

明 細 書

発明の名称：抗 F G F 2 3 抗体又は該抗体断片

技術分野

[0001] 本発明は、抗 F G F 2 3 抗体又は該抗体断片に関する。

背景技術

[0002] 線維芽細胞増殖因子 (F i b r o b l a s t g r o w t h f a c t o r、以下 F G F と記載) は、構造的に類似した一群のポリペプチドファミリーを形成しており、線維芽細胞増殖活性のみならず、中胚葉や神経外胚葉の増殖や血管新生作用、発生段階における肢芽形成など様々な作用が報告されている。また、成人においては、組織の維持や修復、再生や代謝など、ホメオスタシス因子としても機能している (非特許文献 1)。

[0003] 哺乳動物においては、F G F ファミリーに属するタンパク質として、2 2 種類が知られている。ヒトにおいては、F G F 1 5 を除く F G F 1 から F G F 2 3 の 2 2 種類が同定されている。また、ヒトの F G F ファミリーは約 1 5 0 ～ 3 0 0 アミノ酸から構成されており、コア配列の約 1 2 0 アミノ酸は約 3 0 ～ 6 0 % の割合で一致している。F G F ファミリーは、分泌タンパク質として発現し、受容体チロシンキナーゼに作用するものと、細胞内タンパク質として発現し、電位依存的ナトリウムチャンネルやその他の分子に作用するものに分類される (非特許文献 2)。

[0004] F G F 2 3 は、F G F 1 5 との相同性を利用したデータベース検索及び P C R 法を用いてマウスより同定され、その後相同性検索により同定された分泌タンパク質である。ヒトの F G F 2 3 は 2 5 1 アミノ酸残基のポリペプチドで構成され、N 末端の 2 4 残基が分泌シグナルとして機能し、タンパク質の成熟過程で切断されることが知られている (非特許文献 3)。

[0005] F G F 2 3 の産生過剰による低リン血症性疾患が知られており、原因遺伝子が判明している疾患と後天性疾患に大きく分類される (非特許文献 4)。原因遺伝子が判明している F G F 2 3 関連低リン血症性疾患では、p h o s

phate-regulating endopeptidase homolog, X-linked (PHEX) 変異によるX染色体遺伝性低リン血症性くる病 (X-linked hypophosphatemic rickets、以下XLHと記載) の頻度が最も高く、これまでに多数のPHEX遺伝子変異が報告されている (非特許文献5)。

[0006] PHEXは膜1回貫通型タンパク質であり、軟骨、骨芽細胞、象牙芽細胞に多く発現していることが知られており (非特許文献6及び非特許文献7)、XLHは2万人に1人の頻度で発症するといわれている (非特許文献8)。後天性疾患の例としては、腫瘍性骨軟化症 (tumor-induced osteomalacia: TIO) などが知られている。

[0007] これらのFGF23関連低リン血症性疾患に対して、従来は対症療法として活性型ビタミンD3製剤と経口リン製剤が用いられてきた。しかし、長期投与による高カルシウム血症及び尿症、腎石灰化、持続性の副甲状腺機能亢進症の合併などが起こる可能性があった (非特許文献9及び非特許文献10)。

[0008] FGF23の過剰生産が原因と考えられる上記疾患の治療薬として、FGF23中和抗体であるブロスマブが知られている。

[0009] また、その他に、ヒトFGF23中和抗体としては、特許文献1に記載される抗体なども知られている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1: 国際公開第2008/099969号

非特許文献

[0011] 非特許文献1: Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2015 May-Jun;4(3):215-66

非特許文献2: J Biochem. 2011 Feb;149(2):121-30

非特許文献3: Biochem Biophys Res Commun. 2000 Oct 22;277(2):494-8

非特許文献4: Endocrinology. 2011 Jan;152(1):4-10

非特許文献5: Hum Mutat. 2000;16(1):1-6.

非特許文献6：J Clin Invest. 2008 Feb 1; 118(2): 722-734

非特許文献7：J Clin Invest. 1997 Mar 15; 99(6): 1200-1209.

非特許文献8：Orphanet J Rare Dis. 2019; 14: 58

非特許文献9：Lancet. 2019 Jun 15;393(10189):2416-2427

非特許文献10：J Bone Miner Res. 2011 Jul;26(7):1381-8

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明者らは、国際公開第2008/099969号に記載される抗ヒトFGF23抗体の物性を鋭意検討した結果、当該抗体が低pHにおいて安定性が低下し、分解されること、および当該分解は、抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列において、99番目のDと100番目のIとの間の切断によるものであることを見出した。一般的に、抗体製剤を高濃度化する際に抗体が凝集しやすいこと、およびタンパク質溶液中のタンパク質の電荷の絶対値が高まると、タンパク質の凝集が生じる可能性を低減できることが知られている (Arch Pharm Res Vol 35, No 11, 1871-1886, 2012)。そのため、抗体製剤を高濃度化する際には、抗体の凝集を抑制する方法の一つとして、当該製剤のpHを低下させることがある。したがって、抗体製剤のpHを低下させる必要がある場合には、検討可能なpHの幅が広い抗体がより望まれる。

[0013] したがって、本発明は、国際公開第2008/099969号に記載される抗ヒトFGF23抗体よりも低pHでの抗体の分解が抑制された新規な抗FGF23抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0014] 上記課題を鋭意検討した結果、本発明者らは、国際公開第2008/099969号に記載される抗FGF23抗体のVHの100番目のアミノ酸残基または105番目のアミノ酸残基を置換した抗FGF23抗体により、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成させた。

[0015] 1. 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（以下、VHと記載）および配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（以下

、V Lと記載)を含む抗体において、少なくともV Hにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基または105番目のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された、F G F 2 3に結合する抗体または該抗体断片。

2. V Hにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基が、アラニン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、チロシン残基、アルギニン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、トリプトファン残基、およびメチオニン残基から選ばれる1のアミノ酸残基に置換された、前記1に記載の抗体または該抗体断片。

3. V Hにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基が、アラニン残基、またはチロシン残基に置換された、前記1または2に記載の抗体または該抗体断片。

4. V Hにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の105番目のアミノ酸残基が、アラニン残基、フェニルアラニン残基、グリシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基、リシン残基、ロイシン残基、メチオニン残基、プロリン残基、グルタミン残基、アルギニン残基、バリン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、トレオニン残基、アスパラギン残基、およびセリン残基から選ばれる1のアミノ酸残基に置換された、前記1～3のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片。

5. 前記抗体が下記(a 1)～(a 4)から選ばれる1の置換をさらに含む、前記1～4のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片。

(a 1) V Hにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の50番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換、54番目のアミノ酸残基のトリプトファン残基への置換、55番目のアミノ酸残基のヒスチジン残基への置換、57番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および58番目のアミノ酸残基のフェニルアラニン残基への置換から選ばれる少なくとも1の置換、

(a 2) V Lにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の91番目のアミノ酸残基のメチオニン残基またはロイシン残基への置換、92番目のアミノ

酸残基のチロシン残基への置換、94番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、および96番目のアミノ酸残基のアスパラギン残基またはアスパラギン酸残基への置換から選ばれる少なくとも1の置換、

(a3) VLにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の28番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、29番目のアミノ酸残基のバリン残基への置換、31番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および34番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換から選ばれる少なくとも1の置換、並びに

(a4) VLにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の92番目のアミノ酸残基のチロシン残基またはトリプトファン残基への置換、94番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、および96番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換から選ばれる少なくとも1の置換。

6. 前記抗体が下記(c1)～(c10)から選ばれる1である、前記1～5のいずれか1に記載の抗体または該抗体断片。

(c1) 配列番号39で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体、

(c2) 配列番号47で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体、

(c3) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号44で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体、

(c4) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号44で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体、

(c5) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号45で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体、

(c6) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号45で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体、

(c7) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号46で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体、

(c 8) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む V H および配列番号 4 6 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体、

(c 9) 配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を含む V H および配列番号 5 8 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体、並びに

(c 10) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む V H および配列番号 5 9 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体。

7. 前記抗体のサブクラスが I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 である、前記 1 ～ 6 のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片。

8. 前記抗体の F c 領域が下記 (d 1) ～ (d 5) から選ばれる 1 である、前記 1 ～ 7 のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片。

(d 1) E U インデックス 2 5 2 番目のアミノ酸残基のチロシン残基への置換、2 5 4 番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および 2 5 6 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸残基への置換を含む F c 領域、

(d 2) E U インデックス 4 2 8 番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換、および 4 3 4 番目のアミノ酸残基のセリン残基への置換を含む F c 領域、

(d 3) E U インデックス 3 0 8 番目のアミノ酸残基のプロリン残基への置換を含む F c 領域、

(d 4) E U インデックス 2 5 0 番目のアミノ酸残基のグルタミン残基への置換、および 4 2 8 番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換を含む F c 領域、並びに

(d 5) E U インデックス 4 3 4 番目のアミノ酸残基のアラニン残基への置換を含む F c 領域。

9. 前記抗体の重鎖定常領域が配列番号 4 8、4 9、5 0、5 1、または 5 2 で表されるアミノ酸配列を含む、前記 1 ～ 8 のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片。

10. 前記抗体断片が、F a b、F a b'、(F a b')₂、s c F v、D i a b o d y、d s F v および C D R を含むペプチドから選ばれる 1 である前

記 1 ～ 9 のいずれか 1 に記載の抗体断片。

1 1. 前記 1 ～ 1 0 のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸。

1 2. 前記 1 1 に記載の核酸を含有するベクター。

1 3. 前記 1 2 に記載のベクターを含む形質転換細胞。

1 4. 前記 1 3 に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培養物から抗体または該抗体断片を採取することを含む、前記 1 ～ 1 0 のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

1 5. 前記 1 ～ 1 0 のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片を含む組成物。

1 6. 前記 1 ～ 1 0 のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片を含むヒト F G F 2 3 関連疾患の治療薬。

1 7. 前記 1 ～ 1 0 のいずれか 1 に記載の抗体または該抗体断片を含むヒト F G F 2 3 関連疾患の治療方法。

発明の効果

[0016] 本発明の抗 F G F 2 3 抗体は、国際公開第 2 0 0 8 / 0 9 9 9 6 9 号に記載される抗 F G F 2 3 抗体と比較して、低 p H における分解が抑制され、優れた安定性を示す。本発明によれば、抗 F G F 2 3 抗体または該抗体断片、該抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸、該核酸を含むベクター、該ベクターを含む形質転換細胞、該抗体または該抗体断片の製造方法、および該抗体または該抗体断片を含む組成物を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明は、国際公開第 2 0 0 8 / 0 9 9 9 6 9 号に記載される線維芽細胞増殖因子 2 3（以下、F G F 2 3 と記載する）に結合する抗体（以下、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（以下、V H と記載する）および配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（以下、V L と記載する）を含む抗体と記載する）において、少なくとも V H における

配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基または105番目のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたFGF23に結合する抗体または該抗体断片に関する（以下、本発明の抗体と記載する）。

[0018] 「FGF23」は、線維芽細胞増殖因子の一種で、骨細胞由来のホルモンである。ヒトFGFは、N末端に24アミノ酸の分泌シグナルを含む251アミノ酸からなるタンパク質であり、当該分泌シグナルはタンパク質の成熟過程で切断される。FGF23の機能としては、主に腎臓の腎近位尿細管細胞上のFGF受容体1（以下FGFR1とも記載する）/ α -Klotho複合体を介して、腎臓でのリンの再吸収とビタミンDの活性化を抑制することなどが挙げられる。

[0019] 本発明においてヒトFGF23としては、NCBIアクセッション番号NP_065689のアミノ酸配列を含むポリペプチド、NCBIアクセッション番号NP_065689のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒトFGF23の機能を有するポリペプチド、あるいはNCBIアクセッション番号NP_065689のアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列から成り、かつヒトFGF23の機能を有するポリペプチドなどが挙げられる。

[0020] NCBIアクセッション番号NP_065689で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] などを用いて、例えばNCBIアクセッション番号NP_065689で示される

アミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするDNAに、部位特異的変異を導入することにより得ることができる。

[0021] 欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個～数十個、例えば、1～20個、より好ましくは1個～数個、例えば、1～5個のアミノ酸である。

[0022] ヒトFGF23をコードする遺伝子としては、NCBIアクセッション番号NM_020638の塩基配列が挙げられる。NM_020638の塩基配列において、1以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列から成り、かつヒトFGF23の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、NM_020638の塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有する塩基配列、好ましくは80%以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは90%以上の相同性を有する塩基配列、最も好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列から成り、かつヒトFGF23の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子またはNM_020638の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAから成り、かつヒトFGF23の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども本発明のヒトFGF23をコードする遺伝子に含有される。

[0023] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、NM_020638の塩基配列を含むDNAをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法またはDNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAのことをいう。

[0024] 具体的には、ハイブリダイズしたコロニーあるいはブランク由来のDNA、または該配列を有するPCR産物若しくはオリゴDNAを固定化したフィルター若しくはスライドガラスを用いて、0.7～1.0mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory

Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)] を行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターまたはスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

[0025] ハイブリダイズ可能なDNAとしては、NM_020638の塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる

[0026] 真核生物のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も本発明のヒトFGF23をコードする遺伝子に含有される。

[0027] 本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)] においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙げられる。

[0028] デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap) が塩基配列の場合は5、アミノ酸配列の場合は11、-E (Cost to extend gap) が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、-q (Penalty for nucleotide mismatch) が-3、-r (reward for nucleotide match) が1、-e (expect value) が10、-W (wor

dsize) が塩基配列の場合は11残基、アミノ酸配列の場合は3残基、
-y [Dropoff (X) for blast extensions
in bits] がblastnの場合は20、blastn以外のプログラムでは7、-X (X dropoff value for gapped
alignment in bits) が15および-Z (final
X dropoff value for gapped alignm
ent in bits) がblastnの場合は50、blastn以外
のプログラムでは25である。

[0029] NCBIAクセッション番号NP_065689のアミノ酸配列の部分配列を含むポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができる。具体的には、NP_065689のアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、上記と同様の方法により、NCBIAクセッション番号NP_065689のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。さらに、NCBIAクセッション番号NP_065689のアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはNCBIAクセッション番号NP_065689のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換あるいは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 法、t-ブチルオキシカルボニル (tBoc) 法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0030] 本発明において、アミノ酸の欠失、置換または付加等をアミノ酸の改変ともいう。

[0031] 本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびオリゴクローナル抗体のいずれの抗体をも包含する。ポリクローナル抗体とは、異なるクローンの抗体産生細胞が分泌する抗体分子の集団をいう。モノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ (抗原決定基ともいう) を認識し、モノクローナル抗体を構

成するアミノ酸配列（一次配列）が均一である抗体をいう。オリゴクローナル抗体とは、複数の異なるモノクローナル抗体を混合した抗体分子の集団をいう。

[0032] 本発明におけるモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより產生される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により產生される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

[0033] エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する、単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、翻訳後修飾により修飾されたアミノ酸配列および該アミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。

[0034] 翻訳後修飾により修飾されたアミノ酸配列としては、糖鎖がOH置換基を有するTyrおよびSerに結合したO結合型糖鎖、NH₂置換基を有するGlnおよびAsnに結合したN結合型糖鎖ならびに硫酸分子がOH置換基を有するTyrおよびSerに結合した硫酸基などが結合したアミノ酸配列が挙げられる。

[0035] 本発明の抗体がヒトFGF23に結合することは、ヒトFGF23に対する本発明の抗体の結合性を、ELISAおよび表面プラズモン共鳴法などを用いて測定することにより確認することができる。また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（1987）] などを組み合わせて確認することもできる。

[0036] 本発明の抗体が結合するヒトFGF23のアミノ酸残基またはエピトープは、ヒトFGF23の一部のドメインを欠失させた欠損体、他のタンパク質由来のドメインと置換した変異体およびヒトFGF23の部分ペプチド断片等を用いて抗体の結合実験を行うことにより決定することができる。

