shokan (1994)], un isótopo radiactivo, un fármaco de bajo peso molecular, un fármaco de alto peso molecular, una proteína, un fármaco de anticuerpo o un fármaco de ácido nucleico a un lado N-terminal o un lado C-terminal de la cadena H o la cadena L del anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano de la presente invención, un sustituyente apropiado o una cadena lateral o cadena de azúcar en la molécula de anticuerpo.

Además, el derivado del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo

puede producirse mediante un método de ingeniería genética en el que un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano de la presente invención y un ADN que codifica una proteína o un fármaco de anticuerpo que se han de unir se conectan y se insertan en un vector de expresión, y el vector de expresión se introduce en una célula hospedadora adecuada para expresar al derivado.

Los ejemplos del isótopo radiactivo incluyen ^{111}In , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu y ^{211}At . El isótopo radiactivo puede unirse directamente al anticuerpo mediante un método de cloramina T o similar. Una sustancia para quelar el isótopo radiactivo puede unirse al anticuerpo. Los ejemplos de reactivos quelantes incluyen el ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA).

Los ejemplos de los fármacos de bajo peso molecular incluyen un agente alquilante, nitrosourea, un antimetabolito, un antibiótico, un alcaloide vegetal, un inhibidor de topoisomerasa, un agente de terapia hormonal, un antagonista hormonal, un inhibidor de aromatasa, un inhibidor de la glicoproteína P, un derivado de complejo de platino, un agente antineoplásico tal como un inhibidor de la fase M o un inhibidor de cinasas [*Clinical Oncology, Cancer and Chemotherapy* (1996)], un fármaco esteroide tal como hidrocortisona o prednisona, un fármaco no esteroide tal como aspirina o indometacina, un inmunomodulador tal como tiomalato de oro o penicilamina, un inmunosupresor tal como ciclofosfamida o azatioprina, y un agente antiinflamatorio tal como un antihistamínico tal como maleato de clorfeniramina o clemacitina [*Inflammation and anti-inflammatory therapy*, Ishiyaku Pub, Inc. (1982)].

Los ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen amifostina (etiol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU),

lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), epirubicina, gemcitabina (Gemzar), daunorrubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, daunomicina, pepromicina, estramustina, paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotex), aldesleucina,

5 asparaginasa, busulfán, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, hidroxiurea, idarrubicina, mesna, irinotecán (CPT-11), nogitecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, hidroxycarbamida, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, tamoxifeno,

10 goserelina, leuprorenina, flutamida, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, vindesina, nimustina, semustina, capecitabina, tomoxifeno, azacitidina, UFT, oxaloplatino, gefitinib (Iressa), imatinib (STI571), erlotinib, un inhibidor de la tirosina cinasa 3 similar a FMS (Flt3), un inhibidor del receptor del

15 factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), un inhibidor del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tal como Iressa y Tarceva, radicicol, 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina, rapamicina, amsacrina, ácido retinoico, talidomida, lenalidomida, anastrozol, fadrozol, letrozol, exemestano, tiomalato de oro, D-

20 penicilamina, bucilamina, azatioprina, mizoribina, ciclosporina, rapamicina, hidrocortisona, bexaroteno (Targretin), tamoxifeno, dexametasona, progestinas, estrógenos, anastrozol (Arimidex), leuprolida, aspirina, indometacina, celecoxib, penicilamina, tiomalato de oro, maleato de clorfeniramina, clorfeniramina, clemastina, tretinoína, bexaroteno, arsénico, bortezomib, alopurinol,

25 caliqueamicina, ibritumomab tiuxetano, targretina, ozogamina, claritromicina,

leucovorina, ketoconazol, aminoglutetimida, suramina y maitansinoide, o un derivado de los mismos.

Los ejemplos del método de unión de un fármaco de bajo peso molecular a un anticuerpo incluyen un método de unión de un fármaco con un grupo amino del anticuerpo a través de glutaraldehído, y un método de unión de un grupo amino de un fármaco y un grupo carboxilo del anticuerpo a través de carbodiimida soluble en agua.

Los ejemplos de fármaco de alto peso molecular incluyen polietilenglicol (en lo sucesivo en el presente documento, PEG), albúmina, dextrano, polioxietileno, un copolímero de estireno y ácido maleico, polivinilpirrolidona, un copolímero de pirano o hidroxipropil metacrilamida. Uniendo el compuesto de alto peso molecular al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo, se esperan efectos tales como (1) una mejora de la estabilidad con respecto a diversos factores químicos, físicos o biológicos, (2) una prolongación significativa de la semivida en sangre y (3) una pérdida de inmunogenicidad o supresión de la producción de anticuerpos [*Bioconjugate pharmaceuticals*, Hirokawa Shoten (1993)].

Los ejemplos del método de unión de un PEG y el anticuerpo incluyen un método de reacción con un reactivo de modificación por PEGilación [*Bioconjugate pharmaceuticals*, Hirokawa Shoten (1993)]. Los ejemplos del reactivo de modificación por PEGilación incluyen un modificador para un grupo ϵ -amino de lisina (documento JP61-178926A), un modificador para un grupo carboxi de ácido aspártico y ácido glutámico (documento JP56-23587A) o un modificador para un grupo guanidino de arginina (documento JP2-117920A).

El inmunoestimulante puede ser un producto natural conocido como inmunoadyuvante y los ejemplos específicos del mismo incluyen fármacos que

potencian la inmunidad, tales como $\beta(1\rightarrow3)$ glucano (por ejemplo, lentinano o esquizofilano) o α -galactosilceramida (KRN7000).

Los ejemplos de la proteína incluyen una citocina o un factor de crecimiento que activa células inmunocompetentes tales como linfocitos NK, macrófagos o
5 neutrófilos, o una proteína toxina.

Los ejemplos de la citocina o factor de crecimiento incluyen interferón (en lo sucesivo denominado IFN)- α , IFN- β , IFN- γ , interleucina (en lo sucesivo en el presente documento, IL)-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 y IL-23, un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un factor estimulante de colonias de
10 granulocitos/macrófagos (GM-CSF) o un factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Los ejemplos de la proteína toxina incluyen ricina, toxina diftérica, u ONTAK, y la proteína toxina también incluye una toxina proteica obtenida introduciendo una mutación en una proteína para ajustar la toxicidad.

Los ejemplos del fármaco de anticuerpo incluyen un anticuerpo contra un
15 antígeno que induce la apoptosis tras la unión del anticuerpo, un antígeno asociado a la patogenia de tumores, un antígeno que regula una función inmunitaria y un antígeno asociado a la angiogénesis en el lugar de la lesión.

Los ejemplos del antígeno que induce la apoptosis tras la unión del anticuerpo incluyen un grupo de diferenciación (en lo sucesivo en el presente
20 documento, CD) 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80 (B7.1), CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86 (B7.2), el antígeno leucocitario humano (HLA)-Clase II o el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR).

Los ejemplos del antígeno asociado a la patogenia de tumores o del antígeno
25 de un anticuerpo que regula una función inmunitaria incluyen CD4, CD40, un ligando

de CD40, una molécula de la familia B7 (por ejemplo, CD80, CD86, CD274, B7-DC, B7-H2, B7-H3 o B7-H4), un ligando de la molécula de la familia B7 (por ejemplo, CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 o BTLA), OX-40, un ligando de OX-40, CD137, una molécula de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, DR4, DR5, TNFR1 o TNFR2), una molécula de la familia del receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL), una familia de receptores de moléculas de la familia TRAIL (por ejemplo, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 o TRAIL-R4), un receptor activador del ligando del factor nuclear kappa B (RANK), un ligando de RANK, CD25, un receptor de folato, citocinas [por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante (TGF) β o TNF α] o receptores para estas citocinas, o quimiocinas (por ejemplo, SLC, ELC, I-309, TARC, MDC o CTACK), o receptores para estas quimiocinas.

Los ejemplos del antígeno de un anticuerpo que inhibe la angiogenia de una lesión incluyen un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una angiopoyetina, un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), EGF, un factor f de crecimiento de hepatocitos (HGF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor de crecimiento similar a insulina (IGF), eritropoyetina (EPO), TGF β , IL-8, efrina, SDF-1 o receptores de los mismos.

Los ejemplos del fármaco de ácido nucleico incluyen un medicamento farmacológico tal como el ácido ribonucleico de interferencia pequeño (ARNip) o el microARN que actúan sobre organismos vivos controlando las funciones génicas. Por ejemplo, puede considerarse un conjugado con un fármaco de ácido nucleico que suprime un factor de transcripción maestro ROR γ t de los linfocitos Th17.

Cuando el derivado del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención se usa para la detección y medición del FGF23 humano y

el diagnóstico de una enfermedad asociada al FGF23 humano, los ejemplos del fármaco que se une al anticuerpo incluyen un material de marcaje utilizado en métodos inmunológicos de detección o medición habituales. Los ejemplos del material de marcaje incluyen una enzima tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa o
5 luciferasa, una sustancia luminiscente tal como un éster de acridinio o una lofina, o una sustancia fluorescente tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC) o isotiocianato de tetrametilrodamina (RITC).

Una realización de la presente invención es una composición que contiene el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la invención. Los ejemplos de
10 la forma de la composición incluyen una composición que contiene, como principio activo, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano. La composición que contiene el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede usarse para el tratamiento de una enfermedad asociada al FGF23 humano. Como una realización de la
15 presente invención, se proporciona un agente terapéutico para una enfermedad asociada al FGF23 humano que contiene el anticuerpo de la presente invención.

La presente invención también se refiere a un método terapéutico para una enfermedad asociada al FGF23 humano que incluye administrar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano.

20 La enfermedad asociada al FGF23 humano puede ser cualquier enfermedad asociada al FGF23 humano o a un receptor del FGF23 humano. Los ejemplos de los mismos incluyen osteomalacia inducida por tumores (TIO, por sus siglas en inglés), raquitismo/osteomalacia hipofosfática autosómica dominante (ADHR, por sus siglas en inglés), raquitismo hipofosfático ligado al cromosoma X (XLH, por sus siglas en inglés), displasia fibrosa, síndrome de McCune-Albright,
25

raquitismo/osteomalacia hipofosfatémico autosómico recesivo (ARHR, por sus siglas en inglés), osteoporosis, raquitismo (incluyendo el raquitismo hipofosfatémico y el raquitismo resistente a la vitamina D), hipercalcemia, hipocalcemia, calcificación ectópica, osteoesclerosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo, prurito y enfermedades asociadas a la insuficiencia renal o a la diálisis durante la insuficiencia renal, tales como osteodistrofia renal, osteopatía por diálisis y disfunción tubular renal.

La presente invención también incluye un agente terapéutico para síntomas tales como hipofosfatemia, fracaso de la mineralización ósea, dolor de huesos, debilidad muscular, deformación esquelética, trastorno del crecimiento e hipovitaminosis de 1,25-vitamina D, que se observan en enfermedades tales como TIO, ADHR, XLH, displasia fibrosa, síndrome de McCune-Albright y ARHR. El agente terapéutico contiene, como principio activo, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano.

El agente terapéutico que contiene el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede contener sólo el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo como principio activo, y se prefiere que el agente terapéutico se mezcle junto con uno o más vehículos farmacológicamente aceptables y se proporcione como una formulación farmacéutica preparada mediante cualquier método conocido en la técnica farmacéutica.

Se prefiere usar la vía de administración más eficaz para el tratamiento. Los ejemplos de la misma incluyen la administración oral y la administración parenteral tales como la administración bucal, traqueobronquial, intrarrectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los ejemplos preferidos de la misma incluyen la administración intravenosa. Los ejemplos de una forma farmacéutica incluyen

pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas y parches.

La dosis o el número de dosis varía dependiendo del efecto terapéutico deseado, el método de administración, el período de tratamiento, la edad, el peso corporal o similares, y es generalmente de 10 µg/kg a 10 mg/kg por día para adultos.

Los ejemplos de una realización de la composición de la presente invención incluyen un reactivo para detectar o medir el FGF23, que contiene un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano. La presente invención se refiere a un método para detectar o medir el FGF23 usando un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano. Como método para detectar o medir el FGF23 humano en la presente invención, puede usarse cualquier método conocido. Los ejemplos del mismo incluyen un método inmunológico de detección o medición.

El método inmunológico de detección o medición es un método para detectar o medir una cantidad de anticuerpo o antígeno usando un antígeno o anticuerpo marcado. Los ejemplos del método inmunológico de detección o medición incluyen un método de anticuerpos inmunitarios radiomarcados (RIA, por sus siglas en inglés), inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA, por sus siglas en inglés), inmunoensayo de fluorescencia (FIA, por sus siglas en inglés), inmunoensayo luminiscente, transferencia Western o un método fisicoquímico.

Los ejemplos de una realización de la composición de la presente invención incluyen un agente de diagnóstico para una enfermedad asociada al FGF23, que contiene un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano. La presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad asociada al FGF23, que contiene detectar o medir el

FGF23 usando un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23 humano. La enfermedad asociada al FGF23 humano puede diagnosticarse usando el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención para detectar o medir el FGF23 humano de acuerdo con el método descrito anteriormente.

En la presente invención, una muestra biológica que se ha de detectar o medir para detectar el FGF23 humano no se limita particularmente siempre que pueda contener FGF23 humano, tal como un tejido, células, sangre, plasma, suero, un fluido pancreático, orina, heces, un fluido tisular o un medio de cultivo.

Un agente de diagnóstico que contiene el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede contener un reactivo para realizar una reacción antígeno-anticuerpo y un reactivo de detección para la reacción, dependiendo del método de diagnóstico previsto. Los ejemplos de reactivos para realizar una reacción antígeno-anticuerpo incluyen un tampón y una sal. Los ejemplos del reactivo de detección incluyen un anticuerpo secundario marcado que reconoce el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo, o un reactivo utilizado en métodos inmunológicos de detección o medición habituales, tales como un sustrato compatible con marcadores.

Una realización de la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal anti-FGF23 humano o un fragmento de anticuerpo del mismo para la fabricación de un agente terapéutico o de diagnóstico para una enfermedad asociada al FGF23. Una realización de la presente invención se refiere a un método para tratar o diagnosticar una enfermedad asociada al FGF23.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán específicamente el método de producción del anticuerpo, el método terapéutico para una enfermedad

y el método de diagnóstico para una enfermedad de la presente invención.

1. Método para producir anticuerpos

(1) Preparación del antígeno

El FGF23 humano como antígeno puede obtenerse introduciendo un vector
5 de expresión que comprende un ADNc que codifica el FGF23 humano de longitud completa o una longitud parcial del mismo en *Escherichia coli*, levadura, células de insecto, células de animales o similares. El FGF23 humano también puede obtenerse purificando FGF23 humano a partir de diversas estirpes celulares humanas, células humanas, tejidos humanos y similares que expresan grandes
10 cantidades de FGF23 humano. Las estirpes celulares humanas, células humanas, tejidos humanos y similares pueden usarse como antígenos tal cual. Además, puede prepararse un péptido sintético que tiene una secuencia parcial del FGF23 humano mediante un método de síntesis química tal como un método de Fmoc o un método de tBoc y usarse como antígeno. Puede añadirse un marcador bien conocido tal
15 como FLAG o His al FGF23 humano o a un péptido sintético que tenga una secuencia parcial del FGF23 humano en el extremo C-terminal o N-terminal.

El FGF23 humano utilizado en la presente invención puede producirse expresando un ADN que codifica el FGF23 humano en una célula hospedadora usando un método descrito en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda
20 edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) y *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987-1997) y similares, por ejemplo, mediante el siguiente método.

En primer lugar, se prepara un vector recombinante insertando un ADNc de longitud completa que comprende una porción que codifica el FGF23 humano en
25 dirección 3' de un promotor de un vector de expresión apropiado. En lugar del ADNc

de longitud completa descrito anteriormente, puede usarse un fragmento de ADN de longitud apropiada preparado basándose en el ADNc de longitud completa y que comprende una porción que codifica un polipéptido. A continuación, introduciendo el vector recombinante obtenido en una célula hospedadora compatible con el
5 vector de expresión, puede obtenerse un transformante que produce un polipéptido.

Puede usarse cualquier vector de expresión siempre que sea susceptible de replicación autónoma en una célula hospedadora que se ha de usar o de integración en un cromosoma, y contenga un promotor apropiado en una posición en la que pueda transcribirse un ADN que codifique un polipéptido. Puede usarse cualquier
10 célula hospedadora siempre que pueda expresar un gen diana, tal como microorganismos pertenecientes al género *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, levadura, células de insectos o células de animales.

Cuando se usan procariotas tales como *Escherichia coli* como célula hospedadora, el vector recombinante es preferentemente un vector susceptible de
15 replicación autónoma en procariotas y que contiene un promotor, una secuencia de unión al ribosoma, un ADN que comprende una porción que codifica el FGF23 humano y una secuencia de terminación de la transcripción. Aunque el vector recombinante no tiene necesariamente una secuencia de terminación de la transcripción, se prefiere colocar la secuencia de terminación de la transcripción
20 inmediatamente por debajo de un gen estructural. Además, el vector recombinante puede contener un gen que controle un promotor.

