



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2128253 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

C07K 16/24 (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)
C12N 15/09 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.05.11
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.12.03
(86)	Europeisk søknadsnr	08711707.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.02.14
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.12.02
(30)	Prioritet	2007.02.14, JP, 2007034018
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd., 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP-Japan
(72)	Oppfinner	YAMAZAKI, Yuji, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP-Japan URAKAWA, Itaru, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP-Japan YOSHIDA, Hitoshi, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP-Japan AONO, Yukiko, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP-Japan YAMASHITA, Takeyoshi, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP-Japan SHIMADA, Takashi, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP-Japan HASEGAWA, Hisashi, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP-Japan
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	ANTI-FGF23-ANTISTOFF OG FARMASØYTISK SAMMENSETNING OMFATTENDE SAMME
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-02/08271, WO-A1-03/057733, WO-A2-02/088358 SHIMADA T: "Possible roles of fibroblast growth factor 23 in developing X-linked hypophosphatemia" CLINICAL PEDIATRIC ENDOCRINOLOGY 2005 JP, vol. 14, no. SUPPL. 23, 2005, pages 33-37, XP002565931 YAMAZAKI Y ET AL: "Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, ENDOCRINE SOCIETY, CHEVY CHASE, MD, vol. 87, no. 11, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 4957-4966, XP002983510 ISSN: 0021-972X SHIMADA T.: 'FGF23 Phosphorus Taisha' THE JAPANESE SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH GAKUJUTSU SHUKAI PROGRAM SHOROKUSHU vol. 23, 20 June 2005, page 121, XP008142218 AONO Y. ET AL.: 'Hyp Mouse no Tei-Phosphorus Kessho Oyobi Kurubyo ni Taisuru Ko-FGF23 Chuwa Kotai no Kaizen Sayo' THE JAPANESE SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH GAKUJUTSU SHUKAI PROGRAM SHOROKUSHU vol. 22, August 2004, page 137, XP008142219

ANTI-FGF23-ANTISTOFF OG FARMASØYTISK SAMMENSETNING

OMFATTENDE SAMME

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

5

Oppfinnelsens område

The Den foreliggende oppfinnelsen vedrører et anti-FGF23-antistoff som spesifikt binder til et FGF23-antigen. Den foreliggende oppfinnelsen vedrører videre en sammensetning for forebygging eller behandling av mineralmetabolismesykdommer som følger av for høy produksjon av FGF23 eller andre årsaker, omfattende som en aktiv ingrediens anti-FGF23-antistoffet. Den foreliggende oppfinnelsen vedrører et middel for behandling av hypofosfatemisk rakitt og osteomalasi.

15

Faglig bakgrunn

Fibroblastvekstfaktor ble først rensset fra kalvehypofyse som en substans som stimulerer økningen av fibroblastcellelinje NIH3T3. Siden den gangen har lignende proteiner blitt identifisert i forskjellig vev, og en gruppe av substansene omfatter en polypeptidfamilie (FGF-familie). Inntil nå har 22 proteiner blitt identifisert hos virveldyr som tilhørende FGF-familien. Med hensyn til disse proteinenes biologiske aktivitet har de ikke bare fibroblastvekstaktivitet, men disse proteinene er også kjent å ha forskjellige aktiviteter, slik som vekst av mesoblast og nevroektoderm, og angiogenesevirkning og lemdannelse på utviklingsstadiet. FGF er også variert med hensyn til genekspresjonssted og -tid. De uttrykkes ofte kun ved visse steder, kun i utviklingsstadiet eller hos voksne. Det er kjent minst 4 gener som koder for FGF-reseptoren, FGFR1, FGFR2, FGFR3 og FGFR4. Med hensyn til FGFR1, FGFR2 og FGFR3 er det i tillegg kjent at det finnes reseptorproteiner for hver med forskjellige ekstracellulære domener på grunn av forskjeller i skjøting. Heparin- og heparansulfatproteoglykan er i tillegg kjent å kontrollere aktiviteten ved interaksjon med FGF og FGF-reseptorer. Det finnes i tillegg mange som på grunn av strukturelle likheter tilhører FGF-familien, men hvis biologiske aktiviteter og reseptorbindende egenskaper og lignende ikke har vært kjent. FGF-familiens egenskaper er oppsummert i en gjennomgang av litteraturen (se Ornitz, D. et al., Genome biology, 2: 3005.1-3005.12, 2001).

FGF23 (kan generelt også representeres som FGF-23) ble innledningsvis klonet fra en mus gjennom et databasesøk ved anvendelse av homologi med FGF15 og PCR-metoden. Human FGF23 ble videre klonet ved anvendelse av sekvenshomologien FGF23 fra mus. Human FGF23 er et polypeptid med 251 aminosyrerester. I tillegg predikeres det for sekresjonssignalsekvensen at en aminosyresekvens ved aminoterminalsiden på opptil 24 aminosyrer vil bli kløyyet ved tidspunktet for sekresjon (se Yamashita, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277: 494-498, 2000). I forskningen på autosomdominant hypofosfatemisk rakitt / osteomalasi (heretter henvist til som ADHR) ble den muterte genregionen avgrenset i ADHR-pasienter og med fremskritt i identifikasjonen av det ansvarlige genet, ble det oppdaget en feilregistrerende mutasjon i FGF23-genet, karakteristisk i ADHR-pasienter (se White, K.E. et al., *Nature Genet.*, 26: 345-348, 2000). Dette funnet ga viktige antydninger om at FGF23 er fysiologisk viktig i kroppen. På den annen side var det forskning på neoplastisk osteomalasi, som er én av hypofosfatemisk rakitt- og osteomalasisykdommene, som bestemte den biologiske aktiviteten til FGF23. I denne sykdommen er det skadelige neoplasma som produserer og skiller ut en væskesykdomsinitieringsfaktor, og det antas at slike patologier som hypofosfatem, osteomalasi og lignende forårsakes av den sykdomsinitierende faktoren. WO02/088358 gjelder FGF23-polypeptider og fremgangsmåter for anvendelse av peptider, agonister og antagonister for behandling av sykdommer.

I søken etter den sykdomsinitierende faktoren produsert av dette skadelige neoplasmaet, ble FGF23 klonet som et gen som overekspresjoneres i tumoren. Ved administrering av denne faktoren ble det vist at hypofosfatem og osteomalasi ble reprodusert (se Shirnada, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 6500-6505, 2001 og internasjonalt publikasjonsnr. WO02/14504-pamflett).

Basert på denne forskningen har det blitt vist at FGF23 er relatert til den metabole kontrollen relatert til fosfor og kalsium i kroppen. Det ble i tillegg foreslått at denne virker som en systemisk faktor som uttrykker virkningen ved sirkulasjon i kroppen. Senere forskning har videre vist at blodet hos pasienter med neoplastisk osteomalasi har en høyere verdi av FGF23-konsentrasjon sammenlignet med friske individer (se Yamazaki, Y. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87: 4957-4960, 2002 og Jonsson, K. B., et al., *N. Engl. J. Med.*, 348: 1656-1663, 2003).

X-bundet hypofosfatemisk rakitt (heretter henvist til som XLH) er en sykdom som med hensyn til kliniske funn er kjent å presentere på lignende måte som ADHR og neoplastisk osteomalasi. Også i denne sykdommen ble FGF23-konsentrasjonen i blodet vist å være ved en høy verdi (se Yamazaki, Y. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 87: 4957-4960, 2002 og Jonsson, K. B., et al., N. Engl. J. Med., 348: 1656-1663, 2003).

Årsaken til vitamin D-resistent rakitt og osteomalasi som observert i neoplastisk osteomalasi, XLH og lignende, var med andre ord tidligere ukjent, men den utskilte sykdomsforårsakende faktoren ble vist å være FGF23. Med hensyn til andre mineralmetabolismesykdommer, slik som fibrøs dysplasi, McCune-Albright-syndrom, autosom recessiv hypofosfatemisk rakitt og lignende, har videre høye konsentrasjoner av FGF23 i blodet vært rapportert å være forbundet med hypofosfatemi og rakitt og osteomalasi (se 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, B. et al., Nat. Genet., 38: 1248-1250, 2006). WO02/08271 gjelder nyskapende FGF23-nukleinsyrer og -proteiner, samt fremgangsmåter for diagnostisering og behandling av hypofosfatemi og hypofosfatemiske sykdommer.

På grunnlag av den ovennevnte rapporten har tilstanden med for mye FGF23 i kroppen blitt vist å indusere hypofosfatemi og de medfølgende rakittene og osteomalasi og lignende. For kronisk nyreinsuffisienshyperfosfatemi har det videre vært rapportert unormalt høye serumverdier for FGF23. For mye FGF23 har vært foreslått muligens å være relatert til en del av mineralmetabolismesykdommene under nyreinsuffisiens (se Gupta, A. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 89: 4489-4492, 2004 og Larsson, T. et al., Kidney Int., 64: 2272-2279, 2003). Med hensyn til induksjon av disse sykdommene på grunn av for mye FGF23 antas hemming av virkningen av FGF23 eller fjerning av FGF23 å være en mulig måte å behandle sykdommene på. Shimada et al. (2005, Clin Ped Endocrin, 14:33-37) rapporterer flere mus-anti-FGF23-antistoff som hevdes å nøytralisere endogen FGF23-virkning hos mus og rotte. Inntil nå har anti-FGF23 monoklonalt antistoff fra mus vært rapportert å være en måte å hemme virkningen av FGF23 (se Yamashita, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 277: 494-498, 2000). Når det monoklonale anti-FGF23-antistoffet 2C3B og 3C1E anvendt i denne rapporten, ble administrert til normale mus, ble

- funksjonen av endogent FGF23 hos mus hemmet og fosforutskillingen fra nyren ble undertrykket. Ved fluktuering av ekspresjonen av vitamin D-metaboliserende enzym i nyren ble dette vist å resultere i økte konsentrasjoner av fosfor og 1 α , 25 dihydroksyvitamin D (heretter henvist til som 1,25D) i serumet. Gjentatt administrering av anti-FGF23-monoklonalt antistoff fra mus ble videre utført på Hyp-mus, som er en modellmus for XLH som har en høy serumkonsentrasjon av FGF23 og har hypofosfatemi og har beinforlengingsdysfunksjon og kalsifiseringsdysfunksjon. I Hyp-musene ble det som et resultat observert en økning i fosforkonsentrasjonen i blodet, og i tillegg var det forbedringer i beinforlengingsdysfunksjonene og kalsifiseringsdysfunksjonen. Fra disse resultatene ble anvendelsene av FGF23-aktivitetshemmende antistoff antatt å være egnet som en medisin for sykdommer hvor det forekommer for mye FGF23. 2C3B- og 3C1E-antistoffene anvendt i denne rapporten, er imidlertid antistoff avledet fra mus. Antistoff avledet fra mus som gjenkjennes som fremmed av human vert, initierer en såkalt «human anti-mus antistoff» (med andre ord HAMA)-respons, og det kan forekomme situasjoner hvor det observeres alvorlige bivirkninger (se Van Kroonenbergh, M. J. et al., Nucl. Med. Commun 9: 919-930, 1988).
- For å unngå denne typen problemer var én tilnærming å utvikle et kimært antistoff (se europeisk patentpublikasjon, publikasjonsnr. 120694, spesifikasjon, og europeisk patentsøknadsnr. 125023, spesifikasjon). Kimære antistoff inkluderer en porsjon antistoff avledet fra 2 eller flere arter (f.eks. variabel region av mus-antistoffet og den konstante regionen av det humane antistoffet og lignende). Fordelen med denne typen kimært antistoff er at bindingen til antistoffet som var karakteristisk for det opprinnelige mus-antistoffet bevares, men på den andre siden induseres likevel en «human-anti-kimær-antistoff» (med andre ord «HACA»)-respons (se Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med., 170: 2153-2157, 1989).
- Et rekombinant antistoff har videre blitt utviklet, hvor kun en porsjon av det substituerte antistoffet er en komplementaritetsdeterminerende region (CDR) (se britisk patentnummer GB2188638A, spesifikasjon og amerikansk patentnummer 5585089, spesifikasjon). Ved anvendelse av CDR-transplantasjonsteknologi ble det fremstilt et antistoff bestående av mus-CDR, rammeverket fra den humane variable regionen og konstante regionen (med andre ord «humanisert antistoff») (se Riechmann, L. et al., Nature, 332: 323-

327, 1988). Det har vært kjent at ved anvendelse av denne fremgangsmåten kan anti-FGF23-antistoffet, slik som 2C3B-antistoffet, humaniseres ved substituering av mus-antistoffet med en human antistoffsekvens. Når humanisert er det imidlertid mulighet for at antigenets affinitet kan reduseres.

- 5 For den nåværende behandlingen av hypofosfatemisk rakitt i XLH og lignende er i tillegg den vanligste fremgangsmåten regelmessig, oral administrering av vitamin D-formulering og fosforsyre. Det er imidlertid et problem at pasientene påføres en betydelig byrde på grunn av størrelsen på hver dose og dosehyppighet per døgn. For å kunne redusere byrden for pasientene og deres
- 10 familier er det derfor ønskelig med et legemiddel for behandlingen av hypofosfatemi som viser en langtidsvarende virkning i å øke serumfosfatkonsentrasjon og serum 1,25D-konsentrasjon, for å kunne forlenge tiden mellom dosene.

15 **KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN**

- Målet med den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe et humant antistoff mot FGF23 og tilveiebringe en farmasøytisk sammensetning til forebygging eller behandling med få bivirkninger ved anvendelse av antistoffet til å hemme
- 20 FGF23-aktiviteten og derved forebygge eller behandle sykdommen.

- Målet med den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe et antistoff som er et anti-FGF23-antistoff som kan anvendes som en behandlende medisin for hypofosfatemi, med en mer langvarig virkning som øker
- 25 serumfosfatkonsentrasjonen og konsentrasjonen av serum-1,25 med en enkelt dose sammenlignet med eksisterende anti-FGF23-antistoff. Et annet mål med den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe en farmasøytisk sammensetning, slik som et middel for forebygging eller behandling av en sykdom relatert til FGF23, ved anvendelse av dette antistoffet.

30

- Den vanligste behandlingsmetoden for hypofosfatemisk rakitt er for tiden oral administrering av vitamin D-formulering sammen med fosfat, regelmessig flere ganger hver dag. På grunn av den store mengden i hver dose og hyppigheten av doser per døgn er det et problem at pasientene påføres en stor byrde. Det
- 35 anti-FGF23 humane monoklonale antistoffet, C10-antistoffet, oppnådd ved den foreliggende oppfinnelsen, vises å ha mer vedvarende økende virkning for fosfatkonsentrasjonen i blodet og 1,25-konsentrasjonen, med andre ord en

kraftigere FGF23-nøytraliserende aktivitet. Med en enkelt administrering av C10-antistoffet i den foreliggende forskningen ble det observert en vedvarende økende aktivitet for serumfosfatkonsentrasjon og serumkonsentrasjonen av 1,25D. Dette antyder at sammenlignet med den nåværende behandlingen for

5 hypofosfatemie har C10-antistoffet potensial til å være en dramatisk overlegen behandling.

Den foreliggende oppfinnelsen er som følger.

[1] Et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot

10 human FGF23 omfattende en tungkjede aminosyresekvens omfattende en aminosyresekvens fra Q ved posisjon 20 til S ved posisjon 136 av SEQ IC NO: 12 og en lettkjede aminosyresekvens omfattende en aminosyresekvens fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14.

[2] Antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot

15 human FGF23 ifølge [1], omfattende en tungkjede aminosyresekvens vist av en aminosyresekvens fra Q ved posisjon 20 til S ved posisjon 136 av SEQ IC NO: 12 og en lettkjede aminosyresekvens vist av en aminosyresekvens fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14.

[3] Antistoffet mot FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human

20 FGF23 ifølge [1], hvori det funksjonelle fragmentet er et peptidfragment valgt fra gruppen bestående av Fab, Fab', F(ab')₂, disulfidstabilisert Fv (ds Fv), dimerisert V-region (dialegame) og enkeltkjede-Fv (scFv).

[4] Antistoffet mot human FGF23 ifølge én av [1]–[3], hvori antistoffklassen er IgG, IgA, IgE eller IgM.

25 [5] Antistoffet mot human FGF23 ifølge [4], hvori underklassen av antistoffet er IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4.

[6] En farmasøytisk sammensetning omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 ifølge én av [1]–[5].

30 [7] En farmasøytisk sammensetning for anvendelse i en metode for kontroll av fosformetabolisme og/eller vitamin D-metabolisme av FGF23, omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 ifølge én av [1]–[5].

[8] En farmasøytisk sammensetning for anvendelse i forebyggingen eller

35 behandlingen av sykdommer forbundet med mineralmetabolismelidelser, omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 ifølge én av [1]–[5], hvori

sykdommen som er forbundet med mineralmetabolismelidelser, velges fra gruppen bestående av neoplastisk osteomalasi, ADHR, XLH, fibrøs dysplasi, McCune-Albright-syndrom og autosom recessiv hypofosfatemi.

[9] En farmasøytisk sammensetning for anvendelse i forebyggingen eller
5 behandlingen av en sykdom valgt fra gruppen bestående av osteoporose, rakitt, hypokalsemi, heterotrop kalsifisering, osteosklerose, Pagets sykdom, hyperparatyroidisme og pruritt, hvor sammensetningen omfatter som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 som beskrevet i én av [1]–[5].

10 [10] En nukleinsyre kodende for antistoffet ifølge [1], omfattende en nukleinsyre som koder for en aminosyresekvens for en variabel tungkjederegion kodet av en basesekvens fra C ved posisjon 58 til A ved posisjon 408 representert av SEQ ID NO: 11 og en nukleinsyre som koder en aminosyresekvens av en variabel lett kjederegion kodet av en basesekvens fra
15 henholdsvis G ved posisjon 67 til A ved posisjon 384 representert av SEQ ID NO: 13.

[11] En vektor omfattende nukleinsyren ifølge [10]

[12] En isolert vertscelle omfattende vektoren ifølge [11].

[13] En fremgangsmåte for produksjon av et antistoff mot human FGF23 eller
20 et funksjonelt fragment derav mot human FGF23, omfattende trinnet med dyrking av vertscellen ifølge [12] for å uttrykke et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også:

25 [1] Et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav, omfattende en variabel tungkjederegion og/eller en variabel lett kjederegion av et antistoff produsert av hybridom C10 (tilgangsnr. FERM BP-10772).

[2] Et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23, omfattende en tungkjede aminosyresekvens vist av en
30 aminosyresekvens fra Q ved posisjon 20 til S ved posisjon 136 av SEQ IC NO: 12 og/eller en lett kjede aminosyresekvens vist av en aminosyresekvens fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14.

[3] Et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav hvori:
antistoffet mot human FGF23 eller det funksjonelle fragmentet derav
35 inneholder en variabel tungkjederegion- og/eller en variabel lett kjederegionaminosyresekvens; og den variable tungkjederegionaminosyresekvensen vises av en aminosyresekvens fra Q ved

posisjon 20 til S ved posisjon 136 av SEQ ID NO: 12; og den variable lettkjedeaminosyresekvensen vises av en aminosyresekvens fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14.

[4] Et antistoff mot human FGF23 produsert av hybridom C10 (tilgangsnr. 5 FERM BP-10772) eller et funksjonelt fragment derav.

[5] Et antistoff eller et funksjonelt fragment derav som binder til alle eller deler av epitopen på human FGF23, som et antistoff produsert av hybridom C10 (tilgangsnr. FERM BP-10772) binder til.

[6] Antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav, 10 omfattende en variabel tungkjederegion av [3] ovenfor med én av de komplementaritetsdeterminerende regionene (CDR) 1 vist av aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 40, CDR2 vist av aminosyresekvens SEQ ID NO: 41, CDR3 vist av aminosyresekvens SEQ ID NO: 42 eller en variabel tungkjederegion av [3] ovenfor med alle ovennevnte.

[7] Antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav, 15 omfattende en variabel lettkjederegion av [3] ovenfor med én av CDR 1 vist av aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 43, CDR2 vist av aminosyresekvens SEQ ID NO: 44, CDR3 vist av aminosyresekvens SEQ ID NO: 45, eller en variabel lettkjederegion av [3] ovenfor med alle ovennevnte.

[8] Et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav, hvori 20 antistoffet mot human FGF23 eller det funksjonelle fragmentet derav inneholder en variabel tungkjederegion med én av de komplementaritetsdeterminerende regionene (CDR) 1 vist av aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 40, CDR2 vist av aminosyresekvens SEQ 25 ID NO: 41, CDR3 vist av aminosyresekvens SEQ ID NO: 42 eller en variabel tungkjederegion med alle de ovennevnte; og en variabel lettkjederegion med én av de komplementaritetsdeterminerende regionene (CDR) 1 vist av aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 43, CDR2 vist av aminosyresekvens SEQ ID NO: 44, CDR3 vist av aminosyresekvens SEQ ID NO: 45 eller en variabel 30 lettkjederegion med alle de ovennevnte.

[9] Antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav som 35 beskrevet i én av [1]–[8], hvori det funksjonelle fragmentet er et peptidfragment valgt fra gruppen omfattende Fab, Fab', F(ab')₂, disulfidstabilisert Fv (dsFv), dimerisert V-region (dialegame), enkeltkjede Fv (scFv) og CDR.

[10] Antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav, som beskrevet i én av [1]–[8] omfattende: en tungkjede og/eller lettkjede med en

aminosyresekvens i hvilken én eller flere aminosyrer slettes, substitueres eller legges til.

[11] Antistoffet mot human FGF23 som beskrevet i én av [1]–[10], hvori antistoffklassen er IgG, IgA, IgE eller IgM.

- 5 [12] Antistoffet mot human FGF23 som beskrevet i [11], hvori underklassen av antistoffet er IgG1 IgG2, IgG3 eller IgG4.

[13] En farmasøytisk sammensetning omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav som beskrevet i én av [1]–[12].

- 10 [14] En farmasøytisk sammensetning som kan kontrollere fosformetabolisme og/eller vitamin D-metabolisme fra FGF23 og omfatter, som en aktiv ingrediens, antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav som beskrevet i én av [1]–[12].

- [15] En farmasøytisk sammensetning for forebygging eller behandling av
15 sykdommer forbundet med mineralmetabolismelidelser omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav som beskrevet i én av [1]–[12].

- [16] Den farmasøytiske sammensetningen som beskrevet i [15], hvori sykdommen som er forbundet med mineralmetabolismeabnormiteter velges fra
20 gruppen bestående av neoplastisk osteomalasi, ADHR, XLH, fibrøs dysplasi, McCune-Albright-syndrom og autosom recessiv hypofosfatemi.

- [17] En farmasøytisk sammensetning for forebygging eller behandling av en sykdom valgt fra gruppen bestående av osteoperose, rakitt, hyperkalsemi, hypokalsemi, heterotrop kalsifisering, osteosklerose, Pagets sykdom,
25 hyperparatyroidisme, hypoparatyroidisme og pruritt, omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav som beskrevet i én av [1]–[12].

[18] Et hybridom C10 (tilgangsnr. FERM BP-10772).

- [19] Nukleinsyrer som koder for aminosyresekvens av en variabel
30 tungkjederegion kodet for av en basesekvens fra C ved posisjon 58 til A ved posisjon 408 representert av SEQ ID NO: 11.

[20] Nukleinsyrer som koder for en aminosyresekvens av en variabel lett-kjederegion kodet for av en basesekvens fra G ved posisjon 67 til A ved posisjon 384 representert av SEQ ID NO: 13.

- 35 [21] En vektor inneholdende nukleinsyren beskrevet i [19] eller [20].

[22] En vertscelle inneholdende vektoren beskrevet i [21].

[23] En fremgangsmåte for produksjon av et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav, omfattende trinnet med dyrking av vertscellen beskrevet i [22] for å uttrykke et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav.

5

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Fig. 1 er et skjematisk diagram av konstruksjonstrinnene for C10-ekspresjonsvektor.

10 Fig. 2 viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 30) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 31) av antistoffets tungkjedegen i N5KG1_C10_LH. Aminosyresekvens omgitt av en rektangulær linje representerer sekresjonssignalsekvensen (ledersekvensen).

Fig. 3 viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 32) og aminosyresekvensen (SEQ
15 ID NO: 33) av antistoffets lett kjedegen i N5KG1_C10_LH. Aminosyresekvens omgitt av en rektangulær linje representerer sekresjonssignalsekvensen (ledersekvensen).

Fig. 4 viser strukturen til C10-ekspresjonsvektoren.

Fig. 5A viser resultatet av målingen for detektering av rensset full-lengde
20 humant FGF23-protein ved sandwich-ELISA-metoden ved anvendelse av 2C3B-antistoff eller C10-antistoff som det immobiliserende antistoffet og 3C1E-antistoffet som deteksjonsantistoffet.

Fig. 5B viser resultatet av målingen for detektering av den dyrkede supernatanten av FGF23-uttrykkende celler fra cynomolgus-apekatt ved
25 sandwich-ELISA-metoden ved anvendelse av 2C3B-antistoff eller C10-antistoff som fastfaseantistoffet og 3C1E-antistoffet som deteksjonsantistoffet.

Fig. 6 er et diagram som viser kronologiske målinger av serumfosforkonsentrasjon hos cynomolgus-apekatter som fikk administrert løsemiddel, 2C3B-antistoff eller C10-antistoff. Målingsverdier vises i
30 gjennomsnitt +/- standardavvik. Når den løsemiddeladministrerte gruppen ble testet for signifikante forskjeller og testgruppene ble gjennomført på samme dato ved anvendelse av Student-test, ble verdier videre funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,05$), merket med * i diagrammet.

Fig. 7 er et diagram som viser en økning i serumfosforkonsentrasjon hos
35 cynomolgus-apekatter 5 dager etter administrering av 2C3B-antistoff eller C10-antistoff, basert på serumfosforkonsentrasjon av cynomolgus-apekatt 5 dager etter administreringen av løsemidlet som standard.

Fig. 8 er et diagram som viser kronologiske målinger av serum-1,25D-konsentrasjon i cynomolgus-apekatter administrert med løsemiddel, 2C3B-antistoff eller C10-antistoff. Målingsverdier vises i gjennomsnitt $\pm$ standardavvik. Når den løsemiddeladministrerte gruppen ble testet for

5 signifikante forskjeller og testgruppene ble gjennomført på samme dato ved anvendelse av Student-test, ble verdier videre funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,05$), merket med * i diagrammet.

Fig. 9 er et bilde som viser detektering av den dyrkede supernatanten av cellene uten tvunget ekspresjon (kontroll) og den dyrkede supernatanten av

10 human og cynomolgus-apekatt FGF23-ekspresjonsceller av C15-antistoff ved anvendelse av Western-blot-metoden.

Fig. 10 viser strukturen til pPSs FGF23-vektoren.

Fig. 11 viser strukturen til pUS FGF23 KI-vektoren.

Fig. 12 representerer en allelestruktur i hvilken det legemiddelresistente genet

15 (lovsp-neo^r) angripes, en allelestruktur i hvilken human FGF23 (-SP) + legemiddelresistensgen (lospv-puro^r) angripes ved anvendelse av pUS hFGF23 KI-vektoren, en allelestruktur i hvilken de legemiddelresistente genene (loxp-neo^r, loxpv-puro^r) slettes, og posisjonen på Southern-analyseproben. Begrepene som anvendes i figurene, beskrives i detalj som følger:

20 hFGF23 (-SP): Humant FGF23-gen uten noen spesifikk signalpeptidregion C_K: konstant region av murint Ig_K-gen, loxpv-puro: puromycin-resistent gen med loxpV-sekvens som er en delvis mutert loxP-sekvens ved begge endene derav, loxp-neo^r: neomycinresistent gen med loxP-sekvens ved begge endene derav, Ck3'-probe: Southern-blotting-analyseprobe for valg av kloner med hFGF23 (-

25 SP) + loxpv-puro^r-genet introdusert og med loxpv-puro^r-genet slettet, 3'KO-probe: Southern-blotting-analyseprobe for valg av kloner med loxp-neo^r-genet introdusert og slettet, E: EcoRI-restriksjonsenzymsted.

Fig. 13 er et diagram som viser serum FGF23-konsentrasjon 7 dager før administrering av kontrollantistoffet eller C10-antistoffet. Målingsverdier vises i

30 gjennomsnitt $\pm$ standardavvik. Da det ble gjennomført test for signifikant forskjell mellom WT-musgruppen og testgruppene ved anvendelse av Students t-test, ble videre grupper funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med *** på grafen.

Fig. 14 er et diagram som viser serumfosforkonsentrasjonen 7 dager før

35 administrering av kontrollantistoffet eller C10-antistoffet, og 3 dager etter den første administreringen av kontrollantistoffet eller C10-antistoffet. Målingsverdier vises i gjennomsnitt $\pm$ standardavvik. Da det ble gjennomført

test over én dag for signifikant forskjell mellom WT-musgruppen og testgruppene ved anvendelse av Students t-test, ble videre grupper funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med *** på grafen. Da det ble gjennomført test over én dag for signifikant forskjell mellom den

5 kontrollantistoffadministrerte hFGF23KI-musgruppen og testgruppene, ble i tillegg grupper hFGF23KI-mus som hadde fått administrert C10-antistoff funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med ### på grafen.

Fig. 15 er en graf som viser serumfosforkonsentrasjonen 1 dag etter den femte administreringen av kontrollantistoff eller C10-antistoff. Målingsverdier vises i

10 gjennomsnitt +/- standardavvik. Da det ble gjennomført test for signifikant forskjell mellom WT-musgruppen og testgruppene ved anvendelse av Students t-test, ble videre grupper funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med *** på grafen. Da det ble gjennomført test over én dag for signifikant forskjell mellom den kontrollantistoffadministrerte hFGF23KI-

15 musgruppen og testgruppene, ble i tillegg grupper hFGF23KI-mus som hadde fått administrert C10-antistoff, funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med ### på grafen.

Fig. 16 er et diagram som viser gripstyrken 1 døgn etter den fjerde administreringen av kontrollantistoff eller C10-antistoff. Målingsverdier vises i

20 gjennomsnitt +/- standardavvik. Da det ble gjennomført test for signifikant forskjell mellom WT-musgruppen og testgruppene ved anvendelse av Students t-test, ble videre grupper funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med *** på grafen. Da det ble gjennomført test over én dag for signifikant forskjell mellom den kontrollantistoffadministrerte hFGF23KI

25 musgruppen og testgruppene, ble i tillegg grupper hFGF23KI-mus som hadde fått administrert C10-antistoff funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med ### på grafen.

Fig. 17 er et bilde som viser det histologiske fargingsbildet i femur innhentet fra mus 1 døgn etter den femte administreringen av kontrollantistoff eller C10-

30 antistoff, hvori fargingen ble utført med Villaneueva-Goldner-metoden.

Fig. 18 er et diagram som viser forholdet mellom askevekt til tørrvekt for tibia innhentet fra mus 1 døgn etter femte administrering av kontrollantistoff eller C10-antistoff. Målingsverdier vises i gjennomsnitt +/- standardavvik. Da det ble gjennomført test for signifikant forskjell mellom WT-musgruppen og

35 testgruppene ved anvendelse av Students t-test, ble videre grupper funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med *** på grafen. Da det ble gjennomført test over én dag for signifikant forskjell mellom den

kontrollantistoffadministrerte hFGF23KI-musgruppen og testgruppene, ble i tillegg grupper hFGF23KI-mus som hadde fått administrert C10-antistoff, funnet å være signifikant forskjellige ($p < 0,001$), merket med ### på grafen.