[0037] または、本発明の抗体が結合するヒトFGF23のアミノ酸残基またはエピトープは、タンパク質分解酵素にて消化したヒトFGF23のペプチド断片に本発明の抗体を添加し、既知の質量分析法を用いてエピトープマッピング

グを行うことによっても決定することができる。

[0038] 抗体分子はイムノグロブリン（以下、Igと表記する）とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびIgMのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の相同性が比較的高いIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を総称してIgGともいう。

[0039] 抗体分子は重鎖（Heavy chain、以下H鎖と記す）および軽鎖（Light chain、以下L鎖と記す）と呼ばれるポリペプチドより構成される。また、H鎖はN末端側よりVH、H鎖定常領域（CHとも表記される）、L鎖はN末端側よりVL、L鎖定常領域（CLとも表記される）の各領域により、それぞれ構成される。CHは各サブクラスにおいて、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ 鎖がそれぞれ知られている。CHはさらに、N末端側よりCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインの各ドメインにより構成される。ドメインとは、抗体分子の各ポリペプチドを構成する機能的な構造単位をいう。また、CH2ドメインとCH3ドメインを併せてFc領域または単にFcという。CLは、C λ 鎖およびC κ 鎖が知られている。

[0040] 本発明におけるCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインおよびFc領域は、EUインデックス [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]（以下、単にEUインデックスと記載する）により、N末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。具体的には、CH1はEUインデックス118～215番のアミノ酸配列、ヒンジはEUインデックス216～230番のアミノ酸配列、CH2はEUインデックス231～340番のアミノ酸配列、CH3はEUインデックス341～447番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

[0041] 本発明の抗体としては、特に遺伝子工学的に作製された組換えマウス抗体、組換えラット抗体、組換えラビット抗体、ヒト型キメラ抗体（以下、単に

キメラ抗体とも略記する)、ヒト化抗体(ヒト型相補性決定領域CDR移植抗体ともいう)およびヒト抗体などの遺伝子組換え抗体も含まれる。また、本発明の抗体には、異なる2種類の抗体由来のH鎖(又はVH)とL鎖(又はVL)とを組換えて作製される遺伝子組換え抗体も含まれる。異なる2種類の抗体は、ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体いずれのものであってもよい。更に本発明の抗体としては、上述の遺伝子組換え抗体を作製するに当たって、適当なアミノ酸残基を置換した遺伝子組換え抗体も含まれる。

[0042] キメラ抗体とは、ヒト以外の動物(非ヒト動物)の抗体のVHおよびVLと、ヒト抗体のCHおよびCLからなる抗体を意味する。非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

[0043] ハイブリドーマとは、非ヒト動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウスなどに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞をいう。したがって、ハイブリドーマが産生する抗体の可変領域は、非ヒト動物抗体のアミノ酸配列からなる。

[0044] キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産する非ヒト動物細胞由来のハイブリドーマより、該モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0045] ヒト化抗体とは、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの対応するCDRに移植した抗体をいう。VHおよびVLのCDR以外の領域はフレームワーク領域(以下、FRと表記する)と称される。

[0046] ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のVHのCDRのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列からなるVHのアミノ酸配列をコードす

る cDNA と、非ヒト動物抗体の VL の CDR のアミノ酸配列と任意のヒト抗体の VL の FR のアミノ酸配列からなる VL のアミノ酸配列をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH および CL をコードする DNA を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0047] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

[0048] ヒト抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子を保持するマウス (Tomizuka K. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 722-7, 2000) に所望の抗原を免疫することにより、取得することが出来る。また、ヒト由来の B 細胞から抗体遺伝子を増幅した phage display ライブラリーを用いることにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を選択することで、免疫を行わずにヒト抗体を取得することができる (Winter G. et al., Annu Rev Immunol. 12:433-55, 1994)。さらに、EBウイルスを用いてヒト B 細胞を不死化することにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を生産する細胞を作製し、ヒト抗体を取得することができる (Rosen A. et al., Nature 267, 52-54, 1977)。

[0049] ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血から単離したリンパ球を、EBウイルス等を感染させることによって不死化した後、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を得ることができ、該リンパ球を培養した培養物中より該抗体を精製することができる。

[0050] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、scFv 等の抗体断片を表面に発現させたファージのライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全な H 鎖および 2本の完全な L 鎖か

らなるヒト抗体分子へも変換することができる。

[0051] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が宿主動物の染色体内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウスE S細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該E S細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

[0052] 本発明の抗体のV HおよびV Lのアミノ酸配列としては、ヒト抗体、非ヒト動物抗体またはヒト化抗体のV HおよびV Lのアミノ酸配列のいずれでもよい。

[0053] 本発明の抗体におけるC Lのアミノ酸配列としては、ヒト抗体または非ヒト動物抗体のアミノ酸配列のいずれでもよいが、ヒト抗体のアミノ酸配列のC_κまたはC_λが好ましい。

[0054] 本発明の抗体のC Hとしては、イムノグロブリンに属すればいかなるものでもよいが、I g Gクラスに属するサブクラス、γ 1 (I g G 1)、γ 2 (I g G 2)、γ 3 (I g G 3) およびγ 4 (I g G 4) が好ましい。

[0055] 本発明の抗体は、F cと抗体断片とが結合したF c融合タンパク質、F cと天然に存在するリガンドまたは受容体とが結合したF c融合タンパク質（イムノアドヘンシともいう）、複数のF c領域を融合させたF c融合タンパク質等をも包含する。

[0056] 本発明の抗体又は該抗体断片は、翻訳後修飾されたいかなるアミノ酸残基を含む抗体または該抗体断片をも包含する。翻訳後修飾としては、例えば、H鎖のC末端におけるリジン残基の欠失〔リジン・クリッピング (l y s i n e c l i p p i n g) 〕またはポリペプチドのN末端におけるグルタミン残基のピログルタミン (p y r o G l u) への変換などが挙げられる [Bec k et al, Analytical Chemistry, 85, 715-736 (2013)] 。

- [0057] 本発明において、抗体断片とは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体よりも、低pHでの分解が抑制されたヒトFGF23に結合する抗体断片である。本発明において抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)または複数のCDRを含むペプチドなどが挙げられる。Fabは、IgG抗体をタンパク質分解酵素パプシンで処理して得られる断片のうち(H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合(S-S結合)で結合した、分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。
- [0058] F(ab')₂は、IgGをタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち(H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される)、Fabがヒンジ領域のS-S結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のS-S結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。
- [0059] scFvは、1本のVHと1本のVLとを4個のGlyおよび1個のSer残基からなるリンカー(G4S)を任意の個数つなげたリンカーペプチドなどの適当なペプチドリンカー(P)を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。
- [0060] Diabodyは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性または異なる抗原に対する特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。
- [0061] dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のS-S結合を介して結合させたものをいう。
- [0062] CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以

上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、CDR同士を直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明の改変抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法またはtBoc法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0063] 本発明の抗体の一態様としては、下記(i)および(ii)の抗体または該抗体断片等が挙げられる。

(i) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含むFGF23に結合する抗体において、少なくともVHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基が、アラニン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、チロシン残基、アルギニン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、トリプトファン残基、およびメチオニン残基から選ばれる1のアミノ酸残基に置換されたFGF23に結合する抗体または該抗体断片。

(ii) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含むFGF23に結合する抗体において、少なくともVHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の105番目のアミノ酸残基が、アラニン残基、フェニルアラニン残基、グリシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基、リシン残基、ロイシン残基、メチオニン残基、プロリン残基、グルタミン残基、アルギニン残基、バリン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、トレオニン残基、アスパラギン残基、およびセリン残基から選ばれる1のアミノ酸残基に置換されたFGF23に結合する抗体または該抗体断片。

[0064] 当該抗体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と比較して、低pHにおける安定性が高く、抗体の分解を抑制できる。当該抗体は、配列番号1で表

されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体において、少なくともV Hにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基がアラニン残基またはチロシン残基に置換されたF G F 2 3に結合する抗体であることが好ましい。

[0065] 本発明において、低p Hとはp H 6未満の弱酸性又は酸性をいい、例えば、p H 5、p H 4. 5、p H 4等が挙げられるが、特に限定されるものではない。

[0066] 本発明の抗体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体と比較して、低p Hにおける分解が抑制され、優れた安定性を示す。本発明において、抗体の分解は、サイズ除去クロマトグラフィー（Size Exclusion Chromatography（以下、SECと記載する））またはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法（以下、SDS-PAGEと記載する）等で測定することができる。

[0067] 本発明の抗体で、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体と比較して、低p Hでの抗体の分解が抑制されていることは、例えば、以下の工程（I）～（III）を含む方法で確認することができるが、特に該方法に限定されるものではない。

（I）本発明の抗体、または配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体を含有する抗体溶液の溶媒を、NAP（商標）25（GEヘルスケアライフサイエンス）等のカラムを用いて、p H 4、4. 5または5の適当な溶媒に置換した抗体溶液を調製する。

（II）上記（I）で調製した抗体溶液を40度で1か月間もしくは2週間、または25度で3か月間静置した後、SECにて抗体の分解物に相当するピーク（%）を検出する。

または、上記（I）で調製した抗体溶液を40度で1か月間もしくは2週間

、または25度で3カ月間静置した後、還元条件下でSDS-PAGEを行い、抗体の分解物に相当する40kDa付近（例えば、35kDa～45kDa）のバンドを検出する。

（III）上記（II）のSECにより検出される抗体の分解物に相当するピーク（%）が、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体よりも、本発明の抗体で減少している場合、またはSDS-PAGEの40kDa付近のバンドの濃さが、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体よりも、本発明の抗体で低下している場合、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と比較して、本発明の抗体で、低pHでの抗体の分解が抑制されていると確認できる。

[0068] 上記（II）に記載のSDS-PAGEの代わりに、バイオアナライザー電気泳動システム（アジレント・テクノロジー株式会社）およびAgilent Protein 230キット（アジレント・テクノロジー株式会社）を用いてもよい。このとき、得られるエレクトロフェログラムにおいて、H鎖全長のピークよりも10～20kDa程度小さいサイズに検出される抗体の分解物に相当するバンド（例えば、40～60kDa）のピーク面積率（%）が、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体よりも、本発明の抗体で低下している場合に、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と比較して、本発明の抗体で低pHでの抗体の分解が抑制されていると確認できる。

[0069] すなわち、本発明の抗体の低pHにおける安定性を示す態様として、例えば、下記が挙げられる。

・配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と比較して、pH4、4.5または5等の低pHおよび40度にて1か月間もしくは2週間、または25度にて3

か月間静置後における、SDS-PAGEによる分子量が40kDa付近のバンドの濃さが低下している。バンドの濃さは目視により評価できる。

・配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と比較して、pH4、4.5または5等の低pHおよび40度にて1か月間もしくは2週間静置後、または25度にて3か月間における、SECにより検出される抗体の分解物に相当するピーク(%)が減少している。該ピーク(%)は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と比較して、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、または90%以上減少していることが好ましい。

・配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と比較して、pH4、4.5または5等の低pHおよび40度にて1か月間もしくは2週間静置後、または25度にて3か月間における、バイオアナライザー電気泳動システム(アジレント・テクノロジー株式会社)およびAgilent Protein230キット(アジレント・テクノロジー株式会社)によるエレクトロフェログラムにおいて、H鎖全長のピークよりも10~20kDa程度小さいサイズに検出される抗体の分解物に相当するバンド(例えば、40~60kDa)のピーク面積率(%)が減少している。該ピーク面積率(%)が、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体よりも、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、または90%以上減少していることが好ましい。

[0070] 本発明の抗体の一態様としては、下記(a1)~(a4)から選ばれる1の置換をさらに含む、前記抗体が挙げられる。

(a1) VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の50番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換、54番目のアミノ酸残基のトリプトファ

ン残基への置換、55番目のアミノ酸残基のヒスチジン残基への置換、57番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および58番目のアミノ酸残基のフェニルアラニン残基への置換から選ばれる少なくとも1の置換、

(a2) VLにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の91番目のアミノ酸残基のメチオニン残基またはロイシン残基への置換、92番目のアミノ酸残基のチロシン残基への置換、94番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、および96番目のアミノ酸残基のアスパラギン残基またはアスパラギン酸残基への置換から選ばれる少なくとも1の置換、

(a3) VLにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の28番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、29番目のアミノ酸残基のバリン残基への置換、31番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および34番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換から選ばれる少なくとも1の置換、並びに

(a4) VLにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の92番目のアミノ酸残基のチロシン残基またはトリプトファン残基への置換、94番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、および96番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換から選ばれる少なくとも1の置換。

[0071] なお、本発明の抗体は、上記(a1)～(a4)それぞれについて、記載されるすべてのアミノ酸残基の置換がなされていることが好ましい。

[0072] 本発明の抗体は、上記(a1)～(a4)から選ばれる1のアミノ酸残基の置換により、抗体のFGF23に対する結合活性およびFGF23中和活性を向上させることができる。FGF23中和活性とは、FGF23が受容体に結合することで生じるシグナルを阻害する活性をいう。FGF23の受容体としては、FGFR1と α Klothoとの複合体が挙げられる。

[0073] 本発明の抗体のFGF23中和活性は、Nature 2006 Dec 7; 444 (7120)に記載されるレポーターアッセイ（プロモーターアッセイともいう）などで確認することができる。また、マウスEgr1遺伝子由来のプロモーターを有するルシフェラーゼ発現ベクターで形質転換さ

れた α K l o t h o安定発現HEK293細胞を用いたレポーターアッセイなどでも本発明の抗体のFGF23中和活性を確認することができる。

[0074] 本発明の抗体の具体的な例としては、下記(b1)～(b5)から選ばれるいずれか1の抗体が挙げられる。

[0075] (b1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体において、VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の50番目のアミノ酸残基がロイシン残基に、54番目のアミノ酸残基がトリプトファン残基に、55番目のアミノ酸残基がヒスチジン残基に、57番目のアミノ酸残基がトレオニン残基に、58番目のアミノ酸残基がフェニルアラニン残基に、および100番目のアミノ酸残基がアラニン残基またはチロシン残基に置換された抗体、

[0076] (b2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体において、VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基がアラニン残基またはチロシン残基に、およびVLにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の91番目のアミノ酸残基がメチオニン残基に、92番目のアミノ酸残基がチロシン残基に、94番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基に、および96番目のアミノ酸残基がアスパラギン残基に置換された抗体、

[0077] (b3) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体において、VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基がアラニン残基またはチロシン残基に、およびVLにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の28番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基に、29番目のアミノ酸残基がバリン残基に、31番目のアミノ酸残基がトレオニン残基に、および34番目のアミノ酸残基がロイシン残基に置換された抗体、

[0078] (b4) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLを含む抗体において、VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基がアラニン残基ま

たはチロシン残基に、およびV Lにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の91番目のアミノ酸残基がロイシン残基に、92番目のアミノ酸残基がチロシン残基に、94番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基に、および96番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基に置換された抗体、並びに

[0079] (b5) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体において、V Hにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基がアラニン残基またはチロシン残基に、およびV Lにおける配列番号2で表されるアミノ酸配列の92番目のアミノ酸残基がチロシン残基、またはトリプトファン残基に、94番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基に、および96番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基に置換された抗体。

[0080] また、本発明の抗体の具体例としては下記(c1)～(c10)から選ばれる抗体も挙げられ、(c1)、(c8)、(c9)または(c10)が好ましく、(c1)または(c9)がより好ましい。

(c1) 配列番号39で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c2) 配列番号47で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c3) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号44で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c4) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号44で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c5) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号45で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c6) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号45で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c7) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号46で表されるアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体、

(c 8) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む V H および配列番号 4 6 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体、

(c 9) 配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を含む V H および配列番号 5 8 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体、並びに

(c 10) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含む V H および配列番号 5 9 で表されるアミノ酸配列を含む V L を含む抗体。

[0081] 本発明の抗体には、血中半減期の制御を目的として、F c R n への結合性を制御するために、アミノ酸残基を置換した F c 領域なども用いることができる。

