

(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.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/50 (2006.01)	C 0 7 K 14/50	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

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)	(71) 出願人	504389991
(22) 出願日	平成28年4月25日 (2016.4.25)		ノバルティス アーゲー
(62) 分割の表示	特願2012-550437 (P2012-550437) の分割		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセル 35
原出願日	平成23年1月27日 (2011.1.27)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	12/696,693		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成22年1月29日 (2010.1.29)	(74) 代理人	100095360
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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、またはクロトール (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、ポリペプチドリンカー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】

ポリペプチドリンカーが、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】

ポリペプチドリンカーが、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カーの 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カーの 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カーの 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カーの 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】

クロトール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、クロトール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】

クロトール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】

クロトール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－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１７】

シグナルペプチドがＩｇＧ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－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－である、請求項１に記載の融合ポリペプチド。

【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。

【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。

【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

10

20

30

40

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 (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、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 (FGF 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、FGF 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 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。

【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 (FGF 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、FGF 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 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。

【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 (FGF 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、FGF 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 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

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-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し、およびEgr-1(初期増殖応答-1)を活性化し、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性を共有している。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-ora 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(Kurosura 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(Shimadara J. Clin. Invest. 113:561-568 (2004); Yoshidara 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(Urakawara 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、FGF19およびFGF21の必須のパートナーである(Ogawara 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。F G F 1 9 とともにベータ - クロトーは、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)。

【 0 0 0 9 】

米国特許第 6 , 5 7 9 , 8 5 0 号は、アルファ - クロトー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。

【 0 0 1 0 】

米国特許第 7 , 2 2 3 , 5 6 3 号は、F G F 2 3 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。

【 0 0 1 1 】

米国特許第 7 , 2 5 9 , 2 4 8 号は、F G F 2 1 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。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 2 】

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、F G F (例えば、F G F 2 3)、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) および / または F c フラグメント (例えば、F c L A L A) 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、F G F 2 3 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、クロトーポリペプチド、F G F (例えば、F G F 2 3) および修飾された F c フラグメントを含む。F c フラグメントは、例えば、減少した F c - 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、F G F 2 3 および F c L A L A (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) を含む融合タンパク質は、配列番号 4 6、4 7、4 8 および 4 9 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、F G F (例えば、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 (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 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。F G F 2 3 および F c L A L A を含む融合タンパク質は、配列番号 5 0、5 1、5 2 および 5 3 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 F G F 2 3 において 1 つ以上の変異を有する。

【 0 0 1 3 】

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 F c - ガンマ - 受容体に対する親和性 (例えば、減少した K a または増加した K d) および / また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。クロトー細胞外ドメインは、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、クロトー融合ポリペプチドの F G F 成分は、線維芽細胞増殖因子 - 1 9、線維

10

20

30

40

50

芽細胞増殖因子 - 2 1 および線維芽細胞増殖因子 - 2 3 に関して主に記載されているが、任意の 2 3 個の既知の F G F を本明細書の実施において使用することができると考慮される。本出願の読者は、それぞれのヒト F G F 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。

【 0 0 1 4 】

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 K L - D 1 および K L - D 2 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 K L - D 1 ドメイン、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、または少なくとも 1 つの K L - D 1 ドメインおよび少なくとも 1 つの K L - D 2 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 2 8 - 2 9 2 またはアミノ酸 2 8 - 9 8 2（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 5 2 - 9 9 7 を含む。

10

20

【 0 0 1 5 】

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 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（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、 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（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ション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： 1 1、 1 2、 1 3、 1 4、 1 5、 1 6、 1 7 および 1 8 である。このようなリンカーは、少なくとも 1 個、最大約 3 0 個の繰り返しの配列番号： 1 1、 1 2、 1 3、 1 4、 1 5、 1 6、 1 7 および 1 8 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 ） F G F またはその活性なフラグメントおよび（ 3 ）修飾された F c 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。

30

40

【 0 0 1 6 】

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 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（任意の）修飾された F c 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。

【 0 0 1 7 】

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

20

30

40

50

【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。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。

【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。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。

【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（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）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（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。

10

20

【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、グリコシル化される。

30

40

【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

50

されたFcフラグメントをさらに含む。

【0024】

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。

【0025】

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、FGF23）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クロトー（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、FcLALA）を含む融合ポリペプチドであって、FGF（例えば、FGF23）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FGF23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FGF23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FGF23変異を含む融合タンパク質は、グリコシル化される。

【0026】

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）、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）、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

10

20

30

40

50

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。

【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。別の態様において、本明細書は、配列番号: 41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。

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

【 0 0 4 0 】

10

【 0 0 4 1 】

20

【 0 0 4 2 】

20

【 0 0 4 3 】

【 0 0 4 4 】

30

【 0 0 4 5 】

【 0 0 4 6 】

40

【 0 0 4 7 】

【 0 0 4 8 】

50

8 %、少なくとも 99 % または 100 % 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 100 % 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 100 % 同一である融合ポリペプチドを提供する。

【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 クロトーを含む融合ポリペプチドを提供する。

【0052】

本明細書は、本明細書に記載されているクロトー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。

【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融合ポリペプチドを含む治療有効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）を有する治療有効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。

【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

10

20

30

40

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21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。

【0056】

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。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ー融合ポリペプチドを含む薬理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23を有する本明細書の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。

10

【0057】

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ー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

【0058】

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ー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

【0059】

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

【0060】

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。

【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。

【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。

【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inker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inker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inker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inker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融合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つ以上のクロトー細胞外サブドメインを含む。1つ以上のクロトー細胞外サブドメインを含むポリペプチドは、例えば、クロトーの細胞外ドメイン（例えば、ヒトクロトーのアミノ酸1から982）またはクロトー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融合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中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（20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の存在または非存在下で、クロトー融チドのみ、および可溶性クロトーポリペプチドと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融

【図5B】図5Bは、sクロトー - FGF23 - His融合物（0 nM、0.6 nM、1.21 nM、2.41 nM、4.83 nM、9.65 nMおよび19.3 nM）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クロトー融合ポ

【図6B】図6Bは、ラパマイシン（40 nM）の存在または非存在下で、IGF - 1（10 nM）、FGF2（20 ng/ml）、または精製されたクロトー融合ポリペプチド（20 nM）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。

30

【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 - luc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 - luc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】

40

【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 - FGF23融合物のインビボ有効性を示す。

【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 - luc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、FGF23）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、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-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。

【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。

30

【0082】

定義

本明細書において使用される「クロトーポリペプチド」、「クロトータンパク質」または「クロトー」は、野生型「クロトー」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ポリペプチドは、アルファ-クロトー（配列番号：2）およびベータ-クロトー（配列番号：4）を含む。アルファ-クロトーおよびベータ-クロトー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せる）において記載されているものを含む。クロトーポリペプチドは、マウス（NP_03

40

50

8 8 5 1)、ラット(NP__1 1 2 6 2 6)、ウサギ(NP__0 0 1 0 7 5 6 9 2)のアルファ-クロトーおよびマウス(NP__1 1 2 4 5 7)のベータ-クロトーを含むヒト以外の他の種のものを含む。アルファ-クロトーを有することが予測される種は、チンパンジー(XP__5 2 2 6 5 5)、マカク(XP__0 0 1 1 0 1 1 2 7)、ウマ(XP__0 0 1 4 9 5 6 6 2)、ウシ(XP__0 0 1 2 5 2 5 0 0)、カモノハシ(XP__0 0 1 5 1 0 9 8 1)およびニワトリ(XP__4 1 7 1 0 5)を含む。ベータ-クロトーを有することが予測される種は、チンパンジー(XP__5 2 6 5 5 0)、マカク(XP__0 0 1 0 9 1 4 1 3)、ウマ(XP__0 0 1 4 9 5 2 4 8)、イヌ(XP__5 3 6 2 5 7)、ラット(XP__0 0 1 0 7 8 1 7 8)、カモノハシ(XP__0 0 1 5 1 2 7 2 2)およびニワトリ(XP__4 2 3 2 2 4)を含む。クロトーポリペプチドは、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。

【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「クロトー融合ポリペプチド」は、クロトー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、クロトー(例えば、sクロトー)、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。Hessellら 2007 Nature 449:101-104。

【0084】

「繊維芽細胞増殖因子」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、繊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繊維芽細胞増殖因子は、繊維芽細胞増殖因子-19(FGF19;配列番号:31)、繊維芽細胞増殖因子-21(FGF21;配列番号:33)および繊維芽細胞増殖因子-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

10

20

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。

【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得るフランキ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）。

【0087】

本明細書において使用される「繊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繊維芽細胞増殖因子受容体は、繊維芽細胞増殖因子受容体 - 19（例えば、FGFR4 - ベータクロトー）、繊維芽細胞増殖因子受容体 - 21（例えば、FGFR1c - アルファクロトー）および繊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、繊維芽細胞増殖因子に結合することができる、および / または繊維芽細胞増殖因子に結合することにより繊維芽細胞増殖因子が繊維芽細胞増

10

20

30

40

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ポリペプチドの細胞外ドメインを示す。クロトー細胞外ドメインは、全長アルファクロトー配列（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配列（配列番号：4）のアミノ酸残基52 - 997に対応する。

【0089】

「クロトータンパク質の細胞外サブドメイン」は、繊維芽細胞増殖因子を結合することができる、および/または繊維芽細胞増殖因子への結合により繊維芽細胞増殖因子の繊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、クロトーポリペプチドの細胞外ドメインの領域を示す。種々の態様において、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含むポリペプチド、繊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。クロトー細胞外ドメインは、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、それぞれ、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。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ポリペプチドである。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細胞外サブドメインは、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またはベータクロトーKL - D1ドメインであり得る。さらに、クロトーKL - D1ドメインは、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。クロトー細胞外サブドメインは、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ポリペプチドKL - D2ドメインであり得る。さらなる態様において、KL - D2ドメインは、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、クロトータ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およびヒン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 - 融合タンバ

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】

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 のペプチドを産生する。

【0092】

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に、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、クロトーの細胞外ドメインおよび繊維芽細胞増殖因子-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。

【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な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。

【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、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】

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

10

20

30

40

50

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繊維芽細胞増殖因子 - 23 の変異体の例は、繊維芽細胞増殖因子 - 23 変異体（R 1 7 9 Q）である。

【 0 0 9 6 】

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

【 0 0 9 7 】

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。

【 0 0 9 8 】

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

【 0 0 9 9 】

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

【 0 1 0 0 】

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。

【 0 1 0 1 】

40

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。

【 0 1 0 2 】

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。本明細書に関連する代謝障害は、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融合ポリペプチドまたはsクロトーの量である。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「クロトー核酸分子」は、クロトータンパク質をコードする遺伝子である。例のヒトクロトー遺伝子は、GenBank受入番号NM_004795（配列番号：1）で提供される。クロトー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。

【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が由来であり得る。さらに、クロトー融合ポリペプチドのFGF成分は繊維芽細胞増殖因子-19、繊維芽細胞増殖因子-21お

40

50

よび繊維芽細胞増殖因子 - 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繊維芽細胞増殖因子（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繊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、あるいは繊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。

20

30

【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繊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

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inkerが本明細書のクロトー融合ポリペプチドに存在するとき、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は、ポリペプチドリinker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てもよい。あるいは、FGFは、ポリペプチドリinkerのC-末端にペプチド結合により接続されている、クロトーの少なくとも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てもよい。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】

本明細書のクロトー融合ポリペプチドはシグナルペプチドを含み得る。クロトー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、クロトーシグナルペプチド（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、FcLALA）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. クロトーおよび繊維芽細胞増殖因子ポリペプチド

本明細書のクロトー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、それぞれアクセッションナンバー：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、それぞれアクセッションナンバー：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

40

【0117】

クロトータンパク質は、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。クロトー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-クロトーおよびベータ-クロトーの核酸配列（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、それぞれアクセッションナンバー：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-クロトーおよびベータ-クロトーのアミノ酸配列（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、それぞれアクセッションナンバー：NP_004786およびNP_783864の下に見出すことができる。

50

【 0 1 1 8 】

本明細書のクロトー融合ポリペプチドは、繊維芽細胞増殖因子受容体に結合することができ、繊維芽細胞増殖因子 - 1 9 (配列番号 : 3 1)、繊維芽細胞増殖因子 - 2 1 (配列番号 : 3 3)、繊維芽細胞増殖因子 - 2 3 (配列番号 : 3 5) またはそれらの変異体 (繊維芽細胞増殖因子 - 2 3 変異体 (R 1 7 9 Q) (配列番号 : 3 6) を含む) のいずれかに作動可能に連結しているアルファ - クロトーまたはベータ - クロトー細胞外ドメインを有する。

【 0 1 1 9 】

具体的には、本明細書のクロトー融合ポリペプチドは、繊維芽細胞増殖因子 - 2 3 (配列番号 : 3 5) または繊維芽細胞増殖因子 - 2 3 変異体 (R 1 7 9 Q) (配列番号 : 3 6) に作動可能に連結しているアルファ - クロトー (配列番号 : 2) を含み得る。さらに、本明細書のクロトー融合ポリペプチドは、繊維芽細胞増殖因子 - 1 9 (配列番号 : 3 1) に作動可能に連結しているベータ - クロトー (配列番号 : 4) を有し得る。本明細書のクロトー融合ポリペプチドは、繊維芽細胞増殖因子 - 2 1 (配列番号 : 3 3) に作動可能に連結しているベータ - クロトー (配列番号 : 4) を含み得る。

【 0 1 2 0 】

本明細書は、種々のクロトーおよび F G F 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、クロトーおよび F G F 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。

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。

【 0 1 2 1 】

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。

【 0 1 2 2 】

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 B L A S T プログラムが使用され得る。

【 0 1 2 3 】

1 つの態様において、本明細書は、配列番号 : 1 9 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 : 2 0 の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：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。
 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。

10

【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。
 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。
 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。

20

30

【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。
 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。

40

【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

50

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。

【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、ストリンジェント条件下で、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「ストリンジェント条件下で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ェ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ェ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45℃でハイブリダイゼーション、次に0.2×SSC、0.1%のSDS中で50-65℃での1回以上の洗浄である。

40

【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、クロトー融合ポリペプチドは、クロトーポリペプチドの第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細胞外ドメインを有するクロトー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細胞外ドメインの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、クロトー細胞外ドメインの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細胞外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、クロトーをコードする核酸分子は、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

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Fc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スフェクトする。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。

【0136】

本明細書の融合タンパク質を製造するとき、クロト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FGFをコードする核酸分子および修飾されたFc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、FGFポリペプチドに関してN-末端で融合しているクロトーの細胞外サブドメインを生じる。融合物は、クロトーの細胞外サブドメインがFGF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

【0137】

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FGF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、修飾されたFcフラグメントに融合したFGFを含む。本明細書の融合ポリペプチドのクロトーおよび/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。これらの方法は化学的および組換え方法両方を含む。

20

【0138】

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-クロトーまたはベータ-クロトーをコードする核酸配列が使用され得る。クロト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: 30、配列番号: 32 および配列番号: 34 それぞれにより示されているFGF19、FGF21またはFGF23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: 30、配列番号: 32 または配列番号: 34 とハイブリダイズするか、または少なくとも約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含む。

30

【0139】

融合物の種々の成分[クロトーおよび/またはFGFペプチドおよび/または(任意の)修飾されたFc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cDNAおよびゲノムDNAライブラリ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増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鋳型を使用してクロトーおよびFGF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。クロトーまたはFGF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

【0140】

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

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ー、例えば、ポリグリシンリンカー、または炭水化物リンカー、脂質リンカー、脂肪酸リンカー、ポリエーテルリンカーを含む別のタイプの化学リンカー、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ーに組み込まれ、リンカーによる重要な二次構造成分の構成を妨げる。リンカーは、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ーは当業者に既知である。

10

20

30

40

50

【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、ペプチドリリンカーを介して連結されていてもよい。例のペプチドリリンカー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、ペプチドリリンカーは、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リンカーは、フレキシブルなヒンジとして作用し得る。

【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。

【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。

【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ィド残基と結合することができるポリエチレングリコール（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期待される。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

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がある。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より長い、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。

【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NB L A S TおよびXB L A S Tプログラムに組み込まれる。B L A S Tヌクレオチド検索は、NB L A S Tプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12で行われる。B L A S Tタンパク質検索は、XB L A S T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 B L A S T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。B L A S TおよびGapped B L A S T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、XB L A S TおよびNB L A S T)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の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

10

20

30

40

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。

10

【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。

20

【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))。

30

【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産生は、当業者により成し遂げることができる。

40

【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。

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ず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、ウシバピローマ・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、または共トランスフェクション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、トランスフェクション、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、DHFR - 欠損 CHO 細胞におけるジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 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増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

40

【 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使用され得るさらなる精製方法は、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ク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

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F G F 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F G F 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F G F 受容体への結合をアッセイすることを含む。F G F 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、F G F 受容体結合は、F G F 受容体を発現する細胞を標識F G F（例えば、放射性標識）と接触させ、非標識クロトー - F G F 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F G F 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F G F の量の減少は、受容体へのクロトー - F G F 融合ポリペプチドの結合を示す。あるいは、クロトー - F G F 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もよい。

10

【0168】

クロトーまたはF G F 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 - F G F 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、F G F 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E g r - 1 活性化、C 2 C 1 2 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、F G F R、F R S 2、E R K 1 / 2、p 7 0 S 6 K 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

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ボ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もよい。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。

30

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）の形態であっ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、組成物是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

40

【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。

【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効である予防および/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経路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な必要としない (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, 1984, 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た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., Mc-Graw-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繊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的有効用量のヘパリンと共投与される。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繊維芽細胞増殖因子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。

【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繊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的有効用量のヘパリンと共投与される。該方法は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繊維芽細胞増殖因子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、繊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的有効用量のヘパリンと共投与される。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繊維芽細胞増殖因子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】

10

20

30

40

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、繊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、繊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。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、クロトー融合ポリペプチドは薬理学的有効用量のヘパリンと共投与される。いくつかの態様において、アルファクロトータン

20

【0197】

クロトー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繊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繊維芽細胞増殖因子21を含む。

【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。

30

【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。

40

【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

【0201】

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。

【0202】

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- α -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。胆汁酸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

【0203】

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、繊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、繊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

【0204】

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、繊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

【0205】

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、繊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

【0206】

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、霊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】

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、脱神経、廃用性萎縮、代謝障害（例えば、肥満および／または糖尿病動物、例えば、db/dbマウスおよびob/ob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、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】

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、F344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、F344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】

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、F344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】

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SH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】

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

10

20

30

40

50

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、他のインビボ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可能である。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。

【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・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

40

50

、霊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しれないが、それらはクロトー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。WO 01/12851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-誘導マウスモデル 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霊長類(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)、ズッカー糖尿病肥満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 Diabetis, 50:11

50

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 (KR - IGF - IR) 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)) におけるピ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 (STZ) - 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 (pmn) 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 FGF 23 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 (Giovanello 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を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を有するか、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)。クレアチンキナーゼの放出 (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。1 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、膵臓 -

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应答しない「インスリン抵抗性」(米国特許第 5 , 2 6 6 , 5 6 1 号および米国特許第 6 , 5 1 8 , 0 6 9 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 , 2 6 6 , 5 6 1 号) 。例の I I 型糖尿病の症状は、空腹時の高血糖 (米国特許第 5 , 2 6 6 , 5 6 1 号) 、疲労、過度の口渇、頻尿、視力障害および感染率の増加を含む。I I 型糖尿病の指標は膵島のアミロイド沈着を含む。

【 0 2 3 0 】

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 2 0 0 3 0 0 1 3 7 7 1 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ご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 2 0 0 3 0 0 1 3 7 7 1 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 2 0 0 3 0 0 1 3 7 7 1 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。

10

【 0 2 3 1 】

アルツハイマー病

クロトール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 (A D) 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。A D 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、8 - アミロイド前駆タンパク質 (A P P としても既知) の分解産物であるアミロイドペプチド (A p または A p 4 2 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、t a u t 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 Karlawish, Ann. Intern. Med. 138(5):400-410 (2003)) 。例えば、p - アミロイドは培養されたニューロンにおいてカスパーゼ - 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 viva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。

20

30

【 0 2 3 2 】

遺伝学、生化学、生理学および認知基準を含む種々の基準を、対象における A D を評価するために使用することができる。A D の症状および診断は医師に知られている。A D 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 A D 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、「A D 関連パラメーター」として使用することができる。A D 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。A D - 関連パラメーターは、対象が A D と診断されないか、または A D 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 A D の典型ではない認知試験結果、または A D と関連しない遺伝的な A P O E 多型を含む。

40

【 0 2 3 3 】

進行性の認知機能障害は A D 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.