5 [Sekvenstabell, fritekst]

SEQ ID NO: 1-3-, 5-27-, 30-33-, 40-50-syntese

DETALJERT BESKRIVELSE AV DE FORETRUKNE UTFØRELSESFORMENE

10

Ved klargjøring av definisjonene av begrepene som anvendes i den foreliggende oppfinnelsen, vil vi beskrive den foreliggende oppfinnelsen i detalj nedenfor.

15 I. Antistoff ifølge den foreliggende offentliggjøringen

1. Anti-FGF23-antistoff og dets funksjonelle fragment

20

Antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen er et antistoff mot FGF23 som er et medlem av fibroblastvekstfaktor (FGF)-familien.

25

I den foreliggende offentliggjøringen er et «antistoff mot FGF23» et antistoff som binder til FGF23 eller en porsjon derav, et antistoff som reagerer på FGF23 eller en porsjon derav eller et antistoff som gjenkjenner FGF23 eller en porsjon derav. Antistoff mot FGF23 betegnes også et anti-FGF23-antistoff. I den foreliggende offentliggjøringen er et antistoff et immunoglobulin i hvilket alle regionene som konstruerer immunoglobulinet i den variable tungkjederegionen og den konstante tungkjederegionen og den variable og konstante lettkjederegionen, avledes fra et gen som koder for immunoglobulinet.

30

Antistoffet er fortrinnsvis et monoklonalt antistoff. En porsjon av FGF23 betyr her en delvis aminosyresekvens av en full-lengde aminosyresekvens av FGF23, representert av SEQ ID NO: 4 og er et fragmentpeptid av FGF23 omfattende en fortløpende aminosyresekvens. Fortrinnsvis inneholder antistoffet aminosyresekvensen fra Q ved posisjon 20 til S ved posisjon 136 på SEQ ID NO: 12 og/eller aminosyresekvensen fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14. Antistoffet er mer fortrinnsvis et antistoff produsert av hybridom C10. SEQ ID NO: 12 er aminosyresekvensen som omfatter

35

ledersekvensene for den variable tungkjederegionen av antistoffet mot FGF23. Aminosyresekvensen fra Q ved posisjon 20 til S ved nummer 136 av SEQ ID NO: 12 er den modne delen av aminosyresekvensen med ledersekvensdelen fjernet. I tillegg er SEQ ID NO: 14 aminosyresekvensen som omfatter
 5 ledersekvensene for den variable lettkjederegionen av antistoffet mot FGF23. Aminosyresekvensen fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14 er den modne delen av aminosyresekvensen med ledersekvensen fjernet. Med hensyn til antistoffklassen anvendes immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin E (IgE) og immunoglobulin M (Ig).
 10 Fortrinnsvis anvendes IgG. For IgG-underklassen anvendes videre IgG1, IgG2, IgG3, Ig4. Fortrinnsvis anvendes IgG1, IgG2 og IgG4. Mer fortrinnsvis anvendes IgG1.

Antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen inkluderer også et anti-
 15 FGF23-antistoff som omfatter en aminosyresekvens av en nyskapende komplementaritetsdeterminerende region (CDR).

En CDR forekommer i den variable regionen av et antistoff, og delen er ansvarlig for den spesifikke antigengjenkjenningen. Delen annet enn CDR-en i
 20 den variable regionen spiller en rolle i vedlikehold av CDR-strukturen og henvises til som rammeverkregionen (FR). En konstant region forekommer på C-terminalsiden av en tungkjede og en lettkjede, og henvises til som henholdsvis den konstante tungkjederegionen (CH) og den konstante lettkjederegionen (CL).

25 Tre komplementaritetsdeterminerende regioner forekommer i den variable tungkjederegionen, som er en første komplementaritetsdeterminerende region (CDR1), en andre komplementaritetsdeterminerende region (CDR2) og en tredje komplementaritetsdeterminerende region (CDR3). De tre
 30 komplementaritetsdeterminerende regionene i den variable tungkjederegionen henvises til samlet som den komplementaritetsdeterminerende tungkjederegionen. De tre komplementaritetsdeterminerende regionene forekommer på lignende måte i den variable lettkjederegionen, som er en første komplementaritetsdeterminerende region (CDR1), en andre
 35 komplementaritetsdeterminerende region (CDR2) og en tredje komplementaritetsdeterminerende region (CDR3). De tre komplementaritetsdeterminerende regionene i den variable lettkjederegionen

henvises til samlet som den komplementaritetsdeterminerende lettkjederegionen. Sekvensene for disse CDR-ene kan bestemmes ved anvendelse av fremgangsmåter beskrevet i Sequences of Proteins of Immunological Interest (Sekvenser for proteiner av immunologisk interesse),
 5 US Dept. of Health and Human Services (1991).

Antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen har fortrinnsvis minst én eller alle av CDR1 vist av SEQ ID NO: 40, CDR2 vist av SEQ ID NO: 41, og CDR3 vist av SEQ ID NO: 42 som den komplementaritetsdeterminerende tungkjederegionen. Antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen har i tillegg fortrinnsvis minst én eller alle av CDR1 vist av SEQ ID NO: 43, CDR2 vist av SEQ ID NO: 44, og CDR3 vist av SEQ ID NO: 45 som den komplementaritetsdeterminerende lettkjederegionen. Mer fortrinnsvis er antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen et antistoff som binder til
 10 FGF23 og har CDR1 vist av SEQ ID NO: 40, CDR2 vist av SEQ ID NO: 41, og CDR3 vist av SEQ ID NO: 42 som den komplementaritetsdeterminerende tungkjederegionen, og CDR1 vist av SEQ ID NO: 43, CDR2 vist av SEQ ID NO: 44, og CDR3 vist av SEQ ID NO: 45 som den komplementaritetsdeterminerende lettkjederegionen.

20 CDR-sekvensen for antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen er ikke spesifikt begrenset. Antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen er imidlertid fortrinnsvis et antistoff omfattende én eller flere CDR-er, mer fortrinnsvis tre CDR-er av tungkjeden og enda mer fortrinnsvis seks CDR-er av
 25 CDR-sekvensene representert av SEQ ID NO: 40 til og med 45. Aminosyresekvensen annet enn CDR-ene er ikke spesifikt begrenset. Antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen inkluderer såkalte CDR-transplantasjonslegemer, hvori aminosyresekvensen annet enn CDR-ene avledes fra andre antistoffer og spesielt antistoffer i andre arter. Blant disse
 30 foretrekkes et humanisert antistoff eller humant antistoff, hvori aminosyresekvensen annet enn CDR-en avledes fra menneske. Sletting, substituering og/eller innsetting av 1 aminosyrerest eller flere kan i tillegg introduseres inn i FR etter behov. En offentlig kjent fremgangsmåte kan anvendes som fremgangsmåte for produksjon av et humanisert antistoff eller
 35 humant antistoff.

«Funksjonelt fragment» er en del av et antistoff (delvis fragment) og har en eller flere av virkningene av antistoffet på antigenet. Det viser med andre ord til et fragment som bevarer evnen å binde til eller reagere på antigenet, eller som har gjenkjenningsskapasitet for antigenet. Eksempler inkluderer Fv, 5 disulfidstabilisert Fv (dsFv), enkeltkjede Fv (scFv) og polymerer av disse. Eksempler inkluderer mer spesifikt peptider som inneholder Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dialegeme, dsFv og CDR [D. J. King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T. J. International Ltd].

10 Av fragmentene som oppnås ved behandling av et antistoff som binder til FGF23 med protease papain, er Fab antistofffragmentet av molekylvekt omtrent 50 000 med antigenbindingsaktivitet, i hvilken omtrent halvparten av amino-terminalsiden av H-kjeden med hele L-kjeden ved et disulfid bånd.

15 Fab ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan oppnås ved behandling av antistoffet som binder til FGF23 med protease papainet. Fab kan alternativt produseres ved innsetting av DNA som koder for Fab av antistoffet i en ekspresjonsvektor for prokaryotiske organismer eller en ekspresjonsvektor for eukaryotiske organismer, og uttrykker denne vektoren ved introduksjon inn i 20 en prokaryotisk organisme eller eukaryotisk organisme.

Av fragmentene oppnådd ved behandling av IgG med protease pepsin, er F(ab') antistofffragmentet av molekylvekt omtrent 100 000 med antigenbindingsaktivitet og som er større enn det fra Fab bundet via 25 disulfidbindingene av hengsleregionen.

F(ab')₂ ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan oppnås ved behandling av antistoffet som binder med FGF23 med protease pepsinet. Det kan alternativt produseres gjennom en tioeterbinding eller disulfidbinding av Fab' beskrevet 30 nedenfor.

Fab' er et antistofffragment av en molekylvekt på omtrent 50 000 med antigenbindingsaktivitet og i hvilken disulfidbindingen av hengsleregionen av ovennevnte F(ab')₂ kløyves.

35

Fab' ifølge den foreliggende oppfinnelsen oppnås ved behandling av F(ab')₂ ifølge den foreliggende oppfinnelsen, som binder til FGF23, med et

reduseringsmiddel ditiotreitol. DNA som koder for Fab'-fragmentet av dette antistoffet, settes alternativt inn i en ekspresjonsvektor for prokaryotiske organismer eller inn i en ekspresjonsvektor for eukaryotiske organismer, og denne vektoren introduseres inn i prokaryotiske organismer eller eukaryotiske organismer og uttrykkes således til å produsere Fab'.

scFV er et antistofffragment med antistoffbindingsaktivitet med en enkel variabel tungkjederegion (heretter henvist til heri som VH) og en enkelt variabel lett kjederegion (heretter henvist til heri som VL) som forbindes ved anvendelse av en egnet peptidbinder (heretter betegnet P), og som er et VH-P-VL- eller VL-P-VH-polypeptid.

scFv ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan produseres ved innhenting av cDNA-et som koder for VH og VL av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen som binder med FGF23, og å konstruere DNA-et som koder scFV, og innsetting av DNA-et i ekspresjonsvektoren for prokaryotiske organismer eller ekspresjonsvektoren for eukaryotiske organismer, og introduksjon og uttrykking av ekspresjonsvektoren i prokaryotiske organismer eller eukaryotiske organismer.

Et dialegeme er et antistofffragment i hvilket scFV er dimerisert, og er et antistofffragment med en bivalent antistoffbindingsaktivitet. Hver bindingsaktivitet av det bivalente antistoffet kan være den samme eller forskjellig.

Dialeget ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan produseres ved innhenting av cDNA-et som koder for VH og VL av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen som binder til FGF23, konstruksjon av DNA-et som koder for scFV, slik at lengden av aminosyresekvensen for peptidbinderen er 8 rester eller mindre, innsetting av dette DNA-et i en ekspresjonsvektor for prokaryotiske organismer eller ekspresjonsvektor for eukaryotiske organismer, og uttrykking av denne ekspresjonsvektoren ved introduksjon inn i en prokaryotisk organisme eller eukaryotisk organisme.

I dsFV substitueres 1 aminosyrerest av VH og VL med en cysteinrest, og polypeptidet bindes via en diasulfidbinding mellom disse cysteinrestene. Aminosyreresten som substitueres med cysteinresten kan velges basert på den

predikerte teritære strukturen av antistoffet, ifølge fremgangsmåten indikert av Reiter et al. (Protein Engineering, 7: 697-704, 1994).

dsFV ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan produseres ved innhenting av
 5 cDNA-et som koder for VH og VL av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen som binder til FGF23, konstruksjon av DNA-et som koder for dsFV, innsetting av dette DNA-et inn i en ekspresjonsvektor for en prokaryotisk organisme eller en ekspresjonsvektor for en eukaryotisk organisme og introduksjon og uttrykking av denne ekspresjonsvektoren i en prokaryotisk
 10 organisme eller eukaryotisk organisme.

Peptidet som omfatter CDR, konstrueres omfattende minst 1 region eller mer av CDR av VH eller VL. Peptider som omfatter flere CDR-er, kan bindes sammen direkte eller via en egnet peptidbinder.

15 Peptidet som omfatter CDR-en ifølge den foreliggende offentliggjøringen, kan produseres ved konstruksjon av et DNA som koder for CDR-en av VH og VL av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen som binder FGF23, innsetting av dette DNA-et i en ekspresjonsvektor for prokaryotiske organismer eller
 20 ekspresjonsvektor for eukaryotiske organismer og introduksjon og uttrykking av denne ekspresjonsvektoren inn i prokaryotiske organismer eller eukaryotiske organismer.

Peptidet som inneholder CDR, kan i tillegg produseres ved en kjemisk
 25 syntetiseringsmetode, slik som Fmoc-metoden (fluorenylmetyloksykarbonyl-metoden) og tBoc-metoden (t-butoksyloksykarbonyl-metoden).

«Funksjonelt fragment» er videre et fragment av antistoffet som kan binde til antigenet (FGF23). Det «funksjonelle fragmentet» er fortrinnsvis et fragment
 30 som kan binde til FGF23 og omfatter en aminosyresekvens fra Q ved posisjon 20 til S ved posisjon 136 av SEQ ID NO: 12, og/eller en aminosyresekvens fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14. Det «funksjonelle fragmentet» er fortrinnsvis et fragment som omfatter minst én eller flere av alle CDR-ene representert av SEQ ID NO: 40 til og med 45, og kan binde til
 35 FGF23. Det «funksjonelle fragmentet» avledes mer fortrinnsvis fra den variable regionen av et antistoff produsert av hybridom C10 og er et fragment som kan binde til FGF23.

Antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer avledninger av antistoffet i hvilke radioisotoper, lavmolekylvektlegemiddel, makromolekyllegemiddel, proteiner bindes kjemisk eller via genetisk

5 konstruksjon til antistoffet mot FGF23 ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller funksjonelle fragmenter av antistoffet.

Avledningene av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan produseres ved binding av radioisotoper, lavmolekylvektlegemiddel, makromolekyllegemiddel, proteiner for aminoterminalsiden eller

10 karboksyterminalsiden av H-kjeden (tungkjeden) eller L-kjeden (lettkjeden) av antistoffet FGF23 ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller det funksjonelle fragmentet av antistoffet, til en egnet substisjonsgruppe eller sidekjede i antistoffet eller funksjonelt fragment av antistoffet, og videre til en sukkerkjede

15 i antistoffet eller funksjonelt fragment derav ved kjemiske metoder (Koutai Kogaku Nyuumon, Osamu Kanamitsu, Chikin Shokan, 1994).

Derivatet av antistoffet bundet med proteinet produseres i tillegg ved binding av DNA-et som koder for antistoffet mot FGF23 ifølge den foreliggende

20 oppfinnelsen, og det funksjonelle fragmentet av antistoffet og DNA-et som kodet for proteinet som skal bindes, innsetting av dette DNA-et inn i en ekspresjonsvektor og introduksjon og uttrykking av ekspresjonsvektoren i en egnet vertscelle.

25 For radioisotopen inkluderer eksempler ^{131}I , ^{125}I . Radioisotopen kan f.eks. bindes til antistoffet ved kloramin-T-metoden.

Lavmolekylvektlegemiddel inkluderer alkalyserende middel, inkludert nitrogensennep, cyklofosfamid; antimetabolitter slik som 5-fluoracil og

30 metotrekstat; antibiotika slik som daunomycin, bleomycin, mitomycin C, daunorubicin og doksorubicin; plantealkaloider, slik som vinkristin, vinblastin og vindesin; anti-kreft-middel, slik som hormonmiddel, slik som tamoksifen og deksametason (Clinical oncology; Japanese Clinical Oncology Research Meeting, Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Co., 1996); steroider,

35 slik som hydrokortison, prednison; ikke-steriode middel, inkludert aspirin og indometacin; immunmodulatorer, slik som gulltiomalat, penicillamin; immunsuppressorer, slik som cyklofosfamid, azatioprin; anti-inflammatoriske

middel, slik som antihistaminer, klorfeniraminmaleat, klemastin, (Inflammation and anti-inflammatory treatment method, Ishiyaku Publishing Corp. Ltd., 1982). Bindingen av antistoffet med disse lavmolekylvektlegemidlene gjennomføres ved kjente fremgangsmåter. Eksempler på fremgangsmåter for binding av daunomycin med antistoff inkluderer en fremgangsmåte for binding mellom aminosyregrupper av daunomycin og antistoff via glutaraldehyd, og en fremgangsmåte for binding av aminosyregruppen av daunomycin og karboksylgruppen av antistoffet via vannløselig karbodiimid. Ved binding av disse lavmolekylvektlegemidlene med antistoffet oppnås et derivat av antistoffet med funksjonen til lavmolekylvektlegemidlet.

For makromolekyllegemidlet inkluderer eksempler polyetylenglykol (heretter henvist til heri som PEG), albumin, dekstran, polyoksyetylen, styrenmaleatkopolymer, polyvinylpyrrolidon, pyrankopolymer, hydroksypropylmetakrylamid. Ved binding av disse makromolekylforbindelsene med antistoff eller et funksjonelt fragment av et antistoff forventes følgende virkninger, (1) forbedret stabilitet med hensyn til forskjellige kjemiske, fysiske og biologiske faktorer, (2) dramatisk forlengelse av halveringstiden i blod, (3) immunogenisiteten går tapt, antistoffproduksjon undertrykkes, (Bioconjugate Pharmaceutical, Hirokawa Shoten, 1993). Et eksempel på en fremgangsmåte for binding av PEG til et antistoff er en fremgangsmåte for reagering med PEG-modifiserende reagens (Bioconjugate Pharmaceutical, Hirokawa Shoten, 1993). Eksempler på PEG-modifiserende reagens inkluderer ϵ -aminogruppemodifikator av lysin (Laid-Open patentpublikasjon nr. S61-178926), karboksylgruppemodifikator av aspartinsyre og glutaminsyre (Laid-Open patentpublikasjon nr. S56-23587), guanidinogruppemodifikator av arginin (Laid-Open patentpublikasjon nr. H2-117920).

Antistoffet som har bundet til proteinet, kan oppnås som et fusjonsantistoff. cDNA-et som koder for antistoffet eller et funksjonelt fragment av antistoffet, forbindes med andre ord med cDNA-et som koder for et spesifikt protein, og DNA-et som koder for det fusjonerte proteinet av det spesifikke proteinet og antistoffet, konstrueres. Dette DNA-et settes inn i en ekspresjonsvektor for en prokaryotisk organisme eller eukaryotisk organisme. Denne ekspresjonsvektoren kan introduseres og uttrykkes i den prokaryotiske organismen eller eukaryotiske organismen, for å produsere det fusjonerte antistoffet som bindes med det spesifikke proteinet.

Med hensyn til antistoffet mot FGF23 ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller det funksjonelle fragmentet av antistoffet, ved å foreta målinger ved anvendelse av immunologimetoder, slik som ELISA (Antibodies: A Laboratory
 5 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies; Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) eller måling av bindingsdissosieringskonstanten med biosensor Biacore (Journal of Immunological Methods, 145: 229-240, 1991) og måling av inhiberingsaktiviteten (Nature, 444: 770-774, 2006) av promotoraktiviteten av
 10 det tidlige vekstresponsgenet 1 ved human FGF23-simulering ved anvendelse av kloto-ekspresjonsceller, kan human FGF23-bindingsaktivitet og aktiviteten som inhiberer funksjonen av human FGF23, evalueres.

I den foreliggende oppfinnelsen defineres «humant antistoff» som et antistoff
 15 som er et ekspresjonsprodukt av et antistoffgen avledet fra mennesker. Humant antistoff, slik det vil bli beskrevet senere, kan oppnås ved introduksjon av det humane antigenlokus og ved administrering av antigen til transgene dyr med kapasitet til å produsere det humane antistoffet. Eksempler på disse transgene dyrene inkluderer mus. Fremgangsmåten for avling av mus som kan
 20 produsere humant antistoff, beskrives f.eks. i internasjonalt publikasjonsnr. WO02/43478, pamflett.

For antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen inkluderer eksempler et antistoff (C10-antistoff) produsert av C10-hybridomer, som vil bli beskrevet
 25 i eksemplene senere. C10-hybridom er deponert internasjonalt i henhold til Budapest-traktaten, med tilgangsnr. FERM ABP-10772 (en angivelse for identifikasjon: C10) ved Patent Organism Depository Center (sentral 6, 1-1 Higashi 1-kom, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan) den 2. februar 2007 ved den uavhengige administrative institusjonen for Advanced Industrial Science and
 30 Technology.

Antistoffet eller funksjonelt fragment ifølge den foreliggende offentliggjøringen inkluderer også monoklonale antistoff eller funksjonelle fragmenter derav omfattende tungkjeden og/eller lettkjeden bestående av aminosyresekvenser
 35 med 1 eller flere aminosyreslettinger, -substitueringer og -tillegg i hver av aminosyresekvensene for tungkjeden og/eller lettkjeden som konstruerer antistoffet eller funksjonelt fragment. Av «1 eller flere» betyr «flere» her 9

eller mindre, fortrinnsvis 5 eller mindre og mer fortrinnsvis 3 eller mindre. Med 2 foretrekkes særlig. En delvis modifisering (sletting, substituering, innsetting, tillegg) av aminosyren som tidligere beskrevet, kan introduseres inn i aminosyresekvensen av antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen

5 eller funksjonelt fragment ved delvis modifisering av nukleotidsekvensen som koder for aminosyresekvensen. Delvis modifisering av denne nukleotidsekvensen kan introduseres ved anvendelse av den konvensjonelle fremgangsmåten med kjent stedsspesifikk mutagenese [Proc Natl Acad Sci USA., 81: 5662-5666, 1984]. Antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen

10 inkluderer antistoff av alle immunoglobulinklasser og -isotyper.

Antistoffet mot FGF23 ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan produseres ved den følgende fremgangsmåten. FGF23 eller en del av FGF23 eller et konjugat av en del av FGF23 og et egnet bærestoff for økning av antigenisiteten (f.eks.

15 kalveserumalbumin) immuniseres f.eks. sammen med en adjuvans (Freunds komplette eller ufullstendige adjuvans) etter behov inn i ikke-humane pattedyr, slik som en transgen mus som produserer humant antistoff. For FGF23 kan naturlig FGF23 eller rekombinant FGF23 anvendes. Immunsensitisering kan alternativt utføres ved introduksjon av genet som koder for FGF23 inn i en

20 ekspresjonsvektor og uttrykking av FGF23-proteinet inni dyret. Det monoklonale antistoffet oppnås ved dyrking av hybridom oppnådd ved fusjon av antistoffproduserende celler oppnådd fra immunsensitiserte dyr og myelomceller som ikke har antistoffproduserende kapasitet, og ved å velge klonene som produserer monoklonale antistoff som viser spesifikk affinitet for

25 antigenet anvendt for immunisering.

Antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer slike som er konvertert til forskjellige underklasser ved genetisk konstruksjonsmodifisering, som kjent for de med ferdigheter i faget (se f.eks. europeisk patentsøknad EP

30 314161). Ved anvendelse av DNA som koder for den variable regionen av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen, kan det med andre ord oppnås et antistoff som er av en underklasse som er forskjellig fra den opprinnelige underklassen, ved anvendelse av genetiske konstruksjonsmetoder.

2. Fremstilling av antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen.

Fremstilling av et monoklonalt antistoff inkluderer de følgende trinnene. Med andre ord (1) tilberedes antigenproteinet som skal anvendes som immungenet
 5 eller antigenproteinekspresjonsvektoren, (2) etter immunisering ved injeksjon av antigenet inn i dyret eller ved ekspresjon av antigenet inni dyret tas det blodprøver og antistofftiteren assayed, og etter fastsetting av tiden for isolering av milten tilberedes antistoffproduserende celler, (3) myelomceller tilberedes, (4) den antistoffproduserende cellen og myelomet fusjoneres, (5)
 10 hybridomgruppen som produserer målantistoffet velges, (6) hybridomene deles opp i en enkeltcelleklone (kloning), (7) eventuelt dyrkes hybridomet for å produsere store mengder monoklonalt antistoff, eller dyr i hvilket hybridomet har blitt transplantert inn i, reises opp, og (8) den biologiske aktiviteten og gjenkjenningsspesifisiteten for det monoklonale antistoffet produsert på denne
 15 måten, assayed eller egenskapen som en merkingsreagens assayed.

Fremstillingsmetoden for det monoklonale anti-FGF23-antistoffet beskrives heretter i detalj, i henhold til ovennevnte fremgangsmåte. Fremstillingsmetoden for dette antistoffet er imidlertid ikke begrenset til denne
 20 fremgangsmåten. Antistoffproduserende celler og myelom fra annet enn miltceller kan f.eks. også anvendes.

(1) Rensing av antistoffet

25 Ved anvendelse av genetisk rekombinasjonsteknikk integreres DNA-sekvensen som koder for FGF23, inn i et egnet ekspresjonsplasmid. Etter at FGF23 er produsert i en vertscelle, slik som E. Coli- eller en dyrecelle, kan det rensede FGF23-proteinet anvendes. Fordi primærstrukturen for det humane FGF23-proteinet er kjent [GenBank-tilgangsnr. AAG09917, SEQ ID NO: 4], utføres
 30 kjemisk syntetisering av et delvis peptid fra aminosyresekvensen av FGF23 ved fremgangsmåter kjent for de med ferdigheter i faget, og dette kan også anvendes som antigenet.

(2) Trinn for tilberedning av antistoffproduserende celle

35

Antigenet oppnådd som nevnt i (1) blandes med en adjuvans, slik som komplett eller ufullstendig Freund's adjuvans eller aluminiumkalium, og

blandingen immuniseres inn i forsøksdyr som et immunogen. For anvendelse som forsøksdyr er transgene mus med kapasitet til å produsere humanavlede antistoff de mest egnede. Denne typen mus beskrives ved henvisning til Tomizuka et al. [Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 97: 722-727, 2000].

Administrasjonsmetoden for immunogenet ved immunisering av mus kan være en hvilken som helst subkutan injeksjon, intraperitoneal injeksjon, intravenøs injeksjon, intradermal injeksjon, intramuskulær injeksjon, fotputeinjeksjon. Intraperitoneal injeksjon, fotputeinjeksjon eller intravenøs injeksjon foretrekkes.

Immuniseringen kan gjennomføres én gang eller gjentas flere ganger i egnede intervaller. Antistofftiteren mot antigenet i serumet fra det immuniserte dyret måles deretter. Når dyr med en tilstrekkelig høy antistofftiter anvendes som en leveringskilde for antistoffproduserende celler, økes effektiviteten i senere operasjoner. Generelt foretrekkes det å anvende antistoffproduserende celler avledet fra dyr 3–5 dager etter den endelige immuniseringen, for den følgende cellefusjonen.

Eksempler på fremgangsmåter anvendt her for måling av antistofftiter, inkluderer kjente teknikker, slik som røntgenimmunassay (heretter henvist til heri som «RIA-metoden»), enzymforbundet immunabsorberingsassay (heretter henvist til heri som «ELISA-metoden»), fluorescensantistoffmetoden, passiv hemagglutineringsmetoden. Med hensyn til deteksjonssensitivitet, hurtighet, nøyaktighet og muligheten for automatisert drift er RIA-metoden eller ELISA-metoden egnet.

I henhold til f.eks. ELISA-metoden kan målingen av antistofftiter ifølge den foreliggende oppfinnelsen utføres ved følgende prosedyre. Antigenet mot humant antistoff absorberes først f.eks. på fastfaseoverflaten av en ELISA 96-brønnplate. Fastfaseoverflaten som ikke har absorbert antigen, dekkes videre med et protein som ikke er forbundet med antigenet, slik som kalveserumalbumin (BSA). Etter rensing av overflaten tillates den kontakt med en seriefortynnet reagens som et primært antistoff (f.eks. serum fra transgene mus med kapasitet til å produsere humane antistoff), for å fremstille antigenet beskrevet ovenfor som binder til anti-FGF23-antistoffet i prøven. Et

enzymmerket antistoff mot humant antistoff legges videre til som det sekundære antistoffet som tillates å binde til det humane antistoffet. Etter vasking tilsettes et substratum for enzymet. Endring i lysabsorberingen forårsaket av fargen resulterende fra nedbrytingen av substratet måles

5 deretter for å beregne antistofftiteren.

(3) Tilberedningstrinn for myelom

For myeloma kan det anvendes celler som ikke har noen antistoffproduserende

10 kapasitet i seg selv og som avledes fra pattedyr, slik som mus, rotte, marsvin, hamster, kanin eller mennesker. Generelt anvendes fortrinnsvis cellelinjer oppnådd fra mus, f.eks. 8-azaguaninresistent mus (BALB/c-avledet) myelomlinje P3X63Ag8U.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)

15 [Kohler, G. et al., European J. Immunology, 6: 511-519, 1976], Sp2/O-Ag14 (SP2/O) [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. and Harris, A. W., Nature, 256: 495-497, 1975]. Disse cellelinjene etter-dyrkes i et egnet medium, f.eks. 8-azaguaninmedium [et

20 RPMI-1640-medium supplert med glutamin, 2-merkapttoetanol, gentamycin og kalvefosterserum (FCS), samt 8-azaguanin], Iscove's Modified Dulbeccos-medium (IMDM) eller Dulbeccos modifiserte Eagle-medium (DMEM). 3-4 dager før cellefusjonering etter-dyrkes imidlertid cellelinjene i et normalt medium (f.eks. DMEM-medium inneholdende 10 % FCS) og på dagen for fusjonering,

25 tilberedes et antall celler som er 2×10^7 ganger høyere.

(4) Cellefusjon

Antistoffproduserende celler er plasmaceller og lymfocytter som er deres

30 prekursorceller. Disse kan oppnås fra et hvilket som helst sted hos individene. Generelt kan milten, lymfekjertelen, ryggmarg, mandler, perifert blod eller en hvilken som helst av disse kombineres. Generelt anvendes oftest miltceller.

Etter endelig immunisering fjernes stedet hvor de antistoffproduserende cellene

35 finnes, f.eks. milten, fra musen som har oppnådd den foreskrevne antistofftiteren, og miltcellene som er de antistoffproduserende cellene, tilberedes. Deretter fusjoneres miltceller og myelom. Som middel til fusjonering

av miltcellene og myelomet oppnådd i trinn (3), er den hyppigst anvendte fremgangsmåten en fremgangsmåte som anvender polyetylglykol. Denne fremgangsmåten har relativt lav celletoksisitet og fusjonsoperasjonen er også enkel. Denne fremgangsmåten har f.eks. følgende prosedyre:

5

Miltcellen og myelomet vaskes godt med serumfritt medium (f.eks. DMEM) eller en fosfatbufret saltløsning (PBS). Miltcellen og myelomet blandes ved et celletallforhold på omtrent 5:1–10:1 og sentrifugeres. Supernatanten fjernes, og etter løsning av den utfelte cellegruppen dryppes 1 ml av et serumfritt medium inneholdende 50 % polyetylglykol (molekylvekt 1000–4000) (vekt/volum) inn i cellene under omrøring. Etterpå tilsettes sakte 10 ml serumfritt medium, og deretter sentrifugeres dette. Igjen kastes supernatanten, og utfelte celler suspenderes i en egnet mengde normalt medium (henvist til som HAT-medium) som inneholder egnet mengde av hypoksantin/aminopterin/tymidin (HAT)-løsning og human interleukin-6 (IL-6). Cellene alikvoteres til hver brønn i en dyrkingsplate (heretter henvist til som «plate») og dyrkes i omtrent 2 uker ved 37 grader C under 5 % karbondioksidgass. I løpet av denne tiden suppleres HAT-medium etter behov.

