



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0049545
(43) 공개일자 2025년04월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61P 19/08 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7003983
(22) 출원일자(국제) 2023년08월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월07일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/029098
(87) 국제공개번호 WO 2024/034638
국제공개일자 2024년02월15일
(30) 우선권주장
JP-P-2022-128011 2022년08월10일 일본(JP)
JP-P-2022-164256 2022년10월12일 일본(JP)

(71) 출원인
교와 기린 가부시킴가이샤
일본국 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1초메 9방 2고
(72) 발명자
미야기, 히카루
일본 1000004 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1초메 9방 2고 교와 기린 가부시킴가이샤 혼샤 내
오아시, 다이지
일본 1000004 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1초메 9방 2고 교와 기린 가부시킴가이샤 혼샤 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장수길, 이유리, 이석재

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 항FGF23 항체 또는 해당 항체 단편

(57) 요약

본 발명은, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(이하, VH라 기재) 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(이하, VL라 기재)을 포함하는 항체에 있어서, 적어도 VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기 또는 105번째의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환된 FGF23에 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

나카지마, 겐타

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방

2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

오가사와라, 사리

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방

2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(이하, VH라 기재) 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(이하, VL라 기재)을 포함하는 항체에 있어서, 적어도 VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기 또는 105번째의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환된, FGF23에 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가, 알라닌 잔기, 아스파라긴 잔기, 글리신 잔기, 티로신 잔기, 아르기닌 잔기, 아스파르트산 잔기, 히스티딘 잔기, 트립토판 잔기 및 메티오닌 잔기에서 선택되는 1의 아미노산 잔기로 치환된, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가, 알라닌 잔기 또는 티로신 잔기로 치환된, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 105번째의 아미노산 잔기가, 알라닌 잔기, 페닐알라닌 잔기, 글리신 잔기, 히스티딘 잔기, 이소류신 잔기, 리신 잔기, 류신 잔기, 메티오닌 잔기, 프롤린 잔기, 글루타민 잔기, 아르기닌 잔기, 발린 잔기, 트립토판 잔기, 티로신 잔기, 트레오닌 잔기, 아스파라긴 잔기 및 세린 잔기에서 선택되는 1의 아미노산 잔기로 치환된, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 하기 (a1) 내지 (a4)에서 선택되는 1의 치환을 더 포함하는, 항체 또는 해당 항체 단편.

(a1) VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 50번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환, 54번째의 아미노산 잔기의 트립토판 잔기로의 치환, 55번째의 아미노산 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환, 57번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 58번째의 아미노산 잔기의 페닐알라닌 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환,

(a2) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 91번째의 아미노산 잔기의 메티오닌 잔기 또는 류신 잔기로의 치환, 92번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기로의 치환, 94번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 및 96번째의 아미노산 잔기의 아스파라긴 잔기 또는 아스파르트산 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환,

(a3) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 28번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 29번째의 아미노산 잔기의 발린 잔기로의 치환, 31번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 34번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환, 그리고

(a4) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 92번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기 또는 트립토판 잔기로의 치환, 94번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 및 96번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 하기 (c1) 내지 (c10)에서 선택되는 1인, 항체 또는 해당 항체 단편.

(c1) 서열 번호 39로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함

하는 VL을 포함하는 항체,

(c2) 서열 번호 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

(c3) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

(c4) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

(c5) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

(c6) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

(c7) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

(c8) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

(c9) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체, 그리고

(c10) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 서브클래스가 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 Fc 영역이 하기 (d1) 내지 (d5)에서 선택되는 1인, 항체 또는 해당 항체 단편.

(d1) EU 인덱스 252번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기로의 치환, 254번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 256번째의 아미노산 잔기의 글루탐산 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,

(d2) EU 인덱스 428번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환, 및 434번째의 아미노산 잔기의 세린 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,

(d3) EU 인덱스 308번째의 아미노산 잔기의 프롤린 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,

(d4) EU 인덱스 250번째의 아미노산 잔기의 글루타민 잔기로의 치환, 및 428번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역, 그리고

(d5) EU 인덱스 434번째의 아미노산 잔기의 알라닌 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 중쇄 정상 영역이 서열 번호 48, 49, 50, 51 또는 52로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 단편이, Fab, Fab', (Fab')₂, scFv, 디아바디(Diabody), dsFv 및 CDR을 포함하는 펩티드에서 선택되는 1인, 항체 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 염기 서열을 갖는 핵산.

청구항 12

제11항에 기재된 핵산을 함유하는 벡터.

청구항 13

제12항에 기재된 벡터를 포함하는 형질 전환 세포.

청구항 14

제13항에 기재된 형질 전환 세포를 배지 중에서 배양하고, 배양물로부터 항체 또는 해당 항체 단편을 채취하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 인간 FGF23 관련 질환의 치료약.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 인간 FGF23 관련 질환의 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 항FGF23 항체 또는 해당 항체 단편에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 섬유아세포 증식 인자(Fibroblast growth factor, 이하 FGF라 기재)는, 구조적으로 유사한 1군의 폴리펩티드 패밀리를 형성하고 있으며, 섬유아세포 증식 활성뿐만 아니라, 증배엽이나 신경 외배엽의 증식이나 혈관 신생 작용, 발생 단계에 있어서의 지아(肢芽) 형성 등 다양한 작용이 보고되어 있다. 또한, 성인에 있어서는, 조직의 유지나 수복, 재생이나 대사 등, 항상성 인자로서도 기능하고 있다(비특허문헌 1).

[0003] 포유 동물에 있어서는, FGF 패밀리에 속하는 단백질로서, 22종류가 알려져 있다. 인간에 있어서는, FGF15를 제외한 FGF1 내지 FGF23의 22종류가 동정되어 있다. 또한, 인간의 FGF 패밀리는 약 150 내지 300아미노산으로 구성되어 있고, 코어 서열의 약 120아미노산은 약 30 내지 60%의 비율로 일치하고 있다. FGF 패밀리는, 분비 단백질로서 발현되고, 수용체 티로신 키나아제에 작용하는 것과, 세포 내 단백질로서 발현되고, 전위 의존적 나트륨 채널이나 기타 분자에 작용하는 것으로 분류된다(비특허문헌 2).

[0004] FGF23은, FGF15와의 상동성을 이용한 데이터베이스 검색 및 PCR법을 사용하여 마우스로부터 동정되고, 그 후 상동성 검색에 의해 동정된 분비 단백질이다. 인간의 FGF23은 251아미노산 잔기의 폴리펩티드로 구성되고, N 말단의 24 잔기가 분비 시그널로서 기능하고, 단백질의 성숙 과정에서 절단되는 것이 알려져 있다(비특허문헌 3).

[0005] FGF23의 산생 과잉에 의한 저인혈증성 질환이 알려져 있고, 원인 유전자가 판명되어 있는 질환과 후천성 질환으로 크게 분류된다(비특허문헌 4). 원인 유전자가 판명되어 있는 FGF23 관련 저인혈증성 질환에서는, 인산-규제 엔도펩티다제 호몰로그(phosphate-regulating endopeptidase homolog), X-linked(PHEX) 변이에 의한 X 염색체 유전성 저인혈증성 골사병(X-linked hypophosphatemic rickets, 이하 XLH라 기재)의 빈도가 가장 높고, 지금까지 다수의 PHEX 유전자 변이가 보고되어 있다(비특허문헌 5).

- [0006] PHEX는 막 1회 관통형 단백질이며, 연골, 골아 세포, 상아 아세포에 많이 발현되고 있는 것이 알려져 있고(비특허문헌 6 및 비특허문헌 7), XLH는 2만명에 1명의 빈도로 발증한다고 되어 있다(비특허문헌 8). 후천성 질환의 예로서는, 종양성 골연화증(tumor-induced osteomalacia: TIO) 등이 알려져 있다.
- [0007] 이들 FGF23 관련 저인혈증성 질환에 대하여, 종래는 대증 요법으로서 활성형 비타민 D3 제제와 경구 인 제제가 사용되어 왔다. 그러나, 장기 투여에 의한 고칼슘혈증 및 뇨중, 신장 석회화, 지속성의 부갑상선 기능 항진증의 합병 등이 일어날 가능성이 있었다(비특허문헌 9 및 비특허문헌 10).
- [0008] FGF23의 과잉 생산이 원인으로 생각되는 상기 질환의 치료약으로서, FGF23 중화 항체인 부로수맙이 알려져 있다.
- [0009] 또한, 그 밖에도, 인간 FGF23 중화 항체로서는, 특허문헌 1에 기재되는 항체 등도 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2008/099969호

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2015 May-Jun; 4(3): 215-66
- (비특허문헌 0002) J Biochem. 2011 Feb; 149(2): 121-30
- (비특허문헌 0003) Biochem Biophys Res Commun. 2000 Oct 22; 277(2): 494-8
- (비특허문헌 0004) Endocrinology. 2011 Jan; 152(1): 4-10
- (비특허문헌 0005) Hum Mutat. 2000; 16(1): 1-6.
- (비특허문헌 0006) J Clin Invest. 2008 Feb 1; 118(2): 722-734
- (비특허문헌 0007) J Clin Invest. 1997 Mar 15; 99(6): 1200-1209.
- (비특허문헌 0008) Orphanet J Rare Dis. 2019; 14: 58
- (비특허문헌 0009) Lancet. 2019 Jun 15; 393(10189): 2416-2427
- (비특허문헌 0010) J Bone Miner Res. 2011 Jul; 26(7): 1381-8

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명자들은, 국제 공개 제2008/099969호에 기재되는 항인간 FGF23 항체의 물성을 예의 검토한 결과, 당해 항체가 저pH에 있어서 안정성이 저하되고, 분해되는 것, 및 당해 분해는, 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 있어서, 99번째의 D와 100번째의 I 사이의 절단에 의한 것임을 알아내었다. 일반적으로, 항체 제제를 고농도화할 때에 항체가 응집되기 쉬운 것, 및 단백질 용액 중의 단백질의 전하의 절댓값이 높아지면, 단백질의 응집이 발생할 가능성을 저감시킬 수 있는 것이 알려져 있다(Arch Pharm Res Vol 35, No 11, 1871-1886, 2012). 그 때문에, 항체 제제를 고농도화할 때에는, 항체의 응집을 억제하는 방법의 하나로서, 당해 제제의 pH를 저하시키는 경우가 있다. 따라서, 항체 제제의 pH를 저하시킬 필요가 있는 경우에는, 검토 가능한 pH의 폭이 넓은 항체가 보다 요망된다.
- [0013] 따라서, 본 발명은, 국제 공개 제2008/099969호에 기재되는 항인간 FGF23 항체보다도 저pH에서의 항체의 분해가 억제된 신규의 항FGF23 항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 과제를 예의 검토한 결과, 본 발명자들은, 국제 공개 제2008/099969호에 기재되는 항FGF23 항체의 VH의 100번째의 아미노산 잔기 또는 105번째의 아미노산 잔기를 치환한 항FGF23 항체에 의해, 상기 과제를 해결할 수 있는 것을 알아내어, 본 발명을 완성시켰다.
- [0015] 1. 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(이하, VH라 기재) 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(이하, VL라 기재)을 포함하는 항체에 있어서, 적어도 VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기 또는 105번째의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환된, FGF23에 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0016] 2. VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가, 알라닌 잔기, 아스파라긴 잔기, 글리신 잔기, 티로신 잔기, 아르기닌 잔기, 아스파르트산 잔기, 히스티딘 잔기, 트립토판 잔기 및 메티오닌 잔기에서 선택되는 1의 아미노산 잔기로 치환된, 상기 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0017] 3. VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가, 알라닌 잔기 또는 티로신 잔기로 치환된, 상기 1 또는 2에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0018] 4. VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 105번째의 아미노산 잔기가, 알라닌 잔기, 페닐알라닌 잔기, 글리신 잔기, 히스티딘 잔기, 이소류신 잔기, 리신 잔기, 류신 잔기, 메티오닌 잔기, 프롤린 잔기, 글루타민 잔기, 아르기닌 잔기, 발린 잔기, 트립토판 잔기, 티로신 잔기, 트레오닌 잔기, 아스파라긴 잔기 및 세린 잔기에서 선택되는 1의 아미노산 잔기로 치환된, 상기 1 내지 3 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0019] 5. 상기 항체가 하기 (a1) 내지 (a4)에서 선택되는 1의 치환을 더 포함하는, 상기 1 내지 4 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0020] (a1) VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 50번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환, 54번째의 아미노산 잔기의 트립토판 잔기로의 치환, 55번째의 아미노산 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환, 57번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 58번째의 아미노산 잔기의 페닐알라닌 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환,
- [0021] (a2) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 91번째의 아미노산 잔기의 메티오닌 잔기 또는 류신 잔기로의 치환, 92번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기로의 치환, 94번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 및 96번째의 아미노산 잔기의 아스파라긴 잔기 또는 아스파르트산 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환,
- [0022] (a3) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 28번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 29번째의 아미노산 잔기의 발린 잔기로의 치환, 31번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 34번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환, 그리고
- [0023] (a4) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 92번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기 또는 트립토판 잔기로의 치환, 94번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 및 96번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환.
- [0024] 6. 상기 항체가 하기 (c1) 내지 (c10)에서 선택되는 1인, 상기 1 내지 5 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0025] (c1) 서열 번호 39로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0026] (c2) 서열 번호 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0027] (c3) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0028] (c4) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0029] (c5) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포

함하는 VL을 포함하는 항체,

- [0030] (c6) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0031] (c7) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0032] (c8) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0033] (c9) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체, 그리고
- [0034] (c10) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체.
- [0035] 7. 상기 항체의 서브클래스가 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4인, 상기 1 내지 6 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0036] 8. 상기 항체의 Fc 영역이 하기 (d1) 내지 (d5)에서 선택되는 1인, 상기 1 내지 7 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0037] (d1) EU 인덱스 252번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기로의 치환, 254번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 256번째의 아미노산 잔기의 글루탐산 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,
- [0038] (d2) EU 인덱스 428번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환, 및 434번째의 아미노산 잔기의 세린 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,
- [0039] (d3) EU 인덱스 308번째의 아미노산 잔기의 프롤린 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,
- [0040] (d4) EU 인덱스 250번째의 아미노산 잔기의 글루타민 잔기로의 치환, 및 428번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역, 그리고
- [0041] (d5) EU 인덱스 434번째의 아미노산 잔기의 알라닌 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역.
- [0042] 9. 상기 항체의 중쇄 정상 영역이 서열 번호 48, 49, 50, 51 또는 52로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 상기 1 내지 8 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0043] 10. 상기 항체 단편이, Fab, Fab', (Fab')₂, scFv, 디아바디(Diabody), dsFv 및 CDR을 포함하는 펩티드에서 선택되는 1인, 상기 1 내지 9 중 어느 1에 기재된 항체 단편.
- [0044] 11. 상기 1 내지 10 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 염기 서열을 갖는 핵산.
- [0045] 12. 상기 11에 기재된 핵산을 함유하는 벡터.
- [0046] 13. 상기 12에 기재된 벡터를 포함하는 형질 전환 세포.
- [0047] 14. 상기 13에 기재된 형질 전환 세포를 배지 중에서 배양하고, 배양물로부터 항체 또는 해당 항체 단편을 채취하는 것을 포함하는, 상기 1 내지 10 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법.
- [0048] 15. 상기 1 내지 10 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 조성물.
- [0049] 16. 상기 1 내지 10 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 인간 FGF23 관련 질환의 치료약.
- [0050] 17. 상기 1 내지 10 중 어느 1에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 인간 FGF23 관련 질환의 치료 방법.

발명의 효과

- [0051] 본 발명의 항FGF23 항체는, 국제 공개 제2008/099969호에 기재되는 항FGF23 항체와 비교하여, 저pH에 있어서의 분해가 억제되어, 우수한 안정성을 나타낸다. 본 발명에 따르면, 항FGF23 항체 또는 해당 항체 단편, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 염기 서열을 갖는 핵산, 해당 핵산을 포함하는 벡터, 해당 벡터를 포함하는

형질 전환 세포, 해당 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법, 및 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 조성물을 제공할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 본 발명은, 국제 공개 제2008/099969호에 기재되는 섬유아세포 증식 인자 23(이하, FGF23이라 기재함)에 결합하는 항체(이하, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(이하, VH라 기재함) 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(이하, VL이라 기재함)을 포함하는 항체라 기재함)에 있어서, 적어도 VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기 또는 105번째의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환된 FGF23에 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편에 관한 것이다(이하, 본 발명의 항체라 기재함).
- [0053] 「FGF23」은, 섬유아세포 증식 인자의 일종으로, 뼈 세포 유래의 호르몬이다. 인간 FGF는, N 말단이 24아미노산의 분비 시그널을 포함하는 251아미노산을 포함하는 단백질이며, 당해 분비 시그널은 단백질의 성숙 과정에서 절단된다. FGF23의 기능으로서는, 주로 신장의 신장 근위 요세관 세포 상의 FGF 수용체 1(이하 FGFR1이라고도 기재함)/ α -Klotho 복합체를 통해, 신장에서의 인의 재흡수와 비타민 D의 활성화를 억제하는 것 등을 들 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서 인간 FGF23으로서는, NCBI 엑세션 번호 NP_065689의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, NCBI 엑세션 번호 NP_065689의 아미노산 서열에 있어서 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 FGF23의 기능을 갖는 폴리펩티드, 혹은 NCBI 엑세션 번호 NP_065689의 아미노산 서열과 60% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 FGF23의 기능을 갖는 폴리펩티드 등을 들 수 있다.
- [0055] NCBI 엑세션 번호 NP_065689로 나타내지는 아미노산 서열에 있어서 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 부위 특이적 변이 도입법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, 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)] 등을 사용하여, 예를 들어 NCBI 엑세션 번호 NP_065689로 나타내지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에, 부위 특이적 변이를 도입함으로써 얻을 수 있다.
- [0056] 결실, 치환 또는 부가되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1개 내지 수십개, 예를 들어 1 내지 20개, 보다 바람직하게는 1개 내지 수개, 예를 들어 1 내지 5개의 아미노산이다.
- [0057] 인간 FGF23을 코딩하는 유전자로서는, NCBI 엑세션 번호 NM_020638의 염기 서열을 들 수 있다. NM_020638의 염기 서열에 있어서, 1 이상의 염기가 결실, 치환 또는 부가된 염기 서열을 포함하고, 또한 인간 FGF23의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자, NM_020638의 염기 서열과 적어도 60% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열, 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열, 또한 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열을 포함하고, 또한 인간 FGF23의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자 또는 NM_020638의 염기 서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건 하에서 하이브리다이징하는 DNA를 포함하고, 또한 인간 FGF23의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 등도 본 발명의 인간 FGF23을 코딩하는 유전자에 함유된다.
- [0058] 엄격한 조건 하에서 하이브리다이징하는 DNA로서는, NM_020638의 염기 서열을 포함하는 DNA를 프로브에 사용한, 콜로니·하이브리다이제이션법, 플라크·하이브리다이제이션법, 서던 블롯·하이브리다이제이션법 또는 DNA 마이크로어레이법 등에 의해 얻어지는 하이브리다이징 가능한 DNA를 말한다.
- [0059] 구체적으로는, 하이브리다이징한 콜로니 혹은 플라크 유래의 DNA, 또는 해당 서열을 갖는 PCR산물 혹은 올리고 DNA를 고정화한 필터 혹은 슬라이드 글래스를 사용하여, 0.7 내지 1.0mol/L의 염화나트륨 존재 하, 65℃에서 하이브리다이제이션법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997), DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)]을 행한 후, 0.1 내지 2배 농도의 SSC 용액(1배 농도의 SSC 용액의 조성은, 150mmol/L 염화나트륨, 15mmol/L 시트르산 나트륨을 포함함)을 사용하여, 65℃ 조건 하에서 필터 또는 슬라이드 글래스를 세정함으로써 동정할 수 있는

DNA를 들 수 있다.

- [0060] 하이브리다이징 가능한 DNA로서는, NM_020638의 염기 서열과 적어도 60% 이상의 상동성을 갖는 DNA, 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖는 DNA, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 DNA를 들 수 있다
- [0061] 진핵 생물의 단백질을 코딩하는 유전자의 염기 서열에는, 종종 유전자의 다형이 확인된다. 본 발명에 있어서 사용되는 유전자에, 이러한 다형에 의해 염기 서열에 소규모의 변이를 발생한 유전자도 본 발명의 인간 FGF23을 코딩하는 유전자에 함유된다.
- [0062] 본 발명에 있어서의 상동성의 수치는, 특별히 명시한 경우를 제외하고, 당업자에게 공지된 상동성 검색 프로그램을 사용하여 산출되는 수치이면 되지만, 염기 서열에 대해서는, BLAST[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]에 있어서 디폴트의 파라미터를 사용하여 산출되는 수치 등, 아미노산 서열에 대해서는, BLAST2[Nucleic Acids Res., 25, 3389(1997), Genome Res., 7, 649(1997)]에 있어서 디폴트의 파라미터를 사용하여 산출되는 수치 등을 들 수 있다.
- [0063] 디폴트의 파라미터로서는, G(Cost to open gap)가 염기 서열인 경우에는 5, 아미노산 서열인 경우에는 11, -E(Cost to extend gap)가 염기 서열인 경우에는 2, 아미노산 서열인 경우에는 1, -q(Penalty for nucleotide mismatch)가 -3, -r(reward for nucleotide match)이 1, -e(expect value)가 10, -W(wordsize)가 염기 서열인 경우에는 11 잔기, 아미노산 서열인 경우에는 3 잔기, -y(Dropoff(X) for blast extensions in bits)가 blastn인 경우에는 20, blastn 이외의 프로그램에서는 7, -X(X dropoff value for gapped alignment in bits)가 15 및 -Z(final X dropoff value for gapped alignment in bits)가 blastn인 경우에는 50, blastn 이외의 프로그램에서는 25이다.
- [0064] NCBI 액세스 번호 NP_065689의 아미노산 서열의 부분 서열을 포함하는 폴리펩티드는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 제작할 수 있다. 구체적으로는, NP_065689의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA의 일부를 결실시켜, 이것을 포함하는 발현 벡터를 도입한 형질 전환체를 배양함으로써 제작할 수 있다. 또한, 상기와 마찬가지로의 방법에 의해, NCBI 액세스 번호 NP_065689의 아미노산 서열에 있어서 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 얻을 수 있다. 또한, NCBI 액세스 번호 NP_065689의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 NCBI 액세스 번호 NP_065689의 아미노산 서열에 있어서 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 혹은 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc)법, t-부틸옥시카르보닐(tBoc)법 등의 화학 합성법에 의해 제조할 수도 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 아미노산의 결실, 치환 또는 부가 등을 아미노산의 개변이라고도 한다.
- [0066] 본 발명의 항체는, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 및 올리고클로날 항체 중 어느 항체도 포함한다. 폴리클로날 항체란, 다른 클론의 항체 산생 세포가 분비하는 항체 분자의 집단을 말한다. 모노클로날 항체란, 단일 클론의 항체 산생 세포가 분비하는 항체이며, 단일 에피토프(항원 결정기라고도 함)를 인식하고, 모노클로날 항체를 구성하는 아미노산 서열(1차 서열)이 균일한 항체를 말한다. 올리고클로날 항체란, 복수의 다른 모노클로날 항체를 혼합한 항체 분자의 집단을 말한다.
- [0067] 본 발명에 있어서의 모노클로날 항체로서는, 하이브리도마에 의해 산생되는 항체, 또는 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환한 형질 전환체에 의해 산생되는 유전자 재조합 항체를 들 수 있다.
- [0068] 에피토프란, 모노클로날 항체가 인식하고, 결합하는, 단일의 아미노산 서열, 아미노산 서열을 포함하는 입체 구조, 번역 후 수식으로 의해 수식된 아미노산 서열 및 해당 아미노산 서열로부터 결정되는 입체 구조 등을 들 수 있다.
- [0069] 번역 후 수식에 의해 수식된 아미노산 서열로서는, 당쇄가 OH 치환기를 갖는 Tyr 및 Ser에 결합한 O결합형 당쇄, NH₂ 치환기를 갖는 Gln 및 Asn에 결합한 N 결합형 당쇄 그리고 황산 분자가 OH 치환기를 갖는 Tyr 및 Ser에 결합한 황산기 등이 결합한 아미노산 서열을 들 수 있다.
- [0070] 본 발명의 항체가 인간 FGF23에 결합하는 것은, 인간 FGF23에 대한 본 발명의 항체 결합성을, ELISA 및 표면 플라즈몬 공명법 등을 사용하여 측정함으로써 확인할 수 있다. 또한, 공지된 면역학적 검출법[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단샤 사이언티픽(1987)] 등을 조합하여 확인할 수도 있다.