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こす。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 (Ertekein-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。一般的なアプライスのために、例えば、Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd 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、ウエスタンブ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. Biochem. 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 7 7 3 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こす状態において、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こす。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

クロトー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、筋硬直および振戦を含む。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)）。

【0239】

ハンチントン病

クロトー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ー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、霊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): 239-251 (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. 15, 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。ハンチンチン（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チンタンパク質は、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、静止振戦、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カー）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・ヒトハンチンチンタ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 187: 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

【 0 2 4 2 】

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チンタ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チンタンパク質、その一部、またはヒトハンチンチンタ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 - ハンチンチン抗体で染色し、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 - ハンチンチン抗体はマウス抗 - 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

【 0 2 4 3 】

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

【 0 2 4 4 】

例の運動評価は、追跡眼球運動、サッカーボール開始、サッカーボール速度、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。

【 0 2 4 5 】

40

癌

クロトー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、急性骨髄性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病）、真性赤血球増加症、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

ndotheliosarcoma)、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、膵臓癌、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、嚢胞腺癌、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。

【実施例】

【0247】

5. 実施例

実施例1. クロトー融合ポリペプチドの発現および精製

クロトー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ーの細胞外ドメインおよびFGF23(R179Q)変異体を有する、クロトー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、クロトー、FGF23およびクロトー-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DMEMプラス1%のFBSで置き換えた。条件培地を、3mlのDMEMプラス1%のFBSの添加72時間後に回収した。種々の一時的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、ウエスタンブ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)。

【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クロトー;レーン4-6、sクロトー-FGF23)。クマシーブルー染色は、クロトー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、 $>180\text{ kDa}$ 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ー融合ポリペプチドの質をウエスタンブ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、ウエスタンブロットによるクロトー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。クマシー染色ゲルにおいて観察されたさらなるバンドがクロトー融合ポリペプチドであることをウエスタンブロットで確認した。クロトー融合ポリペプチドがクロトー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ブロットで確認した。この分析はクロトー-FGF23(R179Q)融合タンパク質の発現を示す。

【0249】

クロトー融合ポリペプチドの精製

本明細書のポリペプチドを、アルファクロトーの細胞外ドメインおよびFGF23 R179Q変異体を有するクロトー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クロトー-FGF23-6xHis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

/mlで464ml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(18mlの2μg/mlのポリエチレンジイミン(PEI)と混合された18ml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- FGF23-6xHis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、イミダゾールと取り除いた。精製されたsクロト- FGF23-6xHis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- FGF23-6xHis;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- FGF23-6xHis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- FGF23-6xHis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- FGF23-6xHisが精製されたことを示すものであった。

10

【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。

20

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3mlのDMEMプラス1%のFBSで置き換えた。条件培地を、3ml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/mlのヘパリン(Sigma, Cat#H8537; 2mg/ml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。

30

【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

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 クロトー - 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 およびクロトー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 - クロトー融合ポリペプチドの相対発現、および種々の F G F - クロトー融合ポリペプチドに対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 クロトー - F G F 2 3 融合物変異体の発現および活性

【表 1】

	s クロトー - F G F 2 3 融合構築物	発現	E g r - 1 - l u c レポーター遺伝子における活性
1	s クロトー - F G F 2 3	良い	あり
2	I g G s p - s クロトー - 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 クロトー (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 クロトー	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 クロトー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 クロトー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 クロトーの用量に依存し、該効果はヘパリンの存在 (2 0 μ g / m l) により高められた。ルシフェラーゼ活性における s クロトー - F G F 2 3 - 6 x 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 . 2 1 n M 程度の低濃度 (1 . 2 倍変化) および少なくとも最大約 1 9 . 3 n M 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 クロトー - F G F 2 3 - 6 x H i s 融合ポリペプチドの活性は、ヘパリン (2 0 μ g / m l) 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 クロトー - F G F 2 3 - 6 x H i s 融合ポリペプチドの効果は、約 0 . 6 n M 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 クロトー - F G F 2 3 -

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 クロトー - 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ー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

発現したクロトー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 クロトー - 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 クロトー - 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 P i p e l i n e P i l o t 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 クロトー - 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。ウエスタンブロット分析を行い、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 クロトー - 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 クロトー - 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 クロトー - F G F 2 3 と F G F 2 間での差は、観察されなかった。s クロトー - 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。

40

【 0 2 5 8 】

C 2 C 1 2 筋管における効果と一致して、s クロトー - 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 クロトー - 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 クロトー - 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 クロトー - 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 クロトー - 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。

50

【 0 2 5 9 】

実施例 4 . s クロトー、F G F 2 3 および F c L A L A を含む融合ポリペプチド

種々の融合ポリペプチドは、s クロトー、F G F 2 3 および抗体の修飾された F c 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 F c 分子は、改変された（減少した）F c R n 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、F G F 2 3 および s クロトーは、米国特許第 7, 2 1 7, 7 9 8 号および Hessel ら 2007 Nature 449:101-104 に記載されている F c L A L A 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、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。

【0260】

A . s クロトー - F G F 2 3 - F c L A L A v 1

s クロトー、リンカー、F G F 2 3、別のリンカーおよび F c L A L A を含む融合物を構築する。この態様は、s クロトー - F G F 2 3 - F c L A L A v 1 と称され、以下の配列番号：46 および 47 に示される。

s クロトー - 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：46 に示されている。

s クロトー - F G F 2 3 - F c L A L A v 1 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。

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 クロトー：1 - 982；リンカー1：983 - 1001；F G F 2 3：1002 - 1228；リンカー2：1229 - 1233；F c L A L A：1234 - 1459。

【0261】

B . s クロトー - F G F 2 3 - F c L A L A v 2

s クロトー、リンカー、F G F 2 3、別のリンカーおよび F c L A L A を含む融合物を構築する。この態様は、s クロトー - F G F 2 3 - F c L A L A v 2 と称され、以下の配列番号：48 および 49 に示される。

s クロトー - 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：48 に示されている。

s クロトー - F G F 2 3 - F c L A L A v 2 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 クロトー：(a a またはアミノ酸) 1 - 982；リンカー1：983 - 1001；F G F 2 3：1002 - 1228；リンカー2：1229 - 1233；F c L A L A：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、F G F、クロトー、修飾された F c フラグメントおよび（所望により）リンカー配列を組み合わせることにより構築することができる。

【0263】

実施例 5 . F G F 2 3 および F c L A L A 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, 2 1 7, 7 9 8 号に記載されているとおりに、F G F 2 3 および抗体の修飾された F c 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 F c 分子は、改変された（減少した）F c R n 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、F G F 2 3 は、F c L A L A 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、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。

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、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 クロトー - 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 - l 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 - l 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 クロトー - 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 - l 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 - l 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 クロトー - 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 クロトー - F G F 2 3 - F c L A L A v 1 ; s K F - F c v 2 : s クロトー - 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 - l 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、クロトーの全長膜貫通形態と共にE g r - 1 - l 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クロトー - FGF23融合物のインビボ有効性

実験データは、sクロトー - 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クロトー - FGF23(KLOFGF)の筋肉内注射は、sクロトー(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(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クロトー - FGF23(KLOFGF; 1.6mg/ml)またはsクロトー(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クロトー - 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クロトー - 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F G F 2 3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Q 1 5 6、C 2 0 6およびC 2 4 4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	MLGARLRLWVCALCSVCSMSVLRAYPNASPLLGSWSGGLIHLYTATARN SYHLQIHKNGH MLGARLRLWVCALCSVCSMSVIRAYPNASPLLGSWSGGLIHLYTATARN SYHLQIHKNGH MLGARLGLWVCTLSCV-----VQAYPNSSPLLGSWSGGLTHLYTATARN SYHLQIHGDGH MLGTCLRLLVGVLCITVCSLGTARAYPDTSPLLGSNWGSLTHLYTATART SYHLQIHRDGH MLGACLRLLVGALCTVCSLGTARAYS SDTSPLLGSNWGSLTHLYTATARN SYHLQIHRDGH	10
hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	VDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLCMDFRGNI FGSHYFDPENCRFQHQT VDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLCMDFRGNI FGSHYFNPENCRFRHWTL VDGSPQQTIVYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLCMDFTGNI FGSHHFPESCRFRQRTL VDGTPHQTIYSALMITSEDAGSVVITGAMTRRFLCMDLHGNI FGSLHFPENCKFRQWTL VDGTPHQTIYSALMITSEDAGSVVITGAMTRRFLCMDLHGNI FGSYHFPENCRFRQWTL	
hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	ENGVDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPPPY SQFLSRNEIPLIHFNTP IPRHR ENGVDVYHSPQHHLVSLGRAKRAFLPGMNPPPY SQFLSRNEIPLIHFNTP IPRHR ENGVDVYHSPQHRFLVSLGRAKRAFLPGTNPPPYA QFLSRNEIPLPHFAATARPRHR ENGVDVYLSQKHHLVSLGRAKRIFQPGTNPPPF SQFLARRNEVPLLHFYTVR IPRHR ENGVDVYLSPKHHHLVSLGRSKRIFQPGTNPPPF SQFLARRNEVPLLHFYTAR IPRHR	20
hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	SAEDDSE RDPLNVLKPRARMT PAPAS CSQELPSAEDNSP MA SDPLGVVRGGRVN THAGGT SAEDDSE RDPLNVLKPRARMT PAPAS CSQELPSAEDNSP VA SDPLGVVRGGRVN THAGGT SAHDSG--DPLSVLKPRARATPVPAAC CSQELPSAEDSGPAASDPLGVLRGRHLDVRAGSA SAEDPPERDPLNVLKPRPRATPVVPS CSRELPSAEEGGPAASDPLGVLRGRGDARGGAG SAEDPPERDPLNVLKPRPRATPIPV SCSRELPSAEEGGPAASDPLGVLRGRGDARRGAG	
hFGF23 アカゲザル ウシ マウス ラット	GPEG C RPFAKFI (配列番号：69) GPEA C RPFPKFI (配列番号：70) GAER C RPFPGFA (配列番号：71) GADR C RPFPFV (配列番号：72) GTD C R P FPFV (配列番号：73)	

【0277】

これらの3つの変異がF G F 2 3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、F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L A L AならびにQ 1 5 6 A、C 2 0 6 S、C 2 4 4 SおよびC 2 0 6 S / C 2 4 4 S変異体によるE g r - 1 - l u cレポーター遺伝子の活性化を示す。

【0278】

H E K 2 9 3 T細胞を、H E K 2 9 3 T細胞を、クロトーの全長膜貫通形態と共にE G R - 1 - l u cレポーター遺伝子で一過性にトランスフェクトし、F G F 2 3 - F c L a L a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、C 2 0 6 S、C 2 4 4 S、C 2 0 6 S / C 2 4 4 S (3つの独立したクローン) およびQ 1 5 6 A (3つの独立したクローン) 変異体が、E G R - 1 - L u cレポーター遺伝子活性の活性化において、F G F 2 3 - F c L A L A融合タンパク質と同等に有効であることを示す。

【0279】

C 2 4 4およびC 2 0 6の変異がF G F 2 3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、F G F 2 3 (R 1 7 9 Q) - F c L a L aのWT、Q 1 5 6 A、C 2 0 6 S、C 2 4 4 SおよびC 2 0 6 S / C 2 4 4 S変異体のタンパク質の質を示す。示されるF G F 2 3 - F c L a L a発現ベクターで一過性にトランスフェクトされたH E K 2 9 3 T細胞由来の馴化培地を、F G F 2 3抗体を使用してウェスタンブロットにより分析する。結果は、C 2 0 6 S / C 2 4 4 S変異がタンパク質二量化を妨害し、Q 1 5 6 A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。

【 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、説明の目的のための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、興味あるクローンの選択は、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られる。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 】

10

20

【表 3】

配列表(図2)

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

```

1  cgcgagcat gccgcagc gcccgcgc gccgcgcgc gccgcgcgc
ccgtcgctgt
61  cgctgctgct ggtgctgctg ggctgggcg gccgcgcgc gccgcgcgcg
ccgggcgacg
121  gcgcgcgac ctgggcccgt ttctcgcggc ctctgcccc cgaggccgcg
ggcctcttcc
181  agggcacctt cccgcagcg ttcctctggg ccgtgggcg cgcgcctac
cagaccgagg
241  gcgctggca gcagcagcg aagggtgct ccatctgga tacgttcacc
caccacccc
301  tggcaccccc gggagactcc cggaacgcca gtctgccgtt gggcgccccg
tcgccgctgc
361  agcccgccac cggggacgta gccagcgaca gctacaaca cgtcttcgcg
gacacggagg
421  cgctgcgca gctcggggtc actcactacc gcttctccat ctcggggcg
cgagtgtctc
481  ccaatggcag cgcgggcgtc cccaaccgcg aggggctgcg ctactaccg
cgctgctgg
541  agcggctgcg ggagctgggc gtgcagcccg tggtcaccct gtaccactgg
gacctgcccc
601  agcgcctgca ggaagcctac gggcgctggg ccaaccgcg cctggcgac
cacttcaggg
661  attacggga gctctgtctc cgccacttgc ggggtcagg caagtactgg
atcaccatcg
721  acaaccccta cgtggtggcc tggcacggct acgccaccgc gcgcctggcc
cccgcatcc
781  ggggcagccc ggggctggg tacctggtg cgcacaacct cctctggct
catgccaaag
841  tctggcatct ctacaatact ttttccgtc cactcaggg aggtcagggt
tccattgccc
901  taagctctca ctggatcaat cctcgaaga tgaccgacca cagcatcaaa
gaatgtcaaa
961  aatctctgga ctttgtacta ggttggtttg ccaaaccgct atttattgat
ggtgactatc
1021  ccgagagcat gaagaataac ctttcatcta ttctgcctga ttttactgaa
tctgagaaaa
1081  agttcatcaa aggaactgct gacttttttg ctctttgctt tggaccacc
ttgagtttcc
1141  aacttttggg cctcacatg aagttccgcc aattggaatc tcccaacctg
aggcaactgc
1201  ttctctggat tgacctgaa ttttaaccat ctcaaattt tattgtggaa
aatggctggt
1261  ttgtctcagg gaccaccaag agagatgatg ccaaattat gtattacctc
aaaaagtcca
1321  tcatggaaac cttaaaagcc atcaagctgg atggggtgga tgtcatcggt
tataccgcat
1381  ggtccctcat ggatggttgc gactggcaca gaggttacag catcaggcgt
ggactcttct
1441  atgttgactt tctaagccag gacaagatgt tgttgccaaa gtcttcagcc
ttgttctacc
1501  aaaagctgat agagaaaaat ggcttccctc ctttacctga aaatcagccc
ctagaaggga
1561  catttccctg tgactttgct tggggagttg ttgacaacta cattcaagta
gataccaetc

```

10

20

30

40

【表 4】

1621 tgtctcagtt taccgacctg aatgtttacc tgtgggatgt ccaccacagt
 aaaaggctta
 1681 ttaaagtgga tggggttgtg accaagaaga ggaaatccta ctgtgttgac
 tttgctgcca
 1741 tccagcccca gatcgcttta ctccaggaaa tgcacgttac acattttgcg
 ttctccctgg
 1801 actggggcct gattctccct ctgggtaacc agtcccaggt gaaccacacc
 atcctgcagt
 1861 actatcgctg catggccagc gagcttgtcc gtgtcaacat caccocagtg
 gtggccctgt
 1921 ggcagcctat ggccccgaac caaggactgc cgcgcctcct ggccaggcag
 ggcgcctggg
 1981 agaacccta cactgcctg gcttttgcag agtatgcgcg actgrgcttt
 caagagctcg
 2041 gccatcacgt caagcttttg ataacgatga atgagccgta tacaaggaat
 atgacataca
 2101 gtgtgtggca caaccttctg aaggcccatg cctgtgcttg gcatgtgtac
 aatgaaaagt
 2161 ttaggcacgc tcagaatggg aaaatatcca tagccttgca ggtgattgg
 atagaacctg
 2221 cctgcccttt ctccaaaag gacaaagagg tggccgagag agttttggaa
 tttgacattg
 2281 gctggtggc tgagccatt ttggctctg gagattatcc atgggtgatg
 agggactggc
 2341 tgaaccaaag aaacaatttt cttcttcctt atttactga agatgaaaaa
 aagctaattc
 2401 aggtgaccll tgaclllllg gclltaagcc allalaccac calccllyla
 gactcagaaa
 2461 aagaagatcc aataaaatac aatgattacc tagaagtgc agaatgacc
 gacatcacgl
 2521 gctcaactc ccccaqtcag gtggcggtag tqccctgggg gttgcgcaaa
 gtgctgaact
 2581 ggcgaagtl caaglacgga gacctccca tglacataal atccaaagga
 atcgatgacg
 2641 ggtgcacgc tgaggacgac cagctgaggg tgtattatat gcagaattac
 alaaacgaag
 2701 ctctcaaagc ccacatactg gatggtatca atctttgcgg atactttgct
 tattcgttta
 2761 acgaccgcac agctccgagg tttggcctct atcgttatgc tgcagatcag
 tttgagccca
 2821 aggcattcat gaaacattac aggaaaatta ttgacagcaa tggtttcccg
 ggcccagaaa
 2881 ctctggaaag attttgtcca gaagaattca ccgtgtgtac tgagtgcagt
 ttttttcaca
 2941 cccgaaagtc tttactggct ttcatagett ttctattttt tgetctctatt
 atttctctct
 3001 cccttatatt ttactactcg aagaaaggca gaagaagta caaatagttc
 tgaacatttt
 3061 tctattcatt ctttttgaaa taattatgca gacacatcag ctgttaacca
 tttgcacctc
 3121 taagtgtgtg gaaactgtaa atttcaataca tttgacttct agaaaacatt
 tttgtggctt
 3181 atgacagagg ttttgaaatg ggcataagggt atcgtaaaat attgaataat
 gcgaatagtg
 3241 cctgaatttg ttctcttttt gggtgattaa aaaactgaca ggcactataa
 tttctgtaac
 3301 acactaaca aagcatgaaa aataggaacc acaccaatgc aacatttgtg
 cagaaatttg
 3361 aatgacaaga ttaggaatat tttcttctgc acccacttct aaatttaattg
 tttttctgga
 3421 actagtaatt gcaagagttc gaatagaaag ttatgtacca agtaaccatt
 tctcagctgc

10

20

30

40

【表 5】

3481 cataataatg cctagtggct tcccctctgt caaatctagt ttcctatgga
 aaagaagatg
 3541 gcagatacag gagagacgac agagggtcct aggctggaat gttcctttcg
 aaagcaatgc
 3601 ttctatcaaa tactagtatt aatttatgta tctggttaat gacatacttg
 gagagcaaat
 3661 tatggaaatg tgtatattat atgatttttg aggtcctgtc taaacctgt
 gtccctgagg
 3721 gatctgtctc actggcatct tgttgagggc cttgcacata ggaaactttt
 gataagtatc
 3781 tgcggaaaaa caaacatgaa tccgtgtgata ttgggctcct caggaagcat
 aaagcaattg
 3841 tgaatacag tataccgcag tggctctagg tggaggaaag gaggaaaaag
 tgcttattat
 3901 gtgcaacatt atgattaatc tgattataca ccatttttga gcagatcttg
 gaatgaatga
 3961 catgaccttt ccttagagaa taaggatgaa ataatcactc attctatgaa
 cagtgcact
 4021 actttctatt ctttagctgt actgtaattt ctttgagttg atagttttac
 aaattcttaa
 4081 taggttcaaa agcaatctgg tctgaataac actggatttg tttctgtgat
 ctctgaggtc
 4141 tattttatgt ttttctgtct acttctgtgg aagtagcttt gaactagttt
 tactttgaac
 4201 tttcacgctg aaacatgcta gtgatctcta gaaagggcta attaggtctc
 atcctttaat
 4261 gccctttaa taagtcttgc tgattttcag acaggggaagt ctctctatta
 cactggagct
 4321 gttttataga taagtcaata ttgtatcagg caagataaac caatgtcata
 acaggcattg
 4381 ccaacctcac tgacacaggg tcatagtgtg taataatata ctgtactata
 taatatatca
 4441 tctttagagg tatgattttt tcatgaaaga taagcttttg gtaatatcca
 ttttaaagtg
 4501 gacttattaa aattggatgc tagagaatca agtttatttt atgtatatat
 ttttctgatt
 4561 ataagagtaa tatatgttca ttgtaaaaat ttttaaaaca cagaaactat
 atgcaaagaa
 4621 aaaataaaaa ttatctataa tctcagaacc cagaaatagc cactattaac
 atttcctacg
 4681 tattttatct tacatagatc atattgtata tagttagtat ctttattaat
 ttttattatg
 4741 aaactttcct ttgtcattat tagtcttcaa aagcatgatt tttaatagtt
 gttgagtatt
 4801 ccaccacagg aatgtatcac aacttaaccg ttcccgtttg ttagactagt
 ttcttattaa
 4861 tgttgatgaa tgttgtttaa aaataatttt gttgctacat ttactttaat
 ttcttgact
 4921 gtaaagagaa gtaattttgc tccctgataa agtattatat taataataaa
 tctgcctgca
 4981 actttttgcc ttctttcata atc