10

15

20

(5) Valg av hybridomgruppe

Når myelomceller beskrevet ovenfor, er en 8-azaguaninresistent stamme, med andre ord; hvis de er en hypoksantin/guanin/fosforibosyltransferase (HGPRT)-defisient stamme, vil myelomcellene som ikke ble fusjonert, og fusjonerte celler av kun myelomceller ikke overleve i HAT-inneholdende medium. På den annen side kan fusjonerte celler fra kun antistoffproduserende celler og hybridomer av antistoffproduserende celler og myelomceller overleve, men for de fusjonerte cellene av kun antistoffproduserende celler har cellene begrenset levetid. Ved å fortsette dyrking i et HAT-inneholdende medium vil derfor kun hybridomer som er fusjonerte celler mellom antistoffproduserende celler og myelomceller, overleve. Hybridomer kan som et resultat velges.

25

30

35

For hybridomene som vokser i kolonier, utføres utskifting av medium til et medium i hvilket aminopterin er fjernet fra HAT-medium (heretter henvist til som HT-medium). En del av medium supernatanten samles inn etterpå, og anti-FGF23-antistofftiteren måles f.eks. ved ELISA-metoden.

Ovenfor har vi vist et eksempel på en fremgangsmåte som anvender 8-azaguaninresistent cellelinje, men andre cellelinjer kan også anvendes i henhold til utvelgingsmetoden for hybridomer. I disse tilfellene endres også sammensetning av mediet som anvendes.

5

(6) Kloningstrinn

Ved måling av antistofftiteren med samme fremgangsmåte som antistofftitermålingsmetoden som i (2) overføres hybridomet som har blitt
 10 bestemt å produsere det spesifikke antistoffet, til en annen plate og kloning gjennomføres. Eksempler på fremgangsmåter for kloning inkluderer begrenset fortynning-metoden i hvilken hybridomet fortynnes, slik at det i hver brønn på platen finnes 1 hybridom og dette dyrkes; bløtagarmetoden i hvilken hybridomer dyrkes i et medium av myk agar og koloniene samles inn; en
 15 metode i hvilken én celle om gangen fjernes med en mikromanipulator og denne dyrkes; «sorteringskloning» i hvilken en enkelt celle separeres av en cellesorterer. Metoden med begrenset fortynning er enkel og anvendes ofte.

Med hensyn til brønnene i hvilket antistofftiteren har blitt observert, gjentas
 20 f.eks. kloning 2–4 ganger ved begrenset fortynning-metoden, og celler med en stabil antistofftiter velges som monoklonale anti-FGF23-antistoffproduserende hybridomcellelinjer.

(7) Tilberedning av monoklonalt antistoff ved hybridomdyrking

25

Hybridomene i hvilke kloning er fullført, dyrkes ved utskifting av mediet fra HT-medium til normalt medium. For dyrking i stor skala finnes det rotasjonsdyrking som anvender storskala dyrkingskolbe, spinner-dyrking eller dyrking ved anvendelse av et hult fibersystem. Ved rensing av supernatanten i
 30 storskala dyrking ved anvendelse av en metode kjent for de med ferdigheter i faget, slik som gelfiltrering, kan monoklonalt anti-FGF23-antistoff oppnås. Ved dyrking av denne hybridomen intraperitonealt i den samme mus-stammen (f.eks. BALB/c) eller nu/nu-mus, marsvin, hamster eller kanin, kan det oppnås peritoneal væske inneholdende store mengder monoklonalt anti-FGF23-
 35 antistoff. En enkel metode for rensing anvender kommersielle monoklonale antistoffpakker (f.eks. MAbTrap GII-utstyrspakke; GE Healthcare Bioscience Co.).

De monoklonale antistoffene oppnådd på denne måten, har en høy antigenspesifisitet mot FGF23.

- 5 Rekombinant antistoff kan i tillegg tilberedes ved kloning av genet som koder for humant monoklonalt antistoff, fra antistoffproduserende celler av hybridomene, inkorporering av genet inn i en egnet vektor og introduksjon inn i en vert (f.eks. pattedyrcellelinje, E. coli, gjærcele, insektcelle, plantecelle) og anvendelse av genetisk rekombinasjonsteknologi (Delves, P. J., ANTIBODY
10 PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY, Shepherd, P. and Dean C., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, Goding, J. W., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS).

- 15 Den foreliggende offentliggjøringen inkluderer nukleinsyrene som inneholder gensekvensen for antistoffet av hybridoma som produserer antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen, særlig nukleinsyren for den variable tungkjederegionen og den variable lettkjederegionen for antistoffet produsert av hybridoma, ifølge den foreliggende offentliggjøringen som vil bli beskrevet senere. Her inkluderer nukleinsyrer DNA og RNA. Den foreliggende
20 offentliggjøringen inkluderer videre nukleinsyren for den modne delen i hvilken regionen som koder for signalsekvensen av nukleinsyre av den variable tungkjederegionen og den variable lettkjederegionen ifølge den foreliggende offentliggjøringen, har blitt fjernet. I tillegg til nukleinsyrene beskrevet ovenfor, inkluderer videre nukleinsyrene ifølge den foreliggende offentliggjøringen
25 nukleinsyrer med kodoner tilsvarende aminosyrene for aminosyresekvensen av antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen og til aminosyrene av antistoffets variable tungkjederegion og/eller variable lettkjederegion av dette antistoffet.

- 30 For å kunne tilberede genet som koder for det monoklonale antistoffet fra hybridoma, anvendes en fremgangsmåte i hvilken DNA-koding av hvert av L-kjede V-regionen, L-kjede C-regionen, H-kjede V-regionen og H-kjede C-regionen av det monoklonale antistoffet tilberedes ved PCR-metoden. For dette formålet anvendes oligoDNA designet fra anti-FGF23-antistoffgenet eller
35 aminosyresekvensen som primer. Som malen kan DNA tilberedt fra hybridoma, anvendes. Disse DNA-ene inkorporeres inn i én egnet vektor og denne

introduseres inn i en vert og uttrykkes, eller disse DNA-ene inkorporeres hver i en egnet vektor og uttrykkes samtidig.

Som vektor anvendes fager eller plasmider som kan vokse autonomt i
 5 vertsmikroorganismen. For plasmid-DNA inkluderer eksempler plasmider fra E. coli, Bacillus subtilis eller gjær. For fag-DNA-et inkluderer eksemplet λ -fag.

Verten som anvendes i transformasjonen, er ikke begrenset så lenge som den er én som kan uttrykke målgenet. Eksempler inkluderer bakterier (E. coli,
 10 Bacillus subtilis), gjær, dyreceller (COS-celler, CHO-celler) og insektceller.

Fremgangsmåter for introduksjon av gener inn i en vert er kjent, og det finnes mange eksempler på fremgangsmåter (f.eks. en fremgangsmåte som anvender kalsiumion, elektroporeringsmetode, sferoplastmetode, litiumacetatmetode,
 15 kalsiumfosfatmetode, lipofeksjonsmetode). Eksempler på fremgangsmåter for introduksjon av genet inn i dyr som vil bli beskrevet senere, inkluderer i tillegg mikroinjeksjonsmetode, metoden med å introdusere gener inn i ES-celler ved anvendelse av elektroporeringsmetoden og lipofeksjonsmetoden, nukleærtransplantasjon.

20

I den foreliggende oppfinnelsen dyrkes transformanten, og anti-FGF23-antistoffet oppnås ved innsamling fra dyrkingsproduktet. «Dyrkingsproduktet» viser her til enhver av (a) kulturens supernatant, (b) dyrkede celler eller dyrkede bakterier eller deres homogenat, (c) sekreter fra transformanten. For
 25 å kunne dyrke transformanten anvendes et medium egnet for verten, og stasjonær dyrkingsmetode, dyrkingsmetode ved sylinderkolbe.

Etter dyrking, når målantistoffet produseres inni bakterien eller inni cellen, samles antistoffet inn ved homogenisering av bakterien eller cellen. Når
 30 målantistoffet produseres utenfor bakterien eller utenfor cellen, kan kulturløsningen i tillegg anvendes direkte, alternativt fjernes bakteriene eller cellene ved sentrifugering. Målantistoffet kan deretter isoleres og renses fra kulturproduktet ved vanlige biokjemiske metoder, ved anvendelse, alene eller i kombinasjon, av forskjellige kromatografier som anvendes for isolering og
 35 rensing av proteiner.

Ved anvendelse av transgene dyreavlsteknikker kan det avles dyreverter i hvilke genet for målantistoffet inkorporeres til endogene gener, f.eks. trangent fe, transgen geit, transgen sau eller transgen gris. En stor mengde monoklonalt antistoff avledet fra antistoffgenet, kan oppnås fra melken fra disse transgene dyrene (Wright, G., et al., Bio/Technology 9: 830-834, 1991). Ved dyrking av hybridoma in vitro dyrkes, opprettholdes og lagres hybridoma i henhold til de forskjellige betingelsene for egenskaper ved de dyrkede cellene i den eksperimentelle forskningen og dyrkingsmetodene. Kjent næringsmedium eller forskjellige næringsmedier avledet og tilberedt fra kjent grunnmedium, kan anvendes for produksjon av monoklonalt antistoff i kultursupernatanten.

(8) Assay av det monoklonale antistoffet

Fastsetting av isotypen og underklassen av monoklonale antistoff oppnådd på denne måten, kan gjennomføres på følgende måte: Først, eksempler på identifikasjonsmetoden inkluderer Ouchterlony-metoden, ELISA-metoden eller RIA-metoden. Ouchterlony-metoden er enkel, men når konsentrasjonen av det monoklonale antistoffet er lav, er det nødvendig med en konsentreringsprosedyre. Når på den annen side ELISA-metoden eller RIA-metoden anvendes, reageres kultursupernatanten direkte med den antigenabsorberte fastfasen, og som et sekundært antistoff kan antistoffer som responderer på forskjellige immunoglobulinisotyper og -underklasser, anvendes til identifisering av isotypen og underklassen for det monoklonale antistoffet.

Kvantifisering av proteinet kan videre gjennomføres ved Folin/Lowry-metoden og ved en metode som beregner lysabsorbering ved 280 nm [$1,4 \text{ (OD}_{280}) = \text{immunoglobulin } 1 \text{ mg/ml}$].

Identifisering av gjenkjenningsepitoper av det monoklonale antistoffet (epitopkartlegging) gjennomføres som følger. Først fremstilles de delvise strukturene for forskjellige molekyler som monoklonale antistoff gjenkjenner. For fremstilling av delvise strukturer finnes en metode i hvilken kjente oligopeptidsynteseteknikker anvendes for å fremstille forskjellige delvise peptider av molekylet, og en metode i hvilken, ved anvendelse av genetisk rekombinasjonsteknikker, DNA-sekvensen som koder for målpeptidet, inkorporeres i et egnet ekspresjonsplasmid og peptidene produseres inni eller utenfor vertscellen, slik som E. coli. Generelt kombineres imidlertid begge

metodene for det ovennevnte formålet. En serie polypeptider i hvilke antigenproteinet har blitt sekvensielt forkortet ved tilfeldige avstander fra karboksyterminalen eller aminoterminalen, fremstilles f.eks. ved anvendelse av genetisk rekombinasjonsteknikker kjent for de med ferdigheter i faget. Etterpå

5 studeres reaktiviteten for det monoklonale antistoffet for disse polypeptidene og gjenkjenningssteder bestemmes grovt.

Etterpå, med hensyn til videre detaljer, syntetiseres oligopeptidet av den tilsvarende delen eller varianter av disse peptidene ved

10 oligopeptidsynteseteknikker kjent for de med ferdigheter i faget. For å definere epitopene studeres bindingen av de monoklonale antistoffene inneholdt som en aktiv ingrediens i midlet for forebygging eller behandling ifølge den foreliggende oppfinnelsen til disse peptidene, alternativt studeres den konkurrerende inhiberingsaktiviteten for peptidene til bindingsstedet av de

15 monoklonale antistoffene til antigenet. Som en enkel metode for å oppnå forskjellige oligopeptider kan det f.eks. anvendes kommersielle utstyrspakker (f.eks. SPOT-pakker (Genosis Biotechnologies), en serie av multipinpeptidpakker som anvender multipinsyntesemetoden (Chiron Co.).

20 **(9) Produksjon av antistofffragmentet**

Antistofffragmentet produseres ved genetiske konstruksjonsmetoder eller protokjemiske metoder basert på antistoffet beskrevet i (7) ovenfor.

25 For den genetiske konstruksjonsmetoden konstrueres og uttrykkes genet som koder for målantistoffet, ved anvendelse av en egnet vert, slik som en dyrecelle, plantecelle, insektcelle, E. coli og antistofffragmentet renses.

For den protokjemiske metoden anvendes proteaser, slik som pepsin, papain

30 for den stedsspesifikke kløyvingen, og rensing gjennomføres.

For antistofffragmentet inkluderer eksempler peptider omfattende Fab, F (ab')₂, Fab', scFv, dialegeme, dsFv, CDR. Produksjonsmetoden for hvert av antistofffragmentene beskrives i detalj nedenfor.

(i) Produksjon av Fab

Fab kan fremstilles protokjemisk ved behandling av IgG med protasepapain. Etter behandling med papain separeres IgG-molekyler og Fc-fragmenter, hvis
 5 det originale antistoffet er en IgG-underklasse med protein-A-bindingsevne, IgG-molekyler og Fc-fragmenter ved å føres gjennom en protein-A-kolonne, og en uniform Fab kan gjenvinnes (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tredje utgave, 1995). Hvis antistoffet er en IgG-underklasse uten protein-A-bindingsevne, gjenvinnes Fab med ionutvekslingskromatografi fra fraksjonen
 10 som elueres ved lave saltkonsentrasjoner (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tredje utgave, 1995). I tillegg anvendes for genetisk konstruksjon av Fab i de fleste tilfeller E. coli eller insektceller og dyreceller. DNA som koder for V-regionen av antistoffet beskrevet i 2 (7) ovenfor, klones f.eks. til en Fab-ekspresjonsvektor for konstruksjon av en Fab-ekspresjonsvektor. Hva som
 15 helst kan anvendes for Fab-ekspresjonsvektoren, så lenge DNA-et for Fab kan inkorporeres og uttrykkes. Et eksempel er pIT106 (Science, 240: 1041-1043, 1988). Fab-ekspresjonsvektoren introdusere inn i en egnet E. coli og Fab kan genereres og lagres i et inklusjonslegeme eller periplasmasjikt. Fab kan aktiveres fra inklusjonslegemet ved en ombrettingsmetode vanlig anvendt med
 20 proteiner. Nå ekspresjonen er i periplasmasjiktet, skilles den aktive Fab i tillegg ut i kultursupernatanten. En uniform Fab kan renses fra kultursupernatanten ved anvendelse av en kolonne med bundet antigen (Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company, 1992).

25 (ii) Produksjon av F (ab')₂

Protokjemisk produseres F (ab')₂ ved behandling av IgG med proteasepepsin. Etter behandling med pepsin gjenvinnes en uniform F (ab')₂ ved anvendelse av samme renseoperasjonen som med Fab (Monoclonal Antibodies: Principles and
 30 Practice, tredje utgave, Academic Press, 1995). Det kan i tillegg fremstilles ved en metode i hvilken Fab' beskrevet i det følgende (iii), behandles med et maleimid, slik som o-PDM eller bis-maleimidheksan, og det dannes tioeterbindinger eller det kan fremstilles ved en metode i hvilken det behandles med DTNB [5,5'-ditiobis(2-nitrobenzonsyre)] og det dannes S-S-bindinger
 35 (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996).

(iii) Produksjon av Fab'

Fab' kan oppnås ved behandling av F (ab')₂ beskrevet i (ii) ovenfor med et reduksjonsmiddel, slik som ditiotreitol. Fab' kan i tillegg fremstilles ved genetisk konstruksjon ved anvendelse av E. coli, i de fleste tilfeller, eller
 5 insektceller eller dyreceller. DNA som koder for V-regionen av antistoffet beskrevet f.eks. i 2 (7) ovenfor, klones til en Fab'-ekspresjonsvektor og en Fab'-ekspresjonsvektor kan konstrueres. Hva som helst kan anvendes for Fab'-ekspresjonsvektoren, så lenge DNA for Fab' kan inkorporeres og uttrykkes. Et eksempel er pAK19 (BIO/TECHNOLOGY, 10: 163-167, 1992). Fab'-
 10 ekspresjonsvektoren introduseres inn i en egnet E. coli. Fab' kan genereres og akkumuleres i et inklusjonslegeme eller i periplasmasjiktet. Fab' aktiveres fra inklusjonslegemet ved ombrettingsmetoden vanlig anvendt for proteiner. Når uttrykt i periplasmasjiktet, homogeniseres i tillegg bakterier ved behandling med delvis fordøyelse ved lisozym, osmotisk sjokk, ultralyd, og dette kan
 15 gjenvinnes fra utsiden av bakterien. Etter ombretting eller fra det bakterielle homogenatet kan en uniform Fab' renses ved anvendelse av en protein-G-kolonne (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996).

(iv) Produksjon av scFv

20 scFv kan fremstilles ved genetisk konstruksjon ved anvendelse av en fag eller E. coli, eller insektceller eller dyreceller. DNA som koder for V-regionen av antistoffet beskrevet i 2 (7), kan f.eks. klones til en scFv-ekspresjonsvektor for konstruksjon av en scFv-ekspresjonsvektor. Hva som helst kan anvendes for
 25 scFv-ekspresjonsvektoren, så lenge DNA for scFv kan inkorporeres og uttrykkes. Eksempler inkluderer pCANTAB5E (GE Healthcare Bioscience Co.), pHFA (Human Antibodies & Hybridomas, 5: 48-56, 1994). scFv-ekspresjonsvektoren introduseres inn i en egnet E. coli. Ved infeksjon med en hjelper-fag kan det oppnås en fag i hvilken scFv uttrykkes på fagoverflaten
 30 som fusjonert med et fagoverflateprotein. scFv kan i tillegg genereres og akkumuleres i inklusjonslegemet eller i periplasmasjiktet av E. coli i hvilken scFv-ekspresjonsvektoren har blitt introdusert. Fra inklusjonslegemet kan det oppnås aktivert scFv ved ombrettingsmetoden vanlig anvendt for proteiner. Når uttrykt i periplasmasjiktet, homogeniseres i tillegg bakterier ved behandling
 35 med delvis fordøyelse ved lisozym, osmotisk sjokk, ultralyd, og dette gjenvinnes fra utsiden av bakterien. Etter ombretting eller fra de bakterielle homogenatet kan en uniform scFv renses ved anvendelse av positiv

ionutvekslingskromatografi (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996).

(v) Produksjon av dialegeme

5

Et dialegeme kan fremstilles ved genetisk konstruksjon, hovedsakelig ved anvendelse av E. coli, samt insektceller og dyreceller. Det fremstilles f.eks. DNA i hvilket VH og VL av antistoffet beskrevet i 2(7) ovenfor, bindes slik at aminosyrerestene som kodet for av binderen, er 8 rester eller mindre og klones i en dialegemeekspresjonsvektor for konstruksjon av ekspresjonsvektoren for dialegemet. Enhver vektor kan anvendes som dialegemeekspresjonsvektor så lenge den kan integreres med dialegemets DNA og uttrykke dialegeme-DNA. Eksempler inkluderer pCANTAB5E (GE Healthcare Bioscience), pHFA (Human Antibodies Hybridomas, 5, 48, 1994), dialegeme kan genereres og akkumuleres i inklusjonslegemet eller i periplasmasjiktet av E. coli i hvilket dialegemets ekspresjonsvektor har blitt introdusert. Fra inklusjonslegemet kan det oppnås aktivert dialegeme ved ombrettingsmetoden vanlig anvendt for proteiner. Når uttrykt i periplasmasjiktet, homogeniseres i tillegg bakterier ved behandling med delvis fordøyelse ved lisozym, osmotisk sjokk, ultralyd og lignende, og dette gjenvinnes fra utsiden av bakterien. Et uniformt dialegeme kan renses etter ombretting eller fra de bakterielle homogenatet, ved anvendelse av positiv ionutvekslingskromatografi (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996).

25 (vi) Produksjon av dsFv

dsFV kan fremstilles ved anvendelse hovedsakelig av E. coli, samt insektceller og dyreceller ved genetisk konstruksjon. Mutasjoner introduseres først ved egnede steder i DNA-et som koder for VH og VL av antistoffet beskrevet i (ii), (iv) og (v), og DNA i hvilket de kodede aminosyrerestene erstattes med cystein produseres. Hvert produserte DNA kan klones inn i dsFv-ekspresjonsvektoren for konstruksjon av ekspresjonsvektorer for VH og VL. Enhver vektor kan anvendes som dsFv-ekspresjonsvektor så lenge den kan integreres med og uttrykker dsFv-DNA. pUL19 (Protein Engineering, 7: 697-704, 1944) kan f.eks. anvendes. Ekspresjonsvektoren for VH og VL kan introduseres inn i en egnet E. coli og genererte produkter kan akkumuleres i inklusjonslegemet eller periplasmasjiktet. VH og VL oppnås fra inklusjonslegemet og periplasmasjiktet,

blandes og konverteres til aktiv dsFv ved ombrettingsmetoden som anvendes i vanlig proteinbehandling. Etter ombretting kan det utføres videre rensing ved ioneutvekslingskromatografi og gelfiltrering (Protein Engineering, 7: 697-704, 1994).

5

(vii) Produksjon av CDR-peptid

Peptider inneholdende CDR kan produseres ved kjemisk syntesemetoden, slik som Fmoc-metoden eller tBoc-metoden. CDR-peptidekspresjonsvektoren kan også produseres ved fremstilling av DNA som koder for et peptid inneholdende CDR, og ved kloning av det fremstilte DNA-et inn i en egnet ekspresjonsvektor. Enhver vektor kan anvendes som en ekspresjonsvektor så lenge den kan integreres med og uttrykker DNA som koder for CDR-peptidet. pLEX (Invitrogen) og pAX4a+ (Invitrogen) kan f.eks. anvendes. Ekspresjonsvektoren kan introduseres inn i en egnet E. coli og genererte produkter kan akkumuleres i inklusjonslegemet eller periplasmasjiktet. CDR-peptidet oppnås fra inklusjonslegemet eller periplasmasjiktet og kan renses ved ioneutvekslingskromatografi og gel-filtrering (Protein Engineering, 7: 697-704, 1994).

20

3. Egenskaper ved antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen og de funksjonelle fragmentet derav

Antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen og det funksjonelle fragmentet derav besitter en hvilken som helst av egenskapene nedenfor.

(a) FGF23-bindingstest; binder til full-lengdeproteinet med aminosyrerester fra 25. til 251. av SEQ ID NO: 4 av FGF-protein.

(b) In vitro-test; inhiberer aktiviteten av FGF23 i et assay, ved hvilket FGF23-aktiviteten kan detekteres. Et eksempel på metoden for detektering av FGF23-aktiviteten in vitro er aktivering av promotor av tidlig vekstresponsgen-1 ved human FGF23-stimulering (Nature, 444: 770-774, 2006).

(c) In vivo-test; inhiberer aktiviteten av endogene FGF23 og øker serumfosforkonsentrasjonen og serum-1,25D-konsentrasjonen når administrert til et menneske.

35

Graden av økning i serumfosforkonsentrasjonen og serum-1,25D-konsentrasjonen er større sammenlignet med konvensjonelt antistoff, 2C3B-

antistoff (det monoklonale antistoffet mot FGF23-protein fra mus offentliggjort i WO03/057733, anti-FGF23-antistoffet produsert av hybridom med tilgangsnr. FERM BP-7838) og økningen av serumfosforkonsentrasjonen og serum-1,25D-konsentrasjonen er også langvarig. Varigheten av forhøyet

5 serumfosforkonsentrasjon er omtrent 3 ganger eller lengre, fortrinnsvis omtrent 5 ganger det som for 2C3B-antistoffet, og varigheten av den forhøyede serum-1,25D-konsentrasjonen er omtrent 1,5 ganger eller lengre, fortrinnsvis 2,5 ganger det som for 2C3B-antistoffet når administrert til cynomolgus-apekatt.

10

Den foreliggende oppfinnelsen inkluderer også en nukleinsyre som koder for en aminosyresekvens av antistoffet mot FGF23 ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Nukleinsyren kan være DNA eller RNA. Nukleinsyren ifølge den foreliggende offentliggjøringen er fortrinnsvis en nukleinsyre som koder for en

15 aminosyresekvens av antistoffet produsert av hybridom-C10. Et eksempel er en nukleinsyre som koder for aminosyresekvensen av tungkjedens variable region (tungkjedenukleotidsekvenser av C10-antistoff), som kodes for av nukleotidsekvensene fra ved posisjon 58 C til en posisjon 408 A vist i SEQ ID NO: 11. Et annet eksempel er i tillegg en nukleinsyre som koder for

20 aminosyresekvens av den variable lettkjederegionen, som kodes av nukleotidsekvensen fra G ved posisjon 67 til A ved posisjon 384 vist i SEQ ID NO: 13.

II. Farmasøytiske sammensetninger

25

En formulering som er en farmasøytisk sammensetning omfattende det humane anti-FGF23-antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller det funksjonelle fragmentet derav, er inkludert i omfanget av den foreliggende oppfinnelsen. En slik formulering inkluderer fortrinnsvis i tillegg til antistoffet

30 og det funksjonelle fragmentet derav, et fysiologisk akseptabelt fortynningsmiddel eller bæremiddel, og kan være en blanding med andre legemiddel slik som andre antistoff eller antibiotika. Egnede bæremiddel inkluderer fysiologisk saltvann, fosfatbufret saltløsning, fosfatbufret salt-glukoseløsning og bufret fysiologisk saltvann, men er ikke begrenset til disse.

35 Antistoffet kan videre frysetørkes og kan rekonstitueres ved tilsetning av ovennevnte bufferløsning etter behov, og deretter anvendes. Administreringsveier inkluderer oral administrering, eller parenteral

administrering, slik som intraoral, trakeobronkial, endorektal, subkutan, intramuskulær og intravenøs administrering, og foretrukket administrasjonsvei er intravenøs administrasjon. Administrering kan gjennomføres i forskjellige formuleringer og formuleringer inkluderer aerosol, kapsler, tabletter, piller, 5 sirup, emulsjoner, stikkpiller, injeksjoner, kremer og taper.

Væskepreparater, slik som en emulsjon og sirup, kan fremstilles ved anvendelse av tilsetninger, f.eks.: vann; sakkarider slik som sukrose, sorbitol og fruktose; glykoler, slik som polyetylenglykol, propylenglykol; oljer slik som 10 sesamolje, olivenolje og soyaolje; konserveringsmidler slik som p-hydroksybenzonatere; smakstilsetninger slik som jordbærsmak og peppermynte.

Kapsler, tabletter, pulver og granulat kan produseres ved anvendelse av 15 tilsetningsstoffer, f.eks.: eksipienter, slik som laktose, glukose, sukrose og mannitol; desintegrasjonsmiddel, slik som stivelse og natriumalginat; smøremiddel, slik som magnesiumstearat og talkum; bindemiddel, slik som polyvinylalkohol, hydroksypropylcellulose og gelatin; overflateaktive middel, slik som fettsyreester; plastiseringsmiddel, slik som glyserin.

20 I injeksjonene kan det anvendes tilsetningsmidler, inkludert; vann; sakkarider, slik som sukrose, sorbitol, xylose, trehalose, fruktose, sukkeralkoholer, slik som mannitol, xylitol og sorbitol; buffere, slik som fosfatbuffer, sitratbuffer og glutamatbuffer; overflatemiddel, slik som fettsyreester.

25 En egnet formulering for parenteral administrering inkluderer injeksjoner, stikkpiller, aerosol. I tilfelle injeksjoner tilveiebringes disse vanligvis i form av enhetsdoseampuller eller flerdosebeholdere. Det kan være pulver som løses opp igjen, når i bruk, i et egnet bæremiddel, f.eks. pyrogenfritt sterilt vann.

30 Disse formuleringene inneholder tilsetningsstoff, slik som emulgator, suspensjonsmiddel, som vanlig anvendt for formulering av disse sammensetningene. Injeksjonsmetoder inkluderer f.eks. intravenøs infusjon, intravenøs injeksjon, intramuskulær injeksjon, intraperitoneal injeksjon, subkutan injeksjon, intradermal injeksjon. Doseringen er også forskjellig i

35 henhold til alderen på individet som mottar administreringen, administreringsvei, administreringshyppighet, og kan varieres bredt.

En stikkpille tilberedes ved anvendelse av et bæremiddel, slik som kakaosmør, hydrogenert fett eller karboksylsyre. Aerosol kan tilberedes ved anvendelse av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen av det funksjonelle fragmentet derav alene, eller ved anvendelse av et bæremiddel som ikke irriterer slimhinnene i munnen og luftveiene hos en mottaker (pasient), og kan spre det tidligere nevnte antistoffet og det funksjonelle fragmentet derav som fine partikler for å lette absorbering.

Eksempler på bæremiddel inkluderer særlig laktose, glyserin. Avhengig av egenskapene for det tidligere nevnte antistoffet eller det funksjonelle fragmentet derav og egenskapene ved bæremidlet som anvendes, kan det velges formuleringer slik som aerosol, tørt pulver. Komponentene vist som eksempler på tilsetningsstoffer for oral formulering, kan tilsettes disse parenterale formuleringene.

Doseringen kan variere i henhold til symptomer, alder, kroppsvekt, men i oral administrering, administreres vanligvis omtrent 0,01 mg–1000 mg per døgnet til en voksen. Dette kan administreres én gang eller deles opp i flere partier. I parenteral administrering kan det administreres omtrent 0,01 mg–1000 mg ved subkutan, intramuskulær eller intravenøs injeksjon per administrering.

Den foreliggende offentliggjøringen inkluderer et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelsen, eller det funksjonelle fragmentet derav, eller en forebyggende eller terapeutiske metode for sykdommer beskrevet nedenfor ved anvendelse av en farmasøytisk sammensetning inneholdende derav, og videre inkluderer den foreliggende offentliggjøringen en anvendelse av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller det funksjonelle fragmentet derav for produksjon av et middel for forebygging eller behandling av sykdommene beskrevet nedenfor.

