



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101652476 B

(45) 授权公告日 2012.07.04

(21) 申请号 200880004814.5 *A61P 3/02* (2006.01)
(22) 申请日 2008.02.14 *A61P 5/18* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61P 19/08* (2006.01)
034018/2007 2007.02.14 JP *A61P 19/10* (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 *C07K 16/22* (2006.01)
2009.08.12 *C12N 1/15* (2006.01)
(86) PCT申请的申请数据 *C12N 1/19* (2006.01)
PCT/JP2008/052918 2008.02.14 *C12N 1/21* (2006.01)
(87) PCT申请的公布数据 *C12N 5/10* (2006.01)
W02008/099969 JA 2008.08.21 *C12P 21/08* (2006.01)

(73) 专利权人 协和发酵麒麟株式会社
地址 日本东京都

(72) 发明人 山崎雄司 浦川到 吉田均
青野友纪子 山下武美 岛田孝志
长谷川尚

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 张萍 李连涛

(51) Int. Cl.
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

审查员 徐益君

权利要求书 1 页 说明书 40 页
序列表 22 页 附图 15 页

(54) 发明名称

抗 FGF23 抗体和含有该抗体的药物组合物

(57) 摘要

本发明提供一种抗 FGF23 抗体和通过使用此抗体对 FGF23 活性的抑制起到预防或治疗作用的一种作为预防或治疗药物的药物组合物。一种由杂交瘤细胞 C10(索取号 FERM BP-10772)产生的抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段。

1. 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其含有与索取号为 FERM BP-10772 的杂交瘤细胞 C10 产生的抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列相同的重链可变区和轻链可变区。

2. 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其含有 SEQ ID NO:12 的从第 20 位 Q 到第 136 位 S 的氨基酸序列所示的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:14 的从第 23 位 A 到第 128 位 K 的氨基酸序列所示的轻链氨基酸序列。

3. 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其中,所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段含有重链可变区和轻链可变区氨基酸序列;且此重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 的从第 20 位 Q 到第 136 位 S 的氨基酸序列所示,此轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 的从第 23 位 A 到第 128 位 K 的氨基酸序列所示。

4. 由索取号为 FERM BP-10772 的杂交瘤细胞 C10 产生的抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段。

5. 如权利要求 1-4 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其中:所述功能性片段是选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、二硫键稳定的 Fv(dsFv)、二聚化的 V 区域(双体)、单链 Fv(scFv) 和 CDR 的肽段。

6. 如权利要求 1-4 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体,其中,所述抗体的种类是 IgG、IgA、IgE 或 IgM。

7. 如权利要求 6 所述抗人 FGF23 抗体,其中,所述抗体的亚类是 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4。

8. 一种药物组合物,其含有如权利要求 1-7 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段作为活性成分。

9. 如权利要求 1-7 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段在制备可通过 FGF23 控制磷代谢和/或维生素 D 代谢的药物中的用途。

10. 如权利要求 1-7 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段在制备预防或治疗矿物质代谢紊乱相关性疾病的药物中的用途。

11. 如权利要求 10 所述的用途,其中,所述矿物质代谢紊乱相关性疾病选自肿瘤性软骨病、ADHR、XLH、骨纤维性结构不良、麦-奥二氏综合征和常染色体隐性低血磷症。

12. 如权利要求 1-7 中任何一项所述的抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段在制备预防或治疗选自骨质疏松症、佝偻病、高钙血症、低钙血症、异位钙化症、骨硬化、派杰病、甲状旁腺机能亢进症、甲状旁腺机能减退症和搔痒症的疾病的药物中的用途。

13. 索取号为 FERM BP-10772 的杂交瘤细胞 C10。

14. 核酸,其包含编码重链可变区氨基酸序列的核酸和编码轻链可变区氨基酸序列的核酸,其中,此重链可变区氨基酸序列由 SEQ ID NO:11 所示从第 58 位 C 到第 408 位 A 的碱基序列编码,此轻链可变区氨基酸序列由 SEQ ID NO:13 所示从第 67 位 G 到第 384 位 A 的碱基序列编码。

15. 一种载体,其含有如权利要求 14 中所述核酸。

16. 一种宿主细胞,其含有如权利要求 15 中所述载体。

17. 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段的制造方法,包括步骤:培养如权利要求 16 中所述的宿主细胞以表达抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段。

抗 FGF23 抗体和含有该抗体的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可以与 FGF23 抗原特异性结合的抗 FGF23 抗体。而且,本发明还涉及一种可用于预防或治疗 FGF23 过量引起的或其他原因引起的矿物质代谢紊乱的药物,其包含抗 FGF23 抗体作为活性成分。尤其是,本发明涉及一种用于治疗低血磷症性佝偻病(hypophosphatemic ricket)和软骨病(osteomalachia)的药物。

背景技术

[0002] 作为一种可以刺激成纤维细胞系 NIH3T3 细胞增长的物质,成纤维细胞生长因子首次分离纯化自牛垂体。然后,从不同组织中分离出多种类似的蛋白质,这些蛋白质产物组成了一个多肽家族(FGF 家族)。到目前为止,在脊椎动物中,得到分离纯化的 FGF 家族成员已有 22 种蛋白质。关于这些蛋白质的生物学活性,目前已知,其不仅具有成纤维细胞生长活性,还具有多种其它不同功能如中胚层和神经外胚层生长活性,血管生成活性,特定发育阶段肢芽形成活性等。FGF 的基因表达也具有位置和时间差异性。它通常仅仅表达于特定发育阶段或成人的某些位点。目前已知,至少有四个编码 FGF 受体的基因,FGFR1, FGFR2, FGFR3, 和 FGFR4。另外,关于 FGFR1, FGFR2, FGFR3, 已知的是,对于每一种受体,由于不同的剪切方式,产生的受体蛋白具有不同的胞外结构域。另外,目前已知,肝素和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖通过与 FGF 和 FGF 受体的相互作用而控制其活性。另外,还有很多虽因具有与 FGF 相似的结构,而属于 FGF 家族,但其生物学活性和受体结合特性等几乎不明。有一篇综述(详情请看文献:Ornitz,D. 等,Genome biology,2 :3005. 1-3005. 12,2001)总结了这些 FGF 家族成员的特性。

[0003] FGF23(一般来讲,有时候也被记作 FGF-23)的首次克隆是利用 FGF15 同源性的数据库搜索和 PCR 方法自小鼠获得的。随后,利用小鼠 FGF23 同源序列,人 FGF23 也得到克隆。人 FGF23 是一条由 251 个氨基酸残基组成的多肽。另外,预计,作为分泌信号序列,在蛋白质分泌时,多肽 N- 末端由多达 24 个氨基酸组成的氨基酸序列被剪切(详情请看文献:Yamashita, T 等,Biochem. Biophys. Res. Commun. ,277 :494-498,2000)。然后,对常染色体显性型低血磷症性佝偻病/软骨病(以下称作 ADHR)的研究发现,ADHR 病人的基因突变区域变窄(narrow down),随着相关基因鉴定的进展,发现 ADHR 病人的 FGF23 基因发生了一个导致此现象的特有的错义突变(详情请看文献:White, K. E. 等,Nature Genet. ,26 :345-348,2000)。这些发现强烈表明,FGF23 在体内具有重要的生理学意义。另一方面,是什么在决定 FGF23 的生物学活性,这通过低血磷症性佝偻病和软骨病的一种类型-肿瘤性软骨病(neoplastic osteomalachia)得到了研究。在这些疾病中,恶性肿瘤产生和分泌一种液态疾病起始因子,正如所想的那样,像低血磷症性佝偻病和软骨病等疾病是由此疾病起始因子导致的。

[0004] 在对所述由恶性肿瘤产生的疾病起始因子的研究中,FGF23 作为一种在肿瘤中过量表达的基因被克隆。此外,通过给予这种因子,低血磷症性佝偻病/软骨病被重现(详情请看文献 Shimada, T. 等,Proc. Natl. Acad. Sci. ,98 :6500-6505,2001 以及 International

Publication Number W002/14504pamphlet)。基于以上研究表明,在体内,FGF23 表现出与磷和钙元素相关的的代谢控制有关的生物学功能。另外,由此表明,作为系统性因子,FGF23 通过体内循环来实现自己功能。此外,最近的研究显示与健康人相比,肿瘤性软骨病患者血管中 FGF23 浓度更高(详情请看文献 Yamazaki, Y. 等, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87 : 4957-4960, 2002 以及 Jonsson, K. B., 等, *N. Engl. J. Med.*, 348 :1656-1663, 2003)。

[0005] 此外,已知 X 染色体-连锁遗传的低血磷症性佝偻病(以下称为 XLH)是一种在临床上与 ADHR 和肿瘤性软骨病患者具有相似表现的疾病。患有这种疾病的患者血液中也含有高水平的 FGF23(详情请看文献 Yamazaki, Y. 等, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87 : 4957-4960, 2002 以及 Jonsson, K. B., 等, *N. Engl. J. Med.*, 348 :1656-1663, 2003)。

[0006] 换句话说,在肿瘤性软骨病和 XLH 等疾病中发现的维生素 D 耐受性佝偻病和软骨病的病因先前并不清楚,但而今表明此分泌性致病因子正是 FGF23。此外,在关于其它类型的矿物质代谢性疾病如骨纤维性结构不良、麦-奥二氏综合征、常染色体隐性低血磷症性佝偻病等疾病的研究中,也有过有关血液中高浓度的 FGF23 与低血磷症(hypophosphatemia)、佝偻病和软骨病的相关性报道(详情请看文献 Riminucci, M. 等, *J. Clin. Invest.*, 112 :683-692, 2003 ;Yamamoto, T. 等, *J. Bone Miner. Metab.*, 23 : 231-237, 2005 ;Lorenz-Depiereux, B. 等, *Nat. Genet.*, 38 :1248-1250, 2006)。

[0007] 以上报道表明,体内过量表达 FGF23 会导致低血磷症、低血磷症伴随性佝偻病和软骨病等疾病。此外,有报道表明,慢性肾功能不全性高血磷症患者的血清中出现反常高水平 FGF23。有证据证明 FGF23 的过量表达可能与慢性肾功能不全时发生的部分矿物质代谢疾病有关(详情请看文献 Gupta, A. 等, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89 :4489-4492, 2004, Larsson, T. 等, *KidneyInt.*, 64 :2272-2279, 2003)。

[0008] 由于引起这些疾病的原因是 FGF23 的过量表达,那么抑制 FGF23 的活性或消除 FGF23 就可能成为治疗这些疾病的办法。到目前为止,已见有抗-FGF23 小鼠单克隆抗体用于抑制 FGF23 活性的研究报道(详情请看文献 Yamashita, T. 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277 :494-498, 2000)。在这篇报道中,当将抗-FGF23 鼠单克隆抗体 2C3B 和 3C1 E 给予正常小鼠时,小鼠内源性 FGF23 功能被抑制,通过肾完成的磷排泄也被抑制。通过干扰肾中维生素 D 代谢酶的表达,干扰结果表明血清中磷和 $1\alpha, 25-$ 二羟维生素 D(以下记作 $1, 25D$) 的浓度升高。此外,将抗-FGF23 鼠单克隆抗体重复给予 Hyp 小鼠,所述 Hyp 小鼠是一种具有高水平 FGF23 血清,低血磷症,骨延长机能障碍和钙化机能障碍的 XLH 疾病的模型小鼠,其结果,可以看到小鼠血液中磷浓度升高,而且,骨延长机能障碍和钙化机能障碍症状得到改善。通过这些结果可以看到,FGF23 活性抑制性抗体作为一种用于 FGF23 过量表达型疾病的治疗药物是可行的。然而,在文献报道中所用到的 2C3B 和 3C1E 抗体是鼠源抗体。鼠源抗体会被人宿主当做异物从而导致人宿主产生一种所谓的“人抗鼠抗体”(也即是 HAMA)反应,这可能会导致严重的副作用(详情请看文献 Van Kroonenbergh, M. J. 等, *Nucl. Med. Commun.* 9 :919-930, 1988)。

[0009] 为避免产生这种问题,一种解决方法是研制嵌合型抗体(详情请看欧洲专利申请公告号 120694 说明书和欧洲专利申请公告号 125023 说明书)。嵌合型抗体包含来源于两个或两个以上物种的抗体片段(如鼠源抗体可变区和人源抗体恒定区等)。这种类型的嵌合型抗体的优势是原鼠源抗体的对抗原的结合特性得到保留。但是,另一方面,嵌合

型抗体仍然会诱导人宿主产生“人抗嵌合型抗体”(也即是“HACA”)反应(详情请看文献 Bruggemann, M. 等, J. Exp. Med., 170 :2153-2157, 1989)。

[0010] 此外,已经有重组型抗体被研制出来,其中,只有取代型抗体的一部分是互补决定区(complementarity determining region, CDR)(详情请看英国专利号 GB2188638 A 专利说明书和美国专利号 5585089 专利说明书)。应用 CDR 移植技术,制成一种由鼠 CDR、人可变构架区和恒定区组成的抗体(也即是人源化抗体)(详情请看文献 Riechmann, L. 等, Nature, 332 :323-327, 1988)。目前已经知道,使用上述方法,抗 -FGF23 鼠源抗体(如 2C3B 抗体等)可通过人抗体序列取代鼠源抗体而被人源化。然而,在发生人源化时,有可能导致对抗原的亲合性降低。

[0011] 另外,目前对由 XLH 等类似疾病引起的低血症性佝偻病的主要治疗方法是定期口服给药维生素 D 制剂和磷酸。但是,这种治疗手段会导致一个问题,也即是这会导致患者及其家庭要承受由每天用药次数和剂量决定的相当大的负担。因此,为减轻患者及其家庭承受的这种负担,需要对血清磷酸盐浓度和血清 1, 25D 浓度有长时间持续性增长作用的(sustained raising action) 低血磷症治疗性药物,从而延长给药之间的间隔时间。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供人抗 FGF23 抗体及其药物组合物,所述药物组合物例如用于预防或治疗等作用并且几乎没有副作用的药物,其通过利用所述抗体抑制 FGF23 作用并由此预防和治疗疾病。

[0013] 此外,本发明的目的是提供一种抗体,所述抗体是能用作低血磷症治疗药物的抗 -FGF23 抗体,与现有的抗 -FGF23 抗体相比,它仅使用单一剂量即可产生对血清磷酸盐(phosphate) 浓度和血清 1, 25D 浓度的更长时间的持续增长作用。本发明的另一个目的是提供一种药物组合物,例如使用所述抗体用于预防和治疗 FGF23 相关性疾病的药物。

[0014] 目前,低血磷症性佝偻病的主流治疗手段是每天数次定期口服维生素 D 和磷酸盐的给药方式。然而,每天数次的大剂量口服药物,产生一个问题,也即病人被迫承受一个大的负担。本发明获得的抗 -FGF23 人单克隆抗体, C10 抗体,被证实具有对血清磷酸盐浓度和血清 1, 25D 浓度的更长时间持续增长作用。这些表明,与目前已有的低血磷症治疗性药物相比, C10 抗体可望在治疗上具有明显的优越性。

[0015] 本发明如下:

[0016] 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其含有杂交瘤细胞 C10(索取号: FERM BP-10772) 产生的抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区。

[0017] 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其含有 SEQ ID NO :12 的从第 20 位 Q 到第 136 位 S 的氨基酸序列所示的重链氨基酸序列和 / 或 SEQ ID NO :14 的从第 23 位 A 到第 128 位 K 的氨基酸序列所示的轻链氨基酸序列。

[0018] 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其中,所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段含有重链可变区和 / 或轻链可变区氨基酸序列;且此重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO :12 的从第 20 位 Q 到第 136 位 S 的氨基酸序列所示,此轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO :14 的从第 23 位 A 到第 128 位 K 的氨基酸序列所示。

[0019] 由杂交瘤细胞 C10(索取号 FERM BP-10772) 产生的抗人 FGF23 抗体或此抗体的功

能性片段。

[0020] 一种抗体或此抗体的功能性片段,其结合于人 FGF23 上的全部或部分表位,所述人 FGF23 上的全部或部分表位结合由杂交瘤细胞 C10(索取号 FERM BP-10772)产生的抗体。

[0021] 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其含有在上述 [3] 中所述的重链可变区,该重链可变区具有任何一个或所有以下互补决定区(CDR):由 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列所示的互补决定区(CDR)1,由 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列所示的 CDR2,以及由 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列所示的 CDR3。

[0022] 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其含有在上述 [3] 中所述的轻链可变区,该轻链可变区具有任何一个或所有以下互补决定区(CDR):由 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列所示的互补决定区(CDR)1,由 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列所示的 CDR2,以及由 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列所示的 CDR3。

[0023] 一种抗人 FGF23 抗体或该抗体的功能性片段,所述抗人 FGF23 抗体或该抗体的功能性片段含有重链可变区,该重链可变区具有任何一个或所有以下互补决定区(CDR):由 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列所示的互补决定区(CDR)1,由 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列所示的 CDR2,以及由 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列所示的 CDR3;所述抗人 FGF23 抗体或该抗体的功能性片段还含有轻链可变区,该轻链可变区具有任何一个或所有以下互补决定区(CDR):由 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列所示的互补决定区(CDR)1,由 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列所示的 CDR2,以及由 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列所示的 CDR3。

[0024] 如 [1]-[8] 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其中:所述功能性片段是选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、二硫键稳定的 Fv(dsFv)、二聚化的 V 区域(双体)、单链 Fv(scFv) 和 CDR 的肽段。

[0025] 如 [1]-[8] 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其包含重链和/或轻链,所述重链和/或轻链具有的氨基酸序列中一个或几个氨基酸残基被缺失、取代或添加。

[0026] 如 [1]-[10] 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体,其中,所述抗体的种类是 IgG、IgA、IgE 或 IgM。

[0027] 如 [11] 所述抗人 FGF23 抗体,其中,所述抗体的亚类是 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4。

[0028] 一种药物组合物,其含有如 [1]-[12] 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段作为活性成分。

[0029] 一种药物组合物,其可通过 FGF23 控制磷代谢和/或维生素 D 代谢并含有如 [1]-[12] 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段作为活性成分。

[0030] 一种用于矿物质代谢紊乱相关性疾病的预防或治疗的药物组合物,其含有如 [1]-[12] 中任何一项所述抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段作为活性成分。

[0031] 如 [15] 所述药物组合物,其中,所述矿物质代谢紊乱相关性疾病选自肿瘤性软骨病、ADHR、XLH、骨纤维性结构不良、麦-奥二氏综合征和常染色体隐性低血磷症。

[0032] 一种药物组合物,其用于预防或治疗选自骨质疏松症、佝偻病、高钙血症、低钙血症、异位钙化症、骨硬化、派杰病、甲状旁腺机能亢进症、甲状旁腺机能减退症和搔痒症的疾病,此药物组合物含有如 [1]-[12] 中任何一项所述的抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段作为活性成分,

- [0033] 杂交瘤细胞 C10 (索取号 FERM BP-10772)。
- [0034] 一种编码重链可变区氨基酸序列的核酸,其中,此重链可变区氨基酸序列由 SEQ ID NO :11 所示从第 58 位 C 到第 408 位 A 的碱基序列编码。
- [0035] 一种编码轻链可变区氨基酸序列的核酸,其中,此轻链可变区氨基酸序列由 SEQ ID NO :13 所示从第 67 位 G 到第 384 位 A 的碱基序列编码。
- [0036] 一种载体,其含有如 [19] 或 [20] 中所述核酸。
- [0037] 一种宿主细胞,其含有如 [21] 中所述载体。
- [0038] 一种抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段的制造方法,包括步骤:培养如 [22] 中所述的宿主细胞以表达抗人 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段。
- [0039] 附图简要说明
- [0040] 图 1 为 C10 表达载体构建过程示意图
- [0041] 图 2 显示的是 N5KG1_C10_LH 中抗体重链基因的核苷酸序列 (SEQ IDNO :30) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :31)。图中矩形框标记的氨基酸序列为分泌信号序列 (前导序列)。
- [0042] 图 3 显示的是 N5KG1_C10_LH 中抗体轻链基因的核苷酸序列 (SEQ IDNO :32) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :33)。图中矩形框标记的氨基酸序列为分泌信号序列 (前导序列)。
- [0043] 图 4 显示的是 C10 表达载体的结构。
- [0044] 图 5A 显示的是用夹心酶联免疫分析法 (ELISA 法) 对纯化得到的全长人 FGF23 蛋白进行检测所得到的测定结果,其中利用 2C3B 抗体或 C10 抗体作为固定抗体,3C1E 抗体为检测抗体。
- [0045] 图 5B 显示的是用夹心酶联免疫分析法 (ELISA 法) 对表达 FGF23 的猕猴 (cynomolgus monkey) 细胞培养物上清液检测后所得到的测定结果,其中利用 2C3B 抗体或 C10 抗体作为固定抗体,3C1E 抗体为检测抗体。
- [0046] 图 6 中图表所显示的是对猕猴作 2C3B 抗体或 C10 抗体给药时,随时间推移在不同时间点猕猴血清磷浓度的检测结果。测定值以平均值 \pm 标准误差表示。此外,用斯氏 T 检验法 (Student-test) 检验其与溶剂给药组的显著差异,对有显著差异 ($p < 0.05$) 的测定值在图表中标上 * 号。
- [0047] 图 7 中图表所示为:以对猕猴溶剂给药 5 天后,猕猴血清磷浓度为基准,对猕猴作可溶性 2C3B 抗体或 C10 抗体给药 5 天后,猕猴血清磷浓度的升高。
- [0048] 图 8 中图表所示为:对猕猴作溶剂、2C3B 抗体或 C10 抗体给药时,随时间推移在不同时间点猕猴血清 1, 25D 浓度的检测结果。测定值以平均值 \pm 标准误差表示。此外,用斯氏 T 检验法在同一天进行测试组与溶剂给药组之间的显著性差异测试时,对有显著差异 ($p < 0.05$) 的测定值在图表中标上 * 号。
- [0049] 图 9 中图片显示的是用 C15 抗体和蛋白质杂交 (Western blotting) 技术,检测非强制性表达的细胞培养物上清液 (作为对照)、表达 FGF23 的人细胞培养物上清液和表达 FGF23 的猕猴细胞培养物上清液。
- [0050] 图 10 显示的是 pPSs FGF23 载体的结构。
- [0051] 图 11 显示的是 pUS FGF23 KI 载体的结构。
- [0052] 图 12 所示为 3 种等位基因结构:一种等位基因结构为其中的药物抗性基因 ($loxp-peo^r$) 被定向,一种等位基因结构为其中的人 FGF23(-SP)+ 药物抗性基因

(loxp-peo^r) 通过 pUS hFGF23 KI 载体被定向,一种等位基因结构为其中的药物抗性基因 (loxp-peo^r、loxpv-puro^r) 被敲除,以及 DNA 印迹分析用探针的位置。对图中出现的专有名词的详细解释如下:

[0053] hFGF23(-SP):缺少特定的信号肽编码区的人 FGF23 基因。C_k:小鼠 Ig_k 基因恒定区。loxpv-puro:其两端带有 loxpv 序列的嘌呤霉素抗性基因,所述 loxpv 序列是具有部分突变的 loxp 序列。loxp-neo^r:其两端带有 loxp 序列的新霉素磷酸转移酶抗性基因。

[0054] Ck3' 探针:DNA 印迹 (Southern blotting) 分析探针,用于筛选 hFGF23(-SP+loxpv-puro^r 基因的转入和 loxpv-puro^r 基因的敲除克隆。3' KO- 探针:DNA 印迹分析探针,用于筛选 loxp-neo^r 基因的转入和敲除克隆。E:EcoRI 限制酶切位点。

[0055] 图 13 中图表显示的是对照抗体或 C10 抗体给药处理前 7 天的血清 FGF23 浓度的检测结果。测定值以平均值 +/- 标准误差表示。此外,用斯氏 T 检验法 (Student's t-test) 检验测试组与野生型小鼠组的显著差异,对有显著差异 (p < 0.001) 的组在图表中标上 *** 号。

[0056] 图 14 中图表显示的是对照抗体或 C10 抗体给药处理前 7 天和对照抗体或 C10 抗体首次给药处理 3 天后的血清磷酸盐浓度检测结果。测定值以平均值 +/- 标准误差表示。此外,用斯氏 T 检验法检验测试组与野生型小鼠组的显著差异,对有显著差异 (p < 0.001) 的组在图表中标上 *** 号。另外,一天中检验 hFGF23KI 型小鼠对照抗体给药组与测试组之间的显著差异时,对有显著差异 (p < 0.001) 的 hFGF23KI 型小鼠 C10 抗体给药组在图表中标上 ### 号。

[0057] 图 15 中图表显示的是第五次对照抗体或 C10 抗体给药处理 1 天后血清磷浓度检测结果。测定值以平均值 +/- 标准误差表示。此外,用斯氏 T 检验法检验测试组与野生型小鼠组的显著差异,对有显著差异 (p < 0.001) 的组在图表中标上 *** 号。另外,检验 hFGF23KI 型小鼠对照抗体给药组与测试组之间的显著差异时,对有显著差异 (p < 0.001) 的 hFGF23KI 型小鼠 C10 抗体给药组在图表中标上 ### 号。

[0058] 图 16 中图表显示的是第四次对照抗体或 C10 抗体给药处理 1 天后动物握力试验检测结果。测定值以平均值 +/- 标准误差表示。此外,用斯氏 T 检验法检验测试组与野生型小鼠组的显著差异,对有显著差异 (p < 0.001) 的组在图表中标上 *** 号。此外,检验 hFGF23KI 型小鼠对照抗体给药组与测试组之间的显著差异时,对有显著差异 (p < 0.001) 的 hFGF23KI 型小鼠 C10 抗体给药组在图表中标上 ### 号。

[0059] 图 17 所示的是小鼠股骨组织染色图像,所用的股骨来自于第五次对照抗体或 C10 抗体给药处理 1 天后的小鼠,其中使用的染色方法为 Villanueva-Goldner 染色法。

[0060] 图 18 中图表显示的是小鼠胫骨灰烬重量占胫骨干重的比值测定结果,其中所用的股骨来自于第五次对照抗体或 C10 抗体给药处理 1 天后的小鼠。测定值以平均值 +/- 标准误差表示。此外,用斯氏 T 检验法检验测试组与野生型小鼠组的显著差异,对有显著差异 (p < 0.001) 的组在图表中标上 *** 号。另外,检验 hFGF23KI 型小鼠对照抗体给药组与测试组之间的显著差异时,对有显著差异 (p < 0.001) 的 hFGF23KI 型小鼠 C10 抗体给药组在图表中标上 ### 号。

[0061] [序列表纯文本]

[0062] SEQ ID NO:1-3、5-27、30-33、44-50 合成

[0063] 优选实施方式详述

[0064] 下面,通过对本发明中所用到的专有名词定义的阐述,对本发明作详细说明。

[0065] I、本发明中的抗体

[0066] 1. 抗 -FGF23 抗体和它的功能性片段

[0067] 本发明所述抗体是抗 -FGF23 抗体,其是成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族的成员。

[0068] 在本发明中,抗 FGF23 抗体与 FGF23 或其部分相结合,对 FGF23 或其部分具有反应活性,或识别 FGF23 或其部分。抗 FGF23 抗体也被称为抗 -FGF23 抗体。在本发明中,抗体是免疫球蛋白,其中,组成该免疫球蛋白的重链可变区、重链恒定区、轻链可变区、轻链恒定区的所有结构区域均来自于编码此免疫球蛋白的基因。此抗体优选单克隆抗体。在这里,FGF23 的部分表示 SEQ ID NO:4 所示的 FGF 23 全长氨基酸序列的一部分氨基酸序列,且此部分是包括连续性氨基酸序列的 FGF 23 肽段。优选此抗体含有 SEQ ID NO:12 中从第 20 位 Q 到第 136 位 S 的氨基酸序列和 / 或 SEQ IDNO:14 中从第 23 位 A 到第 128 位 K 的氨基酸序列。此抗体更优选是由杂交瘤细胞 C10 产生的抗体。SEQ ID NO:12 是包含前导序列在内的抗 FGF 23 抗体的重链可变区的氨基酸序列,SEQ ID NO:12 中从第 20 位 Q 到第 136 位 S 的氨基酸序列是此氨基酸序列被剪去前导序列后形成的成熟氨基酸序列片段。另外,SEQ ID NO:14 是包含前导序列在内的抗 FGF 23 抗体的轻链可变区的氨基酸序列,SEQ ID NO:14 中从第 23 位 A 到第 128 位 K 的氨基酸序列是此氨基酸序列被剪去前导序列后形成的成熟氨基酸序列片段。关于抗体类型,免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 E(IgE) 和免疫球蛋白 M(IgM) 均可被使用。优选免疫球蛋白 G(IgG),进一步地,对于免疫球蛋白 G(IgG) 的亚类,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 均可被使用,优选 IgG1、IgG2 和 IgG4。更优选 IgG1。

