

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

**特開2016-190847
(P2016-190847A)**

(43) 公開日 平成28年11月10日(2016.11.10)

(51) Int.Cl.

C07K 19/00	(2006.01)	F 1	C07K	19/00	Z N A
C07K 16/00	(2006.01)		C07K	16/00	
C07K 14/50	(2006.01)		C07K	14/50	
C12N 15/09	(2006.01)		C12N	15/00	A
C12N 1/15	(2006.01)		C12N	1/15	

テーマコード(参考)

4B065
4C084
4H045

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-87432 (P2016-87432)
 (22) 出願日 平成28年4月25日 (2016.4.25)
 (62) 分割の表示 特願2012-550437 (P2012-550437)
 の分割
 原出願日 平成23年1月27日 (2011.1.27)
 (31) 優先権主張番号 12/696,693
 (32) 優先日 平成22年1月29日 (2010.1.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100194423
 弁理士 植竹 友紀子
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FGF23融合ポリペプチドを使用する方法および組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 加齢関連状態または代謝障害の予防または処置するための方法、キットおよび組成物の提供。

【解決手段】 (a) 線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトー(Klotho)タンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、融合ポリペプチド。該融合ポリペプチドを有効成分とする加齢関連状態または代謝障害の予防または処置するための方法、キットおよび組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 線維芽細胞増殖因子23 (FGF23) またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b) 減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトート(Klotho)タンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c) リンカーを含む、融合ポリペプチド。

【請求項 2】

(a) のポリペプチドが、(b) のポリペプチドのN-末端に作動可能に連結している、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3】

(b) のポリペプチドが、(a) のポリペプチドのN-末端に作動可能に連結している、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4】

(a) のポリペプチドおよび(b) のポリペプチドが、ポリペプチドリンクにより連結している、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5】

ポリペプチドリンクが、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17および配列番号：18からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項4に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6】

ポリペプチドリンクが、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17および配列番号：18からなる群から選択されるアミノ酸配列の少なくとも1、最大約30の繰り返しを含む、請求項4に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 7】

(a) のポリペプチドが、該ポリペプチドリンクのN-末端にペプチド結合により連結しており、(b) のポリペプチドが、該ポリペプチドリンクのC-末端にペプチド結合により連結している、請求項4に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 8】

(a) のポリペプチドが、該ポリペプチドリンクのC-末端にペプチド結合により連結しており、(b) のポリペプチドが、該ポリペプチドリンクのN-末端にペプチド結合により連結している、請求項4に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 9】

クロトータンパク質の細胞外サブドメインが、KL-D1ドメインまたはKL-D2ドメインである、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 10】

(a) のポリペプチドが、クロトータンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメインを含む、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 11】

クロトータンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメインが、タンデムリピートにおける少なくとも2つのKL-D1ドメインである、請求項10に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 12】

クロトータンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメインが、タンデムリピートにおける少なくとも2つのKL-D2ドメインである、請求項10に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

クロトータンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメインが、KL-D1ドメインおよびKL-D2ドメインを含む、請求項10に記載の融合ポリペプチド。

【請求項14】

(a)のポリペプチドが、クロトータンパク質の細胞外ドメインである、請求項1に記載の融合ポリペプチド

【請求項15】

シグナルペプチドをさらに含む、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項16】

シグナルペプチドがクロトーシグナルペプチドである、請求項15に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項17】

シグナルペプチドがIGシグナルペプチドである、請求項15に記載の融合ポリペプチド。

【請求項18】

線維芽細胞増殖因子受容体に特異的に結合する、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項19】

クロトータンパク質がアルファ-クロトーである、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

。

【請求項20】

クロトータンパク質がベータ-クロトーである、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項21】

線維芽細胞増殖因子が、線維芽細胞増殖因子-23(FGF23)または線維芽細胞増殖因子-23変異体(R179Q)である、請求項19に記載の融合ポリペプチド。

【請求項22】

線維芽細胞増殖因子が、線維芽細胞増殖因子-19または線維芽細胞増殖因子-21である、請求項20に記載の融合ポリペプチド。

【請求項23】

配列番号：54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67または68のアミノ酸配列と95%以上同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

30

【請求項24】

配列番号：58または配列番号：68のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項25】

FcLALAを含む、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項26】

請求項1に記載の融合ポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項27】

請求項1に記載の融合ポリペプチドをコードする配列を含む核酸。

【請求項28】

請求項27に記載の核酸を含む宿主細胞。

40

【請求項29】

請求項27に記載の核酸を含むベクター。

【請求項30】

(a)線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所

50

望により(c) リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における加齢関連状態を処置または予防するための方法。

【請求項 3 1】

加齢関連状態が、サルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチントン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、期待寿命の低下(d iminished life expectancy)、記憶障害、しわ、腎機能障害および加齢性難聴からなる群から選択される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

クロトータンパク質がアルファクロトータンパク質である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

加齢関連状態が筋肉疲労であり、クロトータンパク質がアルファクロトータンパク質であり、線維芽細胞増殖因子が線維芽細胞増殖因子 2 3 である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

(a) 線維芽細胞増殖因子 2 3 (F G F 2 3) またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、F G F 2 3 が、Q 1 5 6 、 C 2 0 6 および C 2 4 4 の 1 つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b) 減少した F c - ガンマ - 受容体に対する親和性および / もしくは増加した血清半減期を有する修飾された F c フラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c) リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における代謝障害を処置または予防するための方法。

【請求項 3 5】

代謝障害が、I I 型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖および肥満からなる群から選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

融合ポリペプチドが、(a) ベータ - クロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインを含むポリペプチド、および(b) 線維芽細胞増殖因子 2 1 を含むポリペプチドを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

(a) 線維芽細胞増殖因子 2 3 (F G F 2 3) またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、F G F 2 3 が、Q 1 5 6 、 C 2 0 6 および C 2 4 4 の 1 つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b) 減少した F c - ガンマ - 受容体に対する親和性および / もしくは増加した血清半減期を有する修飾された F c フラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c) リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における高リン血症または石灰沈着症を処置または予防するための方法。

【請求項 3 8】

融合ポリペプチドが、(a) アルファクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインを含むポリペプチド、および(b) 線維芽細胞増殖因子 2 3 を含むポリペプチドを含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

(a) 線維芽細胞増殖因子 2 3 (F G F 2 3) またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、F G F 2 3 が、Q 1 5 6 、 C 2 0 6 および C 2 4 4 の 1 つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b) 減少した F c - ガンマ - 受容体に対する親和性および / もしくは増加した血清半減期を有する修飾された F c フラ

10

20

30

40

50

グメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置または予防するための方法。

【請求項40】

クロトータンパク質がアルファクロトータンパク質である、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

(a)線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における癌を処置または予防するための方法。

10

【請求項42】

癌が乳癌である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

クロトータンパク質がアルファクロトータンパク質である、請求項41に記載の方法。

20

【請求項44】

クロトータンパク質がヒトクロトータンパク質である、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項45】

筋萎縮の処置または予防における使用のための、請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項46】

配列番号：47または配列番号：49の可溶性クロトー融合タンパク質を含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む(本質的にからなる、またはからなる)、筋萎縮を処置または予防する方法。

30

【請求項47】

(a)線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む(本質的にからなる、またはからなる)、筋萎縮を処置または予防する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本出願は、2010年1月29日付け米国出願シリアル番号12/696693(この内容を出典明示によりその全体を本明細書に包含させる)の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

1. 背景

線維芽細胞増殖因子(FGF)は、多数の生物体において発現される相同ポリペプチド増殖因子のファミリーを構成する(Ornitz and Itoh, *Genome Biol.* 2: reviews, 3005.1-3005.12 (2001))。脊椎動物種において、FGFは、遺伝子構造およびアミノ酸配列の両方において高度に保存されており、互いに13-71%のアミノ酸同一性を有する。ヒ

50

トにおいて、22の既知のFGFファミリーメンバーがある(FGF15はヒトFGF19のマウスオルソログであり、したがってヒトFGF15はない)。初期の発達において、FGFは細胞増殖、移動および分化を調節するが、成体において、FGFはホメオスタシス、組織修復機能および損傷応答を維持する。

【0003】

FGFは、細胞表面FGF受容体に結合し、それにより活性化されることにより増殖因子として機能する。FGF受容体(FGFR)は、FGFRの自己リン酸化、FRS2(FGF受容体基質2)およびERK1/2(細胞外シグナル-調節タンパク質キナーゼ1/2)のリン酸化を介してシグナル伝達を活性化する、およびEngr-1(初期増殖応答-1)を活性化する、チロシンキナーゼ受容体である。FGFは、また、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに対して高親和性を有する。FGFに結合するとき、ヘパラン硫酸はFGFRの活性化を高める。

10

【0004】

アルファ-クロトー(Klotho)遺伝子は、細胞外ドメインおよび短い細胞質ドメインを有する130kDaのI型の1回膜貫通タンパク質をコードする。アルファ-クロトータンパク質の細胞外ドメインは、KL-D1およびKL-D2と称される2つのサブドメインを含む。これらの2つのサブドメインは、細菌および植物の-グルコシダーゼと配列相同意を共有している。アルファ-クロトータンパク質の細胞外ドメインは、膜貫通ドメインにより細胞表面に結合しているか、または開裂し、細胞外環境へ放出され得る。細胞外ドメインの開裂は、その場の低い細胞外Ca²⁺濃度によって、促進されるようである。

20

【0005】

アルファ-クロトーに加えて、アルファ-クロトーのホモログであるベータ-クロトーが同定されている(ItoらMech. Dev. 98:115-9(2000))。ベータ-クロトーも、細胞外KL-D1およびKL-D2サブドメインを有するI型の1回膜貫通タンパク質である。

【0006】

アルファ-クロトー発現の調節によって、哺乳動物における老化関連特性を生産することが証明されている。アルファ-クロトー遺伝子において機能喪失変異のマウスホモ接合体は、寿命の短縮、皮膚萎縮、筋肉疲労、動脈硬化症、肺気腫および骨粗鬆症を含むヒトの老化に類似した特性を発生させる(Kuro-oらNature, 390:45-51(1997))。対照的に、マウスにおけるアルファ-クロトー遺伝子の過剰発現は、寿命を延長させ、野生型マウスと比較して酸化ストレスに対する抵抗性を増加させる(KurosuらScience 309:1829-1833(2005); YamamotoらJ. Biol. Chem. 280:38029-38034(2005))。

30

【0007】

最近の研究によって、FGF23およびアルファ-クロトー間の機能的なクロストークを示すFGF23-欠損マウスおよびアルファ-クロトー-欠損マウス間で著しく類似の生物学的特性が証明された(ShimadaらJ. Clin. Invest. 113:561-568(2004); YoshidaらEndocrinology 143:683-689(2002))。これらの研究では、FGF23と相同のFGF受容体を介する結合およびシグナル伝達の両方に関して、FGF23の必須のパートナーとしてアルファ-クロトーの同定に至った(UrakawaらNature 22:1524-6(2007))。アルファ-クロトー遺伝子は、主に腎臓、副甲状腺および脈絡叢において発現する。アルファ-クロトーの組織特異的発現は、これらの組織におけるFGF23シグナル伝達の活性化を限定するという仮説が立てられている。

40

【0008】

FGF23/アルファ-クロトーと同様に、ベータ-クロトーは、FGF19およびFGF21それぞれの相同的FGF受容体を介する結合およびシグナル伝達の両方に関して、FGF19およびFGF21の必須のパートナーである(OgawaらProc. Natl. Acad. Sci. USA 104:7432-7(2007); LinらJ. Biol. Chem. 282:27227-84(2007);およびWuらJ. Biol. Chem. 282:29069-72(2007))。このような研究は、また、組織特異的な代謝活性の調節におけるベータ-クロトーの関与を証明した。ベータ-クロトーは、脂肪組織における炭水化物および脂質代謝を調節するための補因子として、FGF21と共に作用す

50

ることが最初に示された。FGF19とともにベータ-クロトールは、肝臓における胆汁酸代謝を調節し、したがって、ベータ-クロトール欠損マウスにおける胆汁合成の増加を説明する(Itoら J Clin Invest. 2005 Aug;115(8):2202-8)。

【0009】

米国特許第6,579,850号は、アルファ-クロトールポリペプチドを含むポリペプチドおよび組成物を記載している。ヒトおよびマウスアルファ-クロトールポリペプチドを記載している。該特許は、該ポリペプチドを含む組成物が早期老化に類似した症候群の処置、成人疾患の処置および老化の抑制において有用であることも記載している。

【0010】

米国特許第7,223,563号は、FGF23ポリペプチド配列をコードする単離された核酸またはこのような単離された核酸を含む組換え細胞を記載している。該特許はさらに、低リン酸血症性および高リン酸血症性障害、骨粗鬆症、皮膚筋炎および冠動脈疾患を診断および処置する方法に関する。

10

【0011】

米国特許第7,259,248号は、FGF21ポリペプチド配列をコードする単離された核酸を記載している。該特許はさらに、肝臓疾患、胸腺機能関連状態を診断および処置する方法ならびに精巣の状態を処置する方法に関する。

20

【発明の概要】

【0012】

2. 発明の概要

本明細書は、融合ポリペプチドまたは可溶性ポリペプチドでの加齢関連状態または代謝障害を予防または処置するための方法、使用、キットおよび組成物に関する。本明細書の融合ポリペプチドは、FGF(例えば、FGF23)、およびクロトータンパク質またはその活性なフラグメント(例えば、sクロトール)および/またはFcフラグメント(例えば、FcLALA)のいずれか、および、所望により、リンカーから形成される。いくつかの態様において、FGF23は変異される。いくつかの態様において、本明細書は、クロトータンパク質またはその活性なフラグメントおよび線維芽細胞増殖因子またはその活性なフラグメントを含むクロトール融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、クロトールポリペプチド、FGF(例えば、FGF23)および修飾されたFcフラグメントを含む。Fcフラグメントは、例えば、減少したFc-ガンマ-受容体への結合および増加した血清半減期を有することができる。sクロトール、FGF23およびFcLALA(減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント)を含む融合タンパク質は、配列番号46、47、48および49に記載されている。いくつかの態様において、融合ポリペプチドまたはタンパク質は、FGF(例えば、FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体(例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および/または1つのアミノ酸欠失を含む変異体)、および修飾されたFcフラグメントまたはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体(例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および/または1つのアミノ酸欠失を含む変異体)を含む。FGF23およびFcLALAを含む融合タンパク質は、配列番号50、51、52および53に記載されている。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、凝集および/もしくはプロテアーゼ介在開裂を減少させるFGF23において1つ以上の変異を有する。

30

【0013】

第1の局面において、本明細書は、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子またはそれらの活性なフラグメントを有する融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性(例えば、減少したKaまたは増加したKd)および/または増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。クロトール細胞外ドメインは、アルファまたはベータクロトーアイソフォームのいずれか由来であり得る。さらに、クロトール融合ポリペプチドのFGF成分は、線維芽細胞増殖因子-19、線維

40

50

芽細胞増殖因子 - 21 および線維芽細胞増殖因子 - 23 に関して主に記載されているが、任意の 23 個の既知の FGF を本明細書の実施において使用することができると思慮される。本出願の読者は、それぞれのヒト FGF タンパク質またはそれらの活性なフラグメントとアルファまたはベータ細胞外ドメインとのそれぞれの全ての組合せを、個々におよび具体的に考慮すると想定し得る。

【0014】

本明細書において、クロトータンパク質の細胞外ドメインは、クロトータンパク質の KL-D1 および KL-D2 ドメインまたはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも 1 つの保存アミノ酸置換および / または 1 つのアミノ酸欠失を含む変異体）の 1 つまたは両方を含むことができる。いくつかの態様において、本明細書のクロトート融合ポリペプチドは、クロトータンパク質の少なくとも 2 つの細胞外サブドメインまたはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも 1 つの保存アミノ酸置換および / または 1 つのアミノ酸欠失を含む変異体）を有する。例えば、少なくとも 2 つの細胞外サブドメインは、タンデムリピートにおける少なくとも 2 つの KL-D1 ドメイン、タンデムリピートにおける少なくとも 2 つの KL-D2 ドメイン、または少なくとも 1 つの KL-D1 ドメインおよび少なくとも 1 つの KL-D2 ドメインであり得る。種々の態様において、本明細書の融合ポリペプチドは、全長アルファクロトータンパク質のアミノ酸 28-292 またはアミノ酸 28-982（配列番号：7）を含む。別の態様において、本明細書の融合ポリペプチドは、全長ベータクロトータンパク質のアミノ酸 52-997 を含む。

10

20

30

40

【0015】

本明細書の 1 つの態様において、融合ポリペプチドの成分は、(a) 線維芽細胞増殖因子 23 (FGF 23) またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも 1 つの保存アミノ酸置換および / または 1 つのアミノ酸欠失を含む変異体）を含むポリペプチドであって、FGF 23 が、Q156、C206 および C244 の 1 つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および (b) 減少した Fc-ガンマ-受容体に対する親和性および / もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも 1 つの保存アミノ酸置換および / または 1 つのアミノ酸欠失を含む変異体）、および、所望により (c) リンカーを含む。成分は、例えば、ペプチド結合によりインフレームにて化学的に連結または融合され得る。それらはまた、リンカーを介して連結され得る。ポリペプチドリンカーの非限定的な例は、配列番号：11、12、13、14、15、16、17 および 18 である。このようなリンカーは、少なくとも 1 個、最大約 30 個の繰り返しの配列番号：11、12、13、14、15、16、17 および 18 を含み得る。別の非限定的な態様において、融合ポリペプチドは、(2) FGF またはその活性なフラグメントおよび (3) 修飾された Fc フラグメントを含む。融合ポリペプチドの種々の成分は、任意の順に作動可能に連結され得る。(1) のポリペプチドは、(2) または (3) のポリペプチドの N-末端に作動可能に連結され得る、(2) のポリペプチドは、(1) または (3) のポリペプチドの N-末端に作動可能に連結され得る、(3) のポリペプチドは、(1) または (2) のポリペプチドの N-末端に作動可能に連結され得る。

【0016】

本明細書において、クロトータンパク質の細胞外サブドメイン、線維芽細胞増殖因子および減少した Fc-ガンマ-受容体に対する親和性および / もしくは増加した血清半減期を有する（任意の）修飾された Fc フラグメントは、種々の方向および方法において互いに作動可能に連結され得る。例えば、クロトータンパク質の細胞外サブドメインは、線維芽細胞増殖因子の N-末端に作動可能に連結することができ、あるいは、線維芽細胞増殖因子は、クロトータンパク質の細胞外サブドメインの N-末端に作動可能に連結することができる。

【0017】

50

1つの態様において、本明細書は、クロトータンパク質の s クロトーおよびリンカーを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、アルファクロトータンパク質の s クロトーおよびリンカーを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、ベータクロトータンパク質の s クロトーおよびリンカーを含む融合ポリペプチドを提供する。さらに別の態様において、本明細書は、ヒト FGF タンパク質またはその活性なフラグメント（例えば、シグナルペプチドを有さない）およびリンカーを提供する。1つの態様において、本明細書は、病理学的疾患の治療における使用のための、または処置における使用のための医薬としての、融合タンパク質、核酸分子または医薬組成物を提供する。加齢関連状態または代謝障害を処置または予防するための、本明細書の融合タンパク質を含む医薬組成物およびその使用はまた、本明細書により包含される。いくつかの態様において、融合タンパク質は、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。

10

【0018】

1つの態様において、本明細書は、FGF - 23 に（リンカーを介して直接的または間接的に）融合されたシグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質の s クロトーを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、FGF - 23 に（リンカーを介して直接的または間接的に）融合されたシグナルペプチドを有さないアルファクロトータンパク質の s クロトーを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、シグナルペプチドを有さない FGF - 23 に（リンカーを介して直接的または間接的に）融合されたシグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質の s クロトーを提供する。別の態様において、本明細書は、シグナルペプチドを有さない FGF - 23 に（リンカーを介して直接的または間接的に）融合されたシグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質の s クロトーを含む融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。

20

【0019】

1つの態様において、本明細書は、FGF - 23 (R179Q) 変異体に（リンカーを介して直接的または間接的に）融合されたシグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質の s クロトーを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、FGF - 23 (R179Q) 変異体に（リンカーを介して直接的または間接的に）融合されたシグナルペプチドを有さないアルファクロトータンパク質の s クロトーを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、シグナルペプチドを有さない FGF - 23 (R179Q) 変異体に（リンカーを介して直接的または間接的に）融合されたシグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質の s クロトーを提供する。別の態様において、本明細書は、シグナルペプチドを有さない FGF - 23 (R179Q) 変異体に（リンカーを介して直接的または間接的に）融合されたシグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質の s クロトーを含む融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。

30

【0020】

1つの態様において、本明細書は、(a) 線維芽細胞増殖因子 23 (FGF 23) またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも 1 つの保存アミノ酸置換および／または 1 つのアミノ酸欠失を含む変異体）を含むポリペプチドであって、FGF 23 が、Q156、C206 および C244 の 1 つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および (b) 減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的

40

50

に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、および、所望により（c）リンカーを含む融合ポリペプチドを提供する。このような融合ポリペプチドは、配列番号：54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67および68に記載されている。

【0021】

1つの態様において、本明細書は、（1）シグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質のsクロトーまたはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、（2）リンカー、および（3）シグナルペプチドを有さないFGF-23(R179Q)変異体またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）を含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、（1）シグナルペプチドを有さないアルファクロトータンパク質のsクロトー、またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、（2）リンカー、および（3）シグナルペプチドを有さないFGF-23(R179Q)変異体、またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）を含む融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、本明細書の融合ポリペプチドは、グリコシリ化される。いくつかの態様において、融合タンパク質は、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。

10

20

30

40

【0022】

1つの態様において、本明細書は、（1）シグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質のsクロトー（配列番号：44または配列番号：45）またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、（2）配列番号：11を含むリンカー、および（3）シグナルペプチドを有さないFGF-23(R179Q)変異体（配列番号：43）またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）を含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、（1）シグナルペプチドを有さないアルファクロトータンパク質のsクロトー（配列番号：7）またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、（2）配列番号：11を含むリンカー、および（3）シグナルペプチドを有さないFGF-23(R179Q)変異体（配列番号：43）またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）を含む融合ポリペプチドを提供する。1つの態様において、本明細書は、配列番号：19、20、40または41のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、本明細書の融合ポリペプチドは、グリコシリ化される。

【0023】

1つの態様において、本明細書は、シグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質のsクロトー（配列番号：44または配列番号：45）またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、および配列番号：11を含むリンカーを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、シグナルペプチドを有さないアルファクロトータンパク質のsクロトー（配列番号：7）、および配列番号：11を含むリンカーを含む融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、本明細書の融合ポリペプチドは、グリコシリ化される。いくつかの態様において、融合タンパク質は、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾

50

された Fc フラグメントをさらに含む。

【 0 0 2 4 】

1つの態様において、本明細書は、ヒト FGF タンパク質またはその活性なフラグメント（例えば、シグナルペプチドを有さない）、および配列番号：11を含むリンカーを含む融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、本明細書の融合ポリペプチドは、グリコシル化される。いくつかの態様において、融合タンパク質は、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。

【 0 0 2 5 】

1つの態様において、本明細書は、ヒト FGF タンパク質（例えば、FGF 23）またはその活性なフラグメント（例えば、シグナルペプチドを有さない）、リンカー（例えば、配列番号：11を含むリンカー）、および s クロト（シグナルペプチドを有するか、または有さない）またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）または Fc - ガンマ - 受容体（例えば、Fc L A L A）を含む融合ポリペプチドであって、FGF（例えば、FGF 23）がこれらの残基で1つ以上の変異：R179、Q156、C206、および／またはC244を有する融合ポリペプチドを提供する。種々の態様において、変異は、R179Q、Q156A、C206Sおよび／またはC244Sである。これらの変異は、ヒト、アカゲザル、ウシ、マウスおよびラット FGF 23において保存されているにもかかわらず、それらの変異は FGF 23 活性を防止しない。むしろ、これらのアミノ酸の変異は、凝集を減少させること、望ましくないプロテアーゼ誘導開裂を減少させること、および細胞からのタンパク質生産を増加させることにより、タンパク質の質を予想外に増強する。種々の態様において、1つ以上の FGF 23 変異を含む融合タンパク質は、グリコシル化される。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

1つの態様において、本明細書は、(1)シグナルペプチドを有さない FGF - 23 (R179Q) 変異体（配列番号：43）、または凝集および／もしくはプロテアーゼ介在開裂を減少させるさらなる変異を含む変異体、またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、(2)所望により、配列番号：11を含むリンカー、および(3)シグナルペプチドを有するアルファクロトタンパク質の s クロト（配列番号：44または配列番号：45）またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、または減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントを含む、融合ポリペプチド（例えば、グリコシル化された、またはグリコシル化されていない）を含む（例えば、単一の薬学的に活性な成分として）医薬組成物（例えば、筋肉内投与形態における）、ならびに病理学的疾患の処置、例えば、加齢関連状態、例えば、筋萎縮の処置および／または予防のための治療における、または医薬としての、該医薬組成物の使用を提供する。別の態様において、本明細書は、(1)シグナルペプチドを有さない FGF - 23 (R179Q) 変異体（配列番号：43）、または凝集および／もしくはプロテアーゼ介在開裂を減少させるさらなる変異を含む変異体、またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、(2)配列番号：11を含むリンカー、および(3)シグナルペプチドを有さないアルファクロトタンパク質の s クロト（配列番号：7）またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）、または減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントまたはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体（例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および／または1つのアミノ酸欠失を含む変異体）を含む、融合ポリペプチド（例えば、グリコシル化された、またはグリコシル化

されていない)を含む(例えば、単一の薬学的に活性な成分として)医薬組成物(例えば、筋肉内投与形態における)、ならびに病理学的疾患の処置、例えば、加齢関連状態、例えば、筋萎縮の処置および/または予防のための治療における、または医薬としての医薬組成物の使用を提供する。1つの態様において、本明細書は、配列番号:19、20、40または41のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド(例えば、グリコシル化された、またはグリコシル化されていない)を含む(例えば、単一の薬学的に活性な成分として)医薬組成物(例えば、筋肉内投与形態における)、ならびに病理学的疾患の処置、例えば、加齢関連状態、例えば、筋萎縮の処置および/または予防のための治療における、または医薬としての医薬組成物の使用を提供する。

【0027】

1つの態様において、本明細書は、シグナルペプチドを有するアルファクロトータンパク質のsクロトー(配列番号:44または配列番号:45)および配列番号:11を含むリンカーを含む、融合ポリペプチド(例えば、グリコシル化された、またはグリコシル化されていない)を含む(例えば、単一の薬学的に活性な成分として)医薬組成物(例えば、筋肉内投与形態における)、ならびに加齢関連状態、例えば、筋萎縮を処置および/または予防するための医薬組成物の使用を提供する。別の態様において、本明細書は、シグナルペプチドを有さないアルファクロトータンパク質のsクロトー(配列番号:7)および配列番号:11を含むリンカーを含む、融合ポリペプチド(例えば、グリコシル化された、またはグリコシル化されていない)を含む(例えば、単一の薬学的に活性な成分として)医薬組成物(例えば、筋肉内投与形態における)、ならびに病理学的疾患の処置、例えば、加齢関連状態、例えば、筋萎縮の処置および/または予防のための治療における、または医薬としての医薬組成物の使用を提供する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、修飾されたFcフラグメントをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0028】

1つの態様において、本明細書は、ヒトFGFタンパク質またはその活性なフラグメント(例えば、シグナルペプチドを有さない)および配列番号:11を含むリンカーを含む、融合ポリペプチド(例えば、グリコシル化された、またはグリコシル化されていない)を含む(例えば、単一の薬学的に活性な成分として)医薬組成物を提供する。

【0029】

本明細書の融合タンパク質を含む医薬組成物および病理学的疾患の処置、例えば、加齢関連状態(例えば、筋萎縮)または代謝障害(例えば、糖尿病)の処置のための治療における、または医薬としてのその使用もまた、本明細書により包含される。

【0030】

1つの態様において、本明細書は、配列番号:19と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一である融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、配列番号:20と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一である融合ポリペプチドを提供する。

【0031】

1つの態様において、本明細書は、配列番号:40と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一である融合ポリペプチドを提供する。

8 %、少なくとも 9 9 %または 1 0 0 %同一である融合ポリペプチドを提供する。

【0049】

別の態様において、本明細書は、配列番号：67と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %または 1 0 0 %同一である融合ポリペプチドを提供する。

【0050】

別の態様において、本明細書は、配列番号：68と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %または 1 0 0 %同一である融合ポリペプチドを提供する。10

【0051】

1つの態様において、本明細書は、FGF - 19またはその活性なフラグメントに融合した（リンカーを介して直接的または間接的に）シグナルペプチドを有するベータクロトータンパク質のsクロトートを含む融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。別の態様において、本明細書は、FGF - 19またはその活性なフラグメントに融合した（リンカーを介して直接的または間接的に）シグナルペプチドを有さないベータクロトータンパク質のsクロトートを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、FGF - 21またはその活性なフラグメントに融合した（リンカーを介して直接的または間接的に）シグナルペプチドを有するベータクロトータンパク質のsクロトートを含む融合ポリペプチドを提供する。別の態様において、本明細書は、FGF - 21またはその活性なフラグメントに融合した（リンカーを介して直接的または間接的に）シグナルペプチドを有さないベータクロトータンパク質のsクロトートを含む融合ポリペプチドを提供する。20

【0052】

本明細書は、本明細書に記載されているクロトート融合ポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列および該核酸を含む宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。30

【0053】

本明細書はまた、本明細書において考慮されるクロトート融合ポリペプチドのいずれかを有する組成物を提供する。本明細書の組成物は、ヘパリンをさらに含み得る。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。

【0054】

本明細書はまた、個体における加齢関連状態を処置または予防するための方法を提供する。個体（例えば、ヒト）に、加齢関連状態を処置または予防するように、クロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメイン（例えば、アルファクロトータンパク質）および線維芽細胞増殖因子またはその活性なフラグメントを有するクロトート融合ポリペプチドを含む治療有用量の医薬組成物を投与する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。特に、本明細書は、アルファクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子（またはその活性なフラグメント）を有する治療有用量の融合ポリペプチドを個体（例えば、ヒト）に投与することを含む、筋肉疲労を処置または予防する方法を提供する。40

【0055】

さらに、本明細書は、個体における代謝障害を処置または予防するための方法を提供する。個体に、代謝障害を処置するように、クロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子（またはその活性なフラグメント）を有する本明50

細書の融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を投与する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。特に、ベータ - クロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子 2 1 を有する本明細書の融合ポリペプチドは、代謝障害を処置するために有用である。

【 0 0 5 6 】

本明細書のクロト - FGF 2 3 融合ポリペプチドは、個体における高リン血症または石灰沈着症を処置または予防するために使用することができる。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。クロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子を有する本明細書のクロト - 融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を、高リン血症または石灰沈着症を処置または予防するために投与する。特に、アルファクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子 2 3 を有する本明細書のクロト - 融合ポリペプチドは、高リン血症または石灰沈着症を処置するために有用である。

10

【 0 0 5 7 】

本明細書のクロト - FGF 2 3 融合ポリペプチドは、個体における慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置または予防するために使用することができる。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。クロトータンパク質（例えば、アルファクロトータンパク質）の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子を有する本明細書のクロト - 融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を、慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置または予防するために投与する。

20

【 0 0 5 8 】

本明細書のクロト - FGF 2 3 融合ポリペプチドは、個体における癌（例えば、乳癌）を処置または予防するために使用することができる。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。クロトータンパク質（例えば、アルファクロトータンパク質）の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子を有する本明細書のクロト - 融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を、癌または乳癌を処置または予防するために投与する。

30

【 0 0 5 9 】

本明細書は、医薬における使用のためのクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび FGF またはそれらの活性なフラグメントを含む融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少した Fc - ガンマ - 受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。1 つの態様において、本明細書は、筋萎縮の処置または予防における使用のためのクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインおよび FGF またはそれらの活性なフラグメントを含む融合ポリペプチドを提供する。本明細書はまた、可溶性クロトータンパク質を含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、加齢関連状態（例えば、筋萎縮）を処置または予防する方法を提供する。

40

【 0 0 6 0 】

本明細書は、さらに、個体における病理学的疾患、例えば、加齢関連状態、代謝障害、高リン血症または石灰沈着症、慢性腎臓疾患または慢性腎不全の医薬としての治療における使用のための、または処置における使用のための、または癌または乳癌を予防するための、上記ペプチドおよび融合ポリペプチドまたは該ペプチドを含む医薬組成物を提供する。さらに、本明細書は、病理学的疾患の処置、特に上記障害、好ましくは加齢関連状態、

50

例えば、筋萎縮の処置のための医薬の製造における、本発明のポリペプチド、核酸または医薬組成物の使用をさらに提供する。

【0061】

本明細書はまた、個体における加齢関連状態または代謝障害を処置または予防するためのキットを含む。キットは、使用のための指示書およびクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子を有する精製されたクロトー融合ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したF_c-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたF_cフラグメントをさらに含む。

【0062】

本明細書はまた、本明細書のクロトー融合ポリペプチドを生産するためのキットを提供する。本明細書のキットは、使用のための指示書およびクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子を有するクロトー融合ポリペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したF_c-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたF_cフラグメントをさらに含む。

【0063】

本明細書の1つの態様において、融合ポリペプチドは、(a) 線維芽細胞増殖因子またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体(例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および/または1つのアミノ酸欠失を含む変異体)を含むポリペプチド、および(b) 減少したF_c-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたF_cフラグメントまたはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体(例えば、少なくとも1つの保存アミノ酸置換および/または1つのアミノ酸欠失を含む変異体)を含む。

【0064】

本明細書の1つの態様において、(a)のポリペプチドおよび(b)のポリペプチドは、ポリペプチドリンカーにより連結される。リンカーは、1から30回またはそれ以上繰り返し得る。

【0065】

本明細書の1つの態様において、ポリペプチドリンカーは、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17および配列番号：18からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む

【0066】

本明細書の1つの態様において、(a)のポリペプチドは該ポリペプチドリンカーのN-末端にペプチド結合により連結されており、(b)のポリペプチドは該ポリペプチドリンカーのC-末端にペプチド結合により連結されている。

【0067】

本明細書の1つの態様において、融合ポリペプチドはシグナルペプチドをさらに含む。

本明細書の1つの態様において、シグナルペプチドはIgGシグナルペプチドである。

【0068】

本明細書の1つの態様において、線維芽細胞増殖因子は、線維芽細胞増殖因子-23または線維芽細胞増殖因子-23変異体(R179Q)である。

本明細書の1つの態様において、線維芽細胞増殖因子は、線維芽細胞増殖因子-19または線維芽細胞増殖因子-21である。

【0069】

本明細書の1つの態様において、融合ポリペプチドは、配列番号：51または配列番号：53のアミノ酸配列と95%以上同一であるアミノ酸配列を含む。

本明細書の1つの態様において、融合ポリペプチドは配列番号：51または配列番号：53のアミノ酸配列を含む。

本明細書の1つの態様において、融合ポリペプチドはFcLALAを含む。

10

20

30

40

50

3. 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】図1は、本明細書のクロトーアクセサリーポリペプチドのいくつかの異なる態様を説明する。示されている融合ポリペプチドは、線維芽細胞増殖因子に作動可能に連結した1つ以上のクロトーアクセサリーポリペプチドを含む。1つ以上のクロトーアクセサリーポリペプチドを含むポリペプチドは、例えば、クロトーアクセサリーポリペプチド（例えは、ヒトクロトーアクセサリーポリペプチドのアミノ酸1から982）またはクロトーアクセサリーポリペプチドの活性なフラグメントを含む。

【0071】

【図2】図2は、本明細書のいくつかのクロトーアクセサリーポリペプチドおよびそれらの成

10

【0072】

【図3A】図3A - 3Cは、sクロトー- FGF23融合タンパク質のタンパク質発

【図3B】図3Bは、sクロトー- FGF23融合タンパク質がSDS-PAGEおよびクマシーブルー染色により馴化培地で検出されたことを示す。

【図3C】図3Cは、SDS-PAGEおよびクマシーブルー染色により分析された、高度に精製されたsクロトー- FGF23 - 6xHis融合タンパク質を示す。

【0073】

【図4】図4は、ヘパリン(20μg/ml)の存在または非存在下で、クロトーアクセサリーポリペプチドのみ、および可溶性クロトーアクセサリーポリペプチドとFGF23ポリペプチドのいずれかを含む馴化培地で処理された細胞における、Egr-1の活性化レベルを比較するEgr-1ルシフェラーゼアッセイの結果を説明する。

20

【0074】

【図5A】図5A - 5Bは、ヘパリンの存在または非存在下で、精製されたクロトーアクセサリーポリペプチド

【図5B】図5Bは、sクロトー- FGF23 - His融合物(0nM、0.6nM、1.21nM、2.41nM、4.83nM、9.65nMおよび19.3nM)で処理された細胞における、Egr-1ルシフェラーゼレポーター活性を示す。

【0075】

【図6A】図6A - 6Bは、C2C12筋肉細胞における精製されたsクロトーアクセサリーポリペプチド

30

【図6B】図6Bは、ラバマイシン(40nM)の存在または非存在下で、IGF-1(10nM)、FGF2(20ng/ml)、または精製されたクロトーアクセサリーポリペプチド(20nM)によるC2C12筋肉細胞におけるシグナル伝達経路タンパク質のリン酸化を示す。

【0076】

【図7】図7は、sクロトー- FGF23(R179Q) - FcLALA融合タンパク質によるEGR-1-1ucレポーター遺伝子の活性化を示す。

【図8】図8は、FGF23(R179Q) - FcLALAタンパク質によるEGR-1-1ucレポーター遺伝子の活性化を示す。

【図9】図9は、FGF23(R179Q) 対 FGF23(R179Q) - FcLALA v2の薬物動態学プロフィールを示す。

【0077】

【図10】図10Aおよび10Bは、デキサメタゾン誘導筋萎縮後の、筋肉成長を増強することにおけるsクロトーアクセサリーポリペプチドのインビオ有効性を示す。

40

【図11】この図は、FGF23(R179Q) - FcLALAならびにQ156A、C206S、C244SおよびC206S/C244S変異体によるEGR-1-1ucレポーター遺伝子の活性化を示す。

【図12】図12は、FGF23(R179Q) - FcLalaのWT(野生型)、Q156A、C206S、C244SおよびC206S/C244S変異体のタンパク質の質および二量化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0078】

50

4. 詳細な説明

本明細書は、加齢関連状態および代謝障害を予防または処置するための方法、キットおよび組成物、ならびに病理学的疾患の治療における該組成物の医薬としての使用または処置における使用に関する。本明細書の融合ポリペプチドは、クロトータンパク質またはその活性なフラグメントを含む。いくつかの態様において、本明細書の融合ポリペプチドは、線維芽細胞増殖因子ポリペプチドまたはその活性なフラグメントに作動可能に連結したクロトータンパク質またはその活性なフラグメントを含む。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少した FcRnへの結合する能力および / または増加した血清における安定性を有する修飾された Fc フラグメントをさらに含む。別の態様において、融合ポリペプチドは、FGF (例えば、FGF 23) および減少した FcRnへの結合する能力および / または増加した血清における安定性を有する修飾された Fc フラグメントを含む。

10

【 0079 】

本明細書の融合タンパク質または s クロトーンは、種々の加齢関連状態、例えば、サルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチントン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、期待寿命の低下 (diminished life expectancy) 、記憶障害、しわ、腎機能障害および加齢性難聴、ならびに代謝障害、例えば、I型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖および肥満の処置および予防において有用である。

20

【 0080 】

本発明は、少なくとも一部分において、物理的制約条件 (例えば、クロトーンおよび FGF ポリペプチド両方の大きいサイズ) にもかかわらず、クロトーン - FGF 融合ポリペプチドが FGF 受容体の活性化において非常に有効である発見に基づく。これらの 2 つのタンパク質の融合物がヘテロ二量化、したがってタンパク質の活性化を妨げるであろう ; 例えば、タンパク質の結合ドメインが融合物により乱され得るか、例えば、タンパク質の結合ドメインが融合物により乱され得るか、または「シス」構造を構築するとき、タンパク質が空間的に間違った方向に向けられ得ることを考慮すると、この発見は予期されないものである。

30

【 0081 】

単独で、または別のポリペプチドと一緒に投与されるクロトーンまたは FGF と比較して活性を増強させる、単一の治療タンパク質の投与を可能にするため、本明細書に記載されている融合ポリペプチドには利点がある。2 つの別々のポリペプチド (すなわち、クロトーンポリペプチドおよび別の FGF ポリペプチド) よりもむしろ単一の融合ポリペプチドとしてのクロトーンおよび FGF の使用が、 FGF 受容体の活性化にさらに有効である。

【 0082 】

定義

本明細書において使用される「クロトーンポリペプチド」、「クロトータンパク質」または「クロトーン」は、野生型「クロトーン」の活性なフラグメント、誘導体、模倣物、変異体および化学的に修飾された化合物またはそれらのハイブリッドを含む。活性なクロトーンフラグメントは、 FGF ポリペプチドに結合する能力を有する。一般的に、活性なクロトーンポリペプチドは少なくとも 1 つのクロトーサブドメイン (例えば、KL-D1 および KL-D2) を含む。野生型クロトーンは天然で見出されたとおりのアミノ酸配列を有する。本明細書において使用するために適当な例のクロトーンポリペプチドは、アルファ - クロトーン (配列番号 : 2) およびベータ - クロトーン (配列番号 : 4) を含む。アルファ - クロトーンおよびベータ - クロトーンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、 GenBank データベースにおいてそれぞれ受入番号 NM_004795 、 NP_004786 および NM_175737 、 NP_783864 において見出せる。クロトーンポリペプチドは米国特許第 6,579,850 号 (この内容をその全体において出典明示により本明細書に包含される) において記載されているものを含む。クロトーンポリペプチドは、マウス (NP_0350) において記載されているものを含む。

40

50

8851)、ラット(NP_112626)、ウサギ(NP_001075692)のアルファ-クロト-およびマウス(NP_112457)のベータ-クロト-を含むヒト以外の他の種のものを含む。アルファ-クロト-を有することが予測される種は、チンパンジー(XP_522655)、マカク(XP_001101127)、ウマ(XP_001495662)、ウシ(XP_001252500)、カモノハシ(XP_001510981)およびニワトリ(XP_417105)を含む。ベータ-クロト-を有することが予測される種は、チンパンジー(XP_526550)、マカク(XP_001091413)、ウマ(XP_001495248)、イヌ(XP_536257)、ラット(XP_001078178)、カモノハシ(XP_001512722)およびニワトリ(XP_423224)を含む。クロト-ポリペプチドは、配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列と実質的に同一である。すなわち、配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列またはそれらの活性なフラグメントを有する。

10

【0083】

本明細書において使用される「融合ポリペプチド」または「融合タンパク質」は、天然に同じポリペプチドに存在しない2つ以上の別々のポリペプチドまたはそれらの活性なフラグメントを含むポリペプチドを意味する。いくつかの態様において、2つ以上の別々のポリペプチドは、ペプチド結合によりインフレームで、互いに作動可能に共有結合、例えば、化学的に結合または融合されている。本明細書において使用される「クロト-融合ポリペプチド」は、クロト-ポリペプチドのアミノ酸配列またはその活性なフラグメントを含む融合ポリペプチドである。融合ポリペプチドは、非限定的な例として、クロト-(例えば、sクロト-)、FGF(例えば、FG23)、および減少したFC-ガンマ-受容体に対する結合親和性および/もしくは増加した血清半減期)を有する(所望により)修飾されたFcフラグメント(例えば、修飾されたFcフラグメントを含み得る。融合ポリペプチドのこの型の例は、配列番号46から49に示される。別の態様において、融合タンパク質は、FGF(例えば、FGF23)および修飾されたFc(例えば、FcLALA)を含む。FGF23およびFcLALAを含む融合タンパク質は、配列番号50、51、52および53に記載されている。FcLALAは、効率低下でADCを誘導し、弱くヒト補体に結合し、活性化するLALA変異(L234A、L235A)を有するFcフラグメントである。Hessellら 2007 Nature 449:101-104。

20

【0084】

「纖維芽細胞増殖因子」および「FGF」は、本明細書において互換的に使用され、ヒト対象を含む動物における細胞増殖、移動、分化、ホメオスタシス、組織修復および損傷応答を調節するポリペプチドを示す。FGFは、纖維芽細胞増殖因子受容体に結合し、FGFRの自己リン酸化、FRS2(FGF受容体基質2)およびERK1/2(細胞外シグナル-調節タンパク質キナーゼ1/2)のリン酸化およびEgr-1(初期増殖応答-1)の活性化を含む活性を調節する能力を有する。「FGF」なる用語は、例えば、当分野で既知である、ならびに米国特許第7,223,563号および米国特許第7,259,248号(これらの内容をその全体において出典明示により本明細書に包含させる)において記載されている、野生型「FGF」の活性なフラグメント、誘導体、模倣物、変異体および化学的に修飾された化合物またはそれらのハイブリッドを含む。野生型FGFは天然で見出されたとおりのアミノ酸配列を有する。本発明において使用するために適当な例の纖維芽細胞増殖因子は、纖維芽細胞増殖因子-19(FGF19;配列番号：31)、纖維芽細胞増殖因子-21(FGF21;配列番号：33)および纖維芽細胞増殖因子-23(FGF23;配列番号：35)を含む。FGFポリペプチドは、マウスFGFを含むヒト以外の他の種のものを含む。一般的に、FGFポリペプチドは、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：35のアミノ酸配列と実質的に同一である。すなわち、配列番号：31、配列番号：33または配列番号：35のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%また