Sykdommene som kan forebygges eller behandles av antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen eller det funksjonelle fragmentet derav, inkluderer sykdommer med for høy aktivitet av FGF23, slik som tumorindusert osteomalasi, ADHR, XLH, fibrøs dysplasi, McCune-Albright-syndrom, og en sykdom som følger abnorm mineralmetabolisme, slik som autosom recessiv hypofosfatemi. Forbedrende virkninger kan videre forventes for syndromer forbundet med disse sykdommene, slik som hypofosfatemi,

beinmineraliseringssvikt, smerter i beinet, muskelsvakhet, deformering av skjelettet, vekstlidelse, lavt 1,25D i blodet. Fordi FGF23 spiller en viktig rolle under den fysiologiske betingelsen, kan kalsiummetabolismekontrollaktiviteten for FGF23, som formidles av kontrollen av fosformetabolisme og vitamin D-metabolisme, reguleres av antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen og det funksjonelle fragmentet derav, og de kan slik anvendes forebyggende og terapeutisk for sykdommer forårsaket av abnormitet i mineralmetabolisme og vitamin D-metabolisme, slik som osteoporose, rakitt (inkludert hypofosfatemisk rakitt og vitamin D-resistente rakitt), hyperkalsemi, hypokalsemi, ektopisk kalsifisering, osteosklerose, Pagets sykdom, hyperparatyroidisme, hypoparatyroidisme, pruritt. Antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen og det funksjonelle fragmentet derav kan også anvendes forebyggende eller behandlende for sykdommer forårsaket av komplikasjoner ved nyresvikt og dialyse for nyresvikt, representert ved renal osteodystropfi, dialyseosteopati, renaltubulidysfunksjon. På den annen side har 1,25D vært rapportert å ha aktiviteter ikke bare i mineralmetabolisme, slik som kalsiummetabolisme som beskrevet ovenfor, men også inhiberende virkning på cellevekst, celledifferensierende promotoraktivitet. Antistoffet ifølge den foreliggende offentliggjøringen og det funksjonelle fragmentet derav kan således anvendes terapeutisk og forebyggende mot sykdommer forårsaket av celler hvis vekst og differensiering reguleres av 1,25D.

Det er også kjent at i tumorindusert osteomalasi forårsakes patologi av tumorens overproduksjon av FGF23. Det er derfor mulig at tilbaketrekking av tumoren kan induseres ved anvendelse av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen, bundet til en radioaktiv substans, slik som en radioaktiv isotop, eller med terapeutiske reagenser av forskjellige toksiner, slik som lavmolekylvekt legemiddel og ved akkumulering av det foreliggende antistoffet i den FGF23-overproduserende tumoren.

30

III. Eksempel på formulering

Formuleringen inneholdende antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller det funksjonelle fragmentet derav, tilveiebringes som en ampulle med steril løsning løst opp i vann eller farmasøytisk akseptabel løsning eller suspensjon. En steril pulverformulering (frysetørking av molekylet ifølge den

35

foreliggende oppfinnelsen foretrekkes) kan også plasseres i en ampulle og kan fortynnes for bruk ved anvendelse av en farmakologisk akseptabel løsning.

Eksempler

5

Følgende er den detaljerte beskrivelsen av den foreliggende oppfinnelsen med henvisning til eksempler, men dette betyr ikke at den foreliggende oppfinnelsen er begrenset kun disse beskrivelsene av eksempler.

10 **Eksempel 1**

Tilberedning av en ekspresjonsvektor for rekombinant human FGF23

(1) Konstruksjon av en ekspresjonsvektor for humant FGF23-protein.

15

cDNA kodende for human FGF23 ble amplifisert ved anvendelse av human cDNA-biblioteket over den ansvarlige tumoren for tumorindusert osteomalasi som mal, en F1EcoRI-primer (SEQ ID NO: 1), og en LhisNot-primer (SEQ ID NO: 2), og LA-Taq DNA-polymerase og ved gjennomføring av 35 sykluser PCR-trinn bestående av oppvarming ved 96 °C i 30 sekunder, ved 55 °C i 30 sekunder og ved 72 °C i 30 sekunder. F1EcoRI-primeren ble herdet til en sekvens forekommende videre oppstrøms for 5'-siden av nukleotidsekvensen kodende for human FGF23 og legger til et EcoRI-restriksjonssted ved 5'-siden av nukleotidsekvensen kodende for human FGF23 i det amplifiserte fragmentet.

25

LHisNot-primeren omfatter en sekvens som herdes til sekvensen ved 5'-siden av stoppkodonet av nukleotidsekvensen kodende for human FGF23, en sekvens kodende for terminalkodonen som følger sekvensen kodende for His6-tag-sekvensen (His-His-His-His-His-His) og et NotI-restriksjonssted. Det amplifiserte fragmentet koder for human FGF23-protein i hvilket His6-tag-sekvensen legges til ved karboksyterminalen, og har som et resultat et NotI-restriksjonssted nedstrøms derfra. Dette amplifiserte fragmentet ble fordøyet med EcoRI og NotI og ligert til en dyrecelle ekspresjonsvektor, pcDNA3.IZeo (Invitrogen) som ble fordøyet på lignende måte med EcoRI og NotI. Ekspresjonsvektoren konstruert på denne måten, ble klonet og

35 nukleotidsekvensen ble bestemt for å bekrefte at ekspresjonsvektoren kodet for målet, humant FGF23-protein som His6-tag-sekvensen ble lagt til. Denne vektoren betegnes pcDNA/hFGF23H.

LHisNot:

ATAAGAATGCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGATGGATGAACTTGGCGAA (SEQ ID NO: 2)

5

Et fragment ble amplifisert ved anvendelse av pcDNA/hFGF23H som en mal, FIEcoRI-primeren og en LNot-primer (SEQ ID NO: 3) og LA-Taq DNA-polymerase og ved gjennomføring av 25 sykluser av et PCR-trinn bestående av oppvarming ved 94 °C i 1 min, deretter ved 94 °C i 30 sek, ved 55 °C i 30 sek og ved 72 °C i 1 min. Etter fastsetting av reaksjonen ble fragmentet kodende for human FGF23 fordøyet med EcoRI og NotI og deretter renset. Dette ble klonet ved innsetting ved EcoRI- og NotI-restriksjonsstedene for EAK8/IRES/EGFP-vektoren, en dyrecelleekspresjonsvektor, pEAKS (Edge Biosystem), til hvilken den intramolekylære ribosomale inngangssekvensen (IRES) og forsterket grønn fluoriserende protein (EGFP) ble ligert. Nukleotidsekvensen av plasmidet oppnådd på denne måten ble bestemt for å bekrefte at den koder for humant FGF23-protein. Denne vektoren kalles pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23.

LNnot: ATAAGAATGCGGCCGCTCAGATGAACTTGGCGAA (SEQ ID NO: 3)

(eksempel 2)

25 **Ekspresjon av rekombinant human FGF23 og rekombinant mutert
humant FGF23H-protein**

(1) pcDNA/hFGF23H ble linearisert ved kløyving av FspI-restriksjonsstedet i det ampicillinresistente genet i vektoren og renses, og deretter blandet med CHO Ras klon-1-celler (Shirahata, S., et al., Biosci Biotech Biochem, 59: 345-347, 1995) og transfeksjonert til cellene ved elektroporering ved anvendelse av Gene Pulser II (Bio Rad). Etter dyrking av disse cellene i MEM- α -medium (Gibco BRL) inneholdende 10 % FCS i 24 t ble Zecocin (Invitrogen) tilsatt en endelig konsentrasjon på 0,5 mg/ml, og deretter ble cellene dyrket i en uke. Festede og dyrkede celler ble skilt ut ved trypsinisering og klonet ved begrenset fortykning-metoden i nærvær av Zecocin i endelig konsentrasjon på 0,3 mg/ml for å oppnå en mangfoldighet av klonede celler. Cellen som mest

effektivt uttrykte FGF23, ble identifisert ved Western-blot-metoden. Kutlursupernatanten for hver klonet celle ble samlet inn og ble underkastet SDS-polyakrylamidgelelektroforese, og deretter ble proteiner overført til en PCDF-membran (Millipore). Et signal avledet fra FGF-23H-protein ble

5 detektering ved omtrent 32 kDa ved anvendelse av anti-His-tagg (karboksyterminal)-antistoff (Invitrogen) og ECL-foto-luminiseringssystem (GE Healthcare Bioscience). Den høyeste ekspresjonen ble som et resultat funnet i en klonet betegnnet nr. 20, som fikk navnet CHO-OST311H og ble deponert ved International Patent Organism Depository (IPOD) National Institute of

10 Advanced Industrial Science and Technology (AIST) Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan, den 11. august, 2000 (depotnr.: FERM BP-7273). I den foreliggende beskrivelsen betegnes CHO-OST311H som CHO-hFGF23H.

15 **(2) Fremstilling av humane FGF23-uttrykkende celler**

Transfeksjon av pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23-vektor til CHO Ras klonet-1-celler ble utført ved gentransfeksjonsmetoden ved anvendelse av et membranfusjonslipid. CHO Ras klonet-1-celler ble dyrket i 6 brønnplater inntil

20 omtrent 60 % av bunnen av brønnen var dekket av cellene, og deretter ble dyrkingsmediet fjernet og 1 ml MEMα serumfritt medium ble tilsatt. Hvert av 2,5 µg av vektoren ble introdusert og 10 µl av Transfectam (registrert varemerke) (Promega) ble blandet med 50 µl MEMα serumfritt medium og deretter ble begge løsningene blandet og fikk stå i 10 min. Blandingene ble

25 tilsatt brønner med 6 brønnplater som var tilberedt på forhånd. Etter inkubasjon i 2 timer ble dyrkingsmediet inneholdende DNA fjernet, erstattet med et medium inneholdende 10 % FCS, og kulturen ble inkubert over natten. Neste dag ble Puromycin (Sigma) tilsatt til en endelig konsentrasjon på 5 µg/ml for valg av legemiddelresistente celler. De legemiddelresistente cellene

30 oppnådd på denne måten, ble klonet med begrenset fortynning-metoden. Cellelinjene som uttrykte målprotein mest effektivt, ble videre oppnådd ved Western-blot-metoden. Denne cellelinjen ble benevnt CHO-hFGF23.

35 **(3) Ekspresjon og detektering av rekombinant humant FGF23-protein i dyreceller**

Western-blotting av rekombinanten i kultursupernatanten av CHO-hFGF23H ved anvendelse av antistoffene mot karboksyterminal anti-His6-taggagekvensen dekte bånd på omtrent 32 kDa og omtrent 10 kDa. Disse 2 båndene ble skåret ut av gelen og aminosyresekvensen av aminoterminalene ble bestemt. I

5 det største molekylvektbåndet (omtrent 32 kDa) ble sekvensen fra aminosyre 25 av SEQ ID NO: 4 detektert og den syntes å være FGF23-protein fra hvilket signalsekvensen ble fjernet under utskillingsprosessen. På den annen siden ble sekvensen fra aminosyre 180 av SEQ ID NO: 4 bekreftet i båndet med lavere molekylvekt, og det viste seg at dette fragmentet var

10 karboksyterminalfragmentet produsert ved kløyvingen mellom aminosyre 179 og 180. Nærværet av et polypeptid med sekvensen fra aminosyre 179 for aminoterminalen (aminoterminalfragmentet) ble også gjenkjent ved detektering av det ved anvendelse av polyklonalt antistoff som gjenkjenner aminoterminalsiden av humant FGF23 (internasjonalt publikasjonsnr. WO02/14504, pamflett).

15

I kultursupernatanten av CHO-hFGF23 uten His6-taggagekvensen ble kløyving mellom aminosyrerest 179 og 180 på lignende måte bekreftet (internasjonalt publikasjonsnr. WO02/1450, pamflett). De følgende operasjonene ble derfor

20 gjennomført for å separere og rense full-lengde humant FGF23-protein, som synes ikke å være kløyd, med sekvensen fra aminosyre 25 til aminosyre 251 av SEQ ID NO: 4 (noen ganger betegnet full-lengde FGF23) fra aminoterminal- eller karboksyterminalfragmenter.

25 **(4) Rensing av rekombinant full-lengde humant FGF23-protein**

Kultursupernatanten av CHO-hFGF23 ble filtrert gjennom SuperCap (registrert varemerke) (Pall Gelman Laboratory) som er et membranfilter med 0,2 µm porestørrelse, og filtratet ble ført gjennom SP-Sepharose FF (GE Healthcare

30 Bioscience). Substanser med svak affinitet til kolonnen ble vasket og eluert med 50 mM natriumfosfatbuffer, pH 6,7. Denne fraksjonen inneholdt karboksyterminalfragmentet generert av kløyvingen mellom aminosyre 179 og 180. Protein holdt av kolonnen ble eluert med NaCl-konsentrasjonsgradient fra 0 til 0,7 M, og full-lengde humant FGF23-protein ble observert i fraksjonen

35 eluert med omtrent 0,3 M NaCl. Deretter ble full-lengde humant FGF23-protein absorbert til Talon Superflow (registrert varemerke) (Clontech), som er en metallaaffinitetskolonne, vasket med 50 mM natriumfosfatbuffer, pH 6,7 og

deretter eluert ved tilsetting av imidazol i forskjellige konsentrasjoner. Fraksjonen inneholdende målprotein ble absorbert til en SP-sefarose FF-kolonne og eluert for videre rensing.

5 Human FGF23 aminosyresekvens (SEQ ID NO: 4)

MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI
 HLYTATARN YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY
 SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQT
 L ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR
 AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS AEDDSERDPL
 NVLKPRARMT PAPASCSQEL
 PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF I

(eksempel 3)

10

Fremavling av mus som produserer humant antistoff (KM-mus)

Mus som produserer komplett humant antistoff for tilberedning av humant monoklonalt antistoff, har homozyg genetisk bakgrunn for destruert endogenisitet, både av Ig-tungkjede og kappa-lettkjede, og også for å ha kromosom 14-fragment (SC20) inneholdende humant Ig-tungkjedegenelokus og det humane Ig-kappakjede-transgenet (KCo5) samtidig. Disse musene ble avlet ved kryssing av A-stammemus som har human Ig-tungkjedelokus, og B-stammemus som har det humane Ig-kappa-transgenet. A-stammen er
 15
 20 homozyg for destruert endogenisitet både av Ig-tungkjede- og kappa-lettkjede-stammen, og er en musstamme med kromosom 14-fragment (SC20) som kan overføres til avkom. Denne musstammen beskrives f.eks. i rapporten fra Tomizuka et al., (Tomizuka, et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 97: 722-727, 2000). B-stammen er også homozyg for destruert endogenisitet både av Ig-tungkjeden og kappa-lettkjeden og er en transgen muslinje med det humane
 25 Ig-kappakjedetransgenet (KCo5). Denne muslinjen beskrives f.eks. i rapporten fra Fishwild et al., (Nat. Biotechnol., 14; 845-851, 1996).

I de følgende eksperimentene anvendes individuelle mus som er oppnådd ved
 30 kryssing av en hann A-stammemus og en hunn B-stammemus, eller en hann B-stammemus og en hunn A-stammemus, og i hvilken human Ig-tungkjeden

og kappa-lettkjeden detekteres samtidig i serumet [Ishida & Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000]. Mus som produserer det humane antistoffet, kan videre oppnås fra Kirin Beer Company ved kontrakt.

5 (eksempel 4)

Fremstilling av humant monoklonalt antistoff mot human FGF23

10 **(1) Anskaffelse av et hybridomproduserende humant monoklonalt antistoff mot human FGF23**

Monoklonale antistoff anvendt i de foreliggende eksemplene tilberedes i henhold til den generelle fremgangsmåten beskrevet f.eks i «Introduction to monoclonal antibody experimental manipulation» av Tamio Ando et al.,
15 publisert av Kodansha, 1991. Full-lengde humant FGF23-protein tilberedt i eksempel 2 ble anvendt som et immunogen, og musen som produserer det humane antistoffet fremavlet i eksempel 3, som produserer human immunoglobulin, ble immunisert.

20 For å fremstille det humane monoklonale antistoffet mot FGF23 ble renset full-lengde FGF23-protein tilberedt i eksempel 2 blandet med RIBI-adjuvans (Corixa) og inokulert intraperitonealt i mus som produserer humant antistoff, ved en dose på 20 µg/mus som ved den første immuniseringen. På lignende måte som i den første immuniseringen ble blandingen av renset FGF23- og
25 RIBI-adjuvans (Corixa) inokulert totalt 3 ganger med 2-ukers mellomrom. Fem mus ble anvendt for immunisering, blodprøver ble samlet inn etter den tredje immuniseringen, og nærværet av humant IgG-antistoff mot FGF23 i serum ble bekreftet ved enzymmerkings immunosorberingsassay (ELISA)-metoden som beskrevet nedenfor. Musen ble valgt som viste den høyeste serumverdien ved
30 ELISA ved anvendelse av FGF23 fiksert på fast-fasen med anti-FGF23-protein monoklonalt antistoff fra mus, 3CIE, som ble offentliggjort i internasjonalt publikasjonsnr. WO03/057733, pamflett (anti-FGF23-antistoff produsert av hybridoma deponert som FERM BP-7839), og ble immunisert med 20 µg full-lengde humant FGF23-protein/mus via administrering i halevenen 3 dager før
35 milten ble fjernet som beskrevet nedenfor.

Milten ble kirurgisk fjernet fra den immuniserte musen, senket ned i 10 ml DMEM inneholdende 350 mg/ml natriumbikarbonat, 50 enheter/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin og uten serum (Invitrogen, heretter betegnet DMEM heri) og knust på et finmasket gitter (Cell strainer: Falcon)) ved anvendelse av spatula. Cellesuspensjonen som gikk gjennom gitteret, ble sentrifugert for å skille ut celler og cellene ble deretter vasket to ganger med DMEM uten serum og suspendert i DMEM uten serum for måling av celleantallet. Myelomceller, SP2/0 (ATCC nr. CRL-1581) ble i mellomtiden dyrket i DMEM (Invitrogen) inneholdende 10 % FCS (Sigma) (heretter betegnet DMEM med serum heri) ved 37 °C under 5 % karbondioksidgass slik at celletettheten ikke overskred 1×10^6 celler/ml. Disse myelomcellene ble på lignende måte vasket med DMEM uten serum, suspendert i det samme mediet og talt. Gjenvunnet miltcellesuspensjon og mus myelomcellesuspensjon ble blandet i et forhold på 5:1 celler, sentrifugert og supernatanten ble fullstendig fjernet. Til denne cellepelletten ble det sakte tilsatt 1 ml 50 % (vekt/volum) polyetylglykol 1500 (Boehringer-Manheim) som et fusjonsmiddel mens pelletten ble omrørt med spissen av en pipette, og deretter ble 1 ml DMEM uten serum som var varmet opp på forhånd til 37 °C sakte tilsatt i 2 porsjoner og videre ble det tilsatt 7 ml DMEM uten serum. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet, og de fusjonerte cellene oppnådd på denne måten ble underkastet screening ved begrenset fortykning-metoden som beskrevet nedenfor. Hybridomvalget ble utført ved dyrking i DMEM inneholdende 10 % FCS og IL-6 (10 ng/ml (eller 10 % hybridomkloningsfaktor (heretter betegnet HCF heri): Biobase) og hypoksantin (H), aminopterin (A) og tymidin (T) (heretter betegnet HAT heri: Sigma). Enkeltkloner ble videre oppnådd ved begrenset fortykning-metoden ved anvendelse av DMEM inneholdende HT (Sigma), 10 % FCS og 10 % HCF. Dyrking ble gjennomført på 96-brønn mikrotiterplater (Becton, Dickinson). Valg av hybridomkloner som produserer monoklonalt anti-FGF23-antistoff (screening), og karakterisering av monoklonalt humant antistoff produsert av de respektive hybridomene, ble gjennomført ved enzymmerket immunosorberingsassay (ELISA), som beskrevet nedenfor. Mange hybridomer ble som et resultat oppnådd, som inneholdt human immunoglobulin-γ-kjede (hIgγ) og human immunoglobulin κ-lettkjede, og som produserte monoklonalt humant antistoff med den spesifikke reaktiviteten på human FGF23. Blant en rekke oppnådde hybridomer ble 2 kloner (C10 og C15) spesielt oppnådd som hybridomer som produserer et antistoff som gjenkjenner FGF23-proteinet. I alle eksemplene beskrevet nedenfor, inkludert dette eksemplet, ble videre

hybridomklonene som produserte det monoklonale anti-FGF23-antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen, identifisert ved anvendelse av symboler. «Antistoff» festet før eller etter disse symbolene, indikerte enda videre antistoffet fremstilt av hybridomet eller rekombinant antistoff produsert av

5 vertsceller som bar antistoffgenet (full-lengde eller variabel region) isolert fra hybridomet. I den grad sammenhengen tydelig indikerer det, kan navnet på hybridomklonet også indikere navnet på antistoffet. Hybridomklone C10 ble deponert ved International Patent Organism Depositary (IPOD) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) Tsukuba

10 Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan, den 2,. februar, 2007 (depotnr.: FERM ABP-10772) (ID-merke: C10).

(2) Rensing av C10 og C15 antistoff fra kultursupernatanten av hybridomet

15

C10- og C15-hybridom oppnådd i eksempel 4 ble kondisjonert til eRDF-medium (Kyokuto Seiyaku) inneholdende kalveinsulin (5 µg/ml, Invitrogen), human transferrin (5 µg/ml, Invitrogen), etanoamin (0,01 mM, Sigma), natriumselenitt ($2,5 \times 10^{-5}$ mM, Sigma), 1 % lav-IgG kalvefosterserum

20 (Hyclone). Hybridomet ble dyrket i en kolbe og kultursupernatanten ble gjenvunnet. Kultursupernatanten ble affinitetsrenset ved anvendelse av protein-G fastflytende gel (GE Healthcare, Bioscience), PBS(-) som en absorpsjonsbuffer og 0,1 M glysinbuffer (pH 2,8) som en elueringsbuffer. Den eluerte fraksjonen ble justert til omtrent pH 7,2 ved tilsetning av 1 M Tris (pH

25 9,0). Antistoffløsningen tilberedt på denne måten, ble erstattet med PBS ved anvendelse av Sephadex G25-desalineringskolonne (NAP-kolonne; GE Healthcare Bioscience) og sterilisert ved filtrering med et membranfilter MILLEX-GV med 0,22 µm porestørrelse (Millipore) for å oppnå rensset C10- og C15-antistoff. Konsentrasjonen av det rensede antistoffet ble beregnet ved

30 måling av 280 nm-absorpsjon og ved å anta 1 mg/ml er 1,4 OD.

(eksempel 5)

Fremstilling av antistoffgenet kodende for C10-antistoff og fastsetting

35 **av sekvensen derav**

(1) Syntese av cDNA av C10-antistoffet

For å fremstille DNA-fragmentet inneholdende de variable regionene av humant antistoff tungkjede og lettkjede som uttrykkes i C10-hybridom, ble det gjennomført kloning av 5' RACE-metoden (5' hurtigamplifisering av cDNA-ender) ved anvendelse av primere spesifikke for de konstante regionene av tung- og lettkjeden av humant antistoff. Kloningen ble nærmere bestemt utført uten anvendelse av BD SMART RACE DNA-aplifiseringspakken (Becton Dickinson Bioscience Clonetech), i henhold til produsentens anvisninger.

- 10 RNA-ekstrasjonsreagensen, ISOGEN (Nippon Gene), ble tilsatt C10-hybridom og 15 µg av totalt RNA ble rensset som materialet for cDNA-syntese, i henhold til produsentens anvisninger. Den 1. stammen av cDNA ble tilberedt ved anvendelse av omtrent 1 µg av hvert rensset komplett RNA som mal. Alle reagensene og enzymene unntatt anvendt RNA ble tilveiebragt av BD SMART
- 15 RACE cDNA-amplifikasjonspakken.

I den 1. stammen cDNA-syntese,

Totalt RNA 1 µg/3 µl

5'CDS 1 µl

- 20 SMART Oligo 1 µl

ble reaksjonsblandingen med sammensetningen ovenfor inkubert ved 70 °C i 2 min, og deretter ble

5 x buffer 2 µl

DTT 1 µl

- 25 dNTP blanding 1 µl

PowerScript-revers transkriptase 1 µl

tilsatt og inkubert ved 42 °C i 1,5 t.

Videre ble 50 µl Tricine-EDTA-buffer tilsatt og deretter inkubert ved 72 °C i

- 30 7 min for å oppnå den 1. stammen cDNA.

(2) Amplifisering av tungkjedegenet og lettkjedegenet ved PCR og bekrefting av nukleotidsekvensene.

- 35 **(2)-1, Amplifisering av tungkjedegenet og lettkjedegenet ved PCR.**

- For å amplifisere cDNA av genet som koder for C10-antistoffet, ble følgende reaksjonsblanding tilberedt og underkastet PCR, ved anvendelse av et PCR-primersett for 3'-primer med sekvensene spesifikke for humant antistoff (de spesifikke sekvensene beskrives senere) og 5'-primeren (Universal primer A-blanding) som hybridiserer spesifikt til sekvensene tilsatt 5'-terminalen av cDNA syntetisert av BD SMART RACE cDNA-amplifikasjonspakken, og KOD-Plus-DNA-polymerase (Toyobo) som PCR-enzym.

steril H ₂ O	28 µl
1. stamme cDNA	2,5 µl
KOD-Plus-buffer (10 x)	5 µl
dNTP-blanding (2 mM)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	2 µl
KOD-Plus- (1 enhet/µl)	1 µl
Universal primer A-blanding (UPM) (10 x)	5 µl
Genspesifikke primere (GSP) (10 µM)	1,5 µl
Totalt volum	50 µl

- 10 For amplifiseringen av tungkjedegenet ble settet med UPM-primere i SMART RACE cDNA-amplifikasjonspakken og IgG1p-primer (SEQ ID NO: 5) anvendt, mens for amplifikasjonen av lett kjedegenet ble settet av UPM-primer og hk-2 (SEQ ID NO: 6) anvendt.

IgG1p: TCTTGTCACCTTGGTGTTGCTGGGCTTGTG (SEQ ID NO: 5)

- 15 hk-2: GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGC (SEQ ID NO: 6)

Den anvendte reaksjonsbetingelsen er som følger:

5 sykluser ved 94 °C / 30 sek og 72 °C / 3 min ble gjentatt,

5 sykluser ved 94 °C / 30 sek, 70 °C / 30 sek og 72 °C / 3 min ble gjentatt og

- 20 25 sykluser ved 94 °C / 30 sek, 68 °C / 30 sek og 72 °C / 3 min ble gjentatt.

Denne reaksjonsblandingen 2 µl ble fortynnet ved tilsetning av 98 µl av Tricine-EDTA-buffer, og den andre (nestet) PCR-en ble utført ved anvendelse av 5 µl av den fortynnede blandingen som mal. Sammensetningen av PCR-reaksjonsblandingen er som følger:

25

steril H₂O 30 µl

Den første PCR-reaksjonsblandingen (50 gangers fortynning)	5 µl
KOD-Plus-buffer (10 x)	5 µl
dNTP-blanding (2 mM)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	2 µl
KOD-Plus- (1 enhet/µl)	1 µl
Nestet universell primer A (NUP; 10 µM)	1 µl
Genspesifikke primere (GSP) (10 µM)	1 µl
Totalt volum	50 µl

Som et primersett for amplifisering av tungkjedegenet i den ovennevnte reaksjonen ble det anvendt NUP-primer (i SMART RACE cDNA-amplifikasjonspakke; Becton Dickinson Bioscience Clonetechn) og hh2-primer (SEQ ID NO: 7) og for amplifisering av lett kjedegenet ble det anvendt UPM-primer og hk-5-primer (SEQ ID NO: 8). Reaksjonstemperaturbetingelsen var som følger: ved 94 °C som den innledende temperaturen i 1 min, deretter ble 20 sykluser ved 94 °C / 5 sek, 68 °C / 10 sek og 72 °C / 3 min gjentatt. Endelig ble det gjennomført oppvarming ved 72 °C i 7 min.

hh2: GCTGGAGGGCACGGTCACCACGC (SEQ ID NO: 7)

hk-5: AGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTC (SEQ ID NO: 8)

(2)-2; Fastsetting av nukleotidsekvensen for antigen-genet

Det amplifiserte tungkjede PCR-fragmentet (heretter henvist til heri som HV[C]: bestående av 5'-ikke-oversatt regionledersekvens, variabel region (HV) og en del av konstant region ([C]) av H-kjeden), og det amplifiserte lett kjede PCR-fragmentet (heretter henvist til heri som LV[C]: bestående av 5'-ikke-oversatt regionledersekvensen, variabel region (LV) og en del av konstant region ([C]) av L-kjeden), ble gjenvunnet ved etanolutfelling og deretter underkastet agarosegelelektroforese. Gjenvunnede fragmenter ble rensset på en DNA-rensepakke ved anvendelse av membran, QIAquick-gelekstraksjonspakke (Qiagen). Det rensede HV[C]-amplifiserte fragmentet eller det LV[C]-amplifiserte fragmentet ble subklonet i PCR 4 Blunt-TOPO-vektor fra Zero Blunt TOPO PCR-kloningspakken (Invitrogen) og nukleotidsekvensen av det innsatte DNA-et ble analysert for plasmid-DNA av den oppnådde klonen. Primerne

anvendt for DNA-nukleotidsekvensen, var M13-20FW (SEQ ID NO: 9) og M13RV (SEQ ID NO: 10)

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

5

M13RV: CAGGAAACAGCTATGAC (SEQ ID NO: 10)

DNA-nukleotidsekvensen kodende for den variable tungkjederegionen og den variable lettkjederegionen, og aminosyresekvensen for den variable tungkjederegionen og den variable lettkjederegionen av C10-antistoffet vises nedenfor.

<C10-tungkjede nukleotidsekvens> (fra ATG-initieringskodonen til DNA-sekvensen kodende for karboksyterminalaminosyrerester av den variable regionen) (SEQ ID NO: 11)

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGA CTGGA GGTCT CTGCT GTAG CTCCAGGTGC TCACTCCAG
      70      80      90     100     110     120
GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGGTTTCC
     130     140     150     160     170     180
TGCAAGGCAT CTGGATACAC CTTACCAAC CACTATATGC ACTGGGTGCG ACAGGCCCT
     190     200     210     220     230     240
GGACAAGGGC TTGAGTGGAT GGAATAATC AACCTATTA GTGGTAGCAC AAGTAACGCA
     250     260     270     280     290     300
CAGAAGTTCC AGGGCAGAGT CACCATGACC AGGGACACGT CCACGAGCAC AGTCTACATG
     310     320     330     340     350     360
GAGCTGAGCA GCCTGAGATC TGAGGACACG GCCGTGTATT ATTGTCCGAG AGATATTGTG
     370     380     390     400     408
GATGCTTTTG ATTTCTGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA

```

<C10-tungkjede aminosyresekvens> (til ledersekvensen og den variable regionen) (SEQ ID NO: 12) (Understrekede aminosyrerester representerer ledersekvensene som et sekresjonssignal)

```

      10      20      30      40      50      60
MDWTWRVFCL LAVAPGAHSQ VQLVQSCAEV KKPGASVKVS CKASGYTFN HYMHWVRQAP
      70      80      90     100     110     120
QGQLEWMGII NPISGSTSNA QKFQGRVTMT RDTSTSTVYM ELSSLRSEDV AVYYCARDIV
     130     136
DAFDWQGGT MVTVSS

```

<C10-lettkjede nukleotidsekvens> (fra ATG-initieringskodonen til DNA-sekvensen kodende for karboksyterminalaminosyrerester av den variable regionen) (SEQ ID NO: 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 CTTGCCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTTAGTCTG GTATCAGCAG
     190     200     210     220     230     240
AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGGA AAGTGGGGTC
     250     260     270     280     290     300
CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTICA CTCTACCAT CAGCAGCCTG
     310     320     330     340     350     360
CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGITTA ATGATTACTT CACTTTCGGC
     370     380     384
5 CCTGGGACCA AAGTGGATAT CAAA

```

<C10-lettkjede aminosyresekvens> (til ledersekvensen og den variable regionen) (SEQ ID NO: 14) (Understrekede aminosyresrester representerer ledersekvensene som et sekresjonssignal)

```

10
      10      20      30      40      50      60
MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCAIQLTQSP SLSASVGDRT VTITCRASQG ISSALVWYQQ
      70      80      90     100     110     120
KPGKAPKLLI YDASSLESGV PSRFSGSGSG TDFLTITSSL QPEDFATYYC QQFN DYFTFG
     128
PGTKVDIK

```

I gensekvensen for C10-antistoffet subklonet i PCR 4 Blunt-TOPO-vektoren ble en del av den konstante regionen av den humane antistoffsekvensen klonet, og DNA-nukleotidsekvensen for denne regionen ble også analysert. Resultatet indikerte at nærværet av sekvenskodingen for aminosyrerest 118 til 191 i den konstante tungkjederegionen som vises av EU-indeksen i Kabat et al., ble bekreftet og var i fullstendig overensstemmelse med aminosyresekvensen til humant IgG1, og det ble slik bestemt at underklassen av C10-antistoffet var IgG1. Antistoffgenet kodende for C15-antistoffet ble i tillegg oppnådd og sekvensen derav ble bestemt ved anvendelse av den samme fremgangsmåten.

