

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 670**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61P 3/02** (2006.01)

**A61P 5/18** (2006.01)

**A61P 19/08** (2006.01)

**A61P 19/10** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 1/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2008 E 08711707 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2128253**

54 Título: **Anticuerpo anti-FGF23 y composición farmacéutica que comprende el mismo**

30 Prioridad:

**14.02.2007 JP 2007034018**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.03.2015**

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)  
1-6-1, OHEMACHI, CHIYODA-KU  
TOKYO 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**YAMAZAKI, YUJI;  
URAKAWA, ITARU;  
YOSHIDA, HITOSHI;  
AONO, YUKIKO;  
YAMASHITA, TAKEYOSHI;  
SHIMADA, TAKASHI y  
HASEGAWA, HISASHI**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 530 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpo anti-FGF23 y composición farmacéutica que comprende el mismo

**5 Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-FGF23 que se une específicamente a un antígeno FGF23. Además, la presente invención se refiere a una composición para la prevención o el tratamiento de trastornos metabólicos minerales debido a la producción excesiva de FGF23 u otras causas que comprende como ingrediente activo el anticuerpo anti-FGF23. En particular, la presente invención se refiere a un agente para el tratamiento de raquitismo y osteomalacia hipofosfatémicos.

**15 Antecedentes en la técnica**

El factor de crecimiento de fibroblastos se purificó por primera vez a partir de glándula pituitaria bovina como una sustancia que estimulaba el crecimiento en la línea celular de fibroblastos NIH3T3. Desde entonces, se han identificado proteínas similares en diversos tejidos, y un grupo de las sustancias componen una familia de polipéptidos (familia FGF). Hasta la fecha, se han identificado en vertebrados 22 proteínas que pertenecen a la familia FGF. Con respecto a la actividad biológica de estas proteínas, no solo poseen actividad de crecimiento de fibroblastos, sino que estas proteínas también se conocen por poseer acciones divergentes tales como crecimiento del mesoblasto y el neuroectodermo, y acción de angiogénesis, y formación de la excrecencia celómica en el estadio de desarrollo. FGF también varía en el sitio de expresión génica y el momento de la expresión. A menudo se expresan solo en ciertos sitios únicamente en el estadio de desarrollo o en adultos. Se conocen al menos 4 genes que codifican el receptor de FGF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, y FGFR4. Además, con respecto a FGFR1, FGFR2, y FGFR3, se conoce que hay proteínas receptoras para cada uno con dominios extracelulares diferentes debido a diferencias en el corte y empalme. Además, se conoce que la heparina y el proteoglicano sulfato de heparán controlan la acción mediante interacción con el FGF y los receptores de FGF. Además, hay muchas que, debido a similitudes estructurales, pertenecen a la familia FGF, pero cuyas actividades biológicas y propiedades de unión a receptores y similares no se conocen. Las características de esta familia FGF se han resumido en una revisión (véase Ornitz, D. *et al.*, *Genome biology*, 2: 3005.1-3005.12, 2001).

FGF23 (en general, también se puede representar como FGF-23) se clonó inicialmente a partir de ratón mediante una búsqueda de base de datos usando homología con FGF15 y el método de PCR. Además, el FGF23 humano se clonó usando homología de secuencia con el FGF23 de ratón. El FGF23 humano es un polipéptido con 251 restos de aminoácido. Además, como secuencia de señal secretoria, se predice que se escinde una secuencia de aminoácidos de hasta 24 aminoácidos en el extremo amino terminal en el momento de la secreción (véase Yamashita, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277: 494-498, 2000). A continuación, en la investigación de osteomalacia/raquitismo hipofosfatémico dominante autosómico (denominado en lo sucesivo ADHR), se redujo la región génica mutada en pacientes con ADHR y con antelación en la identificación del gen responsable, se descubrió una mutación en sentido erróneo en el gen FGF23 de forma característica en pacientes con ADHR (véase, K.E. *et al.*, *Nature Genet.*, 26: 345-348, 2000). Con este descubrimiento, había una fuerte sugerencia de que el FGF23 era fisiológicamente importante en el cuerpo. Por otra parte, lo que determinó la actividad biológica del FGF23 fue la investigación en osteomalacia neoplásica, que es una de las enfermedades de raquitismo y osteomalacia hipofosfatémicos. En estas enfermedades, la neoplasia responsable de la enfermedad produce y segrega un factor de iniciación de enfermedad líquido, y se piensa que patologías tales como hipofosfatemia, osteomalacia y similares están causadas por el factor de iniciación de la enfermedad. El documento de Patente WO02/088358 se refiere a polipéptidos FGF23 y métodos para el uso de los polipéptidos, agonistas y antagonistas para el tratamiento de enfermedades.

En la investigación del factor de iniciación de enfermedad producido por esta neoplasia responsable, se clonó FGF23 como un gen que se sobreexpresa en el tumor. Además, por administración de este factor, se mostró que se reprodujeron la hipofosfatemia y la osteomalacia (véase Shimada, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 6500-6505, 2001 y el documento de Publicación Internacional Número WO02/14504). Basándose en esta investigación, se ha descubierto que FGF23 está relacionado con el control metabólico relacionado con el fósforo y calcio en el cuerpo. Además, se sugirió que este actúa como factor sistémico que expresa su acción por circulación en el cuerpo. Además, las investigaciones posteriores también mostraron que la sangre de pacientes con osteomalacia neoplásica real tenía un mayor valor de concentración de FGF23 en comparación con los sujetos sanos (véase Yamazaki, Y. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87: 4957-4960, 2002 y Jonsson, K. B., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 348: 1656-1663, 2003).

Además, el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (denominado en lo sucesivo XLH) es una enfermedad que se conoce que tiene una presentación similar al ADHR y la osteomalacia neoplásica en términos de hallazgos clínicos. En esta enfermedad, también se mostró que la concentración de FGF23 en la sangre tenía un valor elevado (véase Yamazaki, Y. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87: 4957-4960, 2002 y Jonsson, K. B. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 348: 1656-1663, 2003).

En otras palabras, las causas del raquitismo y la osteomalacia resistentes a la vitamina D que se habían observado en osteomalacia neoplásica, XLH, y similares eran previamente desconocidas, pero se mostró que el factor causante de la enfermedad segregado era FGF23. Además, con respecto a otras enfermedades metabólicas minerales tales como displasia fibrosa, síndrome de McCune-Albright, raquitismo hipofosfatémico recesivo autosómico, y similares, se había informado que estaban asociadas altas concentraciones de FGF23 en la sangre con la hipofosfatemia y el raquitismo y la osteomalacia (véase Riminucci, M. *et al.*, J. Clin. Invest., 112: 683-692, 2003; Yamamoto, T. *et al.*, J. Bone Miner. Metab., 23: 231-237; 2005; Lorenz-Depiereux, E. *et al.*, Nat. Genet., 38: 1248-1250, 2006). El documento de Patente WO02/08271 se refiere a nuevos ácidos nucleicos y proteínas de FGF23, así como a métodos de diagnóstico y tratamiento de trastornos hipofosfatémicos e hiperfosfatémicos.

A partir del informe anterior, se ha mostrado que la afección de tener FGF23 excesivo en el cuerpo induce hipofosfatemia y el raquitismo y la osteomalacia acompañantes y similares. Además, para hiperfosfatemia con insuficiencia renal crónica, se han informado valores de FGF23 en suero anormalmente altos. Se ha sugerido que el FGF23 excesivo está posiblemente relacionado con una parte de las enfermedades metabólicas renales durante insuficiencia renal (véase Gupta, A. *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 89: 4489-4492, 2004 y Larsson, T. *et al.*, Kidney Int., 64: 2272-2279, 2003). Con respecto a estas enfermedades inducidas debido a FGF23 excesivo, se piensa que la supresión de la acción de FGF23 o la retirada de FGF23 es una posible forma de tratar las enfermedades. Shimada *et al.* (2005, Clin Ped Endocrin, 14:33-37) informan de diversos anticuerpos anti-FGF23 de ratón que se dice que neutralizan la acción del FGF23 endógeno en ratón y rata. Hasta la fecha, se ha informado que los anticuerpos monoclonales anti-FGF23 de ratón son una forma de suprimir la acción de FGF23 (véase Yamashita, T. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 277: 494-498, 2000). Cuando los anticuerpos monoclonales anti-FGF23 de ratón 2C3B y 3C1E usados en este informe se administraron a ratones normales, se inhibió la función del FGF23 de ratón endógeno, y se suprimió la excreción de fósforo del riñón. Al fluctuar la expresión de la enzima que metaboliza la vitamina D en el riñón, esto mostró resultar en el aumento de las concentraciones de fósforo y 1 $\alpha$ ,25 dihidroxi vitamina D (denominada en lo sucesivo 1,25D) en el suero. Además, se realizó la administración repetida de anticuerpo monoclonal anti-FGF23 de ratón en ratón Hyp, que es un ratón modelo para XLH que tiene una alta concentración en suero de FGF23 y tiene hipofosfatemia y tiene disfunción de elongación ósea y disfunción de calcificación. En consecuencia, en el ratón Hyp, se observó un aumento en la concentración de fósforo en la sangre y, además, hubo mejoras en la disfunción de elongación ósea y la disfunción de calcificación. A partir de estos resultados, se pensó que el uso de un anticuerpo supresor de la acción de FGF23 era apropiado como medicina para las enfermedades de exceso de FGF23. Sin embargo, los anticuerpos 2C3B y 3C1E usados en este informe son anticuerpos derivados de ratón. Los anticuerpos de ratón que se reconocen como extraños por un huésped humano inician la respuesta denominada "humana anti-anticuerpo de ratón" (en otras palabras, HAMA), y pueden existir situaciones en las que se observen efectos secundarios graves (véase Van Kroonenbergh, M. J. *et al.*, Nuci. Med. Commun. 9: 919-930, 1988).

Con el fin de evitar este tipo de problema, un enfoque fue desarrollar un anticuerpo quimérico (véase la Memoria Descriptiva de Publicación de Solicitud de Patente Europea Número 120694 y la Memoria Descriptiva de Publicación de Solicitud de Patente Europea Número 125023). Los anticuerpos quiméricos incluyen una parte de anticuerpo derivada de 2 o más especies (por ejemplo, la región variable del anticuerpo de ratón y la región constante del anticuerpo humano y similares). La ventaja de este tipo de anticuerpo quimérico es que se mantiene la unión al anticuerpo que era la característica del anticuerpo de ratón original pero, por otra parte, aún se induce una respuesta "humana-anti anticuerpo quimérico" (en otras palabras, "HACA") (véase Braggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med., 170: 2153-2157, 1989).

Además, se ha desarrollado un anticuerpo recombinante en el que sólo se sustituye la parte del anticuerpo de la región determinante de la complementariedad (CDR) (véase la memoria descriptiva de Patente Británica Número GB2188638A y la memoria descriptiva de Patente de Estados Unidos Número 5585089). Usando tecnología de trasplante de CDR, se produjo un anticuerpo que consistió en CDR de ratón, y la estructura de la región variable y la región constante humana (en otras palabras, un "anticuerpo humanizado") (véase Riechmann, L. *et al.*, Nature, 332: 323-327, 1988). Se conoce que usando este método, un anticuerpo anti-FGF23 de ratón tal como el anticuerpo 2C3B se puede humanizar sustituyendo el anticuerpo de ratón con una secuencia de anticuerpo humano. Sin embargo, cuando se humaniza, existe la posibilidad de que se pueda reducir la afinidad al antígeno. Además, para el tratamiento actual del raquitismo hipofosfatémico en XLH y similares, el método principal es la administración oral periódica de formulación de vitamina D y ácido fosfórico. Sin embargo, existe el problema de que se fuerza a los pacientes a tener una carga considerable debido al tamaño de cada dosis y a la frecuencia de dosificación por día. Por lo tanto, con el fin de disminuir la carga sobre los pacientes y sus familias, se desea un fármaco para el tratamiento de la hipofosfatemia que muestre una acción de aumento sostenido de la concentración de fosfato en suero y de la concentración de 1,25D en suero con el fin de prolongar el tiempo entre dosis.

### Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo humano frente a FGF23 y proporcionar una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento con pocos efectos secundarios mediante el uso del anticuerpo para suprimir la acción de FGF23 y de ese modo prevenir o tratar la enfermedad.

Además, el objeto de la presente intención es proporcionar un anticuerpo que es un anticuerpo anti-FGF23 que se puede usar como una medicina para el tratamiento de hipofosfatemia que tiene una acción de aumento más sostenida de la concentración de fosfato en suero y la concentración de 1,25D en suero con una dosis individual en comparación con los anticuerpos anti-FGF23 existentes. Otro objeto de la presente intención es proporcionar una composición farmacéutica tal como un agente para la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con FGF23 usando este anticuerpo.

En la actualidad, el método de tratamiento predominante para el raquitismo hipofosfatémico es la administración oral de formulación de vitamina D junto con fosfato periódicamente varias veces al día. Sin embargo, debido a la gran cantidad de cada dosis y a la frecuencia de las dosis por día, existe el problema de que se fuerza a los pacientes a tener una gran carga. Se muestra que el anticuerpo monoclonal anti-FGF23 humano, el anticuerpo C10, obtenido mediante la presente invención tiene una acción de aumento más sostenida de la concentración de fosfato y de la concentración de 1,25D en sangre, en otras palabras, una actividad de neutralización de FGF23 más fuerte. Con una administración individual del anticuerpo C10 de la presente investigación, se observó una acción de aumento sostenido de la concentración de fosfato en suero y de la concentración de 1,25D en suero. Esto sugiere que, en comparación con el tratamiento actual para hipofosfatemia, el anticuerpo C10 tiene el potencial de ser un tratamiento radicalmente superior.

La presente invención es como sigue a continuación.

[1] Un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S en la posición 136 de SEC ID N° 12 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos desde A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14.

[2] El anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con [1], que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada mostrada mediante una secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S en la posición 136 de SEC ID N° 12 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada mediante una secuencia de aminoácidos de A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14.

[3] El anticuerpo frente a FGF23 o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con [1] o [2], en el que dicho fragmento funcional es un fragmento de péptido seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv estabilizado con disulfuro (ds Fv), región V dimerizada (dianticuerpo) y Fv de cadena individual (scFv).

[4] El anticuerpo frente a FGF23 humano de acuerdo con uno cualquiera de [1]-[3], en el que la clase del anticuerpo es IgG, IgA, IgE, o IgM.

[5] El anticuerpo frente a FGF23 humano de acuerdo con [4], en el que la subclase del anticuerpo es IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

[6] Una composición farmacéutica, que comprende como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con uno cualquiera de [1]-[5].

[7] Una composición farmacéutica para su uso en un método para controlar el metabolismo del fósforo y/o el metabolismo de la vitamina D mediante FGF23, que comprende, como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con uno cualquiera de [1]-[5].

[8] Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades que están asociadas con trastornos del metabolismo mineral que comprende como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con uno cualquiera de [1]-[5], en la que la enfermedad que está asociada con los trastornos del metabolismo mineral se selecciona entre el grupo que consiste en osteomalacia neoplásica, ADHR, XLH, displasia fibrosa, síndrome de McCune-Albright, e hipofosfatemia recesiva autosómica.

[9] Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en osteoporosis, raquitismo, hipocalcemia, calcificación heterotrópica, osteoesclerosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo, y prurito, comprendiendo la composición como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano como se describe en uno cualquiera de [1]-[5].

[10] Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de [1], que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de bases desde

C en la posición 58 hasta A en la posición 408 representada por SEC ID N° 11, y un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de bases desde G en la posición 67 hasta A en la posición 384 representada por SEC ID N° 13.

5 [11] Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con [10].

[12] Una célula huésped aislada que comprende el vector de acuerdo con [11].

10 [13] Un método para producir un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano, que comprende la etapa de cultivar la célula huésped de acuerdo con [11] para expresar un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano.

La presente invención también proporciona:

15 [1] Un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido mediante un hibridoma C10 (N° de Referencia FERM BP-10772).

20 [2] Un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada mostrada mediante una secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S en la posición 136 de SEC ID N° 12 y/o una secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada por una secuencia de aminoácidos desde A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14.

25 [3] Un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo, en el que: el anticuerpo frente a FGF23 humano o el fragmento funcional del mismo contiene una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y/o de una región variable de cadena ligera; y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se muestra mediante una secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S en la posición 136 de SEC ID N° 12, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se muestra mediante una secuencia de aminoácidos desde A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14.

30 [4] Un anticuerpo frente a FGF23 humano producido mediante un hibridoma C10 (N° de Referencia FERM BP-10772) o un fragmento funcional del mismo.

35 [5] Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que se une a la totalidad o a una parte del epítipo de FGF23 humano, al que se une un anticuerpo producido mediante un hibridoma C10 (N° de Referencia FERM BP-10772).

40 [6] El anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada del apartado [3] anterior que tiene una de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40, CDR2 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 41 y CDR3 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 42, o una región variable de cadena pesada del apartado [3] anterior que tiene todas las anteriores.

45 [7] El anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera del apartado [3] anterior que tiene una de CDR1 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 43, CDR2 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 44 y CDR3 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 45, o una región variable de cadena ligera del apartado [3] anterior que tiene todas las anteriores.

50 [8] Un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo, en el que el anticuerpo frente a FGF23 humano o el fragmento funcional del mismo contiene una región variable de cadena pesada que tiene una cualquiera de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40, CDR2 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41 y CDR3 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 42, o una región variable de cadena pesada que tiene todas las anteriores; y una región variable de cadena ligera que tiene una cualquiera de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 43, CDR2 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 44 y CDR3 mostrada mediante la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 45, o una región variable de cadena ligera que tiene todas las anteriores.

60 [9] El anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo como se describe en uno cualquiera de [1]-[8], en el que dicho fragmento funcional es un fragmento de péptido seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), región V dimerizada (dianticuerpo) y Fv de cadena individual (scFv) y CDR.

65 [10] El anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo, como se describe en uno cualquiera de [1]-[8], que comprende: una cadena pesada y/o una cadena ligera que tienen una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, se sustituyen o se añaden uno o varios aminoácidos.

[11] El anticuerpo frente a FGF23 humano como se describe en uno cualquiera de [1]-[10], en el que la clase del anticuerpo es IgG, IgA, IgE, o IgM.

5 [12] El anticuerpo frente a FGF23 humano como se describe en [11], en el que la subclase del anticuerpo es IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

[13] Una composición farmacéutica, que comprende como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo como se describe en uno cualquiera de [1]-[12].

10 [14] Una composición farmacéutica que puede controlar el metabolismo del fósforo y/o el metabolismo de la vitamina D mediante FGF23 y comprende, como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo como se describe en uno cualquiera de [1]-[12].

15 [15] Una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de enfermedades que están asociadas con trastornos del metabolismo mineral que comprende como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo como se describe en uno cualquiera de [1]-[12].

20 [16] La composición farmacéutica como se describe en [15], en la que la enfermedad que está asociada con las anomalías del metabolismo mineral se selecciona entre el grupo que consiste en osteomalacia neoplásica, ADHR, XLH, displasia fibrosa, síndrome de McCune-Albright, e hipofosfatemia recesiva autosómica.

25 [17] Una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en osteoporosis, raquitismo, hipercalcemia, hipocalcemia, calcificación heterotrópica, osteoesclerosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo, y prurito, que comprende como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo como se describe en uno cualquiera de [1]-[12].

[18] Un hibridoma C10 (Nº de Referencia FERM BP-10772).

30 [19] Ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de bases desde C en la posición 58 hasta A en la posición 408 representada por SEC ID Nº 11.

35 [20] Ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de bases desde G en la posición 67 hasta A en la posición 384 representada por SEC ID Nº 13.

[21] Un vector que contiene el ácido nucleico descrito en [19] o [20].

40 [22] Una célula huésped que contiene el vector descrito en [21].

[23] Un método para producir un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo, que comprende la etapa de cultivar la célula huésped descrita en [22] para expresar un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo.

45

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama esquemático de las etapas de construcción del vector de expresión C10.

50 La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº 30) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 31) del gen de cadena pesada del anticuerpo en N5KG1\_C10\_LH. La secuencia de aminoácidos rodeada por una línea rectangular representa la secuencia de señal de secreción (secuencia líder).

55 La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº 32) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº 33) del gen de cadena ligera del anticuerpo en N5KG1\_C10\_LH. La secuencia de aminoácidos rodeada por una línea rectangular representa la secuencia de señal de secreción (secuencia líder).

La Figura 4 muestra la estructura del vector de expresión C10.

60 La Figura 5A muestra el resultado de la medida para detectar proteína de FGF23 humano de longitud completa purificada mediante el método ELISA sándwich usando anticuerpo 2C3B o anticuerpo C10 como anticuerpo inmovilizado, y anticuerpo 3C1E como anticuerpo de detección.

65 La Figura 5B muestra el resultado de la medida para la detección del sobrenadante del cultivo de células que expresan FGF23 de mono cinomolgo mediante el método ELISA sándwich que usa anticuerpo 2C3B o anticuerpo C10 como anticuerpo de la fase sólida, y anticuerpo 3C1E como anticuerpo de detección.

La Figura 6 es un gráfico que muestra medidas cronológicas de la concentración de fósforo en suero en monos cinomolgos administrados con disolvente, anticuerpo 2C3B o anticuerpo C10. Los valores de las medidas se muestran en promedio +/- error estándar. Además, cuando el ensayo de diferencia significativa entre el grupo administrado con disolvente y los grupos de ensayo se llevó a cabo en la misma fecha usando el ensayo de Student, los valores que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) se marcaron con \* en el gráfico.

La Figura 7 es un gráfico que muestra un aumento en la concentración de fósforo en suero de monos cinomolgos 5 días después de administración de anticuerpo 2C3B o anticuerpo C10, basado en la concentración de fósforo en suero del mono cinomolgo 5 días después de la administración del disolvente como patrón.

La Figura 8 es un gráfico que muestra medidas cronológicas de la concentración de 1,25D en monos cinomolgos administrados con disolvente, anticuerpo 2C3B o anticuerpo C10. Los valores de las medidas se muestran en promedio +/- error estándar. Además, cuando el ensayo de diferencia significativa entre el grupo administrado con disolvente y los grupos de ensayo se llevó a cabo en la misma fecha usando el ensayo de Student, los valores que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) se marcaron con \* en el gráfico.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la detección del sobrenadante de cultivo de las células sin expresión forzada (control) y el sobrenadante de cultivo de las células con expresión de FGF23 humano y de mono cinomolgo mediante anticuerpo C15 usando el método de transferencia de Western.

La Figura 10 muestra estructura del vector pPSs FGF23.

La Figura 11 muestra la estructura del vector pUS FGF23 KI.

La Figura 12 representa una estructura de un alelo en la que el gen de resistencia a fármacos (loxp-neo<sup>r</sup>) está marcado como objetivo, una estructura de un alelo en la que el gen de resistencia a fármacos (loxpv-puro<sup>r</sup>) + de FGF23 humano (-SP) está marcado como objetivo usando el vector pUS hFGF23 KI, una estructura de un alelo en la que los genes de resistencia a fármacos (loxp-neo<sup>r</sup>, loxpv-puro<sup>r</sup>) están suprimidos, y la posición de la sonda del análisis de Southern. Los términos usados en las figuras se describen con detalle cómo sigue a continuación:

hFGF23 (-SP): gen de FGF23 humano que no tiene ninguna región de código de péptido de señal específica, C<sub>K</sub>: región constante del gen Ig<sub>x</sub> de ratón, loxpv-puro: gen de resistencia a puomicina que tiene la secuencia loxPV que es una secuencia loxP parcialmente mutada en ambos extremos del mismo, loxp-neo<sup>r</sup>: gen de resistencia a neomicina que tiene la secuencia loxP en ambos extremos del mismo, sonda Ck3': sonda de análisis de transferencia de Southern para la selección de clones que tienen genes loxpv-puro<sup>r</sup> + (-SP) de hFGF23 introducidos y que tienen el gen loxpv-puro<sup>r</sup> suprimido, sonda 3'KO: sonda de análisis de transferencia de Southern para la selección de clones que tienen el gen loxp-neo<sup>r</sup> introducido y suprimido, E: sitio de la enzima de restricción EcoRI.

La Figura 13 es un gráfico que muestra la concentración de FGF23 en suero 7 días antes la de la administración de anticuerpo de control o de anticuerpo C10. Los valores de las medidas se muestran en promedio +/- error estándar. Además, cuando el ensayo de diferencia significativa entre el grupo de ratones WT y los grupos de ensayo se llevó a cabo usando el ensayo de Student, los grupos que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con \*\*\* en el gráfico.

La Figura 14 es un gráfico que muestra la concentración de fósforo en suero 7 días antes de la administración de anticuerpo de control o de anticuerpo C10 y 3 días después de la primera administración de anticuerpo de control o anticuerpo C10. Los valores de las medidas se muestran en promedio +/- error estándar. Además, cuando el ensayo de diferencia significativa entre el grupo de ratones WT y los grupos de ensayo se llevó a cabo en un día usando el ensayo de Student, los grupos que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con \*\*\* en el gráfico. Además, cuando el ensayo de diferencia significativa entre el grupo administrado con anticuerpo de control hFGF23KI de ratón y los grupos de ensayo se llevó a cabo en un día, los grupos administrados con anticuerpo C10 de hFGF23KI de ratón que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con ### en el gráfico.

La Figura 15 es un gráfico que muestra la concentración de fósforo en suero 1 día después de la quinta administración de anticuerpo de control o anticuerpo C10. Los valores de las medidas se muestran en promedio +/- error estándar. Además, cuando el ensayo de diferencia significativa entre el grupo de ratones WT y los grupos de ensayo se llevó a cabo en un día usando el ensayo de Student, los grupos que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con \*\*\* en el gráfico. Además, cuando se llevó a cabo el ensayo de diferencia significativa entre el grupo administrado con anticuerpo de control hFGF23KI de ratón y los grupos de ensayo, los grupos administrados con anticuerpo C10 de hFGF23KI de ratón que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con ### en el gráfico.

La Figura 16 es un gráfico que muestra la fuerza de sujeción 1 día después de la cuarta administración de anticuerpo de control o anticuerpo C10. Los valores de las medidas se muestran en promedio +/- error estándar. Además, cuando el ensayo de diferencia significativa entre el grupo de ratones WT y los grupos de ensayo se llevó a cabo en un día usando el ensayo de Student, los grupos que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con \*\*\* en el gráfico. Además, cuando se llevó a cabo el ensayo de diferencia significativa entre el grupo

administrado con anticuerpo de control hFGF23KI de ratón y los grupos de ensayo, los grupos administrados con anticuerpo C10 de hFGF23KI de ratón que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con ### en el gráfico.

5 La Figura 17 es un dibujo que muestra la imagen de tinción histológica de un fémur recogido de un ratón 1 día después de la quinta administración de anticuerpo de control o anticuerpo C10, en la que la tinción se llevó a cabo mediante el método Villanueva-Goldner.

10 La Figura 18 es un gráfico que muestra la proporción entre el peso de ceniza y el peso seco de una tibia recogida de un ratón 1 día después de la quinta administración de anticuerpo de control o anticuerpo C10. Los valores de las medidas se muestran en promedio +/- error estándar. Además, cuando el ensayo de diferencia significativa entre el grupo de ratones WT y los grupos de ensayo se llevó a cabo en un día usando el ensayo de Student, los grupos que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con \*\*\* en el gráfico. Además, cuando se llevó a cabo el ensayo de diferencia significativa entre el grupo administrado con anticuerpo de control hFGF23KI de ratón y los grupos de ensayo, los grupos administrados con anticuerpo C10 de hFGF23KI de ratón que presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) se marcaron con ### en el gráfico.

[Texto libre de tabla de secuencia]

20 SEC ID N°: 1-3, 5-27, 30-33, 40-50 síntesis

### Descripción detallada de las realizaciones preferentes

25 A continuación, aclarando las definiciones de los términos usados en la presente invención, se describirá con detalle la presente invención.

#### I. Anticuerpo de la presente divulgación

30 1. Anticuerpo anti-FGF23 y su fragmento funcional

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo frente a FGF23 que es un miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF).

35 En la presente divulgación, "anticuerpo frente a FGF23" es un anticuerpo que se une a FGF23 o a una parte del mismo, un anticuerpo que es reactivo frente a FGF23 o a una parte del mismo, o un anticuerpo que reconoce el FGF23 o una parte del mismo. También se denomina anticuerpo frente a FGF23 a un anticuerpo anti-FGF23. En la presente divulgación, un anticuerpo es una inmunoglobulina en la que todas las regiones que constituyen la inmunoglobulina de la región variable de cadena pesada y la región constante de cadena pesada y la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera derivan de un gen que codifica la inmunoglobulina. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo monoclonal. Aquí, una parte de FGF23 significa una secuencia de aminoácidos parcial de una secuencia de aminoácidos de longitud completa de FGF23 representada por SEC ID N° 4 y es un péptido fragmento de FGF23 que comprende una secuencia de aminoácidos continua. Preferentemente, el anticuerpo contiene la secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S en la posición 136 de SEC ID N° 12 y/o la secuencia de aminoácidos desde A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14. Más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo producido mediante hibridoma C10. SEC ID N° 12 es la secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia líder de la región variable de cadena pesada del anticuerpo frente a FGF23. La secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S del número 136 de SEC ID N° 12 es la parte madura de la secuencia de aminoácidos con la parte de secuencia líder retirada. Además, SEC ID N° 14 es la secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia líder de la región variable de cadena ligera del anticuerpo frente a FGF23. La secuencia de aminoácidos desde A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14 es la parte madura de la secuencia de aminoácidos con la secuencia líder retirada. Con respecto a la clase del anticuerpo, se usan inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina E (IgE), e inmunoglobulina M (IgM). Preferentemente, es IgG. Además, para la subclase IgG, se usan IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Son preferentes IgG1, IgG2 e IgG4. Más preferentemente, es IgG1.