30

40

50

はそれ以上または100%同一であるアミノ酸配列を有するアミノ酸配列またはそれらの活性なフラグメントを有する。FGF、特にFGF23のさらなる非限定的な例は、配列番号：47のaa1002-1228、配列番号：49のaa1002-1228、配列番号：51のaa1-251および配列番号：53のaa1-251、ならびに、これらの配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上または100%同一である配列で提供される。これらの配列をコードするヌクレオチドは、配列番号：46、48、50および52において提供される。

【0085】

「FGF」なる用語は完全長ポリペプチドの活性なフラグメントを含む。対応するFGF受容体に結合することができる活性なFGFフラグメントは、当分野で既知であり、本明細書の使用において考慮される。本明細書に記載されている配列に基づいて、FGFの重複フラグメントが、例えば、Sambrookら(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)およびAusubelら(1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, New York)に記載されている標準組換え技術を使用して生産することができることは、当業者に理解される。本明細書に存在する記載に基づいて、FGFフラグメントの生物学的活性がFGF受容体への結合を含む当分野で既知の、および本明細書に記載されている方法により試験することができることは、当業者に理解される。同様に、必要なFGFシグナル伝達機構(すなわちFGF受容体)を有する細胞培養モデルは、FGFフラグメントでトランスフェクトされ、次に野生型FGFと比較してFGFシグナル伝達における変化に関して試験され得る。

10

20

30

30

【0086】

FGFは、特に異なるFGFサブファミリー中で、長さおよび一次配列両方において高度に異なるN-およびC-末端配列の横に配置されている、FGF核相同性ドメイン(約120アミノ酸長)の相同性に基づいて7つのサブファミリーに分類される(GoetzらMolecular and Cellular Biology, 2007, Vol 27, 3417-3428)。FGF活性ポリペプチドは、一般的に少なくとも1つのFGF核相同性ドメインを含む。いくつかの態様において、FGF活性ポリペプチドは、FGF核相同性ドメインに加えて、結合FGF受容体においてさらなる特異性を与えるフランкиング配列を含み得る。リガンドの核領域が他のFGFと比較して高い配列同一性を共有するため(FGF19対FGF21:38%同一性、FGF19対FGF23:36%同一性)、FGF19、FGF21およびFGF23はFGF19サブファミリーに分類される。FGF19サブファミリーメンバーは内分泌腺系のシグナル伝達分子と同様に作用し、古典的なFGFに珍しくない異なる生理学的プロセスを調節する(例えば、FGF19:エネルギーおよび胆汁酸ホメオスタシス、FGF21、グルコースおよび脂質代謝、およびFGF23、リン酸塩およびビタミンDホメオスタシス)。

40

【0087】

本明細書において使用される「纖維芽細胞増殖因子受容体」および「FGFR」は、当分野で既知のFGFR1-4のいずれか、またはそれらのスプライス変異体(例えば、FGFR1c)を示す。本明細書において使用するために適当な例の纖維芽細胞増殖因子受容体は、纖維芽細胞増殖因子受容体-19(例えば、FGFR4-ベータクロトー)、纖維芽細胞増殖因子受容体-21(例えば、FGFR1c-アルファクロトー)および纖維芽細胞増殖因子受容体-23(例えば、FGFR1c-アルファクロトー、FGFR3-アルファクロトー、FGFR4-アルファクロトー)を含む。

【0088】

本明細書において使用される「細胞外ドメイン」は、細胞の外側に存在する(例えば、細胞内または膜貫通領域を含まない)膜貫通タンパク質のフラグメントを示す。「クロトータンパク質の細胞外ドメイン」、「可溶性クロトー」または「sクロトー」(例えば、配列番号：7；配列番号：39)は、纖維芽細胞増殖因子に結合することができる、および/または纖維芽細胞増殖因子に結合することにより纖維芽細胞増殖因子が纖維芽細胞増

50

殖因子受容体に結合することを可能にすることができるクロトーアルファクロトーコロナタントンパク質の細胞外ドメインを示す。クロトーアルファクロトーコロナタントンパク質は、全長アルファクロトーコロナタントンパク質（配列番号：2）のアミノ酸残基28-982および全長ベータクロトーコロナタントンパク質（配列番号：4）のアミノ酸残基52-997に対応する。

【0089】

「クロトーアルファクロトーコロナタントンパク質の細胞外サブドメイン」は、纖維芽細胞増殖因子を結合することができる、および／または纖維芽細胞増殖因子への結合により纖維芽細胞増殖因子の纖維芽細胞増殖因子受容体への結合を可能にすることができる、クロトーアルファクロトーコロナタントンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチド、線維芽細胞増殖因子を含むポリペプチド、および、所望により、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントを含む。クロトーアルファクロトーコロナタントンパク質は、繰り返されている2つの相同サブドメイン、すなわち、KL-D1（配列番号：5）およびKL-D2（配列番号：6）を有する。KL-D1およびKL-D2は、それぞれ、全長アルファクロトーアルファクロトーコロナタントンパク質（配列番号：2）のアミノ酸残基58-506および517-953、ならびに、それぞれ、全長ベータクロトーアルファクロトーコロナタントンパク質（配列番号：4）のアミノ酸残基77-508および571-967に対応し、本明細書において使用するために適当である。一般的に、少なくとも1つのクロトーサブドメインを含むポリペプチドは活性なクロトーアルファクロトーコロナタントンパク質である。本明細書のポリペプチドにおいて使用するためのクロトーアルファクロトーコロナタントンパク質は、それぞれ配列番号：5または配列番号：37のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するアルファクロトーアルファクロトーコロナタントンパク質は、配列番号：5または配列番号：37のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を有し得る。クロトーアルファクロトーコロナタントンパク質は、また、それぞれ配列番号：6または配列番号：38のアミノ酸配列と実質的に同一であるアルファまたはベータクロトーアルファクロトーコロナタントンパク質は、配列番号：6または配列番号：38のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、クロトーアルファクロトーコロナタントンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメイン（例えば、KL-D1およびKL-D2、タンデムリピートにおけるKL-D1およびKL-D1、タンデムリピートにおけるKL-D2およびKL-D2など）を含む。

【0090】

本明細書において使用される「修飾されたFcフラグメント」は、修飾された配列を含む抗体のFcフラグメントを意味する。Fcフラグメントは、CH2、CH3およびヒジ領域の部分を含む抗体の一部である。修飾されたFcフラグメントは、例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4由来であり得る。FcLALAは、効率低下でADCを誘導し、弱くヒト補体に結合し、活性化するLALA変異（L234A、L235A）を有する修飾されたFcフラグメントであるHessellら 2007 Nature 449:101-104。Fcフラグメントに対するさらなる修飾は、例えば、米国特許第7,217,798号に記載されている。例えば、種々の修飾されたFcフラグメントにおいて、（a）アミノ酸残基250はグルタミン酸であり、アミノ酸残基428はフェニルアラニンである、または（b）アミノ酸残基250はグルタミンであり、アミノ酸残基428はフェニルアラニンである、または（c）アミノ酸残基250はグルタミンであり、アミノ酸残基428はロイシンである。いくつかの態様において、アミノ酸残基250および428は、アミノ酸残基250がグルタミン酸またはグルタミンであり、アミノ酸残基428がロイシンまたはフェニルアラニンである修飾されていないFc融合タンパク質において存在する残基が異なっており、アミノ酸残基は米国特許第7,217,798号に記載されているEU番号制により番号付けされる。いくつかの態様において、修飾されたFc-融合タンパ

10

20

30

40

50

ク質は、pH 8.0 でよりも pH 6.0 で FcRn に対するより高い親和性を有する。好ましくは、修飾された Fc フラグメントは、減少した FcRn に対する親和性および / もしくは増加した血清半減期を有する。修飾された Fc フラグメントの非限定的な例は、配列番号：47 の aa (アミノ酸) 1234 - 1459、配列番号：49 の aa 1234 から 1450、配列番号：51 の aa 257 から 482 および配列番号：53 の aa 257 から 473、ならびに、これらの配列と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上または 100% 同一である配列を含む。これらの配列をコードするヌクレオチドは、配列番号：46、48、50 および 52 において提供される。

【0091】

10

本明細書において使用される「シグナルペプチド」は、小胞体へのタンパク質の翻訳後輸送を指向して、切断され得るペプチド鎖 (3 - 60 アミノ酸長) を意味する。本明細書において使用するために例の典型的なシグナルペプチドはクロトーシグナルペプチド (配列番号：19) および IgG シグナルペプチド (配列番号：20) を含む。産生細胞系により分泌および開裂されると、シグナルペプチド (例えば、配列番号：19 および配列番号：20 に対応するペプチドの) は開裂されることに注意すること。したがって、産生細胞系によるシグナルペプチドの分泌および開裂後、配列番号：19 のペプチドは配列番号：41 のペプチドを產生する。

【0092】

20

本明細書において使用される「リンカー」は、互いに結合することができるよう、共有結合が 2 つ以上のポリペプチドまたは核酸を結合する機能の基 (例えば、化学物質またはポリペプチド) を意味する。本明細書において使用される「ペプチドリンカー」は、2 つのタンパク質を互いに結合する (例えば、クロトナーの細胞外ドメインおよび纖維芽細胞増殖因子 - 23 を結合する) ために使用される 1 つ以上のアミノ酸を意味する。本明細書において使用するために適当なペプチドリンカーは、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17 および配列番号：18 により示されているアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むが、これらに限定されない。ポリペプチドリンカーは、これらのアミノ酸配列のいずれかの少なくとも 1、最大約 30 の繰り返しを含み得る。

30

【0093】

本明細書において使用される「作動可能に連結している」は、生体分子と関連する生物学的機能、活性および / または構造を少なくとも保持することができるよう 2 つ以上の生体分子の結合を意味する。ポリペプチドに関して、該用語は、2 つ以上のポリペプチドの結合がそれぞれのポリペプチド成分の少なくともいくつかのそれぞれの個々の活性を保持する融合ポリペプチドとなることを意味する。2 つ以上のポリペプチドは直接、またはリンカーを介して結合し得る。核酸に関して、該用語は、適当な分子 (例えば、転写活性化タンパク質) が第 2 のポリヌクレオチドに結合しているとき、第 1 のポリヌクレオチドが第 1 のポリヌクレオチドの転写を指向する第 2 のポリヌクレオチドに隣接して配置されることを意味する。

40

【0094】

本明細書において使用される「特異的に結合する」は、第 1 の分子がそれ自体と他の標的分子間の非共有相互作用の形成をもたらす特定の構造を取ることができるために、第 1 の分子が暴露され得る多くの異なる型の分子の中から 1 つの標的分子に結合することができることを示す。第 1 の分子は安定な複合体を形成する標的に結合するが、他の何らかの非特異的な分子に対して、実質的にあまり、認識せず、接触せず、または第 1 の分子と複合体を形成しない。

【0095】

50

本明細書において使用される「ポリペプチド変異体」または「タンパク質変異体」は、1 つ以上のアミノ酸が参照配列から異なるアミノ酸により置換されているポリペプチドを

示す。いくつかのアミノ酸が、以下に記載されているポリペプチド（保存的置換）の活性の性質を変化することなく広範に同様の性質を有して、他のものにより置換され得ることは当分野で理解されている。これらの用語は、また、1つ以上のアミノ酸が付加されたか、もしくは欠失されたか、または異なるアミノ酸で置換されたポリペプチド、例えば、タンパク質アイソフォームを包含する。本明細書において使用するために適当な纖維芽細胞増殖因子-23の変異体の例は、纖維芽細胞増殖因子-23変異体（R179Q）である。

【0096】

本明細書において使用される「医薬組成物」は、個体における疾患または障害を処置または予防するために投与され得る化合物（例えば、本明細書の融合ポリペプチド）を含む組成物を意味する。10

【0097】

本明細書において使用される「個体」または「対象」は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えば、ウシ、ウマ、イヌ、ヒツジまたはネコを含むが、これらに限定されない哺乳動物を示す。

【0098】

本明細書において使用される「処置」は、疾患の発症または進行を減少、抑制、減衰、軽減、阻止または安定させることを意味する。本明細書との関係において、本明細書のポリペプチドの投与は、サルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチントン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、期待寿命の低下、記憶障害、しわ、腎機能障害および加齢関連難聴を含む加齢関連状態、ならびにⅠⅠ型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖および肥満を含む代謝障害を処置するために使用され得る。20

【0099】

本明細書において使用される「予防」は、対象における障害の発症を減少させる、または障害またはそれに関連する症状を有する危険性を減少させることを意味する。本明細書との関係において、本明細書のポリペプチドの投与は、サルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチントン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、期待寿命の低下、記憶障害、しわ、腎機能障害および加齢関連難聴を含む加齢関連状態、ならびにⅠⅠ型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖および肥満を含む代謝障害を予防するために使用され得る。予防は、加齢関連状態または代謝障害の完全な、例えば、全体の欠如であり得る。予防は、また、対象における加齢関連状態または代謝障害の発症の可能性が本明細書を受けていない対象よりも発症する可能性を低くするような、部分的なものであり得る。30

【0100】

本明細書において使用される「疾患」は、細胞、組織または臓器の正常機能を損なう、または妨げるすべての状態または障害を意味する。

【0101】

本明細書において使用される「加齢関連状態」は、母集団における発生率または個体における重症度が年齢の進行と関連があるすべての疾患または障害を意味する。1つの態様において、加齢関連状態は、100,000個体以上の選択された母集団中で、30-40歳のヒト個体と比較して60歳以上のヒト個体中で発生率が少なくとも1.5倍である疾患または障害である。本明細書に関連する加齢関連状態は、サルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチントン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、期待寿命の低下、記憶障害、しわ、腎機能障害および加齢関連難聴を含むが、これらに限定されない。40

【0102】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される「代謝障害」は、細胞におけるエネルギー生産または細胞、組織、臓器もしくは個体における毒素の蓄積に影響することにより、細胞、組織または臓器における正常機能を損なう、または妨げるすべての疾患または障害を意味する。本明細書に関する代謝障害は、ⅠⅠ型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖および肥満を含むが、これらに限定されない。

【0103】

「有効用量」または「有効量」は、有益な、または望ましい臨床結果をもたらすために十分な量である。本明細書との関係において、それは、意図された薬理学的、治療または予防結果を引き起こすために十分なクロトーアイソフォーム融合ポリペプチドまたはsクロトーアイソフォームの量である。治療有効用量は、障害または障害の1つ以上の症状（例えば、加齢関連状態または代謝障害）の予防または改善をもたらす。治療有効用量は、対象および処置される疾患状態、対象の体重および年齢、疾患状態の重症度、投与様式などに依存して変化し、当業者によって容易に決定することができる。

10

【0104】

本明細書において使用される「クロトーアイソフォーム」は、クロトーアンパク質をコードする遺伝子である。例のヒトクロトーアイソフォームは、GenBank受入番号NM_004795（配列番号：1）で提供される。クロトーアイソフォームのさらなる非限定的な例は、配列番号：47のaa1-982および配列番号：49のaa1-982、ならびに、これらの配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上または100%同一である配列で提供される。

20

【0105】

本明細書において使用される「フラグメント」は、ポリペプチドまたは核酸分子の一部を示す。この一部は、好ましくは、参照核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上を含む。フラグメントは10、20、30、40、50、60、70、80、90または100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000または最大3000ヌクレオチドまたはアミノ酸を含み得る。

20

【0106】

「実質的に同一」なる用語は、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載されているアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（例えば、本明細書に記載されている核酸配列のいずれか1つ）と少なくとも50%同一性を示すポリペプチドまたは核酸分子を示す。好ましくは、このような配列は、アミノ酸レベルまたは核酸において、比較のために使用される配列と少なくとも60%、70%、75%、80%または85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一である。

30

【0107】

本明細書は、加齢関連状態および代謝障害を予防または処置するための方法、キットおよび組成物、および病理学的疾患の治療における使用のための、または、処置における使用のための医薬としての、該組成物の使用に関する。いくつかの態様において、本明細書は、クロトーアンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを有する融合ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、線維芽細胞増殖因子またはその活性なフラグメントをさらに含む。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。他の態様において、融合ポリペプチドは、修飾されたFc（例えば、FcLALA）に融合したFGF（例えば、FGF19、FGF21、FGF23またはFGF23変異体R179Q）を含む。FcLALAは、効率低下でADCCを誘導し、弱くヒト補体に結合し、活性化するLALA変異（L234A、L235A）を有するFcフラグメントである。クロトーアイソフォームのFc成分はアルファまたはベータクロトーアイソフォームのいずれか由来であり得る。さらに、クロトーアイソフォームのFGF成分は線維芽細胞増殖因子-19、線維芽細胞増殖因子-21およ

40

50

および纖維芽細胞増殖因子 - 23 に関して主に記載されているが、23の既知の FGF またはそれらの活性なフラグメントのすべてが本明細書の実施において使用することができると考えられる。

【0108】

クロトータンパク質の細胞外ドメインは、クロトータンパク質の KL-D1 および KL-D2 ドメインの 1つまたは両方を含むことができる。いくつかの態様において、クロトー融合ポリペプチドは、クロトータンパク質の少なくとも 2つの細胞外サブドメインを有する。例えば、少なくとも 2つの細胞外サブドメインは、タンデムリピートにおける少なくとも 2つの KL-D1 ドメイン、タンデムリピートにおける少なくとも 2つの KL-D2 ドメイン、または少なくとも 1つの KL-D1 ドメインおよび少なくとも 1つの KL-D2 ドメインであり得る。10

【0109】

クロトータンパク質の細胞外サブドメインおよび纖維芽細胞増殖因子（またはそれらの活性なフラグメント）は、種々の方向および様式において互いに作動可能に連結することができる。例えば、クロトータンパク質の細胞外サブドメインは纖維芽細胞増殖因子の N-末端に作動可能に連結されていてよく、あるいは纖維芽細胞増殖因子はクロトータンパク質の少なくとも 1つの細胞外サブドメインの N-末端に作動可能に連結されていてよい。

【0110】

本明細書の融合ポリペプチドは、クロトー細胞外ドメイン、すなわち、KL-D1（配列番号：5）および KL-D2（配列番号：6）の 1つまたは両方を含み得る。KL-D1 および KL-D2 は、それぞれ全長アルファクロトーポリペプチド（配列番号：2）のアミノ酸残基 58-506 および 517-953 ならびに全長ベータクロトーポリペプチド（配列番号：4）のアミノ酸残基 77-508 および 571-967 に対応し、本明細書において使用するために適当である。クロトー融合ポリペプチドは、配列番号：5 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するアルファクロトーポリペプチドまたは配列番号：37 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するベータクロトーポリペプチドの KL-D1 ドメインを有し得る。具体的には、クロトー融合ポリペプチドは、配列番号：5 または配列番号：37 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を有し得る。クロトー融合ポリペプチドは、配列番号：6 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するアルファクロトーポリペプチドまたは配列番号：38 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を有するベータクロトーポリペプチドの KL-D2 ドメインを有し得る。具体的には、クロトー融合ポリペプチドは、それぞれ配列番号：6 または配列番号：38 と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を有し得る。2030

【0111】

いくつかの態様において、本明細書のクロトー融合ポリペプチドは可溶性であり、FGF 受容体に結合することができる。40

【0112】

本明細書のクロトー融合ポリペプチドは、クロトータンパク質の少なくとも 1つの細胞外サブドメインを有するポリペプチドおよび纖維芽細胞増殖因子および（任意の）修飾された Fc フラグメントを接続するポリペプチドリンカーを含むことができる。適当なリンカーは当分野で既知であり、一般的にいくつかの Gly およびいくつかの Ser 残基、例えば、(Gly₄ Ser)₃（配列番号：11）、Gly₄ Ser ポリペプチド（配列番号：12）、Gly（配列番号：13）、Gly Gly（配列番号：14）、Gly Ser（配列番号：15）、Gly₂ Ser（配列番号：16）、Ala（配列番号：17）および Ala Ala（配列番号：18）を含む。いくつかの態様において、リンカーは配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18 を含む。また、他のアミノ酸を含む場合、アミノ酸の組合せは、アミノ酸の種類とその数を考慮して適切に選択される。50

号：16、配列番号：17または配列番号：18のいずれかに記載されているアミノ酸配列の少なくとも2から最大約30までの繰り返しを有する。

【0113】

ポリペプチドリンカーが本明細書のクロト-融合ポリペプチドに存在するとき、クロト-タンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを有するポリペプチドは、ポリペプチドリンカーのC-末端にペプチド結合により接続されているFGFと、リンカーポリペプチドのN-末端にペプチド結合により接続されているよい。あるいは、FGFは、ポリペプチドリンカーのC-末端にペプチド結合により接続されている、クロト-の少なくとも1つの細胞外サブドメインを有するポリペプチドと、リンカーポリペプチドのN-末端にペプチド結合により接続されているよい。化学的リンカーが、また、2つのポリペプチドを連結するために使用することができる。

10

【0114】

本明細書のクロト-融合ポリペプチドはシグナルペプチドを含み得る。クロト-融合ポリペプチドにおいて使用するためのシグナルペプチドの例は、クロト-シグナルペプチド（配列番号：8）およびIgGシグナルペプチド（配列番号：9）を含むが、これらに限定されない。

【0115】

いくつかの態様において、本明細書は、FGF（例えば、FGF19、FGF21、FGF23またはFGF23変異体R179Q）および修飾されたFc（例えば、FcLA-LA）間の融合ポリペプチドを提供する。融合ポリペプチドはまた、所望によりFGFおよびFc部分間のリンカーを含み得る。融合ポリペプチドはまた、所望によりシグナルペプチドを含み得る。種々の態様において、本明細書は、これらの融合ポリペプチドをコードする核酸、これらの核酸を含むベクターおよびこれらの核酸を含む宿主細胞を含む。

20

【0116】

4.1. クロト-および纖維芽細胞増殖因子ポリペプチド

本明細書のクロト-融合ポリペプチドは、天然のFGFに相当する生物学的活性を示す、例えば、FGF受容体に結合し、FGF受容体、FRS2（FGF受容体基質2）およびERK1/2（細胞外シグナル-調節タンパク質キナーゼ1/2）のリン酸化を誘導し、Egr-1（初期増殖応答-1）遺伝子を活性化させることが期待される。FGFは、FGF受容体に結合する分泌ペプチド増殖因子である。FGFのアミノ酸および核酸配列は、当業者が容易に利用することができる。例えば、例のFGF19、FGF21およびFGF23の核酸配列（配列番号：30、32および34として本明細書に記載されている）は、GenBankデータベースにおいて、それぞれアクセションナンバー：NM_005117、NM_019113およびNM_020638の下に見出すことができる。例のFGF19、FGF21およびFGF23のアミノ酸配列（配列番号：31、33および35として本明細書に記載されている）は、GenBankデータベースにおいて、それぞれアクセションナンバー：NP_005108、NP_061986およびNP_065689の下に見出すことができる。さらに、FGFはタンパク質の発現に役立つ1つ以上の変化を含み得る（例えば、FGF23（R179Q）変異体（配列番号：36））。

30

【0117】

クロト-タンパク質は、細胞外ドメインおよび短い細胞質ドメインを有する130kDaの1回膜貫通型タンパク質である。クロト-のアミノ酸および核酸配列は、当業者が容易に利用することができる。例えば、例のアルファ-クロト-およびベータ-クロト-の核酸配列（配列番号：7および8として本明細書に記載されている）は、GenBankデータベースにおいて、それぞれアクセションナンバー：NM_004795およびNM_175737の下に見出すことができる。例のアルファ-クロト-およびベータ-クロト-のアミノ酸配列（配列番号：2および4として本明細書に記載されている）は、GenBankデータベースにおいて、それぞれアクセションナンバー：NP_004786およびNP_783864の下に見出すことができる。

40

50

【0118】

本明細書のクロトーコロトーコロトー融合ポリペプチドは、纖維芽細胞増殖因子受容体に結合することができ、纖維芽細胞増殖因子-19（配列番号：31）、纖維芽細胞増殖因子-21（配列番号：33）、纖維芽細胞増殖因子-23（配列番号：35）またはそれらの変異体（纖維芽細胞増殖因子-23変異体（R179Q）（配列番号：36）を含む）のいずれかに作動可能に連結しているアルファ-クロトーコロトーコロトー細胞外ドメインを有する。

【0119】

具体的には、本明細書のクロトーコロトーコロトー融合ポリペプチドは、纖維芽細胞増殖因子-23（配列番号：35）または纖維芽細胞増殖因子-23変異体（R179Q）（配列番号：36）に作動可能に連結しているアルファ-クロトーコロトー（配列番号：2）を含み得る。さらに、本明細書のクロトーコロトーコロトー融合ポリペプチドは、纖維芽細胞増殖因子-19（配列番号：31）に作動可能に連結しているベータ-クロトーコロトー（配列番号：4）を有し得る。本明細書のクロトーコロトーコロトー融合ポリペプチドは、纖維芽細胞増殖因子-21（配列番号：33）に作動可能に連結しているベータ-クロトーコロトー（配列番号：4）を含み得る。

10

【0120】

本明細書は、種々のクロトーコロトーコロトーおよびFGF遺伝子およびこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質のホモログを含む。遺伝子に関して、「ホモログ」は、遺伝子の少なくとも一部と実質的に同一である核酸配列もしくはその相補鎖またはそれらの一部を意味する、ただし、核酸配列が遺伝子によってコードされるタンパク質と実質的に同じ活性／機能を有するタンパク質をコードする。本明細書に記載されている遺伝子のホモログは、推定ホモログのアミノ酸または核酸配列と遺伝子またはそれらによってコードされるタンパク質配列間の同一性パーセントにより同定することができる（例えば、クロトーコロトーコロトーおよびFGFをコードする遺伝子に対する核酸配列またはそれらの相補鎖）。同一性パーセントは、例えば、視覚的検査により、または当分野で既知の、または本明細書に記載されている種々のコンピュータープログラムを使用することにより測定され得る。配列同一性は、一般的に、配列分析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST, BESTFIT, GAPまたはPILEUP/Prettyboxプログラム）を使用して測定される。このようなソフトウェアは、種々の置換、欠失および／または他の修飾に関して相同性の程度を割り当てることにより、同一または同様の配列を合わせる。保存アミノ酸置換は、一般的に、以下のグループ内の置換を含む。

20

グリシンおよびアラニン、

バリン、イソロイシンおよびロイシン、

アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンおよびグルタミン、

セリンおよびスレオニン、

リジンおよびアルギニン、ならびに

フェニルアラニンおよびチロシン。

30

【0121】

したがって、アラニンへのグリシンの変異、グリシンへのアラニンの変異、イソロイシンまたはロイシンへのバリンの変異、イソロイシンのバリンまたはロイシンでの置換、ロイシンのバリンまたはイソロイシンでの置換などは、保存アミノ酸置換である。本明細書は、少なくとも1つの保存アミノ酸置換を有する本明細書に記載されている全てのアミノ酸配列の変異体を提供する。

40

【0122】

同一性の程度を測定するための手段の例において、密接な関連配列を示すプロバビリティスコア e^{-3} から e^{-100} を使用するBLASTプログラムが使用され得る。

【0123】

1つの態様において、本明細書は、配列番号：19の融合ポリペプチドを提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：20の融合ポリペプチドを提供する。

50

1つの態様において、本明細書は、配列番号：40の融合ポリペプチドを提供する。
別の態様において、本明細書は、配列番号：41の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

1つの態様において、本明細書は、配列番号：46の融合ポリペプチドを提供する。
別の態様において、本明細書は、配列番号：47の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：48の融合ポリペプチドを提供する。
別の態様において、本明細書は、配列番号：49の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する

1つの態様において、本明細書は、配列番号：50の融合ポリペプチドを提供する。 10
別の態様において、本明細書は、配列番号：51の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

1つの態様において、本明細書は、配列番号：52の融合ポリペプチドを提供する。
別の態様において、本明細書は、配列番号：53の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：54の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

【0124】

別の態様において、本明細書は、配列番号：55の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。 20

別の態様において、本明細書は、配列番号：56の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：57の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：58の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：59の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：60の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。 30

別の態様において、本明細書は、配列番号：61の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：62の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：63の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

【0125】

別の態様において、本明細書は、配列番号：64の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：65の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。 40

別の態様において、本明細書は、配列番号：66の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：67の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

別の態様において、本明細書は、配列番号：68の融合ポリペプチドまたは少なくとも1つの保存アミノ酸置換を含むその変異体を提供する。

【0126】

本明細書において使用される「相同性」および「相同」なる用語は、理論上共通の遺伝的先祖を有するタンパク質を示すことに限定せず、進化した遺伝的に関連し得ないが、そ

れにもかかわらず、同様の機能を行い、および／または同様の構造を有するようなタンパク質を含む。本明細書に記載されている機能的相同性の種々のタンパク質は、また、ホモログである対応するタンパク質の活性を有するタンパク質を含む。機能的相同性を有するタンパク質に関して、それらがそれらのアミノ酸配列において有意な同一性を有する必要はなく、むしろ、機能的相同性を有するタンパク質は同様の、または同一の活性を有することにより定義される。例えば、クロトー分子に関して、ポリペプチドは F G F ポリペプチドへの結合の機能的特徴と有し、F G F R への F G F の結合が可能であるべきである。F G F 分子に関して、ポリペプチドは F G F R に結合し、F G F R の活性化（例えば、リン酸化）を引き起こす機能的特徴を有するべきである。F G F 受容体への F G F 結合および／または F G F シグナル伝達経路の活性化を評価するためのアッセイは、当分野で既知であるか、または本明細書に記載されている（実施例 2 参照）。クロトー活性を評価するためのアッセイも、当分野で既知であるか、本明細書に記載されている（例えば、F G F ポリペプチドへの結合）。構造的相同性を有するタンパク質は、類似の三次（または四次）構造を有するものとして定義されるが、それらをコードする遺伝子に対するアミノ酸同一性または核酸同一性は必ずしも必要ではない。ある特定の状況では、構造的ホモログはタンパク質の活性部位または結合部位のみで構造的相同性を維持するタンパク質を含み得る。

10

【0127】

構造的および機能的相同性に加えて、本明細書は、さらに本明細書に記載されている種々のクロトーおよび F G F アミノ酸配列とアミノ酸同一性を有するタンパク質を包含する。2つのアミノ酸配列の同一性／相同性パーセントを決定するために、該2つの配列を最適な比較目的のために並べる（例えば、一方のタンパク質のアミノ酸配列と最適なアライメントのために、ギャップをもう一方のタンパク質のアミノ酸配列に導入することができる）。次に、対応するアミノ酸位置のアミノ酸残基を比較する。一方の配列の位置がもう一方の配列の対応する位置に同じアミノ酸残基が存在するとき、それらの分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、配列において共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、% 同一性 = 同一の位置の # / 位置の全 # × 100）。

20

【0128】

本明細書に記載されている本明細書の分子のアミノ酸配列は、本明細書に記載されているアミノ酸配列と少なくとも約 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上同一または相同であるアミノ酸配列を有する。

30

【0129】

本明細書に記載されている本明細書の分子の核酸配列は、本明細書に記載されている核酸配列とハイブリダイズするか、または本明細書に記載されている核酸配列と少なくとも約 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上同一または相同である核酸配列を有する。

40

【0130】

本明細書の融合ポリペプチドにおいて使用するために適当な核酸分子は、ストリンジエント条件下で、クロトーまたは F G F をコードする核酸分子の相補体にハイブリダイズするクロトーまたは F G F 核酸配列を有し得る。本明細書において使用される「ストリンジエント条件下ハイブリダイズする」なる用語は、互いに少なくとも約 70%、80%、85%、90% 以上相同である核酸配列が一般的に互いにハイブリダイズの維持下にて、ハイブリダイゼーションおよび洗浄する条件を表すことを意図する。このようなストリンジエント条件は当業者に既知であり、Ausubel ら Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York (2001), 6.3.1-6.3.6において見出すことができる。特定の非限定的な例のストリンジエントハイブリダイゼーション条件は、6 × 塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム (SSC) 中で約 4.5 でハイブリダイゼーション、次に 0.2 × SSC、0.1% の SDS 中で 5.0 - 6.5 での 1 回以上の洗浄である。

【0131】

4.2. 本明細書のクロトー - F G F 融合ポリペプチド

50

本明細書のいくつかの態様において、クロトーアンチボディ融合ポリペプチドは、クロトーアンチボディの第1のポリペプチド配列またはそれらの活性なフラグメントおよびFGFをコードする第2のポリペプチド配列またはそれらの活性なフラグメントを有するポリペプチド鎖を有する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。

【0132】

本明細書は、配列番号：19-28に存在するアミノ酸配列と少なくとも約95%以上相同である融合ポリペプチドを含む。配列番号：19のアミノ酸配列は、FGF23(R179Q)変異体(配列番号：36)のN-末端に結合しているクロトーアンチボディドメインを有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：20のアミノ酸配列は、FGF23(R179Q)変異体のN-末端に結合しているシグナルペプチドを欠いているクロトーアンチボディドメインのN-末端に結合しているIgGシグナルペプチドを有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：21のアミノ酸配列は、FGF23(R179Q)変異体のN-末端に結合しているKL-D1細胞外サブドメインを有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：22のアミノ酸配列は、FGF23(R179Q)変異体のN-末端に結合しているKL-D2細胞外サブドメインを有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：23のアミノ酸配列は、FGF23(R179Q)変異体のN-末端に結合している2つのKL-D1細胞外サブドメインを有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：24のアミノ酸配列は、FGF23(R179Q)変異体のN-末端に結合している2つのKL-D2細胞外サブドメインを有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：25のアミノ酸配列は、クロトーアンチボディドメインのN-末端に結合しているFGF23(R179Q)変異体を有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：26のアミノ酸配列は、KL-D1細胞外サブドメインのN-末端に結合しているFGF23(R179Q)変異体を有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：27のアミノ酸配列は、KL-D2細胞外サブドメインのN-末端に結合しているFGF23(R179Q)変異体を有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：28のアミノ酸配列は、2つのKL-D1細胞外サブドメインのN-末端に結合しているFGF23(R179Q)変異体を有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。配列番号：29のアミノ酸配列は、2つのKL-D2細胞外サブドメインのN-末端に結合しているFGF23(R179Q)変異体を有するクロトーアンチボディ融合ポリペプチドをコードする。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。

【0133】

本明細書のクロトーアンチボディ融合ポリペプチドは、配列番号：7に記載されているアミノ酸配列と少なくとも約95%同一であるアミノ酸配列を含み得る。配列番号：7のアミノ酸配列はシグナルペプチドを欠いているクロトーアンチボディドメインをコードする。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。

【0134】

対象融合タンパク質は本明細書に記載されており、当分野で既知の方法を使用して製造することができる。例えば、本明細書の融合ポリペプチドは、米国特許第6,194,177号に記載されているとおりに構築され得る。クロトーアンチボディ融合ポリペプチドの使用は、米国特許第6,579,850号に記載されている。FGF核酸分子の使用は、米国特許第7,223,563号に記載されている。

【0135】

いくつかの態様において、クロトーアンチボディ融合ポリペプチドは、PCRによりクローニングされ、インフレームで、FGFをコードする核酸分子と結合される。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントをさらに含む。

10

20

30

40

50

しくは増加した血清半減期を有する修飾された F c フラグメントをさらに含む。融合ポリペプチドをコードする核酸は、発現を可能にするプロモーターに作動可能に連結している。次に、融合ポリペプチドをコードする核酸分子を発現のための宿主細胞にトランسفクトする。最終構築物の配列はシーケンシングにより確認することができる。

【 0 1 3 6 】

本明細書の融合タンパク質を製造するとき、クロトナーの細胞外サブドメインをコードする核酸分子を、インフレームで F G F をコードする核酸分子および修飾された F c フラグメントをコードする（任意の）核酸に融合する。得られた核酸分子の発現は、F G F ポリペプチドに関して N - 末端で融合しているクロトナーの細胞外サブドメインを生じる。融合物は、クロトナーの細胞外サブドメインが F G F ポリペプチドに関して C - 末端で融合しているものも可能である。融合タンパク質を製造するための方法は当分野で既知である。10

【 0 1 3 7 】

本明細書の融合ポリペプチドは、一方のポリペプチドが 1 つのタンパク質配列またはドメイン、例えばクロトナー由来であり、そして、もう一方のポリペプチドが別のタンパク質配列またはドメイン、例えば F G F 由来である、共有結合されてた少なくとも 2 つのポリペプチドを有する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、減少した F c - ガンマ - 受容体に対する親和性および / もしくは増加した血清半減期を有する修飾された F c フラグメントをさらに含む。別の態様において、本明細書は、修飾された F c フラグメントに融合した F G F を含む。本明細書の融合ポリペプチドのクロトナーおよび / または F G F および / または（任意の）修飾された F c フラグメントは、当業者によく知られている方法により連結することができる。これら的方法は化学的および組換え方法両方を含む。20

【 0 1 3 8 】

本明細書の融合ポリペプチドに組み込まれるドメインをコードする核酸は、組換え遺伝の分野における通常の技術を使用して得ることができる。本明細書において使用される一般的な方法を記載している基本的な文献は、Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); および Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel ら eds., 1994-1999) を含む。本明細書のクロトナー融合ポリペプチドをコードする核酸において、配列番号： 1 および配列番号： 3 それぞれにより示されているアルファ - クロトナーまたはベータ - クロトナーをコードする核酸配列が使用され得る。クロトナー融合ポリペプチドをコードする核酸において、配列番号： 3 0 、配列番号： 3 2 および配列番号： 3 4 それぞれにより示されている F G F 1 9 、 F G F 2 1 または F G F 2 3 をコードする核酸配列が使用され得る。本明細書に記載されている本明細書の分子の核酸配列は、配列番号： 1 、配列番号： 3 、配列番号： 3 0 、配列番号： 3 2 または配列番号： 3 4 とハイブリダイズするか、または少なくとも約 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % またはそれ以上同一または相同である核酸配列を含む。30

【 0 1 3 9 】

融合物の種々の成分 [クロトナーおよび / または F G F ペプチドおよび / または（任意の）修飾された F c フラグメント] をコードする核酸配列は、種々の方法のいずれかを使用して得ることができる。例えば、ポリペプチドをコードする核酸配列は、プローブとのハイブリダイゼーションにより c DNA およびゲノム DNA ライブライマーからクローニングされるか、またはオリゴヌクレオチドプライマーとの增幅技術を使用して単離され得る。より一般的には、増幅技術は DNA または RNA 鑄型を使用してクロトナーおよび F G F 配列を増幅および単離するために使用される（例えば、Dieffenbach & Dveksler, PCR Primers: A Laboratory Manual (1995) 、参照）。あるいは、重複オリゴヌクレオチドは合成的に生産し、1 つ以上のドメインを生産して連結することができる。クロトナーまたは F G F をコードする核酸は、また、プローブとして抗体を使用して発現ライブラリーから単離することができる。40

【 0 1 4 0 】

本明細書において、融合物の種々の成分 [クロトナー、および / または F G F および / ま

10

20

30

40

50

たは（任意の）修飾された Fc フラグメント] は、アミノ酸リンカーを含む共有結合リンカ、例えば、ポリグリシンリンカ、または炭水化物リンカ、脂質リンカ、脂肪酸リンカ、ポリエーテルリンカを含む別のタイプの化学リンカ、例えば、PEG などで直接、または、それらを介してのいずれかで連結することができる（例えば、Hermanson, Bioconjugate techniques (1996)、参照）。融合物 / 融合ポリペプチドを形成するポリペプチドは、一般的に、C - 末端から N - 末端に連結するが、それらは、C - 末端から C - 末端、N - 末端から N - 末端または N - 末端から C - 末端に連結することもできる。1つ以上のポリペプチドドメインが、本明細書の融合ポリペプチド内の内部の位置に挿入され得る。融合タンパク質のポリペプチドは任意の順番であり得る。融合ポリペプチドは、隣接して融合タンパク質をコードする組換えポリヌクレオチドを製造することにより、1つのタンパク質配列からのアミノ酸鎖、例えば、クロトーの細胞外サブドメインと別のタンパク質配列からのアミノ酸鎖、例えば、FGF の共有結合により生産され得る。融合タンパク質におけるアミノ酸の異なる鎖は、互いに直接的にスプライシングされるか、化学結合基またはアミノ酸結合基を介して互いに間接的にスプライシングされ得る。アミノ酸結合基は、約 200 以上のアミノ酸長または一般的に 1 から 100 アミノ酸長であり得る。いくつかの態様において、プロリン残基がリンカに組み込まれ、リンカによる重要な二次構造成分の構成を妨げる。リンカは、しばしば、組換え融合タンパク質の一部として合成されるフレキシブルなアミノ酸部分配列であり得る。このようなフレキシブルなリンカは当業者に既知である。

10

20

30

【0141】

本明細書において、融合物 [クロトーの細胞外サブドメインおよび / または FGF および / または（任意の）修飾された Fc フラグメント] のアミノ酸配列は、ペプチドリンカを介して連結されていてもよい。例のペプチドリンカは当分野で既知であり、本明細書に記載されている。例えば、ペプチドリンカは、一般的に、いくつかの Gly およびいくつかの Ser 残基、例えば：(Gly₄ Ser)₃（配列番号：11）、Gly₄ Ser ポリペプチド（配列番号：12）、Gly（配列番号：13）、Gly Gly（配列番号：14）、Gly Ser（配列番号：15）、Gly₂ Ser（配列番号：16）、Ala（配列番号：17）および Ala Ala（配列番号：18）を含む。特に、本明細書の融合タンパク質において使用するためのペプチドリンカは、フレキシブルなヒンジとして作用し得る。

30

【0142】

クロトーまたは FGF のシグナル配列は、本明細書の融合タンパク質へのクロトーの導入前に、除去され得る。融合タンパク質のクロトーまたは FGF に対するシグナル配列は、例えば、配列番号：19 により示されているポリペプチドを含み得る。しかしながら、このような配列は、また、除去されるか、または異なるタンパク質のシグナル配列、例えば、IgG シグナル配列（配列番号：9）で置き換えられ得る。一般的に、本明細書の医薬組成物はクロトーおよび FGF の成熟形態を含む。

40

【0143】

一般的に、イントロンは、融合ポリペプチドへの導入の前に、クロトーまたは FGF 部分のいずれか 1 つまたは両方から除外される。

40

【0144】

本明細書の融合ポリペプチドは、1つ以上の活性アミノ酸側鎖に共有結合した 1 つ以上のポリマーを含み得る。非限定的な例として、このようなポリマーは、1つ以上の遊離のシステインスルフヒドリル残基と結合することができるポリエチレンギリコール（PEG）を含み、それにより、タンパク質が酸化条件に暴露されたとき、ジスルフィド結合および凝集の形成をブロックすることができる。加えて、本明細書の融合ポリペプチドのペグ化は、半減期、溶解度およびプロテアーゼ抵抗性の増加のようなこのような改良された特性を提供することができる。あるいは、本明細書の融合ポリペプチドは、遊離アミノ基、例えば、リシンイップシロンまたは N - 末端アミノ基へのポリマーの共有結合的付加により修飾され得る。共有結合修飾に対して特定の特異的なシステインおよびリシンは、受

50

容体結合、ヘパリン結合または適当なタンパク質フォールディングに関連しないものある。特定のアミノ酸残基の修飾が望ましいタンパク質の活性に影響するか否かを測定するために、融合ポリペプチドの生化学的および／または生物学的活性をアッセイするための方法が使用され得ることは、当業者に明らかである。他の同様の適当な修飾が考えられ、当分野で既知である。

【0145】

本明細書は、また、配列番号：19-28に存在するアミノ酸配列と少なくとも約95%以上相同である融合ポリペプチドの発現に関する。

【0146】

本明細書は、(a)クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインまたはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチド、(b)線維芽細胞増殖因子またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチド、および(c)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および／もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメントを含む融合ポリペプチドを含む。「それらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体」は、生物学的活性を保持するが、対応する野生型ポリペプチドよりも長い、より短いまたは改変されたアミノ酸配列を含む変異体もしくは誘導体を意味する。したがって、クロトータンパク質の細胞外サブドメインまたは線維芽細胞増殖因子の「機能的に活性な変異体もしくは誘導体」は、野生型ポリペプチド配列の少なくとも1つの生物学的活性を保持するが、野生型クロトータンパク質の細胞外サブドメインまたは線維芽細胞増殖因子よりもより少ない、より多いまたは改変されたアミノ酸配列を含む。本明細書に記載されているポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体はまた、翻訳後修飾(例えば、ペグ化、メチル化および／またはグリコシル化)において変化しているか、またはそれに加えられたさらなる部分または因子を有するが、本明細書に記載されているポリペプチドの同じアミノ酸配列を含み得る。種々の態様において、FGF23の変異体もしくは誘導体は、R179Qを含むか、または含まない。