(eksempel 6)

25 Konstruksjon av rekombinant C10-antistoffekspresjonsvektor

Produksjon av C10-ekspresjonsvektor (prosesskjema vises i fig. 1)

DNA fra LV (lettkjedeledersekvens + variabel region) av C10-antistoffet ble

5 amplifisert med PCR ved KOD-Plus-DNA-polymerase ved anvendelse av
 oppnådd plasmid-DNA inneholdende LV[C]-kjede C10-antistoff som mal og
 primere C10_L5_Bgl1 (SEQ ID NO: 15) og C10_L3_Bsi (SEQ ID NO: 16) hvilket
 ble designet for å legge til restriksjonsenzymsteder (5' terminal BglII, 3'-
 terminal BsiWI) for binding til endene. Reaksjonstemperaturbetingelsen var:

10 etter oppvarming i 1 min ved starttemperaturen 94 °C, ble en syklus på 94 °C
 / 5 sek og 68 °C / 45 sek gjentatt 35 ganger og en endelig oppvarming ved
 72 °C / 7 min. Det amplifiserte DNA-fragmentet ble fordøyet med
 restriksjonsenzymene BglII og BsiWI og rensset ved gjenvinning av 400 bp DNA
 fra agarosegelelektroforese. Vektor-DNA-et, N5KG1-Val Lark-vektoren (IDEC

15 Pharmaceuticals, en modifisert vektor av N5KG1 (amerikansk patent
 6001358)) ble sekvensielt fordøyet på lignende måte med restriksjonsenzym
 BglII og BsiWI, underkastet defosforyleringsbehandling med kaliumfosfatase
 (E. coli C75) (Takara Shuzo Co., Ltd.) og deretter gjenvunnet som et litt
 mindre enn 9 kb-DNA etter rensing på agarosegelelektroforese og DNA-

20 rensepakke. Disse 2 fragmentene ble ligert med T4 DNA-ligase og transfisert til
 E. coli DH10B for å oppnå transformanter. Plasmid-DNA av transformanter,
 som inneholdt det innsatte DNA-et, ble underkastet DNA-
 nukleotidsekvensanalyse, og plasmid DNA N5KG1_C10_Lv, i hvilken LV av C10-
 antistoffet ble satt inn i rammen ved 5' oppstrøms av den humane konstante

25 lettkjederegionen av N5KG1-Val Lark, ble oppnådd. HV (ledersekvensen +
 variabel region av tungkjeden) av C10-antistoffet ble satt inn i plasmidvektoren
 i hvilken LC ble innsatt (N5KG1_C10_Lv). HV-en ble amplifisert ved PCR ved
 anvendelse av plasmid-DNA inneholdende HV[C] av C10-antistoff subklonet i
 pCR4Blunt-TOPO-vektor som en mal og primerne, C10_H5_Sal (SEQ ID NO:

30 17) og C10_H3_Nhe (SEQ ID NO: 18) designet for å legges til
 restriksjonsenzymstedet (SalI ved 5'-terminalen, NheI ved 3'-terminalen) for
 binding til endene. Reaksjonstemperaturbetingelsen var: etter oppvarming i
 1 min ved starttemperaturen på 94 °C, ble en syklus på 94 °C / 5 sek. og
 68 °C / 45 sek. gjentatt 35 ganger og endelig varmet opp til 72 °C / 7 min.

35 Renset HV-amplifisert DNA-fragment subklonet i pCR4Blunt-TOPO-vektor og
 innsatt DNA av slik oppnådde kloner av plasmid-DNA ble analysert ved
 sekvensering. Primerne anvendt for DNA-sekvensering var M13-20FW og

M13RV beskrevet ovenfor. Den innsatte delen av subklonene ble analysert ved DNA-sekvensering, og det ble valgt plasmid-DNA (TOPO_C10-Hv), som ikke hadde noen forskjell med mal-HV-en, og hvor primerdelene også var den samme sekvensen som designet. Dette DNA-et ble fordøyet med

5 restriksjonsenzymmer, SalI og NheI, underkastet agarosegelelektroforese, og DNA-fragmentet som har omtrent 420 bp, ble gjenvunnet og rensset og ble ligert ved anvendelse av T4 DNA-ligase til N5KG1_C10_Lv DNA (omtrent 9 kb), som på lignende måte ble underkastet restriksjonsenzymbehandling (SalI og NheI) og defosforylering. Ligeringsproduktet ble introdusert inn i E. coli DH10B

10 og målplasmid-DNA ble valgt fra transformantene oppnådd på denne måten. Antistoffet uttrykkende plasmid-DNA, N5KG1_C10_1H (klone nr. 1) oppnådd på denne måten, ble masseprodusert og rensset, og det ble bekreftet at det ikke ble introdusert noen endringer under kloningsprosessen i DNA-nukleotidsekvensen av hele regionen av L-kjeden og H-kjeden og rundt

15 innsetningsstedet (fig. 2 og 3). Bekreftelse av DNA-sekvensen ble gjennomført ved anvendelse av primere for SEQ ID NO: 19–25. Forenklet kart av C10-antistoffekspresjonsvektor som vist i fig. 4. I tillegg ble en rekombinant C15-antistoffekspresjonsvektor konstruert ved anvendelse av den samme metoden.

20 C10_L5_Bgl: GAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCT (SEQ ID NO: 15)

C10_L3_Bsi: AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGC (SEQ ID NO: 16)

25

C10_H5_Sal: AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTC (SEQ ID NO: 17)

C10_H3_Nhe: AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC (SEQ ID NO: 18)

30

hh-4: GGTGCCAGGGGGAAGACCGATGG (SEQ ID NO: 19)

hh-1: CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC (SEQ ID NO: 20)

35

CMVH903F: GACACCCTCATGATCTCCCGGACC (SEQ ID NO: 21)

CMVHR1303: TGTCTCCGGCTGCCCATGCTCT (SEQ ID NO: 22)

SEQU4618; TCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCC (SEQ ID NO: 23)

5 hk-1: TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC (SEQ ID NO: 24)

SEQU1783: GGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA (SEQ ID NO: 25)

(eksempel 7)

10

Fremstilling av rekombinant C10-antistoff

C10-antistoffuttrykkende celler ble produsert ved introdusering av konstruert C10-antistoffekspresjonsvektor i vertsceller. En stamme dihydrofolatreduktase (DHFR)-slettingsmutant CHO DG44-celler (heretter henvist til heri som CHO-celler, IDEC Pharmaceuticals), kondisjonert til et serumfritt medium, EX-CELL325PF-medium (JRH, inneholdende 2 mM glutamin, 100 enheter/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, hypoksantin og tymidin (HT)-supplement (1: 100) (Invitrogen)) ble anvendt som vertsceller for ekspresjon. Introduksjon av vektoren i vertsceller ble utført ved elektroporering. Genet ble introdusert til 4 x 10⁶ CHO-celler ved elektroporering ved linearisering av omtrent 2 µg av C10-ekspresjonsvektoren med et restriksjonsenzym AscI og anvendelse av en BioRad-elektroporator ved 350 V, 500 µF, og cellene ble deretter sådd i 96-celle kulturplater. Etter introduksjon av vektoren i cellene ble G418 tilsatt, og dyrkingen fortsatte. Etter bekreftelse av koloniene ble stammer uttrykkende antistoff valgt. De valgte CHO-cellelinjene ble dyrket i EX-CELL-325 PF-medium (inneholdende 2 mM glutamin, 100 enheter/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, hypoksantin og tymidin (HT)-supplement (1:100) (Invitrogen)) under 5 % CO₂. Kultursupernatanten ble absorbert til en Mabselect Protein A-kolonne (HE Healthcare Bioscience), vasket med PBS og eluert med 20 mM Na-citrat og 50 mM NaCl (pH 3,4)-buffer. Eluatet ble nøytralisert til pH 7,0 med 50 mM natriumfosfat pH 7,0. Ledeevnen ble justert til 4,0 ms/cm eller under ved fortykning med omtrent 1,5 ganger avionisert vann. Prøven ble deretter påført en lenket kolonne av Q-Sepharose (Hitrap Q HP, GE Healthcare Bioscience) og SP-Sepharose (Hitrap SP FF, GE Healthcare Bioscience) for absorbering, vasket med 20 mM natriumfosfatbuffer (pH 5,0) og deretter eluert med PBS(-). Antistoffløsningen tilberedt på denne måten, ble filtersterilisert

gjennom et 0,22 µm-porestørrelse membranfilter, MILLEX-GV (Millipore). Konsentrasjonen av det rensede C10-antistoffet ble beregnet ved måling av 280 nm-absorpsjon og ved å anta 1 mg/ml er 1,4 OD. Et rekombinant C15-antistoff ble i tillegg fremstilt ved anvendelse av den samme metoden.

5

(Eksempel 8)

Konstruksjon av cynomolgus-apekatt FGF23-proteinekspresjonsvektoren

10

Konstruksjon av cynomolgus-apekatt FGF23-proteinekspresjonsvektoren

EDTA-behandlet veneblod av cynomolgus-apekatt, 5 % Dextran T-2000 (GE Healthcare Bioscience) suspendert i PBS (-) ble blandet i forholdet 2:1 for å skille ut røde blodceller. Supernatanten ble deretter lagt lagvis oppå en lymfocytseparasjonløsning (Ficoll-Plaque) (GE Healthcare Bioscience) og sentrifugert for å oppnå lymfocytfraksjonen. Slik oppnådde lymfocytter ble suspendert i ISOGEN-LS (Nippon Gene) og totalt lymfocyt-RNA av cynomolgus-apekatter ble oppnådd ifølge den vedlagte protokollen. Fra dette totale lymfocyt-RNA av cynomolgus-apekatter ble lymfocyt-cDNA-bibliotek for cynomolgus-apekatt tilberedt ved anvendelse av First Strand cDNA-syntesepakke (Invitrogen) ifølge den vedlagte protokollen. cDNA-kodende cynomolgus-apekatter FGF23 ble amplifisert ved anvendelse av lymfocyt-cDNA-bibliotek av cynomolgus-apekatter som mal, apekatt yFGF23FW-primer (SEQ ID NO: 26), og apekatt FGF23RV-primer (SEQ ID NO: 27), og KOD pluss DNA-polymerase (Toyobo) og inkubasjon ved 94 °C i 5 min, og deretter ble det gjennomført 45 sykluser av et PCR-trinn med oppvarming ved 94 °C for 20 sek., ved 55 °C i 30 sek. og ved 72 °C i 50 sek. Apekatt FGF23FW-primer hybridiseres til en sekvens forekommende i 5'-oppstrømsregionen av nukleotidsekvensen kodende for human FGF23 og legger til EcoRI-restriksjonsstedet til 5'-siden av den FGF23-kodende regionen i det amplifiserte fragmentet. Apekatt FGF23RV-primer inneholder en sekvens som hybridiseres til sekvensen inneholdende stoppkodonen av den humane FGF23-kodende regionen, og NotI-restriksjonsstedet. Dette amplifiserte fragmentet ble fordøyet med EcoRI og NotI og klonet ved innsetting ved EcoRI-og NotI-restriksjonsstedet av pEAK8/IRES/EGFP-vektoren som er en ekspresjonsvektor

pEAK8 (Edge Biosystem) som indre ribosom-inngangssted (IRES) og forsterket grønt fluoresceringsprotein (EGFP) lenkes til. Nukleotidsekvensen av plasmidet oppnådd på denne måten, ble bestemt for å bekrefte at den koder for et cynomolgus-apekatt FGF23-protein. Denne vektoren ble betegnet

5 pEAK8/IRES/EGFP/monkeyFGF23. Nukleotidsekvensen og aminosyresekvensen for cynomolgus-apekatt-FGF23 oppnådd i det foreliggende eksemplet, vises i henholdsvis SEQ ID NO: 28 og 29.

10 monkeyFGF23FW: CGGAATTCCACCATGTTGGGGGCCCCGCCTCAGGCT (SEQ ID NO: 26)

monkeyFGF23FW: ATTTGCGGCCGCTAGATGAACTTGGCGAAGGGGC SEQ ID NO: 27)

15 Nukleotidsekvens for cynomolgus-apekatt-FGF23 (SEQ ID NO: 28)

ATGTTGGGGGCCCCGCCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCCTTGTGCAGCGTCT
GCAGCATGAGCGTCATCAGAGCCTATCCCAATGCCTCCCCATTGCTCGGCTCC
AGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACACAGCCACAGCCAGGAACAGCTACC
ACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCACGTGGATGGCGCACCCCATCAGACCATC
TACAGTGCCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTGGTGATTACAGG
TGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGCATGGATTTTCGGAGGCAACATTTTGGAT
CACACTATTTCAACCCGGAGAACTGCAGGTTCCGACACTGGACGCTGGAGAAC
GGCTACGACGTCTACCACTCTCCTCAGCATCACTTCTGGTCAGTCTGGGCCGG
GCGAAGAGGGCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCCCTACTCCCAGTTCCT
GTCCCGGAGGAACGAGATCCCCCTCATCCACTTCAACACCCCCAGACCACGGC
GGCACACCCGGAGCGCCGAGGACGACTCGGAGCGGGACCCCTGAACGTGCT
GAAGCCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCGGCCTCCTGCTCACAGGAGCTCC
CGAGCGCCGAGGACAACAGCCCGGTGGCCAGCGACCCGTTAGGGGTGGTCAG
GGGCGGTCTGGGTGAACACGCACGCTGGGGGAACGGGCCCGGAAGCCTGCCGC
CCCTTCGCCAAGTTCATCTAG

20

Aminosyresekvens for cynomolgus-apekatt-FGF23 (SEQ ID NO: 29)

MLGARLRLWV CALCSVCSMS VIRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFGG
 NIFGSHYFNP ENCRFRHWTL ENGYDVYHSP QHHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPRPRRHTRS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 PAPASCSQEL PSAEDNSPVA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEACRPFASF I

(2) Tilberedning av supernatant av cynomolgus-apekatt-FGF23-uttrykkende celler

5

pEAK8/IRES/EGFP/apekattFGF23 ble forbigående transfisert til PEAK-hurtigceller (Edge Biosystem) ved kalsiumfosfatmetoden, og kultursupernatanten ble innhentet.

10 (Eksempel 9)

Undersøkelse for binding av C10-antistoff til antistoff cynomolgus-apekatt-FGF23

- 15 Det faktum at C10-antistoffet binder ikke bare til human FGF23, men også til cynomolgusa-apekatt FGF23 ble undersøkt ved den følgende fremgangsmåten ved anvendelse av sandwich-ELISA. C10-antistoff tilberedt i eksempel 4, 2C3B-antistoff og humant IgG1-kontrollantistoff ble fortynnet i 50 mM NaHCO₃-løsning til en konsentrasjon på 5 µg/ml og tilsatt hver brønn med 96-brønn
- 20 mikrotiterplater for ELISA (Maxisorp (registrert varemerkenavn), Nunc), inkubert ved 4 °C i 12 timer. C10-antistoff, 2C3B-antistoff og humant IgG1-kontrollantistoff som kontroll ble absorbert til mikroplatene. Disse løsningene ble deretter fjernet og en blokkeringsreagens (SuperBlock (registrert varemerke) Blocking-buffer, PIERCE) ble tilsatt hver brønn, inkubert ved
- 25 romtemperatur i 30 min og deretter ble hver brønn vasket to ganger med Tris-bufret saltløsning (T-TBS) inneholdende 0,1 % Tween20. Til hver brønn av mikrotiterplate som ble trukket med anti-FGF23-antistoffene, ble det tilsatt full-lengde humant FGF23-protein rensset i eksempel 2 eller uttrykkende cellesupernatanten av celler uttrykkende cynomolgus-apekatt FGF23 tilberedt i
- 30 eksempel 8 etter fortynning til egnede konsentrasjoner, reagert med antistoff i fast-fase i 2 timer og hver brønn ble deretter vasket to ganger med Tris-bufret saltløsning (T-TBS) inneholdende 0,1 % Tween20. Biotinmerket 3C1E-antistoff ved 3 µg/ml ble deretter tilsatt og inkubert ved romtemperatur i 1,5 time for å

binde biotinmerket 3C1E-antistoff til humant eller cynomolgus-apekatt FGF23 bundet til antistoffet i fast-fase. Etter vasking med T-TBS ble pepperrotperoksidasemerket streptavidin (DAKO) fortynnet 5000 ganger reagert i 1 time og vasket 3 ganger med T-TBS. En substatbuffer inneholdende

5 tetrametylbenzidin (DAKO) ble deretter tilsatt hver brønn og inkubert ved romtemperatur i 30 min. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 0,5 M svovelsyre til hver brønn. Absorpsjon ved bølgelengde på 450 nm med referansebølgelengde på 570 nm ble målt ved anvendelse av en

10 mikroplateleser (MTP-300, Colona Electric Co.). Reaktiviteten for humant full-lengde FGF23-protein og kultursupernatanten av cynomolgus-apekatt FGF23-uttrykkende celler ble sammenlignet ved fortynning med en faktor på 3. Resultatene vises i fig. 5A og B. Som tydelig vist i fig. 5A, er reaktiviteten av C10-antistoff eller 2C3B-antistoff i fast-fase til humant full-lengde FGF23-protein er omtrent det samme. For seriefortynnet kultursupernatant fra

15 cynomolgus-apekatt FGF23-uttrykkende celler under betingelsene, ble det ikke observert mye forskjell mellom reaktiviteten av C10-antistoff og 2C3B-antistoff (fig. 5B). C10-antistoff, i likhet med 2C3B-antistoff, ble med andre ord bevist å ha kapasitet til å binde til human og cynomolgus-apekatt FGF23.

20 (Eksempel 10)

Sammenligning av virkningen av C10-antistoff og 2C3B-antistoff på normal cynomolgus-apekatt blodfosforkonsentrasjon og blod-1 α , 25-dihydroksy vitamin D-konsentrasjon

25

FGF23 har fosforutskillingsaktivitet i nyren, og reduserer slik serumfosforkonentrasjon og inhiberer vitamin D-aktiveringsenzym og reduserer vitamin D-aktiveringsenzym og reduserer blod-1 α , 25-dihydroksy vitamin D (heretter henvist til heri som 1,25D)-konsentrasjon (internasjonalt

30 publikasjonsnr. WO02/14504-pamflett). Det har blitt demonstrert at administrering av antistoff, slik som 2C3B-antistoff og lignende, som har en undertrykkende effekt, dvs. nøytraliserende virkning på FGF23, hos normale mus forårsaker inhibering av endogen FGF23-aktivitet og en økning av serumfosforkonsentrasjon og serum-1,25D-konsentrasjon (internasjonal

35 publikasjonsnr. WO03/057733-pamflett). Det har således blitt sterkt antydnet at antistoffet med nøytraliserende aktivitet på FGF23 har terapeutisk virkning på sykdommer hos mennesker, inkludert tumorindusert osteomalasi, XLH og

lignende som forårsakes ved overdreven FGF23. C10-antistoffet oppnådd i den foreliggende oppfinnelsen ble derfor undersøkt for FGF23-nøytraliserende aktivitet in vivo. Fordi dets farmakologiske effekt i mennesker er forventet, ble den nøytraliserende virkningen spesielt målt i apekatter, som evolusjonsmessig er nærmere beslektet med mennesker sammenlignet med arter slik som rotter, ved anvendelse av hemmingen av funksjonen av endogen FGF23, økning av serumfosforkonsentrasjon og økning av serum-1,25D-konsentrasjon som indekser. Eksperimenter ble gjennomført ved anvendelse av et mus-antistoff, 2C3B-antistoff, som en sammenlignende kontroll for C10-antistoff.

10

Virkningen av C10-antistoff og 2C3B-antistoff på økningen av serumfosforkonsentrasjon ble sammenlignet i ubehandlede normale cynomolgus-apekatter etter følgende fremgangsmåte. Det ble anvendt C10-antistoff produsert i eksempel 4. Anvendte forsøksdyr var 2–3 år gamle hunn cynomolgus-apekatter med kroppsvekt på 2–4 kg. Det var 3 dyr i hver gruppe av løsemiddeladministreringen og 2C3B-antistoffadministrering, og det ble anvendt 4 dyr i C10-administreringsgruppen. C10- og 2C3B-antistoff ble tilberedt i PBS (-) ved en konsentrasjon på 3 mg/ml og anvendt som en administreringsløsning. Løsemiddel, PBS (-) ble anvendt som negativ kontroll. C10- og 2C3B-antistoff ble administrert én gang fra den brakiale kefalvenen ved en strømningsrate på 1 ml/min og mengde på 3 mg/kg og 1 ml/kg. Serumfosforkonsentrasjon ble målt ved anvendelse av L-type Wako-uorganisk fosforreagens (Wako Pure Chemical Industries) og en Hitachi Clinical Analyzer Model 7180 (Hitachi, Ltd.). Serum 1,25D-konsentrasjonen ble målt ved anvendelse av 1, 25 (OH)²D RIA-pakken [TFB] (Immunodiagnostic System). Målingene ble utført ved dag 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42 og 49 etter administrering av antistoffet. Data ble vist i gjennomsnittlig +/- standardavvik. Fig. 6 viser overgangen av serumfosforkonsentrasjon i regelmessig innsamlede blodprøver opptil 10 dager etter administreringen av hvert antistoff. I den PBS (-)-administrerte gruppen var serumfosforkonsentrasjonen nesten konstant i testperioden, mens det i de C10-antistoff- og 2C3B-antistoffadministrerte gruppene ble observert en tydelig økning i serumfosforkonsentrasjonen når sammenlignet med før administreringen og den PBS (-)-administrerte gruppen. Dagen for den høyeste observerte serumfosforkonsentrasjonen som ble observert i både den C10-antistoffadministrerte gruppen og 2C3B-administrerte gruppen, var 5 dager etter administreringen av antistoffene. På dette tidspunktet var

35

serumfosforkonsentrasjonen i PBS(-)-gruppen, 2C3B-antistoffgruppen og C10-antistoffgruppen henholdsvis 5,28 mg/dl, 8,10 mg/dl og 9,59 mg/dl. Ved sammenligning av serumfosforkonsentrasjonen for 2C3B-antistoffgruppen og C10-antistoffgruppen på 5. dag etter administreringen av antistoffet med serumkonsentrasjonen for PBS (-), var økningen i 2C3B-antistoffgruppen 2,82 mg/dl, mens for C10-antistoffgruppen var den 4,31 mg, hvilket antyder at C10-antistoffet induerte omtrent 1,5 ganger eller mer økning i serumfosforkonsentrasjonen sammenlignet med 2C3B-antistoffet (fig. 7). Økningsvirkningen i serumfosforkonsentrasjonen i gruppen som fikk administrert C10-antistoff, er markert høyere sammenlignet med den i den 2C3B-antistoffadministrerte gruppen. Ved 10 dager etter administreringen var serumfosforkonsentrasjonen hos gruppen som fikk administrert 2C3B-antistoff, på samme nivået som det i PBS (-)-gruppen, mens serumfosforkonsentrasjonen i den C10-administrerte gruppen (8,76 mg/dl) fremdeles opprettholdt høyere nivå enn det høyeste nivået (8,10 mg/dl) i gruppen som fikk administrert 2C3B-antistoff (fig. 6). Den økte serumfosforkonsentrasjonen fra C10-antistoff opprettholdes videre mye lengre enn det fra 2C3B-antistoffet. Varigheten, i hvilken den signifikante forskjellen i serumfosforkonsentrasjon fra PBS (-)-gruppen ble observert, var 7 dager for 2C3B-gruppen, mens den overraskende var 35 dager, omtrent 5 ganger lengre, i C10-antistoffgruppen. For 1,25D-konsentrasjon ble det på lignende måte demonstrert en markert økning og forlengelse av den vedvarende økningen etter administrering av C10-antistoffet, sammenlignet med 2C3B-antistoffet (fig. 8). Disse resultatene demonstrerer at i cynomolgus-apekatter har C10-antistoff kraftigere økningsvirkning for serumfosforkonsentrasjon og serum-1,25-konsentrasjon, dvs. kraftigere FGF23-nøytraliserende aktivitet. Den nåværende behandlingen for hypofosfatemisk rakitt i XLH krever på nåværende tidspunkt en stor dose med flere administreringen av fosfor- og vitamin D-formuleringer pr. dag for så vidt å opprettholde de normale områdene av fosforkonsentrasjon. Det foreligger rapporter angående dårlig overholdelse hos pasienter, på grunn av mangfoldet av administreringer. Det faktum at det i enkeltadministreringen av C10-antistoff i den foreliggende undersøkelsen ble observert en vedvarende økning av serumfosforkonsentrasjon og serum-1,25D-konsentrasjon, antyder at C10-antistoffet muligens har en markert fordel som et terapeutisk legemiddel for hypofosfatemi i forhold til konvensjonell behandling.

(Eksempel 11)**Bekreftelse av reaktiviteten av C15-antistoff til human- og cynomolgus-apekatt-FGF23**

5

pEAK8/IRES/EGFP/hFGF23 fremstilt i eksempel 1 eller pEAK8/IRES/EGFP/monkeyFGF23 fremstilt i eksempel 8 ble forbigående transisert inn i PEAK-hurtigceller (Edge Biosystem) ved kalsiumfosfatmetoden. Hver kultursupernatant ble samlet inn 3 dager etter introduksjon. Western-

10 blotting av den innsamlede kultursupernatanten ble utført ved anvendelse av C15-antistoff fremstilt i eksempel 13 som et primært antistoff (fig. 9). C15 ble som et resultat vist å binde til cynomolgus-apekatt FGF23, lignende med human FGF23.

15 **(Eksempel 12)****Sammenligning av virkningen av C10-antistoff og C15-antistoff på blodfosforkonsentrasjon og blod-1 α , 25-dihydroksy vitamin D-konsentrasjon i normale cynomolgus-apekatter**

20

Eksempel 11 demonstrerte at C15-antistoff har bindingsaktivitet med humane og cynomolgus-apekatt FGF23 rekombinante proteiner, i likhet med C10-antistoff. FGF23-nøytraliserende aktivitet av C10-antistoff og C15-antistoff *in vivo* ble deretter sammenlignet ved administrering av antistoffene til normale

25 cynomolgus-apekatter. Den nøytraliserende aktiviteten på endogent FGF23 fra cynomolgus-apekatter ble evaluert ved anvendelse av økningen i serumfosforkonsentrasjon som en indeks. C10-antistoffet og C15-antistoffet fremstilt i eksempel 7, ble anvendt. Normale cynomolgus-apekatter, 2–3 år gamle og med kroppsvekt på 2–3 kg, ble anvendt som forsøksdyr. 2 hanndyr

30 og 1 hunndyr, totalt 3, ble anvendt i hver gruppe. Anvendt fortynningsmedium var PBS (-). C10-antistoff ble tilberedt ved en konsentrasjon på 1 mg/ml og 3 mg/ml, og C15-antistoff ble tilberedt ved en konsentrasjon på 3 mg/ml. Antistoffene ble administrert én gang fra saphena-venen i et volum på 1 ml/kg ved en strømningsrate på omtrent 1 ml/min for å oppnå en dose på 1 mg/kg

35 og 3 mg/kg for C10-antistoff og en dose på 3 mg/kg for C15-antistoff. Serumfosforkonsentrasjon ble målt ved anvendelse av L-type Wako-uorganisk fosforreagens (Wako Pure Chemical Industries) og en Hitachi Clinical Analyzer

Model 7180 (Hitachi, Ltd.). Det ble tatt blodprøver før administreringen av antistoff og ved dag 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 og 28 etter administreringen av antistoffet. Målingene av serumfosforkonsentrasjonen ble gjennomført for alle blodprøvetakingspunktene. I C10-antistoff 1 mg/kg-gruppen, C10-antistoff 3 mg/kg-gruppen og C15-antistoff 3 mg/kg-gruppen, var serumfosforkonsentrasjonene før dosering henholdsvis 5,37, 5,70 og 5,58 mg/dl og det var ingen forskjell mellom gruppene. I alle cynomolgus-
 5 apekattene ble økningen i serumfosforkonsentrasjonen observert etter administreringen. Ikke bare C10-antistoff, men også C15-antistoff ble således vist å ha nøytraliserende aktivitet på endogent FGF23 hos cynomolgus-
 10 apekatter. I C10-antistoff 1 mg/kg-gruppen, C10-antistoff 3 mg/kg-gruppen og C15-antistoff 3 mg/kg-gruppen var serumfosforkonsentrasjonen 3 dager etter administreringen henholdsvis 9,03, 9,10 og 8,64 mg/dl. På dette tidspunktet nådde serumfosforkonsentrasjonen i C10-antistoff 1 mg/kg-gruppen og C15-
 15 antistoff 3 mg/kg-gruppen det høyeste nivået. På den annen side økte serumfosforkonsentrasjonen i C10-antistoff 3 mg/kg-gruppen videre og nådde det høyeste nivået 5 dager etter administreringen med et nivå på 9,75 mg/dl. I C10-antistoff 1 mg/kg-gruppen, C10-antistoff 3 mg/kg-gruppen og C15-antistoff 3 mg/kg-gruppen var de maksimale forskjellene
 20 serumfosforkonsentrasjonen før og etter administreringen henholdsvis 3,67, 4,65 og 3,06 mg/dl. Fra dette resultatet ble virkningen av C10-antistoff på økningen i serumfosforkonsentrasjon vist å være høyere sammenlignet med den for C15-antistoff ved den samme dosen på 3 mg/kg. I tillegg økte
 25 overraskende C10-antistoff ved en dose på 1 mg/kg serumfosforkonsentrasjonen mer enn C15-antistoffet ved en dose på 3 mg/kg. Varigheten av økningen av serumfosforkonsentrasjonen over før-doseringsnivå ble deretter sammenlignet. Som et resultat var varighetene av fosforøkning i C10-antistoff 1 mg/kg-gruppen, C10-antistoff 3 mg/kg-gruppen og C15-antistoff 3 mg/kg-gruppen henholdsvis 14, 28 og 7 mg/dl. Fra dette resultatet
 30 ble C10-antistoff vist å ha vedvarende økningsaktivitet på serumfosforkonsentrasjonen sammenlignet med den fra C15-antistoffet ved den samme dosen på 3 mg/kg. I tillegg økte serumfosforkonsentrasjonen overraskende mer ved toppen og opprettholdt høyere nivåer mye lengre fra C10-antistoffet ved en dose på 1 mg/kg enn fra C15-antistoffet ved en dose på
 35 3 mg/kg. Resultatene ovenfor demonstrerer at i cynomolgus-apekatter har C10-antistoff en kraftigere økningsaktivitet for serumfosforkonsentrasjon og opprettholdingsaktivitet for serumfosforkonsentrasjon, sammenlignet med de

fra C15-antistoff oppnådd samtidig med C10-antistoff. C10-antistoff har med andre ord signifikant kraftig nøytraliserende aktivitet på FGF23 hos cynomolgus-apekatter sammenlignet med C15-antistoff.