- [0071] 본 발명의 항체가 결합하는 인간 FGF23의 아미노산 잔기 또는 에피토프는, 인간 FGF23의 일부 도메인을 결실시킨 결손체, 다른 단백질 유래의 도메인과 치환한 변이체 및 인간 FGF23의 부분 펩티드 단편 등을 사용하여 항체의 결합 실험을 행함으로써 결정할 수 있다.
- [0072] 또는, 본 발명의 항체가 결합하는 인간 FGF23의 아미노산 잔기 또는 에피토프는, 단백질 분해 효소로 소화한 인간 FGF23의 펩티드 단편에 본 발명의 항체를 첨가하고, 기지의 질량 분석법을 사용하여 에피토프 매핑을 행함으로써도 결정할 수 있다.
- [0073] 항체 분자는 이뮤노글로불린(이하, Ig라 표기함)이라고도 칭해지고, 인간 항체는, 분자 구조의 차이에 따라서, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgM의 아이소타입으로 분류된다. 아미노산 서열의 상동성이 비교적 높은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 총칭하여 IgG라고도 한다.
- [0074] 항체 분자는 중쇄(Heavy chain, 이하 H쇄라 기재함) 및 경쇄(Light chain, 이하 L쇄라 기재함)라고 불리는 폴리펩티드로 구성된다. 또한, H쇄는 N 말단측에서 VH, H쇄 정상 영역(CH라고도 표기됨), L쇄는 N 말단측에서 VL, L쇄 정상 영역(CL라고도 표기됨)의 각 영역에 의해, 각각 구성된다. CH는 각 서브클래스에 있어서, α , δ , ϵ , γ 및 μ 쇄가 각각 알려져 있다. CH는 또한, N 말단측에서 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인의 각 도메인에 의해 구성된다. 도메인이란, 항체 분자의 각 폴리펩티드를 구성하는 기능적인 구조 단위를 말한다. 또한, CH2 도메인과 CH3 도메인을 아울러 Fc 영역 또는 간단히 Fc라고 말한다. CL은, C_λ쇄 및 C_κ쇄가 알려져 있다.
- [0075] 본 발명에 있어서의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 Fc 영역은, EU 인덱스[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)](이하, 간단히 EU 인덱스라 기재함)에 의해, N 말단으로부터의 아미노산 잔기의 번호로 특정할 수 있다. 구체적으로는, CH1은 EU 인덱스 118 내지 215번의 아미노산 서열, 힌지는 EU 인덱스 216 내지 230번의 아미노산 서열, CH2는 EU 인덱스 231 내지 340번의 아미노산 서열, CH3은 EU 인덱스 341 내지 447번의 아미노산 서열로 각각 특정된다.
- [0076] 본 발명의 항체로서는, 특히 유전자 공학적으로 제작된 재조합 마우스 항체, 재조합 래트 항체, 재조합 래빗 항체, 인간형 키메라 항체(이하, 간단히 키메라 항체라고도 약기함), 인간화 항체(인간형 상보성 결정 영역 CDR 이식 항체라고도 함) 및 인간 항체 등의 유전자 재조합 항체도 포함된다. 또한, 본 발명의 항체에는, 다른 2종류의 항체 유래의 H쇄(또는 VH)와 L쇄(또는 VL)를 재조합하여 제작되는 유전자 재조합 항체도 포함된다. 다른 2종류의 항체는, 하이브리도마 유래의 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체 중 어느 것이어도 된다. 또한 본 발명의 항체로서는, 상술한 유전자 재조합 항체를 제작하는데 있어서, 적당한 아미노산 잔기를 치환한 유전자 재조합 항체도 포함된다.
- [0077] 키메라 항체란, 인간 이외의 동물(비인간 동물)의 항체의 VH 및 VL과, 인간 항체의 CH 및 CL를 포함하는 항체를 의미한다. 비인간 동물로서는, 마우스, 래트, 햄스터, 래빗 등, 하이브리도마를 제작하는 것이 가능하면, 어떠한 것도 사용할 수 있다.
- [0078] 하이브리도마란, 비인간 동물에 항원을 면역하여 취득된 B 세포와, 마우스 등에 유래하는 미엘로마 세포를 세포 융합시켜 얻어지는, 원하는 항원 특이성을 갖는 모노클로날 항체를 산생하는 세포를 말한다. 따라서, 하이브리도마가 산생하는 항체의 가변 영역은, 비인간 동물 항체의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0079] 키메라 항체는, 모노클로날 항체를 생산하는 비인간 동물 세포 유래의 하이브리도마로부터, 해당 모노클로날 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA를 취득하고, 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA를 갖는 동물 세포용 발현 벡터에 각각 삽입하여 인간형 키메라 항체 발현 벡터를 구축하고, 동물 세포에 도입함으로써 발현시켜, 제조할 수 있다.
- [0080] 인간화 항체란, 비인간 동물 항체의 VH 및 VL의 CDR의 아미노산 서열을 인간 항체의 VH 및 VL이 대응하는 CDR에 이식한 항체를 말한다. VH 및 VL의 CDR 이외의 영역은 프레임워크 영역(이하, FR라 표기함)이라고 칭해진다.
- [0081] 인간화 항체는, 비인간 동물 항체의 VH의 CDR의 아미노산 서열과 임의의 인간 항체의 VH의 FR의 아미노산 서열을 포함하는 VH의 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA와, 비인간 동물 항체의 VL의 CDR의 아미노산 서열과 임의의 인간 항체의 VL의 FR의 아미노산 서열을 포함하는 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA를 구축하고, 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA를 갖는 동물 세포용 발현 벡터에 각각 삽입하여 인간화 항체 발현 벡터를 구축하고, 동물 세포에 도입함으로써 발현시켜, 제조할 수 있다.

- [0082] 인간 항체는, 원래 인간체 내에 천연에 존재하는 항체를 말하지만, 최근의 유전자 공학적, 세포 공학적, 발생 공학적인 기술의 진보에 의해 제작된 인간 항체 파지 라이브러리 및 인간 항체 산생 트랜스제닉 동물로부터 얻어지는 항체 등도 포함된다.
- [0083] 인간 항체는, 인간 이뮤노글로불린 유전자를 유지하는 마우스(Tomizuka K. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 722-7, 2000)에 원하는 항원을 면역함으로써, 취득할 수 있다. 또한, 인간 유래의 B 세포로부터 항체 유전자를 증폭한 파지 디스플레이 라이브러리를 사용함으로써, 원하는 결합 활성을 갖는 인간 항체를 선택함으로써, 면역을 행하지 않고 인간 항체를 취득할 수 있다(Winter G. et al., Annu Rev Immunol.12: 433-55. 1994). 또한, EB 바이러스를 사용하여 인간 B 세포를 불사화함으로써, 원하는 결합 활성을 갖는 인간 항체를 생산하는 세포를 제작하여, 인간 항체를 취득할 수 있다(Rosen A. et al., Nature 267, 52-54.1977).
- [0084] 인간체 내에 존재하는 항체는, 예를 들어 인간 말초혈로부터 단리한 림프구를, EB 바이러스 등을 감염시킴으로써 불사화한 후, 클로닝함으로써, 해당 항체를 산생하는 림프구를 얻을 수 있고, 해당 림프구를 배양한 배양물 중으로부터 해당 항체를 정제할 수 있다.
- [0085] 인간 항체 파지 라이브러리는, 인간 B 세포로부터 조제한 항체 유전자를 파지 유전자에 삽입함으로써 Fab, scFv 등의 항체 단편을 표면에 발현시킨 파지의 라이브러리이다. 해당 라이브러리로부터, 항원을 고정화한 기질에 대한 결합 활성을 지표로 하여 원하는 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편을 발현하고 있는 파지를 회수할 수 있다. 해당 항체 단편은, 또한 유전자 공학적 방법에 의해, 2개의 완전한 H쇄 및 2개의 완전한 L쇄를 포함하는 인간 항체 분자라도 변환할 수 있다.
- [0086] 인간 항체 산생 트랜스제닉 동물은, 인간 항체 유전자가 숙주 동물의 염색체 내에 도입된 동물을 말한다. 구체적으로는, 마우스 ES 세포에 인간 항체 유전자를 도입하고, 해당 ES 세포를 다른 마우스의 초기배에 이식 후, 발생시킴으로써 인간 항체 산생 트랜스제닉 동물을 제작할 수 있다. 인간 항체 산생 트랜스제닉 동물로부터의 인간 항체의 제작 방법은, 통상의 인간 이외의 포유 동물에서 행해지고 있는 하이브리도마 제작 방법에 의해 인간 항체 산생 하이브리도마를 취득하고, 배양함으로써 배양물 중에 인간 항체를 산생 축적시킬 수 있다.
- [0087] 본 발명의 항체 VH 및 VL의 아미노산 서열로서는, 인간 항체, 비인간 동물 항체 또는 인간화 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열 중 어느 것이어도 된다.
- [0088] 본 발명의 항체에 있어서의 CL의 아미노산 서열로서는, 인간 항체 또는 비인간 동물 항체의 아미노산 서열 중 어느 것이어도 되지만, 인간 항체의 아미노산 서열 C_k 또는 C_λ 가 바람직하다.
- [0089] 본 발명의 항체 CH로서는, 이뮤노글로불린에 속하면 어떠한 것이어도 되지만, IgG 클래스에 속하는 서브클래스, $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3) 및 $\gamma 4$ (IgG4)가 바람직하다.
- [0090] 본 발명의 항체는, Fc와 항체 단편이 결합한 Fc 융합 단백질, Fc와 천연에 존재하는 리간드 또는 수용체가 결합한 Fc 융합 단백질(이뮤노아드헤신이라고도 함), 복수의 Fc 영역을 융합시킨 Fc 융합 단백질 등도 포함한다.
- [0091] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편은, 번역 후 수식된 어떠한 아미노산 잔기를 포함하는 항체 또는 해당 항체 단편도 포함한다. 번역 후 수식으로서, 예를 들어 H쇄의 C 말단에 있어서의 리신 잔기의 결실[리신·클리핑(lysine clipping)] 또는 폴리펩티드의 N말단에 있어서의 글루타민 잔기의 피로글루타민(pyroGlu)으로의 변환 등을 들 수 있다[Beck et al, Analytical Chemistry, 85, 715-736(2013)].
- [0092] 본 발명에 있어서, 항체 단편이란, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체보다도, 저pH에서의 분해가 억제된 인간 FGF23에 결합하는 항체 단편이다. 본 발명에 있어서 항체 단편으로서, Fab, Fab', F(ab')₂, 단일쇄 항체(scFv), 2량체화 V 영역(디아바디), 디설피드 안정화 V 영역(dsFv) 또는 복수의 CDR을 포함하는 펩티드 등을 들 수 있다. Fab는, IgG 항체를 단백질 분해 효소 파파인으로 처리하여 얻어지는 단편 중(H쇄의 224번째의 아미노산 잔기로 절단됨), H쇄의 N 말단측 약 절반과 L쇄 전체가 디설피드 결합(S-S 결합)으로 결합한, 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0093] F(ab')₂는, IgG를 단백질 분해 효소 펩신으로 처리하여 얻어지는 단편 중(H쇄의 234번째의 아미노산 잔기로 절단됨), Fab가 힌지 영역의 S-S 결합을 통해 결합된 것보다 약간 큰, 분자량 약 10만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. Fab'는, 상기 F(ab')₂의 힌지 영역의 S-S 결합을 절단한 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.

- [0094] scFv는, 1개의 VH와 1개의 VL을 4개의 Gly 및 1개의 Ser 잔기를 포함하는 링커(G4S)를 임의의 개수 연결시킨 링커 펩티드 등의 적당한 펩티드 링커(P)를 사용하여 연결한, VH-P-VL 내지는 VL-P-VH 폴리펩티드로, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0095] 디아바딘은, 항원 결합 특이성의 동일하거나 또는 다른 scFv가 2량체를 형성한 항체 단편으로, 동일한 항원에 대한 2가의 항원 결합 활성 또는 다른 항원에 대한 특이적인 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0096] dsFv는, VH 및 VL 중 각각 1아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 폴리펩티드를 해당 시스테인 잔기간의 S-S 결합을 통해 결합시킨 것을 말한다.
- [0097] CDR을 포함하는 펩티드는, VH 또는 VL의 CDR의 적어도 1 영역 이상을 포함하여 구성된다. 복수의 CDR을 포함하는 펩티드는, CDR끼리를 직접 또는 적당한 펩티드 링커를 통해 결합시킬 수 있다. 본 발명의 개변 항체의 VH 및 VL의 CDR을 코딩하는 DNA를 구축하고, 해당 DNA를 원핵 생물용 발현 벡터 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하고, 해당 발현 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜, 제조할 수 있다. 또한, CDR을 포함하는 펩티드는, Fmoc법 또는 tBoc법 등의 화학 합성법에 의해 제조할 수도 있다.
- [0098] 본 발명의 항체의 일 양태로서는, 하기 (i) 및 (ii)의 항체 또는 해당 항체 단편 등을 들 수 있다.
- [0099] (i) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 FGF23에 결합하는 항체에 있어서, 적어도 VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가, 알라닌 잔기, 아스파라긴 잔기, 글리신 잔기, 티로신 잔기, 아르기닌 잔기, 아스파르트산 잔기, 히스티딘 잔기, 트립토판 잔기 및 메티오닌 잔기에서 선택되는 1의 아미노산 잔기로 치환된 FGF23에 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0100] (ii) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 FGF23에 결합하는 항체에 있어서, 적어도 VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 105번째의 아미노산 잔기가, 알라닌 잔기, 페닐알라닌 잔기, 글리신 잔기, 히스티딘 잔기, 이소류신 잔기, 리신 잔기, 류신 잔기, 메티오닌 잔기, 프롤린 잔기, 글루타민 잔기, 아르기닌 잔기, 발린 잔기, 트립토판 잔기, 티로신 잔기, 트레오닌 잔기, 아스파라긴 잔기 및 세린 잔기에서 선택되는 1의 아미노산 잔기로 치환된 FGF23에 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0101] 당해 항체는, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 저pH에 있어서의 안정성이 높고, 항체의 분해를 억제할 수 있다. 당해 항체는, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체에 있어서, 적어도 VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가 알라닌 잔기 또는 티로신 잔기로 치환된 FGF23에 결합하는 항체인 것이 바람직하다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 저pH란 pH6 미만의 약산성 또는 산성을 말하고, 예를 들어 pH5, pH4.5, pH4 등을 들 수 있지만, 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0103] 본 발명의 항체는, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 저pH에 있어서의 분해가 억제되어, 우수한 안정성을 나타낸다. 본 발명에 있어서, 항체의 분해는, 사이즈 제거 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography(이하, SEC라 기재함)) 또는 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법(이하, SDS-PAGE라 기재함) 등으로 측정할 수 있다.
- [0104] 본 발명의 항체에서, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 저pH에서의 항체의 분해가 억제되어 있는 것은, 예를 들어 이하의 공정 (I) 내지 (III)을 포함하는 방법으로 확인할 수 있지만, 특히 해당 방법에 한정되는 것은 아니다.
- [0105] (I) 본 발명의 항체 또는 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체를 함유하는 항체 용액의 용매를, NAP(상표) 25(GE 헬스케어 라이프 사이언스) 등의 칼럼을 사용하여, pH4, 4.5 또는 5의 적당한 용매로 치환한 항체 용액을 조제한다.
- [0106] (II) 상기 (I)에서 조제한 항체 용액을 40도에서 1개월간 혹은 2주일 또는 25도에서 3개월간 정치한 후, SEC로써 항체의 분해물에 상당하는 피크(%)를 검출한다.
- [0107] 또는, 상기 (I)에서 조제한 항체 용액을 40도에서 1개월간 혹은 2주일 또는 25도에서 3개월간 정치한 후, 환원

조건 하에서 SDS-PAGE를 행하고, 항체의 분해물에 상당하는 40kDa 부근(예를 들어, 35kDa 내지 45kDa)의 밴드를 검출한다.

[0108] (III) 상기 (II)의 SEC에 의해 검출되는 항체의 분해물에 상당하는 피크(%)가, 서열 번호 1로 나타내지는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 나타내지는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체보다도, 본 발명의 항체에서 감소되어 있는 경우, 또는 SDS-PAGE의 40kDa 부근의 밴드의 농도가, 서열 번호 1로 나타내지는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 나타내지는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체보다도, 본 발명의 항체에서 저하되어 있는 경우, 서열 번호 1로 나타내지는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 나타내지는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 본 발명의 항체에서, 저 pH에서의 항체의 분해가 억제되어 있다고 확인할 수 있다.

[0109] 상기 (II)에 기재된 SDS-PAGE 대신에, 바이오 애널라이저 전기 영동 시스템(애질런트·테크놀로지 가부시키키가이샤) 및 Agilent Protein230 키트(애질런트·테크놀로지 가부시키키가이샤)를 사용해도 된다. 이 때, 얻어지는 엘렉트로페로그램에 있어서, H쇄 전체 길이의 피크보다도 10 내지 20kDa 정도 작은 사이즈로 검출되는 항체의 분해물에 상당하는 밴드(예를 들어, 40 내지 60kDa)의 피크 면적률(%)이, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체보다도, 본 발명의 항체에서 저하되어 있는 경우에, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 본 발명의 항체에서 저pH에서의 항체의 분해가 억제되어 있다고 확인할 수 있다.

[0110] 즉, 본 발명의 항체 저pH에 있어서의 안정성을 나타내는 양태로서, 예를 들어 하기를 들 수 있다.

[0111] · 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, pH4, 4.5 또는 5 등의 저pH 및 40도에서 1개월간 혹은 2주일 또는 25도에서 3개월간 정치 후에 있어서의, SDS-PAGE에 의한 분자량이 40kDa 부근의 밴드 농도가 저하되어 있다. 밴드의 농도는 눈으로 보아 평가할 수 있다.

[0112] · 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, pH4, 4.5 또는 5 등의 저pH 및 40도에서 1개월간 혹은 2주일 정치 후 또는 25도에서 3개월간에 있어서의, SEC에 의해 검출되는 항체의 분해물에 상당하는 피크(%)가 감소하고 있다. 해당 피크(%)는, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상 감소하고 있는 것이 바람직하다.

[0113] · 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 비교하여, pH4, 4.5 또는 5 등의 저pH 및 40도에서 1개월간 혹은 2주일 정치 후 또는 25도에서 3개월간에 있어서의, 바이오 애널라이저 전기 영동 시스템(애질런트·테크놀로지 가부시키키가이샤) 및 Agilent Protein230 키트(애질런트·테크놀로지 가부시키키가이샤)에 의한 엘렉트로페로그램에 있어서, H쇄 전체 길이의 피크보다도 10 내지 20kDa 정도 작은 사이즈로 검출되는 항체의 분해물에 상당하는 밴드(예를 들어, 40 내지 60kDa)의 피크 면적률(%)이 감소하고 있다. 해당 피크 면적률(%)이, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체보다도, 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상 감소하고 있는 것이 바람직하다.

[0114] 본 발명의 항체의 일 양태로서는, 하기 (a1) 내지 (a4)에서 선택되는 1의 치환을 더 포함하는, 상기 항체를 들 수 있다.