[0069] 本发明所述抗体也包括抗 FGF23 抗体,此抗体含有新型互补决定区 (CDR) 氨基酸序列。

[0070] CDR 存在于抗体可变区,这部分结构提供抗原识别特异性。可变区的互补决定区之外的部分起到保持互补决定区结构的作用,被称为框架区 (framework region, FR)。恒定区存在于重链和轻链的 C- 末端,且分别称为重链恒定区 (CH) 和轻链恒定区 (CL)。

[0071] 出现在重链可变区的互补决定区是互补决定区 1 (CDR1)、互补决定区 2 (CDR2) 和互补决定区 3 (CDR3)。在重链可变区的这 3 种互补决定区一起被称为重链互补决定区。同样地,出现在轻链可变区的的 3 种互补决定区是互补决定区 1 (CDR1)、互补决定区 2 (CDR2) 和互补决定区 3 (CDR3)。在轻链可变区中的这 3 种互补决定区一起被称为轻链互补决定区。这些互补决定区的序列可利用在美国公共卫生和人类服务部 (1991) 的“具有免疫学重要性的蛋白质序列” (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US DeptHealth and Human Services(1991)) 等中所描述的方法获得。

[0072] 本发明所述抗体优选具有 SEQ ID NO:40 中所示的 CDR1、SEQ ID NO:41 中所示的 CDR2 和 SEQ ID NO:42 中所示的 CDR3 中的至少任意一种或所有互补决定区作为抗体的重链互补决定区。另外,本发明所述抗体优选具有 SEQ ID NO:43 中所示的 CDR1、SEQ ID NO:44 中所示的 CDR2 和 SEQ ID NO:45 中所示的 CDR3 中的至少任意一种或所有互补决定区作为抗体的轻链互补决定区。本发明所述抗体优选是与 FGF23 结合的抗体,并具有 SEQ ID NO:40 中所示的 CDR1、SEQ ID NO:41 中所示的 CDR2 和 SEQ ID NO:42 中所示的 CDR3 作为抗体

的重链互补决定区,且具有 SEQ ID NO:43 中所示的 CDR1、SEQ ID NO:44 中所示的 CDR2 和 SEQ ID NO:45 中所示的 CDR3 作为抗体的轻链互补决定区。

[0073] 本发明所述抗体的 CDR 序列没有特别限制。然而,本发明所述抗体优选包含 SEQ ID NO:40-45 所示的互补决定区序列中任一种或多种互补决定区,更优选包含 3 种重链互补决定区,更进一步优选包含所示 6 种互补决定区。对互补决定区以外的其他氨基酸序列没有特别限制。本发明所述抗体包括所谓的 CDR 移植型抗体,其中,所述移植型抗体中互补决定区以外的氨基酸序列来自于其它抗体,尤其是来源于其它物种的抗体。在这些 CDR 移植型抗体中,优选 CDR 以外的氨基酸序列来源于人的人源化抗体或人抗体。根据需要,可以对 FR 进行一个或多个氨基酸残基的添加、缺失、取代和 / 或插入。用于制造人源化抗体或人抗体的方法可用公知的方法。

[0074] “功能性片段”指抗体的部分(部分片段),具有此抗体对抗原的一种或多种活性(action)。换句话说,指保留了与抗原的结合能力、对抗原的反应活性或者对抗原的识别能力的片段。例如,Fv、二硫键稳定的 Fv(dsFv)、单链 Fv(scFv)、及其聚合物等。更具体的例子包括那些含有 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、双体(diabody)、dsFv 和 CDR 的肽[D. J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T. J. International Ltd]。

[0075] 利用木瓜蛋白酶处理与 FGF23 结合的抗体得到这些片段中,Fab 片段为具有与抗原结合活性,分子量约为 50,000 的抗体片段。Fab 片段中单条重链(H 链)的氨基酸末端一侧将近一半区段和单条完整轻链(L 链)通过二硫键连接在一起。

[0076] 本发明中的 Fab 片段可通过木瓜蛋白酶处理与 FGF23 结合的抗体而制得。或者通过将编码此抗体 Fab 片段的 DNA 序列插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中,再将此载体转入原核生物和真核生物中后,表达此载体后获得。

[0077] 利用胃蛋白酶处理 IgG 得到的片段中,F(ab')₂ 片段为具有与抗原结合活性,分子量约为 100,000 的抗体片段。F(ab')₂ 片段比通过铰链区二硫键结合在一起的 Fab 片段还要大。

[0078] 本发明中的 F(ab')₂ 片段可通过胃蛋白酶处理与 FGF23 结合的抗体而制得,或者通过以下所述的利用二硫键或硫醚键将 Fab' 连接一起而制得。

[0079] Fab' 是一种分子量约为 50,000,具有抗原结合活性的抗体片段。其中,所述 F(ab')₂ 铰链区的二硫键被切断。

[0080] 本发明中的 Fab' 可通过用还原剂二硫苏糖醇处理本发明中能与所述 FGF23 结合的 F(ab')₂ 而得。或者通过将编码此抗体 Fab' 片段的 DNA 序列插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中,再将此载体转入原核生物和真核生物中后,表达此载体后获得。

[0081] scFv 是一种具有抗原结合活性的抗体片段,它是由单条重链可变区(以下记作 VH)和单条轻链可变区(以下记作 VL)通过合适的肽段连接物(以下记作 P)连接组成的 VH-P-VL 或 VL-P-VH 型多肽。

[0082] 本发明中的 scFv 片段可通过获取与 FGF23 结合的本发明所述抗体中编码 VH 和 VL 的 cDNA,构建编码 scFV 的 DNA 序列,并将编码此抗体片段的 DNA 序列插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中,再将此载体转入原核生物和真核生物中后,表达此载体后获得。

[0083] 双体是一种由 scFv 二聚化形成的抗体片段,它具有双价抗原结合活性。双价抗原的结合活性可以相同也可以不同。

[0084] 本发明的双体的制备,可通过获取与本发明 FGF23 结合的所述抗体中编码 VH 和 VL 的 cDNA,按照使肽段连接物的氨基酸序列的长度在 8 个残基以下的方式,构建编码 scFv 的 DNA 序列,并将所述 DNA 序列插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中,再将此载体转入原核生物和真核生物中后,表达此载体后获得。

[0085] 在 dsFv 中,组成 sFv 的 VH 和 VL 片段中各有一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代,这两个多肽片段通过这些半胱氨酸残基之间形成的二硫键连接在一起。被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基的选择,可按照 Reiter 等 (ProteinEngineering, 7 :697-704, 1994) 所用方法,基于对抗体的三维结构预测来进行。

[0086] 本发明中的 dsFv 片段的制备,可通过获取与 FGF23 结合的本发明所述抗体中编码 VH 和 VL 的 cDNA,构建编码 dsFv 的 DNA 序列,并将编码此抗体片段的 DNA 序列插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中,再将此载体转入原核生物和真核生物中后,表达此载体后获得。

[0087] 构建的含有互补决定区的肽段至少含有一种以上的 VH 或 VL 互补决定区。含有多个互补决定区的肽段可以直接连接或通过合适的肽段连接物连接。

[0088] 本发明中包含互补决定区的肽段的制备,可以通过构建编码与 FGF23 结合的本发明所述抗体 VH 和 VL 互补决定区 (CDR) 的 DNA 序列,并将所述 DNA 序列插入原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中,再将此载体转入原核生物和真核生物中后,表达此载体后获得。

[0089] 此外,包含互补决定区的所述肽段的制备,也可通过诸如 Fmoc 法 (芴甲氧羰基法, fluorenylmethyloxycarbonyl method) 和 tBoc 法 (叔丁氧羰基法, t-butyloxycarbonyl method) 等化学合成法制得。

[0090] 此外,“功能性片段”是能与抗原 (FGF23) 结合的抗体的片段。这种“功能性片段”优选可与 FGF23 结合的片段并包含 SEQ ID NO :12 中从第 20 位 Q 到 136 位 S 的氨基酸序列,和 / 或 SEQ ID NO :14 中从第 23 位 A 到第 128 位 K 的氨基酸序列。这种“功能性片段”优选是包含 SEQ ID NO :40-45 中所示至少一种或全部互补决定区并可与 FGF23 结合的片段。这种“功能性片段”更优选衍生自 C10 杂交瘤产生的抗体可变区并可与 FGF23 结合。

[0091] 本发明所述抗体包括抗体衍生物,其中,将放射性同位素、低分子量药物、大分子药物和蛋白等,通过化学方法或基因工程使之结合于本发明的抗 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段上。

[0092] 本发明所述抗体衍生物的制备,可以通过化学等方法将放射性同位素、低分子量药物、大分子药物和蛋白等使之结合于本发明的抗 FGF23 抗体或此抗体的“功能性片段”的重链或轻链的 N- 末端或 C- 末端,此抗 FGF23 抗体或此抗体的“功能性片段”的合适的取代基团或侧链,此抗 FGF23 抗体或此抗体的“功能性片段”的糖链等而制得 (Koutai Kogaku Nyuumon, Osamu Kanamitsu, Chijin shokan, 1994)。

[0093] 此外,结合了蛋白的抗体衍生物的制备,可通过将编码本发明的抗 FGF23 抗体或此抗体的“功能性片段”的 DNA 序列与编码使之被结合蛋白的 DNA 序列相连后,将此 DNA 序列插入表达载体后,再将此表达载体转入合适的宿主细胞中并表达此载体的方法制得。

[0094] 对于放射性同位素,其实例包括¹³¹I、¹²⁵I等。比如,放射性同位素可通过氯胺 T 标记法等方法使之与所述抗体相连在一起。

[0095] 低分子量药物包括: 包括氮芥(nitrogen mustard)、环磷酰胺(cyclophosphamide)在内的烷基化药物(alkylating agents); 抗代谢药物(antimetabolites)如5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、甲氨蝶呤(methotrexate)等; 抗生素(antibiotics)如道诺霉素(daunomycin)、争光霉素(bleomycin)、丝裂霉素C(mitomycin C)、柔红霉素(daunorubicin)和阿霉素(doxorubicin)等; 植物碱(plant alkaloids)类,如长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)和长春地辛(vindesine)等; 抗癌药物如激素类药物三苯氧胺(tamoxifenand)和地塞米松(dexamethasone)(Clinical oncology; Japanese Clinical Oncology Research Meeting, Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Co., 1996); 甾族化合物(steroids)如皮质醇(hydrocortisone)和强的松(prednisone)等; 包括阿司匹林(aspirin)和消炎痛(indomethacin)在内的非甾族化合物; 免疫调节剂(immunomodulators)如硫代苹果酸金(gold thiomalate)和青霉胺(penicillamine)等; 免疫抑制剂(immunosuppressors)如环磷酰胺(cyclophosphamide)和咪唑硫嘌呤(azathioprine)等; 抗炎药(anti-inflammatories)如抗组胺类(anti-histamines)药物扑尔敏(chlorpheniramine maleate)和氯马斯汀(clemastine)等(Inflammation and anti-inflammatory treatment method, Ishiyaku Publishing Corp. Ltd., 1982). 可用公知的方法使所述这些低分子量药物和抗体结合,例如,用于道诺霉素和抗体结合的方法的实例包括通过戊二醛使道诺霉素和抗体的氨基基团间相结合的方法,通过水溶性碳化二亚胺使道诺霉素的氨基基团和抗体的羧基基团结合在一起的方法。通过将低分子量药物和抗体结合在一起,可制得具有该低分子量药物功能的抗体衍生物。

[0096] 对于大分子药物,其实例包括聚乙二醇(以下记作 PEG)、白蛋白、右旋糖酐、聚环氧乙烷、苯乙烯-马来酸共聚物、聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、羟丙基甲基丙烯酸酰胺等。通过这些大分子化合物结合在抗体或抗体的“功能性片段”上,预期获得以下几种效果: (1) 提高其对各种化学、物理和生物因子的稳定性。(2) 显著延长其在血液中的半衰期,(3) 免疫原性消失,抗体产生被抑制等(Bioconjugate Pharmaceutical, Hirokawa Shoten, 1993)。用于结合 PEG 和抗体的一种方法的实例是与 PEG 修饰性试剂反应的方法。PEG 修饰性试剂的实例包括 ε-氨基基团修饰剂赖氨酸(Laid-Open Patent Publication Number S61-178926)、羧基基团修饰剂天冬氨酸和谷氨酸(Laid-Open Patent Publication Number S56-23587)、胍基基团修饰剂精氨酸(Laid-Open Patent Publication Number H2-117920)等。

[0097] 结合了蛋白的所述抗体也可以作为一种融合抗体被制得。换句话说,将编码所述抗体或此抗体的功能性片段的 cDNA 与编码特异性蛋白的 cDNA 连接在一起,则编码由所述抗体和特异性蛋白组成的融合蛋白的 DNA 即被构建。这段 DNA 被插入原核生物用或真核生物用表达载体中。将此表达载体转入原核生物和真核生物中后,表达此载体后,即可生产得到与特异性蛋白相结合的所述融合抗体。

[0098] 关于本发明中所述抗 FGF23 抗体或此抗体的功能性片段,其对 FGF23 结合活性或对人 FGF23 的功能抑制活性的评估,可通过免疫学方法检测如 ELISA 法(Antibodies:

A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988 ;Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996), 或通过生物传感技术如 Biacore 生物传感器测定其结合解离常数 (Journal of Immunological Methods, 145 :229-240, 1991), 以及通过检测用 klothoc 表达细胞对人 FGF23 刺激引起的早期生长反应基因 -1 启动子活性的抑制作用 (Nature, 444 :770-774, 2006) 等来进行。

[0099] 在本发明中,“人抗体”被定义为来源于人的抗体基因的基因表达产物的抗体。正如下面所描述的那样,可以通过将此人抗体基因位点转入动物,从而将抗原给予有产生此人源抗体能力的转基因动物后获得。这些转基因动物的实例包括小鼠。能产生人抗体的小鼠的已建立的方法描述在,如国际专利出版号 W002/43478 中。

[0100] 对于本发明所述抗体的实例包括下面实施例中所述的由 C10 杂交瘤细胞产生的抗体 (C10 抗体)。在 2007 年 2 月 2 日, C10 杂交瘤细胞已经进行基于布达佩斯条约的国际保藏,保藏在专利有机体保藏中心 (Central 6, 1-1Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 日本) 独立的行政机构“先进工业科学和技术研究院 (Advanced Industrial Science and Technology)”, 索取号为 FERM ABP-10772 (识别表示 :C10)。

[0101] 本发明抗体或其功能性片段也包括包含重链和 / 或轻链的单克隆抗体或其功能性片段,组成所述重链和 / 或轻链的氨基酸序列各具有一个或几个氨基酸缺失、取代和添加。在此,“1 个或几个”、“几个”指的是 9 个以下,优选 5 个以下,更优选 3 个以下,尤其优选 2 个。如先前所描述氨基酸序列的部分修饰 (缺失、取代、插入、添加) 可通过对编码此氨基酸序列的核苷酸序列的部分修饰而被引入组成本发明所述抗体或功能性片段的氨基酸序列。这些核苷酸序列的部分修饰可通过已知的位点特异性突变引入法的常规方法被引入 [Proc Natl Acad Sci USA. , 81 :5662-5666, 1984]。本发明所述抗体包括所有免疫球蛋白类型和同种型的抗体。

[0102] 本发明所述抗 FGF23 抗体可通过以下生产方法制得。如将 FGF23, 或 FGF23 的一部分, 或者 FGF23 的一部分和合适的能引起其抗原的抗原性增长的药物载体物 (例如, 牛血清白蛋白等) 所形成的偶合物 (conjugate), 必要时与相应的佐剂 (弗氏完全或不完全佐剂等) 一起免疫所需的非人哺乳动物如人抗体生成转基因小鼠。对于 FGF23, 天然型或重组型 FGF23 均可使用。或者, 通过将编码 FGF23 的基因转入表达载体并在此动物体内表达此 FGF23 蛋白的方法来产生免疫致敏作用。通过杂交瘤 (由来自免疫致敏动物的抗体生成细胞和没有抗体生产能力的骨髓瘤细胞融合而成) 的培养, 产生与用于免疫作用的抗原有特异亲和性的单克隆抗体, 筛选产生所述单克隆抗体的克隆, 由此制得了单克隆抗体。

[0103] 本发明所述抗体包括那些通过利用所属领域技术人员熟知的基因工程修饰技术 (例如, 参见欧洲专利申请 EP314161) 而被转换成不同亚类的抗体。也即是说, 通过基因工程技术, 利用编码本发明所述抗体可变区的 DNA, 可以制得一种不同于原有亚类的亚类抗体。

[0104] 2. 本发明所述抗体的生产

[0105] 生产一种单克隆抗体包括以下几个步骤。也即是:

[0106] (1) 用作免疫原的抗原蛋白或该抗原蛋白表达载体的制备, (2) 通过动物体内抗原注射或动物体内抗原表达, 免疫动物后, 抽取动物血样和分析血样中抗体滴度, 且在确定脾脏分离时间后, 制备抗体生产细胞 (3) 制备骨髓瘤细胞 (4) 融合抗体生产细胞和骨髓瘤

细胞 (5) 筛选能产生目标抗体的杂交瘤细胞团 (6) 杂交瘤细胞团被打散成单个细胞克隆 (7) 可任选地培养杂交瘤或饲养已被移植杂交瘤的动物以用于大量单克隆抗体的生产 (8) 检测分析以此种方法生产的单克隆抗体的生物活性和识别特异性, 或检测作为标记性试剂的特性。

[0107] 下文将按上面步骤对抗 -FGF23 单克隆抗体的生产方法作详细描述。然而, 这种抗体的生产方法并不限于此种方法。如, 也可使用脾脏细胞以外的抗体生成细胞和骨髓瘤细胞 (此抗体的生产)。

[0108] (1) 抗原的纯化

[0109] 作为抗原, 可使用: 利用基因重组技术, 将编码 FGF23 的 DNA 序列整合到一个合适的表达质粒上, 在 FGF23 于宿主如大肠杆菌或动物细胞等中产生后, 已纯化的 FGF23 蛋白。因为人 FGF23 蛋白的一级结构是公知的 [GenBank 索取号: No. AAG09917, SEQ ID NO: 4], 利用本领域技术人员熟知的方法化学合成的来源于 FGF23 氨基酸序列组成的不完全肽段也可当作此抗原使用。

[0110] (2) 抗体生成细胞的制备步骤

[0111] 已制得的上述 (1) 所提到的抗原与佐剂如弗氏完全或不完全佐剂或铝钾等混合, 且混合物作为免疫原免疫实验动物。对于所述实验动物, 最适合使用具有人源抗体生产能力的转基因小鼠。此类小鼠在参考文献 [Tomizuka. 等, Proc Natl Acad Sci USA., 97: 722-727, 2000] 中被 Tomizuka 等描述。

[0112] 免疫小鼠时, 免疫原的给药方法可以是皮下注射、腹腔注射、静脉注射、皮内注射、肌肉注射、足趾注射等方法中的任意一种。优选腹腔注射、足趾注射或静脉注射。

[0113] 可进行一次免疫或在一个合适的时间间隔内进行多次免疫。随后, 测量存在于免疫动物血清的抗所述抗原的抗体滴度。当使用具有很高抗体滴度的动物作为抗体生成细胞的生产原料时, 后续操作步骤的效率将得到提高。一般来讲, 优选使用来源于最终免疫后 3-5 天的动物的抗体生成细胞用于后续的细胞融合。

[0114] 在这里, 用于抗体滴度检测方法的例子包括如放射性同位素免疫定量测定法 (以下记作 "RIA 法")、固定酶免疫定量测定法 (以下记作 "ELISA 法")、荧光抗体法、被动血凝反应法等各种公知技术。从检测灵敏度、快速性、精确性和自动化操作的可行性来看, RIA 法或 ELISA 法是合适的方法。

[0115] 本发明所述抗体的滴度检测, 例如使用 ELISA 检测法, 可通过以下步骤进行。首先, 将抗人抗体的抗原被吸附于 ELISA96 孔板等的固定表面。然后, 用与此抗原无关的蛋白, 如牛血清白蛋白 (BSA), 封闭没有吸附抗原的此固定表面。漂洗此表面后, 与作为一抗的连续浓度梯度稀释的试剂 (如来自于具有人抗体生产能力的转基因小鼠的血清) 接触反应, 以使所述抗原与样品中的抗 -FGF23 抗体相结合。再然后, 作为二抗的酶标记抗人抗体被加入, 此二抗可与所述人抗体结合。漂洗后, 加入所述酶的底物。然后, 检测因底物降解引起的颜色变化所导致的光吸收改变, 以计算抗体滴度。

[0116] (3) 骨髓瘤制备步骤

[0117] 对于骨髓瘤, 可使用来源于哺乳动物如小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔或人等自身不具有抗体生产能力的细胞。一般来讲, 优选使用来自于小鼠的细胞系, 如 8-氮鸟嘌呤抗性小鼠骨髓瘤细胞系 P3X63Ag8U. 1 (P3-U1) [Yelton, D. E. 等, Current Topics in Microbiology

and Immunology, 81 :1-7, 1978], P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1) [Kohler, G. 等, European J. Immunology, 6 :511-519, 1976], Sp2/0-Ag14 (SP2/0) [Shulman, M. 等, Nature, 276 :269-270, 1978], P3X63Ag8.653 (653) [Kearney, J. F. 等, J. Immunology, 123 :1548-1550, 1979], P3X63Ag8 (X63) [Horibata, K. 和 Harris, A. W., Nature, 256 :495-497, 1975] 等。这些细胞系的继代培养要用合适的培养基, 如 8- 氮鸟嘌呤培养基 [一种补充有谷氨酰胺、2- 巯基乙醇、庆大霉素和胎牛血清 (FCS)、还有 8- 氮鸟嘌呤的 RPMI-1640 培养基]、Iscove' s Modified Dulbecco' s 培养基 (IMDM) 或 Dulbecco' s 改良 (Modified) Eagle 培养基 (DMEM 培养基)。然而, 在细胞融合前 3-4 天, 细胞系的继代培养要用正常培养基 (如包含有 10% FCS 的 DMEM 培养基), 为细胞融合准备的细胞数目不低于 2×10^7 。

[0118] (4) 细胞融合

[0119] 抗体生成细胞是浆细胞和其前体细胞的淋巴细胞。这些细胞可以从生物个体任意位置获得。一般来讲, 脾脏、淋巴结、骨髓、扁桃体、外周血、或者它们的合适组合均可被融合。一般来讲, 最常使用脾脏细胞。

[0120] 最后一次免疫动物后, 存在抗体生成细胞的部位, 如脾脏, 从能得到指定的抗体滴度的小鼠中分离出来, 从而制得作为抗体生成细胞的脾脏细胞。下一步, 融合脾脏细胞和骨髓瘤细胞。对于脾脏细胞和步骤 (3) 中得到的骨髓瘤细胞的融合方法, 最常用的方法是使用聚乙二醇。这种方法的细胞毒性相对较低, 融合操作也简单容易。这种方法有以下步骤, 比如:

[0121] 将脾脏细胞和骨髓瘤细胞用无血清培养基 (如 DMEM) 或磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 漂洗好, 脾脏细胞和骨髓瘤细胞以 5 : 1-10 : 1 的比例混合并离心。移去上清液, 打散沉淀的细胞团, 边搅拌边加入 1mL 含 50% (w/v) 聚乙二醇 (分子量 1000-4000) 的无血清培养基。然后, 缓慢加入 10mL 的无血清培养基, 随后离心。弃去上清液, 在正常培养基 (以下称 HAT 培养基) 中悬浮沉淀的细胞, 所述正常培养基 (HAT 培养基) 含有合适量的次黄嘌呤 / 氨基蝶呤 / 胸腺嘧啶脱氧核苷 (以下称 HAT) 溶解物和人白细胞介素 -6 (以下称 IL-6)。这些细胞被等量均分至培养板各孔 (以下称培养板), 并在 37°C 和存在 5% CO₂ 的条件下培养约两个星期。在培养期间, 根据需要补充 HAT 培养基。

[0122] (5) 杂交瘤细胞团的筛选:

[0123] 上述所提到的骨髓瘤细胞为 8- 氮鸟嘌呤抗性株时, 也即是说, 如果它是一种次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT) 缺陷性细胞株时, 没有融合的骨髓瘤细胞或仅由骨髓瘤细胞融合形成的融合型细胞, 在含有 HAT 的培养基中不能存活。而另一方面, 仅由抗体生成细胞形成的融合型细胞, 或由抗体生成细胞与骨髓瘤细胞形成的融合型细胞杂交瘤细胞是能够生存的。但是仅由抗体生成细胞融合形成的融合型细胞的生存周期是有限的。因此, 通过在含 HAT 培养基中的持续培养, 仅仅由抗体生成细胞与骨髓瘤细胞形成的融合型细胞杂交瘤细胞能够生存。从而, 杂交瘤细胞可被筛选出来。

[0124] 对于正在克隆中生长的杂交瘤, 培养基被换成不含氨基蝶呤的培养基 (以下称作 HT 培养基)。然后, 收集部分培养基上清液, 用如 ELISA 法检测抗 -FGF23 抗体滴度。

[0125] 上面, 为利用 8- 氮鸟嘌呤抗性细胞系的方法示例。但是, 其他细胞系也可相应地应用于杂交瘤细胞的筛选方法。在这些情况下, 所使用的培养基组合物也可变化。

[0126] (6) 克隆步骤

[0127] 通过利用与(2)中所用相同的抗体滴度检测方法检测抗体滴度,决定用于生产所述特异性抗体的杂交瘤细胞被移至另一个培养板,并进行克隆。克隆方法的实例包括:限制性稀释法,在此方法中,杂交瘤细胞被稀释至培养板中每个培养孔仅含有一个杂交瘤细胞,并被培养;软琼脂培养法,在这种方法中,杂交瘤细胞被培养在软琼脂培养基中,克隆被收集;一种在此方法中用显微操作器每次转移一个细胞并对其培养的方法;分类机分拣克隆法,在这种方法中,利用细胞分拣机分离单个细胞等。限制性稀释法较为简单和常用。

[0128] 关于培养孔,在培养孔里抗体滴度被观察到,如,当利用限制性稀释法重复克隆2-4次时,产生具有稳定的抗体滴度的细胞系被筛选出来,以用作抗-FGF23单克隆抗体生成杂交瘤细胞系。

[0129] (7) 通过杂交瘤细胞培养制备单克隆抗体

[0130] 将HT培养基换成正常培养基,以培养已完成克隆的杂交瘤细胞。对于大规模培养,有利用大容量培养瓶的循环培养、旋转器培养,或利用中空纤维系统的培养等。通过用本领域技术人员熟知的方法如凝胶过滤等方法对大规模培养上清液的纯化,获得抗-FGF23单克隆抗体。此外,通过将所述杂交瘤在相同品系小鼠(如BALB/c)或nu/nu小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔等腹膜中的生长,获得含有大量抗-FGF23单克隆抗体的腹膜液。简单的抗体纯化方法是使用商品化的单克隆抗体纯化试剂盒(比如,MAbTrap GII kit;GEHealthcare Bioscience Co.)等。