10

20

30

40

【0147】

1つの態様において、機能的に活性な変異体もしくは誘導体ポリペプチドは、本明細書に記載されている配列(例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインまたは線維芽細胞増殖因子)と少なくとも約60%同一であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、ポリペプチドは、本明細書に記載されている配列と少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%またはそれ以上同一である。

【0148】

本明細書において使用される2つのアミノ酸配列(または2つの核酸配列)の同一性パーセントは、KarlinおよびAltschul(PNAS USA 87:2264-2268, 1990)のアルゴリズムを使用して決定され、Karlin and Altschul, PNAS USA 90:5873-5877, 1993)において修飾される。このようなアルゴリズムは、Altschulら(J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で行われる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3で行われる。比較目的のためのギャップアラインメントを取得するために、Gapped BLASTを、Altschulら(Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997)に記載されているとおりに利用し得る。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用するとき、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを、本発明の核酸分子に対して相同的なヌクレオチド配列を得るために使用し得る。

【0149】

同一性または同一は、アミノ酸配列(または核酸配列)類似性を意味し、当分野で認識される意味を有する。同一性を有する配列は、同一の、または同様のアミノ酸(または核酸)を共有する。したがって、参照配列と85%のアミノ酸配列同一性を共有する候補配

50

列が、参照配列と候補配列の以下のアラインメントの後に、候補配列における 85 % のアミノ酸が、参照配列における対応するアミノ酸と同一であり、そして / または保存アミノ酸変化を構成することを必要とする。

【0150】

本明細書に記載されているポリペプチドの機能的に活性な変異体は、元のポリペプチドまたはフラグメントの実質的に同じ機能活性を保持する。天然機能的に活性な変異体、例えば、対立遺伝子変異体および種変異体および非天然機能的に活性な変異体は、本発明において含まれ、例えば、変異誘発技術または直接合成により生産することができる。

【0151】

機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、本明細書に記載されているポリペプチドから約または少なくとも、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60 またはそれ以上のアミノ酸残基で異なっている。この比較がアラインメントを必要とするとき、配列は最大相同性となるようにアラインされる。変異部位は、本明細書に記載されているポリペプチドと実質的に同様の活性を有する限り、ポリペプチド中どこでも起こり得る。

【0152】

表現型でサイレントアミノ酸置換を有する変異体および誘導体を作製する方法についての案内は、Bowieら Science, 247:1306-1310 (1990)において提供され、これは、アミノ酸配列の変化への耐用性を研究するための 2 つの主な戦略があることを教示している。

【0153】

第 1 の戦略は、進化の過程の自然選択によるアミノ酸置換の耐用性を利用する。異なる種中のアミノ酸配列を比較することにより、種間で保存されているアミノ酸位置を同定することができる。例えば、図 5 参照。これらの保存されたアミノ酸は、タンパク質機能のために重要であろう。対照的に、置換が自然選択によって耐用性であるアミノ酸位置は、タンパク質機能に重要でない位置を示す。したがって、アミノ酸置換に耐用性である位置は修飾することができるが、ポリペプチドの特定の結合活性を維持している。

【0154】

第 2 の戦略は、タンパク質機能に重要である領域を同定するために、クローン遺伝子の特定の位置にアミノ酸変化を導入する遺伝子操作を使用する。例えば、部位特異的変異誘発またはアラニン - スキャン変異誘発（分子中の全ての残基において単一のアラニン変異の導入）を使用することができる（Cunninghamら Science, 244:1081-1085 (1989)）。

【0155】

タンパク質のアミノ酸に変異を導入する方法は、当業者によく知られている。例えば、Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 参照。変異もまた、市販のキット、例えば、「QuikChange.TM. Site-Directed Mutagenesis Kit」(Stratagene)を使用して導入することができる。ポリペプチドに対してポリペプチドの機能に影響しないアミノ酸を置換することによるポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体の產生は、当業者により成し遂げることができる。

【0156】

変異体または誘導体は、例えば、少なくとも 1 つの生物学的活性を保持する 1 つ以上の保存的置換を有し得る。保存的置換は、ペプチド化学の当業者が、ポリペプチドの二次構造および水に対する性質が実質的に変化しないと予期されるように、アミノ酸を同様の特性を有する別のアミノ酸に置換された置換である。一般的に、アミノ酸の以下のグループは保存変化を示す：(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr、(2) cys、ser、tyr、thr、(3) val、ile、leu、met、ala、phe、(4) lys、arg、his、および(5) phe、tyr、trp、his。

10

20

30

40

50

【0157】

変異体および誘導体の特定の例は、限定はしないが、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体および誘導体、例えば、野生型配列（配列番号：5または6に記載されている）とわずか約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60またはそれ以上のアミノ酸残基の違いを有する、少なくとも約100、150、200、250、300、350、375、400または425個の隣接するクロトートの細胞外ドメインのアミノ酸（例えば、配列番号：5または6）を含み、野生型ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を保持しているポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約100個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約400個の隣接する配列番号：5または6のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約50個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約400個の隣接する配列番号：5または6のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約25個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約425個の隣接する配列番号：5または6のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約10個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約425個の隣接する配列番号：5または6のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。別の例においてクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、野生型配列とわずか約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、75、80、85、90、95、100、110、120、140、150、160、170、180、190または200個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、925、950または982個の隣接する配列番号：7のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約100個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約500個の隣接する配列番号：7のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約100個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約600個の隣接する配列番号：7のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約100個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約700個の隣接する配列番号：7のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約100個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約800個の隣接する配列番号：7のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約100個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約900個の隣接する配列番号：7のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約50個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約900個の隣接する配列番号：7のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

【0158】

10

20

30

40

50

変異体および誘導体の特定の例は、限定はしないが、線維芽細胞増殖因子を含むポリペプチドの機能的に活性な変異体および誘導体、例えば、野生型配列（配列番号：31、33または35に記載されている）とわずか約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60またはそれ以上のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約100、125、150、150、175、200、225または250個の隣接する線維芽細胞増殖因子のアミノ酸、例えば、FGF19（配列番号：31）、FGF21（配列番号：33）またはFGF23（配列番号：35）を含み、野生型ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を保持しているポリペプチドを含む。種々の態様において、変異体または誘導体は、R179Q変異を含み得るか、または含むことができない。例えば、線維芽細胞増殖因子を含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約25個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約150個の隣接する配列番号：31、33または35のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、線維芽細胞増殖因子を含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約25個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約175個の隣接する配列番号：31、33または35のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、線維芽細胞増殖因子を含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約25個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約200個の隣接する配列番号：31、33または35のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、線維芽細胞増殖因子を含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約50個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約225個の隣接する配列番号：35のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。例えば、線維芽細胞増殖因子を含むポリペプチドの機能的に活性な変異体もしくは誘導体は、わずか約25個のアミノ酸残基の違いを有する少なくとも約225個の隣接する配列番号：35のアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

10

20

30

40

50

【0159】

4.3. 本明細書の融合ポリペプチドの発現

本明細書の融合タンパク質を発現するために、本明細書に記載されているいづれかの方法または当分野で既知である方法により得られるDNA分子を、当分野で既知の技術により適当な発現ベクターに挿入することができる。例えば、二本鎖cDNAは、ホモポリマーの付加または合成DNAリンカーの使用に関連する制限酵素結合または平滑末端ライゲーションにより、適当なベクターにクローニングすることができる。DNAリガーゼは、通常、DNA分子をライゲートするために使用され、望ましくない結合はアルカリホスファターゼでの処理により避けることができる。

【0160】

したがって、本明細書は、本明細書に記載されている核酸分子（例えば、遺伝子または遺伝子をコードする組換え核酸分子）を含むベクター（例えば、組換えプラスミドおよびバクテリオファージ）を含む。「組換えベクター」なる用語は、組換えベクターが由来する天然または非人工の核酸分子において含まれる核酸配列よりも、より多い、より少ない、または異なる核酸配列を含むように、変化、修飾または加工されたベクター（例えば、プラスミド、ファージ、ファスミド、ウイルス、コスミド、フォスミドまたは他の精製された核酸ベクター）を含む。例えば、組換えベクターは、本明細書において定義されている調節配列、例えば、プロモーター配列、終結配列および/または人工リボソーム結合部位（RBS）に作動可能に連結しているクロトナー-FGF23融合物をコードする核酸配列を含み得る。ベクターに包含されている遺伝子または核酸の発現が可能である組換えベクターを「発現ベクター」と称する。

【0161】

真核生物宿主において、異なる転写および翻訳調節配列は、宿主の性質に依存して使用され得る。それらはアデノウイルス、ウシパピローマ・ウイルス、シミアン・ウイルスなどのウイルス源由来であり得、調節シグナルは高レベルの発現を有する特定の遺伝子と関連している。例えば、ヘルペスウイルスのTKプロモーター、SV40早期プロモーター

、酵母菌 g a 1 4 遺伝子プロモーターなどを含むが、これらに限定されない。転写開始調節シグナルは、遺伝子の発現を調節することができるように抑制または活性化することができるものを選択され得る。

【 0 1 6 2 】

本明細書に記載されているいくつかの本明細書の分子において、融合ポリペプチドの1つ以上のポリペプチド鎖をコードする核酸配列を有する1つ以上のDNA分子は、望ましいDNA分子を宿主細胞に組み込むことができる1つ以上の調節配列に作動可能に連結している。導入されたDNAにより安定に形質転換された細胞は、例えば、発現ベクターを含む宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することにより、選択することができる。選択可能なマーカー遺伝子は、発現する核酸配列に直接結合するか、または共トランスクレッショングにより同じ細胞に導入することができる。さらなる因子が、また、本明細書に記載されているタンパク質の最適な合成のために必要であり得る。使用するさらなる因子がどれであるかは、当業者に明白である。

10

【 0 1 6 3 】

特定のプラスミドまたはウイルスベクターの選択において重要な因子は、ベクターを含む受容細胞が認識され、ベクターを含まない受容細胞から選択される容易さ、特定の宿主において望ましいベクターのコピーの数、および、異なる種の宿主細胞間のベクターを「往復する」ことができることが望ましいかどうかを含むが、これらに限定されない。

【 0 1 6 4 】

発現に関するDNA配列を含むようにベクターを構築するとき、例えば、形質転換、トランスクレッショング、コンジュゲーション(conjugation)、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム・沈降、直接マイクロインジェクションなどを含むが、これらに限定されない、当分野で既知の1つ以上の種々の適当な方法により、適当な宿主細胞に導入され得る。

20

【 0 1 6 5 】

宿主細胞は、原核生物または真核生物のいずれかであり得る。真核生物宿主細胞の例は、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト、サル、マウスおよびチャイニーズハムスター(CHO)細胞を含む。このような細胞は、例えば、正しいフォールディングまたはグリコシル化を含むタンパク質の翻訳後修飾を容易にする。さらに、酵母細胞も本明細書の融合ポリペプチドを発現するために使用することができる。多くの哺乳動物細胞のように、酵母細胞も、例えば、グリコシル化を含むタンパク質の翻訳後修飾を可能にする。酵母菌におけるタンパク質の生産のために利用することができる強いプロモーター配列および高コピー数プラスミドのどれを利用するかにおいては、多くの組換えDNA戦略が存在する。酵母菌の転写および翻訳機構は、クローニングされた哺乳動物の遺伝子産物におけるリーダー配列を認識することができ、それによりリーダー配列を有するペプチド(すなわち、前ペプチド)の分泌を可能にする。本明細書の融合ポリペプチドの高収率生産の特定の方法は、D H F R - 欠損 C H O 細胞におけるジヒドロ葉酸還元酵素(D H F R)増幅の使用を介して、米国特許第4,889,803号に記載されているメトトレキサートのレベルの連続的な增加の使用によるものである。得られたポリペプチドをグリコシル化してもよい。

30

【 0 1 6 6 】

1つ以上のベクターの導入後、宿主細胞を、通常、ベクター含有細胞の増殖を選択する選択培地中で増殖させる。組換えタンパク質の精製は、当分野で既知の、または本明細書に記載されているいずれかの方法、例えば、抽出、沈降、クロマトグラフィーおよび電気泳動法に関するいずれかの慣用の方法により実施することができる。タンパク質を精製するためには、標的タンパク質を結合するモノクローナル抗体を使用するアフィニティーコロマトグラフィーである。一般的に、組換えタンパク質を含む粗製造物を、適当なモノクローナル抗体が固定されているカラムに通過させる。不純物は通過するが、タンパク質は、通常、特異的な抗体を介してカラムに結合する。カラムを洗浄後、タンパク質を、例えば、pHまたはイオン強度を変化させることにより、ゲル

40

50

から溶離する。

【0167】

4.4. 融合ポリペプチド活性を評価するためのアッセイ

本明細書に記載されているアッセイ(実施例2、参照)および当分野で既知のものを、本明細書の融合ポリペプチドのクロトーまたはFGF活性を検出するために使用することができる。適当な活性アッセイは、受容体結合アッセイ、細胞増殖アッセイおよび細胞シグナル伝達アッセイを含む。例えば、融合ポリペプチドがクロトーまたはFGF活性を有するか否かを測定するために使用され得る結合アッセイは、融合ポリペプチドのFGF受容体への結合をアッセイすることを含む。FGF受容体結合アッセイは、競合および非競合アッセイ両方を含むが、これらに限定されない。例えば、FGF受容体結合は、FGF受容体を発現する細胞を標識FGF(例えば、放射性標識)と接触させ、非標識クロトー- FGF融合ポリペプチドの濃度を増加させることにより検出することができる。同じ受容体への結合に対して競合する2つのリガンドを、細胞を含む反応混合物に加える。次に細胞を洗浄し、標識FGFを測定する。非標識融合ポリペプチドの存在下で受容体に対する標識FGFの量の減少は、受容体へのクロトー- FGF融合ポリペプチドの結合を示す。あるいは、クロトー- FGF融合ポリペプチドを標識し、細胞への融合ポリペプチドの直接結合を検出してよい。

10

【0168】

クロトーまたはFGF活性は、また、融合ポリペプチドが細胞応答を誘導するか否かを決定することにより測定することができる。例えば、いくつかの態様において、クロトー- FGF融合ポリペプチドの生物学的活性を検出するためのアッセイは、FGF受容体を発現する細胞を融合ポリペプチドと接触させ、細胞応答、例えば、細胞増殖またはEgr-1活性化、C2C12細胞における筋管直径をアッセイし、融合ポリペプチドの存在および非存在下で細胞応答を比較することを含む。融合ポリペプチド複合体の非存在下と比較して融合ポリペプチド複合体の存在下での細胞応答の増加は、融合ポリペプチドが生物学的活性を有することを示す。また、受容体からの下流シグナル伝達事象の増加も、生物学的活性(例えば、FGFR、FRS2、ERK1/2、p70S6Kのリン酸化など)の証拠として、測定することができる。

20

【0169】

4.5. 医薬組成物および処置法

30

本明細書は、また、1つ以上の本明細書の融合ポリペプチドおよび薬学的に許容される希釈剤または担体を含む医薬組成物に関する。該医薬組成物は薬学的有効用量のヘパリンをさらに含むことができる。このような医薬組成物はキットまたは容器に含まれ得る。このようなキットまたは容器には、融合ポリペプチドのインビオ半減期またはインビトロ寿命の延長に関する指示書と共にパッケージされていてよい。所望により、このようなキットまたは容器には、医薬または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する行政機関により指示されている形での通知を添付することができ、この通知は、ヒト投与のための製造、使用または販売の行政機関による承認を反映する。このような組成物は、医薬組成物を患者に投与することにより、患者、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおける疾患または疾患症状(例えば、加齢関連状態または代謝障害)を処置、予防または改善する方法において使用され得る。

40

【0170】

一般的に、本明細書の医薬組成物の治療有効量は、約0.0001mg/kgから0.001mg/kg、0.001mg/kgから約10mg/kg体重または約0.02mg/kgから約5mg/kg体重である。一般的に、融合ポリペプチドの治療有効量は、例えば、約0.001mgから約0.01mg、約0.01mgから約100mgまたは約100mgから約1000mgである。好ましくは、融合ポリペプチドの治療有効量は、約0.001mg/kgから2mg/kgである。

【0171】

融合ポリペプチドに関する最適な医薬製剤は、投与経路および望ましい用量に依存して

50

当業者により決定することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pa.、参照、この文献の全体を出典明示により本明細書に包含させる）。

【0172】

本明細書の融合ポリペプチドは、固体、液体または気体（エアロゾル）の形態であつてよい医薬組成物として投与され得る。典型的な投与経路は、経口、局所、非経腸、舌下、経直腸、腔、皮内および鼻腔内を含むが、これらに限定されない。非経腸投与は、皮下注射、静脈内、筋肉内、腹膜内、胸膜内、胸骨内注射または注入技術を含む。好ましくは、組成物は非経腸的に投与される。さらに好ましくは、組成物は静脈内に投与される。本明細書のポリペプチドが対象への組成物の投与時に生物学的に利用可能にするように、本明細書の医薬組成物を処方することができる。例えば、錠剤が単一の投与単位であり、エアロゾル形態の本明細書のポリペプチドの容器が複数の投与単位を入れることができるととき、組成物は1つ以上の投与単位の形態を取ることができる。

10

【0173】

医薬組成物の製造において使用される物質は使用される量において非毒性であり得る。医薬組成物における活性成分の最適な用量が種々の因子に依存することは当業者に明らかである。関連因子は、対象の型（例えば、ヒト）、対象の健康全般、処置の必要な対象の加齢関連状態または代謝障害の型、多剤レジメンの一部としての組成物の使用、本明細書のポリペプチドの特定の形態、投与様式および使用される組成物を含むが、これらに限定されない。

20

【0174】

薬学的に許容される担体またはビヒクルは、組成物が、例えば、錠剤または粉末形態で存在できるような粒子であり得る。担体は、例えば、経口シロップまたは注射可能な液体である組成物と共に液体であり得る。加えて、担体は、例えば、吸入投与に有用なエアロゾル組成物を提供するために気体であり得る。

【0175】

「担体」なる用語は、本明細書のポリペプチドと一緒に投与される希釈剤、アジュバントまたは賦形剤を示す。このような医薬担体は、液体、例えば、水および油（石油、動物性、植物性または合成のものを含む）、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などであり得る。担体は、塩水、アカシア・ゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイダルシリカ、ウレアなどであり得る。加えて、補助剤、安定剤、増粘剤、潤滑剤および着色剤を使用することができる。1つの態様において、対象に投与されるとき、本明細書のポリペプチドおよび薬学的に許容される担体は滅菌される。本明細書のポリペプチドが静脈内投与されるとき、水は特定の担体である。塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液は、また、液体担体、特に注射可能溶液として使用され得る。適当な医薬担体は、また、賦形剤、例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、ライス、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。望ましいとき、本組成物は少量の湿潤剤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤を含み得る。

30

【0176】

組成物は、経口投与用であり得、そのとき、組成物は好ましくは固体または液体形態であり、半固体、半液体、懸濁液およびゲル形態が本明細書において固体または液体のいずれかとして考慮される形態内に含まれる。

40

【0177】

経口投与用の固体組成物として、組成物は、粉末、顆粒、圧縮錠剤、錠剤、カプセル、チューインガム、ウエハースなどの形態に製剤化することができる。このような固体組成物は一般的に1つ以上の不活性な希釈剤を含む。加えて、1つ以上の以下のものが存在し得る、結合剤、例えば、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、微結晶性セルロースまたはゼラチン、賦形剤、例えば、デンプン、ラクトースまたはデキストリン、崩

50

壊剤、例えば、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、プリモゲル、コーンデンプンなど、滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはステロテックス、流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素、甘味剤、例えば、スクロースまたはサッカリン、香味剤、例えば、ペパーミント、サルチル酸メチルまたはオレンジ香味剤、ならびに着色剤。

【0178】

医薬組成物がカプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形態であるとき、医薬組成物は、上記の型の物質に加えて、液体担体、例えば、ポリエチレングリコール、シクロデキストリンまたは脂肪油を含むことができる。

【0179】

医薬組成物は液体の形態、例えば、エリキシル、シロップ、溶液、エマルジョンまたは懸濁液であり得る。液体は経口投与または注射による送達のために有用であり得る。経口投与用のとき、組成物は1つ以上の甘味剤、防腐剤、色素／着色料および香味料を含み得る。注射による投与用の組成物において、また、1つ以上の界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝剤、安定剤および等張剤を含み得る。

10

【0180】

溶液、懸濁液または他の形態であろうとなかろうと、本明細書の液体組成物は、また、1つ以上の以下のものを含むことができる、滅菌希釈剤、例えば、注射用水、塩水溶液、好ましくは生理食塩水、リンガー溶液、等張塩化ナトリウム、固定油、例えば、溶媒または懸濁媒体として働くことができる合成モノもしくはジグリセリド、ポリエチレングリコール、グリセリン、シクロデキストリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒、抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン、抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム、キレート剤、例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸、緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩および等張化剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース。非経腸用の組成物は、ガラス、プラスチックまたは他の物質製であるアンプル、使い捨て注射器または複数回バイアルに包まれていてもよい。生理食塩水は特定の好ましいアジュバントである。注射可能な組成物は好ましくは滅菌である。

20

【0181】

医薬組成物は、適当な用量が得られる有効量の本明細書の化合物（例えば、融合ポリペプチド）を含む。医薬組成物は、それぞれの障害に対して現在処方されている既知の有効量の化合物を含み得る。

30

【0182】

加齢関連状態または代謝障害の予防、処置および／または管理において有用である予防および／または治療レジメンにおいて使用される本明細書のポリペプチドの投与経路は、当分野で既知の他の治療に対して現在処方されている投与形態に基づくことができる。本明細書のポリペプチドは、任意の便利な経路、例えば、注入またはボーラス注射により、上皮性または皮膚粘膜裏当てを介する吸収（例えば、経口粘膜、経直腸および腸粘膜など）により投与することができる。投与は全身的または局所的であり得る。種々の送達系は、例えば、マイクロ粒子、マイクロカプセル、カプセルなどが知られており、本明細書のポリペプチドを投与するために有用であり得る。1つ以上の本明細書のポリペプチドが対象に投与され得る。投与の方法は、経口投与および非経腸投与、皮内、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、舌下、鼻腔内、大脳内、脳室内、髄腔内、腔内、経皮を含むが、これらに限定されない非経腸投与、経直腸的、吸入による、または、眼、鼻、耳または皮膚への局所的を含むが、これらに限定されない。

40

【0183】

本明細書のポリペプチドは非経腸的に投与され得る。具体的には、本明細書のポリペプチドは静脈内に投与され得る。

【0184】

肺投与は、また、例えば、吸入器または噴霧器、およびエアロゾル剤との製剤の使用により、またはフルオロ炭素または合成肺界面活性剤でのかん流を介して、使用することができる。本明細書のポリペプチドは、また、伝統的な結合剤および担体、例えば、トリグ

50

リセリドと一緒に坐薬として製剤化することができる。

【0185】

本明細書のポリペプチドは制御放出系において送達することができる。例えば、ポンプを使用することができる (Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwaldら Surgery 1980, 88: 507; Saudekら N. Engl. J. Med. 1989, 321: 574、参照)。ポリマー物質も、本明細書のポリペプチドの制御放出のために使用することができる (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, FL, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 1983, 23, 61、参照 ; Levyら Science 1985, 228, 190; Duringら Ann. Neurol., 1989, 25, 351; Howardら J. Neurosurg., 1989, 71, 105も参照)。具体的には、制御放出系を、本明細書のポリペプチドの標的、例えば、脳の近接に置くことができ、したがって、全身投与量に対してほんのわずかしか必要としない(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, 1 984, pp. 115-138、参照)。Langerによる文献 (Science 1990, 249, 1527-1533)において論じられている他の制御放出系を使用することができる。
10

【0186】

本明細書のポリペプチドの制御または持続放出を達成するために使用されるポリマー物質は、例えば、米国特許第5,679,377号、米国特許第5,916,597号、米国特許第5,912,015号、米国特許第5,989,463号、米国特許第5,128,326号、PCT公開WO99/15154およびPCT公開WO99/20253において記載されている。持続放出製剤において使用されるポリマーの例は、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-ビニルアセテート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ酸無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)およびポリオルトエステルを含むが、これらに限定されない。好ましくは、持続放出製剤において使用されるポリマーは、不活性で、浸出される不純物を含まず、保存安定性、滅菌性かつ生分解性である。
20

【0187】

一般的に、本明細書の医薬組成物の治療有効量は、約0.0001mg/kgから0.001mg/kg、0.001mg/kgから約10mg/kg体重または約0.02mg/kgから約5mg/kg体重である。
30

【0188】

他の態様において、予防および/または治療レジメンは、少なくとも0.01μg/mLから少なくとも400μg/mLの本明細書のポリペプチドの血漿レベルを達成する、有効量の本明細書のポリペプチドを患者に1回以上投与することを含む。

【0189】

予防および/または治療レジメンは、少なくとも0.01μg/mLから400μg/mLの本明細書のポリペプチドの血漿レベルを維持する、有効量の本明細書のポリペプチドを患者へ複数回投与することを含み得る。予防および/または治療レジメンにて、少なくとも1日、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月または9ヶ月間投与され得る。
40

【0190】

予防および/または治療レジメンは、1つ以上のさらなる治療と組み合わせての本明細書のポリペプチドの投与を含み得る。加齢関連状態または代謝障害の予防、処置および/または管理のために現在使用されている1つ以上の治療の推奨される用量は、Hardmanら eds., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001; Physician's Desk Reference (60th ed., 2006) (この内容を出典明示により本明細書に包含させる)を含むが、これらに限定されない
50

当分野の参考文献から得ることができる。

【0191】

本発明は、クロトータンパク質およびFGFのアゴニスト活性が望ましい障害を処置するための方法を含む。本明細書は、クロトータンパク質およびFGFのアゴニスト活性が望ましい病理学的疾患の治療における、または処置のための医薬としての記載されているタンパク質、融合タンパク質、核酸分子または医薬組成物の使用をさらに含む。本明細書のこのような方法または使用の例は、加齢関連状態または代謝障害を含むが、これらに限定されない。

【0192】

本明細書は、個体における加齢関連状態を処置または予防するための方法、および個体における加齢関連状態を処置または予防するための治療における、または医薬としての記載されているタンパク質、融合タンパク質、核酸分子または医薬組成物の使用を含む。処置の必要な対象は、加齢関連状態を処置または予防するように、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインおよび纖維芽細胞増殖因子および(任意の)修飾されたFcフラグメントを有する、クロトー融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を投与される。いくつかの態様において、クロトー融合ポリペプチドは薬理学的有効用量のヘパリンと共に投与される。加齢関連状態はサルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチントン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、期待寿命の低下、記憶障害、しわ、腎機能障害および加齢関連難聴を含む。いくつかの態様において、クロトー融合ポリペプチドはアルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインを含む。特定の態様において、アルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインおよび纖維芽細胞増殖因子23を含むクロトー融合タンパク質は、筋肉疲労に対して処置の必要な対象に投与される。

10

20

30

40

【0193】

本発明は、また、個体における代謝障害を処置または予防するための方法、および個体における代謝障害を処置または予防するための治療における、または医薬としての記載されているタンパク質、融合タンパク質、核酸分子または医薬組成物の使用に関する。処置の必要な個体は、代謝障害を処置するように、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインおよび纖維芽細胞増殖因子およびFcRnへの減少した結合および/または増加した血清半減期および/または安定性を有する(任意の)修飾されたFcフラグメントを有する、クロトー融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を投与される。いくつかの態様において、クロトー融合ポリペプチドは薬理学的有効用量のヘパリンと共に投与される。該方法はI型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖および肥満の処置または予防において使用され得る。特定の態様において、ベータ-クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインおよび纖維芽細胞増殖因子21を含むクロトー融合タンパク質は、代謝障害に対して処置の必要な対象に投与される。

【0194】

本明細書はまた、個体における高リン血症または石灰沈着症を処置または予防するための方法、および個体における高リン血症または石灰沈着症を処置または予防するための治療における、または医薬としての記載されているタンパク質、融合タンパク質、核酸分子または医薬組成物の使用を提供する。処置の必要な個体は、高リン血症または石灰沈着症を処置するように、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメイン、纖維芽細胞増殖因子および(任意の)修飾されたFcフラグメントを有する、クロトー融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を投与される。いくつかの態様において、クロトー融合ポリペプチドは薬理学的有効用量のヘパリンと共に投与される。特定の態様において、アルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインおよび線維芽細胞増殖因子23および(任意の)修飾されたFcフラグメントを含むクロトー融合タンパク質は、高リン血症または石灰沈着症に対して処置の必要な個体に投与される。

【0195】

50

本明細書は、また、個体における慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置または予防するための方法、および個体における慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置または予防するための治療における、または医薬としての記載されているタンパク質、融合タンパク質、核酸分子または医薬組成物の使用を提供する。処置の必要な個体は、慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置するように、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメイン、纖維芽細胞増殖因子および(任意の)修飾されたFcフラグメントを有する、クロトーフ融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を投与される。いくつかの態様において、クロトーフ融合ポリペプチドは薬理学的有効用量のヘパリンと共に投与される。いくつかの態様において、アルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインを含むクロトーフ融合タンパク質は、慢性腎臓疾患または慢性腎不全に対して処置の必要な個体に投与される。

10

【0196】

本明細書はまた、個体における癌を処置または予防するための方法、個体における癌を処置または予防するための治療における、または医薬としての記載されているタンパク質、融合タンパク質、核酸分子または医薬組成物の使用を含む。処置の必要な個体は、癌を処置するように、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメイン、纖維芽細胞増殖因子および(任意の)修飾されたFcフラグメントを有する、クロトーフ融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を投与される。該方法は乳癌の処置または予防において使用され得る。いくつかの態様において、クロトーフ融合ポリペプチドは薬理学的有効用量のヘパリンと共に投与される。いくつかの態様において、アルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインを含むクロトーフ融合タンパク質は、癌に対して処置の必要な個体に投与される。

20

【0197】

クロトーフ融合ポリペプチドを含む医薬組成物を投与することにより障害を処置する方法において、または、治療においてクロトーフ融合ポリペプチドを含む医薬組成物を使用するとき、クロトーフ融合ポリペプチドおよび(任意の)修飾されたFcフラグメントはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインおよび線維芽細胞増殖因子を有する。特定の態様において、クロトーフ融合タンパク質は、ベータクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインおよび纖維芽細胞増殖因子21を含む。

30

【0198】

別の態様において、融合ポリペプチドは、FGF(例えば、FGF19、FGF21、FGF23またはFGF23変異体)および減少したFcRnへの結合および/または増加した血清安定性を有する修飾されたFcフラグメントを含む。この型の融合ポリペプチドを、上記種々の疾患において使用することができる、または当分野で知られているあらゆるFGF関連疾患を処置または予防するために使用することができる。融合ポリペプチドをそれを必要とする個体に投与することができる。

40

【0199】

融合ポリペプチド組成物は、当業者に知られている、および本明細書に記載されている投与方法にしたがって投与することができる。投与の特定の方法は皮下または静脈内を含む。他の有効な投与様式は本明細書に記載されている。

【0200】

4.6. 処置法および有効性を評価するためのアッセイ方法

本明細書に記載されている融合ポリペプチドを個体に投与することを提供する本明細書の方法または使用は、加齢関連状態または代謝障害を含む種々の障害を処置するために使用することができる。何らかの特定の理論に限定されることなく、融合ポリペプチドは、クロトーまたはFGFの調節異常がある障害を処置するために使用され得る。例の障害は代謝障害および加齢関連状態を含む。例えば、FGF23またはクロトーノックアウトマウス両方は、低い物理的活性、成長遅延、筋肉疲労、皮膚萎縮、アテローム性動脈硬化症、寿命の短縮などを含む種々の同様の表現型を示す(Razzaque and Lanske, J. of Endocrinology, 194:1-10 (2007)、参照(これを出典明示により本明細書に包含させる))。

50

【 0 2 0 1 】

特に、本明細書の融合ポリペプチドは、筋肉疲労を含む老化関連障害の処置において特に有用である。理論に束縛されることなく、ミネラル（例えば、リン酸塩およびカルシウム）およびビタミンDホメオスタシスをコントロールするクロトーおよびFGF23の能力は、これらのタンパク質が老化および筋萎縮を調節することを意味し得る。

【 0 2 0 2 】

他方では、本明細書の融合ポリペプチドは、代謝障害を処置するために使用され得る。例えば、ベータ-クロトーおよびFGF19は、コレステロール7-ヒドロキシラーゼ(CYP7A1)を調節することにより、胆汁酸ホメオスタシスをコントロールすることが示されている。胆汁ホメオスタシス障害の非限定的な例は胆汁うっ滞である。ベータ-クロトーおよびFGF21は、脂肪細胞における脂肪分解を誘導し、したがって、脂肪貯蔵を減少させ、グルコース摂取を増加させることができることが示されている。脂肪分解／脂肪貯蔵障害の非限定的な例は代謝関連肥満および心臓血管疾患である。

10

【 0 2 0 3 】

少なくとも、FGF23が尿におけるリン酸塩の排出を刺激することができ、それにより血清中のリン酸塩レベルを減少させる発見の一部に基づいて、本明細書のクロトー・FGF23融合ポリペプチドは、個体における高リン血症または石灰沈着症を処置または予防するために使用することができる。例えば、患者におけるクロトーの欠損となるクロトーにおけるホモ接合型ミスセンス変異が深刻な腫瘍性石灰沈着症および動脈石灰化を引き起こし得ることが示されている(Ichikawaら J. Clin. Invest. 117:2684-2691 (2007)(これを出典明示により本明細書に包含させる))。個体は、高リン血症または石灰沈着症を処置または予防するように、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメイン、線維芽細胞増殖因子および(任意の)修飾されたFcフラグメントを有するクロトー融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を投与される。特に、アルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメイン、線維芽細胞増殖因子および(任意の)修飾されたFcフラグメントを含むクロトー融合ポリペプチドは、高リン血症または石灰沈着症を処置するために有用である。

20

【 0 2 0 4 】

本明細書のクロトー融合ポリペプチドはまた、個体における慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置または予防するために使用され得る。例えば、クロトー発現が、慢性腎不全を有さない患者の腎臓と比較して、慢性腎不全を有する患者の腎臓において減少していることが示されている(Kohら Biochem. Biophys. Res. Comm. 280:1015-1020 (2001)(これを出典明示により本明細書に包含させる))。個体は、慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置または予防するように、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメイン、線維芽細胞増殖因子および(任意の)修飾されたFcフラグメントを有する、クロトー融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を投与される。特に、アルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインを含むクロトー融合ポリペプチドは慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置するために有用である。

30

【 0 2 0 5 】

本明細書のクロトー融合ポリペプチドはまた、個体における癌を処置または予防するために使用され得る。例えば、クロトー発現が、正常乳癌組織と比較して、乳癌組織において減少していることが示されている(Wolfら Oncogene (2008)オンライン先行出版(これを出典明示により包含させる))。個体は、癌または乳癌を処置または予防するように、クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメイン、線維芽細胞増殖因子および(任意の)修飾されたFcフラグメントを有する、クロトー融合ポリペプチドを含む薬理学的有効用量の医薬組成物を投与される。特に、アルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外ドメインを含むクロトー融合タンパク質は癌または乳癌を処置するために有用である。

40

【 0 2 0 6 】

加齢関連状態または代謝障害における本明細書のクロトー融合ポリペプチドの有効性を

50

評価する、および／または有効用量を決定するための方法は、例えば、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、靈長類またはいくつかの他の非ヒト）または他の動物（例えば、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュまたは無脊椎動物、例えば、昆虫または線虫）を使用する生物ベースアッセイを含む。クロトー融合ポリペプチドは、1回またはレジメン（定期的または不規則的）のとおりに生物体に投与することができる。次に生物体のパラメーター、例えば、加齢関連パラメーターを評価する。興味あるクロトー融合ポリペプチドは、参照、例えば、コントロール生物体のパラメーターと比較して、パラメーターにおける変化をもたらす。他のパラメーター（例えば、毒性、クリアランスおよび薬物動態学に関連する）も評価され得る。

【0207】

10

本明細書のクロトー融合ポリペプチドは、特定の障害、例えば、本明細書に記載されている障害、例えば、加齢関連障害、代謝障害を有する動物を使用して、評価され得る。これらの障害は、また、生理学における試験ポリペプチドの効果を観察することができる感受性の系を提供することができる。例の障害は、脱神經、廐用性萎縮、代謝障害（例えば、肥満および／または糖尿病動物、例えば、d b / d b マウスおよびo b / o b マウスの障害）、脳、肝臓虚血、シスプラチン／タキソール／ビンクリスチンモデル、種々の組織（異種移植）移植植物、トランスジェニック骨モデル、疼痛症候群（炎症性および神経障害を含む）、パラコート、遺伝毒性および酸化ストレスモデル、および腫瘍 I モデルを含む。

【0208】

20

加齢関連状態を測定するために、動物モデルはカロリー制限されたときに変化した表現型を有する動物であり得る。例えば、F 3 4 4 ラットは、クロトー融合ポリペプチドを評価するために有用なアッセイ系を提供する。カロリー制限されたとき、F 3 4 4 ラットはネフロパシーに対して0から10%の発生率を有する。しかしながら、自由食餌のとき、それらはネフロパシーに対して60から100%の発生率を有する。

【0209】

30

本明細書のクロトー融合ポリペプチドを評価するために、それを動物（例えば、F 3 4 4 ラットまたは他の適当な動物）に投与し、動物のパラメーターを、例えば、期間後に評価する。動物は自由食餌または通常であり得る（例えば、カロリー制限下ではないが、いくつかのパラメーターはこのような条件下で評価することができる）。一般的に、このような動物のコホートはアッセイのために使用される。一般的に、試験ポリペプチドがカロリー制限と同様の動物対象の表現型の方向におけるパラメーターに作用するとき、試験ポリペプチドは動物における寿命調節を好ましく変化させるものとして示すことができる。このような試験ポリペプチドは、生物体からカロリー摂取を奪うことなく、少なくともいくつかのカロリー制限の寿命調節効果、例えば、このような効果の一部をもたらし得る。

【0210】

40

試験すべきパラメーターは、年齢関連または疾患関連パラメーター、例えば、動物モデルと関連する障害の症状であり得る。例えば、試験ポリペプチドをS H ラットに投与することができ、血圧をモニタリングする。好ましいと示される試験ポリペプチドは、該ポリペプチドで処理されていない同様の参照動物と比較して、症状の改善を引き起こすことができる。障害または老化に関連する他のパラメーターは、抗酸化レベル（例えば、抗酸化酵素レベルまたは活性）、ストレス抵抗性（例えば、パラコート抵抗性）、中核温、グルコースレベル、インスリンレベル、甲状腺 - 刺激ホルモンレベル、プロラクチンレベルおよび黄体形成ホルモンレベルを含み得る。

【0211】

50

加齢関連状態を処置するための本明細書のポリペプチドの有効性を測定するために、減少したクロトー発現を有する動物が使用され得る、例えば、変異クロトーを有するマウス；Kurooら Nature, 390; 45 (1997) および米国出願番号第2003/0119910号、参照（これら両方をそれら全体において出典明示により本明細書に包含させる）。例えば、試験ポリペプチドを変異マウスに投与し、加齢関連パラメーターをモニタリングする。好ましいと示

される試験ポリペプチドは、該ポリペプチドで処理されていない同様の参照動物と比較して、症状の改善を引き起こすことができる。代謝障害または老化に関連するパラメーターは、体重の測定、生殖能力の獲得の検査、血糖レベルの測定、寿命の観察、皮膚の観察、歩行のような運動機能の観察などにより評価することができる。評価は、また、胸腺体重の測定、胸腔の内面上に形成された石灰化結節のサイズの観察などにより作ることができる。さらに、クロトーア遺伝子またはクロトータンパク質に対するmRNAの定量も評価のために有用である。

【0212】

さらに、他のインビオモデルおよび生物アッセイは、代謝パラメーター、例えば、インスリン障害、ⅠⅠ型糖尿病に関連するパラメーターに対して動物を評価することを含む。例の代謝パラメーターは、グルコース濃度、インスリン濃度およびインスリン感受性を含む。

10

【0213】

別の系の例は、例えば、動物モデルにおける腫瘍を特徴とする。腫瘍は自発的なものまたは誘導されたものであり得る。例えば、腫瘍は例えば、p53+またはp53-であり得る種々の遺伝的構成を有する細胞から発生し得る。自己免疫疾患である生物体、例えば、SLEにかかりやすいNZBマウスを使用することも可能である。骨疾患の特徴を評価するために、例えば、骨粗鬆症におけるモデルとして卵巣摘出した動物を使用することができる。同様に、関節疾患において、モデルはアジュバント関節炎に基づき（例えば、マウスが軟骨プロテオグリカン、高移動度グループタンパク質、連鎖球菌細胞壁物質またはコラーゲンの免疫を有し得る）、腎臓疾患において、kd/kdマウスを使用することができる。認知、特に学習および記憶の動物モデルも利用することができる。糖尿病およびその合併症の動物モデル、例えば、ストレプトゾトシンモデルも利用することができる。イヌモデルを、例えば、卒中および虚血を評価するために使用することができる。

20

【0214】

試験ポリペプチドが寿命調節を変化することができるか否かの評価において、多くの加齢関連パラメーターまたはバイオマーカーをモニタリングまたは評価することができる。例の加齢関連パラメーターは、(i)細胞または生物体の寿命、(ii)生物学的加齢依存発現パターンを有する細胞または生物体における遺伝子転写物または遺伝子産物の存在または不存在、(iii)ストレスに対する細胞または生物体の抵抗性、(iv)細胞または生物体の1つ以上の代謝パラメーター（例のパラメーターは循環インスリンレベル、血中グルコースレベル、脂肪含有量、中核温などを含む）、(v)細胞または生物体に存在する複数の細胞の増殖能、および(vi)細胞または生物体の外見または挙動を含む。

30

【0215】

「平均寿命」なる用語は、生物体のコホートの死の年齢の平均を意味する。いくつかの場合において、「平均寿命」は、コントロール環境条件下で、遺伝的に同一の生物体のコホートを使用して評価される。事故による死は除外される。平均寿命がコントロール環境条件下で決定できないとき（例えば、ヒト）、十分に大きな母集団に対する信頼性のある統計情報（例えば、保険数理表から）を平均寿命として使用することができる。

40

【0216】

2つのこのような生物体、例えば、1つの参照生物体およびクロトーア融合ポリペプチドで処理された1つの生物体間の分子差の特性化は、生物体の生理学的状態における違いを示すことができる。参照生物体および処理された生物体は、一般的に同じ実年齢である。本明細書において使用される「実年齢」なる用語は、あらかじめ選択された事象、例えば、受胎、定義されている胎生または胎児期、または、さらに好ましくは、出生からの経過時間を示す。生物体が比較分析のための「同じ」実年齢であるかどうかを決定するために、種々の基準が使用することができる。一般的に、必要とされる精度の程度は、野生型生物体の平均寿命と相関関係である。例えば、実験室野生型株N2がいくつかのコントロール条件下で平均約16日間生存する線虫シード・エレガンスにおいて、同じ年齢の生物体は同じ日数の生存であってよい。マウスに関して、同じ年齢の生物体は、同じ週または月数

50

、靈長類またはヒトに関して、同じ年数（または2、3または5年以内）などの生存であってよい。一般的に、同じ実年齢の生物体は、その種の野生型生物体の平均寿命の15、10、5、3、2または1%以内の時間の生存であってよい。好ましくは、生物体は成体であり、例えば、生物体は、少なくとも平均野生型生物体が繁殖能を有する齢に成熟する時間生存している。

【0217】

生物スクリーニングアッセイは、生物体が老化の明白な物理的特徴を示す前に実施することができる。例えば、生物体は、同じ種の野生型生物体の平均寿命の10、30、40、50、60または70%だけ生存した成体であり得る。代謝、免疫能力および染色体構造における加齢関連変化が報告されている。あらゆるこれらの変化を、試験対象（例えば、生物体ベースアッセイにおける）または患者（例えば、本明細書に記載されている治療処置の前、中または後）のいずれかに対して評価することができる。10

【0218】

カロリー制限と関連するマーカーは、また、スクリーニングアッセイの対象生物体（または処置される対象）を評価することができる。これらのマーカーは加齢関連ではないかも知れないが、それらはクロト-経路が調節されるとき、変化する生理学的状態を示し得る。マーカーはmRNAまたはタンパク質であってよく、これらの多くはカロリー制限された動物において変化する。WO01/12851および米国特許第6,406,853号は例のマーカーを記載している。本明細書に記載されている動物細胞由来の細胞モデルまたは本明細書に記載されている動物モデルの類似物を細胞ベースアッセイのために使用することができる。20

【0219】

筋萎縮における試験ポリペプチドの効果を評価するためのモデルは、1) 例えば、中部の腿で右坐骨神経を切断することによる脱神経から生じるラット内側腓腹筋の筋肉量喪失、2) 固定、例えば、90度の屈曲で固定された右足関節から生じるラット内側腓腹筋の筋肉量喪失、3) 後肢懸垂から生じるラット内側腓腹筋の筋肉量喪失（例えば、米国2003-0129686、参照）、4) 悪液質サイトカイン、インターロイキン-1(IL-1)での処理から生じる骨格筋萎縮（R. N. Cooney, S. R. Kimball, T. C. Vary, Shock 7, 1-16 (1997)）、および5) グルココルチコイド、デキサメタゾンでの処理から生じる骨格筋萎縮（A. L. Goldberg, J Biol Chem 244, 3223-9 (1969)）を含む。30