[0082] 抗体の F c R n への結合性を向上させるためにアミノ酸残基を置換した F c 領域としては、下記 (d 1) ~ (d 5) のいずれか 1 の F c 領域などが挙げられる。中でも (d 1) の F c 領域が好ましい。

(d 1) E U インデックス 2 5 2 番目のアミノ酸残基のチロシン残基への置換、2 5 4 番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および 2 5 6 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸残基への置換を含む F c 領域、

(d 2) E U インデックス 4 2 8 番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換、および 4 3 4 番目のアミノ酸残基のセリン残基への置換を含む F c 領域、

(d 3) E U インデックス 3 0 8 番目のアミノ酸残基のプロリン残基への置換を含む F c 領域、

(d 4) E U インデックス 2 5 0 番目のアミノ酸残基のグルタミン残基への置換、および 4 2 8 番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換を含む F c 領域、並びに

(d 5) E U インデックス 4 3 4 番目のアミノ酸残基のアラニン残基への置換を含む F c 領域。

[0083] また、本発明において、抗体の F c R n への結合性を向上させるためにアミノ酸残基が置換された F c 領域を含む重鎖定常領域のアミノ酸配列の具体例としては、配列番号 4 8、4 9、5 0、5 1、および 5 2 で表されるアミ

ノ酸配列などが挙げられる。中でも、配列番号48で表されるアミノ酸配列が好ましい。

[0084] 本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片には、本発明のヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、タンパク質または抗体医薬などを化学的または遺伝子工学的に結合させた抗体または該抗体断片の誘導体を包含する。

[0085] 抗体または該抗体断片の誘導体は、本発明のヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片のH鎖若しくはL鎖のN末端側、C末端側、抗体分子中の適当な置換基または側鎖あるいは糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、免疫賦活剤、タンパク質、抗体医薬または核酸医薬などを化学的手法〔抗体工学入門、地人書館（1994）〕により結合させることにより製造することができる。

[0086] また、本発明のヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片をコードするDNAと、結合させたいタンパク質または抗体医薬をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的手法より製造することができる。

[0087] 放射性同位元素としては、例えば、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu または ^{211}At などが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンT法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、例えば、1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）などが挙げられる。

[0088] 低分子の薬剤としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマトラーゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤若しくはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤〔臨床腫瘍学、癌と化学療法社（1996）〕、ハイドロコチゾン若しくはプレドニゾンな

どのステロイド剤、アスピリン若しくはインドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート若しくはペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド若しくはアザチオプリンなどの免疫抑制剤またはマレイン酸クロルフェニラミン若しくはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（１９８２）〕などが挙げられる。

[0089] 抗癌剤としては、例えば、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エピルビシン、ゲムシタビン（ゲムザール）、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキサート、５－フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシー７－エチル－カンプトテシン（SN38）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、メスナ、イリノテカン（CPT-11）、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニボシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、UFT、オキザロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（STI571）、エル

ロチニブ、FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3) 阻害剤、Vascular Endothelial Growth Facotr receptor (VEGFR) 阻害剤、Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) 阻害剤、イレッサ若しくはタルセバなどのEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 阻害剤、ラディシコール、17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オールートランスレチノイン酸、サリドマイド、レナリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D-ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリビン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン（タルグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリツモマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミンまたはメイタンシノイドあるいはその誘導体などが挙げられる。

[0090] 低分子の薬剤と抗体とを結合させる方法としては、例えば、グルタルアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法または水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などが挙げられる。

[0091] 高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（以下、PEGと表記する）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。これらの高分子化合物を抗体またはその抗体断片に結合させることにより、（１）化学的、物

理的若しくは生物的な種々の因子に対する安定性の向上、（２）血中半減期の顕著な延長、または（３）免疫原性の消失若しくは抗体産生の抑制、などの効果が期待される〔バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店（１９９３）〕。

[0092] 例えば、PEGと抗体を結合させる方法としては、PEG化修飾試薬と反応させる方法などが挙げられる〔バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店（１９９３）〕。PEG化修飾試薬としては、リジンの ϵ -アミノ基への修飾剤（日本国特開昭６１－１７８９２６号公報）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤（日本国特開昭５６－２３５８７号公報）、またはアルギニンのグアニジノ基への修飾剤（日本国特開平２－１１７９２０号公報）などが挙げられる。

[0093] 免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、 β （１→３）グルカン（例えば、レンチナンまたはシゾフィラン）または α ガラクトシルセラミド（KRN7000）などが挙げられる。

[0094] タンパク質としては、例えば、NK細胞、マクロファージまたは好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカイン若しくは増殖因子または毒素タンパク質などが挙げられる。

[0095] サイトカインまたは増殖因子としては、例えば、インターフェロン（以下、IFNと記す）- α 、IFN- β 、IFN- γ 、インターロイキン（以下、ILと記す）-２、IL-１２、IL-１５、IL-１８、IL-２１、IL-２３、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）またはマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）などが挙げられる。毒素タンパク質としては、例えば、リシン、ジフテリアトキシンまたはONTAKなどが挙げられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

[0096] 抗体医薬としては、例えば、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原、免疫機能を調節する抗原または病変部

位の血管新生に関与する抗原に対する抗体が挙げられる。

[0097] 抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、例えば、cluster of differentiation (以下、CDと記載する) 19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7. 1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7. 2)、human leukocyte antigen (HLA) -Class IIまたはEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR) などが挙げられる。

[0098] 腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、例えば、CD4、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子 (例えば、CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3またはB7-H4)、B7ファミリー分子のリガンド (例えば、CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1またはBTLA)、OX-40、OX-40リガンド、CD137、tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリー分子 (例えば、DR4、DR5、TNFR1またはTNFR2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL) ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー (例えば、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3またはTRAIL-R4)、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANK)、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体、サイトカイン [例えば、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、transforming growth factor (TGF) β またはTNF α など] 若しくはこれらのサイトカインの受容体、またはケモカイン (例えば、SLC、ELC、I-309、TARC、MDCまたはCTACKなど) 若

しくはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

[0099] 病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、例えば、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)、angiopoietin、Fibroblast Growth Factor (FGF)、EGF、Hepatocyte Growth Factor (HGF)、Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)、Insulin-like Growth Factor (IGF)、erythropoietin (EPO)、TGF β 、IL-8、eprhrinまたはSDF-1若しくはこれらの受容体などが挙げられる。

[0100] 核酸医薬としては、例えば、遺伝子の機能を制御することによって生体に作用するsmall interference ribonucleic acid (siRNA) またはmicroRNAなどの核酸を含む医薬品が挙げられる。例えば、Th17細胞のマスター転写因子ROR γ tを抑制する核酸医薬とのコンジュゲートが考えられる。

[0101] 本発明の抗体または該抗体断片の誘導体をヒトFGF23の検出および測定ならびにヒトFGF23関連疾患の診断に使用する場合に、当該抗体に結合する薬剤としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体が挙げられる。標識体としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ若しくはルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル若しくはロフィンなどの発光物質、またはフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート (RITC) などの蛍光物質などが挙げられる。

[0102] また、本発明の一実施形態は、本発明の抗体または該抗体断片を含む組成物である。組成物の形態としては、ヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有する組成物などが挙げられる。本発明の抗体または該抗体断片を含む組成物は、ヒトFGF23関連疾患の治療に用いることができる。本発明の一実施形態として、本発明の抗体を

含むヒトFGF23関連疾患の治療剤が提供される。

- [0103] また、本発明は、ヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片を投与することを含む、ヒトFGF23関連疾患の治療方法に関する。
- [0104] ヒトFGF23関連疾患としては、ヒトFGF23又はヒトFGF23の受容体が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば、腫瘍性骨軟化症（TIO）、常染色体顕性低リン血症性くる病・骨軟化症（ADHR）、X染色体連鎖性低リン血症（XLH）、fibrous dysplasia、McCune-Albright syndrome、常染色体潜性低リン血症性くる病・骨軟化症（ARHR）、骨粗鬆症、くる病（低リン血症性くる病、ビタミンD抵抗性くる病を含む）、高カルシウム血症、低カルシウム血症、異所性石灰化、骨硬化症、パジェット病、副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能低下症、掻痒、ならびに腎性骨異栄養症、透析骨症、および尿管機能障害等に代表される腎不全や腎不全時人工透析に合併する疾患等が挙げられる。
- [0105] また、本発明は、ヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有する、TIO、ADHR、XLH、fibrous dysplasia、McCune-Albright syndrome及びARHRなどの疾患で見られる低リン血症、骨石灰化不全、骨痛、筋力低下、骨格の変形、成長障害、低1, 25ビタミンD血症などの症状の治療剤も含む。
- [0106] 本発明の抗体または該抗体断片を含む治療剤は、有効成分としての該抗体または該抗体断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが好ましい。
- [0107] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられ、好ましくは静脈内投与を挙げられる。投与形態と

しては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。

[0108] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢および体重などにより異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\text{mg}/\text{kg}$ である。

[0109] 本発明の組成物の一実施形態としては、ヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を含有する、FGF23の検出若しくは測定用試薬が挙げられる。また本発明はヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を用いたFGF23の検出若しくは測定方法に関する。本発明においてヒトFGF23を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法が挙げられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などが挙げられる。

[0110] 免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、例えば、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、酵素免疫測定法（EIAまたはELISA）、蛍光免疫測定法（FIA）、発光免疫測定法（luminescent immunoassay）、ウエスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

[0111] 本発明の組成物の一実施形態としては、ヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体又は該抗体断片を含む、FGF23関連疾患の診断薬が挙げられる。また、ヒトFGF23に結合するモノクローナル抗体又は該抗体断片を用いてFGF23の検出または測定をすることを含む、FGF23関連疾患の診断方法に関する。本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、上記の方法に従いヒトFGF23を検出または測定することにより、ヒトFGF23が関連する疾患を診断することができる。

[0112] 本発明においてヒトFGF23を検出または測定する対象となる生体試料としては、例えば、組織、細胞、血液、血漿、血清、腓液、尿、糞便、組織液または培養液など、ヒトFGF23を含む可能性のあるものであれば特に

限定されない。

[0113] 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を含有する診断薬は、目的の診断方法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩などが挙げられる。検出用試薬としては、該モノクローナル抗体若しくはその抗体断片を認識する標識された二次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬が挙げられる。

[0114] 本発明の一実施形態はF G F 2 3関連疾患の治療薬若しくは診断薬の製造のための、抗ヒトF G F 2 3モノクローナル抗体または該抗体断片の使用に関する。また、本発明の一実施形態はF G F 2 3関連疾患の治療方法または診断方法に関する。

[0115] 以下に、本発明の抗体の製造方法、疾患の治療方法、および疾患の診断方法について、具体的に説明する。

[0116] 1. 抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

抗原となるヒトF G F 2 3は、ヒトF G F 2 3全長またはその部分長をコードするc D N Aを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞または動物細胞などに導入することで得ることができる。また、ヒトF G F 2 3は、ヒトF G F 2 3を多量に発現している各種ヒト細胞株、ヒト細胞およびヒト組織などからヒトF G F 2 3を精製することによっても得ることができる。また、これらヒト細胞株、ヒト細胞およびヒト組織などをそのまま抗原として使用することもできる。さらに、F m o c法またはt B o c法などの化学合成法によりヒトF G F 2 3の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。ヒトF G F 2 3またはヒトF G F 2 3の部分配列を有する合成ペプチドには、C末端またはN末端にF L A GまたはH i sなどの公知のタグが付加されていてもよい。

[0117] 本発明で用いられるヒトF G F 2 3は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やC

urrent Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該ヒト F G F 2 3 をコードする D N A を宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

- [0118] まず、ヒト F G F 2 3 をコードする部分を含む完全長 c D N A を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長 c D N A の代わりに、完全長 c D N A をもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さの D N A 断片を用いてもよい。次に、得られた該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。
- [0119] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製または染色体中への組込みが可能で、ポリペプチドをコードする D N A を転写できる位置に、適当なプロモーターを含有しているものであればいずれも用いることができる。宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵母、昆虫細胞または動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。
- [0120] 大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、ヒト F G F 2 3 をコードする部分を含む D N A、および転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでもよい。
- [0121] 該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガールノ配列（S D 配列ともいう）と開始コドンとの間を適当な距離（例えば 6 ～ 1 8 塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。
- [0122] また、該ヒト F G F 2 3 をコードする D N A の塩基配列としては、宿主内

での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするヒト FGF 23 の生産率を向上させることができる。

[0123] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（以上、ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、pKK233-2（ファルマシア社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-8（キアゲン社製）、pKYP10（日本国特開昭58-110600号公報）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript IISK（-）（ストラタジー社製）、pTrs30 [大腸菌JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [大腸菌JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [大腸菌IGHA2 (FERM BP-400) より調製、日本国特開昭60-221091号公報]、pGKA2 [大腸菌IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、日本国特開昭60-221091号公報]、pTerm2（米国特許第4,686,191号明細書、米国特許第4,939,094号明細書、米国特許第160,735号明細書）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX（ファルマシア社製）、pETシステム（ノバジェン社製）またはpME18SFL3などが挙げられる。

[0124] プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーターまたはT7プロモーターなどの、大腸菌またはファージなどに由来するプロモーターが挙げられる。また、例えば、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tlacプロモーター、lacT7プロモーターまたはletIプロモーター

などの人為的に設計改変されたプロモーターなどが挙げられる。

- [0125] 宿主細胞としては、例えば、大腸菌XL1-Blue、大腸菌XL2-Blue、大腸菌DH1、大腸菌MC1000、大腸菌KY3276、大腸菌W1485、大腸菌JM109、大腸菌HB101、大腸菌No. 49、大腸菌W3110、大腸菌NY49または大腸菌DH5 α などが挙げられる。
- [0126] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] が挙げられる。
- [0127] 動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pcDNA1、pCDM8（フナコシ社製）、pAGE107 [日本国特開平3-22979号公報；Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3（日本国特開平2-227075号公報）、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp（インビトロジェン社製）、pcDNA3.1（インビトロジェン社製）、pREP4（インビトロジェン社製）、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93（国際公開第97/10354号）、N5KG1val（米国特許第6,001,358号明細書）、INPEP4（Biogen-IDEC社製）およびトランスポゾンベクター（国際公開第2010/143698号）などが挙げられる。
- [0128] プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）のimmediate early（IE）遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーターまたはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター若しくはエンハンサーが挙げられる。ま

た、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

- [0129] 宿主細胞としては、例えば、ヒト白血病細胞N a m a l w a細胞、サル細胞C O S細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞C H O細胞 [Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129(1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II(pp. 883-900)]、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、d h f rと表記する）が欠損したC H O細胞（C H O / D G 4 4細胞） [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)]、C H O - K 1 (A T C C C C L - 6 1)、D U k X B 1 1 (A T C C C C L - 9 0 9 6)、P r o - 5 (A T C C C C L - 1 7 8 1)、C H O - S (L i f e T e c h n o l o g i e s、C a t # 1 1 6 1 9)、P r o - 3、ラットミエローマ細胞Y B 2 / 3 H L. P 2. G 1 1. 1 6 A g. 2 0（またはY B 2 / 0ともいう）、マウスミエローマ細胞N S O、マウスミエローマ細胞S P 2 / 0 - A g 1 4、シリアンハムスター細胞B H KまたはH B T 5 6 3 7（日本国特開昭63-000299号公報）などが挙げられる。
- [0130] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法（日本国特開平2-227075号公報）またはリポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、などが挙げられる。
- [0131] 以上のようにして得られるヒトF G F 2 3をコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物または動物細胞などの由来の形質転換体を培地中で培養し、培養液中に該ヒトF G F 2 3を生成蓄積させ、該培養液から採取することにより、ヒトF G F 2 3を製造することができる。該形質

転換体を培地中で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0132] 真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖または糖鎖が付加されたヒトFGF23を得ることができる。

[0133] 誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシドなどを、*trp*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを培地に添加してもよい。

[0134] 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] 若しくは *Iscoe's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) 培地またはこれら培地に牛胎児血清 (FBS) などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下などの条件下で1~7日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシンまたはペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