[0115] (a1) VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 50번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환, 54번째의 아미노산 잔기의 트립토판 잔기로의 치환, 55번째의 아미노산 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환, 57번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 58번째의 아미노산 잔기의 페닐알라닌 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환,

[0116] (a2) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 91번째의 아미노산 잔기의 메티오닌 잔기 또는 류신 잔기로의 치환, 92번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기로의 치환, 94번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 및 96번째의 아미노산 잔기의 아스파라긴 잔기 또는 아스파르트산 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환,

- [0117] (a3) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 28번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 29번째의 아미노산 잔기의 발린 잔기로의 치환, 31번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 34번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환, 그리고
- [0118] (a4) VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 92번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기 또는 트립토판 잔기로의 치환, 94번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환, 및 96번째의 아미노산 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환에서 선택되는 적어도 1의 치환.
- [0119] 또한, 본 발명의 항체는, 상기 (a1) 내지 (a4) 각각에 대해서, 기재되는 모든 아미노산 잔기의 치환이 이루어져 있는 것이 바람직하다.
- [0120] 본 발명의 항체는, 상기 (a1) 내지 (a4)에서 선택되는 1의 아미노산 잔기의 치환에 의해, 항체의 FGF23에 대한 결합 활성 및 FGF23 중화 활성을 향상시킬 수 있다. FGF23 중화 활성이란, FGF23이 수용체에 결합함으로써 발생하는 시그널을 저해하는 활성을 말한다. FGF23의 수용체로서는, FGFR1과 αKlotho의 복합체를 들 수 있다.
- [0121] 본 발명의 항체 FGF23 중화 활성은, Nature 2006 Dec 7; 444(7120)에 기재되는 리포터 검정(프로모터 어세이이라고도 함) 등으로 확인할 수 있다. 또한, 마우스 Egr1 유전자 유래의 프로모터를 갖는 루시페라아제 발현 벡터로 형질 전환된 αKlotho 안정 발현 HEK293 세포를 사용한 리포터 검정 등에서도 본 발명의 항체 FGF23 중화 활성을 확인할 수 있다.
- [0122] 본 발명의 항체의 구체적인 예로서는, 하기 (b1) 내지 (b5)에서 선택되는 어느 1의 항체를 들 수 있다.
- [0123] (b1) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체에 있어서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 50번째의 아미노산 잔기가 류신 잔기로, 54번째의 아미노산 잔기가 트립토판 잔기로, 55번째의 아미노산 잔기가 히스티딘 잔기로, 57번째의 아미노산 잔기가 트레오닌 잔기로, 58번째의 아미노산 잔기가 페닐알라닌 잔기로, 및 100번째의 아미노산 잔기가 알라닌 잔기 또는 티로신 잔기로 치환된 항체,
- [0124] (b2) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체에 있어서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가 알라닌 잔기 또는 티로신 잔기로, 및 VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 91번째의 아미노산 잔기가 메티오닌 잔기로, 92번째의 아미노산 잔기가 티로신 잔기로, 94번째의 아미노산 잔기가 아스파르트산 잔기로, 및 96번째의 아미노산 잔기가 아스파라긴 잔기로 치환된 항체,
- [0125] (b3) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체에 있어서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가 알라닌 잔기 또는 티로신 잔기로, 및 VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 28번째의 아미노산 잔기가 아스파르트산 잔기로, 29번째의 아미노산 잔기가 발린 잔기로, 31번째의 아미노산 잔기가 트레오닌 잔기로, 및 34번째의 아미노산 잔기가 류신 잔기로 치환된 항체,
- [0126] (b4) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체에 있어서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가 알라닌 잔기 또는 티로신 잔기로, 및 VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 91번째의 아미노산 잔기가 류신 잔기로, 92번째의 아미노산 잔기가 티로신 잔기로, 94번째의 아미노산 잔기가 아스파르트산 잔기로, 및 96번째의 아미노산 잔기가 아스파르트산 잔기로 치환된 항체, 그리고
- [0127] (b5) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체에 있어서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기가 알라닌 잔기 또는 티로신 잔기로, 및 VL에 있어서의 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 92번째의 아미노산 잔기가 티로신 잔기 또는 트립토판 잔기로, 94번째의 아미노산 잔기가 아스파르트산 잔기로, 및 96번째의 아미노산 잔기가 아스파르트산 잔기로 치환된 항체.
- [0128] 또한, 본 발명의 항체 구체예로서는 하기 (c1) 내지 (c10)에서 선택되는 항체도 들 수 있고, (c1), (c8), (c9) 또는 (c10)이 바람직하고, (c1) 또는 (c9)가 보다 바람직하다.
- [0129] (c1) 서열 번호 39로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,

- [0130] (c2) 서열 번호 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0131] (c3) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0132] (c4) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0133] (c5) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0134] (c6) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0135] (c7) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0136] (c8) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체,
- [0137] (c9) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체, 그리고
- [0138] (c10) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체.
- [0139] 본 발명의 항체에는, 혈 중 반감기의 제어를 목적으로 하여, FcRn에의 결합성을 제어하기 위해서, 아미노산 잔기를 치환한 Fc 영역 등도 사용할 수 있다.
- [0140] 항체의 FcRn에의 결합성을 향상시키기 위해 아미노산 잔기를 치환한 Fc 영역으로서, 하기 (d1) 내지 (d5) 중 어느 1의 Fc 영역 등을 들 수 있다. 그 중에서도 (d1)의 Fc 영역이 바람직하다.
- [0141] (d1) EU 인덱스 252번째의 아미노산 잔기의 티로신 잔기로의 치환, 254번째의 아미노산 잔기의 트레오닌 잔기로의 치환, 및 256번째의 아미노산 잔기의 글루탐산 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,
- [0142] (d2) EU 인덱스 428번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환, 및 434번째의 아미노산 잔기의 세린 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,
- [0143] (d3) EU 인덱스 308번째의 아미노산 잔기의 프롤린 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역,
- [0144] (d4) EU 인덱스 250번째의 아미노산 잔기의 글루타민 잔기로의 치환, 및 428번째의 아미노산 잔기의 류신 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역, 그리고
- [0145] (d5) EU 인덱스 434번째의 아미노산 잔기의 알라닌 잔기로의 치환을 포함하는 Fc 영역.
- [0146] 또한, 본 발명에 있어서, 항체의 FcRn에의 결합성을 향상시키기 위해 아미노산 잔기가 치환된 Fc 영역을 포함하는 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열의 구체예로서는, 서열 번호 48, 49, 50, 51 및 52로 표시되는 아미노산 서열 등을 들 수 있다. 그 중에서도, 서열 번호 48로 표시되는 아미노산 서열이 바람직하다.
- [0147] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편에는, 본 발명의 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편에 방사성 동위 원소, 저분자의 약제, 고분자의 약제, 단백질 또는 항체 의약 등을 화학적 또는 유전자 공학적으로 결합시킨 항체 또는 해당 항체 단편의 유도체를 포함한다.
- [0148] 항체 또는 해당 항체 단편의 유도체는, 본 발명의 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편의 H쇄 혹은 L쇄의 N 말단측, C 말단측, 항체 분자 중의 적당한 치환기 또는 측쇄 혹은 당쇄 등에, 방사성 동위 원소, 저분자의 약제, 고분자의 약제, 면역 부활제, 단백질, 항체 의약 또는 핵산 의약 등을 화학적 방법[항체 공학 입문, 치진 쇼칸(1994)]에 의해 결합시킴으로써 제조할 수 있다.
- [0149] 또한, 본 발명의 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 코딩하는 DNA와, 결합시키고자 하는 단백질 또는 항체 의약을 코딩하는 DNA를 연결시켜 발현 벡터에 삽입하고, 해당 발현 벡터를 적당한 숙주

세포에 도입하여, 발현시키는 유전자 공학적 방법으로부터 제조할 수 있다.

[0150] 방사성 동위 원소로서는, 예를 들어 ^{111}In , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu 또는 ^{211}At 등을 들 수 있다. 방사성 동위 원소는 클로라민 T법 등에 의해 항체에 직접 결합시킬 수 있다. 또한, 방사성 동위 원소를 킬레이팅하는 물질을 항체에 결합시켜도 된다. 킬레이트제로서는, 예를 들어 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌트리아민헨타아세트산(MX-DTPA) 등을 들 수 있다.

[0151] 저분자의 약제로서는, 예를 들어 알킬화제, 니트로소우레아제, 대사 길항제, 항생 물질, 식물 알칼로이드, 토포 이소머라아제 저해제, 호르몬 요법제, 호르몬 길항제, 아로마타아제 저해제, P당 단백 저해제, 백금 착체 유도제, Mgi 저해제 혹은 키나아제 저해제 등의 항암제[임상 종양학, 암과 화학 요법사(1996)], 하이드로코르티손 혹은 프레드니손 등의 스테로이드제, 아스피린 혹은 인도메타신 등의 비스테로이드제, 금티오말레이트 혹은 페니실라민 등의 면역 조절제, 시클로포스파미드 혹은 아자티오프린 등의 면역 제어제 또는 말레산클로르페니라민 혹은 클레마스틴과 같은 항히스타민제 등의 항염증제[염증과 항염증 요법, 이시야쿠 슛판 가부시기가이샤(1982)] 등을 들 수 있다.

[0152] 항암제로서는, 예를 들어 아미포스틴(에티올), 시스플라틴, 다카르바진(DTIC), 닥티노마이신, 메클로레타민(질소 머스터드), 스트렙토조신, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 카르무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU), 독소루비신(아드리아마이신), 에피루비신, 젬시타빈(젬자르), 다우노루비신, 프로카르바진, 마이토마이신, 시타라빈, 에토포시드, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실, 플루오로우라실, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 블레오마이신, 다우노마이신, 페플로마이신, 에스트라무스틴, 파클리탁셀(탁솔), 도세탁셀(탁소텔), 알테스류킨, 아스파라기나아제, 부술판, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 네다플라틴, 클라드리빈, 캄토테신, 10-히드록시-7-에틸-캄토테신(SN38), 플록스우리딘, 플루다라빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 메스나, 이리노테칸(CPT-11), 노기테칸, 미톡산트론, 토포테칸, 류프롤리드, 메게스트롤, 멜팔란, 머캄토포린, 히드록시카르바미드, 플리카마이신, 미토탄, 폐가스파르가제, 펜토스타틴, 피코브로만, 타목시펜, 고세렐린, 류프롤레닌, 플루타미드, 테니포시드, 테스토락톤, 티오구아닌, 티오테파, 우라실머스타드, 비노렐빈, 클로람부실, 하이드로코르티손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 빈데신, 니무스틴, 세무스틴, 카페시타빈, 토뮤텍스, 아자시티딘, UFT, 옥살로플라틴, 게피티닙(이렛사), 이마티닙(STI571), 에를로티닙, FMS-like tyrosine kinase 3(Flt3) 저해제, 혈관 내피 성장 인자 수용체(Vascular Endothelial Growth Facotr receptor)(VEGFR) 저해제, 섬유아세포 성장 인자 수용체(Fibroblast Growth Factor Receptor)(FGFR) 저해제, 이렛사 혹은 타세바 등의 표피 성장 인자 수용체(Epidermal Growth Factor Receptor)(EGFR) 저해제, 라디시콜, 17-알릴아미노-17-데메톡시젤다나마이신, 라파마이신, 암사크린, 올-트랜스레티노산, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 아나스트로졸, 파드로졸, 레트로졸, 엑세메스탄, 금티오말레이트, D-페니실라민, 부실라민, 아자티오프린, 미조리빈, 시클로스포린, 라파마이신, 히드로코르티손, 백사로텐(타르그레틴), 타목시펜, 텍사메타손, 프로게스틴류, 에스트로겐류, 아나스트로졸(아리미텍스), 류프린, 아스피린, 인도메타신, 셀레콕시브, 페니실라민, 금티오말레이트, 말레산클로르페니라민, 클로로페닐라민, 클레마스틴, 트레티노인, 백사로텐, 비소, 보르테조미, 알로푸리놀, 칼리케아마이신, 이브리투모맙, 티옥세탄, 타르그레틴, 오조가민, 클라리트로마이신, 류코보린, 케토코나졸, 아미노글루테티미드, 수라민 또는 메이탄시노이드 혹은 그의 유도체 등을 들 수 있다.

[0153] 저분자의 약제와 항체를 결합시키는 방법으로서, 예를 들어 글루타르알데히드를 통해 약제와 항체의 아미노기 간을 결합시키는 방법 또는 수용성 카르보다이미드를 통해 약제의 아미노기와 항체의 카르복실기를 결합시키는 방법 등을 들 수 있다.

[0154] 고분자의 약제로서는, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜(이하, PEG라 표기함), 알부민, 텍스트란, 폴리옥시에틸렌, 스티렌말레산 코폴리머, 폴리비닐피롤리돈, 피란 코폴리머 또는 히드록시프로필메타크릴아미드 등을 들 수 있다. 이들의 고분자 화합물을 항체 또는 그의 항체 단편에 결합시킴으로써, (1) 화학적, 물리적 혹은 생물적인 각종 인자에 대한 안정성의 향상, (2) 혈 중 반감기의 현저한 연장, 또는 (3) 면역원성의 소실 혹은 항체 산생의 억제 등의 효과가 기대된다[바이오 콘쥬게이트 의약품, 히로카와 쇼텐(1993)].

[0155] 예를 들어, PEG와 항체를 결합시키는 방법으로서, PEG화 수식 시약과 반응시키는 방법 등을 들 수 있다[바이오 콘쥬게이트 의약품, 히로카와 쇼텐(1993)]. PEG화 수식 시약으로서, 리신의 ε -아미노기에의 수식제(일본 특허 공개 소61-178926호 공보), 아스파르트산 및 글루탐산의 카르복실기에의 수식제(일본 특허 공개 소56-23587호 공보) 또는 아르기닌의 구아니디노기에의 수식제(일본 특허 공개 평2-117920호 공보) 등을 들 수 있다.

[0156] 면역 부활제로서는, 이뮤노아주반트로서 알려져 있는 천연물이어도 되고, 구체예로서는, 면역을 항진하는 약제

가, β (1→3)글루칸(예를 들어, 렌티난 또는 시조피란) 또는 α 갈락토실세라마이드(KRN7000) 등을 들 수 있다.

- [0157] 단백질로서는, 예를 들어 NK 세포, 마크로파지 또는 호중구 등의 면역 담당 세포를 활성화하는 사이토카인 혹은 증식 인자 또는 독소 단백질 등을 들 수 있다.
- [0158] 사이토카인 또는 증식 인자로서는, 예를 들어 인터페론(이하, IFN이라 기재함)- α , IFN- β , IFN- γ , 인터류킨(이하, IL이라 기재함)-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구/마크로파지 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 또는 마크로파지 콜로니 자극 인자(M-CSF) 등을 들 수 있다. 독소 단백질로서는, 예를 들어 리신, 디프테리아독소 또는 ONTAK 등을 들 수 있고, 독성을 조절하기 위해 단백질에 변이를 도입한 단백질 독소도 포함된다.
- [0159] 항체 의약으로서는, 예를 들어 항체의 결합에 의해 아포토시스가 유도되는 항원, 종양의 병태 형성에 관계되는 항원, 면역 기능을 조절하는 항원 또는 병변 부위의 혈관 신생에 관여하는 항원에 대한 항체를 들 수 있다.
- [0160] 항체의 결합에 의해 아포토시스가 유도되는 항원으로서는, 예를 들어 분화 클러스터(cluster of differentiation)(이하, CD라 기재함) 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), 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen)(HLA)-Class II 또는 상피 성장 인자 수용체(Epidermal Growth Factor Receptor)(EGFR) 등을 들 수 있다.
- [0161] 종양의 병태 형성에 관계되는 항원 또는 면역 기능을 조절하는 항체의 항원으로서는, 예를 들어 CD4, CD40, CD40 리간드, B7 패밀리를 분자(예를 들어, CD80, CD86, CD274, B7-DC, B7-H2, B7-H3 또는 B7-H4), B7 패밀리를 분자의 리간드(예를 들어, CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 또는 BTLA), OX-40, OX-40 리간드, CD137, 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)(TNF) 수용체 패밀리를 분자(예를 들어, DR4, DR5, TNFR1 또는 TNFR2), TNF-관련 세포사멸-유도 리간드 수용체(TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor)(TRAIL) 패밀리를 분자, TRAIL 패밀리를 분자의 수용체 패밀리를 분자(예를 들어, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 또는 TRAIL-R4), 핵 인자 카파 B 리간드의 수용체 활성화자(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)(RANK), RANK 리간드, CD25, 엽산 수용체, 사이토카인[예를 들어, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, 전환 성장 인자(transforming growth factor)(TGF) β 또는 TNF α 등] 혹은 이들 사이토카인의 수용체 또는 케모카인(예를 들어, SLC, ELC, I-309, TARC, MDC 또는 CTACK 등) 혹은 이들 케모카인의 수용체를 들 수 있다.
- [0162] 병변 부위의 혈관 신생을 저해하는 항체의 항원으로서는, 예를 들어 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor)(VEGF), 안지오펜(angiopoietin), 섬유아세포 성장 인자(Fibroblast Growth Factor)(FGF), EGF, 간세포 성장 인자(Hepatocyte Growth Factor)(HGF), 혈소판 유래 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor)(PDGF), 인슐린 유사 성장 인자(Insulin-like Growth Factor)(IGF), 에리스로포이에틴(erythropoietin)(EPO), TGF β , IL-8, 에프린(ephlin) 또는 SDF-1 혹은 이들의 수용체 등을 들 수 있다.
- [0163] 핵산 의약으로서는, 예를 들어 유전자의 기능을 제어함으로써 생체에 작용하는 짧은 간섭 리보핵산(small interference ribonucleic acid)(siRNA) 또는 microRNA 등의 핵산을 포함하는 의약품을 들 수 있다. 예를 들어, Th17 세포의 마스터 전사 인자 ROR γ t를 억제하는 핵산 의약과의 콘주게이트를 생각할 수 있다.
- [0164] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편의 유도체를 인간 FGF23의 검출 및 측정 그리고 인간 FGF23 관련 질환의 진단에 사용하는 경우에, 당해 항체에 결합하는 약제로서는, 통상의 면역학적 검출 또는 측정법에서 사용되는 표지체를 들 수 있다. 표지체로서는, 예를 들어 알칼리 포스파타아제, 퍼옥시다아제 혹은 루시페라아제 등의 효소, 아크리딘늄에스테르 혹은 로핀 등의 발광 물질, 또는 플루오레세인이소티오시아네이트(FITC) 혹은 테트라메틸로다민이소티오시아네이트(RITC) 등의 형광 물질 등을 들 수 있다.
- [0165] 또한, 본 발명의 일 실시 형태는, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 조성물이다. 조성물의 형태로서는, 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는 조성물 등을 들 수 있다. 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 조성물은, 인간 FGF23 관련 질환의 치료에 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시 형태로서, 본 발명의 항체를 포함하는 인간 FGF23 관련 질환의 치료제가 제공된다.
- [0166] 또한, 본 발명은, 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 투여하는 것을 포함하는, 인간 FGF23 관련 질환의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0167] 인간 FGF23 관련 질환으로서, 인간 FGF23 또는 인간 FGF23의 수용체가 관여하는 질환이면 어떠한 것이어도 되

고, 예를 들어 종양성 골연화증(TIO), 상염색체 현성 저인혈증성 골사병·골연화증(ADHR), X 염색체 연쇄성 저인혈증(XLH), 섬유성 이형성증(fibrous dysplasia), 맥쿤-알브라이트 증후군(McCune-Albright syndrome), 상염색체 잠수성 저인혈증성 골사병·골연화증(ARHR), 골조송증, 골사병(저인혈증성 골사병, 비타민 D 저항성 구루병을 포함함), 고칼슘혈증, 저칼슘혈증, 이소성 석회화, 골경화증, 파제트병, 부갑상선 기능 항진증, 부갑상선 기능 저하증, 소양, 그리고 신장성 골이영양증, 투석 골증 및 요세관 기능 장애 등으로 대표되는 신부전이나 신부전 시 인공 투석에 합병하는 질환 등을 들 수 있다.

[0168] 또한, 본 발명은, 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는, TIO, ADHR, XLH, 섬유성 이형성증, 맥쿤-알브라이트 증후군 및 ARHR 등의 질환에서 보이는 저인혈증, 골석회화 부전, 골통, 근력 저하, 골격의 변형, 성장 장애, 저1,25 비타민 D 혈증 등의 증상의 치료제도 포함한다.

[0169] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 치료제는, 유효 성분으로서의 해당 항체 또는 해당 항체 단편만을 포함하는 것이어도 되지만, 통상은 약리학적으로 허용되는 1 이상의 담체와 함께 혼합하여, 제제학의 기술 분야에 있어서 공지된 임의의 방법에 의해 제조한 의약 제제로서 제공하는 것이 바람직하다.

[0170] 투여 경로는, 치료 시에 가장 효과적인 것을 사용하는 것이 바람직하고, 경구 투여 또는 구강 내, 기도 내, 직장 내, 피하, 근육 내 혹은 정맥 내 등의 비경구 투여를 들 수 있고, 바람직하게는 정맥 내 투여를 들 수 있다. 투여 형태로서는, 예를 들어 분무제, 캡슐제, 정제, 산제, 과립제, 시럽제, 유제, 좌제, 주사제, 연고 또는 테이프제 등을 들 수 있다.

[0171] 투여량 또는 투여 횟수는, 목적으로 하는 치료 효과, 투여 방법, 치료 기간, 연령 및 체중 등에 따라서 다르지만, 통상 성인 1일당 10 µg/kg 내지 10mg/kg이다.

[0172] 본 발명의 조성물의 일 실시 형태로서는, 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 함유하는, FGF23의 검출 혹은 측정용 시약을 들 수 있다. 또한 본 발명은, 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용한 FGF23의 검출 혹은 측정 방법에 관한 것이다. 본 발명에 있어서 인간 FGF23을 검출 또는 측정하는 방법으로서, 임의의 공지된 방법을 들 수 있다. 예를 들어, 면역학적 검출 또는 측정 방법 등을 들 수 있다.

[0173] 면역학적 검출 또는 측정 방법이란, 표지를 실시한 항원 또는 항체를 사용하여, 항체량 또는 항원량을 검출 또는 측정하는 방법이다. 면역학적 검출 또는 측정 방법으로서, 예를 들어 방사성 물질 표지 면역 항체법(RIA), 효소 면역 측정법(EIA 또는 ELISA), 형광 면역 측정법(FIA), 발광 면역 측정법(luminescent immunoassay), 웨스턴 블로트법 또는 물리화학적 방법 등을 들 수 있다.

[0174] 본 발명의 조성물의 일 실시 형태로서는, 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는, FGF23 관련 질환의 진단약을 들 수 있다. 또한, 인간 FGF23에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용하여 FGF23의 검출 또는 측정을 하는 것을 포함하는, FGF23 관련 질환의 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용하여, 상기 방법에 따라서 인간 FGF23을 검출 또는 측정함으로써, 인간 FGF23이 관련되는 질환을 진단할 수 있다.

[0175] 본 발명에 있어서 인간 FGF23을 검출 또는 측정하는 대상이 되는 생체 시료로서는, 예를 들어 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 체액, 오줌, 분변, 조직액 또는 배양액 등, 인간 FGF23을 포함할 가능성이 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다.

[0176] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 함유하는 진단약은, 목적으로 하는 진단 방법에 따라서, 항원 항체 반응을 행하기 위한 시약, 해당 반응의 검출용 시약을 포함해도 된다. 항원 항체 반응을 행하기 위한 시약으로서, 완충제, 염 등을 들 수 있다. 검출용 시약으로서, 해당 모노클로날 항체 혹은 그의 항체 단편을 인식하는 표지된 2차 항체 또는 표지에 대응한 기질 등의 통상의 면역학적 검출 또는 측정법에 사용되는 시약을 들 수 있다.