【0220】

AMDに対する例の動物モデルは、滲出性（湿性）黄斑変性症を模倣するレーザー-誘導マウスマodel Boraら Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 100:2679-84 (2003)、AMDの「地図状萎縮」型と関連する特徴となるカテプシンDの変異型を発現するトランスジェニックマウス（Rakoczyら Am. J. Pathol., 161:1515-24 (2002)）、およびCNVとなる網膜色素上皮においてVEGFを過剰発現するトランスジェニックマウスSchwesingerら Am. J. Pathol. 158:1161-72 (2001)を含む。

【0221】

パーキンソン病の動物モデルの例は、ドーパミン神経毒1-メチル-4フェニル1,2,3,6-テトラヒドロピリジン（MPTP）での処理によりパーキンソン病になった靈長類（以下参照、例えば、米国特許公開第20030055231号およびWichmannら Ann. N.Y. Acad. Sci., 991:199-213 (2003)、6-ヒドロキシドーパミン-障害ラット（例えば、Lab. Anim. Sci., 49:363-71 (1999)）、およびトランスジェニック無脊椎動物モデル（例えば、Laksoら J. Neurochem. 86:165-72 (2003)およびLink, Mech. Ageing Dev., 122:1639-49 (2001)）を含む。40

【0222】

II型糖尿病の分子モデルの例は、欠損Nkx-2.2またはNkx-6.1を有するトランスジェニックマウス、（米国特許第6,127,598号）、ズッカ-糖尿病肥満fa/fa（ZDF）ラット（米国特許第6,569,832号）、および自発的に肥満を発症し、次に頻繁に明白な2型糖尿病に進行するアカゲザル（Hottaら Diabets, 50:1150

26-33 (2001)、および2型糖尿病 - 様インスリン抵抗性を有するドミナント・ネガティブIGF - I受容体 (K R - I G F - I R) を有するトランスジェニックマウスを含む。

【0223】

ニューロパシーに対する例の動物および細胞モデルは、マウス（米国特許第5,420,112号）またはウサギ（Ogawaら Neurotoxicology, 21:501-11 (2000)）におけるビンクリスチン誘導感覚運動ニューロパシー、自律性ニューロパシーの試験のためのストレプトゾトシン (S T Z) - 糖尿病ラット（Schmidtら Am. J. Pathol., 163:21-8 (2003)）、および進行性運動ニューロパシー (p m n) マウス（Martinら genomics, 75:9-16 (2001)）を含む。

【0224】

高リン血症または腫瘍性石灰沈着症の動物モデルの例は、クロトーノックアウトマウスおよびFGF23ノックアウトマウス（Yoshidaら Endocrinology 143:683-689 (2002)）を含む。

【0225】

慢性腎臓疾患または慢性腎不全の動物モデルの例は、COL4A3+/-マウス（Beirowskiら J. Am. Soc. Nephrol. 17:1986-1994 (2006)）を含む。

【0226】

癌の動物モデルの例は、当分野で既知であるヌードマウスへの癌細胞または組織の移植または注入を含む（Giovanellaら Adv. Cancer Res. 44:69-120 (1985)）。例えば、乳癌の動物モデルは、乳癌細胞または組織を移植または注入されたヌードマウスを含む（例えば、Yueら Cancer Res. 54:5092-5095 (1994); Glinskyら Cancer Res. 56:5319-5324 (1996); Visonneau Am. J. Path. 152:1299-1311 (1998)）。

【0227】

当該組成物は、対象、例えば、成体対象、特に健常成体対象または加齢関連疾患有する対象に投与することができる。後者の場合、当該方法は、例えば、加齢関連疾患の症状または他の疾患のマーカーを特徴付けるために対象を評価し、それにより神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病または加齢関連疾患有するか、またはこのような疾患になりやすい対象を同定することができる。

【0228】

骨格筋萎縮

クロトーフ融合ポリペプチドを個体に投与することを提供する本明細書の方法または使用は、骨格筋萎縮を処置するために使用することができる。筋萎縮は、多数の神経筋、代謝、免疫および神経障害および疾患ならびに飢餓、栄養欠損、代謝ストレス、糖尿病、老化、筋ジストロフィーまたはミオパシーを含む。筋萎縮は老化プロセス中に起こる。筋萎縮は、また、筋肉の使用の減少または不使用による。症状は骨格筋組織量の減少で引き起こされる。ヒト男性において、筋肉量は50から80歳の間に1/3に減少する。筋萎縮のいくつかの分子特徴は、ユビキチンリガーゼの上方調節および筋原線維タンパク質の喪失を含む（Furunoら J. Biol. Chem., 265:8550-8557, 1990）。これらのタンパク質の崩壊は、例えば、アクチンの特異的成分であり、ミオシンの特定の筋肉中の3-メチル-ヒスチジン生産を測定することによって追跡することができる（Goodman, Biochem. J. 241:121-12, 1987 and Lowellら Metabolism, 35:1121-112, 1986; Stein and Schluter, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 272: E688-E696, 1997）。クレアチニカーゼの放出（細胞損傷マーカー）（Jacksonら Neurology, 41: 101-104, 1991）も示され得る。

【0229】

非インスリン依存糖尿病

クロトーフ融合ポリペプチドを個体に投与することを提供する本明細書の方法または使用は、非-インスリン-依存糖尿病を処置するために使用することができる。非-インスリン-依存糖尿病は、「成人発症型」糖尿病および2型糖尿病とも呼ばれる。2型糖尿病は、また、「非-2型肥満」および「2型肥満」を含む。II型糖尿病は、(1)血中グルコースレベルバランスを維持するために必要な量未満のインスリンが生産される、臍臓-

10

20

30

40

50

ベータ - 島 - 細胞のインスリンの分泌の減少、および / または (2) 体がインスリンに正常に応答しない「インスリン抵抗性」(米国特許第 5,266,561 号および米国特許第 6,518,069 号)により特徴付けることができる。例えば、グルコース - 刺激インスリンレベルは、一般的に 4.0 nmol/L 以上に上がらない(米国特許第 5,266,561 号)。例の I 型糖尿病の症状は、空腹時の高血糖(米国特許第 5,266,561 号)、疲労、過度の口渴、頻尿、視力障害および感染率の増加を含む。I 型糖尿病の指標は臍島のアミロイド沈着を含む。

【0230】

ニューロパシー

ニューロパシーは、運動、感覚、感覚運動または自律神経を冒す全身性疾患、遺伝性疾患または毒物により引き起こされる中枢および / または末梢神経機能障害を含み得る(例えば、米国特許出願第 20030013771 号、参照)。症状は神経損傷の原因および冒されている神経の特定の型に依存して変化し得る。例えば、運動ニューロパシーの症状は、肉体作業の実施におけるぎこちなさまたは筋力低下、軽い運動後の極度の疲労、立位または歩行の困難および神経筋反射の減衰または欠損を含む(米国特許出願第 20030013771 号)。自律性ニューロパシーの症状は便秘、心臓の不規則性および姿勢低血圧反射の減衰を含む(米国特許出願第 20030013771 号)。感覚ニューロパシーの症状は疼痛および無感覚、手、脚または足のチクチク感、ならびに接触に対する極端な感度を含み、網膜症の症状は視力障害、突然の失明、黒斑および閃光を含む。

【0231】

アルツハイマー病

クロト - 融合ポリペプチドを個体に投与することを提供する本明細書の方法または使用は、アルツハイマー病(AD)を処置するために使用することができる。アルツハイマー病は、ニューロンの不可逆性喪失を引き起こす複雑な神経変性疾患である。それは、加齢関連状態でもある神経変性疾患の単に 1 つの例を提供する。アルツハイマー病の臨床的特徴は、記憶、判断、物理的周囲に対する見当識、および言語における進行性の障害を含む。AD の神経病理学的特徴は領域特異的なニューロン脱落、アミロイド斑および神経原線維変化を含む。アミロイド斑は、 β -アミロイド前駆タンパク質(APP としても既知)の分解産物であるアミロイドペプチド(Ap または Ap42 としても既知)を含む細胞外の斑である。神経原線維変化は異常に高リン酸化された微小管関連タンパク質のフィラメントから構成される不溶性細胞内凝集体であり、tau アミロイド斑および神経原線維変化はアポトーシスによりニューロン脱落となる二次事象に寄与し得る(Clark and Karlsowish, Ann. Intern. Med. 138(5):400-410 (2003))。例えば、 β -アミロイドは培養されたニューロンにおいてカスバーゼ-2 - 依存アポトーシスを誘導する(Troy ら J Neurosci. 20(4):1386-1392)。斑の沈着は、in vivo で、同様の様式において近位ニューロンのアポトーシスを誘導し得る。

【0232】

遺伝学、生化学、生理学的および認知基準を含む種々の基準を、対象における AD を評価するために使用することができる。AD の症状および診断は医師に知られている。AD のいくつかの症状およびマーカーの例は以下のものである。これらの徴候および AD と関連することが知られている他の徴候についての情報を、「AD 関連パラメーター」として使用することができる。AD 関連パラメーターは定性的または定量的情報を含むことができる。定量的情報の例は、1 つ以上の特徴の数値、例えば、タンパク質の濃度または断層マップである。定性的情報は評価、例えば、医師のコメントまたは二者択一(「イエス」/「ノー」)などを含むことができる。AD - 関連パラメーターは、対象が AD と診断されないか、または AD の特定の徴候を有さないことを示す情報、例えば、典型的な AD の典型ではない認知試験結果、または AD と関連しない遺伝的な APOE 多型を含む。

【0233】

進行性の認識機能障害は AD の特徴である。この障害は、記憶、判断、意思決定、周りの物理的方向および言語の減衰として現れ得る(Nussbaum and Ellis, New Eng J. Med.

10

20

30

40

50

348(14):1356 35 1364 (2003)）。他の型の認知症の排除は A D の診断に役立てることができる。神経細胞死は、A D 患者における進行性の脳萎縮を引き起す。映像技術（例えば、磁気共鳴映像法またはコンピューター断層撮影）は、脳における A D 関連病変および / または脳萎縮を検出するために使用することができる。

【 0 2 3 4 】

A D 患者は疾患の病状によって生じる生化学的異常を示し得る。例えば、脳脊髄液におけるタウタンパク質のレベルは A D 患者において高まる (Andreasen, Nら Arch Neurol. 58:349-350 (2001))。

【 0 2 3 5 】

アミロイドベータ 4 2 (A , B 4 2) ペプチドのレベルは、A D 患者の C S F において減少し得る。A p 4 2 のレベルは A D 患者の血漿において増加し得る (Ertekin-Taner, Nら Science 290:2303 2304 (2000))。対象からのサンプルにおいて生化学異常を検出するための技術は、当分野で既知の細胞、免疫および他の生物学的方法を含む。一般的なアドバイスのために、例えば、Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3r Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001), Ausubelら Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), (Harrow, E. and Lane, D. (1988)Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ならびにそれらの最新版に記載されている技術、参照。

【 0 2 3 6 】

例えば、抗体、他の免疫グロブリンおよび他の特異的結合リガンドを、A D と関連する生体分子、例えば、タンパク質または他の抗原を検出するために使用することができる。例えば、1つ以上の特異抗体を、サンプルを調べるために使用することができる。種々の方法、例えば、E L I S A、蛍光 - ベースアッセイ、ウエスタンプロットおよびタンパク質アッセイが可能である。ポリペプチドアレイを生産する方法は、当分野において、例えば、De Wildtら (2000). Nature Biotech. 18, 989-994; Luckingら (1999). Anal. Bioc hem. 270, 103-111; Ge, H. (2000). Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeath, G. , and Schreiber, S.L. (2000). Science 289, 1760 to 1 763; および W O 9 9 / 5 1 773 A 1 において記載されている。

【 0 2 3 7 】

1つのアッセイにおいて、A D の非ヒト動物モデル（例えば、マウスモデル）が、例えば、ポリペプチドまたは治療レジメンを評価するために使用される。例えば、米国特許第 6 , 5 0 9 , 5 1 5 号は、天然に学習および記憶試験で使用することができる 1 つのこのようなモデル動物を記載している。該動物は、該動物が誕生から短期間内、一般的に誕生から 1 年以内、好ましくは誕生から 2 から 6 月以内に進行性の神経障害を発症するようなレベルで脳組織においてアミロイド前駆タンパク質 (A P P) 配列を発現する。A P P タンパク質配列を胚形成期の動物または動物の原細胞、好ましくは 1 つの細胞または受精卵母細胞期および一般的に約 8 細胞期より遅くない細胞に導入する。次に受精卵または胚を、里親のメスとして擬似 - 妊娠期に発達させる。アミロイド前駆タンパク質遺伝子を、脳の皮質辺縁領域、進行性の神経疾患状態、例えば A D において顕著に影響される脳の領域において、アミロイド前駆タンパク質の過剰な内因性発現および進行性の神経疾患の発症を引き起す状態において、染色体に組み込まれるように動物胚に導入する。グリオーシスおよび臨床症状が、トランスジェニック動物モデルにおいて神経疾患を起す。神経疾患の進行性の局面は、探索および / または運動行動の減少およびデオキシグルコース摂取 / 利用の減少および脳の皮質辺縁領域における異常肥大グリオーシスにより特徴付けられる。さらに、見られる変化は、いくつかの老化動物において見られるものと同様である。他の動物モデルは、また、U S 5 , 3 8 7 , 7 4 2 、 5 , 8 7 7 , 3 9 9 、 6 , 3 5 8 , 7 5 2 および 6 , 1 8 7 , 9 9 2 に記載されている。

【 0 2 3 8 】

パーキンソン病

10

20

30

40

50

クロト-融合ポリペプチドを個体に投与することを提供する本明細書の方法または使用は、パーキンソン病を処置するために使用することができる。パーキンソン病は、運動機能を調節する黒質線条体ドーパミン系の変性となる、黒質におけるドーパミンニューロンの神経変性を含む。この病状は、同様に、運動機能障害を引き起こす（例えば、Lothariusら Nat. Rev. Neurosci., 3:932-42 (2002)、参照）。例の運動症状は、無動症、前屈姿勢、歩行困難、姿勢の不安定、強硬症、筋硬直および振戻を含む。例の非運動症状は、鬱病、意欲の欠如、消極的な態度、認知症および消化器機能障害を含む（例えば、Fahn, Ann. N.Y. Acad. Sci., 991:1-14 (2003) およびPfeiffer, Lancet Neurol., 2:107-16 (2003)、参照）。パーキンソン病は65から69歳の個体の0.5から1パーセントおよび80歳以上の個体の1から3パーセントで観察された（例えば、Nussbaumら N. Engl. J. Med., 348:1356-64 (2003)、参照）。パーキンソン病の分子マーカーは、芳香族性Lアミノ酸デカルボキシラーゼ（AADC）の減少（例えば、米国出願第20020172664号、参照）、および黒質線条体におけるドーパミン含量の喪失（例えば、Fahn, Ann. N.Y. Acad. Sci., 991:1-14 (2003) およびLothariusら Nat. Rev. Neurosci., 3:932-42 (2002)、参照）を含む。いくつかの家族性症例において、PDはアルファ-シヌクレインおよびパーキン（E3ユビキチンリガーゼ）タンパク質をコードする単一の遺伝子の変異に関連する（例えば、Riessら J. Neurol. 250 Suppl 1:13 10 (2003) およびNussbaumら N. Engl. J. Med., 348:1356-64 (2003)）。ニューロン特異的C-末端ユビキチンヒドロラーゼ遺伝子におけるミスセンス変異もパーキンソン病と関連する（例えば、Nussbaumら N. Engl. J. Med., 348:1356-64 (2003)）。

10

20

30

40

50

【0239】

ハンチントン病

クロト-融合ポリペプチドを個体に投与することを提供する本明細書の方法または使用は、ハンチントン病を処置するために使用することができる。ハンチントン病におけるクロト-融合ポリペプチドの有効性を評価および/または有効用量を決定するための方法は、例えば、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、靈長類または他の何らかの非ヒト）または他の動物（例えば、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュまたは無脊椎動物、例えば、昆虫または線虫）を使用する生物ベースアッセイを含む。ハンチントン病において多くの動物モデル系が利用できる。例えば、Brouillet, Functional Neurology 15(4): 239-51 (2000); Onaら Nature 399: 263-267 (1999), Batesら Hum Mol Genet. 6(10):1633-7 (1997); Hanssonら J. of Neurochemistry 78: 694-703; およびRubinsztein, D. C., Trends in Genetics, Vol. 1S, No. 4, pp. 202-209 (HDの種々の動物および非ヒトモデルにおける確認）、参照。

【0240】

このような動物モデルの例は、R6/2系のトランスジェニックマウス系である（Mangiariniら Cell 87: 493-506 (1996)）。R6/2マウスはヒトHD遺伝子のエクソン1を過剰発現する（内因性プロモーターのコントロール下）トランスジェニックハンチントン病マウスである。R6/2ヒトHD遺伝子のエクソン1は広範なCAG/ポリグルタミン繰り返し（平均で150のCAG繰り返し）を有する。これらのマウスは、ヒトハンチントン病の多くの特徴を有する進行性の最終的に致命的な神経疾患を発症する。ハンチントン（HDエクソン1によってコードされる）のN末端部分により構成される異常凝集体が、R6/2マウスにおいて、細胞質および細胞の核において両方とも45で観察される（Daviesら Cell 90: 537-548 (1997)）。例えば、トランスジェニック動物におけるヒトハンチントンタンパク質は、少なくとも55のCAG繰り返しおよびさらに好ましくは約150のCAG繰り返しを含む遺伝子によってコードされる。これらのトランスジェニック動物はハンチントン病様表現型を発現することができる。

【0241】

これらのトランスジェニックマウスは、誕生後8から10週の体重増加の減少、寿命の減少および異常な足取りにより特徴付けられる運動障害、静止振戻、後肢抱擁および過活動により特徴付けられる（例えば、R6/2系；Mangiariniら Cell 87: 493-506 (1996)

、参照）。表現型は運動機能低下の方向へ悪化する。これらのトランスジェニックマウスの脳は、神経化学的および組織学的異常、例えば、神経伝達物質受容体（グルタミン酸塩、ドーパミン）の変化、N-アセチルアスパラギン酸（完全なニューロンのマークー）の濃度の減少ならびに線条体および脳サイズの減少を示す。したがって、評価は、神経伝達物質レベル、神経伝達物質受容体レベル、脳サイズおよび線条体サイズに関連するパラメーターを評価することを含むことができる。加えて、部分または完全長のトランスジェニック・ヒトハンチントンパク質を含む異常凝集体は、これらの動物（例えば、R 6 / 2トランスジェニックマウス系）の脳組織において存在する。例えば、Mangiariniら Cell 87: 493-506 (1996), Daviesら Cell 90: 537-548 (1997), Brouillet, Functional Neurology 15(4): 239-251 (2000)およびChaら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6480-6485 (1998)、参照。

10

【0242】

動物モデルにおける本明細書に記載されている試験ポリペプチドまたは既知のポリペプチドの効果を試験するため、異なる濃度の試験ポリペプチドを、例えば、試験ポリペプチドを動物の循環系に注射することにより、トランスジェニック動物に投与する。ハンチントン病のような症状が動物において評価され得る。次に、例えば、マウスモデルに関して上記されているハンチントン病のような症状の進行を、試験ポリペプチドでの処理が症状の軽減または遅延をもたらすか否かを決定するためにモニタリングする。他のアッセイにおいて、これらの動物におけるハンチントンパク質凝集体の分離をモニタリングする。次に動物を殺し、脳スライスを得ることができる。次に脳スライスを、トランスジェニックヒトハンチントンパク質、その一部、またはヒトハンチントンパク質もしくはその一部を含む融合タンパク質を含む凝集体の存在に関して分析する。この分析は、例えば、脳組織のスライスを抗-ハンチントン抗体で染色し、抗-ハンチントン抗体を認識するF I T Cを結合させた二次抗体を加え（例えば、抗-ハンチントン抗体はマウス抗-ヒト抗体であり、二次抗体はヒト抗体に特異的である）、蛍光顕微鏡法によりタンパク質凝集体を視覚化することを含むことができる。

20

【0243】

種々の方法がハンチントン病を評価および/またはモニタリングするために利用できる。該疾患に対する種々の臨床的症状および兆候は知られている。ハンチントン病は、運動障害、精神問題および認知変化を引き起こす。これらの症状の程度、発症年齢および症状は変化し得る。運動障害は速いランダムなダンスのような動きを含むことができ、舞踏病と呼ばれる。

30

【0244】

例の運動評価は、追跡眼球運動、サッカード開始、サッカード速度、構音障害、挺舌、指をたたく能力、回内/回外、げんこつ-手-手のひらの反復(a lo fist-hand-palm)、腕の硬直、動作緩慢、最大のジストニア（体幹、上および下肢）、最大の舞踏病（例えば、体幹、顔、上および下肢）、足取り、タンデム歩行および後方突進を含む。例の処置は、例えば、1年間にわたって、Total Motor Score 4 (T M S - 4)、U H D R S の下位尺度を変化させることである。

40

【0245】

癌

クロト-融合ポリペプチドを個体に投与することを提供する本明細書の方法または使用は、癌を処置するために使用することができる。癌は、不適当に高レベルの細胞分裂、不適当に低いレベルのアポトーシスまたはその両方により誘導されるか、または引き起こされるすべての疾患を含む。癌の例は、白血病（例えば、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、急性骨髓芽球性白血病、急性前骨髓球性白血病、急性骨髓单球性白血病、急性单球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ性白血病）、真性赤血球增加症、リンパ腫（ホジキン病、非ホジキン病）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、および固形腫瘍、例えば、肉腫および癌腫（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（e

50

endothelioma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、大腸癌腫、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌腫、基底細胞癌腫、腺癌、汗腺癌腫、皮脂腺癌腫、乳頭癌、乳頭腺癌、囊胞腺癌、髄様癌、気管支癌腫、腎細胞癌腫、肝臓癌、胆管(nile duct)癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、肺癌腫、小細胞肺癌腫、膀胱癌腫、上皮性癌腫、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、神経鞘腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫および網膜芽腫)を含むが、これらに限定されない。リンパ組織増殖性障害も増殖性疾患と考慮される。

【0246】

本明細書で引用するすべての特許、特許出願および刊行物は、出典明示によりそれらの全体を本明細書に包含する。本明細書はその態様について具体的に示され、記載されているが、本明細書の範囲から逸脱することなく、形態における種々の変化および詳細が添付の特許請求の範囲内に包含されることは理解される得ることは当業者に明らかである。

10

【実施例】

【0247】

5. 実施例

実施例 1. クロト-融合ポリペプチドの発現および精製

クロト-融合ポリペプチドの発現

本明細書のポリペプチドは、HEK293T細胞をアルファクロト-の細胞外ドメインおよびFGF23(R179Q)変異体を有する、クロト-融合ポリペプチドをコードする発現ベクターで一時的にトランスフェクトすることにより作った。発現したポリペプチドを含む条件培地を、クロト-、FGF23およびクロト--FGF23(R179Q)融合タンパク質のそれぞれの発現プラスミドの一時的なトランスフェクションにより製造した。トランスフェクションを、リポフェクタミン2000(Invitrogen, Cat # 11668-019)を使用して6-ウェルプレートにて行った。トランスフェクションの5時間後、トランスフェクション混合物を、3mlのD MEM プラス1%のFBSで置き換えた。条件培地を、3mlのD MEM プラス1%のFBSの添加72時間後に回収した。種々の一時にトランスフェクトされたHEK293T細胞の条件培地のサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)により分離し、ウエスタンプロットにより分析するか(図3A)、またはクマシーブルーで染色した(図3B)。

20

【0248】

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を種々のサンプルで実施した(レーン1、コントロール；レーン2、FGF23；レーン3、sクロト-；レーン4-6、sクロト--FGF23)。クマシーブルー染色は、クロト-融合ポリペプチドをコードするベクターでトランスフェクトされていないサンプルを含むレーン1-3において存在しない、>180kDaバンド(図3B、右側に矢印で示されている)の高い発現を示した。培地に分泌されたクロト-融合ポリペプチドの質をウエスタンプロットにより評価した(図3A)。抗-FGF23ラットモノクローナルIgG2A(R&D Systems, Cat# MAB26291)を、ウエスタンプロットによるクロト-融合ポリペプチドを検出するための一次抗体として使用した。クマシーチェル染色ゲルにおいて観察されたさらなるバンドがクロト-融合ポリペプチドであることをウエスタンプロットで確認した。クロト-融合ポリペプチドがクロト-融合ポリペプチドの期待された分子量を有することをウエスタンプロットで確認した。この分析はクロト--FGF23(R179Q)融合タンパク質の発現を示す。

30

【0249】

クロト-融合ポリペプチドの精製

本明細書のポリペプチドを、アルファクロト-の細胞外ドメインおよびFGF23(R179Q)変異体を有するクロト-融合ポリペプチドをコードする発現ベクターで一時的にトランスフェクトされたHEK293T細胞の培養した条件培地から精製した。条件培地を製造するために、sクロト--FGF23-6×Hisをコードする発現ベクターを、発現培地(Freestyle 293発現培地(GIBCO, Cat #12338)中で 10^6 細胞

40

50

/ m¹で464m¹のHEK293T細胞)で懸濁液中で培養されたHEK293細胞にトランスフェクトした(18m¹の2μg/m¹のポリエチレンイミン(PET)と混合された18m¹のOptiMEM 1(GIBCO, Cat #11058)中で500μgのDNA)。トランスフェクション後、培養物を増殖させた(120時間、37 5% CO₂インキュベーター中、125rpmで振とう)。インキュベーション終了後、条件培地を遠心分離(1000rpmで5分)により回収した。次に条件培地をニッケル-アガロースカラムに付した。sクロト- - FGF23-6×Hisがカラムにしっかりと結合し、50mMのイミダゾールで溶離した。次に得られた精製された物質をPBS中で透析し、イミダゾールを取り除いた。精製されたsクロト- - FGF23-6×HisのサンプルをSDS-PAGEにより分離し(レーン1、精製されたsクロト- - FGF23-6×His; レーン2、分子量マーカー)、クマシーブルーでの染色により分析した(図3C)。精製されたsクロト- - FGF23-6×Hisが期待された分子量を有することを染色されたSDS-PAGEゲルで確認した。精製された物質で負荷されたレーンにおける完全長sクロト- - FGF23-6×His以外のタンパク質に対応するバンドを検出しないということは、sクロト- - FGF23-6×Hisが精製されたことを示すものであった。

【0250】

実施例2. クロト-融合ポリペプチドの活性を評価するインビトロアッセイ
Egr-1-ルシフェラーゼ

発現したアルファクロト-融合ポリペプチドの生物学的活性を、Egr-1-ルシフェラーゼレポーターアッセイで試験した。FGF23受容体へのクロト-融合ポリペプチドの結合により、Egr-1プロモーターにより調節される、Egr-1の下流活性化およびルシフェラーゼレポーターの発現を引き起こした。Egr-1-ルシフェラーゼレポーター遺伝子はUrakawaら(Nature, 2006, Vol 444, 770-774)の報告に基づいて構築した。48-ウェル ポリ-D-リシン プレートに播種したHEK293T細胞を、トランスフェクション正規化レポーター遺伝子(ウミシイタケルシフェラーゼ)と一緒にEgr-1-ルシフェラーゼレポーター遺伝子でトランスフェクトした。Egr-1ルシフェラーゼレポーター遺伝子のトランスフェクションの5時間後、トランスフェクション混合物を3m¹のDMEMプラス1%のFBSで置き換えた。条件培地を、3m¹のDMEMプラス1%のFBSの添加72時間後に回収した。5時間後、トランスフェクション混合物を活性を試験するサンプルと置き換えた。最初の実験において、20μg/m¹のヘパリン(Sigma, Cat#H8537; 2mg/m¹の貯蔵物としてDMEMに溶解されている)の存在または非存在下で、50%の条件培地(クロト-、FGF23、クロト-およびFGF23、ならびにクロト- - FGF23(R179Q)融合タンパク質を含む)および1%のFBSを有する50%のDMEMを、Egr-1-ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて試験した(図4)。さらなる実験では、定義された量の精製されたポリペプチドを使用した(図5Aおよび5B)。細胞を不活性な溶解緩衝剤(Promega, Cat #E194A)中で20時間で溶解し、ルシフェラーゼ活性をDual-Gloルシフェラーゼアッセイ系(Promega, Cat #E2940)を使用して決定した。

【0251】

最初の実験において、クロト-融合ポリペプチド活性を非分画条件培地中で実施した。Egr-1-ルシフェラーゼレポーター遺伝子を使用して、これらの実験ではルシフェラーゼレポーターの発現における倍数変化を定量した(図4)。FGF23およびクロト-タンパク質の細胞外ドメインの組合せを含む条件培地はEgr-1-ルシフェラーゼを活性化させたが、FGF23のみを含む条件培地またはクロト-の細胞外ドメインのみを含む条件培地ではEgr-1-ルシフェラーゼを活性化させなかった。融合タンパク質sクロト- - FGF23(R179Q)を含む条件培地は、FGF23またはクロト-のいずれか単独を含む条件培地と対照的に、Egr-1-ルシフェラーゼレポーター遺伝子を活性化した。これらの実験において、融合タンパク質sクロト- - FGF23(R179Q)を含む条件培地は、FGF23およびクロト-の組合せを含む条件培地よりも有意に良

10

20

30

40

50

く E g r - 1 - ルシフェラーゼレポーター遺伝子を活性化した。ヘパリンの存在下で、融合タンパク質 s クロト - F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) を含む条件培地および F G F 2 3 およびクロト - の組合せを含む条件培地による誘導ではわずかに高まった。表 1 は、 E g r - 1 - ルシフェラーゼレポーター・アッセイにおける、条件培地における種々の F G F - クロト - 融合ポリペプチドの相対発現、および種々の F G F - クロト - 融合ポリペプチドに對応する非分画条件培地の相対活性を示す。

【 0 2 5 2 】

表 1 . s クロト - F G F 2 3 融合物変異体の発現および活性

【 表 1 】

	s クロト - F G F 2 3 融合構築物	発現	E g r - 1 - 1 u c レポーター遺伝子における活性
1	s クロト - F G F 2 3	良い	あり
2	I g G s p - s クロト - F G F 2 3	良い	あり
3	s K L - D 1 - F G F 2 3	良い	なし
4	s K L - D 2 - F G F 2 3	無い	不適用
5	s (K L - D 1) 2 - F G F 2 3	良い	なし
6	s K L - D 1 / D 2 - F G F 2 3	無い	不適用
7	s s クロト - (Δ N - 2 6) - F G F 2 3	悪い	なし*
8	s K L D 1 - D 2 (Δ 6 9 2 - 9 6 5) - F G F 2 3	悪い	なし*
9	s K L - D 1 - D 2 (Δ 5 0 7 - 7 9 8) - F G F 2 3	悪い	なし*
10	F G F 2 3 - s クロト	悪い	なし*

* 活性の欠如は、低発現の結果であり得る

【 0 2 5 3 】

E g r - 1 - ルシフェラーゼレポーター・アッセイは、また、実施例 1 に記載されている精製方法を使用して、条件培地から精製された定義された量のタンパク質を使用して行った。発現したポリペプチドを含む非分画条件培地を使用する以前の結果と一致して、精製された F G F 2 3 および s クロト - の組合せでの処理ではルシフェラーゼレポーター活性が得られたが、精製された F G F 2 3 単独での処理では得られなかった(図 5 A)。精製された F G F 2 3 および s クロト - の組合せによるルシフェラーゼレポーター活性は、さらに精製された s クロト - の用量に依存し、該効果はヘパリンの存在(20 μg / ml)により高められた。ルシフェラーゼ活性における s クロト - F G F 2 3 - 6 × H i s 融合ポリペプチドの効果は、E g r - 1 - ルシフェラーゼレポーター・アッセイにおいて、約 1.21 nM 程度の低濃度(1.2 倍変化)および少なくとも最大約 19.3 nM まで(2.4 倍変化)で検出することができた(図 5 B)。ルシフェラーゼ活性における s クロト - F G F 2 3 - 6 × H i s 融合ポリペプチドの活性は、ヘパリン(20 μg / ml)の存在下で有意に高まった。ヘパリンの存在下で、ルシフェラーゼ活性における s クロト - F G F 2 3 - 6 × H i s 融合ポリペプチドの効果は、約 0.6 nM 程度の低濃度(2.0 倍変化)で検出することができた。該結果は、精製された s クロト - F G F 2 3 -

10

20

30

40

50

6 × H i s が用量依存的に E G R - 1 - l u c レポーター遺伝子を誘導したこと、および s クロト - - F G F 2 3 - 6 × H i s における処置を示した。

【 0 2 5 4 】

実施例 3 . 筋肉細胞におけるクロト - 融合ポリペプチドの効果を評価するインビトロアッセイ

発現したクロト - 融合ポリペプチドの生物学的効果を C 2 C 1 2 筋芽細胞で試験した。 C 2 C 1 2 筋芽細胞を I G F - 1 、 F G F 2 または s クロト - - F G F 2 3 で処理することにより、筋管増殖およびシグナル伝達タンパク質のリン酸化を引き起こした。 C 2 C 1 2 筋芽細胞を、 6 ウェルのポリ - D - リシンおよびフィブロネクチン被覆プレートにおいて 4 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で、増殖培地中に (D M E M および F 1 2 、 3 対 1) 、 1 0 % の F B S 、 1 % の G l u t 、 1 % の P / S 、 1 % のリノール酸、 0 . 1 % の I T S : [インスリン (1 0 m g / m l) 、トランスフェリン (5 . 5 m g / m l) およびセレン (5 n g / m l)] 播種した。筋芽細胞がコンフルエンスに達した後 (3 日間) 、培地を分化培地に変えた (2 % のウマ血清、 1 % の G l u t 、 1 % の P / S を有する D M E D) 。 10

【 0 2 5 5 】

筋管直径実験のために、コンフルエント 3 日後、培地を分化培地に変え、細胞を、分化培地中でデキサメタゾン (1 0 0 μ M) の存在または非存在下で、 I G F - 1 (1 0 n M) 、 F G F 2 (2 0 n g / m l) または s クロト - - F G F 2 3 (2 0 n M) で 2 4 時間処理した。処置終了後、細胞をグルタルアルデヒド (P B S 中で 5 %) で固定し、多重蛍光像を回収した。筋管直径を Pipeline Pilot プログラムを使用して測定し、肥大または萎縮を測定した。 20

【 0 2 5 6 】

シグナル伝達タンパク質リン酸化実験のために、コンフルエント 3 日後、培地を分化培地に変え、細胞を、 F B S なしの D M E M で 4 時間飢餓にし、次にラパマイシン (4 0 n M) の存在または非存在下で、 I G F - 1 (1 0 n M) 、 F G F 2 (2 0 n g / m l) または s クロト - - F G F 2 3 (2 0 n M) で 3 0 分処理した。細胞をプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤の存在下で R I P A 緩衝剤中で溶解した。ウエスタンプロット分析を行い、膜を図で示されるように異なる抗体で探査し、スキャンした X 線フィルムを現像した。 30

【 0 2 5 7 】

この試験の結果は、 s クロト - - F G F 2 3 が、コントロールと比較して筋管直径の増加を引き起こし、 I G F - 1 および F G F 2 の結果と同様に C 2 C 1 2 筋管肥大を誘導することを示した (図 5 A) 。加えて、 s クロト - - F G F 2 3 、 I G F - 1 および F G F 2 での処理は、筋管直径の測定に基づいて、デキサメタゾンにより誘導された筋管萎縮を部分的に逆転させることができた。デキサメタゾンの存在または非存在下で、筋管形態における (筋管の厚さにより測定される) s クロト - - F G F 2 3 と F G F 2 間での差は、観察されなかった。 s クロト - - F G F 2 3 、 I G F - 1 および F G F 2 の栄養作用は統計学的に有意であった。

【 0 2 5 8 】

C 2 C 1 2 筋管における効果と一致して、 s クロト - - F G F 2 3 融合タンパク質シグナル伝達は p 7 0 S 6 K および E R K のリン酸化を誘導したが、 C 2 C 1 2 筋管における A K T または F オキソにおいて誘導しなかった (図 5 B) 。シグナル伝達における s クロト - - F G F 2 3 の効果は F G F 2 と同様であったが、 I G F - 1 と異なっていた。 s クロト - - F G F 2 3 による E R K リン酸化の程度は、 I G F - 1 または F G F 2 未満であることが観察された。 s クロト - - F G F 2 3 による p 7 0 S 6 K のリン酸化は、ラパマイシン感受性であった。 C 2 C 1 2 細胞に関する実験において、ヘパリンはシグナル伝達を活性化するために必要ではなかった。これらの結果は、 s クロト - - F G F 2 3 融合ポリペプチドが C 2 C 1 2 筋管においてシグナル伝達を活性化させたことを示す。 40

【 0 2 5 9 】

50

20

30

40

50

実施例4 . sクロト-、FGF23およびFcLALAを含む融合ポリペプチド

種々の融合ポリペプチドは、sクロト-、FGF23および抗体の修飾されたFcフラグメントを使用して構築される。これらの修飾されたFc分子は、改変された（減少した）FcRnへの結合、したがって増加した血清半減期を有する。それらはまた、修飾されたバイオアベイラビリティならびに改変された粘膜表面および体内の他の標的への輸送を有する。本実施例において、FGF23およびsクロト-は、米国特許第7,217,798号およびHessellら2007 Nature 449:101-104に記載されているFcLALAに融合される。これらの融合ポリペプチドの種々の成分間の仲介は、Lodeら1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2475-2480に記載されているリンカーである。これらの融合物は、構築物、例えば、pCDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に挿入され、HEK293細胞において発現される。

10

【0260】

A . sクロト- - FGF23 - FcLALA v1

sクロト-、リンカー、FGF23、別のリンカーおよびFcLALAを含む融合物を構築する。この態様は、sクロト- - FGF23 - FcLALA v1と称され、以下の配列番号：46および47に示される。

sクロト- - FGF23 - FcLALA v1のヌクレオチド配列（1として開始ATG）は配列番号：46に示されている。

sクロト- - FGF23 - FcLALA v1のアミノ酸配列は、配列番号：47として以下に記載されている。

20

この配列において、融合物の種々の成分は以下のとおりである：

sクロト- : 1 - 982 ; リンカー1 : 983 - 1001 ; FGF23 : 1002 - 1228 ; リンカー2 : 1229 - 1233 ; FcLALA : 1234 - 1459。

【0261】

B . sクロト- - FGF23 - FcLALA v2

sクロト-、リンカー、FGF23、別のリンカーおよびFcLALAを含む融合物を構築する。この態様は、sクロト- - FGF23 - FcLALA v2と称され、以下の配列番号：48および49に示される。

sクロト- - FGF23 - FcLALA v2のヌクレオチド配列（1として開始ATG）は配列番号：48に示されている。

30

sクロト- - FGF23 - FcLALA v2のアミノ酸配列は、配列番号：49として以下に記載されている。

この配列において、融合物の種々の成分は以下のとおりである：

sクロト- : (aaまたはアミノ酸) 1 - 982 ; リンカー1 : 983 - 1001 ; FGF23 : 1002 - 1228 ; リンカー2 : 1229 - 1233 ; FcLALA : 1234 - 1450。

【0262】

他の融合ポリペプチドならびにその変異体および誘導体を、本明細書に記載されている、または当分野で知られているとおりに、種々の組合せにおいて、FGF、クロト-、修飾されたFcフラグメントおよび（所望により）リンカー配列を組み合わせることにより構築することができる。

40

【0263】

実施例5 . FGF23およびFcLALAを含む融合ポリペプチド

種々の融合ポリペプチドは、米国特許第7,217,798号に記載されているとおりに、FGF23および抗体の修飾されたFcフラグメントを使用して構築される。これらの修飾されたFc分子は、改変された（減少した）FcRnへの結合、したがって増加した血清半減期を有する。それらはまた、修飾されたバイオアベイラビリティならびに改変された粘膜表面および体内の他の標的への輸送を有する。本実施例において、FGF23は、FcLALAに融合される。これらの融合ポリペプチドの種々の成分間の仲介は、Lodeら1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2475-2480に記載されているリンカーである

50

。これらの融合物は、例えば、p c D N A 3 . 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に挿入され、H E K 2 9 3 細胞において発現される。

【 0 2 6 4 】

C . F G F 2 3 - F c L A L A v 1

F G F 2 3 、リンカーおよびF c L A L A を含む融合物を構築する。この構築物は、F G F 2 3 - F c L A L A v 1と称され、以下の配列番号：5 0 および5 1に示される。

F G F 2 3 - F c L A L A v 1のヌクレオチド配列（1として開始A T G）は配列番号：5 0 に示されている。

F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L A L A v 1のアミノ酸配列は、配列番号：5 1として以下に記載されている。

10

この配列において、融合物の種々の成分は以下のとおりである：

F G F 2 3 : (a a) 1 - 2 5 1 ; リンカー：2 5 2 - 2 5 6 ; F c L A L A : 2 5 7 - 4 8 2 。

【 0 2 6 5 】

D . F G F 2 3 - F c L A L A v 2

F G F 2 3 およびF c L A L A を含むF G F 2 3 - F c L A L A v 2を含む融合物を構築する。

F G F 2 3 - F c L A L A v 2のヌクレオチド配列（1として開始A T G）は配列番号：5 2 に示されている。

20

F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L A L A v 2のアミノ酸配列は、配列番号：5 3 として以下に記載されている。

20

この配列において、融合物の種々の成分は以下のとおりである：

F G F 2 3 : 1 - 2 5 1 ; リンカー：2 5 2 - 2 5 6 ; F c L A L A : 2 5 7 - 4 7 3 。

【 0 2 6 6 】

他の融合ポリペプチドを、本明細書に記載されている、または当分野で知られているとおりに、種々の組合せにおいて、F G F 配列、修飾されたF c フラグメントおよび（所望により）リンカー、およびそれらの変異体および誘導体を組み合わせることにより構築することができる。

【 0 2 6 7 】

E . s クロト - - F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L A L A 融合タンパク質によるE g r - 1 - 1 u c レポーター遺伝子の活性化、F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L A L A タンパク質によるE g r - 1 - 1 u c レポーター遺伝子の活性化、およびF G F 2 3 (R 1 7 9 Q) 対 F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L a L a v 2 の薬物動態学プロフィールを決定する。

30

【 0 2 6 8 】

図7は、s クロト - - F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L A L A 融合タンパク質によるE g r - 1 - 1 u c レポーター遺伝子の活性化を示す。H E K 2 9 3 T 細胞を、E g r - 1 - 1 u c レポーター遺伝子で一過性にトランスフェクトし、2 0 μ g / m l のヘパリンの非存在または存在下で示されている馴化培地でインキュベートする。次に、ルシフェラーゼ活性を1 8 時間後に決定する。結果は、s クロト - - F G F 2 3 - F c L A L A 融合タンパク質がレポーター遺伝子活性を誘導することを示す。これらの誘導は、ヘパリンの存在において有意に増強される。s K F - F c v 1 : s クロト - - F G F 2 3 - F c L A L A v 1 ; s K F - F c v 2 : s クロト - - F G F 2 3 - F c L A L A v 2 。

40

【 0 2 6 9 】

図8は、F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L A L A タンパク質によるE g r - 1 - 1 u c レポーター遺伝子の活性化を示す。H E K 2 9 3 T 細胞を、クロトの全長膜貫通形態と共にE g r - 1 - 1 u c レポーター遺伝子で一過性にトランスフェクトし、示されている3 0 % の馴化培地でインキュベートする。次に、ルシフェラーゼ活性を1 8 時間後に決定する。結果は、F G F 2 3 - F c L A L A 融合タンパク質がF G F 2 3 と同様の様式においてレポーター遺伝子活性を誘導することを示す。

50

【0270】

図9は、FGF23(R179Q) 対 FGF23(R179Q)-FcLALA_v2の薬物動態学プロフィールを示す。グループあたり4匹のマウスに、FGF23(R179Q)-6×HisまたはFGF23(R179Q)-FcLALA_v2を2mg/kgで皮下注射する。示されている時間に、血清サンプルを回収し、ELISAによりFGF23について分析する。血清中のFGF23(R179Q)-FcLALA濃度は、24時間時点で上昇を維持するが、FGF23(R179Q)-6×Hisは基底レベルに戻る。結果は、FcLALAの添加で、FGF23(R179Q)のインビボ半減期が有意に改善されることを示す。

【0271】

実施例6. デキサメタゾン誘導筋萎縮後の筋肉成長の増強におけるsクロト- - FGF23融合物のインビボ有効性

実験データは、sクロト- - FGF23の筋肉内注射は、デキサメタゾン誘導筋萎縮後の筋肉量の成長を有意に増強することを示す。この実験において、配列番号：41に対応するペプチドを使用する。