10

20

30

クローアミノ酸配列(NP_004786) (配列番号: 2)

1 MPASAPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPDGAQ TWARFSRPPA PEAAGLFQGT
 61 FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP PGDSRNASLP LGAPSPLQPA
 121 TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLERL
 181 RELGVQPVVT LYHWDLPQRL QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP
 241 YVVAWHGYAT GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP DFTESEKKFI
 361 KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW IDLEFNHPQI FIVENGWFFVS

40

【表 6】

421	GTTRKDDAKY	MYYLKKFIME	TLKAIKLDGV	DVIGYTAWSL	MDGFEWHRGY	SIRRGIFYVD
481	FLSQDRMLLP	KSSALFYQKL	IEKNGFPPLP	ENQPLEGTFP	CDFAWGVVDN	YIQVDTTSLQ
541	FTDLNVYLWD	VHHSKRLIKV	DGVVTKKRKS	YCVDFAAIQP	QIALLOEMHV	THFRFSLDWA
601	LILPLGNQSQ	VNHTILQYYR	CMASELVRVN	ITPVVALWQP	MAPNQGLPRL	LARQGAWENP
661	YALAFAYEYA	RLCFQELGHH	VKLWITMNEP	YTRNMTYSAG	HNLLKAHALA	WHVYNEKFRH
721	AQNGKISIAL	QADWIEPACP	FSQKDKEVAE	RVLEFDIGWL	AEPIFGSGDY	PWVMRDWLNQ
781	RNNFLLPYFT	EDEKKLIQGT	FDFLALSHYT	TILVDSEKED	PIKYNDYLEV	QEMTDITWLN
841	SPSQVAVVPW	GLRKVLNWLK	FKYGDLEPMYI	ISNGIDDGLH	AEDDQLRVYY	MQNYINEALK
901	AHILDGINLC	GYFAYSFNDR	TAPRFGLYRY	AADQFEPKAS	MKHYRKIIDS	NGFPGPETLE
961	RFCPEEFTVC	TECSFFHTRK	SLLAFTIAFLF	FASIISLSLI	FYYSKKGRRS	YK

ベータ-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

10

1	atcctcagtc	tcccagttca	agctaatacat	tgacagagct	ttacaatcac	aagctttttac
61	tgaagctttg	ataagacagt	ccagcagttg	gtggcaaatg	aagccaggct	gtgcggcagg
121	atctccaggg	aatgaatgga	ttttcttcag	cactgatgaa	ataaccacac	gctataggaa
181	tacaatgtcc	aacgggggat	tgcaaagatc	tgctatcctg	tcagcactta	ttctgctacg
241	agctgttact	ggattctctg	gagatggaag	agctatatgg	tctaaaaatc	ctaattttac
301	tccggtaaat	gaaagtcagc	tgtttctcta	tgacactttc	cctaaaaact	ttttctgggg
361	tattgggact	ggagcattgc	aagtgggaag	gagttggaag	aaggatggaa	aaggaccttc
421	tatatgggat	catttcatcc	acacacacct	taaaaatgtc	agcagcacga	atgggtccag
481	tgacagttat	attttctggg	aaaaagactt	atcagccctg	gattttatag	gagtttcttt
541	ttatcaattt	tcaatttcct	ggccaaggct	tttcccgat	ggaatagtaa	cagttgccaa
601	cgcaaaaggt	ctgcagtaact	acagtaactct	tctggacgct	ctagtgttta	gaaacattga
661	acctatagtt	actttatacc	actgggattt	gcctttggca	ctacaagaaa	aatatggggg
721	gtggaaaaat	gataccataa	tagatatctt	caatgactat	gccacatact	gtttccagat
781	gtttggggac	cgtgtcaaat	attggattac	aattcacaac	ccatatctag	tggttgggca
841	tgggttatggg	acaggtatgc	atgcccctgg	agagaaggga	aatttagcag	ctgtctacac
901	tgtgggacac	aacttgatca	aggctcactc	gaaagtgttg	cataactaca	acacacattt
961	ccgcccacat	cagaagggtt	ggttatcgat	cacgttggga	tctcattgga	tcgagccaaa
1021	ccggtcggaa	aacacgatgg	atatattcaa	atgtcaacaa	tcoatgggtt	ctgtgcttgg
1081	atgggtttgcc	aacctatccc	atggggatgg	cgactatcca	gaggggatga	gaaagaagtt
1141	gttctccgtt	ctacccattt	tctctgaagc	agagaagcat	gagatgagag	gcacagctga
1201	ttcttttgcc	ttttcttttg	gacccaacaa	cttcaagccc	ctaaacacca	tggctaaaaa
1261	gggacaaaaa	gtttcactta	attttaagaga	agcgtggaac	tggattaaac	tggaaatacaa
1321	caaccctcga	atcttgattg	ctgagaatgg	ctggttcaca	gacagtctgt	tgaaaacaga
1381	agacaccacg	gccatctaca	tgatgaagaa	tttctcagc	caggtgcttc	aagcaataag
1441	gttagatgaa	atacagatgt	ttggttatac	tgccctggtc	ctcctggatg	gctttgaatg
1501	gcaggatgct	tacaccatcc	gccaggagtt	attttatgtg	gattttaaca	gtaaacagaa
1561	agagcggaaa	ctcaagtctt	cagcacacta	ctacaaacag	atcatacag	aaaatggttt
1621	ttcttttaaaa	gagtcacagc	cagatgtgca	gggccagttt	ccctgtgact	tctcctgggg
1681	tgtcactgaa	tctgttctta	agcccgagtc	tgtggttctg	tccccacagt	tcagcgatcc
1741	tcattctgtac	gtgtggaacg	ccactggcaa	cagactgttg	cacogagtgg	aaggggtgag
1801	gctgaaaaca	cgacccgctc	aatgcacaga	ttttgtaaac	atcaaaaaac	aacttgagat
1861	gttggcaaga	atgaaagtca	cccactaccg	gtttgctctg	gattgggcct	cggtccttcc
1921	cactggcaac	ctgtccgcgg	tgaaccgaca	ggccctgagg	tactacaggt	gcgtggtcag
1981	tgaggggctg	aagcttgga	tctccgcgat	ggtcacccctg	tattatccga	cccacgcca
2041	cctaggcctc	cccagacctc	tggtgcatgc	cgacgggtgg	ctgaacccat	cgacggccga
2101	ggccttccag	gcctacgctg	ggctgtgctt	ccaggagctg	ggggacctgg	tgaagctctg
2161	gatcaccatc	aacgagccta	acgggctaag	tgacatctac	aaccgctctg	gcaacgacac
2221	ctacggggcg	gcgcacaacc	tgctggtggc	ccacgcccctg	gcctggcgcc	tctacgaccg
2281	gcagttcagg	ccctcacagc	gcggggccgt	gtcgtgtctg	ctgcacgcgg	actgggcgga
2341	acccgccaac	ccctatgctg	actcgactg	gagggcgcc	gagcgcttcc	tgcagttcga
2401	gatcgctctg	ttcgccgagc	cgctcttcaa	gaccggggac	taccccgcg	ccatgagggg
2461	atacattgcc	tccaagcacc	gacgggggct	ttccagctcg	gcctgcccgc	gcctcaccga
2521	ggccgaaagg	aggctgtcca	agggcaagg	cgacttctgc	gcgctcaacc	acttcaccac
2581	taggttctgtg	atgcacgagc	agctggccgg	cagccgctac	gactcggaca	gggacatcca
2641	gtttctgcag	gacatcaccc	gcctgagctc	cccacgcgc	ctggctgtga	ttccctgggg
2701	gttgcgcaag	ctgctgcggg	gggtccggag	gaactacggc	gacatggaca	tttacatcac
2761	cgccagtggc	atcgacgacc	aggctctgga	ggatgaccgg	ctccggaagt	actacctagg

20

30

40

【 0 2 8 6 】

【表 7】

```

2821 gaagtacctt caggaggtgc tgaagcata cctgattgat aaagtcagaa tcaaaggcta
2881 ttatgcattc aaactggctg aagagaaatc taaacccaga tttggattct tcacatctga
2941 ttttaaagct aaatcctcaa tacaatttta caacaaagtg atcagcagca ggggcttccc
3001 ttttgagaac agtagttcta gatgcagtca gacccaagaa aatacagagt gcaactgtctg
3061 cttattcctt gtgcagaaga aaccactgat attcctgggt tgttgcttct tctccaccct
3121 ggttctactc ttatcaattg ccatttttca aaggcagaag agaagaaagt tttggaaagc
3181 aaaaaactta caacacatac cattaagaa aggcaagaga gttgttagct aaactgatct
3241 gtctgcattg tagacagttt aaaaattcat cccagttcc

```

ベータークロトーアミノ酸配列(NP_783864) (配列番号: 4)

```

1 mkpgcaagsp gnewiffstd eittryrntm sngglqrsvi lsalillrav tgfsgdgrai
61 wsknpnftpv nesqlflydt fpknffwgig tgalqvegsw kkdgkqpsiw dhfihthlkn
121 vsstngssds yiflekdlas ldfigvsfyg fsiswprlfp dgivtvanak glqyytild
181 alvlnrniepi vtlyhwdlpl alqekyggwk ndtiidifnd yatycfmgf drvkywiti
241 npylvawhgy gtgmhapgek gnlaavytvg hnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
301 gshwiepnrs entmdifkq qsmvsvlgwf anpihgddgy pegmrkkkfs vlpifseae
361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgq nvslnlreal nwikleynnp riliaengwf
421 tdsrvktedt taiymknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglfi
481 vdfnskqker kpkssahyyk qiirengfsl kestpdvqgq fpcdfswgvt esvlkpesva
541 sspqfsdphl yvwnatgnrl lhrvegvrk trpagctdfv nikkglemla rmkvthyrfa
601 ldwasvlptg nlsavnrqal ryyrcvvseg lklgisamvt lyyphahlg lpepllhadd
661 wlnpstaeaf qayaglcfe lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsndtyg aahnllvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfktg
781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrlkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgv kllrwvrrny gdmidiyas giddqaledd
901 rlrkyylygky lqevlkayli dkvrkgyya fklaeekskp rfgfftsdfk akssiqfykn
961 vissrgfpfe nsssrscqtg entectvclf lvqkkplifl gccffstlvi llsiaifqrq
1021 krrkfwkakn lqhiplkkgk rvvs

```

10

20

ヒトクロードメイン1(KL-D1)アミノ酸配列(配列番号: 5)

```

58 ggt
61 fpdgflwavg saayqteggw qhgkgasiw dtfthhplap pgdsrnaslp lgapsplqpa
121 tgdvasdsyn nvfrdtealr elgvthyrf iswarvlpng sagvpnregl ryyrrllerl
181 relgvqpvvt lyhwdlpqrl qdayggwanr aladhfrdya elcfrhfggq vkywitidnp
241 yvwawhgyat grlapgirs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptq ggqvsialss
301 hwinprmt dhsiectqsl dfvlwgafak vfidgdypes mknnlssilp dftesekki
361 kgtadffalc fgptlsfql dphmkfrqle spnlrqlslw idlefhnbpqi fivengwfv
421 gttkrddaky myyikkkfime tlkaikldgv dvigytawsl mdgfewhrgy sirrglfiyvd
481 flsqdkmlip kssalfyqkl iekngf

```

30

ヒトクロードメイン2(KL-D2)アミノ酸配列(配列番号: 6)

```

517 gtfp cdfawgvvdn yiqvdttsq
541 ftdlnvylwd vhhsrklikv dgvttkrks ycvdfaaiqp qiallqemhv thfrfslawa
601 lilplngsq vnhtilgyyr cmaselvrn itpvvalwqp mapnqglprl larqgawenp
661 ytalafaeya rlcqelghh vklwitmnep ytrnmtysag hnllkahala whvynekfrh
721 aqngkisial qadwiepacp fsqkdevae rvlefdigwl aepifgsgdy pwvmrdwlnq
781 rnnflpyft edekklqgt fdflalshyt tilvdseked pikyndylev qemttditwln
841 spsqvavvpw glrkvlwkl fkygdipmyi isngiddglh aeddglrvy mqnvyinealk
901 ahildginlc gyfaysfndr taprfglyry aadqfepkas mkhyrkiids ngf

```

クロード細胞外ドメイン(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 qhgkgasiw dtfthhplap pgdsrnaslp lgapsplqpa
121 tgdvasdsyn nvfrdtealr elgvthyrf iswarvlpng sagvpnregl ryyrrllerl

```

40

【表 8】

```

181 relgvqpvt lyhwdlpqrl qdayggwanr aladhfrdya elcfrhfggq vkywitidnp
241 yvvawhgyat grlapgirgs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptq ggqvsialss
301 hwinprmrtd hsiqecqksl dfvlgwfkp vfidgdypes mknnlssilp dfteseckfi
361 kgtadffalc fgptlsfqll dphmkfrgle spnlrqllsw idlefhnpgi fivengwfv
421 gttkrddaky myylkkfime tlkaikldgv dvigytawsl mdgfewhrgy sirrglfyvd
481 flsqdkmlip kssalfyqkl iekngfpplp enqplegtfp cdfawgvvdn yiqvdttsq
541 ftdlnvylwd vhhskrlkv dgvvtkkrks ycvdffaaiqp qiallqemhv thfrfslwa
601 lilplgnqsq vnhtilgyr cmaselvrn itpvvalwqp mapngglprl larqgawenp
661 ytalafaeya rlcfeqlghh vklwitmnep ytrnmtysag hnllkahala whvynekfrh
721 aqngkisial qadwiepacp fsqkdkevae rvlef digwl aepifgsgdy pwvmrdwlnq
781 rnnfilpyft edekkliqgt fdflalshyt tilvdseked pikyndylev qemtditwln
841 spsqvavvpw glrkvlwkl fkygdipmyi isngiddgln aeddqlrvyy mqnyinealk
901 ahildginlc gyfaysfndr taprfglyry aadqfepkas mkhyrkiids ngfpgpetle
961 rfcpeeftvc tecsfhtrk sl

```

10

クロトシグナルペプチドアミノ酸配列(配列番号:8)

```
1 mpasapprrp rpppslsll lvllglgrr lra
```

IgGシグナルペプチドアミノ酸配列(配列番号:9)

```
1 msvltqvlal lllwltgtrc rrlra
```

(Gly₄ Ser)₃ ポリペプチドリナー核酸配列(配列番号:10)

```
1 ggaggtggag gttcaggagg tggaggttca ggaggtggag gttca
```

20

(Gly₄ Ser)₃ ポリペプチドリナーアミノ酸配列(配列番号:11)

```
1 GGGSGGGGS GGGGS
```

(Gly₄ Ser) ポリペプチドリナーアミノ酸配列(配列番号:12)

```
1 GGGGS
```

(Gly) ポリペプチドリナーアミノ酸配列(配列番号:13)

```
1 G
```

30

(Gly Gly) ポリペプチドリナーアミノ酸配列(配列番号:14)

```
1 GG
```

(Gly Ser) ポリペプチドリナーアミノ酸配列(配列番号:15)

```
1 GS
```

(Gly₂ Ser) ポリペプチドリナーアミノ酸配列(配列番号:16)

```
1 GGS
```

40

(Ala) ポリペプチドリナーアミノ酸配列(配列番号:17)

【 0 2 8 7 】

【表 9】

1 A

(Ala Ala) ポリペプチドリッカーアミノ酸配列(配列番号: 18)

1 AA

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

```

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTTHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNLSSILP
351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRLQLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTLSQ FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALQLQEMHV THFRFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHL TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHFNTPI
1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

```

10

20

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

```

1 MSVLTQVLAL LLLWLTGLGG RRLRAEPGDG AQTWARFSRP PAPEAAGLFQ
51 GTFPDGFLWA VGSAAYQTEG GWQQHGKGAS IWDFTTHHPL APPGDSRNAS
101 LPLGAPSPLQ PATGDVASDS YNNVFRDTEA LRELGVTHYR FSISWARVLP
151 NGSAGVPNRE GLRYRRLLE RLRELGVQPV VTLYHWDLPQ RLQDAYGGWA
201 NRALADHFRD YAELECFRHFQ GQVKYWITID NPYVVAWHGY ATGRLAPGIR
251 GSPRLGYLVA HNLLAHAKV WHLYNTSFRP TQGGQVSIAL SSHWINPRRM
301 TDHSIKECQK SLDFVLGWFA KPVFIDGDYP ESMKNLSSI LPDFTESEKK
351 FIKGTADFFA LCFGPTLSFQ LLDPHMKFRQ LESPNLRQLL SWIDLEFNHP
401 QIFIVENGWF VSGTTKRDDA KYMYLKKFI METLKAIKLD GVDVIGYTAW
451 SLMDGFEWHR GYSIRRGLFY VDFLSQDKML LPKSSALFYQ KLIKNGFPP
501 LPENQPLEGT FPCDFAWGVV DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLI
551 KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI QPQIALQEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ
601 SQVNHTILQY YRCMASELVR VNITPVVALW QPMAPNQGLE RLLARQGAWE
651 NPYTALAFEA YARLCFQELG HHVKLWITMN EPYTRNMTYS AGHNLLKAHA
701 LAWHVYNEKF RHAQNGKISI ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLEFDIG
751 WLAEPFPGSG DYPWVMRDWL NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ GTFDFLALSH
801 YTTILVDSEK EDPIKYNDYL EVQEMTDITW LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW
851 LKFKYGDLPY YIISNGIDDG LHAEDDQLRV YMQNYINEA LKAHILDGIN
901 LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY RYAADQFEPK ASMKHYRKII DSNGFPGPET
951 LERFCPEEFT VCTECSFHT RKSLGSGGGG SGGGGSGGGG SLKYPNASPL

```

30

40

【表 10】

1001 LGSSWGGLIH LYTATARN SY HLQIHKNGHV DGAPHQTIYS ALMIRSEDAG
 1051 FVVITGVMSR RYLCMDFRGN IFGSHYFDPE NCRFQHQTL NQYDVYHSPQ
 1101 YHFLVSLGRA KRAFLPGMNP PPYSQFLSRR NEIPLIHNT PIPRRHTQSA
 1151 EDDSERDPLN VLKPRARMTP APASCSQELF SAEDNSPMAS DPLGVVRGGR
 1201 VNTHAGGTGP EGCRPFKFI *

KL-D1-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列(配列番号: 21)

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QHKGKASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDPES MKNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFWEHRYG SIRRLGFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGSGG GSGGGGSGG GSKLYPNAS PLLGSSWGGL
 551 IHLTYATARN SYHLQIHKNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVVITGVM
 601 SRRYLCMDFR GNIFGSHYFD PENC RFHQHT LENGVDVYHS PQYHFLVSLG
 651 RAKRAFLPGM NPPYSQFLS RRNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDDSERDP
 701 LNVLKPRARM TPAPASCSQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT
 751 GPEGCRPFAK FI*

10

KL-D2-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列(配列番号: 22)

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LPLPENQPLE GTFPCDFAWG
 51 VVDNYIQVDT TLSQFTDLNV YLWDVHHSKR LIKVDGVVTK KRKSYCVDF
 101 AIQPIALLQ EMHVTHFRFS LDWALILPLG NQSQVNHTIL QYYRCMASEL
 151 VRVNITPVVA LWQPMAPNQG LPRLLARQGA WENPYTALAF AEYARLCFQE
 201 LGHHVKLWIT MNEPYTRNMT YSAGHNLLKA HALAWHYNE KFRHAQNGKI
 251 SIALQADWIE PACPFSQKDK EVAERVLFD IGWLAEPFIG SGDPVWVRD
 301 WLNQRNFFLL PYFTEDEKKL IQGTDFDLAL SHYTILVDS EKEDPIKYND
 351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFYGD LPMYIISNGID
 401 DGLHAEDDQL RVYMQNYIN EALKAHILDG INLCGYFAYS FNDRTAPRFG
 451 LYRYAADQFE PKASMKHYRK IIDSNGFPGP ETLERFCPEE FTVCTECSFF
 501 HTRKSLGSGG GSGGGGSGG GSKLYPNAS PLLGSSWGGL IHLTYATARN
 551 SYHLQIHKNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVVITGVM SRRYLCMDFR
 601 GNIFGSHYFD PENC RFHQHT LENGVDVYHS PQYHFLVSLG RAKRAFLPGM
 651 NPPYSQFLS RRNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDDSERDP LNVLKPRARM
 701 TPAPASCSQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFAK
 751 FI*

20

30

(KL-D1)₂-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列(配列番号: 23)

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QHKGKASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDPES MKNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFWEHRYG SIRRLGFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGSGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QHKGKASIW
 551 DTFTHHPLAP PGDSRNASLP LGAPSPQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR
 601 ELGVTHYRFS ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLERL RELGVQPVVT
 651 LYHWDLPQRL QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP

40

【表 1 1】