[0177] 본 발명의 일 실시 형태는 FGF23 관련 질환의 치료약 혹은 진단약의 제조 위한, 항인간 FGF23 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편의 사용에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 일 실시 형태는 FGF23 관련 질환의 치료 방법 또는 진단 방법에 관한 것이다.

[0178] 이하에, 본 발명의 항체의 제조 방법, 질환의 치료 방법 및 질환의 진단 방법에 대해서, 구체적으로 설명한다.

[0179] 1. 항체의 제조 방법

- [0180] (1) 항원의 조제
- [0181] 항원이 되는 인간 FGF23은, 인간 FGF23 전체 길이 또는 그의 부분 길이를 코딩하는 cDNA를 포함하는 발현 벡터를, 대장균, 효모, 곤충 세포 또는 동물 세포 등에 도입함으로써 얻을 수 있다. 또한, 인간 FGF23은, 인간 FGF23을 다량으로 발현하고 있는 각종 인간 세포주, 인간 세포 및 인간 조직 등으로부터 인간 FGF23을 정제함으로써 얻을 수 있다. 또한, 이들 인간 세포주, 인간 세포 및 인간 조직 등을 그대로 항원으로서 사용할 수도 있다. 또한, Fmoc법 또는 tBoc법 등의 화학 합성법에 의해 인간 FGF23의 부분 서열을 갖는 합성 펩티드를 조제하여, 항원에 사용할 수도 있다. 인간 FGF23 또는 인간 FGF23의 부분 서열을 갖는 합성 펩티드에는, C 말단 또는 N 말단에 FLAG 또는 His 등의 공지된 태그가 부가되어 있어도 된다.
- [0182] 본 발명에서 사용되는 인간 FGF23은, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)나 Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997) 등에 기재된 방법 등을 사용하고, 예를 들어 이하의 방법에 의해, 해당 인간 FGF23을 코딩하는 DNA를 숙주 세포 중에서 발현시켜, 제조할 수 있다.
- [0183] 먼저, 인간 FGF23을 코딩하는 부분을 포함하는 완전 길이 cDNA를 적당한 발현 벡터의 프로모터 하류에 삽입함으로써, 재조합 벡터를 제작한다. 상기 완전 길이 cDNA 대신에, 완전 길이 cDNA를 바탕으로 하여 조제된, 폴리펩티드를 코딩하는 부분을 포함하는 적당한 길이의 DNA 단편을 사용해도 된다. 이어서, 얻어진 해당 재조합 벡터를, 해당 발현 벡터에 적합한 숙주 세포에 도입함으로써, 폴리펩티드를 생산하는 형질 전환체를 얻을 수 있다.
- [0184] 발현 벡터로서는, 사용하는 숙주 세포에 있어서의 자율 복제 또는 염색체 중으로의 도입이 가능하며, 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 전사할 수 있는 위치에, 적당한 프로모터를 함유하고 있는 것이면 모두 사용할 수 있다. 숙주 세포로서는, 대장균 등의 에스케리키아속 등에 속하는 미생물, 효모, 곤충 세포 또는 동물 세포 등, 목적으로 하는 유전자를 발현할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있다.
- [0185] 대장균 등의 원핵 생물을 숙주 세포로서 사용하는 경우, 재조합 벡터는, 원핵 생물 중에서 자율 복제가 가능함과 동시에, 프로모터, 리보솜 결합 서열, 인간 FGF23을 코딩하는 부분을 포함하는 DNA, 및 전사 종결 서열을 포함하는 벡터인 것이 바람직하다. 또한, 해당 재조합 벡터에는, 전사 종결 서열은 반드시 필요하지는 않지만, 구조 유전자의 바로 아래에 전사 종결 서열을 배치하는 것이 바람직하다. 또한, 해당 재조합 벡터에는, 프로모터를 제어하는 유전자를 포함하고 있어도 된다.
- [0186] 해당 재조합 벡터로서는, 리보솜 결합 서열인 샤인·달가노 서열(SD 서열이라고도 함)과 개시 코돈 사이를 적당한 거리(예를 들어 6 내지 18 염기)로 조절한 플라스미드를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0187] 또한, 해당 인간 FGF23을 코딩하는 DNA의 염기 서열로서는, 숙주 내에서의 발현에 최적인 코돈이 되도록 염기를 치환할 수 있고, 이것에 의해 목적으로 하는 인간 FGF23의 생산율을 향상시킬 수 있다.
- [0188] 발현 벡터로서는, 사용하는 숙주 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 pBTrp2, pBTac1, pBTac2(이상, 로슈·다이아그노스틱스사제), pKK233-2(파머시아사제), pSE280(인비트로젠사제), pGEMEX-1(프로메가사제), pQE-8(퀴아젠사제), pKYP10(일본 특허 공개 소58-110600호 공보), pKYP200[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(-)(스트라타진사제), pTrs30[대장균 JM109/pTrs30(FERM BP-5407)으로부터 조제], pTrs32[대장균 JM109/pTrs32(FERM BP-5408)로부터 조제], pGHA2[대장균 IGHA2(FERM BP-400)로부터 조제, 일본 특허 공개 소60-221091호 공보], pGKA2[대장균 IGKA2(FERM BP-6798)로부터 조제, 일본 특허 공개 소60-221091호 공보], pTerm2(미국 특허 제4,686,191호 명세서, 미국 특허 제4,939,094호 명세서, 미국 특허 제160,735호 명세서), pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pEG400[J. Bacteriol., 172, 2392(1990)], pGEX(파머시아사제), pET 시스템(노바젠사제) 또는 pME18SFL3 등을 들 수 있다.
- [0189] 프로모터로서는, 사용하는 숙주 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 어떠한 것이어도 된다. 예를 들어, trp 프로모터(Ptrp), lac 프로모터, PL 프로모터, PR 프로모터 또는 T7 프로모터 등의, 대장균 또는 파지 등에 유래하는 프로모터를 들 수 있다. 또한, 예를 들어 Ptrp를 2개 직렬시킨 탠덤 프로모터, tac 프로모터, lacT7 프로모터 또는 let I 프로모터 등의 인위적으로 설계 개변된 프로모터 등을 들 수 있다.
- [0190] 숙주 세포로서는, 예를 들어 대장균 XL1-Blue, 대장균 XL2-Blue, 대장균 DH1, 대장균 MC1000, 대장균 KY3276, 대장균 W1485, 대장균 JM109, 대장균 HB101, 대장균 No.49, 대장균 W3110, 대장균 NY49 또는 대장균 DH5 α 등

을 들 수 있다.

- [0191] 숙주 세포에의 재조합 벡터의 도입 방법으로서, 사용하는 숙주 세포에 DNA를 도입하는 방법이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 칼슘 이온을 사용하는 방법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110(1972), Gene, 17, 107(1982), Molecular & General Genetics, 168, 111(1979)]을 들 수 있다.
- [0192] 동물 세포를 숙주로서 사용하는 경우, 발현 벡터로서는, 동물 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 pcDNA1, pCDM8(후나코시사제), pAGE107[일본 특허 공개 평3-22979호 공보; Cytotechnology, 3, 133(1990)], pAS3-3(일본 특허 공개 평2-227075호 공보), pCDM8[Nature, 329, 840(1987)], pcDNA1/Amp(인비트로젠사제), pcDNA3.1(인비트로젠사제), pREP4(인비트로젠사제), pAGE103[J. Biochemistry, 101, 1307(1987)], pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93(국제 공개 제97/10354호), N5KG1val(미국 특허 제6,001,358호 명세서), INPEP4(Biogen-IDEC사제) 및 트랜스포존 벡터(국제 공개 제2010/143698호) 등을 들 수 있다.
- [0193] 프로모터로서는, 동물 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 사이토메갈로 바이러스(CMV)의 극초기(immediate early)(IE) 유전자의 프로모터, SV40의 초기 프로모터, 레트로바이러스의 프로모터, 메타로티오네인 프로모터, 히트 쇼크 프로모터, SR α 프로모터 또는 폴로니 마우스 백혈병 바이러스의 프로모터 혹은 인헨서를 들 수 있다. 또한, 인간 CMV의 IE 유전자의 인헨서를 프로모터와 함께 사용해도 된다.
- [0194] 숙주 세포로서는, 예를 들어 인간 백혈병 세포 Namalwa 세포, 원숭이 세포 COS 세포, 차이니즈·햄스터 난소 세포 CHO 세포[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. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275(1968); Cell, 6, 121(1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II(pp. 883-900)], 디히드로엽산 환원 효소 유전자(이하, dhfr라 표기함)가 결손된 CHO 세포(CHO/DG44 세포)[Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77, 4216(1980)], CHO-K1(ATCC CCL-61), DukXB11(ATCC CCL-9096), Pro-5(ATCC CCL-1781), CHO-S(Life Technologies, Cat#11619), Pro-3, 래트 미엘로마 세포 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(또는 YB2/0이라고도 함), 마우스 미엘로마 세포 NS0, 마우스 미엘로마 세포 SP2/0-Ag14, 시리안 햄스터 세포 BHK 또는 HBT5637(일본 특허 공개 소63-000299호 공보) 등을 들 수 있다.
- [0195] 숙주 세포에의 재조합 벡터의 도입 방법으로서, 동물 세포에 DNA를 도입하는 방법이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 일렉트로포레이션법[Cytotechnology, 3, 133(1990)], 인산칼슘법(일본 특허 공개 평2-227075호 공보) 또는 리포펙션법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)] 등을 들 수 있다.
- [0196] 이상과 같이 하여 얻어지는 인간 FGF23을 코딩하는 DNA를 도입한 재조합 벡터를 보유하는 미생물 또는 동물 세포 등의 유래의 형질 전환체를 배지 중에서 배양하고, 배양액 중에 해당 인간 FGF23을 생성 축적시켜, 해당 배양액으로부터 채취함으로써, 인간 FGF23을 제조할 수 있다. 해당 형질 전환체를 배지 중에서 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법에 따라서 행할 수 있다.
- [0197] 진핵 생물 유래의 세포에서 발현시켰을 경우에는, 당 또는 당쇄가 부가된 인간 FGF23을 얻을 수 있다.
- [0198] 유도성의 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질 전환한 미생물을 배양할 때에는, 필요에 따라서 인두서를 배지에 첨가해도 된다. 예를 들어, lac 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질 전환한 미생물을 배양하는 경우에는 이소프로필- β -D-티오갈락토피라노시드 등을, trp 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질 전환한 미생물을 배양하는 경우에는 인돌아크릴산 등을 배지에 첨가해도 된다.
- [0199] 동물 세포를 숙주로 하여 얻어진 형질 전환체를 배양하는 배지로서는, 예를 들어 일반적으로 사용되고 있는 RPMI1640 배지[The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)], 이글(Eagle)의 MEM 배지[Science, 122, 501(1952)], 돌베코 개변 MEM 배지[Virology, 8, 396(1959)], 199 배지[Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1(1950)] 혹은 이스코브 변형 돌베코 배지(Scove's Modified Dulbecco's Medium)(IMDM) 배지 또는 이들 배지에 소태아 혈청(FBS) 등을 첨가한 배지 등을 들 수 있다. 배양은, 통상 pH6 내지 8, 30 내지 40℃, 5% CO₂ 존재 하 등의 조건 하에서 1 내지 7일간 행한다. 또한, 배양 중에 필요에 따라서, 카나마이신 또는 페니실린 등의 항생 물질을 배지에 첨가해도 된다.
- [0200] 인간 FGF23을 코딩하는 유전자의 발현 방법으로서, 예를 들어 직접 발현 이외에도, 분비 생산 또는 융합 단백

질 발현 등의 방법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]을 들 수 있다.

- [0201] 인간 FGF23의 생산 방법으로서, 예를 들어 숙주 세포 내에 생산시키는 방법, 숙주 세포 외에 분비시키는 방법, 또는 숙주 세포 외막 상에 생산시키는 방법을 들 수 있고, 사용하는 숙주 세포 또는 생산시키는 인간 FGF23의 구조를 바꿈으로써, 적절한 방법을 선택할 수 있다.
- [0202] 인간 FGF23이 숙주 세포 내 또는 숙주 세포 외막 상에 생산되는 경우, 폴슨 등의 방법[J. Biol. Chem., 264, 17619(1989)], 로우 등의 방법[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227(1989), Genes Develop., 4, 1288(1990)], 일본 특허 공개 평05-336963호 공보 또는 국제 공개 제94/23021호 등에 기재된 방법을 사용함으로써, 인간 FGF23을 숙주 세포 외에 적극적으로 분비시킬 수 있다. 또한, 디히드로엽산 환원 효소 유전자 등을 사용한 유전자 증폭제(일본 특허 공개 평2-227075호 공보)를 이용하여 인간 FGF23의 생산량을 상승시킬 수도 있다.
- [0203] 얻어진 인간 FGF23은, 예를 들어 이하와 같이 하여 단리, 정제할 수 있다. 인간 FGF23이 세포 내에 용해 상태에서 발현된 경우에는, 배양 종료 후에 세포를 원심 분리에 의해 회수하고, 수계 완충액에 현탁 후, 초음파 파쇄기, 프렌치 프레스, 만톤 가울린 호모게나이저 또는 다이노 밀 등을 사용하여 세포를 파쇄하여, 무세포 추출액을 얻는다. 해당 무세포 추출액을 원심 분리함으로써 얻어지는 상청으로부터, 통상의 단백질 단리 정제법, 즉, 용매 추출법, 황산암모늄 등에 의한 염석법, 탈염법, 유기 용매에 의한 침전법, 디에틸아미노에틸(DEAE)-세파로스, DIAION HPA-75(미쯔비시 가가꾸사제) 등의 레진을 사용한 음이온 교환 크로마토그래피법, S-Sepharose FF(파머시아사제) 등의 레진을 사용한 양이온 교환 크로마토그래피법, 부틸세파로스, 페닐세파로스 등의 레진을 사용한 소수성 크로마토그래피법, 분자체를 사용한 겔 여과법, 친화성 크로마토그래피법, 크로마토그래피 포커싱법, 또는 등전점 전기 영동 등의 전기 영동법 등의 방법을 단독 또는 조합하여 사용하여, 정제 표품을 얻을 수 있다.
- [0204] 인간 FGF23이 세포 내에 불용체를 형성하여 발현된 경우에는, 상기와 마찬가지로 세포를 회수 후 파쇄하여, 원심 분리를 행함으로써, 침전 분획으로서 해당 인간 FGF23의 불용체를 회수한다. 회수한 해당 인간 FGF23의 불용체를 단백질 변성제로 가용화한다. 해당 가용화액을 희석 또는 투석함으로써, 해당 인간 FGF23을 정상적인 입체 구조로 되돌린 후, 상기와 마찬가지로의 단리 정제법에 의해 폴리펩티드의 정제 표품을 얻을 수 있다.
- [0205] 인간 FGF23 또는 그의 당수식체 등의 유도체가 세포 외에 분비되었을 경우에는, 배양 상청에 있어서 해당 인간 FGF23 또는 그의 당수식체 등의 유도체를 회수할 수 있다. 해당 배양물을 상기와 마찬가지로 원심 분리 등의 방법에 의해 처리함으로써 가용성 분획을 취득하고, 해당 가용성 분획으로부터, 상기와 마찬가지로의 단리 정제법을 사용함으로써, 정제 표품을 얻을 수 있다.
- [0206] 또한, 본 발명에 있어서 사용되는 인간 FGF23은, Fmoc법 또는 tBoc법 등의 화학 합성법에 의해서도 제조할 수 있다. 또한, 어드밴스드 캠텍사제, 퍼킨 엘머사제, 파머시아사제, 프로테인 테크놀로지 인스트루먼트사제, 신세셀-베가사제, 퍼셉티브사제 또는 시마즈 세이사쿠쇼사제 등의 펩티드 합성기를 이용하여 화학 합성할 수도 있다.
- [0207] (2) 동물의 면역과 융합용 항체 산생 세포의 조제
- [0208] 3 내지 20주령의 마우스, 래트 또는 햄스터 등의 동물에, (1)에서 얻어지는 항원을 면역하여, 그 동물의 비장, 림프절, 말초혈 중의 항체 산생 세포를 채취한다. 또한, 마우스 FGF23 녹아웃 마우스를 피면역 동물로서 사용할 수도 있다.
- [0209] 면역은, 동물의 피하, 정맥 내 또는 복강 내에, 예를 들어 프로인드의 완전 아쥘반트 또는 수산화알루미늄겔과 백일해균 백신 등의 적당한 아쥘반트와 함께 항원을 투여함으로써 행한다. 항원이 부분 펩티드인 경우에는, BSA(소혈청 알부민) 또는 KLH(Keyhole Limpet hemocyanin) 등의 캐리어 단백질을 콘쥬게이트를 제작하고, 이것을 면역원으로서 사용한다.
- [0210] 항원의 투여는, 1회째의 투여 후, 1 내지 2주일 간격으로 5 내지 10회 행한다. 각 투여 후 3 내지 7일째에 안저정맥총으로부터 채혈하고, 그 혈청의 항체값을 효소 면역 측정법[Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 등을 사용하여 측정한다. 면역에 사용한 항원에 대하여 그 혈청이 충분한 항체값을 나타낸 동물을 융합용 항체 산생 세포의 공급원으로 한다.
- [0211] 항원의 최종 투여 후 3 내지 7일째에, 면역한 동물로부터 비장 등의 항체 산생 세포를 포함하는 조직을 적출하

고, 항체 산생 세포를 채취한다. 비장 세포를 사용하는 경우에는, 비장을 세단하여 쏘 후, 원심 분리하고, 추가로 적혈구를 제거하여 융합용 항체 산생 세포를 취득한다.

[0212] (3) 골수종 세포의 조제

[0213] 골수종 세포로서는, 마우스로부터 얻어진 주화 세포를 사용하여, 예를 들어 8-아자구아닌 내성 마우스(BALB/c 유래) 골수종 세포주 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)] 또는 P3-X63-Ag8(X63)[Nature, 256, 495(1975)] 등이 사용된다.

[0214] 해당 골수종 세포는, 정상 배지(글루타민, 2-머캅토에탄올, 젠타마이신, FBS 및 8-아자구아닌을 첨가한 RPMI1640 배지)로 계대하고, 세포 융합의 3 내지 4일 전에 정상 배지에 계대하여, 융합 당일 2×10^7 개 이상의 세포수를 확보한다.

[0215] (4) 세포 융합과 모노클로날 항체 산생 하이브리도마의 조제

[0216] (2)에서 얻어지는 융합용 항체 산생 세포와 (3)에서 얻어지는 골수종 세포를 Minimum Essential Medium(MEM) 배지 또는 PBS(인산이나트륨 1.83g, 인산1칼륨 0.21g, 식염 7.65g, 증류수 1리터, pH7.2)로 잘 세정하고, 세포 수가, 융합용 항체 산생 세포:골수종 세포=5 내지 10:1이 되도록 혼합하여, 원심 분리한 후, 상청을 제거한다. 침전된 세포군을 잘 쏘 후, 폴리에틸렌글리콜-1000(PEG-1000), MEM 배지 및 디메틸설폭시드의 혼합액을 37℃에서, 교반하면서 첨가한다. 또한 1 내지 2분간마다 MEM 배지 1 내지 2mL를 몇회 첨가한 후, MEM 배지를 첨가하여 전량이 50mL이 되도록 한다. 원심 분리 후, 상청을 제거한다. 침전된 세포군을 서서히 쏘 후, 융합용 항체 산생 세포에 HAT 배지[히포크산틴, 티미딘 및 아미노프테린을 첨가한 정상 배지] 중에 서서히 세포를 현탁시킨다. 이 현탁액을 5% CO₂인큐베이터 중, 37℃에서 7 내지 14일간 배양한다.

[0217] 배양 후, 배양 상청의 일부를 발취하여, 후술하는 바인딩 어레이 등의 하이브리도마의 선택 방법에 의해, 인간 FGF23을 포함하는 항원에 반응하고, 인간 FGF23을 포함하지 않는 항원에 반응하지 않는 세포군을 선택한다. 이어서, 한계 희석법에 의해 클로닝을 행하고, 안정되고 강한 항체값이 확인된 것을 모노클로날 항체 산생 하이브리도마로서 선택한다.

[0218] (5) 정제 모노클로날 항체의 조제

[0219] 프리스탄 처리[2,6,10,14-테트라메틸펜타데칸(Pristane) 0.5mL를 복강 내 투여하여, 2주일 사육함]한 8 내지 10 주령의 마우스 또는 누드 마우스에, (4)에서 얻어지는 모노클로날 항체 산생 하이브리도마를 복강 내에 주사한다. 10 내지 21일 동안 하이브리도마는 복수암화한다. 이 마우스로부터 복수를 채취하고, 원심 분리하여 고형분을 제거 후, 40 내지 50% 황산암모늄으로 염색하고, 카프릴산 침전법, DEAE-세파로스 칼럼, 프로테인 A-칼럼 또는 겔 여과 칼럼에 의한 정제를 행하여, IgG 또는 IgM 분획을 모아, 정제 모노클로날 항체로 한다.

[0220] 또한, (4)에서 얻어지는 모노클로날 항체 산생 하이브리도마를, 10% FBS를 첨가한 RPMI1640 배지 등으로 배양한 후, 원심 분리에 의해 상청을 제거하고, Hybridoma SFM 배지에 현탁시켜, 3 내지 7일간 배양한다. 얻어진 세포 현탁액을 원심 분리하고, 얻어진 상청으로부터 프로테인 A-칼럼 또는 프로테인 G-칼럼에 의한 정제를 행하여, IgG 분획을 모아, 정제 모노클로날 항체를 얻을 수도 있다. 또한, Hybridoma SFM 배지에는 5% 다이오GF21을 첨가할 수도 있다.

[0221] 항체의 서브클래스 결정은, 서브클래스 타이핑 키트를 사용하여 효소 면역 측정법에 의해 행한다. 단백질량의 정량은 로리법 또는 280nm에서의 흡광도로부터 산출한다.

[0222] (6) 모노클로날 항체의 선택

[0223] 모노클로날 항체의 선택은 이하에 기재한 바와 같이, ELISA를 사용하여, 인간 FGF23에의 항체의 결합성을 측정하는 것 등에 의해 행한다.

[0224] 인간 FGF23을 96웰 플레이트 등의 플레이트에 분주한 후, 제1 항체로서 혈청, 하이브리도마의 배양 상청 또는 정제 모노클로날 항체 등의 피험 물질을 분주하여, 반응시킨다. 이어서, 당해 플레이트를 PBS 등으로, 잘 세정한 후, 제2 항체로서 효소 시약 등으로 표지한 항이뮤노글로불린 항체를 분주하여 반응시킨다. 그 후, 당해 플레이트를 PBS 등으로 잘 세정한 후, 기질을 첨가하여 플레이트 리더로 각 웰의 흡광 계수를 측정함으로써, 인간

FGF23에 대하여 특이적으로 반응하는 모노클로날 항체를 선택한다.