【0272】

図10は、腓腹筋-ヒラメ筋-足底筋(GSP)筋肉の絶対重量(A)および重量変化パーセント(B)を示し、sクロト- - FGF23(KLOFGF)の筋肉内注射は、sクロト- (SKLO)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)の筋肉内注射と比較して、デキサメタゾン(DEX) - 誘導筋萎縮後の筋肉量の再成長を有意に増強することを示す。

【0273】

80匹の15週齢のオスC57BL/6マウスを、それぞれ10匹のマウスで8つのグループに体重においてランダム化する。2.4mg/kg/日で3週間、4つのグループにDEXなしの水を与える(W21d)、他の4つのグループにDEXありの飲料水を与える(D21d)。3週間後、DEX処置を停止し、1つのW21dおよび1つのD21dグループを即座に殺し、DEX処置により誘導される筋萎縮の程度を確立する。残りの3つのグループのW21dまたはD21dマウスは、右側の腓腹筋-ヒラメ筋-足底筋の筋肉複合体に1日おきに、2×50μlのPBS、sクロト- - FGF23(KLOFGF; 1.6mg/ml)またはsクロト- (SKLO; 1.6mg/ml)のいずれかを筋肉内注射で与える別の14日間(R14d)中に回復することができる。マウスを最後の筋肉内注射24時間後に殺し、筋肉体重を決定し、絶対重量(A)またはW21d+PBSグループと比較しての変化パーセントとして示す。

【0274】

これらのデータは、デキサメタゾン誘導筋萎縮後の筋肉成長の増強におけるsクロト- - FGF23融合物のインビボ有効性を示す。

【0275】

実施例7. 凝集を減少させる、望ましくないプロテアーゼ誘導開裂を減少させる、および生産を増加させる融合タンパク質のFGF23部分におけるさらなる変異

いくつかの変異を、sクロト- - FGF23およびFGF23-FcLala融合ポリペプチドのFGF23部分内で試験する。これらは、Q156、C206およびC244(数字はFGF23アミノ酸配列に基づく)を含む。実施例の個々の変異は、Q156A、C206SおよびC244Sを含み、これらの部位のいずれかでの変異は、R179(例えば、R179Q)での変異と組み合わせることができる。実施例の配列は、図2の配列番号：54から68において提供される。

【0276】

C206およびC244は、二量化に関与することと考えられ、Q156は、プロテアーゼ感受性部位として本発明者らにより同定された部位である。他の任意のアミノ酸へのこれらのアミノ酸の変異は、FGF23活性を妨害することなく、凝集を減少させること、望ましくないプロテアーゼ誘導開裂を減少させること、および細胞からのタンパク質生

10

20

30

40

50

産を増加させることによりタンパク質の質を増強する。これは、これらの3つの位置がヒト、アカゲザル、ウシ、マウスおよびラットにおいて見出されるFGF23タンパク質において保存されているため、予期し得ない結果である。この保存は、太字で下線のQ156、C206およびC244にて、配列番号：69、70、71、72および73間の比較において以下に示される。

【表2】

hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	MLGARLRLWVCALCSVCSMSVLRAYPNASPLLGSSWGGLIHLHYTATARNSYHLQIHKNGH MLGARLRLWVCALCSVCSMSVIRAYPNASPLLGSSWGGLIHLHYTATARNSYHLQIHKNGH MLGARLGLWLWVCTLSCV----VQAYPNSSPLLGSSWGGLIHLHYTATARNSYHLQIHKDGH MLGTCLRLLVGVLCVSLGTARAYPDTSPILLGSNWGSLTHLYTATARTSYHLQIHRDGH MLGACLRLLVGVLCVSLGTARAYSDTSPILLGSNWGSLTHLYTATARNSYHLQIHRDGH
hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	VDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSSRRYLCMDFRGNIFGSHYFPENCRFQHQTL VDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSSRRYLCMDFRGNIFGSHYFPENCRFRHWTL VDGSPQQTVYSALMIRSEDAGFVVITGVMSSRRYLCMDFTGNIFGSHHFSPESCRFRQRTL VDGTPHQTIYSALMITSEDAGSVVITGAMTRRFLCMDLHGNIFGSLHFSPENCKFRQWTL VDGTPHQTIYSALMITSEDAGSVVIIGAMTRRFLCMDLRGNIFGSYHFSPENCRFRQWTL
hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	ENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPPPS <u>Q</u> FLSRRNEIPLIHFNTPPI-PRRHTR ENGYDVYHSPQHHFLVSLGRAKRAFLPGMNPPPS <u>Q</u> FLSRRNEIPLIHFNTPPI-PRRHTR ENGYDVYHSPQHRFVLVSLGRAKRAFLPGTNPPPYA <u>Q</u> FLSRRNEIPLPHFAATARPRRHTR ENGYDVYLSQKHHYLVSLGRAKEIFQPGTNPPPF <u>S</u> FLARRNEVPLLHFYTVR-PRRHTR ENGYDVYLSPKHHYLVSLGRSKEIFQPGTNPPPF <u>S</u> FLARRNEVPLLHFYTAR-PRRHTR
hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	SAEDDSERDPLNVLKPRARMTPAPAS <u>C</u> SQELPSAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNTHAGGT SAEDDSERDPLNVLKPRARMTPAPAS <u>C</u> SQELPSAEDNSPVASDPLGVVRGGRVNTHAGGT SAHDSG--DPLSVLKPRARATPVPAAC <u>C</u> SQELPSAEDSGPAASDPLGVLRGHRLDVRAGSA SAEDPPERDPLNVLKPRPRATPVPS <u>C</u> SRELPSAEEG GPAASDPLGVLRGRGDARGGAG SAEDPPERDPLNVLKPRPRATPIPVPS <u>C</u> SRELPSAEEG GPAASDPLGVLRGRGDARGGAG
hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	GPEG <u>C</u> RPFPAKFI (配列番号：69) GPE <u>A</u> CRPFPPKFI (配列番号：70) GAER <u>C</u> RPFPGFA (配列番号：71) GADRC <u>C</u> RPFPRFV (配列番号：72) GTD <u>R</u> CRPFPRFV (配列番号：73)

【0277】

これらの3つの変異がFGF23活性を妨害しないという事実は、図11に示される。この図は、FGF23(R179Q)-FcLALAならびにQ156A、C206S、C244SおよびC206S/C244S変異体によるEgr-1-lucレポーター遺伝子の活性化を示す。

【0278】

HEK293T細胞を、HEK293T細胞を、クロトーネ全長膜貫通形態と共にEGR-1-lucレポーター遺伝子で一過性にトランスフェクトし、FGF23-FcLALA変異体を示す。次に、ルシフェラーゼ活性を18時間後に決定する。結果は、C206S、C244S、C206S/C244S(3つの独立したクローニング)およびQ156A(3つの独立したクローニング)変異体が、EGR-1-lucレポーター遺伝子活性の活性化において、FGF23-FcLALA融合タンパク質と同等に有効であることを示す。

【0279】

C244およびC206の変異がFGF23の二量化および凝集を変化させることを示すデータは、図12に示される。この図は、FGF23(R179Q)-FcLALAのWT、Q156A、C206S、C244SおよびC206S/C244S変異体のタンパク質の質を示す。示されるFGF23-FcLALA発現ベクターで一過性にトランスフェクトされたHEK293T細胞由来の馴化培地を、FGF23抗体を使用してウェスタンプロットにより分析する。結果は、C206S/C244S変異がタンパク質二量化を妨害し、Q156A変異が減少したタンパク質分解フラグメントを有することを示す。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 0 】

したがって、驚くべきことに、これらのQ 1 5 6、C 2 0 6およびC 2 4 4残基が種間で保存されているにもかかわらず、それらは、F G F 2 3活性を減少させることなく変異させることができ、凝集および開裂を減少させること、および生産を改善することにより、タンパク質の質を増強することができる。

【 0 2 8 1 】

他に定義がない限り、本明細書において使用されている技術的および科学的用語は、本明細書が属する分野でよく知っている専門家により通常理解されるのと同じ意味を有する。

【 0 2 8 2 】

他に示されていない限り、具体的に詳細に記載されていないすべての方法、工程、技術および操作は、当業者に明らかであるため、それ自体既知の方法で行うことができるか、または行われている。例えば、標準ハンドブックおよび本明細書に記載されている一般的な背景技術および本明細書で引用されているさらなる文献も参照されたい。

【 0 2 8 3 】

特許請求の範囲は、非限定的であり、以下で提供される。

特定の態様および特許請求の範囲は、本明細書に詳細に記載されているが、これは、説明の目的のためほんの一例としてであり、特許請求の範囲、または、あらゆる対応するさらなる出願の特許請求の範囲の対象の範囲に対して限定することを意図しない。特に、種々の置換、変化および修飾が、特許請求の範囲により定義されている記載の精神および範囲から逸脱することなく、本記載から作られ得ると本発明者らは考える。核酸出発物質、興味あるクローニングの選択は、本明細書に記載されている態様の知識を有する当業者に対して日常的な事柄であると考えられる。他の局面、有利なものおよび修飾は、特許請求の範囲内であると考える。後に出願された対応する出願における特許請求の範囲の補正は、種々の国の特許法による限定のためであって、特許請求の範囲の対象を放棄すると解釈されるべきではない。

【 0 2 8 4 】

【表3】

配列表(図2)

ヒトクロト一核酸配列(NM_004795) (配列番号:1)
タンパク質コード領域:9-3047

1	cgcgcaagcat gccccccaggc gccccggcgc gcccggcccg gcccggcccg ccgtcgctgt	
61	cgctgctgct ggtgctgctg ggctggcg gcccggccct gctgtggag ccggggcgacg	
121	gcgcgcagac ctgggcccgt ttctcgccgc ctccctgcccc cgaggccg ggccctttcc	10
181	agggcacatt ccccgacggc ttcccttggg ccgtgggcaag cgccgcctac cagaccgagg	
241	gcccgtggca gcagcacggc aagggtgcgt ccatactggga tacgttacc caccacccccc	
301	tggcacccccc gggagactcc cgaaacgcca gtctggcggtt gggccccc tcggcgctgc	
361	agcccgccac cggggacgta gccagcgaca gctacaacaa cgtcttccgc gacacggagg	
421	cgtcgccgaa gctcggttc actcaactacc gtttctccat ctcgtggcg cgagtgcctcc	
481	ccaaatggcag cgcggcggtc cccaaacccgg aggggctgcg ctactaccgg ccgctgctgg	
541	agccggctgcg ggagctggc gtgcagcccg tggtcaccct gtaccactgg gacctggcccc	
601	agcgcctgca ggacgcctac ggccgttggg ccaacccgcg cctggccgac cacttcagg	20
661	attacgcgga gctctgttc cgccacttcg gccgtcaggt caagtactgg atcaccatcg	
721	acaaaccccta cgtgggtggcc tggcacggct acgccaccgg ggcctggcc cccgccatcc	
781	ggggcagccc ggggctcggg tacctgggtt ccgcacaacct cctccctggct catgccaaag	
841	tctggcatct ctacaatact tcttccgtc ccactcagg aggtcagg tccattggccc	
901	taagctctca ctggatcaat cctcgaagaa tgaccgacca cagcatcaa aatgtcaaa	
961	aatctctgga ctttgtacta ggttggtttg ccaaaccgt atttattgt ggtgactatc	
1021	ccgagagcat gaagaataac ctttcatcta ttctgcctga tttactgaa tctgagaaaaa	30
1081	atttcataa aggaactgct gacttttttgc ctctttgtt tggacccacc tttagtttcc	
1141	aacttttggaa ccctcacatg aagttccgccc aatttggaaatc tcccaacctg aggcaactgc	
1201	ttcctggat tgaccctgaa tttaaccatc ctccaaatatt tattgtggaa aatggctgg	
1261	tgttctcagg gaccaccaag agagatgtatg ccaaataatat gtattacctc aaaaaggatca	
1321	tcatggaaac cttaaaagcc atcaagctgg atgggggttga tgtcatcg tataccgcatt	
1381	ggccctcat ggtgggtttc gagtggcaca gaggttacag catcaggcg ggactcttct	
1441	atgttgcatt tctaagccag gacaagatgt ttttgcctaa gtcttcagcc ttgttctacc	40
1501	aaaagctgat agagaaaaat ggcttccctc ctttacctga aaatcagccc ctagaaggaa	
1561	catttccctg tgactttgtt tggggagttt ttgacaacta cattcaagta gataccactc	

【表4】

1621	tgtctcagtt taccgacctg aatgtttacc tgtggatgt ccaccacagt aaaaggctta	
1681	ttaaagtgga tggggttgc accaagaaga gaaatccca ctgtgttgc tttgctccca	
1741	tccagccccca gatcgcttta ctccaggaaa tgcacgttac acatittcgc ttctccctgg	
1801	actggccct gatttcctt ctggtaacc agtcccaggt gaaccacacc atccctgcagt	
1861	actatcgctg catgccage gagcttgcct gtgtcaacat caccccaagt gtggccctgtt	10
1921	gccccctat ggccccaac caaggactgc cgcccttcct ggccaggcag ggccgctgg	
1981	agaaccccta cactgcctg gctttgcag agtatgcgg actgrgcatt caagagctcg	
2041	gccatcacgt caagcttgg ataacgatga atgagccgtataaaggaaat atgacataca	
2101	gtgctggcca caacccctg aaggcccatg ccctggcttg gcatgtgtac aatgaaaaagt	
2161	ttaggcatgc tcagaatggg aaaatatcca tagccttgca ggctgattgg atagaacctg	
2221	cctgccttt ctccaaaag gacaaagagg tggccgagag agttttggaa tttgacatcg	
2281	gctggctggc tgagccattt tcggctctg gagattatcc atgggtgatg agggactgc	
2341	tgaaccaaag aaacaatttt cttttccctt atttcactga agatgaaaaa aagctaattc	
2401	aaggtaatll tgactlffff gcttaagcc attttaccac calcccttgta qactcaaaaa	20
2461	aagaagatcc aataaaatac aatgattacc tagaagtgc agaaatgacc gacatcacgt	
2521	ccctcaactc ccccaactcg gtggcggtcg tqccctgggg qttqcqcaaa gtgctgaact	
2581	ggctgaatll caagtaacggg gaccccccata tgtaataat atccaaacyga atcgatcgacg	
2641	ggctgcattgc tgaggacgac cagctgaggg tgtattatgc cagaattac ataaaaaay	
2701	ctctcaaagc ccacatactg qatqgtatca atctttgcgg atactttgt tattcggtta	
2761	acgaccgcac agctccgagg tttggctct atcgatgc tgcagatcg tttgagccca	
2821	aaggcatccat gaaacattac aggaaaatta ttgacagcaa tggttcccg ggcccaaaaa	30
2881	ctctggaaag attttgtcca gaagaattca ccgtgtgtac tgagtgcagt ttttttcaca	
2941	cccgaaagtc ttactggct ttcatagctt ttctattttt tgcttcatt atttctctct	
3001	cccttatatt ttactactcg aagaaaggca gaagaagtta caaatagttc tgaacattt	
3061	tctattcatt cattttgaaa taattatgc gacacatcg ctgttaacca tttgcaccc	
3121	taagtgttgt gaaactgtaa atttcataca ttgtacttct agaaaaacatt tttgcgttct	
3181	atgacagagg ttttggaaatg ggcatacggtg atcgaaaaat attgaataat gcgaatagt	
3241	cctgaatttg ttctttttt ggggtgattaa aaaactgaca ggcactataa tttctgtaac	
3301	acactaacaa aagcatgaaa aataggaacc acaccaatgc aacatgg cagaaatttg	40
3361	aatgacaaga ttaggaatat ttcttctgc acccacttct aaatataatg tttttctgaa	
3421	aatgtatattt gcaagagttc gaatagaaag ttatgtacca agtaaccatt tctcagctgc	

【0285】

【表5】

3481 cataataatg octagtggct tcccctctgt caaatctagt ttcctatgga
 aaagaagatg
 3541 gcagatacag gagagacgac agagggtcct aggctggaat gttccttcg
 aaagcaatgc
 3601 ttcttatcaa tactagtatt aatttatgtt tactggtaat gacataacttg
 gagagcaaat
 3661 tatggaaatg tgtatTTT atgatTTT aggtcctgtc taaaaccctgt
 gtccctgagg
 3721 gatctgtctc actggcatct tgTTGAGGGC cttgcacata ggaaactttt
 gataagtatc
 3781 tgCGGaaaaaa caaacatgaa tcctgtgata ttggctctt caggaagcat
 aaagcaattt
 3841 tggaaatacag tataccgcag tggctctagg tggaggaaag gggaaaaag
 tgcTTTTT
 3901 gtgcaacatt atgattaatc tgattataca ccattttga gcagatcttg
 gaatgaatga
 3961 catgaccttt cccttagagaa taaggatgaa ataatcactc attctatgaa
 cagtgcacact
 4021 atTTTCTATT CTTAGCTGT ACTGTAATT CTTGAGTTG ATAGTTTAC
 aaattcttaa
 4081 taggttcaaa agcaatctgg tctgaataac actggatttg tttctgtat
 ctctgaggc
 4141 tattttatgt ttttgcgtc acttctgtgg aagtagctt gaacttagttt
 tactttgaac
 4201 ttTCACGCTG aaacatgcta gtgatatcta gaaaggccta attaggtctc
 atccTTTAA
 4261 gcccTTAAA taagtcttgc tgatTTTCAg acaggaaagt ctctcttata
 cactggagct
 4321 gttttataga taagtcaata ttgtatcagg caagataaac caatgtcata
 acaggcattt
 4381 ccaacctcac tgacacaggg tcatagtgtt taataatata ctgtactata
 taatataatca
 4441 tcttttagagg tatgatTTT tcatgaaaga taagctttt gtaatattca
 tttaaagtg
 4501 gacttattaa aattggatgc tagagaatca agtttatttt atgtatataat
 tttctgtatt
 4561 ataagagtaa tatatgttca ttgtaaaaat tttaaaaaca cagaaactat
 atgcaaaagaa
 4621 aaaataaaaaa ttatctataa ttcagaacc cagaaatgc cactattaa
 atttcctacg
 4681 tattttattt tacatagatc atattgtata tagttgtat ctTTTATTAAT
 ttttattatg
 4741 aaactttcct ttgtcattat tagtcttcaa aagcatgatt tttaatagtt
 gtgtgaggatt
 4801 ccaccacagg aatgtatcac aacttaaccg ttcccgtttt ttagactagt
 ttcttattaa
 4861 ttttgatgaa ttgtgtttaa aaataatttt gttgctacat ttactttat
 ttccTTGACT
 4921 gtaaaagagaa gtaattttgc ttcttgataa agtattatata taataataaa
 tctgcctgca
 4981 acttttgcc ttctttcata atc

クロトーアミノ酸配列(NP_004786) (配列番号:2)

1 MPASAPRRP RPPPPSLSLL LVLLGLGRRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA PEAAGLFQGT
 61 FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGKGSIW DFTHHPLAP PGDSRNALSP LGAPSPLQPA
 121 TGDVASDSDYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRLLERL
 181 RELGVQPVVT LYHWDLQRL QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQQ VKYWITIDNP
 241 YVVAWHGYAT GRLAPGIRGS PRLGYLVahn LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPDRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP DFTESEKKFI
 361 KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW IDLEFNHPQI FIVENGWFV

【表6】

421 GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD
 481 FLSQDKMLLP KSSALFYQKL IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ
 541 FTDLNVYLWD VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL LARQGAWENP
 661 YTALAFAEYA RLCFQELGRH VKLWITMNEP YTRNMNTYSAG HNLLKAHALA WHVYNEKFRH
 721 AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNLQ
 781 RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT FDFFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLNLQ
 841 SPSQVAVVWP GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIIDS NGFPGPETLE
 961 RFCPEEFTVC TECSEFFHTRK SLLAFIAFLF FASIISLSLI FYYSKKGRRS YK

ペータークロト－核酸配列(NM_175737) (配列番号:3)
タンパク質コード領域:98-3232

1 atcctcagtc tcccagttca agctaattcat tgacagagct ttacaatcac aagcttttac
 61 tgaagctttg ataagacagt ccagcagttg gtggcaaatt aagccaggct gtgcggcagg
 121 atctccaggaa aatgaatggta ttttcttcag cactgtatggaa ataaccacac gctataggaa
 181 tacaatgtcc aacggggggat tgcaaaatgc tgcatacctt tcagcactt ttctgtacg
 241 agctgttact ggattctctg gagatggaaat agctatatgg tctaaaaatc ctaatttac
 301 tcccgtaaat gaaaatgcacg tgtttcttca tgacactttc cctaaaaact ttttctgggg
 361 tattgggact ggacgttttc aagtggaaat gagttggaaat aaggatggaa aaggaccttc
 421 tatataggat catttcattcc acacacaccc taaaatgtc agcagcacga atgttccag
 481 tgacagttat attttctgg aaaaagactt atcagccctg gattttatag gagtttcttt
 541 ttatcaattt tcaatttctt ggcacaggct tttccccat ggaatagtaa cagttgcca
 601 cgccaaaaggat ctgcagttact acagtacttct tctggacgc ctatgtctt gaaacattga
 661 acctatagtt actttatacc actgggattt gcctttggca ctacaagaaa aatatgggg
 721 gtggaaaaat gataccatata tagatatctt caatgactat gccacatact gtttccagat
 781 gtttggggac cgtgtcaaat attggattac aattcacaac ccataatctt tggcttggca
 841 tgggtatggg acaggatgtc atgcccctgg agagaaggaa aatttagcag ctgtctacac
 901 tggggacac aacttgcatac aggttcactc gaaatgttgg cataactaca acacacattt
 961 ccccccacat cagaagggtt ggttatcgat cacgttggga tctcatggc tcgagccaaa
 1021 ccggctggaa aacaatgttcc atatattca atgtcaacaa tccatgtttt ctgtgttgg
 1081 atggtttgc aaccctatcc atggggatgg ccaactatccca gaggggatga gaaagaagtt
 1141 gttcteogttt ctaccatcc tctctgttgc agagaaggcat gagatggag gcacagctga
 1201 tttcttttgc ttttcttttgc gaccaacaa cttcaagccc ctaaacacca tggctaaaat
 1261 gggacaaaat gtttcttca atttaagaga agcgctgaac tggattaaac tggaaatacaa
 1321 caaccctcga atcttgattt ctgagaatgg ctggttcaca gacagtctg tgaaaacaga
 1381 agacaccacg gccatctaca tgatgaagaa tttcctcagc caggtgttca aagaataaag
 1441 gtttagatgaa atacgatgtt ttgggtatac tgcctggctt ctcctgtatg gctttgaatg
 1501 gcaggatgt tacaccatcc gcccggattt atttatgtt gattttaca gtaaacagaa
 1561 agagcggaaa cctaagtctt cagcacacta ctacaaacag atcatacgaa aaaaatggttt
 1621 ttctttaaaaa gagtccacgc cagatgtc gggccagttt cccctgtact tctcttgggg
 1681 tgtcaactgaa tctgttcttca agcccgagtc tgggttcttc tccccacagt tcagcgatcc
 1741 tcatactgtac gtgtggaaacg ccactggcaaa cagactgttgc caccgagtgg aaggggtgag
 1801 gctaaaaaca cggcccgctc aatgcacaga tttttaaac ataaaaaaac aaccttggat
 1861 gttggcaaga atgaaatgtca cccactaccg gtttgcctt gattggcctt cggcccttcc
 1921 cactggcaac ctgtccgggg tgaaccgaca gggccctgagg tactacaggt gcgtggcag
 1981 tgaggggctg aagcttggca tctccgcgtt ggtcaccctt tattatccca cccacgcccc
 2041 cctaggccctc cccgaggccctc tggatgttgc cggccgggtgg ctgaaccctt cggccggca
 2101 ggcottccag gcttacgttgc ggttgttgc tccaggagctg ggggacctgg tgaagotctg
 2161 gatcaccatc aacgacccatc accggcttca agtacatctac aaccgcttgc gcaacgacac
 2221 ctacggggcgg gggccacacc tgggttgc ccaacccctt ggcctggccctt tttacgaccc
 2281 gcagttcagg cccttcacgc gggggccctt gtcgttgc tggccacggc actggggccga
 2341 acccgccaaac ccctatgttgc acttcacgtt gggccggcc gggccgttcc tggccatgttgc
 2401 gatcgttgc ttcggccggc cttttttca gacccggggac tttttttccggg ccatgaggga
 2461 atacatttgc tccaaaggccacc gacggggctt tccatgttgc gcccctgcgc gcccaccc
 2521 ggccggaaagg aggctgttca agggccggc cttttttccggg tttttttccggg tttttttcc
 2581 tagtttgcgtt atgcacccatc agttttttccggg cttttttccggg tttttttccggg
 2641 gttttttccggg gacatccatc gttttttccggg tttttttccggg tttttttccggg
 2701 ggttggccaaat ctgttgcgtt gggccggcc gacatccatc gttttttccggg tttttttcc
 2761 cggccatgttgc atgcacccatc gttttttccggg tttttttccggg tttttttccggg

10

20

30

40

【0286】

【表7】

2821 gaagtacott caggaggtgc tgaaaagcata cctgatttat aaagtcagaa tcaaaggcta
 2881 ttatgcattt aaactggctg aagagaaaatc taaacccaga tttggatct tcacatctga
 2941 ttttaaagct aaatcctcaa tacaattta caacaaagt atcagcagca ggggcttccc
 3001 ttttgagaac agtagttcta gatgcagtc aacccaagaa aatacagagt gcactgtctg
 3061 cttattcattt gtgcagaaga aaccacttat attctgggt ttttgcttc tctccaccct
 3121 ggttctactc ttatcaattt ccattttca aaggcagaag agaagaaaagt tttggaaagc
 3181 aaaaaactta caacacatac cattaaagaa aggcaagaga gttgttagct aaactgtatc
 3241 gtctgcattt tagacagttt aaaaattcat cccagttcc

ペータークロトーアミノ酸配列(NP_783864)(配列番号:4)

1 mkgcgaagsp gnewiffstd eittryrntm sngqlqrsvi lsalillrav tgfsgdgrai
 61 wsknlpftpv nesqlflydt fpknfwgq tgqalqvegsw kkdqkgsiw dhfihthlkn
 121 vsetngssds yifilekdlsa ldfqvsfyq fsiswprlfpl dgivtvanak glqyystlld
 181 alvlniepi vtlyhwdlpl alqekyggwk ndtiidifnd yatycfqmfg drvkywitih
 241 npylvawhgy gtgmhpgek gnlaavytvq hnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
 301 gshwiepnrs entmdifkcq qsmvsvlgwf anpihgdy pegmrkkifs vlpifseaek
 361 hemrgtadff afsfgpnfnk plntmakmgq nvslnlreal nwikleynnp riliaengwf
 421 tdsrvketedt taiymmmknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytiirrlfy
 481 vdfnskqker kpkssahyyk qirengfsl kestpdvqqq fpcdfswgvt esvlkpesa
 541 sspqfsdphl yvwnatgnrl lhrvegvrlk trpaqctdfv nikkqlemla rmkvthyrfa
 601 ldwasvlpptg nlsavnrgnl ryyrcvvseg lkligisamvt lyypthahlg lpepllhadg
 661 wlmpstaeaf qayaglcfcqf lgdlvklwt inepnrlsdi ynrsgndtyg aahnllvaha
 721 lawrlydrqf rpsqrgavsl sihadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfk
 781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrlrkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
 841 ydsdrdqfql qditrlsspt rlavipwgvr kllrwvrrny gdmdiyitas giddqaledd
 901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrikgyya fklaeekskp rfgfftddf akssiqfynk
 961 vissrgfpfe nsssrsqstq entectvclf lvqkkplifl gccffstlvi llsiaifqrq
 1021 krrkfwkakn lqhiplkkkgk rvvs

10

ヒトクロトードメイン1(KL-D1)アミノ酸配列(配列番号:5)

58 qgt
 61 fpdgflwavg saayqteggw qqhgkgasiw dtfthhplap pgdsrnaslp lgapsplqpa
 121 tgdvasdsyn nvfrdeair elgvthyrfs iswarvlpng sagvpnregl ryrrllerl
 181 relgvqvvt lyhwlpqrl qdayggwanr aladhfrdy elcfhrfqq vkywitidnp
 241 yvawhgyat grlapgirgs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptq ggqvsialss
 301 hwinprrmtd hsikecqksl dfvlwgafk vfidgdypes mknnllssilp dftesekkfi
 361 kgtadffalc fgptlsfqll dphmkfrqle spnlrqllsw idlefnhpqi fivegwfv
 421 gttkrddaky myylkkfime tlkaikldgv dvigytawsl mdgfehwrgy sirrglfyvd
 481 flsqdkmlip kssalfyqkl iekngf

20

30

ヒトクロトードメイン2(KL-D2)アミノ酸配列(配列番号:6)

517 gtfp cdawgvvdn yiqvdttlsq
 541 ftdlnvyiwd vhhskrlikv dgvttkkrks ycvdfaaiqp qiallqemhv thfrfsldwa
 601 lilplgnqsq vnhtilqyyr cmaselrvrn itpvvalwqp mapnqglpml larqgawenp
 661 ytalafaeaya rlcfqelghh vklwitmnep ytrnmtyasg hnllkahala whvynekfrh
 721 aqngkisial qadwiepacp fsqkdkevae rviefdigwl aepifgsgdy pwvmrdwlnq
 781 rnnfllypyft edekkliqgt fdflalshyt tilvdseked pikyndylev qemtditwln
 841 spsqvavvpw glrvlnwlk fkygdlpmyi isngiddqlh aeddqlrvyy mqnyinealk
 901 ahildginlc gyfaysfnr taprfglyry aadqfepkas mhyrkids ngf

40

クロトー細胞外ドメイン(シグナルペプチドを有さない)アミノ酸配列(配列番号:7)

28 epgdgaq twarfsrppa peaaglfqgt
 61 fpdgflwavg saayqteggw qqhgkgasiw dtfthhplap pgdsrnaslp lgapsplqpa
 121 tgdvasdsyn nvfrdeair elgvthyrfs iswarvlpng sagvpnregl ryrrllerl

【表8】

181 relgvqpvt lyhwqlpqrl qdayggwanr aladhfrya elcfrrhfgqq vkywitiidnp
 241 yvvawhgyat grlapgirgs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptq gggvsialss
 301 hwinprrrmtd hsikecqksl dfvlgwfaikp vfidgatypes mknlnssilp dftesekkfi
 361 kgtadffalc fgptlsfqll dphmkfrqle spnlrqllsw idlefnhpqi fivengwfvs
 421 gttkrddaky myylkkfime tlkaikldgv dvigytawsl mdgfehwrgy sirrglfyvd
 481 flsqdkmlp kssalfyqkl iekngfpplp enqplegtfp cdfawgvvdn yiqvdttlsq
 541 ftdlnvylwd vhhskrlikv dgvtktkrks ycvdfaaiqp qiallqemhv thfrfsldwa
 601 lilplgnqsq vnhtilqyyr cmaselrvrn itpvvalwqp mapnqglpnl larqgawenp
 661 ytalafaeya rlcfcqelghh vklwitmne ytrnmtyas hnllkahala whvynekfrh
 721 aqngkisial qadwiepacp fsqkdkevae rvlefdigwl aepifgsgdy pwvmrdwlnq
 781 rnnfilpyft edekkliqgt fdflalshyt tilvdseked pikyndylev qemtditwln
 841 spsqvavvpw girkvlnwlk fkygdlpmyi isngiddglh aeddqlrvyy mqnyinealk
 901 ahildginlc gyfaysfnr taprfglyry aadqfepkas mkhyrkiids ngfpgepetle
 961 rfcpeeftvc tecssffhtrk sl

10

クロトーシグナルペプチドアミノ酸配列(配列番号:8)

1 mpasapprrp rppppslsli lvlllggrr lra

IgGシグナルペプチドアミノ酸配列(配列番号:9)

1 msvaltqvial lllwltgtrc rrlra

(Gly₄ Ser)₃ ポリペプチドリンカーアミノ酸配列(配列番号:10)

1 ggaggtggag gttcaggagg tggaggttca ggaggtggag gttca

20

(Gly₄ Ser)₃ ポリペプチドリンカーアミノ酸配列(配列番号:11)

1 GGGGS

(Gly₄ Ser) ポリペプチドリンカーアミノ酸配列(配列番号:12)

1 GGGGS

(Gly) ポリペプチドリンカーアミノ酸配列(配列番号:13)

1 G

30

(Gly Gly) ポリペプチドリンカーアミノ酸配列(配列番号:14)

1 GG

(Gly Ser) ポリペプチドリンカーアミノ酸配列(配列番号:15)

1 GS

(Gly₂ Ser) ポリペプチドリンカーアミノ酸配列(配列番号:16)

1 GGS

40

(Ala) ポリペプチドリンカーアミノ酸配列(配列番号:17)

【0 2 8 7】

【表9】

1 AA

(Ala Ala) ポリペプチドリソルバーアミノ酸配列(配列番号:18)

1 AA

クロトーシグナルペプチドークロトー細胞外ドメインーFGF23(R179Q)
アミノ酸配列(配列番号:19)

1 MPASAPPRRP RPPPSLSSL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFELWAVG SAAAYQTEGGW QQHKGKASIWI DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL YYRRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQPQL
 201 QDAYGGWANP ALADHFRDYA ELCFRHFQGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSI MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMILLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRKLKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQEILGH VKLWITTMNEP YTRNMITYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFHR AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMDRWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSSFHTRK SLGSGGGGSG GGGGGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGIHLHY TATARNSYHL QIHKNHGVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCDMFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHFNTP
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFNAKFI*

IgGシグナルペプチドークロトー細胞外ドメインーFGF23(R179Q)
アミノ酸配列(配列番号:20)

10

20

30

1 MSVLTQVLAL LLLWLTGLGG RRLRAEPGDG AQTWARFSRP PAPEAAGLFQ
 51 GTFPDGFLWA VGSAAYQTEG GWQQHKGKGS IWDTFTHHPL APPGDSRNAS
 101 LPLGAPSPLQ PATGDVASDS YNNVFRDTEA LRELGVTHYR FSISWARVLP
 151 NGSAGVPNRE GLRYYRLLR RLRELGQPV VTLYHWDLPQ RLQDAYGGWA
 201 NRALADHFRD YAELCFRHFQ GQVKYWITID NPYVVAWHGY ATGRLAPGIR
 251 GSPRLGYLVA HNLLLAHAKV WHLYNTSFRP TQGGQVSIAL SSHWINPRRM
 301 TDHSIKECQK SLDFVLGWFA KVFIDGDYP ESMKNNLSSI LPDFTESEKK
 351 FIKGTADFFA LCFGPTLSFQ LLDPHMFKFQ LESPNLRQLL SWIDLEFNHE
 401 QIFIVENGWF VSGTTKRDAA KYMMYLLKKFI METLKAIKLD GVDVIGYTAW
 451 SLMDGFEWHR GYSIRRGLFY VDFLSDQDKML LPKSSALFYQ KLIKEKNGFPP
 501 LPENQPLEGT FPCDFAWGVV DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLI
 551 KVDGVVTKRR KSYCVDFAAI QPQIALQEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ
 601 SQVNHTILQY YRCMASELVR VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGANE
 651 NPYTALAFAE YARLCFQEGL HHVKLWITMN EPYTRNMITYS AGHNLLKAHA
 701 LAHWVYNEKF RHAQNGKISI ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLEFDIG
 751 WLAEPIFGSG DYPVMDRWLN QPNMFLLPY FTEDEKKLIQ GTFDFLALSH
 801 YTTILVDSEK EDPIKYNDYL EVQEMTDITW LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW
 851 LKFKYGDLM YIISNGIDDG LHAEDDQLRV YYMQNYINEA LKAHILDGIN
 901 LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY RYAADQFEPK ASMKHYRKII DSNQFPGPET
 951 LERFCPEEFT VCTECSSFHT BKSLGSGGGG SGGGGGGGGG SLKYPNASPL

40

【表10】

1001 LGSSWGGLIH LYTATARNSY HLQIHKNGHV DGAPHQTIYS ALMIRSEDAG
 1051 FVVITGVMSR RYLCMDFRGN IFGSHYFDPE NCRFQHQTL NGYDVYHSPQ
 1101 YHFLVSLGRA KRAFLPGMNP PPYSQFLSRR NEIPLIHFT PIPRRHTQSA
 1151 EDDSERDPLN VLKPRARMTP APASCSCQELP SAEDNSPMAS DPLGVVRGGR
 1201 VNTHAGGTGP EGCRPFACKFI *

KL-D1-FGF23 (R179Q)アミノ酸配列(配列番号:21)

1 MPASAPPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGVDASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQQL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRIGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPDRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFQKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQOLL DPHMKFRQLE SPNLRLQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAICLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGSQG GGSGGGGSGG GGSLKYPNAS PLLGSSWGGL
 551 IHLYTATARN SYHLQIHKNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVVITGVM
 601 SRRYLCMDFR GNIFGSHYFD PENCRFQHQT LENGYDVYHS PQYHFLVSLG
 651 RAKRAFLPGM NPPPYSQFLS RRNEIPLIH NTPIPRRHTQ SAEDDSERDP
 701 LNVLKPRARM TPAPASCSCQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT
 751 GPEGCRPFACKFI *

KL-D2-FGF23(R179Q)アミノ酸配列(配列番号:22)

1 MPASAPPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGRR LPLPENQPLE GTFPcdfawg
 51 VVDNYIQVDT TLSQFTDLNV YLNDVHHSKR LIKVDGVVTK KRKSVCDF
 101 AIQPQIALLQ EMHVTHFRFS LDWALILPLG NQSQVNHTIL QYYRCMAS
 151 VRVNITPVVA LWQPMAPNQG LPRILLARQGA WENPYTALAF AEYARLCFQE
 201 LGHHVVKLWIT MNEPYTRNMT YSAGHNLLKA HALAWHVVNE KFRHAQNGKI
 251 SIALQADWIE PACPFSQKDK EVAERVLEFD IGWLAEFIG SGDYPWVMRD
 301 WLNQRNNFL PYFTEDDEKKI IQGTFDFLAL SHYTTILVDS EKEDPIKYND
 351 YLEVQEMTDI TWLNPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFKYGDQ PMYIIISNGID
 401 DGLHAEDDQL RVYYMTHONYIN EALKAHILDG INLCGYFAYS FNDRTAPRFG
 451 LYRYAADQFE PKASMKHRYK IIDSNGFPGP ETLERFCPEE FTVCTEC
 501 HTRKSLGSGG GGSGGGGSGG GGSLKYPNAS PLLGSSWGGL IHLYTATARN
 551 SYHLQIHKNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVVITGVM SRRYLCMDFR
 601 GNIFGSHYFD PENCRFQHQT LENGYDVYHS PQYHFLVSLG RAKRAFLPGM
 651 NPPPYSQFLS RRNEIPLIH NTPIPRRHTQ SAEDDSERDP LNVLKPRARM
 701 TPAPASCSCQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFACK
 751 FI*

(KL-D1)₂-FGF23 (R179Q)アミノ酸配列(配列番号:23)

1 MPASAPPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGVDASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQQL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRIGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPDRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFQKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQOLL DPHMKFRQLE SPNLRLQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAICLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGSQG FPDGFLWAVG SAAQTEGGW QQHGKGASIW
 551 DTFTHHPLAP PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGVDASDSYN NVFRDTEALR
 601 ELGVTHYRFS ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT
 651 LYHWDLQQL QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQGQ VKYWITIDNP

10

20

30

40

【0288】

【表11】

701 YVVAWHGYAT GRLAPGIRGS PRLCYLVANN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ
 751 GGQVSIALSS HWINPFRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES
 801 MKNNLSSILP DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE
 851 SPNLRQLLSW IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME
 901 TLKAIKLDGV DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGFLFYVD FLSQDKMLLP
 951 KSSALFYQKL IEKNGFPEFG SGGGGSGGGG SGGGGSLKYP NASPLLGSSW
 1001 GGLIHLYTAT ARNSYHLQIR KNIGHVGDAPH QTIYSALMIR SEDAGFVVIT
 1051 GVMSRRYLCM DFRGNIFGSH YFDPENCRFO HQTLNGYDV YHSPQYHFLV
 1101 SLGRAKRAFL PGMMNPYPSQ FLSRRNEIPL IHFNTPIPWR HTQSAEDDSE
 1151 RDPLNVLKPR ARMTPAPASC SQELPSAEDN SPMASDPLGV VRGGRVNTHA
 1201 GGTGPEGCRP FAKFI*

10

(KL-D2)₂-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列(配列番号:24)

1 MPASAPP RRPPPSLSSL LVLLGLGGRR LPLPENQPLE GTFPcdfawg
 51 VVDNYIQVDT TLSQFTDLNV YIWDVHHSKR LIKVGVVTK KRKSVCDF
 101 AIQPQIALLQ EMHVTHFRFES LDWALILPLG NQSQVNHTIL QYYRCMASEL
 151 VRVNITPVVA LWQPMAPNQG LPRLLARQGA WENPYTALAF AEYARLCFQE
 201 LGHHVKLWIT MNEPYTRNMT YSAGHNLLKA HALAWHYNE KFRHAQNGKI
 251 SIALQADWIE PACPFSQDKD EVAERVLEFD IGWLAEPIFG SGDYPWVMRD
 301 WLNQRNNFLL PYFTEDEEKKL IQGTFDFLAL SHYTTILVDS EKEDPIKYND
 351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFKYGDL PMYIISNGID
 401 DGLHAEDDQL RVYYMQNYYIN EALKAHILDG INLCGYFAYS FNDRTAPRFG
 451 LYRYAADQFE PKASMKHRYK IIDSNGFPGP ETLERFCPEE FTVCTECSFF
 501 HTRKSLGTFF CDFANGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD VHHSKRLIKV
 551 DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIAALLQEMHV THFRFSLDWA LILPLGNQSQ
 601 VNHTILOQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL LARQGAWENP
 651 YTALAFAYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG HNLLKAHALA
 701 WHVYNEKFRH AQNCKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE RVLEFDIGWL
 751 AEPIFGSGDY PWVMRDWLINQ RNNFILLPYFT EDEKKLIQGT FDFLALSHT
 801 TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLIN SPSQVAVVPW GLRKVLNWLK
 851 FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK AHILDGINLC
 901 GFYFAYSFNDR TAPRFLGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS NGFGSGGGGS
 951 GGGGSGGGGS LKYPNASPLL GSSWGGLIHL YTATARNSYH LQJHKNGHVD
 1001 GAPHQTIYSA LMIRSEDAGF VVITGVMSRR YLCMDFRGNI FGSHYFDPEN
 1051 CRFQHQTLN GYDVYHSPQY HFLVSLGRAK RAFLPGMNPP PYSQFLSRRN
 1101 EIPLIHFNTP IPRRHTQSAE DDSERDPLNV LKPRARMTPA PASCSQELPS
 1151 AEDNSPMASD PLGVVRGGRV NTHAGGTGPE GCRPFAKFI*

20

FGF23 (R179Q) - クロト-細胞外ドメインアミノ酸配列(配列番号:25)

30

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQLT ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFISR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSCQL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGSGGGGSGGG GGSGGGGSLK EPGDGAQWTW RFSRPPAPEA AGLFQGTFPD
 301 GFLWAVGSAA YQTEGGWQQH GRKGASIWDTF THHPLAPPGD SRNASLPLGA
 351 PSPLQPATGD VASDSYNNVF RDTEALRELQ VTHYRFISIW ARVLPNGSAG
 401 VPNREGLRYY RRLLERLREL GVQPVVTLYH WDLPQRLQDA YGGWANRALA
 451 DHFRDYAELC FRHFQQVKEY WITIDNPYVV AWHGYATGRL APGIRGSPRL
 501 GYLVAHNLLL AHAKVWHLYN TSFRPTQGGQ VSIALSSHVI NPPRMTDHSI
 551 KECQKSLDFV LGWFAKPVFI DGDYPESMKN NLSSILPDFT ESEKKFIKGT
 601 ADFFALCFGP TLSFQQLDPH MKFRQLESPI LRQQLSWIDL EFNHPQIFIV
 651 ENGWGVSGTT KRDDAKYMYY LKKFIMETLK AIKLDGVDFI GYTAWSLMDG
 701 FEWHRGYSIR RGLFYVDFLS QDKMILLPKSS ALFYQKLLIEK NGFPPLPENQ
 751 PLEGTFPCDF AWGVVDNYIQ VDITTLSQFTD LNVYLWDVHH SKRLIKVDFV
 801 VTKKRKSYCV DFAAIQCPQIA LLQEMHVTHF RFSLDWALIL PLGNQSQVN
 851 TILQYYRCMA SELVRVNITP VVALWQPMAP NQGLPRLAR QGAWENPYTA

40

【表12】

901 LAFAEYARLC FQELGHHVKL WITMNEPYTR NMNTYSAGHNL LKAHALAWHV
 951 YNEKFRHAQN GKISIALQAD WIEPACPFSQ KDKVEAERVL EFDIGWLAEP
 1001 IFGSGDYPWV MRDWLNQRNN FLLPYFTEDE KKLIQGTFDF LALSHYTTIL
 1051 VDSEKEDPIK YNDYLEVQEM TDITWLNSPS QVAVVPWGLR KVNLWLKFYF
 1101 GDLPMYIISN GIDDGLHAED DQLRVYYMQN YINEALKAHF LDGINLCGYF
 1151 AYSFNDRTAP RFGLYRYAAD QFEPKASMKH YRKIIIDSNGF PGPETLERFC
 1201 PEEFTVCTEC SFFHTRKSL*