[0131] 以这些方法获得的单克隆抗体具有高抗FGF23抗原特异性。

[0132] 此外,重组型抗体的制备可通过利用基因重组技术(Delves, P. J., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY, Shepherd, P. 和 Dean C., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORDUNIVERSITY PRESS, Goding, J. W., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS),从骨髓瘤等抗体生成细胞中克隆编码所述抗体的基因,将此基因整合到一种合适的载体并转入一种宿主(如哺乳动物细胞系、大肠杆菌、酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞等)而得到。

[0133] 本发明包括含有由产生本发明抗体的杂交瘤产生的抗体的基因序列的核酸,尤其包括下述的含有由本发明的杂交瘤产生的抗体的重链可变区和轻链可变区的核酸。在这里,核酸包括DNA和RNA。此外,本发明也包括本发明中所述的重链可变区和轻链可变区成熟片段的核酸,在此,所述成熟片段是指去除所述信号肽序列后剩余的重链可变区和轻链可变区肽段。此外,除上述的核酸外,本发明中所述核酸还包括具有与本发明中所述抗体氨基酸序列的氨基酸和所述抗体重链可变区和/或轻链可变区的氨基酸相对应的密码子的核酸。

[0134] 为制备编码来自于所述杂交瘤的单克隆抗体的基因,一种方法被运用,按照这种方法,编码所述单克隆抗体每条轻链可变区,轻链恒定区,重链可变区,重链恒定区的DNA可通过PCR等方法得到制备。在此制备方法中,根据抗-FGF23抗体基因或其氨基酸序列设计的寡DNA被用作引物。对于模板,从杂交瘤中制得的DNA可用作模板。所述这些DNA被整合到一个合适的载体上并被转入宿主细胞后,得到表达,或者将这些DNA一起整合到一个合适的载体后共表达。

[0135] 对于载体,可以使用能在微生物宿主中自主生长的噬菌体或质粒。对于质粒DNA,其实例包括来源于大肠杆菌、枯草杆菌或酵母等的质粒。对于噬菌体DNA,其实例包括 λ 噬

菌体。

[0136] 所有能表达目的基因的宿主均可用作转化宿主。其实例包括细菌（大肠杆菌、枯草杆菌等）、酵母、动物细胞（COS 细胞、CHO 细胞等）和昆虫细胞等。

[0137] 将基因转入宿主中所用的方法是众所周知的，可例举出许多方法（如钙离子法、电穿孔法、原生质体法、乙酸锂法、磷酸钙、脂质体转染法等）。此外，将基因转入下述动物中所用的方法，其实例包括以下所述方法：显微注射法、应用电穿孔技术或脂质体转染法将基因转入胚胎细胞的方法、以及核移植法等。

[0138] 在本发明中，可通过培养转化子，以及对培养产物的收集，获得抗 -FGF23 抗体。在这里，“培养产物”表示以下的任何一种：(a) 培养物上清液，(b) 培养的细胞或培养的菌体或它们的匀浆，以及 (c) 转化子分泌物。为了培养转化子，要使用适合所用宿主的培养基，并使用静止培养法、滚瓶培养法等培养方法。

[0139] 培养完毕后，当所述目标抗体产生于细菌菌体或细胞内时，所述抗体通过细菌菌体或细胞的匀浆得到收集。此外，当所述目标抗体产生于细菌菌体或细胞外时，培养物溶液被直接使用，或者是通过离心等方法除去细菌菌体或细胞。随后，通过单独使用或适当组合使用各种用于蛋白质分离纯化的色谱技术的常规生物化学方法，从所述培养产物中分离纯化所述目标抗体

[0140] 此外，利用转基因动物构建技术，构建所述目标抗体基因被整合为内源基因的动物宿主如转基因牛、转基因山羊、转基因绵羊或转基因猪等。从这些转基因动物分泌的奶中可以得到大量的来源于所述目标抗体基因的单克隆抗体 (Wright, G., 等, Bio/Technology 9:830-834, 1991)。当在体外培养杂交瘤时，按照培养细胞的特性、试验研究的目的和培养方法等各种条件，使所述杂交瘤得到生长、保持和储存。已知营养培养基或各种来源和制备于已知基础培养基的营养培养基可被用于在培养上清液中生产所述单克隆抗体。

[0141] (8) 所述单克隆抗体的分析

[0142] 在这些方法中制得的所述单克隆抗体的同型类和亚类分析可通过以下方法进行。首先，鉴定方法的实例包括平板双向扩散 (Ouchterlony) 法、ELISA 法或 RIA 法等。平板双向扩散法较简单，但当所述单克隆抗体浓度低时，必需进行浓缩操作。另一方面，当使用 ELISA 法或 RIA 法时，培养上清液可直接与被吸附于固定表面的抗原反应，且通过使用与各种免疫球蛋白的同型类和亚类反应的抗体作为二抗抗体，可对所述单克隆抗体的同型类和亚类进行鉴定。

[0143] 此外，可用 Folin/Lowry 法，以及通过计算其在 280nm 的光吸收 $[1.4(OD_{280}) = \text{免疫球蛋白 } 1\text{mg/mL}]$ 的方法，进行蛋白质定量。

[0144] 所述单克隆抗体识别表位的鉴定（表位作图）按如下进行。首先，构建单克隆抗体识别的分子的各部分结构。对于部分结构的构建，其方法如下：一种方法是采用众所周知的寡肽合成技术，制取分子的各部分肽段；一种方法是利用基因重组技术将编码所述目标部分肽段的 DNA 序列整合到一个合适的表达质粒，所述肽段在宿主如大肠杆菌等体内或体外制得。然而，为实现上述目的，一般是将上述两种方法组合使用。例如，利用本领域技术人员熟知的基因重组技术构建以随机长度从羧基末端或氨基末端开始连续性缩短的抗原蛋白多肽系列。然后，研究所述单克隆抗体与这些多肽的反应活性，并大致确定其识别位点。

[0145] 以下，作更详细的说明，利用本领域技术人员众所周知的寡肽合成技术，合成这些

肽的相应部分的寡肽或变体等。为了确定表位,研究单克隆抗体与这些多肽的结合能力,所述单克隆抗体含有在本发明用于预防或治疗的药物中作为活性成分,或者研究这些多肽对所述单克隆抗体与相应抗原的结合能力的竞争性抑制活性。作为获得各种寡肽的简单方法,可使用商品试剂盒(如 SPOTs kit(Genosis Biotechnologies),利用多肽合成技术的多肽系列合成试剂盒(Chiron Co)等)

[0146] (9) 所述抗体片段的生产

[0147] 基于上述(7)中所描述抗体,利用基因工程或蛋白质化学方法生产所述抗体片段。

[0148] 对于基因工程技术方法,其实例是:构建编码目的抗体片段的基因,并用合适的宿主如动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、大肠杆菌等表达此基因,纯化所述抗体片段。

[0149] 对于蛋白质化学方法,其实例是:蛋白酶(如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等)被用于特异性位点剪切并进行纯化。

[0150] 对于所述抗体片段,其实例是含有 Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、双体、dsFv、CDR 的肽段等。每一种抗体片段的生产方法将在下面得到详细描述。

[0151] (i) Fab 的生产

[0152] Fab 可用蛋白质化学方法,通过利用木瓜蛋白酶处理 IgG 制得。木瓜蛋白酶处理后,如果所述初始抗体是具有蛋白 A 结合能力的 IgG 亚类,则通过蛋白 A 层析柱,分离 IgG 分子和 Fc 片段,回收均质 Fab(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第三版,1995)。如果所述抗体为不具有蛋白 A 结合能力的 IgG 亚类抗体,利用离子交换层析, Fab 从被洗脱在低盐浓缩液的片断中得到回收(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第三版,1995)。此外,对于利用基因工程技术获得 Fab,在大多数情况下使用大肠杆菌,或者使用昆虫细胞和动物细胞等来生产 Fab。如,在上面 2(7) 中被描述的编码所述抗体可变区的 DNA 被克隆到 Fab 表达载体中,以构建 Fab 表达载体。对于所述 Fab 表达载体,任何可使 Fab 的 DNA 得到整合和表达的质粒都可使用。一个实例是 pIT106(Science, 240:1041-1043,1988)等。Fab 表达载体被转入合适的大肠杆菌,并可生成并聚集于包涵体或外周质中。对于来自于包涵体的 Fab,可通过被常用于蛋白质的重折叠的方法而被激活。此外,当 Fab 表达于外周质时,具有活性的 Fab 被释放到培养上清液中。利用结合有抗原的层析柱,经过重折叠处理或来自于培养上清中的 Fab 被纯化得到均质 Fab(Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company, 1992)。

[0153] (ii) F(ab')₂ 的生产

[0154] F(ab')₂ 可用蛋白质化学方法,通过利用胃蛋白酶处理 IgG 制得。胃蛋白酶处理后,利用与 Fab 相同的纯化操作,可回收得到均质 F(ab')₂(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第三版,1995)。此外,也可通过马来酰亚胺类(如 o-PDM 或双马来酰亚胺己烷等)处理以下(iii)所述的 Fab', 形成硫醚键,或者通过 DTNB(5,5'-二硫代-双(硝基苯甲酸))处理,形成 S-S 键的方法,得到 F(ab')₂(Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

[0155] (iii) Fab' 的生产

[0156] Fab' 可通过用还原性试剂(如二硫苏糖醇等)处理上述(ii)中所述的 F(ab')₂ 制得。此外, Fab' 的生产可用基因工程技术,在大多数情况下使用大肠杆菌,或者使用昆虫

细胞和动物细胞等。例如,在上述 2(7) 中的编码所述抗体可变区的 DNA 被克隆到 Fab' 表达载体中,以构建 Fab' 表达载体。对于所述 Fab' 表达载体,任何可使 Fab' 的 DNA 得到整合和表达的质粒都可使用。一个实例是 pAK19(BIO/TECHNOLOGY, 10:163-167, 1992) 等。Fab' 表达载体被转入合适的大肠杆菌。Fab' 可生成并聚集于包涵体或外周质中。对于来自于包涵体的 Fab', 可通过被常用于蛋白质的重折叠的方法而被激活。此外,当 Fab' 表达于外周质时,通过溶菌酶部分消化、渗透压休克、超声波裂解等方法,匀浆细菌,这些 (Fab') 可从菌体外得到回收。利用 G 蛋白层析柱等,经过重折叠处理或来自于细菌匀浆液中的 Fab' 被纯化得到均质 Fab' (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

[0157] (iv) scFv 的生产

[0158] 利用基因工程技术,可用噬菌体或大肠杆菌或昆虫细胞或动物细胞等来生产 scFv。如,在上述 2(7) 中的编码所述抗体可变区的 DNA 被克隆到 scFv 表达载体中,以构建 scFv 表达载体。对于所述 scFv 表达载体,任何可使 scFv 的 DNA 得到整合和表达的质粒都可使用。其实例包括 pCANTAB5E (GEHealthcare Bioscience Co.), pHFA (Human Antibodies & Hybridomas, 5:48-56, 1994) 等。将 scFv 表达载体转入合适的大肠杆菌,通过使辅助性噬菌体感染,可得到其中 scFv 以与噬菌体表面蛋白融合的形式而被表达于噬菌体表面的噬菌体。此外,scFv 可生成并聚集于转入有 scFv 表达载体的大肠杆菌的包涵体或外周质中。对于来自于包涵体的 scFv, 可通过被常用于蛋白质的重折叠的方法而被激活。此外,当 scFv 表达于外周质时,通过溶菌酶部分消化、渗透压休克、超声波裂解等方法,匀浆细菌,这些 (scFv) 从菌体外被回收。利用阳离子交换层析等,经过重折叠处理或来自于细菌匀浆液中的 scFv 被纯化得到均质 scFv (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

[0159] (v) 双体的生产

[0160] 利用基因工程技术生产双体时,主要使用大肠杆菌,也可使用昆虫细胞和动物细胞。例如,制备 DNA, 其中连接上述 2(7) 中所述抗体的 VH 和 VL, 从而接头 (linker) 编码的氨基酸残基为 8 个残基或更少,并将其克隆到双体表达载体上,从而构建了双体表达载体。任何可使双体 DNA 得到整合和表达的质粒都可用作双体表达载体。其实例包括 pCANTAB5E (GEHealthcare Bioscience), pHFA (Human Antibodies Hybridomas, 5, 48, 1994) 等,双体可产生和聚集在转入双体表达载体的大肠杆菌包涵体或外周质中。从包涵体中获得的双体,可通过常被用于蛋白质的重折叠法而被激活。此外,当 (双体) 被表达于外周质时,通过溶菌酶部分消化、渗透压休克、超声波裂解法等方法,匀浆细菌,这些 (双体) 从菌体外被回收。通过使用阳离子交换层析等技术 (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996) 处理,经过重折叠处理或来自细菌匀浆液的双体被纯化得到均质双体。

[0161] (vi) dsFv 的生产

[0162] 利用基因工程技术生产 dsFv 时,主要使用大肠杆菌,也使用昆虫细胞和动物细胞。首先,将突变引入到在上述 (ii)、(iv) 和 (v) 中编码抗体 VH 和 VL 的 DNA 的合适位点,从而得到所述编码的氨基酸残基被半胱氨酸取代的 DNA。所述制得的每条 DNA 均可被克隆于 dsFv 表达载体中以构建 VH 和 VL 表达载体。任何可使 dsFv 的 DNA 得到整合和表达的质

粒均可用作 dsFv 表达载体。例如 pUL19 (Protein Engineering, 7 :697-704, 1944) 等。所述 VH 和 VL 表达载体可被转入合适的大肠杆菌中, 且其可在包涵体或外周质中产生和聚集。获得来自包涵体或外周质的 VH 和 VL, 并使之混合, dsFv 可通过常被用于蛋白质的重折叠法而被激活。经过重折叠法处理后, 可通过离子交换层析法和凝胶过滤法进一步纯化 (Protein Engineering, 7 :697-704, 1994)。

[0163] (vii) CDR 肽的生产

[0164] 含有 CDR 的肽可通过化学合成法 (如 Fmoc 法或 Boc 法等) 制得。此外, CDR 肽表达载体可通过制备编码含有 CDR 肽的 DNA, 并克隆于合适的表达载体后获得。任何可使编码 CDR 肽的 DNA 得到整合和表达的质粒均可用作所述表达载体。如 pLEX (Invitrogen) 和 pAX4a+ (Invitrogen) 等。所述表达载体可被转入合适的大肠杆菌中, 且其可在包涵体或外周质中产生和聚集。从包涵体或外周质中得到 CDR 肽, 并可通过离子交换层析法和凝胶过滤法对其进行纯化 (Protein Engineering, 7 :697-704, 1994)。

[0165] 3. 本发明中所述抗体和此抗体的功能性片段的特征

[0166] 本发明中所述抗体和此抗体的功能性片段具有任何以下特征:

[0167] (a) FGF23 结合试验; 与具有 SEQ ID NO :4 中从第 25 位到第 251 位的氨基酸残基的全长 FGF 蛋白序列结合。

[0168] (b) 体外试验; 一种检测方法中 FGF23 的活性受抑制, 利用此检测方法可以检测 FGF23 活性。体外检测 FGF23 活性的一个方法的实例是用 FGF23 刺激引起早期生长反应基因 -1 的启动子活化 (Nature, 444 :770-774, 2006)。

[0169] (c) 体内实验; 对人给药时, 抑制内源性 FGF23 活性, 增加血清磷浓度和血清 1, 25D 浓度。与常规抗体 (2C3B 抗体 (抗 FGF23 蛋白的小鼠单克隆抗体, 公开于 W003/057733, 由索取号为 FERM BP-7838 的杂交瘤细胞产生的抗 -FGF23 抗体) 相比, 血清磷浓度和血清 1, 25D 浓度增加程度更大, 且增加血清磷浓度和血清 1, 25D 浓度的持续时间长。比如, 当给予猕猴时, 其引起血清磷浓度升高的持续时间约是 2C3B 抗体的约 3 倍以上, 优选约 5 倍, 其引起血清 1, 25D 浓度升高的持续时间约是 2C3B 抗体的约 1.5 倍以上, 优选约 2.5 倍。

[0170] 本发明也包括编码本发明的抗 FGF23 抗体的氨基酸序列的核酸。此核酸可以是 DNA 或 RNA。本发明中的核酸, 优选编码 C10 杂交瘤产生的抗体的氨基酸序列的核酸。一个实例是编码重链可变区的氨基酸序列的核酸 (C10 抗体的重链核酸序列), 所述氨基酸序列由 SEQ ID NO :11 中从第 58 位 C 到第 408 位 A 的核苷酸序列编码。此外, 另一个实例是编码轻链可变区的氨基酸序列的核酸, 所述氨基酸序列由 SEQ ID NO :13 中从第 67 位 G 到第 384 位 A 的核苷酸序列编码。

[0171] II. 药物组合物

[0172] 制剂, 即含有本发明的人抗 -FGF23 抗体或此抗体的功能性片段的药物组合物包括在本发明范围内。这种制剂, 除所述抗体或此抗体的功能性片段之外, 优选包括生理上可接受的稀释剂或药物载体, 或可以是一种与其他药物 (如其它抗体或抗生素) 的混合物。合适的药物载体包括: 生理盐水、磷酸盐缓冲生理盐水、磷酸盐缓冲生理盐水葡萄糖溶液、缓冲生理盐水, 但不限于这些载体。此外, 抗体可以是冻干的和在必要时添加上述缓冲液后得到重建。给药方法包括: 口服给药、或肠胃外给药如口腔内、气管支气管内、直肠内、皮下注射、肌肉注射、静脉注射等给药, 优选给药方法优选静脉注射给药。可通过各种制剂形式进

行给药,这些剂型包括:气雾剂、胶囊、药片、颗粒剂、糖浆剂、乳剂、栓剂、注射剂、软膏剂和胶布制剂(tapes)。

[0173] 被制成液态制剂如乳剂和糖浆剂时,可使用添加剂如:水;糖类如蔗糖、山梨醇和果糖等;醇类如聚乙二醇、丙二醇等;油类如芝麻油、橄榄油和大豆油等;防腐剂如对羟基苯甲酸酯类等;调味剂如草莓调味剂和薄荷等。

[0174] 被制备胶囊、药片、粉剂、颗粒剂等时,可使用添加剂如:赋形剂如乳糖、葡萄糖、蔗糖、和甘露(糖)醇等;崩解剂如淀粉、海藻酸钠等;润滑剂如硬脂酸镁和滑石粉等;粘合剂如聚乙烯醇、羟丙基纤维素和凝胶等;表面活性剂如脂肪酸酯等;增塑剂如丙三醇等。

[0175] 注射制剂可使用的添加剂包括:水;糖类如蔗糖、山梨醇、木糖、海藻糖、果糖等;糖醇如甘露(糖)醇、木糖醇和山梨糖醇等;缓冲液如磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液和谷氨酸盐缓冲液等;表面活性剂如脂肪酸酯等。

[0176] 肠胃外给药的合适制剂包括:注射剂、栓剂、气雾剂等。在使用注射剂时,通常以单剂量安瓿或多剂量容器的形式被提供。它可能是合适的粉剂,在使用时以合适的药物载体,如不含热源质的无菌水重新溶解。这些制剂含有常被用于制剂配制的添加剂如乳化剂、悬浮剂等。注射剂使用方法包括,如静脉输注、静脉注射、肌肉注射、腹腔内注射、皮下注射、皮内注射等。此外,给药剂量随给药对象的年龄、给药方式、给药频率而不同,并能在很宽范围内调整。

[0177] 栓剂可用药物载体(如可可脂、氢化脂肪、羧酸等)进行配制。气雾剂可用载体所述抗体或此抗体的功能性片段本身进行配制,或者用载体进行配制,所述载体对给药对象(患者)的口部和呼吸道粘膜不产生刺激作用,且能使所述抗体或此抗体的功能性片段扩散成微粒,使其容易吸收。

[0178] 载体的具体实例包括乳糖、丙三醇等。根据所述抗体或此抗体的功能性片段的特性和所用载体的特性,可选用气雾剂、干粉等剂剂。此外,在口服制剂中所用的添加剂组分也可添加到这些肠胃外给药制剂中。

[0179] 所用剂量一般因症状、年龄、体重等而异,但是一般来说,对成年人的口服给药,约为每天0.01mg-1000mg。此剂量可一次给药或分成几次给药。在肠胃外给药时,可通过皮下注射、肌肉注射或静脉注射每次的给药量为0.01mg-1000mg。

[0180] 本发明包括本发明所述抗体,或此抗体的功能性片段,或使用包含本发明所述抗体、或此抗体的功能性片段的药物组合物预防或治疗下述疾病的方法,此外,本发明还包括本发明所述抗体、或此抗体的功能性片段在制备用于预防或治疗下述疾病的药物中的用途。

[0181] 可被本发明所述抗体、或此抗体的功能性片段预防和治疗的疾病包括:具有FGF23过度活性的疾病,如肿瘤引起的软骨病(tumor-induced osteomalacia)、ADHR、XLH、骨纤维性结构不良、麦-奥二氏(McCune+Albright)综合征,以及伴随有异常矿物质代谢的疾病如常染色体隐性低血磷症。此外,(本发明)还有望提高对低血磷症、骨盐沉积衰竭、骨骼疼痛、肌肉无力、骨骼畸形、成长障碍、低1,25D血症等疾病相关的综合征的疗效。由于FGF23在生理条件下具有重要作用,被磷代谢和维生素D代谢控制所介导的FGF23钙代谢控制活性,可通过本发明所述抗体、或此抗体的功能性片段来调控,因此,它们(本发明所述抗体、或此抗体的功能性片段)可用于预防和治疗的疾病包括:由矿物质代谢和维生素D代谢异常所导

致的疾病,如骨质疏松症、佝偻病(包括低血磷症性佝偻病和维生素D抗性佝偻病)、高钙血症、低钙血症、异位钙化症(ectopic calcification)、骨硬化、派杰(Paget's)病、甲状旁腺机能亢进症、甲状旁腺机能减退症、搔痒症等。此外,本发明所述抗体或此抗体的功能性片段也可用于以肾病性骨营养不良、透析性骨病、肾小管功能障碍为代表的由肾衰竭透析和肾衰竭并发症引起的疾病的预防和治疗。另一方面,据报道,1,25D不仅具有上述的对矿物质代谢(如钙代谢等)的活性,也具有细胞生长抑制作用、细胞分化活性等。因此,本发明所述抗体或此抗体的功能性片段也可用于其生长分化由1,25D调控的细胞引起的疾病的预防和治疗。

[0182] 此外,众所周知,在肿瘤引起的软骨病中,由肿瘤引起的FGF23过量表达可导致病变。因此,可以想到,通过使用连接有放射性物质(如放射性同位素等)、或者连接有各种毒素治疗试剂(如低分子量药物等)的本发明抗体,和所述抗体在过量产生FGF23的肿瘤中的聚集,会导致肿瘤回缩。

[0183] III. 制剂实例

[0184] 包含本发明所述抗体或此抗体的功能性片段的制剂,以溶解在水或除水以外的药理上可接受的溶液中的无菌溶液或悬浮液的安瓿形式供使用。此外,也可将无菌粉剂(优选冻干的本发明所述抗体分子)填充在安瓿中,使用时用药理上可接受的溶液稀释后供使用。

[0185] 实施例

[0186] 下面是通过实施例对本发明作更详细描述,但这并不意味着本发明仅受限于实施例的这些描述。

[0187] 实施例 1

[0188] 重组人 FGF23 表达载体的制备。

[0189] (1) 人 FGF23 H 蛋白表达载体的构建。

[0190] 使用可造成肿瘤引起的软骨病(tumor-induced osteomalachia)的肿瘤的人 cDNA 文库为模板,扩增编码人 FGF23 基因的 cDNA,所述操作过程使用 F1EcoRI 引物(SEQ ID NO:1)和 LHisNot 引物(SEQ ID NO:2)和 LA-Taq DNA 聚合酶,进行 35 个 PCR 循环,每个 PCR 循环的组成为:96°C 保温 1min,然后 96°C 30 秒,55°C 30 秒和 72°C 30 秒。所述 F1EcoRI 引物在退火后与存在于编码人 FGF23 基因的核苷酸片段 5' 上游远端的序列结合,并在扩增获得的编码人 FGF23 基因的核苷酸片段 5' 端处引入 EcoRI 限制性酶切位点。所述 LHisNot 引物中含有:可与编码人 FGF23 基因的核苷酸序列中的终止密码子 5' 端发生退火的序列、编码末端(terminal)密码子的序列(其在编码 His6 标记序列(His-His-His-His-His-His)和 NotI 限制性位点的序列之后)。结果,扩增片段编码人 FGF23 蛋白,在所述 FGF23 蛋白的羧基末端被加入一段 His6- 标记的序列,其下游处有一个 NotI 限制酶位点。所述扩增片段经 EcoRI 和 NotI 消化后,与同样经 EcoRI 和 NotI 消化的动物细胞表达载体 pcDNA3.1Zeo(Invitrogen)相连接。以这种方法构建的所述表达载体被克隆且其核苷酸序列得以确定,从而确认该表达载体编码添加有 His6 标记序列的目标蛋白,即人 FGF23 蛋白。所述载体被称为 pcDNA/hFGF23H。

[0191] F1EcoRI :CCGGAATTCAGCCACTCAGAGCAGGGCACG (SEQ IDNO :1)

[0192] LHisNot :

[0193] ATAAGAATGCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGATGGATGAACTTGGCGAA (SEQ ID NO :2)

[0194] (2) 人 FGF23 蛋白表达载体的构建

[0195] 用 pcDNA/hFGF23H 作为模板扩增片段, 其中使用 F1EcoRI 引物和 LNot 引物 (SEQ ID NO :3) 和 LA-Taq DNA 聚合酶, 进行 25 个 PCR 循环, 每个 PCR 循环的组成为 :94°C 保温 1min, 然后 94°C 30 秒, 55°C 30 秒和 72°C 1min。结束反应后, 所述编码人 FGF23 片段用 EcoRI 和 Not I 进行消化处理, 然后纯化。通过将其插入到 pEAK8/IRES/EGFP 载体的 EcoRI 和 NotI 限制酶位点, 这些纯化得到的片段被克隆, 所述 pEAK8/IRES/EGFP 载体是动物细胞表达载体, 其是通过在 pEAKS (Edge Biosystem) 内连接分子内核糖体进入序列 (intramolecular ribosomal entry sequence, IRES) 和增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 而得到的。由此获得的质粒的核苷酸序列得以确定, 从而确认其编码人 FGF23 蛋白。所述载体被称为 pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23。

[0196] LNot :ATAAGAATGCGGCCGCTCAGATGAACTTGGCGAA (SEQ ID NO :3)

[0197] (实施例 2)

[0198] (1) 重组人 FGF23 蛋白和重组突变型人 FGF23 H 蛋白的表达。

[0199] 通过对所述载体中氨苄青霉素抗性基因上 FspI 限制酶位点的剪切, 使 pcDNA/hFGF23H 被线性化并被纯化, 然后与鼠 CHO 克隆 -1 细胞 (Shirahata, S., 等, Biosci Biotech Biochem, 59 :345-347, 1995) 混合, 并利用 Gene Pulser II (Bio Rad) 穿孔仪, 使用电穿孔法被转染到此细胞内。在用含有 10% FCS 的 MEM α 培养基 (Gibco BRL) 培养这些细胞 24 小时后, 培养基中加入 Zecocin (Invitrogen) 到终浓度 0.5mg/ml, 然后 (用此培养基) 培养所述细胞 1 个星期。胰酶消化后, 贴壁生长的细胞被释放, 并通过有限稀释法, 使其在 Zecocin 终浓度为 0.3mg/ml 的条件下被克隆, 以得到很多的细胞克隆。利用蛋白质印迹 (Western blotting) 技术, 表达人 FGF23H 效率最高的细胞被鉴定出来。每个细胞克隆的培养上清液都被收集并对其进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将 (电泳得到的) 蛋白转移到 PVDF 膜 (Millipore) 上。通过使用抗 -His-tag (羧基末端) 抗体和 ECL 光致发光系统 (photo-luminescent, GE Healthcare Bioscience), 检测出来自约 32kDa 附近的 FGF23 H 蛋白的信号。因此, 具有最高表达能力的被称为 #20 的细胞克隆被发现, 此细胞克隆被命名为 CHO-OST311H, 并于 2000 年 8 月 11 日保藏于位于日本的国际专利生物体保藏中心国立先进工业科学和技术研究院 (International Patent Organism Depository (IPOD) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)), Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (保藏号 :FERM BP-7273)。在本说明书中, CHO-OST311H 被称作 CHO-hFGF23H。