[0225] 2. 유전자 재조합 항체의 제작

[0226] 유전자 재조합 항체의 제작예로서, 이하에 인간형 키메라 항체 및 인간화 항체의 제작 방법을 나타낸다. 유전자 재조합의 마우스 항체, 래트 항체 및 래빗 항체 등도 마찬가지로 방법으로 제작할 수 있다.

[0227] (1) 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 구축

[0228] 유전자 재조합 항체 발현용 벡터는, 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA가 도입된 동물 세포용 발현 벡터이며, 동물 세포용 발현 벡터에 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA를 각각 클로닝함으로써 구축할 수 있다.

[0229] 인간 항체의 C 영역은 임의의 인간 항체의 CH 및 CL을 사용할 수 있다. 예를 들어, 인간 항체의 $\gamma 1$ 서브클래스의 CH 및 κ 클래스의 CL 등을 사용한다. 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA에는, cDNA를 사용하지만, 엑손과 인트론을 포함하는 염색체 DNA를 사용할 수도 있다. 동물 세포용 발현 벡터에는, 인간 항체의 C 영역을 코딩하는 유전자를 도입해 발현할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, 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)] 또는 pSE1UK1Sed1-3[Cytotechnol., 13, 79(1993)] 등을 사용한다. 동물 세포용 발현 벡터 중 프로모터와 인핸서에는, SV40의 초기 프로모터[J. Biochem., 101, 1307(1987)], 모로니 마우스 백혈병 바이러스 LTR[Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960(1987)] 또는 면역 글로불린 H쇄의 프로모터[Cell, 41, 479(1985)]와 인핸서[Cell, 33, 717(1983)] 등을 들 수 있다.

[0230] 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에는, 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 구축 용이함, 동물 세포에의 도입의 용이함, 동물 세포 내에서의 항체 H쇄 및 L쇄의 발현량의 밸런스가 균형을 이루는 등의 점에서, 항체 H쇄 및 L쇄가 동일한 벡터 상에 존재하는 타입(탠덤형)의 유전자 재조합 항체 발현용 벡터[J. Immunol. Methods, 167, 271(1994)]를 사용하지만, 항체 H쇄 및 L쇄가 개개의 벡터 상에 존재하는 타입을 사용할 수도 있다. 탠덤형의 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에는, pKANTEX93(국제 공개 제97/10354호), pEE18[Hybridoma, 17, 559(1998)] 등을 사용한다.

[0231] (2) 인간 이외의 동물 유래의 항체 V 영역을 코딩하는 cDNA의 취득 및 아미노산 서열의 해석

[0232] 비인간 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA의 취득 및 아미노산 서열의 해석은 이하와 같이 하여 행할 수 있다.

[0233] 비인간 항체를 산생하는 하이브리도마 세포로부터 mRNA를 추출하여, cDNA를 합성한다. 합성한 cDNA를 파지 또는 플라스미드 등의 벡터에 클로닝하여 cDNA 라이브러리를 제작한다. 해당 라이브러리로부터, 마우스 항체의 C 영역 부분 또는 V 영역 부분을 코딩하는 DNA를 프로브로서 사용하여, VH 혹은 VL을 코딩하는 cDNA를 갖는 재조합 파지 또는 재조합 플라스미드를 각각 단리한다. 재조합 파지 또는 재조합 플라스미드 상의 목적으로 하는 마우스 항체의 VH 또는 VL의 전염기 서열을 각각 결정하고, 염기 서열로부터 VH 또는 VL의 전아미노산 서열을 각각 추정한다.

[0234] 비인간 항체를 산생하는 하이브리도마 세포를 제작하는 인간 이외의 동물에는, 마우스, 래트, 햄스터 또는 래빗 등을 사용하지만, 하이브리도마 세포를 제작하는 것이 가능하면, 어떠한 동물도 사용할 수 있다.

[0235] 하이브리도마 세포로부터의 전RNA의 조제에는, 티오시안산구아니딘-트리플루오로아세트산세슘법[Methods in Enzymol., 154, 3(1987)] 또는 RNA easy kit(키아젠사제) 등의 키트 등을 사용한다.

[0236] 전RNA로부터의 mRNA의 조제에는, 올리고(dT) 고정화 셀룰로오스 칼럼법[MolecularCloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor LaboratoryPress(1989)] 또는 Oligo-dT30 <Super>mRNA Purification(등록 상표) Kit(다카라 바이오사제) 등의 키트 등을 사용한다. 또한, Fast Track mRNA Isolation(등록 상표) Kit(인비트로젠사제) 또는 QuickPrep mRNA Purification(등록 상표) Kit(파머시아사제) 등의 키트를 사용하여 하이브리도마 세포로부터 mRNA를 조제할 수도 있다.

[0237] cDNA의 합성 및 cDNA 라이브러리의 제작에는, 공지된 방법[MolecularCloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor LaboratoryPress(1989), Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons(1987-1997)] 또는 SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(인비트로젠사제) 혹은 ZAP-cDNA Synthesis(등록 상표) Kit(스트라타진사제) 등의 키트 등을 사용한다.

- [0238] cDNA 라이브러리의 제작 시, 하이브리도마 세포로부터 추출한 mRNA를 주형으로 하여 합성한 cDNA를 도입하는 벡터에는, 해당 cDNA를 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, ZAP Express[Strategies, 5, 58(1992)], pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)], λ ZAPII(Stratagene사제), λgt10, λgt11[DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49(1985)], Lambda BlueMid(클론테크사제), λExCell, pT7T3-18U(파머시아사제), pCD2[Mol. Cell. Biol., 3, 280(1983)] 또는 pUC18[Gene, 33, 103(1985)] 등을 사용한다.
- [0239] 파지 또는 플라스미드 벡터에 의해 구축되는 cDNA 라이브러리를 도입하는 대장균에는, 해당 cDNA 라이브러리를 도입, 발현 및 유지할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, 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)] 또는 JM105[Gene, 38, 275(1985)] 등을 사용한다.
- [0240] cDNA 라이브러리로부터의 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA 클론의 선택에는, 동위 원소 혹은 형광 표지한 프로브를 사용한 콜로니·하이브리다이제이션법 또는 플라크·하이브리다이제이션법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)] 등을 사용한다.
- [0241] 또한, 프라이머를 조제하고, mRNA로부터 합성한 cDNA 또는 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여, Polymerase Chain Reaction법[이하, PCR법이라 표기함, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons(1987-1997)]을 행함으로써 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 조제할 수도 있다.
- [0242] 선택된 cDNA를, 적당한 제한 효소 등으로 절단 후, pBluescript SK(-)(스트라타진사제) 등의 플라스미드에 클로닝하여, 통상 사용되는 염기 서열 해석 방법 등에 의해 해당 cDNA의 염기 서열을 결정한다. 염기 서열 해석 방법에는, 예를 들어 디데옥시법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)] 등의 반응을 행한 후, ABI PRISM3700(PE 바이오 시스템즈사제) 또는 A.L.F.DNA 시퀀서(파머시아사제) 등의 염기 서열 자동 분석 장치 등을 사용한다.
- [0243] 결정한 염기 서열로부터 VH 및 VL의 전아미노산 서열을 각각 추정하고, 기지의 항체 VH 및 VL의 전아미노산 서열[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써, 취득한 cDNA가 분비 시그널 서열을 포함하는 항체의 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열을 코딩하고 있는지를 각각 확인한다. 분비 시그널 서열을 포함하는 항체의 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열에 대해서는, 기지의 항체 VH 및 VL의 전아미노산 서열[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써, 분비 시그널 서열의 길이 및 N 말단 아미노산 서열을 추정할 수 있고, 나아가 그들이 속하는 서브그룹을 알 수 있다. 또한, VH 및 VL의 각 CDR의 아미노산 서열에 대해서도, 기지의 항체 VH 및 VL의 아미노산 서열[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써 알아낼 수 있다.
- [0244] 또한, 얻어진 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열을 사용하여, 예를 들어 SWISS-PROT 또는 PIR-Protein 등의 임의의 데이터베이스에 대하여 BLAST법[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)] 등의 상동성 검색을 행하여, VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열이 신규인지를 확인할 수 있다.
- [0245] (3) 인간형 키메라 항체 발현 벡터 또는 인간형 키메라 항체 개변체 발현 벡터의 구축
- [0246] (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에, 각각 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 각각 클로닝함으로써, 인간형 키메라 항체 발현 벡터를 구축할 수 있다.
- [0247] 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA의 3' 말단측과, 인간 항체의 CH 또는 CL의 5' 말단측을 연결하기 위해서, 연결 부분의 염기 서열이 적절한 아미노산을 코딩하며, 또한 적당한 제한 효소 인식 서열이 되도록 설계한 VH 및 VL의 cDNA를 제작한다. 제작된 VH 및 VL의 cDNA를, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에 그들이 적절한 형으로 발현되도록 각각 클로닝하여, 인간형 키메라 항체 발현 벡터를 구축한다.
- [0248] 또한, 비인간 항체 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, 적당한 제한 효소의 인식 서열을 양단에 갖는 합성 DNA를 사용하여 PCR법에 의해 각각 증폭시키고, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에 클로닝할 수도 있

다.

[0249] (4) 인간화 항체의 V 영역을 코딩하는 cDNA의 구축

[0250] 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA는, 이하와 같이 하여 구축할 수 있다.

[0251] 비인간 항체의 VH 또는 VL의 CDR의 아미노산 서열을 이식하기 위한, 인간 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열을 각각 선택한다. 선택하는 FR의 아미노산 서열에는, 인간 항체 유래의 것이면, 어느 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, Protein Data Bank 등의 데이터베이스에 등록되어 있는 인간 항체의 FR의 아미노산 서열 또는 인간 항체의 FR의 각 서브그룹의 공통 아미노산 서열[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)] 등을 사용한다. 항체의 결합 활성의 저하를 억제하기 위해서, 원래의 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열과 가능한 한 높은 상동성(적어도 60% 이상)의 FR의 아미노산 서열을 선택한다.

[0252] 이어서, 선택한 인간 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열에, 원래의 항체 CDR의 아미노산 서열을 각각 이식하여, 인간화 항체의 VH 또는 VL의 아미노산 서열을 각각 설계한다. 설계한 아미노산 서열을 항체의 유전자의 염기 서열에 보이는 코돈의 사용 빈도[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]를 고려하여 DNA 서열로 변환하고, 인간화 항체의 VH 또는 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열을 각각 설계한다.

[0253] 설계한 DNA 서열에 기초하여, 100 염기 전후의 길이를 포함하는 몇개의 합성 DNA를 합성하고, 그들을 사용하여 PCR 반응을 행한다. 이 경우, PCR 반응에서의 반응 효율 및 합성 가능한 DNA의 길이로부터, 바람직하게는 VH, VL 각각에 대하여 각 6개의 합성 DNA를 설계한다. 또한, 양단에 위치하는 합성 DNA의 5' 또는 3' 말단에 적당한 제한 효소의 인식 서열을 도입함으로써, 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에 용이하게 클로닝할 수 있다.

[0254] PCR 반응 후, 증폭 산물을 pBluescript SK(-)(스트라타진사제) 등의 플라스미드에 각각 클로닝하고, (2)에 기재된 방법과 마찬가지로의 방법에 의해, 염기 서열을 결정하여, 원하는 인간화 항체의 VH 또는 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열을 갖는 플라스미드를 취득한다.

[0255] 또는, 설계한 DNA 서열에 기초하여, VH 전체 길이 및 VL 전체 길이를 각각 1개의 장쇄 DNA로서 합성한 것을, 상기 PCR 증폭 산물 대신에 사용할 수도 있다. 또한, 합성 장쇄 DNA의 양단에 적당한 제한 효소의 인식 서열을 도입함으로써, 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에 용이하게 클로닝할 수 있다.

[0256] (5) 인간화 항체의 V 영역의 아미노산 서열 개변

[0257] 인간화 항체는, 비인간 항체의 VH 및 VL의 CDR만을 인간 항체의 VH 및 VL의 FR에 이식한 것만으로는, 그의 항원 결합 활성은 원래의 비인간 항체에 비교하여 저하된다[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]. 인간화 항체에서는, 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 서열 중에서, 직접 항원과의 결합에 관여하고 있는 아미노산 잔기, CDR의 아미노산 잔기와 상호 작용하는 아미노산 잔기, 및 항체의 입체 구조를 유지하고, 간접적으로 항원과의 결합에 관여하고 있는 아미노산 잔기를 동정하고, 그들 아미노산 잔기를 원래의 비인간 항체의 아미노산 잔기로 치환함으로써, 저하된 항원 결합 활성을 상승시킬 수 있다.

[0258] 항원 결합 활성에 관계되는 FR의 아미노산 잔기를 동정하기 위해서, X선 결정 해석[J. Mol. Biol., 112, 535(1977)] 또는 컴퓨터 모델링[Protein Engineering, 7, 1501(1994)] 등을 사용함으로써, 항체의 입체 구조의 구축 및 해석을 행할 수 있다. 또한, 각각의 항체에 대하여 수종의 개변 항체를 제작하여, 각각의 항원 결합 활성과의 상관을 검토하는 것을 반복하고, 시행 착오함으로써 필요한 항원 결합 활성을 갖는 인간화 항체를 취득할 수 있다.

[0259] 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 잔기는, 개변용 합성 DNA를 사용하여 (4)에 기재된 PCR 반응을 행함으로써, 개변시킬 수 있다. PCR 반응 후의 증폭 산물에 대해서 (2)에 기재된 방법에 의해, 염기 서열을 결정하여, 목적으로 하는 개변이 실시된 것을 확인한다.

[0260] (6) 인간화 항체 발현 벡터의 구축

[0261] (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에, 구축한 유전자 재조합 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 각각 클로닝하여, 인간화 항체 발현 벡터를 구

축할 수 있다.

- [0262] 예를 들어, (4) 및 (5)에서 얻어지는 인간화 항체의 VH 또는 VL을 구축할 때에 사용하는 합성 DNA 중, 양단에 위치하는 합성 DNA의 5' 또는 3' 말단에 적당한 제한 효소의 인식 서열을 도입함으로써, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에 그들이 적절한 형으로 발현되도록 각각 클로닝한다.
- [0263] 또한, 상술한 키메라 항체, 인간화 항체 등의 유전자 재조합 항체를 제작하는 경우에, 다른 2종류의 항체 유래의 H쇄(또는 VH)와 L쇄(또는 VL)를 재조합한 항체 발현용 벡터를 제작함으로써, VL 치환 키메라 항체 발현용 벡터를 구축할 수 있다.
- [0264] (7) 유전자 재조합 항체의 일과성 발현
- [0265] (3) 및 (6)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터, 또는 그들을 개변한 발현 벡터를 사용하여 유전자 재조합 항체의 일과성 발현을 행하여, 제작한 다종류의 키메라 항체, 인간화 항체의 항원 결합 활성을 효율적으로 평가할 수 있다.
- [0266] 발현 벡터를 도입하는 숙주 세포에는, 유전자 재조합 항체를 발현할 수 있는 숙주 세포라면, 어떠한 세포라도 사용할 수 있지만, 예를 들어 COS-7 세포[American Type Culture Collection(ATCC) 번호: CRL1651]를 사용한다 [Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283(1991)].
- [0267] COS-7 세포에의 발현 벡터의 도입에는, DEAE-텍스트란법[Methods in Nucleic Acids Res., CRC press(1991)] 또는 리포펙션법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)] 등을 사용한다.
- [0268] 발현 벡터의 도입 후, 배양 상청 중의 유전자 재조합 항체의 발현량 및 항원 결합 활성은 효소 면역 항체법 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단샤 사이언티픽 (1987)] 등을 사용하여 측정한다.
- [0269] (8) 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질 전환주의 취득과 유전자 재조합 항체의 조제
- [0270] (3) 및 (6)에서 얻어진 유전자 재조합 항체 발현용 벡터, 또는 그들을 개변한 발현 벡터를 적당한 숙주 세포에 도입함으로써 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질 전환주를 얻을 수 있다.
- [0271] 숙주 세포에의 발현 벡터의 도입에는, 일렉트로포레이션법[일본 특허 공개 평2-257891호 공보, Cytotechnology, 3, 133(1990)] 등을 사용한다.
- [0272] 유전자 재조합 항체 발현용 벡터를 도입하는 숙주 세포에는, 유전자 재조합 항체를 발현시킬 수 있는 숙주 세포라면, 어떠한 세포라도 사용할 수 있다. 예를 들어, CHO-K1(ATCC CCL-61), DUKXB11(ATCC CCL-9096), Pro-5(ATCC CCL-1781), CHO-S(Life Technologies, Cat#11619), 래트 미엘로마 세포 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(ATCC 번호: CRL1662 또는 YB2/0이라고도 함), 마우스 미엘로마 세포 NS0, 마우스 미엘로마 세포 SP2/0-Ag14(ATCC 번호: CRL1581), 마우스 P3X63-Ag8.653 세포(ATCC 번호: CRL1580), 디히드로엽산 환원 효소 유전자 (Dihydroforate Reductase, 이하, dhfr라 표기함)가 결손된 CHO 세포(CHO/DG44 세포)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)] 등을 사용한다.
- [0273] 또한, 세포 내 당뉴클레오타이드 GDP-푸코오스의 합성에 관여하는 효소 등의 단백질, N-글리코시드 결합 복합형 당쇄의 환원 말단의 N-아세틸글루코사민의 6위치에 푸코오스의 1위치가 α 결합하는 당쇄 수식에 관여하는 효소 등의 단백질 혹은 세포 내 당뉴클레오타이드 GDP-푸코오스의 골지체에서의 수송에 관여하는 단백질 등의 활성이 저하 또는 결실된 숙주 세포, 예를 들어 α 1,6-푸코오스 전이 효소 유전자가 결손된 CHO 세포(국제 공개 제 2005/035586호, 국제 공개 제02/31140호), 렉틴 내성을 획득한 Lec13[Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55(1986)] 등을 사용할 수도 있다.
- [0274] 발현 벡터의 도입 후, 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질 전환주는, G418 황산염(이하, G418이라 표기함) 등의 약제를 포함하는 동물 세포 배양용 배지로 배양함으로써 선택한다(일본 특허 공개 평2-257891호 공보).
- [0275] 동물 세포 배양용 배지에는, RPMI1640 배지(인비트로젠사제), GIT 배지(니혼 세이야쿠사제), EX-CELL301 배지(JRH사제), IMDM 배지(인비트로젠사제) 혹은 Hybridoma SFM 배지(인비트로젠사제), 또는 이들 배지에 FBS 등의 각종 첨가물을 첨가한 배지 등을 사용한다. 얻어진 형질 전환주를 배지 중에서 배양함으로써 배양 상청 중에

유전자 재조합 항체를 발현 축적시킨다. 배양 상청 중의 유전자 재조합 항체의 발현량 및 항원 결합 활성은 ELISA법 등에 의해 측정할 수 있다. 또한, dhfr 유전자 증폭제(일본 특허 공개 평2-257891호 공보) 등을 이용하여, 형질 전환주가 산생하는 유전자 재조합 항체의 발현량을 향상시킬 수 있다.

[0276] 유전자 재조합 항체는, 형질 전환주의 배양 상청으로부터 프로테인 A-칼럼을 사용하여 정제한다[Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]. 또한, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피 및 한외 여과 등의 단백질의 정제에서 사용되는 방법을 조합할 수도 있다.

[0277] 정제한 유전자 재조합 항체의 H쇄, L쇄 혹은 항체 분자 전체의 분자량은, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법[Nature, 227, 680(1970)] 또는 웨스턴 블로팅법[Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 등 사용하여 측정할 수 있다.

[0278] 3. 정제 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편의 활성 평가

[0279] 정제한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편의 활성 평가는, 이하와 같이 행할 수 있다.

[0280] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편의 인간 FGF23에 대한 결합 활성은, ELISA법 또는 표면 플라즈몬 공명법 등을 사용하여 측정할 수 있다.

[0281] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편의 인간 FGF23 중화 활성은, 상기 리포터 검정 등을 사용하여 측정할 수 있다.

[0282] 4. 본 발명의 항인간 FGF23 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 사용한 질환의 치료 방법

[0283] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편은, 인간 FGF23이 관련되는 질환의 치료에 사용할 수 있다.

[0284] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 함유하는 치료제는, 유효 성분으로서의 해당 항체 또는 해당 항체 단편만을 포함하는 것이어도 되지만, 통상은 약리학적으로 허용되는 1 이상의 담체와 함께 혼합하여, 제제학의 기술 분야에 있어서 공지된 방법에 의해 제조한 의약 제제로서 제공된다.

[0285] 투여 경로로서는, 예를 들어 경구 투여 또는 구강 내, 기도 내, 직장 내, 피하, 근육 내 혹은 정맥 내 등의 비경구 투여를 들 수 있다. 투여 형태로서는, 예를 들어 분무제, 캡슐제, 정제, 산제, 과립제, 시럽제, 유제, 좌제, 주사제, 연고 또는 테이프제 등을 들 수 있다.

[0286] 경구 투여에 적당한 제제로서는, 유제, 시럽제, 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등을 들 수 있다.

[0287] 유제 또는 시럽제와 같은 액체 조제물은, 물, 자당, 소르비톨 혹은 과당 등의 당류, 폴리에틸렌글리콜 혹은 프로필렌글리콜 등의 글리콜류, 호마유, 올리브유 혹은 대두유 등의 유류, p-히드록시벤조산에스테르류 등의 방부제 또는 스트로베리 플레이버 혹은 페퍼민트 등의 플레이버류 등을 첨가제로서 사용하여 제조한다.

[0288] 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등은, 유당, 포도당, 자당 혹은 만니톨 등의 부형제, 진분 혹은 알긴산나트륨 등의 붕괴제, 스테아르산마그네슘 혹은 탈크 등의 활택제, 폴리비닐알코올, 히드록시프로필셀룰로오스 혹은 젤라틴 등의 결합제, 지방산에스테르 등의 계면 활성제 또는 글리세린 등의 가소제 등을 첨가제로서 사용하여 제조한다.

[0289] 비경구 투여에 적당한 제제로서는, 주사제, 좌제 또는 분무제 등이다. 주사제는, 염용액 혹은 포도당 용액, 또는 그 양자가 혼합물을 포함하는 담체 등을 사용하여 제조한다. 좌제는 카카오 버터, 수소화 지방 또는 카르복실산 등의 담체를 사용하여 제조한다.