5 (Eksempel 13)

Fremstilling av human FGF23 DNA-fragment (uten signalsekvens)

En reaksjonsblanding ble tilberedt med KOD-plus-DNA-polymerase (Toyobo) i henhold til produsentens anvisninger. Femti pmol av FGF23(-SP) FW-primer (SEQ ID NO: 34) og FGF23(-SP) RV-primer (SEQ ID NO: 35) og human FGF23-cDNA (756 bp fra startkodonen til stoppkodonen, SEQ ID NO: 36) som mal ble tilsatt opptil 50 µl av reaksjonsløsningen. Etter inkubasjon av løsningen ved 94 °C i 3 min ble den underkastet 30 sykluser med et PCR-trinn for oppvarming ved 98 °C i 15 sek., ved 63 °C i 15 sek. og ved 68 °C i 2 min. 30 sek. Blandingen ble deretter inkubert ved 72 °C i 3 min. Det oppnådde 684 bp-amplifiserte fragmentet ble separert og samlet inn på en 0,8 %-gel. Det amplifiserte fragmentet ble gjenvunnet fra den innsamlede gelen ved QIAquick Gel Extraction-pakken (Qiagen) i henhold til produsentens anvisninger. Det innsamlede PCR-amplifiserte fragmentet ble fordøyet med FseI (New England Biolabs Japan), og det enzymbehandlede fragmentet ble gjenvunnet med QIAquick PCR-rensepakke (Qiagen) i henhold til produsentens anvisninger. Et delvis DNA-fragment tilsvarende den modne regionformen uten signalsekvensen av human FGF23 ble som et resultat oppnådd.

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

FGF23(-SP) RV: TTGGCCGGCCCTAGATGAACTTGGCGAAGGGGCGGCAGCCTTCCG (SEQ ID NO: 35, inkludert FseI-stedet)

Nukleotidsekvensene for human FGF23 (nukleotider i signalsekvensregionen er understreket og nukleotider i den modne regionformen ekskludert signalsekvensregionen fra full-lengden er omgitt av en rektangulær linje). (SEQ ID NO: 36)

ATGTTGGGGGCCCCCTCAGGCTCTGGGTCTGTGCCTTGTGCAGCGTCTGCAGCATGAGCGTCCTCAGAGCC
 TATCCCAATGCCTCCCCACTGCTCGGCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACACAGCCACAGCCAG
 GAACAGCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCATGTGGATGGCGCACCCCATCAGACCATCTACAGTG
 CCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTGGTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAGATACCTCTGC
 ATGGATTTTCAGAGGCAACATTTTTGGATCACACTATTTGACCCGGAGAACTGCAGGTTCCAACACCAGAC
 GCTGGAAAACGGGTACGACGTCTACCACTCTCCTCAGTATCACTTCCTGGTCAGTCTGGGCCGGGCGAAGA
 GAGCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGTACTCCAGTTCCTGTCCCGGAGGAACGAGATCCCCCTA
 ATTCACTTCAACACCCCATACCACGGCGGCACCCCGAGCGCCGAGGACGACTCGGAGCGGGACCCCT
 GAACGTGCTGAAGCCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCGGCCTCCTGTTCACAGGAGCTCCCGAGCGCCG

 AGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCATTAGGGGTGGTCAGGGGCGGTCGAGTGAACACGCACGCTGGG
 GGAACGGGCCCGGAAGGCTGCCGCCCTTCGCCAAGTTCATCTAG

- 5 Aminosyresekvensen av human FGF23 basert på SEQ ID NO: 36 som standard (aminosyrerester i signalsekvensregionen er understreket, og aminosyrerester i den modne regionformen ekskludert signalsekvensregionen fra full-lengden er omgitt av en rektangulær linje). (SEQ ID NO: 37)

MLGARLRLWVCALCSVCSMSVLRAYPNASPLLGSSWGGLIHLTYTATARNSYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYS
 ALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLCMDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAK
 RAFLPGMNPPYSQFLSRRNEIPLIHFNTPIPRRHTRSIEDDSEDPNLVLPKPRARMTAPASCSQELPSA
 10 EDNSPMSDPLGVVRGGRVNTAGGTGPEGCRPFAKFI

(Eksempel 14)

Konstruksjon av pPSs FGF23-vektor

- 15 pPSs5.5 beskrevet i eksempel 1–8 av WO2006/78072 ble fordøyet med SfoI og FseI og dets terminaler ble underkastet defosforyleringsbehandling med kaliumfosfatase avledet fra E. coli. Et DNA-fragment inkludert human FGF23 fremstilt i eksempel 13 ble satt inn i vektoren. Vektoren ble deretter
- 20 introdusert inn i DH5α, og DNA ble fremstilt fra de oppnådde transformantene. Nukleotidsekvensen for den ligerte regionen ble bekreftet for å oppnå pPSs FGF23-vektoren (fig. 10).

(Eksempel 15)**Konstruksjon av pUS FGF23 KI-vektor**

- 5 pCk loxPVΔP beskrevet i eksempel 43-1 av WO2006/78072 ble fordøyet med SalI og FseI, og terminalene ble underkastet defosforyleringsbehandling med kaliumfosfatase avledet fra E. coli C75. Etter innsetting av et fragment på omtrent 1,5 kb, hvori fragmentet ble separert og samlet inn på 0,8 % agarosegel etter fordøying av pPSs FGF23-vektoren fremstilt i eksempel 14
- 10 ovenfor med SalI og FseI, ble vektoren deretter introdusert inn i E. coli XL10-Gold Ultracompetent-celler (STRATAGENE). DNA ble fremstilt fra de oppnådde transformantene. Nukleotidsekvensen av den ligerte regionen ble bekreftet for å oppnå pUS FGF23 KI-vektoren (fig. 11).
- 15 Polynukleotidsekvensen fra startkodonen til stoppkodonen av pUS FGF23 KI-vektor human FGF23-ekspresjonsenhet (985 bp inneholdende Igk-signalsekvens fra mus, inkludert en intronregion substituert til FGF23-signalsekvensen (den understrekede delen i SEQ ID NO: 38) og moden FGF23 fra sekvensen i dets nedstrøms SEQ ID NO: 38) og aminosyrsekvensen kodet for av cDNA (247
- 20 aminosyrer, de understrekede delene representerer Igk-signalsekvensen fra mus, SEQ ID NO: 39) vises i det følgende. Sekvensinformasjonen for mus Igk-signalsekvensen inkludert i en intronregion ble basert på MUSIGKVR1 oppnådd fra GenBank (tilgangsnr. K02159), og oppstrøms genomsekvensen derav ble oppnådd fra UCSC-musgenomdatabasen.

25

SEQ ID NO: 38

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTGAGAGTGACAGAGAAGTGTGG
ATGCAACCTCTGTGGCCATTATGATACTCCATGCCTCTCTGTTCTTGATCACTATAATTAGGGCATTGTCA
CTGGTTTTAAGTTTCCCCAGTCCCCTGAATTTTCATTTTCTCAGAGTGATGTCCAAAATTATTCTTAAAAA
TTTAAATAAAAAAGGTCCTCTGCTGTGAAGGCTTTTATACATATATAACAATAATCTTTGTGTTTATCATTCC
AGGTTCCACTGGCTATCCCAATGCCTCCCCACTGCTCGGCTCCAGCTGGGGTGGCCTGATCCACCTGTACAC
AGCCACAGCCAGGAACAGCTACCACCTGCAGATCCACAAGAATGGCCATGTGGATGGCGCACCCCATCAGAC
CATCTACAGTGGCCTGATGATCAGATCAGAGGATGCTGGCTTTGTGGTGATTACAGGTGTGATGAGCAGAAG
ATACCTCTGCATGGATTTTCAGAGGCAACATTTTTGGATCACACTATTTTCGACCCGGAGAACTGCAGGTTCCA
ACACCAGACGCTGGAAAACGGGTACGACGTCTACCACTCTCCTCAGTATCACTTCCTGGTCAGTCTGGGCGG
GGCGAAGAGAGCCTTCCTGCCAGGCATGAACCCACCCCGTACTCCAGTTCCTGTCCCGGAGGAACGAGAT

CCCCCTAATTCACTTCAACACCCCCATACCACGGCGGCACACCCGGAGCGCCGAGGACGACTCGGAGCGGGA
 CCCCCTGAACGTGCTGAAGCCCCGGGCCCGGATGACCCCGGCCCGCCTCCTGTTACAGGAGCTCCCGAG
 CGCCGAGGACAACAGCCCGATGGCCAGTGACCCATTAGGGGTGGTCAGGGGCGGTGAGTGAACACGCACGC
 TGGGGGAACGGGCCCCGGAAGGCTGCCGCCCTTCGCCAAGTTCATCTAG

SEQ ID NO: 39

5

METDTLLLWVLLWVPGSTGYPNASPLLGSSWGGLIHLTYTATARNSYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYSALMIR
 SEDAGFVVITGVMSRRYLCMDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPG
 MNPPPYSQLSRNEIPLIHFNTPIPRRHTRS AEDDSE RDPLNVLKPRARMT PAPASCSQELPSAEDNSPMA
 SDPLGVVRGGRVNT HAGGTGPEGCRPFAKFI

(Eksempel 16)

10 Fremstilling av pUS FGF23 KI-vektoren for elektroporering

60 µg av pUS FGF23 KI-vektor ble fordøyet ved 37 °C i 5 timer ved anvendelse av spermidintilsatt (1 mM pH 7,0, Sigma Aldrich Japan) buffer (Roche Diagnostics, H-buffer for restriksjonsenzym) og NotI (Takara Bio, Inc.). Etter
 15 fenol/kloroformekstraksjon ble det tilsatt 2,5 volumer av 100 % etanol og 0,1 volum av 3 M natriumacetat, og blandingen ble holdt ved -20 °C i 16 timer. Vektoren linearisert med NotI ble samlet inn ved sentrifugering og sterilisert ved tilsetning av 70 % etanol dertil. 70 % etanol ble fjernet, og det ble utført lufttørking i 1 time på en ren benk. En HBS-løsning ble tilsatt for å danne
 20 0,5 µg/µl DNA-løsning og løsningen ble holdt ved romtemperatur i 1 time for å tilberede pUS FGF23 KI-vektor for elektroporering.

(Eksempel 17)

25 Fremstilling av PL FGF23 mus ES-cellelinje ved anvendelse av pUS FGF23 KI-vektor og en RS-elementinnrettet mus ES-cellelinje

For å oppnå en PL FGF23 mus ES-cellelinje hvori human FGF23-cDNA ble satt inn ved homolog rekombinasjon nedstrøms av et immunoglobulin κ-
 30 lettkjedegen, ifølge fremgangsmåten vist i eksempel 16, ble pUS FGF23 KI-vektor linearisert med restriksjonsenzymet NotI introdusert til RS-elementet

innrettet mot mus ES-celler i henhold til den etablerte fremgangsmåten (Shinichi Aizawa, «Biotechnology Manual Series 8, Gene Targeting,» Yodosha, 1995). RS-elementinnrettet mus ES-celler ble oppnådd ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 10 av WO2006/78072.

5

Fremgangsmåten for dyrking av RS-elementinnrettet mus ES-celler var i henhold til den beskrevne fremgangsmåten (Shinichi Aizawa, dokument nevnt tidligere), og G418-resistente primærceller i dyrkingsmedium (anskaffet fra Invitrogen) behandlet med mitomycin C (Sigma Aldrich Japan) ble anvendt som

10 fôringsceller. De RS-elementinnrettede mus ES-cellene ble først dyrket og ble behandlet med trypsin og suspendert i HBS til en tetthet på 3×10^7 celler/ml. 0,5 ml av cellesuspensjonen ble blandet med 10 µg av vektor-DNA. Elektroporering (Capacitance: 960 µF, spenning: 250 V, romtemperatur) ble deretter utført ved anvendelse av Gene Pulser Cuvette (elektrodeavstand:

15 0,4 cm, Bio Rad Laboratories). De elektroporerte cellene ble suspendert i 10 ml av ES-dyrkingsmedium (Shinichi Aizawa, dokumentet nevnt tidligere), og cellene ble deretter sådd i en plastikk petriskål for 100 mm vevskultur (Falcon, Becton, Dickinson) hvori fôringsceller ble sådd tidligere. Etter 36 timer ble dyrkingsmediet substituert med ES-dyrkingsmedium inneholdende 0,8 µg/ml

20 puromycin (Sigma Aldrich Japan). Kolonier som viste seg 7 dager etterpå, ble plukket opp, og hver ble dyrket til sammenløping i en 24-brønn plate. To tredjedeler derav ble suspendert i 0,2 ml av et stammedium (FBS + 10 % DMSO, Sigma Aldrich Japan), og den resulterende suspensjonen ble holdt ved -80 °C. Den gjenværende tredjedelen ble sådd på en 12-brønnsplate trukket

25 med gelatin. Cellene ble dyrket i 2 døgn, og genomt DNA ble fremstilt fra 10^6 -til 10^7 -celler ved anvendelse Puregene DNA-isoleringspakker (Qiagen). Det resulterende genom-DNA-et av puromycinresistent RS-elementinnrettede mus ES-celler ble fordøyet med restriksjonsenzymet EcoRI (Takara Bio, Inc.) og separert av agarosegelelektroforese. Southern-blotting ble deretter utført for å

30 detektere homologe rekombinanter ved anvendelse Ck 3'probe som probe, som var DNA-fragmentet av 3'-terminalen av Ig-lettkjede X-COX genomt DNA (XhoI til EcoRI, omtrent 1,4 kb, WO00/10383, fig. 5) anvendt i oppfinnelsen beskrevet i WO00/10383 (se eksempel 48). Det ble detektert et bånd (15,1 kb) som resultat av EcoRI-fordøyelse i villtype RS-elementinnrettede mus

35 ES-celler. Et nytt bånd (12,8 kb) var forventet å vises nedenfor båndet i tillegg til båndet (fig. 12) i en homolog rekombinant, og det nye båndet ble detektert i den puromycinresistente stammen. Disse klonene ble med andre ord vist å ha

humant FGF23-cDNA innsatt nedstrøms av immunoglobulin κ -kjedegenet i én av allelene.

(Eksempel 18)

5

Fremstilling av US FGF23 mus ES-cellelinje ved sletting av de legemiddelresistente genene fra en PL FGF23 mus ES-cellelinje

10 For å oppnå en mus ES-cellelinje med innsatt US FGF23-gen, hvori 2 typer legemiddelresistente gener (Puror, Neor) ble slettet, fra en PL FGF23 mus ES-cellelinje, ble pCAGGS-Cre-vektor (Sunaga et al., Mol Reprod Dev., 46: 109-113, 1997) introdusert i PL FGF23 mus ES-celler i henhold til den etablerte fremgangsmåten (Shinichi Aizawa, «Biotechnology Manual Series 8, Gene Targeting,» Yodosha, 1995).

15

Fremgangsmåten for dyrking av PL FGF23 mus ES-celler var i henhold til den beskrevne fremgangsmåten (Shinichi Aizawa, dokument nevnt tidligere), og G418-resistente primærceller i dyrkingsmedium (anskaffet fra Invitrogen) behandlet med mitomycin C (Sigma Aldrich Japan), ble anvendt som
20 fôringsceller. PL FGF23 mus ES-cellene ble først dyrket og ble behandlet med trypsin og suspendert i HBS til en tetthet på 3×10^7 celler/ml. 0,5 ml av cellesuspensjonen ble blandet med 10 μ g av vektor-DNA. Elektroporering (Capacitance: 960 μ F, spenning: 250 V, romtemperatur) ble deretter utført ved anvendelse av Gene Pulser Cuvette (elektrodeavstand: 0,4 cm, Bio Rad
25 Laboratories). De elektroporeerte cellene ble suspendert i 10 ml av ES-dyrkingsmedium (Shinichi Aizawa, dokument nevnt tidligere), og 2,5 ml av suspensjonen ble deretter sådd i en plastikk petriskål for 60 mm vevskultur (Falcon, Becton, Dickinson) hvori fôringsceller ble sådd tidligere. Etter 30 timer ble 1000 celler av ES-cellene sådd i en plastikk petriskål for 100 mm vevskultur
30 (Falcon, Becton, Dickinson) hvori fôringsceller ble sådd tidligere. Kolonier som viste seg 6 dager etterpå, ble plukket opp og hver ble dyrket til sammenløping i en 24-brønn plate. To tredjedeler derav ble suspendert i 0,2 ml av et stammedium (FBS + 10 % DMSO, Sigma Aldrich Japan), og den resulterende suspensjonen ble holdt ved -80 °C. Den gjenværende tredjedelen ble sådd på
35 en 12-brønnsplate trukket med gelatin. Cellene ble dyrket i 2 døgn, og genomt DNA ble fremstilt fra 10^6 - til 10^7 -celler ved anvendelse Puregene DNA-isoleringspakker (Qiagen). Det resulterende genome DNA av mus ES-celler ble

fordøyet med restriksjonsenzymet EcoRI (Takara Bio, Inc.) og separert av agarosegelelektroforese. LineSouthern-blotting ble deretter utført for å detektere en ES-cellelinje, hvori kun Purgenet mellom IoxPV-sekvensene ble slettet ved anvendelse Ck 3'-proben som probe, som var DNA-fragmentet av 3'-terminalen av Ig-lettkjede Jk-Ck genomt DNA (XhoI til EcoRI, omtrent 1,4 kb, WO00/10383, fig. 5) anvendt i oppfinnelsen beskrevet i WO00/10383 (se eksempel 48). To bånd (15,1 kb og 12,8 kb) ble detektert på grunn av EcoRI-fordøyelse i ES-cellene som bibeholdt Puror-genet, og to bånd (15,1 kb og 10,9 kb) ble registrert på grunn av EcoRI-fordøyelse i ES-cellelinjen hvori kun Puror-genet var slettet (fig. 12). Ved anvendelse av Southern-blottingmembranen oppnådd i lignende prosedyre som ovenfor, og 3'KO-proben fremstilt ved fremgangsmåten vist i eksempel 9 av WO2006/78072 som proben, ble i tillegg ES-cellelinjen hvori kun Neor-genet mellom loxP-sekvensen var slettet, detektert. To bånd (7,4 kb og 5,7 kb) ble detektert på grunn av EcoRI-fordøyelse i ES-cellene som bibeholdt Neor-genet, og to bånd (5,7 kb og 4,6 kb) ble registrert på grunn av EcoRI-fordøyelse i ES-cellelinjen hvori kun Neor-genet var slettet (fig. 12). Fra disse resultatene ble US FGF23 mus ES-cellelinje, hvori 2 typer av legemiddelresistente gener (Puror, Neor) var slettet, samtidig oppnådd fra PL FGF23 mus ES-cellelinje.

20

(Eksempel 19)

Tilberedning av US FGF23 KI-kimær mus ved anvendelse av US FGF23 mus ES-cellelinje og et vertsembryo avledet fra B-lymfocyttemanglende musstamme

25

I en homozyg knockout for immunoglobulin μ -kjedegenet mangler funksjonelle B-lymfocytter og det produseres ikke antistoffer (Kitamura et al., Nature, 350: 423-426, 1991). Fostre oppnådd ved kryssavling av ovennevnte individuelle homozyge hanner og hunner avlet i et rent miljø, ble anvendt som verter for fremstilling av kimære mus i det foreliggende eksemplet. I et slikt tilfelle ble hoveddelen av funksjonelle B-lymfocytter i en kimær mus avledet fra de injiserte ES-cellene. I det foreliggende eksemplet ble det for vertsembryotilberedning anvendt en individuell immunoglobulin μ -kjedegene knockout-mus beskrevet i en rapport av Tomizuka et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 722-7, 2000), som ble tilbakekrysset til MCH (ICR)-stammen (CLEA Japan, Inc.) 3 ganger eller mer.

35

US FGF23 mus ES-cellelinje oppnådd i eksempel 18 ovenfor, hvori innsetting av humant FGF23-cDNA nedstrøms av et immunoglobulin κ -kjedegen ble bekreftet, ble startet fra frossen stamløsning, og cellene ble injisert inn i 8-cellestadium embryo oppnådd ved kryssavling av individuelle hann- og hunnmus av de ovennevnte immunoglobulin μ -kjedegen knockout-homozygotene med 8-10 celler pr. embryo. Etter dyrking over natten i ES-dyrkingsmedium (Shinichi Aizawa, «Biotechnology Manual Series 8, Gene Targeting,» Yodosha, 1995) ble embryoene utviklet til blastocytter. Injeksjonsemryo ble deretter transplantert til uterus i adopterte mor-MCH (ICR)-mus (CLEA Japan, Inc.) 2,5 dager etter pseudograviditetsbehandling med henholdsvis omtrent 10 injiserte embryo pr. én side av uterus. Som et resultat av transplanteringen av injeksjonsembryo fremstilt ved anvendelse av US FGF23 mus ES-cellelinje fremstilt i eksempel 18, ble det født kimære avkom. Et individuelt kimæra bestemmes ved beleggfargen, i hvilken ES-celleavledet villtypefarge (mørk brun) enten forekommer eller ikke, som kan gjenkjennes i vertsembryoavledet hvit farge. Blant de fødte kimære avkommusene ble det oppnådd individuelle mus som åpenbart hadde deler i villtypefargen i beleggfargen, dvs. de har gjenkjennelig bidrag fra ES-cellene. Fra disse resultatene ble US FGF23 mus ES-cellelinjen, hvori human FGF23-cDNA er innsatt nedstrøms av et immunoglobulin κ -kjedegen, vist å bevare kimærdannende kapasitet. Denne cellelinjen har med andre ord kapasitet til å differensiere til normalt vev hos en individuell mus. US FGF23 KI kimær-mus, som vil bli beskrevet senere i eksempel 21, har i tillegg høy FGF23-konsentrasjon i blodet og kan muligens anvendes som dyremodell for sykdommer som viser funn lignende hypofosfatemisk rakitt.

(Eksempel 20)

Fremstilling av kimær kontrollmus

En kimær mus, i hvilken funksjonelle gener som inkluderer human FGF23-cDNA fremstilt ifølge fremgangsmåten beskrevet i eksempel 11 i WO2006/78072 ikke er innsatt, ble anvendt som en individuell, kimær kontrollmus (WT-mus) i eksperimentet administrering av C10-antistoff til US FGF23 KI kimære mus i det følgende eksempel 21.

(Eksempel 21)**Bekreftelse av virkningen av C10-antistoff på forbedring i patologi ved anvendelse av US FGF23 KI kimær mus**

5 Eksempel 10 og 12 demonstrerte at C10-antistoff i signifikant grad undertrykker virkningen av endogen FGF23 og forhøyer serumfosforkonsentrasjonen og serum-1,25D-konsentrasjonen derav, sammenlignet med 2C3B-antistoff og C15-antistoff i normale cynomolgus-
 10 apeakatter. Det har således blitt sterkt antydnet at antistoff med en nøytraliserende aktivitet på human FGF23 har terapeutisk virkning på sykdommer hos mennesker, slik som tumorindusert osteomalasi, hypofosfatemisk rakitt inkludert XLH og lignende, og osteomalasi som er forårsaket av forhøyet FGF23. C10-antistoffet oppnådd i den foreliggende oppfinnelsen, ble derfor undersøkt for virkning på forbedring av patologi
 15 forårsaket av forhøyet human FGF23. For forsøket vedrørende denne terapeutiske virkningen av C10-antistoff ble det gjennomført eksperimenter ved anvendelse av en USFGF23 KI kimær mus (henvist til heretter heri som en «hFGF23KI-mus) fremstilt i eksempel 19. 12 FGF23 KI-mus ble anvendt som sykdomsmodell dyr og 6 normale kontrollmus (WT-mus, fremstilt i eksempel
 20 20) med samme uke-alder ble anvendt som kontroller. Ved 7 ukers alder ble serum fra hFGF23 KI-mus samlet inn for å måle serumkonsentrasjonen av henholdsvis FGF23 (FGF-23 ELISA KIT, Kainos Laboratories, Inc.) og fosfor. Sammenlignet med WT-mus var serum FGF23-konsentrasjonen betydelig forhøyet i hFGF23 KI-mus (WT-mus; n=6, 163 pg/ml, hFGF23KI-mus; n=12,
 25 1467 pg/ml). Dette resultatet antyder at introduksjonen av humant FGF23-gen i hFGF23KI-mus var presist utført og at forhøyede mengder eksogent humant FGF23 i tillegg forekom i blodet til hFGF23KI-musene. Sammenlignet med WT-mus ble det i hFGF23 KI-mus i tillegg vist en betydelig reduksjon i serumfosforkonsentrasjonen (WT-mus; n=6, 5,82 mg/dl, hFGF23KI-mus;
 30 n=12, 2,62 mg/dl). Det ble også antydnet at hypofosfatemi ble indusert på grunn av forhøyet human FGF23-aktivitet i hFGF23KI-mus. På dette tidspunktet ble 12 hFGF23 KI-mus delt inn i følgende 2 grupper på 6 mus i hver, med en lik FGF23-konsentrasjon: den C10-antistoffadministrerte gruppen og den IgG1-administrerte kontrollgruppen (fig. 13). Fra 8-ukers alder ble
 35 deretter gjentatt intravenøs administrering av C10-antistoff eller renset human IgG1 (kontrollantistoff) for isotypekontroll utført ved en dose på 30 mg/kg og en hyppighet på én gang i uken fem ganger. Det ble tatt blodprøver før den

- første administreringen og 3 dager etter administreringen, og serum ble innhentet. Appendikulær gripestyrke ble målt 24 timer etter den fjerde administreringen ved anvendelse av en Saitoh-gripestyrkemåler (MK-380S, Muromachi Kikai Co., Ltd.). Appendikulær gripestyrke ble evaluert ved
- 5 anvendelse som en indeks maksimal kraft (gripestyrke) utøvd av en mus, hvori musen ble plassert på et målingsnett for å la musen gripe nettet, og musen deretter ble trukket for hånd horisontalt etter halen inntil dyret slapp nettet fordi det ikke kunne motstå trekkraften. Beinene ble vurdert 24 timer etter den femte administreringen. Innsamlet femur og tibia fra mus avlivet ved tapping
- 10 av blod fra hjertet under anestesi, ble fiksert i 70 % etanol. Serumfosforkonsentrasjon ble målt ved før første administrering, 3 dager etter den første administreringen og 24 timer etter den femte administreringen. Ikke-avkalsifisert femur ble lagt i resin og farget med Villanueva-Goldner for histologisk evaluering. Beinmineralinnhold i tibia ble målt ved askeprosessen.
- 15
- Betydelig lavere serumfosforkonsentrasjon ble som et resultat observert i hFGF23KI-mus kontrollantistoffadministrert-gruppen på tidspunkt for gruppering og 24 timer etter femte administrering, sammenlignet med WT-mus kontrollantistoffadministrert-gruppen, hvilket betyr fortløpende
- 20 hypofosfatemiske tilstander (fig. 14). Det ble på den annen side observert at serumfosforkonsentrasjonen ved 3 dager etter administreringen hadde økt i hFGF23KI-musgruppen som fikk administrert C10-antistoff til samme nivået som det i den kontrollantistoffadministrerte WT-musgruppen. 14).
- Serumfosforkonsentrasjonen etter den femte administreringen i den C10-antistoffadministrerte hF23KI-musgruppen var også ved det samme nivået som
- 25 det i den kontrollantistoffadministrert WT-musgruppen, hvilket betyr at virkningen av C10-antistoff for inkrement av serumfosforkonsentrasjon ble opprettholdt selv etter fem gangers administrering (fig. 15).
- 30
- Det har vært rapportert tilfeller av skjelettmuskelsvakhet hos hypofosfatemi-pasienter (Baker and Worthley, Crit Care Resusc., 4: 307-315, 2000). I den foreliggende studien var hFGF23KI-mus forventet å vise muskelsvakhet på grunn av hypofosfatemi. Appendikulær gripestyrke ble følgelig målt ved den ovennevnte fremgangsmåten, som en indeks for muskelsvakhet og
- 35 sammenlignet blant grupper. Gripestyrken hos den kontrollantistoffadministrert hFGF23KI-musgruppen ble vist å være betydelig lavere sammenlignet med den hos den kontrollantistoffadministrerte WT-musgruppen 16). I kontrast til dette

ble det observert signifikant økning i gripestyrken hos den C10-antistoffadministrerte hFGF23KI-musgruppen (fig. 16).

Ikke-dekalsifisert femurveg ble deretter farget med Villanueva-Goldner-
 5 metoden for histologisk observasjon. En stor mengde osteoid (vist i rødt i fig. 17) ble som et resultat observert i beinet i den kontrollantistoffadministrerte hFGF23KI-musgruppen, sammenlignet med det i den kontrollantistoffadministrerte WT-musgruppen, hvilket antyder at kalsifiseringsdefekten ble induert i den gruppen. Dette er bredt kjent som et
 10 karakteristisk symptom på rakitt. I hFGF23KI-mus som mottok C10-antistoffbehandlingen ble det i motsetning til dette observert reduksjon i området dekket av osteoid og som forutsagt var osteid erstattet av kalsifisert bein (vist i grønt i fig. 17). Fra dette resultatet ble det foreslått at C10-antistoffet forbedrer beinkalsifisering redusert av forhøyet FGF23. Mengden
 15 mineraler inneholdt i tibia ble følgelig målt ved kalsifisering og sammenlignet mellom hver gruppe. Mengden mineraler inneholdt i tibia i den kontrollantistoffadministrerte hFGF23KI-musgruppen var signifikant redusert sammenlignet med den kontrollantistoffadministrerte WT-musgruppen (fig. 18). I den C10-antistoffadministrerte hFGF23KI-musgruppen ble det i
 20 motsetning til dette bekreftet forbedring i mineralmengden (fig. 18). Fra resultatene ovenfor ble det bekreftet at i hFGF23KI-mus nøytraliserer C10-antistoffadministrering virkningen av for mye aktivt human FGF23 in vivo, og forbedrer forskjellige symptomer på hypofosfatemisk rakitt, slik som hypofosfatemi, muskelsvakhet, beinkalsifiseringslidelser og lignende. C10-
 25 antistoff ble med andre ord vist å være et effektivt terapeutisk middel for forskjellige sykdommer hos menneske som involverer FGF23.

Industriell anvendbarhet

30 C10-antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen som er et antistoff mot FGF23, har høy aktivitet for økning av serumfosfatkonsentrasjoner in vivo på en vedvarende måte og/eller øke serum-1,25D-konsentrasjoner på en vedvarende måte, sammenlignet med kjente antistoff mot FGF23. Den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes med dramatisk effekt som et middel til
 35 forebygging eller behandling av sykdommer som forårsakes av for høy aktivitet av FGF23, eller for sykdommer som kan patologisk forbedres ved kontroll av FGF23-aktiviteten.