[0200] (2) 人 FGF23 表达细胞的获得

[0201] pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23 载体对 CHO Ras 克隆 -1 细胞的转染通过使用膜融合脂的基因转染方法完成。当培养于 6 孔培养板中的 CHO Ras 克隆 -1 细胞已经覆盖住所述 6 孔培养板底部约 60% 时, 移去所述培养基, 并加入 1ml 无血清的 MEM α 培养基。2.5 μ g 转入载体和 10 μ l Transfectam (注册商标) (Promega) 分别与 50 μ l MEM α 无血清培养基混合, 两种溶液混合后, 静置 10min。将混合物加入事先准备好的 6 孔板的培养孔中。孵育 2 小时后, 移去含有 DNA 的培养基, 换上含有 10% FCS 的培养基, 孵育培养物一整夜。第二天, 加入嘌呤霉素 (Sigma) 至终浓度 5 μ g/ml, 以选择具有药物抗性的细胞。通过有限稀释法,

由此获得的具有药物抗性的细胞被克隆。此外,利用蛋白质印迹技术,得到表达目标蛋白效率最高的细胞系。所述细胞被称为 CHO-hFGF23。

[0202] (3) 重组人 FGF23 蛋白在动物细胞中的表达和检测。

[0203] 用抗羧基端-His6 标记序列的抗体对培养物上清液中 CHO-hFGF23H 重组物的蛋白质印迹,检测到两条约为 32kDa 和 10kDa 的条带。将这两条带从凝胶中切出,并测定其 N-末端氨基酸序列。在较大分子量条带(约为 32kDa)中,所检测到的序列是从 SEQ ID NO:4 中第 25 位氨基酸开始的氨基酸序列,它可被视为是在分泌过程中其信号肽段序列已被切除的人 FGF23 蛋白。另一方面,在较小分子量条带中,所检测序列被确认是从 SEQ ID NO:4 中第 180 位氨基酸开始的氨基酸序列,事实证明此片段是 179 与 180 位氨基酸之间发生剪切后产生的羧基末端片段。此外,通过利用可识别所述人 FGF23N-末端一侧的多克隆抗体对其的检测,具有从第 179 位氨基酸开始到 N-末端氨基酸序列的多肽(氨基酸末端肽段)的存在也得到确认(国际专利出版号 W002/14504)。

[0204] 相似地,在所述不具 His6 标记序列的 CHO-hFGF23 培养上清液中,发生于第 179 与 180 位氨基酸残基之间的剪切也得到确认(国际专利出版号 W002/14504)。因此,以下的操作被用于分离和纯化没有发生剪切的全长人 FGF23 蛋白,所述全长人 FGF23 蛋白具有 SEQ ID NO:4 中从第 25 位到第 251 位的氨基酸序列(有时称作全长 FGF23)。

[0205] (4) 重组全长人 FGF23 蛋白的纯化

[0206] 所述 CHO-hFGF23 培养上清液用 SuperCap(注册商标)(Pall GelmanLaboratory)过滤,所使用的 SuperCap 是一种孔径为 0.2 μm 的膜过滤装置,过滤所得滤液通过 SP-Sepharose FF(GE Healthcare Bioscience)。与层析柱结合能力较弱的物质被 50mM 的磷酸钠盐缓冲液(pH 6.7)漂洗和洗脱下来。所述(洗脱)成分包括发生于第 179 与 180 位氨基酸残基之间的剪切作用产生的所述羧基末端片段。吸附在层析柱中的蛋白被浓度梯度为 0-0.7M 的 NaCl 溶液洗脱下来,全长人 FGF23 蛋白在约 0.3M NaCl 溶液的洗脱成分中被观察到。下一步,全长人 FGF23 蛋白被吸附到金属亲和性层析柱 TalonSuperflow(注册商标)(Clontech)中,并经 50mM 的磷酸钠盐缓冲液(pH6.7)漂洗,通过加入不同浓度咪唑,将所述全长人 FGF23 蛋白洗脱纯化。

[0207] 包含目标蛋白的所述(洗脱)成分被 SP-Sepharose FF 柱吸收,洗脱后纯化。

[0208] 人 FGF23 氨基酸序列(SEQ ID NO:4)

[0209] MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLIHLYTATARN S YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY

[0210] SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDPENCRFQHQT L ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR

[0211] AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRSAEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL

[0212] PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKFI

[0213] (实施例 3)

[0214] 生产人抗体的小鼠的产生(KM 小鼠)

[0215] 用于制备人单克隆抗体的生产完全人抗体的小鼠具有内源性 Ig 重链和 κ-轻链都被破坏的纯合体遗传背景,同时具有包含人 Ig 重链基因位点的第 14 号染色体片段

(SC20) 和人 Ig κ - 轻链转基因 (KCo5)。所述小鼠通过 A 品系小鼠和 B 品系小鼠的杂交育种获得, 其中 A 品系小鼠具有人 Ig 重链基因位点, B 品系小鼠具有人 Ig κ - 轻链转基因 (KCo5)。所述 A 品系小鼠为内源性 Ig 重链和 κ - 轻链都被破坏的纯合体, 且具有可被传递给后代的第 14 号染色体片段 (SC20) 的小鼠品系。此小鼠品系在如 Tomizuka 等作出的报道中被描述 (Tomizuka, 等, Proc Natl. Acad. Sci. USA., 97 :722-727, 2000)。此外, 所述 B 品系小鼠为内源性 Ig 重链和 κ - 轻链都被破坏的纯合体, 且具有所述人 Ig κ - 轻链转基因 (KCo5) 的转基因小鼠品系。此小鼠品系在如 Fishwild 等作出的报道中被描述 (Nat. Biotechnol., 14 ;845-851, 1996)。

[0216] 在以下的免疫实验中所用的小鼠个体是由雄性 A 品系小鼠和雌性 B 品系小鼠或雌性 B 品系小鼠和雌性 A 品系小鼠杂交所获得的小鼠, 并且, 在此所用的小鼠血清中可同时检测到人 Ig 重链和 κ - 轻链 [Ishida & Lonberg, IBC' s 11th Antibody Engineering, Abstract 2000]。此外, 所述产生人抗体的小鼠也可通过缔结合约的方法从 Kirin Beer Company 公司获得。

[0217] (实施例 4)

[0218] 抗人 FGF23 的人单克隆抗体的制备

[0219] (1). 产生抗人 FGF23 的人单克隆抗体的杂交瘤的获得。

[0220] 本实施例中所用单克隆抗体可用普通方法制备, 如, 由 Tamio Ando 等编写的“单克隆抗体实验室操作说明”(“Introduction to monoclonal antibody experimental manipulation”), (Kodansha 出版, 1991)。实施例 2 中制备的全长人 FGF23 蛋白被用作免疫原, 使用可产生实施例 3 中制得的人免疫球蛋白的人抗体生成小鼠。

[0221] 为制备人抗 FGF23 单克隆抗体, 首先, 将实施例 2 中得到的经纯化的全长人 FGF23 蛋白与 RIBI 佐剂 (Corixa) 在腹腔内混合, 并在首次免疫时以每只小鼠 20 μ g 的剂量, 将其腹腔接种于人抗体生成小鼠。与首次免疫相类似, 在两周的时间间隔内, 将纯化得到的 FGF23 蛋白与 RIBI 佐剂 (Corixa) 混合物共接种小鼠 3 次。五只小鼠被用于免疫作用, 第三次免疫后, 抽取血液样本, 利用下述酶标识免疫吸附法 (ELISA 法), 血清中抗 FGF23 人 IgG 抗体的存在得到确认。利用 ELISA 方法, 使用由用抗 FGF23 蛋白单克隆鼠抗体 --3CIE 抗体而固定化的 FGF23, 血清中含有最高 (抗 FGF23 人 IgG 抗体) 浓度值的小鼠被筛选出来, 其中, 所用抗 FGF23 蛋白单克隆鼠抗体 --3CIE 抗体被公开于国际专利出版号 W003/057733 (作为 FERM BP-7839 被保藏的杂交瘤产生的抗 -FGF23 抗体)。在进行如下所描述的脾脏分离之前 3 天, 通过鼠尾静脉 (接种) 给药, 以每个小鼠给药 20 μ g 全长人 FGF23 蛋白免疫小鼠。

[0222] 所述脾脏用外科手术从经免疫的小鼠中分离出来, 并被浸入含有 350mg/mL 碳酸氢钠、50 单位/mL 青霉素、50 μ g/mL 链霉素的 10mL 无血清 DMEM 培养基中 (Invitrogen, 以下称作无血清 DMEM 培养基), 然后用刮勺 (spatula) 将其碾碎在滤网 (mesh) 上 (细胞滤器 :Falcon)。通过此滤网 (mesh) 的所述细胞悬浮液经离心后, 生成细胞沉淀, 然后, 用无血清 DMEM 培养基漂洗这些细胞两次, 接着, 对悬浮在无血清 DMEM 培养基中的这些细胞进行细胞计数。当骨髓瘤细胞 SP2/0 (ATCC No. CRL-1581) 在含有 10% FCS (Sigma) 的 DMEM (Invitrogen) 培养基 (以下称作含血清 DMEM 培养基) 中, 于 37°C 和存在 5% CO₂ 条件下进行培养时, 要使其细胞密度不高于 1 \times 10⁶ 细胞 /mL。同样, 用无血清 DMEM 培养基

漂洗这些骨髓瘤细胞,并悬浮在无血清 DMEM 培养基中进行细胞计数。回收得到的脾脏细胞悬浮液与鼠骨髓瘤细胞悬浮液按 5 : 1 的细胞数目比例混合并离心后,将上清液完全去除。对所述细胞团,在一边用移液管尖端搅拌此细胞团时,一边缓慢加入作为融合介质的 1mL 50% (w/v) 的聚乙二醇 1500 (Boehringer-Manheim),然后分两次缓慢加入预热到 37°C 的 1mL 无血清 DMEM 培养基,再加入 7mL 无血清 DMEM 培养基。离心后,去除上清液,得到融合细胞。由此所得的融合细胞用如下所述的有限稀释法进行筛选。杂交瘤的筛选通过在含 10% FCS、IL-6 (10ng/mL) (或 10% 杂交瘤克隆因子 (以下称作 HCF) :Biobase)、次黄嘌呤 (H)、氨基蝶呤 (A) 和胸腺嘧啶脱氧核苷 (T) (以下称作 HAT Sigma) 的 DMEM 培养基中培养来完成的。此外,用含 HT (Sigma)、10% FCS 和 10% HCF 的 DMEM 培养基,并通过有限稀释法,进行单个克隆。(细胞的) 培养在 96 孔微量滴定板 (Becton, Dickinson) 上进行。生成抗 -FGF23 人单克隆抗体的杂交瘤克隆的选择 (筛选) 和由各个产生杂交瘤的人单克隆抗体的品质鉴定,通过如下所述的酶标识免疫吸附法 (ELISA 法) 进行。结果,得到许多杂交瘤,所述杂交瘤包含人免疫球蛋白 γ 链 (hIg γ) 和人免疫球蛋白轻链 κ , 并且可产生具有与人 FGF23 特殊反应活性的人单克隆抗体。从这些所得到的许多杂交瘤中,作为产生识别 FGF23 蛋白的抗体的杂交瘤,特别获得 2 个克隆 (C10 和 C15)。此外,在包括本实施例在内的以下所有实施例中,生成本发明的抗 -FGF23 人单克隆抗体的各杂交瘤克隆用符号代表。在所述符号的前或后所出现的“抗体”意指由杂交瘤生成的抗体,或由宿主细胞产生的重组抗体,所述宿主细胞带有从所述杂交瘤中分离出来的抗体基因 (全长或可变区)。在本文明确指出的范围内,有时杂交瘤克隆的名称可表示抗体的名称。在 2007 年 2 月 2 日, C10 杂交瘤克隆已保藏于位于日本的国际专利生物体保藏中心国立先进工业科学和技术研究院 (International Patent Organism Depository (IPOD) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)), Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki) (保藏号为 FERM ABP-10772) (ID 标签 :C10)。

[0223] (2) 来自于所述杂交瘤培养物上清液的 C10 和 C15 抗体的纯化

[0224] 实施例 4(1) 中得到的 C10 和 C15 杂交瘤被限制培养在含有胰岛素 (5 μ g/ml, Invitrogen)、人转铁蛋白 (5 μ g/ml, Invitrogen)、二磷脂酰甘油 (0.01mM, Sigma)、亚硒酸钠 (2.5 \times 10⁻⁵mM, Sigma)、1% Low IgG 胎牛血清 (Hyclone) 的 eRDF 培养基 (Kyokuto Seiyaku) 中。所述杂交瘤被培养在长颈瓶中,所得培养物上清液被回收。利用 Protein G Fast Flow 凝胶 (GE Healthcare, Bioscience),使所述培养物上清液被亲和性纯化,此法使用 PBS(-) 为吸附缓冲液,0.1M 甘氨酸缓冲液为洗脱缓冲液 (pH 2.8)。通过加入 1M Tris (pH9.0),将洗脱成分的 pH 值调整到约为 pH 7.2。使用 Sephadex G25 脱盐层析柱 (NAP column ;GE Healthcare Bioscience),由此制得的所述抗体溶液被 PBS 所置换,然后通过孔径为 0.22 μ m 膜过滤器 MILLEX-GV (Millipore) 的过滤灭菌作用,使其无菌化,从而得到纯化的 C10 和 C15 抗体。通过测定经纯化的抗体在 280nm 的吸光值,来测定其浓度,其中,计算基准为 1.40D = 1mg/mL。

[0225] (实施例 5)

[0226] 编码 C10 抗体的抗体基因的获得及其序列的测定

[0227] (1). C10 抗体的 cDNA 序列的合成

[0228] 为获得表达于 C10 杂交瘤的含有人抗体重链和轻链的抗体可变区的所述 DNA 片

段,应用 5' RACE 法(5' cDNA 末端快速扩增技术)进行克隆,所述 5' RACE 法使用可与人抗体重链和轻链恒定区特异性结合的引物。具体是,进行克隆时所用的试剂盒为 BD SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Becton Dickinson Bioscience Clonotech),克隆按试剂盒所附的操作说明进行。

[0229] 根据操作说明,将 RNA 抽提试剂 ISOGEN(Nippon Gene)加入到 C10 杂交瘤中,取 15 μ g 纯化得到的总 RNA 用作 cDNA 合成的原料。以各个约 1 μ g 的纯化获得的总 RNA 为模板,制得第一链 cDNA。除 RNA 之外的所有试剂和酶均由 BD SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(cDNA 扩增试剂盒)提供。

[0230] 在第一链 cDNA 的合成中,

[0231] 总 RNA 1 μ g/3 μ l

[0232] 5' CDS 1 μ l

[0233] SMART Oligo 1 μ l

[0234] 由上述组分组成的反应混合物于 70°C 孵育 2 分钟,然后,加入:

[0235] 5 \times Buffer 2 μ l

[0236] DTT 1 μ l

[0237] dNTP Mix 1 μ l

[0238] PowerScript 反转录酶 1 μ l

[0239] 接着,于 42°C 孵育 1.5 小时。

[0240] 进一步地,加入 50 μ l Tricine-EDTA 缓冲液,然后于 72°C 孵育 7 分钟,获得第一链 cDNA。

[0241] (2)PCR 方法扩增所述重链和轻链基因,并确认其核苷酸序列

[0242] (2)-1;PCR 方法扩增所述重链和轻链基因

[0243] 为扩增编码所述 C10 抗体的基因的 cDNA,下述的反应混合物被制备并被用于 PCR,所使用的一组 PCR 引物包括 3' 引物和 5' 引物,其中,所述 3' 引物序列具有对人抗体基因的特异性序列(所述特异性序列将在下面被描述),所述 5' 引物(通用引物 A 混合物)与添加于所述 cDNA 的 5' 末端的序列特异性杂交结合,所述 cDNA 用 BD SMART RACE cDNA 扩增试剂盒合成,此外,PCR 所用酶为 KOD-Plus-DNA 聚合酶(Toyobo)。

[0244] 无菌水 H₂O 28 μ l

[0245] 第 1 链 cDNA 2.5 μ l

[0246] KOD-Plus-缓冲液(10X) 5 μ l

[0247] dNTP Mix(2mM) 5 μ l

[0248] MgSO₄(25mM) 2 μ l

[0249] KOD-Plus-(1 单位/ μ l) 1 μ l

[0250] 通用引物 A 混合物(UPM)(10X) 5 μ l

[0251] 基因特异性引物(GSP)(10 μ M) 1.5 μ l

[0252] 总体积 50 μ l

[0253] 对于所述重链基因的扩增反应,所使用的引物为 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒中的 UPM 引物和 IgG1p 引物(SEQ ID NO:5),而对于所述轻链基因的扩增,所使用的引物为 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒中的 UPM 引物和 hk-2 引物(SEQ ID NO:6)。

[0254] IgG1p :TCTTGTCCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG (SEQ ID NO :5)

[0255] hk-2 :GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGC (SEQ ID NO :引物 6)

[0256] 此外,所用的反应条件如下:

[0257] 重复 5 个循环,每个循环包括 :94°C /30 秒,72°C /3min,

[0258] 重复 5 个循环,每个循环包括 :94°C /30 秒,70°C /30 秒,72°C /3min

[0259] 重复 25 个循环,每个循环包括 :94°C /30 秒,68°C /30 秒,72°C /3min

[0260] 进一步地,2 μ l 所述反应混合物通过加入 98 μ l Tricine-EDTA 缓冲液得到稀释,所得 5 μ l 稀释液作为模板用于第二次 (巢式)PCR 反应

[0261] 所述 PCR 反应溶液的组成如下:

[0262] 无菌水 H₂O 30 μ l

[0263] 第一次 PCR 反应溶液 (50 倍稀释) 5 μ l

[0264] KOD-Plus- 缓冲液 (10X) 5 μ l

[0265] dNTP Mix (2mM) 5 μ l

[0266] MgSO₄ (25mM) 2 μ l

[0267] KOD-Plus- (1 单位 / μ l) 1 μ l

[0268] 巢式通用引物 A (NUP ;10 μ M) 1 μ l

[0269] 基因特异性引物 (GSP) (10 μ M) 1 μ l

[0270] 总体积 50 μ l

[0271] 在上述反应中,用于所述重链基因扩增的一组引物为 NUP 引物 (在 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒中 ;Becton Dickinson Bioscience Clonotech) 和 hh2 引物 (SEQ ID NO :7)。用于所述轻链基因扩增的一组引物为 UPM 引物和 hk-5 引物 (SEQ ID NO :8)。所述反应温度条件如下 :起始温度 94°C 1min,然后重复 20 个循环,每个循环由 :94°C /5sec,68°C /10 秒和 72°C /3min 组成,最后,72°C 加热 7min。

[0272] hh2 :GCTGGAGGGCACGGTCACCACGC (SEQ ID NO :7)

[0273] hk-5 :AGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTTC (SEQ ID NO :8)

[0274] (2)-2 ;所述抗原基因的核苷酸序列的测定

[0275] 经扩增的重链 PCR 片段 (以下称作 HV[C] :由 H 链的 5' - 非翻译区的前导序列,可变区 (HV) 和恒定区的部分区域 [C] 组成) 和经扩增的轻链 PCR 片段 (以下称作 LV[C] :由 L 链的 5' - 非翻译区的前导序列,可变区 (LV) 和所述恒定区的部分区域 [C] 组成) 通过乙醇沉淀法被回收,然后用琼脂糖凝胶电泳法回收。再通过使用膜的 DNA 纯化试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)) 进行纯化。经纯化的 HV[C] 扩增片段或 LV[C] 扩增片段分别被亚克隆到 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒 (Zero Blunt TOPO PCR 克隆盒) (Invitrogen) 的 PCR 4 Blunt-TOPO 载体上,对所获得的克隆的质粒 DNA,作插入 DNA 的核苷酸序列分析。DNA 的核苷酸序列测定所用的引物是 M13-20FW (SEQ ID NO :9) 和 M13RV (SEQ ID NO :10)。

[0276] M13-20FW :GTAAAACGAC GGCCAGTG (SEQ ID NO :9)

[0277] M13RV :CAGGAAACAGCTATGAC (SEQ ID NO :10)

[0278] 编码 C10 抗体的重链可变区和轻链可变区的 DNA 核苷酸序列,以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列展示如下:

[0279] <C10 重链核酸序列>(可变区从 ATG 起始密码子到编码羧基末端氨基酸残基的 DNA 序列)(SEQ ID NO:11)

```
[0280]          10          20          30          40          50          60
[0281] ATGGACTGGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG CTCCAGGTGC TCACTCCCAG
[0282]          70          80          90          100         110         120
[0283] GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GGCCTCAGT GAAGGTTTCC
[0284]          130         140         150         160         170         180
[0285] TGCAAGGCAT CTGGATACAC CTTACCAAC CACTATATGC ACTGGGTGCG ACAGGCCCTT
[0286]          190         200         210         220         230         240
[0287] GGACAAGGGC TTGAGTGGAT GGAATAATC AACCTATTA GTGGTAGCAC AAGTAACGCA
[0288]          250         260         270         280         290         300
[0289] CAGAAGTTCC AGGGCAGAGT CACCATGACC AGGGACACGT CCACGAGCAC AGTCTACATG
[0290]          310         320         330         340         350         360
[0291] GAGCTGAGCA GCCTGAGATC TGAGGACACG GCCGTGTATT ATTGTGCGAG AGATATTGTG
[0292]          370         380         390         400         408
[0293] GATGCTTTTG ATTTCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA
```

[0294] <C10 重链氨基酸序列>(到前导序列和可变区)(SEQ ID NO:12)(划线部分氨基酸残基代表作为分泌信号的前导序列)

```
[0295]          10          20          30          40          50          60
[0296] MDWTWRVFL LAVAPGAHSQ VQLVQSGAEV KPGASVKVS CKASGYFTN HYMHWRQAP
[0297]          70          80          90          100         110         120
[0298] GQGLEWMGII NPISGSTSNA QKFQGRVTMT RDTSTSTVYM ELSSLRSEDV AVYYCARDIV
[0299]          130         136
[0300] DAFDFWGQGT MVTVSS
```

[0301] <C10 轻链核酸序列>(可变区从 ATG 起始密码子到编码羧基末端氨基酸残基的 DNA 序列)(SEQ ID NO:13)

```
[0302]          10          20          30          40          50          60
[0303] ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC
[0304]          70          80          90          100         110         120
[0305] AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA
[0306]          130         140         150         160         170         180
[0307] GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTTAGTCTG GTATCAGCAG
[0308]          190         200         210         220         230         240
[0309] AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGGG AAGTGGGGTC
[0310]          250         260         270         280         290         300
[0311] CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTC A CTCTACCAT CAGCAGCCTG
[0312]          310         320         330         340         350         360
[0313] CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATGATTACTT CACTTTCGGC
[0314]          370         380         384
```

[0315] CCTGGGACCA AAGTGGATAT CAAA

[0316] <C10 轻链氨基酸序列>(到前导序列和可变区)(SEQ ID NO:14)(划线部分氨基酸残基代表作为分泌信号的前导序列)

[0317] 10 20 30 40 50 60

[0318] MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCAIQLTQSP SLSASVGDRTVTITCRASQG ISSALVWYQQ

[0319] 70 80 90 100 110 120

[0320] KPGKAPKLLI YDASSLESV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QGFNDYFTFG

[0321] 128

[0322] PGTKVDIK

[0323] 此外,在亚克隆于载体 PCR 4 Blunt-TOPO 的 C10 抗体的基因序列中,所述人抗体恒定区的部分序列被克隆,且此区域的 DNA 核苷酸序列也得到分析。其结果,可确认编码由 Kabat 等编写的 EU index 中所示的重链恒定区 118 位到 191 位氨基酸残基的序列,在此区域中,此序列被确认与人 IgG1 的氨基酸序列完全一致,且 C10 抗体亚类为 IgG1。此外,通过使用同样的方法,编码 C15 抗体的抗体基因也被获得,此抗体所属序列也得到确定。

[0324] (实施例 6)

[0325] 重组 C10 抗体表达载体的构建

[0326] C10 表达载体的产生(技术方案显示在图 1)

[0327] 利用 PCR 技术,使用 KOD-Plus-DNA 聚合酶,以获得的含有 C10 抗体 LV[C] 链的质粒 DNA 为模板,使用在其末端被设计成连上限制酶切位点(5' 末端 BgIII,3' 末端 BgIII)的引物 C10_L5_BgI(SEQ ID NO:15)和 C10_L3_Bsi(SEQ ID NO:16),所述 C10 抗体的 LV(轻链的前导序列+可变区)DNA 被扩增。所述反应温度条件为:起始温度 94°C 加热 1min,每个循环包括:94°C /5 秒和 68°C /45 秒重复此循环 35 次,最后,72°C 加热 3min。经扩增的 DNA 片段用限制性内切酶 BgIII 和 BsiWI 消化处理后,再用琼脂糖凝胶电泳法纯化,回收得到约 400bp DNA。另一方面,所述载体,N5KG1-Val Lark 载体(IDEA Pharmaceuticals,N5KG1 修饰型载体(美国专利 6001358))同样经限制性内切酶 BgIII 和 BsiWI 消化处理,并经碱性磷酸酶(E. coli C75)(Takara Shuzo Co.,Ltd.)去磷酸化作用处理,然后用琼脂糖凝胶和 DNA 纯化试剂盒纯化,回收得到稍小于 9kb 的 DNA。这两条 DNA 片段经 T4 DNA 连接酶连接后,转染到大肠杆菌 DH10B,以获得转化子。对含有插入 DNA 的转化子的质粒 DNA 作 DNA 核苷酸序列分析后,获得质粒 DNA,N5KG1_C10_Lv,其中,C10 抗体的 LV 被插入到编码 N5KG1-Val Lark 人抗体轻链恒定区的 5' 上游处的框架内。下一步,所述 C10 抗体的 HV DNA(重链前导序列+可变区)被插入质粒载体(N5KG1_C10-Lv),其中,此质粒载体中已被插入 LV。以含有所述 C10 抗体的 HV[C] 的被亚克隆于 pCR4Blunt-TOPO 载体的质粒 DNA 为模板,使用设计成末端连有限制酶切位点(SalI 位于 5' 末端,NheI 位于 3' 末端)的引物 C10_H5_Sal(SEQ ID NO:17)和 C10_H3_Nhe(SEQ ID NO:18),用 PCR 扩增 HV。所述反应温度条件为:起始温度 94°C 加热 1min,每个循环包括:94°C /5 秒和 68°C /45 秒,重复此循环 35 次,最后,72°C 加热 7min。经纯化的扩增的 HV DNA 片段被亚克隆于 pCR4Blunt-TOPO 载体,对由此获得的克隆的质粒 DNA,作插入 DNA 的核苷酸序列分析。DNA 的核苷酸序列测定所用的引物是上面所述的 M13-20FW 和 M13RV。对亚克隆,作插入部分 DNA 的核苷酸序列的分析,这与作为模板的 HV 没有差异,此外,选择的质粒 DNA(TOPO_C10_Hv),其中的引物部分具有所设计的序

列。这些 DNA 被限制酶 SalI 和 NheI 消化后,用琼脂糖凝胶电泳法纯化,回收得到约 420bp 的 DNA,此 DNA 片段用 T4 DNA 连接酶连接到同样地经限制酶 (SalI 和 NheI) 处理和去磷酸化处理的 N5KG1_C10_Lv DNA (约 9kb) 上,然后,将所得连接产物转入到大肠杆菌 DH10B,从由此得到的转化子中筛选出所述目标的质粒 DNA。大量纯化由上述方法得到的抗体表达质粒 DNA--N5KG1_C10_IH(克隆 #1),并证实在克隆过程中, L 链和 H 链整个区域,及其插入位点周围的 DNA 核苷酸序列没有被引入变化 (图 2,图 3)。进行 DNA 核苷酸序列的确认时,使用 SEQ ID NO:19-25 的各种引物。制得的所述 C10 抗体表达载体的简图见图 4。此外,使用同样的方法,构建重组 C10 抗体表达载体。