Como el vector recombinante, se prefiere usar un plásmido en el que una distancia entre una secuencia Shine-Dalgarno (también llamada secuencia SD), que es una secuencia de unión al ribosoma, y un codón de inicio, se ajusta a una
25 distancia apropiada (por ejemplo, de 6 bases a 18 bases).

Como secuencia de nucleótidos del ADN que codifica el FGF23 humano, las bases pueden sustituirse de manera que el codón sea óptimo para la expresión en el hospedador, mejorando de este modo la velocidad de producción del FGF23 humano diana.

5 Puede usarse cualquier vector de expresión siempre que pueda funcionar en una célula hospedadora que se ha de usar. Los ejemplos del mismo incluyen pBTrp2, pBTac1 y pBTac2 (fabricados por Roche Diagnostics), pKK233-2 (fabricado por Pharmacia), pSE280 (fabricado por Invitrogen), pGEMEX-1 (fabricado por Promega), pQE-8 (fabricado por Qiagen), pKYP10 (JP58-110600A), pKYP200
10 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)], pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)], pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)], pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene Corporation), pTrs30 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrS30 (FERM BP-5407)], pTrs32 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrS32 (FERM BP-5408)], pGHA2 [preparado a partir de
15 *Escherichia coli* IGHA2 (FERM BP-400), JP60-221091A], pGKA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798), JP60-221091A], pTerm2 (Patente de los EE.UU. N.º 4.686.191, Patente de los EE.UU. N.º 4.939.094, Patente de los EE.UU. N.º 160.735), pSupex, pUB110, pTP5, pC194 y pEG400 [*J. Bacteriol.*, 172, 2392 (1990)], pGEX (fabricado por Pharmacia), un sistema pET (fabricado por
20 Novagen) o pME18SFL3.

 Puede usarse cualquier promotor siempre que pueda funcionar en una célula hospedadora que se ha de usar. Los ejemplos de los mismos incluyen un promotor derivado de *Escherichia coli* o de un fago, tal como un promotor trp (Ptrp), un promotor lac, un promotor PL, un promotor PR o un promotor T7. Los ejemplos del
25 mismo incluyen un promotor diseñado artificialmente tal como un promotor en

tándem con dos Ptrps dispuestos en serie, un promotor tac, un promotor lacT7 y un promotor let I.

Los ejemplos de la célula hospedadora incluyen *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* N.º 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49 y *Escherichia coli* DH5α.

Puede usarse cualquier método para introducir un vector recombinante en una célula hospedadora siempre que introduzca un ADN en una célula hospedadora que se ha de usar, tal como un método usando iones de calcio [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110 (1972), *Gene*, 17, 107 (1982), *Molecular & General Genetics*, 168, 111 (1979)].

Cuando se usa una célula animal como hospedador, puede usarse cualquier vector de expresión que pueda funcionar en una célula animal. Los ejemplos del mismo incluyen pcDNAI, pCDM8 (fabricado por Funakoshi), pAGE107 [documento JP3-22979A; *Cytotechnology*, 3, 133 (1990)], pAS3-3 (documento JP2-227075A), pCDM8 [*Nature*, 329, 840 (1987)], pcDNAI/Amp (fabricado por Invitrogen), pcDNA3.1 (fabricado por Invitrogen), pREP4 (fabricado por Invitrogen), pAGE103 [*J. Biochemistry*, 101, 1307 (1987)] y pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93 (documento WO97/10354), N5KG1val (Patente de los EE.UU. N.º 6.001.358), INPEP4 (fabricado por Biogen-IDEA) y un vector de transposón (documento WO2010/143698).

Puede usarse cualquier promotor siempre que pueda funcionar en una célula animal y los ejemplos del mismo incluyen un promotor del gen temprano inmediato (IE) del citomegalovirus (CMV), un promotor temprano de SV40, un promotor de

retrovirus, un promotor de metalotioneína, un promotor de choque térmico, un promotor SR α o un promotor o potenciador del virus de la leucemia murina de Moloney. Puede usarse un potenciador del gen IE del CMV humano junto con el promotor.

5 Los ejemplos de células hospedadoras incluyen células de leucemia humana células Namalwa, células de mono células COS, células de ovario de hámster chino células CHO [*Journal of Experimental Medicine*, 108, 945 (1958); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60, 1275 (1968); *Genetics*, 55, 513 (1968); *Chromosoma*, 41, 129 (1973); *Methods in Cell Science*, 18, 115 (1996); *Radiation Research*, 148, 260 (1997); *Proc.*
10 *Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216 (1980); *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 60, 1275 (1968); *Cell*, 6, 121 (1975); *Molecular Cell Genetics*, Anexo I, II (págs. 883-900)]; células CHO (células CHO/DG44) en las que se ha suprimido un gen de la dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo en el presente documento, dhfr) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216 (1980)], CHO-K1 (ATCC CCL-61), DUKXB11 (ATCC CCL-9096), Pro-5 (ATCC
15 CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, N.º de Cat. 11619), Pro-3, células de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (también denominadas YB2/0), células de mieloma de ratón NSO, células de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 y células de hámster sirio BHK o HBT5637 (documento JP63-000299A).

Puede usarse cualquier método para introducir un vector recombinante en
20 una célula hospedadora siempre que introduzca un ADN en una célula animal y los ejemplos del mismo incluyen un método de electroporación [*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)], un método de fosfato de calcio (documento JP2-227075A) o un método de lipofección [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)].

El FGF23 humano puede producirse cultivando, en un medio, un
25 transformante derivado de un microorganismo, una célula animal o similar que tiene

un vector recombinante incorporado con el ADN que codifica el FGF23 humano obtenido como se ha descrito anteriormente, produciendo y acumulando el FGF23 humano en un cultivo y recogiendo el FGF23 humano del cultivo. El transformante puede cultivarse en un medio de acuerdo con un método general utilizado para
5 cultivar hospedadores.

Cuando se expresa en células derivadas de eucariotas, puede obtenerse FGF23 humano con un azúcar añadido o cadena de azúcares.

Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante usando un promotor inducible, si es necesario, puede añadirse un
10 inductor al medio. Por ejemplo, cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante usando un promotor lac, puede añadirse isopropil- β -D-tiogalactopiranosido o similar al medio, y cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante usando un promotor trp, puede añadirse al medio ácido indol acrílico o similar.

15 Los ejemplos del medio para cultivar el transformante obtenido usando una célula animal como hospedador incluyen un medio RPMI1640 utilizado generalmente [*The Journal of the American Medical Association*, 199, 519 (1967)], un medio MEM de Eagle [*Science*, 122, 501 (1952)], un medio MEM modificado de Dulbecco [*Virology*, 8, 396 (1959)], un medio 199 [*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73, 1
20 (1950)], un medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) y un medio que contiene suero bovino fetal (FBS). El cultivo se realiza generalmente durante 1 día a 7 días en condiciones de pH 6 a 8, 30 °C a 40 °C y en presencia de CO₂ al 5 %. Durante el cultivo, puede añadirse al medio un antibiótico tal como kanamicina y penicilina, si es necesario.

25 Como método para expresar el gen que codifica el FGF23 humano, además

de la expresión directa, por ejemplo, puede usarse un método tal como la producción secretora o la expresión de proteínas de fusión [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)].

Los ejemplos del método para producir el FGF23 humano incluyen un método
5 para producir FGF23 humano dentro de una célula hospedadora, un método para secretar FGF23 humano fuera de una célula hospedadora y un método para producir FGF23 humano en una membrana externa de una célula hospedadora. Puede seleccionarse un método apropiado cambiando la célula hospedadora que se ha de usar y la estructura del FGF23 humano que se ha de producir.

10 Cuando el FGF23 humano se produce dentro de una célula hospedadora o en una membrana externa de una célula hospedadora, el FGF23 humano puede secretarse activamente fuera de la célula hospedadora usando un método de Paulson *et al.* [*J. Biol. Chem.*, 264, 17619 (1989)], un método de Rowe *et al.* [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8227 (1989), *Genes Develop.*, 4, 1288 (1990)] y un método
15 descrito en el documento JP05-336963A o WO94/23021. También puede aumentarse la cantidad de producción de FGF23 humano usando un sistema de amplificación génica (documento JP2-227075A) usando un gen de la dihidrofolato reductasa o similar.

El FGF23 humano obtenido puede aislarse y purificarse, por ejemplo, de la
20 siguiente manera. Cuando el FGF23 humano se expresa en un estado disuelto en las células, las células se recogen mediante centrifugación después de finalizar el cultivo, suspendidas en una solución de tampón acuosa y después se rompen con un desintegrador ultrasónico, una prensa francesa, un homogeneizador de Manton-Gaurin, un molino de Dyno o similar para obtener un extracto sin células. A partir de
25 un sobrenadante obtenido mediante centrifugación del extracto sin células, puede

obtenerse una muestra de ensayo purificada usando un método general de aislamiento y purificación de proteínas, es decir, un método tal como un método de extracción con disolventes, un método de precipitación por salado con sulfato de amonio o similar, un método de desalinización, un método de precipitación con un
5 disolvente orgánico, dietilaminoetil (DEAE)-Sepharose, un método de cromatografía de intercambio aniónico usando una resina tal como DIAION HPA-75 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), un método de cromatografía de intercambio catiónico usando una resina tal como S-Sepharose FF (fabricada por Pharmacia), un método de cromatografía hidrófoba usando una resina tal como butil sefarosa y
10 fenil sefarosa, un método de filtración en gel usando tamices moleculares, un método de cromatografía de afinidad, un método de cromatoenfoque y un método de electroforesis tal como el enfoque isoelectrico, solo o en combinación.

Cuando el FGF23 humano se expresa en forma insoluble en las células, las células se recogen y se rompen de la misma manera que anteriormente y se
15 centrifugan para recoger una forma insoluble del FGF23 humano como fracción de precipitado. La forma insoluble recogida de FGF23 humano se solubiliza con un desnaturante de proteínas. Después de recuperar el FGF23 humano a una estructura tridimensional normal diluyendo o dializando la solución solubilizada, una muestra de ensayo purificada de un polipéptido puede obtenerse mediante un
20 método de aislamiento y purificación igual al descrito anteriormente.

Cuando el FGF23 humano o un derivado tal como un derivado glicosilado del mismo se secreta extracelularmente, el FGF23 humano o el derivado tal como un derivado glicosilado del mismo puede recogerse en un sobrenadante de cultivo. Puede obtenerse una fracción soluble procesando el cultivo usando un método tal
25 como centrifugación, igual al descrito anteriormente, y puede obtenerse una

muestra de ensayo purificada a partir de la fracción soluble usando un método de aislamiento y purificación igual al descrito anteriormente.

El FGF23 humano utilizado en la presente invención también puede producirse mediante un método de síntesis química tal como un método de Fmoc o un método de tBoc. El FGF23 humano puede producirse mediante síntesis química usando un sintetizador de péptidos fabricado por Advanced ChemTech Inc, PerkinElmer, Pharmacia, Protein Technology Instruments, Synthecell-Vega, Perceptiv o Shimadzu.

(2) Inmunización de animales y preparación de células productoras de anticuerpos para la fusión

Se inmunizan animales tales como ratones, ratas o hámsteres de 3 a 20 semanas de edad con el antígeno obtenido en (1), y se recogen las células productoras de anticuerpos en bazo, ganglios linfáticos y sangre periférica de los animales. También puede usarse un ratón con inactivación de FGF23 como animal inmunizado.

La inmunización se realiza administrando un antígeno en la cavidad subcutánea, venosa o abdominal de un animal junto con, por ejemplo, un adyuvante adecuado tal como adyuvante completo de Freund o gel de hidróxido de aluminio y vacuna de *Bordetella pertussis*. Cuando el antígeno es un péptido parcial, se prepara un conjugado con una proteína transportadora tal como una albúmina sérica bovina (BSA) o una hemocianina de lapa californiana (KLH), y se usa como inmunógeno.

Después de la primera administración, el antígeno se administra de 5 a 10 veces cada 1 semana a 2 semanas. Se extrae sangre de un plexo venoso del fondo del ojo de 3 a 7 días después de cada administración y se mide el título de

anticuerpos del suero de la misma usando un inmunoensayo enzimático [*Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] o similar. Un animal cuyo suero presenta un título de anticuerpos suficiente contra el antígeno utilizado para la inmunización se usa como fuente de suministro de células productoras de anticuerpos para la fusión.

Se extirpan tejidos que contienen células productoras de anticuerpos, tales como el bazo, del animal inmunizado del Día 3 al Día 7 después de la administración final del antígeno y se recogen las células productoras de anticuerpos. Cuando se usan células del bazo, el bazo se tritura y se afloja, seguido de centrifugación, y después se eliminan adicionalmente los eritrocitos para obtener células productoras de anticuerpos para la fusión.

(3) Preparación de células de mieloma

Como células de mieloma, se usa una estirpe celular establecida obtenida de un ratón, por ejemplo, se usan una estirpe celular de mieloma de ratón resistente a la 8-azaguanina (derivada de BALB/c) P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [*Current Topics in Microbiology and Immunology*, 18, 1 (1978)], P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [*European J. Immunology*, 6, 511 (1976)], SP2/0-Ag14 (SP-2) [*Nature*, 276, 269 (1978)], P3-X63-Ag8653 (653) [*J. Immunology*, 123, 1548 (1979)] y P3-X63-Ag8 (X63) [*Nature*, 256, 495 (1975)].

Las células de mieloma se subcultivan en un medio normal (medio RPMI 1640 suplementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, FBS y 8-azaguanina) y se subcultivan en el medio normal 3 días y 4 días antes de la fusión celular para garantizar un número de células de 2×10^7 o más el día de la fusión.

(4) Fusión celular y preparación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales

Las células productoras de anticuerpos para la fusión obtenidas en (2) y las células de mieloma obtenidas en (3) se lavan minuciosamente con un Medio Esencial Mínimo (MEM) o PBS (1,83 g de fosfato disódico, 0,21 g de linato de potasio, 7,65 g de cloruro de sodio, 1 litro de agua destilada, pH 7,2) y se mezclan de manera que el número de células productoras de anticuerpos para la fusión:células de mieloma = 5:1 a 10:1, seguido de realizar una centrifugación y después eliminar el sobrenadante. Después de aflojar minuciosamente un grupo celular precipitado, se añade una solución mixta de polietilenglicol-1000 (PEG-1000), un medio MEM y sulfóxido de dimetilo a 37 °C mientras se agita. Además, se añaden de 1 ml a 2 ml del medio MEM varias veces cada 1 minuto a 2 minutos y después se añade el medio MEM para hacer una cantidad total a 50 ml. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retira. Después de aflojar suavemente el grupo celular precipitado, las células se suspenden suavemente en un medio HAT [medio normal que contiene hipoxantina, timidina y aminopterina] como células productoras de anticuerpos para la fusión. La suspensión se cultiva a 37 °C durante 7 a 14 días en una incubadora con CO₂ al 5 %.

Después del cultivo, se elimina una parte del sobrenadante del cultivo y se selecciona un grupo celular que reacciona a un antígeno que contiene el FGF23 humano y no reacciona a un antígeno que no contiene el FGF23 humano, usando un método de selección de hibridomas tal como un ensayo de unión que se describirá más adelante. A continuación, se realiza una clonación mediante un método de dilución limitante, y los hibridomas con títulos de anticuerpos estables y fuertes se seleccionan como hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

(5) Preparación del anticuerpo monoclonal purificado

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales obtenidos en (4)

se inyectan por vía intraperitoneal en ratones o ratones atímicos de entre 8 y 10 semanas de edad y se tratan con pristano [administrado por vía intraperitoneal con 0,5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano) y mantenido durante 2 semanas]. Los hibridomas se convierten en cáncer de ascitis en 10 días a 21 días.

- 5 Se recoge un fluido de ascitis de los ratones, se centrifuga para eliminar los sólidos, seguido de precipitación por salado con sulfato de amonio del 40 % al 50 % y purificación usando un método de precipitación de ácido caprílico, una columna de DEAE-Sepharose, una columna de Proteína A o una columna de filtración en gel, y las fracciones de IgG o IgM se recogen y se usan como anticuerpos monoclonales
- 10 purificados.

- Después de cultivar los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales obtenidos en (4) en un medio RPMI1640 suplementado con FBS al 10 %, el sobrenadante se elimina por centrifugación, y el precipitado resultante se suspende en un medio SFM de hibridoma, seguido de cultivo durante 3 días a 7 días. La
- 15 suspensión celular obtenida puede centrifugarse, el sobrenadante puede purificarse mediante una columna de proteína A o una columna de proteína G, puede recogerse una fracción IgG para obtener anticuerpos monoclonales purificados. Al medio SFM de hibridoma, también se le puede añadir Daigo GF21 al 5 %.

- La determinación de la subclase de anticuerpos se realiza mediante
- 20 inmunoensayo enzimático usando un kit de tipificación de subclases. La cuantificación de la cantidad de proteína se calcula mediante el método de Lowry o absorbancia a 280 nm.