```

701 YVVAWHGYAT GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ
751 GGQVSIALSS HWINPRMTD HSIKECQKSL DFLGWFAKP VFIDGDYPES
801 MKNNLSSILP DFESEKKFI KGTAFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE
851 SPNLRQLLSW IDLEFNHPQI FIVENGWFSV GTTKRDDAKY MYYLKKFIME
901 TLKAIKLDGV DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGIFYVD FLSQDKMLLP
951 KSSALFYQKL IEKNGFPEFG SGGGSGGGG SGGGSLKYP NASPLLSSW
1001 GGLIHLYTAT ARNSYHLQIH KNGHVDGAPH QTIYSALMIR SEDAGFVVIT
1051 GVMSRRYLCM DFRGNIFGSH YFDPENCRFQ HQTLENGYDV YHSPQYHFLV
1101 SLGRAKRAFL PGMNPPYSQ FLSRRNEIPL IHFNTPIPR HTQSAEDDSE
1151 RDPLNLVKPR ARMTAPASC SQELPSAEDN SPMASDPLGV VRGGRVNTHA
1201 GGTGPEGCRP FAKFI*

```

10

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

```

1 MPASAPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGR LPLPENQPLE GTFPCDFAWG
51 VVDNYIQVDT TLSQFTDLNV YLWDVHHSKR LIKVDGVVTK KRKSYCVDF
101 AIQPQIALLO EMHVTHFRFS LDWALILPLG NQSQVNHTIL QYYRCMASEL
151 VRVNITPVVA LWQPMAPNQG LPRLLARQGA WENPYTALAF AEYARLCFOE
201 LGHHVKLWIT MNEPYTRNMT YSAGHNLLKA HALAWHVYNE KFRHAQNGKI
251 SIALQADWIE PACPFSQKDK EVAERVLEFD IGWLAEPFSG SGDPWPVVRD
301 WLNQNNFLL PYFTEDEKKL IQGTFDFLAL SHYTTLVDS EKEDPIKYND
351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFYKGD LPMYIISNGID
401 DGLHAEDDQL RYVYMQNYIN EALKAHILDG INLCGYFAYS FNDRTAPRFG
451 LYRYAADQFE PKASMKHYRK IIDSNGFPGP ETLERFCPEE FTVCTECSFF
501 HTRKSLGTFP CDFANGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD VHHSKRLIK
551 DGVVTKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA LILPLGNQSQ
601 VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL LARQGAWENP
651 YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG HNLLKAHALA
701 WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE RVLEFDIGWL
751 AEPIFGSGDY PWVMDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT FDFLALSHYT
801 TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW GLRKVLNWLK
851 FKYGDLPYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVY YMQNYINEAL AHILDGINLC
901 GYFAYSFNDR TAPRFGYLYR AADQFEPKAS MKHYRKIDS NGFGSGGGGS
951 GGGSGGGGS LKYPNASPLL GSSWGGLIHL YTATARNYSY LQIHKNHVD
1001 GAPHQTIYA MIRSSEDAGF VVITGVMSRR YLCMDFRGNI FGSHYFDPEN
1051 CRFQHQTLN GYDVYHSPQY HFLVSLGRAK RAFLPGMNP PYSQFLSRN
1101 EIPLIHFNTP IPRRHTQSAE DDSERDPLNV LKPRARMTA PASCSQELPS
1151 AEDNSPMASD PLGVVRGGRV NTHAGGTGPE GCRPFAKFI*

```

20

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

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPFYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
251 IGGGGSGGG GSGGGGSLK EPGDGAQTWA RFSRPPAPEA AGLFQGTFFD
301 GFLWAVGSAA YQTEGGWQGH KGASIWDTF THHPLAPPGD SRNASLPLGA
351 PSPLQPATGY VASDSYNNVF RDTEALRELG VTHYRFSISW ARVLPNGSAG
401 VPNREGLRYY RRLERLREL GVQPVVTLYH WDLQRLQDA YGGWANRALA
451 DHFRDYAELC FRHFGGQVKY WITIDNPYV AWHGYATGRL APGIRGSPRL
501 GYLVAHNLLL AHAKVWHLYN TSFRPTQGGQ VSIALSSHVI NPRRMTDHSI
551 KECQKSLDFV LGWFAKPVFI DGDPESMKN NLSSILPDT ESEKKFKGT
601 ADFFALCFGP TLSFQLLDPH MKFRQLESPN LRQLLSWIDL EFNHPQIFIV
651 ENGWFVSGT KRDDAKYMY LKKFIMETLK AIKLDGVDVI GYTAWSLMDG
701 FEWHRYGYSIR RGLFYVDFLS QDKMLLPKSS ALFYQKLIK NGFPPLPENQ
751 PLEGTFFCDF AWGVVDNYIQ VDTTSLQFTD LNVYLWDVHH SKRLIKVDGV
801 VTKKRKSYCV DFAAIQFQIA LLQEMHVTHF RFLDQWALIL PLGNQSQVNH
851 TILQYYRCMA SELVRVNITP VVALWQPMAP NQGLPRLAR QGAWENPYTA

```

40

【表 1 2】

901 LAFAEYARLC FQELGHHVKL WITMNEPYTR NMTYSAGHNL LKAHALAWHV
 951 YNEKFRHAQN GKISIALQAD WIEPACPFSS KDKEVAERVL EFDIGWLAEP
 1001 IFGSGDYFVW MRDWNQRRN FLLPYFTEDE KKLIQGTDFD LALSHYTTIL
 1051 VDSEKEDPIK YNDYLEVQEM TDITWLNPS QVAVVPWGLR KVLNWLKFKY
 1101 GDLPYIISN GIDDGLHAED DQLRVYYMQN YINEALKAHI LDGINLCGYF
 1151 AYSFNDRTAP RFGLYRYAAD QFEPKASKMH YRKIIDSNGF PGPETLERFC
 1201 PEEFTVCTEC SFFHTRKSL*

FGF23 (R179Q) -KL-D1 アミノ酸配列(配列番号:26)

1 MLGARLRLVW CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTLENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IQGTFFPDGFL WAVGSAAYQT EGGWQHGKGIASIWDFTTHH PLAPPGDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQPATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
 351 LPNGSAGVFN REGLRYRRL LERLRELGVQ PVVTLYHWDL PQRLQDAYGG
 401 WANRALADHF RDYAEELCFRH FGGQVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGR LAPG
 451 IRGSPRLGYL VAHNLLLAHA KVVHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSSHWINPR
 501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLGW FAKPVFIDGD YPESMKNNLS SILPDFTESE
 551 KKFIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPHMKF RQLESPNLRQ LLSWIDLEFN
 601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLKK FIMETLKAIK LDGVDVIGYT
 651 AWSLMDGFEW HRGYSIRRG L FYVDFLSQDK MLLPKSSALF YQKLIKNGF
 652 *

10

20

FGF23 (R179Q) -KL-D2 アミノ酸配列(配列番号:27)

1 MLGARLRLVW CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTLENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGTFFPCDFW GVVDNYIQVD TTLSQFTDLN VYLWDVHHSK RLIKVDGVVT
 301 KKRKSYCVDF AAIQPQIAL QEMHVTHFRF SLDWALILPL GNQSQVNHTI
 351 LQYYRCMASE LVRVNITPVV ALWQPMAPNQ GLPRLLARQG AWENPYTALA
 401 FAEYARLCFQ ELGHHVKLWI TMNEPYTRNM TYSAGHNLK AHALAWHVYN
 451 EKFRHAQNGK ISIALQADWI EPACPFSSKD KEVAERVLEF DIGWLAEPF
 501 GSGDYFVWVR DWLNQRRNFL LPYFTEDEKK LIQGTDFDLA LSHYTTILVD
 551 SEKEDPIKYN DYLEVQEMTD ITWLNPSQV AVVPWGLRKY LNWLKFKYGD
 601 LPMYIISNGI DDGLHAEDDQ LRVYYMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
 651 SFNDRTAPRF GLYRYAADQF EPKASKMHYR KIIDSNGF*

30

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

1 MLGARLRLVW CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTLENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IQGTFFPDGFL WAVGSAAYQT EGGWQHGKGIASIWDFTTHH PLAPPGDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQPATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
 351 LPNGSAGVFN REGLRYRRL LERLRELGVQ PVVTLYHWDL PQRLQDAYGG
 401 WANRALADHF RDYAEELCFRH FGGQVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGR LAPG
 451 IRGSPRLGYL VAHNLLLAHA KVVHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSSHWINPR
 501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLGW FAKPVFIDGD YPESMKNNLS SILPDFTESE
 551 KKFIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPHMKF RQLESPNLRQ LLSWIDLEFN
 601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLKK FIMETLKAIK LDGVDVIGYT
 651 AWSLMDGFEW HRGYSIRRG L FYVDFLSQDK MLLPKSSALF YQKLIKNGF
 701 QGTFFPDGFLW AVGSAAYQTE GGWQHGKGA SIWDFTTHHP LAPPGDSRNA

40

【表 13】

```

751 SLPLGAPSP L QPATGDVASD SYNNVFRDTE ALRELGVTHY RFSISWARVL
801 PNGSAGV PNR EGLRYRRL L ERLRELGVQP VVTLYHWDLP QRLQDAYGGW
851 ANRALADHFR DYAE LCFRHF GGQVKY WITI DNPYVVAWHG YATGRLAPGI
901 RGSPLRGYLV AHNLLLAHAK VWHLYNTSFR PTQGGQVSIA LSSHWINPRR
951 MTDHSIKECQ KSLEFVLGWF AKPVFIDGDY PESMKNNLSS ILPDFTESEK
1001 KFIKGTADFF ALCFGPTLSF QLLDPHMKFR QLESPNLRQL LSWIDLEFNH
1051 PQIFIVENGW FVSGTTKRDD AKYMYLKKF IMETLKAIKL DGVDVIGYTA
1101 WSLMDGFEWH RGYSIRRLGF YVDFLSQDKM LLPKSSALFY QKLIKNGF*

```

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

```

1 MLGARLR L WV CALCSVCSMS VLRAYPNASF LLGSSWGGLI HLYTATARN S
51 YHLQIHKN GH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYF DP ENCRFQHQTL ENGYDVYHSF QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFL SR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSE RDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQ EL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
251 IGTFPCDF AW GVVDNYIQVD TTLSQFTDLN VYLWDBVHHSK RLIKVDGVVT
301 KKRKSYCV DF AAIQPQIAL L QEMHVTHFRF SLDWALILPL GNQSQVNHTI
351 LQYYRCMA SE LVRVNITPVV ALWQPMAPNQ GLPRLARQG AWENPYTALA
401 FAEYARLC FQ ELGHHVKLWI TMNEPYTRNM TYSAGHNLK AHALAWHVYN
451 EKFRHAQNG K ISIALQADWI EPACPF S QKD KEVAERVLEF DIGWLAEPIF
501 GSGDYPWVM R DWLNQRNNFL LPYFTEDEKK LIQGTDFDLA LSHYTTILVD
551 SEKEDPIKY N DYLEVQEMTD ITWLNSPSQV AVVPWGLRKV LNWLFKFKYGD
601 LPMYIISNG I DDGLHAEDDQ LRVYMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
651 SFNDRTAPR F GLYRYAADQF EPKASMKHYR KIIDSNGFGT FPCDFAWGVV
701 DNYIQVD T TL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLI KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI
751 QPQIAL L QEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ SQVNHTILQY YRCMASELVR
801 VNITPVVAL W QPMAPNQGLP RLLARQGAWE NPYTALAF AE YARLCFQELG
851 HHVKLWITM N EPYTRNMTYS AGHNLK AHA LAWHVYNEKF RHAQNGKISI
901 ALQADWIEP A CPF S QKDKEV AERVLEFDIG WLAEPFGSG DYPWVMRDWL
951 NQRNNFLLP Y FTEDEKKLIQ GTFDFLALSH YTTILVDSEK EDPIKYNDYL
1001 EVQEMTDIT W LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW LKFKYGD LPM YIISNGIDDG
1051 LHAEDDQLR V YYMQNYINEA LKAHILDGIN LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY
1101 RYAADQFE PK ASMKHYRKII DSNGF*

```

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 gctcccgagg c aagaacctcg gggccgctgc gcggtgggga ggagttcccc gaaacccggc
61 cgtaagcgga ggccctctcc tcccgcagat ccgaacggcc tgggcggggt cccccggct
121 gggacaagaa gccgcgcctt gctgcccgg gcccggggag ggggctggg ctggggccgg
181 aggcgggggtg tgagtgggtg tgtgcgggg gcgaggctt gatgcaatc cgataagaaa
241 tgctcgggtg tcttgggcac ctaccctgg gcccgtaa ggcgtactat ataaggctgc
301 cggcccgagg ccgcgcgcgc gtcagagcag gagcgtcgcg tccaggatct agggccacga
361 ccatcccaac ccggcactca cagcccgcga gcgcaccccg gtcgcgcgcc agcctccgc
421 acccccatcg ccggagctgc gccgagagcc ccaggagggt gccatgcgga gcggtgtgt
481 ggtggtccac gtatggatcc tggccggcct ctggtgccc gtggccgggc gcccctcgc
541 cttctcgga c gcggggcccc acgtgcacta cggtcggggc gaccccatcc gcctcgggca
601 cctgtacacc tccggcccc acgggctctc cagctgcttc ctgcgcaccc gtgccgacgg
661 cgtcgtggac tgcgcgcggg gccagagcgc gcacagtgtg ctggagatca aggcagtcgc
721 tctgcggacc gtggccatca agggcgtgca cagcgtcggg tacctctgca tgggcgcgca
781 cggcaagatg caggggctgc ttcagtactc ggaggaaagac tgtgctttcg aggaggagat
841 ccgccccagat ggctacaatg tgtaccgatc cgagaagcac cgcctcccg tctccctgag
901 cagtgccaaa cagcggcagc tgtacaagaa cagaggcttt cttccactct ctcatttcct
961 gccatgctg cccatggtcc cagaggagcc tgaggacctc aggggccact tgggaatctga
1021 catgttctct tcgcccctgg agaccgacag catggaccca tttgggcttg tcaccggact
1081 ggaggcctg aggagtccca gctttgagaa gtaactgaga ccatgcccg gcctcttcac
1141 tgctgccagg ggctgtggtc cctgcagcgt gggggacgtg cttctacaag aacagtctctg
1201 agtccacgtt ctgttagct ttaggaagaa acatctagaa gttgtacata ttcagagttt
1261 tccattggca gtgccagttt ctagccaata gacttgtctg atcataacat tgaagcctg

```

【表 1 4】

```

1321 tagcttgccc agctgctgcc tgggccccca ttctgctccc tcgagggttc tggacaagct
1381 gctgcactgt ctcagttctg cttgaatacc tccatcgatg gggaaactcac ttcctttgga
1441 aaaattctta tgtcaagctg aaattctcta attttttctc atcacttccc caggagcagc
1501 cagaagacag gcagtagttt taatttcagg aacagggtgat ccactctgta aaacagcagg
1561 taaatttcac tcaaccccat gtgggaattg atctatatct ctacttccag ggaccatttg
1621 cccttcccaa atccctccag gccagaactg actggagcag gcatggccca ccaggcttca
1681 ggagtagggg aagcctggag ccccaactcca gccctgggac aacttgagaa ttccccctga
1741 ggccagttct gtcattggatg ctgtcctgag aataacttgc tgtcccgggtg tcacctgctt
1801 ccatctccca gcccaccagc cctctgcca cctcacatgc ctccccatgg attggggcct
1861 ccaggcccc ccaccttatg tcaacctgca cttcttggtc aaaaatcagg aaaagaaaag
1921 atttgaagac cccaagtctt gtcaataact tgcgtgtgtg aagcagcggg ggaagacctt
1981 gaaccctttc ccagcactt ggttttccaa catgatattt atgagtaatt tattttgata
2041 tgtacatctc ttattttctt acattattta tgcccccaaa ttatatttat gtatgtaagt
2101 gaggtttgtt ttgtatatta aaatggagtt tgtttgtaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

10

FGF19アミノ酸配列(NP__005108) (配列番号:31)

```

1 MRSGCVVHVH WILAGLWLAV AGRPLAFSDA GPHVHYGWD PIRLRHLYTS GPHGLSSCFL
61 RIRADGVVDC ARGQSAHSL EIKAVLRV AIKGVHVSRY LCMGADGKM LLLQYSEEDC
121 AFEEIEIRPDG YNVYRSEKHR LPVSLSSAKQ RQLYKNRGFL PLSHFLPMLP MVPEEPEDLR
181 GHLESDMFSS PLETDSMPDF 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

```

1 CTGTCAGCTG AGGATCCAGC CGAAAGAGGA GCCAGGCACT CAGGCCACCT GAGTCTACTC
61 ACCTGGACAA CTGGAATCTG GCACCAATTC TAAACCACTC AGCTTCTCCG AGCTCACACC
121 CCGGAGATCA CCTGAGGACC CGAGCCATTG ATGGACTCGG ACAGAGCCGG GTTCGAGCAC
181 TCAGGACTGT GGGTTTCTGT GCTGGCTGGT CTTCTGCTGG GAGCCTGCCA GGCACACCCC
241 ATCCCTGACT CCAGTCCTCT CCTGCAATTC GGGGGCCAAG TCCGGCAGCG GTACCTCTAC
301 ACAGATGATG CCCAGCAGAC AGAAGCCCAC CTGGAGATCA GGGAGGATGG GACGGTGGGG
361 GCGCTGCTG ACCAGAGCCC CGAAAGTCTC CTGCAGCTGA AAGCCTTGAA GCCGGGAGTT
421 ATTCAAATCT TGGGAGTCAA GACATCCAGG TTCCTGTGCC AGCGGCCAGA TGGGGCCCTG
481 TATGGATCGC TCCACTTTGA CCTGAGGCC TGCAGCTTCC GGGAGCTGCT TCTTGAGGAC
541 GGATACAATG TTTACCAGTC CGAAGCCCAC GGCCTCCCGC TGCACCTGCC AGGGAACAAG
601 TCCCCACACC GGGACCCCTG ACCCCGAGGA CCAGCTCGCT TCCTGCCACT ACCAGGCCCTG
661 TCCCCCGCAC TCCCGGAGCC ACCCGAATTC CTGGCCCCCG AGCCCCCGA TGTGGGCTCC
721 TCGGACCTC TGAGCATGGT GGGACCTTCC CAGGGCCGAA GCCCCAGCTA CGCTTCCTGA
781 AGCCAGAGGC TGTTTACTAT GACATCTCCT CTTTATTTAT TAGGTTATTT ATCTTATTTA
841 TTTTATTTAT TTTCTTACTT GAGATAATAA AGAGTTCCAG AGGAGAAAAA AAAAAAAAAA
901 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

20

30

FGF21アミノ酸配列(NP__061986) (配列番号:33)

```

1 MDSDETFGEH SGLWVSVLAG LLLGACQAH IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDAQQTEAH
61 LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGL YGSLHFDPEA
121 CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPNGK SPSRDPAPRG PARFLPLPGL FPALPEPPGI
181 LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS

```

FGF23核酸配列(NM__020638) (配列番号:34)
タンパク質コード領域147-902

```

1 cgcaaaaaag gaggggaatcc agtctaggat cctcacacca gctacttgca agggagaagg
61 aaaaggccag taaggcctgg gccaggagag tcccgacagg agtgtcaggt ttcaatctca
121 gcaccagcca ctcagagcag ggcacgatgt tgggggcccg cctcaggctc tgggtctgtg
181 ccttgtgcag cgtctgcagc atgagcgtcc tcagagccta tcccaatgcc tccccactgc
241 tcggctccag ctggggtggc ctgatccacc tgtacacagc cacagccagg aacagctacc
301 accagcagat ccacaagaat ggccatgtgg atggcgccac ccatcagacc atctacagtg
361 ccctgatgat cagatcagag gatgctggct ttgtgggtgat tacagggtgtg atgagcagaa