55 El anticuerpo de la presente divulgación también incluye un anticuerpo anti-FGF23 que comprende una secuencia de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad (CDR) nueva.

60 En la región variable del anticuerpo está presente una CDR, y esta parte es responsable de la especificidad de reconocimiento de antígeno. Las partes distintas de la CDR en la región variable tienen el papel de mantener la estructura de la CDR, y se denominan región de entramado (FR). En el extremo C terminal de una cadena pesada y de una cadena ligera está presente una región constante, y se denomina región constante de cadena pesada (CH) y región constante de cadena ligera (CL), respectivamente.

65 En la región variable de cadena pesada están presentes tres regiones determinantes de la complementariedad, que son una primera región determinante de la complementariedad (CDR1), una segunda región determinante de la



complementariedad (CDR2), y una tercera región determinante de la complementariedad (CDR3). Las tres regiones determinantes de la complementariedad en la región variable de la cadena pesada se denominan colectivamente región determinante de la complementariedad de cadena pesada. De forma similar, en la región variable de la cadena ligera están presentes tres regiones determinantes de la complementariedad, que son una primera región determinante de la complementariedad (CDR1), una segunda región determinante de la complementariedad (CDR2), y una tercera región determinante de la complementariedad (CDR3). Las tres regiones determinantes de la complementariedad en la región variable de la cadena ligera se denominan colectivamente región determinante de la complementariedad de cadena ligera. Las secuencias de estas CDR se pueden determinar usando los métodos que se describen en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991).

El anticuerpo de la presente divulgación tiene preferentemente al menos una cualquiera o la totalidad de CDR1 mostrada por SEC ID N° 40, CDR2 mostrada por SEC ID N° 41, y CDR3 mostrada por SEC ID N° 42 como región determinante de la complementariedad de cadena pesada. Además, el anticuerpo de la presente divulgación tiene preferentemente al menos una cualquiera o la totalidad de CDR1 mostrada como SEC ID N° 43, CDR2 mostrada como SEC ID N° 44, y CDR3 mostrada como SEC ID N° 45 como región determinante de complementariedad de cadena ligera. Más preferentemente, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo que se une a FGF23 y tiene CDR1 mostrada por SEC ID N° 40, CDR2 mostrada por SEC ID N° 41, y CDR3 mostrada por SEC ID N° 42 como la región determinante de la complementariedad de cadena pesada, y CDR1 mostrada por SEC ID N° 43, CDR2 mostrada por SEC ID N° 44, y CDR3 mostrada por SEC ID N° 45 como la región determinante de la complementariedad de cadena ligera.

La secuencia de la CDR del anticuerpo de la presente divulgación no se limita de forma específica. Sin embargo, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo que comprende preferentemente una cualquiera o más CDR, más preferente tres CDR de la cadena pesada, e incluso más preferentemente seis CDR de las secuencias de CDR representadas por SEC ID N° 40 a 45. Las secuencias de aminoácidos distintas de la CDR no se limitan de forma específica. El anticuerpo de la presente divulgación incluye los denominados anticuerpos de trasplante de CDR, en los que en las secuencias de aminoácidos distintas de la CDR derivan de otros anticuerpos, y particularmente anticuerpos de otras especies. Entre estos, es preferente un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, en el que las secuencias de aminoácidos distintas de la CDR derivan del ser humano. Además, se puede introducir una supresión, sustitución y/o inserción de uno o más restos de aminoácido en la FR según necesidades. Se puede aplicar un método conocido públicamente como el método para la producción de un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

"Fragmento funcional" es una parte de un anticuerpo (fragmento parcial) y tiene una o más de las acciones del anticuerpo frente al antígeno. En otras palabras, se refiere a un fragmento que retiene la capacidad de unión al antígeno, la reactividad frente al antígeno, o la capacidad de reconocimiento del antígeno. Los ejemplos incluyen Fv, Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), Fv de cadena individual (scFv), y polímeros de estos. Indicado más específicamente, los ejemplos incluyen péptidos que contienen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dianticuerpo, dsFv, y CDR [D. J. King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T. J. International Ltd].

De los fragmentos que se obtienen por tratamiento de un anticuerpo que se une a FGF23 con la proteasa papaína, Fab es el fragmento de anticuerpo de peso molecular de aproximadamente 50.000 con actividad de unión a antígeno, en el que se une aproximadamente la mitad del extremo amino terminal de la cadena H con la totalidad de la cadena L mediante un enlace disulfuro.

El Fab de la presente invención se puede obtener por tratamiento del anticuerpo que se une a FGF23 con la proteasa papaína. Alternativamente, Fab se puede producir por inserción de ADN que codifica el Fab del anticuerpo en un vector de expresión para organismos procariotas o un vector de expresión para organismos eucariotas y expresando este vector por introducción en un organismo procariota o un organismo eucariota.

De los fragmentos obtenidos por tratamiento de IgG con la proteasa pepsina, F(ab')<sub>2</sub> es el fragmento de anticuerpo de peso molecular de aproximadamente 100.000 con actividad de unión a antígeno y que es mayor que el de Fab unido a través de enlaces disulfuro de la región bisagra.

El F(ab')<sub>2</sub> de la presente invención se puede obtener por tratamiento del anticuerpo que se une a FGF23 con la proteasa pepsina. Alternativamente, se puede producir mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro del Fab' que se describe posteriormente.

Fab' es un fragmento de anticuerpo de un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene actividad de unión a antígeno y en el que el enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')<sub>2</sub> anterior se escinde.

El Fab' de la presente invención se obtiene por tratamiento del F(ab')<sub>2</sub> de la presente invención, que se une a FGF23, con el agente reductor ditiotretitol. Alternativamente, se inserta ADN que codifica el fragmento Fab' de este anticuerpo en un vector de expresión para organismos procariotas o en un vector de expresión para organismos eucariotas, y este vector se introduce en organismos procariotas o en organismos eucariotas y de ese modo se expresa para producir Fab'.

El scFv es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión de anticuerpo con una región variable de cadena pesada individual (denominada en lo sucesivo VH) y una región variable de cadena ligera individual (escrita en lo sucesivo como VL) que se unen usando un conector peptídico adecuado (escrito en lo sucesivo como P y es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH).

5 El scFv de la presente invención se puede producir obteniendo el ADNc que codifica las VH y VL del anticuerpo de la presente invención que se une con FGF23 y construyendo el ADN que codifica el scFv e insertando el ADN en un vector de expresión para organismos procariotas o un vector de expresión para organismos eucariotas e introduciendo y expresando el vector de expresión en organismos procariotas u organismos eucariotas.

10 Un dianticuerpo es un fragmento de anticuerpo en el que scFv se dimeriza y es un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión de anticuerpo divalente. Cada actividad de unión del anticuerpo divalente puede ser igual o diferente.

15 El dianticuerpo de la presente invención se puede producir obteniendo el ADNc que codifica las VH y VL del anticuerpo de la presente invención que se une a FGF23, construyendo el ADN que codifica el scFv de modo que la longitud de la secuencia de aminoácidos para el conector peptídico sea de 8 residuos o inferior, insertando este ADN en un vector de expresión para organismos procariotas o un vector de expresión para organismos eucariotas, y expresando este vector de expresión por introducción en un organismo procariota o un organismo eucariota.

20 En un dsFv, 1 resto de aminoácido en cada una de las VH y VL está sustituido con un resto de cisteína, y los polipéptidos se unen a través de un enlace disulfuro entre estos restos de cisteína. El resto de aminoácido que está sustituido con el resto de cisteína se puede seleccionar basándose en la estructura terciaria prevista del anticuerpo de acuerdo con el método indicado por Reiter *et al.* (Protein Engineering, 7: 697-704, 1994).

25 El dsFv de la presente invención se puede producir obteniendo el ADNc que codifica las VH y VL del anticuerpo de la presente invención que se une a FGF23, construyendo el ADN que codifica el dsFv, insertando este ADN en un vector de expresión para un organismo procariota o un vector de expresión para un organismo eucariota, e introduciendo y expresando este vector de expresión en un organismo procariota o un organismo eucariota.

30 El péptido que comprende CDR se construye comprendiendo al menos una o más regiones de las CDR de VH o VL. Los péptidos que comprenden múltiples CDR se pueden unir conjuntamente de forma directa o a través de un conector peptídico adecuado.

35 El péptido que comprende la CDR de la presente divulgación se puede producir construyendo un ADN que codifica la CDR de las VH y VL del anticuerpo de la presente invención que se une a FGF23, insertando este ADN en un vector de expresión para organismos procariotas o un vector de expresión para organismos eucariotas, e introduciendo y expresando este vector de expresión en organismos procariotas u organismos eucariotas.

40 Además, el péptido que contiene CDR se puede producir mediante un método de síntesis química tal como el método Fmoc (método de fluorenilmetiloxycarbonilo) y el método tBoc (método de t-butiloxycarbonilo).

Además, "fragmento funcional" es un fragmento del anticuerpo que se puede unir al antígeno (FGF23). Preferentemente, el "fragmento funcional" es un fragmento que se puede unir a FGF23 y comprende una secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S en la posición 136 de SEC ID N° 12, y/o una secuencia de aminoácidos desde A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14. Preferentemente, el "fragmento funcional" es un fragmento que comprende al menos una o todas las CDR representadas por las SEC ID N° 40 a 45 y que se puede unir a FGF23. Más preferentemente, el "fragmento funcional" deriva de la región variable de un anticuerpo producido mediante hibridoma C10 y es un fragmento que se puede unir a FGF23.

50 El anticuerpo de la presente invención incluye derivados del anticuerpo en los que se unen químicamente o mediante ingeniería genética radioisótopos, fármacos de bajo peso molecular, fármacos macromoleculares, y proteínas al anticuerpo frente a FGF23 de la presente invención o a los fragmentos funcionales del anticuerpo.

55 Los derivados del anticuerpo de la presente invención se pueden producir por unión de radioisótopos, fármacos de bajo peso molecular, fármacos macromoleculares y proteínas al extremo amino terminal o al extremo carboxi terminal de la cadena H (cadena pesada) o la cadena L (cadena ligera) del anticuerpo frente a FGF23 de la presente invención o el fragmento funcional del anticuerpo, a un grupo sustituido o cadena lateral sustituibles en el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo y, además, a una cadena de azúcar en el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo mediante métodos químicos (Koutai Kogaku Nyuumon, Osamu Kanamitsu, Chijin shokan, 1994).

60 Además, el derivado del anticuerpo unido con la proteína se produce por unión del ADN que codifica el anticuerpo frente a FGF23 de la presente invención y el fragmento funcional del anticuerpo y el ADN que codifica la proteína que se va a unir, insertando este ADN en un vector de expresión, e introduciendo y expresando el vector de expresión en una célula huésped adecuada.

65

Para el radioisótopo, los ejemplos incluyen <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I. Por ejemplo, el radioisótopo se puede unir al anticuerpo mediante el método de cloramina T.

5 Los fármacos de bajo peso molecular incluyen agentes alquilantes que incluyen mostaza nitrogenada, y ciclofosfamida; antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo y metotrexato; antibióticos tales como daunomicina, bleomicina, mitomicina C, daunorrubicina y doxorubicina; alcaloides de plantas, tales como vincristina, vinblastina y vindesina; agentes anticancerígenos tales como agentes hormonales tales como tamoxifeno y dexametasona (Clinical oncology; Japanese Clinical Oncology Research Meeting, Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Co., 1996); esteroides tales como hidrocortisona, y prednisona; agentes no esteroideos que incluyen aspirina e indometacina; inmunomoduladores tales como tiomalato de oro, y penicilamina; inmunosupresores tales como ciclofosfamida, y azatioprina; antiinflamatorios tales como antihistaminas tales como maleato de clorfeniramina, y clemastina (Inflammation and anti-inflammatory treatment method, Ishiyaku Publishing Corp. Ltd., 1982). La unión del anticuerpo a estos fármacos de bajo peso molecular se lleva a cabo mediante métodos conocidos. Ejemplos de métodos para unir daunomicina a un anticuerpo incluyen un método para la unión entre los grupos amino de la daunomicina y el anticuerpo mediante glutaraldehído, y un método para la unión de los grupos amino de la daunomicina y el grupo carboxilo del anticuerpo mediante carbodiimida soluble en agua. Por unión de estos fármacos de bajo peso molecular al anticuerpo, se obtiene un derivado de un anticuerpo que tiene la función del fármaco de bajo peso molecular.

20 Para el fármaco macromolecular, los ejemplos incluyen polietilenglicol (denominado en lo sucesivo PEG), albúmina, dextrano, polioxietileno, copolímero de maleato de estireno, polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, e hidroxipropil metacrilamida. Por unión de estos compuestos macromoleculares al anticuerpo o al fragmento funcional de un anticuerpo, se anticipan los siguientes efectos: (1) se mejora la estabilidad con respecto a diversos factores químicos, físicos, y biológicos, (2) se prolonga considerablemente la semivida en sangre, (3) se pierde la inmunogenicidad, se suprime la producción de anticuerpos (Bioconjugate Pharmaceutical, Hirokawa Shoten, 1993). Un ejemplo de un método para unir PEG a un anticuerpo es un método de reacción con un reactivo modificador de PEG (Bioconjugate Pharmaceutical, Hirokawa Shoten, 1993). Ejemplos del reactivo modificador de PEG incluyen modificador del grupo ε-amino de lisina (documento de Publicación de Patente abierta a la inspección pública Número S61-178926), modificador del grupo carboxilo de ácido aspártico y ácido glutámico (documento de Publicación de Patente abierta a la inspección pública Número S56-23587), y modificador del grupo guanidilo de arginina (documento de Publicación de Patente abierta a la inspección pública Número H2-117920).

35 El anticuerpo que se une a la proteína se puede obtener como un anticuerpo de fusión. En otras palabras, el ADN que codifica el anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo se une con el ADN que codifica una proteína específica, y se construye el ADN que codifica la proteína fusionada de la proteína específica y el anticuerpo. Este ADN se inserta en un vector de expresión para un organismo procariota o un organismo eucariota. Este vector de expresión se puede introducir y expresar en el organismo procariota o el organismo eucariota con el fin de producir el anticuerpo fusionado que está unido a la proteína específica.

40 Con respecto al anticuerpo frente a FGF23 de la presente invención o el fragmento funcional del anticuerpo, tomando medidas mediante métodos inmunológicos tales como ELISA (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 14, 1988; Monoclonal Antibodies; Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) o midiendo la constante de disociación de unión mediante un biosensor Biacore (Journal of Immunological Methods; 145: 229-240, 1991), y midiendo la actividad de inhibición (Nature, 444: 770-774, 2006) de la actividad del promotor del gen 1 de respuesta de crecimiento temprano mediante la estimulación de FGF23 humano usando células de expresión klotho, se puede evaluar la actividad de unión de FGF23 humano y la actividad de inhibición de la función de FGF23 humano.

50 En la presente invención, "anticuerpo humano" se define como un anticuerpo que es un producto de expresión de un gen de anticuerpo derivado de seres humanos. El anticuerpo humano, como se describirá posteriormente, se puede obtener introduciendo el locus génico del anticuerpo humano y administrando antígeno a animales transgénicos que tienen la capacidad de producir el anticuerpo humano. Ejemplos de estos animales transgénicos incluyen ratones. El método de creación de ratones que pueden producir el anticuerpo humano se describe, por ejemplo, en el documento de Publicación Internacional Número WO02/43478.

55 Para el anticuerpo de la presente divulgación, los ejemplos incluyen un anticuerpo (anticuerpo C10) producido mediante hibridoma C10 como se describirá posteriormente en los Ejemplos. El hibridoma C10 ha tenido un depósito internacional basado en el tratado de Budapest con N° de referencia FERM ABP-10772 (una exposición para la identificación: C10) en el Patent Organism Depository Center (Central 6, 1-1 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón) el 2 de febrero del 2007 en la institución administrativa independiente del Advanced Industrial Science and Technology.

65 El anticuerpo o el fragmento funcional de la presente divulgación también incluye anticuerpos monoclonales o fragmentos funcionales de los mismos que comprenden una cadena pesada y/o una cadena ligera que consisten en secuencias de aminoácidos con una o varias supresiones, sustituciones, y adiciones de aminoácidos en cada secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y/o la cadena ligera que construyen el anticuerpo o fragmento

funcional. Aquí, en "una o varias", "varias" es 9 o menos, preferentemente 5 o menos, y más preferentemente 3 o menos. Tener 2 es especialmente preferente. Se puede introducir una modificación parcial (supresión, sustitución, inserción, adición) del aminoácido como se ha descrito previamente en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente divulgación o el fragmento funcional mediante modificación parcial de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos. Se puede introducir la modificación parcial de esta secuencia de nucleótidos usando el método convencional de mutagénesis específica de sitio conocido [Proc Natl Acad Sci USA., 81: 5662-5666, 1984]. El anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos de todas las clases e isotipos de inmunoglobulinas.

El anticuerpo frente a FGF23 de la presente invención se puede producir mediante el siguiente método de producción. Por ejemplo, el FGF23 o una parte del FGF23 o un conjugado de una porción del FGF23 y una sustancia vehículo adecuada para aumentar la antigenicidad (por ejemplo, albúmina de suero bovino) se inmunizan junto con un adyuvante (adyuvante completo o incompleto de Freund) según sea necesario en mamíferos no humanos tales como ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos. Para el FGF23, se puede usar FGF23 natural o FGF23 recombinante. Alternativamente, la sensibilización inmune se puede llevar a cabo introduciendo el gen que codifica FGF23 en un vector de expresión y expresando la proteína FGF23 en el animal. El anticuerpo monoclonal se obtiene cultivando el hibridoma obtenido por fusión de las células productoras de anticuerpos obtenidas de los animales con sensibilización inmune y células de mieloma que no tienen la capacidad de producción de anticuerpos, y seleccionando los clones que producen los anticuerpos monoclonales que muestran afinidad específica por el antígeno usado para la inmunización.

El anticuerpo de la presente invención incluye los que se han convertido en una subclase diferente mediante modificación por ingeniería genética como conocen los expertos en la materia (por ejemplo, véase el documento de Solicitud de Patente Europea EP314161). En otras palabras, usando ADN que codifica la región variable del anticuerpo de la presente invención, se puede obtener un anticuerpo que es de una subclase que es diferente de la subclase original usando métodos de ingeniería genética.

## 2. Producción del anticuerpo de la presente divulgación

La producción de un anticuerpo monoclonal incluye las siguientes etapas. En otras palabras, (1) se prepara la proteína antígeno que se va a usar como inmunógeno o el vector de expresión de la proteína antígeno, (2) después de inmunización por inyección del antígeno en el animal o por expresión del antígeno en el animal, se toma una muestra de sangre y se ensaya su concentración de anticuerpo, y después de determinar el tiempo para el aislamiento del bazo, se preparan las células de producción de anticuerpos, (3) se preparan células de Mieloma, (4) se fusionan la célula de producción de anticuerpos y el mieloma, (5) se selecciona el grupo hibridoma que produce el anticuerpo diana, (6) los hibridomas se dividen en un clon celular individual (clonación), (7) opcionalmente, se cultiva el hibridoma para producir grandes cantidades de anticuerpo monoclonal, o se crían animales en los que se ha trasplantado el hibridoma, y (8) se ensayan la actividad biológica y la especificidad de reconocimiento del anticuerpo monoclonal producido de este modo, o se ensaya la propiedad como reactivo de marcado.

A continuación en el presente documento, se describe con detalle el método de producción para el anticuerpo monoclonal anti-FGF23 siguiendo el proceso anterior. Sin embargo, el método de producción para este anticuerpo no se limita a este método. Por ejemplo, también se pueden usar células productoras de anticuerpos y mieloma de células distintas a las del bazo.

### (1) Purificación del anticuerpo

Usando una técnica de recombinación genética, se integra la secuencia de ADN que codifica el FGF23 en un plásmido de expresión adecuado. Después de producir FGF23 en un huésped tal como *E. coli* o una célula animal, se puede usar la proteína FGF23 purificada. Debido a que se conoce la estructura primaria de la proteína FGF23 humana [Nº de referencia GenBank AAG09917, SEC ID Nº 4], se sintetiza químicamente un péptido parcial a partir de la secuencia de aminoácidos de FGF23 mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, y este también se puede usar como antígeno.

### (2) Etapa de preparación de la célula productora de anticuerpos

El antígeno obtenido como se ha mencionado en (1) se mezcla con un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund o aluminio potasio, y la mezcla se inmuniza en animales experimentales como inmunógeno. Con respecto a los animales experimentales, los ratones transgénicos que tienen la capacidad de producir anticuerpos derivados de seres humanos son los que se usan de forma más adecuada. Este tipo de ratones se describen en la referencia de Tomizuka *et al.* [Tomizuka *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA., 97: 722-727, 2000].

El método de administración del inmunógeno cuando se inmunizan los ratones puede ser cualquiera de inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, inyección intravenosa, inyección intradérmica, inyección intramuscular e inyección en la almohadilla de la pata. Es preferente la inyección intraperitoneal, la inyección en la almohadilla de la pata o la inyección intravenosa.

La inmunización se puede llevar a cabo de una vez o en varias veces repetidas en un intervalo adecuado. Después de esto, se mide la concentración del anticuerpo frente al antígeno en el suero del animal inmunizado. Cuando se usan animales con una concentración de anticuerpo lo suficientemente alta como fuente de suministro de células productoras de anticuerpos, aumenta la eficacia de las operaciones posteriores. En general, es preferente usar células productoras de anticuerpos derivadas de animales 3-5 días después de la inmunización final para la siguiente fusión celular.

Ejemplos del método que se usa aquí para medir la concentración del anticuerpo incluyen técnicas conocidas tales como radioinmunoensayo (denominado en lo sucesivo en el presente documento "método RIA"), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (denominado en lo sucesivo en el presente documento "método ELISA"), método de anticuerpo fluorescente, y método de hemaglutinación pasiva. Desde el punto de vista de la sensibilidad de detección, rapidez, precisión, y la posibilidad de operación automatizada, es adecuado el método RIA o el método ELISA.

De acuerdo con el método ELISA, por ejemplo, la medida de la concentración del anticuerpo de la presente invención se puede llevar a cabo mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se absorbe el antígeno frente al anticuerpo humano sobre la superficie de la fase sólida de una placa de ELISA de 96 pocillos, por ejemplo. Además, la superficie de la fase sólida que no ha absorbido el antígeno se cubre con una proteína sin relación con el antígeno, tal como albúmina de suero bovino (BSA). Después de aclarar la superficie, se permite el contacto con un reactivo diluido en serie como anticuerpo primario (por ejemplo, suero de ratón transgénico que tiene la capacidad de producir anticuerpos humanos) para hacer que el antígeno descrito anteriormente se una al anticuerpo anti-FGF23 de la muestra. Además, se añade un anticuerpo marcado con enzima frente al anticuerpo humano como anticuerpo secundario para permitir que se una al anticuerpo humano. Después de lavar, se añade un sustrato para la enzima. A continuación, se mide el cambio en la absorción de la luz causado por el color que resulta de la descomposición del sustrato para calcular la concentración del anticuerpo.

### (3) Etapa de preparación para el mieloma

Con respecto al mieloma, se pueden usar células que no tienen capacidad de producción de anticuerpos por sí mismas y que derivan de mamíferos tales como ratón, rata, cobaya, hámster, conejo o seres humanos. En general, se usan preferentemente líneas celulares obtenidas a partir de ratones, por ejemplo, línea de mieloma de ratón resistente a 8-azaguanina (derivado de BALB/c) P3X63AgSU.1 (P3-U1) [Yelton; D. E. *et al.*, Current Topics in Microbiology and Immunology, 81: 1-7, 1978], P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1) E Kohler, G. *et al.*, European J. Immunology, 6: 511-519, 1976], Sp2/O-Ag14 (SP2/0) [Shulman, M. *et al.*, Nature, 276: 269-270, 1978], P3X63Ag8.653 (653) [Kearney, J. F. *et al.*, J. Immunology, 123: 1548-1550, 1979], P3X63Ag8 (X63) [Horibata, K. y Harris, A. W, Nature, 256: 495-497, 1975]. Estas líneas celulares se subcultivan en un medio adecuado, por ejemplo, medio de 8-azaguanina [un medio RPMI-1640 complementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, y suero de ternera fetal (FCS) así como con 8-azaguanina], Medio Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM), o Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). Sin embargo, 3-4 días antes de la fusión celular, las líneas celulares se subcultivan en un medio normal (por ejemplo, medio DMEM que contiene un 10 % de FCS), y en el día de la fusión, se prepara un número de células mayor o igual de  $2 \times 10^7$ .

### (4) Fusión celular

Las células productoras de anticuerpos son células plasmáticas y linfocitos que son sus células precursoras. Estas se pueden obtener a partir de cualquier lugar de los individuos. En general, se pueden combinar el bazo, los nódulos linfáticos, la médula ósea, la amígdala, sangre periférica, o cualquiera de estos. En general, se usan con la mayor frecuencia las células esplénicas.

Después de la inmunización final, se retira el lugar donde están presentes las células productoras de anticuerpos, por ejemplo el bazo, del ratón que ha conseguido una concentración de anticuerpo prescrita, y se preparan las células esplénicas que son las células productoras de anticuerpos. A continuación, se fusionan las células esplénicas y el mieloma. Con respecto a los medios para fusionar las células esplénicas y el mieloma obtenido en la etapa (3), el método que se usa más generalmente es un método que usa polietilenglicol. Este método tiene una toxicidad celular relativamente baja y la operación de fusión también es fácil. Este método tiene el siguiente procedimiento, por ejemplo.

La célula esplénica y el mieloma se lavan bien con medio exento de suero (por ejemplo, DMEM) o una solución salina tamponada con fosfato (PBS). La célula esplénica y el mieloma se mezclan con una proporción numérica de células de aproximadamente 5:1-10:1 y se centrifugan. Se retira el sobrenadante, y después de liberar el grupo celular precipitado, se instila 1 ml de un medio exento de suero que contiene un 50 % de polietilenglicol (peso molecular de 1000-4000) (p/v) en las células con agitación. Después de esto, se añaden lentamente 10 ml de medio exento de suero, y a continuación, esto se centrifuga. Se descarta de nuevo sobrenadante, y las células precipitadas se suspenden en una cantidad adecuada de medio normal (denominado medio HAT) que contiene una cantidad adecuada de solución de hipoxantina/aminoptericina/timidina (HAT) e interleuquina-6 humana (IL-6). Las células se alicotan en cada pocillo de una placa de cultivo (denominada en lo sucesivo "placa"), y se cultivan durante

aproximadamente 2 semanas a 37 °C en atmósfera de gas dióxido de carbono al 5 %. Durante este tiempo, se suplementa medio HAT según sea necesario.

#### (5) Selección del grupo hibridoma

Cuando las células de mieloma que se han descrito anteriormente son una cepa resistente a 8-azaguanina, en otras palabras, si es una cepa deficiente en hipoxantina/guanina/fosforribosiltransferasa (HGPRT), las células de mieloma que no se fusionaron y las células fusionadas sólo de células de mieloma no sobrevivirán en el medio que contiene HAT. Por otra parte, las células fusionadas sólo de células productoras de anticuerpos e hibridomas de células productoras de anticuerpo y células de mieloma pueden sobrevivir, pero las células fusionadas sólo de células productoras de anticuerpo tienen una vida útil limitada. Por lo tanto, continuando el cultivo en un medio que contiene HAT, sólo sobrevivirán los hibridomas que son células fusionadas entre células productoras de anticuerpos y células de mieloma. En consecuencia, se pueden seleccionar los hibridomas.

Con respecto al hibridoma que crece en las colonias, se lleva a cabo un cambio de medio a un medio en el que se retira la aminopterina del medio HAT (denominado en lo sucesivo medio HT). A continuación, se recoge una parte del sobrenadante del medio, y se mide la concentración de anticuerpo anti-FGF23 mediante el método ELISA, por ejemplo.

Se ha mostrado anteriormente un ejemplo de un método que usa una línea celular resistente a 8-azaguanina, pero también se pueden usar otras líneas celulares de acuerdo con el método de selección de hibridomas. En estos casos, la composición del medio a utilizar también cambia.

#### (6) Etapa de clonación

Midiendo la concentración de anticuerpo con el mismo método que el método de medida de la concentración de anticuerpo usado en (2), se transfiere a otra placa el hibridoma que se ha determinado para producir el anticuerpo específico, y se lleva a cabo la clonación. Ejemplos de métodos de clonación incluyen en el método de dilución limitante en el que el hibridoma se diluye de modo que haya un hibridoma contenido por 1 pocillo de una placa y este se cultiva; el método de agar blando en el que los hibridomas se cultivan en un medio de agar blando y se recogen las colonias; un método en el que se retira una célula de una vez con un micromanipulador y esta se cultiva; la "clonación mediante clasificador" en el que una célula individual se separa mediante un clasificador celular. El método de dilución limitante es sencillo y se usa a menudo.

Con respecto a los pocillos en los que se ha observado la concentración de anticuerpo, por ejemplo, la clonación se repite 2-4 veces mediante el método de dilución limitante, y las células que tienen una concentración de anticuerpo estable se seleccionan como líneas de hibridoma productoras de anticuerpo monoclonal anti-FGF23.