(6) Selección del anticuerpo monoclonal

- La selección del anticuerpo monoclonal se realiza midiendo la capacidad de
- 25 unión del anticuerpo al FGF23 humano usando ELISA como se describe a

continuación.

Después de que el FGF23 humano se dispensa en una placa tal como una placa de 96 pocillos, se dispensa y reacciona una sustancia de ensayo como primer anticuerpo, tal como suero, un sobrenadante de cultivo de hibridoma o un anticuerpo monoclonal purificado. A continuación, la placa se lava minuciosamente con PBS o similar, y después se dispensa y se permite que reaccione un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con un reactivo enzimático o similar como segundo anticuerpo. Posteriormente, la placa se lava minuciosamente con PBS o similar, y después se añade un sustrato y se mide el coeficiente de absorción de cada pocillo con un lector de placas para seleccionar un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con el FGF23 humano.

2. Preparación del anticuerpo recombinante

Como ejemplo de producción del anticuerpo recombinante, a continuación se muestra un método para producir un anticuerpo quimérico humano y un anticuerpo humanizado. También pueden producirse anticuerpo recombinante de ratón, anticuerpo de rata o anticuerpo de conejo mediante un método similar.

(1) Construcción del vector de expresión de anticuerpos recombinantes

Un vector de expresión de anticuerpos recombinantes es un vector de expresión de células de animales incorporado con ADN que codifican cada uno una CH y una CL de un anticuerpo humano, y puede construirse clonando ADN que codifican cada uno una CH y una CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión de células de animales, respectivamente.

Como región C del anticuerpo humano, puede usarse una CH y una CL de cualquier anticuerpo humano. Por ejemplo, se usan una CH de la subclase $\gamma 1$ y una CL de la clase κ de un anticuerpo humano. Se usa un ADNc como el ADN que

codifica cada una una CH y una CL de un anticuerpo humano y también puede usarse un ADN cromosómico que consiste en un exón y un intrón. Puede usarse cualquier vector de expresión de células de animales siempre que pueda incorporar y expresar un gen que codifique la región C del anticuerpo humano. Por ejemplo,

5 se usa pAGE107 [*Cytotechnol.*, 3, 133 (1990)], pAGE103 [*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)], pHSG274 [*Gene*, 27, 223 (1984)], pKCR [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1527 (1981)], pSG1bd2-4 [*Cytotechnol.*, 4, 173 (1990)] o pSE1UK1Sed1-3 [*Cytotechnol.*, 13, 79 (1993)]. Los ejemplos de un promotor y un potenciador para el vector de expresión de células de animales incluyen un promotor temprano de SV40

10 [*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)], un LTR del virus de leucemia murina de Moloney [*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 960 (1987)] o un promotor de la cadena H de inmunoglobulina [*Cell*, 41, 479 (1985)], un potenciador [*Cell*, 33, 717 (1983)].

Como vector de expresión de anticuerpos recombinantes, se usa un vector de expresión de anticuerpos recombinantes de un tipo (tipo tándem) en el que la

15 cadena H y la cadena L de un anticuerpo están presentes en el mismo vector [*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994)], desde el punto de vista de la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpos recombinantes, la facilidad de introducción en células de animales y un equilibrio de los niveles de expresión de la cadena H y la cadena L del anticuerpo en células de animales, y también puede

20 usarse un vector de expresión de anticuerpos recombinantes de un tipo en el que la cadena H y la cadena L del anticuerpo estén presentes en vectores separados. Como vector de expresión de anticuerpos recombinantes de tipo tándem, se usan pKANTEX93 (documento WO97/10354), pEE18 [*Hybridoma*, 17, 559 (1998)] y similares.

25 (2) Obtención de ADNc que codifica la región V del anticuerpo derivado de

un animal no humano y análisis de la secuencia de aminoácidos

La obtención de un ADNc que codifica una VH y una VL de un anticuerpo no humano y el análisis de una secuencia de aminoácidos pueden realizarse de la siguiente manera.

- 5 Se extrae un ARNm de una célula de hibridoma no productora de anticuerpos humanos para sintetizar un ADNc. El ADNc sintetizado se clona en un vector tal como un fago o un plásmido para preparar una biblioteca de ADNc. De la biblioteca, se aísla un fago recombinante o un plásmido recombinante que comprende el ADNc que codifica la VH o la VL usando, como sonda, un ADN que codifica una porción
- 10 de la región C o una porción de la región V de un anticuerpo de ratón. Se determina una secuencia total de nucleótidos de una VH o una VL del anticuerpo diana de ratón en el fago recombinante o el plásmido recombinante, y se estima una secuencia total de aminoácidos de la VH o la VL basándose en la secuencia de nucleótidos.
- 15 Como animal no humano para producir células de hibridoma productoras de anticuerpos no humanos, se usan ratones, ratas, hámsteres, conejos y similares, y puede usarse cualquier animal siempre que puedan producirse células de hibridoma.

- 20 Para la preparación de un ARN total a partir de la célula de hibridomas, se usa un método de tiocianato de guanidina [*Methods in Enzymol*, 154, 3 (1987)] o un kit tal como un kit RNA easy (fabricado por Qiagen).

- 25 Para la preparación de un ARNm a partir del ARN total, se usa un método de columna de celulosa inmovilizada con oligo (dT) [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] o se usa un kit tal como un kit Oligo-dT30<Super>mRNA Purification (marca registrada) Kit

(fabricado por Takara Bio Inc.). El ARNm también puede prepararse a partir de la célula de hibridoma usando un kit tal como un kit Fast Track mRNA Isolation (marca registrada) Kit (fabricado por Invitrogen) o el kit QuickPrep mRNA Purification (marca registrada) Kit (fabricado por Pharmacia).

- 5 Para la síntesis del ADNc y la preparación de la biblioteca de ADNc, se usa un método bien conocido [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*. Suplemento 1, John Wiley & Sons (1987-1997)], el sistema SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (fabricado por Invitrogen)
- 10 o un kit ZAP-cDNA Synthesis (marca registrada) Kit (fabricado por Stratagene).

 Cuando se prepara la biblioteca de ADNc, puede usarse cualquier vector siempre que pueda incorporar un ADNc sintetizado usando como molde un ARNm extraído de una célula de hibridoma. Por ejemplo, se usa ZAP Express [*Strategies*, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [*Nucleic Acids Research*, 17, 9494 (1989)], λZAPII

15 (fabricado por Stratagene), λgt10, λgt11 [*DNA Cloning: A Practical Approach*, I, 49 (1985)], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell, pT7T3-18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [*Mol. Cell. Biol.*, 3, 280 (1983)] o pUC18 [*Gene*, 33, 103 (1985)].

 Puede usarse cualquier *Escherichia coli* que pueda usarse para introducir,

20 expresar y mantener la biblioteca de ADNc construida usando un vector de fago o plásmido. Por ejemplo, se usa XL1-Blue MRF' [*Strategies*, 5,81 (1992)], C600 [*Genetics*, 39, 440 (1954)], Y1088, Y1090 [*Science*, 222, 778 (1983)], NM522 [*J. Mol. Biol.*, 166, 1 (1983)], K802 [*J. Mol. Biol.*, 16, 118 (1966)] o JM105 [*Gene*, 38, 275 (1985)].

- 25 Para la selección de un clon del ADNc que codifica una VH o una VL de un

anticuerpo no humano a partir de la biblioteca de ADNc, se usa un método de hibridación de colonias usando una sonda marcada con isótopos o con fluorescencia, un método de hibridación en placa [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] o similar.

- 5 El ADNc que codifica la VH o la VL también puede prepararse preparando cebadores y realizando un método de Reacción en Cadena de la Polimerasa [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*. Suplemento 1, John Wiley & Sons (1987-1997)] usando como molde un ADNc sintetizado a partir
10 del ARNm o de la biblioteca de ADNc.

- Después de escindir el ADNc seleccionado con una enzima de restricción apropiada, o similar, se realiza una clonación en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene) y se determina una secuencia de nucleótidos del ADNc mediante un método de análisis de secuencia de nucleótidos utilizado
15 habitualmente. Como método de análisis de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, se usa un analizador automático de secuencias de nucleótidos tal como ABI PRISM 3700 (fabricado por PE Biosystems) o un secuenciador de ADN A. L. F. (fabricado por Pharmacia) después de realizar una reacción tal como un método de dideoxi [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463 (1977)].

- 20 Estimando las secuencias completas de aminoácidos de la VH y la VL a partir de las secuencias de nucleótidos determinadas, respectivamente, y la comparación con las secuencias completas de aminoácidos de una VH y una VL de un anticuerpo conocido [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU. (1991)], se confirma si el ADNc obtenido codifica
25 la secuencia completa de aminoácidos de cada VH y VL del anticuerpo, que

comprende una secuencia señal secretora. Respecto a la secuencia completa de aminoácidos de cada VH y VL del anticuerpo, que incluye una secuencia señal secretora, comparando con las secuencias completas de aminoácidos de una VH y una VL de un anticuerpo conocido [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,
 5 Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU. (1991)], puede estimarse una longitud y una secuencia de aminoácidos N-terminal de la secuencia señal secretora, y además, puede identificarse el subgrupo al que pertenecen. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de la VH y la VL pueden encontrarse mediante la comparación con las secuencias de aminoácidos de una VH y una VL
 10 de un anticuerpo conocido [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU. (1991)].

Usando las secuencias completas de aminoácidos obtenidas de la VH y la VL, se realiza una búsqueda de homología mediante un método BLAST [*J. Mol. Biol.*, 215, 403 (1990)] usando cualquier base de datos tal como SWISS-PROT o
 15 PIR-Protein, y puede confirmarse si las secuencias completas de aminoácidos de la VH y la VL son novedosas.

(3) Construcción del vector de expresión de anticuerpos quiméricos humanos o del vector de expresión de anticuerpos quiméricos humanos modificado

Puede construirse un vector de expresión de anticuerpos quiméricos
 20 humanos clonando el ADNc que codifica la VH o la VL del anticuerpo no humano en dirección 5' de cada gen que codifica una CH o una CL del anticuerpo humano en el vector de expresión de anticuerpos recombinantes obtenido en (1).

Con el fin de unir un lado terminal 3' del ADNc que codifica la VH o la VL del anticuerpo no humano y un lado terminal 5' de la CH o la CL de un anticuerpo
 25 humano, se preparan ADNc de una VH y una VL de manera que una secuencia de

nucleótidos de una porción de enlace codifica un aminoácido apropiado y es una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción apropiada. Los ADNc preparados de la VH y la VL se clonan, respectivamente, en dirección 5' de cada gen que codifica la CH o la CL del anticuerpo humano en el vector de expresión de anticuerpos recombinantes obtenido en (1), de manera que se expresan en una forma apropiada, y se construye un vector de expresión de anticuerpos quiméricos humanos.

El ADNc que codifica la VH o la VL del anticuerpo no humano puede amplificarse mediante PCR usando un ADN sintético que tiene secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción apropiadas en ambos extremos, y el ADNc puede clonarse en el vector de expresión del anticuerpo recombinante obtenido en (1).

(4) Construcción de ADNc que codifica la región V del anticuerpo humanizado

Un ADNc que codifica una VH o una VL de un anticuerpo humanizado puede construirse de la siguiente manera.

Se selecciona una secuencia de aminoácidos de una FR de una VH o una VL de un anticuerpo humano para injertar una secuencia de aminoácidos de CDR de una VH o una VL de un anticuerpo no humano. La secuencia de aminoácidos seleccionada del FR puede ser cualquier secuencia de aminoácidos derivada de un anticuerpo humano. Por ejemplo, se usa una secuencia de aminoácidos de una FR de un anticuerpo humano registrada en una base de datos tal como un Banco de Datos de Proteínas, o una secuencia de aminoácidos común de cada subgrupo de una FR de un anticuerpo humano [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU. (1991)]. Con el fin de suprimir una disminución de la actividad de unión del anticuerpo, se selecciona la

secuencia de aminoácidos de una FR que tiene la mayor homología posible (al menos un 60 % o más) con la secuencia de aminoácidos de una VH o una VL de un anticuerpo original.

5 A continuación, una secuencia de aminoácidos de la CDR del anticuerpo original se injerta en la secuencia de aminoácidos de la FR de la VH o la VL del anticuerpo humano seleccionado para diseñar una secuencia de aminoácidos de una VH o una VL de un anticuerpo humanizado. Convirtiendo la secuencia de aminoácidos diseñada en una secuencia de ADN teniendo en cuenta la frecuencia de uso de los codones encontrados en la secuencia de nucleótidos de un gen de anticuerpo [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de
10 Salud y Servicios Sociales de los EE.UU. (1991)], se diseña una secuencia de ADNc que codifica una secuencia de aminoácidos de una VH o una VL de un anticuerpo humanizado.

Basándose en la secuencia de ADN diseñada, se sintetizan varios ADN
15 sintéticos con una longitud de aproximadamente 100 bases y se realiza una reacción de PCR usando el ADN sintetizado. En este caso, se diseñan preferentemente seis ADN sintéticos para cada una de VH y VL en vista de la eficiencia en la reacción de PCR y de la longitud de ADN que puede sintetizarse. Además, introduciendo secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción
20 apropiadas en los extremos 5' o 3' del ADN sintético ubicado en ambos extremos, puede clonarse un ADNc que codifica la VH o la VL del anticuerpo humanizado fácilmente en el vector de expresión del anticuerpo recombinante obtenido en (1).

Después de la reacción de PCR, cada producto amplificado se clonó en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), y se determina una
25 secuencia de nucleótidos mediante un método igual al descrito en (2) para obtener

un plásmido que tiene una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos de una VH o una VL de un anticuerpo humanizado deseado.

Basándose en la secuencia de ADN diseñada, en lugar del producto de amplificación de la PCR, puede usarse un ADN sintetizado usando la longitud completa de la VH y la longitud completa de la VL como una cadena larga de ADN. Además, introduciendo la secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción apropiada en ambos extremos del ADN sintético de cadena larga, puede clonarse un ADNc que codifica la VH o la VL del anticuerpo humanizado fácilmente en el vector de expresión del anticuerpo recombinante obtenido en (1).

(5) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo humanizado

Cuando sólo se injertan CDR de una VH y una VL de un anticuerpo no humano en las FR de la VH y la VL del anticuerpo humano, la actividad de unión a antígeno del anticuerpo humanizado es inferior a la del anticuerpo no humano original [*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)]. En el anticuerpo humanizado, identificando, entre las secuencias de aminoácidos de las FR de la VH y la VL del anticuerpo humano, un resto de aminoácido directamente asociado a la unión a un antígeno, un resto de aminoácido que interactúa con un resto de aminoácido de la CDR y un resto de aminoácido que mantiene una estructura tridimensional de un anticuerpo e indirectamente asociado a la unión a un antígeno, y sustituyendo esos restos de aminoácidos por restos de aminoácidos del anticuerpo no humano original, puede aumentarse la actividad de unión a antígeno reducida.

Con el fin de identificar los restos de aminoácidos de FR asociados a la actividad de unión a antígeno, la estructura tridimensional del anticuerpo puede construirse y analizarse usando análisis de cristales de rayos X [*J. Mol. Biol.*, 112,

535 (1977)], modelado informático [*Protein Engineering*, 7, 1501 (1994)] o similares. Puede obtenerse un anticuerpo humanizado que tenga una actividad de unión a antígeno necesaria mediante la preparación de varios tipos de anticuerpos modificados para cada anticuerpo, examinando repetidamente cada correlación con la actividad de unión a antígeno y realizando pruebas de ensayo y error.

Los restos de aminoácidos de las FR de la VH y la VL del anticuerpo humano pueden modificarse realizando la reacción de PCR descrita en (4) usando un ADN sintético para la modificación. La secuencia de nucleótidos del producto amplificado después de la reacción de PCR se determina mediante el método descrito en (2) para confirmar que se ha realizado la modificación deseada.

(6) Construcción del vector de expresión de anticuerpos humanizados

Clonando el ADNc que codifica la VH o la VL del anticuerpo recombinante construido en dirección 5' del gen que codifica la CH o la CL del anticuerpo humano en el vector de expresión de anticuerpos recombinantes obtenido en (1), puede construirse un vector de expresión de anticuerpos humanizados.

Por ejemplo, introduciendo secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción apropiadas en los extremos 5' o 3' del ADN sintético utilizado para construir la VH y la VL del anticuerpo humanizado obtenido en (4) y (5) en ambos extremos, respectivamente, el ADN sintético se clona en dirección 5' del gen que codifica la CH o la CL del anticuerpo humano en el vector de expresión de anticuerpos recombinantes obtenido en (1), de manera que el ADN sintético se expresa en una forma apropiada.

Cuando se prepara un anticuerpo recombinante tal como el anticuerpo quimérico descrito anteriormente o el anticuerpo humanizado, puede construirse un vector de expresión de anticuerpos quiméricos con sustitución de VL mediante la

preparación de un vector de expresión de anticuerpos en el que se recombinan la cadena H (o VH) y la cadena L (o VL) derivadas de dos tipos diferentes de anticuerpos.