[0328] C10_L5_Bgl :

[0329] GAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCT (SEQ IDNO :15)

[0330] C10_L3_Bsi :

[0331] AGAGAGAGAGCGTACGTTTGTATCCACTTTGGTCCCAGGGC (SEQ IDNO :16)

[0332] C10_H5_Sal :

[0333] AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTC (SEQID NO :17)

[0334] C10_H3_Nhe :

[0335] AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC (SEQ IDNO :18)

[0336] hh-4 :GGTGCCAGGGGAAGACCGATGG (SEQ ID NO :19)

[0337] hh-1 :CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC (SEQ ID NO :20)

[0338] CMVH903F :GACACCCTCATGATCTCCCGGACC (SEQ ID NO :21)

[0339] CMVHR1303 :TGTTCTCCGGCTGCCCATTGCTCT (SEQ ID NO :22)

[0340] SEQU4618 :TCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCC (SEQ ID NO :23)

[0341] hk-1 :TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC (SEQ ID NO :24)

[0342] SEQU1783 :GGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA (SEQ ID NO :25)

[0343] (实施例 7)

[0344] 重组型 C10 抗体的制备

[0345] 通过将所述构建完成的 C10 抗体表达载体转入宿主细胞,制得 C10 抗体表达细胞。对于表达宿主细胞,使用在无血清培养基 --EX-CELL325PF 培养基 (JRH,含有 2mM 谷氨酰胺,100 单位 /ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素,次黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷 (HT) 补充物 (1 : 100) (Invitrogen)) 中条件性 (conditioned) 培养的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 缺失的突变型 CHO DG44 细胞系 (以下称作 CHO 细胞, IDEC Pharmaceuticals)。用电穿孔法进行所述载体对宿主细胞的转入。通过电穿孔法,用限制酶 AscI 使约 2 μ g C10 表达载体线性化,并在 350V,500 μ F 条件下,使用 BioRad Electroporator (BioRad 电穿孔仪),将所述基因转入 4×10^6 CHO 细胞中,然后,将所得细胞接种于 96 孔细胞培养板。载体被转入宿主细胞后,加入 G418 并继续培养。对克隆进行确认检验后,筛选得到抗体表达株系。筛选得到的 CHO 细胞系在 EX-CELL-325 PF 培养基 (含有 2mM 谷氨酰胺,100 单位 /ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素,次黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷 (HT) 补充物 (1 : 100) (Invitrogen)) 中,于 5% CO₂ 条件下进行培养。所得培养物上清液被吸收在 Mabselect Protein A column (GE Healthcare Bioscience) 中,用 PBS 漂洗后,再用 20mM 柠檬酸钠盐 (citrate-Na) 和 50mM NaCl (pH3.4) 缓冲液洗脱。用 50mM pH7.0 磷酸钠盐缓冲液中和洗脱液。用去离子水稀释

1.5 倍,将经稀释的洗脱液的导电率调整到 4.0ms/cm 以下。紧接着,所得样品进料后被吸收到由 Q-Sepharose (Hitrap Q HP, GE Healthcare Bioscience) 和 SP-Sepharose (Hitrap SP FF, GE Healthcare Bioscience) 连接组成的层析柱上,用 20mM 磷酸钠盐缓冲液 (pH5.0) 漂洗,然后用 PBS(-) 洗脱。因此制得的抗体溶液通过孔径为 0.22 μm 的膜过滤器, MILLEX-GV (Millipore), 过滤除菌。通过检测其在 280nm 的光吸收值,计算经纯化的 C10 抗体浓度,计算基准为:[1.40D280 = 1mg/mL]。另外,通过使用同样的方法,制备重组 C15 抗体。

[0346] (实施例 8)

[0347] 猕猴 FGF23 蛋白表达载体的构建

[0348] 将经 EDTA 处理后的猕猴静脉血和悬浮在 PBS(-) 中的 5% DextranT-2000 (GE Healthcare Bioscience) 以 2:1 的比例混合,以沉淀血红细胞。随后,上清液分层在淋巴细胞分离液 (Ficoll-Plaque) (GE Healthcare Bioscience) 的上层,离心得到淋巴细胞成分。由此所得的淋巴细胞被悬浮在 ISOGEN-LS (Nippon Gene), 按照所附的实验方案,得到猕猴总淋巴细胞 RNA。按照所附的实验方案,利用所制得猕猴总淋巴细胞 RNA 和第一链 cDNA 合成试剂盒 (Invitrogen), 制备得到猕猴淋巴细胞 cDNA 文库。通过实施以下操作过程使编码猕猴 FGF23 的 cDNA 扩增:所述猕猴淋巴细胞 cDNA 文库为模板,使用猴 yFGF23FW 引物 (SEQ ID NO:26) 和猴 FGF23RV 引物 (SEQ ID NO:27), 以及 KOD plus DNA 聚合酶 (Toyobo), 94°C 孵育 5min, 然后进行 45 个 PCR 循环,每个 PCR 循环由 94°C /20 秒,55°C /30 秒和 72°C /50 秒组成。所述猴 FGF23FW 引物退火后与存在于编码人 FGF23 的核苷酸序列 5' 上游区域的序列相结合,并在扩增得到的 DNA 片段 FGF23 编码区的 5' 处加入 EcoRI 限制酶位点。所述猴 FGF23RV 引物包含一段退火后可与包括编码人 FGF23 编码区终止密码子的序列相结合的序列,并包含有 Not I 限制酶位点。扩增所得的片段经 EcoRI 和 NotI 消化,再插入在 pEAK8/IRES/EGFP 载体的 EcoRI 和 NotI 限制酶位点处而被克隆,其中,所述 pEAK8/IRES/EGFP 载体在表达载体 pEAKS (Edge Biosystem) 内连接了内核糖体进入序列 (IRES) 和增强型绿色荧光蛋白 (EGFP)。对由此得到的质粒的核苷酸序列测序,以确定其编码猕猴 FGF23 蛋白,此载体被称为 pEAK8/IRES/EGFP/猕猴 FGF23。此外,在本实施例中获得的猕猴 FGF23 的核酸序列和氨基酸序列分别显示于 SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:29 中。

[0349] 猴 FGF23FW :CGGAATTCACCATGTTGGGGGCCCGCTCAGGCT (SEQ ID NO:26)

[0350] 猴 FGF23RV :ATTTGCGGCCGCTAGATGAACTTGGCGAAGGGGC (SEQ ID NO:27)

[0351] 猕猴 FGF23 核酸序列 (SEQ ID NO:28)

[0352] ATGTTGGGGGCCCGCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCCTTGTGCAGCGTCTGCAGCATGAGCGTCATCAGAGCCTATCCCAATGCCTCCCCATTGCTCGGCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACACAGCCACAGCCAGGAA CAGCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCACGTGGATGGCGCACCCCATCAGACCATCTACAGTGCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTGGTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGCATGGATTTTCGGAGGC AACATTTTTGGATCACACTATTTCAACCCGAGAACTGCAGGTTCCGACACTGGACGCTGGAGAACGGCTACGACGT CTACCACTCTCCTCAGCATCACTTTCTGGTCAGTCTGGGCCGGGCGAAGAGGGCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCAC CCCCCTACTCCCAGTTCTGTCCCGGAGGAACGAGATCCCCCTCATCCACTTCAACACCCCCAGACCACGGCGGCAC ACCCGGAGCGCCGAGGACGACTCGGAGCGGGACCCCTGAACGTGCTGAAGCCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCC GGCCTCTGCTCACAGGAGCTCCCGAGCGCCGAGGACAACAGCCCGTGGCCAGCGACCCGTTAGGGGTGGTCAGGG

GCGGTCGGGTGAACACGCACGCTGGGGGAACGGGCCCGGAAGCCTGCCGCCCTTCGCCAAGTTCATCTAG

[0353] 猕猴 FGF23 氨基酸序列 (SEQ ID NO :29)

[0354] MLGARLRLWV CALCSVCSMS VIRAYPNASP LLGSSWGGLIHLYTATARN YHLQIHKNHG
VDGAPHQTIY SALMIRSEDAGFVVITGVMS RRYLCMDFFG NIFGSHYFNP ENCRFRHWTLNENGYDVYHSP
QHHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSRRNEIPLIHFN TPRPRRHTRS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
PAPASCSQELPSAEDNSPVA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEACRPFKAF I

[0355] (2) 猕猴 FGF23 表达细胞上清液的制备

[0356] 通过磷酸钙法,将 pEAK8/IRES/EGFP/猴 FGF23 瞬时转染到 PEAK 快速细胞 (rapid cells) (Edge Biosystem) 中,从而获得它们的培养物上清液。

[0357] (实施例 9)

[0358] C10 抗体对猕猴 FGF23 结合能力的研究。

[0359] 通过以下用夹心 ELISA 的方法,研究了 C10 抗体不仅结合于人 FGF23,同样也与猕猴 FGF23 结合。将实施例 4 中制得的 C10 抗体、2C3B 抗体和人 IgG1 对照抗体稀释在 50mM NaHCO₃ 溶液中,得到浓度为 5 μg/ml 的稀释溶液,然后被加到 96 孔微孔板的各个孔中,4℃ 孵育 12 小时,以用于 ELISA (Maxisorp (注册商标),Nunc) 反应。由此,C10 抗体、2C3B 抗体和作为对照的人 IgG1 对照抗体被吸收到微孔板中。接下来,除去所述这些溶液,并在每个孔中加入阻断剂 (SuperBlock (注册商标) 阻断缓冲液,PIERCE),室温孵育 30min,然后用含有 0.1% Tween20 的 Tris 缓冲生理盐水 (T-TBS) 漂洗各个孔两次。将实施例 2 中纯化制得的全长人 FGF23 蛋白或实施例 8 中制得的表达猕猴 FGF23 的细胞上清液稀释到合适的浓度后,加到被抗 -FGF23 抗体覆盖的微孔板的各个孔中,与固定化的抗体反应两个小时,然后用含有 0.1% Tween20 的 Tris 缓冲生理盐水 (T-TBS) 漂洗每个孔两次。接下来加入 3 μg/ml 生物素标记的 3C1E 抗体,室温孵育 1.5 小时,以使生物素标记的 3C1E 抗体与人或猕猴 FGF23 结合,其中,所述人或猕猴 FGF23 被结合在固定化抗体上。用 T-TBS 漂洗后,加入 5000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的链亲合素 (DAKO),使之反应 1 小时,并用 T-TBS 漂洗 3 次。每孔加入含有四甲基联苯胺 (DAKO) 的底物缓冲液,室温孵育 30min。每孔中加入 0.5M 的硫酸,终止反应。以 570nm 波长为参照波长,用微孔板读出机 (MTP-300,ColonaElectric Co.) 检测其在 450nm 波长的吸光度。比较人全长 FGF23 蛋白和猕猴 FGF23 表达细胞培养物上清液在以 3 倍的稀释比进行稀释时的反应活性。所得结果显示在图 5A 和图 B。正如图 5A 清楚显示的那样 C10 抗体或 2C3B 抗体固定化时,对人全长 FGF23 蛋白的反应活性是相同的。在此条件下,对于猕猴 FGF23 表达细胞培养物上清液的稀释系列的反应性,在 C10 抗体反应活性和 2C3B 抗体反应活性之间,没有观察到太大差异 (图 5B)。也即是,C10 抗体,与 2C3B 抗体相同,被证明能够结合于人和猕猴 FGF23。

[0360] (实施例 10)

[0361] C10 抗体和 2C3B 抗体对正常猕猴血中磷浓度和血中 1 α, 25-二羟基维生素 D 浓度的作用效果比较。

[0362] FGF23 具有以下的作用:促进肾磷排泄和降低血液磷浓度,抑制肾中维生素 D 活化酶和降低血中 1 α, 25-二羟基维生素 D (以下称作 1, 25D) 浓度 (国际专利出版号 W002/14504)。已证实将对 2C3B 抗体等 FGF23,具有抑制作用,也即是,中和活性的抗体,给药于正常鼠,导致内源性 FGF23 活性的抑制、血清磷酸盐浓度和血清 1, 25D 浓度升高 (国际

专利出版号 W003/057733)。由此,这强烈表明对 FGF23 具有中和活性的抗体对由过量 FGF23 导致的包括肿瘤引起的软骨病、XLH 等在内的人类疾病具有治疗作用。因此,研究了本发明中得到的人抗体 --C10 抗体在体内对 FGF23 的中和活性。尤其是,由于对它在人体上的药理作用的期望,通过使用猴的内源性 FGF23 功能的抑制、以及猴的血清磷酸盐浓度和血清 1,25D 浓度的升高为指标,测定其中和活性能,其中,猴与其它动物种如啮齿类动物等相比,猴在进化上与人更接近。进行实验时,使用小鼠抗体 --2C3B 抗体,作为 C10 抗体的比较对照。

[0363] 使用下面的方法,在未经处理的正常猕猴体内 C10 抗体和 2C3B 对血清磷酸盐浓度的增长效果进行比较。使用实施例 4 中生产的 C10 抗体。所用实验动物为 2-3 岁的雌性猕猴,体重 2-4kg。各有 3 只动物被用于所述溶剂给药组和 2C3B 抗体给药组,4 只动物被用于 C10 抗体给药组。C10 抗体和 2C3B 抗体分别用 PBS(-) 配制成浓度为 3mg/ml 的抗体溶液,以此作为给药溶液。所述 PBS(-) 溶剂被用作阴性对照。C10 和 2C3B 抗体分别通过头臂静脉以 1ml/min 的流速,分别按 1mL/kg(相当于 3mg/kg) 给药量给药一次。通过 L 型 Wako 无机磷试剂(Wako Pure Chemical Industries)和 Hitachi Clinical Analyzer Model 7180(Hitachi, Ltd.), 检测血清磷酸盐浓度。通过 1,25(OH)₂D RIA Kit[TFB](Immunodiagnostic System), 检测血清 1,25D 浓度。所述检测在抗体给药后 0.5、1、2、3、5、7、10、14、21、28、35、42、和 49 天分别进行。数据用平均值 +/- 标准误差表示。图 6 的数据显示每种抗体给药后 10 天内定期收集的血液样本中血清磷浓度的变化。在测试期间,PBS(-) 给药组血清磷浓度几乎不变,而在所述 C10 抗体给药组和 2C3B 抗体给药组,与给药前和 PBS(-) 给药组相比,观察到明显的血清磷浓度升高。在所述 C10 抗体和 2C3B 抗体给药组,血清磷浓度最高值出现时间均为抗体给药后第 5 天。在此时间点上,PBS(-) 组、2C3B 抗体组和 C10 抗体组的血清磷浓度分别为 5.28mg/dl, 8.10mg/dl 和 9.59mg/dl。比较抗体给药 5 天后 2C3B 抗体组和 C10 抗体组的血清磷浓度与同时期的 PBS(-) 组的血清磷浓度的上升值,2C3B 抗体组中血清磷浓度增长为 2.82mg/dl,而在 C10 抗体组血清磷浓度增长为 4.31mg, (这些结果) 表明,与所述 2C3B 抗体组相比,C10 抗体诱导的血清磷浓度增长是 2C3B 抗体诱导的血清磷浓度增长的 1.5 倍以上(图 7)。因此,与所述 2C3B 抗体给药组相比,C10 抗体给药组对血清磷浓度增长的作用明显更高。此外,给药 10 天后,2C3B 抗体给药组的血清磷浓度与 PBS(-) 组的血清磷浓度处于相同水平,而 C10 抗体给药组中的血清磷浓度(8.76mg/dl) 仍维持在比 2C3B 抗体给药组血清磷浓度最高水平(8.10mg/dl) 还要高的水平(图 6)。另外,由 C10 抗体引起的增加后血清磷浓度的保持时间比由 2C3B 抗体引起的增加后血清磷浓度保持时间更长,用 2C3B 抗体的所述保持时间是 7 天,这与 PBS(-) 给药组有明显差别,而用 C10 抗体的所述保持时间是令人惊讶的 35 天,两者相差约 5 倍。同样地,对于抗体给药后的 1,25D 浓度,与 2C3B 抗体给药相比,C10 抗体给药后的 1,25D 浓度明显上升,并且其保持时间明显延长(图 8)。

[0364] 这些结果表明,与现有的 FGF23 中和抗体 --2C3B 抗体相比,在猕猴体内,C10 抗体具有更强的促血清磷浓度和血清 1,25D 浓度增长活性,也即是,具有更强的 FGF23 中和活性。目前对 XLH 等低血磷症性佝偻病的治疗,要求每天大剂量的磷和维生素 D 多次给药,以勉强维持磷浓度处于正常范围内。有报道表明给药多次性导致病人应变性差。本研究中,C10 抗体的单次给药即可得到对血清磷浓度和血清 1,25D 浓度持续性增长活性的事实表

明,作为低磷血症治疗性药物,与常规的治疗方法相比,C10 抗体在治疗的疗效上很可能具有显著的优势。

[0365] (实施例 11)

[0366] C15 抗体对人和猕猴 FGF23 反应活性的确定

[0367] 用磷酸钙法将实施例 11 中制得的 pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23 或实施例 8 中制得的 pEAK8/IRES/EGFP/猴 FGF23 瞬时基因转染于 PEAK 快速细胞 (Edge Biosystem)。转染 3 天后,收集每个培养物上清液。以实施例 13 中制得的 C15 抗体为一抗 (图 9),对所收集的培养物上清液作蛋白质印迹。结果表明:类似于 C15 与人 FGF23 结合,C15 也与猕猴 FGF23 结合。

[0368] (实施例 12)

[0369] C10 抗体和 C15 抗体对正常猕猴血磷浓度和血中 $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D 浓度的作用效果比较。

[0370] 实施例 11 表明:C15 抗体如同 C10 抗体那样具有与人和猕猴 FGF23 重组蛋白结合活性。随后,对于 C10 抗体和 C15 抗体,通过将其给予正常猕猴,比较其在体内对 FGF23 的中和活性。对猕猴内源性 FGF23 的中和活性的评价,以血磷浓度的上升值为指标来进行,使用实施例 7 中制得的 C10 抗体和 C15 抗体。所用实验动物为 2-3 岁和体重 2-3kg 的正常猕猴。每个实验组使用 2 只雄性和一只雌性共 3 只动物。所用稀释介质为 PBS(-)。制备的 C10 抗体浓度为 1mg/ml 和 3mg/ml, C15 抗体浓度为 3mg/ml。所述抗体通过隐静脉以 1ml/min 的流速,按 1mL/kg 的容量给药一次,以此获得 1mg/kg 和 3mg/kg 的 C10 抗体给药剂量和 3mg/kg C15 抗体给药剂量。血清磷浓度通过 L 型 Wako 无机磷试剂 (L 型 Wako 无机磷试剂) (Wako PureChemical Industries) 和日立自动分析仪 7180 (Hitachi Clinical Analyzer Model 7180 (Hitachi, Ltd.)) 被测定。采血在抗体给药前和给药 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 和 28 天后进行。测定在所有采血点的血清磷浓度。在 C10 抗体 1mg/kg 给药组, C10 抗体 3mg/kg 给药组和 C15 抗体 3mg/kg 给药组, 给药前它们的血清磷浓度分别为 5.37, 5.70 和 5.58mg/dL, 各组之间没有显著差异。给药后, 所有猕猴体内均被观察到有血清磷浓度的增长。因此, 不仅 C10 抗体, 而且 C15 抗体也显示出对猕猴内源性 FGF23 的中和活性。在 C10 抗体 1mg/kg 给药组, C10 抗体 3mg/kg 给药组和 C15 抗体 3mg/kg 给药组, 给药 3 天后血清磷浓度分别为 9.03, 9.10 和 8.64mg/dL。在此时间点, C10 抗体 1mg/kg 给药组和 C15 抗体 3mg/kg 给药组的血清磷浓度达到最高值。另一方面, C10 抗体 3mg/kg 给药组的血清磷浓度继续增长并在给药 5 天后达到最高值, 此最高值为 9.75mg/dL。在 C10 抗体 1mg/kg 给药组, C10 抗体 3mg/kg 给药组和 C15 抗体 3mg/kg 给药组, 给药前和给药后的血清磷浓度最大差额分别为 3.67, 4.65 和 3.06mg/dL。由此结果可知, 在同样 3mg/kg 剂量下, 与 C15 抗体 (对血清磷浓度的增长作用) 相比, C10 抗体不仅显示出对血清磷浓度更高的增长作用。而且让人惊讶的是, C10 抗体 1mg/kg 剂量给药对血清磷浓度的增长作用比 C15 抗体 3mg/kg 剂量给药 (对血清磷浓度的增长作用) 还要高。接下来, 对相比于给药前水平的血清磷浓度增长的持续时间进行了比较。其结果是: 所述 C10 抗体 1mg/kg 给药组, C10 抗体 3mg/kg 给药组和 C15 抗体 3mg/kg 给药组的血清磷浓度增长的持续时间分别是 14, 28 和 7 天。由此结果可知, 在同样 3mg/kg 剂量下, 与 C15 抗体 (对血清磷浓度增长的持续时间) 相比, C10 抗体不仅显示出对血清磷浓度增长活性的更高持续性。而且让人惊讶的是, C10 抗体 1mg/kg 剂量, 比 C15 抗

体 3mg/kg 剂量,可将血清磷浓度更长期地保持在高水平。以上这些事实说明,在猕猴体内,C10 抗体与同时获得的 C15 抗体(对血清磷浓度的作用)相比,C10 抗体具有更强的对血清磷浓度的增长活性和对血清磷浓度增长活性的持续性。也即是,与 C15 抗体相比,C10 抗体具有明显强的对猕猴 FGF23 的中和活性。

[0371] (实施例 13)

[0372] 人 FGF23 DNA 片段(不含信号肽序列)的制备。

[0373] 按照操作说明书,用 KOD-plus-DNA 聚合酶(Toyobo)制备反应溶液。将 FGF23(-SP) FW 引物(SEQ ID NO:34)和 FGF23(-SP)RV 引物(SEQ IDNO:35)各 50pmol,作为模板的人 FGF23-cDNA(从起始密码子到终止密码子共长 756bp,SEQ ID NO:36),添加到 50 μ l 反应溶液中,94℃ 孵育 3min 后,进行 30 个循环扩增,每个循环由 98℃ /15 秒、63℃ /15 秒和 68℃ /2min30 秒组成。再在 72℃ 孵育 3min。所得 684bp 扩增片段用 0.8% 凝胶分离收集。按照操作说明书,使用 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen),从经回收的凝胶中回收所述扩增片段。用 FseI(New England Biolabs Japan)对所回收的扩增片段进行酶消化,按照操作说明书,用 QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen)回收经酶处理的片段。由此得到与不含人 FGF23 的信号序列的人 FGF23 成熟形式相对应的部分 DNA 片段。

[0374] FGF23(-SP)FW:TATCCCAATGCCTCCCCACTGCTCGGCTCCAGCTG(SEQ ID NO:34)

[0375] FGF23(-SP)RV:

[0376] TTGGCCGGCCCTAGATGAACTTGGCGAAGGGGCGGCAGCCTTCCG(SEQ ID NO:35,包括 FseI 位点)

[0377] 所述人 FGF23 核苷酸序列(下划线标记为信号序列部分的,矩形框标记的是来自于所述(FGF23)全长序列的不含所述信号序列的人 FGF23 成熟形式区域的核苷酸)(SEQ ID NO:36)。

[0378] ATGTTGGGGGCCCGCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCCTTGTGCAGCGTCTGCAGCATGAGCGTCCTCAGAGCC
GCC TATCCCAATGCCTCCCCACTGC

TCGGCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACACAGCCACAGCCA
 GGAACAGCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCATGTGGATGGCG
 CACCCCATCAGACCATCTACAGTGCCCTGATGATCAGATCAGAGGATGC
 TGGCTTTGTGGTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGCATG
 GATTCAGAGGCAACATTTTTGGATCACACTATTCGACCCGGAGAACT
 GCAGGTTCCAACACCAGACGCTGGAAAACGGGTACGACGTCTACCACT
 CTCCTCAGTATCACTTCCTGGTCAGTCTGGGCGGGCGAAGAGAGCCT
 TCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGTACTCCCAGTTCCTGTCCCGGAG
 GAACGAGATCCCCCTAATCACTTCAACACCCCCATAACCACGGCGGCAC
 ACCCGGAGCGCCGAGGACGACTCGGAGCGGGACCCCTGAACGTGCT
 GAAGCCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCGGCCTCCTGTTCACAGGA
 GCTCCCGAGCGCCGAGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCATTAGG
 GGTGGTCAGGGGCGGTCGAGTGAACACGCACGCTGGGGGAACGGGCC
 CGGAAGGCTGCCGCCCTTCGCCAAGTTCATCTAG

[0379] 所述人 FGF23 氨基酸序列基于 SEQ ID NO :36 为标准（下划线标记为信号序列部分的氨基酸残基，矩形框标记的是来自于所述（FGF23）全长序列的不含所述信号序列的人 FGF23 成熟形式区域氨基酸残基）（SEQ IDNO :37）。

[0380] MLGARLRLWVCALCSVCSMSVLRA **YPNASPLLGSSWGGLIHLTYAT**

ARNSYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLC
 MDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRA
 FLPGMNPPPYSQLSRRNEIPLIHFNTPIPRRHTRS AEDDSERDPLNVLKPR
 ARMT PAPASCSQELPSAEDNSPMASDPLGVVVRGGRVNTHAGGTGPEGCR
PFAKFI

[0381] （实施例 14）

[0382] pPSs FGF23 载体的构建

[0383] W02006/78072 实施例 1-8 中描述的 pPSs5.5 经 SfoI 和 FseI 消化，其末端经来自于大肠杆菌的碱性磷酸酶去磷酸化处理。插入在实施例 13 中制得的包含有人 FGF23 基因的 DNA 片段，然后转染入 DH5 α 。从获得的转化子中制取 DNA，确定连接区的核苷酸序列，从而得到 pPSs FGF23 载体（图 10）。

[0384] （实施例 15）

[0385] pUS FGF23 KI 载体的构建

[0386] W02006/78072 实施例 43-1 中被描述的 pCk 1oxPV Δ P 经 SalI 和 FseI 酶消化，其末端经来自于大肠杆菌 C75 的碱性磷酸酶去磷酸化处理。插入一个约为 1.5kb 的片段后，其中，此片段为上述实施例 14 中制得的 pPSs FGF23 载体经 SalI 和 FseI 酶消化后用

0.8%琼脂糖凝胶分离回收后获得,所述载体被转染入大肠杆菌 XL10-Gold 超感受态细胞 (Ultracompetent Cells) (STRA TAGENE)。从获得的转化子中制得 DNA。确定连接区核苷酸序列,从而得到 pUS FGF23 KI 载体 (图 11)。

[0387] 以下所示为 985bp 序列 (SEQ ID NO :38) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :39)。所述 985bp 序列 (SEQ ID NO :38),其中,pUS FGF23 KI 载体人 FGF23 表达单位的从起始密码子到终止密码子的多核苷酸序列 (FGF23 信号序列) 被含编码区域的鼠 Ig κ 信号序列 (SEQ ID NO :38 的划线部分) 取代,并且其下游含有 FGF23 成熟形式序列;所述氨基酸序列 (SEQ ID NO :39),系为由所述 cDNA 编码的氨基酸序列 (247 个氨基酸,划线部分代表鼠 Ig κ 信号序列,SEQ ID NO :39)。包括内含子区域在内的鼠 Ig κ 信号序列的序列信息基于从 GenBank 得到的 MUSIGKVR1 (索取号 K02159),其上游基因组序列从 UCSC 鼠基因组数据库获得。