[0135] ヒトFGF23をコードする遺伝子の発現方法としては、例えば、直接発現以外に、分泌生産または融合タンパク質発現などの方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] が挙げられる。

[0136] ヒトFGF23の生産方法としては、例えば、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法が挙げられ、使用する宿主細胞または生産させるヒトFGF23の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

- [0137] ヒト FGF 23 が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポーソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、日本国特開平 05-336963 号公報または国際公開第 94/23021 号などに記載の方法を用いることにより、ヒト FGF 23 を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系（日本国特開平 2-227075 号公報）を利用してヒト FGF 23 の生産量を上昇させることもできる。
- [0138] 得られたヒト FGF 23 は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。ヒト FGF 23 が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザーまたはダイノミルなどを用いて細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学社製）などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（ファルマシア社製）などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、または等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独または組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。
- [0139] ヒト FGF 23 が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該ヒト FGF 23 の不溶体を回収する。回収した該ヒト FGF 23 の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該ヒト FGF 23 を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法に

よりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

[0140] ヒト FGF 23 またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該ヒト FGF 23 またはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

[0141] また、本発明において用いられるヒト FGF 23 は、Fmoc 法または tBoc 法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンストケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジーインストルメント社製、シンセセルーベガ社製、パーセプチブ社製または島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[0142] (2) 動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

3～20週令のマウス、ラットまたはハムスターなどの動物に、(1)で得られる抗原を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、マウス FGF 23 ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

[0143] 免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、例えば、フロインドの完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA（ウシ血清アルブミン）またはKLH（Keyhole Limpet hemocyanin）などのキャリアタンパク質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

[0144] 抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間おきに5～10回行う。各投与後3～7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

[0145] 抗原の最終投与後3～7日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

[0146] (3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を用い、例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1) [European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)] またはP3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] などが用いられる。

[0147] 該骨髓腫細胞は、正常培地(グルタミン、2-メルカプトエタノール、ジエンタマイシン、FBS、および8-アザグアニンを加えたRPMI1640培地)で継代し、細胞融合の3～4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

[0148] (4) 細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

(2)で得られる融合用抗体産生細胞と(3)で得られる骨髓腫細胞をMinimum Essential Medium(MEM)培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髓腫細胞=5～10：1になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール1000(PEG-1000)、MEM培地およびジメチルスルホキシドの混液を37℃で、攪拌しながら加える。さらに1～2分間毎にMEM培地1～2mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにする。遠心分離後、上清を除く。沈澱した細胞群をゆるやかにほぐ

した後、融合用抗体産生細胞にHAT培地〔ヒポキサンチン、チミジン、およびアミノプテリンを加えた正常培地〕中にゆるやかに細胞を懸濁する。この懸濁液を5%CO₂インキュベーター中、37℃にて7～14日間培養する。

[0149] 培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のバインディングアッセイなどのハイブリドーマの選択方法により、ヒトFGF23を含む抗原に反応し、ヒトFGF23を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを行い、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

[0150] (5) 精製モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristan) 0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(4)で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。10～21日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、40～50%硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、DEAEセファロースカラム、プロテインAカラムまたはゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgGまたはIgM画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

[0151] また、(4)で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、10%FBSを添加したRPMI 1640培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Hybridoma SFM培地に懸濁し、3～7日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテインAカラムまたはプロテインGカラムによる精製を行ない、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Hybridoma SFM培地には5%ダイゴGF21を添加することもできる。

[0152] 抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。タンパク質量の定量は、ローリー法または280nm

での吸光度より算出する。

[0153] (6) モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示すように、E L I S Aを用いて、ヒト F G F 2 3 への抗体の結合性を測定することなどにより行う。

[0154] ヒト F G F 2 3 を 9 6 ウェルプレートなどのプレートに分注した後、第 1 抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清又は精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。次に、当該プレートを P B S など、よく洗浄した後、第 2 抗体として酵素試薬などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。その後、当該プレートを P B S などよく洗浄した後、基質を添加してプレートリーダーで各ウェルの吸光係数を測定することにより、ヒト F G F 2 3 に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

[0155] 2. 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体、およびヒト化抗体の作製方法を示す。遺伝子組換えのマウス抗体、ラット抗体およびラビット抗体なども同様の方法で作製することができる。

[0156] (1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体の C H および C L をコードする D N A が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の C H および C L をコードする D N A をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

[0157] ヒト抗体の C 領域は任意のヒト抗体の C H および C L を用いることができる。例えば、ヒト抗体の $\gamma 1$ サブクラスの C H および κ クラスの C L などを用いる。ヒト抗体の C H および C L をコードする D N A には、c D N A を用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体 D N A を用いることもできる。動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、p A G E 1 0 7 [Cytotechnol., 3, 133 (1990)]、p A G E 1 0 3 [J. B

iochem., 101, 1307 (1987)]、p H S G 2 7 4 [Gene, 27, 223 (1984)]、p K C R [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、p S G 1 b d 2 - 4 [Cytotechnol., 4, 173 (1990)] または p S E 1 U K 1 S e d 1 - 3 [Cytotechnol., 13, 79 (1993)] などを用いる。動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーには、S V 4 0 の初期プロモーター [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルス L T R [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)] または免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] などが挙げられる。

[0158] 遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体 H 鎖および L 鎖が同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）の遺伝子組換え抗体発現用ベクター [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)] を用いるが、抗体 H 鎖および L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプを用いることもできる。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、p K A N T E X 9 3（国際公開第 9 7 / 1 0 3 5 4 号）、p E E 1 8 [Hybridoma, 17, 559 (1998)] などを用いる。

[0159] (2) ヒト以外の動物由来の抗体の V 領域をコードする c D N A の取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体の V H 及び V L をコードする c D N A の取得およびアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。

[0160] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞より m R N A を抽出し、c D N A を合成する。合成した c D N A をファージまたはプラスミドなどのベクターにクローニングして c D N A ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体の C 領域部分または V 領域部分をコードする D N A をプローブとして用い、V H 若しくは V L をコードする c D N A を有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージまたは組

換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVHまたはVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVHまたはVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

- [0161] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスターまたはラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。
- [0162] ハイブリドーマ細胞からの全RNAの調製には、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、またはRNA easy kit (キアゲン社製)などのキットなどを用いる。
- [0163] 全RNAからのmRNAの調製には、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]、またはOligo-dT 30<Super>mRNA Purification (登録商標) Kit (タカラバイオ社製)などのキットなどを用いる。また、Fast Track mRNA Isolation (登録商標) Kit (インビトロジェン社製)、またはQuickPrep mRNA Purification (登録商標) Kit (ファルマシア社製)などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からmRNAを調製することもできる。
- [0164] cDNAの合成およびcDNAライブラリーの作製には、公知の方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)]、またはSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (インビトロジェン社製)若しくはZAP-cDNA Synthesis (登録商標) Kit (ストラジーン社製)などのキットなどを用いる。

- [0165] cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターには、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λZAP II (Stratagene社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Lambda Blue Mid (クローンテック社製)、λExCell、pT7T3-18U (ファルマシア社製)、pCD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] または pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] などを用いる。
- [0166] ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌には、該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] または JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] などを用いる。
- [0167] cDNAライブラリーからの非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAクローンの選択には、アイソトープ若しくは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、またはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] などを用いる。
- [0168] また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction法 [以下、PCR法と表記する、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley &

Sons (1987-1997)] を行うことよりVHまたはVLをコードするcDNAを調製することもできる。

- [0169] 選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBlue-script SK(−) (ストラタジーン社製)などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該cDNAの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] などの反応を行った後、ABI PRISM 3700 (PEバイオシステムズ社製)またはA. L. F. DNAシーケンサー (ファルマシア社製)などの塩基配列自動分析装置などを用いる。
- [0170] 決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することによって見出すことができる。
- [0171] また、得られたVHおよびVLの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、SWISS-PROTまたはPIR-Proteinなどの任意のデータベースに対してBLAST法 [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]などの相同性検索を行い、VHおよびVLの完全なアミノ酸配列が新規なものかを確認できる。

[0172] (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターまたはヒト型キメラ抗体改変体発現ベクターの構築

(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、それぞれ非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

[0173] 非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAの3'末端側と、ヒト抗体のCHまたはCLの5'末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したVHおよびVLのcDNAを作製する。作製されたVHおよびVLのcDNAを、(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

[0174] また、非ヒト抗体VHまたはVLをコードするcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法によりそれぞれ増幅し、(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

[0175] (4) ヒト化抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。

[0176] 非ヒト抗体のVHまたはVLのCDRのアミノ酸配列を移植するための、ヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するFRのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のFRのアミノ酸配列、またはヒト抗体のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (199

1)] などを用いる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも60%以上）のFRのアミノ酸配列を選択する。

[0177] 次に、選択したヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列に、もとの抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] を考慮してDNA配列に変換し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列をそれぞれ設計する。

[0178] 設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR反応を行う。この場合、PCR反応での反応効率及び合成可能なDNAの長さから、好ましくはVH、VL各々について各6本の合成DNAを設計する。さらに、両端に位置する合成DNAの5'または3'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAを、(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0179] PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK(−) (ストラタジーン社製)などのプラスミドにそれぞれクローニングし、(2)に記載の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

[0180] または、設計したDNA配列に基づき、VH全長およびVL全長を各々1本の長鎖DNAとして合成したものを、上記PCR増幅産物に代えて用いることもできる。さらに、合成長鎖DNAの両端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAを、(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターへ容易にクローニングすることができる。

[0181] (5) ヒト化抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。ヒト化抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

[0182] 抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を同定するために、X線結晶解析[J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)]またはコンピューターモデリング[Protein Engineering, 7, 1501 (1994)]などを用いることにより、抗体の立体構造の構築および解析を行うことができる。また、それぞれの抗体について数種の改変抗体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有するヒト化抗体を取得できる。

[0183] ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて(4)に記載のPCR反応を行うことにより、改変させることができる。PCR反応後の増幅産物について(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

[0184] (6) ヒト化抗体発現ベクターの構築

(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

[0185] 例えば、(4)および(5)で得られるヒト化抗体のVHまたはVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5' また

は3'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

[0186] また、上述キメラ抗体、ヒト化抗体などの遺伝子組換え抗体を作製する場合に、異なる2種類の抗体由来のH鎖（またはVH）とL鎖（またはVL）とを組み換えた抗体発現用ベクターを作製することで、VL置換キメラ抗体発現用ベクターを構築することができる。

[0187] (7) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

(3) および(6)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類のキメラ抗体、ヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

[0188] 発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばCOS-7細胞 [American Type Culture Collection(ATCC)番号:CRL1651] を用いる [Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991)]。

[0189] COS-7細胞への発現ベクターの導入には、DEAE-デキストラン法 [Methods in Nucleic Acids Res., CRC press (1991)]、またはリポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] などを用いる。

[0190] 発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などを用いて測定する。

[0191] (8) 遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製

(3) および(6)で得られた遺伝子組換え抗体発現用ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法〔日本国特開平2-257891号公報、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕などを用いる。

[0192] 遺伝子組換え抗体発現用ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DUKXB11 (ATCC CCL-9096)、Pro-5 (ATCC CCL-1781)、CHO-S (Life Technologies、Cat #11619)、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC番号:CRL1662、またはYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞NS0、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14 (ATCC番号:CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞 (ATCC番号:CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (Dihydrofolate Reductase、以下、dhfrと表記する) が欠損したCHO細胞 (CHO/DG44細胞) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)] などを用いる。

[0193] また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素などのタンパク質、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素などのタンパク質若しくは細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与するタンパク質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、例えば α 1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞 (国際公開第2005/035586号、国際公開第02/31140号)、レクチン耐性を獲得したLec13 [Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)] などを用いることもできる。

- [0194] 発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、G 4 1 8 硫酸塩（以下、G 4 1 8 と表記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平 2 - 2 5 7 8 9 1 号公報）。
- [0195] 動物細胞培養用培地には、R P M I 1 6 4 0 培地（インビトロジェン社製）、G I T 培地（日本製薬社製）、E X - C E L L 3 0 1 培地（ジェイアールエイチ社製）、I M D M 培地（インビトロジェン社製）若しくは H y b r i d o m a S F M 培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地に F B S などの各種添加物を添加した培地などを用いる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性は E L I S A 法などにより測定できる。また、d h f r 遺伝子増幅系（日本国特開平 2 - 2 5 7 8 9 1 号公報）などを利用して、形質転換株の産生する遺伝子組換え抗体の発現量を向上させることができる。
- [0196] 遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A - カラムを用いて精製する [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過などのタンパク質の精製で用いられる方法を組み合わせることもできる。
- [0197] 精製した遺伝子組換え抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 [Nature, 227, 680 (1970)]、またはウェスタンブロッティング法 [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] など用いて測定することができる。
- [0198] 3. 精製モノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価
精製した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価は、

以下のように行うことができる。

- [0199] 本発明の抗体または該抗体断片のヒト F G F 2 3 に対する結合活性は、E L I S A 法または表面プラズモン共鳴法などを用いて測定できる。
- [0200] 本発明の抗体または該抗体断片のヒト F G F 2 3 中和活性は、上記のレポーターアッセイなどを用いて測定することができる。
- [0201] 4. 本発明の抗ヒト F G F 2 3 モノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の治療方法
- 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、ヒト F G F 2 3 が関連する疾患の治療に用いることができる。
- [0202] 本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体または該抗体断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される 1 以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。
- [0203] 投与経路としては、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。
- [0204] 経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などが挙げられる。
- [0205] 乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール若しくは果糖などの糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油若しくは大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。
- [0206] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若しくはマンニトールなどの賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルクなどの滑沢剤、ポ

リビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

[0207] 非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤または噴霧剤などである。注射剤は、塩溶液若しくはブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造する。

[0208] 噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖またはグリセリンなどを用いる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適切な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0209] 5. 本発明の抗ヒトFGF23モノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、ヒトFGF23を検出または測定することにより、ヒトFGF23関連疾患を診断することができる。

[0210] ヒトFGF23関連疾患の診断は、例えば患者体内に存在するヒトFGF23を免疫学的手法により検出または測定して行うことができる。

[0211] 免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射性物質標識免疫抗体法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などを用いる。

[0212] 放射性物質標識免疫抗体法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または該抗体断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

[0213] 酵素免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに酵素などで標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、基質を添加して反応液の吸光度を吸光度計で測定する。例えばサンドイッチELISA法などを用いる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知〔酵素免疫測定法、医学書院（1987）〕の酵素標識を用いることができる。

[0214] 例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識またはビオチン標識などを用いる。サンドイッチELISA法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該ELISA法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、第1の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、96ウェルプレート）に吸着させ、次に第2の抗体または抗体断片をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素またはビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破碎液、組織またはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水または眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作成した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab' またはF(ab)₂などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチELISA法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片との組み合わせでもよい。

[0215] 蛍光免疫測定法は、文献〔Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル

、講談社サイエンティフィック（1987）]などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知[蛍光抗体法、ソフトサイエンス社（1983）]の蛍光標識を用いることができる。例えば、FITCまたはRITCなどを用いる。

[0216] 発光免疫測定法は文献[生物発光と化学発光 臨床検査42、廣川書店（1998）]などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識が挙げられ、アクリジニウムエステルまたはロフィンなどを用いる。

[0217] ウエスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）-PAGE（ポリアクリルアミドゲル）[Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。

[0218] 物理化学的手法は、例えば、抗原であるヒトFGF23と本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法として、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法またはラテックス免疫比濁法[臨床検査法提要、金原出版（1998）]などを用いることもできる。ラテックス免疫比濁法は、抗体または抗原を感作させた粒径0.1～1μm程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原または抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度または積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

[0219] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例

[0220] [実施例 1] A 抗体の分解物の検出

国際公開第 2008/099969 号に記載される抗ヒト FGF23 抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列を配列番号 1、軽鎖可変領域アミノ酸配列を配列番号 2 に記載する。以下、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含む VH および配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む VL を含むヒト IgG1 抗体を A 抗体と記載する。