Patentkrav

1. Antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23, omfattende en tungkjede aminosyresekvens omfattende en aminosyresekvens fra Q ved posisjon 20 til S ved posisjon 136 av SEQ IC NO: 12 og en lettkjede aminosyresekvens omfattende en aminosyresekvens fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14.
2. Antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 ifølge krav 1, omfattende en tungkjede aminosyresekvens vist av en aminosyresekvens fra Q ved posisjon 20 til S ved posisjon 136 av SEQ IC NO: 12 og en lettkjede aminosyresekvens vist av en aminosyresekvens fra A ved posisjon 23 til K ved posisjon 128 av SEQ ID NO: 14.
3. Antistoffet mot FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 ifølge krav 1 eller 2, hvori det funksjonelle fragmentet er et peptidfragment valgt fra gruppen bestående av Fab, Fab', F(ab')₂, disulfidstabilisert Fv (ds Fv), dimerisert V-region (dialegame) og enkeltkjede-Fv (scFv).
4. Antistoffet mot human FGF23 ifølge ett av kravene 1–3, hvori antistoffklassen er IgG, IgA, IgE eller IgM.
5. Antistoffet mot human FGF23 ifølge krav 4, hvori underklassen av antistoffet er IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4.
6. Farmasøytisk sammensetning omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 ifølge ett av kravene 1–5.
7. Farmasøytisk sammensetning for anvendelse i en metode for kontroll av fosformetabolisme og/eller vitamin D-metabolisme av FGF23, omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 ifølge et av kravene 1–5.
8. Farmasøytisk sammensetning for anvendelse i forebyggingen eller behandlingen av sykdommer forbundet med mineralmetabolismelidelser, omfattende som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et

funksjonelt fragment derav mot human FGF23 ifølge ett av kravene 1–5, hvori sykdommen som er forbundet med mineralmetabolismelidelser velges fra gruppen bestående av neoplastisk osteomalasi, ADHR, XLH, fibrøs dysplasi, McCune-Albright-syndrom og autosom recessiv hypofosfatemi.

5

- 9.** Farmasøytisk sammensetning for anvendelse i forebyggingen eller behandlingen av en sykdom valgt fra gruppen bestående av osteoporose, rakitt, hypokalsemi, heterotrop kalsifisering, osteosklerose, Pagets sykdom, hyperparatyroidisme og pruritt, hvor sammensetningen omfatter som en aktiv ingrediens antistoffet mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23 som beskrevet i ett av kravene 1–5.

10

- 10.** Nukleinsyre kodende for antistoffet ifølge krav 1 eller 2, omfattende en nukleinsyre som koder for en aminosyresekvens for en variabel tungkjederegion kodet av en basesekvens fra C ved posisjon 58 til A ved posisjon 408 representert av SEQ ID NO:11, og en nukleinsyre som koder for en aminosyresekvens av en variabel lettkjederegion kodet av en basesekvens fra G ved posisjon 67 til A ved posisjon 384 SEQ ID NO: 13.

15

- 11.** Vektor omfattende nukleinsyren ifølge krav 10.

20

- 12.** En isolert vertscelle omfattende vektoren ifølge krav 11.

- 13.** Fremgangsmåte for produksjon av et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23, omfattende trinnet med dyrking av vertscellen ifølge krav 12 for å uttrykke et antistoff mot human FGF23 eller et funksjonelt fragment derav mot human FGF23.

25

SEKVENSLISTE

<110> KIRIN PHARMA KABUSHIKI KAISHA
 <120> Anti FGF23 antibody and a pharmaceutical composition comprising the same
 <130> PH-3490-PCT
 <150> JP 2007-34018
 < 151> 2007-02-14
 <160> 45
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 < 211> 30
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 1
 ccggaattca gccactcaga gcagggcacg 30
 <210> 2
 < 211> 52
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 2
 ataagaatgc ggccgctcaa tggatgatgat gatgatgat gaactggcg aa 52
 <210> 3
 < 211> 34
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 3
 ataagaatgc ggccgctcag atgaacttg cgaa 34
 <210> 4
 < 211> 251
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

2

<400> 4

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val
 1 5 10 15

Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu
 20 25 30

Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg
 35 40 45

Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala
 50 55 60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala
 65 70 75 80

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met
 85 90 95

Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn

100	105	110
Cys Arg Phe Gln His Gln Thr	Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His	
115	120	125
Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala		
130	135	140
Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg		
145	150	155
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
Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile		
245	250	
<210> 5		
< 211> 31		
< 212> DNA		
< 213> Artificial		
<220>		
< 223> Synthetic		
<400> 5		
tcttgccac cttggtgttg ctgggcttgt g 31		
<210> 6		
< 211> 25		
< 212> DNA		
< 213> Artificial		

<220>
 < 223> Synthetic
 <400> 6
 gttgaagctct ttgtgacggg cgagc 25
 <210> 7
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 7
 gctggagggc acggtcacca cgc 23
 <210> 8
 < 211> 30
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 8
 aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc 30
 <210> 9
 < 211> 18
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 9
 gtaaaacgac ggccagtg 18
 <210> 10
 < 211> 17
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 10
 caggaaacag ctatgac 17
 <210> 11
 < 211> 408
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 11
 atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag ctccagggtgc tcactcccag 60

 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120

 tgcaaggcat ctggatacac cttcaccaac cactatatgc actgggtgcg acaggcccct 180

ggacaagggc ttgagtggat gggaataatc aacctatta gtggtagcac aagtaacgca 240
 cagaagttcc agggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 300
 gagctgagca gcctgagatc tgaggacaag gccgtgtatt attgtgagag agatattgtg 360
 gatgcttttg atttctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttca 408
 <210> 12
 < 211> 136
 < 212> PRT
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 12
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn His Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ile Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Val Asp Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 13
 < 211> 384

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<400> 13

atggacatga gggccccgc tcagtcctg gggcttctgc tgctctggct cccagggtgcc 60

agatgtgcca tccagttgac ccagtcctca tcctccctgt ctgcattctg aggagacaga 120

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagt ctttagtctg gtatcagcag 180

aaaccaggga aagctcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240

ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300

cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atgattactt cactttcggc 360

cctgggacca aagtggatat caaa 384

<210> 14

< 211> 128

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

7

<400> 14

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Phe Asn Asp Tyr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 115 120 125

<210> 15

< 211> 41

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<400> 15

agagagagag atctctcacc atggacatga ggggtccccgc t 41

<210> 16

< 211> 42

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<400> 16

agagagagag cgtacgtttg atatccactt tgggtcccagg gc 42

<210> 17

< 211> 44

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>
 < 223> Synthetic
 <400> 17
 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggt ctct 44
 <210> 18
 < 211> 40
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 18
 agagagagag gctagctgaa gagacggtga ccattgtccc 40
 <210> 19
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 19
 ggtgccaggg ggaagaccga tgg 23
 <210> 20
 < 211> 30
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 20
 ccaagggccc atcggctctc cccctggcac 30
 <210> 21
 < 211> 24
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 21
 gacaccctca tgatctcccg gacc 24
 <210> 22
 < 211> 24
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 22
 tgttctccgg ctgcccattg ctct 24
 <210> 23
 < 211> 27
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 23
 tctatataag cagagctggg tacgtcc 27
 <210> 24
 < 211> 26

< 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 24
 tggctgcacc atctgtcttc atcttc 26
 <210> 25
 < 211> 27
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 25
 ggtacgtgaa ccgtcagatc gcctgga 27
 <210> 26
 < 211> 35
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 26
 cggaattcca ccatgttggg ggcccgcctc aggct 35
 <210> 27
 < 211> 34
 < 212> DNA
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 27
 atttgcggcc gctagatgaa cttggcgaag gggc 34
 <210> 28
 < 211> 756
 < 212> DNA
 < 213> Macaca fascicularis
 <400> 28
 atgttggggg ccogootcag gctctgggtc tgtgccttgt gcagcgtctg cagcatgagc 60
 gtcacagag cctatcccaa tgcctccca ttgctcggct ccagctgggg tggcctgac 120
 cacctgtaca cagccacagc caggaacagc taccacctgc agatccaca gaatggccac 180
 gtggatggcg caccocatca gaccatctac agtgccctga tgatcagatc agaggatgct 240
 ggctttgtgg tgattacagg tgtgatgagc agaagatacc tctgcatgga ttccggaggc 300
 aacatttttg gatcacacta tttcaaccg gagaactgca ggttccgaca ctggacgctg 360

gagaacggct acgacgtcta ccactctcct cagcatcact ttctggtcag tctgggccgg 420
 gcgaagaggg ccttcctgcc aggcataaac ccacccccct actcccagtt cctgtcccgg 480
 aggaacgaga tccccctcat ccacttcaac acccccagac cacggcggca caccgggagc 540
 gccgaggacg actcggagcg ggaccccctg aacgtgctga agccccgggc ccggatgacc 600
 ccggccccgg cctcctgctc acaggagctc ccgagcgccg aggacaacag cccggtggcc 660
 agcgaccctt taggggtggt caggggcggt cgggtgaaca cgcacgctgg gggaacgggc 720
 ccggaagcct gccgccccct cgccaagttc atctag 756
 <210> 29
 < 211> 251
 < 212> PRT
 < 213> Macaca fascicularis
 <400> 29
 Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val
 1 5 10 15
 Cys Ser Met Ser Val Ile Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu
 20 25 30
 Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg
 35 40 45
 Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala
 50 55 60
 Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala
 65 70 75 80

11

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met
 85 90 95

Asp Phe Gly Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asn Pro Glu Asn
 100 105 110

Cys Arg Phe Arg His Trp Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His
 115 120 125

Ser Pro Gln His His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala
 130 135 140

Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg
 145 150 155 160

Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Arg Pro Arg Arg
 165 170 175

His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val
 180 185 190

Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln
 195 200 205

Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Val Ala Ser Asp Pro Leu
 210 215 220

Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile

245 250

<210> 30

< 211> 1417

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<400> 30
 gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag ctccaggtgc 60
 tcactcccag gtgcagctgg tgcagtctgg ggotgagggtg aagaagcctg gggcctcagt 120
 gaaggtttcc tgcaaggcat ctggatacac cttaccaaac cactatatgc actgggtgcg 180
 acaggcccct ggacaagggc ttgagtggat ggggaataatc aaccctatta gtggtagcac 240
 aagtaacgca cagaagtcc agggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac 300
 agtctacatg gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgcgag 360
 agatattgtg gatgcttttg atttctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttcagc 420
 tagcaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaacctcc tccaagagca cctctggggg 480
 cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg 540
 gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg 600
 actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta 660
 catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa 720
 atcttgtagc aaaactcaca catgcccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc 780
 gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga 840
 ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta 900
 cgtggacggc gtggagggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 960
 cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga 1020
 gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaa ccatctcaa 1080
 agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct 1140
 gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcg 1200
 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1260
 ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca 1320
 gcaggggaac gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca 1380
 gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaagt aggatcc 1417
 <210> 31
 < 211> 466

13

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<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

14

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

15

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240

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

16

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

< 212> DNA

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<400> 32

agatctctca ccatggacat gaggggtcccc gctcagctcc tggggcttct gctgctctgg 60

ctcccagggtg ccagatgtgc catcagttg acccagtctc catcctccct gtctgcatct 120

gtaggagaca gagtcacat cacttgccgg gcaagtcagg gcattagcag tgctttagtc 180

tggtatcagc agaaaccagg gaaagctcct aagctcctga tctatgatgc ctccagtttg 240

gaaagtgggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

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

<210> 33

< 211> 235

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<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

18

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

< 212> DNA

< 213> Homo sapiens

<400> 34 35

tatcccaatg cctccccact gctcggctcc agctg 35

<210> 35
 < 211> 45
 < 212> DNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 35
 ttggccggcc ctatgatgaac ttggcgaagg ggcggcagcc ttccg 45
 <210> 36
 < 211> 756
 < 212> DNA
 < 213> Homo sapiens
 <400> 36
 atgttggggg cccgcctcag gctctgggtc tgtgccttgt gcagcgtctg cagcatgagc 60

 gtcctcagag cctatcccaa tgcctcccca ctgctcggct ccagctgggg tggcctgac 120

 cacctgtaca cagccacagc caggaacagc taccacctgc agatccacaa gaatggccat 180

 gtggatggcg caccocatca gaccatctac agtgcctga tgatcagatc agaggatgct 240

 ggctttgtgg tgattacagg tgtgatgagc agaagatacc tctgcatgga tttcagaggc 300

 aacatttttg gatcacacta ttctgaccog gagaactgca ggttccaaca ccagacgctg 360

 gaaaacgggt acgacgtcta ccactctcct cagtatcaact tcctggtcag tctgggccgg 420

 gcgaagagag ccttcttgcc aggcataaac ccaccccggt actccagtt cctgtcccgg 480

 aggaacgaga tccccctaat tcacttcaac accccatac cacggcggca caccgggagc 540

 gccgaggacg actcggagcg ggaccccctg aacgtgctga agccccgggc ccgcatgacc 600

 ccggcccccgg cctcctgttc acaggagctc ccgagcgccg aggacaacag cccgatggcc 660

 agtgacccat taggggtggt caggggcggg cgagtgaaca cgcacgctgg gggaacgggc 720

 ccggaaggct gccgcccctt cgccaagttc atctag 756
 <210> 37
 < 211> 251
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

20

<400> 37

Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser Val
 1 5 10 15

Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu
 20 25 30

Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg
 35 40 45

Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala
 50 55 60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala
 65 70 75 80

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met
 85 90 95

Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn
 100 105 110

Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His
 115 120 125

Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala
 130 135 140

Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg
 145 150 155 160

Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg
 165 170 175

His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val
 180 185 190

Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln
 195 200 205

Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu
 210 215 220

Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240

Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile
 245 250

<210> 38

<211> 985

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 38

```

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttcagg tgagagtga      60

gagaagtgtt ggatgcaacc tctgtggcca ttatgatact ccatgcctct ctgttcttga    120

tcaactataat tagggcattt gtcactggtt ttaagtttcc ccagtccctt gaattttcca    180

ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta aataaaaagg tcctctgctg    240

tgaaggcttt tatacatata taacaataat ctttgtgttt atcattccag gttccactgg    300

ctatcccaat gcctcccccac tgctcggctc cagctggggg ggctgatcc acctgtacac    360

agccacagcc aggaacagct accacctgca gatccacaag aatggccatg tggatggcgc    420

accccatcag accatctaca gtgccctgat gatcagatca gaggatgctg gctttgttgt    480

gattacaggt gtgatgagca gaagatacct ctgcatggat ttcagaggca acatTTTTg    540

atcacactat ttgacccgg agaactgcag gttccaacac cagacgctgg aaaacgggta    600

cgacgtctac cactctcctc agtatcactt cctggtcagt ctgggccggg cgaagagagc    660

cttctgcca ggcatgaacc ccccccgta ctccagttc ctgtcccgga ggaacgagat    720

ccccctaatt cacttcaaca ccccatacc acggcggcac acccgagagc ccgaggacga    780

ctcggagcgg gacccctga acgtgctgaa gcccggggc cggatgacc cggccccggc    840

ctcctgttca caggagctcc cgagcgccga ggacaacagc ccgatggcca gtgaccatt    900

aggggtggtc aggggcggtc gagtgaacac gcacgtggg ggaacgggcc cggaaggctg    960

ccgccccctc gccaaagtta tctag                                           985

```

<210> 39

< 211> 247

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

23

<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

24

145 150 155 160

Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg Ser
165 170 175

Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg
180 185 190

Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser
195 200 205

Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg
210 215 220

Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys
225 230 235 240

Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile
245

<210> 40

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<400> 40

Asn His Tyr Met His

1 5

<210> 41

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Synthetic

<400> 41

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

1 5 10 15

Gly

<210> 42

< 211> 8

< 212> PRT

< 213> Artificial

25

<220>
 < 223> Synthetic
 <400> 42
 Asp Ile Val Asp Ala Phe Asp Phe
 1 5
 <210> 43
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 43
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Val
 1 5 10
 <210> 44
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 44
 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 45
 < 211> 8
 < 212> PRT
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Synthetic
 <400> 45
 Gln Gln Phe Asn Asp Tyr Phe Thr
 1 5

Fig. 1

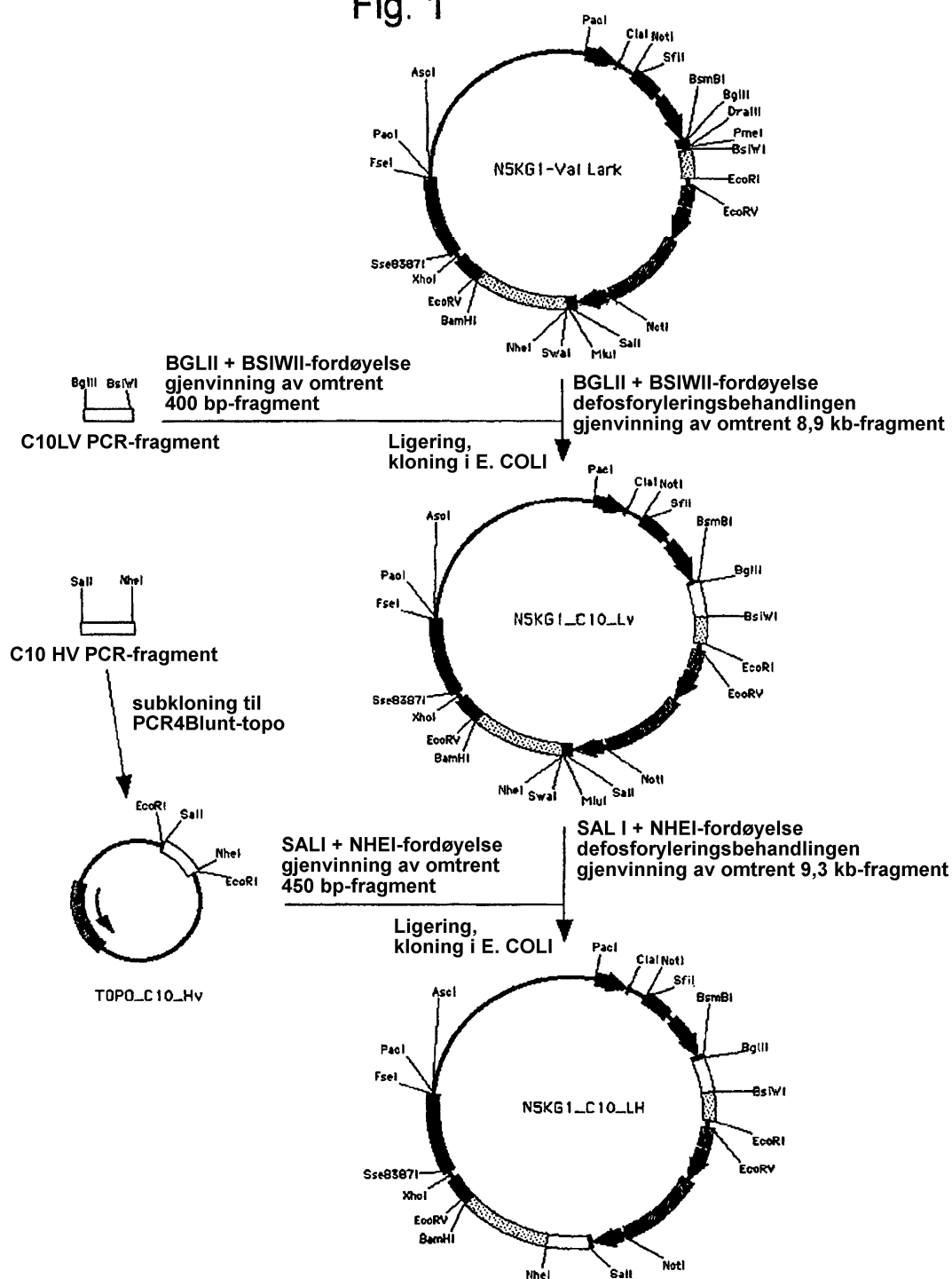


Fig. 2

Sall
 1 GTCGACCACC ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT GCT CAC TCC
 1▶ M D Y T W R V F C L L A Y A P G A H S

68 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC
 20▶ Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S
 131 TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC ACC AAC CAC TAT ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA
 41▶ C K A S G Y T F T N H Y M H W V R Q A P G
 194 CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA ATA ATC AAC CCT ATT AGT GGT AGC ACA AGT AAC GCA CAG AAG
 62▶ Q G L E W M G I I N P I S G S T S N A Q K
 257 TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC AGG GAC ACG TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC
 83▶ F Q G R V T M T R D T S T S T V Y M E L S

BglII
 320 AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAT TGT GCG AGA 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 AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GCG TGC CTG GTC AAG
 146▶ P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K
 509 GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC
 167▶ D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H
 572 ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
 188▶ T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
 635 TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG
 209▶ S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K
 698 GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA
 230▶ V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A
 761 CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG
 251▶ P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M
 824 ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC
 272▶ I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V
 887 AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG GAG
 293▶ K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
 950 CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT
 314▶ Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N
 1013 GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC
 335▶ G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
 1076 TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG
 356▶ S K A K G Q P R E P Q Y Y T L P P S R D E
 1139 CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC
 377▶ L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
 1202 GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC
 398▶ V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 1265 TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AAG TGG CAG CAG GGG
 419▶ S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
 1328 AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC
 440▶ N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L

BamHI
 1391 TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA GGATCC
 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 GGT GCC AGA TGT GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA

18► P G A R C A I Q L T Q S P S S L S A S V G

127 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GTC TGG TAT CAG

39► D R V T I T C R A S Q G I S S A L V W Y Q

190 CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC

60► Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V

253 CCA TCA 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

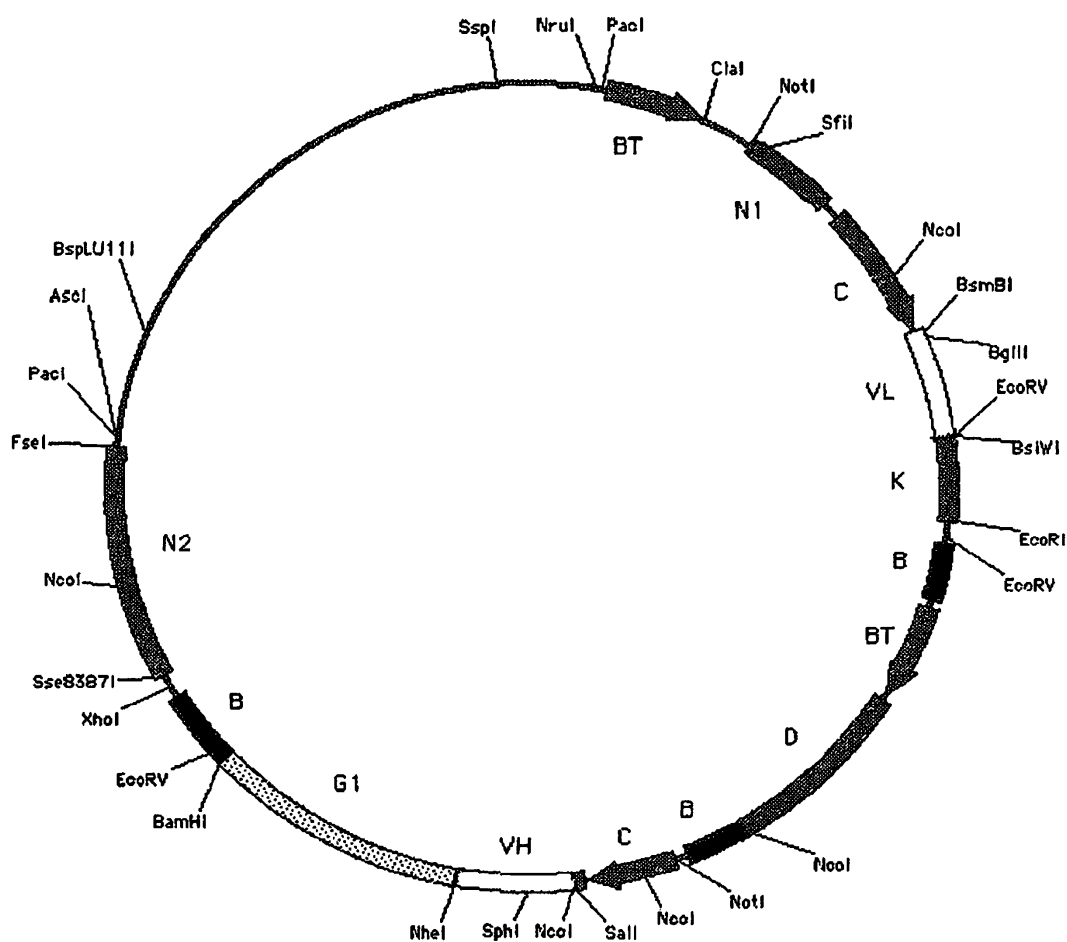
207► Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T

EcoRI

694 AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGA ATTC

228► K S F N R G E C

Fig. 4



- BT: Mus betaglobulin, hovedpromotor
 N1: Neomycinfosfotransferase, ekson 1
 C: Cytomegalovirus-promotor/forsterker
 B: Polydeanlysering av veksthormon fra kalv
 VL: C10 variabel lett kjederegion
 K: Human konstant immunoglobulin kapparegion
 D: Dihydrofolatreduktase
 VH: C10 variabel tungkjederegion
 G1: Human konstant immunoglobulin gamma 1-region
 N2: Neomycinfosfotransferase, ekson 2

Fig. 5A

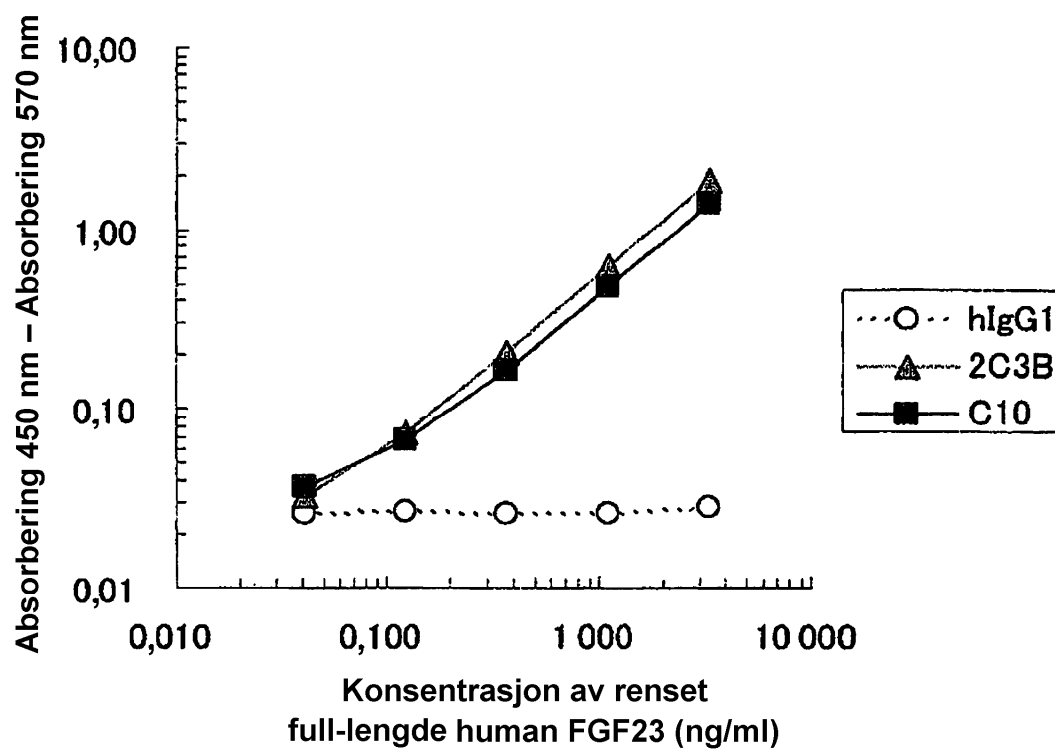


Fig. 5B

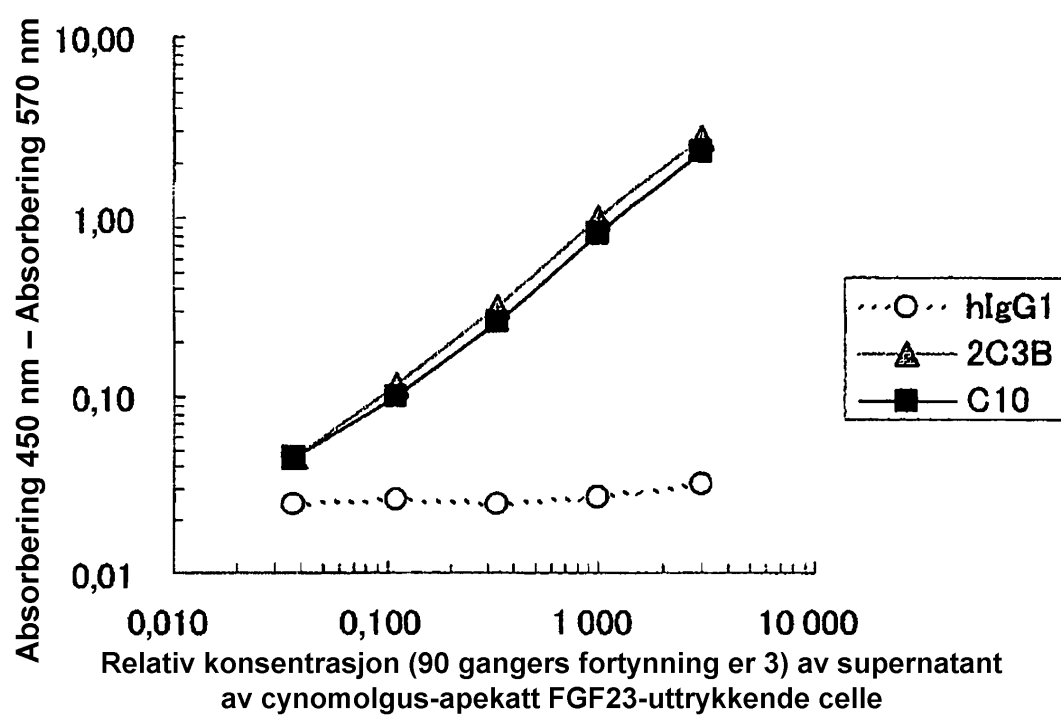
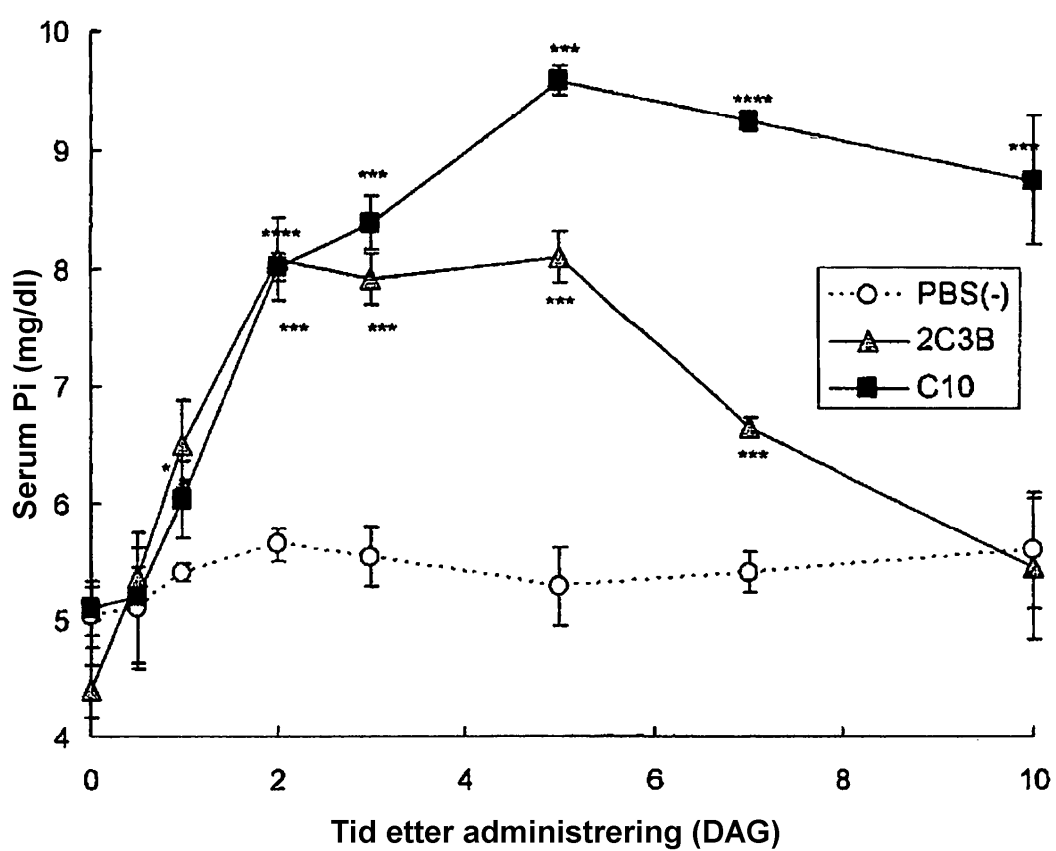