#### (7) Preparación de anticuerpo monoclonal mediante cultivo del hibridoma

Los hibridomas en los que se ha completado la clonación se cultivan por intercambio de medio del medio HT a un medio normal. Para el cultivo a gran escala, hay cultivos en rotación que usan un frasco de cultivo a gran escala, cultivo en centrifugadora, o cultivo usando un sistema de fibra hueca. Mediante la purificación del sobrenadante en un cultivo a gran escala usando un método conocido por los expertos en la materia tal como filtración en gel, se puede obtener el anticuerpo monoclonal anti-FGF23. Además, haciendo crecer este hibridoma intraperitonealmente en la misma cepa de ratón (por ejemplo, BALB/c) o ratón, rata, cobaya, hámster, o conejo nu/nu, se puede obtener fluido peritoneal que contiene grandes cantidades de anticuerpo monoclonal anti-FGF23. Un método sencillo para purificación usa kits de purificación de anticuerpo monoclonal comerciales (por ejemplo, kit MAbTrap GII; GE Healthcare Bioscience Co.).

Los anticuerpos monoclonales obtenidos de este modo tienen una alta especificidad de antígeno frente a FGF23.

Además, se puede preparar anticuerpo recombinante por clonación del gen que codifica el anticuerpo monoclonal humano a partir de las células productoras de anticuerpos del hibridoma, incorporando el gen a un vector adecuado e introduciéndolo en un huésped (por ejemplo, línea celular de mamífero, *E. coli*, célula de levadura, célula de insecto, y célula de planta), y usando tecnología de recombinación genética (Delves, P. J., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY, Shepherd, P. y Dean C, Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, Goding, J. W., Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 ACADEMIC PRESS).

La presente divulgación incluye los ácidos nucleicos que contienen la secuencia genética para el anticuerpo del hibridoma que produce el anticuerpo de la presente divulgación, en particular el ácido nucleico para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo producido por el hibridoma de la presente divulgación que se describirá posteriormente. Aquí, ácido nucleico incluye ADN y ARN. Además, la presente divulgación incluye el ácido nucleico de la parte madura en la que se ha retirado la región que codifica la secuencia de señal del ácido nucleico de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera

de la presente divulgación. Adicionalmente, además de los ácidos nucleicos que se han descrito anteriormente, el ácido nucleico de la presente divulgación incluye los ácidos nucleicos que tienen los codones correspondientes a los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente divulgación y a los aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo y/o de la región variable de cadena ligera de este anticuerpo.

Con el fin de preparar un gen que codifique el anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma, se usa un método en el que se prepara el ADN que codifica cada una de la región V de cadena L, la región C de cadena L, la región V de cadena H y la región C de cadena H del anticuerpo monoclonal mediante el método de PCR. Para esto, se usa como cebador oligoADN diseñado a partir del gen del anticuerpo anti-FGF23 o de la secuencia de aminoácidos. Con respecto a la plantilla, se puede usar ADN preparado a partir del hibridoma. Estos ADN se incorporan a un vector adecuado y este se introduce en un huésped y se expresa, o bien estos ADN se incorporan cada uno a un vector adecuado, y se expresan conjuntamente.

Para el vector, se usan fagos o plásmidos que puedan crecer de forma autónoma en los microorganismos huésped. Para el plásmido de ADN, los ejemplos incluyen plásmidos de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, o levadura. Para el fago de ADN, los ejemplos incluyen fago  $\lambda$ .

El huésped usado en la transformación no se limita siempre que sea uno que pueda expresar el gen diana. Los ejemplos incluyen bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis*), levaduras, células animales (células COS, células CHO), y células de insecto.

Se conocen métodos para introducir genes en un huésped, y existen numerosos ejemplos de métodos (por ejemplo, un método que usa el ion calcio, método de electroporación, método de esferoplasto, método de acetato de litio, método de fosfato de calcio, método de lipofección). Además, ejemplos de métodos para introducir el gen en animales que se describirán posteriormente incluyen método de microinyección, método de introducir genes en células ES usando el método de electroporación y el método de lipofección, y trasplante nuclear.

En la presente invención, se cultiva el transformante, y se obtiene el anticuerpo anti-FGF23 por recolección del producto de cultivo. Aquí, "producto de cultivo" significa cualquiera de (a) el sobrenadante del cultivo, (b) las células cultivadas o las bacterias cultivadas o su homogenato, (c) secreciones del transformante. Con el fin de cultivar el transformante, se usa un medio adecuado para el huésped, y se usan un método de cultivo estacionario, y un método de cultivo mediante frasco de rodillo.

Después del cultivo, cuando se produce el anticuerpo objetivo en la bacteria o en la célula, se recoge el anticuerpo por homogeneización de la bacteria o la célula. Además, cuando se produce el anticuerpo objetivo fuera de la bacteria o fuera de la célula, se puede usar la solución de cultivo directamente o, alternativamente, se retiran las bacterias son las células mediante centrifugación. A continuación, el anticuerpo objetivo se puede aislar y purificar del producto de cultivo mediante métodos bioquímicos generales usando, individualmente o en combinación, diversas cromatografías usadas para el aislamiento y la purificación de proteínas.

Además, usando técnicas de creación de animales transgénicos, se crean animales huésped en los que se incorpora el gen del anticuerpo objetivo en genes endógenos, por ejemplo, ganado transgénico, cabra transgénica, oveja transgénica, o cerdo transgénico. Se puede obtener una gran cantidad de anticuerpo monoclonal derivado del gen del anticuerpo a partir de la leche secretada por estos animales transgénicos (Wright, G., *et al.*, Bio/Technology 9: 830-834, 1991). Cuando se cultiva el hibridoma *in vitro*, el hibridoma se hace crecer, se mantiene y se almacena de acuerdo con las diversas condiciones de las propiedades de las células cultivadas de los métodos de cultivo e investigación experimentales. Se pueden usar medios de nutrición conocidos o diversos medios de nutrición derivados y preparados a partir de medios básicos conocidos para producir el anticuerpo monoclonal en el sobrenadante de cultivo.

#### (8) Ensayo del anticuerpo monoclonal

La determinación del isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal obtenido de este modo se puede llevar a cabo de la siguiente manera. En primer lugar, los ejemplos del método de identificación incluyen el método de Ouchterlony, el método ELISA, o el método RIA. El método de Ouchterlony es sencillo, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, es necesario un procedimiento de concentración. Por otra parte, cuando se usa el método ELISA o el método RIA, el sobrenadante de cultivo se hace reaccionar directamente con el antígeno absorbido en una fase sólida, y como anticuerpo secundario, se pueden usar anticuerpos que responden a diversos isotipos y subclases de inmunoglobulinas para identificar el isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal.

Además, la cuantificación de la proteína se puede llevar a cabo mediante el método de Folin/Lowry y mediante un método que calcula la absorción de la luz a 280 nm [ $1,4 \text{ (DO280)} = \text{inmunoglobulina } 1 \text{ mg/ml}$ ].

La identificación de los epítomos de reconocimiento del anticuerpo monoclonal (mapeado de epítomos) se lleva a cabo como sigue a continuación. En primer lugar, se crean las estructuras parciales de diversas moléculas que reconocen los anticuerpos monoclonales. Para la creación de estructuras parciales, existe un método en el que se

usan técnicas de síntesis de oligopéptidos conocidas para crear diversos péptidos parciales de la molécula, y un método en el que, usando técnicas de recombinación genética, se incorpora la secuencia de ADN que codifica el péptido parcial objetivo a un plásmido de expresión adecuado, y los péptidos se producen en el interior o en el exterior de un huésped tal como *E. coli*. Sin embargo, en general, ambos métodos se combinan para el objetivo anterior. Por ejemplo, se crea una serie de polipéptidos en los que la proteína antígeno se ha acortado secuencialmente en longitudes aleatorias a partir del extremo carboxi terminal o amino terminal usando técnicas de recombinación genética conocidas por los expertos en la materia. A continuación, se estudia la reactividad del anticuerpo monoclonal frente a estos péptidos, y se determinan aproximadamente los sitios de reconocimiento.

A continuación, con detalle adicional, se sintetiza el oligopéptido de la parte correspondiente, o variantes de estos péptidos mediante técnicas de síntesis de oligopéptidos conocidas por los expertos en la materia. Con el fin de definir los epítomos, se estudia la unión de los anticuerpos monoclonales contenidos como ingrediente activo en el agente para la prevención o el tratamiento de la presente invención en estos péptidos, y alternativamente se estudia la actividad de inhibición competitiva de los péptidos en la unión de los anticuerpos monoclonales frente al antígeno. Como método sencillo para la obtención de diversos oligopéptidos, se pueden usar kits comerciales (por ejemplo, kit SPOTs (Genesis Biotechnologies), una serie de kits de síntesis de péptidos multiconectores que usan el método de síntesis de multiconector (Chiron Co.)).

#### (9) Producción del fragmento de anticuerpo

El fragmento de anticuerpo se produce mediante métodos de ingeniería genética o métodos de proteoquímica basados en el anticuerpo descrito en (7) anteriormente.

Con respecto al método de ingeniería genética, se construye el gen que codifica el fragmento de anticuerpo objetivo y se expresa usando un huésped adecuado tal como una célula animal, célula de planta, célula de insecto, y *E. coli*, y se purifica el fragmento de anticuerpo.

Con respecto al método de proteoquímica, se usan proteasas tales como pepsina y papaína para la escisión en un sitio específico, y se lleva a cabo la purificación.

Con respecto al fragmento de anticuerpo, los ejemplos incluyen péptidos que comprenden Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv, dianticuerpo, dsFv, y CDR. El método de producción para cada fragmento de anticuerpo se describe con detalle a continuación.

#### (i) Producción de Fab

Proteoquímicamente, Fab se puede crear tratando una IgG con la proteasa papaína. Después del tratamiento con papaína, si el anticuerpo original es una subclase IgG que tiene capacidad de unión a proteína A, mediante el paso a través de una columna de proteína A, se separan las moléculas de IgG y los fragmentos Fc, y se puede recuperar un Fab uniforme (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición, 1995). Si el anticuerpo es una subclase IgG que no tiene capacidad de unión a proteína A, mediante cromatografía de intercambio iónico, se recupera Fab de la fracción que eluye a bajas concentraciones salinas (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición, 1995). Además, para la ingeniería genética de Fab, se usa *E. coli* en la mayoría de los casos, o se usan células de insecto y células animales para producir Fab. Por ejemplo, se clona el ADN que codifica la región V del anticuerpo descrito en 2 (7) anteriormente en un vector de expresión de Fab para construir un vector de expresión de Fab. Para el vector de expresión de Fab, se puede usar cualquier cosa siempre que el ADN para Fab se pueda incorporar y expresar. Un ejemplo es pIT106 (Science, 240: 1041-1043, 1988). El vector de expresión de Fab se introduce en una *E. coli* adecuada, y se puede generar el Fab y almacenarse en un cuerpo de inclusión o capa de periplasma. A partir del cuerpo de inclusión, se puede activar el Fab mediante un método de replegado usado normalmente con proteínas. Además, cuando la expresión es en la capa de periplasma, se descarga el Fab activo en el sobrenadante de cultivo. Después del replegado o del sobrenadante de cultivo, usando una columna con antígeno unido, se puede purificar un Fab uniforme (Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company, 1992).

#### (ii) Producción de F(ab')<sub>2</sub>

Proteoquímicamente, F(ab')<sub>2</sub> se produce por tratamiento de IgG con la proteasa pepsina. Después del tratamiento con pepsina, se recupera una F(ab')<sub>2</sub> uniforme a través de la misma operación de purificación que con Fab (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición, 1995). Además, se puede crear mediante un método en el que se trata el Fab' descrito en el siguiente apartado (iii) con una maleimida tal como o-PDM o bis maleimida hexano, y se forman enlaces tioéter o se puede crear mediante un método en el que se trata con DTNB [5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)], y se forman enlaces S-S (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996).



(iii) Producción de Fab'

Fab' se puede obtener por tratamiento del F(ab')<sub>2</sub> descrito en el apartado (ii) anterior con un agente reductor tal como ditiotreitól. Además, con ingeniería genética, se puede crear Fab' usando *E. coli* en la mayoría de los casos o células de insecto o células animales. Por ejemplo, se clona el ADN que codifica la región V del anticuerpo descrito anteriormente en el apartado 2 (7) en un vector de expresión de Fab' y se puede construir un vector de expresión de Fab'. Para el vector de expresión de Fab', se puede usar cualquier cosa siempre que se pueda incorporar y expresar el ADN para Fab'. Un ejemplo es pAK19 (BIO/TECHNOLOGY, 10: 163-167, 1992). El vector de expresión de Fab' se introduce en una *E. coli* adecuada. Fab' se puede generar y acumular en un cuerpo de inclusión o en la capa de periplasma. A partir del cuerpo de inclusión, Fab' se activa mediante el método de replegado usado normalmente en proteínas. Además, cuando se expresa en la capa de periplasma, las bacterias se homogeneizan por tratamiento con digestión parcial mediante lisozima, choque osmótico, y sonicación y este se puede recuperar del exterior de las bacterias. Después del replegado o del homogeneato bacteriano, se puede purificar un Fab' uniforme usando una columna de proteína G (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996).

(iv) Producción de scFv

Mediante ingeniería genética, se puede producir scFv usando un fago o *E. coli* o células de insecto o células animales. Por ejemplo, se puede clonar el ADN que codifica la región V del anticuerpo descrito anteriormente en el apartado 2 (7) en un vector de expresión de scFv para construir un vector de expresión de scFv. Para el vector de expresión de scFv, se puede usar cualquier cosa siempre que se pueda incorporar y expresar ADN para scFv. Los ejemplos incluyen pCANTAB5E (GE Healthcare Bioscience Co.), y pHFA (Human Antibodies & Hybridomas, 5: 48-56, 1994). El vector de expresión de scFv se introduce en una *E. coli* adecuada. Por infección con un fago adyuvante, se puede obtener un fago en el que se expresa scFv en la superficie del fago ya que se fusiona con una proteína de superficie del fago. Además, se puede generar y acumular scFv en el cuerpo de inclusión o en la capa de periplasma de la *E. coli* en la que se ha introducido el vector de expresión de scFv. A partir del cuerpo de inclusión, se puede obtener scFv activado mediante el método de replegado usado normalmente para proteínas. Además, cuando se expresa en la capa de periplasma, las bacterias se homogeneizan por tratamiento con digestión parcial mediante lisozima, choque osmótico, y sonicación y este se puede recuperar del exterior de las bacterias. Después del replegado o del homogeneato bacteriano, se puede purificar un scFv uniforme usando cromatografía de intercambio iónico positivo (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996).

(v) Producción de dianticuerpo

Mediante ingeniería genética, se puede producir dianticuerpo usando principalmente *E. coli* así como células de insecto y células animales. Por ejemplo, se produce ADN en el que las VH y VL del anticuerpo descrito anteriormente en el apartado 2 (7) se unen de modo que los restos de aminoácido codificados mediante el conector son 8 residuos o menos y se clona en un vector de expresión de dianticuerpo siempre que se pueda integrar con ADN de dianticuerpo y expresar ADN de dianticuerpo. Los ejemplos incluyen pCANTAB5E (GE Healthcare Bioscience), y pHFA (Human Antibodies Hybridomas, 5, 48, 1994). Se puede generar y acumular dianticuerpo en el cuerpo de inclusión o en la capa de periplasma de la *E. coli* en la que se ha introducido el vector de expresión del dianticuerpo. A partir del cuerpo de inclusión, se puede obtener dianticuerpo activado mediante el método de replegado usado normalmente para proteínas. Además, cuando se expresa en la capa de periplasma, las bacterias se homogeneizan por tratamiento con digestión parcial mediante lisozima, choque osmótico, sonicación, y similares, y este se recupera del exterior de las bacterias. Después del replegado o del homogeneato bacteriano, se puede purificar un dianticuerpo uniforme usando cromatografía de intercambio iónico positivo (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996).

(vi) Producción de dsFv

Se puede crear dsFv usando principalmente *E. coli* así como células de insecto y células animales mediante ingeniería genética. En primer lugar, se introducen mutaciones en lugares apropiados del ADN que codifica las VH y VL del anticuerpo descrito en (ii), (iv) y (v), y se produce ADN en el que los restos de aminoácido codificados están reemplazados con cisteína. Cada ADN producido se puede clonar en un vector de expresión de dsFv para construir vectores de expresión para VH y VL. Se puede usar cualquier vector como el vector de expresión de dsFv siempre que se pueda integrar con y expresar ADN de dsFv. Por ejemplo, se puede usar pUL19 (Protein Engineering, 7: 697-704, 1944). El vector de expresión para VH y VL se puede introducir en una *E. coli* apropiada y se pueden acumular los productos generados en un cuerpo de inclusión o la capa de periplasma. VH y VL se obtienen a partir del cuerpo de inclusión y la capa de periplasma, y se mezclan y se convierten en dsFv con actividad mediante el método de replegado que se emplea en el procesamiento normal de proteínas. Después del replegado, se puede llevar a cabo una purificación adicional mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel (Protein Engineering, 7: 697-704, 1994).

## (vii) Producción de péptidos CDR

Se pueden producir péptidos que contienen CDR mediante un método de síntesis química tal como el método Fmoc o el método tBoc. Además se puede producir un vector de expresión de péptido CDR por introducción del ADN que codifica un péptido que contiene CDR y por clonación del ADN producido en un vector de expresión apropiado. Se puede usar cualquier vector como vector de expresión siempre que se pueda integrar con y expresar el ADN que codifica el péptido CDR. Por ejemplo, se pueden usar pLEX (Invitrogen) y pAX4a+ (Invitrogen). El vector de expresión se puede introducir en una *E. coli* apropiada y se pueden acumular los productos generados en el cuerpo de inclusión o la capa de periplasma. El péptido CDR se obtiene a partir del cuerpo de inclusión o la capa de periplasma y se puede purificar mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel (Protein Engineering, 7: 697-704, 1994).

## 3. Características del anticuerpo de la presente invención y el fragmento funcional del mismo

El anticuerpo de la presente invención y el fragmento funcional del mismo poseen cualquiera de las siguientes características.

(a) Ensayo de unión a FGF23; se une a la proteína de longitud completa que tiene los restos de aminoácido desde el 25° hasta el 251° de SEC ID N° 4 de la proteína FGF.

(b) Ensayo *in vitro*; inhibe la acción de FGF23 en un ensayo, mediante el cual se detecta la acción de FGF23. Un ejemplo del método para detectar la acción de FGF23 *in vitro* es la activación del promotor del gen 1 de respuesta de crecimiento temprano mediante la estimulación de FGF23 humano (Nature, 444; 770-774, 2006).

(c) Ensayo *in vivo*; inhibe la actividad del FGF23 endógeno y aumenta la concentración de fósforo en suero y la concentración de 1,25D en suero cuando se administra a seres humanos. El grado del aumento de la concentración de fósforo en suero y de la concentración de 1,25D en suero es mayor en comparación con un anticuerpo convencional, el anticuerpo 2C3B (el anticuerpo monoclonal de ratón frente a proteína FGF23 que se desvela en el documento de Patente WO03/057733, anticuerpo anti-FGF23 producido mediante hibridoma de N° de Referencia FERM BP-7838) y también es mayor la duración del nivel aumentado de concentración de fósforo en suero y de concentración de 1,25D en suero. Por ejemplo, la duración de la concentración elevada de fósforo en suero es aproximadamente 3 veces o mayor, preferentemente aproximadamente 5 veces la del anticuerpo 2C3B, y la duración de la concentración elevada de 1,25D en suero es aproximadamente 1,5 veces o mayor, preferentemente 2,5 veces la del anticuerpo 2C3B cuando se administra a mono cinomolgo.

La presente invención también incluye un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos del anticuerpo frente a FGF23 de la presente invención. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN. El ácido nucleico de la presente divulgación es, preferentemente, un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos del anticuerpo producido mediante hibridoma C10. Un ejemplo es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (secuencia de nucleótidos de cadena pesada del anticuerpo C10), que está codificada por la secuencia de nucleótidos desde la posición 58 C hasta la posición 408 A mostrada en SEC ID N° 11. Además, otro ejemplo es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera, que está codificada por la secuencia de nucleótidos desde G en la posición 67 hasta A en la posición 384 mostrada en SEC ID N° 13.

## II. Composiciones farmacéuticas

Se incluye en alcance de la presente invención una formulación que es una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-FGF23 humano de la presente invención o el fragmento funcional del mismo. Tal formulación incluye, preferentemente, además del anticuerpo y el fragmento funcional del mismo, diluyentes o vehículos fisiológicamente aceptables y puede ser una mezcla con otros fármacos tales como otros anticuerpos o antibióticos. Los vehículos apropiados incluyen solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato, solución salina de glucosa tamponada con fosfato, y solución salina fisiológica tamponada, pero no se limitan a estos. Además, se puede liofilizar el anticuerpo y se puede reconstituir por adición de una de las soluciones tampón anteriores cuando se necesite, y usarse a continuación. Las vías de administración incluyen administración oral, o administración parenteral tal como administración intraoral, traqueobronquial, endorrectal, subcutánea, intramuscular e intravenosa, y la vía de administración preferente es administración intravenosa. La administración se puede realizar en diversas formulaciones y las formaciones incluyen aerosol, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabe, emulsión, supositorios, inyecciones, pomadas y cintas.

Se pueden producir preparaciones líquidas tales como emulsiones y jarabe usando aditivos, por ejemplo: agua, sacáridos tales como sacarosa, sorbitol y fructosa; glicoles tales como polietilenglicol, propilenglicol; aceites tales como aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de semilla de soja; conservantes tales como ésteres de p-hidroxibenzoato; aromas tales como aroma de fresa y menta.

Se pueden producir cápsulas, comprimidos, polvo o gránulos usando aditivos, por ejemplo: excipientes tales como lactosa, glucosa, sacarosa y manitol; disgregantes tales como almidón y alginato sódico; lubricantes tales como estearato de magnesio y talco; aglutinantes tales como alcohol polivinílico, hidroxipropil celulosa y gelatina; agentes tensioactivos tales como ésteres de ácidos grasos; plastificantes tales como glicerina.

5 En las inyecciones, se pueden usar aditivos que incluyen; agua; sacáridos tales como sacarosa, sorbitol, xilosa, trehalosa, fructosa; alcoholes azúcares tales como manitol, xilitol y sorbitol; tampones tales como tampón fosfato, tampón citrato y tampón glutamato; agentes tensioactivos tales como ésteres de ácidos grasos.

10 Una formulación apropiada para administración parenteral incluye inyecciones, supositorios, aerosoles. En el caso de inyecciones, se proporcionan normalmente en forma de ampolla de dosificación unitaria o recipientes de dosificación múltiple. Puede ser un polvo que se redisuelve, cuando se va a usar, en un vehículo apropiado, por ejemplo agua estéril exenta de pirógenos. Estas formulaciones contienen aditivos tales como emulgentes, o agentes de suspensión, que se usan generalmente para la formulación en estas composiciones. Métodos para inyección incluyen, por ejemplo, infusión intravenosa, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intradérmica. Además, la dosificación es diferente de acuerdo con la edad del sujeto administrado, la vía de administración, la frecuencia de administración, y se puede cambiar ampliamente.

20 Un supositorio se prepara usando un vehículo tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada o ácido carboxílico. El aerosol se puede preparar usando el propio anticuerpo de la presente invención o el fragmento funcional del mismo, o usando un vehículo que no irrite la mucosa oral y del tracto respiratorio de un receptor (paciente) y pueda dispersar el anticuerpo mencionado anteriormente y el fragmento funcional del mismo en forma de partículas finas para facilitar la absorción.

25 En particular, ejemplos de un vehículo incluyen lactosa, glicerina. Dependiendo de las características del anticuerpo mencionado anteriormente o el fragmento funcional del mismo y las características del vehículo que se va a usar, se puede seleccionar una formulación tal como aerosol, polvo seco. Además, se pueden añadir los componentes mostrados como ejemplos de aditivos para formulación oral a estas formulaciones parenterales.

30 La dosificación puede variar de acuerdo con los síntomas, edad, peso corporal pero normalmente en la administración oral, se administra aproximadamente 0,01 mg-1000 mg por día para un adulto. Esto se puede administrar una vez o dividir en varios lotes. En la administración parenteral, se puede administrar aproximadamente 0,01 mg-1000 mg mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por administración.

35 La presente divulgación incluye el anticuerpo de la presente invención, o el fragmento funcional del mismo, o un método preventivo o terapéutico para las enfermedades descritas posteriormente usando una composición farmacéutica que contiene el mismo, y además, la presente divulgación incluye el uso del anticuerpo de la presente invención o el fragmento funcional del mismo para la fabricación de un agente para acción preventiva o terapéutica de las enfermedades descritas posteriormente.

40 Enfermedades que se pueden prevenir o tratar mediante el anticuerpo de la presente divulgación o el fragmento funcional del mismo incluyen enfermedades que tienen una actividad excesiva de FGF23 tales como osteomalacia inducida por tumor, ADHR, XLH, displasia fibrosa, síndrome de McCune-Albright, y una enfermedad que acompaña un metabolismo mineral anormal tal como hipofosfatemia recesiva autosómica. Además, se pueden esperar efectos de mejora para los síndromes asociados con estas enfermedades tales como, hipofosfatemia, insuficiencia de mineralización ósea, dolor óseo, debilidad muscular, deformidad esquelética, trastorno de crecimiento, baja concentración de 1,25D en sangre. Dado que el FGF23 desempeña un importante papel en las condiciones fisiológicas, se puede regular la actividad de control de metabolismo del calcio de FGF23, que está mediada mediante el control del metabolismo del fósforo y el metabolismo de la vitamina D, mediante el anticuerpo de la presente divulgación y el fragmento funcional del mismo y, de ese modo, se puede usar de forma preventiva y terapéutica para enfermedades causadas por anomalías en el metabolismo mineral y el metabolismo de la vitamina D, tales como osteoporosis, raquitismo (incluyendo raquitismo hipofosfatémico y raquitismo resistente a la vitamina D), hipercalcemia, hipocalcemia, calcificación ectópica, osteoesclerosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo, prurito. Además, el anticuerpo de la presente divulgación y el fragmento funcional del mismo también se puede usar de forma preventiva o terapéutica para enfermedades causadas por la complicación de una insuficiencia renal y la diálisis para la insuficiencia renal, representadas por osteodistrofia renal, osteopatía por diálisis, disfunción tubular renal. Por otra parte, se ha informado que 1,25D tiene actividad no sólo en el metabolismo mineral tal como el metabolismo del calcio como se ha descrito anteriormente sino también efecto inhibitorio del crecimiento celular, actividad de promoción de diferenciación celular. De ese modo, el anticuerpo de la presente divulgación y el fragmento funcional del mismo se puede usar de forma terapéutica y preventiva frente a enfermedades causadas por las células cuyo crecimiento y diferenciación está regulado por 1,25D.

65 Además, se conoce que, en osteomalacia inducida por tumor, la sobreproducción de FGF23 por el tumor causa una patología. Por lo tanto, puede ser concebible que se pueda inducir la retracción del tumor mediante el uso del anticuerpo de la presente invención unido a una sustancia radioactiva tal como un isótopo radiactivo, o a un reactivo terapéutico de diversas toxinas tales como fármacos de bajo peso molecular, y mediante la acumulación del

presente anticuerpo en el tumor que sobreproduce FGF23.

### III. Ejemplo de Formulación

- 5 La formulación que contiene el anticuerpo de la presente invención o el fragmento funcional del mismo, se proporciona como una ampolla de solución estéril disuelta en agua o solución o suspensión farmacológicamente aceptable. Además, una formulación de polvo estéril (es preferente liofilizar la molécula de la presente invención) se puede colocar en una ampolla y se puede diluir en uso con una solución farmacológicamente aceptable.

### 10 Ejemplos

A continuación sigue la descripción detallada de la presente invención mediante los Ejemplos, pero esto no significa que la presente invención se limite solamente a estas descripciones de Ejemplos.

#### 15 Ejemplo 1

Preparación de un vector de expresión para FGF23 humano recombinante

(1) Construcción de un vector de expresión para proteína FGF23H humana

- 20 Se amplificó el ADNc que codifica FGF23 humana usando como molde la biblioteca de ADNc humano del tumor responsable de la osteomalacia inducida por tumor, un cebador FIEcoRI (SEC ID N°: 1) y un cebador LHisNot (SEC ID N°: 2) y LA-Taq ADN polimerasa y llevando a cabo 35 ciclos de una etapa de PCR que consistía en calentamiento 96 °C durante 1 min, a continuación a 96 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos. El cebador FIEcoRI se hibridó con una secuencia presente en la cadena arriba adicional del lado 5' de la secuencia de nucleótidos que codifican FGF23 humana y añade un sitio de restricción EcoRI en el lado 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica FGF23 humana en el fragmento amplificado. El cebador LHisNot comprende una secuencia que se hibrida con la secuencia en el lado 5' del codón de parada de la secuencia de nucleótidos que codifica FGF23 humana, una secuencia que codifica el codón terminal que sigue a la secuencia que codifica la secuencia His6-tag (His-His-His-His-His-His) y un sitio de restricción NotI. Como resultado, el fragmento amplificado codifica proteína FGF 23 humana en que se añade la secuencia His6-tag al carboxi terminal y tiene un sitio de restricción NotI en la cadena abajo del mismo. Este fragmento amplificado se digirió con EcoRI y Not I, y se ligó a un vector de expresión celular animal, pcDNA3.1Zeo (Invitrogen) que se difirió de forma similar con EcoRI y NotI. El vector de expresión construido de tal modo se clonó y se determinó que la secuencia de nucleótidos confirmaba que el vector de expresión codifica la diana, proteína FGF23 humana a la que se añadió la secuencia His6-tag. Este vector se denomina pcDNA/hFGF23H.