[0221] A 抗体を実施例 2 と同様の方法で作製し、当該抗体溶液の溶媒を、10 mM Sodium L-glutamate、262 mM D-Sorbitol、および 0.05 mg/mL Polysorbate 80 を含む、pH 4 の溶媒に置換した。得られた抗体溶液を、40 度で 1 ヶ月間静置（以下、40 度 1 M 検体と記載する）または -80 度で 1 ヶ月間静置した後解凍した（以下、イニシャル検体と記載する）。

[0222] その後、40 度 1 M 検体およびイニシャル検体を用いて SEC 分析と還元条件での SDS-PAGE を行った。SEC 分析の結果、イニシャル検体においては、抗体の分解物に相当するピークが約 3% 程度を示した一方、40 度 1 M 検体は 9.32% を示した。

[0223] また、SDS-PAGE の結果、イニシャル検体に比べ、40 度 1 M 検体では、50 kDa 付近の H 鎖よりも約 10 kDa 小さいサイズに位置するバンド（バンド A）が顕著に濃くなっており、それと相関して H 鎖のバンドが薄くなっていた。したがって、バンド A は H 鎖の分解物のバンドであり、40 度 1 M 検体は H 鎖で分解されることが示唆された。バンド A について、N 末端アミノ酸配列を分析した結果、A 抗体の重鎖可変領域の 99 番目の D と 100 番目の I で切断されていることが確認できた。

[0224] [実施例 2] I100 改変抗体の作製

A 抗体について、VH における配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 100 番目のアミノ酸残基である I を、表 1 に記載するアミノ酸残基と置換した抗体を以下に記載する方法で作製した。以下、表 1 に記載の抗体の一部また

は全部を、I 1 0 0 改変抗体とも記載する。

[0225] [表1]

抗体の名称	I 1 0 0 と置換したアミノ酸	重鎖可変領域のアミノ酸配列
I 1 0 0 A	A	配列番号 3
I 1 0 0 L	L	配列番号 4
I 1 0 0 V	V	配列番号 5
I 1 0 0 Y	Y	配列番号 6
I 1 0 0 W	W	配列番号 7
I 1 0 0 T	T	配列番号 8
I 1 0 0 S	S	配列番号 9
I 1 0 0 R	R	配列番号 10
I 1 0 0 Q	Q	配列番号 11
I 1 0 0 N	N	配列番号 12
I 1 0 0 M	M	配列番号 13
I 1 0 0 K	K	配列番号 14
I 1 0 0 H	H	配列番号 15
I 1 0 0 G	G	配列番号 16
I 1 0 0 F	F	配列番号 17
I 1 0 0 E	E	配列番号 18
I 1 0 0 D	D	配列番号 19

[0226] 表 1 に記載する各抗体の V H のアミノ酸配列をコードする塩基配列に対応する遺伝子断片を、シームレスクローニング法（ファスマック社に委託）を用いて発現ベクターに導入して必要なプラスミドを作製した。H 鎖発現ベクターとしてはシグナル配列およびヒト γ 鎖定常領域配列を有した p C I - O t C A G _ h G 1 ベクターを用いた。いずれのクローンも、H 鎖定常領域はヒト I g G 1 を使用した。

[0227] また、I 1 0 0 改変抗体の V L のアミノ酸配列は、いずれも A 抗体の V L のアミノ酸配列（配列番号 2）を使用した。L 鎖発現ベクターとしてはシグナル配列およびヒト κ 鎖定常領域配列を有した p C I - O t C M V _ h K ベクターを用いた。完成したプラスミドは、Q I A G E N P l a s m i d M a x i K i t（Q I A G E N 社）を用いて大量調製した。

[0228] 次に、各抗体を E x p i 2 9 3 E x p r e s s i o n S y s t e m

Kit (Life Technologies社) を使用して一過性に発現させた。プラスミドの導入の方法は添付書類に従った。L鎖発現ベクターとH鎖発現ベクターは、1 : 2の比率で混合して導入した。プラスミド導入後の細胞を、37度、5% CO₂、125 rpmの条件下で、3日間培養した。その後、細胞培養懸濁液の遠心分離を行い、0.2 μmフィルター (Thermo Scientific社) を通して培養上清を回収した。培養上清からMabSelect SuRe (GE Healthcare社) を用いたアフィニティー精製により、精製抗体を取得した。

[0229] 具体的には、カラムに充填したレジンをPBSで平衡化した後、当該カラムに培養上清を添加し、PBSで2回洗浄し、Washバッファー1 (PBS with 1M NaCl)、Washバッファー2 (20mM クエン酸、50mM NaCl, pH5.0) で各1回洗浄後、溶出バッファー (20mM クエン酸、50mM NaCl, pH3.4) を用いて抗体を溶出した。

[0230] 得られた抗体溶液に中和バッファー (1M リン酸-NaOH, pH7.0) を1/10量加えて中和し、NAP25 (GE Healthcare社) を用いて抗体溶液の溶媒をPBSに置換した。バッファー置換後の抗体溶液について、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (ミリポア社) を用いて限外濾過による濃縮を行い、Nanodrop (Thermo Scientific社) を使用して吸光度A₂₈₀を測定し、抗体溶液の濃度の測定と調整を行った。吸光係数は、C. N. Paceらの方法に従って (1995, Prot. Sci. 4:2411-2423) それぞれのヒト化抗体のアミノ酸配列から算出した。

[0231] [実施例3] I100改変抗体の抗原結合活性評価

実施例2で得られたI100改変抗体とA抗体について、Recombinant Human FGF-23 (R&D Systems社、Cat No. 2604-FG-025/CF) に対する結合活性を以下のように測定した。

[0232] Human Antibody Capture Kit (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社、Cat. No. BR-1008-39) を用いて、添付のプロトコルに従い、Anti-human IgG antibody を CM5 センサーチップ (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社、Cat. No. BR100530) に固定化した。

[0233] Anti-human IgG antibody を固定化したフローセルに、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ に調製した抗体を $10\text{ }\mu\text{L/分}$ の流速で 30 秒間添加した。

[0234] 次に、 130.5 ng/mL より 2 倍希釈で段階的に 5 濃度に調製した Recombinant Human FGF-23 を $30\text{ }\mu\text{L/分}$ の流速で、結合反応を 2 分間、解離反応を 10 分間モニターした。測定は、シングルサイクル法を用いた。取得したセンサーグラムは、Bia Evaluation Software (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社) を用いて解析し、各抗体の速度論定数を算出した。算出された各抗体の結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d) および解離定数 [$k_d/k_a = K_D$] の一部の結果を表 2、表 3 に示す。表 3 の A__1、A__2、A__3 は、いずれも A 抗体をさす。

[0235] [表2]

抗体名	k_a	k_d	K_D (M)
A	9.12×10^7	4.11×10^{-4}	4.51×10^{-12}
I100A	4.60×10^7	6.46×10^{-4}	1.40×10^{-11}
I100L	1.95×10^7	2.46×10^{-4}	1.26×10^{-11}
I100V	1.07×10^8	5.04×10^{-4}	4.73×10^{-12}

[0236]

[表3]

抗体名	ka	kd	KD (M)
A_1	5.29E+07	1.09E-04	2.06E-12
A_2	4.21E+07	1.10E-04	2.60E-12
A_3	4.20E+07	1.58E-04	3.76E-12
I100Y	2.24E+07	4.17E-04	1.86E-11
I100A	2.06E+07	5.16E-04	2.51E-11
I100H	6.21E+06	4.17E-04	6.72E-11
I100N	7.78E+06	7.27E-04	9.34E-11
I100G	8.70E+06	1.29E-03	1.49E-10
I100D	1.15E+07	2.51E-03	2.19E-10
I100R	9.89E+05	2.19E-04	2.22E-10

[0237] 表2、表3より、I100A抗体およびI100Y抗体を含むほぼ全てのI100改変抗体で、A抗体よりも抗原結合活性が低下していることが確認できた。

[0238] また、I100W、I100S、I100KおよびI100E抗体では、A抗体より抗原結合活性が低下していること、およびI100T、I100Q、I100MおよびI100F抗体は、A抗体と同程度の抗原結合活性を有することも確認できた。

[0239] [実施例4] I100改変抗体の分解抑制効果の確認

実施例2で得られたI100改変抗体およびA抗体について、NAP25 (GE Healthcare社)を用いて抗体溶液の溶媒を10mM SodiumL-glutamateおよび262mM D-Sorbitolを含むpH4の溶媒に置換した。得られた抗体溶液を、40度で1ヶ月間または2週間静置した後、還元条件下でSDS-PAGEを行った。各抗体とA抗体とで、抗体の分解物に相当する40kDa付近のバンドの濃さを比較した結果を表4に示す。A抗体と比較して、改変抗体で当該バンドの濃さが低下している場合に、A抗体と比較して、改変抗体で分解が抑制されたと判断した。

[0240] 表4の分解抑制効果の欄に記載される数値は、以下のように設定した。A

抗体よりも分解が抑制されていた抗体を 1、A 抗体と同程度分解された抗体を 2、A 抗体よりも分解が促進された抗体を 3 と記載した。

[0241] [表4]

抗体名	分解抑制効果
I100A	1
I100L	2
I100V	2
I100Y	1
I100W	1
I100T	2
I100S	2
I100R	1
I100Q	3
I100N	1
I100M	1
I100K	2
I100H	1
I100G	1
I100F	2
I100E	2
I100D	1

[0242] 表4に示すように、I100A、I100Y、I100W、I100R、I100N、I100M、I100H、I100G、およびI100Dは、A抗体よりも分解が抑制された。I100L、I100V、I100T、I100S、I100K、I100F、およびI100Eは、A抗体と同程度分解された。また、I100Qは、A抗体よりも分解が促進された。

[0243] [実施例5] A抗体およびI100改変抗体の熱安定性評価

A抗体およびI100改変抗体の各抗体ドメイン（Fab、CH2、CH3）の熱安定性を、示差走査熱量測定（Differential scanning calorimetry、以下DSCと記載する）の手法で評価した。

[0244] 測定サンプルは、D-PBSバッファーにて0.5mg/mLの濃度に調

製した。測定には、Micro Cal VP-Capillary DSC System（スペクトリス株式会社）を用いた。また、25度から100度まで1分間に1度昇温するプログラムで測定を実施した。得られた結果を表5および表6に示す。

[0245] [表5]

抗体名	Fab (度)	CH2 or Fab+CH2 (度)	CH3 (度)
A	66.8	69.3(CH2)	82.9
I100A		70.0(Fab+CH2)	82.9
I100L	64.3	70.1(CH2)	83.1
I100V	67.3	71.6(CH2)	83.3

[0246] [表6]

抗体名	Fab (度)	CH2 or Fab+CH2 (度)	CH3 (度)
A	66.9	69.9(CH2)	83.0
I100A		70.3(Fab+CH2)	83.1
I100D	65.5	70.0(CH2)	83.4
I100G		70.7(Fab+CH2)	83.4
I100H	69.3	72.3(CH2)	83.3
I100N		71.3(Fab+CH2)	83.3
I100R		74.3(Fab+CH2)	83.4
I100Y	66.8	69.0(CH2)	83.5

[0247] 表5および表6より、I100A、I100G、I100N、およびI100Rは、FabのピークとCH2のピークが重なって検出されており、Fabの熱安定性がA抗体より3～8度向上した。以上より、I100A、I100G、I100N、およびI100Rは、A抗体よりも構造安定性が高まっていることが確認できた。

[0248] [実施例6] D105改変抗体の作製

実施例2と同様の方法で、A抗体の配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHのアミノ酸配列の105番目のDを、表7に示すアミノ酸残基に置

換した抗体（以下、当該抗体の一部、または全部をD 1 0 5 改変抗体とも記載する）を作製した。

[0249] [表7]

抗体の名称	D 1 0 5 と置換したアミノ酸	重鎖可変領域のアミノ酸配列
D 1 0 5 A	A	配列番号 2 0
D 1 0 5 E	E	配列番号 2 1
D 1 0 5 F	F	配列番号 2 2
D 1 0 5 G	G	配列番号 2 3
D 1 0 5 H	H	配列番号 2 4
D 1 0 5 I	I	配列番号 2 5
D 1 0 5 K	K	配列番号 2 6
D 1 0 5 L	L	配列番号 2 7
D 1 0 5 M	M	配列番号 2 8
D 1 0 5 P	P	配列番号 2 9
D 1 0 5 Q	Q	配列番号 3 0
D 1 0 5 R	R	配列番号 3 1
D 1 0 5 V	V	配列番号 3 2
D 1 0 5 W	W	配列番号 3 3
D 1 0 5 Y	Y	配列番号 3 4
D 1 0 5 T	T	配列番号 3 5
D 1 0 5 N	N	配列番号 3 6
D 1 0 5 S	S	配列番号 3 7

[0250] [実施例 7] D 1 0 5 改変抗体の抗原結合活性評価

実施例 6 で得られた D 1 0 5 改変抗体について、R e c o m b i n a n t Human FGF-23（R&D Systems 社、Cat No. 2604-FG-025/CF）に対する結合活性を実施例 3 と同様の方法で測定した。得られた結果を表 8、表 9 に示す。表 8 の A _ 1、A _ 2 はいずれも A 抗体の測定結果である。

[0251]

[表8]

抗体名	ka	kd	KD (M)
A _1	3.72E+07	1.40E-04	3.76E-12
A _2	2.96E+07	1.23E-04	4.15E-12
I100A	2.13E+07	6.17E-04	2.89E-11
D105E	1.29E+07	2.18E-04	1.70E-11
D105F	2.65E+06	4.72E-04	1.78E-10
D105G	4.84E+06	4.72E-04	9.75E-11
D105H	1.19E+06	1.70E-04	1.43E-10
D105I	2.50E+06	1.83E-04	7.34E-11
D105K	1.73E+06	4.53E-04	2.62E-10
D105L	3.39E+06	2.17E-04	6.39E-11
D105M	4.54E+05	3.05E-04	6.71E-10
D105N	2.92E+06	1.34E-04	4.60E-11
D105P	2.51E+06	5.04E-04	2.01E-10
D105Q	1.02E+06	2.57E-04	2.52E-10
D105R	3.81E+05	7.26E-04	1.91E-09
D105S	1.63E+06	1.72E-04	1.06E-10
D105V	1.63E+06	4.30E-04	2.63E-10
D105W	2.01E+06	3.00E-04	1.49E-10
D105Y	3.21E+06	3.27E-04	1.02E-10

[0252] [表9]

抗体名	ka	kd	KD (M)
A	4.82E+07	4.78E-04	9.93E-12
D105A	5.21E+06	5.61E-04	1.08E-10
D105T	3.86E+06	4.28E-04	1.11E-10

[0253] 表8、表9より、D105改変抗体は、いずれもA抗体よりも抗原結合活性が低下していることが確認できた。

[0254] [実施例8] D105改変抗体の分解抑制効果の確認

実施例6で得られたD105改変抗体について、実施例4と同様の方法で、抗体の分解抑制効果を確認した。なお、抗体溶液は、40度で2週間静置した。

[0255] 得られた結果を表10に示す。表10の分解抑制効果の欄に記載される数値は、A抗体よりも分解が抑制された抗体を1、A抗体と同程度分解された抗体を2、A抗体よりも分解が促進された抗体を3と記載した。

[0256] [表10]

抗体名	分解抑制効果
D105E	2
D105F	1
D105G	1
D105H	1
D105I	1
D105K	1
D105L	1
D105M	1
D105N	1
D105P	1
D105Q	1
D105R	1
D105S	1
D105V	1
D105W	1
D105Y	1
D105A	1
D105T	1

[0257] 表10より、D105Eを除くD105改変抗体17種は、A抗体より分解が抑制されていることが確認できた。いずれの抗体も、A抗体よりも、SDS-PAGEで抗体の分解物に相当する約40kDaのバンドの濃さが大幅に低下しており、抗体の分解が大幅に抑制されていることが確認できた。