(7) Expresión transitoria del anticuerpo recombinante

5 Usando los vectores de expresión de anticuerpos recombinantes obtenidos en (3) y (6) o un vector de expresión modificado a partir de los mismos, puede realizarse la expresión transitoria de un anticuerpo recombinante y evaluar eficazmente la actividad de unión a antígeno de diversos tipos de anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados producidos.

10 Cualquier célula hospedadora que pueda expresar un anticuerpo recombinante puede usarse como célula hospedadora en la que se ha de introducir el vector de expresión y, por ejemplo, se usan células COS-7 [número de la American Type Culture Collection (ATCC): CRL1651] [*Methods in Nucleic Acids Res.*, CRC press, 283 (1991)].

15 Para la introducción del vector de expresión en células COS-7, se un método de DEAE-dextrano [*Methods in Nucleic Acids Res.*, CRC press (1991)] o un método de lipofección [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)].

Después de la introducción del vector de expresión, se miden el nivel de expresión y la actividad de unión a antígeno del anticuerpo recombinante en un sobrenadante de cultivo usando inmunoensayo enzimático [*Monoclonal Antibodies - Principles and practice*, Tercera edición, Academic Press (1996), *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), *Monoclonal Antibody Laboratory Manual*, Kodansha Scientific (1987)], y similares.

20

(8) Obtención de transformante que expresa de forma estable el anticuerpo recombinante y preparación del anticuerpo recombinante

25

Introduciendo los vectores de expresión de anticuerpos recombinantes o los vectores de expresión modificados de los mismos obtenidos en (3) y (6) en células hospedadoras apropiadas, pueden obtenerse transformantes que expresen de forma estable el anticuerpo recombinante.

5 Se usa un método de electroporación [documento JP2-257891A, *Cytotechnology*, 3, 133 (1990)] para introducir el vector de expresión en una célula hospedadora.

Cualquier célula hospedadora que pueda expresar el anticuerpo recombinante puede usarse como célula hospedadora en la que se ha de introducir
10 el vector de expresión del anticuerpo recombinante. Por ejemplo, se usan CHO-K1 (ATCC CCL-61), DUKXB11 (ATCC CCL-9096), Pro-5 (ATCC CCL-1781), CHO-S (*Life Technologies*, N.º de cat. 11619), células de mieloma de rata YB2/3HL.P2. G11.16Ag. 20 (N.º de ATCC: CRL1662, o también denominadas YB2/0), células de mieloma de ratón NS0, células de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 (N.º de ATCC:
15 CRL1581), células de ratón P3X63-Ag8.653 (N.º de ATCC: CRL1580) y células CHO (células CHO/DG44) en las que se ha suprimido un gen de la dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo en el presente documento, dhfr) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216 (1980)].

También puede usarse una célula hospedadora en la que está reducida o
20 suprimida la actividad de una proteína tal como una enzima asociada a la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular GDP-fucosa, una proteína tal como una enzima asociada a la modificación de la cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa α se une a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en un extremo reductor de una cadena de azúcar compleja ligada a un N-glicósido, una proteína asociada
25 al transporte del nucleótido de azúcar intracelular GDP-fucosa a un cuerpo de Golgi,

por ejemplo, células CHO en las que se ha suprimido un gen de la $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa (documento WO2005/035586, documento WO02/31140) o Lec13 con resistencia adquirida a la lectina [*Somatic Cell and Molecular genetics*, 12, 55 (1986)].

5 Después de la introducción del vector de expresión, se selecciona un transformante que expresa de forma estable el anticuerpo recombinante realizando un cultivo en un medio de cultivo de células de animales que contiene un fármaco tal como sulfato de G418 (en lo sucesivo en el presente documento, denominado G418) (documento JP2-257891A).

10 Los ejemplos del medio de cultivo de células de animales incluyen un medio RPMI 1640 (fabricado por Invitrogen), un medio GIT (fabricado por Japan Pharmaceutical Co., Ltd.), un medio EX-CELL 301 (fabricado por JRH Co., Ltd.), un medio IMDM (fabricado por Invitrogen), un medio Hybridoma-SFM (fabricado por Invitrogen) y un medio suplementado con diversos aditivos tales como FBS. El
15 transformante obtenido se cultiva en un medio para expresar y acumular el anticuerpo recombinante en el sobrenadante del cultivo. El nivel de expresión y la actividad de unión a antígeno del anticuerpo recombinante en el sobrenadante del cultivo pueden medirse mediante ELISA o métodos similares. El nivel de expresión del anticuerpo recombinante producido por el transformante puede aumentarse
20 usando un sistema de amplificación de dhfr (documento JP2-257891A) o similar.

El anticuerpo recombinante puede purificarse a partir del sobrenadante de cultivo del transformante usando una columna de proteína A [*Monoclonal Antibodies - Principles and practice*, Tercera edición, Academic Press (1996), *Antibodies - A Laboratory Manual*, Laboratorio Cold Spring Harbor (1988)]. Como alternativa,
25 pueden combinarse métodos utilizados para la purificación de proteínas, tales como

filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración.

El peso molecular de la cadena H, la cadena L o toda la molécula de anticuerpo del anticuerpo recombinante purificado puede medirse usando electroforesis en gel de poliacrilamida [*Nature*, 227, 680 (1970)], transferencia
5 Western [*Monoclonal Antibodies - Principles and practice*, Tercera edición, Academic Press (1996), *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] o similares.

3. Evaluación de actividad del anticuerpo monoclonal purificado o el fragmento de anticuerpo del mismo

10 La actividad del anticuerpo monoclonal purificado o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede evaluarse de la siguiente manera.

La actividad de unión del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención al FGF23 humano puede medirse mediante ELISA, un
15 método de resonancia de plasmón superficial o similares.

La actividad neutralizante de FGF23 humano del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede medirse usando el ensayo indicador descrito anteriormente o similar.

4. Método terapéutico para enfermedades usando anticuerpo monoclonal
20 anti-FGF23 humano o fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención

El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede usarse para el tratamiento de una enfermedad asociada al FGF23 humano.

El agente terapéutico que contiene el anticuerpo monoclonal o el fragmento
25 de anticuerpo del mismo de la presente invención puede contener únicamente el

anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo como principio activo, y el agente terapéutico puede mezclarse junto con uno o más vehículos farmacológicamente aceptables y proporcionarse como una formulación farmacéutica preparada mediante un método conocido en la técnica farmacéutica.

5 Los ejemplos de la vía de administración incluyen la administración oral y la administración parenteral tales como la administración bucal, traqueobronquial, intrarrectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los ejemplos de una forma farmacéutica incluyen pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas y parches.

10 Los ejemplos de la preparación adecuada para la administración oral incluyen una emulsión, un jarabe, una cápsula, un comprimido, un polvo y un gránulo.

 Puede producirse una preparación líquida tal como una emulsión o un jarabe usando, como aditivo, agua, azúcares, tales como sacarosa, sorbitol o fructosa, glicoles tales como polietilenglicol o propilenglicol, aceites tales como aceite de
15 sésamo, aceite de oliva o aceite de soja, antisépticos tales como un éster del ácido p-hidroxibenzoico o aromatizantes tales como el aroma a fresa o menta.

 La cápsula, el comprimido, el polvo, el gránulo y similares pueden producirse usando, como aditivo, un excipiente, tal como lactosa, glucosa, sacarosa o manitol, un disgregante tal como almidón o alginato de sodio, un lubricante tal como
20 estearato de magnesio o talco, un aglutinante tal como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa o gelatina, un tensioactivo tal como un éster de ácido graso o un plastificante tal como la glicerina.

 Los ejemplos de la preparación adecuada para la administración parenteral incluyen una inyección, un supositorio y una pulverización. La inyección puede
25 producirse usando una solución salina, una solución de glucosa o un vehículo

formado por una mezcla de ambos. El supositorio puede producirse usando un vehículo tal como la manteca de cacao, alifático hidrogenado o ácido carboxílico.

El aerosol puede producirse usando un vehículo que no estimule la cavidad oral y la mucosa del tracto respiratorio de un receptor y que permita que el anticuerpo monoclonal y el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención se dispersen como partículas finas y faciliten la absorción. Los ejemplos del vehículo incluyen la lactosa y la glicerina. La preparación también puede producirse en forma de un aerosol o un polvo seco. Además, al agente precursor anterior también se le puede añadir un componente que figure como aditivo en una preparación adecuada para la administración oral.

5 5. Método de diagnóstico de enfermedades usando anticuerpo monoclonal anti-FGF23 humano o fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención

La enfermedad asociada al FGF23 humano puede diagnosticarse usando el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención para detectar o medir el FGF23 humano.

15 Puede realizarse el diagnóstico de una enfermedad asociada al FGF23 humano, por ejemplo, detectando o midiendo el FGF23 humano presente en el cuerpo del paciente mediante un método inmunológico.

La técnica inmunológica es un método de detección y medición de una cantidad de anticuerpos o una cantidad de antígenos usando un antígeno o un anticuerpo sometido a marcaje. Los ejemplos de la misma incluyen un método de inmunoanticuerpos radiomarcados, inmunoensayo enzimático, inmunoensayo de fluorescencia, inmunoensayo luminiscente, transferencia Western o un método fisicoquímico.

25 En el método de inmunoanticuerpos radiomarcados, por ejemplo, se permite

que un antígeno, una célula que expresa un antígeno, o similar, reaccione con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención, y después se permite que reaccione con un anticuerpo anti-inmunoglobulina radiomarcado o un fragmento de anticuerpo del mismo, y después se realiza la
5 medición usando un contador de centelleo o similar.

En el inmunoensayo enzimático, por ejemplo, se permite que un antígeno, una célula que expresa un antígeno, o similar, reaccione con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención, y después se permite que reaccione con un anticuerpo anti-inmunoglobulina y un fragmento de unión
10 marcado con una enzima, o similar, y después se añade un sustrato y se mide la absorbancia de la solución de reacción usando un absorciómetro. Por ejemplo, se usa ELISA sándwich. Como material de marcaje que se ha de usar en el método de inmunoensayo enzimático, puede usarse un marcador enzimático conocido [*Enzyme Immunoassay*, Igaku Shoin (1987)].

15 Por ejemplo, se usa un marcador de fosfatasa alcalina, un marcador de peroxidasa, un marcador de luciferasa o un marcador de biotina. El ELISA sándwich es un método en el que un anticuerpo se conjuga con una fase sólida, después se atrapa un antígeno que se ha de detectar o medir y se permite que un segundo anticuerpo reaccione con el antígeno atrapado. En el ELISA, se preparan dos tipos
20 de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que reconocen el antígeno que se ha de detectar o medir y que tienen diferentes sitios de reconocimiento del antígeno, y entre ellos, un primer anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo se adsorbe previamente en una placa (por ejemplo, una placa de 96 pocillos) y después un segundo anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo se marca con una
25 sustancia fluorescente tal como FITC, una enzima tal como peroxidasa o biotina.

Las células aisladas de un cuerpo vivo o un lisado de las mismas, los tejidos o un lisado de los mismos, el sobrenadante de cultivo celular, suero, un fluido pleural, un fluido de ascitis o un fluido ocular se dejan reaccionar con la placa a la que se adsorbe el anticuerpo anterior, seguido de dejar reaccionar con un anticuerpo monoclonal marcado o un fragmento de anticuerpo para realizar una reacción de detección dependiendo de la sustancia marcadora. La concentración de antígeno en una muestra de ensayo se calcula a partir de una curva de calibración preparada mediante dilución escalonada de un antígeno conocido. Como anticuerpo utilizado en el método de ELISA sándwich, puede usarse un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, y puede usarse un fragmento de anticuerpo tal como Fab, Fab' o F(ab')₂. La combinación de dos tipos de anticuerpos utilizados en el ELISA sándwich puede ser una combinación de anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítomos y fragmentos de anticuerpos de los mismos, o una combinación de un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo.

Para el inmunoensayo de fluorescencia, por ejemplo, se usa un método descrito en la bibliografía [*Monoclonal Antibodies - Principles and practice*, Tercera edición, Academic Press (1996), *Monoclonal Antibody Experiment Manual*, Kodansha Scientific (1987)]. Como material de marcaje utilizado en el inmunoensayo de fluorescencia, puede usarse un marcador fluorescente conocido [*Fluorescent Antibody Method*, Soft Science Co., Ltd. (1983)]. Por ejemplo, se usa FITC o RITC.

Para el inmunoensayo luminiscente, por ejemplo, la medición se realiza mediante un método descrito en, por ejemplo, la bibliografía [*Bioluminescence, Chemiluminescence Clinical Examination 42*, Hirokawa Shoten (1998)]. Los

ejemplos del material de marcaje utilizado en el inmunoensayo luminiscente incluyen un marcador luminiscente conocido. Se usa éster de acridinio o lofina.

Para la transferencia Western, después de fraccionar los antígenos o las células que expresan los antígenos usando SDS (dodecil sulfato de sodio)-PAGE (gel de poliacrilamida) [*Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (1988)], el gel se transfiere a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) o a una membrana de nitrocelulosa, se permite que la membrana reaccione con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que reconoce el antígeno, seguido de permitir adicionalmente la reacción con un anticuerpo anti-IgG de ratón o un fragmento de unión marcado con una sustancia fluorescente, tal como FITC, un marcador enzimático tal como peroxidasa, o un marcador de biotina, y después se realiza la medición visualizando el marcador.

El método fisicoquímico se realiza, por ejemplo, uniendo FGF23 humano como antígeno al anticuerpo monoclonal de la presente invención o el fragmento de anticuerpo del mismo para formar un agregado y detectando el agregado. Como método fisicoquímico, también puede usarse un método capilar, un método de inmunodifusión radial único, un inmunoensayo de inhibición turbidimétrica o un inmunoensayo de inhibición turbidimétrica en látex [*Clinical Testing Projection*, Kanehara (1998)]. En el inmunoensayo de inhibición turbidimétrica en látex, cuando se usa un vehículo tal como el látex de poliestireno con un tamaño de partícula de aproximadamente 0,1 μm a 1 μm que está sensibilizado con un anticuerpo o antígeno y se provoca una reacción antígeno-anticuerpo mediante el antígeno o anticuerpo correspondiente, la luz dispersa en la solución de reacción aumenta y la luz transmitida disminuye. La concentración de antígeno en la muestra de ensayo se mide detectando este cambio como absorbancia o turbidez de la esfera

integradora.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se explicará específicamente con referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no se limita a los siguientes Ejemplos.

5 [Ejemplo]

[Ejemplo 1] Detección del producto de degradación del anticuerpo A

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-FGF23 humano descrito en el documento WO2008/099969 se representa por la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de la región variable
10 de cadena ligera del anticuerpo se representa por la SEQ ID NO: 2. En lo sucesivo en el presente documento, un anticuerpo IgG1 humano que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 se denominará anticuerpo A.

15 El anticuerpo A se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 2 y un disolvente de la solución de anticuerpo se reemplazó por un disolvente a pH 4 que contenía L-glutamato de sodio 10 mM, D-sorbitol 262 mM y Polisorato 80 0,05 mg/ml. La solución de anticuerpo obtenida se dejó reposar a 40 grados durante un mes (en lo sucesivo en el presente documento, denominada muestra de ensayo
20 1M a 40 grados) o a -80 grados durante un mes, y después se descongeló (en lo sucesivo en el presente documento, denominada muestra de ensayo inicial).

Posteriormente, se realizaron análisis por SEC y SDS-PAGE en condiciones de reducción usando la muestra de ensayo 1M de 40 grados y la muestra de ensayo inicial. Como resultado del análisis por SEC, en la muestra de ensayo inicial, un pico
25 correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo mostró

aproximadamente un 3 %, mientras que en la muestra de ensayo 1M de 40 grados, el pico mostró un 9,32 %.

Como resultado de la SDS-PAGE, en comparación con la muestra de ensayo inicial, en la muestra de ensayo 1M de 40 grados, una banda (una banda A) ubicada en un tamaño inferior en aproximadamente 10 kDa al de la cadena H a aproximadamente 50 kDa es significativamente más oscura, y en correlación con esto, la banda de la cadena H era más débil. En consecuencia, se sugirió que la banda A era la banda del producto de degradación de la cadena H, y la muestra de ensayo 1M de 40 grados estaba degradada en la cadena H. Como resultado del análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal de la banda A, se confirmó que la región variable de cadena pesada del anticuerpo A se escindió en D en la posición 99 y en I en la posición 100.

[Ejemplo 2] Preparación del anticuerpo modificado I100

Para el anticuerpo A, un anticuerpo en el que I, que es el resto de aminoácido en la posición 100 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH, se sustituyó por el resto de aminoácido descrito en la Tabla 1, se preparó mediante un método que se describe a continuación. En lo sucesivo en el presente documento, algunos o todos los anticuerpos enumerados en la Tabla 1 también se denominarán anticuerpo modificado I100.