```

40

【表 15】

```

421 gatacctctg catgatttcc agaggcaaca tttttggatc acactatttc gacccggaga
481 actgcagggt ccaacaccag acgctggaac acgggtacga cgtctaccac tctcctcagt
541 atcacttcct ggtagtctg ggccgggcca agagagcctt cctgccaggc atgaaccac
601 ccccgtaact ccagttcctg tccggaggga acgagatccc cctaattcac ttcaacaccc
661 ccataccacg gcggcacacc cggagcgccg aggacgactc ggagcgggac cccctgaacg
721 tgctgaagcc cggggcccgg atgaccccgg ccccgccctc ctgttcacag gagctcccga
781 gcgcggagga caacagcccg atggccagtg acccattagg ggtggtcagg ggcggtcag
841 tgaacacgca cgctggggga acgggcccgg aaggctgccg ccccttgccc aagttcatct
901 agggctcgtg gaagggcacc ctctttaacc catccctcag caaacgcagc tcttcccacg
961 gaccagggtc cttgacgttc cgaggatggg aaaggtgaca ggggcatgta tggaaatttg
1021 tgcttctctg ggggtccctc cacaggagggt cctgtgagaa ccaacctttg agggcccaagt
1081 catgggggtt caccgccttc ctccactocat atagaacacc ttccccaata ggaaacccca
1141 acaggtaaac tagaaatttc ccttctcatg aggttagagag aagggggtctc tcccaacata
1201 tttctcttcc ttgtgcctct cctctttatc acttttaagc ataaaaaaa aaaaaaaaaa
1261 aaaaaaaaaa aaaagcagtg ggttccctgag ctcaagactt tgaaggtgta gggaagagga
1321 aatcggggtt cccgccttc ctccactgc cctatgcatt tatgttagat gccccgactc
1381 cactggcatt tgagtgtgca aaccttgaca ttaacagctg aatggggcaa gttgatgaaa
1441 acactacttt caagccttcg ttcttctctg agcatctctg ggggaagagct gtcaaaagac
1501 tgggtgtagg ctggtgaaaa cttgacagct agacttgatg cttgctgaaa tgaggcagga
1561 atcataatg aaaactcagc ctccctacag ggtgagcacc ttctgtctcg ctgtctccct
1621 cttgtgcagc acagccagag ggcccagaat ggcccactc tgttcccaag cagttcatga
1681 tacagcctca ccttttggcc ccatctctgg tttttgaaaa tttggtctaa ggaataaata
1741 gcttttacac tggctcacga aaatctgccc tgctagaatt tgcttttcaa aatggaaata
1801 aattccaact ctctaagag gcatttaatt aaggctctac ttccagggtg agtaggaatc
1861 cattctgaac aaactacaaa aatgtgactg ggaagggggc tttgagagac tgggactgct
1921 ctgggttagg ttttctgttg actgaaaaat cgtgtccctt tctctaaatg aagtggcact
1981 aaggactcag ggggaaagaa atcaggggac atgttataga agttatgaaa agacaaccac
2041 atggtcaggc tctgtctctg ggtctctagg gctctgcagc agcagtggtc cttcgattag
2101 ttaaaactct cctaggtcga cactctggg totcaatccc cttggaaatt cttggtgcat
2161 taaatgaagc cttaccccat tactcggtt ctctctgtaa gggggctcca ttttccctcc
2221 tctctttaa tgaccaccta aaggacagta tattaacaag caaagtcgat tcaacaacag
2281 cttcttccca gtcacttttt ttttctcac tgccatcaca tactaacctt atactttgat
2341 ctattctttt tggttatgag agaaatgttg ggcaactgtt tttacctgat ggttttaagc
2401 tgaacttgaa ggactgggtc ctattctgaa acagtataat tatgtataat agtatatagc
2461 catgcatggc aaatatttta atatttctgt tttcatttcc tgttggaat attatcctgc
2521 ataatagcta ttggaggctc ctacgtgaaa gatcccaaaa ggattttggt ggaaaactag
2581 ttgtaatctc acaaactcaa cactaccatc aggggttttc tttatggcaa agccaaaaata
2641 gctcctacaa tttcttatat cctcgctcat gtggcagtat ttatttattt atttggaagt
2701 ttgcctatcc ttctatatat atagatatat ataaaaatgt aacccctttt tcccttcttc
2761 tgttttaaat aaaaaataaa tttatctcag cttctgttag cttatcctct ttgtagtact
2821 acttaaaagc atgtcggaat ataagaataa aaaggattat gggaggggaa cattagggaa
2881 atccagagaa ggcaaaattg aaaaaaagat tttagaattt taaaattttc aaagatttct
2941 tccattcata aggagactca atgattttta ttgatctaga cagaattatt taagttttat
3001 caatatggga tttctggt

```

10

20

30

FGF23アミノ酸配列(NP_065689) (配列番号: 35)

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs YHLQIHKNGH
61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
121 ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241 PEGCRPFAKF I

```

FGF23(R179Q)アミノ酸配列(配列番号: 36)

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs YHLQIHKNGH
61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
121 ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241 PEGCRPFAKF I

```

40

【表 16】

ヒトベタークロードメイン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 fsiswprlfp dgivtvanak glgyystlld
181 alvlrniepi vtlyhwdlpl algekyggwk ndtiidifnd yatycfmgf drvkywiti
241 npylvawhgy gtgmhapgek gnlaavytv g hnlakahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
301 gshwiepnrs entmdifkcg qsmvsvlgwf anpihgddgy pegmrkklfs vlpifseae
361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgg nvslnlreal nwikleyannp riliaengwf
421 tdsrvktedt taiymmknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglgy
481 vdfnsqker kpkssahyyk qiirengf

```

ヒトベタークロードメイン2(b-KL-D2)アミノ酸配列(配列番号:38)

```

571          trpaqctdfv nikkqlemla
rmkvthyrfa
601 ldwasvlptg nlsavnrqal ryyrcvvseg lklgisamvt lypthahlg
lpepllhadv
661 wlnpstaeaf qayaglcfcg lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsndtyg
aahnlhvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia
wfaeplfktg
781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrlkgtvdf calnhfttrf
vmheqlagrs
841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgv kllrwvrrny gdmidiyas
gidddaled
901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrkgyya fklaeekskp rfgfftsdfk
akssiqfynk
961 vissrgf

```

ベタークロー細胞外ドメイン(シグナルペプチドを有さない)
アミノ酸配列(配列番号:39)

```

52          gfsdgdrai
61 wsknpnftpv nesqlflydt fpknffwgig tgalqvegsw kkdgkgpsiw dhfihthlkn
121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlfp dgivtvanak glgyystlld
181 alvlrniepi vtlyhwdlpl algekyggwk ndtiidifnd yatycfmgf drvkywiti
241 npylvawhgy gtgmhapgek gnlaavytv g hnlakahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
301 gshwiepnrs entmdifkcg qsmvsvlgwf anpihgddgy pegmrkklfs vlpifseae
361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgg nvslnlreal nwikleyannp riliaengwf
421 tdsrvktedt taiymmknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglgy
481 vdfnsqker kpkssahyyk qiirengfsl kestpdvqgg fpcdfswgvt esvlkpesva
541 sspqfsdphl ywnatgnrl lhrvegvrk trpaqctdfv nikkqlemla rmkvthyrfa
601 ldwasvlptg nlsavnrqal ryyrcvvseg lklgisamvt lypthahlg lpepllhadv
661 wlnpstaeaf qayaglcfcg lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsndtyg aahnlhvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfktg
781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrlkgtvdf calnhfttrf vmheqlagrs
841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgv kllrwvrrny gdmidiyas gidddaled
901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrkgyya fklaeekskp rfgfftsdfk akssiqfynk
961 vissrgfpfe nsssrscqtq entectvcif lvqkkpl

```

シグナルペプチドを有さないクロー-FGF23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 DTFTTHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL

```

【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 YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQF QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYV MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLL G SSWGGLIHL Y TATARN SYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHFNTP I
 1151 PRRHTRS AED D SERDPLNVL KPRARMT PAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

10

シグナルペプチドを有さない s クロトロー 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)

51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QPHGKGASIW DTFTTHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 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 YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQF QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYV MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLL G SSWGGLIHL Y TATARN SYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHFNTP I
 1151 PRRHTQSAED D SERDPLNVL KPRARMT PAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

20

30

シグナルペプチドを有さない FGF23 (配列番号: 42)

61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
 121 ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTS
 181 AEDDSESDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
 241 PEGCRPFAKF I

40

【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 YHLQIHKNHG
61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
121 ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PFPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARM T PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241 FEGCRPFAKF I

```

10

κロト-シグナルペプチドを有するκロト- (配列番号: 44)

```

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGKASIW DTFTHHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLENG SAGVPNREGL RYRRLERL RELGVQFVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GR LAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
351 DFTSEKKFI KGTAFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGEFWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTLSQ FTDLNVYLWD
551 VHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALQEMHV THFRFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWE NP YALAFAYE RLCFOELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMDWLNQ RNNFLPYFT EDEKKLIQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEFKAS MKHYRKIDS
951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SL

```

20

Igシグナルペプチドを有するκロト- (配列番号: 45)

```

1 MSVLTQVLAL LLLWLTGLGG RRLRAEPGDG AQTWARFSRP PAPEAAGLFQ
51 GTFFPDGFLWA VGSAAVQTEG GWQHQKGAS IWDTFTHHPL APPGDSRNAS
101 LPLGAPSLQ PATGDVASDS YNNVFRDTEA LRELGVTHYR FSISWARVLP
151 NGSAGVPNRE GLRYRRLLE RLRELGVQPV VTLYHWDLPQ RLQDAYGGWA
201 NRALADHFRD YAE LCFRHF GQVKYWITID NPYVVAWHGY ATGR LAPGIR
251 GSPRLGYLVA HNLLAHAKV WHLYNTSFRP TQGGQVSIAL SSHWINPRRM
301 TDHSIKECQK SLDFVLGWFA KPVFIDGDYP ESMKNNLSSI LPDFTSEKK
351 FIKGTADFFA LCFGPTLSFQ LLDPHMKFRQ LESP NLRQLL SWIDLEFNHP
401 QIFIVENGWF VSGTTKRDDA KYMYLKKFI METLKAIKLD GVDVIGYTAW
451 SLMDGFEWHR GYSIRRGLFY VDFLSQDKML LPKSSALFYQ KLIKNGFPP
501 LPENQPLEGT FPCDFAWGVV DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLI
551 KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI QPQIALLQEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ
601 SQVNHTILQY YRCASELVR VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAWE
651 NPYTALAFAYE YARLCFQELG HHVKLWITMN EPYTRNMTYS AGHNLLKAHA
701 LAWHVYNEKF RHAQNGKISI ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLEFDIG
751 WLAEPFIFGSG DYPWVMDWL NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ GTFDFLALSH
801 YTTILVDSEK EDPIKYNDYL EVQEMTDITW LNPSQVAVV PWGLRKVLNW
851 LKFKYGDLP M YIISNGIDDG LHAEDDQLRV YMQNYINEA LKAHILDGIN
901 LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY RYAADQFEKP ASMKHYRKII DSNFGPGPET
951 LERFCPEEFT VTECSFFHT RKS L*

```

30

40

【 0 2 9 2 】

【表 19】

sクロトー-FGF23-FcLALA v1 (配列番号: 46)

```

1  ATGCCCGCCA GCGCCCCGCC GCGCCGCCCG CGGCCGCCGC CGCCGTCGCT
   GTCGCTGCTG
61  CTGGTGCTGC TGGGCCTGGG CGGCCGCCGC CTGCGTGCGG AGCCGGGGCGA
   CGGCGCGCAG
121 ACCTGGGCCC GTTTCCTCGG GCCTCCTGCC CCCGAGGCCG CGGGCCTCTT
   CCAGGGCACC
181 TTCCCCGACG GCTTCCTCTG GGCCGTGGGC AGCGCCGCCT ACCAGACCGA
   GGGCGGCTGG
241 CAGCAGCACG GCAAGGGTGC GTCCATCTGG GATACGTTCA CCCACCAACC
   CCTGGCACCC
301 CCGGGAGACT CCCGGAACGC CAGTCTGCCG TTGGGCGCCC CGTCGCCGCT
   GCAGCCCGCC
361 ACCGGGGACG TAGCCAGCGA CAGCTACAAC AACGTCTTCC GCGACACGGA
   GCGGCTGCGC
421 GAGCTCGGGG TCACTACTA CCGCTTCTCC ATCTCGTGGG CGCGAGTGCT
   CCCCAATGGC
481 AGCGCGGGCG TCCCCAACCG CGAGGGGCTG CGCTACTACC GGCGCCTGCT
   GGAGCGGCTG
541 CGGGAGCTGG GCGTGACGCC CGTGGTCACC CTGTACCACT GGGACCTGCC
   CCAGCGCCTG
601 CAGGACGCCT ACGGCGGCTG GGCCAACCGC GCCCTGGCCG ACCACTTCAG
   GGATTACGCG
661 GAGCTCTGCT TCCGCCACTT CGGCGGTCAG GTCAAGTACT GGATCACCAT
   CGACAACCCC
721 TACGTGGTGG CCTGGCACGG CTACGCCACC GGGCGCCTGG CCCCCGGCAT
   CCGGGGCAGC
781 CCGCGGCTCG GGTACCTGGT GGCGCACAACTCCTCCTGG CTCATGCCAA
   AGTCTGGCAT
841 CTCTACAATA CTTCTTTCCG TCCCACTCAG GGAGGTCAGG TGTCCATTGC
   CCTAAGCTCT
901 CACTGGATCA ATCCTCGAAG AATGACCGAC CACAGCATCA AAGAATGTCA
   AAAATCTCTG
961 GACTTTGTAC TAGGTTGGTT TGCCAAACCC GTATTTATTG ATGGTGAATA
   TCCCAGAGAGC
1021 ATGAAGAATA ACCTTTCATC TATTCTGCCT GATTTTACTG AATCTGAGAA
   AAAGTTCATC
1081 AAAGGAACCT CTGACTTTTT TGCTCTTTGC TTTGGACCCA CCTTGAGTTT
   TCAACTTTTG
1141 GACCCTCACA TGAAGTTCCG CCAATTGGAA TCTCCCAACC TGAGGCAACT
   GCTTTCCTGG
1201 ATTGACCTTG AATTTAACCA TCCTCAAATA TTTATTGTGG AAAATGGCTG
   GTTTGTCTCA
1261 GGGACCACCA AGAGAGATGA TGCCAAATAT ATGTATTACC TCAAAAAGTT
   CATCATGGAA
1321 ACCTTAAAAAG CCATCAAGCT GGATGGGGTG GATGTCATCG GGTATACCGC
   ATGGTCCCTC
1381 ATGGATGGTT TCGAGTGGCA CAGAGGTTAC AGCATCAGGC GTGGACTCTT
   CTATGTTGAC
1441 TTTCTAAGCC AGGACAAGAT GTTGTTGCCA AAGTCTTCAG CCTTGTTCTA
   CCAAAAGCTG
1501 ATAGAGAAAA ATGGCTTCCC TCCTTTACCT GAAAATCAGC CCCTAGAAGG
   GACATTTCCT
1561 TGTGACTTTG CTTGGGGAGT TGTGACAAC TACATTCAAG TAGATACCAC
   TCTGTCTCAG
1621 TTTACCGACC TGAATGTTTA CCTGTGGGAT GTCCACCACA GTAAAAGGCT
   TATTAAAGTG

```

10

20

30

40

【表 20】

1681 GATGGGGTTG TGACCAAGAA GAGGAAATCC TACTGTGTTG ACTTTGCTGC
 CATCCAGCCC
 1741 CAGATCGCTT TACTCCAGGA AATGCACGTT ACACATTTTC GCTTCTCCCT
 GGACTGGGCC
 1801 CTGATTCTCC CTCTGGGTAA CCAGTCCCAG GTGAACCACA CCATCCTGCA
 GTACTATCGC
 1861 TGCATGGCCA GCGAGCTTGT CCGTGTCAAC ATCACCACAG TGGTGGCCCT
 GTGGCAGCCT
 1921 ATGGCCCCGA ACCAAGGACT GCCGCGCCTC CTGGCCAGGC AGGGCGCCTG
 GGAGAACCCC
 1981 TACTCTGCCC TGGCCTTTGC AGAGTATGCC CGACTGTGCT TTCAAGAGCT
 CGGCCATCAC
 2041 GTCAAGCTTT GGATAACGAT GAATGAGCCG TATACAAAGGA ATATGACATA
 CAGTGCTGGC
 2101 CACAACCTTC TGAAGGCCCA TGCCCTGGCT TGGCATGTGT ACAATGAAAA
 GTTTAGGCAT
 2161 GCTCAGAATG GGAATATATC CATAGCCTTG CAGGCTGATT GGATAGAACC
 TGCCCTGCCCT
 2221 TTCTCCCCAA AGGACAAAGA GGTGGCCGAG AGAGTTTGG AATTTGACAT
 TGGCTGGCTG
 2281 GCTGAGCCCA TTTTCGGCTC TGGAGATTAT CCATGGGTGA TGAGGGACTG
 GCTGAACCAA
 2341 AGAAACAATT TTCTTCTTCC TTATTTCACT GAAGATGAAA AAAAGCTAAT
 CCAGGGTACC
 2401 TTTGACTTTT TGGCTTTAAG CCATTATACC 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 GCCCACATAC TGGATGGTAT CAATCTTTGC GGATACTTTG CTTATTGCTT
 TAACGACCGC
 2761 ACAGCTCCGA GGTTTGGCCT CTATCGTTAT GCTGCAGATC AGTTTGAGCC
 CAAGGCATCC
 2821 ATGAAACATT ACAGGAAAAT TATTGACAGC AATGGTTTCC CGGGCCCAGA
 AACTCTGGAA
 2881 AGATTTTGTC CAGAAGAATT CACCGTGTGT ACTGAGTGCA GTTTTTTTCA
 CACCCGAAAG
 2941 TCTTTAGGAT CCGGAGGTGG AGGTTCAGGA GGTGGAGGTT CAGGAGGTGG
 AGGTTCACTT
 3001 AAGTATCCCA ATGCCTCCCC ACTGCTCGGC TCCAGCTGGG GTGGCCTGAT
 CCACCTGTAC
 3061 ACAGCCACAG CCAGGAACAG CTACCACCTG CAGATCCACA AGAATGSCCA
 TGTGGATGGC
 3121 GCACCCCATC AGACCATCTA CAGTGCCCTG ATGATCAGAT CAGAGGATGC
 TGGCTTTGTG
 3181 CTGATTACAG GTGTGATGAG CAGAAGATAC CTCTGCATCG ATTTCAAGG
 CAACATTTTT
 3241 GGATCACACT ATTTGACCCC GGAGAACTGC AGGTTCCAAC ACCAGACGCT
 GGAAACCGG
 3301 TACGACGTCT ACCACTCTCC TCAGTATCAC TTCTGGTCA GTCTGGGCCG
 GGCGAAGAGA
 3361 GCCTTCCTGC CAGGCATGAA CCCACCCCG TACTCCAGT TCCTGTCCCG
 GAGGAACGAG
 3421 ATCCCCCTAA TTCATTCAA CACCCCATTA CCACGGCGGC ACACCCAGAG
 CGCCGAGGAC
 3481 GACTCGGAGC GGGACCCCTT GAACGTGCTG AAGCCCCGGG CCGGATGAC
 CCCGGCCCCG

10

20

30

40

【 0 2 9 3 】

【表 2 1】

3541 GCCTCCTGTT CACAGGAGCT CCCGAGCGCC GAGGACAACA GCCCGATGGC
 CAGTGACCCA
 3601 TTAGGGGTGG TCAGGGGCGG TCGAGTGAAC ACGCACGCTG GGGGAACGGG
 CCCGGAAGGC
 3661 TGCCGCCCT TCGCCAAGTT CATCGGAGGT GGAGGTTC AAACCCACAC
 GTGTCTCCT
 3721 TGTCTGCCC CAGAAGCAGC AGGTGGTCCA TCAGTTTTTC TTTTCCCTCC
 CAAACCCAAG
 3781 GATACGCTGA TGATCTCTCG CACGCCTGAG GTGACATGCG TCGTAGTAGA
 CGTGAGCCAC
 3841 GAAGATCCCG AGGTGAAGTT CAATTGGTAT GTGGACGGAG TAGAAGTGCA
 TAACCGGAAA
 3901 ACTAAGCCGC GCGAGGAACA ATATAACAGT ACTTACAGGG TGGTATCCGT
 GCTCACAGTC
 3961 CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGTAAGGAA TACAAGTGCA AAGTAAGCAA
 CAAGGCACTT
 4021 CCCGCGCCTA TTGAGAAAAC AATCTCCAAG GCGAAGGGAC AACCAAGAGA
 ACCTCAGGTT
 4081 TACACTCTCC CGCCTTCCAG GGAAGAGATG ACCAAAAATC AAGTTTCCCT
 GACTTGCCTC
 4141 GTCAAAGGAT TCTACCCTTC CGACATTGCT GTTGAATGGG AAAGCAATGG
 ACAACCAGAG
 4201 AACAACTACA AGACAACACC CCCGGTGCTG GATAGTGACG GATCTTTCTT
 TCTCTACTCA
 4261 AAGCTGACCG TGGATAAGTC CAGGTGGCAG CAGGGAAACG TGTTTCTCTG
 CTCTGTCATG
 4321 CATGAAGCGC TGCATAATCA CTATACCCAG AAGTCTCTGA GCTTGAGCCC
 AGGCAAGTAA

10

20

sクロト -- FGF23-FcLALA v1 (配列番号: 47)

1 MPASAPRRRP RPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLOPA TGDVASDSYN NVRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRLQLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYI MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYR AADQFEPKAS MKHYRKIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLV TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRNE IPLIHNTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFKFIGG GSKTHTCPP CPAPEAAGGP
 1251 SVFLFPKPK DTLMSRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 1301 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 1351 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 1401 NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSQSVI HEALHNHYTQ

30

40

【表 2 2】

1451 KSLSLSPGK*

sクローン-FGF23-FcLALA v2(配列番号:48)