[0258] [実施例9] I100改変抗体およびD105改変抗体のヒトFGF23に対する中和活性の測定

実施例4及び実施例8でA抗体よりも抗体の分解が抑制されていたI100改変抗体およびD105改変抗体(I100A、I100N、I100G、I100Y、I100R、I100D、I100H、D105A、D105

F、D105G、D105H、D105I、D105K、D105L、D105M、D105P、D105Q、D105R、D105V、D105W、D105Y、D105T、D105N、およびD105S) 24種類について、以下に記載する方法でヒトFGF23に対する中和活性を測定した。

[0259] 中和活性の測定には、マウスEgr1遺伝子由来のプロモーターを有するルシフェラーゼ発現ベクターで形質転換された α Klortho安定発現HEK293細胞(以下、mEgr1/ α KL/HEK293と記載する)を用いたプロモーターアッセイを用いた。mEgr1/ α KL/HEK293は、Nature 2006 Dec 7; 444 (7120)に記載される方法と同様の方法で作製した。

[0260] 当該プロモーターアッセイは、FGF23がmEgr1/ α KL/HEK293上の α Klorthoに結合すると、細胞内にシグナルが流れてルシフェラーゼ遺伝子が発現し、当該ルシフェラーゼの蛍光を検出することができる。FGF23中和抗体の存在により、FGF23が中和されると、当該蛍光強度が減少する。

[0261] 抗体は10mM Sodium L-glutamateおよび262mM D-Sorbitolを含むバッファーにより100 μ g/mlに希釈し、原液とした。mEgr1/ α KL/HEK293の標準培養培地として、DMEM培地(ThermoFisher)に10(vol%)のFetal Bovine Serum(ThermoFisher)、1(vol%)のペニシリン/ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。

[0262] 抗体を上記標準培養培地で1000倍希釈した濃度(100ng/ml)を最高濃度とし、 $\sqrt{10}$ 倍希釈で8段階の希釈系列を用意し、評価に供した。評価は384wellプレートを用いて行った。細胞は2000細胞/well、添加するFGF23濃度は4ng/mlとした。FGF23は、実施例3と同様のものを標準培養培地で希釈して用いた。

[0263] 細胞に各抗体を添加後、24時間培養し、その後FGF23を添加し4時間培養した。ルシフェラーゼの蛍光強度は、Bright-Glo(商標)

Luciferase Assay System (プロメガ) を用い、マルチプレートリーダーEnvision (perkinelmer) で測定した。

[0264] 得られた結果について、FGF23添加時の蛍光強度を100%、非添加時の蛍光強度を0%とし、各抗体添加時の蛍光強度の割合を算出し、そのIC50値 (ng/mL) を表11に示す。

[0265] [表11]

抗体名	IC50 (ng/mL)
A	1.4
D105A	>100
D105F	>100
D105G	33.1
D105H	46.7
D105I	23.7
D105K	45.7
D105L	25.6
D105M	>100
D105N	14.0
D105P	99.2
D105Q	>100
D105R	>100
D105S	27.8
D105T	>100
D105V	>100
D105W	77.9
D105Y	21.6
I100A	5.1
I100D	>100
I100G	>100
I100H	8.9
I100N	26.2
I100R	82.5
I100Y	3.0

[0266] 表11に示すように、いずれの改変抗体も、A抗体よりもFGF23中和

活性が低下していた。

[0267] [実施例 10] A 抗体の重鎖定常領域改変抗体の作製

A 抗体の重鎖定常領域のアミノ酸改変抗体（以下、C H 改変抗体と記載する）を以下に記載する方法で作製した。

[0268] C H 改変抗体は、A 抗体の C H（ヒト I g G 1）を、ヒト I g G 2、I g G 2 A A A S（ヒト I g G 2 の F c について、E U インデックス 234 番目のバリンをアラニンに、237 番目のグリシンをアラニンに、および 331 番目のプロリンをセリンに置換したヒト I g G 2 改変抗体）（Michael, S., et al., J. Immunol., 1997, 159: 3613; J. Immunol. 2000, 164:4178-4184）、もしくは I g G 4 P E _ R 4 0 9 K（ヒト I g G 4 の F c について、E U インデックス 228 番目のセリンをプロリンに、235 番目のロイシンをグルタミン酸に、409 番目のアルギニンのリジンに置換したヒト I g G 4 改変抗体）（国際公開第 2006/033386 号）の C H に置換したアイソタイプ抗体、または A 抗体もしくは A 抗体のアイソタイプ抗体 3 種類のそれぞれの F c 領域に、ヒトおよびサル F c R n への結合活性を向上させることが知られている下記（10-1）～（10-5）の F c アミノ酸改変を加えた合計 23 種類の抗体を作製した。

[0269] 〈F c アミノ酸改変〉

（10-1）E U インデックス 252 番目の M を Y に、254 番目の S を T に、および 256 番目の T を E に置換するアミノ酸改変（J. Biol. Chem. 2006b;281:23514-23524）

（10-2）E U インデックス 250 番目の T を Q に、および 428 番目の N を L に置換するアミノ酸改変（J. Biol. Chem. 2004;279:6213-6216）

（10-3）E U インデックス 434 番目の N を A に置換するアミノ酸改変（J. Immunol. 1997;158:2211-2217）、

（10-4）E U インデックス 308 番目の V を P に置換するアミノ酸改変（Drug. Metab. Dispos. 2012a;40:1545-1555）

（10-5）E U インデックス 428 番目の M を L に、および 434 番目の

NをSに置換するアミノ酸改変 (Nat. Biotechnol. 2010;28:157-159)

[0270] 以下、A抗体のCHをヒトIgG2のCHに置換したCH改変抗体をA__G2抗体と記載する。他のサブクラスに置換したCH改変抗体も同様に記載する。

[0271] 以下、A抗体のFc領域に上記(10-1)～(10-5)のアミノ酸改変を加えたCH改変抗体は、それぞれA__YTE抗体、A__QL抗体、A__A抗体、A__P抗体、A__LS抗体と記載する。また、A__G2抗体、A__G2AAS抗体、およびA__G4PE__R409K抗体に、上記(10-1)～(10-5)のアミノ酸改変を加えたCH改変抗体も同様に記載する。

[0272] 実施例2で作製したA抗体のH鎖の可変領域と定常領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドを、NheIとBamHIで制限酵素処理し、定常領域部分を除いたベクター断片を調製した。当該プラスミド断片をもとにして、ファスマック社にて上記23種類のCH改変抗体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子断片を合成し適当な発現ベクターに導入して必要なプラスミドを作製した。得られたプラスミドを用いて、実施例2と同様の方法で抗体を調製した。

[0273] [実施例11] A抗体、およびA抗体のCH改変抗体のFcRnへの結合活性の測定

実施例2、10で作製したA抗体、およびA抗体のCH改変抗体について、以下に記載する方法で、ヒトおよびサルFcRnへの結合活性をBiacoreで測定した。

[0274] HBS-EP+ (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社、Cat. No. BR-1006-69) に1Mの塩酸 (富士フィルム和光純薬株式会社、Cat. No. 083-01095) を添加して、pH6のHBS-EP+を調整した。各抗体は、NAP25を用いて上記のpH6のHBS-EP+にバッファーを交換した。ヒトFcRnとサルFcRnも、pH6のHBS-EP+を用いて希釈した。実験で用いたヒトFcRnおよびサルFcRnは、以下のように作製した。

- [0275] ヒトFcRn（可溶型分子として発現させるために、ヒトFcRnの全長アミノ酸配列のうち、1～297番目のアミノ酸のみを使用）とそのC末端に6個のヒスチジンを付加したヒトFcRn-His tag（アミノ酸配列：配列番号54）とヒトβ2ミクログロブリン（アミノ酸配列：配列番号55）をコードするDNA配列を哺乳細胞の発現プラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入した。当該プラスミドを用いて、実施例2に示す方法と同様に、Expi293 Expression System Kit（Life Technologies社）を使用して一過性に発現させた。
- [0276] サルFcRn（可溶型分子として発現させるために、サルFcRnの全長アミノ酸配列のうち、1～297番目のアミノ酸のみを使用）とそのC末端に6個のヒスチジンを付加したサルFcRn-His tag（アミノ酸配列：配列番号56）とサルβ2ミクログロブリン（アミノ酸配列：配列番号57）についても、ヒトFcRn-His tagと同様の方法で一過性に発現させた。
- [0277] それぞれの培養上清を取得後、Ni-NTA Agarose（QIAGEN, Cat. No. 30210）を用いて、ヒトとサルFcRnを精製した。精製方法については、Ni-NTA Agaroseのマニュアルに記載されている標準的な手法に従って実施した。
- [0278] Biacoreの測定は、以下の条件で実施した。Tetra His Antibody BSA Free（QIAGEN社）をCM5センサーチップ（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社、Cat. No. BR100530）に固定化した。Tetra His Antibody BSA Freeを固定化したフローセルに、10 μg/mLに調製したヒトFcRn及びサルFcRnを10 μL/分の流速で120秒間添加した。次に、450 μg/mLより3倍希釈で段階的に5濃度に調製した各Fc改変抗体を30 μL/分の流速で、結合反応を2分間、解離反応を5分間モニターした。
- [0279] 測定は、マルチサイクル法で行った。取得したセンサーグラムは、Bia

Evaluation Software（グローバルライフサイエンス
テクノロジーズジャパン株式会社）を用いて解析し、各抗体の解離定数 $[k_d / k_a = K_D]$ を算出した。その結果を表 12、13 に示す。

[0280] [表12]

抗体名	KD (M)	
	h FcRn	cyno FcRn
A	5.05E-07	2.12E-07
A_A	3.08E-07	1.55E-07
A_P	1.83E-07	6.02E-08
A_QL	1.87E-07	Not detected
A_YTE	1.59E-07	1.15E-07
A_G2	6.24E-07	2.33E-07
A_G2_A	2.86E-07	1.33E-07
A_G2_P	2.34E-07	7.82E-08
A_G2_QL	2.02E-07	4.33E-08
A_G2_YTE	1.86E-07	3.91E-08
A_G2AAAS	6.23E-07	2.42E-07
A_G2AAAS_A	2.47E-07	1.29E-07
A_G2AAAS_P	2.20E-07	7.53E-08
A_G2AAAS_QL	2.13E-07	6.90E-08
A_G2AAAS_YTE	1.97E-07	4.79E-08
A_IgG4PE_R409K	9.12E-07	3.24E-07
A_IgG4PE_R409K_A	4.29E-07	1.90E-07
A_IgG4PE_R409K_P	1.92E-07	7.69E-08
A_IgG4PE_R409K_QL	2.65E-07	8.70E-08
A_IgG4PE_R409K_YTE	2.27E-07	1.23E-07

[0281]

[表13]

抗体名	hFcRn への KD (M)
A_LS	1.42E-07
A_G2_LS	3.10E-07
A_G2AAAS_LS	1.59E-07
A_IgG4PE_R409K_LS	1.16E-07

[0282] 表 1 2 および表 1 3 に示すように、A 抗体および A 抗体のアイソタイプ（A 2 _ G 2、A _ G 2 A A A S、および A _ I g G 4 P E _ R 4 0 9 K 抗体）よりも、F c に実施例 1 0（1）～（5）に記載するアミノ酸改変を導入した C H 改変抗体の方が、ヒト F c R n 及びサル F c R n への結合活性が向上していることが確認できた。

[0283] [実施例 1 2] I 1 0 0 および D 1 0 5 改変抗体の C H 改変抗体の作製

実施例 4、及び実施例 8 で A 抗体よりも抗体の分解が抑制されることが確認できた I 1 0 0 および D 1 0 5 改変抗体のうち、D 1 0 5 N、I 1 0 0 A、I 1 0 0 H、及び I 1 0 0 Y 抗体のそれぞれについて、下記（1 2－1）～（1 2－5）のアミノ酸改変を加えた C H 改変抗体を以下に記載する方法で作製した。

[0284]（1 2－1）E U インデックス 2 5 2 番目の M を Y に、2 5 4 番目の S を T に、および 2 5 6 番目の T を E に置換するアミノ酸改変

[0285]（1 2－2）C H をヒト I g G 1 からヒト I g G 2 に置換し、E U インデックス 2 5 2 番目の M を Y に、2 5 4 番目の S を T に、および 2 5 6 番目の T を E に置換するアミノ酸改変

[0286]（1 2－3）C H をヒト I g G 1 からヒト I g G 2 に置換し、E U インデックス 4 2 8 番目の M を L に、4 3 4 番目の N を S に置換するアミノ酸改変

[0287]（1 2－4）C H をヒト I g G 1 からヒト I g G 4 P E _ R 4 0 9 K に置換し、E U インデックス 3 0 8 番目の V を P に置換するアミノ酸改変

[0288]（1 2－5）C H をヒト I g G 1 からヒト I g G 4 P E _ R 4 0 9 K に置換し、E U インデックス 4 2 8 番目の M を L に、および 4 3 4 番目の N を S に

置換するアミノ酸改変

[0289] 以下、D105N抗体において、上記(12-1)～(12-5)のアミノ酸改変を行ったCH改変抗体を、それぞれD105N_YTE、D105N_G2_YTE、D105N_G2_LS、D105N_G4PE_R409K_P、およびD105N_G4PE_R409K_LS抗体と記載する。その他の抗体についても同様の記載をする。

なお、上記(12-1)～(12-5)のアミノ酸改変を行ったCH改変抗体のCHのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52に記載する。

[0290] 実施例10で作製したプラスミドをBstz17IとNheIで制限酵素処理し、可変領域部分を除いたベクター断片を調製した。当該プラスミド断片をもとに、ファスマック社にて、D105N、I100A、I100H、及びI100Y抗体のVHのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子断片を合成し、適当な発現ベクターに導入して必要なプラスミドを作製した。得られたプラスミドを用いて、実施例2と同様の方法で、各抗体を調製した。

[0291] [実施例13] 重鎖定常領域改変抗体のFGF23中和活性の測定

実施例12で調製した20種類のCH改変抗体について、実施例9と同様の方法で、FGF23中和活性を測定した。得られた結果を表14に示す。

[0292]

[表14]

抗体名	IC50 (ng/mL)
A	1.2
D105N_YTE	12.4
D105N_G2_YTE	12.4
D105N_G2_LS	12.4
D105N_IgG4PE_R409K_P	13.3
D105N_IgG4PE_R409K_LS	11.7
I100A_YTE	4
I100A_G2_YTE	5
I100A_G2_LS	2.4
I100A_IgG4PE_R409K_P	5.2
I100A_IgG4PE_R409K_LS	6.6
I100H_YTE	11.3
I100H_G2_YTE	8.9
I100H_G2_LS	13
I100H_IgG4PE_R409K_P	14.4
I100H_IgG4PE_R409K_LS	13.1
I100Y_YTE	5.6
I100Y_G2_YTE	2.9
I100Y_G2_LS	4.4
I100Y_IgG4 PE_R409K_P	4.1
I100Y_IgG4PE_R409K_LS	2.9

[0293] 表 1 4 に示すように、可変領域のアミノ酸配列が同じ抗体は、定常領域のアミノ酸配列が変わっても、同程度の F G F 2 3 中和活性を示した。以上より、各抗体における重鎖定常領域のアミノ酸改変は、抗体の F G F 2 3 中和活性に影響しないことが確認できた。

[0294] [実施例 1 4] 抗原結合活性を向上させる改変抗体の作製

I 1 0 0 A と I 1 0 0 Y 抗体について、表 2 および表 3 に記載する抗原結合活性を向上させるために、A b w i z B i o 社にてファージディスプレイ法を用いたアフィニティマチュレーションを行い、下記（1 4 - 1）～（1 4 - 9）のアミノ酸配列情報を取得した。

[0295] （1 4 - 1）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含む V H において、配列

番号1で表されるアミノ酸配列の51番目のアミノ酸をVに、54番目のアミノ酸をFに、55番目のアミノ酸をWに、57番目のアミノ酸をRに、58番目のアミノ酸をWに、および100番目のアミノ酸をAに置換したVH (H2B11__A、アミノ酸配列：配列番号38)