20 [Tabla 1]

Nombre del anticuerpo	Aminoácido sustituido en I100	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada
I100A	A	SEQ ID NO: 3
I100L	L	SEQ ID NO: 4

I100V	V	SEQ ID NO: 5
I100Y	Y	SEQ ID NO: 6
I100W	W	SEQ ID NO: 7
I100T	T	SEQ ID NO: 8
I100S	S	SEQ ID NO: 9
I100R	R	SEQ ID NO: 10
I100Q	Q	SEQ ID NO: 11
I100N	N	SEQ ID NO: 12
I100M	M	SEQ ID NO: 13
I100K	K	SEQ ID NO: 14
I100H	H	SEQ ID NO: 15
I100G	G	SEQ ID NO: 16
I100F	F	SEQ ID NO: 17
I100E	E	SEQ ID NO: 18
I100D	D	SEQ ID NO: 19

Un fragmento de gen correspondiente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de una VH de cada anticuerpo mostrado en la Tabla 1 se introdujo en un vector de expresión usando un método de clonación sin costuras (encargado a FASMAC Co., Ltd.) para preparar un plásmido necesario.

5 El vector de expresión de la cadena H utilizado fue un vector pCI-OtCAG_hG1 que comprendía una secuencia señal y una secuencia de región constante de la cadena y humana. En todos los clones, se usó IgG1 humana como la región constante de la cadena H.

La secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo modificado I100 utilizada fue la secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo A (SEQ ID NO: 2). El vector de expresión de la cadena L utilizado fue un vector pCI-OtCMV_hK que tenía una secuencia señal y una secuencia de región constante de la cadena k
5 humana. El plásmido completo se preparó en gran cantidad usando un kit Plasmid Maxi de QIAGEN (QIAGEN).

A continuación, cada anticuerpo se expresó transitoriamente usando un kit Expi293 Expression System (Life Technologies). El método para introducir el plásmido era conforme al documento adjunto. El vector de expresión de la cadena
10 L y el vector de expresión de la cadena H se mezclaron en una relación de 1:2 y se introdujeron. Las células en las que se introdujo el plásmido se cultivaron en condiciones de 37 grados, CO₂ al 5 % y 125 rpm durante 3 días. Posteriormente, una suspensión de cultivo celular se centrifugó y el sobrenadante del cultivo se recogió a través de un filtro de 0,2 µm (Thermo Scientific). Se obtuvo un anticuerpo
15 purificado a partir del sobrenadante del cultivo mediante purificación por afinidad usando Mab Select SuRe (GE Healthcare).

Específicamente, la resina cargada en la columna se equilibró con PBS y después se añadió el sobrenadante del cultivo a la columna. La columna se lavó dos veces con PBS, una vez con el tampón de lavado 1 (PBS con NaCl 1 M) y con
20 el tampón de lavado 2 (ácido cítrico 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,0), y después el anticuerpo se eluyó usando un tampón de elución (ácido cítrico 20 mM, NaCl 50 mM, pH 3,4).

La solución de anticuerpo obtenida se neutralizó añadiendo una cantidad 1/10 de tampón de neutralización (ácido fosfórico 1 M-NaOH, pH 7,0) y el disolvente
25 de la solución de anticuerpo se reemplazó por PBS usando NAP25 (GE Healthcare).

La solución de anticuerpo después del reemplazo del tampón se concentró por ultrafiltración usando unidades de filtro centrifugas Amicon Ultra-4 (Millipore) y se midió la absorbancia A280 usando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), y se realizó la medición de la concentración y el ajuste de la solución de anticuerpo. Se calculó el coeficiente de absorción basándose en la secuencia de aminoácidos de cada anticuerpo humanizado de acuerdo con un método de C. N. Pace *et al.* (1995, *Prot. Sci.*4: 2411-2423).

[Ejemplo 3] Evaluación de la actividad de unión a antígeno del anticuerpo modificado I100

Con respecto al anticuerpo modificado I100 y al anticuerpo A obtenido en el Ejemplo 2, la actividad de unión al FGF-23 humano recombinante (R&D Systems, N.º de cat. 2604-FG-025/CF) se midió de la siguiente manera.

Usando un kit de captura de anticuerpos humanos (Global Life Sciences Technologies Japan K.K., N.º de cat. BR-1008-39), el anticuerpo IgG antihumano se inmovilizó en un chip sensor CM5 (Global Life Sciences Technologies Japan K.K., N.º de cat. BR100530) de acuerdo con el protocolo adjunto.

Se añadió un anticuerpo preparado a 1 µg/ml a una celda de flujo en la que se inmovilizó el anticuerpo anti-IgG humana a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos.

A continuación, el FGF-23 humano recombinante se preparó escalonadamente a cinco concentraciones por dilución doble comenzando a partir de 130,5 ng/ml y la reacción de unión se controló durante 2 minutos y la reacción de disociación se controló durante 10 minutos a un caudal de 30 µl/min. La medición se realizó usando un método de ciclo único. Los sensorgramas obtenidos se analizaron usando el software de evaluación Bia (Global Life Sciences Technologies

Japan K.K.), y se calcularon las constantes cinéticas de los anticuerpos. Los resultados de algunas de entre la constante de velocidad de unión (k_a), la constante de velocidad de disociación (k_d) y la constante de disociación [$k_d/k_a = K_D$] calculadas de cada anticuerpo se muestran en las Tablas 2 y 3. En la Tabla 3, A_1, A_2 y A_3 se refieren al anticuerpo A.

5 [Tabla 2]

Nombre del anticuerpo	k_a	k_d	K_D (M)
A	9,12+07	4,11E-04	4,51E-12
I100A	4,60E+07	6,46E-04	1,40E-11
I100L	1,95E+07	2,46E-04	1,26E-11
I100V	1,07E+08	5,04E-04	4,73E-12

[Tabla 3]

Nombre del anticuerpo	k_a	k_d	K_D (M)
A_1	5,29E+07	1,09E-04	2,06E-12
A_2	4,21E+07	1,10E-04	2,60E-12
A_3	4,20E+07	1,58E-04	3,76E-12
I100Y	2,24E+07	4,17E-04	1,86E-11
I100A	2,06E+07	5,16E-04	2,51E-11
I100H	6,21E+06	4,17E-04	6,72E-11
I100N	7,78E+06	7,27E-04	9,34E-11
I100G	8,70E+06	1,29E-03	1,49E-10
I100D	1,15E+07	2,51E-03	2,19E-10

I100R	9,89E+05	2,19E-04	2,22E-10
-------	----------	----------	----------

En las Tablas 2 y 3 se confirmó que casi todos los anticuerpos modificados I100, incluyendo el anticuerpo I100A y el anticuerpo I100Y, tenían una actividad de unión a antígeno reducida en comparación con el anticuerpo A.

5 Además, también se confirmó que los anticuerpos I100W, I100S, I100K y I100E tenían una actividad de unión a antígeno reducida en comparación con el anticuerpo A, y los anticuerpos I100T, I100Q, I100M e I100F tenían una actividad de unión a antígeno comparable a la del anticuerpo A.

10 [Ejemplo 4] Confirmación del efecto de supresión de la degradación del anticuerpo modificado I100

Para el anticuerpo modificado I100 y el anticuerpo A obtenido en el Ejemplo 2, un disolvente de una solución de anticuerpo se reemplazó por un disolvente a pH 4 que contenía L-glutamato de sodio 10 mM y D-sorbitol 262 mM usando NAP25 (GE Healthcare). La solución de anticuerpo obtenida se dejó reposar a 40 grados
15 durante un mes o dos semanas, y después se sometió a SDS-PAGE en condiciones reductoras. La Tabla 4 muestra los resultados de la comparación de la densidad de una banda a aproximadamente 40 kDa, que corresponde a un producto de degradación del anticuerpo, entre cada anticuerpo y el anticuerpo A. Cuando la densidad de la banda se redujo en el anticuerpo modificado en comparación con el
20 anticuerpo A, se determinó que la degradación se suprimió en el anticuerpo modificado en comparación con el anticuerpo A.

Los valores numéricos que se muestran en la columna correspondiente para el efecto de supresión de la degradación en la Tabla 4 se fijaron de la siguiente manera. A un anticuerpo cuya degradación se suprimió en comparación con el

anticuerpo A se le proporcionó un valor numérico de 1, a un anticuerpo cuya degradación fue comparable a la del anticuerpo A se le proporcionó un valor numérico de 2 y a un anticuerpo cuya degradación se vio favorecida en comparación con el anticuerpo A se le proporcionó un valor numérico de 3.

5 [Tabla 4]

Nombre del anticuerpo	Efecto de supresión de la degradación
I100A	1
I100L	2
I100V	2
I100Y	1
I100W	1
I100T	2
I100S	2
I100R	1
I100Q	3
I100N	1
I100M	1
I100K	2
I100H	1
I100G	1
I100F	2
I100E	2
I100D	1

Como se muestra en la Tabla 4, la degradación de I100A, I100Y, I100W, I100R, I100N, I100M, I100H, I100G e I100D se suprimió en comparación con el anticuerpo A. I100L, I100V, I100T, I100S, I100K, I100F e I100E se degradaron en una medida comparable a la del anticuerpo A. La degradación de I100Q se vio favorecida en comparación con el anticuerpo A.

[Ejemplo 5] Evaluación de la estabilidad térmica del anticuerpo A y del anticuerpo modificado I100

La estabilidad térmica de cada dominio de anticuerpo (Fab, CH2, CH3) del anticuerpo A y del anticuerpo modificado I100 se evaluó mediante calorimetría diferencial de barrido (en lo sucesivo en el presente documento, DSC).

Se preparó una muestra de medición con una concentración de 0,5 mg/ml en un tampón de D-PBS. Para la medición, se usó un sistema Micro Cal VP-Capillary DSC (Spectris Co., Ltd.). La medición se realizó mediante un programa de aumento de la temperatura de 25 grados a 100 grados a un grado por minuto. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 5 y 6.

[Tabla 5]

Nombre del anticuerpo	Fab (grado)	CH2 o Fab+CH2 (grado)	CH3 (grado)
A	66,8	69,3 (CH2)	82,9
I100A		70,0 (Fab+CH2)	82,9
I100L	64,3	70,1 (CH2)	83,1
I100V	67,3	71,6 (CH2)	83,3

[Tabla 6]

Nombre del anticuerpo	Fab (grado)	CH2 o Fab+CH2 (grado)	CH3 (grado)
A	66,9	69,9 (CH2)	83,0
I100A		70,3 (Fab+CH2)	83,1
I100D	65,5	70,0 (CH2)	83,4
I100G		70,7 (Fab+CH2)	83,4
I100H	69,3	72,3 (CH2)	83,3
I100N		71,3 (Fab+CH2)	83,3
I100R		74,3 (Fab+CH2)	83,4
I100Y	66,8	69,0 (CH2)	83,5

A partir de las Tablas 5 y 6, en I100A, I100G, I100N y I100R, se detectaron un pico de Fab y un pico de CH2 superpuestos, y la estabilidad térmica de Fab mejoró entre 3 y 8
5 grados en comparación con el anticuerpo A. A partir de lo anterior, se confirmó que I100A, I100G, I100N e I100R tenían una estabilidad estructural superior a la del anticuerpo A.

[Ejemplo 6] Preparación del anticuerpo modificado D105

De la misma manera que en el Ejemplo 2, se prepararon anticuerpos en los
10 que D en la posición 105 de la secuencia de aminoácidos de una VH que comprendía la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 del anticuerpo A se sustituyó por los restos de aminoácidos mostrados en la Tabla 7 (en lo sucesivo en el presente documento, parte o la totalidad del anticuerpo también se denomina anticuerpo modificado D105).

[Tabla 7]

Nombre del anticuerpo	Aminoácido sustituido en D105	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada
D105A	A	SEQ ID NO: 20
D105E	E	SEQ ID NO: 21
D105F	F	SEQ ID NO: 22
D105G	G	SEQ ID NO: 23
D105H	H	SEQ ID NO: 24
D105I	I	SEQ ID NO: 25
D105K	K	SEQ ID NO: 26
D105L	L	SEQ ID NO: 27
D105M	M	SEQ ID NO: 28
D105P	P	SEQ ID NO: 29
D105Q	Q	SEQ ID NO: 30
D105R	R	SEQ ID NO: 31
D105V	V	SEQ ID NO: 32
D105W	W	SEQ ID NO: 33
D105Y	Y	SEQ ID NO: 34
D105T	T	SEQ ID NO: 35
D105N	N	SEQ ID NO: 36
D105S	S	SEQ ID NO: 37

[Ejemplo 7] Evaluación de la actividad de unión a antígeno del anticuerpo modificado

D105

Con respecto a los anticuerpos modificados D105 obtenidos en el Ejemplo 6, la actividad de unión al FGF-23 humano recombinante (R&D Systems, N.º de cat. 2604-FG-025/CF) se midió de la misma manera que en el Ejemplo 3. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 8 y 9. A_1 y A_2 en la Tabla 8 son ambos resultados de medición para el anticuerpo A.

[Tabla 8]

Nombre del anticuerpo	ka	kd	KD (M)
A_1	3,72E+07	1,40E-04	3,76E-12
A_2	2,96E+07	1,23E-04	4,15E-12
I100A	2,13E+07	6,17E-04	2,89E-11
D105E	1,29E+07	2,18E-04	1,70E-11
D105F	2,65E+06	4,72E-04	1,78E-10
D105G	4,84E+06	4,72E-04	9,75E-11
D105H	1,19E+06	1,70E-04	1,43E-10
D105I	2,50E+06	1,83E-04	7,34E-11
D105K	1,73E+06	4,53E-04	2,62E-10
D105L	3,39E+06	2,17E-04	6,39E-11
D105M	4,54E+05	3,05E-04	6,71E-10
D105N	2,92E+06	1,34E-04	4,60E-11
D105P	2,51E+06	5,04E-04	2,01E-10
D105Q	1,02E+06	2,57E-04	2,52E-10
D105R	3,81E+05	7,26E-04	1,91E-09
D105S	1,63E+06	1,72E-04	1,06E-10

D105V	1,63E+06	4,30E-04	2,63E-10
D105W	2,01E+06	3,00E-04	1,49E-10
D105Y	3,21E+06	3,27E-04	1,02E-10

[Tabla 9]

Nombre del anticuerpo	ka	kd	KD (M)
A	4,82E+07	4,78E-04	9,93E-12
D105A	5,21E+06	5,61E-04	1,08E-10
D105T	3,86E+06	4,28E-04	1,11E-10

A partir de las Tablas 8 y 9 se confirmó que la actividad de unión a antígeno de cada uno de los anticuerpos modificados D105 se redujo en comparación con el anticuerpo A.

[Ejemplo 8] Confirmación del efecto de supresión de la degradación del anticuerpo modificado D105

Para los anticuerpos modificados D105 obtenidos en el Ejemplo 6, se confirmó un efecto de supresión de la degradación de anticuerpos de la misma manera que en el Ejemplo 4. La solución de anticuerpo se dejó reposar a 40 grados durante 2 semanas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. Para los valores numéricos mostrados en la columna del efecto de supresión de la degradación en la Tabla 10, a un anticuerpo cuya degradación se suprimió en comparación con el anticuerpo A se le proporcionó un valor numérico de 1, a un anticuerpo cuya degradación fue comparable a la del anticuerpo A se le proporcionó un valor

numérico de 2 y a un anticuerpo cuya degradación se vio favorecida en comparación con el anticuerpo A se le proporcionó un valor numérico de 3.

[Tabla 10]

Nombre del anticuerpo	Efecto de supresión de la degradación
D105E	2
D105F	1
D105G	1
D105H	1
D105I	1
D105K	1
D105L	1
D105M	1
D105N	1
D105P	1
D105Q	1
D105R	1
D105S	1
D105V	1
D105W	1
D105Y	1
D105A	1
D105T	1

Se confirmó a partir de la Tabla 10 que la degradación de 17 tipos de anticuerpos modificados D105, excepto D105E, se suprimió en comparación con el anticuerpo A. Se confirmó que, en cada uno de los anticuerpos, la densidad de una banda a aproximadamente 40 kDa correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo en SDS-PAGE se redujo significativamente en comparación con el anticuerpo A, y la degradación del anticuerpo se suprimió significativamente.

[Ejemplo 9] Medición de la actividad neutralizante del anticuerpo modificado I100 y del anticuerpo modificado D105 frente al FGF23 humano

La actividad neutralizante de 24 tipos de anticuerpos modificados I100 y anticuerpos modificados D105 (I00A, I100N, I100G, I100Y, I100R, I100D, I100H, D105A, D105F, D105G, D105H, D105I, D105K, D105L, D105M, D105P, D105Q, D105R, D105V, D105W, D105Y, D105T, D105N y D105S) en los que se suprimió la degradación del anticuerpo en comparación con el anticuerpo A de los Ejemplos 4 y 8 frente al FGF23 humano se midió mediante un método que se describe a continuación.

Para la medición de la actividad neutralizante, se realizó un ensayo de promotor usando células HEK 293 de expresión estable de α Klotho (en lo sucesivo en el presente documento, denominadas mEgr1/ α KL/HEK293) transformadas con un vector de expresión de luciferasa que comprendía un promotor derivado del gen Egr1 de ratón. La mEgr1/ α KL/HEK293 se produjo mediante un método idéntico al descrito en *Nature*, 7 de diciembre de 2006; 444 (7120).