Fig. 6



* p<0,05

** p<0,01

*** p<0,005

**** p<0,001

student-t

Fig. 7

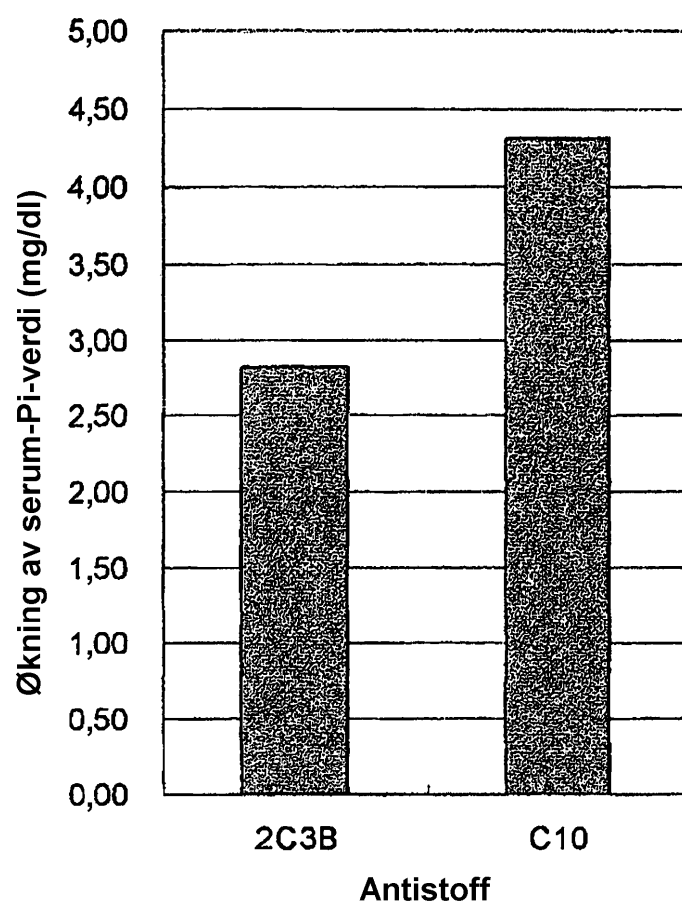
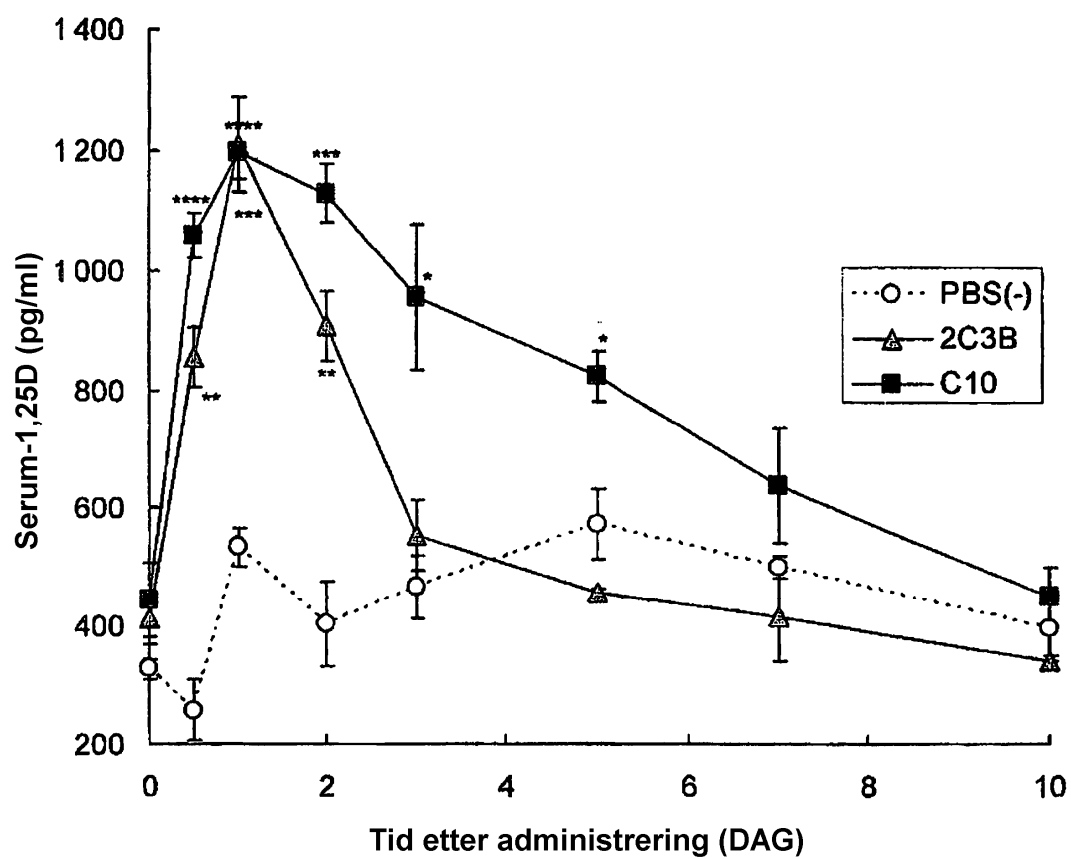


Fig. 8



*p<0,05

**p<0,01

***p<0,005

****p<0,001

student-t

Fig. 9

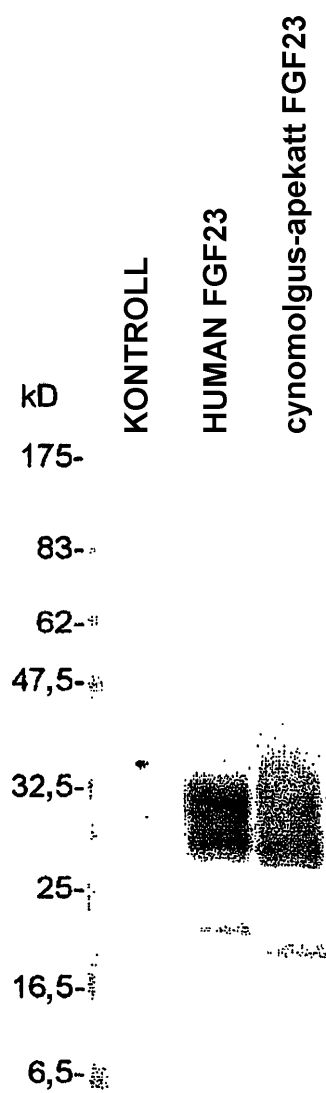


Fig. 10

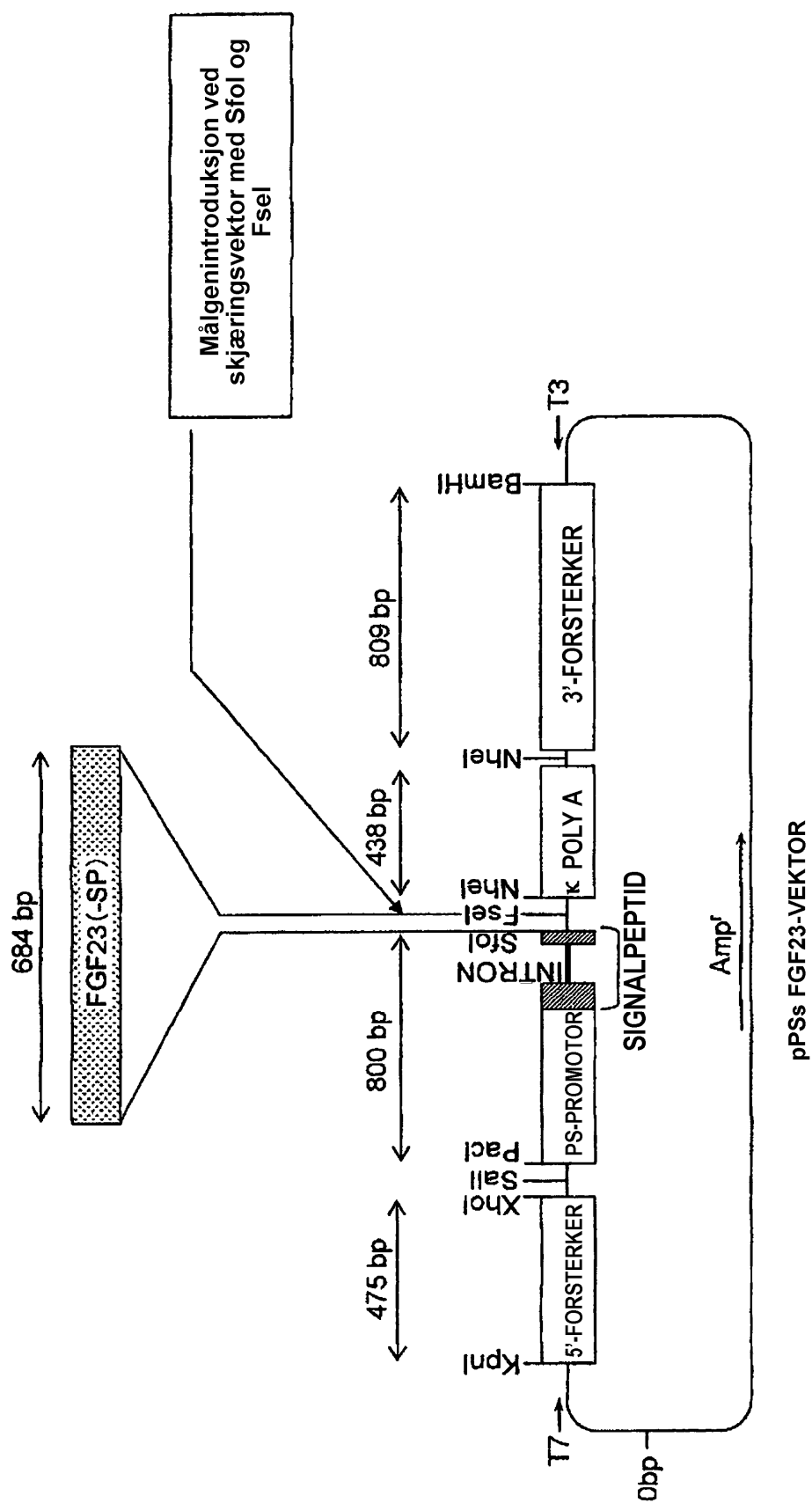


Fig. 11

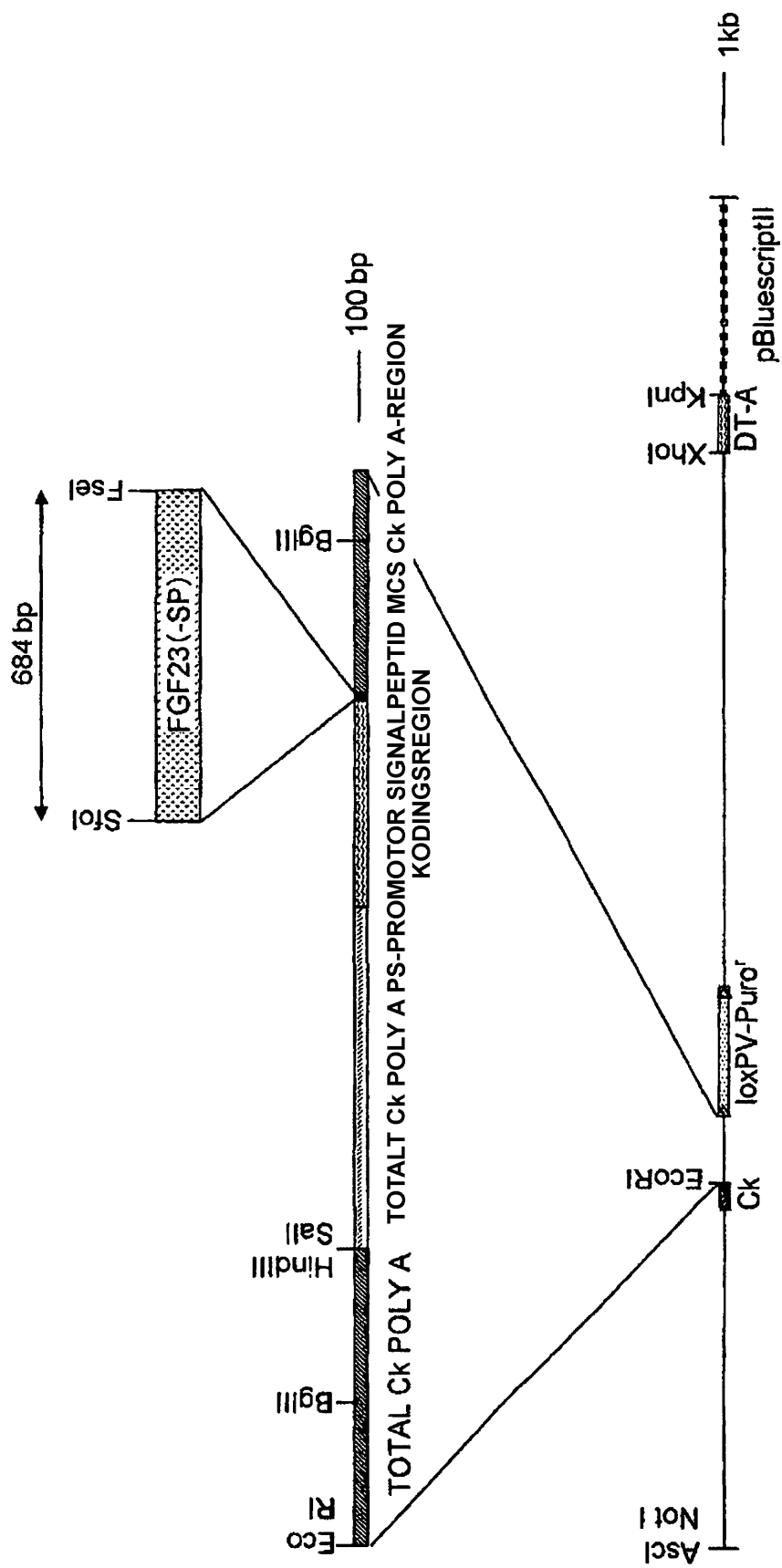


Fig. 12

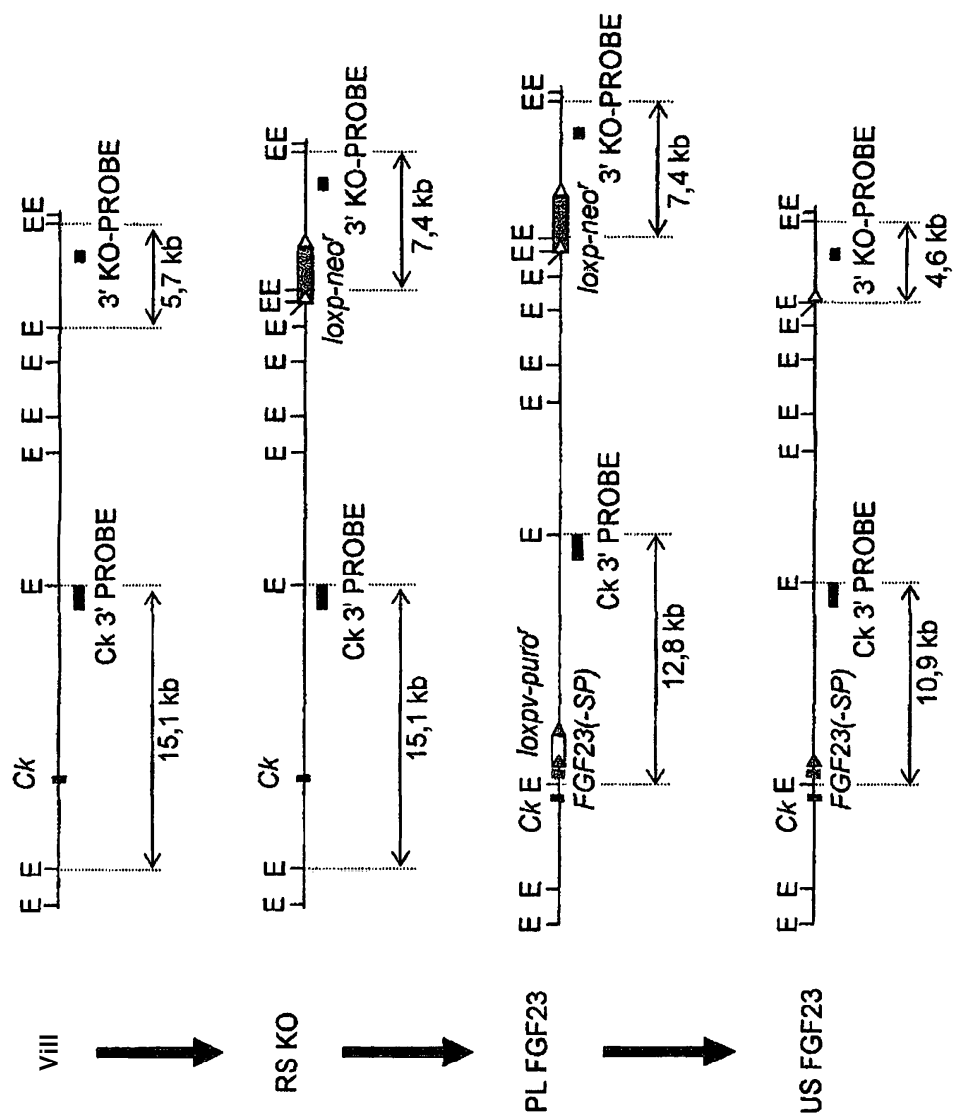


Fig. 13

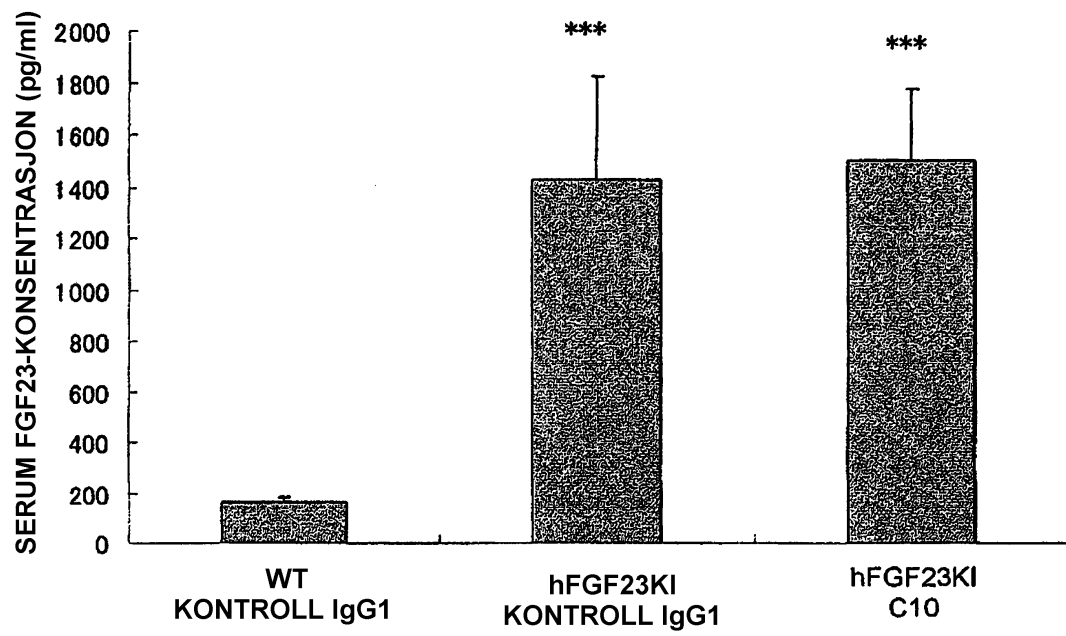


Fig. 14

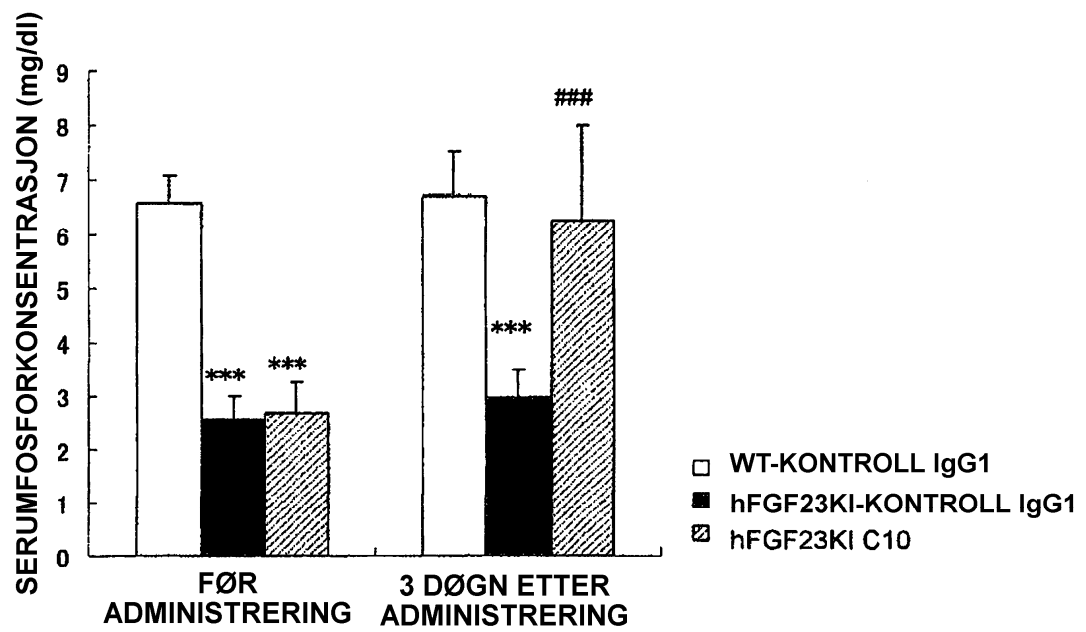


Fig. 15

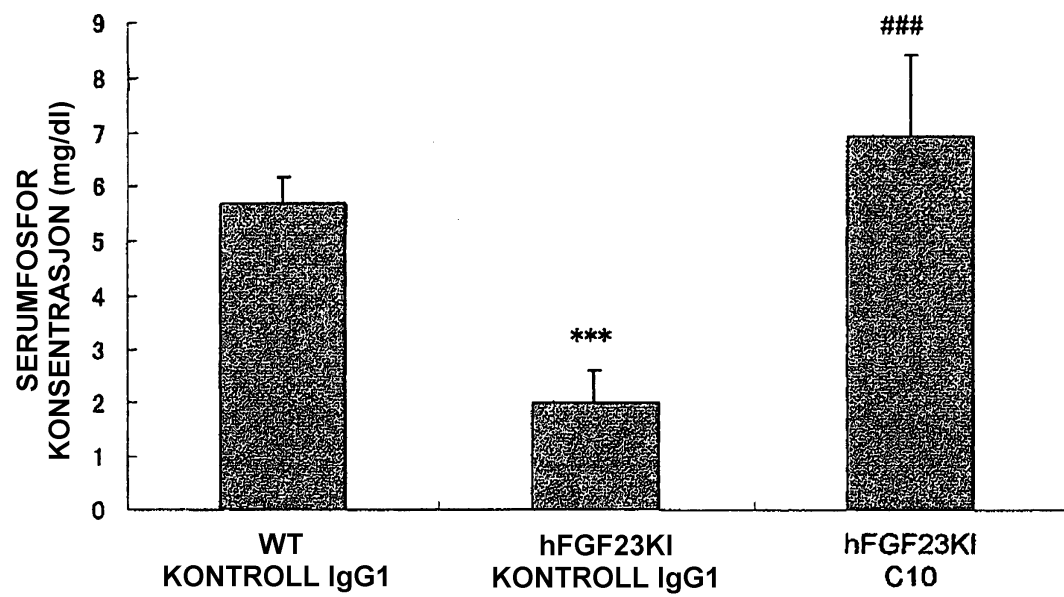


Fig. 16

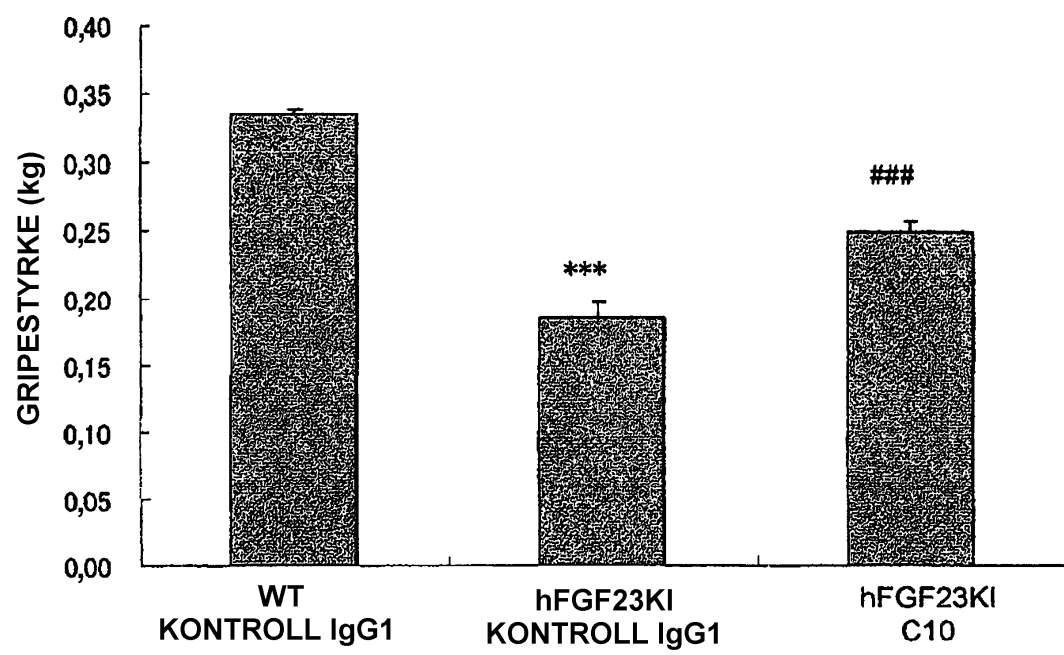


Fig. 17

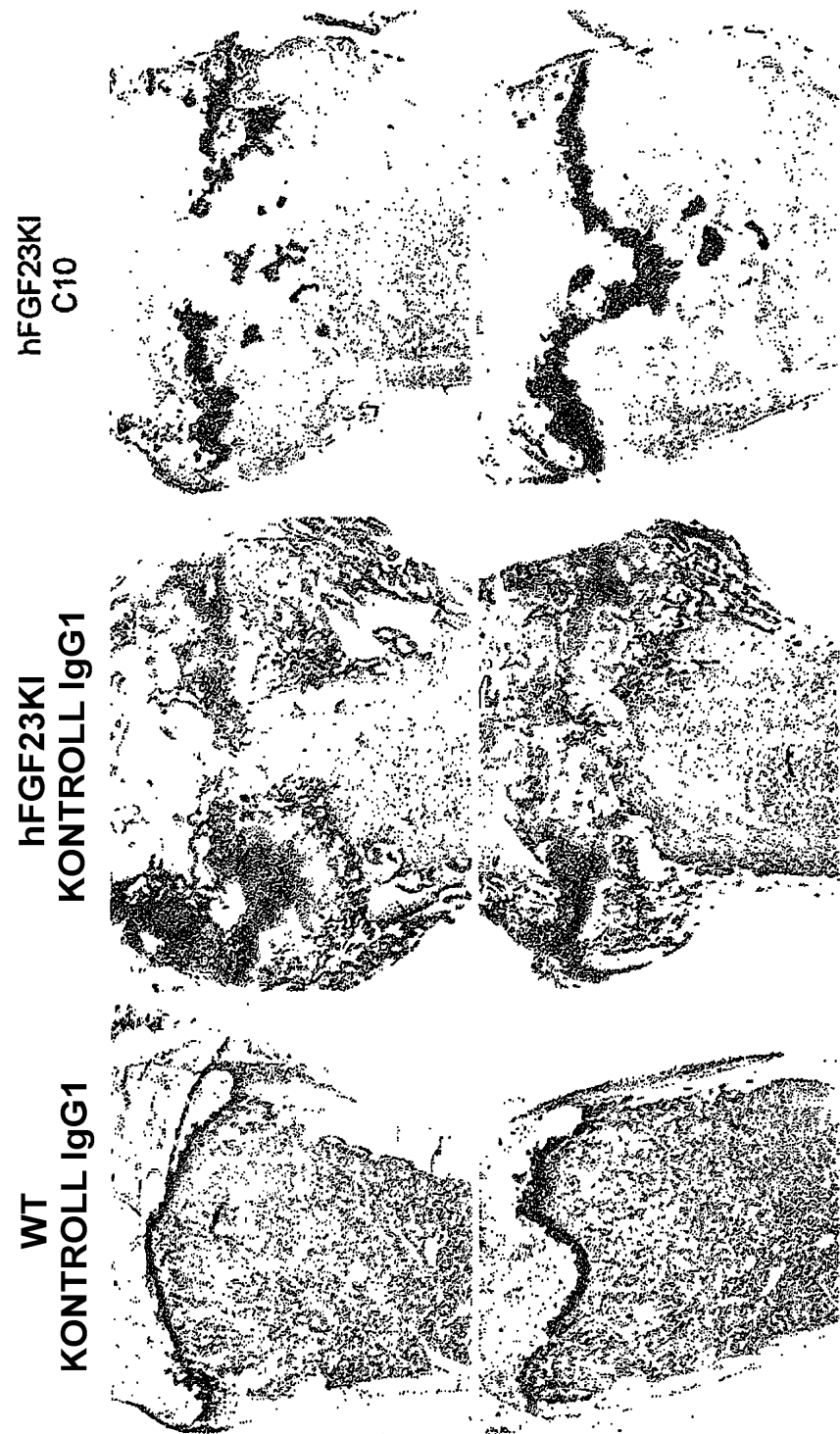


Fig. 18