[0388] SEQ ID NO :38

[0389] ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTGAGAGTGCAGAGAAGTGT
TGGATGCAACCTCTGTGGCCATTATGATACTCCATGCCTCTCTGTTCTTGATCACTATAATTAGGGCATTGTCACT
GGTTTTAAGTTTCCCAGTCCCCTGAATTTTCCATTTTCTCAGAGTGATGTCCAAAATTATTCTTAAAAATTTAAAT
AAAAAGGTCCTCTGCTGTGAAGGCTTTTATACATATATAACAATAATCTTTGTGTTTATCATTCCAGGTTCCACTGG
CTATCCCAATGCCTCCCCACTGCTCGGCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACACAGCCACAGCCAGGAACA
GCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCATGTGGATGGCGCACCCCATCAGACCATCTACAGTGCCCTGATGATC
AGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTGGTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGCATGGATTTTCAGAGGCAA
CATTTTTGGATCACACTATTTTCGACCCGGAAGACTGCAGGTTCCAACACCAGACGCTGGAAAACGGGTACGACGTCT
ACCACTCTCCTCAGTATCACTTCTGGTCAGTCTGGGCCGGGCGAAGAGAGCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCC
CCGTACTCCCAAGTTCTGTCCCGGAGGAACGAGATCCCCCTAATCACTTCAACACCCCATACCACGGCGGCACAC
CCGGAGCGCCGAGGACGACTCGGAGCGGGACCCCTGAACGTGCTGAAGCCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCGG
CCTCTGTTACAGGAGCTCCCGAGCGCCGAGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCATTAGGGGTGGTCAGGGGC
GGTCGAGTGAACACGCACGCTGGGGGAACGGGCCCGGAAGGCTGCCGCCCTTCGCCAAGTTCATCTAG

[0390] SEQ ID NO :39

[0391] METDTLLLWVLLLWVPGSTGYPNASPLLGSWGLIHLTYTATARNYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYSAL
MIRSEDAGFVVITGVMSRRYL CMDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLNENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMN
PPPYSQFLSRNEIPLIHFNTPIPRRHTRSAEDDSEKPLNVLKPRARMTPAPASCSQELPSAEDNSPMASDPLGVV
RGGRVNTHAGGTGPEGCRPFAKFI

[0392] (实施例 16)

[0393] 用于电穿孔法的 pUS FGF23 KI 载体的制备

[0394] 60 μg pUS FGF23 KI 载体在 37°C 条件下,用添加亚精胺 (spermidine-added) (1mM pH7.0, Sigma Aldrich Japan) 的缓冲液 (RocheDiagnostics, 限制酶用 H 缓冲液 (H buffer for restriction enzyme)) 和 NotI (Takara Bio, Inc.) 消化 5 小时。经苯酚 / 氯仿抽提后,加入 2.5 倍体积的 100%乙醇和 0.1 倍体积的 3M 乙酸钠,所得混合物在 -20°C 放置 16 小时。所述载体经 NotI 线性化处理,被离心收集,再加入 70%乙醇灭菌。在净化工作台内去除 70%乙醇并风干处理 1 小时。加入 HBS 溶液以配制成 0.5 μg/μLDNA 溶液,所得溶液室温放置 1 小时后,用于制备电穿孔法所用的 pUSFGF23 KI 载体。

[0395] (实施例 17)

[0396] 用 pUS FGF23 KI 载体和 RS 因子敲除鼠胚胎细胞系获得 PL FGF23 鼠胚胎细胞系。

[0397] 为获得 PL FGF23 鼠胚胎细胞系（其中人 FGF23-cDNA 通过同源重组的方法被插入到免疫球蛋白 κ 轻链基因下游），按照已建立的方法（Shinichi Aizawa, " Biotechnology Manual Series 8, Gene Targeting," Yodosha, 1995），将经限制酶 NotI 线性化处理的 pUS FGF23 KI 载体（按照实施例 16 中所示的方法制得）转入到 RS 因子敲除鼠胚胎细胞，通过使用 W02006/78072 实施例 10 中所描述的方法，得到 RS 因子敲除鼠胚胎细胞。

[0398] RS 因子敲除鼠胚胎细胞的培养方法按照已被描述过的方法（Shinichi Aizawa, 见上文），所用滋养细胞为培养在经丝裂霉素 C (Sigma Aldrich Japan) 处理的培养基中的 G418 抗性原代培养细胞（从 Invitrogen 购入）。首先，培养 RS 因子敲除鼠胚胎细胞并经胰蛋白酶处理，细胞以 3×10^7 细胞/ml 的浓度悬浮在 HBS 中。将 0.5ml 所述细胞悬浮液与 10 μ g 载体 DNA 混合。然后，用基因脉冲试管 (Gene Pulser Cuvette)（电极距离：0.4cm, Bio Rad Laboratories）进行电穿孔（电容：960 μ F, 电压：250V, 室温）。所述电穿孔处理后的细胞被悬浮在 10ml 胚胎细胞培养基中（Shinichi Aizawa, 见上文），然后这些细胞被接种于塑料培养皿 (Falcon, Becton Dickinson) 中，用于 100mm 组织培养，其中滋养层细胞为先前已被预先铺入。36 小时后，所用培养基换成含有 0.8 μ g/ml 嘌呤霉素的 (Sigma Aldrich Japan) 胚胎细胞培养基。将被挑取的培养 7 天后出现的每个克隆都接种入 24 孔板培养至完全汇合。将所得细胞三分之二悬浮于 0.2ml 的接种培养基 (FBS+10% DMSO, Sigma Aldrich Japan) 中，所得悬浮液 -80°C 保存。剩下的三分之一接种于 12 孔明胶涂层培养板中。所述细胞被培养 2 天后，使用 Puregene DNA 提取试剂盒 (Qiagen) 提取得到 10^6 - 10^7 细胞的基因组 DNA。由此得到的抗嘌呤霉素 RS 因子敲除鼠胚胎细胞基因组 DNA 经限制酶 EcoRI (Takara Bio, Inc.) 消化后，用琼脂糖凝胶电泳法分离。随后，以 Ck 3' 探针为探针进行 Southern 印迹检测，以检测同源重组子，其中，Ck 3' 探针是在本发明中使用的，已在 W000/10383 得到描述的（见实施例 48）Ig 轻链 J κ -C κ 基因组 DNA 3' 末端的 DNA 片段（XhoI 酶切位点到 EcoRI 酶切位点，长约 1.4kb, W000/10383, 图 5）。经 EcoRI 消化后，在野生型 RS 因子敲除鼠胚胎细胞中检测到一条长 15.1kb 的条带。在同源重组体中，除 15.1kb 的条带外，预计应该还有一条新的条带 (12.8kb) 出现在 15.1kb 的条带下面（图 12），且所述新条带在嘌呤霉素抗性品系中被检测到。也即是，这些克隆被证实其免疫球蛋白 κ 链基因下游处一个等位基因座插入有人 FGF23-cDNA。

[0399] （实施例 18）

[0400] 通过敲除 PL FGF23 小鼠胚胎干细胞系中的抗药性基因获得 US FGF23 小鼠胚胎干细胞系。

[0401] 在获得的由 PL FGF23 小鼠胚胎干细胞系而来的 US FGF23 小鼠胚胎干细胞系中，2 种抗性基因 (Puro^r, Neo^r) 被敲除，这是参照现有成熟的实验方法（Shinichi Aizawa, "生物技术手册" 系列 8, 基因打靶技术" Yodosha, 1995 年, Shinichi Aizawa, " Biotechnology Manual Series 8, Gene Targeting," Yodosha, 1995) 进行的，在这一过程中将 pCAGGS-Cre 载体 (Sunaga 等, Mol Reprod Dev., 46:109-113, 1997) 引入 PL FGF23 小鼠胚胎干细胞系中。

[0402] PL FGF23 小鼠胚胎干细胞的培养方法参照现有方法（Shinichi Aizawa, 上述文件），培养液中加入经丝裂霉素 C (Sigma Aldrich Japan) 处理的 G418 抗性原代培养细胞（购自 Invitrogen）作为滋养层细胞。首先，将培养好的 PL FGF23 小鼠胚胎干细胞用

胰酶消化,所述细胞以 3×10^7 细胞/ml 的浓度悬浮于 HBS 中,将 0.5ml 的细胞悬浮液与 $10 \mu\text{g}$ 的载体 DNA 混合,采用基因脉冲试管 (Gene Pulser Cuvette) (电极间距:0.4cm, Bio Rad Laboratories) 进行电穿孔法 (电容: $960 \mu\text{F}$, 电压:250V, 室温操作)。经电穿孔的细胞悬浮在 10ml 胚胎干细胞培养液 (Shinichi Aizawa, 见上文) 中,2.5ml 的细胞悬浮液接种到预先铺入滋养层细胞的 60mm 组织培养用的塑料培养皿中 (Falcon, Becton Dickinson)。经过 30 小时的培养,将 1000 个胚胎干细胞接种到预先铺入滋养层细胞的 100mm 组织培养用的塑料培养皿中 (Falcon, Becton Dickinson)。挑取 6 天之后出现的克隆,每个克隆接种入 24 孔板培养至完全汇合。其三分之二悬浮于 0.2ml 的冻存培养液 (FBS+10% 以 Ck 3' 探针进行 Southern 印迹检测,以检测同源重组子,其中, Ck 3' 探针是在本发明中使用的,已在 W000/10383 得到描述的 (见实施例 48) Ig 轻链 J κ -C κ 基因组 DNA (XhoI 酶切位点到 EcoRI 酶切位点,长约 1.4kb, W000/10383, 图 5) 3' 末端 DNA 片段。DMSO (Sigma Aldrich Japan), -80°C 保存备用;其余的三分之一接种于 12 孔明胶涂层板。所述细胞被培养 2 天后,使用 Puregene DNA 提取试剂盒 (Qiagen) 提取得到 10^6 - 10^7 细胞的基因组 DNA。由此产生的小鼠胚胎干细胞基因组 DNA 用限制性内切酶 EcoRI (Takara Bio, Inc.) 酶切消化,用琼脂糖凝胶电泳法分离目标条带。随后,以 Ck 3' 探针为探针进行 Southern 印迹检测,检测出其中只有位于 loxPV 基因序列之间的 Puro^r 基因被敲除的胚胎干细胞系,所述使用探针 Ck 3' 的检测,其中 Ck 3' 探针是在本发明中使用的,已在 W000/10383 得到描述的 (见实施例 48) Ig 轻链 J κ -C κ 基因组 DNA 的 3' 末端 DNA 片段 (XhoI 酶切位点到 EcoRI 酶切位点,长约 1.4kb, W000/10383, 图 5)。当胚胎干细胞基因组中保留有 Puro^r 基因,由 EcoRI 酶切可以检测到两个条带 (15.1kb 和 12.8kb);而只有当胚胎干细胞基因组中敲除了 Puro^r 基因,由 EcoRI 酶切可以检测到两个条带分别为 15.1kb 和 10.9kb (图 12)。此外,通过上述过程中获得的 Southern 杂交膜,用例 9 所示的专利 W02006/78072 中的 3' KO 探针方法检测,在胚胎干细胞系基因组 DNA 中,只有位于 loxPVPuro^r 基因序列之间的 Neo^r 基因被敲除,通过使用探针 3' KO 检测,当胚胎干细胞基因组中保留有 Neo^r 基因,由 EcoRI 酶切可以检测到两个条带 (7.4k 和 5.7k);而只有当胚胎干细胞基因组中敲除了 Neo^r 基因,由 EcoRI 酶切可以检测到两个条带分别为 5.7k 和 4.6k (图 12)。通过上述实验,由 PL FGF23 小鼠胚胎干细胞系可以获得 2 种耐药基因 (Puro^r, Neo^r) 同时被敲除的胚胎干细胞系 (US FGF23 小鼠胚胎干细胞系。

[0403] (实施例 19)

[0404] 用 US FGF23 小鼠胚胎干细胞系和宿主胚胎制备 US FGF23 KI 嵌合小鼠,其中宿主胚胎来自 B 淋巴细胞缺陷小鼠品系。

[0405] 在一个免疫球蛋白 μ 链基因被敲除的纯合小鼠中, B 淋巴细胞功能有缺陷,并且不能产生抗体 (Kitamura 等, Nature, 350:423-426, 1991)。在本实施例中,宿主胚胎通过上述培养在洁净环境中的纯合雄性和雌性小鼠杂交繁育而来,用于嵌合体小鼠的制备。在这种情况下,嵌合小鼠的大部分 B 淋巴细胞功能来自其所注射的胚胎干细胞。在本例中,由 Tomizuka 等报道的免疫球蛋白 μ 链基因敲除的纯合小鼠 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-7, 2000), 是通过 3 次以上的与 MCH (ICR) 品系 (CLEA Japan, Inc.) 回交,被用于宿主胚胎的制备。

[0406] 通过上述实施例 18 所获得的 US FGF23 胚胎干细胞系被复苏,这些胚胎干细胞系

被确认其中插入了人类免疫球蛋白 κ 链基因的下游序列的 FGF23-cDNA。US FGF23 胚胎干细胞被注射入 8 细胞期宿主胚胎,这些宿主胚胎由上述免疫球蛋白 μ 链基因敲除的纯合雄性和雌性小鼠杂交繁育而来,注射细胞量为 8-10 胚胎干细胞 / 宿主胚胎。注射胚胎在胚胎干细胞培养液中培养过夜 (Shinichi Aizawa,“生物技术手册”系列 8,基因打靶技术”Yodosha,1995 年),注射胚胎发育成为胚泡后,将被注射的胚胎移植到 2.5 天假孕处理的代孕 MCH(ICR) 母鼠子宫中 (CLEA Japan, Inc.),每一侧子宫分别植入约 10 个注射胚胎。利用上述实例 18 的 US FGF23 小鼠胚胎干细胞系通过注射胚胎的方法获得嵌合小鼠。嵌合小鼠是由毛色的差别来鉴定的,其中是否具有胚胎干细胞源性的野生型颜色(深褐色)能够在宿主胚胎源性(白色)毛色中鉴定出来。在嵌合小鼠的后代中,每个小鼠有明显的部分野生型源性毛色的毛色分布,也就是说,通过可辨认的胚胎干细胞源性的野生型颜色(深褐色)可以区别嵌合小鼠和纯合小鼠。从这些实验结果,插入了人类免疫球蛋白 κ 链基因的下游序列的 FGF23-cDNA 的 US FGF23 胚胎干细胞系具有维持嵌合小鼠生成的能力。也就是说,在小鼠个体中,US FGF23 胚胎干细胞具有分化成正常组织的能力。此外,US FGF23 KI 嵌合小鼠的血中具有高浓度的 FGF23,这在稍后的范例 21 中我们要进一步地提到,US FGF23 KI 嵌合小鼠具有类似于低磷佝偻病的特征,可以作为这一疾病研究的动物模型。

[0407] (实施例 20)

[0408] 对照嵌合小鼠的制备

[0409] 根据前述(专利 W02006/78072)实施例 11 中的方法,没有插入具有人类 FGF23-cDNA 功能基因的嵌合小鼠(来源于野生型小鼠),在下述实施例 21 中对 US FGF23 KI 嵌合小鼠的 C10 抗体给药实验中用作各个对照嵌合小鼠。

[0410] (实施例 21)

[0411] 使用 US FGF23 KI 嵌合型小鼠对 C10 抗体病理改善功效的证明

[0412] 在实施例 10 和实施例 12 中已证明,在猕猴(cynomolgus monkey)体内,与 2C3B 抗体和 C15 抗体相比,C10 抗体能更显著地抑制内源性 FGF23 的效果,并且提高血清中磷浓度和血清 1,25D 浓度。已经强烈暗示:具有对人 FGF23 中和活性的抗体,对人类疾病例如肿瘤引起的软骨病、诸如 XLH 等的低血磷佝偻病、以及过量的 FGF23 引起的软骨病具有治疗效果。因此,本文研究了 C10 抗体对那些由过量 FGF23 引起的病状的改善作用。C10 抗体的治疗试验是使用在实施例 19 中制得的 US FGF23 KI 嵌合型小鼠(以下缩写为 hFGF23KI 小鼠)。12 只 hFGF23KI 小鼠被用作疾病模型动物,6 只同周龄的正常小鼠(野生型小鼠,在实施例 20 中所制得的)作为对照动物,进行对比实验。收集 7 周龄的 hFGF23 KI 小鼠的血清,分别检测血清中 FGF23 浓度(FGF-23 ELISA KIT, Kainos Laboratories, Inc)和血磷浓度。与野生型小鼠相比,hFGF23KI 小鼠血清 FGF23 浓度显著升高(野生型小鼠;n = 6, 163pg/mL, hFGF23KI 小鼠;n = 12, 1467pg/mL)。这个结果表明,在 hFGF23KI 小鼠中引入人 FGF23 基因是被正确地进行,并且也表示在 hFGF23 KI 小鼠血清中存在有过量的外源性人 FGF23。此外,与野生型小鼠相比,hFGF23KI 小鼠的血磷浓度显著下降(野生型小鼠;n = 6, 5.82mg/dL, hFGF23KI 小鼠;n = 12, 2.62mg/dL)。由于过量人 FGF23 的作用 hFGF23 KI 小鼠出现了低血磷症状。此时,将 12 只 hFGF23 KI 小鼠分成 C10 抗体给药组和对照的 IgG1 给药组两组,每组六只,每只都有等量 FGF23 浓度(图 13)。然后,从第八周开始,对两组小鼠重复静脉注射 C10 抗体或同种型对照用的纯化的人 IgG1(对照抗体),注射剂量为 30mg/

kg, 给药频率为一周一一次, 共给药五次。取第一次给药前和给药三天后的血样, 提取血清。用 Saitoh 握力器 (Saitoh-GRIP STRENGTH METER, MK-380S, Muromachi Kikai Co., Ltd.) 测评第四次给药 24 小时后小鼠的四肢紧握力量。四肢紧握力量是以小鼠尽全力时最大力量 (握力) 为指标, 其中, 将小鼠置于一个测量的栅格中, 让小鼠抓住栅格, 然后用手水平拉动小鼠尾部, 直至小鼠不能承受拉力而松开栅格。在第五次给药 24 小时后评测小鼠的骨骼状况。麻醉小鼠, 通过心脏取血法将其处死, 取出其大腿骨 (femur) 和胫骨 (tibia), 在 70% 的乙醇中固定。分别检测第一次给药前, 第一次给药三天后和第五次给药 24 小时后的血清中磷浓度。将未去除钙质的大腿骨包裹在树脂中, 用 Villanueva-Goldner 染色后, 进行组织学评价。胫骨中的矿物质含量经灰化后测得。

[0413] 实验结果表明, 对照抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠, 在分组时和一同处死时 (即在给药之前和在第五次给药 24 小时之后), 其血清中磷浓度显著低于对照抗体给药组的野生型小鼠, 这种情况表明 hFGF23KI 小鼠持续的低血磷状况 (图 14)。另一方面, C10 抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠在给药三天后, 其血清中磷浓度提高到与对照抗体给药组的野生型小鼠同等水平 (图 14)。此外, C10 抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠在第五次给药后血清中磷浓度仍与对照抗体给药组的野生型小鼠处于同等水平, 这就表明, C10 抗体对增加血清磷浓度的作用即使在五次给药之后仍然存在 (图 15)。

[0414] 作为低血磷病人的一个症状, 骨骼肌弱化已有临床报道 (Baker 和 Worthley. Crit Care Resusc., 4 :307-315, 2000)。在本实验究中, 由于血磷酸盐过少, 我们预计 hFGF23KI 小鼠会出现肌肉弱化症状。因此, 用上述方法测量并比较每组小鼠的四肢紧握力, 作为肌肉弱化的指标。其结果, 对照抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠的紧握力显著低于对照抗体给药的野生型小鼠, 在这个疾病模型小鼠中观察到肌肉弱化的症状 (图 16)。与之相反, C10 抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠的紧握力显著提高 (图 16)。

[0415] 然后, 用 Villanueva-Goldner 方法对未去除钙质的大腿骨组织染色并进行组织学观察。结果是, 与对照抗体给药组的野生型小鼠相比, 在对照抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠骨骼中观察到大量类骨质 (osteoid, 在图 17 中用红色表示), 表明该组小鼠被诱导出钙化缺陷。这正是佝偻病的特征症状。相反, 在 C10 抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠大腿骨组织中, 观察到类骨质所占的区域减少, 并推测类骨质是被钙化的骨质所取代 (在图 17 中以绿色表示)。这些结果表明, C10 抗体可以改善由过量 FGF23 引起的骨质钙化降低。胫骨中的矿物质用灰化的方法测量并在各组之间进行比较。对照抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠胫骨中矿物质含量显著低于对照抗体给药组的野生型小鼠 (图 18)。相反, 实验证明 C10 抗体给药组的 hFGF23KI 小鼠胫骨中矿物质含量有所提高 (图 18)。通过以上实验, 证明在 hFGF23KI 小鼠体内, C10 抗体抑制了过量表达的人 FGF23 在体内的作用, 并改善了低血磷症性佝偻病的各种症状, 如低血磷症, 肌肉弱化, 骨骼钙化紊乱等症状。这些结果表明 C10 抗体是一种与 FGF23 相关的各种人类疾病的有效治疗剂。

[0416] 工业实用性

[0417] 本发明所述 C10 抗体是一种抗 FGF23 的抗体, 与其它抗 FGF23 的抗体相比, C10 抗体在体内对持续性提高磷浓度和 / 或持续性提高血清 1, 25D 浓度有很高的活性。本发明所述 C10 抗体是一种对于预防或治疗由 FGF23 活性过度引起的疾病, 或者通过控制 FGF23 活性能够改善病状的疾病有显著疗效的药物。

序列表

<110> 协和发酵麒麟株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD)

<120> 抗 FGF23 抗体和含有该抗体的药物组合物

<130>PH-3490-PCT

<150>JP 2007-34018

<151>2007-02-14

<160>45

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>1

ccggaattca gccactcaga gcagggcagc

30

<210>2

<211>52

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>2

ataagaatgc ggccgctcaa tggatgatggt gatgatggat gaacttggcg aa

52

<210>3

<211>34

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>3

ataagaatgc ggccgctcag atgaacttgg cgaa

34

<210>4

<211>251

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>4

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val
 1 5 10 15
 Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu
 20 25 30
 Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg
 35 40 45
 Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala
 50 55 60
 Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala
 65 70 75 80
 Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met
 85 90 95
 Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn
 100 105 110
 Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His
 115 120 125
 Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala
 130 135 140
 Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg
 145 150 155 160
 Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg
 165 170 175
 His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val
 180 185 190

Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln
 195 200 205
 Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu
 210 215 220
 Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240
 Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile
 245 250

<210>5

<211>31

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>5

tcttgtccac cttggtgttg ctgggcttgt g 31

<210>6

<211>25

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>6

gttgaagctct ttgtgacggg cgagc 25

<210>7

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>7

gctggagggc acggtcacca cgc	23
<210>8	
<211>30	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成的	
<400>8	
aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc	30
<210>9	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成的	
<400>9	
gtaaaacgac ggccagtg	18
<210>10	
<211>17	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成的	
<400>10	
caggaaacag ctatgac	17
<210>11	
<211>408	
<212>DNA	
<213> 人工的	

<220>

<223> 合成的

<400>11

```

atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag ctccagggtgc tcaactcccag    60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc    120
tgcaaggcat ctggatacac cttcaccaac cactatatgc actgggtgcg acaggcccct    180
ggacaagggc ttgagtggat gggaataate aaccctatta gtggtagcac aagtaacgca    240
cagaagttcc agggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg    300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgagag agatattgtg    360
gatgcttttg atttctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttca                    408

```

<210>12

<211>136

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>12

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
1           5           10           15
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
           20           25           30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
           35           40           45
Thr Asn His Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
           50           55           60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ile Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ala
65           70           75           80
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
           85           90           95
Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
           100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Val Asp Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln
           115          120          125
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

```

130

135

<210>13

<211>384

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>13

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc	60
agatgtgcca tccagttgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga	120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagtctg gtatcagcag	180
aaaccaggga aagctcctaa gctcctgate tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc	240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg	300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atgattactt cactttcggc	360
cctgggacca aagtggatat caaa	384

<210>14

<211>128

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>14

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp	
1 5 10 15	
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser	
20 25 30	
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser	
35 40 45	
Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	
50 55 60	
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val	
65 70 75 80	

Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
				85				90						95	
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
			100					105					110		
Phe	Asn	Asp	Tyr	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys
		115					120					125			

<210>15

<211>41

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>15

agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc t

41

<210>16

<211>42

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>16

agagagagag cgtacgtttg atatecactt tggccccagg gc

42

<210>17

<211>44

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>17

agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cttc

44

<210>18	
<211>40	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成的	
<400>18	
agagagagag gctagctgaa gagacggtga ccattgtccc	40
<210>19	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成的	
<400>19	
ggtgccaggg ggaagaccga tgg	23
<210>20	
<211>30	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成的	
<400>20	
ccaagggeccc atcggtcttc cccctggcac	30
<210>21	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	

<223> 合成的

<400>21

gacaccctca tgatctcccg gacc

24

<210>22

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>22

tgttctccgg ctgccattg ctct

24

<210>23

<211>27

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>23

tctatataag cagagctggg tacgtcc

27

<210>24

<211>26

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>24

tggtgcacc atctgtette atette

26

<210>25

<211>27		
<212>DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的		
<400>25		
ggtacgtgaa ccgtcagatc gcctgga	27	
<210>26		
<211>35		
<212>DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的		
<400>26		
cggaattcca ccatgttggg ggccccctc aggct	35	
<210>27		
<211>34		
<212>DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成的		
<400>27		
atttgcggcc gctagatgaa cttggcgaag gggc	34	
<210>28		
<211>756		
<212>DNA		
<213> 长尾猕猴 (<i>Macaca fascicularis</i>)		
<400>28		
atgttggggg cccgcctcag gctctgggtc tgtgccttgt gcagcgtctg cagcatgagc	60	
gtcatcagag cctateccaa tgccctccca ttgctcggct ccagctgggg tggcctgate	120	

cacctgtaca cagccacagc caggaacagc taccacctgc agatccacaa gaatggccac 180
gtggatggcg caccccatca gaccatctac agtgcctga tgatcagatc agaggatgct 240
ggctttgtgg tgattacagg tgtgatgagc agaagatacc tctgcatgga tttcggaggc 300
aacatttttg gatcacacta tttcaaccgc gagaactgca ggttccgaca ctggacgctg 360
gagaacggct acgacgteta ccaactctct cagcatcact ttctggtcag tctgggccgg 420
gcgaagaggg ccttctgccc aggcattgac ccacccccct actcccagtt cctgtcccgg 480
aggaacgaga tccccctcat ccacttcaac acccccagac cacggcggca cacccggagc 540
gccgaggacg actcggagcg ggacccccctg aacgtgctga agccccgggc ccgatgacc 600
ccggccccgg cctcctgctc acaggagctc ccgagcgccg aggacaacag cccggtggcc 660
agcgaccctg taggggtggt caggggaggt cgggtgaaca cgcacgctgg gggaacgggc 720
ccggaagcct gccgccccct cgccaagtgc atctag 756

<210>29

<211>251

<212>PRT

<213> 长尾猕猴

<400>29

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val
1 5 10 15
Cys Ser Met Ser Val Ile Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu
 20 25 30
Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg
 35 40 45
Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala
 50 55 60
Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala
65 70 75 80
Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met
 85 90 95
Asp Phe Gly Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asn Pro Glu Asn
 100 105 110
Cys Arg Phe Arg His Trp Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His
 115 120 125
Ser Pro Gln His His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala
 130 135 140
Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg
145 150 155 160
Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Arg Pro Arg Arg

	165		170		175
His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val					
	180		185		190
Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln					
	195		200		205
Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Val Ala Ser Asp Pro Leu					
	210		215		220
Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly					
225		230		235	240
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile					
	245		250		

<210>30

<211>1417

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>30