En el ensayo de promotor, cuando el FGF23 se une a α Klotho en la mEgr1/ α KL/HEK293, fluye una señal en la célula para expresar un gen de luciferasa y puede detectarse la fluorescencia de la luciferasa. Cuando el FGF23 es neutralizado por la presencia del anticuerpo neutralizante de FGF23, la intensidad

de fluorescencia disminuye.

El anticuerpo se diluyó a 100 µg/ml con un tampón que contenía L-glutamato de sodio 10 mM y D-sorbitol 262 mM para preparar una solución madre. Como medio de cultivo convencional de la mEgr1/αKL/HEK293, se usó un medio DMEM
5 (Thermo fisher) suplementado con 10 (% en volumen) de Suero Fetal Bovino (Thermo fisher) y 1 % (en volumen) de penicilina/estreptomicina.

El anticuerpo se diluyó 1000 veces con el medio de cultivo convencional descrito anteriormente para que tuviera una concentración (100 ng/ml) como concentración máxima, y se prepararon ocho series de dilución mediante dilución
10 $\sqrt[10]{10}$ veces y se usaron para su evaluación. La evaluación se realizó usando una placa de 384 pocillos. Las células se dispusieron a 2000 células/pocillo y la concentración de FGF23 a añadir era de 4 ng/ml. El FGF23 fue el mismo que en el Ejemplo 3 y se diluyó con el medio de cultivo convencional.

Después de añadir cada anticuerpo a las células, las células se cultivaron
15 durante 24 horas, después se añadió FGF23, y las células se cultivaron durante 4 horas. La intensidad de fluorescencia de la luciferasa se midió usando un sistema Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) con un lector multiplaca Envision (Perkinelmer).

Para los resultados obtenidos, la intensidad de fluorescencia en el momento
20 de añadir FGF23 es del 100 %, la intensidad de fluorescencia en el momento de no añadir FGF23 es del 0 %, y se calcula la relación de la intensidad de fluorescencia en el momento de añadir cada anticuerpo, y los valores de CI50 (ng/ml) de los mismos se muestran en la Tabla 11.

[Tabla 11]

Nombre del	CI50 (ng/ml)
------------	--------------

anticuerpo	
A	1,4
D105A	>100
D105F	>100
D105G	33,1
D105H	46,7
D105I	23,7
D105K	45,7
D105L	25,6
D105M	>100
D105N	14,0
D105P	99,2
D105Q	>100
D105R	>100
D105S	27,8
D105T	>100
D105V	>100
D105W	77,9
D105Y	21,6
I100A	5,1
I100D	>100
I100G	>100
I100H	8,9
I100N	26,2

I100R	82,5
I100Y	3,0

Como se muestra en la Tabla 11, todos los anticuerpos modificados tenían una actividad neutralizante de FGF23 reducida en comparación con el anticuerpo A.

[Ejemplo 10] Preparación de anticuerpo modificado en la región constante de
5 cadena pesada del anticuerpo A

Se preparó un anticuerpo con aminoácidos modificados en la región constante de cadena pesada (en lo sucesivo en el presente documento, denominado anticuerpo modificado en CH) del anticuerpo A mediante un método que se describe a continuación.

10 Como el anticuerpo modificado CH, se prepararon un anticuerpo isotópico en el que la CH (IgG1 humana) del anticuerpo A se sustituye por una CH de IgG2 humana, IgG2AAAS (un anticuerpo modificado IgG2 humano en el que la valina en la posición 234 se sustituye por alanina, la glicina en la posición 237 se sustituye por alanina y la prolina en la posición 331 se sustituye por serina en el Fc de la IgG2
15 humana de acuerdo con el índice EU) (Michael, S., *et al.*, *J. Immunol.*, 1997, 159: 3613; *J. Immunol.* 2000, 164: 4178-4184) o IgG4PE_R409K (un anticuerpo modificado IgG4 humano en el que la serina en la posición 228 se sustituye por prolina, la leucina en la posición 235 se sustituye por ácido glutámico y la arginina en la posición 409 se sustituye por lisina en el Fc de la IgG4 humana de acuerdo
20 con el índice EU) (documento WO2006/033386), y un total de 23 tipos de anticuerpos obtenidos añadiendo las siguientes modificaciones de aminoácidos de Fc (10-1) a (10-5), que se sabe que mejoran la actividad de unión a FcRn humano y de mono, a la región Fc del anticuerpo A o cada uno de los tres tipos de isotipos

del anticuerpo A.

<Modificación de aminoácidos de Fc>

(10-1) Modificación de aminoácidos en la que M en la posición 252 se sustituye por Y, S en la posición 254 se sustituye por T y T en la posición 256 se
5 sustituye por E de acuerdo con el índice EU (*J. Biol. Chem.* 2006b; 281: 23514-23524)

(10-2) Modificación de aminoácidos en la que T en la posición 250 se sustituye por Q y N en la posición 428 se sustituye por L de acuerdo con el índice EU (*J. Biol. Chem.* 2004; 279: 6213-6216)

10 (10-3) Modificación de aminoácidos en la que N en la posición 434 se sustituye por A de acuerdo con el índice EU (*J. Immunol.* 1997; 158: 2211-2217),

(10-4) Modificación de aminoácidos en la que V en la posición 308 se sustituye por P de acuerdo con el índice EU (*Drug. Metab. Dispos.* 2012a; 40: 1545-1555)

15 (10-5) Modificación de aminoácidos en la que M en la posición 428 se sustituye por L y N en la posición 434 se sustituye por S de acuerdo con el índice EU (*Nat. Biotechnol.* 2010; 28: 157-159)

En lo sucesivo en el presente documento, el anticuerpo modificado en CH en el que la CH del anticuerpo A se sustituye por una CH de IgG2 humana se denomina
20 anticuerpo A_G2. Lo mismo se aplica a los anticuerpos modificados en CH sustituidos con otras subclases.

En lo sucesivo en el presente documento, los anticuerpos modificados en CH obtenidos añadiendo las modificaciones de aminoácidos descritas anteriormente (10-1) a (10-5) a la región Fc del anticuerpo A se denominan anticuerpo A_YTE,
25 anticuerpo A_QL, anticuerpo A_A, anticuerpo A_P y anticuerpo A_LS,

respectivamente. Lo mismo se aplica a los anticuerpos modificados en CH obtenidos añadiendo las modificaciones de aminoácidos descritas anteriormente (10-1) a (10-5) al anticuerpo A_G2, anticuerpo A_G2AAS y anticuerpo A_G4PE_R409K.

5 Un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las secuencias de aminoácidos de la región variable y la región constante de la cadena H del anticuerpo A que se prepara en el Ejemplo 2 se sometió a un tratamiento de enzimas de restricción con NheI y BamHI para preparar un fragmento de vector del que se eliminó la región estacionaria. Basándose en el fragmento de plásmido, se
10 sintetizó un fragmento de gen que comprendía una secuencia de nucleótidos que codificaba las secuencias de aminoácidos de los 23 tipos de anticuerpos modificados en CH descritos anteriormente y se introdujo en un vector de expresión apropiado para preparar un plásmido necesario. Usando el plásmido obtenido, se preparó un anticuerpo de la misma manera que en el Ejemplo 2.

15 [Ejemplo 11] Medición de la actividad de unión del anticuerpo A y el anticuerpo modificado en CH del anticuerpo A a FcRn

 La actividad de unión del anticuerpo A y de los anticuerpos modificados en CH del anticuerpo A que se preparan en los Ejemplos 2 y 10 a FcRn humano y de mono se midió por Biacore de acuerdo con un método que se describe a
20 continuación.

 A HBS-EP+ (Global Life Sciences Technologies Japan K.K., N.º de cat. BR-1006-69), se le añadió ácido clorhídrico 1 M (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, N.º de Cat. 083-01095) para ajustar el HBS-EP+ a pH 6. Cada anticuerpo se sometió a un intercambio de tampón con el HBS-EP+ descrito
25 anteriormente a pH 6 usando NAP25. El FcRn humano y el FcRn de mono también

se diluyeron con HBS-EP+ a pH 6. El FcRn humano y el FcRn de mono utilizados en el experimento se prepararon de la siguiente manera.

Una secuencia de ADN que codifica el FcRn humano (sólo se usaron para su expresión como molécula soluble los aminoácidos de las posiciones 1 a 297 entre
5 las secuencias de aminoácidos de longitud completa del FcRn humano), FcRn humano-marcador His (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 54) que tiene 6 histidinas añadidas al extremo C-terminal del mismo, y $\beta 2$ microglobulina humana (la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 55) se insertó en dirección 3' de un promotor CMV de un plásmido de expresión de células de mamífero. El plásmido
10 se usó para la expresión transitoria usando un Kit Expi293 Expression System Kit (Life Technologies) de la misma manera que en el Ejemplo 2.

También se expresaron transitoriamente FcRn de mono (sólo se usaron para su expresión como molécula soluble los aminoácidos de las posiciones 1 a 297 de la secuencia de aminoácidos de longitud completa del FcRn de mono), FcRn de
15 mono-marcador His (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 56) que tiene seis histidinas añadidas al extremo C-terminal del mismo, y microglobulina $\beta 2$ de mono (la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 57) de la misma manera que el FcRn humano-marcador His.

Después de obtener el sobrenadante de cada cultivo, FcRn humano y de
20 mono se purificaron usando agarosa Ni-NTA (QIAGEN, N.º de cat. 30210). La purificación se realizó de acuerdo con los procedimientos convencionales descritos en el manual de Ni-NTA Agarosa.

La medición por Biacore se realizó en las siguientes condiciones. Se inmovilizó anticuerpo Tetra His Sin BSA (QIAGEN) en un chip sensor CM5 (Global
25 Life Sciences Technologies Japan K.K., N.º de cat. BR100530). El FcRn humano y

el FcRn de mono ajustados a 10 µg/ml se añadieron a una celda de flujo en la que se inmovilizó el anticuerpo Tetra His Sin BSA a un caudal de 10 µl/min durante 120 segundos. A continuación, cada anticuerpo modificado en Fc se preparó a cinco concentraciones por dilución triple comenzando a partir de 450 µg/ml y la reacción de unión se monitorizó durante 2 minutos y la reacción de disociación durante 5 minutos a un caudal de 30 µl/min.

La medición se realizó mediante un método de múltiples ciclos. Los sensorgramas obtenidos se analizaron usando el software de evaluación Bia (Global Life Sciences Technologies Japan K.K.), y se calcularon las constantes de disociación [$k_{d1}/k_{a1} = KD$] de los anticuerpos. Los resultados se muestran en las Tablas 12 y 13.

[Tabla 12]

Nombre del anticuerpo	KD (M)	
	FcRn h	FcRn de macaco cangrejero
A	5,05E-07	2,12E-07
A_A	3,08E-07	1,55E-07
A_P	1,83E-07	6,02E-08
A_QL	1,87E-07	No detectado
A_YTE	1,59E-07	1,15E-07
A_G2	6,24E-07	2,33E-07
A_G2_A	2,86E-07	1,33E-07
A_G2_P	2,34E-07	7,82E-08
A_G2_QL	2,02E-07	4,33E-08
A_G2_YTE	1,86E-07	3,91E-08
A_G2AAAS	6,23E-07	2,42E-07
A_G2AAAS_A	2,47E-07	1,29E-07
A_G2AAAS_P	2,20E-07	7,53E-08
A_G2AAAS_QL	2,13E-07	6,90E-08
A_G2AAAS_YTE	1,97E-07	4,79E-08
A_IgG4PE_R409K	9,12E-07	3,24E-07
A_IgG4PE_R409K_A	4,29E-07	1,90E-07
A_IgG4PE_R409K_P	1,92E-07	7,69E-08
A_IgG4PE_R409K_QL	2,65E-07	8,70E-08
A_IgG4PE_R409K_YTE	2,27E-07	1,23E-07

[Tabla 13]

Nombre del anticuerpo	KD (M) a FcRn h
A_LS	1,42E-07
A_G2_LS	3,10E-07
A_G2AAAS_LS	1,59E-07
A_IgG4PE_R409K_LS	1,16E-07

Como se muestra en las Tablas 12 y 13, se confirmó que los anticuerpos modificados en CH en los que se introdujeron en el Fc las modificaciones de aminoácidos descritas en el Ejemplo 10(1) a (5) tenían una actividad de unión mejorada al FcRn humano y al FcRn de mono en comparación con el anticuerpo A y los isotipos del anticuerpo A (anticuerpos A2_G2, A_G2AAAS y A_IgG4PE_R409K).

[Ejemplo 12] Preparación de anticuerpos modificados en CH de anticuerpos modificados I100 y D105

Entre los anticuerpos modificados I100 y D105 para los que se confirmó en los Ejemplos 4 y 8 que la degradación del anticuerpo se suprimió en comparación con el anticuerpo A, se prepararon anticuerpos modificados en CH a los que se les añadieron modificaciones de aminoácidos de los siguientes puntos (12-1) a (12-5) para cada uno de los anticuerpos D105N, I100A, I100H e I100Y mediante un método que se describe a continuación.

(12-1) Modificación de aminoácidos en la que M en la posición 252 se sustituye por Y, S en la posición 254 se sustituye por T y T en la posición 256 se sustituye por E de acuerdo con el índice EU

(12-2) Modificación de aminoácidos en la que una CH se sustituye de IgG1

humana a IgG2 humana, M en la posición 252 se sustituye por Y, S en la posición 254 se sustituye por T y T en la posición 256 se sustituye por E de acuerdo con el índice EU

(12-3) Modificación de aminoácidos en la que una CH se sustituye de IgG1 humana a IgG2 humana, M en la posición 428 se sustituye por L y N en la posición 434 se sustituye por S de acuerdo con el índice EU

(12-4) Modificación de aminoácidos en la que una CH de IgG1 humana se sustituye a IgG4PE_R409K humana y V en la posición 308 se sustituye por P de acuerdo con el índice EU

(12-5) Modificación de aminoácidos en la que una CH se sustituye de IgG1 humana a IgG4PE_R409K humana, M en la posición 428 se sustituye por L y N en la posición 434 se sustituye por S de acuerdo con el índice EU

En lo sucesivo en el presente documento, en el anticuerpo D105N, los anticuerpos modificados en CH sometidos a la modificación de aminoácidos de los puntos (12-1) a (12-5) descritos anteriormente se describen como anticuerpos D105N_YTE, D105N_G2_YTE, D105N_G2_LS, D105N_G4PE_R409K_P y D105N_G4PE_R409K_LS, respectivamente. Lo mismo se aplica a otros anticuerpos.

Las secuencias de aminoácidos de las CH de los anticuerpos modificados en CH con las modificaciones de aminoácidos descritas anteriormente (12-1) a (12-5) se exponen en las SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52, respectivamente.

El plásmido preparado en el Ejemplo 10 se sometió a un tratamiento enzimático de restricción con Bstz17I y NheI para preparar un fragmento de vector que excluyera una porción de región variable. Basándose en el fragmento de

plásmido, se sintetizó un fragmento de gen que comprendía una secuencia de nucleótidos que codificaba una secuencia de aminoácidos de una VH de cada uno de los anticuerpos D105N, I100A, I100H e I100Y en FASMAC Corporation, y se introdujo en un vector de expresión apropiado para preparar un plásmido necesario.

- 5 Usando el plásmido obtenido, cada anticuerpo se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 2.

[Ejemplo 13] Medición de la actividad neutralizante de FGF23 del anticuerpo modificado en la región constante de cadena pesada

- 10 Se midió la actividad neutralizante de FGF23 de los 20 tipos de anticuerpos modificados en CH preparados en el Ejemplo 12 de la misma manera que en el Ejemplo 9. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

[Tabla 14]

Nombre del anticuerpo	CI50 (ng/ml)
A	1,2
D105N_YTE	12,4
D105N_G2_YTE	12,4
D105N_G2_LS	12,4
D105N_IgG4PE_R409K_P	13,3
D105N_IgG4PE_R409K_LS	11,7
I100A_YTE	4
I100A_G2_YTE	5
I100A_G2_LS	2,4
I100A_IgG4PE_R409K_P	5,2
I100A_IgG4PE_R409K_LS	6,6

I100H_YTE	11,3
I100H_G2_YTE	8,9
I100H_G2_LS	13
I100H_IgG4PE_R409K_P	14,4
I100H_IgG4PE_R409K_LS	13,1
I100Y_YTE	5,6
I100Y_G2_YTE	2,9
I100Y_G2_LS	4,4
I100Y_IgG4PE_R409K_P	4,1
I100Y_IgG4PE_R409K_LS	2,9

Como se muestra en la Tabla 14, los anticuerpos que comprendían la misma secuencia de aminoácidos en la región variable presentaban el mismo grado de actividad neutralizante de FGF23 incluso cuando se cambiaba la secuencia de aminoácidos en la región constante. A partir de lo anterior, se confirmó que la

5 modificación de aminoácidos de la región constante de cadena pesada en cada anticuerpo no afectaba a la actividad neutralizante de FGF23 del anticuerpo.