[0290] 분무제는 수용자의 구강 및 기도 점막을 자극하지 않으면서, 또한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 미세한 입자로서 분산시켜, 용이하게 흡수시키는 담체 등을 사용하여 제조한다. 담체로서는, 예를 들어 유당 또는 글리세린 등을 사용한다. 또한, 에어로졸 또는 드라이 파우더로서 제조할 수도 있다. 또한, 상기 비경구제에 있어서도, 경구 투여에 적당한 제제에서 첨가제로서 예시한 성분을 첨가할 수도 있다.

[0291] 5. 본 발명의 항인간 FGF23 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 사용한 질환의 진단 방법

[0292] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용하여, 인간 FGF23을 검출 또는 측정함으로써, 인간 FGF23 관련 질환을 진단할 수 있다.

- [0293] 인간 FGF23 관련 질환의 진단은, 예를 들어 환자체 내에 존재하는 인간 FGF23을 면역학적 방법에 의해 검출 또는 측정하여 행할 수 있다.
- [0294] 면역학적 방법이란, 표지를 실시한 항원 또는 항체를 사용하여, 항체량 또는 항원량을 검출 또는 측정하는 방법이다. 예를 들어, 방사성 물질 표지 면역 항체법, 효소 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 발광 면역 측정법, 웨스턴 블로트법 또는 물리화학적 방법 등을 사용한다.
- [0295] 방사성 물질 표지 면역 항체법은, 예를 들어 항원 또는 항원을 발현한 세포 등에, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 반응시키고, 또한 방사선 표지를 실시한 항이뮤노글로불린 항체 또는 해당 항체 단편을 반응시킨 후, 신틸레이션 카운터 등으로 측정한다.
- [0296] 효소 면역 측정법은, 예를 들어 항원 또는 항원을 발현한 세포 등에, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 반응시키고, 또한 효소 등으로 표지를 실시한 항이뮤노글로불린 항체 또는 결합 단편을 반응시킨 후, 기질을 첨가하여 반응액의 흡광도를 흡광 광도계로 측정한다. 예를 들어 샌드위치 ELISA법 등을 사용한다. 효소 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 공지[효소 면역 측정법, 이가쿠쇼인(1987)]된 효소 표지를 사용할 수 있다.
- [0297] 예를 들어, 알칼리 포스파타아제 표지, 퍼옥시다아제 표지, 루시페라아제 표지 또는 비오틴 표지 등을 사용한다. 샌드위치 ELISA법은, 고상에 항체를 결합시킨 후, 검출 또는 측정 대상인 항원을 포획시켜, 포획된 항원에 제2 항체를 반응시키는 방법이다. 해당 ELISA법에서는, 검출 또는 측정하고자 하는 항원을 인식하는 항체 또는 항체 단편이며, 항원 인식 부위의 다른 2종류의 항체를 준비하여, 그 중, 제1 항체 또는 항체 단편을 미리 플레이트(예를 들어, 96웰 플레이트)에 흡착시키고, 다음에 제2 항체 또는 항체 단편을 FITC 등의 형광 물질, 퍼옥시다아제 등의 효소 또는 비오틴 등으로 표지해둔다. 상기 항체가 흡착된 플레이트에, 생체 내에서 분리된, 세포 또는 그의 파쇄액, 조직 또는 그의 파쇄액, 세포 배양 상청, 혈청, 홍수, 복수 또는 안액 등을 반응시킨 후, 표지한 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 반응시켜, 표지 물질에 따른 검출 반응을 행한다. 농도 기지의 항원을 단계적으로 희석하여 제작한 검량선으로부터, 시험 샘플 중의 항원 농도를 산출한다. 샌드위치 ELISA법에 사용하는 항체로서는, 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체 중 어느 것을 사용해도 되고, Fab, Fab' 또는 F(ab)₂ 등의 항체 프래그먼트를 사용해도 된다. 샌드위치 ELISA법에서 사용하는 2종류의 항체의 조합으로서, 다른에피토프를 인식하는 모노클로날 항체 또는 항체 단편의 조합이어도 되고, 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체 또는 항체 단편의 조합이어도 된다.
- [0298] 형광 면역 측정법은, 문헌[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단샤 사이언티픽(1987)] 등에 기재된 방법으로 측정한다. 형광 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 공지[형광 항체법, 소프트 사이언스사(1983)]의 형광 표지를 사용할 수 있다. 예를 들어, FITC 또는 RITC 등을 사용한다.
- [0299] 발광 면역 측정법은 문헌[생물 발광과 화학 발광 임상 검사 42, 히로카와 쇼텐(1998)] 등에 기재된 방법으로 측정한다. 발광 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 공지된 발광체 표지를 들 수 있고, 아크리디늄에스테르 또는 로핀 등을 사용한다.
- [0300] 웨스턴 블로트법은, 항원 또는 항원을 발현한 세포 등을 SDS(도데실황산나트륨)-PAGE(폴리아크릴아미드 겔)[Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]로 분획한 후, 해당 겔을 폴리불화비닐리덴(PVDF)막 또는 니트로셀룰로오스막에 블로팅하여, 해당 막에 항원을 인식하는 항체 또는 항체 단편을 반응시키고, 또한 FITC 등의 형광 물질, 퍼옥시다아제 등의 효소 표지 또는 비오틴 표지 등을 실시한 항마우스 IgG 항체 또는 결합 단편을 반응시킨 후, 해당 표지를 가시화함으로써 측정한다.
- [0301] 물리화학적 방법은, 예를 들어 항원인 인간 FGF23과 본 발명의 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 결합시킴으로써 응집체를 형성시키고, 이 응집체를 검출함으로써 행한다. 이 밖에도 물리화학적 방법으로서, 모세관법, 일차원 면역 확산법, 면역 비탁법 또는 라텍스 면역 비탁법[임상 검사법 제요, 가네하라 슛판(1998)] 등을 사용할 수도 있다. 라텍스 면역 비탁법은, 항체 또는 항원을 감작시킨 입경 0.1 내지 1 μ m 정도의 폴리스티렌 라텍스 등의 담체를 사용하여, 대응하는 항원 또는 항체에 의해 항원 항체 반응을 발생시키면, 반응액 중의 산란광은 증가하고, 투과광은 감소한다. 이 변화를 흡광도 또는 적분구 탁도로서 검출함으로써 시험 샘플 중의 항원 농도 등을 측정한다.
- [0302] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명하지만, 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0303] 실시예

[0304] [실시예 1] A 항체의 분해물 검출

[0305] 국제 공개 제2008/099969호에 기재되는 항인간 FGF23 항체의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 서열 번호 1, 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 서열 번호 2에 기재한다. 이하, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 인간 IgG1 항체를 A 항체라 기재한다.

[0306] A 항체를 실시예 2와 마찬가지로의 방법으로 제작하고, 당해 항체 용액의 용매를, 10mM 소듐L-글루타메이트, 262mM D-소르비톨 및 0.05mg/mL 폴리소르베이트 80을 포함하는, pH4의 용매로 치환하였다. 얻어진 항체 용액을, 40도에서 1개월간 정치(이하, 40도 1M 검체라 기재함) 또는 -80도에서 1개월간 정치한 후 해동(압축 해체)하였다(이하, 이니셜 검체라 기재함).

[0307] 그 후, 40도 1M 검체 및 이니셜 검체를 사용하여 SEC 분석과 환원 조건에서의 SDS-PAGE를 행하였다. SEC 분석의 결과, 이니셜 검체에 있어서는, 항체의 분해물에 상당하는 피크가 약 3% 정도를 나타낸 한편, 40도 1M 검체는 9.32%를 나타냈다.

[0308] 또한, SDS-PAGE의 결과, 이니셜 검체에 비해, 40도 1M 검체에서는, 50kDa 부근의 H쇄보다도 약 10kDa 작은 사이즈에 위치하는 밴드(밴드 A)가 현저하게 진해져 있고, 그것과 상대하여 H쇄의 밴드가 얇아져 있었다. 따라서, 밴드 A는 H쇄의 분해물의 밴드이며, 40도 1M 검체는 H쇄에서 분해되는 것이 시사되었다. 밴드 A에 대해서, N 말단 아미노산 서열을 분석한 결과, A 항체의 중쇄 가변 영역의 99번째의 D와 100번째의 I에서 절단되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0309] [실시예 2] I100 개변 항체의 제작

[0310] A 항체에 대해서, VH에 있어서의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 100번째의 아미노산 잔기인 I를, 표 1에 기재하는 아미노산 잔기와 치환한 항체를 이하에 기재하는 방법으로 제작하였다. 이하, 표 1에 기재된 항체의 일부 또는 전부를, I100 개변 항체라고도 기재한다.

[0311] [표 1]

항체의 명칭	I 1 0 0과 치환한 아미노산	중쇄 가변 영역의 아미노산 서열
I 1 0 0 A	A	서열 번호 3
I 1 0 0 L	L	서열 번호 4
I 1 0 0 V	V	서열 번호 5
I 1 0 0 Y	Y	서열 번호 6
I 1 0 0 W	W	서열 번호 7
I 1 0 0 T	T	서열 번호 8
I 1 0 0 S	S	서열 번호 9
I 1 0 0 R	R	서열 번호 10
I 1 0 0 Q	Q	서열 번호 11
I 1 0 0 N	N	서열 번호 12
I 1 0 0 M	M	서열 번호 13
I 1 0 0 K	K	서열 번호 14
I 1 0 0 H	H	서열 번호 15
I 1 0 0 G	G	서열 번호 16
I 1 0 0 F	F	서열 번호 17
I 1 0 0 E	E	서열 번호 18
I 1 0 0 D	D	서열 번호 19

[0312]

[0313] 표 1에 기재하는 각 항체의 VH의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열에 대응하는 유전자 단편을, 심리스 클로닝법(파스맥사에 위탁)을 사용하여 발현 벡터에 도입할 필요한 플라스미드를 제작하였다. H쇄 발현 벡터로서는 시그널 서열 및 인간 γ 쇄 정상 영역 서열을 갖는 pCI-0tCAG_hG1 벡터를 사용하였다. 어느 클론도, H쇄 정상 영역은 인간 IgG1을 사용하였다.

[0314] 또한, I100 개변 항체의 VL의 아미노산 서열은, 모두 A 항체의 VL의 아미노산 서열(서열 번호 2)을 사용하였다. L쇄 발현 벡터로서는 시그널 서열 및 인간 κ 쇄 정상 영역 서열을 갖는 pCI-0tCMV_hK 벡터를 사용하였다. 완성

한 플라스미드는, QIAGEN Plasmid Maxi Kit(QIAGEN사)를 사용하여 대량 조제하였다.

[0315] 이어서, 각 항체를 Expi293 Expression System Kit(Life Technologies사)를 사용하여 일과성으로 발현시켰다. 플라스미드의 도입 방법은 첨부 서류를 따랐다. L쇄 발현 벡터와 H쇄 발현 벡터는, 1:2의 비율로 혼합하여 도입하였다. 플라스미드 도입 후의 세포를, 37도, 5% CO₂, 125rpm의 조건 하에서 3일간 배양하였다. 그 후, 세포 배양 현탁액의 원심 분리를 행하고, 0.2 μ m 필터(Thermo Scientific사)를 통하여 배양 상청을 회수하였다. 배양 상청으로부터 MabSelect SuRe(GE Healthcare사)를 사용한 어피니티 정제에 의해, 정제 항체를 취득하였다.

[0316] 구체적으로는, 칼럼에 충전한 레진을 PBS로 평형화한 후, 당해 칼럼에 배양 상청을 첨가하여, PBS로 2회 세정하고, 워시 버퍼 1(1M NaCl가 첨가된 PBS), 워시 버퍼 2(20mM 시트르산, 50mM NaCl, pH5.0)로 각 1회 세정 후, 용출 버퍼(20mM 시트르산, 50mM NaCl, pH3.4)를 사용하여 항체를 용출하였다.

[0317] 얻어진 항체 용액에 중화 버퍼(1M 인산-NaOH, pH7.0)를 1/10양 첨가하여 중화하고, NAP25(GE Healthcare사)를 사용하여 항체 용액의 용매를 PBS로 치환하였다. 버퍼 치환 후의 항체 용액에 대해서, Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units(밀리포어사)를 사용하여 한외 여과에 의한 농축을 행하고, Nanodrop(Thermo Scientific사)를 사용하여 흡광도 A280을 측정하고, 항체 용액의 농도 측정과 조정을 행하였다. 흡광 계수는, C.N.Pace 등의 방법에 따라서(1995, Prot. Sci.4: 2411-2423) 각각의 인간화 항체의 아미노산 서열로부터 산출하였다.

[0318] [실시예 3] I100 개변 항체의 항원 결합 활성 평가

[0319] 실시예 2에서 얻어진 I100 개변 항체와 A 항체에 대해서, 재조합 인간(Recombinant Human) FGF-23(R&D Systems 사, Cat No.2604-FG-025/CF)에 대한 결합 활성을 이하와 같이 측정하였다.

[0320] 인간 항체 포획 키트(Human Antibody Capture Kit)(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지즈 재팬 가부시키키가이샤, Cat.No.BR-1008-39)를 사용하여, 첨부하는 프로토콜에 따라서, 항-인간 IgG 항체(Anti-human IgG antibody)를 CM5 센서칩(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지즈 재팬 가부시키키가이샤, Cat.No.BR100530)에 고정화하였다.

[0321] 항-인간 IgG 항체를 고정화한 플로셀에, 1 μ g/mL로 조제한 항체를 10 μ L/분의 유속으로 30초간 첨가하였다.

[0322] 이어서, 130.5ng/mL로부터 2배 희석으로 단계적으로 5 농도로 조제한 재조합 인간 FGF-23을 30 μ L/분의 유속으로, 결합 반응을 2분간, 해리 반응을 10분간 모니터하였다. 측정은 싱글 사이클법을 사용하였다. 취득한 센서그램은, Bia Evaluation Software(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지즈 재팬 가부시키키가이샤)를 사용하여 해석하고, 각 항체의 속도론 상수를 산출하였다. 산출된 각 항체의 결합 속도 상수(k_a), 해리 속도 상수(k_d) 및 해리 상수[$k_d/k_a=K_D$]의 일부의 결과를 표 2, 표 3에 나타낸다. 표 3의 A_1, A_2, A_3은, 모두 A 항체를 가리킨다.

[0323] [표 2]

항체명	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

[0324]

[0325] [표 3]

항체명	ka	kd	KD (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

[0326]

[0327] 표 2, 표 3으로부터, I100A 항체 및 I100Y 항체를 포함하는 거의 모든 I100 개변 항체에서, A 항체보다도 항원 결합 활성이 저하되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0328] 또한, I100W, I100S, I100K 및 I100E 항체에서는, A 항체보다 항원 결합 활성이 저하되어 있는 것, 및 I100T, I100Q, I100M 및 I100F 항체는, A 항체와 동일 정도의 항원 결합 활성을 갖는 것도 확인할 수 있었다.

[0329] [실시예 4] I100 개변 항체의 분해 억제 효과의 확인

[0330] 실시예 2에서 얻어진 I100 개변 항체 및 A 항체에 대해서, NAP25(GE Healthcare사)를 사용하여 항체 용액의 용매를 10mM 소듐L-글루타메이트 및 262mM D-소르비톨을 포함하는 pH4의 용매로 치환하였다. 얻어진 항체 용액을, 40도에서 1개월간 또는 2주일 정치한 후, 환원 조건 하에서 SDS-PAGE를 행하였다. 각 항체와 A 항체로, 항체의 분해물에 해당하는 40kDa 부근의 밴드 농도를 비교한 결과를 표 4에 나타낸다. A 항체와 비교하여, 개변 항체에서 당해 밴드의 농도가 저하되어 있는 경우에, A 항체와 비교하여, 개변 항체에서 분해가 억제되었다고 판단하였다.

[0331] 표 4의 분해 억제 효과의 란에 기재되는 수치는, 이하와 같이 설정하였다. A 항체보다도 분해가 억제되어 있었던 항체를 1, A 항체와 동일 정도 분해된 항체를 2, A 항체보다도 분해가 촉진된 항체를 3으로 기재하였다.

[0332] [표 4]

항체명	분해 억제 효과
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

[0333]

[0334] 표 4에 나타내는 바와 같이, I100A, I100Y, I100W, I100R, I100N, I100M, I100H, I100G 및 I100D는, A 항체보다도 분해가 억제되었다. I100L, I100V, I100T, I100S, I100K, I100F 및 I100E는, A 항체와 동일 정도 분해되었다. 또한, I100Q는, A 항체보다도 분해가 촉진되었다.

[0335] [실시예 5] A 항체 및 I100 개변 항체의 열안정성 평가

[0336] A 항체 및 I100 개변 항체의 각 항체 도메인(Fab, CH2, CH3)의 열안정성을, 시차 주사 열량 측정(Differential scanning calorimetry, 이하 DSC라 기재함)의 방법으로 평가하였다.

[0337] 측정 샘플은, D-PBS 버퍼로 0.5mg/mL의 농도로 조제하였다. 측정에는, Micro Cal VP-Capillary DSC system(스펙트리스 가부시키가이샤)을 사용하였다. 또한, 25도에서 100도까지 1분간에 1도 승온하는 프로그램으로 측정을 실시하였다. 얻어진 결과를 표 5 및 표 6에 나타낸다.

[0338] [표 5]

항체명	Fab (도)	CH2 or Fab+CH2 (도)	CH3 (도)
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

[0339]

[0340] [표 6]

항체명	Fab (도)	CH2 or Fab+CH2 (도)	CH3 (도)
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

[0341]

[0342] 표 5 및 표 6으로부터, I100A, I100G, I100N 및 I100R은, Fab의 피크와 CH2의 피크가 겹쳐 검출되고 있으며, Fab의 열안정성이 A 항체보다 3 내지 8도 향상되었다. 이상으로부터, I100A, I100G, I100N 및 I100R은, A 항체보다도 구조 안정성이 높아져 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0343] [실시예 6] D105 개변 항체의 제작

[0344] 실시예 2와 마찬가지로의 방법으로, A 항체의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH의 아미노산 서열의 105번째의 D를, 표 7에 나타내는 아미노산 잔기로 치환한 항체(이하, 당해 항체의 일부 또는 전부를 D105 개변 항체라고도 기재함)를 제작하였다.

[0345] [표 7]

항체의 명칭	D105와 치환한 아미노산	중쇄 가변 영역의 아미노산 서열
D 1 0 5 A	A	서열 번호 20
D 1 0 5 E	E	서열 번호 21
D 1 0 5 F	F	서열 번호 22
D 1 0 5 G	G	서열 번호 23
D 1 0 5 H	H	서열 번호 24
D 1 0 5 I	I	서열 번호 25
D 1 0 5 K	K	서열 번호 26
D 1 0 5 L	L	서열 번호 27
D 1 0 5 M	M	서열 번호 28
D 1 0 5 P	P	서열 번호 29
D 1 0 5 Q	Q	서열 번호 30
D 1 0 5 R	R	서열 번호 31
D 1 0 5 V	V	서열 번호 32
D 1 0 5 W	W	서열 번호 33
D 1 0 5 Y	Y	서열 번호 34
D 1 0 5 T	T	서열 번호 35
D 1 0 5 N	N	서열 번호 36
D 1 0 5 S	S	서열 번호 37

[0346]

[0347] [실시예 7] D105 개변 항체의 항원 결합 활성 평가

[0348] 실시예 6에서 얻어진 D105 개변 항체에 대해서, 재조합 인간 FGF-23(R&D Systems사, Cat No.2604-FG-025/CF)에 대한 결합 활성을 실시예 3과 마찬가지로의 방법으로 측정하였다. 얻어진 결과를 표 8, 표 9에 나타낸다. 표 8의 A_1, A_2는 모두 A 항체의 측정 결과이다.

[0349] [표 8]

항체명	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

[0350]

[0351] [표 9]

항체명	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

[0352]

[0353] 표 8, 표 9로부터, D105 개변 항체는, 모두 A 항체보다도 항원 결합 활성이 저하되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0354] [실시에 8] D105 개변 항체의 분해 억제 효과의 확인

[0355] 실시예 6에서 얻어진 D105 개변 항체에 대해서, 실시예 4와 마찬가지로의 방법으로, 항체의 분해 억제 효과를 확인하였다. 또한, 항체 용액은 40도에서 2주일 정치하였다.

[0356] 얻어진 결과를 표 10에 나타낸다. 표 10의 분해 억제 효과의 란에 기재되는 수치는, A 항체보다도 분해가 억제된 항체를 1, A 항체와 동일 정도 분해된 항체를 2, A 항체보다도 분해가 촉진된 항체를 3으로 기재하였다.

[0357] [표 10]

항체명	분해 억제 효과
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

[0358]

[0359] 표 10으로부터, D105E를 제외한 D105 개변 항체 17종은, A 항체보다 분해가 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 어느 항체도, A 항체보다도, SDS-PAGE로 항체의 분해물에 상당하는 약 40kDa의 밴드의 농도가 대폭 저하되어 있으며, 항체의 분해가 대폭 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0360] [실시에 9] I100 개변 항체 및 D105 개변 항체의 인간 FGF23에 대한 중화 활성의 측정

[0361] 실시예 4 및 실시예 8에서 A 항체보다도 항체의 분해가 억제되어 있던 I100 개변 항체 및 D105 개변 항체(I00A, I100N, I100G, I100Y, I100R, I100D, I100H, D105A, D105F, D105G, D105H, D105I, D105K, D105L, D105M, D105P, D105Q, D105R, D105V, D105W, D105Y, D105T, D105N 및 D105S) 24종류에 대해서, 이하에 기재하는 방법으로 인간 FGF23에 대한 중화 활성을 측정하였다.

[0362] 중화 활성의 측정에는, 마우스 Egr1 유전자 유래의 프로모터를 갖는 루시페라아제 발현 벡터로 형질 전환된 α Klotho 안정 발현 HEK293 세포(이하, mEgr1/ α KL/HEK293이라 기재함)를 사용한 프로모터 어세이를 사용하였다. mEgr1/ α KL/HEK293은, Nature 2006 Dec 7; 444(7120)에 기재되는 방법과 마찬가지로의 방법으로 제작하였다.