```

gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag ctccaggtgc 60
tcaactcccag gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt 120
gaaggtttcc tgcaaggcat ctggatacac cttcaccaac cactatatgc actgggtgcg 180
acaggcccct ggacaagggc ttgagtggat ggaataatc aaccctatta gtggtagcac 240
aagtaacgca cagaagtcc agggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac 300
agtctacatg gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgcgag 360
agatattgtg gatgcttttg atttctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttcage 420
tagcaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg 480
cacageggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggta cgggtgctgtg 540
gaactcagge gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg 600
actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta 660
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa 720
atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc 780
gtcagtette ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga 840
ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtaagt tcaactggta 900
cgtggacggc gtggagggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 960
cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga 1020
gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa 1080
agccaaaggg cageccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgaget 1140

```

gaccaagaac caggtcagcc tgacctgect ggtcaaagge ttctatccca gcgacatcgc 1200
 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1260
 ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca 1320
 gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca 1380
 gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaattg aggatcc 1417

<210>31

<211>466

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>31

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn His Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ile Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Val Asp Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

180	185	190
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
195	200	205
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
210	215	220
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
225	230	235
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
245	250	255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
260	265	270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
275	280	285
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
290	295	300
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
305	310	315
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
325	330	335
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
340	345	350
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
355	360	365
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
370	375	380
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
385	390	395
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
405	410	415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
420	425	430
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
435	440	445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
450	455	460
Gly Lys		
465		

<210>32

<211>724

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>32

```

agatctctca ccatggacat gagggtcccc gctcagctcc tggggcttct gctgctctgg      60
ctcccaggtg ccagatgtgc catccagttg acccagtctc catcctccct gtctgcatct      120
gtaggagaca gagtcacat cacttgccgg gcaagtcagg gcattagcag tgctttagtc      180
tggtatcagc agaaaccagg gaaagctcct aagctcctga tctatgatgc ctccagtttg      240
gaaagtgggg tccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc      300
atcagcagcc tgcagcctga agatthttgca acttattact gtcaacagtt taatgattac      360
ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa      660
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga      720
attc                                          724

```

<210>33

<211>235

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>33

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1           5           10           15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
           20           25           30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
           35           40           45
Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
           50           55           60

```


<211>756

<212>DNA

<213> 智人

<400>36

```

atgttggggg cccgcctcag gctctggggtc tgtgccttgt gcagcgtctg cagcatgagc   60
gtcctcagag cctateccaa tgectcccca ctgctcggct ccagctgggg tggcctgac   120
cacctgtaca cagccacagc caggaacagc taccacctgc agatccacaa gaatggccat   180
gtggatggcg cacccatca gaccatctac agtgcctga tgatcagatc agaggatgct   240
ggctttgtgg tgattacagg tgtgatgagc agaagatacc tctgcatgga tttcagaggc   300
aacatttttg gatcacacta tttegaccgg gagaactgca ggttccaaca ccagacgctg   360
gaaaacgggt acgacgtcta ccactctct cagtatcact tcctggtcag tctgggccgg   420
gcgaagagag ctttctgcc aggcataaac ccacccccgt actcccagtt cctgtcccgg   480
aggaacgaga tccccctaat tcaattcaac acccccatac cacggcggca caccgggagc   540
gccgaggacg actcggagcg ggacccccctg aacgtgctga agccccgggc ccggatgacc   600
ccggccccgg cctcctgttc acaggagctc ccgagcgcgg aggacaacag cccgatggcc   660
agtgacctat taggggtggt caggggcggg cgagtgaaca cgcacgctgg gggaacgggc   720
ccggaaggct gccgcccctt cgccaagttc atctag                                     756

```

<210>37

<211>251

<212>PRT

<213> 智人

<400>37

```

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

```

	100		105		110										
Cys	Arg	Phe	Gln	His	Gln	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Tyr	Asp	Val	Tyr	His
	115		120		125										
Ser	Pro	Gln	Tyr	His	Phe	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Arg	Ala	Lys	Arg	Ala
	130		135		140										
Phe	Leu	Pro	Gly	Met	Asn	Pro	Pro	Pro	Tyr	Ser	Gln	Phe	Leu	Ser	Arg
145			150		155										160
Arg	Asn	Glu	Ile	Pro	Leu	Ile	His	Phe	Asn	Thr	Pro	Ile	Pro	Arg	Arg
		165			170										175
His	Thr	Arg	Ser	Ala	Glu	Asp	Asp	Ser	Glu	Arg	Asp	Pro	Leu	Asn	Val
	180		185		190										
Leu	Lys	Pro	Arg	Ala	Arg	Met	Thr	Pro	Ala	Pro	Ala	Ser	Cys	Ser	Gln
	195		200		205										
Glu	Leu	Pro	Ser	Ala	Glu	Asp	Asn	Ser	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu
210			215		220										
Gly	Val	Val	Arg	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Thr	His	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly
225			230		235										240
Pro	Glu	Gly	Cys	Arg	Pro	Phe	Ala	Lys	Phe	Ile					
		245			250										

<210>38

<211>985

<212>DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>38

atggagacag	acacactcct	gttatgggta	ctgctgctct	gggttccagg	tgagagtgca	60
gagaagtgtt	ggatgcaacc	tctgtggcca	ttatgatact	ccatgcctct	ctgttcttga	120
tcactataat	tagggcattt	gtcactgggt	ttaagtttcc	ccagtcccct	gaattttcca	180
ttttctcaga	gtgatgtcca	aaattattct	taaaaattta	aataaaaagg	tcctctgctg	240
tgaagctttt	tatacatata	taacaataat	ctttgtgttt	atcattccag	gttccactgg	300
ctateccaat	gcctccccac	tgctcggctc	cagctggggg	ggcctgatcc	acctgtacac	360
agccacagcc	aggaacagct	accacctgca	gatccacaag	aatggccatg	tgatggcgc	420
accccatcag	accatctaca	gtgccctgat	gatcagatca	gaggatgctg	gctttgtggt	480
gattacaggt	gtgatgagca	gaagatacct	ctgcatggat	ttcagaggca	acatttttgg	540
atcacactat	ttegaccggg	agaactgcag	gttccaacac	cagacgctgg	aaaacgggta	600
cgacgtctac	cactctctct	agtatacact	cctggctcagt	ctgggccggg	cgaagagagc	660
cttctctgcca	ggcatgaacc	cacccccgta	ctcccagttc	ctgtcccgga	ggaacgagat	720
ccccctaatt	cacttcaaca	ccccataacc	acggcggcac	acccggagcg	ccgaggacga	780

ctcggagcgg gacccccctga acgtgctgaa gccccggggcc cggatgaccc cggccccggc 840
 ctctgtttca caggagctcc cgagcgccga ggacaacagc ccgatggcca gtgaccatt 900
 aggggtggtc aggggcggtc gagtgaacac gcacgctggg ggaacggggc cggaaaggctg 960
 ccgccccttc gccaaagtta tctag 985

<210>39

<211>247

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>39

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp
 20 25 30
 Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His
 35 40 45
 Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr
 50 55 60
 Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val
 65 70 75 80
 Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly
 85 90 95
 Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln
 100 105 110
 His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr
 115 120 125
 His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly
 130 135 140
 Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile
 145 150 155 160
 Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg Ser
 165 170 175
 Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg
 180 185 190
 Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser
 195 200 205
 Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg
 210 215 220

Gly Gly Arg Val	Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys
225	230 235 240
Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile	
	245

<210>40

<211>5

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>合成的

<400>40

Asn His Tyr Met His

1 5

<210>41

<211>17

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>合成的

<400>41

Ile Ile Asn Pro Ile Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210>42

<211>8

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>合成的

<400>42

Asp Ile Val Asp Ala Phe Asp Phe
1 5

<210>43

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>43

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Val
1 5 10

<210>44

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>44

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210>45

<211>8

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>45

Gln Gln Phe Asn Asp Tyr Phe Thr

1

5

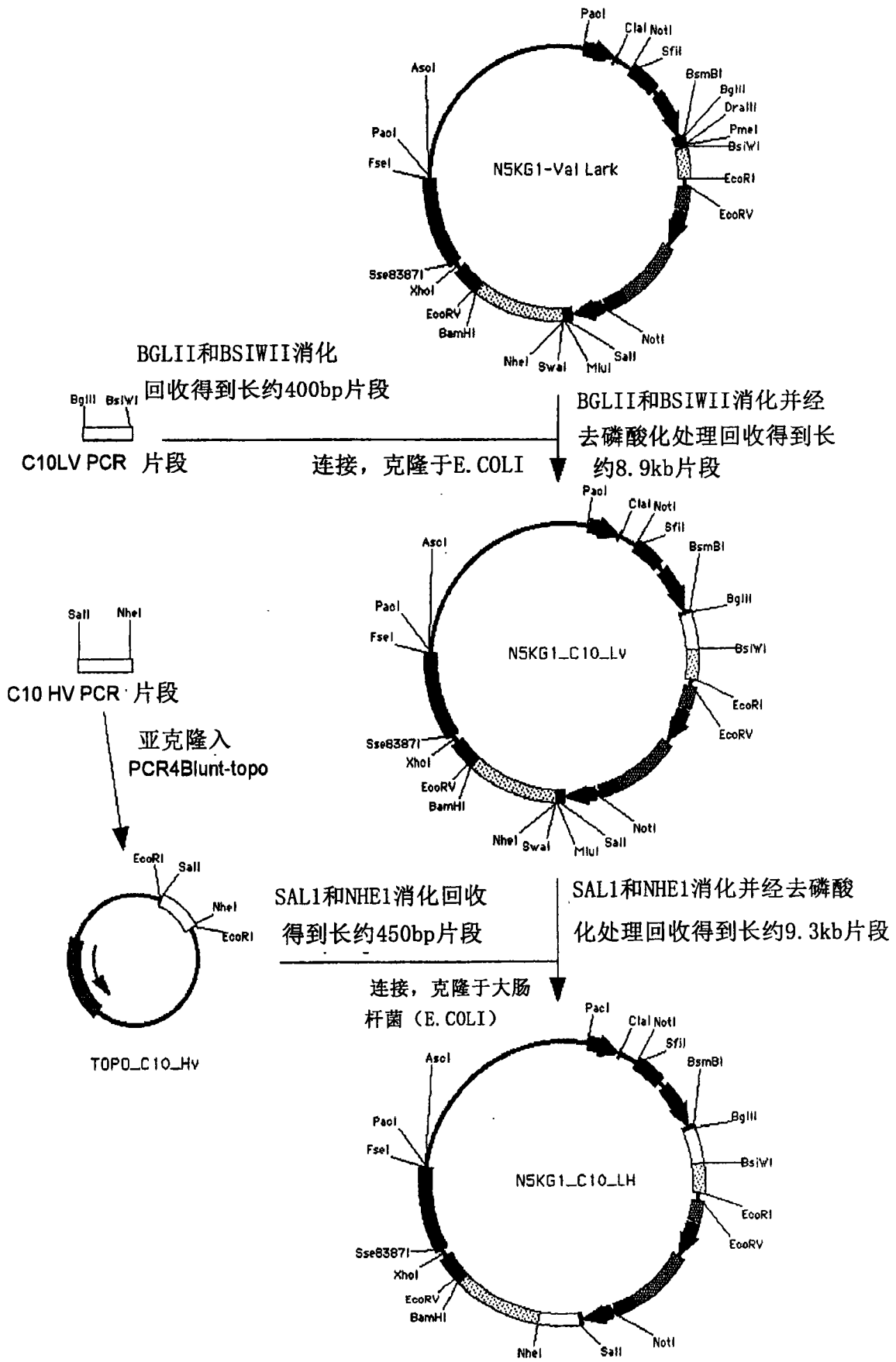


图 1

Sall
 1 GTCGACCACC ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT GCT CAC TCC
 1 M D W T W R V F C L L A V A P G A H S
 68 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC
 20 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S
 131 TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC ACC AAC CAC TAT ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA
 41 C K A S G Y T F T N H Y M H W V R Q A P G
 194 CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA ATA ATC AAC CCT ATT AGT GGT AGC ACA AGT AAC GCA CAG AAG
 62 Q G L E W M G I I N P I S G S T S N A Q K
 257 TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC AGG GAC ACG TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG ACG
 83 F Q G R V T M T R D T S T S T V Y M E L S
 BglII
 320 AGC CTG AGR TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAT TGT GCG AGR GAT ATT GTG GAT GCT TTT GAT
 104 S L R S E D T A V Y Y C A R D I V D A F D
 NheI
 383 TTC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA GCT AGC AAC GGC CCA TCG GTC TTC
 125 F W G Q G T M V T Y S S A S T K G P S V F
 446 CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG
 146 P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K
 509 GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC
 167 D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H
 572 ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
 188 T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
 635 TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG
 209 S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K
 698 GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA
 230 V D K K V E P K S C D K T H T C P C P A
 761 CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG
 251 P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M
 824 ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC
 272 I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V
 887 AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG GAG
 293 K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
 950 CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT
 314 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N
 1013 GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC
 335 G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
 1076 TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG
 356 S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
 1139 CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC
 377 L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
 1202 GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC
 398 V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 1265 TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AAG TGG CAG CAG GGG
 419 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
 1328 AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC
 440 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
 BamHI
 1391 TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA GGATCC
 451 S L S P G K

图 2

BglII
 1 AGATCTCTCACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTT CTG CTG CTC TGG CTC
 1▶ M D M R V P A Q L L G L L L L W L

64 CCA GGT GCC AGA TGT GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA
 18▶ P G A R C A I Q L T Q S P S S L S A S V G

127 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GTC TGG TAT CAG
 39▶ D R V T I T C R A S Q G I S S A L V W Y Q

190 CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC
 60▶ Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V

253 CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG
 81▶ P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q

316 CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT GAT TAC TTC ACT TTC GGC CCT GGG
 102▶ P E D F A T Y Y C Q Q F N D Y F T F G P G

BsiWI
 379 ACC AAA GTG GAT ATC AAA CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT
 123▶ T K V D I K R T V A A P S V F I F P P S D

442 GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG
 144▶ E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E

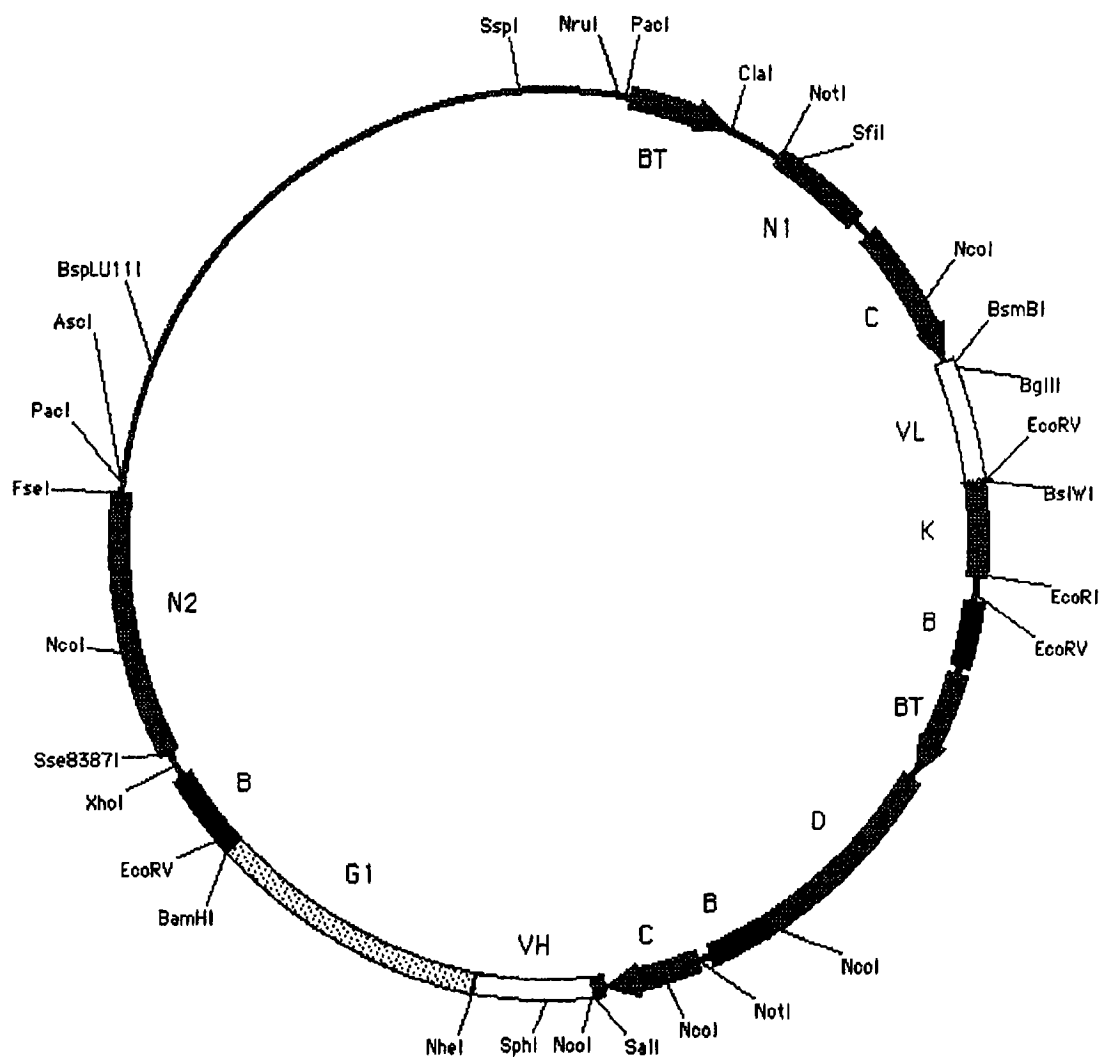
505 GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA
 165▶ A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T

568 GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC
 186▶ E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D

631 TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA
 207▶ Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T

EcoRI
 694 AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGA ATTC
 228▶ K S F N R G E C

图 3



- BT: 鼠 β 球蛋白主启动子
- N1: 新霉素磷酸转移酶外显子1
- C: 巨细胞病毒启动子/增强子
- B: 牛生长激素聚腺苷酸化
- VL: C10轻链可变区
- K: 人免疫球蛋白KAPPA恒定区
- D: 二氢叶酸还原酶
- VH: C10重链可变区
- G1: 人免疫球蛋白GAMMA1恒定区
- N2: 新霉素磷酸转移酶外显子2

图 4

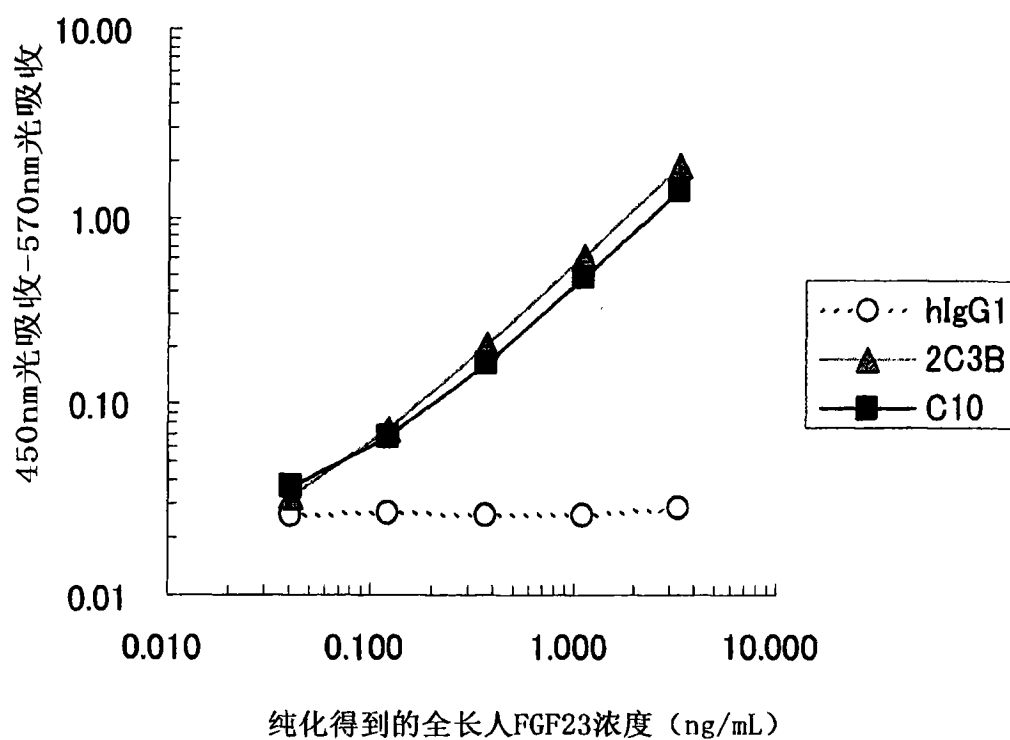


图 5A

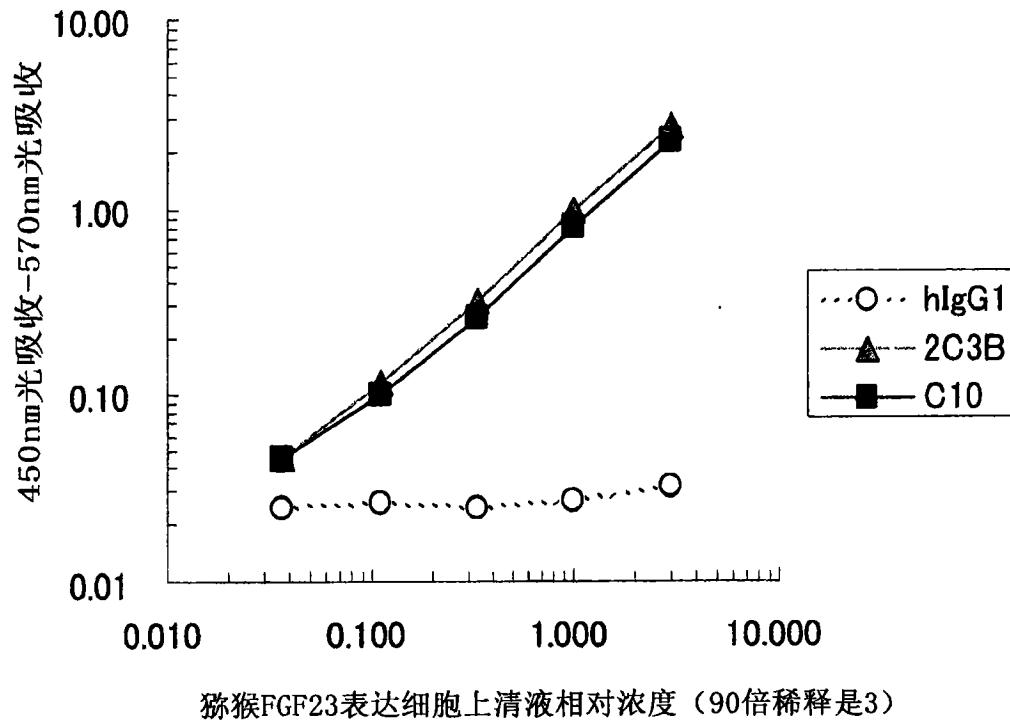
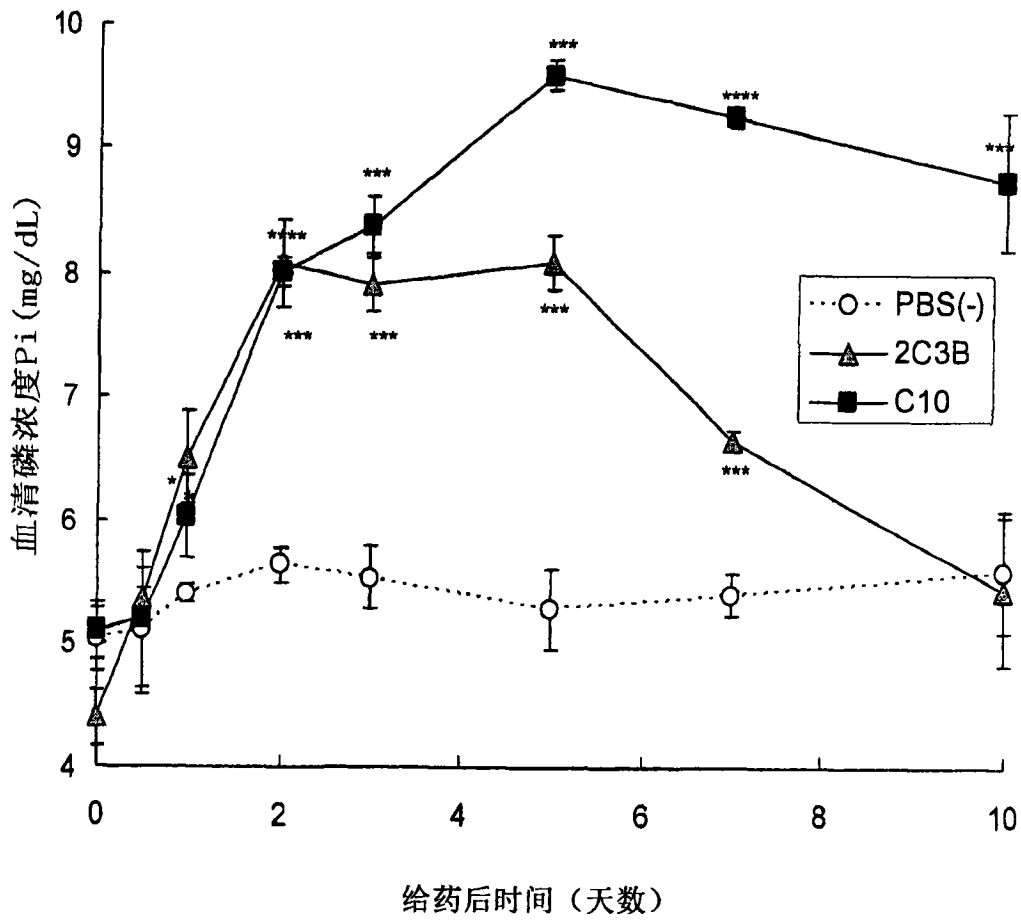