FGF23 (R179Q) -KL-D1 アミノ酸配列(配列番号:26)

1 MLGARLRLWV CALCSVCMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL EMGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSCQL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IQGTFPDGFL WAVGSAAYQT EGGSQQHKGK ASIWTFTHH PLAPPGDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQPATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVT H YRFISISWARV
 351 LPNGSAGVPN REGLRYYRRL LERLRELGVQ PVVTLHYWDL PQRLQDAYGG
 401 WANRALADHF RDYAEELCFRH FGGQVKYWI IDNPYVVAWH GYATGRLAPG
 451 IRGSPLRLGYL VAHNLLLAHA KVWHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSHWINPR
 501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLGW FAKPVFIDGD YPESMKNNLS SILPDFTESE
 551 KKFIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPHMKF RQLESPNLRQ LLSWIDLEFN
 601 HPQIFIVENG WFVSGTTKRD DAKYMMYLKK FIMETLKAIF LDGVDVIGYT
 651 AWSLMDGF EW HRGYSIRRGL FYVDFLSQDK MLLPKSSALF YQKLIKEKNGF
 652 *

10

FGF23 (R179Q) -KL-D2 アミノ酸配列(配列番号:27)

1 MLGARLRLWV CALCSVCMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL EMGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSCQL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGTFPDCFAW GVVDNYIQVD TTLSQFTDLM VYLWDVHSK RLKVDGVVT
 301 KKRKSYCVDF AAIQPQIALL QEMHVTHFRF SLDWALILPL GNQSQVNHTI
 351 LQYYRCMASE LVRVNITPVV AIWQPMAPNQ GLPRILLARQ AWENPYTALA
 401 FAEYARLCFQ ELGHHVKLWI TMNEPYTRNM TYSAGHNLLK AHALAWHVYN
 451 EKFRHAQNKG ISIALQADWI EPACPFSQKD KEVAERVLEF DIGWLAEPF
 501 GSGDYPWVMP DWLNQPNNFL LPYETTEDEKK LIQGTFDFA LSHYTTILVD
 551 SEKEDPIKYN DYLEVOEMTD ITWLNSPSOV AVVPWGLRKV LNWLKFYGD
 601 LPMYIISNGI DDGLHAEDDO LRVYYMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
 651 SFNDRTAPRF GLYRYAADQF EPKASMKHRY KIIDSNGF*

30

FGF23 (R179Q) -(KL-D1)₂ アミノ酸配列(配列番号:28)

1 MLGARLRLWV CALCSVCMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL EMGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSCQL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IQGTFPDGFL WAVGSAAYQT EGGSQQHKGK ASIWTFTHH PLAPPGDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQPATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVT H YRFISISWARV
 351 LPNGSAGVPN REGLRYYRRL LERLRELGVQ PVVTLHYWDL PQRLQDAYGG
 401 WANRALADHF RDYAEELCFRH FGGQVKYWI IDNPYVVAWH GYATGRLAPG
 451 IRGSPLRLGYL VAHNLLLAHA KVWHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSHWINPR
 501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLGW FAKPVFIDGD YPESMKNNLS SILPDFTESE
 551 KKFIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPHMKF RQLESPNLRQ LLSWIDLEFN
 601 HPQIFIVENG WFVSGTTKRD DAKYMMYLKK FIMETLKAIF LDGVDVIGYT
 651 AWSLMDGF EW HRGYSIRRGL FYVDFLSQDK MLLPKSSALF YQKLIKEKNGF
 701 QGTFPDGFLW AVGSAAYQTE GGWQQHGRGA SIWDTFTHHP LAPPGDSRNA

40

【表13】

751 SLPILGAPSPL QPATGDVASD SYNNVFRDTE ALRELGVTHY RFSISWARVL
 801 PNGSAGVPNR EGLRYYRLL ERLRELGVQP VVTLYHWDLF QRLQDAYGGW
 851 ANRALADHRF DYAEELCFRHG GGQVKYWITI DNPYVVAWHG YATGRLAPGI
 901 RGSPRLGYLV AHNLLLAHAK VWHLYNTSFR PTQGGQVSIA LSSHWINPWR
 951 MTDHSIKECQ KSLDFVLGWF AKPVFIDGDY PESMKNNLSS ILPDFTESEK
 1001 KFIKGTADFF ALCFGPTLSF QLLDPHMKFR QLESPNLRQL LSWIDLEFNH
 1051 PQIFIVENGW FVSGTTKRDD AKYMMYLLKKF IMETLKAIKL DGVDVIGYTA
 1101 WSLMDGFEWH RGYSIRRGLF YVDFLSQDKM LLPKSSALFY QKLIEKNGF*

FGF23 (R179Q) -(KL-D2)₂ アミノ酸配列(配列番号:29)

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTYY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NTFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGTFCPCDFAW GVVDNYIQVD TTLSQFTDLM VYLWDVHHSK RLIKVDGVVT
 301 KKRKSVCVDF AAIQPQIALL QEMHVTHFRF SLWDWALILPL GNQSQVNHTI
 351 LQYYRCMASE LVRVNITPVV ALWQPMAPNQ GLPRLRARQG AWENPYTALA
 401 FAEYARLCFQ ELGHHVKLWI TMNEPYTRNM TYSAGHNLK AHALAHVYN
 451 EKFRHAQNGK SIALQADWI EPACPFSQKD KEVAERVLEF DIGWLAEPF
 501 GSGDYPWVMR DWLNQRNNFL LPYFTEDEKK LIQGTFDFLIA LSHYTTILVD
 551 SEKEDPIKYN DYLEVQEMTD ITWLIMSPSQV AVVPWGLRKV LNWLKFKYGD
 601 LPMYIIISNGI DDGLHAEDDQ LRVYYMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
 651 SFNDRTAPRF GLYRYAADQF EPKASMKHRY KIIDSNGFGT FPCDFAWGVV
 701 DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLI KVDGVVTKRR KSYCVDFAAI
 751 QPQIALLQEM HVTHFRFSLD WALIPLGNQ SQVNHTILOQ YRCMASELVR
 801 VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAWE NPYTALAFAE YARLCFQELG
 851 HHVKLWITMN E PYTRNMTYS AGHNLKKAHA LAHWVYNEKF RHAQNGKISI
 901 ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLIEDIG WLAEPIFGSG DYPWVMRDWL
 951 NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ GTFDPLALSH YTTILDSEK EDPIKYNDYL
 1001 EVQEMTDITW LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW LKFKYGDLPY YIISNGIDDG
 1051 LHAEDDQLRV YYMQNYINEA LKAHILDGIN LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY
 1101 RYAADQFEPK ASMKHRYKII DSNGF*

10

20

30

40

FGF19 核酸配列(NM_005117)(配列番号:30)

タンパク質コード領域(464-1114)

1 gctccccagcc aagaacctcg gggccgctgc gcggtgggg a gagttcccc gaaaccggc
 61 cgctaaggcgca ggccctccgc tcccgcatat ccgaacggcc tggggccgggt caccggcgct
 121 gggacaagaa gcccggcgct gcctggccgg gcccggggag ggggctgggg ctggggccgg
 181 aggccgggtg tgagtgggtg tgtgcggggg ggggaggctt gatgeaatcc cgataagaaaa
 241 tgctccgggtg tcttggcac ctaccgtgg gccccgtaa ggcgtactat ataaggctgc
 301 cggccggag ccggccgcgc gtcagagcag gaggcgtcg tccaggatct agggccacga
 361 ccatcccaac ccggcactca cagcccgca ggcgcattccg gtcggccccc agccctccgc
 421 accccccatcg ccggagctgc gccgagagcc ccaggagggt gccatcgcca gccgggtgtgt
 481 ggtggtccac gtatggatcc tggccggctt ctggctggcc gtggccgggc gccccctcgc
 541 cttctccggac gccccggccc acgtgcacta cggctggggc gaccggatcc gctgcggca
 601 cctgtacacc tccggccccc acgggtcttc cagctgtttc ctgcgcattcc gtggccacgg
 661 cgtcgtggac tgcggcgccgg gccagagcgc gcacagttt ctggagatca agcagtcgc
 721 tctgcggacc gtggccatca agggcgtgca cagcgtgcgg tacctctgca tgggcgcgca
 781 cggcaagatc caggggtctgc ttcaagtactc ggaggaagac tggctttcg agaggagat
 841 ccggcccgat ggctacaatg tggatccgatc cgagaagcac cgcctcccg tctcccttag
 901 catgtccaaa cagccggcgc tggatcaagaa cagaggctt cttccactct ctcatttcc
 961 gccccatgtcg cccatggtcc cagaggagcc tgaggaccc agggggact tgaatctga
 1021 catgttctct tcggccctgg agaccgacag catggaccca ttggcttg tcaccggact
 1081 ggaggccgtg aggagtccca gtttggaaa gtaactgaga ccatggccgg gctctttcac
 1141 tgctggcagg ggctgtggta cctgcagcgt ggggacgtg ctttataaag aacagtccctg
 1201 agtccacgtt ctgttttagt ttaggaagaa acatctagaa gttgtacata ttccagatgtt
 1261 tccattggca gtgccagttt ctagccaata gacttgtctg atcataaacat tgtaagoctg

【表14】

1321 tagcttgccc agctgctgcc tggggccccc ttctgctccc tcgaggttgc tgacaaagct
 1381 gctgcactgt ctcagttctg cttgaataacc tccatcgatg gggaaactcac ttcccttttgg
 1441 aaaattctta tgtcaagctg aaattctcta attttttctc atcacttccc caggagcagc
 1501 cagaagacag gcagtagttt taatttcagg aacaggttat ccactctgtaa aacagcagg
 1561 taaaatttcac tcaaccccat gtgggaatttgc atctatatact ctacttccag ggaccatttg
 1621 cccttcccaa atccctccag gccagaactg actggagcag gcatgccccca ccaggcattca
 1681 ggagttagggg aaggctggag ccccactcca gcccctggac aacttgagaa ttccccctgaa
 1741 ggcccaattct gtcatggatg ctgtcctgag aataacttgc tgcgttgcgtt tcacctgtt
 1801 cccatctccca gcccaccaggc cctctgccccca cctcacatgc ctccccatgg attggggcct
 1861 cccaggcccccc ccacctttagt tcaacctgca cttcttgc aaaaatcagg aaaaagaaaaag
 1921 atttgaagac cccaaatctt gtcaataact tgctgtgtgg aagcagcggg ggaagacacta
 1981 gaaccctttc cccagcactt ggtttccaa catgatattt atgagaattt tattttgata
 2041 tgtacatctc ttattttctt acattattta tgccccccaaa ttatattttat gtatgttaagt
 2101 gaggtttgtt ttgtatattta aaatggagtt tggttgtaaa aaaaaaaaaaaaaaaa

10

FGF19アミノ酸配列(NP_005108)(配列番号:31)

1 MRSGCVVVHV WILAGLWLAV AGRPLAFSDA GPHVHYGWGD PIRLRHLYTS GPHGLSSCFL
 61 RIRADGVVDC ARGQSAHSLL EIKAVALRTV AIKGVHSVRY LCMGADGKMQ GLQYSEEDC
 121 AFEEE1RPDG YNVYRSEKHR LPVSLSSAKQ PQLYKNRGFL PLSHFLPMLP MVPEEPEDLR
 181 GHLESDMFSS PLETDSMDPF GLVTGLEAVR SPSFEK

FGF21核酸配列(NM_019113)(配列番号:32)
タンパク質コード領域151-780

20

1 CTGTCAGCTG AGGATCCAGC CGAAAGAGGA GCCAGGCACCT CAGGCCACCT GAGTCTACTC
 61 ACCTGGACAA CTGGAATCTG GCACCAATTTC TAAACCACCTC AGCTTCTCCG AGTCACACCC
 121 CCGGAGATCA CCTGAGGACC CGAGCCATTG ATGGACTCGG ACGAGACCGG GTTCGAGCAC
 181 TCAGGACTGT GGGTTCTGT GCTGGCTGGT CTTCTGCTGG GAGCCTGCCA GCCACACCCCC
 241 ATCCCTGACT CCAGTCTCT CCTGCAATTTC GGGGGCCAAG TCCGGCAGCG GTACCTCTAC
 301 ACAGATGATG CCCAGCAGAC AGAACGCCCAC CTGGAGATCA GGGAGGATGG GACGGTGCCCC
 361 GGCGCTGCTG ACCAGAGCCC CGAAAGTCTC CTGCAGCTGA AAGCCTTGAA GCCGGGAGTT
 421 ATTCAAATCT TGGGAGTCAA GACATCCAGG TTCTGTGCC AGCGGCCAGA TGGGGCCCTG
 481 TATGGATCGC TCCACTTTGA CCCTGAGGCC TGCAGCTTCC GGGAGCTGCT TCTTGAGGAC
 541 GGATACAATG TTTACCAGTC CGAACGCCCAC GGCCTCCCGC TGCACCTGCC AGGAAACAAG
 601 TCCCCACACC GGGACCCCTGC ACCCGAGGA CGAGCTCGCT TCCCTGCCACT ACCAGGCTG
 661 CCCCCCGCAC TCCCGGAGCC ACCCGGAATC CTGGCCCCCGA AGCCCCCGA TGTTGGCTCC
 721 TCGGACCCCTC TGAGCATGGT GGGACCTTCC CAGGGCCGAA GCCCCAGCTA CGCTTCTGTA
 781 AGCCAGAGGC TGTTTACTAT GACATCTCCT CTTTATTTAT TAGGTTATTT ATCTTATTIA
 841 TTTTTTATT TTCTTACTT GAGATAATAA AGAGTTCCAG AGGAGAAAAA AAAAAAAAAAAA
 901 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

30

FGF21アミノ酸配列(NP_061986)(配列番号:33)

1 MDSDETGFH SGLWVSVLAG LLLGACQAHP IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDAQQTTEAH
 61 LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGAL YGSLHFDPEA
 121 CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI
 181 LAPQPVDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS

40

1 cggcaaaaaag gagggaatcc agtcttaggt ctcacacacca gctacttgca agggagaagg
 61 aaaaggccag taaggccctgg gcccaggagat tcccgacagg agtgcgttgc ttcaatctca
 121 gcaccagcca ctcagagccag ggcacgtgt tggggcccg ctcacggctc tgggtctgt
 181 ccttgtcagc cgtctgcagc atgagcgatcc tcagacgcata tcacatgcc tcacactgc
 241 tcggctccag ctgggggtggc ctgatccacc tgcacacacg cacagccagg aacagctacc
 301 acctgcagat ccacaagaat ggccatgtgg atggcgcacc ccatcagacc atctacagtg
 361 ccctgtatgtat cagatcagag gatgttgtat ttgttgtat tacagtgatc atgagcagaa

【0290】

【表 1 5】

421 gataacctctg catggatttc agaggcaaca ttttggatc acactatttc gaccggaga
481 actgcagggtt ccaacaccag acgctggaaa acgggtacga cgtctaccac ttcctcaagt
541 atcacttctt ggtcgtctg ggccggcgta agagagcctt cctgccagc atgaaccac
601 ccccgtaactc ccagtctctg tcccgaggaga acgagatccc cctaattcac ttcaacacc
661 ccataccacg gcggcacacc cggagcgcgcg aggacgactc ggagcgggac ccctgaacg
721 tgctgaacc ccggggcccg atgaccctcg ccccccctc ctgttccacag gagctcccgaa
781 gcggcgagga caacacggcc atggccatg acccattag gggtgtcagg ggccgtcagg
841 tgaacacgca cgtggggga acggggcccg aaggctgccg cccttgcgc aagtctatc
901 agggtcgctg gaggggcacc ctcttaacc catccctcag caaacgcgcg tttcccaagg
961 gaccagggtcc cttgacgttc cgaggatggg aaaggtgaca ggggcatgtt tggaaatttgc
1021 tgcttctctg gggtcccttc cacaggaggt ccttgagaa ccaacctttg agggccaagt
1081 catgggttt caccgcctt ctcactccat atagaacacc ttcccaata gaaaccccc
1141 acaggtaaac tagaaatttc cccttcatga aggttagagag aagggtctc tcccaacata
1201 ttctcttcc ttgtgcctct cctctttatc actttaagc ataaaaaaaaaaaaaaa
1261 aaaaaaaaaaa aaaacgcgtt ggttccctgag ctcaagactt tgaagggtgtt gggaaagaggaa
1321 aatccggatg cccagaagct tctccactgc cctatgcatt tatgttagat gccccatccc
1381 cactggcatt ttgtgtgc aacccgttgcata aacccgttgcata aatggggcaa gttgtatgaaa
1441 acactacttt caagccttc ttcttccttgc agcatctcg gggaaagagct gtcaaaagacc
1501 tgggtttagg ctggtaaaaa cttgacagct agacttgatc ctgtcgaaaa tgaggcaggaa
1561 atcataatag aaaactcagg ctccctacag ggtgagcacc ttctgtctcg ctgtctccct
1621 ctgtcagcc acagccagag ggcccagaat ggcccacac tttcccaag cagtccatgaa
1681 tacagcccta cctttggcc ccatctcg ttttggaaaa ttgtgtctaa ggaataaaata
1741 gctttacac tggctcacga aaatctgcgc tgcttagaatt tgctttcaa aatggaaata
1801 aatccaaact ctccctaagag gcatttaatt aaggctctac ttccagggtt agtaggaatc
1861 cattctgaac aaactcaaaa aatgtgtc ggaagggggc tttagagac tggactgt
1921 ctgggtttagg tttttgtgttgc actggaaaat cgtgtccctt tctctaaatg aatggcattc
1981 aagactctcg gggggaaagaa atcaggggac atgttataga atgttatgaaa agacaacc
2041 atggtcagge tcttgtctgt ggtctctagg qctctgcgc agcagtggct ctgcattaa
2101 taaaactct ctaggctga cacatctggg tctcaatccc ctggaaatt ctgggtcat
2161 taaatgaagc cttaccccat tactgcgtt ctctctgtt gggggctcca tttccctccc
2221 tctctttaaa tgaccaccta aaggacagta tattaacaag caaagtogat tcaacaac
2281 ctcttccca gtcacttttt tttttctac tgccatcaca tactaacctt atactttgt
2341 ctatctttt tggttatgag agaaaatgtt ggcactgtt ttatctgtat ggtttaagc
2401 tgaacttggaa ggactgttcc ctattctgaa acagaaaaatc tatgtataat agatataatc
2461 catgcatggc aaatattttt atattttctgt ttctatcc tttgtggaaat attatctgc
2521 ataataatgta ttggaggctc ctcagtggaaat gatccaaaaa ggatttttgtt gggaaaact
2581 ttgtatctc acaaactcaa cactaccatc aggggtttt tttatggcaa agccaaaaata
2641 gctccatcaa ttcttataat ccctcgtcat gtggcgtat ttattttattt atttggaaat
2701 ttgcctatcc ttctatattt atagatattt ataaaaatgt aacccctttt tccttctc
2761 tggataaaaat aaaaataaaa ttatctcg cttctgttag ctatccctt ttgttagtact
2821 actaaaatgc atgttggaaat ataagaataa aaaggattat gggaggggaa cattaggaa
2881 atccagagaa ggccaaaaatgg aaaaaaaatgtttagaattt taaaattttc aaagatttt
2941 tccattccata aggagactca atgatttaa ttgtatctaga cagaatttatt taagttttat
3001 caatatttoga ttctgtt

10

20

30

FGF23アミノ酸配列(NP_065689)(配列番号:35)

I MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S YHLQIHKNGH
61 VDGAPHQTIV SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRVLCDMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
121 ENGYDVFYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241 FEGCRCPFAKE I

FGF23(R179Q)アミノ酸配列(配列番号:36)

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S YHLQIHKNGH
61 VDGAPHOTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLICMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFOHOQL
121 ENGYDVFYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPJPRRHTQS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241 PEGCRPFAKE I

```

40

【表16】

ヒトベータークロトードメイン1(b-KL-D1)アミノ酸配列(配列番号:37)

77 ydt fpknffwgig tgalqvegsw kkdgkgpsiw dhfihthlkn
 121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlf p dgivtvanak glqyystlld
 181 alvlniepi vtlyhwdlpl algekyggwk ndtiidifnd yatycfqmfg drvkywitih
 241 npylvawhgy gtgmhapgek gnlaavytvq hnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
 301 gshwiepnrs entmdifkcq qsmvsvlgwf anpihgdgy pegmrkkifs vlpifseaek
 361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgg nvslnlreal nwikleynn riliaengwf
 421 tdsrvktedt taiymmnknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglyf
 481 vdfnskqker kpkssahyyk qirengf

ヒトベータークロトードメイン2(b-KL-D2)アミノ酸配列(配列番号:38)

571 trpaqctdfv nikkglemla
 rmkvthyrfa
 601 ldwasvlp tg nlsavnraqal ryryrcvvseg lklgisamvt lyypthahlg
 lpepllhadg
 661 wlnpstaeaf qayaglcfcqe lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsgndtyg
 aahnllvaha
 721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia
 wfaeplfktr
 781 dypaamreyi askhrrgless salprlteae rrlkgtvdf calnhfttrf
 vmheqlagsr
 841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgvr klrrwvrrny qdmdiyitas
 giddqaledd
 901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrikgyya fklaeekskp rfgfftsdfk
 akssiqfynk
 961 vissrgf

10

ベーターカロト一細胞外ドメイン(シグナルペプチドを有さない)
アミノ酸配列(配列番号:39)

52 gfsgdgrai
 61 wsknpnftp v nesqlflydt fpknffwgig tgalqvegsw kkdgkgpsiw dhfihthlkn
 121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlf p dgivtvanak glqyystlld
 181 alvlniepi vtlyhwdlpl algekyggwk ndtiidifnd yatycfqmfg drvkywitih
 241 npylvawhgy gtgmhapgek gnlaavytvq hnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
 301 gshwiepnrs entmdifkcq qsmvsvlgwf anpihgdgy pegmrkkifs vlpifseaek
 361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgg nvslnlreal nwikleynn riliaengwf
 421 tdsrvktedt taiymmnknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglyf
 481 vdfnskqker kpkssahyyk qirengfsl kestpvdvqqq fpccdfswgvt esvlkpesva
 541 ssppqfsdphl yvwnatgnrl lhrvegvrlk trpaqctdfv nikkglemla rmkvthyrfa
 601 ldwasvlp tg nlsavnraqal ryryrcvvseg lklgisamvt lyypthahlg lpepllhadg
 661 wlnpstaeaf qayaglcfcqe lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsgndtyg aahnllvaha
 721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfktr
 781 dypaamreyi askhrrgless salprlteae rrlkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
 841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgvr klrrwvrrny qdmdiyitas giddqaledd
 901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrikgyya fklaeekskp rfgfftsdfk akssiqfynk
 961 vissrgfpfe nsssrcsqtq entectvcclf lvqkkpl

20

30

シグナルペプチドを有さないクロトー-EGF23アミノ酸配列
(シグナルペプチドを有さない)(配列番号:40)

EPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNALSP LGAPSPLQFA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQQL

40

【0291】

【表17】

201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVTKCRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQQYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEB YTRNMITYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACE FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHT TILDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLW SPSQVAVVPW
 851 GLRKVNLWLNK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GFYFASFNDR TAPRGFLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSSFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLH TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHFNTP
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

10

シグナルペプチドを有さないsクロトーーFGF23(R179Q)
 (シグナルペプチドを有さない)アミノ酸配列(配列番号:41)

20

51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGVDASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLFQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVTKCRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQQYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEB YTRNMITYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACE FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHT TILDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLW SPSQVAVVPW
 851 GLRKVNLWLNK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GFYFASFNDR TAPRGFLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSSFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLH TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHFNTP
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

30

シグナルペプチドを有さないFGF23(配列番号:42)

40

YPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S YHLQIHKNGH
 61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
 121 ENGYDVKHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
 181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMAS SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
 241 PEGCRPFAKFI I

【表18】

シグナルペプチドを有さないFGF23(R179Q)（配列番号:43）

YPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S YHLQIHKNGH
 61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
 121 ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS
 181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
 241 PEGCRPFAKF I

10

クロトーシグナルペプチドを有するsクロトー（配列番号:44）

1 MPASAPP RR PPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNALP LGAPSPLQPA TGVDASDYN NVFRDTEALP ELGVTHYRFS
 151 ISWARVL PNG SAGVPNREGL RYYRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHF RDY A ELCFRHFGQQ VKYWI TIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PR LGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINP RRM TD HS IKCQKSL DF VL GWFAKP VF IDG DYP ES MKNNLSSILP
 351 DF TE SEKKF J KGTADFFALC FG PTLSF QLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 ID LE FNHPQI FIVE GWF VS GTTKR DDAK Y MYYL KK FIME TLKA IKL DG V
 451 DVIG YTAWSL MDGE W H RGY SIRR GLF YVD FLS QDKMLLP KSSA LF YQKL
 501 IE KNGFPPLP EN QPLE GTFP CDF A WG VVDN YIQV DTTLSQ FT DLTNV YLWD
 551 VHHS KRLIKV DGV VT KKR KS YCV DFAAIQP QIA LIQ EMH V THFR FS LDW A
 601 LILPLGNQSQ VN HTI LQ YYR CMASE LVR VN ITPV VALW QP MAPN QGLP RL
 651 LARQ GAWEN P YT ALA FAE YA RLC FQ E LGH H VKL WI TMN EP YTRN MTY SAG
 701 HNLLKA HALA WHV YME KFR H A QNG KIS IAL QAD WIE PAC P FS QKD KEV AE
 751 RV LE FDIG WL A EPI F GSG DY FW VM RD WLN Q RNN FLL P YFT EDE KKLI QGT
 801 FD FLA LS HY T ILV DSE KED PI KYND YLEV QEM TD IT WLN S PSQ VA V VPW
 851 GLRK VLN WLK FK YG DLP MYI IS NGID DGL H A EDD QL R VYY MQ NYI NE ALK
 901 AH ILD GIN LC GY FAY SFN DR TAP R F GLY RY A AD QF EPK AS MKHY RK II DS
 951 NG FPG PET LE RFC PEE FT VC TECS FF HTR K SL

20

IgGシグナルペプチドを有するsクロトー（配列番号:45）

1 MSVLTQVL AL LLLWL TGLGG RRLRAEPGDG AQ TWA RF SRP PAPE AAGL FQ
 51 GTFP DGFL WA VGS AAY QTEG GW QQH KGKG AS IWD T FTH HPL APP GDS RN AS
 101 LPLG AP SPLQ PAT GDV AS DS YNN VFR DTEA LRE LGV THYR FS IS WAR VLP
 151 NGSAGV PN RE GL RY YR RLLE RL RELG VQ PV VT LYH WDL P Q R Q DAY G GWA
 201 NR ALAD HF RD YAE LCF RHF G QV KY WI TID NP VV AWH GY AT GRL A P G IR
 251 GSP RL GYL V A HNLLKA HAKV WH LYNT SFRP T QGG QV SIAL SSH WIN PRR M
 301 TD HS IKC QK SLD FV LGW FA KP VFI DGD YP ESM KNN LSSI LP DF TE SEKK
 351 FIK G TAD FFA LCF GPT LS FQ LLD PHMK FRQ LESP NL RQ LL SW ID L FEN HP
 401 QI FIV EN GWF VSG TTKR DDA K YMY LK KF I MET LKA IKL GD VD VIG YTA W
 451 SLM DGF E W H R GY SIR R G LF VDF L S QDK ML LP KSSA LF YQ K LIE KNG FP
 501 LP EN Q PLE GT FPC D FAW GVV DNY IQV DTT L SQFT DL NV YL WD VV HSK RLI
 551 KVD GV VT KKR KSY CVD FAA I QP QIA LL QEM HVT HFR FS LD WAL I LPL GN Q
 601 SQVN HTI LQ YRC MASE LVR VN IT P VVAL W QPM APN QGL P RLL ARQ GAW E
 651 NPY TAL AFAE YAR LCF QEL G HHV K L WI TMN EP YTRN MTY S AGH NLL KA HA
 701 LA W H VY NE KF RHA QNG KIS I AL QAD WIE PA CP F S QKD KEV AER VLE FDIG
 751 WLA EPI F GSG D YP W VMR DW L NQR NN FLL PY FTE EKKLI Q GTF DFL A LSH
 801 YTT I L VD SEK ED PI KYND YL EV QEM TD IT W LN SP SQ VAV V PW GLR KV LN W
 851 LKFK YG DLP M YI IS NGID D G LHA E DD QL RV Y YM QNYI NEA LKA HILD GIN
 901 LCG YFAY SFN DRT A P R F GLY RY A AD QF EPK AS MKHY RK II DS NG FPG PET
 951 LER FC PEE FT VC TECS FF HTR K RK SL *

30

40

【0292】

【表19】

sウロト--FGF23-FcLALA v1(配列番号:46)

1	ATGCCCGCCA GCGCCCCGCC GCGCCGCGCG CGGCCGCCGC CGCCGTGCT GTCGCTGCTG	
61	CTGGTGTGCTGC TGGGCCTGGG CGGCCGCGCG CTGCGTGCAG AGCGGGCGA CGGCCGCGCAG	
121	ACCTGGGCC GTTTCTCGCG GCCTCCTGCC CCCGAGGCCG CGGGCCTCTT CCAGGGCAC	
181	TTCCCGACG GCTTCCTCTG GCCCGTGGGC ACCGCCGCCT ACCAGACCGA GGCGCGCTGG	
241	CAGCAGCAGC GCAAGGGTGC GTCCATCTGG GATACGTTCA CCCACCACCC CCTGGCACCC	10
301	CCGGGAGACT CCCGGAACGC CAGTCTGCCG TTGGGCGCCC CGTCGCCGCT GCAGCCGCC	
361	ACCGGGGACG TAGCCAGCGA CAGCTACAAC AACGTCTTCC GCGACACCGA GGCGCTGC	
421	GAGCTCGGGG TCACTCACTA CCGCTTCTCC ATCTCGTGGG CGCGAGTGCT CCCCAATGGC	
481	AGCCGGGGCG TCCCCAACCG CGAGGGGCTG CGCTACTACC GGCGCCTGCT GGAGCGGCTG	
541	CGGGAGCTGG CGGTGCAGCC CGTGGTCACC CTGTACCACT GGGACCTGCC CCAGCGCCTG	
601	CAGGACGCCT ACGGCGGCTG GGCCAACCGC GCCCTGGCCG ACCACTTCAG GGATTACGCG	
661	GACCTCTGCT TCCGCCACTT CGGGCGTCAG GTCAAGTACT GGATCACCAT CGACAAACCC	20
721	TACGTGGTGG CCTGGCACGG CTACGCCACC GGGCGCCTGG CCCCCGGCAT CCGGGGCAGC	
781	CCGGGGCTCG GGTACCTGGT GGCGCACAAC CTGCTCTGG CTCATGCCAA AGTCTGGCAT	
841	CTCTACAATA CTTCTTCCG TCCCACTCAG GGAGGTCAGG TGTCCATTGC CCTAACGCTCT	
901	CACTGGATCA ATCCTCGAAG AATGACCGAC CACAGCATCA AAGAATGTCA AAAATCTCTG	
961	GACTTTGTAC TAGGTTGGTT TGCCAAACCC GTATTTATTG ATGGTACTA TCCCAGAGC	
1021	ATGAAGAATA ACCTTTCATC TATTCTGCCT GATTTACTG AATCTGAGAA AAAGTTCATC	
1081	AAAGGAACGT CTGACTTTTG TGCTCTTGC TTTGGACCA CCTTGAGTTT TCAACTTTG	30
1141	GACCTCACA TGAAGTTCCG CCAATTGGAA TCTCCCAACC TGAGGCAACT GCTTCTCTGG	
1201	ATTGACCTTG AATTAAACCA TCCTCAAATA TTTATTGTGG AAAATGGCTG GTTTGTCTCA	
1261	GGGACCACCA AGAGAGATGA TGCCAAATAT ATGTATTACC TCAAAAAGTT CATCATGGAA	
1321	ACCTTAAAG CCATCAAGCT GGATGGGGTG GATGTCATCG GGTATACCGC ATGGTCCCTC	
1381	ATGGATGGTT TCGAGTGGCA CAGAGGTTAC AGCATCAGGC GTGGACTCTT CTATGTTGAC	
1441	TTCTAAGGCC AGGACAAGAT GTTGTGCCA AAGTCTTCAG CCTTGTCTA CCAAAAGCTG	
1501	ATAGAGAAAA ATGGCTTCCC TCCTTTACCT GAAAATCAGC CCCTAGAAGG GACATTTC	40
1561	TGTGACTTTG CTTGGGGAGT TGTTGACAAC TACATTCAAG TAGATACCAC TCTGCTCTG	
1621	TTTACCGACC TGAATGTTA CCTGTGGGAT GTCCACCACCA GTAAAAGGCT TATTAAAGTG	

【表 20】

1681	GATGGGGTTG	TGACCAAGAAA GAGGAAATCC TACTGTGTTG ACTTTGCTGC CATCCAGCCC	
1741	CAGATCGCTT	TACTCCAGGA AATGCCACGTT ACACATTTC GCTTCTCCCT GGACTGGGCC	
1801	CTGATTCTCC	CTCTGGGTAA CCAGTCCCAG GTGAACCACA CCATCCTGCA GTACTATCGC	
1861	TGCATGGCCA	GCGAGCTTGT CCGTGTCAAC ATCACCCCCAG TGTTGGCCCT GTGGCAGCCT	
1921	ATGGCCCCGA	ACCAAGGACT GCCGCGCCTC CTGGCCAGGC AGGGCGCCTG GGAGAACCCC	10
1981	TACACTGCC	TGGCCTTGCG AGAGTATGCC CGACTGTGCT TTCAAGAGCT CGGCCATCAC	
2041	GTCAAGCTT	GGATAACCGAT GAATGAGCCG TATACAAGGA ATATGACATA CAGTGTGGC	
2101	CACAACTTC	TGAAGGCCA TGCCCTGGCT TGGCATGTGT ACAATGAAAA GTTTAGGCAT	
2161	GCTCAGAATG	GGAAATATAC CATAGCCTTG CAGGCTGATT GGATAGAAC TGCCTGCCCC	
2221	TTCTCCCAA	AGGACAAAGA GGTGGCCGAG AGAGTTTGG AATTGACAT TGGCTGGCTG	
2281	GCTGAGCCA	TTTCGGCTC TGGAGATTAT CCATGGGTGA TGAGGGACTG GCTGAACCAA	
2341	AGAAACAATT	TTCTCTTCC TTATTCACT GAAGATGAAA AAAAGCTAAT CCAGGGTACC	20
2401	TTTGACTTTT	TGGCTTAAG CCATTATAACC ACCATCCTTG TAGACTCAGA AAAAGAAGAT	
2461	CCAATAAAAT	ACAATGATTA CCTAGAAGTG CAAGAAATGA CCGACATCAC GTGGCTCAAC	
2521	TCCCCCAGTC	AGGTGGCGGT AGTGCCCTGG GGGTTGCGCA AAGTGCTGAA CTGGCTGAAG	
2581	TTCAAGTACG	GAGACCTCCC CATGTACATA ATATCCAACG GAATCGATGA CGGGCTGCAT	
2641	GCTGAGGACG	ACCAGCTGAG GGTGTATTAT ATGCAGAATT ACATAAACGA AGCTCTCAAA	
2701	GCCCCACATAC	TGGATGGTAT CAATCTTGC GGATACTTGT CTTATTCGTT TAACGACCGC	
2761	ACAGCTCCGA	GGTTGGCCT CTATCGTTAT GCTGCAGATC AGTTTGAGCC CAAGGCATCC	
2821	ATGAACACATT	ACAGGAAAT TATTGACAGC AATGGTTCC CGGGCCCAGA AACTCTGGAA	
2881	AGATTTGTC	CAGAAGAATT CACCGTGTGT ACTGAGTGCA GTTTTTTCA CACCGAAAG	30
2941	TCTTCTAGGAT	CCGGAGGTGG AGGTCAGGA GGTGGAGGTT CAGGAGGTGG AGGTTCACTT	
3001	AAGTATCCC	ATGCCTCCCC ACTGCTCGGC TCCAGCTGGG GTGGCCTGAT CCACCTGTAC	
3061	ACAGCCACAG	CCAGGAACAG CTACCACCTG CAGATCCACA AGAATGCCA TGTGGATGGC	
3121	GCACCCCATC	AGACCATCTA CAGTGCCTG ATGATCAGAT CAGAGGATGC TGGCTTGTG	
3181	GTGATTACAG	GTGTGATGAG CAGAAGATAC CTCTGCATCG ATTTCACAGG CAACATTTTT	
3241	GGATCACACT	ATTCGACCC GGAGAACTGC AGGTTCCAAC ACCAGACGCT CGAAVACGGC	
3301	TACGACGTCT	ACCACTCTCC TCAGTATCAC TTCCTGGTCA GTCTGGCCG GGCGAAGAGA	
3361	GCCTTCCTGC	CAGGCATGAA CCCACCCCCG TACTCCCAGT TCCTGTCCCG GAGGAACGAG	
3421	ATCCCCCTAA	TTCACTTCAA CACCCCCATA CCACGGCGGC ACACCCAGAG CGCCGAGGAC	
3481	GACTCGGAGC	GGGACCCCCCT GAACGTGCTG AAGCCCCGGG CCCGGATGAC CCCGGCCCCG	40

【0293】

【表21】

3541 GCCTCCTGTT CACAGGAGCT CCCGAGCGCC GAGGACAACA GCCCGATGGC
 CAGTGACCCA
 3601 TTAGGGGTGG TCAGGGCGG TCGAGTGAAC ACGCACGCTG GGGGAACGGG
 CCCCGAAGGC
 3661 TCGGCCCTCCT TCGCCAAGTT CATCGGAGGT GGAGGTTCAA AAACCCACAC
 GTGTCCTCCT
 3721 TGTCTGCCC CAGAACAGC AGGTGGTCCA TCAGTTTTC TTTTCCCTCC
 CAAACCAAG
 3781 GATAAGCTGA TGATCTCTCG CACCCCTGAG GTGACATGCG TCGTAGTAGA
 CGTGAGCCAC
 3841 GAAGATCCCG AGGTGAAGTT CAATTGGTAT GTGGACGGAG TAGAAAGTCCA
 TAACCGAAA
 3901 ACTAAGCCG GCGAGGAACA ATATAACAGT ACTTACAGGG TGGTATCCGT
 GCTCACAGTC
 3961 CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGTAAGGAA TACAAGTGCA AAGTAAGCAA
 CAAGGCACCTT
 4021 CCCGCGCTA TTGAGAAAAC AATCTCCAAG GCGAAGGGAC AACCAAGAGA
 ACCTCAGGTT
 4081 TACACTCTCC CGCCTTCCAG GGAAGAGATG ACCAAAAATC AAGTTCCCT
 GACTTGCCTC
 4141 GTCAAAGGAT TCTACCCCTC CGACATTGCT GTTGAATGGG AAAGCAATGG
 ACAACCAGAG
 4201 ACAAACTACA AGACAACACC CCCGGTGCTG GATAGTGACG GATCTTCTT
 TCTCTACTCA
 4261 AAGCTGACCG TGGATAAGTC CAGGTGGCAG CAGGGAAACG TGTTCCTG
 CTCTGTATG
 4321 CATGAAGCGC TGCATAATCA CTATACCCAG AAGTCTCTGA GCTTGAGCCC
 AGGCAAGTAA

10

20

sクロトー-FGF23-FcLALA v1(配列番号:47)

1 MPASAPRRP RPPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGKASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDEVASDSDY NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQQLR
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQQQ VKYWIITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTSEKKFRI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFANGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELEGHH VKLWITMNEP YTRNMITYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY FWVMRDWLHQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLFLASHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGII AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GFYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFITVC TECSSFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLTY TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRNE IPLIHNTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFRAKFIGG GGSKTHTCPP CPAPEAAGGP
 1251 SVFLFPPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHN
 1301 TKPREEQYNS TYRUVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 1351 AKGQPREPOV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESENQPE
 1401 NNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ

30

40

【表22】

1451 KSLSLSPGK*

sクロト--FGF23-FcLALA v2(配列番号:48)

1 ATGCCCGCCA GCGCCCCGCC GCGCCGCCCG CGGCCGCCGC CGCCGTGCT
GTCGCTGCTG
61 CTGGTGCCTGC TGGGCCTGGG CGGCCGCCGC CTGCGTGCAG AGCCGGCGA
CGGCCGCCAG
121 ACCTGGGCC GTTTCTCGCG GCCTCCTGCC CCCGAGGCCG CGGGCCTCTT
CCAGGGCAC
181 TTCCCCGACG GCTTCCTCTG GGCGTGGGC AGCGCCGCCT ACCAGACCGA
GGGCGGCTGG
241 CAGCAGCAGC GCAAGGGTGC GTCCATCTGG GATACGTTCA CCCACCACCC
CCTGGCACCC
301 CGGGGAGACT CCCGGAACCG CAGTCTGCCG TTGGGCGCC CGTCGCCGCT
GCAGCCCGCC
361 ACCGGGGACG TAGCCAGCGA CAGCTACAAC AACGTCTTCC GCGACACCGA
GGCGCTGCC
421 GAGCTCGGGG TCACTCACTA CCGCTTCTCC ATCTCGTGGG CGCGAGTGCT
CCCCAATGGC
481 AGCCGGGGCG TCCCCAACCG CGAGGGGCTG CGCTACTACC GGGCCCTGCT
GGAGCGGCTG
541 CGGGAGCTGG GCGTGCAGCC CGTGGTCACC CTGTACCACT GGGACCTGCC
CCAGCGCTG
601 CAGGACGCCT ACGGCGGCTG GGCGAACCGC GCCCTGGCCG ACCACTTCAG
GGATTACGCG
661 GAGCTCTGCT TCCGCCACTT CGCGGGTCAG GTCAAGTACT GGATCACCAT
CGACAACCCC
721 TACGTGGTGG CCTGGCACCG CTACGCCACC GGGCGCCTGG CCCCCGGCAT
CCGGGGCAGC
781 CCCGGGCTCG GGTACCTGGT GGCGCACAAAC CTCCTCCTGG CTCATGCCAA
AGTCTGGCAT
841 CTCTACAATA CTTCTTCAG TCCCACCTCAG GGAGGGTCAGG TGTCCATTGC
CCTAAGCTCT
901 CACTGGATCA ATCCTCGAAG AATGACCGAC CACAGCATCA AAGAATGTCA
AAAATCTCTG
961 GACTTTGTAC TAGGTTGGTT TGCCAAACCC GTATTTATTG ATGGTGACTA
TCCCGAGAGC
1021 ATGAAGAATA ACCTTTCATC TATTCTGCCT GATTTTACTG AATCTGAGAA
AAAGTTCATC
1081 AAAGGAACCTG CTGACTTTTT TGCTCTTGC TTTGGACCCA CCTTGAGTTT
TCAACTTTG
1141 GACCCCTACA TGAAGTTCCG CCAATTGGAA TCTCCCAACC TGAGGCAACT
GCTTCCCTGG
1201 ATTGACCTTG AATTAAACCA TCCTCAAATA TTTATTGTGG AAAATGGCTG
GTTTGTCTCA
1261 GGGACCACCA AGAGAGATGA TGCCAAATAT ATGTATTACC TCAAAAAGTT
CATCATGGAA
1321 ACCTTAAAG CCATCAAGCT GGATGGGTG GATGTCATCG GGTATACCGC
ATGGTCCCTC
1381 ATGGATGGTT TCGAGTGGCA CAGAGGTTAC ACCATCAGGC GTGGACTCTT
CTATGTTGAC
1441 TTTCTAAGCC AGGACAAGAT GTTGTGCCA AAGTCTTCAG CCTTGTCTA
CCAAAAGCTG
1501 ATAGAGAAAA ATGGCTTCCC TCTTTACCT GAAAATCAGC CCCTAGAAGG
GACATTTC
1561 TGTGACTTTG CTTGGGGAGT TGTGACAAC TACATTCAAG TAGATACCAC
TCTGTCTCAG
1621 TTTACCGACC TGAATGTTA CCTGTGGGAT GTCCACCACA GTAAAAGGCT
TATTAAGTG

10

20

30

40

【0294】

【表23】

1681	GATGGGGTTG	TGACCAAGAA	GAGGAAATCC	TACTGTGTTG	ACTTTGC	
	CATCCAGCCC					
1741	CAGATCGCTT	TACTCCAGGA	AATGCACGTT	ACACATTTC	GCTTCTCC	
	GGACTGGGCC					
1801	CTGATTCTCC	CTCTGGTAA	CCAGTCCCAG	GTGAACCACA	CCATCCTGCA	
	GTACTATCGC					
1861	TGCAATGGCCA	GCGAGCTTGT	CCGTGTCAAC	ATCACCCCCAG	TGGTGGCC	
	GTGGCAGCCT					
1921	ATGGCCCCGA	ACCAAGGACT	GCCGCGCCTC	CTGGCCAGGC	AGGGCGCCTG	
	GGAGAACCCC					
1981	TACACTGCC	TGGCCTTG	AGAGTATGCC	CGACTGTGCT	TTCAAGAGCT	10
	CGGCCATCAC					
2041	GTCAAGCTT	GGATAACGAT	GAATGAGCCG	TATACAAGGA	ATATGACATA	
	CAGTGCTGGC					
2101	CACAACCTTC	TGAAGGCCA	TGCCCTGGCT	TGGCATGTGT	ACAATGAAAA	
	GTTCAGGCAT					
2161	GCTCAGAATG	GGAAAATATC	CATAGCCTTG	CAGGCTGATT	GGATAGAAC	
	TGCCCTGCC					
2221	TTCTCCCCAA	AGGACAAAGA	GGTGGCCGAG	AGAGTTTGG	AATTTGACAT	
	TGGCTGGCTG					
2281	GCTGAGCCC	TTTCGGCTC	TGGAGATTAT	CCATGGGTGA	TGAGGGACTG	
	GCTGAACCAA					
2341	AGAAACAATT	TTCTTCTTC	TTATTC	GAAGATGAAA	AAAAGCTAAT	20
	CCAGGGTACC					
2401	TTTGACTTT	TGGCTTAAG	CCATTATACC	ACCATCCTG	TAGACTCAGA	
	AAAAGAACAT					
2461	CCAATAAAAT	ACAATGATTA	CCTAGAAGTG	CAAGAAATGA	CCGACATCAC	
	GTGGCTCAAC					
2521	TCCCCCAGTC	AGGTGGCGGT	AGTGCCTGG	GGGTTGCGCA	AAAGTGTGAA	
	CTGGCTGAAG					
2581	TTCAGTACG	GAGACCTCCC	CATGTACATA	ATATCCAACG	GAATCGATGA	
	CGGGCTGCAT					
2641	GCTGAGGACG	ACCAGCTGAG	GGTGTATTAT	ATGCAGAATT	ACATAAACGA	
	AGCTCTCAA					
2701	GCCCCACATAC	TGGATGGTAT	CAATCTTGC	GGATACTTTG	CTTATTGTT	
	TAACGACCGC					
2761	ACAGCTCCGA	GGTTTGGCCT	CTATCGTTAT	GCTGCAGATC	AGTTTGAGCC	
	CAAGGCATCC					
2821	ATGAAACATT	ACAGGAAAAT	TATTGACAGC	AATGGTTTCC	CGGGCC	
	AACTCTGGAA					
2881	AGATTTGTC	CAGAAGAATT	CACCGTGTGT	ACTGAGTGCA	GT	30
	CACCCGAAAG					
2941	TCTTAGGAT	CCGGAGGTGG	AGGTTCAGGA	GGTGGAGGTT	CAGGAGGTGG	
	AGGTTCACTT					
3001	AAGTATCCCA	ATGCCTCCCC	ACTGCTCGGC	TCCAGCTGGG	GTGGCCTGAT	
	CCACCTGTAC					
3061	ACAGCCACAG	CCAGGAACAG	CTACCACCTG	CAGATCCACA	AGAATGCCA	
	TGTGGATGGC					
3121	GCACCCCATC	AGACCAC	CTA	CAGTGCCTG	ATGATCAGAT	
	TGGCTTGTG					
3181	GTGATTACAG	GTGTGATGAG	CAGAAGATAC	CTCTGCATGG	ATTCAGAGG	
	CAACATTTT					
3241	GGATCACACT	ATTCGACCC	GGAGAAC	AGGTTCCAAC	ACCAGACGCT	
	GGAAACCGG					
3301	TACGACGTCT	ACCACTCTCC	TCAGTATCAC	TTCC	TGGTCA	
	GGCGAAGAGA					
3361	GCCTTCCTGC	CAGGCATGAA	CCCACCCCCG	TACTCCCAGT	TCCTGTCCC	40
	GAGGAACGAG					
3421	ATCCCCCTAA	TTCAC	TTCA	CACCCCCATA	CCACGGCGGC	
	CGCCGAGGAC					
3481	GACTCGGAGC	GGGACCCCCCT	GAACGTGCTG	AAGCCCCGGG	CCC GGATGAC	
	CCCGGCCCCG					

【表24】

3541 GCCTCCTGTT CACAGGAGCT CCCGAGCGCC GAGGACAACA GCCCGATGGC
 CACTGACCCA
 3601 TTAGGGGTGG TCAGGGGCCG TCGAGTGAAC ACGCACGCTG GGGGAACGGG
 CCCGGAAGGC
 3661 TGCCGCCCT TCGCCAAGTT CATCGGAGGT GGAGGTTCAAG OCCCAGAAC
 AGCAGGTGGT
 3721 CCATCAGTTT TTCTTTCCC TCCCAAACCC AAGGATAACGC TGATGATCTC
 TCGCACGCCT
 3781 GAGGTGACAT CGTCGTAGT AGACGTGAGC CACGAAGATC CCGAGGTGAA
 GTTCAATTGG
 3841 TATGTGGACG GAGTAGAAGT GCATAACGCG AAAACTAACG CGCGCGAGGA
 ACAATATAAC
 3901 AGTACTTACA GGGTGGTATC CGTGCTCACA GTCTGCACC AGGACTGGCT
 GAACGTAAG
 3961 GAATACAAGT GCAAAGTAAG CAACAAGGCA CTTCCCGCGC CTATTGAGAA
 AACAACTCTCC
 4021 AAGGCGAAGG GACAACCAAG AGAACCTCAG GTTTACACTC TCCCGCCTTC
 CAGGGAAAGAG
 4081 ATGACCAAAA ATCAAGTTTC CCTGACTTGC CTCGTCAAAG GATTCTACCC
 TTCCGACATT
 4141 GCTGTTGAAT GGGAAAGCAA TGGACAACCA GAGAACAACT ACAAGACAAAC
 ACCCCCGGTG
 4201 CTGGATAGTG ACGGATCTT CTTCTCTAC TCAAAGCTGA CGCTGGATAA
 GTCCAGGTGG
 4261 CAGCAGGGAA ACGTGTTCCTC CTGCTCTGTC ATGCATGAAG CGCTGCATAA
 TCACTATACC
 4321 CAGAAGTCTC TGAGCTTGAG CCCAGGCAAG TAA

10

20

sクロト--FGF23-FcLALA v2(配列番号:49)

1 MPASAPP RRPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGKASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNALP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVVHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVIGWFAKP VFIDGDYPES MNNNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFV S GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGF EWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMILLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIAALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHV VKLWITMNEP YTRNMHTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GFYFAYSFNDR TAPRGFLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECASFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHL TATARNSYHL QIHKNHGHDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHFNTP
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFIGG GGSAPEAAGG PSVFLFPPPKP
 1251 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 1301 STYRRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTI S KAKGOPREPQ
 1351 VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV
 1401 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW Q0GNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
 1451 *

30

40

【0295】

【表 25】

FGF23 - FcLALA v1 (配列番号:50)

1 ATGTTGGGG CCCGCCTCAG GCTCTGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG
 CAGCATGAGC
 61 GTCTCAGAG CCTATCCAA TGCTCCCCA CTGCTCGGCT CCAGCTGGGG
 TGGCTGTAC
 121 CACCTGTACA CAGCCACAGC CAGGAACAGC TACCACCTGC AGATCCACAA
 GAATGGCCAT
 181 GTGGATGGCG CACCCCCTCA GACCACCTAC AGTGCCTGA TGATCAGATC
 AGAGGATGCT
 241 GGCTTGTGG TGATTACAGG TGTGATGAGC AGAAGATACC TCTGCATGGA
 TTTCAGAGGC
 301 AACATTTTG GATCACACTA TTTCGACCCG GAGAACTGCA GGTTCCAACA
 CCAGACGCTG
 361 GAAAACGGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG
 TCTGGGCCGG
 421 GCGAAGAGAG CCTTCCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCCGT ACTCCCAGTT
 CCTGTCCCAG
 481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAAC CACGGCGGCA
 CACCCAGAGC
 541 GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTG AACGTGCTGA AGCCCCGGGC
 CCGGATGACC
 601 CCGGCCCCGG CCTCCTGTT ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG
 CCCGATGGCC
 661 AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG
 GGGAACGGGC
 721 CCGGAAGGCT GCCGCCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTCAA
 AACCCACACG
 781 TGTCTCCCTT GTCCTGCCAG AGAAGCAGCA GGTGGTCCAT CAGTTTTCT
 TTTCCCTCCC
 841 AAACCCAAGG ATACGCTGAT GATCTCTCGC ACGCCTGAGG TGACATGCGT
 CGTAGTAGAC
 901 GTGAGCCACG AAGATCCGA GGTGAAGTTC AATTGGTATG TGGACGGAGT
 AGAAGTGCAT
 961 AACGCGAAAAA CTAAGCCCG CGAGGAACAA TATAACAGTA CTTACAGGGT
 GGTATCCGTG
 1021 CTCACAGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC GGTAAGGAAT ACAAGTGCAA
 AGTAAGCAAC
 1081 AAGGCCTTC CCGCGCCTAT TGAGAAAACA ATCTCCAAGG CGAAGGGACA
 ACCAAGAGAA
 1141 CCTCAGGTTT ACACTCTCCC GCCTTCCAGG GAAGAGATGA CCAAAATCA
 AGTTCCCTG
 1201 ACTTGCTCG TCAAAGGATT CTACCCCTTCC GACATTGCTG TTGAATGGGA
 AAGCAATGGG
 1261 CAACCAGAGA ACAACTACAA GACAACACCC CCGGTGCTGG ATAGTGACGG
 ATCTTCTTT
 1321 CTCTACTCAA AGCTGACCGT GGATAAGTCC AGGTGGCAGC AGGGAAACGT
 GTTTCCTGC
 1381 TCTGTCTGC ATGAAGCGCT GCATAATCAC TATACCCAGA AGTCTCTGAG
 CTTGAGCCCA
 1441 GGCAAGTAA

FGF23(R179Q) - FcLALAv1 (配列番号:51)

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATRNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN

【表26】

151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIP RRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 ICGGGSKHTH CPPCPAPEAA GGPSTVLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 301 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTPP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*

FGF23-FcLALA v2(配列番号:52)

1 ATGTTGGGG CCCGCCTCAG GCTCTGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGCTG
 CAGCATGAGC
 61 GTCCTCAGAG CCTATCCCAA TGCCCTCCCCA CTGCTCGGCT CCAGCTGGGG
 TGGCCTGATC
 121 CACCTGTACA CAGCCACAGC CAGGAACAGC TACCACCTGC AGATCCACAA
 GAATGGCCAT
 181 GTGGATGGCG CACCCCATCA GACCATCTAC AGTGCCCTGA TGATCAGATC
 AGAGGATGCT
 241 GGCTTTGTGG TGATTACAGG TGTGATGAGC AGAAGATAACC TCTGCATGGA
 TTTCAGAGGC
 301 AACATTTTG GATCACACTA TTTCGACCCG GAGAACTGCA GGTTCCAACA
 CCAGACGCTG
 361 GAAAACGGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG
 TCTGGCCCG
 421 GCGAAGAGAG CCTTCCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCCGT ACTCCCAGTT
 CCTGTCCCG
 481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCCATAC CACGGCGGCA
 CACCCAGAGC
 541 GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCCCTG AACGTGCTGA AGCCCCGGGC
 CCGGATGACC
 601 CCGGCCCCGG CCTCCTGTT ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG
 CCCGATGGCC
 661 AGTACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG
 GGGAACGGGC
 721 CCGGAAGGCT GCCGCCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTCAGC
 CCCAGAAAGCA
 781 GCAGGTGGTC CATCAGTTT TCTTTTCCCT CCCAAACCCA AGGATAACGCT
 GATGATCTCT
 841 CGCACGCTG AGGTGACATG CGTCGTAGTA GACGTGAGCC ACGAAGATCC
 CGAGGTGAAG
 901 TTCAATTGGT ATGTGGACGG AGTAGAAGTG CATAACGCGA AAACTAAGCC
 GCGCGAGGAA
 961 CAATATAACA GTACTTACAG GGTGGTATCC GTGCTCACAG TCCTGCACCA
 GGACTGGCTG
 1021 AACGGTAAGG AATACAAGTG CAAAGTAAGC AACAAAGGCAC TTCCCCGGCC
 TATTGAGAAA
 1081 ACAATCTCCA AGGCGAAGGG ACAACCAAGA GAACCTCAGG TTTACACTCT
 CCCGCCCTCC
 1141 AGGGAAGAGA TGACCAAAAA TCAAGTTCC CTGACTTGCC TCGTCAAAGG
 ATTCTACCC
 1201 TCCGACATTG CTGTTGAATG GGAAAGCAAT GGACAACCAG AGAACAACTA
 CAAGACAACA
 1261 CCCCCGGTGC TGGATAGTGA CGGATCTTC TTTCTCTACT CAAAGCTGAC
 CGTGGATAAG
 1321 TCCAGGTGGC AGCAGGGAAA CGTGTGTTCC TGCTCTGTCA TGCATGAAGC
 GCTGCATAAT
 1381 CACTATACCC AGAAGTCTCT GAGCTTGAGC CCAGGCAAGT AA

FGF23(R179Q)-FcLALAv2(配列番号:53)

【0296】

【表 2 7】

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVIVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL EMGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSP RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEI PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPPFAKF
251 IGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLFPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

【表28】

sクロト--FGF23(R1156Q、C1183S)のアミノ酸配列(配列番号:54)

sクロト-:aa[アミノ酸]1-982;リンカ-1:aa983-1001;FGF23:aa1002-1228

1 MPASAPRRRP RPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAAYQTEGGW QQHKGKASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQPQL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFPGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRILGYLVVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPERRMTD HSIKECQKSL DEVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQOLL DPHMKFRQLE SPNLRLQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVEMGWVFS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGFLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFANGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYIWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYVR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQEELGHH VKLWITMNEP YTRNMITYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSERED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWKL FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GFYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECFFFTRK SLGSGGGGSG GGGGGGGSSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHL TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMRSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVFHSPQYH FLVSLIGRAKR AFLPGMNNPPP YSQFLSRNE IPLIHFMTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASSSQELPSA EDNSPMASDF
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFACKI*

10

20

sクロト--FGF23(R1156Q、C1221S)のアミノ酸配列(配列番号:55)

sクロト-:1-982;リンカ-1:983-1001;FGF23:1002-1228;

1 MPASAPRRRP RPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAAYQTEGGW OOOGKGKASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLQPQL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFPGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRILGYLVVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPERRMTD HSIKECQKSL DEVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQOLL DPHMKFRQLE SPNLRLQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVEMGWVFS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGFLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFANGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYIWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYVR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQEELGHH VKLWITMNEP YTRNMITYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSERED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWKL FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GFYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECFFFTRK SLGSGGGGSG GGGGGGGSSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHL TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMRSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVFHSPQYH FLVSLIGRAKR AFLPGMNNPPP YSQFLSRNE IPLIHFMTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASSSQELPSA EDNSPMASDF
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFACKI*

30

40

【0297】

【表29】

1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPI YSQFLSRRNE IPLLHFNTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG SRFFAKFI*

sクロト--FGF23(R1156Q, Q1133A)のアミノ酸配列(配列番号:56)
 sクロト--:1-982;リンク-1:983-1001;FGF23:1002-1228

1 MPASAPP RRPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRF
 151 ISWARVLNG SAGVPMREGI RYYRRLLERL RELGVQPVTT LYHWDLFQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQQQ VKYWITIDNP YVVAWGHYAT
 251 GRLAPGIRGS PRIGLYLVANN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HS1KECQKSL DFVLGWFKA P VFIDGDPES MKNNLSSILP
 351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSPQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFHHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFANGVVDN YIQVDTTILSQ FTDLNVYLWD
 551 VVHSKRLIKV DGVVVKRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMNTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYMEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLHQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVFW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGGLRY AADQFEPKAS MKHYRKIIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECFFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLIG SSWGGLIHLH TATARNSYHL QIHKINGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPEMC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPI YSAFLSRRNE IPLLHFNTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRFFAKFI*

10

20

sクロト--FGF23(R1156Q, C1183S, C1221S)のアミノ酸配列(配列番号:57)
 sクロト--:1-982;リンク-1:983-1001;FGF23:1002-1228

1 MPASAPP RRPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRF
 151 ISWARVLNG SAGVPMREGI RYYRRLLERL RELGVQPVTT LYHWDLFQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQQQ VKYWITIDNP YVVAWGHYAT
 251 GRLAPGIRGS PRIGLYLVANN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HS1KECQKSL DFVLGWFKA P VFIDGDPES MKNNLSSILP
 351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSPQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFHHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFANGVVDN YIQVDTTILSQ FTDLNVYLWD
 551 VVHSKRLIKV DGVVVKRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMNTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYMEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLHQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVFW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGGLRY AADQFEPKAS MKHYRKIIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECFFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL

30

40

【表30】

1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHL TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSSRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPI YSQFLSRRNE IPLIHFNTP
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASSSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVVRGGRVN THAGGTGPEG **SRPFAKFI***

sクロト--FGF23(R1156Q, C1183S, C1221S, Q1133A)のアミノ酸配列(配列番号:58)
 sクロト-:1-982;リンカ-1:983-1001;FGF23:1002-1228

1 MPASAPPRRP RPPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLEQGT FPDGFELWAVG SAAYQTEGGW QOHGKGASIN DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAFSPQPA TGDVASDSYN NVERDTEALR ELGVVTHYRF
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGI RYYRRLERL RELGVQPVVT LYHWDLQRL
 201 QDAYGGWAHR ALADHFIRDY ELCFRHFPGQ VKYWITIDNP YYVAWGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRIGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPDRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFPAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTESERKKFI KGTADDFALC FGPTLSPQQL DPHMKFRQLE SPNLRLQLL
 401 IDLEFNHFPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIAKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLEYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPEPLP ENQFEGTTF CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLLKV DGWVTKRKRS YCVDFAAIQP QIAALLQEMHV THFRESLDWA
 601 LILPLGNCSQ VHHTILQYYR CMASELVRVN ITFPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHM VKLWITMNEP YTRNMNTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEFIFGSGDY FWVMMRDWLHQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLAISHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLM SPSQVAVVWP
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVVY MQNYINEALK
 901 AHILDGINL C GYFAYSFNDR TAPRFLGLYR AADQFEPKAS MKHYRKIIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSSHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHL TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSSRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPI YSQFLSRRNE IPLIHFNTP
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASSSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVVRGGRVN THAGGTGPEG **SRPFAKFI***

FGF23(R179Q;C206S)-FcLALAv1のアミノ酸配列(配列番号:59)
 FGF23:1-251;リンカ-:252-256;FcLALA:257-482

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAVPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVFYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIFN TPIPERRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 301 VSHEDEPVKF NWYVVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK*

10

20

30

【0298】

【表31】

FGF23(R179Q, C244S) -FcLALAv1のアミノ酸配列(配列番号:60)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-482

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVFHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPDRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTAGGTG PEGSRPFAKF
251 IGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSPVLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
301 VSHEDEPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*