```

1  ATGCCCCGCA GCGCCCCGCC GCGCCGCCCG CGGCCGCCGC CGCCGTCGCT
   GTCGCTGCTG
61  CTGGTGCTGC TGGGCCTGGG CGGCCGCCGC CTGCGTGCGG AGCCGGGCGA
   CGGCGCGCAG
121 ACCTGGGCCC GTTTCCTCGG GCCTCCTGCC CCCGAGGCCG CGGGCCTCTT
   CCAGGGCACC
181 TTCCCGGACG GCTTCCTCTG GCCCGTGGGC AGCGCCGCCT ACCAGACCGA
   GGGCGGCTGG
241 CAGCAGCAGC GCAAGGGTGC GTCCATCTGG GATACGTTCA CCCACCACCC
   CCTGGCACCC
301 CCGGGAGACT CCCGGAACGC CAGTCTGCCG TTGGGCGCCC CGTCGCCGCT
   GCAGCCCGCC
361 ACCGGGGACG TAGCCAGCGA CAGCTACAAC AACGTCTTCC GCGACACGGA
   GGGCGCTGCG
421 GAGCTCGGGG TCACTCACTA CCGCTTCTCC ATCTCGTGGG CGCGAGTGCT
   CCCC AATGGC
481 AGCGCGGGCG TCCCCAACCG CGAGGGGGTG CGCTACTACC GGCGCCTGCT
   GGAGCGGCTG
541 CGGGAGCTGG GCGTGCAGCC CGTGGTCACC CTGTACCACT GGGACCTGCC
   CCAGCGCCTG
601 CAGGACGCCT ACGGCGGCTG GGCCAACCGC GCCCTGGCCG ACCACTTCAG
   GGATTACGCG
661 GAGCTCTGCT TCCGCCACTT CGGCGGTCAG GTCAAGTACT GGATCACCAT
   CGACAACCCC
721 TACGTGGTGG CCTGGCACGG CTACGCCACC GGGCGCCTGG CCCCCGGCAT
   CCGGGGCAGC
781 CCGCGGCTCG GGTACCTGGT GGGCGACAAC CTCCTCCTGG CTCATGCCAA
   AGTCTGGCAT
841 CTCTACAATA CTTCTTTCCG TCCCACTCAG GGAGGTCAGG TGTCCATTGC
   CCTAAGCTCT
901 CACTGGATCA ATCCTCGAAG AATGACCGAC CACAGCATCA AAGAATGTCA
   AAAATCTCTG
961 GACTTTGTAC TAGGTTGGTT TGCCAAACCC GTATTTATTG ATGGTGACTA
   TCCCGAGAGC
1021 ATGAAGAATA ACCTTTCATC TATTCTGCCT GATTTTACTG AATCTGAGAA
   AAAGTTCATC
1081 AAAGGAACTG CTGACTTTTT TGCTCTTTGC TTTGGACCCA CCTTGAGTTT
   TCAACTTTTG
1141 GACCCTCACA TGAAGTTCGG CCAATTGGAA TCTCCCAACC TGAGGCAACT
   GCTTTCCTGG
1201 ATTGACCTTG AATTTAACCA TCCTCAAATA TTTATTGTGG AAAATGGCTG
   GTTGTCTCA
1261 GGGACCACCA AGAGAGATGA TGCCAAATAT ATGTATTACC TCAAAAAGTT
   CATCATGGAA
1321 ACCTTAAAAG CCATCAAGCT GGATGGGGTG GATGTCATCG GGTATACCGC
   ATGGTCCCTC
1381 ATGGATGGTT TCGAGTGGCA CAGAGGTTAC AGCATCAGGC GTGGACTCTT
   CTATGTTGAC
1441 TTTCTAAGCC AGGACAAGAT GTTGTTGCCA AAGTCTTCAG CCTTGTTCTA
   CCAAAGCTG
1501 ATAGAGAAAA ATGGCTTCCC TCCTTTACCT GAAAATCAGC CCCTAGAAGG
   GACATTCCC
1561 TGTGACTTTG CTTGGGGAGT TGTTGACAAC TACATTCAAG TAGATACCAC
   TCTGTCTCAG
1621 TTTACCGACC TGAATGTTTA CCTGTGGGAT GTCCACCACA GTAAAAGGCT
   TATTAAAGTG

```

10

20

30

40

【 0 2 9 4 】

【表 2 3】

1681 GATGGGGTTG TGACCAAGAA GAGGAAATCC TACTGTGTG ACTTTGCTGC
 CATCCAGCCC
 1741 CAGATCGCTT TACTCCAGGA AATGCACGTT ACACATTTTC GCTTCTCCCT
 GGA CTGGGCC
 1801 CTGATTCTCC CTCTGGGTAA CCAGTCCCAG GTGAACCACA CCATCCTGCA
 GTACTATCGC
 1861 TGCATGGCCA GCGAGCTTGT CCGTGTCAAC ATCACCCAG TGGTGGCCCT
 GTGGCAGCCT
 1921 ATGGCCCCGA ACCAAGGACT GCCGCGCCTC CTGGCCAGGC AGGGCGCCTG
 GGAGAACCCC
 1981 TACACTGCCG TGGCCTTTGC AGAGTATGCC CGACTGTGCT TTCAAGAGCT
 CGGCCATCAC
 2041 GTCAAGCTTT GGATAACGAT GAATGAGCCG TATACAAGGA ATATGACATA
 CAGTGCTGGC
 2101 CACAACCTTC TGAAGGCCCA TGCCCTGGCT TGGCATGTGT ACAATGAAAA
 GTTTAGGCAT
 2161 GCTCAGAAATG GAAAAATATC CATAGCCTTG CAGGCTGATT GGATAGAACC
 TGCCCTGCCCT
 2221 TTCTCCCAAA AGGACAAAGA GGTGGCCGAG AGAGTTTTGG AATTTGACAT
 TGGCTGGCTG
 2281 GCTGAGCCCA TTTTCGGCTC TGGAGATTAT CCATGGGTGA TGAGGGACTG
 GCTGAACCAA
 2341 AGAAACAATT TTCTTCTTCC TTATTTCACT GAAGATGAAA AAAAGCTAAT
 CCAGGGTACC
 2401 TTTGACTTTT TGGCTTTAAG CCATTATACC 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 GGTGIATTAT ATGCAGAAAT ACATAAACGA
 AGCTCTCAAA
 2701 GCCCACATAC TGGATGGTAT CAATCTTTGC GGATACTTTG CTTATTCGTT
 TAACGACCGC
 2761 ACAGCTCCGA GGTTTGGCCT CTATCGTTAT GCTGCAGATC AGTTTGAGCC
 CAAGGCATCC
 2821 ATGAAACATT ACAGGAAAAAT TATTGACAGC AATGGTTTCC CGGGCCCAGA
 AACTCTGGAA
 2881 AGATTTTGTG CAGAAGAATT CACCGTGTGT ACTGAGTGCA GTTTTTTTCA
 CACCCGAAAG
 2941 TCTTTAGGAT CCGGAGGTGG AGGTTCAGGA GGTGGAGGTT CAGGAGGTGG
 AGGTTCACTT
 3001 AAGTATCCCA ATGCCTCCCC ACTGCTCGGC TCCAGCTGGG GTGGCCTGAT
 CCACCTGTAC
 3061 ACAGCCACAG CCAGGAACAG CTACCACCTG CAGATCCACA AGAATG3CCA
 TGTGGATGGC
 3121 GCACCCCATC AGACCATCTA CAGTCCCTG ATGATCAGAT CAGAGGATGC
 TGGCTTTGTG
 3181 GTGATTACAG GTGTGATGAG CAGAAGATAC CTCTGCATGG ATTTCA3AGG
 CAACATTTTT
 3241 GGATCACACT ATTTGACACC GGAGAATGCG AGGTTC3AAC ACCAGACGCT
 GGAAAACCGG
 3301 TACGACGTCT ACCACTCTCC TCAGTATCAC TTCCTGGTCA GTCTGG3CCG
 GGCGAAGAGA
 3361 GCCTTCCTGC CAGGCATGAA CCCACCCCG TACTCCAGT TCCTGT3CCG
 GAGGAACGAG
 3421 ATCCCCCTAA TTCACTTCAA CACCCCCATA CCACGGCGGC ACACCCAGAG
 CGCCGAGGAC
 3481 GACTCGGAGC GGGACCCCT GAACGTGCTG AAGCCCCGGG CCCGGATGAC
 CCCGGCCCG

10

20

30

40

【表 2 4】

3541 GCCTCCTGTT CACAGGAGCT CCCGAGCGCC GAGGACAACA GCCCGATGGC
 CAGTGACCCA
 3601 TTAGGGGTGG TCAGGGGCGG TCGAGTGAAC ACGCACGCTG GGGGAACGGG
 CCCGGAAGGC
 3661 TGCCGCCCTT TCGCCAAGTT CATCGGAGGT GGAGGTTCAG CCCAGAAGC
 AGCAGGTGGT
 3721 CCATCAGTTT TTCTTTTCCC TCCCAAACCC AAGGATACGC TGATGATCTC
 TCGCACGCCCT
 3781 GAGGTGACAT GCGTCGTAGT AGACGTGAGC CACGAAGATC CCGAGGTGAA
 GTTCAATTGG
 3841 TATGTGGACG GAGTAGAAGT GCATAACGCG AAAACTAAGC CGCGCGAGGA
 ACAATATAAC
 3901 AGTACTTACA GGGTGGTATC CGTGCTCACA GTCCTGCACC AGGACTGGCT
 GAACGGTAAG
 3961 GAATACAAGT GCAAAGTAAG CAACAAGGCA CTTCCCGCGC CTATTGAGAA
 AACAATCTCC
 4021 AAGGCGAAGG GACAACCAAG AGAACCTCAG GTTTACACTC TCCCGCCTTC
 CAGGGAAGAG
 4081 ATGACCAAAA ATCAAGTTTC CCTGACTTGC CTCGTCAAAG GATTCTACCC
 TTCCGACATT
 4141 GCTGTTGAAT GGGAAAGCAA TGGACAACCA GAGAACAACCT ACAAGACAAC
 ACCCCCGGTG
 4201 CTGGATAGTG ACGGATCTTT CTTTCTCTAC TCAAAGCTGA CCGTGGATAA
 GTCCAGGTGG
 4261 CAGCAGGGAA ACGTGTTTTC CTGCTCTGTC ATGCATGAAG CGCTGCATAA
 TCACTATAAC
 4321 CAGAAGTCTC TGAGCTTGAG CCCAGGCAAG TAA

10

20

sノロウイルス-FGF23-FcLALA v2(配列番号:49)

1 MPASAPPRRP RPPPPSLSL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGKASIW DTFTTHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLPQA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 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 FIVENGWVFS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDITLSQ FTDLNVYLWD
 551 VVHSHKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTAFAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNSYHL QIHKNHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRNE IPLIHNTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFIGG GSAPEAAGG PSVFLFPPKP
 1251 KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 1301 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 1351 VYTLPPSREE MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
 1401 LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSCV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
 1451 *

30

40

【 0 2 9 5 】

【表 2 5】

FGF23-FcLALA v1 (配列番号:50)

1 ATGTTGGGGG CCCGCTCAG GCTCTGGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG
 CAGCATGAGC
 61 GTCCTCAGAG CCTATCCCAA TGCTCCCCA CTGCTCGGCT CCAGCTGGGG
 TGGCCTGATC
 121 CACCTGTACA CAGCCACAGC CAGGAACAGC TACCACCTGC AGATCCACAA
 GAATGGCCAT
 181 GTGGATGGCG CACCCCATCA GACCATCTAC AGTGCCCTGA TGATCAGATC
 AGAGGATGCT
 241 GGCTTTGTGG TGATTACAGG TGTGATGAGC AGAAGATACC TCTGCATGGA
 TTTCAGAGGC
 301 AACATTTTGT GATCACACTA TTTCGACCCG GAGAACTGCA GGTTCACAAC
 CCAGACGCTG
 361 GAAAACGGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG
 TCTGGGCCGG
 421 GCGAAGAGAG CCTTCCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCGT ACTCCAGTT
 CCTGTCCCGG
 481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAC CACGGCGGCA
 CACCCAGAGC
 541 GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTG AACGTGCTGA AGCCCCGGC
 CCGGATGACC
 601 CCGGCCCCCG CCTCCTGTTC ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG
 CCCGATGGCC
 661 AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG
 GGGAACGGGC
 721 CCGGAAGGCT GCCGCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTCAAA
 AACCCACAGC
 781 TGTCTCTCTT GTCCTGCCCC AGAAGCAGCA GGTGGTCCAT CAGTTTTTCT
 TTCCCTCCC
 841 AAACCCAAAG ATACGCTGAT GATCTCTCGC ACGCCTGAGG TGACATGCGT
 CGTAGTAGAC
 901 GTGAGCCACG AAGATCCCGA GGTGAAGTTC AATTGGTATG TGGACGGAGT
 AGAAGTGCAT
 961 AACGCGAAAA CTAAGCCGCG CGAGGAACAA TATAACAGTA CTTACAGGGT
 GGTATCCGTG
 1021 CTCACAGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC GGTAAGGAAT ACAAGTGCAA
 AGTAAGCAAC
 1081 AAGGCACCTC CCGCGCTAT TGAGAAAACA ATCTCCAAGG CGAAGGGACA
 ACCAAGAGAA
 1141 CCTCAGGTTT ACACTCTCCC GCCTTCCAGG GAAGAGATGA CCAAAAATCA
 AGTTTCCCTG
 1201 ACTTGCTCG TCAAAGGATT CTACCCTTCC GACATTGCTG TTGAATGGGA
 AAGCAATGGA
 1261 CAACCAGAGA ACAACTACAA GACAACACCC CCGGTGCTGG ATAGTGACGG
 ATCTTTCTTT
 1321 CTCTACTCAA AGCTGACCGT GGATAAGTCC AGGTGGCAGC AGGGAAACGT
 GTTTTCCCTG
 1381 TCTGTATGCT ATGAAGCGCT GCATAATCAC TATACCCAGA AGTCTCTGAG
 CTTGAGCCCA
 1441 GGCAAGTAA

10

20

30

FGF23(R179Q)-FcLALAv1 (配列番号:51)

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

40

【表 2 6】

151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAPF
 251 IGGGSKTHT CPFCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 301 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 401 TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTF PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK*

FGF23-FcLALA v2(配列番号:52)

1 ATGTTGGGGG CCCGCCTCAG GCTCTGGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG
 CAGCATGAGC
 61 GTCTCAGAG CCTATCCCAA TGCCTCCCCA CTGCTCGGCT CCAGCTGGGG
 TGGCCTGATC
 121 CACCTGTACA CAGCCACAGC CAGGAACAGC TACCACCTGC AGATCCACAA
 GAATGGCCAT
 181 GTGGATGGCG CACCCCATCA GACCATCTAC AGTGCCCTGA TGATCAGATC
 AGAGGATGCT
 241 GGCTTTGTGG TGATTACAGG TGTGATGAGC AGAAGATACC TCTGCATGGA
 TTTGAGAGGC
 301 AACATTTTGG GATCACACTA TTTCGACCCG GAGAACTGCA GGTCCAACA
 CCAGACGCTG
 361 GAAAACGGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG
 TCTGGGCCGG
 421 GCGAAGAGAG CCTTCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCGT ACTCCAGTT
 CCTGTCCCGG
 481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAC CACGGCGGCA
 CACCCAGAGC
 541 GCGGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTG AACGTGCTGA AGCCCGGGC
 CCGGATGACC
 601 CCGGCCCCGG CCTCCTGTTC ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG
 CCCGATGGCC
 661 AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG
 GGGAACGGGC
 721 CCGGAAGGCT GCCGCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTGAGC
 CCCAGAAGCA
 781 GCAGGTGGTC CATCAGTTTT TCTTTTCCCT CCCAAACCCA AGGATACGCT
 GATGATCTCT
 841 CGCAGCCTG AGGTGACATG CGTCGTAGTA GACGTGAGCC ACGAAGATCC
 CGAGGTGAAG
 901 TTCAATTGGT ATGTGGACGG AGTAGAAGTG CATAACGCGA AACTAAGCC
 GCGCGAGGAA
 961 CAATATAACA GTACTTACAG GGTGGTATCC GTGCTCACAG TCCTGCACCA
 GGAATGGCTG
 1021 AACGGTAAGG AATACAAGTG CAAAGTAAGC AACAAGGCAC TTCCCGCGCC
 TATTGAGAAA
 1081 ACAATCTCCA AGGCGAAGGG ACAACCAAGA GAACCTCAGG TTTACTCTCT
 CCCGCCTTCC
 1141 AGGGAAGAGA TGACCAAAAA TCAAGTTTCC CTGACTTGCC TCGTCAAAGG
 ATTCTACCTT
 1201 TCCGACATTG CTGTTGAATG GGAAAGCAAT GGACAACCAG AGAACAACCTA
 CAAGACAACA
 1261 CCCCCGGTGC TGGATAGTGA CGGATCTTTC TTTCTCTACT CAAAGCTGAC
 CGTGGATAAG
 1321 TCCAGGTGGC AGCAGGGAAA CGTGTTTTCC TGCTCTGTCA TGCATGAAGC
 GCTGCATAAT
 1381 CACTATACCC AGAAGTCTCT GAGCTTGAGC CCAGGCAAGT AA

10

20

30

40

FGF23(R179Q)-FcLALAv2(配列番号:53)

【0296】

【表 2 7】

```

1  MLGARLRLWV  CALCSVCSMS  VLRAYPNASP  LLGSSWGGLI  HLYTATARNs
51 YHLQIHKNHG  VDGAPHQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP  ENCRFQHQTl  ENGyDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR  RNEIPLIHFN  TPIPRRHtQS  AEDDSERDPL  NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG  PEGCRPFAKE
251 IGGGGSAPeA  AGGPSVFLFP  PKPKDTLMIS  RTPEVTCVVV  DVSHEDPEVK
301 FNWYVDGVEV  HNAKTKPREE  QYNSTYRVVS  VLTVLHQDWL  NGKEYKCKVS
351 NKALPAPIEK  TISKAKGQPR  EPQVYTLFPS  REEMTKNQVS  LTCLVKGFYP
401 SDIAVEWESN  GQPENNYKTT  PPVLDSGGSF  FLYSKLTVDK  SRWQQGNVFS
451 CSVMEALHN  HYTQKSLSLs  PGK*

```

【表 28】

sクローターFGF23(R1156Q、C1183S)のアミノ酸配列(配列番号:54)

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

```

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAGLFGQT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QOHGKGASIW DTFTTHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLOPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFEVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGEFWHRGY SRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFF CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTALAFAYEA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDEVAE
751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNSYHL QIHKNHVDG APHQTIYSAL
1051 MIRSADAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AELPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHENTPI
1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASSSQELPSA EDNSPMASDP
1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPPAKFI*

```

10

20

sクローターFGF23(R1156Q、C1221S)のアミノ酸配列(配列番号:55)

sクローター: 1-982; リンカー1: 983-1001; FGF23: 1002-1228;