图 5B



* p<0.05
** p<0.01
*** p<0.005
**** p<0.001
斯氏T检验法

图 6

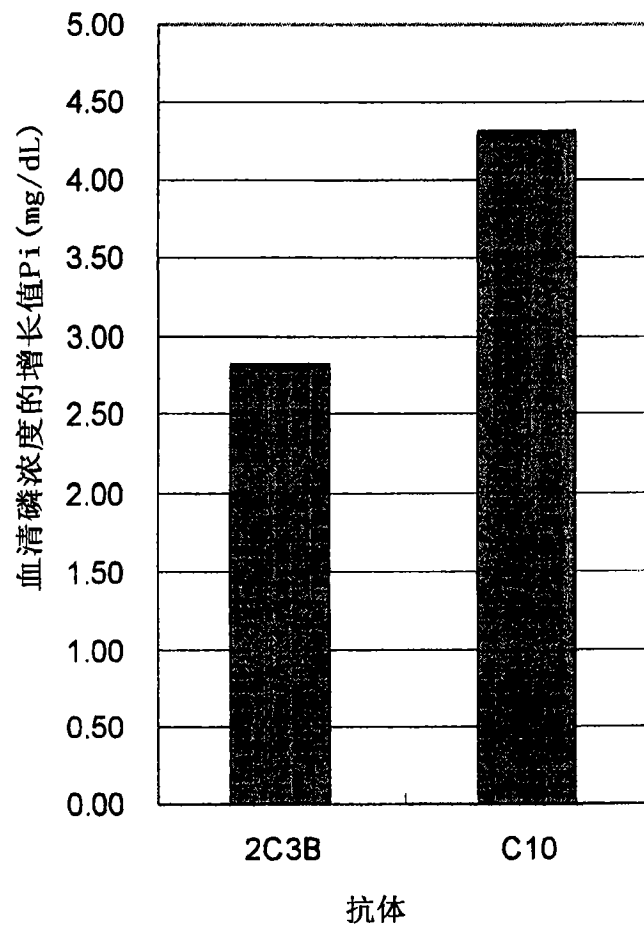
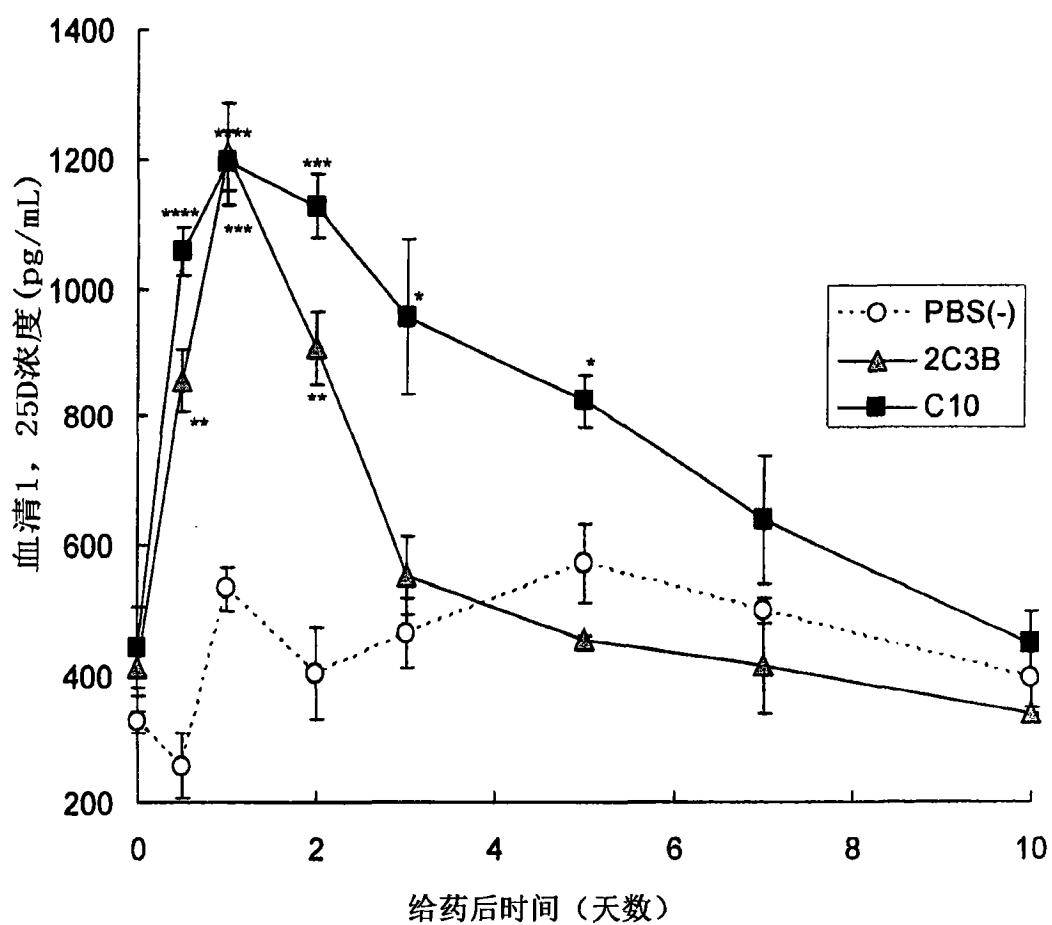


图 7



*p<0.05

**p<0.01

***p<0.005

****p<0.001

斯氏T检验法

图 8

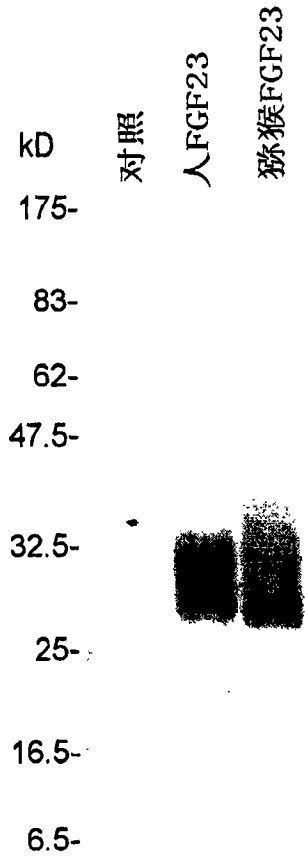


图 9

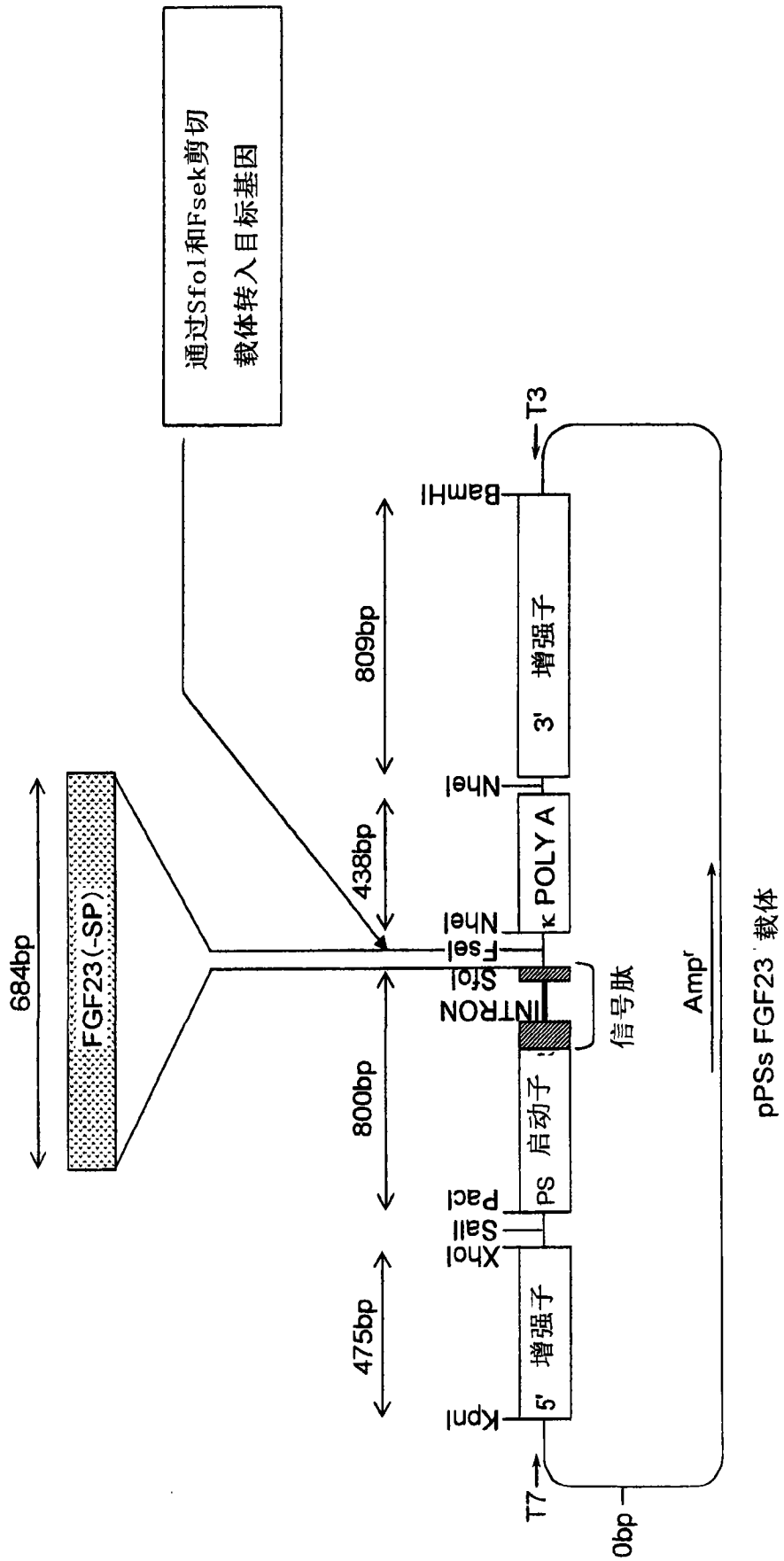


图 10

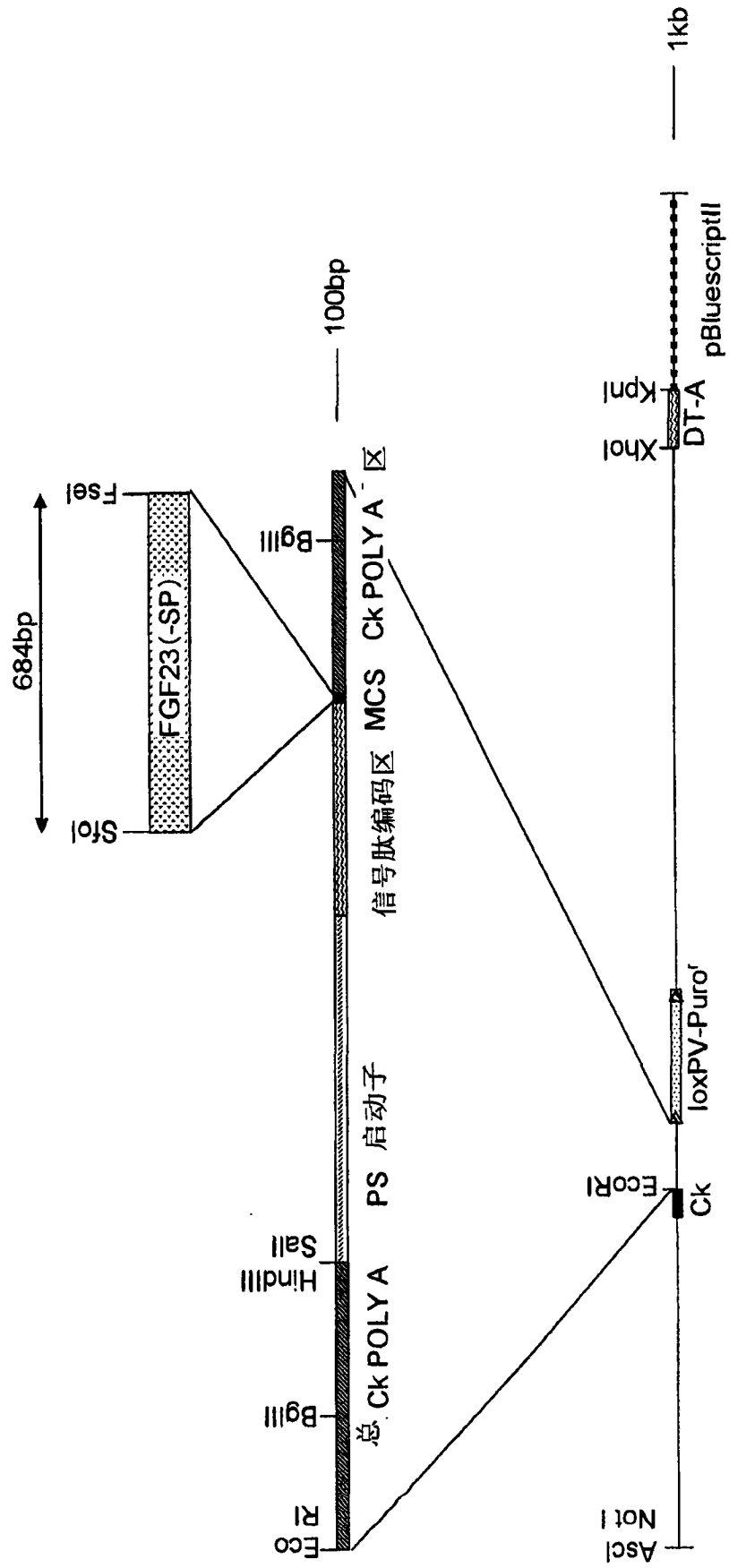


图 11

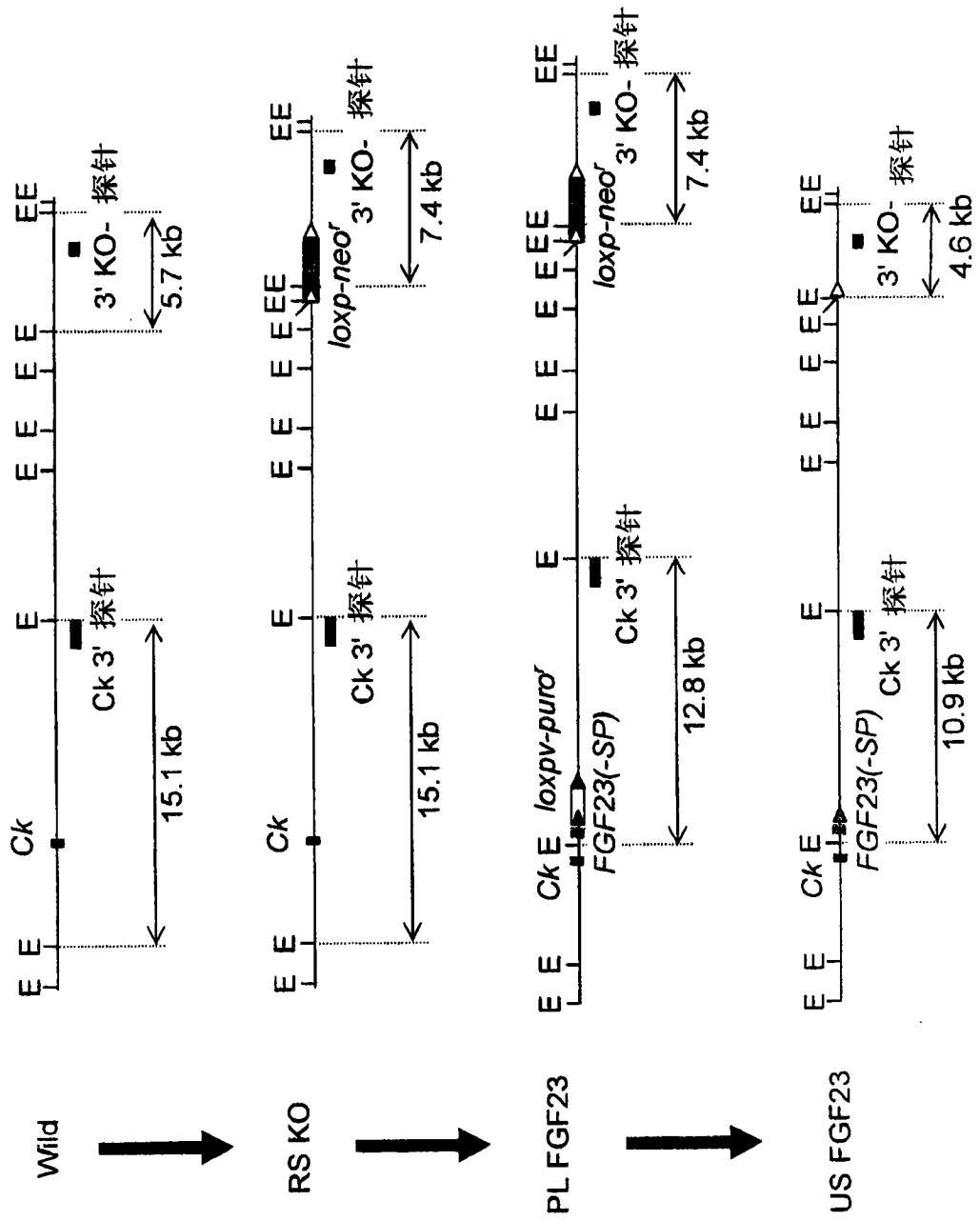


图 12

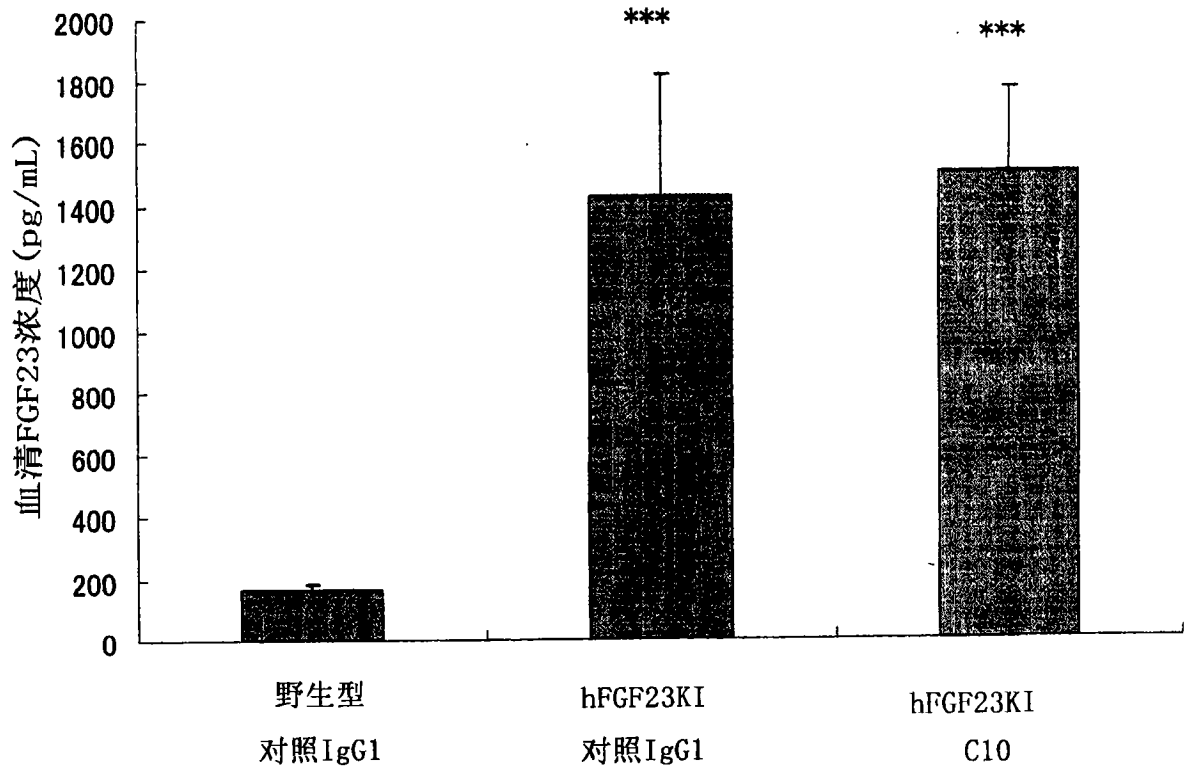


图 13

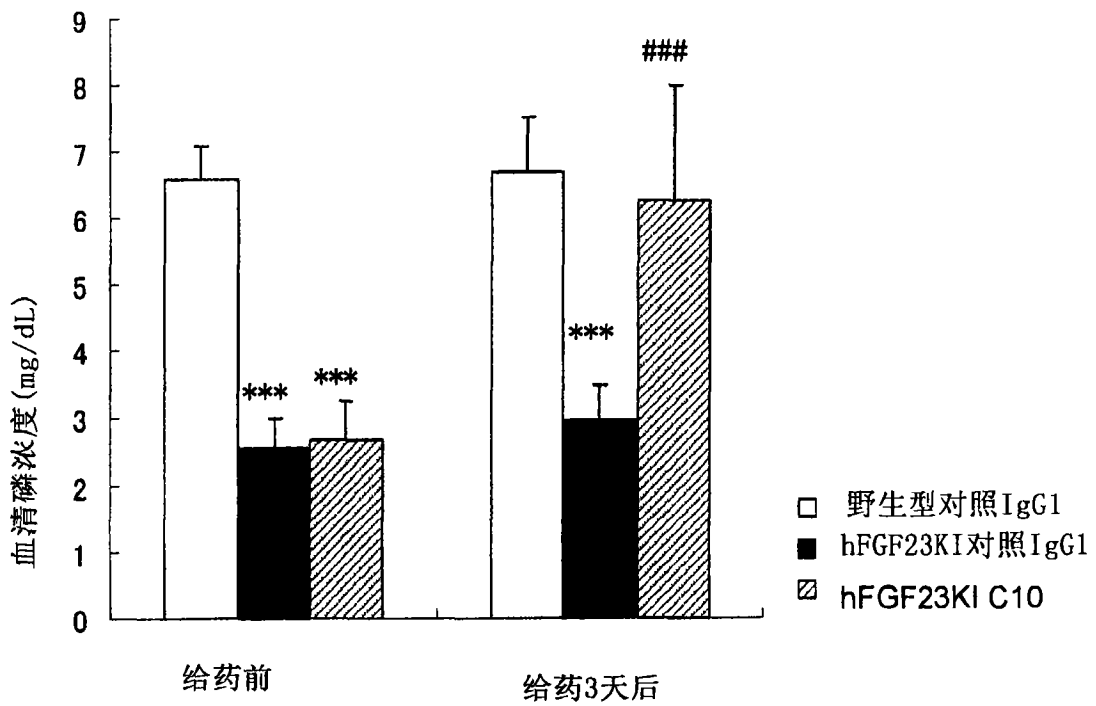


图 14

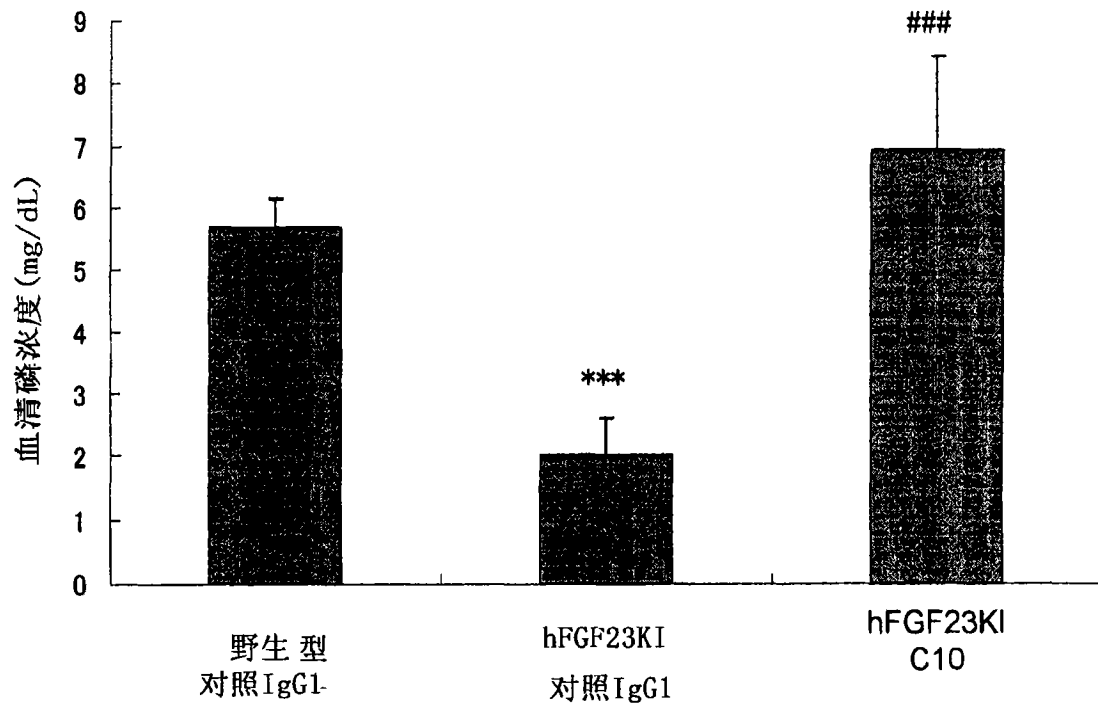


图 15

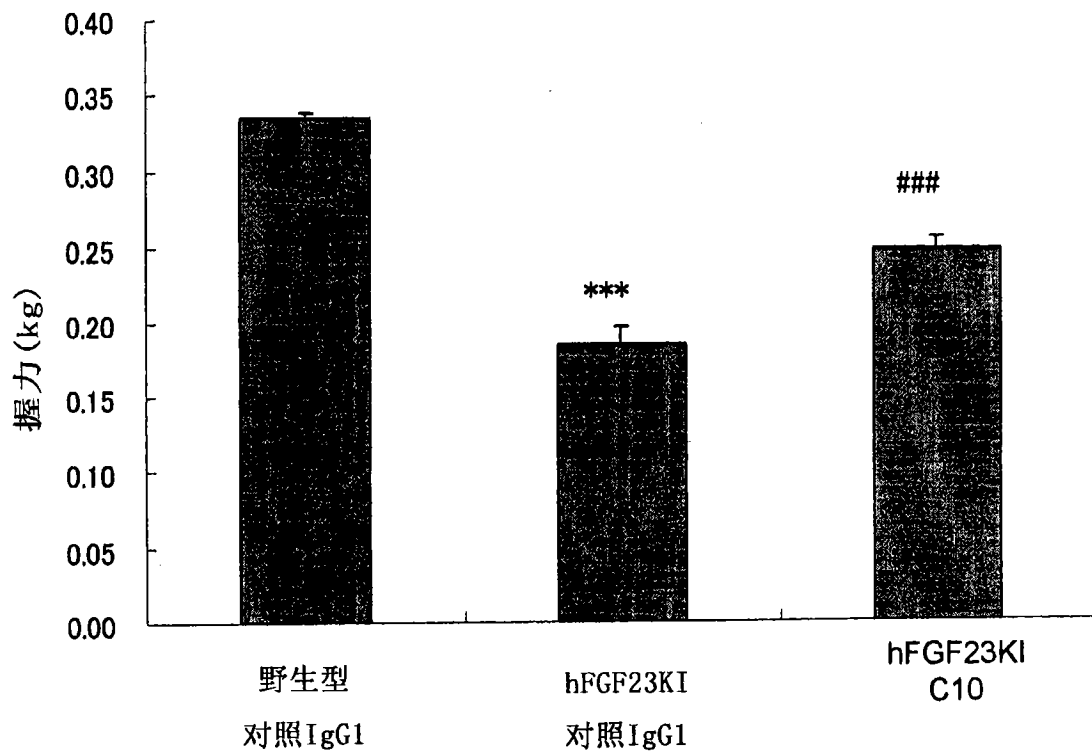


图 16



图 17

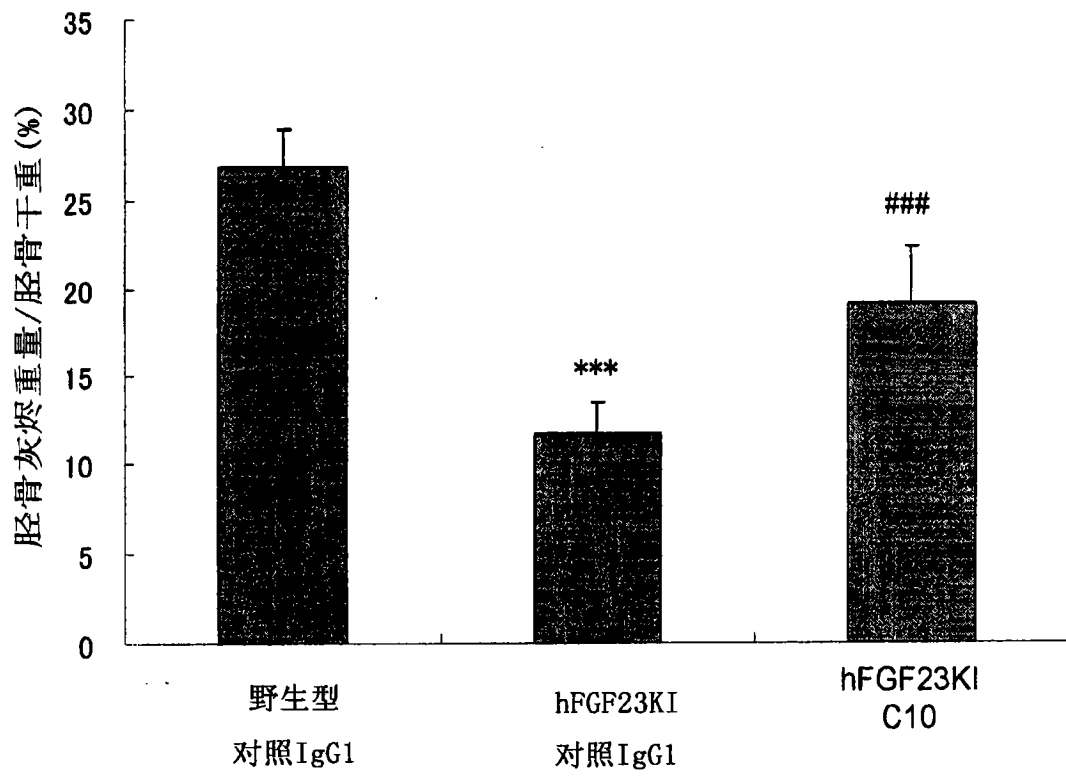


图 18