[0296] (14-2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHにおいて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の50番目のアミノ酸をLに、54番目のアミノ酸をWに、55番目のアミノ酸をHに、57番目のアミノ酸をTに、58番目のアミノ酸をFに、および100番目のアミノ酸をAに置換したVH (J2H2B9__A、アミノ酸配列：配列番号39)

[0297] (14-3) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHにおいて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の50番目のアミノ酸をVに、54番目のアミノ酸をFに、55番目のアミノ酸をCに、57番目のアミノ酸をFに、58番目のアミノ酸をVに、および100番目のアミノ酸をAに置換したVH (J2H2E9__A、アミノ酸配列：配列番号40)

[0298] (14-4) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHにおいて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の51番目のアミノ酸をLに、54番目のアミノ酸をWに、55番目のアミノ酸をTに、57番目のアミノ酸をYに、58番目のアミノ酸をRに、および100番目のアミノ酸をAに置換したVH (2H2E1__A、アミノ酸配列：配列番号41)

[0299] (14-5) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHにおいて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の54番目のアミノ酸をWに、55番目のアミノ酸をVに、57番目のアミノ酸をRに、58番目のアミノ酸をAに、および100番目のアミノ酸をAに置換したVH (2H2E5__A、アミノ酸配列：配列番号42)

[0300] (14-6) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHにおいて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の51番目のアミノ酸をVに、54番目のアミノ酸をYに、55番目のアミノ酸をRに、57番目のアミノ酸をKに、58番目のアミノ酸をWに、および100番目のアミノ酸をYに置換したVH

(2 H 2 E 8 __ Y、アミノ酸配列：配列番号43)

[0301] (14-7) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLにおいて、配列番号2で表されるアミノ酸配列の91番目のアミノ酸をMに、92番目のアミノ酸をYに、94番目のアミノ酸をDに、96番目のアミノ酸をNに置換したVL (L3G12、アミノ酸配列：配列番号44)

[0302] (14-8) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLにおいて、配列番号2で表されるアミノ酸配列の28番目のアミノ酸をDに、29番目のアミノ酸をVに、31番目のアミノ酸をTに、34番目のアミノ酸をLに置換したVL (L1H8、アミノ酸配列：配列番号45)

[0303] (14-9) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むVLにおいて、配列番号2で表されるアミノ酸配列の91番目のアミノ酸をLに、92番目のアミノ酸をYに、94番目のアミノ酸をDに、96番目のアミノ酸をDに置換したVL (2L3H7、アミノ酸配列：配列番号46)

[0304] [実施例15] 改変抗体の調製

実施例14で得られたアミノ酸配列情報および(15-1)に記載するVHのアミノ酸配列を用いて、表15に記載するA-1からA-8の改変抗体を作製した。

[0305] (15-1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むVHにおいて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の50番目のアミノ酸をLに、54番目のアミノ酸をWに、55番目のアミノ酸をHに、57番目のアミノ酸をTに、58番目のアミノ酸をFに、および100番目のアミノ酸をYに置換したVH (J2H2B9 __ Y、アミノ酸配列：配列番号47)

[0306]

[表15]

抗体の名前	VH の配列番号	VL の配列番号	重鎖定常領域の配列番号
A	配列番号 1	配列番号 2	配列番号 53
A-1	配列番号 39	配列番号 2	配列番号 48
A-2	配列番号 47	配列番号 2	配列番号 48
A-3	配列番号 3	配列番号 44	配列番号 48
A-4	配列番号 6	配列番号 44	配列番号 48
A-5	配列番号 3	配列番号 45	配列番号 48
A-6	配列番号 6	配列番号 45	配列番号 48
A-7	配列番号 3	配列番号 46	配列番号 48
A-8	配列番号 6	配列番号 46	配列番号 48

[0307] 実施例 1 2 と同様の方法で、各抗体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドを作製し、実施例 2 と同様の方法で当該プラスミドから抗体を調製した。

[0308] [実施例 1 6] 改変抗体の評価

実施例 1 5 で調製した 8 種類の改変抗体と、コントロールとして A 抗体を用いて、抗原結合活性、F G F 2 3 中和活性、及び熱安定性を評価した。いずれの改変抗体についても、バッファーは D - P B S (ナカライテスク株式会社、C o d e 1 4 2 4 9 - 2 4)、濃度は 0. 5 m g / m L に調整されたサンプルを目的に応じて希釈することで各種測定を行った。

[0309] 1 6 - 1) 改変抗体の抗原結合活性の測定

実施例 3 と同様の方法で、ヒト F G F 2 3 への結合活性を測定した。なお、センサーチップは、CM5 センサーチップに A n t i - h u m a n I g G a n t i b o d y を固定化する代わりに、P r o t e i n A センサーチップ (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社、C a t . N o . 2 9 1 2 7 5 5 5) を用いて実施した。各抗体の結合速度定数 (k_a)、および解離速度定数 (k_d) およびから算出された解離定数 [$k_d / k_a = K_D$] を表 1 6 に示す。

[0310]

[表16]

抗体名	抗原結合活性 KD (M)	FGF23 中和活性 IC50 (ng/mL) () は同じ測定ロットでの A 抗体の値	pI (4 度、PBS)
A-1	8.22E-12	3.5(3.1)	7.84
A-2	8.08E-12	3.4(3.1)	7.87
A-3	8.27E-12	2.7(3.3)	7.72
A-4	8.74E-12	1.9(3.3)	7.73
A-5	3.61E-12	1.9(3.3)	7.31
A-6	1.13E-11	3.6(3.3)	7.35
A-7	1.61E-11	3.2 (3.3)	7.26
A-8	6.70E-12	2.4(3.3)	7.32
A	8.77E-12	3.3	8.19

[0311] 表 16 より、A-1 から A-8 のいずれの抗体も、A 抗体と同程度の抗原結合活性を有することが確認できた。

[0312] 実施例 3 で I 100 A 抗体および I 100 Y 抗体の抗原結合活性は A 抗体よりも低下した。また、A-1 から A-8 のいずれの抗体も、VH の 100 番目のアミノ酸残基は A または Y である。

[0313] 以上より、A 抗体について、VH の 100 番目のアミノ酸残基を A または Y に置換すると、抗体の抗原結合活性が低下するが、A-1 から A-8 抗体が有する更なるアミノ酸残基の置換により、抗体の抗原結合活性が A 抗体と同程度にまで向上することが確認できた。

[0314] 16-2) ヒト FGF23 中和活性の測定

改変抗体について、実施例 9 と同様の方法で、ヒト FGF23 中和活性を測定した。得られた結果を表 16 に示す。表 16 より、いずれの改変抗体も、同一測定ロットでの A 抗体と同程度の FGF23 中和活性を有することが確認できた。

[0315] 実施例 9 では I 100 A 抗体および I 100 Y 抗体の FGF23 中和活性は A 抗体よりも低下した。また、A-1 から A-8 のいずれの抗体も、VH

の100番目のアミノ酸残基はAまたはYである。

[0316] 以上より、A抗体について、VHの100番目のアミノ酸残基のAまたはYに置換すると、抗体のFGF23中和活性が低下するが、A-1からA-8抗体が有する更なるアミノ酸残基の置換により、抗体の中和活性がA抗体と同程度にまで向上することが確認できた。

[0317] 16-3) 等電点の確認

各抗体の等電点は、iCE3 system (Protein Simple社) を使用した。測定の担体として、Pharmalyte 3-10 for IEF (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社、Cat. No. 17-0456-01) を使用し、酸性マーカーとしてpI Marker 5.12 (Protein Simple社、Cat. No. 102224)、塩基性マーカーとしてpI Marker 9.77 (Protein Simple社、Cat. No. 102219) を使用した。測定方法は、標準的なプロトコルに従った。

[0318] 得られた結果を表16に示す。表16より、いずれの改変抗体も、A抗体よりpIが低下していることが確認できた。

[0319] 16-4) 抗体の分解抑制率の確認

実施例4と同様の方法で、A-1抗体からA-8抗体について、分解抑制率を確認した。なお、本実施例においては、各抗体を、40度で2週間静置し、バイオアナライザー電気泳動システム (アジレント・テクノロジー株式会社) とAgilent Protein230キット (アジレント・テクノロジー株式会社、Cat. 5067-1517) を用いて、抗体の分解を確認した。サンプル調製と泳動条件については、キットに付属するプロトコルに従って実験を行った。得られたエレクトロフェログラムにおいて、抗体のH鎖のバンドは63kDa、抗体の分解物に相当するバンドは約55kDaに検出された。当該抗体の分解物に相当するバンドのピーク面積率(%)、およびA抗体に対する各抗体の分解バンドピーク面積率の比(%)を表17と表18に示す。

[0320] [表17]

抗体名	分解バンドピーク面積率 (%)	分解バンドピーク面積率の比 (%)
A	39.2	100
A-1	14.6	37.2
A-2	14.8	37.8
A-3	15	38.3
A-4	7.6	19.4
A-5	26.8	68.4
A-6	7.7	19.6

[0321] [表18]

抗体名	分解バンドピーク面積率 (%)	分解バンドピーク面積率の比 (%)
A	39.4	100
A-7	9.8	24.9
A-8	5.4	13.7

[0322] 表17と表18に示すように、A抗体と比較し、A-1抗体からA-8抗体の全てで分解が抑制されていることが確認できた。

[0323] 16-5) 熱安定性の確認

A抗体、A_YTE抗体、A-1抗体、A-3抗体、A-5抗体、及びA-8抗体の6種の抗体について、実施例5に記載の方法と同様に、熱安定性評価を実施した。得られた結果を、表19に示す。

[0324] [表19]

抗体名	Fab (度)	CH2 or Fab+CH2 (度)	CH3 (度)
A	66.9	69.7(CH2)	82.9
A_YTE	65.7	70.2(CH2)	83.0
A-1		70.1(Fab+CH2)	82.6
A-3		69.4(Fab+CH2)	82.9
A-5	64.6	70.8(CH2)	82.6
A-8	64.2	70.9(CH2)	82.8

[0325] 表 19 に示すように、A 抗体と A_{YTE} 抗体とでは、抗体の各部位の熱安定性に変化がなかった。一方、A_{YTE} 抗体と同じ重鎖定常領域アミノ酸配列を有する A-1 抗体と A-3 抗体では、A 抗体および A_{YTE} 抗体よりも Fab の熱安定性が約 3 度向上していることが確認できた。

[0326] [実施例 17] A-9 抗体、A-10 抗体の作製

表 20 に記載する A-9 抗体および A-10 抗体を実施例 2 と同様の方法で作製した（以下、A-9 抗体、A-10 抗体を改変抗体と記載する場合もある）。

[0327] A-9 抗体の L 鎖発現ベクターは、実施例 2 の pC1 ベクターではなく、pCDNA3.4 ベクター（インピトロジェン）を用いた。また、A-9 抗体、A-10 抗体ともに、L 鎖の発現ベクターと H 鎖の発現ベクターを 1 : 1 の比率で混合して細胞に導入した。

[0328] [表 20]

抗体の名前	VH の配列番号	VL の配列番号	重鎖定常領域の配列番号
A-9	配列番号 3	配列番号 58	配列番号 48
A-10	配列番号 6	配列番号 59	配列番号 48

[0329] A-9 抗体の VL は、I100A 抗体について、Abwiz Bio 社にてファージディスプレイ法を用いたアフィニティマチュレーションを行い、下記のアミノ酸配列情報を取得した。

[0330] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む VL において、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の 92 番目のアミノ酸を W に、94 番目のアミノ酸を D に、96 番目のアミノ酸を D に置換した VL（アミノ酸配列：配列番号 58）

[0331] A-10 抗体の VL は、下記の VL を設計し、用いた。

[0332] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む VL において、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の 92 番目のアミノ酸を Y に、94 番目のアミノ酸を D に、96 番目のアミノ酸を D に置換した VL（アミノ酸配列：配列番号 59）

[0333] [実施例 18] 改変抗体の評価

実施例 17 で調製した 2 種類の改変抗体と、コントロールとして A 抗体を用いて、抗原結合活性、FGF23 中和活性、及び熱安定性を評価した。いずれの改変抗体についても、バッファーは D-PBS（ナカライテスク株式会社、Code 14249-24）、濃度は 1 mg/mL に調整されたサンプルを目的に応じて希釈することで各種測定を行った。

[0334] (18-1) 改変抗体の抗原結合活性の測定

実施例 16 と同様の方法で、ヒト FGF23 への結合活性を測定した。各抗体の結合速度定数 (ka)、および解離速度定数 (kd) およびから算出された解離定数 [kd1/ka1=KD] を表 21 に示す。

[0335] [表21]

抗体名	抗原結合活性 KD (M)	FGF23 中和活性 IC50 (ng/mL) () は同じ測定ロットでの A 抗体の値	pI (4 度、PBS)
A-9	6.87E-12	1.0(3.2)	7.69
A-10	2.02E-11	1.5(2.8)	7.53
A	1.44E-11	3.2	8.19

[0336] 表 21 より、A-9 抗体は A 抗体の 2 倍、A-10 抗体は A 抗体と同程度の抗原結合活性を有することが確認できた。実施例 3 では、I100A 抗体および I100Y 抗体で A 抗体よりも抗原結合活性が低下した。また、A-9 抗体および A-10 抗体は、VH の 100 番目のアミノ酸残基がそれぞれ A および Y である。

以上より、A 抗体の VH の 100 番目のアミノ酸残基を A または Y に置換すると、抗体の抗原結合活性が低下するが、A-9 抗体および I100Y 抗体が有する更なるアミノ酸残基の置換により、抗体の結合活性が A 抗体と同等以上に向上することが確認できた。

[0337] (18-2) ヒト FGF23 中和活性の測定

改変抗体について、実施例 9 と同様の方法で、ヒト FGF23 中和活性を測定した。得られた結果を表 21 に示す。表 21 より、A-9 抗体は A 抗体

の3倍、A-10抗体はA抗体の2倍強いFGF23中和活性を有することが確認できた。

[0338] 実施例9では、I100AやI100YはA抗体よりも中和活性が低下した。また、A-9抗体およびA-10抗体は、VHの100番目のアミノ酸残基がそれぞれAおよびYである。

[0339] 以上より、A抗体についてVHの100番目のアミノ酸残基をAまたはYに置換すると抗体のFGF23中和活性が低下するが、A-9抗体およびA-10抗体が有する更なるアミノ酸残基の置換により、抗体のFGF23中和活性がA抗体以上に向上することが確認できた。

[0340] [実施例19] 改変抗体の分解抑制率の確認

A-1抗体、A-3抗体、A-5抗体、A-8抗体の4種類の改変抗体と、コントロールとしてA抗体を用いて、分解抑制率を確認した。

[0341] なお、本実施例で用いた抗体は、目的遺伝子配列を哺乳動物用発現ベクターに挿入し、CHO細胞に導入後、哺乳動物細胞用培地上清から、Ma b S e l e c t S u R e（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を用いたアフィニティー精製及び陽イオン交換クロマトグラフィーにより、精製抗体を取得した。N A P 2 5（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社）を用いて抗体溶液の溶媒を10mM S o d i u m L - g l u t a m a t e、262mM D - S o r b i t o l、および0.05mg/mL P o l y s o r b a s e 80を含むpH4およびpH4.5の溶媒に置換し、タンパク質濃度を1mg/mLとした。

[0342] 得られた抗体溶液を、40度で1ヶ月間および25度で3ヶ月間静置した後、-80度で凍結した。当該抗体溶液を融解した後、生物製剤解析システムP A 8 0 0 P l u s（S C I E X社）を用いて、抗体の分解を確認した。サンプル調製や分析などの基本条件は、O s c a r S a l a s - S o l a n oらの方法に従って実施し（2006, Anal. Chem. :6583-6594）、適宜変更した。

[0343] 当該抗体の分解物に相当するバンドのピーク面積率（％）について、pH

4. 5での結果は表22に、pH5.0での結果は表23に示した。溶媒置換直後に−80度で凍結したサンプルをInitial、40度で1ヶ月間静置した後に−80度で凍結したサンプルを40℃1M、25度で3ヶ月間静置した後に−80度で凍結したサンプルを25℃3Mと表記した。いずれのサンプルも同条件で融解後、測定を実施した。