FIEcoRI: **CCGGAATTCAGCCACTCAGAGCAGGGCAGC** (SEC ID N°: 1)

40 LHisNot:

**ATAAGAATGCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGATGGATGAACTTGGCGAA**

(SEC ID N°: 2)

45

(2) Construcción de un vector de expresión para proteína FGF23 humana

- 50 Se amplificó un fragmento usando pcDNA/hFGF23H como un molde, el cebador F1EcoRI y un cebador LNot (SEC ID N°: 3) y LA-Taq ADN polimerasa y llevando a cabo 25 ciclos de una etapa de PCR que consistía en calentamiento a 94 °C durante 1 min, a continuación a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 1 min. Después de terminar la reacción, el fragmento que codifica FGF23 humana se digirió con EcoRI y NotI, y a continuación se purificó. Esto se clonó por inserción en los sitios de restricción EcoRI y NotI del vector pEAK8/IRES/EGFP, un vector de expresión celular animal, pEAKS (Edge Biosystem), al que se ligaron la secuencia de entrada al ribosoma intramoleculares (IRES) y proteína fluorescente verde potenciada (EGFP). Se determinó que la secuencia de nucleótidos del plásmido obtenido de este modo confirmaba que codifica la proteína FGF23 humana. Este vector se denominó pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23.

LNot: **ATAAGAATGCGGCCGCTCAGATGAACTTGGCGAA** (SEC ID N°: 3)

60 (Ejemplo 2)

Expresión de proteína FGF23 humana recombinante y FGF23H humana mutante recombinante

(1) Se linealizó pcDNA/hFGF23H por escisión del sitio de restricción FspI en el gen resistente de ampicilina en el

vector y se purificó, y a continuación se mezcló con células CHO Ras clon-1 (Shirahata, S., *et al.*, Biosci Biotech Biochem, 59: 345-347, 1995) y se transfectaron a las células por electroporación usando Gene Pulser II (Bio Rad). Después de cultivar estas células en medio MEM  $\alpha$  (Gibco BRL) que contenía FCS al 10 % durante 24 h, se añadió Zecocin (Invitrogen) hasta una concentración final de 0,5 mg/ml y a continuación las células se cultivaron durante una semana. Las células unidas y cultivadas se liberaron por tripsinización y se clonaron mediante el método de dilución limitada en presencia de Zecocin a la concentración final de 0,3 mg/ml para obtener una multiplicidad de células clonadas. La célula que expresa FGF23H humana de forma más eficaz se identificó con el método de transferencia de Western. Los sobrenadantes del cultivo de cada célula clonada se recogieron y se sometieron al electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, y a continuación se transfectaron proteínas a una membrana de PVDF (Millipore). Una señal derivada de la proteína FGF-23H se detectó a aproximadamente 32 kDa usando anticuerpo anti-His-tag (carboxi terminal) (Invitrogen) y sistema foto-luminiscente ECL (GE Healthcare Bioscience). Como resultado, se encontró la expresión más elevada en un clon llamado N° 20, que se denominó CHO-OST311H y se depositó en el Depositario del Organismo Internacional de Patentes (IPOD) Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (AIST) Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón el 11 de agosto de 2000 (N° de Registro: FERM BP-7273). En la presente descripción, CHO-OST311H se denomina CHO-hFGF23H.

#### (2) Obtención de células que expresan FGF23 humana

La transfección del vector pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23 a células CHO Ras clon-1 se llevó a cabo mediante el método de transfección genética usando un lípido de fusión de membrana. Las células CHO Ras clon-1 se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta que aproximadamente un 60 % del fondo del pocillo quedo cubierto con las células, y a continuación se retiró el medio de cultivo y se añadió 1 ml de medio MEM $\alpha$  sin suero. Cada uno de los 2,5  $\mu$ g del vector a introducir y 10  $\mu$ l de Transfectam (Marca Comercial Registrada) (Promega) se mezcló con 50  $\mu$ l de medio MEM $\alpha$  sin suero, y a continuación se mezclaron ambas soluciones y se dejaron en reposo durante 10 minutos. Las mezclas se añadieron a los pocillos de placas de 6 pocillos preparadas con anterioridad. Después de incubación durante 2 horas, el medio de cultivo que contenía ADN se retiró, se sustituyó con un medio que contenía FCS al 10 %, y el cultivo se incubó durante una noche. Al día siguiente, se añadió Puromicina (Sigma) hasta una concentración final de 5  $\mu$ g/ml para seleccionar las células resistentes al fármaco. Las células resistentes al fármaco obtenidas de este modo se clonaron mediante el método de dilución limitada. Además, la línea celular que expresa la proteína diana de la forma más eficaz se obtuvo mediante el método de transferencia de Western. Esta línea celular se denominó CHO-hFGF23.

#### (3) Expresión y detección de proteína FGF23 humana recombinante en células animales

La transferencia de Western de la proteína recombinante en el sobrenadante del cultivo de CHO-hFGF23H usando los anticuerpos frente a la secuencia anti-His6 tag carboxi terminal detectó bandas de aproximadamente 32 kDa y aproximadamente 10 kDa. Estas 2 bandas se extrajeron del gel, y se determinaron las secuencias de aminoácidos de los extremos amino. En la banda de peso molecular más elevado (aproximadamente 32 kDa), se detectó la secuencia del aminoácido 25 de la SEC ID N°: 4 y parecía que era proteína FGF23 humana a partir de la que se retiró la secuencia de la señal durante el proceso de excreción. Por otro lado, en la banda que tenía un peso molecular menor, se confirmó la secuencia del aminoácido 180 de la SEC ID N°: 4 y resultó que este fragmento era el fragmento carboxi terminal producido por la escisión entre los aminoácidos 179 y 180. Además, la presencia de un polipéptido que tenía la secuencia del aminoácido 179 en el extremo amino (fragmento amino terminal) se reconoció detectándola usando anticuerpo policlonal que reconoce el lado amino terminal de la proteína FGF23 humana (Folleto de la Publicación Internacional N° WO02/14504).

Del mismo modo, en el sobrenadante del cultivo de CHO-hFGF23 que no tiene la secuencia His6-tag, se confirmó la escisión entre el resto de los aminoácidos 179 y 180 (Folleto de la Publicación Internacional N° WO02/14504). Por lo tanto, se llevaron a cabo las operaciones siguiente para separar y purificar la proteína FGF23 humana de longitud completa, que no parecía que se cortara, que tenía la secuencia del aminoácido 25 al aminoácido 251 de la SEC ID N°: 4 (en ocasiones denominada FGF23 de longitud completa) de los fragmentos amino terminal o carboxi terminal.

#### (4) Purificación de la proteína FGF23 humana de longitud completa recombinante

El sobrenadante del cultivo de CHO-hFGF23 se filtró a través de SuperCap (Marca Comercial Registrada) (Laboratorio Pall Gelman) que es un filtro de membrana que tiene 0,2  $\mu$ m de tamaño de poro, y el filtrado se pasó a través de SP-Sepharose FF (GE Healthcare Bioscience). Las sustancias que tienen una afinidad débil a la columna se lavaron y se eluyeron con tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 6,7. Esta fracción contenía el fragmento carboxi terminal generado por la escisión entre los aminoácidos 179 y 180. La proteína mantenida en la columna se eluyó con gradiente de concentración de NaCl de 0 a 0,7 M, y la proteína FGF23 humana de longitud completa se observó en la fracción eluida con NaCl aproximadamente 0,3 M. A continuación, la proteína FGF23 humana de longitud completa se absorbió en Talon Superflow (Marca Comercial Registrada) (Clonetech), que es una columna de afinidad metálica, se lavó con tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 6,7 y a continuación se eluyó por adición de imidazol a diferentes concentraciones. La fracción que contenía la proteína diana se absorbió en una columna de SP sepharose FF y se eluyó para purificación adicional.

Secuencia de aminoácidos de FGF23 Humana (SEC ID N°: 4)

**MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI**  
**HLYTATARN S YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY**  
**SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL**  
**ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR**  
**AKRAPLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS AEDDSERDPL**  
**NVLKPRARMT PAPASCSQEL**  
**PSAEDNSPMA SDPLGVVRRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF I**

5 (Ejemplo 3)

Producción de ratones que producen anticuerpo humano (ratones KM)

Los ratones que producen anticuerpo humano completo para la preparación de anticuerpo monoclonal humano tienen el fondo genético homocigoto tanto para cadena pesada de Ig como para cadena ligera kappa endógenas destruido y también tienen el fragmento del cromosoma 14 (SC20) que contiene los sitios del gen de la cadena pesada de Ig humana y el transgén de cadena kappa de Ig humana (KCo5) al mismo tiempo. Estos ratones se produjeron por reproducción cruzada de ratón de la cepa A que tiene los sitios del gen de cadena pesada de Ig humana y el ratón de la cepa B que tiene el transgén de la cadena kappa de Ig humana. La cepa A es homocigota tanto para la cadena pesada de Ig como para la cadena ligera kappa endógenas destruidas, y es una línea de ratón que tiene el fragmento del cromosoma 14 (SC20) que se puede transmitir a sus descendencias. Esta línea de ratón se describe, por ejemplo, en el informe de Tomizuka *et al.*, (Tomizuka, *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA., 97: 722-727, 2000). Además, la cepa B homocigota tanto para la cadena pesada de Ig como para la cadena ligera kappa endógenas destruidas y es una línea de ratón transgénica que tiene el transgén de la cadena kappa de Ig humana (KCo5). Esta línea de ratón se describe, por ejemplo, en el informe de Fishwild *et al.*, (Nat. Biotechnol., 14; 845-851, 1996).

En los siguientes experimentos, se usan ratones individuales, que se obtienen cruzando un ratón macho de la cepa A y un ratón hembra de la cepa B, o un ratón macho de la cepa B y un ratón hembra de la cepa A, y en los que la cadena pesada de human Ig humana y la cadena ligera kappa se detectan al mismo tiempo en el suero [Ishida y Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000]. Además, los ratones que producen anticuerpo humano se pueden obtener en Kirin Beer Company por contratación.

30 (Ejemplo 4)

Preparación de anticuerpo monoclonal humano frente a FGF23 humano

(1) Obtención de un hibridoma que produce anticuerpo monoclonal humano frente a FGF23 humano

Los anticuerpos monoclonales usados en los presentes Ejemplos se preparan de acuerdo con el método general que se describe, como tal, en "Introduction to monoclonal antibody experimental manipulation" de Tamio Ando *et al.*, Publicado por Kodansha, 1991. La proteína FGF23 humana de longitud preparada en el Ejemplo 2 se usó como un inmunógeno, y se inmunizaron los ratones que producen anticuerpos humanos producidos en el Ejemplo 3 que producen inmunoglobulina humana.

En primer lugar, para preparar anticuerpo monoclonal humano frente a FGF23, la proteína FGF23 humana de longitud completa purificada preparada en el Ejemplo 2 se mezcló con adyuvante RIBI (Corixa) y se inoculó por vía intraperitoneal a ratones que producen anticuerpo humano a una dosis de 20 µg/ratón como la primera inmunización. De forma similar a la primera inmunización, la mezcla de FGF23 purificado y adyuvante RIBI se inóculo durante un total de 3 veces en intervalos de 2 semanas. Se usaron cinco ratones para la inmunización, se tomaron muestras de sangre después de la tercera inmunización, y la presencia de anticuerpo IgG humano frente a FGF23 se confirmó en los sueros mediante el método de ensayo de inmunoabsorción con marcado enzimático (ELISA) tal como se describe a continuación. Se seleccionó el ratón que mostraba el valor en suero más elevado mediante el ELISA usando FGF23 fijado en la fase sólida con anticuerpo monoclonal de ratón para proteína anti-FGF23, 3CIE, que se desveló en el Folleto de la Publicación Internacional N° WO03/057733 (anticuerpo anti FGF23 producido por el hibridoma depositado como FERM BP-7839) y se inmunizó con administración de 20 µg de proteína

FGF23 humana de longitud completa/ratón a través de la vena de la cola 3 días antes de extirpar el bazo tal como se describe a continuación.

5 El bazo del ratón inmunizado se extirpó de forma quirúrgica, se sumergió en 10 ml del DMEM que contenía 350 mg/ml de bicarbonato sódico, 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y sin suero (Invitrogen, denominado en lo sucesivo en el presente documento DMEM sin suero) y se aplastó en una malla (Tamiz celular: Falcon)) usando una espátula. La suspensión celular que pasó a través de la malla se centrifugó para precipitar las células, y a continuación las células se lavaron dos veces con DMEM sin suero y se suspendieron en DMEM sin suero para medir el número de células. Mientras tanto, se cultivaron células de mieloma, SP2/0 (N° CRL-1581 de la ATCC) en DMEM (Invitrogen) que contenía FCS al 10 % (Sigma) (denominado en lo sucesivo en el presente documento DMEM sin suero) a 37 °C con gas dióxido de carbono al 5 % de modo que la densidad celular no supera 1 x 10<sup>6</sup> células/ml. Estas células de mieloma se lavaron del mismo modo con DMEM sin suero, se suspendieron en el mismo medio y se hizo el recuento. Se mezcló suspensión de células de bazo recuperadas y suspensión de células de mieloma de ratón a una relación de índice celular de 5:1, se centrifugó y el sobrenadante se retiró completamente. A este sedimento celular, se añadió lentamente 1 ml de polietilenglicol 1500 al 50 % (p/v) (Boehringer-Mannheim) como un agente de fusión a la vez que se agitaba el sedimento con una punta de una pipeta, y a continuación se añadió lentamente 1 ml de DMEM sin suero que se calentó previamente a 37 °C en 2 porciones y se añadieron adicionalmente 7 ml de DMEM sin suero. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró y las células fusionadas obtenidas de este modo se sometieron a la identificación sistemática con el método de dilución limitada tal como se describe a continuación. La selección del hibridoma se llevó a cabo cultivando en DMEM que contenía FCS al 10 % e IL-6 (10 ng/ml) (o factor de clonación de hibridoma al 10 % (denominado en lo sucesivo en el presente documento HCF): Biobase), e hipoxantina (H), aminopterina (A) y timidina (T) (denominada en lo sucesivo en el presente documento HAT: Sigma). Además, se obtuvieron clones individuales con el método de dilución limitada usando DMEM que contenía HT (Sigma), FCS al 10 % y HCF al 10 %. El cultivo se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos (Becton, Dickinson). La selección de los clones de hibridoma que producen anticuerpo monoclonal humano anti-FGF23 (identificación sistemática) y la caracterización del anticuerpo monoclonal humano producido por los respectivos hibridomas se realizaron con el ensayo de inmunoabsorción con marcado enzimático (ELISA) tal como se describe a continuación. Como resultados, se obtuvieron muchos hibridomas que contenían cadena  $\gamma$  y de inmunoglobulina humana (Hlg $\gamma$ ) y cadena  $\kappa$  ligera de inmunoglobulina humana, y producían anticuerpo monoclonal humano con la reactividad específica para FGF23 humano. Entre una serie de hibridomas obtenidos, en particular se obtuvieron 2 clones (C10 y C15) como hibridomas que producen un anticuerpo que reconoce la proteína FGF23. Además, en todos los Ejemplos que se describen a continuación incluyendo este Ejemplo, los clones de hibridoma que producen el anticuerpo monoclonal humano anti-FGF23 de la presente invención se diseñaron usando símbolos. Además adicionalmente, "anticuerpo" colocado antes o después de estos símbolos indica el anticuerpo producido por el hibridoma o anticuerpo recombinante producido por células huésped que llevan el gen del anticuerpo (longitud completa o región variable) aislado del hibridoma. Además, en la medida en que el contexto lo indique claramente, en nombre del clon del hibridoma puede indicar el nombre del anticuerpo. El clon del hibridoma C10 se ha depositado en el Depositario del Organismo Internacional de Patentes (IPOD) Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (AIST) Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón el numerosos de febrero de 2007 (N° de Depósito: FERM ABP-10772) (Etiqueta para ID: C10).

#### (2) Purificación de anticuerpo C10 y C15 a partir del sobrenadante del cultivo del hibridoma

45 El hibridoma C10 y C15 obtenido en el Ejemplo 4 se acondicionó al medio eRDF (Kyokuto Seiyaku) que contenía insulina bovina (5 µg/ml, Invitrogen), transferrina humana (5 µg/ml, Invitrogen), etanoamina (0,01 mM, Sigma), selenito sódico (2,5 x 10<sup>-5</sup> mM, Sigma), Suero Bovino Fetal de IgG Baja al 1 % (Hyclone). El hibridoma se cultivó en un matraz y se recuperó el sobrenadante del cultivo. El sobrenadante del cultivo se purificó por afinidad usando gel de Flujo Rápido de Proteína G (GE Healthcare, Bioscience), PBS(-) como un tampón de absorción y tampón de glicina 0,1 M (pH 2,8) como un tampón de elución. La fracción eluida se ajustó a un pH de aproximadamente 7,2 mediante la adición de Tris 1 M (pH 9,0). La solución de anticuerpo preparada de este modo se sustituyó por PBS usando una columna de desalación Sephadex G25 (columna NAP; GE Healthcare Bioscience) y se esterilizó por filtración con un filtro de membrana MILLEX-GV con un tamaño de poro de 0,22 µm (Millipore) para obtener el anticuerpo C10 y C15 purificado. La concentración del anticuerpo purificado se calculó midiendo la absorción a 280 nm y suponiendo 1 mg/ml como DO de 1,4.

#### (Ejemplo 5)

Obtención del gen de anticuerpo que codifica el anticuerpo C10 y determinación de la secuencia del mismo

#### 60 (1) Síntesis del ADNc del anticuerpo C10

65 Para obtener el fragmento de ADN que contiene las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo humano que se expresan en el hibridoma C10, la clonación con el método RACE en la posición 5' (amplificación rápida en la posición 5' de los extremos del ADNc) se llevó a cabo usando cebadores específicos para las regiones constantes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo humano. De forma más particular, la clonación

## ES 2 530 670 T3

se llevó a cabo usando el Kit de Amplificación de ADNc BD SMART RACE (Becton Dickinson Bioscience Clonotech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 El reactivo para la extracción del ARN, ISOGEN (Nippon Gene), se añadió al hibridoma C10 y se purificaron 15 µg de ARN total como el material para la síntesis del ADNc de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La primera hebra del ADNc se preparó usando aproximadamente 1 µg de ARN total purificado como un molde. Todos los reactivos y enzimas excepto el ARN usado se proporcionaron con el Kit de Amplificación de ADNc BD SMART RACE.

10 En la primera hebra de la síntesis del ADNc,

1 µg/3 µl de ARN Total  
1 µl de 5'CDS  
1 µl de SMART Oligo

15 la mezcla de reacción con la composición anterior se incubó a 70 °C durante 2 min, y a continuación

5 x 2 µl de Tampón  
1 µl de DTT  
20 1 µl de mezcla de dNTP  
1 µl de Transcriptasa Inversa PowerScript

se añadieron y se incubaron a 42 °C durante 1,5 h.

25 Se añadieron 50 µl adicionales de tampón de Tricina-EDTA y a continuación se incubó a 72 °C durante 7 min para obtener la primera hebra de ADNc.

(2) Amplificación del gen de cadena pesada y el gen de cadena ligera por PCR y confirmación de las secuencias de nucleótidos.

30 (2)-1; Amplificación del gen de cadena pesada y el gen de cadena ligera por PCR.

35 Para amplificar el ADNc del gen que codifica el anticuerpo C10, se preparó la siguiente mezcla de reacción y se sometió a PCR, usando un conjunto de cebador de PCR del cebador en la posición 3' que tiene la secuencia específica para anticuerpo humano (la secuencia en particular se describe posteriormente) y el cebador en la posición 5' (mezcla Universal de cebador A) ese híbrido específicamente con la secuencia añadida al extremo 5' Del ADNc sintetizado con el Kit de Amplificación de ADNc BD SMART RACE, y KOD-Plus-ADN polimerasa (Toyobo) como enzima para PCR.

40	H <sub>2</sub> O estéril	28 µl
	Primera hebra de ADNc	2,5 µl
	Tampón KOD-Plus- (10X)	5 µl
	Mezcla de dNTP (2 mM)	5 µl
	MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	2 µl
45	KOD-Plus- (1 unidad/µl)	1 µl
	Mezcla Universal de cebador A (UPM) (10X)	5 µl
	Cebadores específicos para genes (GSP) (10 µM)	1,5 µl
	Volumen total	50 µl

50 Para la amplificación del gen de cadena pesada, se usó el conjunto de cebador UPM en el Kit de Amplificación de ADNc SMART RACE y cebador IgG1p (SEC ID N°: 5), aunque para la amplificación del gen de cadena ligera, se usó el conjunto de cebador UPM y cebador hk-2 (SEC ID N°: 6).

**IgG1p: TCTTGICCCACCTTGGTGTTGCTGGGCTTGIG** (SEC ID N°: 5)

55 **hk-2: GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGC** (SEC ID N°: 6)

Además, las condiciones de reacción usadas son las que siguen a continuación.

60 Se repitieron 5 ciclos de 94 °C/30 segundos y 72 °C/3 min,  
se repitieron 5 ciclos de 94 °C/30 segundos, 70 °C/30 segundos y 72 °C/3 min, y  
se repitieron 25 ciclos de 94 °C/30 segundos, 68 °C/30 segundos y 72 °C/3 min.

65 Adicionalmente, estos 2 µl de mezcla de reacción se diluyeron mediante la adición de 98 µl de Tampón de Tricina-EDTA, y la segunda PCR (anidada) se llevó a cabo usando 5 µl de la mezcla diluida como un molde. La composición



de la solución de reacción para PCR es como sigue a continuación:

	H <sub>2</sub> O estéril	30 µl	
	La primera solución de reacción de PCR (factor de dilución 50)		5 µl
5	Tampón KOD-Plus- (10X)		5 µl
	Mezcla de dNTP (2 mM)		5 µl
	MgSO <sub>4</sub> (25 mM)		2 µl
	KOD-Plus- (1 unidad/µl)		1 µl
	Cebador A Universal Anidado (NUP; 10 µM)		1 µl
10	Cebadores específicos para genes (GSP) (10 µM)		1 µl
	Volumen Total		50 µl

15 Como un primer conjunto de cebador para la amplificación del gen de cadena pesada en la reacción anterior, se usaron el cebador NUP (en el Kit de Amplificación de ADNc SMART RACE; Becton Dickinson Bioscience Cloneteck) y el cebador hh2 (SEC ID N°: 7), y para la amplificación del gen de cadena ligera, se usaron el cebador UPM y el cebador hk-5 (SEC ID N°: 8). La condición de la temperatura de reacción fue la que sigue a continuación: a 94 °C como la temperatura inicial durante 1 min, a continuación se repitieron 20 ciclos de 94 °C/5 segundos, 68 °C/10 segundos y 72 °C/3 minutos. Por último se llevó a cabo el calentamiento a 72 °C/7 minutos.

20 hh2: **GCTGGAGGGCACGGTCACCACGC** (SEC ID N°: 7)

hk-5: **AGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTTC** (SEC ID N°: 8)

25 (2)-2; Determinación de la secuencia de nucleótidos del gen antigénico

El fragmento amplificado de PCR de cadena pesada (en lo sucesivo en el presente documento, denominado HV[C]: que consistía en la secuencia directora de la región sin traducir en la posición 5', región variable (HV) y una parte de la región constante ([C]) de la cadena H), y el fragmento amplificado de PCR de cadena ligera (en lo sucesivo en el presente documento, denominado LV[C]: que consistía en la secuencia directora de la región sin traducir en la posición 5', región variable (LV) y una parte de la región constante ([C]) de la cadena L) se recuperaron por precipitación en etanol, y a continuación se sometieron electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos recuperados se purificaron mediante un kit de purificación de ADN usando un, Kit para Extracción en Gel QIAquick (Qiagen), membrana. El fragmento amplificado HV[C] o el fragmento amplificado LV[C] purificados se subclonaron en vector PCR 4 Blunt-TOPO del Kit de Clonación por PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen) y la secuencia de nucleótidos del ADN inserto se analizó para el ADN plásmido del clon obtenido. Los cebadores usados para la secuencia de nucleótidos del ADN fueron M13-20FW (SEC ID N°: 9) y M13RV (SEC ID N°: 10).

M13-20FW: **GTAAAACGAC GGCCAGTG** (SEC ID N°: 9)

40 M13RV: **CAGGAAACAGCTATGAC** (SEC ID N°: 10)

A continuación se muestra la secuencia de nucleótidos del ADN que codifica la región variable de cadena pesada Y la región variable de cadena ligera, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo C10.

45 <secuencia de nucleótidos de cadena pesada C10> (desde el codón de inicio ATG hasta la secuencia de ADN que codifica los restos de aminoácidos carboxi terminales de la región variable) (SEC ID N°: 11)

ES 2 530 670 T3

```

10      20      30      40      50      60
ATGGACTGGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG CTCCAGGTGC TCACTCCCAG
70      80      90      100     110     120
GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGGTTTCC
130     140     150     160     170     180
TGCAAGGCAT CTGGATACAC CTTACCAAC CACTATATGC ACTGGGTGEG ACAGGCCCCCT
190     200     210     220     230     240
GGACAAGGGC TTGAGTGGAT GGAATAATC AACCCATTA GTGGTAGCAC AAGTAACGCA
250     260     270     280     290     300
CAGAAGTICC AGGGCAGAGT CACCATGACC AGGGACACGI CCACGAGCAC AGTCTACATG
310     320     330     340     350     360
GAGCTGAGCA GCCTGAGATC TGAGGACADG GCCGTGTATT ATTGTCCGAG AGATATTGTG
370     380     390     400     408
GATGCTTTTC ATTTCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCC TCTCTTCA

```

<secuencia de aminoácidos de cadena pesada C10> (a la secuencia directora y la región variable) (SEC ID N°: 12)  
(Los restos de aminoácidos subrayados representan la secuencia directora como una señal de secreción)

5

```

10      20      30      40      50      60
MDWTRVRFCL LAVAPGAHSQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYFTN HYMHWRQAP
70      80      90      100     110     120
GQGLEWMGITI NPISGSTSNA QKFGQRTMT RDTSTSTVYM ELSSLRSEDT AVYYCARDIV
130     136
DAFDFWQGT MVTVSS

```

<secuencia de nucleótidos de cadena ligera C10> (desde el codón de inicio ATG hasta la secuencia de ADN que codifica los restos de aminoácidos carboxi terminales de la región variable) (SEC ID N°: 13)

```

10      20      30      40      50      60
ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC
70      80      90      100     110     120
AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA
130     140     150     160     170     180
GTCACCATCA CTGCGCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTAGTCTG GTATCAGCAG
190     200     210     220     230     240
AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGG AAGTGGGGTC
250     260     270     280     290     300
CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTC A CTCTACCAT CAGCAGCCTG
310     320     330     340     350     360
CAGCCTGAAG ATTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATGATTACTT CACTTTCGGC
370     380     384
CCTGGGACCA AAGTCGATAT CAAA

```

10

<secuencia de aminoácidos de cadena ligera C10> (a la secuencia directora y la región variable) (SEC ID N°: 14)  
(Los restos de aminoácidos subrayados representan la secuencia directora como una señal de secreción)

```

      10      20      30      40      50      60
MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCAIQLTQSP SLSASVGDV VTITCRASQG ISSALVWYQQ
      70      80      90     100     110     120
KPGKAPKLLI YDASSLESGV PSRFSGSGSG TDFLTISL QPEDFATYYC QQFNQYPTFG
      128
PGTKVDIK
    
```

Además, en la secuencia genética del anticuerpo C10 subclonada en vector PCR 4 Blunt-TOPO, se clonó una parte de la región constante de la secuencia de anticuerpo humano y también se analizó la secuencia de nucleótidos del ADN de esta región. El resultado indicó que se confirmaba la presencia de la secuencia que codifica el resto de los aminoácidos 118 a 191 en la región constante de cadena pesada que se muestra en el índice de EU en Kabat *et al.*, y estaba en total acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la IgG1 humana, y por lo tanto se determinó que la subclase del anticuerpo C10 era IgG1. Además, se obtuvo el gen del anticuerpo que codifica el anticuerpo C15 y la secuencia del mismo se determinó usando el mismo método.