[Ejemplo 14] Preparación de anticuerpo modificado con actividad de unión a antígeno mejorada

10 Con respecto a los anticuerpos I100A e I100Y, con el fin de mejorar la actividad de unión a antígeno descrita en las Tablas 2 y 3, se realizó una maduración por afinidad usando un método de presentación en fagos en Abwiz Bio y se obtuvo información sobre la secuencia de aminoácidos de los siguientes puntos (14-1) a (14-9).

(14-1) Una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 51 se sustituye por V, el aminoácido en la posición 54 se sustituye por F, el aminoácido en la posición 55 se sustituye por W, el aminoácido en la posición 57 se sustituye por R, el aminoácido en la posición 58 se sustituye por W y el aminoácido en la posición 100 se sustituye por A en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (H2B11_A, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 38)

(14-2) Una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 50 se sustituye por L, el aminoácido en la posición 54 se sustituye por W, el aminoácido en la posición 55 se sustituye por H, el aminoácido en la posición 57 se sustituye por T, el aminoácido en la posición 58 se sustituye por F y el aminoácido en la posición 100 se sustituye por A en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (J2H2B9_A, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 39)

(14-3) Una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 50 se sustituye por V, el aminoácido en la posición 54 se sustituye por F, el aminoácido en la posición 55 se sustituye por C, el aminoácido en la posición 57 se sustituye por F, el aminoácido en la posición 58 se sustituye por V y el aminoácido en la posición 100 se sustituye por A en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (J2H2E9_A, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 40)

(14-4) Una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 51 se sustituye por L, el aminoácido en la posición 54 se sustituye por W, el aminoácido en la posición 55 se sustituye por T, el aminoácido en la posición 57 se sustituye por Y, el aminoácido

en la posición 58 se sustituye por R y el aminoácido en la posición 100 se sustituye por A en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (2H2E1_A, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 41)

5 (14-5) Una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 54 se sustituye por W, el aminoácido en la posición 55 se sustituye por V, el aminoácido en la posición 57 se sustituye por R, el aminoácido en la posición 58 se sustituye por A y el aminoácido en la posición 100 se sustituye por A en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (2H2E5_A, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 42)

10 (14-6) Una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 51 se sustituye por V, el aminoácido en la posición 54 se sustituye por Y, el aminoácido en la posición 55 se sustituye por R, el aminoácido en la posición 57 se sustituye por K, el aminoácido en la posición 58 se sustituye por W y el aminoácido en la posición 100 se sustituye
15 por Y en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (2H2E8_A, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 43)

(14-7) Una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido en la posición 91 se sustituye por M, el aminoácido en la posición 92 se sustituye por Y, el aminoácido en la posición 94 se
20 sustituye por D el aminoácido en la posición 96 se sustituye por N en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 (L3G12, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 44)

(14-8) Una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido en la posición 28 se sustituye por D, el
25 aminoácido en la posición 29 se sustituye por V, el aminoácido en la posición 31 se

sustituye por T el aminoácido en la posición 34 se sustituye por L en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 (L1H8, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 45)

(14-9) Una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido en la posición 91 se sustituye por L, el aminoácido en la posición 92 se sustituye por Y, el aminoácido en la posición 94 se sustituye por D el aminoácido en la posición 96 se sustituye por D en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 (2L3H7, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 46)

10 [Ejemplo 15] Preparación del anticuerpo modificado

Usando la información de la secuencia de aminoácidos obtenida en el Ejemplo 14 y la secuencia de aminoácidos de la VH descrita en (15-1), se prepararon los anticuerpos modificados A-1 a A-8 descritos en la Tabla 15.

(15-1) Una VH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, en la que el aminoácido en la posición 50 se sustituye por L, el aminoácido en la posición 54 se sustituye por W, el aminoácido en la posición 55 se sustituye por H, el aminoácido en la posición 57 se sustituye por T, el aminoácido en la posición 58 se sustituye por F y el aminoácido en la posición 100 se sustituye por Y en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 (J2H2B9_Y, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 47)

[Tabla 15]

Nombre del anticuerpo	SEQ ID NO de VH	SEQ ID NO de VL	SEQ ID NO de la región constante de cadena pesada
A	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 53

A-1	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 48
A-2	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 48
A-3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 48
A-4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 48
A-5	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 48
A-6	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 48
A-7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 48
A-8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 48

Se preparó un plásmido que comprendía una secuencia de nucleótidos que codificaba la secuencia de aminoácidos de cada anticuerpo de la misma manera que en el Ejemplo 12, y se preparó un anticuerpo a partir del plásmido de la misma manera que en el Ejemplo 2.

[Ejemplo 16] Evaluación del anticuerpo modificado

Los ocho tipos de anticuerpos modificados preparados en el Ejemplo 15 y el anticuerpo A como control se usaron para evaluar la actividad de unión a antígeno, la actividad neutralizante de FGF23 y la estabilidad térmica. Para todos los anticuerpos modificados, se realizaron diversas mediciones diluyendo una muestra usando un tampón de D-PBS (Nacalai Tesque, Inc., Código 14249-24) de manera que una concentración de los mismos se ajustó a 0,5 mg/ml de acuerdo con el propósito.

16-1) Medición de la actividad de unión al antígeno del anticuerpo modificado

La actividad de unión a FGF23 humano se midió de la misma manera que en el Ejemplo 3. Se usó un chip sensor de Proteína A (Global Life Sciences

Technologies Japan K.K., N.º de cat. 29127555) en lugar de un chip sensor CM5 que tenía un anticuerpo anti-IgG humana inmovilizado. La constante de velocidad de asociación (k_a), la constante de velocidad de disociación (k_d) y la constante de disociación [$k_d/k_a = K_D$] calculadas a partir de la constante de velocidad de asociación (k_a) y la constante de velocidad de disociación (k_d) de cada anticuerpo se muestran en la Tabla 16.

[Tabla 16]

Nombre del anticuerpo	Actividad de unión a antígeno K _D (M)	CI50 de la actividad neutralizante de FGF23 (ng/ml) () es el valor del anticuerpo A en el mismo lote de medición	pI (4 grados, PBS)
A-1	8,22E-12	3,5 (3,1)	7,84
A-2	8,08E-12	3,4 (3,1)	7,87
A-3	8,27E-12	2,7 (3,3)	7,72
A-4	8,74E-12	1,9 (3,3)	7,73
A-5	3,61E-12	1,9 (3,3)	7,31
A-6	1,13E-11	3,6 (3,3)	7,35
A-7	1,61E-11	3,2 (3,3)	7,26
A-8	6,70E-12	2,4 (3,3)	7,32
A	8,77E-12	3,3	8,19

En la Tabla 16 se confirmó que todos los anticuerpos A-1 a A-8 tenían una actividad

de unión a antígeno comparable a la del anticuerpo A.

En el Ejemplo 3, la actividad de unión a antígeno del anticuerpo I100A y del anticuerpo I100Y se redujo en comparación con el anticuerpo A. En cualquiera de los anticuerpos A-1 a A-8, el resto de aminoácido en la posición 100 de la VH es A o Y.

5 A partir de lo anterior, se confirmó que, para el anticuerpo A, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 100 de la VH por A o Y reduce la actividad de unión a antígeno del anticuerpo, mientras que la sustitución de restos de aminoácidos adicionales contenidos en los anticuerpos A-1 a A-8 mejora la actividad de unión a antígeno del anticuerpo en la misma medida que la del anticuerpo A.

10 16-2) Medición de la actividad neutralizante de FGF23 humano

La actividad neutralizante de FGF23 humano del anticuerpo modificado se midió de la misma manera que en el Ejemplo 9. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16. A partir de la Tabla 16, se confirmó que todos los anticuerpos modificados tenían una actividad neutralizante de FGF23 comparable
15 a la del anticuerpo A del mismo lote de medición.

En el Ejemplo 9, la actividad neutralizante de FGF23 del anticuerpo I100A y del anticuerpo I100Y fue inferior a la del anticuerpo A. En cualquiera de los anticuerpos A-1 a A-8, el resto de aminoácido en la posición 100 de la VH es A o Y.

20 A partir de lo anterior, se confirmó que, la sustitución del resto de aminoácido en la posición 100 de la VH por A o Y en el anticuerpo A reduce la actividad neutralizante de FGF23 del anticuerpo, mientras que la sustitución de restos de aminoácidos adicionales contenidos en los anticuerpos A-1 a A-8 mejora la actividad neutralizante del anticuerpo en la misma medida que la del anticuerpo A.

16-3) Confirmación del punto isoeléctrico

25 El punto isoeléctrico de cada anticuerpo se determinó usando un sistema

iCE3 (Protein Simple). Se usó Pharmalyte 3-10 para IEF (Global Life Sciences Technologies Japan K.K., N.º de cat. N° 17-0456-01) como vehículo de medición, se usó marcador de pl 5.12 (Protein Simple, N.º de cat. 102224) como marcador ácido y se usó marcador de pl 9.77 (Protein Simple, N.º de cat. 102219) como
5 marcador básico. El método de medición se basó en un protocolo convencional.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16. En la Tabla 16 se confirmó que todos los anticuerpos modificados tenían un pl reducido en comparación con el anticuerpo A.

16-4) Confirmación de la relación de supresión de la degradación del
10 anticuerpo

Las relaciones de supresión de la degradación se confirmaron para el anticuerpo A-1 y el anticuerpo A-8 de la misma manera que en el Ejemplo 4. En el presente Ejemplo, se dejó reposar cada anticuerpo a 40 grados durante dos semanas y se confirmó la degradación del anticuerpo usando un sistema de
15 electroforesis Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) y un kit Agilent Protein 230 (Agilent Technologies, Inc., Cat. 5067-1517). Con respecto a la preparación de la muestra y las condiciones de migración, los experimentos se realizaron de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. En el electroferograma obtenido, se detectó una banda de la cadena H del anticuerpo a 63 kDa y se detectó una banda
20 correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo a aproximadamente 55 kDa. En las Tablas 17 y 18 se muestra una relación de área de pico (%) de la banda correspondiente al producto de degradación del anticuerpo y una relación (%) de una relación de área de pico de la banda de degradación de cada anticuerpo con respecto al anticuerpo A.

[Tabla 17]

Nombre del anticuerpo	Relación de área de pico de la banda de degradación (%)	Relación de la relación de área de pico de la banda de degradación (%)
A	39,2	100
A-1	14,6	37,2
A-2	14,8	37,8
A-3	15	38,3
A-4	7,6	19,4
A-5	26,8	68,4
A-6	7,7	19,6

[Tabla 18]

Nombre del anticuerpo	Relación de área de pico de la banda de degradación (%)	Relación de la relación de área de pico de la banda de degradación (%)
A	39,4	100
A-7	9,8	24,9
A-8	5,4	13,7

Como se muestra en las Tablas 17 y 18, se confirmó que la degradación se suprimió en todos los anticuerpos A-1 a A-8 en comparación con el anticuerpo A.

5 16-5) Confirmación de la estabilidad térmica

La estabilidad térmica de seis tipos de anticuerpos, es decir, el anticuerpo A, el anticuerpo A_YTE, el anticuerpo A-1, el anticuerpo A-3, el anticuerpo A-5 y el anticuerpo A-8, se evaluó de la misma manera que se describe en el Ejemplo 5. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19.

10 [Tabla 19]

Nombre del anticuerpo	Fab (grado)	CH2 o Fab+CH2 (grado)	CH3 (grado)
A	66,9	69,7 (CH2)	82,9
A_YTE	65,7	70,2 (CH2)	83,0
A-1		70,1 (Fab+CH2)	82,6
A-3		69,4 (Fab+CH2)	82,9
A-5	64,6	70,8 (CH2)	82,6

A-8	64,2	70,9 (CH2)	82,8
-----	------	------------	------

Como se muestra en la Tabla 19, no hubo diferencias en la estabilidad térmica de cada sitio del anticuerpo entre el anticuerpo A y el anticuerpo A_YTE. Por otro lado, se confirmó que los anticuerpos A-1 y A-3, que comprenden la misma secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada que el anticuerpo A_YTE, tenían una estabilidad térmica de Fab mejorada en aproximadamente 3 grados en comparación con el anticuerpo A y el anticuerpo A_YTE.

[Ejemplo 17] Preparación del anticuerpo A-9 y del anticuerpo A-10

El anticuerpo A-9 y el anticuerpo A-10 mostrados en la Tabla 20 se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 2 (en lo sucesivo en el presente documento, el anticuerpo A-9 y el anticuerpo A-10 pueden denominarse anticuerpos modificados).

Como vector de expresión de la cadena L para el anticuerpo A-9, se usó un vector pcDNA3.4 (Invitrogen) en lugar del vector pCI utilizado en el Ejemplo 2. Tanto para el anticuerpo A-9 como para el anticuerpo A-10, un vector de expresión de la cadena L y un vector de expresión de la cadena H se mezclaron en una relación de 1:1 y se transfectaron en células.

[Tabla 20]

Nombre del anticuerpo	SEQ ID NO de VH	SEQ ID NO de VL	SEQ ID NO de la región constante de cadena pesada
A-9	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 48
A-10	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 48

Para la VL del anticuerpo A-9, se realizó una maduración por afinidad del anticuerpo

I100A usando un método de presentación en fagos en Abwiz Bio y se obtuvo la siguiente información sobre la secuencia de aminoácidos.

Una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido en la posición 92 se sustituye por W, el aminoácido en la posición 94 se sustituye por D el aminoácido en la posición 96 se sustituye por D en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 58)

Como la VL del anticuerpo A-10, se diseñó y se usó la siguiente VL.

Una VL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, en la que el aminoácido en la posición 92 se sustituye por Y, el aminoácido en la posición 94 se sustituye por D el aminoácido en la posición 96 se sustituye por D en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 59)

[Ejemplo 18] Evaluación del anticuerpo modificado

Los dos tipos de anticuerpos modificados preparados en el Ejemplo 17 y el anticuerpo A como control se usaron para evaluar la actividad de unión a antígeno, la actividad neutralizante de FGF23 y la estabilidad térmica. Para todos los anticuerpos modificados, se realizaron diversas mediciones diluyendo una muestra usando un tampón de D-PBS (Nacalai Tesque, Inc., Código 14249-24) de manera que una concentración de los mismos se ajustó a 1 mg/ml de acuerdo con el propósito.

18-1) Medición de la actividad de unión al antígeno del anticuerpo modificado

La actividad de unión a FGF23 humano se midió de la misma manera que en el Ejemplo 16. La constante de velocidad de asociación (k_a), la constante de velocidad de disociación (k_d) y la constante de disociación [$k_d/k_a = K_D$]

calculadas a partir de la constante de velocidad de asociación (k_a) y la constante de velocidad de disociación (k_d) de cada anticuerpo se muestran en la Tabla 21.

[Tabla 21]

Nombre del anticuerpo	Actividad de unión a antígeno KD (M)	CI50 de la actividad neutralizante de FGF23 (ng/ml) () es el valor del anticuerpo A en el mismo lote de medición	pI (4 grados, PBS)
A-9	6,87E-12	1,0 (3,2)	7,69
A-10	2,02E-11	1,5 (2,8)	7,53
A	1,44E-11	3,2	8,19

5 Se confirmó a partir de la Tabla 21 que el anticuerpo A-9 tenía una actividad de unión a antígeno dos veces mayor que la del anticuerpo A y el anticuerpo A-10 tenía una actividad de unión a antígeno comparable a la del anticuerpo A. En el Ejemplo 3, el anticuerpo I100A y el anticuerpo I100Y tenían una actividad de unión a antígeno reducida en comparación con el anticuerpo A. En los anticuerpos A-9 y A-10, los
10 restos de aminoácidos en la posición 100 de la VH son A e Y, respectivamente.

A partir de lo anterior, se confirmó que la sustitución del resto de aminoácido en la posición 100 de la VH del anticuerpo A por A o Y reduce la actividad de unión a antígeno del anticuerpo, mientras que la sustitución de restos de aminoácidos adicionales contenidos en el anticuerpo A-9 y en el anticuerpo I100Y mejora la
15 actividad de unión del anticuerpo para que sea igual o superior a la del anticuerpo

A.

18-2) Medición de la actividad neutralizante de FGF23 humano

La actividad neutralizante de FGF23 humano del anticuerpo modificado se midió de la misma manera que en el Ejemplo 9. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21. Se confirmó a partir de la Tabla 21 que el anticuerpo A-9 tenía una actividad neutralizante de FGF23 tres veces mayor que la del anticuerpo A y que el anticuerpo A-10 tenía una actividad neutralizante de FGF23 dos veces mayor que la del anticuerpo A.

En el Ejemplo 9, la actividad neutralizante de I100A e I100Y se redujo en comparación con el anticuerpo A. En los anticuerpos A-9 y A-10, los restos de aminoácidos en la posición 100 de la VH son A e Y, respectivamente.