```

10

FGF23(R179Q, Q156A) -FcLALAv1のアミノ酸配列(配列番号:61)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-482

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVFHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPDRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTAGGTG PEGCRPFAKF
251 IGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSPVLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
301 VSHEDEPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*

```

20

FGF23(R179Q, C206S, C244S) -FcLALAv1のアミノ酸配列(配列番号:62)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-482

30

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVFHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPDRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTAGGTG PEGSRPFAKF
251 IGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSPVLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
301 VSHEDEPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*

```

【表32】

FGF23(R179Q, C206S, C244S, Q156A) - FcLALAv1のアミノ酸配列(配列番号:63)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-482

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVKHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSALSR RNEIPLIHFN TPIPDRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
 251 IGGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVV
 301 VSHEDEPEVVF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTT PPVLDSDGSF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHN YTQKSLSLSP GK*

10

FGF23(R179Q, C206S) - FcLALAv2のアミノ酸配列(配列番号:64)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-473

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVKHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPDRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS LTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFP
 401 SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLSP PGK*

20

FGF23(R179Q, C244S) - FcLALAv2のアミノ酸配列(配列番号:65)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-473

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVKHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPDRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
 251 IGGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS LTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFP
 401 SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS

30

【0299】

【表33】

451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK*

FGF23(R179Q, Q156A) - FcLALAv2のアミノ酸配列(配列番号:66)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-473

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVFYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK*

10

FGF23(R179Q, C206S, C244S) - FcLALAv2のアミノ酸配列(配列番号:67)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-473

20

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVFYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFKA
 251 IGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK*

30

FGF23(R179Q, C206S, C244S, Q156A) - FcLALAv2のアミノ酸配列(配列番号:68)
 FGF23:1-251; リンカ:-252-256; FcLALA:257-473

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVFYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFKA
 251 IGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS

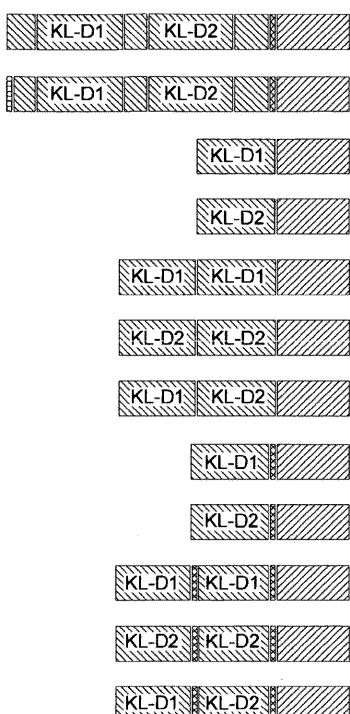
40

【表34】

451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK*

【 図 1 A 】

1

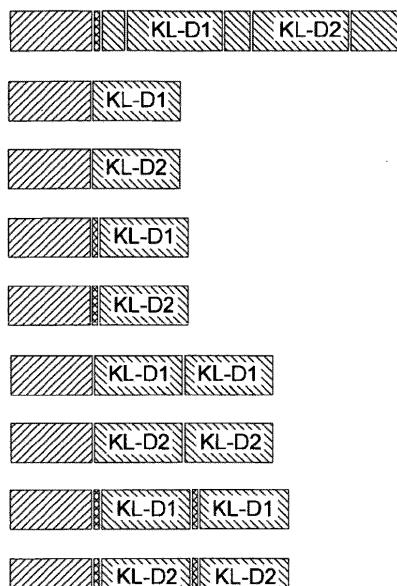


：クロト-（細胞外サブドメイン）またはクロト-の活性なフラグメント；

: FGF23 (R179Q), FGF23, FGF 19, FGF21; : リンカー; : IgG シグナルペプチド

【 図 1 B 】

図1(続き)



■：クロトニ（細胞外サブドメイン）またはクロトニの活性なフラグメント：

: FGF23 (R179Q), FGF23, FGF 19, FGF21; : リンカー; : IgG シグナルペプチド

(図 2 A)

ヒトクロト一核酸配列(NM_004795)(配列番号: 1)
タンパク質コード領域: 9-3047

アシハラ真一 懸城: 94-3647

(図 2 B)

如上一頁 / 酒配對 QR: 994782 (日期: 1/3)

【図2G】

601 SQVNHTILQY YRCMASELVR VNITEPVVVALW QPMAPNCGLP RILLARQGAWE
 651 NPYTALAFEA YARLCFCDFELG HHVKLWITMN EFYTRNMTYS AGHNLKRAHA
 701 LNHVYNEKEF RHAQNGKISI ALQADWIEPA CPFSQDKDEKV AERVLFEFDIG
 751 WLAEPFGCS DYPWVMRDWL NORRNFLPY FTEDEKKLIO GTFDEALSH
 801 YTTILVDSKED EDPIKYNDYL EVQEMTDITW LNSPSQAVV FWGLRKRVINW
 851 LKFKYGDLPM YIISNGIDDG LHAEDDQLRV YYMMONYINEA LKAHILLDGIN
 901 LCGYFAYFSNF DRTAPRFLGY RYAAADQFEPK ASMKHYRKII DSNCFGCPET
 951 LERFCPEEFV VCTECSEFH T RSKSLCGSGGG SGCCGSGGGG SLKVNPNASPL
 1001 LGSSWGLLH LYATATARNY HLOJTHKNGHV DGAFAHOIYT ALMIRSEADAG
 1051 FVITIVGMSR RYLCMDFERGN FKGSHYDFP NCREFHQHOTL NGYDVYHSPO
 1101 YHFLVLSLGR KRAFLPGMNP PPySQFLSRLK NEIPLHFNT PIPRHTQSA
 1151 EDDSERDPLN VLKPRARMTP APASCQSELQ SAEDNSPMAS DPLGVVRRGGR
 1201 VNTAGGTGF EGCRPFAKF *

KL-D1-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列 (配列番号: 21)

1 MPASAPPERR RPPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGQDQO TWAERFSRPPA
 51 NPYTALAFEA YARLCFCDFELG HHVKLWITMN EFYTRNMTYS AGHNLKRAHA
 101 PCDRSNASLP LGAPSPLQPA TGVDASDSYN KVFRETEALR ELGVTHYRF
 151 ISWARVLPGN SAGVNPNEREGI RYVKGRLLERL RLGVPHVPTT LYHWDLQL
 201 QDAYGWNK ALADHFRDIA ELCFRHFGQO VYKYMIDNQ YVWVHGYAT
 251 GRALPGLRG SRLQYLVHNH LLLAHAKVWH LNAEPLHRSQFPLQ GQVSTALSS
 301 HWINPRMTD HSIRGKPLR KGTADDFPALC PGPTLSQFOL DPMKFRQLEL SENRROLLSW
 351 DTESEERKKFI KGTADDFPALC PGPTLSQFOL DPMKFRQLEL SENRROLLSW
 401 IDLEPNPQI FIVENGWVFS GTTKHDADAE MYLKAHEKQ EALKAIKLDGV
 451 DWIYGTAWSL MDGFPHMRYG SIRGRGLYFVD FLSQDMMLP KSSALFQKL
 501 IERKGFFPLP ENQPLHPCGQ FPDGFILWAVG SANQTEGQN QGQKGQGAIW
 551 DFTTHMFLAP PGDSMASLQ LGAPSPLQPA TGVDASDSYN KVFRETEALR ELGVTHYRF
 601 ELGVTHYRF PGDSMASLQ LGAPSPLQPA TGVDASDSYN KVFRETEALR ELGVTHYRF
 651 LYHWDLQLPQD NGVWNGWANR ELYHWDLQLPQD NGVWNGWANR ELYHWDLQLPQD
 701 YVWVHGYAT GLAFLPQD NGVWNGWANR ELYHWDLQLPQD NGVWNGWANR ELYHWDLQLPQD
 751 GQVSTALSS HPMYHNGPQD HSIEKOKSL DFVLGCHSAPK VSIDGQYTES
 801 MDPKFRQLEL DTESEERKKFI KGTADDFPALC PGPTLSQFOL DPMKFRQLEL SENRROLLSW
 851 SPNRLQSLP IDLEPNPQI FIVENGWVFS GTTKHDADAE MYLKAHEKQ EALKAIKLDGV
 901 IERKGFFPLP ENQPLHPCGQ FPDGFILWAVG SANQTEGQN QGQKGQGAIW
 951 ISWARVLPGN SAGVNPNEREGI RYVKGRLLERL RLGVPHVPTT LYHWDLQL
 1001 QDAYGWNK ALADHFRDIA ELCFRHFGQO VYKYMIDNQ YVWVHGYAT
 1051 GMWSRVLCKM DFRGNNIFGSH YDFPENCRFQ HQTLNGCYD VHSPOYHFLV
 1101 SLGKRNPLK RGMPPWPFYSS FLRSRNIEIPL THNNTPIPRR HTQSSEDDSE
 1151 RDPNLVLRPK ARMPAPASAC QSELESAEDN SPMASDPLGV VRGGVNTHA
 1201 GGTGPECCR FAKF*

KL-D2-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列 (配列番号: 22)

1 MPASAPPERR RPPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGQDQO TWAERFSRPPA
 51 VVNYXIOVTDT TLSQFNTLW YLWDVHBSKR LKLVGDGVVTK KRKSVCVDFA
 101 AIOPQALIO EMVHVTHERFS LDWALILPQD NOSOVNTIL OYYRCMASEL
 151 VVNRITPVAW LWQPMAPNQ TLPLRLLARQD WENPYTALP AEXARLFCQE
 201 LGHVWKLWIT MNEPYTTHNQ TSAGHNLKKA HALAWHVNVE KFRHAQNGKI
 251 SIALQADWE PACPFLRNLQ TSAGHNLKKA HALAWHVNVE KFRHAQNGKI
 301 WLQRNNEFL PYTFEDDEKKL IQLGTFDLAL SHYTTILVDS EKEDPIKYND
 351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VWPGLRKLW NLWLFKYGDL PMYI18NGID
 401 DGLRAEDDQL RVYMMQNTIN EALKAHILDG INLCGTFATPS FNDTAPRFG
 451 LYRKAADQFEE PKASMKHYRK I1DSNGPFP ETBLRCPCEE FTVCTECSFF
 501 HTRKSLGSQG GSQGSGGGG GSLSKYPNNS PLLGSSWGLL ILYTATARNY
 551 SYHJQIHNGK HVGDAFHQTY SALMIRSEDG AGFVVIITGMV SRRYLCMDFR
 601 NPPFYSQFLS RRNEIPLHFP NTPIPRHRQD SAEDDSERDPL NLVKPRARM
 651 TPAPACCSQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFAK
 701 TPAPACCSQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFAK
 751 FI*

(KL-D1)-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列 (配列番号: 23)

1 MPASAPPERR RPPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGQDQO TWAERFSRPPA

【図2I】

51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTYI SALMIRSEDA GFVVITGVM S RYLCMDFRG
 101 NIFGSHYDFP ENCRFHQHOTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSLRSLR RNIEIPLHFP TPIPRHRTOS AEDDSERDPL NLVKPRARM
 201 PAPACSCQSL PSEADNSPMAS SDPLGVVRG RYVNTAGHGTG PEGCRPFAK
 251 IOGTFPDGLP WAVGSAQYTF EGGWQOHGKG ASIWTFTHH PLAGPDSRN
 301 PSPLQPATGD VASDNNVNE RDTEALRREL GQVWPLQJQDA YGQWANRALA
 351 VENREGLRY RRLLEKLELW QWVPPVTLW WDLPQJQDA YGQWANRALA
 401 DHLVHANLL AHARVWHLYN TSFPRQGQQ VSIALSSHWA NPMHDTIHSI
 451 KECQRSLSDDW LGWFMKQDQD DADYDPESHN ESRPQDLSL ESRPQDLSL
 501 BNGHVGSGT KQDADYKMYK LQWVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWV
 551 FDRKEDPIKIR AGLVYDDEQD QWMLKDKS ESRPQDLSL ESRPQDLSL
 601 PLBCTFICGQ AMQWVNIQIO VDTTLLQFTD LNVAWVWVWVWVWVWVWVWV
 651 VTKKRGKMAE DFLAIIQDPL LQLOMWHUFTT DFLRQWALLI FLGNGQSVHH
 701 TILQYRCMAE SELVRNNTA VVAVWQHMAP NOCLPULLAR QGAMENPYTA
 751 LAFAKRAEFL FOELSGHVKL WITMNPYTR NMYSAGHNN LKAHALAHNVV
 801 KNEKFRHQNQG KQISIALQWQ WIEPACPFQD KDKFBEVRL EFDIGHLABP
 851 IFPGSDCFMV MRDQLNQRMN FILYPTFEDD KKLQGTFD LALSHYTTIL
 901 VDSEKEDPIKIR YNDYLEVEON DTIWMNPSQ QVAVWPLGRL KVBNWLEK
 951 GDLPMYIISN GIDDLAHDAD QDLYRUVYMQN YSEALKAHI LDCGNCVWF
 1001 AVSFNDRATP RGFYRUYAAD QFEPKASMKH YKTIIDSNFGF PGPETLERFC
 1051 PEETVCTC SFPHTKRS*

EGF23 (R179Q) -KL-D1 アミノ酸配列 (配列番号: 26)

1 MLGARLRLWV CALCSVCMSM VLRAYPNASP LLGSSWGLL HLYTATARNY
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTYI SALMIRSEDA GFVVITGVM S RYLCMDFRG
 101 NIFGSHYDFP ENCRFHQHOTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSLRSLR RNIEIPLHFP TPIPRHRTOS AEDDSERDPL NLVKPRARM
 201 PAPACSCQSL PSEADNSPMAS SDPLGVVRG RYVNTAGHGTG PEGCRPFAK
 251 IOGTFPDGLP WAVGSAQYTF EGGWQOHGKG ASIWTFTHH PLAGPDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQATPGDVS DSYNNVFRDT EALRRELGVTH YRFISIWARV
 351 LPNGSAGVNP REGLYRYYRSL RERLRELGVTH PWTYLYHWDL PQLRQDAGG
 401 WANRALADHF RYAOELCPRM FGQVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWV
 451 IRGSDPFLG VAHNLLLAHQA KWHVWHTHPRF RPLQGQVSSA ILSHWNINPR
 501 RMTDHSIEKC QKSLDFLWGLVQ FQFLDFPHMFQ RYPSMKNLNS SILDPTES
 551 KKFTRKDFAD FALCFCGFTLS QFLDQPHMFQ RQESLQDQK RLLSWDLEFN
 601 HQQIFIVENG WFVSGTTRKRD AYKMYMLKK FIMETLKAIK DGDVWIGYTA
 652 *

EGF23 (R179Q) -KL-D2 アミノ酸配列 (配列番号: 27)

1 MLGARLRLWV CALCSVCMSM VLRAYPNASP LLGSSWGLL HLYTATARNY
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTYI SALMIRSEDA GFVVITGVM S RYLCMDFRG
 101 NIFGSHYDFP ENCRFHQHOTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSLRSLR RNIEIPLHFP TPIPRHRTOS AEDDSERDPL NLVKPRARM
 201 PAPACSCQSL PSEADNSPMAS SDPLGVVRG RYVNTAGHGTG PEGCRPFAK
 251 IOGTFPDGLP WAVGSAQYTF EGGWQOHGKG ASIWTFTHH PLAGPDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQATPGDVS DSYNNVFRDT EALRRELGVTH YRFISIWARV
 351 LPNGSAGVNP REGLYRYYRSL RERLRELGVTH PWTYLYHWDL PQLRQDAGG
 401 WANRALADHF RYAOELCPRM FGQVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWV
 451 IRGSDPFLG VAHNLLLAHQA KWHVWHTHPRF RPLQGQVSSA ILSHWNINPR
 501 RMTDHSIEKC QKSLDFLWGLVQ FQFLDFPHMFQ RYPSMKNLNS SILDPTES
 551 KKFTRKDFAD FALCFCGFTLS QFLDQPHMFQ RQESLQDQK RLLSWDLEFN
 601 HQQIFIVENG WFVSGTTRKRD AYKMYMLKK FIMETLKAIK DGDVWIGYTA
 652 *

【図2H】

51 PEAAGLFGQT FPDGFILWAVG SAAYQTEGGM QMGKGCASIN DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGVDASDSYN KVFRETEALR ELGVTHYRF
 151 ISWARVLPGN SAGVNPNEREGI RYVKGRLLERL RLGVPHVPTT LYHWDLQL
 201 QDAYGWNK ALADHFRDIA ELCFRHFGQO ELCFRHFGQO VYKWTITLQV YVWVHGYAT
 251 GRALPGLRG SRLQYLVHNH LLLAHAKVWH LYNTSERTPTQ GGQVSIA
 301 HWINPRMTD HSIRGKPLR KGTADDFPALC PGPTLSQFOL DPMKFRQLEL SENRROLLSW
 351 DTESEERKKFI KGTADDFPALC PGPTLSQFOL DPMKFRQLEL SENRROLLSW
 401 IDLEPNPQI FIVENGWVFS GTTKHDADAE MYLKAHEKQ EALKAIKLDGV
 451 DWIYGTAWSL MDGFPHMRYG SIRGRGLYFVD FLSQDMMLP KSSALFQKL
 501 IERKGFFPLP ENQPLHPCGQ FPDGFILWAVG SANQTEGQN QGQKGQGAIW
 551 DFTTHMFLAP PGDSMASLQ LGAPSPLQPA TGVDASDSYN KVFRETEALR ELGVTHYRF
 601 ELGVTHYRF PGDSMASLQ LGAPSPLQPA TGVDASDSYN KVFRETEALR ELGVTHYRF
 651 LYHWDLQLPQD NGVWNGWANR ELYHWDLQLPQD NGVWNGWANR ELYHWDLQLPQD
 701 YVWVHGYAT GLAFLPQD NGVWNGWANR ELYHWDLQLPQD NGVWNGWANR ELYHWDLQLPQD
 751 GQVSTALSS HPMYHNGPQD HSIEKOKSL DFVLGCHSAPK VSIDGQYTES
 801 MDPKFRQLEL DTESEERKKFI KGTADDFPALC PGPTLSQFOL DPMKFRQLEL SENRROLLSW
 851 SPNRLQSLP IDLEPNPQI FIVENGWVFS GTTKHDADAE MYLKAHEKQ EALKAIKLDGV
 901 IERKGFFPLP ENQPLHPCGQ FPDGFILWAVG SANQTEGQN QGQKGQGAIW
 951 ISWARVLPGN SAGVNPNEREGI RYVKGRLLERL RLGVPHVPTT LYHWDLQL
 1001 QDAYGWNK ALADHFRDIA ELCFRHFGQO VYKYMIDNQ YVWVHGYAT
 1051 GMWSRVLCKM DFRGNNIFGSH YDFPENCRFQ HQTLNGCYD VHSPOYHFLV
 1101 SLGKRNPLK RGMPPWPFYSS FLRSRNIEIPL THNNTPIPRR HTQSSEDDSE
 1151 RDPNLVLRPK ARMPAPASAC QSELESAEDN SPMASDPLGV VRGGVNTHA
 1201 GGTGPECCR FAKF*

(KL-D2)-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列 (配列番号: 24)

1 MPASAPPERR RPPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGQDQO TWAERFSRPPA
 51 VVNYXIOVTDT TLSQFNTLW YLWDVHBSKR LKLVGDGVVTK KRKSVCVDFG
 101 AIOPQALIO EMVHVTHERFS LDWALILPQD NOSOVNTIL OYYRCMASEL
 151 VVNRITPVAW LWQPMAPNQ TLPLRLLARQD WENPYTALP AEXARLFCQE
 201 LGHVWKLWIT MNEPYTTHNQ TSAGHNLKKA HALAWHVNVE KFRHAQNGKI
 251 SIALQADWE PACPFLRNLQ TSAGHNLKKA HALAWHVNVE KFRHAQNGKI
 301 WLQRNNEFL PYTFEDDEKKL IQLGTFDLAL SHYTTILVDS EKEDPIKYND
 351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VWPGLRKLW NLWLFKYGDL PMYI18NGID
 401 DGLRAEDDQL RVYMMQNTIN EALKAHILDG INLCGTFATPS FNDTAPRFG
 451 LYRKAADQFEE PKASMKHYRK I1DSNGPFP ETBLRCPCEE FTVCTECSFF
 501 HTRKSLGSQG GSQGSGGGG GSLSKYPNNS PLLGSSWGLL ILYTATARNY
 551 SYHJQIHNGK HVGDAFHQTY SALMIRSEDG AGFVVIITGMV SRRYLCMDFR
 601 NPPFYSQFLS RRNEIPLHFP NTPIPRHRQD SAEDDSERDPL NLVKPRARM
 651 TPAPACCSQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFAK
 701 TPAPACCSQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFAK
 751 FI*

FGF23 (R179Q) -クロト-細胞外ドメインアミノ酸配列 (配列番号: 25)

1 MLGAKRLRLWV CALCSVCMSM VLRAYPNASP LLGSSWGLL HLYTATARNY

【図2J】

501 GSGDYPWVMR DWLNQRNQFL LPLYFTEDDEKK LIQGTFDFLA LSHYTTIILVD
 551 SEKEDPIKIR DLYEVQEMTDI ITWLNPSQV AVVPWGLRKV LNWLKFKYGD
 601 LPMYIISNGI DGLHLAEDDQ LRVYMMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
 651 SFNDRTAIPF GLYRYAADQF EPKASMKHYR KIDSNGF*

FGF23 (R179Q)-(KL-D1) アミノ酸配列 (配列番号: 28)

1 MLGARLRLWV CALCSVCMSM VLRAYPNASP LLGSSWGLL HLYTATARNY
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTYI SALMIRSEDA GFVVITGVM S RYLCMDFRG
 101 NIFGSHYDFP ENCRFHQHOTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSLRSLR RNIEIPLHFP TPIPRHRTOS AEDDSERDPL NLVKPRARM
 201 PAPACSCQSL PSEADNSPMAS SDPLGVVRG RYVNTAGHGTG PEGCRPFAK
 251 ICQTFPDGEL WAGVSAQYTF EGGWQOHGKG ASIWTFTHH PLAGPDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQATPGDVS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFISIWARV
 351 LPNGSAGVNP REGLYRYYRSL RERLRELGVTH PWTYLYHWDL PQLRQDAY
 401 WANRALADHF RYAOELCPRM FGQVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWV
 451 IRGSDPFLG VAHNLLLAHQA KWHVWHTHPRF RPLQGQVSSA ILSHWNINPR
 501 RMTDHSIEKC QKSLDFLWGLVQ FQFLDFPHMFQ RYPSMKNLNS SILDPTES
 551 KKFTRKDFAD FALCFCGFTLS QFLDQPHMFQ RQESLQDQK RLLSWDLEFN
 601 QGTFPDGELV AVGSAYAQTF EGGWQOHGKG ASIWTFTHH PLAGPDSRN
 651 SLPLGAPSP LQATPGDVS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFISIWARV
 701 PNSAGVNP REGLYRYYRSL RERLRELGVTH PWTYLYHWDL PQLRQDAY
 751 ANKRALADHF RYAOELCPRM FGQVWVWVWVWVWVWVWVWVWVWV
 801 RCGSPRLGVLWV CAAQKQJLQD KQSLDFLWGLVQ FWTYLYHWDL PQLRQDAY
 851 RCGSPRLGVLWV CAAQKQJLQD KQSLDFLWGLVQ FWTYLYHWDL PQLRQDAY
 901 MTDHISIEKC QKSLDFLWGLVQ FWTYLYHWDL PQLRQDAY
 951 KKFTRKDFAD FALCFCGFTLS QFLDQPHMFQ RYPSMKNLNS SILDPTES
 1001 PNSAGVNP REGLYRYYRSL RERLRELGVTH PWTYLYHWDL PQLRQDAY
 1051 QGTFPDGELV AVGSAYAQTF EGGWQOHGKG ASIWTFTHH PLAGPDSRN
 1101 WSLMDGEFWW RGYSIRURGL YTFDPLSQDK LKPSSALFY QKLIKEKNF*

FGF23 (R179Q)-(KL-D2) アミノ酸配列 (配列番号: 29)

1 MLGARLRLWV CALCSVCMSM VLRAYPNASP LLGSSWGLL HLYTATARNY
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTYI SALMIRSEDA GFVVITGVM S RYLCMDFRG
 101 NIFGSHYDFP ENCRFHQHOTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSLRSLR RNIEIPLHFP TPIPRHRTOS AEDDSERDPL NLVKPRARM
 201 PAPACSCQSL PSEADNSPMAS SDPLGVVRG RYVNTAGHGTG PEGCRPFAK
 251 ICQTFPDGEL WAGVSAQYTF EGGWQOHGKG ASIWTFTHH PLAGPDSRN
 301 KKRKSYCVDF AAIQPAQIQLI QEMHTFTRHPRF GLPPLRQDQK RLLSWDLEFN
 351 LQYRCMAE LERLRELGVTH PWTYLYHWDL PQLRQDAY
 401 FAEYARLCPRM FGQVWVWVWVWVWVWVWVWVWV
 451 EXFRHAQNGI ISIAQDWTI EPACPFQSKD KEVARELVEF DIGWLAPIF
 501 GSGDYPWVMR DWLNQRNQFL LPLYFTEDDEKK LIQGTFDFLA LSHYTTIILVD
 551 SEKEDPIKIR DLYEVQEMTDI ITWLNPSQV AVVPWGLRKV LNWLKFKYGD
 601 LPMYIISNGI DGLHLAEDDQ LRVYMMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
 651 SFNDRTAIPF GLYRYAADQF EPKASMKHYR KIDSNGFEGT FPCDFAWGV
 701 DMYIIVDPTTLQD SOFTQLWVNLWV DWDVHNSKLI KDGCVVTKK KSYCVDFAAI
 751 QPQIQLQEM VHTHFRFLD WALLELPLGNO SVQVNTILQV YRCMSESELVR
 801 VNTIPWVNLWV QPMAPNQGDL RLLWVQHGAEE YNTALAFAE YARLCFCDFELG
 851 HHVKLWITMN EPYTRNMTYS AGHNLKKA HALAWHVNVE KHAQNGKISI
 901 ALQADWIEPA CPFSQSKDKEV AERVLFEFIC WLAEPLFGSG DYPWVMDRNWL
 951 QCRNNEFLPY FTEDEKKLIO GTFDFLASH YTTILPUSK EDPIKINDYL
 1001 EVQEMTDIITLQD LMNSQFQVAVV ALWQFLRVLNWK LKFRYQGDLF YIISNGIDDG
 1051 RHAEDDQLURV YMMSQYINNEA LKAHALHGV LCGYFAYNSF DRTAPRFLG
 1101 RYAAQDFEPK ASMKHYRKII DSNGF*