(Ejemplo 6)

Construcción del vector de expresión del anticuerpo C10 recombinante

Producción del vector de expresión C10 (El esquema del proceso se muestra en la FIG. 1)

El ADN de LV (secuencia directora de cadena ligera + región variable) del anticuerpo C10 se amplificó por PCR mediante KOD-Plus-ADN polimerasa usando el ADN del plásmido obtenido que contiene la cadena LV[C] del anticuerpo C10 como un molde y los cebadores C10\_L5\_Bg1 (SEC ID N°: 15) y C10\_L3\_Bsi (SEC ID N°: 16) que se diseñaron para añadir sitios de enzimas de restricción (BgIII 5' terminal, BsiWI 3' terminal) para unión a los extremos. La condición de la temperatura de reacción fue: después de calentar durante 1 min a la temperatura de partida de 94 °C, un ciclo de 94 °C/5 segundos y 68 °C/45 segundos se repitió 35 veces y un calentamiento final de 72 °C/7 min. El fragmento de ADN amplificado se digirió con las enzimas de restricción BgIII y BsiWI y se purificó mediante la recuperación de ADN de 400 bp a partir de electroforesis en gel de agarosa. Aunque el ADN del vector, vector N5KG1-Val Lark (IDEC Pharmaceuticals, un vector modificado de N5KG1 (Patente de Estados Unidos N° 6001358)) se digirió del mismo modo con las enzimas de restricción BgIII y BsiWI secuencialmente, se sometió a tratamiento de desfosforilación con Fosfatasa Alcalina (C75 de *E. coli*) (Takara Shuzo Co., Ltd.) y a continuación se recuperó en forma de un ADN un poco más pequeño de aproximadamente 9 kb después de la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa y kit de purificación de ADN. Estos 2 fragmentos se ligaron con T4 ADN ligasa y se transfectoron a DH10B de *E. coli* para obtener transformantes. El ADN plásmido de los transformantes, que contenía el ADN inserto, se sometió a análisis de secuencia de nucleótidos de ADN, y se obtuvo ADN plásmido, N5KG1\_C10\_Lv, en el que la LV del anticuerpo C10 se insertó en fase de lectura cadena arriba en la posición 5' de la región constante de cadena ligera del anticuerpo humano en N5KG1-Val Lark. A continuación, la HV (la secuencia directora + región variable de cadena pesada) del anticuerpo C10 se insertó en el vector plásmido en que se insertó la LV (N5KG1\_C10\_Lv). La HV se amplificó por PCR usando el ADN plásmido que contenía la HV[C] del anticuerpo C10 subclonado en vector pCR4Blunt-TOPO como un molde y los cebadores, C10\_H5\_Sal (SEC ID N°: 17) y C10\_H3\_Nhe (SEC ID N°: 18) diseñados para añadir sitios de enzima de restricción (Sall en la posición 5' terminal, NheI en la posición 3' terminal) para unión a los extremos. La condición de la temperatura de reacción fue: después de calentar durante 1 min a la temperatura de partida de 94 °C, un ciclo de 94 °C/5 segundos y 68 °C/45 segundos se repitió 35 veces y un calentamiento final de 72 °C/7 min. El fragmento de ADN amplificado de la HV purificado se subclonó en vector pCR4Blunt-TOPO, y el ADN inserto de los clones obtenidos de este modo del ADN plásmido se analizaron por secuenciación. Los cebadores usados para la secuenciación del ADN fueron M13-20FW y M13RV descritos anteriormente. La parte insertada de los subclones se analizó mediante secuenciación de ADN, y se seleccionó el ADN plásmido (TOPO\_C10\_Hv), que no presentaba diferencia con la HV molde y las partes del cebador también eran las mismas secuencias tal como se diseñaron. Este ADN se digirió con enzimas de restricción, Sall y NheI, se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de ADN que era de aproximadamente 420 bp se recuperó y se purificó, y se ligó usando T4 ADN ligasa a ADN de N5KG1\_C10\_Lv (aproximadamente 9 kb) que se sometió del mismo modo a tratamiento con enzima de restricción (Sall y NheI) y desfosforilación. El producto de ligación se introdujo en DH10B de *E. coli* y el ADN del plásmido diana se seleccionó a partir de los transformantes obtenidos de este modo. El ADN plásmido que expresa anticuerpo, N5KG1\_C10\_IH (clon N° 1) obtenido de este modo se produjo en masa y se purificó, y se confirmó que no se introdujeron cambios durante el proceso de clonación en la secuencia de nucleótidos del ADN en toda la región de la cadena L y la cadena H y alrededor del sitio insertado (FIG. 2 y 3). La confirmación de la secuencia del ADN se llevó a cabo usando cebadores de las SEC ID N°: 19-25. El mapa simplificado del vector de expresión del anticuerpo C10 se muestra en la FIG. 4. Además, se construyó un vector de expresión del anticuerpo C15 recombinante usando el mismo método.

**C10\_L5\_Bgl:** GAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCT  
(SEC ID N°: 15)

**C10\_L3\_Bsi:**

5 **AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGC** (SEC ID N°: 16)

**C10\_H5\_Sal:**

**AGAGAGAGAGGTGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTC** (SEC ID N°: 17)

**C10\_H3\_Nhe:**

10 **AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC** (SEC ID N°: 18)

**hh-4: GGTGCCAGGGGGAAGACCGATGG** (SEC ID N°: 19)

15 **hh-1: CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC** (SEC ID N°: 20)

**CMVH903F: GACACCCTCATGATCTCCCGGACC** (SEC ID N°: 21)

**CMVHR1303: TGTTCTCCGGCTGCCATTGCTCT** (SEC ID N°: 22)

20 **SEQU4618: TCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCC** (SEC ID N°: 23)

**hk-1: TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC** (SEC ID N°: 24)

25 **SEQUI783: GGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA** (SEC ID N°: 25)

(Ejemplo 7)

Preparación de anticuerpo C10 recombinante

30 Las células que expresan el anticuerpo C10 se produjeron por introducción del vector de expresión del anticuerpo C10 construido a células huésped. Se usó una cepa de células CHO DG44 mutantes con supresión con dihidrofolato reductasa (DHFR) (en lo sucesivo en el presente documento, denominadas células CHO, IDEC Pharmaceuticals), acondicionadas en un medio libre de suero, medio EX-CELL325PF (JRH, que contiene glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomocina, suplemento de hipoxantina y timidina (HT) (1:100) (Invitrogen)) como células huésped para expresión. La introducción del vector en las células huésped se llevó a cabo mediante electroporación. El gen se introdujo en  $4 \times 10^6$  células CHO mediante electroporación por linealización de aproximadamente 2 µg del vector de expresión de C10 con una enzima de restricción *Ascl* y usando un Electroporador BioRad a 350 V, 500 µF, y a continuación las células se sembraron en placas de cultivo de 96 células. Después de la introducción del vector a las células, se añadió G418 y el cultivo continuó. Después de confirmar las colonias, se seleccionaron cepas que expresan anticuerpo. Las líneas de células CHO seleccionadas se cultivaron en medio EX-CELL-325 PF (que contenía glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomocina, suplemento de hipoxantina y timidina (HT) (1:100) (Invitrogen)) con CO<sub>2</sub> al 5 %. El sobrenadante del cultivo se absorbió a una columna de Proteína A Mabselect (GE Healthcare Bioscience), se lavó con PBS y se eluyó con tampón de citrato sódico 20 mM y NaCl 50 mM (pH 3,4). El eluato se neutralizó a pH 7,0 con fosfato sódico 50 mM a pH 7,0. La conductividad se ajustó a 4,0 ms/cm o inferior por dilución con un factor de aproximadamente 1,5 con agua desionizada. A continuación, la muestra se aplicó a una con una unidad de Q-Sepharose (Hitrap Q HP, GE Healthcare Bioscience) y SP-Sepharose (Hitrap SP FF, GE Healthcare Bioscience) para absorción, se lavó con tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 5,0) y a continuación se diluyó con PBS(-). La solución de anticuerpo preparada de este modo se filtro esterilizada a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm, MILLEX-GV (Millipore). La concentración del anticuerpo C10 purificado se calculó midiendo la absorción a 280 nm y suponiendo 1 mg/ml como DO de 1,4. Además, se preparó un anticuerpo C15 recombinante usando el mismo método.

45

50

(Ejemplo 8)

Construcción de vector de expresión de proteína FGF23 de mono cinomolgo

5 Se mezcló sangre de mono cinomolgo tratada con EDTA, con Dextrano T-2000 al 5 % (GE Healthcare Bioscience) suspendido en PBS (-) a la relación de 2:1 para precipitar glóbulos rojos. A continuación, se formaron capas del sobrenadante en la parte superior de una solución de separación de linfocitos (Ficoll-Plaque) (GE Healthcare Bioscience) y se centrifugó para obtener la fracción de linfocitos. Los linfocitos obtenidos de este modo se suspendieron en ISOGEN-LS (Nippon Gene), y se obtuvo el ARN linfocítico total de mono cinomolgo de acuerdo con el protocolo adjunto. A partir de este ARN linfocítico total de mono cinomolgo, se preparó la biblioteca de ADNc linfocítico de mono cinomolgo usando Kit para Síntesis de la Primera Hebra del ADNc (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo adjunto. El ADNc que codifica FGF23 de mono cinomolgo se amplificó usando la biblioteca del ADNc linfocítico de mono cinomolgo como un molde, cebador FGF23FW de mono (SEC ID N°: 26) y cebador FGF23RV de mono (SEC ID N°: 27), y KOD plus ADN polimerasa (Toyobo), e incubando a 94°C durante 5 min, a continuación llevando a cabo 45 ciclos de una etapa de PCR de calentamiento a 94°C durante 20 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 50 segundos. El cebador FGF23FW de mono se hibridar alguna secuencia presente en la región cadena arriba en la posición 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica FGF23 humano y añade el sitio de restricción EcoRI al lado en la posición 5' de la región de codificación de FGF23 en el fragmento amplificado. El cebador FGF23RV de mono contiene una secuencia que se divide con la secuencia que contiene el codón de parada de la región de codificación de FGF23 humano, y el sitio de restricción Not I. Este fragmento amplificado se digirió con EcoRI y NotI, y se clonó por inserción en los sitios de restricción de EcoRI y NotI de vector pEAK8/IRES/EGFP, que es un vector de expresión pEAK8 (Edge Biosystem) al que se unen el sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) y proteína fluorescente verde potenciada (EGFP). Se determinó que la secuencia de nucleótidos del plásmido obtenido de este modo confirmaba que codifica una proteína FGF23 de mono cinomolgo. Este vector se denominó pEAK8/IRES/EGFP/FGF23 de mono. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de FGF23 de mono cinomolgo obtenidas en el presente Ejemplo se muestran en las SEC ID N°: 28 y 29, respectivamente.

**FGF23FW de mono: CGGAATTCCACCATGTTGGGGGCCCGCCTCAGGCT**

30 (SEC ID N°: 26)

**FGF23RV de mono: ATTTGCGGCCGCTAGATGAACTTGGCGAAGGGGC**

(SEC ID N°: 27)

35 Secuencia de nucleótidos de FGF23 de mono cinomolgo (SEC ID N°: 28)

**ATGTTGGGGGCCCGCCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCCTTGTGCAGCGTCT  
GCAGCATGAGCGTCATCAGAGCCTATCCCAATGCCTCCCCATTGCTCGGCTCC  
AGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACACAGCCACAGCCAGGAACAGCTACC**

ACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCACGTGGATGGCGCACCCCATCAGACCATC  
TACAGTGCCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTGOTGATTACAGG  
TGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGCATGGATTTCGGAGGCAACATTTTTGGAT  
CACACTATTTCAACCCGGAGAACTGCAGGTTCCGACACTGGACGCTGGAGAAC  
GGCTACGACGCTTACCCTCTCCTCAGCATCACTTTCTGGTCAGTCTGGGCCGG  
GCGAAGAGGGCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCCCTACTCCCAGTTCCT  
GTCCCGGAGGAACGAGATCCCCCTCATCCACTTCAACACCCCCAGACCACGGC  
GGCACACCCGGAGCGCCGAGGACGACTCGGAGCGGGACCCCTGAACGTGCT  
GAAGCCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCGGCCTCCTGCTCACAGGAGCTCC  
CGAGCGCCGAGGACAACAGCCCGGTGGCCAGCGACCCGTTAGGGGTGGTCAG  
GGCGGTTCGGGTGAACACGCACGCTGGGGGAACGGGCCCGGAAGCCTGCCGC  
CCCTTCGCCAAGTTCATCTAG

Secuencia de aminoácidos de FGF23 de mono cinomolgo (SEC ID N°: 29)

MLGARLRLWV CALCSVCSMS VIRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN  
YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFFG  
NIFGSHYFNP ENCRFRHWTL ENGYDVYHSP QHHFLVSLGR AKRAFLPGMN  
PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPRPRRHTRS AEDDSERDPL NVLKPRARMT  
5 PAPASCSQEL PSAEDNSPVA SDPLGVVRRG RVNTHAGGTG PEACRPFKFI

(2) Preparación de sobrenadante de células que expresan FGF23 de mono cinomolgo

10 pEAK8/IRES/EGFP/FGF23 de mono se transfectó de forma transitoria a células rápidas PEAK (Edge Biosystem) con el método de fosfato cálcico, y se obtuvo su sobrenadante del cultivo.

(Ejemplo 9)

15 Investigación para la unión de anticuerpo C10 a FGF23 de mono cinomolgo

Se investigó el hecho de que el anticuerpo C10 se une no solamente al FGF23 humano sino también a la FGF23 de mono cinomolgo con el siguiente método usando ELISA sándwich. El anticuerpo C10 preparado en el Ejemplo 4, anticuerpo 2C3B y anticuerpo de control de IgG1 humana se diluyeron en solución de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM a una concentración de 5 µg/ml y se añadió a cada pocillo de placas de microtitulación de 96 pocillos para ELISA (Maxisorp (Marca Comercial Registrada), Nunc), se incubó a 4 °C durante 12 horas. De este modo, el anticuerpo C10, anticuerpo 2C3B y anticuerpo de control de IgG1 humana como un control se absorbieron en microplacas. A continuación, estas soluciones se retiraron, y se añadió un reactivo de bloqueo (SuperBlock (Marca Comercial Registrada) Tampón de bloqueo, PIERCE) a cada pocillo, se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y a continuación cada pocillo se lavó dos veces con solución salina tamponada con Tris (T-TBS) que contenía Tween 20 al 0,1 %. A cada pocillo de la placa de microtitulación en la que se revistieron los anticuerpos anti-FGF23, la proteína FGF23 humana de longitud completa purificada en el Ejemplo 2 o el sobrenadante celular de expresión que expresa FGF23 de mono cinomolgo preparado en el Ejemplo 8 se añadió después de diluir hasta concentraciones apropiadas, se hizo reaccionar con anticuerpo en fase sólida durante 2 horas, y a continuación cada pocillo se lavó dos veces con solución salina tamponada con Tris (T-TBS) que contenía Tween 20 al 0,1 %. A continuación, se añadieron 3 µg/ml de anticuerpo 3C1E marcado con biotina y se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas para unir el anticuerpo 3C1E marcado con biotina a FGF23 humana o de mono cinomolgo unida al anticuerpo en

fase sólida. Después de lavar con T-TBS, se hizo reaccionar estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (DAKO) con un índice de dilución de 5000 durante 1 hora y se lavó 3 veces con T-TBS. A continuación, se añadió un tampón de sustrato que contenía tetrametilbencidina (DAKO) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. la reacción se detuvo por adición de ácido sulfúrico 0,5 M a cada pocillo. La absorción a la longitud de onda de 450 nm con referencia a la longitud de onda de 570 nm se midió usando un vector de microplacas (MTP-300, Colona Electric Co.). La reactividad de la proteína FGF23 de longitud completa humana y el sobrenadante del cultivo de células que expresan FGF23 de mono cinomolgo se comparó con la dilución con factor de 3. El resultado se muestra en la FIG. 5A y B. Tal como se muestra claramente en la FIG. 5A, la reactividad del anticuerpo C10 o del anticuerpo 2C3B en fase sólida hacia la proteína FGF23 de longitud completa humana es aproximadamente la misma. Para el sobrenadante del cultivo diluido en serie de células que expresan FGF23 de mono cinomolgo en las condiciones, no se observa mucha diferencia entre la reactividad del anticuerpo C10 y el anticuerpo 2C3B (FIG. 5B). Es decir, se demostró que el anticuerpo C10, al igual que el anticuerpo 2C3B, era capaz de unirse a FGF23 humano y de mono cinomolgo.

(Ejemplo 10)

Comparación del efecto del anticuerpo C10 y del anticuerpo 2C3B en concentración normal de fósforo en sangre de mono cinomolgo y concentración de  $1\alpha$ , 25 dihidroxi vitamina D en sangre.

FGF23 tiene actividades de excretar fósforo desde el riñón, reducir la concentración de fósforo en suero así como inhibir enzimas de activación de vitamina D y reducir la concentración de  $1\alpha$ , 25 dihidroxi vitamina D en sangre (en lo sucesivo en el presente documento denominada 1,25D) (Folleto de la Publicación Internacional N° WO02/14504). Se ha demostrado que la administración de anticuerpo, tal como anticuerpo 2C3B y similares, que tiene un efecto supresor, es decir, actividad de neutralización, sobre FGF23, en ratones normales causa la inhibición de la acción de FGF23 endógena y un aumento de la concentración de fósforo en suero y la concentración de 1,25D en suero (Folleto de la Publicación Internacional N° WO03/057733). Por lo tanto, se ha sugerido fuertemente que el anticuerpo que tiene actividad de neutralización sobre FGF23 tiene efecto terapéutico en enfermedades humanas incluyendo osteomalacia inducida por tumor, XLH y similares que son causadas por un FGF23 en exceso. Por lo tanto, el anticuerpo C10 obtenido la presente invención se investigó para la actividad de neutralización de FGF23 *in vivo*. En particular, dado que se espera su efecto farmacológico en seres humanos, el efecto de neutralización se midió en monos, que evolutivamente están relacionados de forma más próxima a los seres humanos en comparación con especies tales como roedores, mediante el uso de supresión de la función del FGF23 endógeno, aumento de concentración de fósforo en suero y aumento de la concentración de 1,25D en suero como índices. Los experimentos se llevaron a cabo usando un anticuerpo de ratón, en anticuerpo 2C3B, como un control comparativo para el anticuerpo C10.

El efecto del anticuerpo C10 y del anticuerpo 2C3B sobre el aumento de la concentración de fósforo en suero se comparó en monos cinomolgos sin tratar normales con el siguiente método. Se usó el anticuerpo C10 producido en el Ejemplo 4. Los animales experimentales usados fueron monos cinomolgos hembra de 2-3 años de edad y peso corporal de 2-4 kg. Se usaron 3 animales en cada grupo de la administración de solvente y administración de anticuerpo 2C3B, y se usaron 4 animales en el grupo de administración de C10. Los anticuerpos C10 y 2C3B se prepararon en PBS (-) a una concentración de 3 mg/ml y se usaron como una solución de administración. El solvente, PBS (-), se usó como un control negativo. Los anticuerpos C10 y 2C3B se administraron una vez desde la vena cefálica braquial con un caudal de 1 ml/min y una cantidad de 3 mg/kg y 1 ml/kg. La concentración de fósforo en suero se midió usando reactivo de fósforo inorgánico de Wako de tipo L (Wako Pure Chemical Industries) y un Analizador Clínico de Hitachi, Modelo 7180 (Hitachi, Ltd.). La concentración de 1,25D en suero se midió usando el Kit 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D RIA [TFB] (Immunodiagnostic System). Las medidas se llevaron a cabo los días 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, y 49 después de la administración de anticuerpo. Los datos se mostraron como promedio +/- error estándar. La FIG. 6 muestra la transición de la concentración de fósforo en suero en muestras de sangre extraídas periódicamente hasta 10 días después de la administración de cada anticuerpo. En el grupo administrado con PBS (-), la concentración de fósforo en suero era casi constante durante el periodo de ensayo, aunque en el los grupos administrados con anticuerpo C10 y 2C3B se observó un claro aumento de la concentración de fósforo en suero cuando se compara antes en la administración y con el grupo administrado con PBS (-). El día en el que se observó la concentración de fósforo en suero más elevada tanto en el grupo administrado con el anticuerpo C10 como en el grupo administrado con el anticuerpo 2C3B fue 5 días después de la administración de los anticuerpos. En este punto temporal, la concentración de fósforo en suero en el grupo de PBS(-), grupo de anticuerpo 2C3B y grupo de anticuerpo C10 era de 5,28 mg/dl, 8,10 mg/dl y 9,59 mg/dl, respectivamente. Comparando la concentración de fósforo en suero del grupo del anticuerpo 2C3B y el grupo del anticuerpo C10 a los 5 días después de la administración de anticuerpo con la concentración de fósforo en suero del PBS (-), el aumento en el grupo del anticuerpo 2C3B era de 2,82 mg/dl, mientras que en el grupo del anticuerpo C10 era de 4,31 mg, lo que sugiere que el anticuerpo C10 inducía un aumento de aproximadamente 1,5 veces superior en la concentración de fósforo en suero en comparación con el anticuerpo 2C3B (FIG. 7). Por lo tanto el defecto de aumento en la concentración de fósforo en suero en el grupo administrado con el anticuerpo C10 es notablemente superior en comparación con la del grupo administrado con el anticuerpo 2C3B. Además, 10 días después, la administración de la concentración de fósforo en suero en el grupo administrado con el anticuerpo 2C3B estaba en el mismo nivel que en el grupo de PBS (-), mientras que la concentración de fósforo en suero en el grupo administrado con C10 (8,76 mg/dl) aún se

5 mantenía un nivel mayor que el nivel más elevado (8,10 mg/dl) en el grupo administrado con el anticuerpo 2C3B (FIG. 6). Además, el aumento de la concentración de fósforo en suero con el anticuerpo C10 se sostiene durante mucho más tiempo que la del anticuerpo 2C3B. La duración, en la que se observó la diferencia significativa de la concentración de fosfato en suero desde el grupo de PBS (-), fue de 7 días para el grupo de 2C3B, aunque fue de forma sorprendente 35 días, aproximadamente 5 veces mayor, en el grupo del anticuerpo C10. del mismo modo, para la concentración de 1,25D, después de la administración del anticuerpo C10 se demostró un aumento notable y un aumento de la duración sostenida en comparación con el anticuerpo 2C3B (FIG. 8). Estos resultados demuestran que, en monos cinomolgos, el anticuerpo C10 tiene un aumento de la actividad más potente para la concentración de fósforo en suero y la concentración de 1,25D en suero, es decir, que tiene una actividad de neutralización de FGF23 más potente. El tratamiento actual para raquitismo hipofosfataémico en XLH en este momento requiere una gran dosis de múltiples administraciones de formulaciones de fósforo y vitamina D al día para mantener apenas el intervalo normal de la concentración de fósforo. Existen informes del escaso cumplimiento de los pacientes debido a la pluralidad de administraciones a tomar. El hecho de que en la administración única de anticuerpo C10 en el presente estudio, se observó un aumento de la actividad sostenida en la concentración de fósforo en suero y en la concentración de 1,25 D en suero sugiere que el anticuerpo C10 tiene posiblemente una marcada ventaja como un fármaco terapéutico para la hipofosfatemia sobre la terapia convencional.

(Ejemplo 11)

20 Confirmación de la reactividad del anticuerpo C15 para FGF23 humano y de mono cinomolgo

pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23 preparado en el Ejemplo 1 o pEAK8/IRES/EGFP/FGF23 de mono preparado en el Ejemplo 8 ser transfectó de forma transitoria en las células rápidas PEAK (Edge Biosystem) con el método de fosfato cálcico. Cada sobrenadante del cultivo se recogió 3 días después de la introducción. Se realizó transferencia de Western del sobrenadante del cultivo recogido usando el anticuerpo C15 preparado en el Ejemplo 13 como un anticuerpo primario (FIG. 9). Como resultado, se mostró que C15 se unía a FGF23 de mono cinomolgo, del mismo modo que a FGF23 humano.

(Ejemplo 12)

30 Comparación del efecto del anticuerpo C10 y del anticuerpo C15 en la concentración de fósforo en sangre y la concentración de  $1\alpha, 25$  dihidroxi vitamina D en sangre en monos cinomolgos normales

35 El Ejemplo 11 demostró que el anticuerpo C15 tiene actividad de unión con las proteínas recombinantes FGF23 humana y de mono cinomolgo al igual que el anticuerpo C10. Posteriormente, la actividad de neutralización de FGF23 del anticuerpo C10 y del anticuerpo C15 *in vivo* se comparó mediante la administración de los anticuerpos a monos cinomolgos normales. La actividad de neutralización en FGF23 endógeno de mono cinomolgo se evaluó usando el aumento de la concentración de fósforo en suero como un índice. Se usaron el anticuerpo C10 y el anticuerpo C15 producidos en el Ejemplo 7. Como animales experimentales se usaron monos cinomolgos normales de 2-3 años de edad y peso corporal de 2-3 kg. En cada grupo se usaron 2 animales macho y 1 animal hembra, haciendo un total de 3. El medio de dilución usado fue PBS (-). El anticuerpo C10 se preparó a una concentración de 1 mg/ml y 3 mg/ml, y el anticuerpo C15 se preparó a una concentración de 3 mg/ml. Los anticuerpos se administraron una vez desde la vena safena en un volumen de 1 ml/kg a un caudal de aproximadamente 1 ml/min para conseguir una dosis de 1 mg/kg y de 3 mg/kg para el anticuerpo C10 y una dosis de 3 mg/kg para el anticuerpo C15. La concentración de fósforo en suero se midió usando reactivo de fósforo inorgánico de Wako de tipo L (Wako Pure Chemical Industries) y un Analizador Clínico de Hitachi, Modelo 7180 (Hitachi, Ltd.). Se tomaron muestras de sangre antes de la administración del anticuerpo, y los días 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 después de la administración del anticuerpo. Se realizaron medidas de concentración de fósforo en suero para todos los puntos de toma de muestras de sangre. En el grupo de 1 mg/kg del anticuerpo C10, el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C10 y el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C15, las concentraciones de fósforo en suero antes de la dosificación eran 5,37, 5,70 y 5,58 mg/dl, respectivamente, y no había diferencia entre grupos. En todos los monos cinomolgos, se observó aumento de la concentración de fósforo en suero después de la administración. Por lo tanto, se mostró que no solamente en anticuerpo C10 sino también el anticuerpo C15 tenían actividad de neutralización en la FGF23 endógena de mono cinomolgo. En el grupo de 1 mg/kg del anticuerpo C10, el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C10 y el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C15, la concentración de fósforo en suero 3 días después de la administración era 9,03, 9,10 y 8,64 mg/dl, respectivamente. En este punto temporal, la concentración de fósforo en suero en el grupo de 1 mg/kg del anticuerpo C10 y el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C15 alcanzó el nivel más elevado. Por otro lado, la concentración de fósforo en suero en el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C10 aumentó adicionalmente y alcanzó el nivel más elevado 5 días después de la administración, y el nivel era de 9,75 mg/dl. En el grupo de 1 mg/kg del anticuerpo C10, el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C10 y el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C15, las diferencias máximas de concentración de fósforo en suero entre antes y después de la administración eran de 3,67, 4,65 y 3,06 mg/dl, respectivamente. A partir de este resultado, se mostró que el efecto del anticuerpo C10 sobre el aumento de la concentración de fósforo en suero era superior en comparación con la del anticuerpo C15 a la misma dosis de 3 mg/kg. Además, de forma sorprendente, el anticuerpo C10 a una dosis de 1 mg/kg aumentó la concentración de fósforo en suero más que la del anticuerpo C15 a una dosis de 3 mg/kg. A continuación, se comparó la duración del aumento de fósforo en suero con respecto a nivel anterior a la dosificación. Como resultado,



la duración del aumento de fósforo en el grupo de 1 mg/kg del anticuerpo C10, el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C10 y el grupo de 3 mg/kg del anticuerpo C15 era de 14, 28 y 7 días, respectivamente. A partir de este resultado, se mostró que el anticuerpo C10 tenía una actividad de aumento sostenido de la concentración de fósforo en suero en comparación con la del anticuerpo C15 a la misma dosis de 3 mg/kg. Además, de forma sorprendente, la concentración de fósforo en suero aumentó más en el máximo y en el nivel elevado sostenido mucho mayor para el anticuerpo C10 una dosis de 1 mg/kg que para el anticuerpo C15 aún a dosis de 3 mg/kg. los resultados anteriores demuestran que en monos cinomolgos el anticuerpo C10 tiene una actividad de aumento más potente para la concentración de fósforo en suero y mantenimiento de la actividad para la concentración de fósforo en suero en comparación con las del anticuerpo C15 obtenidas de forma simultánea con el anticuerpo C10. es decir, el anticuerpo C10 tiene una actividad de neutralización significativamente potente en FGF23 de mono cinomolgo en comparación con el anticuerpo C15.

(Ejemplo 13)

15 Preparación de fragmento de ADN de FGF23 humano (libre de secuencia de señal)

Se preparó una solución de reacción con KOD-plus-ADN polimerasa (Toyobo), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como molde se añadieron cincuenta pmol de cebador FGF23(-SP) FW (SEC ID N°: 34) y cebador FGF23(-SP) RV (SEC ID N°: 35), y ADNc de FGF23 humano (756 bp desde el codón de inicio hasta el codón de parada, SEC ID N°: 36) hasta 50 µl de la solución de reacción. Después de incubar la mezcla a 94 °C durante 3 min, se sometió al 30 ciclos de una etapa de PCR de calentamiento a 98 °C durante 15 segundos, a 63 °C durante 15 segundos y a 68 °C durante 2 min 30 segundos. A continuación, la mezcla se incubó a 72 °C durante 3 min. El fragmento amplificado de 684 bp obtenido se separó y se recogió en un gel al 0,8%. El fragmento amplificado se recuperó del gel recogido con el Kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento amplificado por PCR recogido se digirió con Fsel (New England Biolabs Japón), y el fragmento tratado con enzimas se recuperó con el Kit de Purificación por PCR QIAquick (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN parcial que corresponde a la región de la forma madura sin la secuencia de señal del FGF23 humano.