A partir de lo anterior, se confirmó que la sustitución del resto de aminoácido en la posición 100 de la VH del anticuerpo A por A o Y reduce la actividad neutralizante de FGF23 del anticuerpo, mientras que la sustitución de restos de aminoácidos adicionales contenidos en el anticuerpo A-9 y el anticuerpo A-10 mejora la actividad neutralizante de FGF23 del anticuerpo para que sea igual o mayor que la del anticuerpo A.

[Ejemplo 19] Confirmación de la relación de supresión de la degradación del anticuerpo modificado

La relación de supresión de la degradación se confirmó usando cuatro tipos de anticuerpos modificados, es decir, el anticuerpo A-1, el anticuerpo A-3, el anticuerpo A-5 y el anticuerpo A-8, y el anticuerpo A como control.

El anticuerpo utilizado en el presente Ejemplo se preparó insertando una secuencia de gen diana en un vector de expresión de mamífero e introduciendo el vector en células CHO, y después obteniendo anticuerpo purificado a partir de un

sobrenadante de cultivo de células de mamífero mediante purificación por afinidad usando MabSelect SuRe (Global Life Sciences Technologies Japan K.K.) y cromatografía de intercambio catiónico. Usando NAP25 (Global Life Sciences Technologies Japan K.K.), el disolvente de una solución de anticuerpo se reemplazó
 5 por disolventes a pH 4 y pH 4,5 que contenían L-glutamato de sodio 10 mM, D-sorbitol 262 mM y Polisorbato 80 0,05 mg/ml, y la concentración de proteínas se ajustó a 1 mg/ml.

La solución de anticuerpo obtenida se dejó reposar a 40 grados durante un mes y a 25 grados durante tres meses, y después se congeló a -80 grados. Después
 10 de descongelar la solución de anticuerpo, la degradación del anticuerpo se confirmó usando un sistema de análisis biofarmacéutico PA800Plus (SCIEX). Las condiciones básicas tales como la preparación de la muestra y el análisis se realizaron de acuerdo con el método de Óscar Salas-Solano *et al.* (2006, *Anal. Chem.*: 6583-6594), con las modificaciones apropiadas.

15 Con respecto a una relación de área de pico (%) de una banda correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo, los resultados a pH 4,5 se muestran en la Tabla 22 y los resultados a pH 5,0 se muestran en la Tabla 23. Una muestra congelada a -80 grados inmediatamente después del reemplazo del disolvente se designó como "Inicial", una muestra dejada en reposo a 40 grados
 20 durante un mes y después congelada a -80 grados se designó como "1M 40 °C" y una muestra dejada en reposo a 25 grados durante tres meses y después congelada a -80 grados se designó como "3M 25 °C". Todas las muestras se fundieron en las mismas condiciones y después se midieron.

[Tabla 22]

Nombre del anticuerpo	Relación de área de pico de la banda de degradación Inicial (%)	Relación de área de pico de la banda de degradación 1M 40 °C (%)	Relación de área de pico de la banda de degradación 3M 25 °C (%)
A	2,5	47,2	36,8
A-1	0,4	17,7	9,3
A-3	0,3	14,2	6,7
A-5	0,7	30,8	18,6
A-8	0,1	5,8	1,3

[Tabla 23]

Nombre del anticuerpo	Relación de área de pico de la banda de degradación Inicial (%)	Relación de área de pico de la banda de degradación 1M 40 °C (%)	Relación de área de pico de la banda de degradación 3M 25 °C (%)
A	2,5	19,6	16,8
A-1	0,4	9,0	5,4
A-3	0,3	6,1	3,0
A-5	0,7	15,1	9,4
A-8	0,1	3,5	0,9

Como se muestra en las Tablas 22 y 23, como en el Ejemplo 16, se confirmó que,

incluso en condiciones de tampón de pH 4,5 y pH 5,0 y de almacenamiento a 40 grados durante un mes y a 25 grados durante tres meses, la degradación del anticuerpo A-1, el anticuerpo A-3, el anticuerpo A-5 y el anticuerpo A-8 se suprimió en todos los casos en comparación con el anticuerpo A.

5 [Ejemplo 20] Confirmación de la relación de supresión de la degradación del anticuerpo modificado

Se confirmó una relación de supresión de la degradación usando dos tipos de anticuerpos modificados preparados en el Ejemplo 17 y el anticuerpo A como control.

10 El anticuerpo A y el anticuerpo A-1 utilizados en el presente Ejemplo se prepararon insertando una secuencia de gen diana en un vector de expresión de mamífero e introduciendo el vector en células CHO, y después obteniendo anticuerpo purificado a partir de un sobrenadante de cultivo de células de mamífero mediante purificación por afinidad usando MabSelect SuRe (Global Life Sciences Technologies Japan K.K.) y cromatografía de intercambio catiónico. Usando NAP25
15 (Global Life Sciences Technologies Japan K.K.), el disolvente de la solución de anticuerpo se reemplazó por un disolvente de pH 4 y pH 4,5 que contenía L-glutamato de sodio 10 mM, D-sorbitol 262 mM y Polisorbato 0,05 mg/ml, y la concentración de proteínas se ajustó a 1 mg/ml.

20 La solución de anticuerpo obtenida se dejó reposar a 40 grados durante un mes y después se confirmó la degradación del anticuerpo usando un sistema de electroforesis en microchip LabChip (PerkinElmer) y un kit Protein Clear Reagent Kit (PerkinElmer, Cat. CLS960014). Con respecto a la preparación de la muestra y las condiciones de migración, los experimentos se realizaron de acuerdo con el
25 protocolo adjunto al kit.

Con respecto a la relación de área de pico (%) de la banda correspondiente a un producto de degradación del anticuerpo en los resultados de la medición en condiciones reductoras, los resultados a pH 4,0 se muestran en la Tabla 24, los resultados a pH 4,5 se muestran en la Tabla 25 y los resultados a pH 5,0 se muestran en la Tabla 26.

[Tabla 24]

Nombre del anticuerpo	Relación de área de pico de la banda de degradación (%)	Relación de la relación de área de pico de la banda de degradación (%)
A	32,7	100
A-1	11,2	34,2
A-9	9,2	28,0
A-10	5,1	15,6

[Tabla 25]

Nombre del anticuerpo	Relación de área de pico de la banda de degradación (%)	Relación de la relación de área de pico de la banda de degradación (%)
A	20,7	100
A-1	7,1	34,4
A-9	5,4	26,0
A-10	3,2	15,3

[Tabla 26]

Nombre del anticuerpo	Relación de área de pico de la banda de degradación (%)	Relación de la relación de área de pico de la banda de degradación (%)
A	8,2	100
A-1	3,5	42,7
A-9	2,6	32,1
A-10	1,7	21,0

Como se muestra en las Tablas 24, 25 y 26, se confirmó que la degradación del anticuerpo A-9 y del anticuerpo A-10 se suprimió en comparación con el anticuerpo A en condiciones de tampón de pH 4,0, pH 4,5 o pH 5,0 y condiciones de almacenamiento de 40 grados durante un mes.

[Ejemplo 21]

Se midió la concentración (mg/d) de fósforo inorgánico en suero para confirmar la sostenibilidad de una acción farmacológica cuando se administró un anticuerpo de ensayo por vía subcutánea en una dosis única a macacos cangrejeros macho.

El anticuerpo A8 (1,8 mg/kg) se administró por vía subcutánea como anticuerpo de ensayo. Se recogió sangre a lo largo de 56 días después de la administración y se midió la concentración de fósforo inorgánico en suero en cada punto temporal. La concentración de fósforo se midió mediante el método PNP-XDH

usando un clizer (JCA-BM6070).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 27. Después de la administración del anticuerpo A-8, la concentración de fósforo inorgánico en suero aumentó a partir del Día 3 después de la administración y siguió siendo superior a la concentración de fósforo inorgánico en el momento basal (concentración de fósforo el Día 0 en la Tabla 27) incluso el Día 56 después de la administración.

[Tabla 27]

		A-8 (1,8 mg/kg)
Días	-7	5,54±0,90
	-3	5,53±0,65
	0	5,05±0,86
	3	10,4±0,77
	7	10,9±0,64
	10	10,7±0,84
	14	10,1±0,82
	17	9,02±0,79
	21	9,18±0,87
	24	9,14±0,74
	28	8,28±0,64
	35	8,61±0,82
	42	7,9±1,11
	49	7,46±1,17
	56	7,37±0,74

Por otro lado, después de administrar burosumab (KRN23, Crysvida) por vía subcutánea en una dosis única de 3 mg/kg a macacos cangrejeros, la concentración de fósforo inorgánico en suero aumentó a partir del Día 3 después de la administración, y el Día 42 después de la administración, la concentración de fósforo inorgánico disminuyó al mismo nivel que la del grupo de administración de medio y el valor basal (administración el Día 0) (Formulario de Entrevista de Inyección Subcutánea de Crysvida revisado en diciembre de 2021 (quinta edición) P44).

En consecuencia, se demostró que el anticuerpo A-8 tenía una duración de la concentración de fósforo inorgánico en suero en macacos cangrejeros superior a la de burosumab.

El anticuerpo A-1 y el anticuerpo A-5 se administraron por vía subcutánea a 3 mg/kg a macacos cangrejeros, y la concentración de fósforo inorgánico en suero se midió de la misma manera que en el caso anterior. Como resultado, en estos anticuerpos, la concentración de fósforo inorgánico en suero aumentó a partir del Día 3 después de la administración, y la concentración de fósforo inorgánico disminuyó hasta el valor basal el Día 42 después de la administración, como en el caso del burosumab.

La secuencia de aminoácidos en la región constante de cadena pesada del burosumab se representa por la SEQ ID NO: 53 y la secuencia de aminoácidos en la región constante de cadena pesada de cada uno de entre el anticuerpo A-1, el anticuerpo A-5 y el anticuerpo A-8 se representa por la SEQ ID NO: 48. Entre el anticuerpo A-1, el anticuerpo A-5 y el anticuerpo A-8, que tienen la misma secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada, sólo en el anticuerpo A-8, la concentración de fósforo inorgánico en suero se mantuvo durante más tiempo

que la de burosumab en macacos cangrejeros.

En consecuencia, se sugirió que la duración de la concentración de fósforo inorgánico en suero en el anticuerpo A-8 es mayor que en el burosumab, el anticuerpo A-1 o el anticuerpo A-5, no debido a la diferencia de secuencia de aminoácidos en la región constante de cadena pesada, sino a la diferencia de

5 secuencia de aminoácidos en la región variable.

[Ejemplo 22]

La concentración (mg/dl) de fósforo inorgánico en suero se midió de la misma manera que en el Ejemplo 21. Se administraron por vía subcutánea el anticuerpo A-9 y el anticuerpo A-10 (3,0 mg/kg) como anticuerpos de ensayo. Se recogió sangre

10 a lo largo de 57 días después de la administración y se midió la concentración de fósforo inorgánico en suero en cada punto temporal.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 28.

[Tabla 28]

		A-9	A-10
Días	0	6,37±0,21	5,83±0,67
	1	6,27±0,31	5,60±0,35
	4	11,4±0,95	10,5±0,15
	8	11,1±1,80	10,5±0,97
	11	10,9±0,75	10,4±1,04
	15	9,80±1,05	9,20±1,73
	18	8,77±1,42	7,07±1,25
	22	9,90±0,98	8,40±1,71
	25	9,40±0,66	7,67±1,00

	29	9,53±0,81	7,60±0,92
	32	8,90±0,92	7,93±0,49
	36	8,03±0,49	6,47±1,07
	39	8,67±0,68	7,20±0,60
	43	8,37±1,45	7,17±0,87
	46	7,47±1,17	7,67±0,95
	50	8,97±0,55	7,23±1,12
	53	7,00±1,55	6,33±0,68
	57	7,67±0,74	6,10±1,04

Como se muestra en la Tabla 28, como en el caso del anticuerpo A-8 del Ejemplo 22, después de la administración del anticuerpo A-9 y el anticuerpo A-10, la concentración de fósforo inorgánico en suero aumentó a partir del Día 3 después de la administración y siguió
5 siendo superior a la concentración de fósforo inorgánico en el momento basal (concentración de fósforo el Día 0 en la Tabla 28) incluso el Día 57 después de la administración.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de cadena pesada del anticuerpo A-9 y del anticuerpo A-10 son las mismas que las secuencias
10 de aminoácidos de las regiones constantes de cadena pesada del anticuerpo A-1, el anticuerpo A-5 y el anticuerpo A-8, y son la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 48.

En consecuencia, se sugirió que la duración de la concentración de fósforo inorgánico en suero en el anticuerpo A-9 y el anticuerpo A-10 es mayor que en el
15 burosumab, el anticuerpo A-1 o el anticuerpo A-5, no debido a la diferencia de

secuencia de aminoácidos en la región constante de cadena pesada, sino a la diferencia de secuencia de aminoácidos en la región variable como en el anticuerpo A-8.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a realizaciones específicas, es evidente para los expertos en la materia que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención. La presente solicitud se basa en una solicitud de patente japonesa (documento JP2022-128011A) presentada el 10 de agosto de 2022 y una solicitud de patente japonesa (documento JP2022-164256A) presentada el 12 de octubre de 2022, cuya divulgación se incorpora por la presente como referencia en el presente documento en su totalidad. Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan en su totalidad.

TEXTO LIBRE DE LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo A

15 SEQ ID NO: 2: secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo A

SEQ ID NO: 3: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100A

SEQ ID NO: 4: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100L

SEQ ID NO: 5: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100V

SEQ ID NO: 6: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100Y

20 SEQ ID NO: 7: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100W

SEQ ID NO: 8: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100T

SEQ ID NO: 9: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100S

SEQ ID NO: 10: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100R

SEQ ID NO: 11: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100Q

25 SEQ ID NO: 12: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100N

	SEQ ID NO: 13: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100M
	SEQ ID NO: 14: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100K
	SEQ ID NO: 15: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100H
	SEQ ID NO: 16: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100G
5	SEQ ID NO: 17: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100F
	SEQ ID NO: 18: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100E
	SEQ ID NO: 19: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo I100D
	SEQ ID NO: 20: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105A
	SEQ ID NO: 21: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105E
10	SEQ ID NO: 22: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105F
	SEQ ID NO: 23: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105G
	SEQ ID NO: 24: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105H
	SEQ ID NO: 25: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105I
	SEQ ID NO: 26: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105K
15	SEQ ID NO: 27: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105L
	SEQ ID NO: 28: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105M
	SEQ ID NO: 29: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105P
	SEQ ID NO: 30: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105Q
	SEQ ID NO: 31: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105R
20	SEQ ID NO: 32: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105V
	SEQ ID NO: 33: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105W
	SEQ ID NO: 34: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105Y
	SEQ ID NO: 35: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105T
	SEQ ID NO: 36: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105N
25	SEQ ID NO: 37: secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo D105S

- SEQ ID NO: 38: secuencia de aminoácidos de H2B11_A
- SEQ ID NO: 39: secuencia de aminoácidos de J2H2B9_A
- SEQ ID NO: 40: secuencia de aminoácidos de J2H2E9_A
- SEQ ID NO: 41: secuencia de aminoácidos de 2H2E1_A
- 5 SEQ ID NO: 42: secuencia de aminoácidos de 2H2E5_A
- SEQ ID NO: 43: secuencia de aminoácidos de 2H2E8_Y
- SEQ ID NO: 44: secuencia de aminoácidos de L3G12
- SEQ ID NO: 45: secuencia de aminoácidos de L1H8
- SEQ ID NO: 46: secuencia de aminoácidos de 2L3H7
- 10 SEQ ID NO: 47: secuencia de aminoácidos de J2H2B9_Y
- SEQ ID NO: 48: secuencia de aminoácidos de la CH de YTE
- SEQ ID NO: 49: secuencia de aminoácidos de la CH de G2_YTE
- SEQ ID NO: 50: secuencia de aminoácidos de la CH de G2_LS
- SEQ ID NO: 51: secuencia de aminoácidos de la CH de G4PE_R409K_P
- 15 SEQ ID NO: 52: secuencia de aminoácidos de la CH de G4PE_R409K_LS
- SEQ ID NO: 53: secuencia de aminoácidos de la región constante de G1
- SEQ ID NO: 54: secuencia de aminoácidos del cuerpo de His-tag del dominio extracelular de FcRn humano
- SEQ ID NO: 55: secuencia de aminoácidos de la $\beta 2$ microglobulina humana
- 20 SEQ ID NO: 56: secuencia de aminoácidos del cuerpo de His-tag del dominio extracelular de FcRn de macaco cangrejero
- SEQ ID NO: 57: secuencia de aminoácidos de la $\beta 2$ microglobulina de macaco cangrejero
- SEQ ID NO: 58: secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo A-9
- 25 SEQ ID NO: 59: secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo A-10

RESUMEN

ANTICUERPO ANTI-FGF23 Y FRAGMENTO DE DICHO ANTICUERPO

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une al FGF23. El anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (en lo sucesivo en el presente documento, descrita como VH) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (en lo sucesivo en el presente documento, 10 descrita como VL) que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2. Al menos el resto de aminoácido en la posición 100 o el resto de aminoácido en la posición 105 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 en la VH se sustituye por otro resto de aminoácido.