【 図 2 K 】

FGF19 核酸配列(NM_005117) (配列番号: 30)

タンパク質コード領域(464-1114)

FGF19 アミノ酸配列 (NP_005108) (配列番号: 31)

1 MRSQGVVVHV WILAGLWLAV AGRPLAFLSDA GPHVHYGWGD PIRLRHLYTS GPHGLSSCFL
61 RIRADGVVDC ARGGQSANSLL EIKAVALRTV AIKGVHSVRY LCGMADGKMQ GLLQYSEEDC
121 AFEELIEPRDG NTYVDSRMEKKH RYDQVSKRQ EQLYQHNGEL PLSHFLPMLP MVPEEPEDLR
181 GHLESDMESS PLETDNSRPEK GLVTGIEAVE SPSEFK

FGF21 核酸配列 (NM_019113) (配列番号: 32)

1 CTGTCAGCTG AGGATCCAGC CGAAAGAGGA GCCAGGGACT CAGGCCACCT CAGTCTACTC
61 ACGCTTGACAA CTGGAACTCG GCACCAATTG TAAACCACTC AGCTTCTCCG AGCTCACACC

(図 2 M)

FGF23 アミノ酸配列 (NP_065689) (配列番号: 35)

```

1 MIGARLRLNV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGGSSWGGLL HLYTATARNs YHLQIHKHNG
61 VDGAAPHOTIX SALMIRSED GFFVYDPLRQ RYRLCMLDRG NIFGSHSYDFF ENRCQHQTL
121 ENGYDVYDHSS QYHFLVLSGR AKRAFELPGMN PFPYSCFLRSN PNLISLHFV PTLPRHRTS
181 AEDDSERDPL NWLXPRARMT PAPASCSQL PSAEDNSPMA SDPLGVVRCC RVNTHHAGTG
241 PEGCFPAREFA I

```

EGF23(B179Q) 乙酰配列(配列番号:36)

ヒトベータクロトードメイン1(b-KL-D1)アミノ酸配列(配列番号: 37)

77 ydt fpknffwgq tgalyqvegs kkdgkgspsiw dhfihthln
121 vstngseds yiflfrtq ldfiqgysw fesirwpbf dgjtvwan glqysswllid
181 alvivnlept qdggqkqkq dndtqkqkq dndtqkqkq dndtqkqkq
241 tgnmhpqkq gqssqkqkq gqssqkqkq gqssqkqkq gqssqkqkq
301 schpribaff atnfmpqkqkq plntmavqmgwq amphidgdyq pgmkkifis vilipseaqk
361 hemeroffaff taitymshknl sqylqgqkq eirrfqytaw sldgfewqd ayirrqlfy
421 tsdrskrted taitymshknl sqylqgqkq eirrfqytaw sldgfewqd ayirrqlfy
481 vdfnskqkq kpksashknyk qzqifeng

上ベニタク吐キドメイン 2 (h-KI-D2) フィブロ酸配列 (配列番号: 38)

571 ldwasvlptg nlsavnrqal ryryrcvvsge lkigisamvt lyypthahlg lpelphadg
601 wlwpsttbfq qayqafqfe lgldvkwlwt inepnrlsdi ynzrgndtyg aahnlvhaha
661 lawlvdrtf xrosarcavsl alshadwra ntwashwra aerflfclo wfaefplvka
721

【 図 2 L 】

181 TCAAGGCTTG GGGTTCTTCGT CGTCTGCTGG CTTCCTCGG AGGCCCTGCG GGCAGCCGCG
182 ATCCGCSACAT CGAACCTGGC CTCTGCAACTG GGGCCGCAAC GGGCCGCG
301 ACAGATGAGC CCGCACGAGC AAAGCCGGCA CTGGAGATCA GGCGGGATGAG
361 GGCCCCTGCG AACAGACGGC AAAGCCAGTC CTGCAGCGCA AAAGCTTGA
421 ATTCAGATCGG FGGTAGCATG CCGATGAGCAGG TTGGCTTGGC
481 TATGGATCGC FCACATTGG CCCATGAGCAGG TTGGCTTGGC
541 GGATACATGG TTACAGATCGC GAGCCGGAC GGCTCCCTGGC
601 TCCCCCACAC CGAACCTGGC ACCGGAGAGA CGAACCTGGC
661 TCCCCCCCACAC TGCGGCTGGC GGGGGGGGGG GCGCCCGCGA
721 TGGCTGGCTGG GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GCGCCCGCGA
781 AGCCGAGGCC GGGGGGGGGG GGGGGGGGGG GCGCCCGCGA
841 TTTTTTTTTT TTCTTCTACTG GACATCTCTCC TTCTTTTTTTT TTTTTTTTTT
901 AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA

FGF21 アミノ酸配列 (NP_061986) (配列番号: 33)

1 MDSDETFGEH SGLWVSVLAC LLLGACQAHF IPDSSPLLQF CGQVQRQYLY TDDAQQTTEAH
61 LEIREDTGTVG GAADQFSPESL LQLKALRKPGV IQLIGVKTST FLCQRPDGAL YGSLHFDPPEA
121 CSFREDFGIV GMYNQYSEMAN GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLFLPGL PPALPEPPGI
181 QAPKQFDWGS SDPLSMVGFS QRSPFSYSA

FGF23 核酸配列 (NM_020638) (配列番号: 34)

【図2N】

781 dypaamreyi askhrqrgss salprlteae rrlkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrispt xlavipwgvx kllrwvrzny gdmdiyitas giddqaledd
901 rklygklyq lgevlkayil dkvrikgyya fklaeekskp rgfftsdfk akssiqfyn
961 visarcf

ベータクロト-細胞外ドメイン(シグナルペプチドを有さない)アミノ酸配列(配列番号:39)

シグナルペプチドを有さない **s**クロト-- **FGF23** アミノ酸配列 (シグナルペプチドを有さない)

(目次番号: 40)

51 PEAAGLFGQT FPDGFLWAVG SAAQYEGGW
 52 QKQKGASWTF DFTDTHPLHKA
 101 PGCSRNASLP LGPSPSLQPA TGIVASDYSN
 102 NFRNTDAEIL ELGVTHYRFS
 103 ISQWARYLVEG SAGVNENREGL EYCFRRRLER
 104 RFLGVQFVTT LYWWHLQLR
 201 QDQYGGWANR ALADHYRDEO EFLCHFFHG
 202 VKYWTIDMNG VVWAMHCVY
 203 GLPGRGPIRS PRLGYLGKNN LDDLAJHWKF
 204 LYNTSFRTPO GQGVSIALSLP
 301 HNWFRMTD HSIKCKCSSL DFLHAWKFPK
 302 FFLGDPCEYD GQGVSIALSLP
 401 DLELQHLSLW DFLGKQHDFYD
 402 MDCFGWHRVY FFLGDPCEYD
 403 DVQYTAWSL MDCFGWHRVY SIRGLRFYDV
 404 FFLGDPCEYD
 501 LERNGRPFLP ENQVLTTRKPS YCDEAUVGQI
 502 QVCDTFLLSQ FFLGDPCEYD
 503 VHHSKRLPKV ENQVLTTRKPS
 504 QVCDTFLLSQ FFLGDPCEYD
 601 LILPLGNQSO VNHTILYRQ CMEASLVRW
 602 ITPVVAWLQP MAPNQTSYSA
 603 LARQANENP YTLAFAAYA RCLFCRELGHN
 604 RFLGVQFVTT LYWWHLQLR
 701 HNLKALAHKA WHVYNGRFD AGWKNSIAL
 702 QWNRHMLQWQ FFLGDPCEYD
 703 PFLDGFQWL APEIFGSGD
 704 PFLDGFQWL
 705 PFLDGFQWL
 706 PFLDGFQWL
 707 PFLDGFQWL
 708 PFLDGFQWL
 709 PFLDGFQWL
 710 PFLDGFQWL
 711 HNLKALAHKA WHVYNGRFD AGWKNSIAL
 712 QWNRHMLQWQ FFLGDPCEYD
 713 PFLDGFQWL
 714 PFLDGFQWL
 715 PFLDGFQWL
 716 PFLDGFQWL
 717 PFLDGFQWL
 718 PFLDGFQWL
 719 PFLDGFQWL
 720 PFLDGFQWL
 721 PFLDGFQWL
 722 PFLDGFQWL
 723 PFLDGFQWL
 724 PFLDGFQWL
 725 PFLDGFQWL
 726 PFLDGFQWL
 727 PFLDGFQWL
 728 PFLDGFQWL
 729 PFLDGFQWL
 730 PFLDGFQWL
 731 PFLDGFQWL
 732 PFLDGFQWL
 733 PFLDGFQWL
 734 PFLDGFQWL
 735 PFLDGFQWL
 736 PFLDGFQWL
 737 PFLDGFQWL
 738 PFLDGFQWL
 739 PFLDGFQWL
 740 PFLDGFQWL
 741 PFLDGFQWL
 742 PFLDGFQWL
 743 PFLDGFQWL
 744 PFLDGFQWL
 745 PFLDGFQWL
 746 PFLDGFQWL
 747 PFLDGFQWL
 748 PFLDGFQWL
 749 PFLDGFQWL
 750 PFLDGFQWL
 751 PFLDGFQWL
 752 PFLDGFQWL
 753 PFLDGFQWL
 754 PFLDGFQWL
 755 PFLDGFQWL
 756 PFLDGFQWL
 757 PFLDGFQWL
 758 PFLDGFQWL
 759 PFLDGFQWL
 760 PFLDGFQWL
 761 PFLDGFQWL
 762 PFLDGFQWL
 763 PFLDGFQWL
 764 PFLDGFQWL
 765 PFLDGFQWL
 766 PFLDGFQWL
 767 PFLDGFQWL
 768 PFLDGFQWL
 769 PFLDGFQWL
 770 PFLDGFQWL
 771 PFLDGFQWL
 772 PFLDGFQWL
 773 PFLDGFQWL
 774 PFLDGFQWL
 775 PFLDGFQWL
 776 PFLDGFQWL
 777 PFLDGFQWL
 778 PFLDGFQWL
 779 PFLDGFQWL
 780 PFLDGFQWL
 781 PFLDGFQWL
 782 PFLDGFQWL
 783 PFLDGFQWL
 784 PFLDGFQWL
 785 PFLDGFQWL
 786 PFLDGFQWL
 787 PFLDGFQWL
 788 PFLDGFQWL
 789 PFLDGFQWL
 790 PFLDGFQWL
 791 PFLDGFQWL
 792 PFLDGFQWL
 793 PFLDGFQWL
 794 PFLDGFQWL
 795 PFLDGFQWL
 796 PFLDGFQWL
 797 PFLDGFQWL
 798 PFLDGFQWL
 799 PFLDGFQWL
 800 PFLDGFQWL
 801 PFLDGFQWL
 802 PFLDGFQWL
 803 PFLDGFQWL
 804 PFLDGFQWL
 805 PFLDGFQWL
 806 PFLDGFQWL
 807 PFLDGFQWL
 808 PFLDGFQWL
 809 PFLDGFQWL
 810 PFLDGFQWL
 811 PFLDGFQWL
 812 PFLDGFQWL
 813 PFLDGFQWL
 814 PFLDGFQWL
 815 PFLDGFQWL
 816 PFLDGFQWL
 817 PFLDGFQWL
 818 PFLDGFQWL
 819 PFLDGFQWL
 820 PFLDGFQWL
 821 PFLDGFQWL
 822 PFLDGFQWL
 823 PFLDGFQWL
 824 PFLDGFQWL
 825 PFLDGFQWL
 826 PFLDGFQWL
 827 PFLDGFQWL
 828 PFLDGFQWL
 829 PFLDGFQWL
 830 PFLDGFQWL
 831 PFLDGFQWL
 832 PFLDGFQWL
 833 PFLDGFQWL
 834 PFLDGFQWL
 835 PFLDGFQWL
 836 PFLDGFQWL
 837 PFLDGFQWL
 838 PFLDGFQWL
 839 PFLDGFQWL
 840 PFLDGFQWL
 841 PFLDGFQWL
 842 PFLDGFQWL
 843 PFLDGFQWL
 844 PFLDGFQWL
 845 PFLDGFQWL
 846 PFLDGFQWL
 847 PFLDGFQWL
 848 PFLDGFQWL
 849 PFLDGFQWL
 850 PFLDGFQWL
 851 PFLDGFQWL
 852 PFLDGFQWL
 853 PFLDGFQWL
 854 PFLDGFQWL
 855 PFLDGFQWL
 856 PFLDGFQWL
 857 PFLDGFQWL
 858 PFLDGFQWL
 859 PFLDGFQWL
 860 PFLDGFQWL
 861 PFLDGFQWL
 862 PFLDGFQWL
 863 PFLDGFQWL
 864 PFLDGFQWL
 865 PFLDGFQWL
 866 PFLDGFQWL
 867 PFLDGFQWL
 868 PFLDGFQWL
 869 PFLDGFQWL
 870 PFLDGFQWL
 871 PFLDGFQWL
 872 PFLDGFQWL
 873 PFLDGFQWL
 874 PFLDGFQWL
 875 PFLDGFQWL
 876 PFLDGFQWL
 877 PFLDGFQWL
 878 PFLDGFQWL
 879 PFLDGFQWL
 880 PFLDGFQWL
 881 PFLDGFQWL
 882 PFLDGFQWL
 883 PFLDGFQWL
 884 PFLDGFQWL
 885 PFLDGFQWL
 886 PFLDGFQWL
 887 PFLDGFQWL
 888 PFLDGFQWL
 889 PFLDGFQWL
 890 PFLDGFQWL
 891 PFLDGFQWL
 892 PFLDGFQWL
 893 PFLDGFQWL
 894 PFLDGFQWL
 895 PFLDGFQWL
 896 PFLDGFQWL
 897 PFLDGFQWL
 898 PFLDGFQWL
 899 PFLDGFQWL
 900 PFLDGFQWL
 901 PFLDGFQWL
 902 PFLDGFQWL
 903 PFLDGFQWL
 904 PFLDGFQWL
 905 PFLDGFQWL
 906 PFLDGFQWL
 907 PFLDGFQWL
 908 PFLDGFQWL
 909 PFLDGFQWL
 910 PFLDGFQWL
 911 PFLDGFQWL
 912 PFLDGFQWL
 913 PFLDGFQWL
 914 PFLDGFQWL
 915 PFLDGFQWL
 916 PFLDGFQWL
 917 PFLDGFQWL
 918 PFLDGFQWL
 919 PFLDGFQWL
 920 PFLDGFQWL
 921 PFLDGFQWL
 922 PFLDGFQWL
 923 PFLDGFQWL
 924 PFLDGFQWL
 925 PFLDGFQWL
 926 PFLDGFQWL
 927 PFLDGFQWL
 928 PFLDGFQWL
 929 PFLDGFQWL
 930 PFLDGFQWL
 931 PFLDGFQWL
 932 PFLDGFQWL
 933 PFLDGFQWL
 934 PFLDGFQWL
 935 PFLDGFQWL
 936 PFLDGFQWL
 937 PFLDGFQWL
 938 PFLDGFQWL
 939 PFLDGFQWL
 940 PFLDGFQWL
 941 PFLDGFQWL
 942 PFLDGFQWL
 943 PFLDGFQWL
 944 PFLDGFQWL
 945 PFLDGFQWL
 946 PFLDGFQWL
 947 PFLDGFQWL
 948 PFLDGFQWL
 949 PFLDGFQWL
 950 PFLDGFQWL
 951 PFLDGFQWL
 952 PFLDGFQWL
 953 PFLDGFQWL
 954 PFLDGFQWL
 955 PFLDGFQWL
 956 PFLDGFQWL
 957 PFLDGFQWL
 958 PFLDGFQWL
 959 PFLDGFQWL
 960 PFLDGFQWL
 961 PFLDGFQWL
 962 PFLDGFQWL
 963 PFLDGFQWL
 964 PFLDGFQWL
 965 PFLDGFQWL
 966 PFLDGFQWL
 967 PFLDGFQWL
 968 PFLDGFQWL
 969 PFLDGFQWL
 970 PFLDGFQWL
 971 PFLDGFQWL
 972 PFLDGFQWL
 973 PFLDGFQWL
 974 PFLDGFQWL
 975 PFLDGFQWL
 976 PFLDGFQWL
 977 PFLDGFQWL
 978 PFLDGFQWL
 979 PFLDGFQWL
 980 PFLDGFQWL
 981 PFLDGFQWL
 982 PFLDGFQWL
 983 PFLDGFQWL
 984 PFLDGFQWL
 985 PFLDGFQWL
 986 PFLDGFQWL
 987 PFLDGFQWL
 988 PFLDGFQWL
 989 PFLDGFQWL
 990 PFLDGFQWL
 991 PFLDGFQWL
 992 PFLDGFQWL
 993 PFLDGFQWL
 994 PFLDGFQWL
 995 PFLDGFQWL
 996 PFLDGFQWL
 997 PFLDGFQWL
 998 PFLDGFQWL
 999 PFLDGFQWL
 1000 PFLDGFQWL

【図2O】

シグナルペプチドを有さないsクロト-**-FGF23(R179Q)** (シグナルペプチドを有さないアミノ酸配列 (配列番号:41))

```

51 PEAAGLFFQGT FPDGFLLWAVG SAAVQTEGGW QHQHKGASIW DFTFHHLPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDYN NVERDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPGN SAGVPLMIGL RYVRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPLRL
201 QDAGYGGWANR ALADHPRDYA ELCFRHHFGQQ VKWITIDNE XVAVAHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGIVLVAHN LLAHAKVWH LYNTSKRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPGRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDPES MKNNLSSILP
351 DPTSEKKFL KTDADFFALC FGHTLSIFOL DPHMKFRQLE SPNLQLLSSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDRAY MYVLLKKFIME TLKAIAKLGDV
451 DVIGYTAWSL MDGEFMWHRG SIRRGCLPVDF FLSQDMVYLWD
501 IEKNGFPPLP ENQPECTPP CDFAMGVVUD YIQVQDTLSC FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLLKV DGVTTKKRKS YCVDFAAICP OIAALLOEMHV THFRESLDWA
601 LILPLGNQSO QNHITLQYR CMASELVRVN ITPVVVALWQF MAPNQGLPRL
651 LAROGAWENP YTALAFABEY RLCFCELGHH IJKLWITMNEE YTRNMITYSAG
701 HNLIKAHALA WHVYNEKFHM ACQNGKISIAL QADWIEPACF FSQDKDEVAE
751 RVLFEDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLQ RNNEFLLYFI EDEKKLIQGT
801 FDFFLALSHYT TILDVSEKED PIKYNDLQYR QEMTDITWLQ SPNLRQLLSSW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNG1DDGLA AEDDQLRVYY MQNYINELAK
901 AHILGCGNLK GYFAFYSNDR TAPREGLYRQ AADQFEPKAS MKHYRKII
951 NGFPGPETLE EFCPEEFTVC TCCSFHTRI SL

```

シグナルペプチドを有さない **FGF23 (SEQ ID NO:42)**

```

YPNAASP LLGSSWGGLLI HLYTATARNNS XHLOIHKHGH
61 VDGAPHOTY SALMIRSEDA GFVWITCVMS REYLCLMDPFG NIFGSHYDDP ENCPFEHQL
121 ENGYDGVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLGGMN PFPYISQFLSR RHEIPLIHFN TPIPRHTQS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCQSEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGCTG
241 PEGCRPPFAK I

```

シグナルペプチドを有さない **FGF23(R179Q) (SEQ ID NO:43)**

```

YPNAASP LLGSSWGGLLI HLYTATARNNS XHLOIHKHGH
61 VDGAPHOTY SALMIRSEDA GFVWITCVMS REYLCLMDPFG NIFGSHYDDP ENCPFEHQL
121 ENGYDGVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLGGMN PFPYISQFLSR RHEIPLIHFN TPIPRHTQS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCQSEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGCTG
241 PEGCRPPFAK I

```

【図2P】

クロト-シグナルペプチドを有するsクロト- (配列番号:44)

```

1 MPASAPPERRP RPPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFFQGT FPDPGFLLWAVG SAAVQTEGGW QHQHKGASIW DFTFHHLPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDYN NVERDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPGN SAGVPLMIGL RYVRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPLRL
201 QDAGYGGWANR ALADHPRDYA ELCFRHHFGQQ VKWITIDNE XVAVAHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGIVLVAHN LLAHAKVWH LYNTSKRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPGRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDPES MKNNLSSILP
351 DPTSEKKFL KTDADFFALC FGHTLSIFOL DPHMKFRQLE SPNLRLQQLSSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDRAY MYVLLKKFIME TLKAIAKLGDV
451 DVIGYTAWSL MDGEFMWHRG SIRRGCLPVDF FLSQDMVYLWD
501 IEKNGFPPLP ENQPECTPP CDFAMGVVUD YIQVQDTLSC FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLLKV DGVTTKKRKS YCVDFAAICP OIAALLOEMHV THFRESLDWA
601 LILPLGNQSO QNHITLQYR CMASELVRVN ITPVVVALWQF MAPNQGLPRL
651 LAROGAWENP YTALAFABEY RLCFCELGHH IJKLWITMNEE YTRNMITYSAG
701 HNLIKAHALA WHVYNEKFHM ACQNGKISIAL QADWIEPACF FSQDKDEVAE
751 RVLFEDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLQ RNNEFLLYFI EDEKKLIQGT
801 FDFFLALSHYT TILDVSEKED PIKYNDLQYR QEMTDITWLQ SPNLRQLLSSW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNG1DDGLA AEDDQLRVYY MQNYINELAK
901 AHILGCGNLK GYFAFYSNDR TAPREGLYRQ AADQFEPKAS MKHYRKII
951 NGFPGPETLE EFCPEEFTVC TCCSFHTRI SL

```

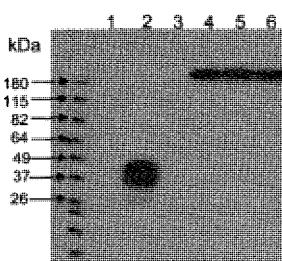
IgG シグナルペプチドを有するsクロト- (配列番号:45)

```

1 MSVLTQVLAL LLLWLTGLGG RRLRAEPGDG AQTWARFSRP PAPEAAGLFQ
51 GTFPDGFELWA VGSAAXYCTEG GWQHQHKGAS 1MDTFTHREL APPGDSRNAs
101 LPLGAPSLQ PATGDSWASL YYNVRDTEAS LRELGVTHYR FSISLWVLP
151 NGSCAVPNRPLQ PATGDSWASL YYNVRDTEAS LRELGVTHYR FSISLWVLP
151 NGSCAVPNRPLQ PATGDSWASL YYNVRDTEAS LRELGVTHYR FSISLWVLP
151 NGSCAVPNRPLQ PATGDSWASL YYNVRDTEAS LRELGVTHYR FSISLWVLP
201 NRALADHFRD YAEELCFRHFG GOVYKWTID NPVIVANHGY ATGRALAPGIR
251 GSFRGLYVLA HNLLLAHAKV WHLYNTSFRU TQGGQVSIAL SSHWINPWRM
301 TDHSIKECQI SLDPLVGLWPA KPFVFDGQY ESMKNNLSSI LPDFTESKEK
351 FIKGTADFFA LCGPPTLSPF LLDPHMKEFQ LESPNLRQLL SWIDLEFNHP
401 QFIVENGWV VSGTTKRDAA KYMYLLKKFI METLKAIAKL GDVIDVYGTAW
451 SLMIDGFEWHR GYSIRRGLFY VDFELSQDKML LPKSSALFYQ KLLIEKNGFPP
501 LPENQPLECT FPCDFAMGVV DNYIOVDTL SOFTDLNVYL WDWHHSKRLI
551 KVDGVTKKS KSYCVDFAAI QPQIALLQEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ
601 SQVNHTLQ YRCMASELVR VNITFVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAWE
651 NPYNTLALAFAR YARLCKFOELG HHVKLWITMA EPYTRNMITYS AGHNLKKAHA
701 LAWHVYNEKFH RHQANGKISI ALQADWIEPA CPFSQRDKEV AERVLEFDIG
751 WLAEPIFGSGD DYWPVMRDWL NQNRNNFLPYT FTEDDEKLLIQ GTFDFLALSH
801 YTTLILVDSK EDPIKYNDLQ EVQEMTDITW LNNSPSQAVVV FWGLRKVLNW
851 LKFKYGDLEM YIISNG1DDLG LHAEDDOLRV YYMONYINEA LKAHILDGIN
901 LCGYFAYSEN DRATPREGLY RYAADQFEPK ASMKHYRKII DSNGFPGPET
951 LERFCPEEFT VCTECSSFFTRI SL

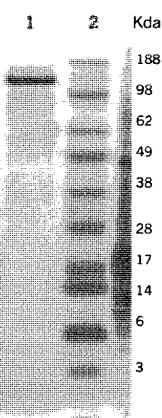
```

【図3A】



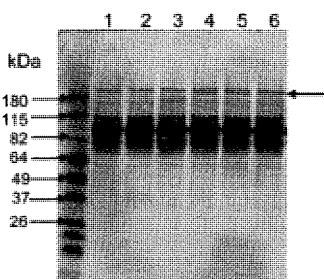
レーン1, Ctrl; レーン2, FGF23; レーン3, sクロト-; レーン4-6, sクロト- -FGF23

【図3C】



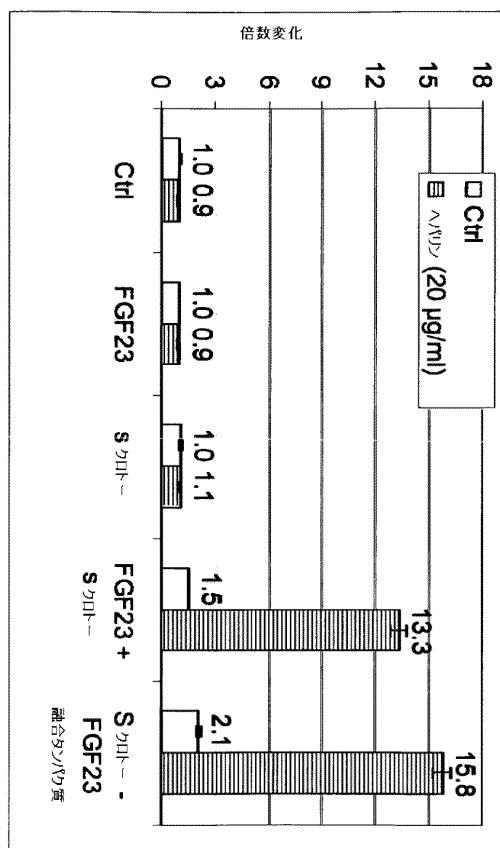
レーン1, 精製されたsクロト- -FGF23-6xHis;
レーン2, 分子量マーカー

【図3B】

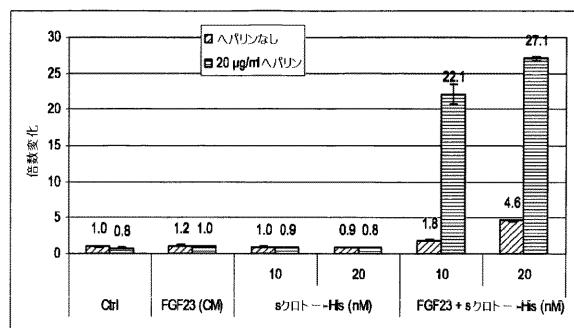


レーン1, Ctrl; レーン2, FGF23; レーン3, sクロト-; レーン4-6, sクロト- -FGF23

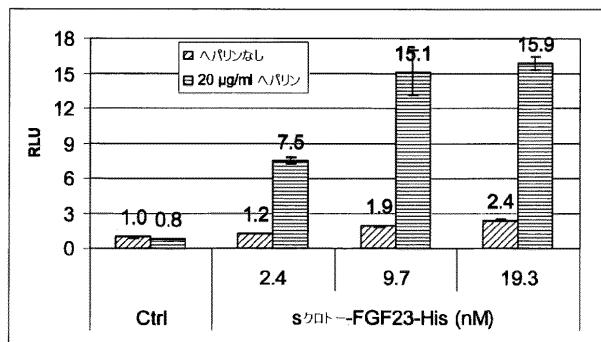
【図4】



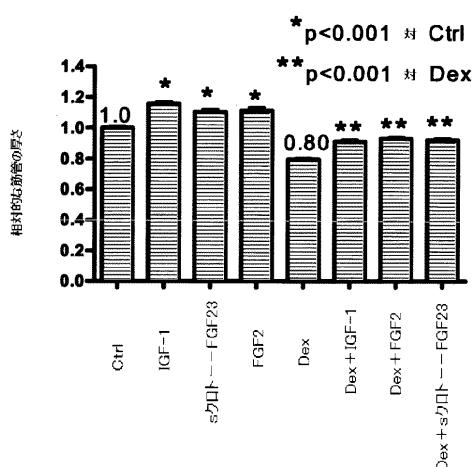
【図5 A】



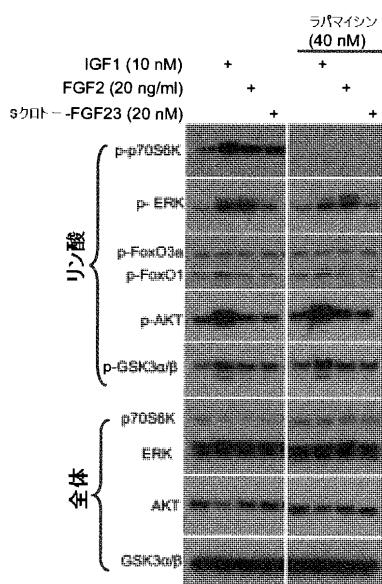
【図5 B】



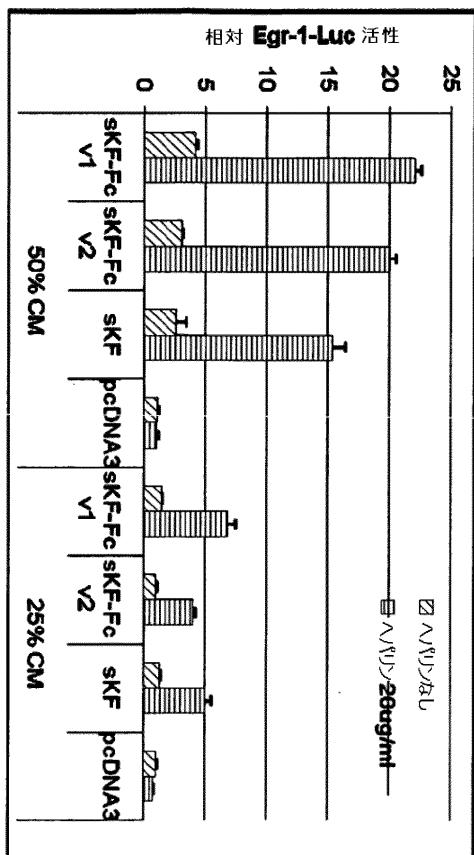
【図6 A】



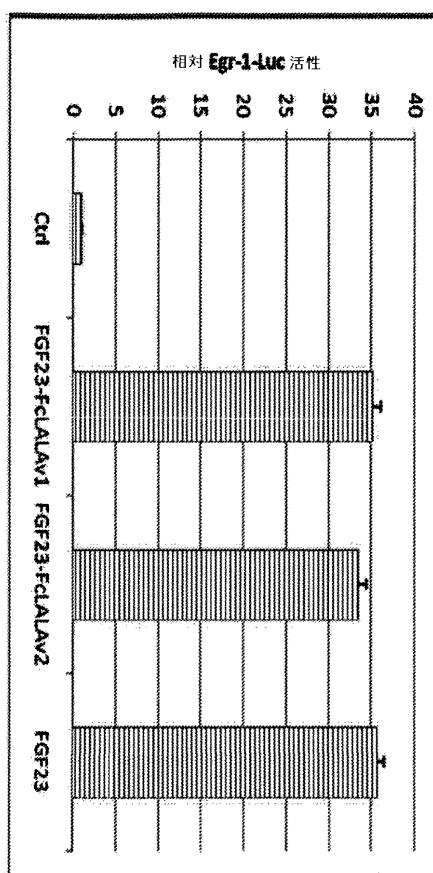
【図6 B】



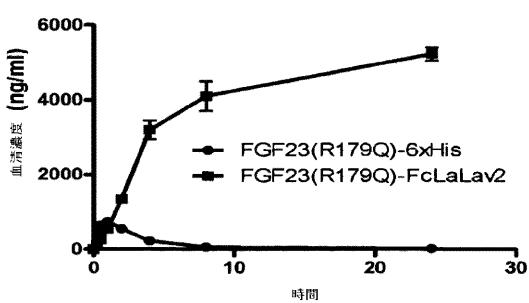
【図7】



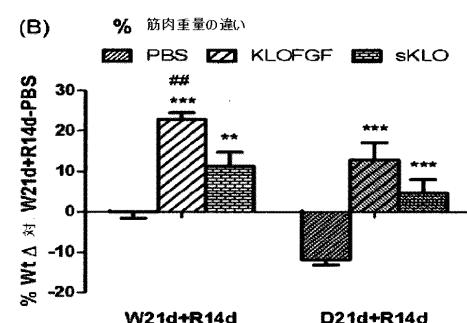
【図8】



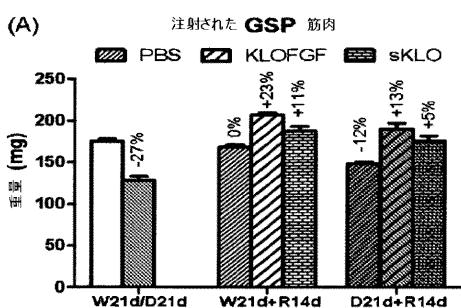
【図9】



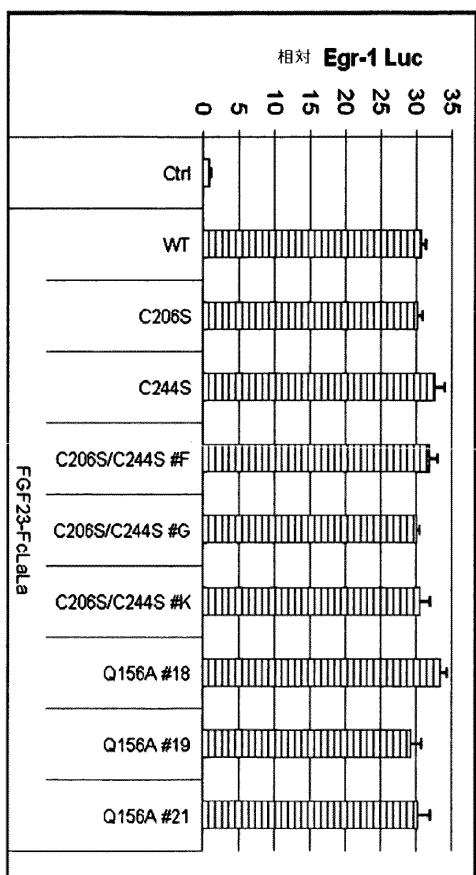
【図10B】



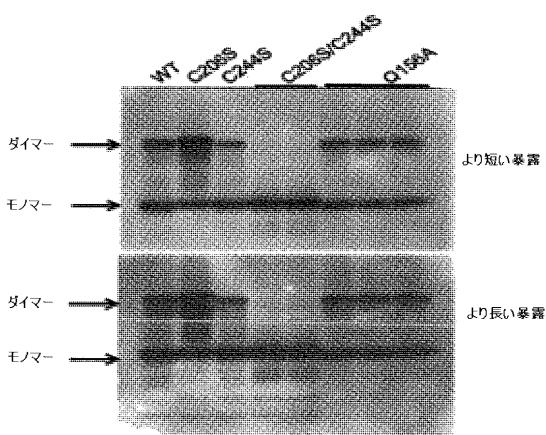
【図10A】



【図 1 1】



【図 1 2】



【配列表】

2016190847000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月20日(2016.5.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本明細書に記述された発明。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 9 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 9 9】

【表33】

451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

FGF23(R179Q, Q156A) – FcLALAv2のアミノ酸配列(配列番号:66)
 FGF23:1–251; リンカー:252–256; FcLALA:257–473

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
251 IGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

```

FGF23(R179Q, C206S, C244S) – FcLALAv2のアミノ酸配列(配列番号:67)
 FGF23:1–251; リンカー:252–256; FcLALA:257–473

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
251 IGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

```

FGF23(R179Q, C206S, C244S, Q156A) – FcLALAv2のアミノ酸配列(配列番号:68)
 FGF23:1–251; リンカー:252–256; FcLALA:257–473

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNS
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
251 IGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS

```

【表34】

451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

以下に、本願の当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[1]

(a) 線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしく

は誘導体を含むポリペプチドであって、F G F 2 3 が、Q 1 5 6 、C 2 0 6 およびC 2 4 4 の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したF c - ガンマ - 受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたF c フラグメント、またはクロトー(Klotho)タンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、融合ポリペプチド。

[2]

(a)のポリペプチドが、(b)のポリペプチドのN-末端に作動可能に連結している、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[3]

(b)のポリペプチドが、(a)のポリペプチドのN-末端に作動可能に連結している、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[4]

(a)のポリペプチドおよび(b)のポリペプチドが、ポリペプチドリンクにより連結している、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[5]

ポリペプチドリンクが、配列番号：1 1 、配列番号：1 2 、配列番号：1 3 、配列番号：1 4 、配列番号：1 5 、配列番号：1 6 、配列番号：1 7 および配列番号：1 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、[4]に記載の融合ポリペプチド。

[6]

ポリペプチドリンクが、配列番号：1 2 、配列番号：1 3 、配列番号：1 4 、配列番号：1 5 、配列番号：1 6 、配列番号：1 7 および配列番号：1 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列の少なくとも1、最大約30の繰り返しを含む、[4]に記載の融合ポリペプチド。

[7]

(a)のポリペプチドが、該ポリペプチドリンクのN-末端にペプチド結合により連結しており、(b)のポリペプチドが、該ポリペプチドリンクのC-末端にペプチド結合により連結している、[4]に記載の融合ポリペプチド。

[8]

(a)のポリペプチドが、該ポリペプチドリンクのC-末端にペプチド結合により連結しており、(b)のポリペプチドが、該ポリペプチドリンクのN-末端にペプチド結合により連結している、[4]に記載の融合ポリペプチド。

[9]

クロトータンパク質の細胞外サブドメインが、K L - D 1 ドメインまたはK L - D 2 ドメインである、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[10]

(a)のポリペプチドが、クロトータンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメインを含む、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[11]

クロトータンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメインが、タンデムリピートにおける少なくとも2つのK L - D 1 ドメインである、[10]に記載の融合ポリペプチド。

[12]

クロトータンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメインが、タンデムリピートにおける少なくとも2つのK L - D 2 ドメインである、[10]に記載の融合ポリペプチド。

[13]

クロトータンパク質の少なくとも2つの細胞外サブドメインが、K L - D 1 ドメインおよびK L - D 2 ドメインを含む、[10]に記載の融合ポリペプチド。

[14]

(a)のポリペプチドが、クロトータンパク質の細胞外ドメインである、[1]に記載の融合ポリペプチド

[1 5]

シグナルペプチドをさらに含む、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[1 6]

シグナルペプチドがクロトーシグナルペプチドである、[1 5]に記載の融合ポリペプチド。

[1 7]

シグナルペプチドが I g G シグナルペプチドである、[1 5]に記載の融合ポリペプチド。

[1 8]

線維芽細胞増殖因子受容体に特異的に結合する、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[1 9]

クロトータンパク質がアルファ - クロト - である、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[2 0]

クロトータンパク質がベータ - クロト - である、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[2 1]

線維芽細胞増殖因子が、線維芽細胞増殖因子 - 2 3 (F G F 2 3) または線維芽細胞増殖因子 - 2 3 变異体 (R 1 7 9 Q) である、[1 9]に記載の融合ポリペプチド。

[2 2]

線維芽細胞増殖因子が、線維芽細胞増殖因子 - 1 9 または線維芽細胞増殖因子 - 2 1 である、[2 0]に記載の融合ポリペプチド。

[2 3]

配列番号 : 5 4 、 5 5 、 5 6 、 5 7 、 5 8 、 5 9 、 6 0 、 6 1 、 6 2 、 6 3 、 6 4 、 6 5 、 6 6 、 6 7 または 6 8 のアミノ酸配列と 9 5 % 以上同一であるアミノ酸配列を含む、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[2 4]

配列番号 : 5 8 または配列番号 : 6 8 のアミノ酸配列を有する、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[2 5]

F c L A L A を含む、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[2 6]

[1]に記載の融合ポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

[2 7]

[1]に記載の融合ポリペプチドをコードする配列を含む核酸。

[2 8]

[2 7]に記載の核酸を含む宿主細胞。

[2 9]

[2 7]に記載の核酸を含むベクター。

[3 0]

(a) 線維芽細胞増殖因子 2 3 (F G F 2 3) またはその機能的に活性な变異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、F G F 2 3 が、Q 1 5 6 、 C 2 0 6 および C 2 4 4 の 1 つ以上の位置で变異を有するポリペプチド、および (b) 減少した F c - ガンマ - 受容体に対する亲和性および / もしくは增加した血清半減期を有する修飾された F c フラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも 1 つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な变異体もしくは誘導体、および、所望により (c) リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における加齢関連状態を処置または予防するための方法。

[3 1]

加齢関連状態が、サルコペニア、皮膚萎縮、筋肉疲労、脳萎縮、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、肺気腫、骨粗鬆症、骨関節症、免疫不全、高血圧、認知症、ハンチント

ン病、アルツハイマー病、白内障、加齢黄斑変性症、前立腺癌、卒中、期待寿命の低下(diminished life expectancy)、記憶障害、しわ、腎機能障害および加齢性難聴からなる群から選択される、[30]に記載の方法。

[32]

クロトータンパク質がアルファクロトータンパク質である、[30]に記載の方法。

[33]

加齢関連状態が筋肉疲労であり、クロトータンパク質がアルファクロトータンパク質であり、線維芽細胞増殖因子が線維芽細胞増殖因子23である、[31]に記載の方法。

[34]

(a) 線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における代謝障害を処置または予防するための方法。

[35]

代謝障害が、I型糖尿病、メタボリック・シンドローム、高血糖および肥満からなる群から選択される、[34]に記載の方法。

[36]

融合ポリペプチドが、(a)ベータ-クロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチド、および(b)線維芽細胞増殖因子21を含むポリペプチドを含む、[34]に記載の方法。

[37]

(a) 線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における高リン血症または石灰沈着症を処置または予防するための方法。

[38]

融合ポリペプチドが、(a)アルファクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチド、および(b)線維芽細胞増殖因子23を含むポリペプチドを含む、[37]に記載の方法。

[39]

(a) 線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における慢性腎臓疾患または慢性腎不全を処置または予防するための方法。

[40]

クロトータンパク質がアルファクロトータンパク質である、[39]に記載の方法。

[41]

(a) 線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、融合ポリペプチドを含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む、個体における癌を処置または予防するための方法。

[42]

癌が乳癌である、[41]に記載の方法。

[43]

クロトータンパク質がアルファクロトータンパク質である、[41]に記載の方法。

[44]

クロトータンパク質がヒトクロトータンパク質である、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[45]

筋萎縮の処置または予防における使用のための、[1]に記載の融合ポリペプチド。

[46]

配列番号：47または配列番号：49の可溶性クロトー融合タンパク質を含む治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む（本質的にからなる、またはからなる）、筋萎縮を処置または予防する方法。

[47]

(a) 線維芽細胞増殖因子23(FGF23)またはその機能的に活性な変異体もしくは誘導体を含むポリペプチドであって、FGF23が、Q156、C206およびC244の1つ以上の位置で変異を有するポリペプチド、および(b)減少したFc-ガンマ-受容体に対する親和性および/もしくは増加した血清半減期を有する修飾されたFcフラグメント、またはクロトータンパク質の少なくとも1つの細胞外サブドメインを含むポリペプチドのいずれか、またはそれらの機能的に活性な変異体もしくは誘導体、および、所望により(c)リンカーを含む、治療有効用量の医薬組成物を必要とする個体に投与することを含む（本質的にからなる、またはからなる）、筋萎縮を処置または予防する方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/10 1 0 1
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/10
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/16
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
			A 6 1 P	37/02

(72)発明者 デイビッド・グラス

アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア100番、
ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ショウ - イー・フ

アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア100番、
ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72 AA90X AA93Y BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA02 AA07 BA44 CA18 DB54 NA14 ZA152 ZA162 ZA222 ZA332

ZA342 ZA362 ZA422 ZA452 ZA592 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZA972

ZB072 ZB262 ZC352

4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA40 DA01 DA76 EA20 EA28 FA74

【外国語明細書】

2016190847000001.pdf