```

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAGLFGQT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QOHGKGASIW DTFTTHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLOPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFEVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGEFWHRGY SRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFF CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTALAFAYEA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDEVAE
751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNSYHL QIHKNHVDG APHQTIYSAL
1051 MIRSADAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG

```

30

40

【0297】

【表 2 9】

1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRNE IPLIHFWTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG SRPFAKFI*

sκロトーFGF23(R1156Q、Q1133A)のアミノ酸配列(配列番号:56)
 sκロトー:1-982;リンカー:1:983-1001;FGF23:1002-1228

1 MPASAPRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPQLPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPMREGL RYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWTIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIQYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIK V DGVVTKKRKS YCVDFAAIQ P QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YALAFAYEA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQDKKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYV MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
 951 NGFFGPETLE RCFPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHL Y TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGHIF GSHYFDPENC RFQHTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSAFLSRNE IPLIHFWTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

10

20

sκロトーFGF23(R1156Q、C1183S、C1221S)のアミノ酸配列(配列番号:57)
 sκロトー:1-982;リンカー:1:983-1001;FGF23:1002-1228

1 MPASAPRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPQLPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPMREGL RYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWTIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIQYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIK V DGVVTKKRKS YCVDFAAIQ P QIALLQEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YALAFAYEA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQDKKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYV MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
 951 NGFFGPETLE RCFPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL

30

40

【表 3 0】

1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNSYHL QIHKNHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNI F GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRNE IPLIHFNTP I
 1151 PRRHTQSAED DSERDFLNVL KPRARMTAP AS~~SS~~QELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG SRPFAKFI*

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

1 MPASAPRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWAFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGASIN DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPQLQA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVL PNG SAGVFNREGL RYRRLLEL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWTIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHFQI FIVENGWFSV GTTKRDBAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQRL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKRRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THERFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAHNP YTAFAEYA RLCFQELGHH VRLWITMNEP YTRNMTYAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPFPGSGDY PWVMRDWLHQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLHNLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
 951 NGFFGPETLE RCPPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNSYHL QIHKNHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNI F GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YS~~A~~FLSRNE IPLIHFNTP I
 1151 PRRHTQSAED DSERDFLNVL KPRARMTAP AS~~SS~~QELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG SRPFAKFI*

10

20

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

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENG YDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPAS~~SS~~QEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 301 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK*

30

【 0 2 9 8 】

【表 3 1】

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

```

1  MLGARLRLWV  CALCSVCSMS  VLRAYPNASP  LLGSSWGGLI  HLYTATARNs
51 YHLQIHKNHG  VDGAPHQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP  ENCRFQHQTl  ENGYDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR  RNEIPLIHFN  TPIPRRHTQS  AEDDSERDPL  NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG  PEGSRPFAKF
251 IGGGGSKTHT  CPPCPAPEAA  GGPSVFLFPP  KPKDTLMISR  TPEVTCVVVD
301 VSHEDPEVKF  NWYVDGVEVH  NAKTKPREEQ  YNSTYRVVSV  LTVLHQDWLN
351 GKEYKCKVSN  KALPAPIEKT  ISKAKGQPRE  PQVYTLPPSR  EEMTKNQVSL
401 TCLVKGFYPS  DIAVEWESNG  QPENNYKTP  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;リンカー:252－256;FcLALA:257－482

```

1  MLGARLRLWV  CALCSVCSMS  VLRAYPNASP  LLGSSWGGLI  HLYTATARNs
51 YHLQIHKNHG  VDGAPHQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP  ENCRFQHQTl  ENGYDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGMN
151 PPPYSAFLSR  RNEIPLIHFN  TPIPRRHTQS  AEDDSERDPL  NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG  PEGCRPFAKF
251 IGGGGSKTHT  CPPCPAPEAA  GGPSVFLFPP  KPKDTLMISR  TPEVTCVVVD
301 VSHEDPEVKF  NWYVDGVEVH  NAKTKPREEQ  YNSTYRVVSV  LTVLHQDWLN
351 GKEYKCKVSN  KALPAPIEKT  ISKAKGQPRE  PQVYTLPPSR  EEMTKNQVSL
401 TCLVKGFYPS  DIAVEWESNG  QPENNYKTP  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;リンカー:252－256;FcLALA:257－482

```

1  MLGARLRLWV  CALCSVCSMS  VLRAYPNASP  LLGSSWGGLI  HLYTATARNs
51 YHLQIHKNHG  VDGAPHQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP  ENCRFQHQTl  ENGYDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR  RNEIPLIHFN  TPIPRRHTQS  AEDDSERDPL  NVLKPRARMT
201 PAPASSSQEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG  PEGSRPFAKF
251 IGGGGSKTHT  CPPCPAPEAA  GGPSVFLFPP  KPKDTLMISR  TPEVTCVVVD
301 VSHEDPEVKF  NWYVDGVEVH  NAKTKPREEQ  YNSTYRVVSV  LTVLHQDWLN
351 GKEYKCKVSN  KALPAPIEKT  ISKAKGQPRE  PQVYTLPPSR  EEMTKNQVSL
401 TCLVKGFYPS  DIAVEWESNG  QPENNYKTP  PVLDSDGsFF  LYSKLTVDKS
451 RWQQGNVFSC  SVMHEALHNH  YTQKSLSLSP  GK*

```

30

【表 3 2】

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

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNHG VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
251 IGGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLEFP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
301 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
351 GKEYKCKVSN KALPAPIEK TISKAKGQPR PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*
```

10

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

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNHG VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
251 IGGGGSAPAA AGGPSVFLEFP KPKDTLMISR RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
301 FNWYVDGVEV HNAKTKPRE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK*
```

20

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

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNHG VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
251 IGGGGSAPAA AGGPSVFLEFP KPKDTLMISR RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
301 FNWYVDGVEV HNAKTKPRE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
```

30

【 0 2 9 9 】

【表 3 3】

451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL S 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 HLYTATARN S
51 YHLQIHKN GH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQT L ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSE RDPL 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 S PGK*

```

10

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

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S
51 YHLQIHKN GH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQT L ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSE RDPL 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 HYTQKSLSL S PGK*

```

20

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 HLYTATARN S
51 YHLQIHKN GH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQT L ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSE RDPL 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

```

30

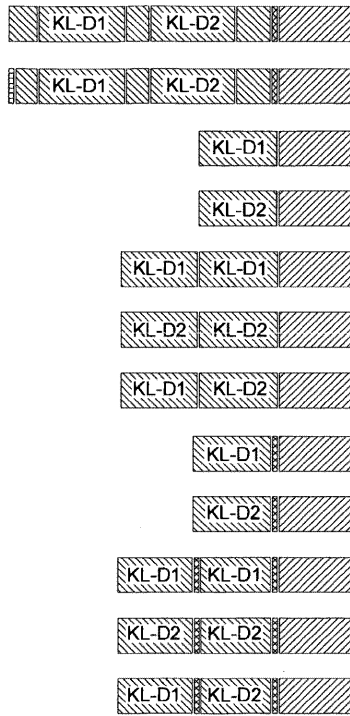
40

【表 3 4】

451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PGK*

【図 1 A】

図 1



KL-D1 (細胞外サブドメイン)またはKL-D2の活性なフラグメント;

KL-D2 (細胞外サブドメイン)またはKL-D2の活性なフラグメント;

KL-D1 (細胞外サブドメイン)またはKL-D2の活性なフラグメント;

KL-D2 (細胞外サブドメイン)またはKL-D2の活性なフラグメント;

【図 2 A】

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

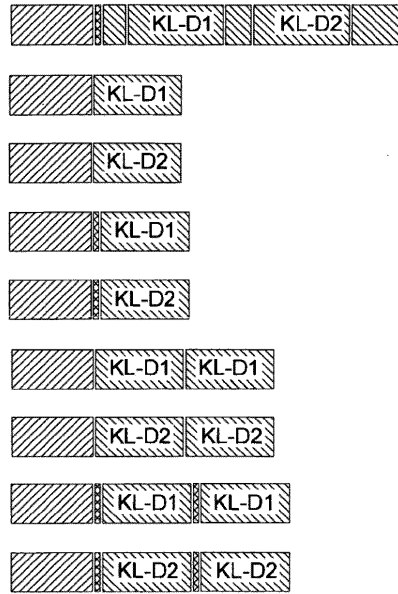
```

1  cgcgcagcat  gccgcgcagc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  ccgtgcgtgt
61  ccgtgcgtgt  ggtgcgtgtg  ggcgtgcgtg  gccgcgcgcg  ccgcgcgcagc
121  gccgcgcagc  ctgggcgcgt  ttctgcgcgc  ctctgcgcgc  ccgcgcgcgcg
181  aggcgcgcgt  ccgcgcgcgc  ttctgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
241  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
301  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
361  aggcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
421  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
481  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
541  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
601  aggcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
661  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
721  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
781  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
841  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
901  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
961  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1021  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1081  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1141  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1201  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1261  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1321  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1381  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1441  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1501  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1561  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1621  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1681  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1741  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1801  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1861  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1921  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
1981  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2041  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2101  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2161  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2221  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2281  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2341  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2401  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2461  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2521  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2581  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2641  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2701  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2761  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2821  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2881  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
2941  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg
3001  attgcgcgcg  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgc  ccgcgcgcgcg

```

【図 1 B】

図 1 (続き)



KL-D1 (細胞外サブドメイン)またはKL-D2の活性なフラグメント;

KL-D2 (細胞外サブドメイン)またはKL-D2の活性なフラグメント;

KL-D1 (細胞外サブドメイン)またはKL-D2の活性なフラグメント;

KL-D2 (細胞外サブドメイン)またはKL-D2の活性なフラグメント;

【図 2 B】

```

3061  ttctattcatt  caatttgaaa  taattatgca  gccacatcag  ctgttaacca  ttgtgaacct
3121  taaglytltgt  gaaactylaa  atttcaatac  ttgtgaacct  ttgtgaacct
3181  atgcagcagg  ttgtgaacct  ggcataaggt  atgcataaat  ttgtgaacct
3241  cctgaatttg  ttctcttttt  ggttgattaa  aacactgaac  ttgtgaacct
3301  aactatacaa  aagcatgaaa  aataggaacc  aacactgaac  ttgtgaacct
3361  aatgacaaga  ttaggaatat  ttctctctgc  accactctct  aaatttaagt  ttgtgaacct
3421  agtgaactgt  gcaagaghtc  gaatagaag  ttatgataac  aaactgaact  ttgtgaacct
3481  cataataatg  cctagtgtgt  ttctctctgc  accactgaac  ttgtgaacct
3541  gaagatacag  gagagacagc  agaggttctc  aggtctgaat  gtctctctgc  aaactgaact
3601  ttctatacaa  tactagtatt  aatttatgta  ttgtgaacct  gaactgaact  ttgtgaacct
3661  tatggaatgt  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
3721  gatctgtctc  actgcatctc  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
3781  ttgcggaata  caaacatgaa  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
3841  taataataag  tataacagag  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
3901  gtgcaacatt  atgataatc  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
3961  catgaacttt  cctgaagaaa  taaggaatga  ataatcaact  attctatgaa  caactgaact
4021  actttctatt  ctttagctgt  actgaatttt  ctttagctgt  atagtattac  aaactgaact
4081  taggttcaaa  agcaactctg  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4141  tattttatgt  ttgtgtgtgt  actttgtgtg  aagtgaacttt  gaactgaact  ttgtgaacct
4201  ttctacagct  aacactgtca  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4261  gccctttaa  taactctgt  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4321  gttttataga  taagttaata  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4381  caaacctcac  ttgcacagag  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4441  ttcttagag  tatgatttt  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4501  gaactattaa  aatttgatgt  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4561  atagagtaa  tataatttca  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4621  aaataaaaa  ttatataata  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4681  tattttatt  taactgaact  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4741  aaactttct  ttgttaatt  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4801  ccacacagag  aatgtatcac  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4861  ttgtgatgaa  ttgtgtttta  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4921  gtaagagaaa  gtaattttgc  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct
4981  actttttgc  ttctttcata  ttgtgaacct  ttgtgaacct  ttgtgaacct

```

クロトーアミノ酸配列 (NP_004786) (配列番号: 2)

```

1  MFASAPPFRP  RPPPPSLSL  LVLLGLGRR  LRAEPGDAQ  TWAFSRPFA  PEAGFLPQT
61  PDCPLMAYD  SAAYTESG  QHKGKASIN  DTFTHPLAP  TCDERNASL  LGAPFLQPA
121  CGVDASDSIN  NVFRDTEAL  ELGVTHYRS  ISAWRLVFN  SAGVFNRECL  RYRRLRLRL
181  YVAVQPVVT  LYHNDLPQR  ODAYGGMAN  LADHFRDFA  ELCPHFVGG  VKYWTIDNP
241  YVAVQPVVT  GRLAPGIRS  PRLGYLVAN  LLLAHKAVH  LNTSFRPTQ  GGVSVIALS
301  HWNFRPRMD  HSIKEQKSL  DFLVGFAPK  VFDGDXPES  MONLSSILP  DFTSEKKPI
361  KGDAFFALC  FGPTLSFQL  DFHMKFPLE  SPNHLQLSN  IDLEFNMFOI  FIVENGWFS
421  GTKRDARKY  MYLKKFIME  TLKAKLDGV  DVIGYTAWS  MDGFEMHRC  STRGLPVVD
481  FLSDQMLLP  KSDALPVOL  IENKGFPLP  ENQKAGTSP  CDFWCVFVN  YIQVTTLSQ
541  PDLNVLYLD  VHSKRLKLV  DGVVTKRKS  YCVDFAIOP  QIALQEMHV  THRFSLDWA
601  LILPLNGQS  VNHTILQYR  CMASLVKVN  ITPVVALVP  MAPNGLPR  LARGGAWEN
661  YLALAFREYA  RLCPQLGHH  VKLWITMNE  YTRNMYSAC  HNLKAKALA  WHVNEKFRH
721  AQNKISIAL  QADWIEPAC  FSKDKVEAE  RVLEFDIWL  AEPFGSDY  PWVMDWLNQ
781  RNNELLPYT  EDEKLLIGT  FDFLALSHY  TILVDSERK  FIKYNDYLEV  QEMDTIWNL
841  SPQAVAVFW  GLRKLNLWK  FKYGDLWYI  ISNGIDGLH  REDQLRVYI  MGVINEALK
901  ALLDGLNLC  GYFAYFNDR  TAPRFLYRY  AADQEPKAS  MKHYRIIDS  NGPPEPTE
961  RFPCEETVC  TCSFPHTRK  SLALFIAFL  FASIIISLI  FYSKRGRS  YK

```

【図 2 C】

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

```
1 atectcagtc tccagatcca agctaatacat tgacagagct ttaacaatcac aagctttttac
61 tgaagctcttg ataagacagtg ccagcagcttg gtggcaaatg aagcgaagctc gtgcggcgagg
121 atctcccggt aatgaatgga tttctctlong caclgatgaa ataaaccaac gclataaggaa
181 tacaagtgtcc aacgggggagt tgaacaagatc tgcatactctg taagcaactta tttctgtacg
241 agctgttact ggaattctctg gagatgggaag agtatatcg tctaaaaatc ctaattttac
301 tccggttaaat gaagatcagc tggttctctta tgacacttttc cctaaaaactt tttcttgggg
361 tattgggaact ggagcattgc aagtggaagc aggttgggaag aaggatggaa aaggaactctc
421 tatatgggat catcttctcc acacacaactc taataatgtc agcagcacga atgtgtccag
481 tgcagctatc attttcttg aaaaagagct atcagccctg gattttatga gagtttcttc
541 ttatcaatttt tcaatttctc ggcgaaggtc tttccccgat ggaatagtaa cagttgcaaa
601 cgcgaagaagt ctgcaagtact acagtactct tctggagcct ctagtgotta gaaacattga
661 acctatagt ttacttatac actgggattt gcctttggca ctacaagaaa aatatggggg
721 gtggaaaaat gataccataa tagatatctt caatgactat gccacatact gtttccagat
781 gtttggggac cgtgtcaaat atttgatcaa aaltcaaac ccatactag tgcgttggca
841 tgggtatggg acaggtatgc atgcacctgg agagaaggga aattatagcag ctgctctaac
901 tgtgggacac aacttgatca aggtcactc gaagatttgg gataactcaa acacacttt
961 cggccacat cagaagggtt ggttatcag caegtggga tctcattgga tcgagccaaa
1021 ccggtcgga aacacagtg atatatcaa atgtcaacaa tcoattggtt cttgtcttgg
1081 atggtttgc aacctatcc atgggagtg agactatcca gagggatga gaaagagtt
1141 gtttccggtt ctacccattt tctctgaagc agagaagcat gagatgagag gccacagctga
1201 tttctttgct ttttcttttg gaaccaacaa cttcaagccc ctaaaacaca tggcttaaat
1261 gggcaaaat gtttcaacta atttaaggga agcgtgaa tgatataac tggatatcaa
1321 caacctcga atcttggattg ctgagaatgg ctggttcaac gacagtctgt tgaacaaga
1381 agacacacg gccatctaca tgatgaagaa tttctcaag cagtgcttc aagcatcaag
1441 gttatgatgaa atacagattc tgggttatac tgccctggtc ctctcgatg gotttgaatg
1501 gcaagatgcl tacaactcgc gccagagatt atttlatglt gatttlaaca gtaaacaga
1561 agagcgaaa cctaagttct cagcacacta ctacaaacag atatacag agaatggtt
1621 tttcttaaaa gagtccacgc agatgtatga gggccagttt cccgtgatc tctcctggg
1681 tgcactcga tctgtctta agccagatc tgtggctgt tcccaactg tccagatcc
1741 tcatctgtac gtgtggaacg ccaactgcga acagtgttg caccagatgg aaggggtgag
1801 gctgaaacaa ctttgaacg ttttgaac atcaaaaac aacttgagat ccttgagat
1861 gttgcgaaga atgaagatac cccaactcag gtttgcctc gattggcct cgtctcctcc
1921 cactggcaac ctgtcccgcg tgaaccgaca gcccctgag tactacaggt cgggtggcga
1981 tgaagggctg aagcttggca tctcccgcat ggtcacacct latlatacca cccaagccca
2041 actaaggctc cccagacac tgttgatgc gaaaggttg ctgaacctc cccagcgga
2101 ggccttccag gctcagctg gctgtgctt ccaggaactg gggagcctg tgaactctc
2161 gatcaccatc aacgagctca accgcttaag tgacatctac aaocctctc gcaacacac
2221 tctacggggc gcgcacaacc aatgcacagc ccacgcctg gctcgccgc ctacagccga
2281 gcagttcagc ccttcacagc cgggggcgt gtgcgtgtcg ctgcacgcg atgcggcgga
2341 accgcacac ccttatcgt actgcactg agggcgccgc gagcgcttc tgcagttga
2401 gatcgctgtg ttgcgcagac cgtctctcaa gaccggggac taccgccgc ccatgaggg
2461 atcaactctc tccaaagcgc ttccagctcg gctcgcgcg gctacacga gtaactcga
2521 gcgcgaagc aggtcctgc agggacagc agacttctg cgcctcaac atcaaccac
2581 tagtctctg atgcacagc agctggccgc cagcgcctac gactcggaca gggacatca
2641 gttctgcag caactacacc gctcgactc cccaacgcgc ctggtgtgaa tttccctggg
2701 ggtgcgaacg ctgcctcgtt ggttccggag gaactacggc gacatgtaca ttatcatc
2761 ccagcagctc atcgagcagc aggtctctga ggatgcgcg ctccggagat actaactagg
2821 gaagcagctc caggagctg tgaagacata cctgattgat aagtcagaa tcaaaagca
2881 ttatgattc aacagcttca agagaatc taaacccaga tttagattc tcaacttga
2941 ttttaaaagt aaactcctaa tacaatttta caacaaagtg atcaagcatic gggcctccc
3001 ttttgagaac agtatttcta gatcgatcga gacccaagaa aatacagagt gcaactgct
3061 ctattctcct gtgcagaaga aaccactgat attctcgggt tgttgccttc tctccacct
3121 ggttctactc ttatcaattg cactttttca aaggcagaag aagaagaagt tttggaagc
```

【図 2 E】

```
241 yvawhgyat grlapgrgs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptg ggvgsialss
301 hwinprzmt haikccksl dflvfwfakp vfdgdypes mknnsiilp dtesekkf
361 kgtadffalc fgptlafqll dphmkfrle apnrlqlaw idlefnhpqi fivengwfe
421 gtkrddaky myylkkfime tkaikldgw dvigytawsl mdgfewhryz sirgflfyvd
481 flsqdkmlp ksaalfyql iekngfplp onqlegtp cdawgvvnd yiqdttllq
541 ftdlnvlywd vhhakrlikv dqvutkkrrs ycvdfaaiqp qiallqemhv thfrfldwa
601 liilpnqscq vnhltlgyr cmaselvrn itpvvalwqp mapngqlprl largawenp
661 ytalafaea rlcfgelghh vklwtmnep ytrnmtyag hnllkaha whvnyekrfr
721 aqngksial qadwepacp fsqkdevae rvlefdiawl aeplfgsgdy pvmrmdlwnq
781 rnnflpyft edekklqgt fdflalshyt tllvdseked pikyndylev qemditwnl
841 spsgvavpw glskvlnwk fkygdlpmyt langiddgh aedgdlrvy mnyinealk
901 ahildginlc gyfaysfndr taprfglyr aadqefpkas mkhyrkiids ngfpgpetle
961 rcpceeftvc tecsffhtrk al
```

クロト－シグナルペプチドアミノ酸配列 (配列番号: 8)

```
1 mpaaspprrp rpeppslall lylvgigrr ira
```

IgGシグナルペプチドアミノ酸配列 (配列番号: 9)

```
1 msvltqvial lllwltgtcc rrlra
```

(Gly₃Ser)₃ ポリバチドリンカー－核酸配列 (配列番号: 10)