[0344] [表22]

抗体名	分解バンドピーク面積率 Initial (%)	分解バンドピーク面積率 40℃1M (%)	分解バンドピーク面積率 25℃3M (%)
A	2.5	47.2	36.8
A-1	0.4	17.7	9.3
A-3	0.3	14.2	6.7
A-5	0.7	30.8	18.6
A-8	0.1	5.8	1.3

[0345] [表23]

抗体名	分解バンドピーク面積率 Initial (%)	分解バンドピーク面積率 40℃1M (%)	分解バンドピーク面積率 25℃3M (%)
A	2.5	19.6	16.8
A-1	0.4	9.0	5.4
A-3	0.3	6.1	3.0
A-5	0.7	15.1	9.4
A-8	0.1	3.5	0.9

[0346] 表22と表23に示すように、実施例16同様、バッファー条件がpH4.5およびpH5.0、保存条件が40度で1ヶ月間および25度で3ヶ月間であっても、A抗体と比較し、A-1抗体、A-3抗体、A-5抗体、およびA-8抗体は全て分解が抑制されていることが確認できた。

[0347] [実施例 20] 改変抗体の分解抑制率の確認

実施例 17 で調製した 2 種類の改変抗体と、コントロールとして A 抗体及び A-1 抗体を用いて、分解抑制率を確認した。

[0348] なお、本実施例で用いた A 抗体及び A-1 抗体は、目的遺伝子配列を哺乳動物用発現ベクターに挿入し、CHO 細胞に導入後、哺乳動物細胞用培地上清から、MabSelect SuRe（グローバルライフサイエンステクノロジー株式会社）を用いたアフィニティー精製及び陽イオン交換クロマトグラフィーにより、精製抗体を取得した。NAP25（グローバルライフサイエンステクノロジー株式会社）を用いて抗体溶液の溶媒を 10mM Sodium L-glutamate、262mM D-Sorbitol、および 0.05mg/mL Polysorbate を含む pH4、pH4.5、および pH5 の溶媒に置換し、タンパク質濃度を 1mg/mL とした。

[0349] 得られた抗体溶液を、40度で 1 ヶ月間静置した後、マイクロチップ型電気泳動システム LabChip（パーキンエルマー社）と Protein Clear Reagent キット（パーキン・エルマー社、Cat. CLS960014）を用いて、抗体の分解を確認した。サンプル調製と泳動条件については、キットに付属するプロトコルに従って実験を行った。

[0350] 還元条件での測定結果における当該抗体の分解物に相当するバンドのピーク面積率（%）について、pH4.0 での結果は表 24 に、pH4.5 での結果は表 25 に、pH5.0 での結果は表 26 に示す。

[0351] [表24]

抗体名	分解バンドピーク面積率 (%)	分解バンドピーク面積率の比 (%)
A	32.7	100
A-1	11.2	34.2
A-9	9.2	28.0
A-10	5.1	15.6

[0352] [表25]

抗体名	分解バンドピーク面積率 (%)	分解バンドピーク面積率の比 (%)
A	20.7	100
A-1	7.1	34.4
A-9	5.4	26.0
A-10	3.2	15.3

[0353] [表26]

抗体名	分解バンドピーク面積率 (%)	分解バンドピーク面積率の比 (%)
A	8.2	100
A-1	3.5	42.7
A-9	2.6	32.1
A-10	1.7	21.0

[0354] 表24、表25および表26に示すように、A-9抗体、A-10抗体についても、バッファー条件がpH4.0、pH4.5またはpH5.0、保存条件が40度で1ヶ月間において、A抗体と比較し分解が抑制されていることが確認できた。

[0355] [実施例21]

雄性カニクイザルに対し、被験抗体を単回皮下投与した時の薬理作用の持続性を確認するため、血清中の無機リン濃度(mg/dL)の測定を実施した。

被験抗体としてA8抗体(1.8 mg/kg)を皮下投与した。投与後56日間、経時的に採血を行い、各時点での血清中の無機リン濃度を測定した。リン濃度の測定は、クリナライザ(JCA-BM6070)を用いて、PNP-XDH法により測定した。

[0356] 得られた結果を表27に示す。A-8抗体投与後、血清中の無機リン濃度は投与後3日目から上昇し、投与後56日目でもベースラインの無機リン濃度(表27のDay0でのリン濃度)に比べて高値を示した。

[0357] [表27]

		A-8 (1.8 mg/kg)
Days	-7	5.54±0.90
	-3	5.53±0.65
	0	5.05±0.86
	3	10.4±0.77
	7	10.9±0.64
	10	10.7±0.84
	14	10.1±0.82
	17	9.02±0.79
	21	9.18±0.87
	24	9.14±0.74
	28	8.28±0.64
	35	8.61±0.82
	42	7.9±1.11
	49	7.46±1.17
	56	7.37±0.74

[0358] 一方で、ブロスマブ（K R N 2 3，クリースピーータ）は、3 m g / k g をカニクイザルに単回皮下投与した後、投与後3日目から血清中の無機リン濃度が上昇し、投与後42日目には媒体投与群およびベースライン（投与0日）と同等まで無機リン濃度が低下する（クリースピーータ皮下注 医薬品インタビューフォーム2021年12月改定（第5版）P44）。

[0359] したがってA-8抗体は、ブロスマブに比べて、カニクイザルでの血清中の無機リン濃度持続時間が長いことが示された。

[0360] また、A-1抗体、A-5抗体を、3 m g / k g でカニクイザルに皮下投与し、上記と同様の方法で血清中の無機リン濃度を測定した。その結果、こ

これらの抗体は、ブロスマブと同様に、投与後3日目から血清中の無機リン濃度が上昇し、投与後42日目にはベースラインまで無機リン濃度が低下した。

[0361] ブロスマブの重鎖定常領域のアミノ酸配列は配列番号53で表され、A-1抗体、A-5抗体、A-8抗体の重鎖定常領域のアミノ酸配列は、配列番号48で表される。同一の重鎖定常領域アミノ酸配列を有するA-1抗体、A-5抗体およびA-8抗体のうち、A-8抗体のみがカニクイザルでブロスマブよりも長く血清中の無機リン濃度が持続した。

[0362] したがって、A-8抗体がブロスマブやA-1抗体、A-5抗体よりもカニクイザルでの血清中の無機リン濃度の持続時間が長いことは、重鎖定常領域のアミノ酸配列の違いではなく、可変領域のアミノ酸配列の違いによるものであることが示唆された。

[0363] [実施例22]

実施例21と同様の方法で、血清中の無機リン濃度 (mg/dL) を測定した。被験抗体としてA-9抗体、A-10抗体 (3.0 mg/kg) を皮下投与した。投与後57日間、経時的に採血を行い、各時点での血清中の無機リン濃度を測定した。

[0364] 得られた結果を表28に示す。

[0365]

[表28]

		A-9	A-10
Days	0	6.37±0.21	5.83±0.67
	1	6.27±0.31	5.60±0.35
	4	11.4±0.95	10.5±0.15
	8	11.1±1.80	10.5±0.97
	11	10.9±0.75	10.4±1.04
	15	9.80±1.05	9.20±1.73
	18	8.77±1.42	7.07±1.25
	22	9.90±0.98	8.40±1.71
	25	9.40±0.66	7.67±1.00
	29	9.53±0.81	7.60±0.92
	32	8.90±0.92	7.93±0.49
	36	8.03±0.49	6.47±1.07
	39	8.67±0.68	7.20±0.60
	43	8.37±1.45	7.17±0.87
	46	7.47±1.17	7.67±0.95
	50	8.97±0.55	7.23±1.12
	53	7.00±1.55	6.33±0.68
	57	7.67±0.74	6.10±1.04

[0366] 表28に示すように、実施例22のA-8抗体と同様に、A-9抗体、A-10抗体の投与後、血清中の無機リン濃度は投与後3日目から上昇し、投与後57日目でもベースラインの無機リン濃度（表28におけるDay0でのリン濃度）に比べて高値を示した。

[0367] A-9抗体、A-10抗体の重鎖定常領域のアミノ酸配列は、A-1抗体、A-5抗体およびA-8抗体の重鎖定常領域アミノ酸配列と同じ、配列番号48で表されるアミノ酸配列である。

[0368] したがって、A-9抗体、A-10抗体についても、ブロスラブやA-1抗体、A-5抗体よりもカニクイザルでの血清中の無機リン濃度の持続時間が長いことは、重鎖定常領域のアミノ酸配列の違いではなく、A-8抗体と同様に可変領域のアミノ酸配列の違いによるものであることが示唆された。

[0369] 本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加え得ることは、当業者にと

って明らかである。なお、本出願は、2022年8月10日付けで出願された日本特許出願（特願2022-128011）及び2022年10月12日付けで出願された日本特許出願（特願2022-164256）に基づいており、その全体が引用により援用される。また、ここに引用されるすべての参照は全体として取り込まれる。

配列表フリーテキスト

- [0370] 配列番号1：A抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号2：A抗体のVLのアミノ酸配列
配列番号3：I100A抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号4：I100L抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号5：I100V抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号6：I100Y抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号7：I100W抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号8：I100T抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号9：I100S抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号10：I100R抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号11：I100Q抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号12：I100N抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号13：I100M抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号14：I100K抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号15：I100H抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号16：I100G抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号17：I100F抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号18：I100E抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号19：I100D抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号20：D105A抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号21：D105E抗体のVHのアミノ酸配列
配列番号22：D105F抗体のVHのアミノ酸配列

配列番号 23 : D105G 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 24 : D105H 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 25 : D105I 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 26 : D105K 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 27 : D105L 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 28 : D105M 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 29 : D105P 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 30 : D105Q 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 31 : D105R 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 32 : D105V 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 33 : D105W 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 34 : D105Y 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 35 : D105T 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 36 : D105N 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 37 : D105S 抗体の V H のアミノ酸配列
配列番号 38 : H2B11 __ A のアミノ酸配列
配列番号 39 : J2H2B9 __ A のアミノ酸配列
配列番号 40 : J2H2E9 __ A のアミノ酸配列
配列番号 41 : 2H2E1 __ A のアミノ酸配列
配列番号 42 : 2H2E5 __ A のアミノ酸配列
配列番号 43 : 2H2E8 __ Y のアミノ酸配列
配列番号 44 : L3G12 のアミノ酸配列
配列番号 45 : L1H8 のアミノ酸配列
配列番号 46 : 2L3H7 のアミノ酸配列
配列番号 47 : J2H2B9 __ Y のアミノ酸配列
配列番号 48 : YTE の C H のアミノ酸配列
配列番号 49 : G2 __ YTE の C H のアミノ酸配列
配列番号 50 : G2 __ LS の C H のアミノ酸配列

配列番号 51 : G4PE__R409K__PのCHのアミノ酸配列

配列番号 52 : G4PE__R409K__LSのCHのアミノ酸配列

配列番号 53 : G1 定常領域のアミノ酸配列

配列番号 54 : ヒトFcRn細胞外ドメインHis-tag体のアミノ酸配列

配列番号 55 : ヒト β 2ミクログロブリンのアミノ酸配列

配列番号 56 : カニクイザルFcRn細胞外ドメインHis-tag体のアミノ酸配列

配列番号 57 : カニクイザル β 2ミクログロブリンのアミノ酸配列

配列番号 58 : A-9抗体のVLのアミノ酸配列

配列番号 59 : A-10抗体のVLのアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（以下、VHと記載）および配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（以下、VLと記載）を含む抗体において、少なくともVHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基または105番目のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された、FGF23に結合する抗体または該抗体断片。
- [請求項2] VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基が、アラニン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、チロシン残基、アルギニン残基、アスパラギン酸残基、ヒスチジン残基、トリプトファン残基、およびメチオニン残基から選ばれる1のアミノ酸残基に置換された、請求項1に記載の抗体または該抗体断片。
- [請求項3] VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の100番目のアミノ酸残基が、アラニン残基、またはチロシン残基に置換された、請求項1または2に記載の抗体または該抗体断片。
- [請求項4] VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の105番目のアミノ酸残基が、アラニン残基、フェニルアラニン残基、グリシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基、リシン残基、ロイシン残基、メチオニン残基、プロリン残基、グルタミン残基、アルギニン残基、バリン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、トレオニン残基、アスパラギン残基、およびセリン残基から選ばれる1のアミノ酸残基に置換された、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。
- [請求項5] 前記抗体が下記（a1）～（a4）から選ばれる1の置換をさらに含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。
- （a1）VHにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列の50番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換、54番目のアミノ酸残基のトリプトファン残基への置換、55番目のアミノ酸残基のヒスチジン

残基への置換、５７番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および５８番目のアミノ酸残基のフェニルアラニン残基への置換から選ばれる少なくとも１の置換、

（ａ２）ＶＬにおける配列番号２で表されるアミノ酸配列の９１番目のアミノ酸残基のメチオニン残基またはロイシン残基への置換、９２番目のアミノ酸残基のチロシン残基への置換、９４番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、および９６番目のアミノ酸残基のアスパラギン残基またはアスパラギン酸残基への置換から選ばれる少なくとも１の置換、

（ａ３）ＶＬにおける配列番号２で表されるアミノ酸配列の２８番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、２９番目のアミノ酸残基のバリン残基への置換、３１番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および３４番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換から選ばれる少なくとも１の置換、並びに

（ａ４）ＶＬにおける配列番号２で表されるアミノ酸配列の９２番目のアミノ酸残基のチロシン残基またはトリプトファン残基への置換、９４番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換、および９６番目のアミノ酸残基のアスパラギン酸残基への置換から選ばれる少なくとも１の置換。

[請求項６]

前記抗体が下記（ｃ１）～（ｃ１０）から選ばれる１である、請求項１～５のいずれか１項に記載の抗体または該抗体断片。

（ｃ１）配列番号３９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む抗体、

（ｃ２）配列番号４７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む抗体、

（ｃ３）配列番号３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号４４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む抗体、

（ｃ４）配列番号６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番

号44で表されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む抗体、

(c5) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号45で表されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む抗体、

(c6) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号45で表されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む抗体、

(c7) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号46で表されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む抗体、

(c8) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号46で表されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む抗体、

(c9) 配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号58で表されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む抗体、並びに

(c10) 配列番号6で表されるアミノ酸配列を含むV_Hおよび配列番号59で表されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む抗体。

[請求項7]

前記抗体のサブクラスがIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4である、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

[請求項8]

前記抗体のFc領域が下記(d1)～(d5)から選ばれる1である、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

(d1) EUインデックス252番目のアミノ酸残基のチロシン残基への置換、254番目のアミノ酸残基のトレオニン残基への置換、および256番目のアミノ酸残基のグルタミン酸残基への置換を含むFc領域、

(d2) EUインデックス428番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換、および434番目のアミノ酸残基のセリン残基への置換を含むFc領域、

(d3) EUインデックス308番目のアミノ酸残基のプロリン残基への置換を含むFc領域、

(d4) EUインデックス250番目のアミノ酸残基のグルタミン残

基への置換、および428番目のアミノ酸残基のロイシン残基への置換を含むFc領域、並びに

(d5) EUインデックス434番目のアミノ酸残基のアラニン残基への置換を含むFc領域。

[請求項9] 前記抗体の重鎖定常領域が配列番号48、49、50、51、または52で表されるアミノ酸配列を含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

[請求項10] 前記抗体断片が、Fab、Fab'、(Fab')₂、scFv、Diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドから選ばれる1である請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体断片。

[請求項11] 請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸。

[請求項12] 請求項11に記載の核酸を含有するベクター。

[請求項13] 請求項12に記載のベクターを含む形質転換細胞。

[請求項14] 請求項13に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培養物から抗体または該抗体断片を採取することを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

[請求項15] 請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を含む組成物。

[請求項16] 請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を含むヒトFGF23関連疾患の治療薬。

[請求項17] 請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を含むヒトFGF23関連疾患の治療方法。