30 **FGF23(-SP) FW: TATCCCAATGCCTCCCCACTGCTCGGCTCCAGCTG** (SEC ID N°: 34)

FGF23(-SP)

RV:

35 **TTGGCCGGCCCTAGATGAACTTGGCGAAGGGGCGGCAGCCTTCCG** (SEC ID N°: 35, incluyendo el sitio Fsel)

40 La secuencia de nucleótidos del FGF23 humano (los nucleótidos en la región de la secuencia de señal están subrayados, y los nucleótidos en la región de la forma madura excluyendo la región de la secuencia de señal desde la longitud completa están rodeados con una línea rectangular). (SEC ID N°: 36)

ATGTTGGGGGCCGCCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCCTTGTGCAGCGTCTGCAGCATGAGCGTCCTCAGAGCC  
TATCCCAATGCCTCCCCACTGCTCGGCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACACAGCCACAGCCAG  
GAACAGCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCATGTGGATGGCGCACCCCATCAGACCATCTACAGTG  
CCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTGGTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGC  
ATGGATTTAGAGGCAACATTTTTGGATCACACTATTTGACCCGGGAGAACTGCAGGTTCCAACACCAGAC  
GCTGGAAAACGGGTACGACGTCTACCACTCTCCTCAGTATCACTTCCTGGTCAGTCTGGGCCGGGGCAAGA  
GAGCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGTACTCCAGTTCCTGTCCCGGAGGAACGAGATCCCCTA  
ATTCACTTCAACACCCCATACCAACGGCGGCACACCCGGAGCGCGAGGACGACTCGGAGCGGGACCCCT  
GAACGTGCTGAAGCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCGGCCTCCTGTTACAGGAGCTCCCGAGCGCCG

**AGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCATTAGGGGTGGTCAGGGGCGGTGCGAGTGAACACGCACGCTGGG**

**GGAACGGGCCCCGGAAGGCTGCCGCCCTTCGCCAAGTTCATCTAG**

5 La secuencia de aminoácidos del FGF23 humano en base a la SEC ID N°: 36 como el patrón (los restos de aminoácidos en la región de la secuencia de señal están subrayados, y los restos de aminoácidos en la región de la forma madura excluyendo la región de la secuencia de señal desde la longitud completa están rodeados con una línea rectangular). (SEC ID N°: 37)

**MLGARLRLWYCALCSVCSMSVLRALYPNASPLLGSWSGGLIHLYTATARNSYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYS**

**ALMIRSEDAGFVYITGVMSRRYLCMDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLNGYDVYHSPQYHFLVSLGRAK**

**RAFLPGMNPPYPYSQFLSRNEIPLIHFNTPIPRHTRSAEDDSERDPLNVLKPRARMTAPASCSQELPSA**

**EDNSPMASDPLGVVRGGRVNHAGGTGPEGCRPFAKFI**

10 (Ejemplo 14)

Construcción del vector pPSs FGF23

15 Se digirió pPSs5.5 descrito en el Ejemplo 1-8 del documento de patente WO2006/78072 con Sfol y FseI, y sus extremos se sometieron a tratamiento de desfosforilación con Fosfatasa Alcalina derivada de *E. coli*. Se insertó al vector un fragmento de ADN que incluye FGF23 humano ha preparado en el Ejemplo 13. A continuación, el vector se introdujo en DH5 $\alpha$ , y se preparó el ADN a partir de los transformantes obtenidos. Se confirmó la secuencia de nucleótidos de la región ligada para obtener el vector pPSs FGF23 (FIG. 10).

20 (Ejemplo 15)

Construcción del vector pUS FGF23 KI

25 Se digirió pCk loxPV $\Delta$ P descrito en el Ejemplo 43-1 del documento de patente WO2006/78072 con Sall y FseI, y los extremos se sometieron a tratamiento de desfosforilación con Fosfatasa Alcalina derivada de C75 de *E. coli* E. Después de insertar un fragmento de aproximadamente 1,5 kb, en el que se separó el fragmento y se recogió en un gel de agarosa al 0,8 % después de digerir el vector pPSs FGF23 preparado en el Ejemplo 14 anterior con Sall y FseI, el vector se introdujo a continuación en Células Ultracompetentes XL10-Gold de *E. coli* (STRATAGENE). Se preparó ADN a partir de los transformantes obtenidos. Se confirmó la secuencia de nucleótidos de la región ligada para obtener el vector pUS FGF23 KI (FIG. 11).

35 La secuencia de polinucleótidos a partir del codón de inicio al codón de parada de la unidad de expresión de FGF23 humano del vector pUS FGF23 KI (secuencia de señal Igk de ratón que contiene 985 bp que incluye una región de intrón sustituida a la secuencia de señal de FGF23 (la parte subrayada en la SEC ID N°: 38) y la forma madura de la secuencia de FGF23 en su cadena abajo, SEC ID N°: 38) y la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc (247 aminoácidos, la parte subrayada representa secuencia de señal de Igk de ratón, SEC ID N°: 39) se muestran en lo sucesivo. La información de la secuencia de la secuencia de señal de Igk de ratón que incluye una región de intrón se basó en MUSIGKVR1 obtenido en GenBank (N° de Referencia K02159), y la secuencia del genoma cadena arriba del mismo se obtuvo a partir de la base de datos de genoma de ratón de UCSC.

40

SEC ID Nº: 38

ATGGAGACAGACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTGAGAGTGCAGAGAAGTGTGG  
ATGCAACCTCTGTGGCCATTATGATACTCCATGCCTCTCTGTTCTTGATCACTATAATTAGGGCAITTTGTCA  
CTGGTTTTAAGTTTCCCCAGTCCCCTGAATTTTCCATTTTCTCAGAGTGATGTCCAAAATTATTCTTAAAAA  
TTTAAATAAAAAGGTCTCTGCTGGAAGGCTTTTATACATATATAACAATAATCTTTGTGTTTATCATTCC  
AGGTTCCACTGGCTATCCCAATGCCTCCCCACTGCTCGGCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACAC  
 AGCCACAGCCAGGAACAGCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCATGTGGATGGCGCACCCCATCAGAC  
 CATCTACAGTGCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTGGTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAG  
 ATACCTCTGCATGGATTTAGAGGCAACATTTTTGGATCACACTATTTGACCCGGAGAACTGCAGGTCCA  
 ACACCAGACGCTGGAAAACGGGTACGAGCTTACCCTCTCCTCAGTATCACTTCCCTGGTCACTCTGGGCCG  
 GGCGAAGAGAGCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGTACTCCCAGTTCCTGTCCCGGAGGAACGAGAT  
  
 CCCCCTAATCACTTCAACACCCCCATACCACGGCGGCACACCCGGAGCGCCGAGGACGACTCGGAGCGGGA  
 CCCCCTGAACGTGCTGAAGCCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCGCCTCCTGTTACAGGAGCTCCCGAG  
 CGCCGAGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCATTAGGGGTGGTCAGGGCGGTGAGTGAACACGCACGC  
 TGGGGGAACGGGCCCGGAAGGCTGCCGCCCTTCGCCAAGTTCATCTAG

5 SEC ID Nº: 39

METDTLLLWVLLLWVPGSTGYPNASPLLGSSWGLIHLYTATARNYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYSALMIR  
SEDAGFVVIIGVMSRRYLCMDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLNENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPG  
MNPPPYSQLSRRNEIPLIHFNTPIPRRHTRSABDDSERDPLNVLKPRARMTTPAPASCSQELPSAEDNSPMA  
SDPLGVVYRGGRVNTHAGGTGPEGCRPFAKFI

(Ejemplo 16)

10

Preparación de vector pUS FGF23 KI para electroporación

15

Se digirieron 60 µg de vector pUS FGF23 KI a 37 °C durante 5 horas usando tampón con espermidina añadida (1 mM pH 7,0, Sigma Aldrich Japón) (Roche Diagnostics, tampón H para enzima de restricción) y NotI (Takara Bio, Inc.). Después de extracción con fenol/cloroformo, se añadieron 2,5 volúmenes de etanol al 100 % y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, y la mezcla se mantuvo al -20 °C durante 16 horas. El vector linealizado con NotI se recogió por centrifugación y se esterilizó mediante la adición de etanol al 70 % al mismo. El etanol al 70 % se retiró y se llevó a cabo secado al aire durante 1 hora en un banco limpio. Se añadió una solución de HBS para formar una solución de 0,5 µg/µl de ADN, y la solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora para preparar vector pUS FGF23 KI para electroporación.

20

(Ejemplo 17)

25

Obtención de una línea de células ES de ratón PL FGF23 usando vector pUS FGF23 KI y una línea de células ES de ratón que dirige elemento RS

Para obtener una línea de células ES de ratón PL FGF23, en la que se insertó ADNc de FGF23 humano por recombinación homóloga en la cadena abajo de un gen de cadena ligera k de inmunoglobulina, de acuerdo con el

método que se muestra en el Ejemplo 16, el vector pUS FGF23 KI linealizado con la enzima de restricción NotI se introdujo a las células ES de ratón que dirigen elemento RS de acuerdo con el método establecido (Shinichi Aizawa, "Biotechnology Manual Series 8, Gene Targeting", Yodosha, 1995). Las células ES de ratón que dirigen elemento RS se obtuvieron con el método que se describe en el Ejemplo 10 del documento de patente WO2006/78072.

El método para cultivar las células ES de ratón que dirigen elemento RS estaba de acuerdo con el método descrito (Shinichi Aizawa, el documento mencionado anteriormente), y se usaron células primarias resistentes a G418 en cultivo (adquiridas en Invitrogen) tratadas con mitomicina C (Sigma Aldrich Japón) como células alimentadoras. En primer lugar, las células ES de ratón que dirigen elemento RS se desarrollaron y se trataron con tripsina, y se suspendieron en HBS hasta una densidad de  $3 \times 10^7$  células/ml. Se mezclaron 0,5 ml de la suspensión celular con 10 µg de ADN del vector. A continuación, se llevó a cabo electroporación (Capacitancia: 960 µF, voltaje: 250 V, temperatura ambiente) usando Cubeta Gene Pulser (distancia del electrodo: 0,4 cm, Bio Rad Laboratories). Las células electroporadas se suspendieron en 10 ml de medios de cultivo de ES (Shinichi Aizawa, el documento mencionado anteriormente), y a continuación las células se sembraron en una placa de Petri de plástico para cultivo tisular de 100 mm (Falcon, Becton Dickinson), en la que se sembraron previamente las células alimentadoras. Después de 36 horas, el medio de cultivo se sustituyó con medios de cultivo de ES que contenía 0,8 µg/ml de puromicina (Sigma Aldrich Japón). Se recogieron las colonias que aparecieron 7 días después, y cada una se desarrolló hasta confluencia en una placa de 24 pocillos. Dos tercios de las mismas se suspendieron en 0,2 ml de un medio de reserva (FBS + DMSO al 10 %, Sigma Aldrich Japón) y la suspensión resultante se mantuvo a -80 °C. El tercio restante se sembró en una placa revestida con gelatina de 12 pocillos. Las células se cultivaron durante 2 días, y se preparó ADN genómico a partir de  $10^6$  a  $10^7$  células usando Kits de Aislamiento de ADN Puregene (Qiagen). El ADN genómico resultante de células ES de ratón que dirigen elemento RS existentes a puromicina se digirieron con la enzima de restricción EcoRI (Takara Bio, Inc.) y se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se llevó a cabo transferencia de Southern para detectar recombinantes homólogos usando como sonda la sonda Ck 3' que era el fragmento de ADN del extremo 3' del ADN genómico Jk-Ck de cadena ligera de Ig (XhoI a EcoRI, aproximadamente 1,4 kb, documento de patente WO00/10383, FIG. 5) usada en la invención que se describe en el documento de patente WO00/10383 (véase el Ejemplo 48). Se detectó una banda (15,1 kb) debido a la digestión con EcoRI en las células ES de ratón que dirigen elemento RS de tipo silvestre. Se espera que aparezca una nueva banda (12,8 kb) por debajo de la banda además de la banda (FIG. 12) en un recombinante homólogo, y se detectó la nueva banda en la cepa resistente a puromicina. Es decir, se demostró que estos clones tenía insertado ADNc de FGF23 humano en la cadena abajo del gen de la cadena k de inmunoglobulina en uno de los alelos.

(Ejemplo 18)

Obtención de una línea de células ES de ratón US FGF23 por supresión de los genes de resistencia a fármacos a partir de una línea de células ES de ratón PL FGF23

Para obtener una línea de células ES de ratón introducidas por gen US FGF23, en la que se suprimieron 2 tipos de genes de resistencia a fármacos (Puro<sup>r</sup>, Neo<sup>1</sup>), a partir de una línea de células ES de ratón PL FGF23, se introdujo el vector pCAGGS-Cre (Sunaga *et al.*, Mol Reprod Dev., 46: 109-113, 1997) en células ES de ratón PL FGF23 de acuerdo con el método establecido (Shinichi Aizawa, "Biotechnology Manual Series 8, Gene Targeting", Yodosha, 1995).

El método para cultivar las células ES de ratón PL FGF23 estaba de acuerdo con el método descrito (Shinichi Aizawa, el documento mencionado anteriormente), y se usaron células primarias resistentes a G418 en cultivo (adquiridas en Invitrogen) tratadas con mitomicina C (Sigma Aldrich Japón) como células alimentadoras. En primer lugar, las células ES de ratón PL FGF23 se desarrollaron y se trataron con tripsina, y se suspendieron en HBS hasta una densidad de  $3 \times 10^7$  células/ml. Se mezclaron 0,5 ml de la suspensión celular con 10 µg de ADN del vector. A continuación, se llevó a cabo electroporación (Capacitancia: 960 µF, voltaje: 250 V, temperatura ambiente) usando Cubeta Gene Pulser (distancia del electrodo: 0,4 cm, Bio Rad Laboratories). Las células electroporadas se suspendieron en 10 ml de medios de cultivo de ES (Shinichi Aizawa, el documento mencionado anteriormente), y a continuación las células se sembraron en una placa de Petri de plástico para cultivo tisular de 60 mm (Falcon, Becton Dickinson), en la que se sembraron previamente las células alimentadoras. Después de 30 horas, se sembraron 1000 células de las células ES en una placa de Petri de plástico para cultivo tisular de 100 mm (Falcon, Becton Dickinson), en la que se sembraron previamente las células alimentadoras. Se recogieron las colonias que aparecieron 6 días después, y cada una se desarrolló hasta confluencia en una placa de 24 pocillos. Dos tercios de las mismas se suspendieron en 0,2 ml de un medio de reserva (FBS + DMSO al 10 %, Sigma Aldrich Japón) y la suspensión resultante se mantuvo a -80 °C. El tercio restante se sembró en una placa revestida con gelatina de 12 pocillos. Las células se cultivaron durante 2 días, y se preparó ADN genómico a partir de  $10^6$  a  $10^7$  células usando Kits de Aislamiento de ADN Puregene (Qiagen). El ADN genómico resultante de células ES de ratón se digirió con la enzima de restricción EcoRI (Takara Bio, Inc.) y se separó por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se llevó a cabo transferencia de Southern para detectar una línea de células ES, en la que solamente se suprimió el gen Puro<sup>r</sup> entre secuencias loxPV, usando como sonda la sonda Ck 3' que era el fragmento de ADN del extremo 3' del ADN genómico Jk-Ck de cadena ligera de Ig (XhoI a EcoRI, aproximadamente 1,4 kb, documento de patente WO00/10383, FIG. 5) usada en la invención que se describe en el documento de patente WO00/10383 (véase el

Ejemplo 48). Se detectaron dos bandas (15,1 kb y 12,8 kb) debido a la digestión con EcoRI en la línea de células ES que retienen el gen Puro<sup>r</sup>, y se detectaron dos bandas (15,1 kb y 10,9 kb) debido a la digestión con EcoRI en la línea de células ES, en la que solamente se suprimió el gen Puro<sup>r</sup> (FIG. 12). Además, mediante el uso de la membrana de transferencia de Southern obtenida en el procedimiento similar al anterior, y como sonda la sonda 3'KO preparada con el método que se muestran en el Ejemplo 9 del documento de patente WO2006/78072, se detectó la línea de células ES, en la que solamente se suprimió el gen Neo<sup>r</sup> entre secuencias loxP. Se detectaron dos bandas (7,4 K. y 5,7 K) debido a la digestión con EcoRI en las células ES que retienen el gen Neo<sup>r</sup>, y se detectaron dos bandas (5,7 K. y 4,6 K) debido a la digestión con EcoRI en la línea de células ES, en la que solamente se suprimió el gen Neo<sup>r</sup> (FIG. 12). A partir de estos resultados, se obtuvo la línea de células ES de ratón US FGF23, en la que se suprimieron simultáneamente 2 tipos de los genes de resistencia a fármacos (Puro<sup>r</sup>, Neo<sup>r</sup>), a partir de la línea de células ES de ratón PL FGF23.

(Ejemplo 19)

15 Preparación de un ratón quimérico US FGF23 KI usando una línea de células ES de ratón US FGF23 y un embrión huésped derivado de una cepa de ratón deficiente en linfocitos B

En un ratón knockout homocigoto para el gen de cadena  $\mu$  de inmunoglobulina, los linfocitos B funcionales son deficientes y no se producen anticuerpos (Kitamura *et al.*, Nature, 350: 423-426, 1991). Los embriones obtenidos por reproducción cruzada del macho homocigoto individual anterior y hembra criados en un entorno limpio se usaron como los huéspedes para preparar ratones químicos en el presente Ejemplo. En tal caso, la mayoría de los linfocitos B funcionales en un ratón quimérico se derivaron de las células ES inyectadas. En el presente Ejemplo, se usó un ratón knockout con genes de cadena  $\mu$  de inmunoglobulina individuales descritos en un informe de Tomizuka *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 722-7, 2000), que se retrocruzó con la cepa MCH (ICR) (CLEA Japan, Inc.) 3 veces o más, para la preparación de embrión huésped.

La línea de células ES de ratón US FGF23 obtenida en el Ejemplo 18 anterior, en la que se confirmó la inserción de ADNc de FGF23 humano cadena abajo de un gen de cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina, se comenzó a partir de una reserva congelada, y las células se inyectaron a un embrión en estadio de 8 células obtenido por reproducción cruzada de ratones macho y hembra individuales de los homocigotos knockout de gen de cadena  $\mu$  de inmunoglobulina anteriores, con 8-10 células por embrión. Después de una noche de cultivo en medio de cultivo de ES (Shinichi Aizawa, "Biotechnology Manual Series 8, Gene Targeting", Yodosha, 1995), los embriones se desarrollaron en blastocistos. Los embriones inyectados se trasplantaron a continuación en el útero en un ratón MCH (ICR) adoptado como padre (CLEA Japan, Inc.) 2,5 días después del tratamiento de pseudogestación, con aproximadamente 10 embriones inyectados por un lado del útero, respectivamente. Como resultado del trasplante de los embriones inyectados preparados mediante el uso de una línea de células ES de ratón US FGF23 preparada en el Ejemplo 18, nacieron ratones de descendencia quimérica. Una quimera individual se determina por el color del pelaje, en el que el color de tipo silvestre derivado de las células ES (marrón oscuro) se puede reconocer o no en el color blanco derivado del embrión huésped. Entre los ratones nacidos de descendencia quimérica, se obtuvieron ratones individuales que obviamente tienen partes del color de tipo silvestre en el color del pelaje, es decir, tiene una contribución reconocible de las células ES. A partir de estos resultados, se mostró que la línea de células ES de ratón US FGF23, en la que se inserta ADNc de FGF23 humano en la cadena abajo de un gen de cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina, mantenía la capacidad de formar quimeras. Es decir, la línea celular tiene la capacidad de diferenciarse en tejidos normales de un ratón individual. Además, el ratón quimérico US FGF23 KI, tal como se describirá posteriormente en el Ejemplo 21, tiene una concentración elevada de FGF23 en sangre, y se podría usar como un modelo animal de enfermedad que presenta hallazgos similares a los del raquitismo hipofosfatémico.

(Ejemplo 20)

50 Preparación de ratón quimérico de control

Como un ratón quimérico de control individual (ratón WT) se usó un ratón quimérico, en el que no se insertan genes funcionales que incluyen el ADNc de FGF23 humano preparado de acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 11 del documento de patente WO2006/78072, en el experimento que administra anticuerpo C10 a ratón quimérico US FGF23 KI en el siguiente Ejemplo 21.

(Ejemplo 21)

60 Verificación del efecto del anticuerpo C10 en la mejora de la patología usando un ratón quimérico US FGF23 KI

Los Ejemplos 10 y 12 demostraron que el anticuerpo C10 suprime de forma significativa el efecto del FGF23 endógeno y eleva la concentración de fósforo en suero y la concentración de 1,25D en suero del mismo en comparación con el anticuerpo 2C3B y el anticuerpo C15 en mono cinomolgo normal. Se ha sugerido fuertemente que el anticuerpo que tiene actividad de neutralización sobre el FGF23 humano tiene efecto terapéutico en las enfermedades humanas tales como osteomalacia inducida por tumor, raquitismo hipofosfatémico incluyendo XLH y similares, y osteomalacia que son causadas por FGF23 en exceso. Por lo tanto, el anticuerpo C10 obtenido en el

presente invención se investigó para el efecto de mejora en la patología causada por FGF23 humano en exceso. Para el ensayo de este efecto terapéutico de anticuerpo C10, se llevaron a cabo experimentos usando un ratón quimérico US FGF23 KI (denominado "ratón hFGF23KI" en lo sucesivo en el presente documento) separado en el Ejemplo 19. Se usaron 12 ratones hFGF23 KI como animales de modelo de enfermedad y se usaron 6 ratones de control normal (ratones WT, preparados en el Ejemplo 20) de las mismas semanas de edad como los controles comparativos. A las 7 semanas de edad, se recogió el suero de ratones hFGF23 KI para medir la concentración en suero de FGF23 (KIT ELISA para FGF-23, Kainos Laboratories, Inc.) y de fósforo, respectivamente. En comparación con los ratones WT, la concentración en suero de FGF23 aumentaba de forma significativa en los ratones hFGF23 KI (ratones WT; n = 6, 163 pg/ml, ratones hFGF23KI; n = 12, 1467 pg/ml). a partir de este resultado, se sugirió que la introducción del gen FGF23 humano al ratón hFGF23 KI se realizó de forma precisa y que, además, una cantidad excesiva de FGF23 exógena humana estaba presente en la sangre del ratón hFGF23 KI. Además, en comparación con los ratones WT, en los ratones hFGF23 KI, se mostró una reducción significativa en la concentración de fósforo en suero (ratones WT; n = 6, 5,82 mg/dl, ratones hFGF23KI; n = 12, 2,62 mg/dl). También se sugirió que la hipofosfatemia se induce debido a la acción de FGF23 humano excesivo en los ratones hFGF23 KI. En este punto temporal, 12 ratones hFGF23 KI se dividieron en los 2 grupos siguientes de 6 ratones cada uno, con una concentración de FGF23 igual: el grupo administrado con el anticuerpo C10 y el grupo administrado con IgG1 de control (FIG. 13). A continuación, ya con 8 semanas de edad, se realizó administración intravenosa repetida de anticuerpo C10 o IgG1 humana purificada (anticuerpo de control) para el control de isotipos a una dosis de 30 mg/kg y frecuencia de cinco veces una vez a la semana. Se extrajeron muestras de sangre antes de la primera administración y 3 días después de la administración, y se obtuvo el suero. La fuerza de sujeción apendicular se midió 24 horas después de la cuarta administración usando un MEDIDOR DE FUERZA DE SUJECIÓN Saitoh (MK-380S, Muromachi Kikai Co., Ltd.). La fuerza de sujeción apendicular se evaluó usando como índice la fuerza máxima (fuerza de sujeción) ejercida por un ratón, en la que el ratón se colocó en una parrilla de medida, para dejar que el ratón agarrara la parrilla, y a continuación el ratón se arrastró por la cola de forma horizontal a nuestra mano hasta que el animal lideró la parrilla por ser incapaz de soportar la fuerza de retirada. Se evaluaron los huesos 24 horas después de la quinta administración. El fémur y la tibia extraídos de los ratones sacrificados por extracción de sangre desde el corazón con anestesia se fijaron en etanol al 70 %. Se midió la concentración de fósforo en suero antes de la primera administración, 3 días después de la primera administración y 24 horas después de la quinta administración. El fémur sin descalcificar se embebió en resina, y se tiñó con Villanueva-Goldner para la evaluación histológica. El contenido de mineral óseo en la tibia se midió a través del proceso de incineración.

Como resultado, se observó una concentración de fósforo en suero significativamente baja en el grupo administrado con anticuerpo de control del ratón hFGF23KI en el momento de formación de grupos y 24 horas después de la quinta administración en comparación con el grupo administrado con anticuerpo de control del ratón WT, lo que significa condiciones hipofosfatémicas continuas (FIG. 14). Por otro lado, se observó que la concentración de fósforo en suero a los 3 días después de la administración aumentó en el grupo administrado con anticuerpo C10 de ratón hFGF23KI con el mismo nivel que en el grupo administrado con anticuerpo de control de ratón WT (FIG. 14). Además, la concentración de fósforo en suero después de la quinta administración en el grupo administrado con anticuerpo C10 de ratón hFGF23KI también estaba al mismo nivel que en el grupo administrado con anticuerpo de control de ratón WT, lo que significa que el efecto de anticuerpo C10 para el aumento de la concentración de fósforo en suero se mantuvo incluso después de cinco veces de administración (FIG. 15).

Como un caso de pacientes hipofosfatémicos, se ha informado debilidad del músculo esquelético (Baker y Worthley, Crit Care Resusc, 4: 307-315, 2000). En el presente estudio, se esperaba debilidad muscular en los ratones hFGF23KI a causa de la hipofosfatemia. En consecuencia, la fuerza de sujeción apendicular se midió con el método anterior como un índice de debilidad muscular, y se comparó entre grupos. Como resultado, se mostró que la fuerza de sujeción del grupo administrado con anticuerpo de control de ratón hFGF23KI era significativamente baja en comparación con la del grupo administrado con el cuerpo de control de ratón WT, y se observó debilidad muscular en este modelo de enfermedad (FIG. 16). Por el contrario, se observó una mejora significativa en la fuerza de sujeción en el grupo administrado con anticuerpo C10 de ratón hFGF23KI (FIG. 16).

A continuación, los tejidos femorales descalcificados se tiñeron con el método de Villanueva-Goldner para la observación histológica. Como resultado, se observó una gran cantidad de osteoide (mostrado en rojo en la FIG. 17) en el hueso en el grupo de administrado con anticuerpo de control de ratón hFGF23KI en comparación con el grupo administrado con anticuerpo de control de ratón WT, lo que sugiere que el defecto de calcificación se indujo en ese grupo. Esto se conoce ampliamente como un síntoma característico de raquitismo. Por el contrario, en los ratones hFGF23KI que recibieron el tratamiento con anticuerpo C10, se observó reducción de la superficie ocupada con osteoide, y predijo que el osteoide se reemplazó con huesos calcificados (mostrados en verde en la FIG. 17). A partir de este resultado, se sugirió que el anticuerpo C10 mejora la calcificación ósea reducida por FGF23 excesivo. En consecuencia, la cantidad de minerales contenidos en la tibia se midió por la calcificación, y se comparó entre cada grupo. La cantidad de minerales contenidos en la tibia en el grupo administrado con anticuerpo de control de ratón hFGF23KI se redujo significativamente en comparación con el grupo administrado con anticuerpo de control de ratón WT (FIG. 18). Por el contrario, en el grupo administrado con anticuerpo C10 de ratón hFGF23KI, se confirmó mejora en la cantidad de minerales (FIG. 18). A partir de los resultados anteriores, se confirmó que, en ratones hFGF23KI, la administración del anticuerpo C10 neutraliza el efecto de FGF23 humano que actúa de forma excesiva *in vivo*, y mejora diversos síntomas de raquitismo hipofosfatémico tales como hipofosfatemia, debilidad muscular, trastorno de

calcificación ósea y similares. Es decir, se ha demostrado que el anticuerpo C10 es un agente terapéutico eficaz para diversas enfermedades humanas relacionadas con FGF23.