- [0363] 당해 프로모터 어세이는, FGF23이 mEgr1/αKL/HEK293 상의 αKlotho에 결합되면, 세포 내에 시그널이 흘러들어 루시페라아제 유전자가 발현되고, 당해 루시페라아제의 형광을 검출할 수 있다. FGF23 중화 항체의 존재에 의해, FGF23이 중화되면, 당해 형광 강도가 감소한다.
- [0364] 항체는 10mM 소듐L-글루타메이트 및 262mM D-소르비톨을 포함하는 버퍼에 의해 100 μg/ml로 희석하여, 원액으로 하였다. mEgr1/αKL/HEK293의 표준 배양 배지로서, DMEM 배지(Thermofisher)에 10(vol%)의 소태아 혈청(FetalBovine Serum)(Thermofisher), 1(vol%)의 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 것을 사용하였다.
- [0365] 항체를 상기 표준 배양 배지로 1000배 희석한 농도(100ng/ml)를 최고 농도로 하고, √10배 희석으로 8단계의 희석 계열을 준비하고, 평가에 제공하였다. 평가는 384well 플레이트를 사용하였다. 세포는 2000 세포/well, 첨가하는 FGF23 농도는 4ng/ml로 하였다. FGF23은, 실시예 3과 마찬가지로의 것을 표준 배양 배지로 희석하여 사용하였다.
- [0366] 세포에 각 항체를 첨가 후, 24시간 배양하고, 그 후 FGF23을 첨가하여 4시간 배양하였다. 루시페라아제의 형광 강도는, Bright-Glo(상표) Luciferase Assay System(프로메가)을 사용하고, 멀티플레이트 리더 Envision(perkinelmer)으로 측정하였다.
- [0367] 얻어진 결과에 대해서, FGF23 첨가 시의 형광 강도를 100%, 비첨가 시의 형광 강도를 0%로 하고, 각 항체 첨가 시의 형광 강도의 비율을 산출하여, 그의 IC50값(ng/ml)을 표 11에 나타낸다.

[0368] [표 11]

항체명	IC50 (ng/mL)
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

- [0369]
- [0370] 표 11에 나타내는 바와 같이, 어느 개변 항체도, A 항체보다도 FGF23 중화 활성이 저하되어 있었다.
- [0371] [실시예 10] A 항체의 중쇄 정상 영역 개변 항체의 제작
- [0372] A 항체의 중쇄 정상 영역의 아미노산 개변 항체(이하, CH 개변 항체라 기재함)를 이하에 기재하는 방법으로 제

작하였다.

- [0373] CH 개변 항체는, A 항체의 CH(인간 IgG1)를, 인간 IgG2, IgG2AAS(인간 IgG2의 Fc에 대해서, EU 인덱스 234번째의 발원을 알라닌으로, 237번째의 글리신을 알라닌으로, 및 331번째의 프롤린을 세린으로 치환한 인간 IgG2개변 항체)(Michael, S., et al., J.Immunol., 1997, 159: 3613; J.Immunol. 2000, 164: 4178-4184), 혹은 IgG4PE_R409K(인간 IgG4의 Fc에 대해서, EU 인덱스 228번째의 세린을 프롤린으로, 235번째의 류신을 글루탐산으로, 409번째의 아르기닌을 리신으로 치환한 인간 IgG4 개변 항체)(국제 공개 제2006/033386호)의 CH로 치환한 아이소타입 항체, 또는 A 항체 혹은 A 항체의 아이소타입 항체 3종류의 각각의 Fc 영역에, 인간 및 원숭이 FcRn에의 결합 활성을 향상시키는 것이 알려져 있는 하기 (10-1) 내지 (10-5)의 Fc아미노산 개변을 가한 합계 23종류의 항체를 제작하였다.
- [0374] <Fc 아미노산 개변>
- [0375] (10-1) EU 인덱스 252번째의 M을 Y로, 254번째의 S를 T로, 및 256번째의 T를 E로 치환하는 아미노산 개변(J. Biol. Chem. 2006b; 281: 23514-23524)
- [0376] (10-2) EU 인덱스 250번째의 T를 Q로, 및 428번째의 N을 L로 치환하는 아미노산 개변(J. Biol. Chem. 2004; 279: 6213-6216)
- [0377] (10-3) EU 인덱스 434번째의 N을 A로 치환하는 아미노산 개변(J. Immunol. 1997; 158: 2211-2217),
- [0378] (10-4) EU 인덱스 308번째의 V를 P로 치환하는 아미노산 개변(Drug. Metab. Dispos. 2012a; 40: 1545-1555)
- [0379] (10-5) EU 인덱스 428번째의 M을 L로, 및 434번째의 N을 S로 치환하는 아미노산 개변(Nat. Biotechnol. 2010; 28: 157-159)
- [0380] 이하, A 항체의 CH를 인간 IgG2의 CH로 치환한 CH 개변 항체를 A_G2 항체라 기재한다. 다른 서브클래스로 치환한 CH 개변 항체도 마찬가지로 기재한다.
- [0381] 이하, A 항체의 Fc 영역에 상기 (10-1) 내지 (10-5)의 아미노산 개변을 가한 CH 개변 항체는, 각각 A_YTE 항체, A_QL 항체, A_A 항체, A_P 항체, A_LS 항체라 기재한다. 또한, A_G2 항체, A_G2AAS 항체 및 A_G4PE_R409K 항체에, 상기 (10-1) 내지 (10-5)의 아미노산 개변을 가한 CH 개변 항체도 마찬가지로 기재한다.
- [0382] 실시예 2에서 제작한 A 항체의 H쇄의 가변 영역과 정상 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 플라스미드를, NheI와 BamHI로 제한 효소 처리하여, 정상 영역 부분을 제외한 벡터 단편을 조제하였다. 당해 플라스미드 단편을 바탕으로 하여, 파스택사에서 상기 23종류의 CH 개변 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 유전자 단편을 합성하여 적당한 발현 벡터에 도입할 필요한 플라스미드를 제작하였다. 얻어진 플라스미드를 사용하여, 실시예 2와 마찬가지로의 방법으로 항체를 조제하였다.
- [0383] [실시예 11] A 항체, 및 A 항체의 CH 개변 항체의 FcRn에의 결합 활성의 측정
- [0384] 실시예 2, 10에서 제작한 A 항체, 및 A 항체의 CH 개변 항체에 대해서, 이하에 기재하는 방법으로, 인간 및 원숭이 FcRn에의 결합 활성을 비아코어(Biacore)로 측정하였다.
- [0385] HBS-EP+(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지스 제팬 가부시키키가이샤, Cat.No.BR-1006-69)에 1M의 염산(후지 필름 와코 준야쿠 가부시키키가이샤, Cat.No.083-01095)을 첨가하여, pH6의 HBS-EP+를 조정하였다. 각 항체는, NAP25를 사용하여 상기 pH6의 HBS-EP+로 버퍼를 교환하였다. 인간 FcRn과 원숭이 FcRn도, pH6의 HBS-EP+를 사용하여 희석하였다. 실험에서 사용한 인간 FcRn 및 원숭이 FcRn은, 이하와 같이 제작하였다.
- [0386] 인간 FcRn(가용형 분자로서 발현시키기 위해서, 인간 FcRn의 전체 길이 아미노산 서열 중, 1 내지 297번째의 아미노산만을 사용)과 그의 C 말단에 6개의 히스티딘을 부가한 인간 FcRn-His tag(아미노산 서열: 서열 번호 54)와 인간 β 2 마이크로글로불린(아미노산 서열: 서열 번호 55)을 코딩하는 DNA 서열을 포유 세포의 발현 플라스미드의 CMV 프로모터의 하류에 삽입하였다. 당해 플라스미드를 사용하여, 실시예 2에 나타내는 방법과 마찬가지로, Expi293 Expression System Kit(Life Technologies사)를 사용하여 일과성으로 발현시켰다.
- [0387] 원숭이 FcRn(가용형 분자로서 발현시키기 위해서, 원숭이 FcRn의 전체 길이 아미노산 서열 중, 1 내지 297번째의 아미노산만을 사용)과 그의 C 말단에 6개의 히스티딘을 부가한 원숭이 FcRn-His tag(아미노산 서열: 서열 번호 56)와 원숭이 β 2 마이크로글로불린(아미노산 서열: 서열 번호 57)에 대해서도, 인간 FcRn-His tag와 마찬가지로의 방법으로 일과성으로 발현시켰다.

[0388] 각각의 배양 상청을 취득 후, Ni-NTA 아가로스(Agarose)(QIAGEN, Cat.No.30210)를 사용하여, 인간과 원숭이 FcRn을 정제하였다. 정제 방법에 대해서는, Ni-NTA 아가로스의 매뉴얼에 기재되어 있는 표준적인 방법을 따라서 실시하였다.

[0389] 비아코어의 측정은, 이하의 조건에서 실시하였다. Tetra His Antibody BSA Free(QIAGEN사)를 CM5 센서칩(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지스 재팬 가부시키키가이샤, Cat.No.BR100530)에 고정화하였다. Tetra His Antibody BSA Free를 고정화한 플로셀에, 10 µg/mL로 조제한 인간 FcRn 및 원숭이 FcRn을 10 µL/분의 유속으로 120초간 첨가하였다. 이어서, 450 µg/mL로부터 3배 희석으로 단계적으로 5 농도로 조제한 각 Fc 개변 항체를 30 µL/분의 유속으로, 결합 반응을 2분간, 해리 반응을 5분간 모니터링하였다.

[0390] 측정은, 멀티 사이클법으로 행하였다. 취득한 센서 그래프는, Bia Evaluation Software(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지스 재팬 가부시키키가이샤)를 사용하여 해석하고, 각 항체의 해리 상수[kd1/ka1=KD]를 산출하였다. 그 결과를 표 12, 13에 나타낸다.

[0391] [표 12]

항체명	KD (M)	
	h FcRn	cyno FcRn
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	검출되지 않음
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

[0392]

[0393] [표 13]

항체명	hFcRn 에의 KD (M)
A_LS	1.42E-07
A_G2_LS	3.10E-07
A_G2AAAS_LS	1.59E-07
A_IgG4PE_R409K_LS	1.16E-07

[0394]

[0395] 표 12 및 표 13에 나타내는 바와 같이, A 항체 및 A 항체의 아이소타입(A2_G2, A_G2AAAS 및 A_IgG4PE_R409K 항체)보다도, Fc에 실시예 10(1) 내지 (5)에 기재하는 아미노산 개변을 도입한 CH 개변 항체쪽이, 인간 FcRn 및 원숭이 FcRn에의 결합 활성이 향상되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0396] [실시예 12] I100 및 D105 개변 항체의 CH 개변 항체의 제작

- [0397] 실시예 4 및 실시예 8에서 A 항체보다도 항체의 분해가 억제되는 것을 확인할 수 있었던 I100 및 D105 개변 항체 중, D105N, I100A, I100H 및 I100Y 항체 각각에 대해서, 하기 (12-1) 내지 (12-5)의 아미노산 개변을 가한 CH 개변 항체를 이하에 기재하는 방법으로 제작하였다.
- [0398] (12-1) EU 인덱스 252번째의 M을 Y로, 254번째의 S를 T로, 및 256번째의 T를 E로 치환하는 아미노산 개변
- [0399] (12-2) CH를 인간 IgG1로부터 인간 IgG2로 치환하고, EU 인덱스 252번째의 M을 Y로, 254번째의 S를 T로, 및 256번째의 T를 E로 치환하는 아미노산 개변
- [0400] (12-3) CH를 인간 IgG1로부터 인간 IgG2로 치환하고, EU 인덱스 428번째의 M을 L로, 434번째의 N을 S로 치환하는 아미노산 개변
- [0401] (12-4) CH를 인간 IgG1로부터 인간 IgG4PE_R409K로 치환하고, EU 인덱스 308번째의 V를 P로 치환하는 아미노산 개변
- [0402] (12-5) CH를 인간 IgG1로부터 인간 IgG4PE_R409K로 치환하고, EU 인덱스 428번째의 M을 L로, 및 434번째의 N을 S로 치환하는 아미노산 개변
- [0403] 이하, D105N 항체에 있어서, 상기 (12-1) 내지 (12-5)의 아미노산 개변을 행한 CH 개변 항체를, 각각 D105N_YTE, D105N_G2_YTE, D105N_G2_LS, D105N_G4PE_R409K_P 및 D105N_G4PE_R409K_LS 항체라 기재한다. 기타 항체에 대해서도 마찬가지로의 기재를 한다.
- [0404] 또한, 상기 (12-1) 내지 (12-5)의 아미노산 개변을 행한 CH 개변 항체의 CH의 아미노산 서열은, 각각 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52에 기재한다.
- [0405] 실시예 10에서 제작한 플라스미드를 Bstz17I와 NheI로 제한 효소 처리하여, 가변 영역 부분을 제외한 벡터 단편을 조제하였다. 당해 플라스미드 단편을 바탕으로, 파스맥사에서, D105N, I100A, I100H 및 I100Y 항체의 VH의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 유전자 단편을 합성하고, 적당한 발현 벡터에 도입할 필요한 플라스미드를 제작하였다. 얻어진 플라스미드를 사용하여, 실시예 2와 마찬가지로의 방법으로, 각 항체를 조제하였다.
- [0406] [실시예 13] 중쇄 정상 영역 개변 항체의 FGF23 중화 활성의 측정
- [0407] 실시예 12에서 조제한 20종류의 CH 개변 항체에 대해서, 실시예 9와 마찬가지로의 방법으로, FGF23 중화 활성을 측정하였다. 얻어진 결과를 표 14에 나타낸다.

[0408] [표 14]

항체명	IC50 (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_IgG4 PE_R409K_P	4.1
I100Y_IgG4PE_R409K_LS	2.9

[0409]

[0410] 표 14에 나타내는 바와 같이, 가변 영역의 아미노산 서열이 동일한 항체는, 정상 영역의 아미노산 서열이 바뀌어도, 동일 정도의 FGF23 중화 활성을 나타냈다. 이상으로부터, 각 항체에 있어서의 중쇄 정상 영역의 아미노산 개변은, 항체의 FGF23 중화 활성에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0411] [실시예 14] 항원 결합 활성을 향상시키는 개변 항체의 제작

[0412] I100A와 I100Y 항체에 대해서, 표 2 및 표 3에 기재하는 항원 결합 활성을 향상시키기 위해서, Abwiz Bio사에서 파지 디스플레이법을 사용한 어피니티 머쥬레이션을 행하여, 하기 (14-1) 내지 (14-9)의 아미노산 서열 정보를 취득하였다.

[0413] (14-1) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH에 있어서, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 51번째의 아미노산을 V로, 54번째의 아미노산을 F로, 55번째의 아미노산을 W로, 57번째의 아미노산을 R로, 58번째의 아미노산을 W로, 및 100번째의 아미노산을 A로 치환한 VH(H2B11_A, 아미노산 서열: 서열 번호 38)

[0414] (14-2) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH에 있어서, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 50번째의 아미노산을 L로, 54번째의 아미노산을 W로, 55번째의 아미노산을 H로, 57번째의 아미노산을 T로, 58번째의 아미노산을 F로, 및 100번째의 아미노산을 A로 치환한 VH(J2H2B9_A, 아미노산 서열: 서열 번호 39)

[0415] (14-3) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH에 있어서, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 50번째의 아미노산을 V로, 54번째의 아미노산을 F로, 55번째의 아미노산을 C로, 57번째의 아미노산을 F로, 58번째의 아미노산을 V로, 및 100번째의 아미노산을 A로 치환한 VH(J2H2E9_A, 아미노산 서열: 서열 번호 40)

[0416] (14-4) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH에 있어서, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 51번째의 아미노산을 L로, 54번째의 아미노산을 W로, 55번째의 아미노산을 T로, 57번째의 아미노산을 Y로, 58번째의 아미노산을 R로, 및 100번째의 아미노산을 A로 치환한 VH(2H2E1_A, 아미노산 서열: 서열 번호 41)

[0417] (14-5) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH에 있어서, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 54번째의 아미노산을 W로, 55번째의 아미노산을 V로, 57번째의 아미노산을 R로, 58번째의 아미노산을 A로, 및 100번째의 아미노산을 A로 치환한 VH(2H2E5_A, 아미노산 서열: 서열 번호 42)

- [0418] (14-6) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH에 있어서, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 51번째의 아미노산을 V로, 54번째의 아미노산을 Y로, 55번째의 아미노산을 R로, 57번째의 아미노산을 K로, 58번째의 아미노산을 W로, 및 100번째의 아미노산을 Y로 치환한 VH(2H2E8_Y, 아미노산 서열: 서열 번호 43)
- [0419] (14-7) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL에 있어서, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 91번째의 아미노산을 M으로, 92번째의 아미노산을 Y로, 94번째의 아미노산을 D로, 96번째의 아미노산을 N으로 치환한 VL(L3G12, 아미노산 서열: 서열 번호 44)
- [0420] (14-8) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL에 있어서, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 28번째의 아미노산을 D로, 29번째의 아미노산을 V로, 31번째의 아미노산을 T로, 34번째의 아미노산을 L로 치환한 VL(L1H8, 아미노산 서열: 서열 번호 45)
- [0421] (14-9) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL에 있어서, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 91번째의 아미노산을 L로, 92번째의 아미노산을 Y로, 94번째의 아미노산을 D로, 96번째의 아미노산을 D로 치환한 VL(2L3H7, 아미노산 서열: 서열 번호 46)
- [0422] [실시예 15] 개변 항체의 조제
- [0423] 실시예 14에서 얻어진 아미노산 서열 정보 및 (15-1)에 기재하는 VH의 아미노산 서열을 사용하여, 표 15에 기재하는 A-1 내지 A-8의 개변 항체를 제작하였다.
- [0424] (15-1) 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH에 있어서, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 50번째의 아미노산을 L로, 54번째의 아미노산을 W로, 55번째의 아미노산을 H로, 57번째의 아미노산을 T로, 58번째의 아미노산을 F로, 및 100번째의 아미노산을 Y로 치환한 VH(J2H2B9_Y, 아미노산 서열: 서열 번호 47)
- [0425] [표 15]

항체의 이름	VH의 서열 번호	VL의 서열 번호	중쇄 정상 영역의 서열 번호
A	서열 번호 1	서열 번호 2	서열 번호 53
A-1	서열 번호 39	서열 번호 2	서열 번호 48
A-2	서열 번호 47	서열 번호 2	서열 번호 48
A-3	서열 번호 3	서열 번호 44	서열 번호 48
A-4	서열 번호 6	서열 번호 44	서열 번호 48
A-5	서열 번호 3	서열 번호 45	서열 번호 48
A-6	서열 번호 6	서열 번호 45	서열 번호 48
A-7	서열 번호 3	서열 번호 46	서열 번호 48
A-8	서열 번호 6	서열 번호 46	서열 번호 48

- [0426]
- [0427] 실시예 12와 마찬가지로의 방법으로, 각 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 플라스미드를 제작하여, 실시예 2와 마찬가지로의 방법으로 당해 플라스미드로부터 항체를 조제하였다.
- [0428] [실시예 16] 개변 항체의 평가
- [0429] 실시예 15에서 조제한 8종류의 개변 항체와, 컨트롤로서 A 항체를 사용하여, 항원 결합 활성, FGF23 중화 활성 및 열안정성을 평가하였다. 어느 개변 항체에 대해서도, 버퍼는 D-PBS(나카라이테스크 가부시기가이샤, Code 14249-24), 농도는 0.5mg/mL로 조정된 샘플을 목적에 따라서 희석함으로써 각종 측정을 행하였다.
- [0430] 16-1) 개변 항체의 항원 결합 활성의 측정
- [0431] 실시예 3과 마찬가지로의 방법으로, 인간 FGF23에의 결합 활성을 측정하였다. 또한, 센서칩은 CM5 센서칩에 항-인간 IgG 항체를 고정화하는 대신, ProteinA 센서칩(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지스 재팬 가부시기가이샤, Cat.No.29127555)을 사용하여 실시하였다. 각 항체의 결합 속도 상수(k_a) 및 해리 속도 상수(k_d) 및 로부터 산출된 해리 상수[$kd1/ka1=KD$]를 표 16에 나타낸다.

[0432] [표 16]

항체명	항원 결합 활성 KD (M)	FGF23 중화 활성 IC50(ng/mL) ()는 동일한 측정 로 트에서의 A 항체의 값	pI (4도, 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

[0433]

[0434] 표 16으로부터, A-1 내지 A-8 중 어느 항체도, A 항체와 동일 정도의 항원 결합 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0435] 실시예 3에서 I100A 항체 및 I100Y 항체의 항원 결합 활성은 A 항체보다도 저하되었다. 또한, A-1 내지 A-8 중 어느 항체도, VH의 100번째의 아미노산 잔기는 A 또는 Y이다.

[0436] 이상으로부터, A 항체에 대해서, VH의 100번째의 아미노산 잔기를 A 또는 Y로 치환하면, 항체의 항원 결합 활성이 저하되지만, A-1 내지 A-8 항체가 갖는 추가의 아미노산 잔기의 치환에 의해, 항체의 항원 결합 활성이 A 항체와 동일 정도로까지 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0437] 16-2) 인간 FGF23 중화 활성의 측정

[0438] 개변 항체에 대해서, 실시예 9와 마찬가지로의 방법으로, 인간 FGF23 중화 활성을 측정하였다. 얻어진 결과를 표 16에 나타낸다. 표 16으로부터, 어느 개변 항체도, 동일 측정 로트에서의 A 항체와 동일 정도의 FGF23 중화 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0439] 실시예 9에서는 I100A 항체 및 I100Y 항체의 FGF23 중화 활성은 A 항체보다도 저하되었다. 또한, A-1 내지 A-8 중 어느 항체도, VH의 100번째의 아미노산 잔기는 A 또는 Y이다.

[0440] 이상으로부터, A 항체에 대해서, VH의 100번째의 아미노산 잔기의 A 또는 Y로 치환하면, 항체의 FGF23 중화 활성이 저하되지만, A-1 내지 A-8 항체가 갖는 추가의 아미노산 잔기의 치환에 의해, 항체의 중화 활성이 A 항체와 동일 정도로까지 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0441] 16-3) 등전점의 확인

[0442] 각 항체의 등전점은, iCE3system(Protein Simple사)을 사용하였다. 측정의 담체로서, Pharmalyte 3-10for IEF(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지즈 재팬 가부시키키가이샤, Cat.No.17-0456-01)를 사용하고, 산성 마커로서 pI Marker 5.12(Protein Simple사, Cat. No.102224), 염기성 마커로서 pI Marker 9.77(Protein Simple사, Cat.No.102219)을 사용하였다. 측정 방법은, 표준적인 프로토콜을 따랐다.