**Aplicabilidad Industrial**

5 El anticuerpo C10 de la presente invención, que es un anticuerpo frente a FGF23, tiene actividad elevada para aumentar las concentraciones de fosfato en suero *in vivo* de una forma sostenida y/o para aumentar las concentraciones de 1,25D en suero de una forma sostenida en comparación con los anticuerpos conocidos frente a FGF23. La presente invención se puede usar con efectos espectaculares como un agente para prevención o  
10 tratamiento de enfermedades que son causadas por una acción excesiva de FGF23 o para enfermedades cuya patología se puede mejorar controlando la acción de FGF23.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> KIRIN PHARMA KABUSHIKI KAISHA
- <120> Anticuerpo anti-FGF23 y composición farmacéutica que comprende el mismo
- <130> PH-3490-PCT
- 20 <150> JP 2007-34018
- <151> 14-02-2007
- <160> 45
- 25 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 30
- 30 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Sintética
- 35 <400> 1
- ccggaattca gccactcaga gcagggcagc 30
- <210> 2
- <211> 52
- 40 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 45 <223> Sintética
- <400> 2
- ataagaatgc ggccgctcaa tggatgatgatgatgatgat gaacttggcg aa 52
- <210> 3
- <211> 34
- 50 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 55 <223> Sintética
- <400> 3
- 60 ataagaatgc ggccgctcag atgaacttg cga 34
- <210> 4
- <211> 251
- <212> PRT
- 65 <213> *Homo sapiens*
- <400> 4

ES 2 530 670 T3

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> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintética

<400> 5  
 tcttgtccac.cttggtgtg ctgggcttgt g

31

# ES 2 530 670 T3

5	<210> 6 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial  <220> <223> Sintética	
10	<400> 6 gttgaagctct ttgtgacggg cgagc	25
15	<210> 7 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial  <220> <223> Sintética	
20	<400> 7 gctggagggc acggtcacca cgc	23
25	<210> 8 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial  <220> <223> Sintética	
30	<400> 8 aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc	30
35	<210> 9 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial  <220> <223> Sintética	
40	<400> 9 gtaaacgac ggccagtg	18
45	<210> 10 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial  <220> <223> Sintética	
50	<400> 10 caggaaacag ctatgac	17
55	<210> 11 <211> 408 <212> ADN <213> Artificial  <220> <223> Sintética	
60	<400> 11	
65		

atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag ctccaggtgc tcactcccag 60  
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120  
 tgcaaggcat ctggatacac cttcaccaac cactatatgc actgggtgcg acaggcccct 180  
 ggacaagggc ttgagtggat gggataate aacctatta gtggtagcac aagtaacgca 240  
 cagaagttcc agggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 300  
 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgogag agatattgtg 360  
 gatgcttttg atttctgggg ccaagggaca atggtcaccg totcttca 408

5 <210> 12  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sintética  
 <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

ES 2 530 670 T3

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

5 <210> 13  
 <211> 384  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 13

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60  
 agatgtgcca tccagttgac ccagctcca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120  
 gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcttg gtatcagcag 180  
 aaaccagggg aagctcctaa gctcctgata tatgatgcct ccagtttggg aagtggggtc 240  
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300  
 cagcctgaag attttgaac ttattactgt caacagtta atgattaact cactttcggc 360  
 cctgggacca aagtggatat caaa 384

15 <210> 14  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<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

5 <210> 15  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 15  
 agagagagag atctctcacc atggacatga gggctccccgc t 41

15 <210> 16  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 16  
 agagagagag cgtacgttg atatccactt tggctcccagg gc 42

ES 2 530 670 T3

5	<210> 17 <211> 44 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintética	
10	<400> 17 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggt ctcc	44
15	<210> 18 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintética	
20	<400> 18 agagagagag gctagctgaa gagacgggta ccattgtccc	40
25	<210> 19 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintética	
30	<400> 19 ggtgccaggg ggaagaccga tgg	23
35	<210> 20 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintética	
40	<400> 20 ccaagggccc atcgtcttc cccctggcac	30
45	<210> 21 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 21 gacaccctca tgatctcccg gacc	24
60	<210> 22 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintética	
65	<400> 22 tgtctccgg ctgcccattg ctct	24

ES 2 530 670 T3

	<210> 23	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 23	
10	tctatataag cagagctggg tacgtcc	27
	<210> 24	
	<211> 26	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 24	
20	tggtgcacc atctgtcttc atcttc	26
	<210> 25	
	<211> 27	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
30	<400> 25	
	ggtacgtgaa ccgtcagatc gcctgga	27
	<210> 26	
35	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Sintética	
	<400> 26	
	cggaattcca ccatgttggg ggcccgcctc aggct	35
45	<210> 27	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 27	
55	attgcggcc gctagatgaa ctggcgaag gggc	34
	<210> 28	
	<211> 756	
	<212> ADN	
	<213> <i>Macaca fascicularis</i>	
60	<400> 28	

atgttggggg ccogootcag gctctgggtc tgtgcoittgt gcagcgtctg cagcatgagc 60  
 gtcatoagag cctatoccaa tgcctcccca ttgctcggct ccagctgggg tggcctgac 120  
 cacctgtaca cagccacagc caggaacagc taccacctgc agatccaca gaatggccac 180  
 gtggatggcg cacoccatca gaccatctac agtgccctga tgatcagac agaggatgct 240  
 ggctttgtgg tgattacagg tgtgatgagc agaagatacc totgcatgga tttcggaggc 300  
 aacatttttg gatcacacta tttcaaccg gagaactgca ggttccgaca ctggacgctg 360  
 gagaacggct acgacgtcta ccactctoct cagcatcact ttctggtcag tctgggccgg 420  
 gcgaagaggg ccttctgoc aggcataaac ccacccccct actcccagtt ootgtcccgg 480  
 aggaacgaga tccccctcat ccacttcaac acccccagac cacggcggca caccggagc 540  
 gccgaggacg actcggagcg ggaccccctg aacgtgctga agccccgggc ccggatgacc 600  
 ccggccccgg cctcctgctc acaggagctc ccgagcgcg aggacaacag ccoggtggcc 660  
 agcgaccctg taggggtggt caggggcggt cgggtgaaca cgcacgctgg gggaacgggc 720  
 ccggaagcct gccgcccctt cgccaagttc atctag 756

5 <210> 29  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca fascicularis*

10 <400> 29



ES 2 530 670 T3

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

ES 2 530 670 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Sintética

<400> 30

gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag ctccagggtc 60  
 tcactcccag gtgcagotgg tgcagtctgg ggctgagggt aagaagcctg gggcctcagt 120  
 gaaggtttcc tgcaaggcat ctggatacac cttcaccaac cactatatgc actgggtgcg 180  
 acaggcccct ggacaagggc ttgagtggat ggaataatc aacctatta gtggtagcac 240  
 aagtaacgca cagaagttcc agggcagagt caccatgacc agggacaagt ccaogagcac 300  
 agtctacatg gagctgagca gctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgcgag 360  
 agatattgtg gatgcttttg atttctgggg ccaagggaca atggtaaccg tctcttcagc 420  
 tagcaccaag ggcccatcgg tcttcccctt gccaccctcc tccaagagca cctctggggg 480  
 cacagcggcc ctgggtgccc tggtaagga ctacttcccc gaaccggatga cgggtgctgtg 540  
 gaactcaggc gccctgacca gggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg 600  
 actctactcc ctcagcagcg tggtagcctg gccctccagc agcttgggca ccagacctc 660  
 catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa 720  
 atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaaactcc tggggggacc 780  
 gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaca ggacaccctc atgatctccc ggaccctga 840  
 ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtc 900

cgtggacggc gtggaggatc ataatgocaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 960  
 cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga 1020  
 gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa 1080  
 agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct 1140  
 gaccaagaac caggtcagcc tgacctgoot ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc 1200  
 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1260  
 ggactccgac ggtccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca 1320  
 gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggot ctgcacaacc actacacgca 1380  
 gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg aggatcc 1417

<210> 31  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintética

<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  
 226 230 235 240

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  
 305 310 315 320

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		400
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  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Sintética

<400> 32

agatctctca ccatggacat gaggtcccc gctcagctcc tggggcttet gctgctctgg	60
ctcccaggtg ccagatgtgc catccagttg acccagctct catctccct gtctgcatct	120
gtaggagaca gagtcaccat cacttgccgg gcaagtcagg gcattagcag tgctttagtc	180
tggtatcage agaaaccagg gaaagctcct aagctcctga tctatgatgc ctccagtttg	240
gaaagtgggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	300

atcagcagcc tgcagcctga agattttgca acttattact gtcaacagtt taatgattac 360  
 ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaacgta cggctggctgc accatctgtc 420  
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480  
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540  
 togggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600  
 agcagcacc c tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660  
 gtcacccata agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 720  
 attc 724

<210> 33  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintética

<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



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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 34  
 <211> 35

ES 2 530 670 T3

<212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 34  
 tatcccaatg cctccccact gctcggctcc agctg 35

10 <210> 35  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 35  
 ttggccggcc ctgatgaac ttggcgaagg ggcggcagcc ttccg 45

20 <210> 36  
 <211> 756  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 36

atgttggggg cccgcctcag gctctgggto tgtgcottgt gcagcgtctg cagcatgagc 60

gtcctcagag cctatcccaa tgcctcccca ctgctcggtt ccagctgggg tggcctgac 120

cacctgtaca cagccacagc caggaacage taccactgac agatecaca gaatggccat 180

gtggatggcg caccocatca gaccatctac agtgccttga tgatcagac agaggatgct 240

ggctttgtgg tgattacagg tctgatgagc agaagatacc tctgcatgga tttagaggc 300

aacatttttg gatcacacta tttagaccog gagaactgca ggttccaaca ccagacgctg 360

gaaaacgggt acgacgtota ccactctcct cagtatcact tcttggtcag tctgggcccg 420

gcgaagagag ccttctctgc aggcataaac ccaccccgt actcccagtt cctgtcccgg 480

aggaacgaga tccccctaat tcacttcaac acccccatac cagggggca caccggagc 540

gccgaggacg actoggagcg ggaccccctg aacgtgctga agcccgggc ccggatgacc 600

ccggcccggg cctcctgttc acaggagctc ccgagcgcg aggacaacag cccgatggcc 660

agtgaccat taggggtgt cagggcggt cgagtgaaca cgcacgctgg ggaacgggc 720

ccggaaggct gcccccctt cgccaagttc atctag 756

25 <210> 37  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30 <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> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 38

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg tgagagtgca 60  
 gagaagtgtt ggatgcaacc tctgtggcca ttatgatact ccatgcctct ctgttcttga 120  
 tcactataat tagggcattt gtcactggtt ttaagtttcc ccagtcacct gaattttcca 180  
 ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta aataaaaagg tcctctgctg 240  
 tgaaggcttt tatacatata taacaataat ctttgtgttt atcattccag gttccactgg 300  
 ctatccaat gcctccccac tgctcggctc cagctggggt ggootgatcc acctgtacac 360  
 agccacagcc aggaacagct accacotgca gatccacaag aatggccatg tggatggcgc 420  
 accccatcag accatetaca gtgccctgat gatcagatca gaggatgctg gotttgtgtg 480  
 gattacaggt gtgatgagca gaagatacct ctgcatggat ttcagaggca acatttttgg 540  
 atcacactat ttcgacccgg agaactgcag gttccaacac cagacgctgg aaaacgggta 600  
 cgacgtctac cactctcttc agtatoactt cctggtcagt ctgggccggg cgaagagagc 660  
 ctctctgcca ggcatgaacc caccccgta ctcccagtte ctgtcccgga ggaacgagat 720  
 cccctaatt caottcaaca ccccatacc acggcggcac acccggagcg cogaggacga 780  
 ctcggagcgg gacccccgta acgtgtgaa gccccgggcc oggatgacco cggccccggc 840  
 ctctgttca caggagctcc cgagcgcga ggacaacagc ccgatggcca gtgaccatt 900  
 aggggtggtc aggggcggtc gagtgaacac gcacgctggg ggaacgggoc cggaaggctg 960  
 ccgccccttc gccaaagtta tctag 985

<210> 39  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<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

ES 2 530 670 T3

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											

5 <210> 40  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 40

Asn His Tyr Met His  
1 5

15 <210> 41  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Sintética

<400> 41

Ile Ile Asn Pro Ile Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

**Gly**

5 <210> 42  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 42

**Asp Ile Val Asp Ala Phe Asp Phe**

1 5

15 <210> 43  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 43

**Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Val**

1 5 10

25 <210> 44  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

<400> 44

**Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser**

1 5

35 <210> 45  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

45 <400> 45

**Gln Gln Phe Asn Asp Tyr Phe Thr**

1 5



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S en la posición 136 de SEC ID N° 12 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos desde A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14.
- 10 2. El anticuerpo frente a FGF23 o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada mostrada por una secuencia de aminoácidos desde Q en la posición 20 hasta S en la posición 136 de SEC ID N° 12 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada por una secuencia de aminoácidos desde A en la posición 23 hasta K en la posición 128 de SEC ID N° 14.
- 15 3. El anticuerpo frente a FGF23 o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho fragmento funcional es un fragmento de péptido seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), región V dimerizada (dianticuerpo) y Fv de cadena individual (scFv).
- 20 4. El anticuerpo frente a FGF23 humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la clase del anticuerpo es IgG, IgA, IgE, o IgM.
- 25 5. El anticuerpo frente a FGF23 humano de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la subclase del anticuerpo es IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.
- 30 6. Composición farmacéutica, que comprende como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 35 7. Composición farmacéutica para su uso en un método de control del metabolismo del fósforo y/o el metabolismo de la vitamina D mediante FGF23, que comprende, como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 40 8. Composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades que están asociadas con trastornos del metabolismo mineral que comprende como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la enfermedad que está asociada con los trastornos del metabolismo mineral se selecciona entre el grupo que consiste en osteomalacia neoplásica, ADHR, XLH, displasia fibrosa, síndrome de McCune-Albright, e hipofosfatemia recesiva autosómica.
- 45 9. Composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en osteoporosis, raquitismo, hipocalcemia, calcificación heterotrópica, osteoesclerosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo, y prurito, comprendiendo la composición como ingrediente activo, el anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 50 10. Ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de bases desde C en la posición 58 hasta A en la posición 408 representada por SEC ID N° 11, y un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de bases desde G en la posición 67 hasta A en la posición 384 representada por SEC ID N° 13.
- 55 11. Vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Célula huésped aislada que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Método para producir un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano, que comprende la etapa de cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 12 para expresar un anticuerpo frente a FGF23 humano o un fragmento funcional del mismo frente a FGF23 humano.

Fig: 1

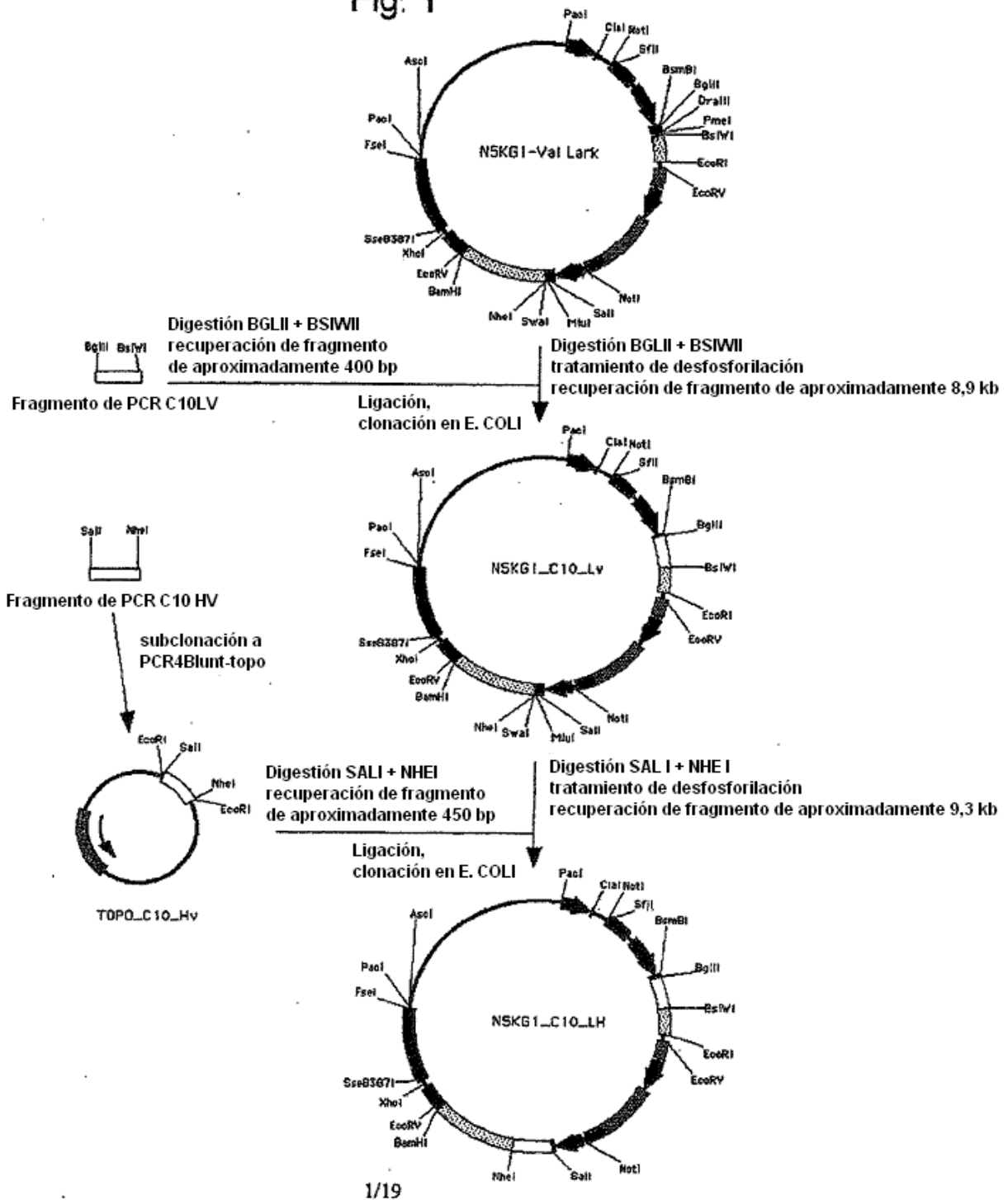


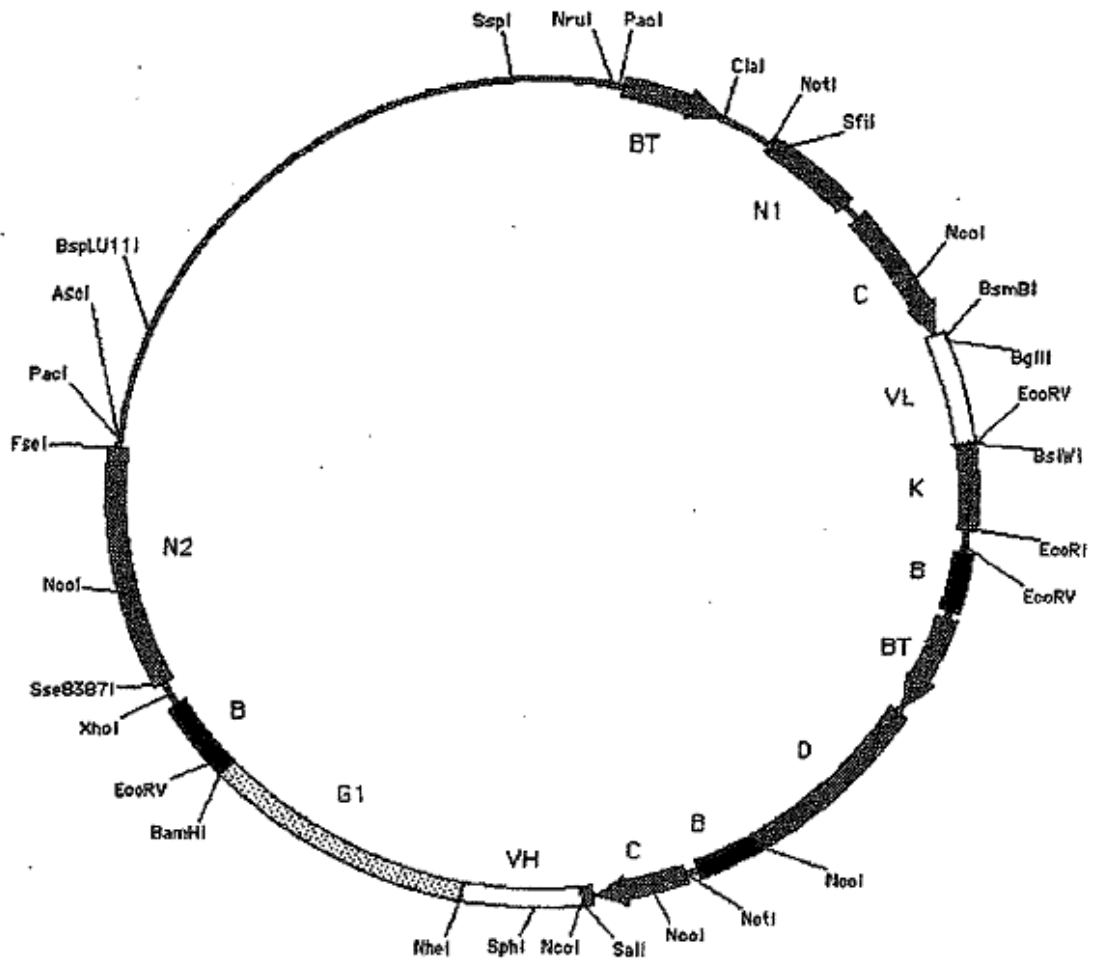
Fig. 2

Salt  
 † 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 AGR GTC ACC ATG ACC AAG GAC ACG TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC  
 63‡ F Q G R V T M T R D T S T S T V Y M E L S  
 BglII  
 328 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 ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC  
 125‡ F W G Q G T M V T V S S A S T K G P S V F  
 446 CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG ACC 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 AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GCC CTG 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  
 180‡ 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 CCG 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 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 Q F S V F L F P P K P K D T L M  
 824 ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC 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 CGG 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 CBT 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 CGG 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 O 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  
 461‡ S L S P G K

Fig. 3

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 GST 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 AAG 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 AAG GGA GAG TGT TGA ATTC  
 228 K S F N R G E C

Fig. 4



- BT: Promotor principal de beta globulina de ratón
- N1: Exón 1 de neomicina fosfotransferasa
- C: Promotor/potenciador de citomegalovirus
- B: Poladenilación de hormona de crecimiento bovina
- VL: Región variable de cadena ligera de C10
- K: Región constante kappa de inmunoglobulina humana
- D: Dihidrofolato reductasa
- VH: Región variable de cadena pesada de C10
- G1: Región constante gamma 1 de inmunoglobulina humana
- N2: Exón 2 de neomicina fosfotransferasa

Fig. 5A

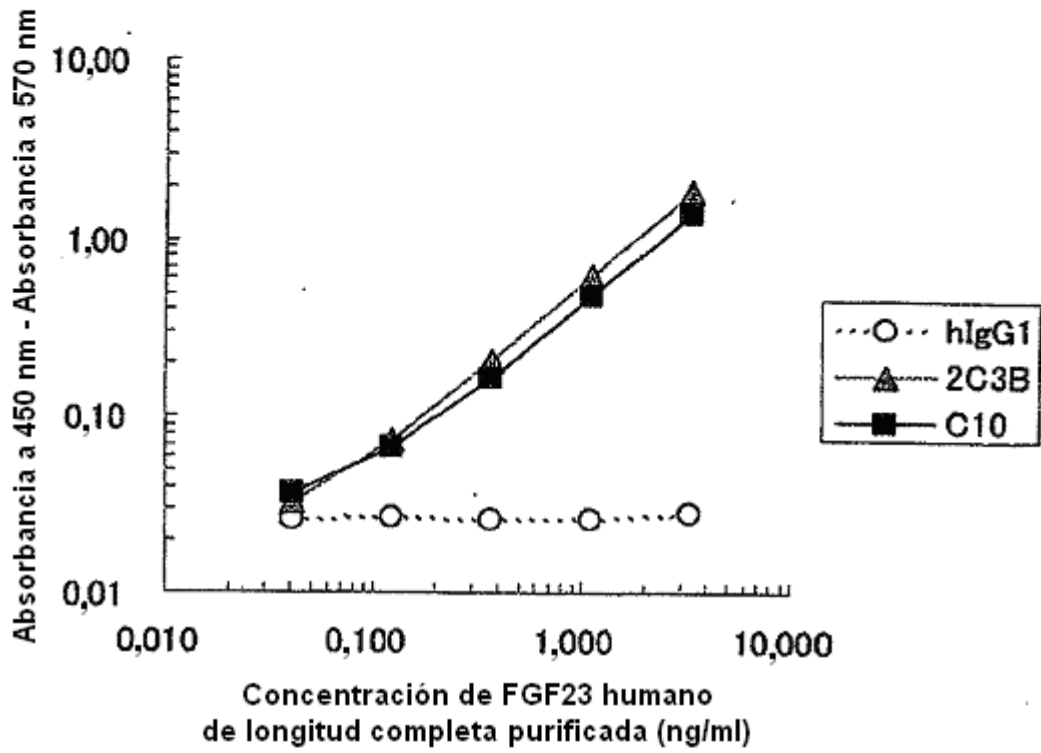


Fig. 5B

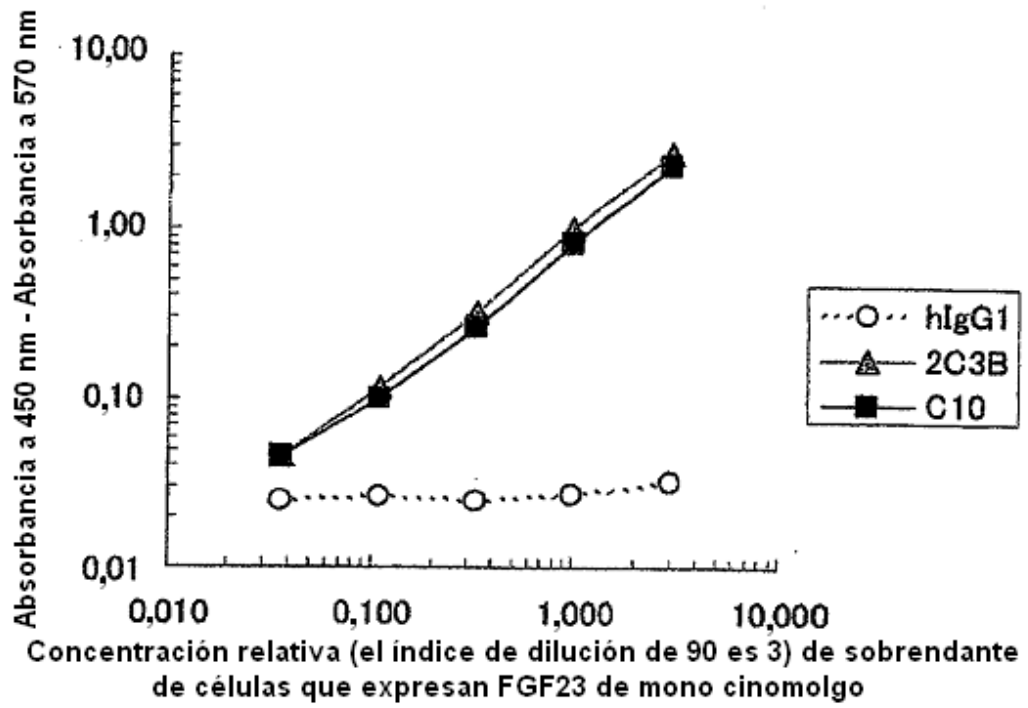
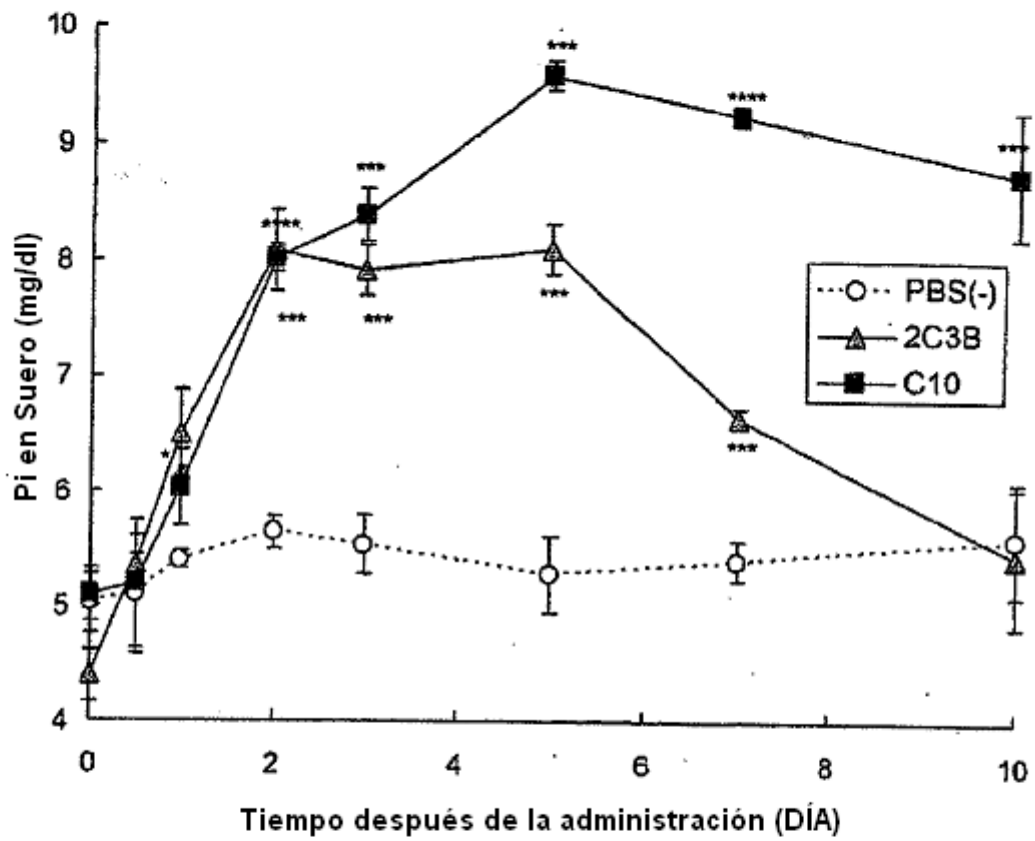


Fig. 6



\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

\*\*\* p < 0,005

\*\*\*\* p < 0,001

t-student



Fig. 7

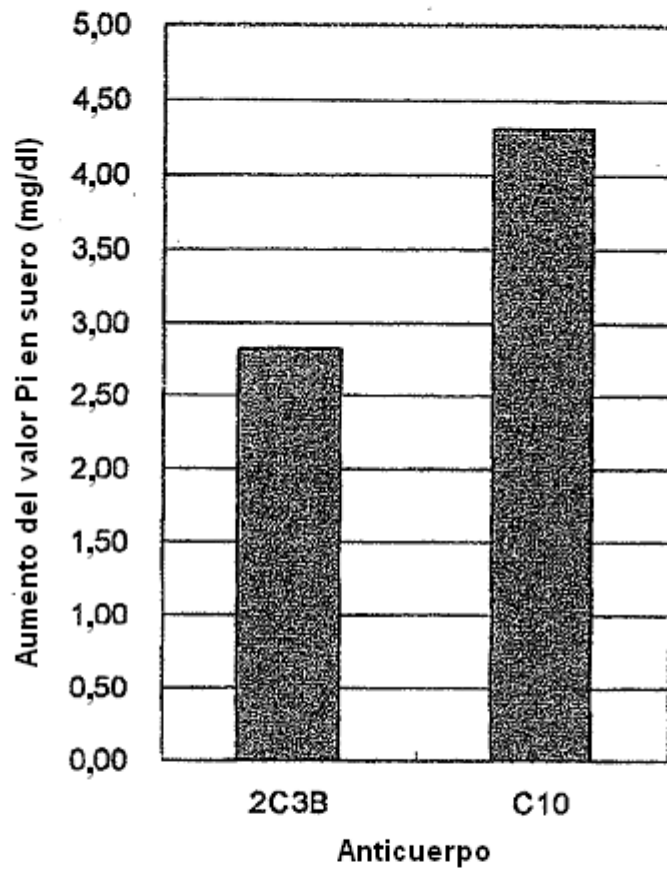
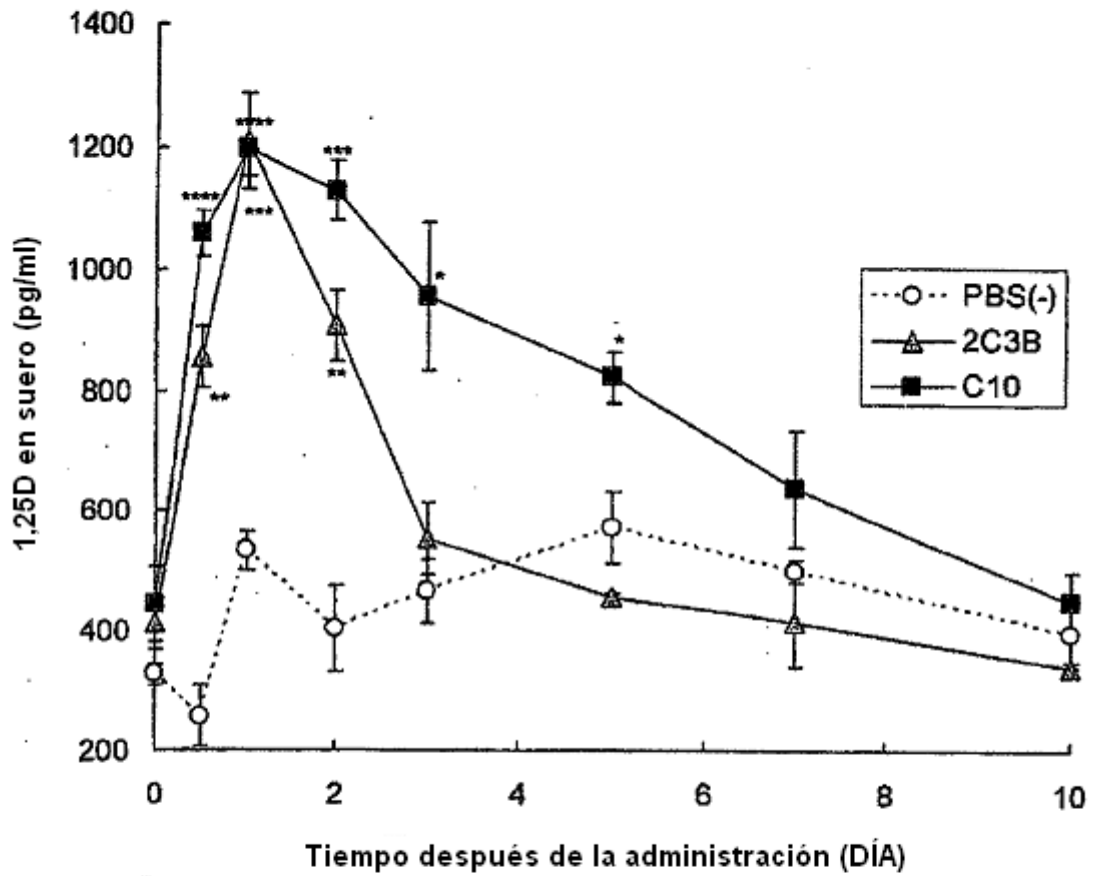


Fig. 8



\* p<0,05  
 \*\* p<0,01  
 \*\*\* p<0,005  
 \*\*\*\* p<0,001  
 t-student

Fig. 9

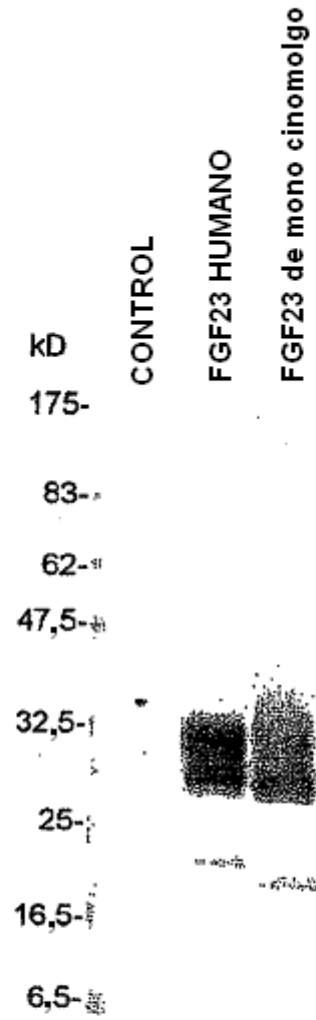


Fig. 10

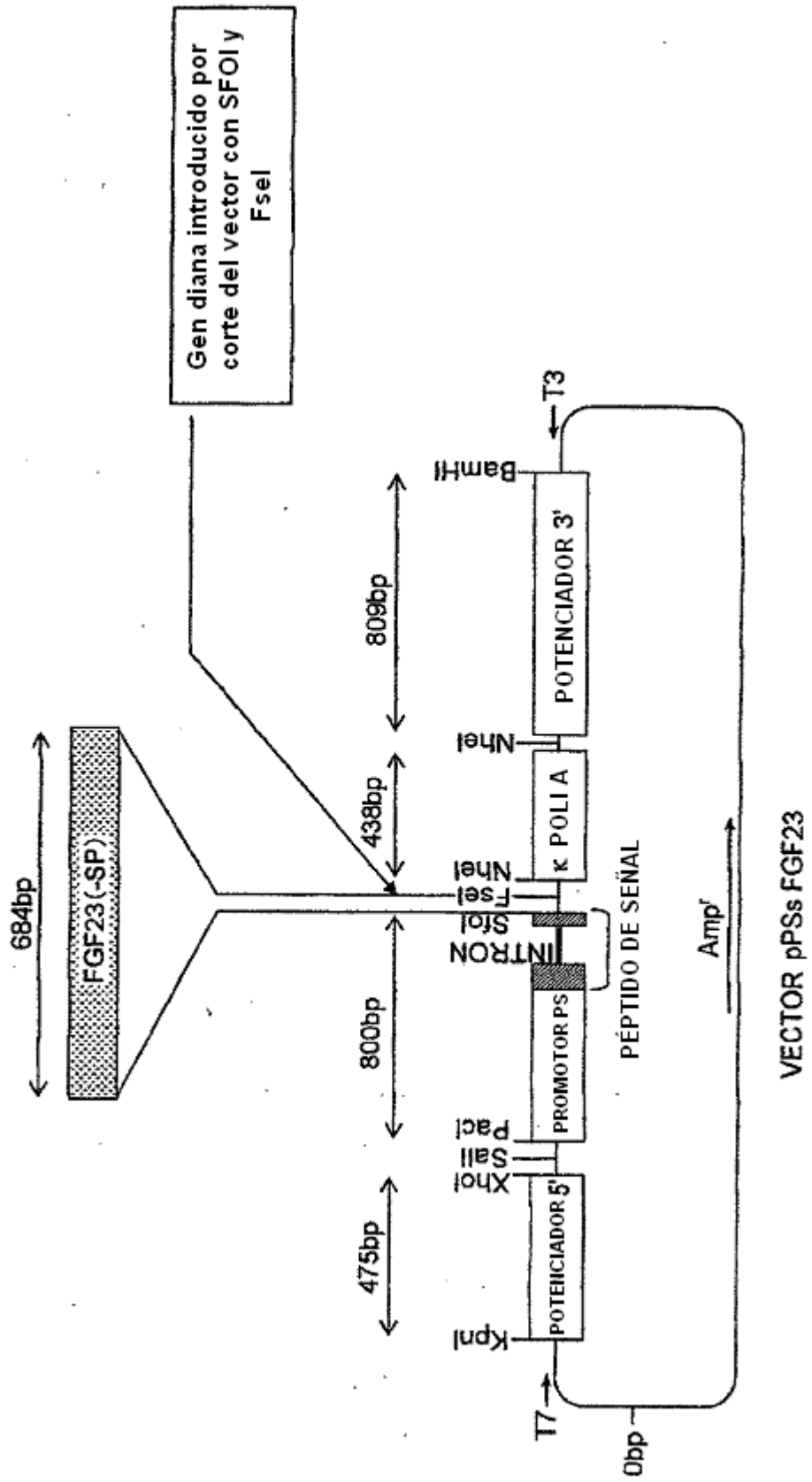


Fig. 11

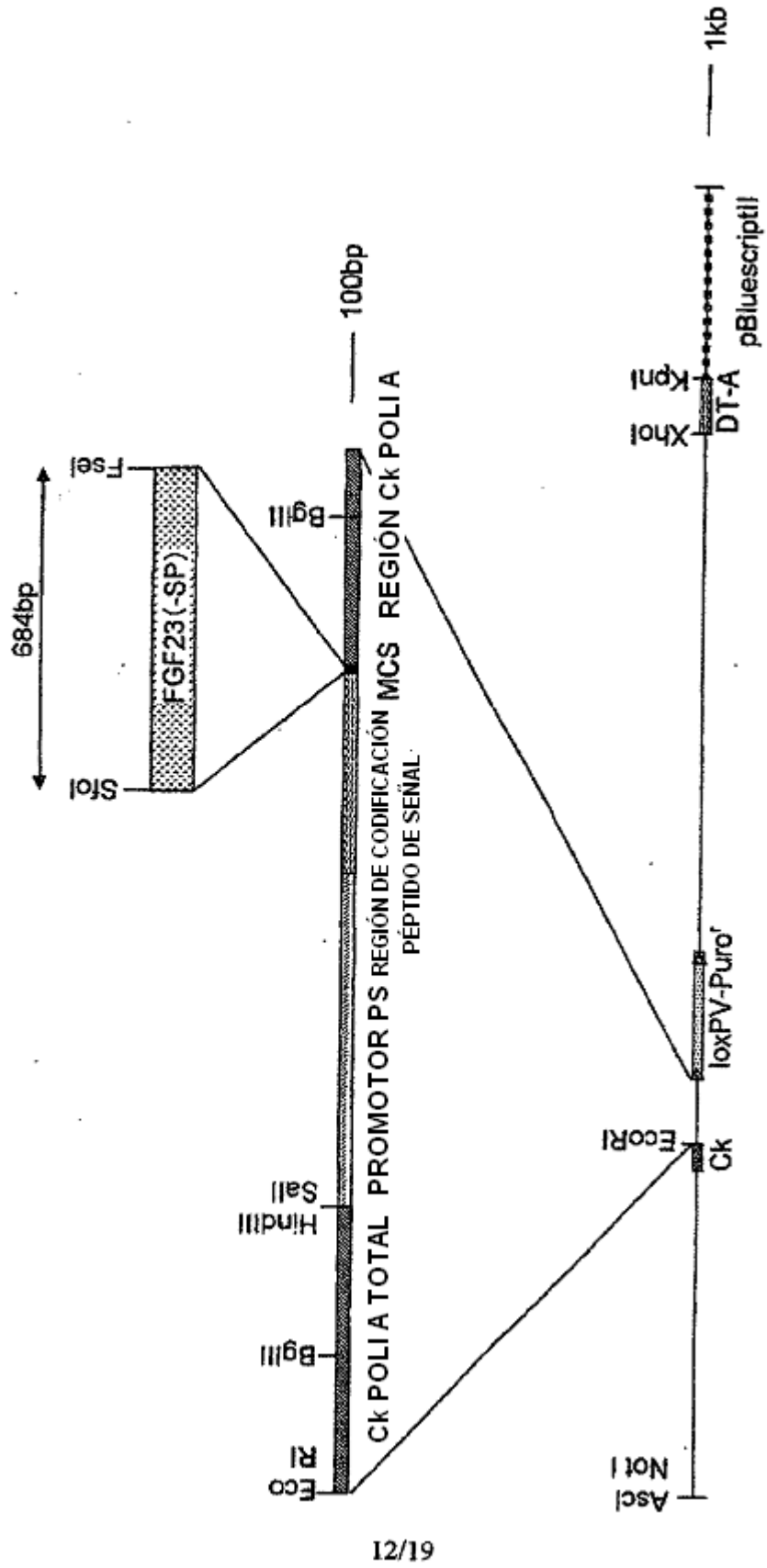


Fig. 12

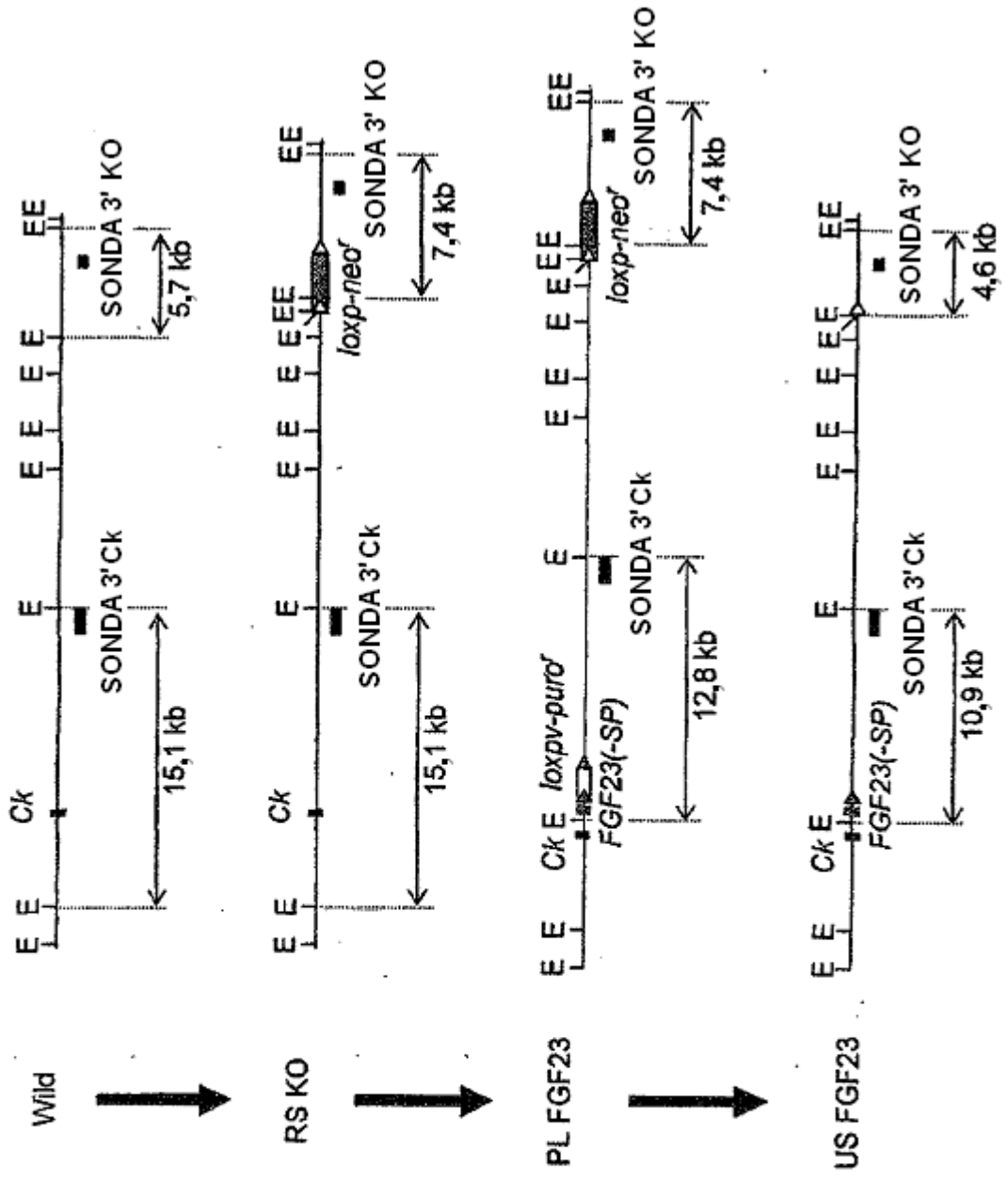


Fig. 13

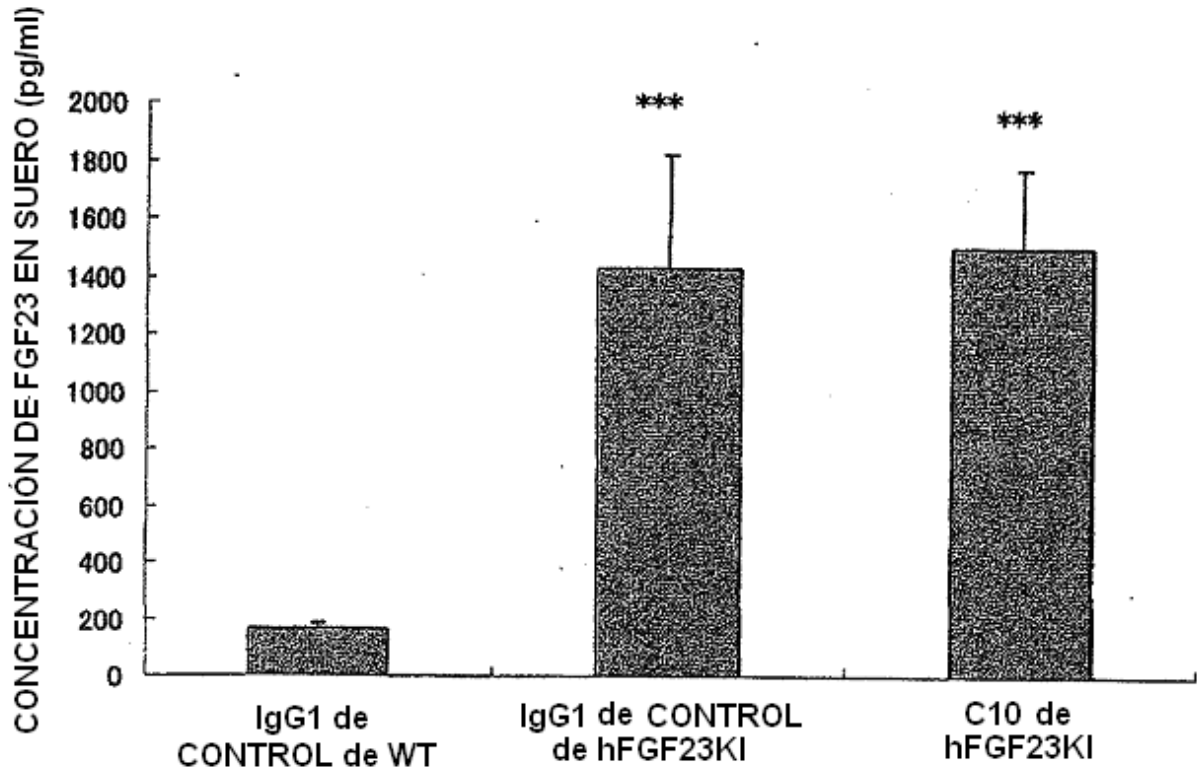


Fig. 14

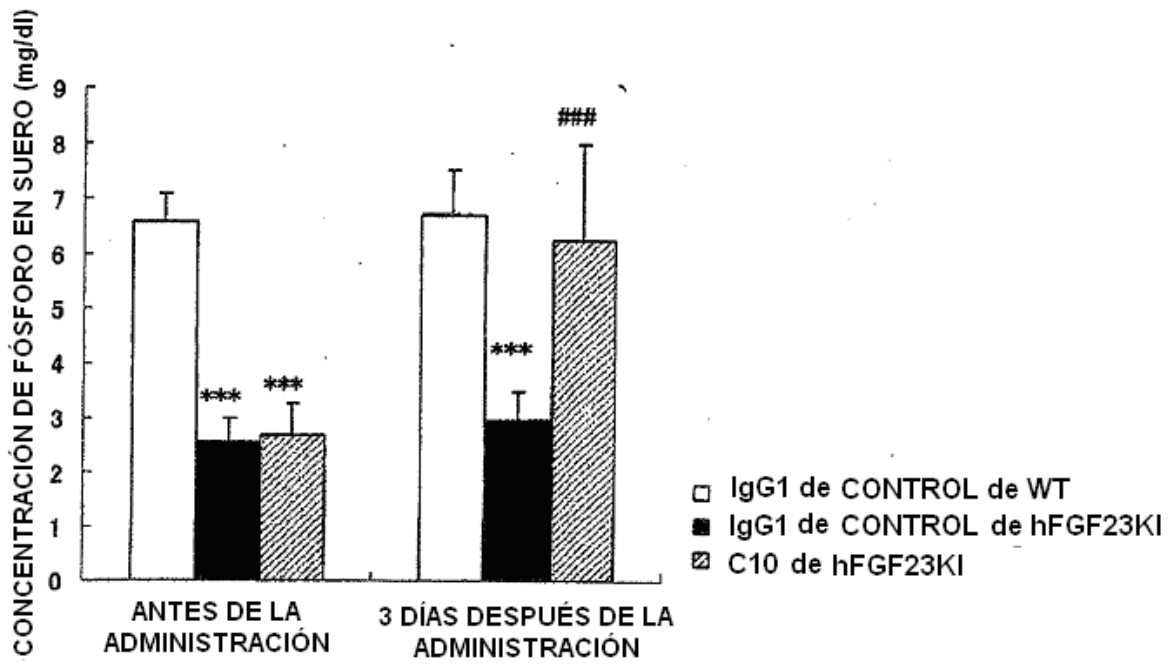




Fig. 15

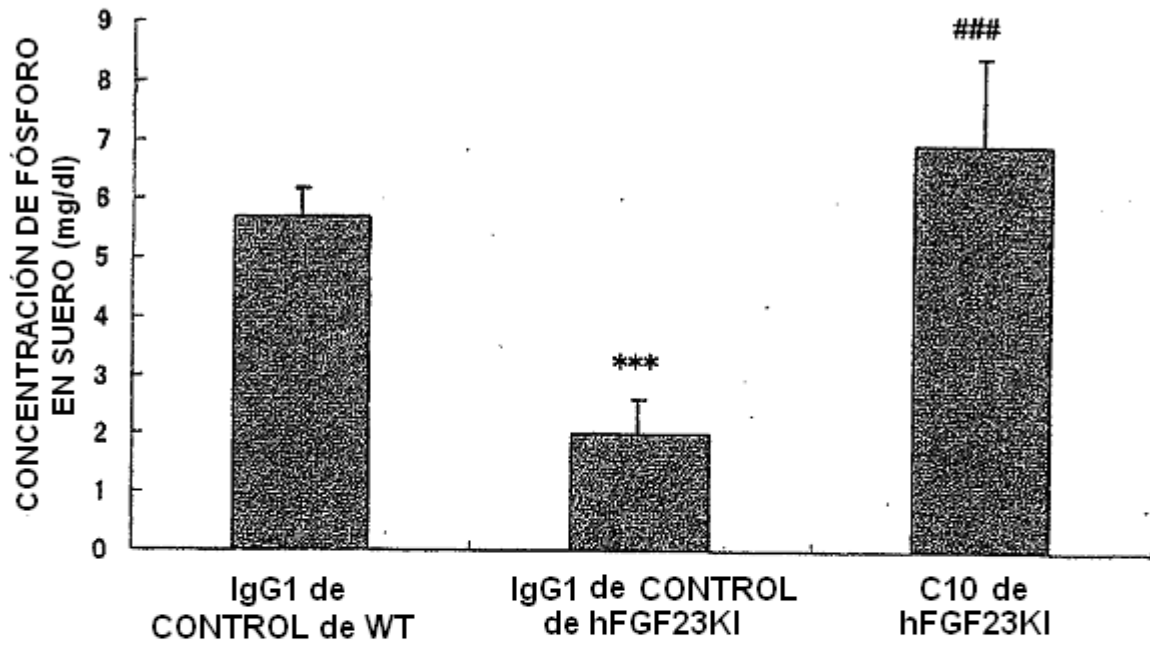


Fig. 16

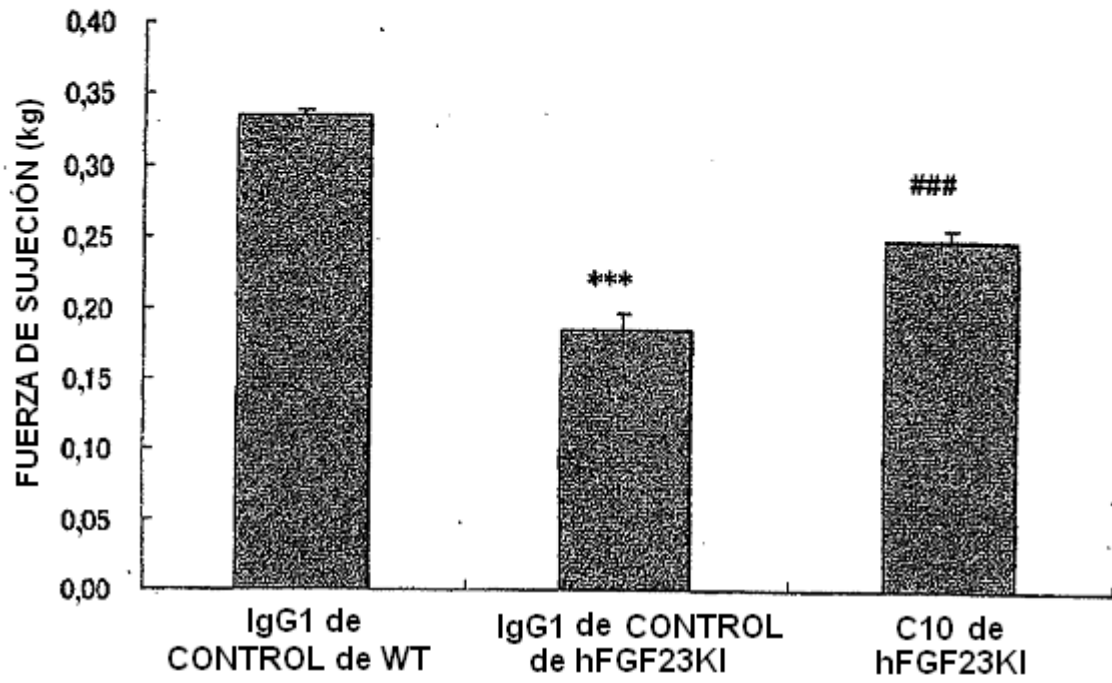


Fig. 17

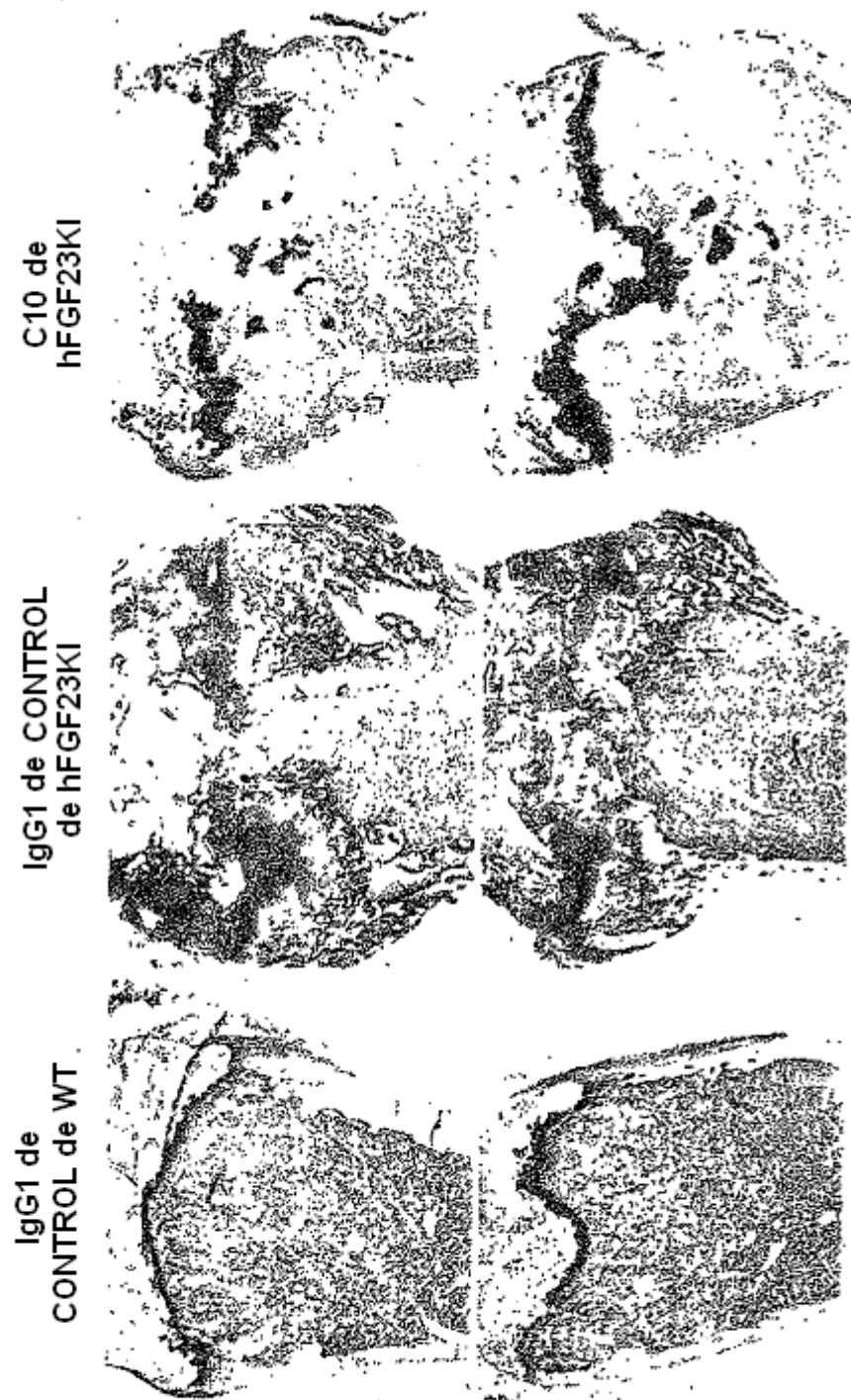


Fig. 18