[0443] 얻어진 결과를 표 16에 나타낸다. 표 16으로부터, 어느 개변 항체도, A 항체보다 pI가 저하되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0444] 16-4) 항체의 분해 억제율의 확인

[0445] 실시예 4와 마찬가지로의 방법으로, A-1 항체 내지 A-8 항체에 대해서, 분해 억제율을 확인하였다. 또한, 본 실시예에서는, 각 항체를, 40도에서 2주일 정치하고, 바이오 애널라이저 전기 영동 시스템(애질런트·테크놀로지 가부시키키가이샤)과 Agilent Protein230 키트(애질런트·테크놀로지 가부시키키가이샤, Cat.5067-1517)를 사용하여, 항체의 분해를 확인하였다. 샘플 조제와 영동 조건에 대해서는, 키트에 부속되는 프로토콜을 따라서 실험을 행하였다. 얻어진 엘렉트로페로그램에 있어서, 항체의 H쇄의 밴드는 63kDa, 항체의 분해물에 상당하는 밴드는 약 55kDa에 검출되었다. 당해 항체의 분해물에 상당하는 밴드의 피크 면적률(%), 및 A 항체에 대한 각

항체의 분해 밴드 피크 면적률의 비(%)를 표 17과 표 18에 나타낸다.

[표 17]

항체명	분해 밴드 피크 면적률 (%)	분해 밴드 피크 면적률의 비 (%)
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

[표 18]

항체명	분해 밴드 피크 면적률 (%)	분해 밴드 피크 면적률의 비 (%)
A	39.4	100
A-7	9.8	24.9
A-8	5.4	13.7

표 17과 표 18에 나타내는 바와 같이, A 항체와 비교하여, A-1 항체 내지 A-8 항체 모두에서 분해가 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

16-5) 열안정성의 확인

A 항체, A_YTE 항체, A-1 항체, A-3 항체, A-5 항체 및 A-8 항체에 6종의 항체에 대해서, 실시예 5에 기재된 방법과 마찬가지로, 열안정성 평가를 실시하였다. 얻어진 결과를, 표 19에 나타낸다.

[표 19]

항체명	Fab (도)	CH2 또는 Fab+CH2 (도)	CH3 (도)
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

표 19에 나타내는 바와 같이, A 항체와 A_YTE 항체는, 항체의 각 부위의 열안정성에 변화가 없었다. 한편, A_YTE 항체와 동일한 중쇄 정상 영역 아미노산 서열을 갖는 A-1 항체와 A-3 항체에서는, A 항체 및 A_YTE 항체보다도 Fab의 열안정성이 약 3도 향상되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[실시예 17] A-9 항체, A-10 항체의 제작

표 20에 기재하는 A-9 항체 및 A-10 항체를 실시예 2와 마찬가지로의 방법으로 제작하였다(이하, A-9 항체, A-10 항체를 개변 항체라 기재하는 경우도 있음).

A-9 항체의 L쇄 발현 벡터는, 실시예 2의 pCI 벡터가 아니라, pcDNA3.4 벡터(인비트로젠)를 사용하였다. 또한, A-9 항체, A-10 항체 모두, L쇄의 발현 벡터와 H쇄의 발현 벡터를 1:1의 비율로 혼합하여 세포에 도입하였다.

[0459] [표 20]

항체의 이름	VH의 서열 번호	VL의 서열 번호	중쇄 정상 영역의 서열 번호
A-9	서열 번호 3	서열 번호 5 8	서열 번호 48
A-10	서열 번호 6	서열 번호 5 9	서열 번호 48

[0460]

[0461] A-9 항체의 VL은, I100A 항체에 대해서, Abwiz Bio사에서 파지 디스플레이법을 사용한 어피니티 머쥬레이션을 행하여, 하기 아미노산 서열 정보를 취득하였다.

[0462] 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL에 있어서, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 92번째의 아미노산을 W로, 94번째의 아미노산을 D로, 96번째의 아미노산을 D로 치환한 VL(아미노산 서열: 서열 번호 58)

[0463] A-10 항체의 VL은, 하기 VL을 설계하여, 사용하였다.

[0464] 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL에 있어서, 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 92번째의 아미노산을 Y로, 94번째의 아미노산을 D로, 96번째의 아미노산을 D로 치환한 VL(아미노산 서열: 서열 번호 59)

[0465] [실시예 18] 개변 항체의 평가

[0466] 실시예 17에서 조제한 2종류의 개변 항체와, 컨트롤로서 A 항체를 사용하여, 항원 결합 활성, FGF23 중화 활성 및 열안정성을 평가하였다. 어느 개변 항체에 대해서도, 버퍼는 D-PBS(나카라이테스크 가부시기가이샤, Code 14249-24), 농도는 1mg/mL로 조정된 샘플을 목적에 따라서 희석함으로써 각종 측정을 행하였다.

[0467] (18-1) 개변 항체의 항원 결합 활성의 측정

[0468] 실시예 16과 마찬가지로의 방법으로, 인간 FGF23에의 결합 활성을 측정하였다. 각 항체의 결합 속도 상수(ka) 및 해리 속도 상수(kd) 및 으로부터 산출된 해리 상수[kd1/ka1=KD]를 표 21에 나타낸다.

[0469] [표 21]

항체명	항원 결합 활성 KD (M)	FGF23 중화 활성 IC50(ng/mL) ()는 동일한 측정 로 트에서의 A 항체의 값	pI (4도, 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

[0470]

[0471] 표 21로부터, A-9 항체는 A 항체의 2배, A-10 항체는 A 항체와 동일 정도의 항원 결합 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 실시예 3에서는, I100A 항체 및 I100Y 항체에서 A 항체보다도 항원 결합 활성이 저하되었다. 또한, A-9 항체 및 A-10 항체는, VH의 100번째의 아미노산 잔기가 각각 A 및 Y이다.

[0472] 이상으로부터, A 항체의 VH의 100번째의 아미노산 잔기를 A 또는 Y로 치환하면, 항체의 항원 결합 활성이 저하되지만, A-9 항체 및 I100Y 항체가 갖는 추가의 아미노산 잔기의 치환에 의해, 항체의 결합 활성이 A 항체와 동등 이상으로 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0473] (18-2) 인간 FGF23 중화 활성의 측정

[0474] 개변 항체에 대해서, 실시예 9와 마찬가지로의 방법으로, 인간 FGF23 중화 활성을 측정하였다. 얻어진 결과를 표 21에 나타낸다. 표 21로부터, A-9 항체는 A 항체의 3배, A-10 항체는 A 항체의 2배 강한 FGF23 중화 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0475] 실시예 9에서는, I100A나 I100Y는 A 항체보다도 중화 활성이 저하되었다. 또한, A-9 항체 및 A-10 항체는, VH의 100번째의 아미노산 잔기가 각각 A 및 Y이다.

[0476] 이상으로부터, A 항체에 대하여 VH의 100번째의 아미노산 잔기를 A 또는 Y로 치환하면 항체의 FGF23 중화 활성

이 저하되지만, A-9 항체 및 A-10 항체가 갖는 추가의 아미노산 잔기의 치환에 의해, 항체의 FGF23 중화 활성이 A 항체 이상으로 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0477] [실시예 19] 개변 항체의 분해 억제율의 확인

[0478] A-1 항체, A-3 항체, A-5 항체, A-8 항체의 4종류의 개변 항체와, 컨트롤로서 A 항체를 사용하여, 분해 억제율을 확인하였다.

[0479] 또한, 본 실시예에서 사용한 항체는, 목적 유전자 서열을 포유 동물용 발현 벡터에 삽입하고, CHO 세포에 도입 후, 포유 동물 세포용 배지 상청으로부터, MabSelect SuRe(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지스 재팬 가부시키가이샤)를 사용한 어피니티 정제 및 양이온 교환 크로마토그래피에 의해, 정제 항체를 취득하였다. NAP25(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지스 재팬 가부시키가이샤)를 사용하여 항체 용액의 용매를 10mM 소듐L-글루타메이트, 262mM D-소르비톨 및 0.05mg/mL 폴리소르베이스(Polysorbate) 80을 포함하는 pH4 및 pH4.5의 용매로 치환하고, 단백질 농도를 1mg/mL로 하였다.

[0480] 얻어진 항체 용액을, 40도에서 1개월간 및 25도에서 3개월간 정치한 후에 -80도로 동결하였다. 당해 항체 용액을 용해시킨 후, 생물 제제 해석 시스템 PA800Plus(SCIEX사)를 사용하여, 항체의 분해를 확인하였다. 샘플 조제나 분석 등의 기본 조건은, Oscar Salas-Solano 등의 방법에 따라서 실시하여(2006, Anal. Chem.: 6583-6594), 적절히 변경하였다.

[0481] 당해 항체의 분해물에 상당하는 밴드의 피크 면적률(%)에 대해서, pH4.5에서의 결과는 표 22에, pH5.0에서의 결과는 표 23에 나타냈다. 용매 치환 직후에 -80도로 동결한 샘플을 초기(Initial), 40도에서 1개월간 정치한 후에 -80도로 동결한 샘플을 40℃ 1M, 25도에서 3개월간 정치한 후에 -80도로 동결한 샘플을 25℃ 3M으로 표기하였다. 어느 샘플도 동일한 조건에서 용해 후, 측정을 실시하였다.

[0482] [표 22]

항체명	분해 밴드 피크 면적률 초기 (%)	분해 밴드 피크 면적률 40℃1M (%)	분해 밴드 피크 면적률 25℃3M (%)
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

[0483]

[0484] [표 23]

항체명	분해 밴드 피크 면적률 초기 (%)	분해 밴드 피크 면적률 40℃1M (%)	분해 밴드 피크 면적률 25℃3M (%)
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

[0485]

[0486] 표 22와 표 23에 나타내는 바와 같이, 실시예 16과 마찬가지로, 버퍼 조건이 pH4.5 및 pH5.0, 보존 조건이 40도에서 1개월간 및 25도에서 3개월간이어도, A 항체와 비교하여, A-1 항체, A-3 항체, A-5 항체 및 A-8 항체는 모두 분해가 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0487] [실시예 20] 개변 항체의 분해 억제율의 확인

[0488] 실시예 17에서 조제한 2종류의 개변 항체와, 컨트롤로서 A 항체 및 A-1 항체를 사용하여, 분해 억제율을 확인하였다.

[0489] 또한, 본 실시예에서 사용한 A 항체 및 A-1 항체는, 목적 유전자 서열을 포유 동물용 발현 벡터에 삽입하고, CHO 세포에 도입 후, 포유 동물 세포용 배지 상청으로부터, MabSelect SuRe(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지스 재팬 가부시키키가이샤)를 사용한 어피니티 정제 및 양이온 교환 크로마토그래피에 의해, 정제 항체를 취득하였다. NAP25(글로벌 라이프 사이언스 테크놀로지스 재팬 가부시키키가이샤)를 사용하여 항체 용액의 용매를 10mM 소듐L-글루타메이트, 262mM D-소르비톨 및 0.05mg/mL 폴리소르베이트를 포함하는 pH4, pH4.5 및 pH5의 용매로 치환하고, 단백질 농도를 1mg/mL로 하였다.

[0490] 얻어진 항체 용액을, 40도에서 1개월간 정치한 후, 마이크로칩형 전기 영동 시스템 LabChip(퍼킨 엘머사)와 단백질 클리어 리전트(Protein Clear Reagent) 키트(퍼킨 엘머사, Cat.CLS960014)를 사용하여, 항체의 분해를 확인하였다. 샘플 조제와 영동 조건에 대해서는, 키트에 부속되는 프로토콜을 따라서 실험을 행하였다.

[0491] 환원 조건에서의 측정 결과에 있어서의 당해 항체의 분해물에 상당하는 밴드의 피크 면적률(%)에 대해서, pH4.0에서의 결과는 표 24에, pH4.5에서의 결과는 표 25에, pH5.0에서의 결과는 표 26에 나타낸다.

[0492] [표 24]

항체명	분해 밴드 피크 면적률 (%)	분해 밴드 피크 면적률의 비 (%)
A	32.7	100
A-1	11.2	34.2
A-9	9.2	28.0
A-10	5.1	15.6

[0493]

[0494] [표 25]

항체명	분해 밴드 피크 면적률 (%)	분해 밴드 피크 면적률의 비 (%)
A	20.7	100
A-1	7.1	34.4
A-9	5.4	26.0
A-10	3.2	15.3

[0495]

[0496] [표 26]

항체명	분해 밴드 피크 면적률 (%)	분해 밴드 피크 면적률의 비 (%)
A	8.2	100
A-1	3.5	42.7
A-9	2.6	32.1
A-10	1.7	21.0

[0497]

[0498] 표 24, 표 25 및 표 26에 나타내는 바와 같이, A-9 항체, A-10 항체에 대해서도, 버퍼 조건이 pH4.0, pH4.5 또는 pH5.0, 보존 조건이 40도에서 1개월간에 있어서, A 항체와 비교하여 분해가 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0499] [실시예 21]

[0500] 음성 계잡이 원숭이에 대하여, 피험 항체를 단회 피하 투여했을 때의 약리 작용의 지속성을 확인하기 위해서, 혈청 중의 무기 인 농도(mg/dL)의 측정을 실시하였다.

[0501] 피험 항체로서 A8 항체(1.8mg/kg)를 피하 투여하였다. 투여 후 56일간, 경시적으로 채혈을 행하여, 각 시점에서의 혈청 중의 무기 인 농도를 측정하였다. 인 농도의 측정은, 클리날라이저(JCA-BM6070)를 사용하여, PNP-XDH법에 의해 측정하였다.

[0502] 얻어진 결과를 표 27에 나타낸다. A-8 항체 투여 후, 혈청 중의 무기 인 농도는 투여 후 3일째로부터 상승하고, 투여 후 56일째에도 베이스 라인의 무기 인 농도(표 27의 Day0에서의인 농도)에 비해 고값을 나타냈다.

[0503] [표 27]

		A-8 (1.8 mg/kg)
일	-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

[0504]

[0505] 한편, 부로수맵(KRN23, 크리스 비터)은 3mg/kg을 게잡이 원숭이에 단회 피하 투여한 후, 투여 후 3일째로부터 혈청 중의 무기 인 농도가 상승하고, 투여 후 42일째에는 매체 투여군 및 베이스 라인(투여 0일)과 동등까지 무기 인 농도가 저하된다(크리스 비터 피하 주사용 의약품 인터뷰폼 2021년 12월 개정(제5판) P44).

[0506] 따라서 A-8 항체는, 부로수맵에 비해, 게잡이 원숭이에서의 혈청 중의 무기 인 농도 지속 시간이 긴 것이 나타내졌다.

[0507] 또한, A-1 항체, A-5 항체를, 3mg/kg으로 게잡이 원숭이에 피하 투여하고, 상기와 마찬가지로의 방법으로 혈청 중의 무기 인 농도를 측정하였다. 그 결과, 이들 항체는, 부로수맵과 마찬가지로, 투여 후 3일째로부터 혈청 중의 무기 인 농도가 상승하고, 투여 후 42일째에는 베이스 라인까지 무기 인 농도가 저하되었다.

[0508] 부로수맵의 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열은 서열 번호 53으로 표시되고, A-1 항체, A-5 항체, A-8 항체의 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열은, 서열 번호 48로 표시된다. 동일한 중쇄 정상 영역 아미노산 서열을 갖는 A-1 항체, A-5 항체 및 A-8 항체 중, A-8 항체만이 게잡이 원숭이에서 부로수맵보다도 길게 혈청 중의 무기 인 농도가 지속되었다.

[0509] 따라서, A-8 항체가 부로수맵이나 A-1 항체, A-5 항체보다도 게잡이 원숭이에서의 혈청 중의 무기 인 농도의 지속 시간이 긴 것은, 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열의 차이가 아니라, 가변 영역의 아미노산 서열의 차이에 의한 것인 것이 시사되었다.

[0510] [실시예 22]

[0511] 실시예 21과 마찬가지로의 방법으로, 혈청 중의 무기 인 농도(mg/dL)를 측정하였다. 시험 항체로서 A-9 항체, A-10 항체(3.0mg/kg)를 피하 투여하였다. 투여 후 57일간, 경시적으로 채혈을 행하여, 각 시점에서의 혈청 중의 무기 인 농도를 측정하였다.

[0512] 얻어진 결과를 표 28에 나타낸다.

[0513] [표 28]

		A-9	A-10
일	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

[0514]

[0515] 표 28에 나타내는 바와 같이, 실시예 22의 A-8 항체와 마찬가지로, A-9 항체, A-10 항체의 투여 후, 혈청 중의 무기 인 농도는 투여 후 3일째로부터 상승하고, 투여 후 57일째에도 베이스 라인의 무기 인 농도(표 28에 있어서의 0일(day)에서의 인 농도)에 비해 고값을 나타냈다.

[0516] A-9 항체, A-10 항체의 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열은, A-1 항체, A-5 항체 및 A-8 항체의 중쇄 정상 영역 아미노산 서열과 동일한, 서열 번호 48로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0517] 따라서, A-9 항체, A-10 항체에 대해서도, 부로수맙이나 A-1 항체, A-5 항체보다도 게잡이 원숭이에서의 혈청 중의 무기 인 농도의 지속 시간이 긴 것은, 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열의 차이가 아니라, A-8 항체와 마찬가지로 가변 영역의 아미노산 서열의 차이에 의한 것인 것이 시사되었다.

[0518] 본 발명을 상세하면서 또한 특정한 실시 양태를 참조하여 설명했지만, 본 발명의 정신과 범위를 이탈하지 않고 각종 변경이나 수정을 가할 수 있는 것은, 당업자에 있어서 명백하다. 또한, 본 출원은, 2022년 8월 10일자로 출원된 일본 특허 출원(일본 특허 출원 제2022-128011호) 및 2022년 10월 12일자로 출원된 일본 특허 출원(일본 특허 출원 제2022-164256호)에 기초하고 있으며, 그 전체가 인용에 의해 원용된다. 또한, 여기에 인용되는 모든 참조는 전체로서 도입된다.

[0519] **서열표 프리텍스트**

[0520] 서열 번호 1: A 항체의 VH의 아미노산 서열

[0521] 서열 번호 2: A 항체의 VL의 아미노산 서열

[0522] 서열 번호 3: I100A 항체의 VH의 아미노산 서열

[0523] 서열 번호 4: I100L 항체의 VH의 아미노산 서열

[0524] 서열 번호 5: I100V 항체의 VH의 아미노산 서열

[0525] 서열 번호 6: I100Y 항체의 VH의 아미노산 서열

[0526] 서열 번호 7: I100W 항체의 VH의 아미노산 서열

[0527] 서열 번호 8: I100T 항체의 VH의 아미노산 서열

[0528] 서열 번호 9: I100S 항체의 VH의 아미노산 서열

[0529]	서열 번호 10: I100R 항체의 VH의 아미노산 서열
[0530]	서열 번호 11: I100Q 항체의 VH의 아미노산 서열
[0531]	서열 번호 12: I100N 항체의 VH의 아미노산 서열
[0532]	서열 번호 13: I100M 항체의 VH의 아미노산 서열
[0533]	서열 번호 14: I100K 항체의 VH의 아미노산 서열
[0534]	서열 번호 15: I100H 항체의 VH의 아미노산 서열
[0535]	서열 번호 16: I100G 항체의 VH의 아미노산 서열
[0536]	서열 번호 17: I100F 항체의 VH의 아미노산 서열
[0537]	서열 번호 18: I100E 항체의 VH의 아미노산 서열
[0538]	서열 번호 19: I100D 항체의 VH의 아미노산 서열
[0539]	서열 번호 20: D105A 항체의 VH의 아미노산 서열
[0540]	서열 번호 21: D105E 항체의 VH의 아미노산 서열
[0541]	서열 번호 22: D105F 항체의 VH의 아미노산 서열
[0542]	서열 번호 23: D105G 항체의 VH의 아미노산 서열
[0543]	서열 번호 24: D105H 항체의 VH의 아미노산 서열
[0544]	서열 번호 25: D105I 항체의 VH의 아미노산 서열
[0545]	서열 번호 26: D105K 항체의 VH의 아미노산 서열
[0546]	서열 번호 27: D105L 항체의 VH의 아미노산 서열
[0547]	서열 번호 28: D105M 항체의 VH의 아미노산 서열
[0548]	서열 번호 29: D105P 항체의 VH의 아미노산 서열
[0549]	서열 번호 30: D105Q 항체의 VH의 아미노산 서열
[0550]	서열 번호 31: D105R 항체의 VH의 아미노산 서열
[0551]	서열 번호 32: D105V 항체의 VH의 아미노산 서열
[0552]	서열 번호 33: D105W 항체의 VH의 아미노산 서열
[0553]	서열 번호 34: D105Y 항체의 VH의 아미노산 서열
[0554]	서열 번호 35: D105T 항체의 VH의 아미노산 서열
[0555]	서열 번호 36: D105N 항체의 VH의 아미노산 서열
[0556]	서열 번호 37: D105S 항체의 VH의 아미노산 서열
[0557]	서열 번호 38: H2B11_A의 아미노산 서열
[0558]	서열 번호 39: J2H2B9_A의 아미노산 서열
[0559]	서열 번호 40: J2H2E9_A의 아미노산 서열
[0560]	서열 번호 41: 2H2E1_A의 아미노산 서열
[0561]	서열 번호 42: 2H2E5_A의 아미노산 서열
[0562]	서열 번호 43: 2H2E8_Y의 아미노산 서열
[0563]	서열 번호 44: L3G12의 아미노산 서열
[0564]	서열 번호 45: L1H8의 아미노산 서열

- [0565] 서열 번호 46: 2L3H7의 아미노산 서열
- [0566] 서열 번호 47: J2H2B9_Y의 아미노산 서열
- [0567] 서열 번호 48: YTE의 CH의 아미노산 서열
- [0568] 서열 번호 49: G2_YTE의 CH의 아미노산 서열
- [0569] 서열 번호 50: G2_LS의 CH의 아미노산 서열
- [0570] 서열 번호 51: G4PE_R409K_P의 CH의 아미노산 서열
- [0571] 서열 번호 52: G4PE_R409K_LS의 CH의 아미노산 서열
- [0572] 서열 번호 53: G1 정상 영역의 아미노산 서열
- [0573] 서열 번호 54: 인간 FcRn 세포 외 도메인 His-tag체의 아미노산 서열
- [0574] 서열 번호 55: 인간 $\beta 2$ 마이크로글로불린의 아미노산 서열
- [0575] 서열 번호 56: 게잡이 원숭이 FcRn 세포 외 도메인 His-tag체의 아미노산 서열
- [0576] 서열 번호 57: 게잡이 원숭이 $\beta 2$ 마이크로글로불린의 아미노산 서열
- [0577] 서열 번호 58: A-9 항체의 VL의 아미노산 서열
- [0578] 서열 번호 59: A-10 항체의 VL의 아미노산 서열

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.