```
1 ggaggtggag gttcaggagg tggaggtcca ggaggtggag gttca
```

(Gly₃Ser)₃ ポリバチドリンカーアミノ酸配列 (配列番号: 11)

```
1 GGGGSGGGG GGGGS
```

(Gly₄Ser)₃ ポリバチドリンカーアミノ酸配列 (配列番号: 12)

```
1 GGGGS
```

(Gly)₃ ポリバチドリンカーアミノ酸配列 (配列番号: 13)

```
1 G
```

(Gly Gly)₃ ポリバチドリンカーアミノ酸配列 (配列番号: 14)

```
1 GG
```

(Gly Ser)₃ ポリバチドリンカーアミノ酸配列 (配列番号: 15)

```
1 GS
```

(Gly₃Ser)₃ ポリバチドリンカーアミノ酸配列 (配列番号: 16)

```
1 GGS
```

【図 2 D】

```
3181 aaaaaactta caacacatac cattaagaa aggcaagaga gttgttagct aaactgatct
3241 gtcgtcatga tagacagttt aaaaattcat cccagttcc
```

ベータクロト－アミノ酸配列 (NP_783864) (配列番号: 4)

```
1 mkpccaagap gnewiffstd eittcryntm sngglqrsvi lsaillirav tgfsgdgrai
61 wkknptfvp nesqlifdyt fphnfewig tgaigvqav kdgkkgpsaw dhifhthkn
121 vstngsada yiflcklnea ldfagvfwg fslwvrlp dqvttvanak qlayysitld
181 alvlniepi vtylhwldpl alqekyggwk ndtiidifnd yatycfmgfg drvkywtiwh
241 nplyvawhgy gtgmhagpek gnlaavyctg hnllkashkv whnynthfrp hqkwlaitl
301 gshwiepnrs entmdifkcc qamsvlwgw anpighdgdy pegmrkkfsl vipifseak
361 hemrgtadff afafgpnfrk plntmakgg nvalnlreal nwikleyonp rlliasengwf
421 tdrvktctd talymmkfl seylqairld eirvfytaf sldgfwedq aytrrsfly
481 vdfnskqker kpkasahyik qlirengtl kestdpvggc fpcdfswgtv eavlkpsva
541 aspgfsdphl yvwnatgnrl lhrvegvrlk trpaqctdfr nikkllema rmkthyryfa
601 ldwsvlptg nlsavnraq ryyrcvvesg lkligasamv lyyptahlig lpepllhag
661 vlnputaeaf gayaglofge lqdvklwit inepnrlsdi inegpndtyg aahnlvaha
721 lawllydrqf rpsqgavsl shadwaapa nryadshwa aenlfqfeta vfaeplfktg
781 dyaammyei askhrcglas aalprteae rrltkgtvdf calnhftfrf vmbeglagsr
841 ydsddidqfl qdittlsapt rlavipwgvz kllrvwrny gmdiyitas giddgaledd
901 rlrkylygky lqevlkayli dkvrkgyya fklaeekskp rfgfiftsdfk akasiqfynk
961 vlsargfpfe nasarcscqt enteactvcl lvqkkplifl gccffastlv llsaiqfqrq
1021 krrkfwkkn lqhiplkkkg rvva
```

ヒトクロトドメイン 1 (KL-D1) アミノ酸配列 (配列番号: 5)

```
58
61 fpdgflwavg aaaygtggw qhgkgasiv dftthhplap pgdsrnaalp lqapslpa
121 tgdvasdyn nvfrdtear elgvthyrfc iswarvlpg sagvnpregl ryyrrlleri
181 relvgvppvt lyhwdlpqrl qdayggwanr aladhfryda elcfhrfggg vkywtidnp
241 yvrwghyat grlapgrgs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptg ggvgsialss
281 hwinprzmt haikccksl dflvfwfakp vfdgdypes mknnsiilp dtesekkf
361 kgtadffalc fgptlafqll dphmkfrle apnrlqlaw idlefnhpqi fivengwfe
421 gtkrddaky myylkkfime tkaikldgw dvigytawsl mdgfewhryz sirgflfyvd
481 flsqdkmlp ksaalfyql iekngf
```

ヒトクロトドメイン 2 (KL-D2) アミノ酸配列 (配列番号: 6)

```
517
541 ftdlnvlywd vhhakrlikv dqvutkkrrs ycvdfaaiqp qiallqemhv thfrfldwa
601 liilpnqscq vnhltlgyr cmaselvrn itpvvalwqp mapngqlprl largawenp
661 ytalafaea rlcfgelghh vklwtmnep ytrnmtyag hnllkaha whvnyekrfr
721 aqngksial qadwepacp fsqkdevae rvlefdiawl aeplfgsgdy pvmrmdlwnq
781 rnnflpyft edekklqgt fdflalshyt tllvdseked pikyndylev qemditwnl
841 spsgvavpw glskvlnwk fkygdlpmyt langiddgh aedgdlrvy mnyinealk
901 ahildginlc gyfaysfndr taprfglyr aadqefpkas mkhyrkiids ngf
```

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: 7)

```
28
61 fpdgflwavg aaaygtggw qhgkgasiv dftthhplap pgdsrnaalp lqapslpa
121 tgdvasdyn nvfrdtear elgvthyrfc iswarvlpg sagvnpregl ryyrrlleri
181 relvgvppvt lyhwdlpqrl qdayggwanr aladhfryda elcfhrfggg vkywtidnp
```

【図 2 F】

(Ala) ポリバチドリンカー－アミノ酸配列 (配列番号: 17)

```
1 A
```

(Ala Ala) ポリバチドリンカーアミノ酸配列 (配列番号: 18)

```
1 AA
```

クロト－シグナルペプチドクロト－細胞外ドメイン-FGF23 (R179Q)

アミノ酸配列 (配列番号: 19)

```
1 MPASAPPPRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAGALFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGW QQHKGASIV DTTHHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLPQA TGDVASDYN NVFRDTEAR ELGVTHYRF
151 ISWARVLPNG SAVGNPREL RYRRLLEKL RELGVQVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGWANR ALADHFROYA ELCFRHFQGG VKYWTIDNP YVVAWHGYAT
251 GRAPAFIRGS PRGYGVANH LLLAHAKVWH LYNTSFRPT GGVGSIALSS
301 HWNPRZMT HSIECKSL DFLVFWFAP VFDGDYPES MKNNSIILP
351 DTESEKKEI KTADEFFALC FGPTLAFQLL DPHMKFRLE SPFLKQLLSV
401 IDLEFNHPOI FIVENGWFS GTTKRDDAKY MYYLKFKIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTANSL MDGFENHRYG SIRGLFYVD FLSQDKMLP KSAALFYQKL
501 IENKGFPLP ENQPLEGTFP CDFAMGVND YIQDVTLSQ FTDNLVLYWD
551 VHHSKRLIKV DGVUTKKRKS YCVDFAIQF QIALQEMHV THFRFLDWA
601 LIPLPNQSQ VNHTILQYR CMASELVRN ITPVVALWQP MAFNQGFLRL
651 LARGAWENP YTALAFAYA RLCFQELGHV VKLWTMNEP YTRNMITYAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKSIAL QADWIEPACP FSQKDEVAE
751 RVLEFDIGWL AEPFSGSDY PVMRMDLWNQ RNNFLPYFT EDEKLLQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKNDYLEV QEMDITWLN SPSQVAVPW
851 GLRKLVLNWK FKYGDLPMYI ISNGIDDLGH AEDDQLRVYV MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYR AADQEFKAS MKHYRKIIDS
951 NGFPFPEPTE RCPPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGSL
1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNSYHL QHNKHGVDG APHQTIYSAL
1051 MIRSEDAFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYDFPENC RFQHTOLENG
1101 YDHYHSPQH FVFLGRAKR ALFGMNPFP YSGLFSRME IPLIFHNTPI
1151 FRHTQSAED DSRDPLNLV KPRARMTAP ASCSQELFSA EDNSFMAADP
1201 LGVVRGGRVN THAGGTFPEG CRPFAKFI*
```

IgGシグナルペプチドクロト－細胞外ドメイン-FGF23 (R179Q)

アミノ酸配列 (配列番号: 20)

```
1 MSVLTQVIAL LLLWLTGLGG RRLRAEPDQ AQTWARFSRP PAPEAAGLFQ
51 GTFPDGLFWA VGSAAAYQTEG GWQGHKGAS IWDTEHHPL APFGDSRNAS
101 LPLGAPSLQ PATGDVASDS YNNVFRDTEA LRELGVTHYR FSISWARVLA
151 NGSAGVPNRE GLRYRRLLE RRELGVQVVT VTYLHWDLPL RLQDAYGGWA
201 NRALADHFRO YAEICFRHFG GGVKYWTITD NPVVAWHGYA ATGRALPEIR
251 GSPRLGYLYA HNLLLAHAKV HPLNTSFRP TGQGVQVIAL SSWHNINPRM
301 TDHSIKCQK SLDPVLGFWA KPVFDGDPF ESKNNLSI LPFDESEKK
351 FIKGTADFFA LCFGFLPQ LLDPRMDEL LLDPRMDEL SLDLEFNHP
401 QIFIVENWF VSGTKRDDA KMYYLKKEI METLKAIKLD GVDTIGYTAN
451 SLMDGFENHR GYSIRRGLEY VDFLSQDKML LPSSALFYQ KLEKNGFPP
501 LPENQPLEGT FQCDFAWGVV DNYIQDVTLSQ FTDNLVLYWD VHHSKRLI
551 KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI PQQIALQLQM HVTHFRFSLD WALILPLNGQ
```

【図 2 G】

601 SQVNHTILQY YRCMASLVR VNITPVVALV QPMAPNGGLP RLLARQGAWE
651 NPYNTALAFB YARLCQNGKISL HHVKLWITMN EPHYTRMTYS AGHNLLKAHGA
751 LAHWVYNEKF RHACQNGKISL ALQADWIEPA CPFSQDKKEV AERVLFEFDIG
751 WLAEPFPGSG DYIWMKRDWL NQRNELLFPY FTEDEKKLIQ GTTFDELALSH
801 YTTILVDSKK EDPKYNDYL EVQEMTDITW LNSPSQVAV PWGLRVNLNW
851 LKFKYGDLMN YIISNGIDQG LHAEDDQLRV YVMQNYINEA LKAHILDGIN
901 LCGYFAYSFN DRTAFRPFGLK RYAADQFEFK ASMKHYRKII DSNQFGPGPT
951 LERFCPEEFT VCTECSFFHT KSLSGSGGGG SLKYPNWSPL
1001 LGSWSGGLIH LYTATARNYS HLQIKHNGHV DGAPHQTIYS ALMIRSEDA
1051 FVVITGVMSR RYLCDMDFRGN LFGSHYFDPE NCRFQHTLE NGYDVHSPQ
1101 YHFLVSLGKA KRAFLPGMNP PPYSQFLSKR NEIFLIHFNTP FIPRRHTQSA
1151 EDDSERDPLN VLKPRARMTAP APASCQSQEL SAEDNSPMAS DFLGVVRGGR
1201 VNTHAGGTGF EGCRRPFAKI *

KL-D1-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列 (配列番号: 21)

1 MPASAPPRRP RPPFPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIV DTFTHHFLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPQLQA TGDVADSDYN NVFRDTEALR ELGVTHYFRS
151 ISWARVLNPG SAGVFNREGI RYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGMNAR ALADHFRDYA ELCFRHFQGG VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRAPGIRGS PRGLYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GQGVSIALLS
301 HWINPRRMTD HSKECCQKSL DFLVGLWFAKP VEIDGDYFES MKNNLSLILP
351 DTESEKKFI KGTADFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNRLQLSLW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFSV GTTKRDAKY MYYLKRFIME TLKAIKLDGV
451 DWIGYTAWSL MDGFEWHRRY SIRGLFYVD FLSQDMKLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFFPLP EMOPLEGSGG GSGGSGGGG GSKLYPMAS PLLSGWSGL
551 IHLVYATANK SYHLOIHKNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVITVGM
601 SRRYLCDMDF GNIFGSHYFD PENCRFQHTQ LENGVDVHS PQYHFLVSLG
651 RAKRAFLPGM NPPPYQSFLS RNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDSERDPL
701 LNVLPKPRAM TPAFASCQSE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT
751 GPEGCRPFAP FI*

KL-D2-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列 (配列番号: 22)

1 MPASAPPRRP RPPFPSLSLL LVLLGLGGRR LPLPENQPLE GTFFCDFAWG
51 VVONYIQVDT TLSQFTDLNV YLWDVHNSKR LIKVDGVVTK KRKSYCVDFE
101 AIQPIALQEL EMVHTHFRFS LDWALLPLFG NQSQVNHTIL QYRCMASEL
151 VRVNTIPVVA LWQPMAPNGG LRLRLARQGA WENPYTALAF AEYARLCQFE
201 LGHHVKWITP MNEPYTRMT YSAGHNLLKA HALAWHNYNE KFRHAQNGKI
251 SIALQADWIE PACPFQDKKE EVAERVLFEF IGWLAEPFPG SDYFVWVRD
301 WLNRNNFLL PYTFDEKCL TQGTDFDLAL SHYTITLIVDS EKEDPIKND
351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFYKGL PMYIISNGID
401 DGLHAEDDQL RYFYMONTIN EALKAHILDG INLCGYFAS FNDRTPAPFG
451 LYRYAADQFE PKASMKHYRK IIDSNGFPG ETLERFCFEE FIVCTECSFF
501 HTRKSLGSGG GSGGSGGGGG GSGSLPNAS PLLSGWSGL IHLVYATARN
551 SYHLQIKHNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVITVGM SAKRLCDMDF
601 GNIFGSHYFD HVDGAPHQTI LENGVDVHS PQYHFLVSLG RAKRAFLPGM
651 NPPPYQSFLS RNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDSERDPL LNVLPKPRAM
701 TPAFASCQSE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFAP
751 FI*

(KL-D1)₂-FGF23 (R179Q) アミノ酸配列 (配列番号: 23)

1 MPASAPPRRP RPPFPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA

【図 2 I】

51 YHLQIKHNGH VDGAPHQTIY SAIMIRSEDA GFVITGVMS RRYLDMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHTL ENGVDVHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PFPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLPKPRARMT
201 PAPASCQSLE PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAPK
251 IGTFFPDGFL WAGVSAAYQT EGGWQCHGKG ASIWDTFTHH PLAPFGDSRN
301 ASLPLGAPSP LQATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
351 LFNAGSAGVFN RGLRYRRL LERLELGVQ PVVTLVHWDL PQLQDAYGG
401 WANKALADHF RDYALCLFRH FGQGVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRILAP
451 IRGSPRLGLY VAHNLILLA KVMHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSXWNTFR
501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLWG FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDFTSE
551 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPMHKKF RQLESFNLRL LSWIDLEFN
601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLYKK FIMETLKAIK LDGVNIGVT
651 ANSLMDGFEE HRGYSIRGL FVYDFLSQDK MLPLKSSALF YQKLEKNGF
1001 IFSGDYFVW MRDNLNQRN FLFPYFTEDE KLIQGTDFDL LALSHYITIL
1051 VDSEKEDPIK YNDYLVLEQM TDTIWNLSFS QVAVFVWGLR KYLNLKFKY
1101 GDLPMYIISN GIDGCLHRED DQLRVYHMQ YINEALKAH LDCINLCGYF
1151 AYSFNDRATP RFLRYRYAAD QFEPKASMKH YRKIIDSNGF PGPETLERFC
1201 PEFTVCTEC SFFHTKRLS*

FGF23 (R179Q)-KL-D1 アミノ酸配列 (配列番号: 26)

1 MLGARLRMLV CALCSVCMS VLRAYPNASF LLGSSWGGLI HLYTATARN
51 YHLQIKHNGH VDGAPHQTIY SAIMIRSEDA GFVITGVMS RRYLDMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHTL ENGVDVHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PFPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLPKPRARMT
201 PAPASCQSLE PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAPK
251 IGTFFPDGFL WAGVSAAYQT EGGWQCHGKG ASIWDTFTHH PLAPFGDSRN
301 ASLPLGAPSP LQATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
351 LFNAGSAGVFN RGLRYRRL LERLELGVQ PVVTLVHWDL PQLQDAYGG
401 WANKALADHF RDYALCLFRH FGQGVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRILAP
451 IRGSPRLGLY VAHNLILLA KVMHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSXWNTFR
501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLWG FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDFTSE
551 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPMHKKF RQLESFNLRL LSWIDLEFN
601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLYKK FIMETLKAIK LDGVNIGVT
651 ANSLMDGFEE HRGYSIRGL FVYDFLSQDK MLPLKSSALF YQKLEKNGF
652 *

FGF23 (R179Q)-KL-D2 アミノ酸配列 (配列番号: 27)

1 MLGARLRMLV CALCSVCMS VLRAYPNASF LLGSSWGGLI HLYTATARN
51 YHLQIKHNGH VDGAPHQTIY SAIMIRSEDA GFVITGVMS RRYLDMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHTL ENGVDVHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PFPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLPKPRARMT
201 PAPASCQSLE PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAPK
251 IGTFFPDGFL WAGVSAAYQT EGGWQCHGKG ASIWDTFTHH PLAPFGDSRN
301 ASLPLGAPSP LQATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
351 LFNAGSAGVFN RGLRYRRL LERLELGVQ PVVTLVHWDL PQLQDAYGG
401 WANKALADHF RDYALCLFRH FGQGVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRILAP
451 IRGSPRLGLY VAHNLILLA KVMHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSXWNTFR
501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLWG FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDFTSE
551 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPMHKKF RQLESFNLRL LSWIDLEFN
601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLYKK FIMETLKAIK LDGVNIGVT
651 ANSLMDGFEE HRGYSIRGL FVYDFLSQDK MLPLKSSALF YQKLEKNGF
652 *

【図 2 H】

51 PEAAGLFQGT FPDGLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIV DTFTHHFLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPQLQA TGDVADSDYN NVFRDTEALR ELGVTHYFRS
151 ISWARVLNPG SAGVFNREGI RYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGMNAR ALADHFRDYA ELCFRHFQGG VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRAPGIRGS PRGLYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GQGVSIALLS
301 HWINPRRMTD HSKECCQKSL DFLVGLWFAKP VEIDGDYFES MKNNLSLILP
351 DTESEKKFI KGTADFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNRLQLSLW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFSV GTTKRDAKY MYYLKRFIME TLKAIKLDGV
451 DWIGYTAWSL MDGFEWHRRY SIRGLFYVD FLSQDMKLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFFPLP EMOPLEGSGG GSGGSGGGG GSKLYPMAS PLLSGWSGL
551 IHLVYATANK SYHLOIHKNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVITVGM
601 SRRYLCDMDF GNIFGSHYFD PENCRFQHTQ LENGVDVHS PQYHFLVSLG
651 RAKRAFLPGM NPPPYQSFLS RNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDSERDPL
701 LNVLPKPRAM TPAFASCQSE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT
751 GPEGCRPFAP FAKFI*

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

1 MPASAPPRRP RPPFPSLSLL LVLLGLGGRR LPLPENQPLE GTFFCDFAWG
51 VVONYIQVDT TLSQFTDLNV YLWDVHNSKR LIKVDGVVTK KRKSYCVDFE
101 AIQPIALQEL EMVHTHFRFS LDWALLPLFG NQSQVNHTIL QYRCMASEL
151 VRVNTIPVVA LWQPMAPNGG LRLRLARQGA WENPYTALAF AEYARLCQFE
201 LGHHVKWITP MNEPYTRMT YSAGHNLLKA HALAWHNYNE KFRHAQNGKI
251 SIALQADWIE PACPFQDKKE EVAERVLFEF IGWLAEPFPG SDYFVWVRD
301 WLNRNNFLL PYTFDEKCL TQGTDFDLAL SHYTITLIVDS EKEDPIKND
351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFYKGL PMYIISNGID
401 DGLHAEDDQL RYFYMONTIN EALKAHILDG INLCGYFAS FNDRTPAPFG
451 LYRYAADQFE PKASMKHYRK IIDSNGFPG ETLERFCFEE FIVCTECSFF
501 HTRKSLGSGG GSGGSGGGGG GSGSLPNAS PLLSGWSGL IHLVYATARN
551 SYHLQIKHNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVITVGM SAKRLCDMDF
601 GNIFGSHYFD HVDGAPHQTI LENGVDVHS PQYHFLVSLG RAKRAFLPGM
651 NPPPYQSFLS RNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDSERDPL LNVLPKPRAM
701 TPAFASCQSE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFAP
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 MLGARLRMLV CALCSVCMS VLRAYPNASF LLGSSWGGLI HLYTATARN

【図 2 J】

501 GSGDYPMVNR DWLNQRNNFL LPYTFDEKK LIQGTDFDLA LSHYTITLVD
551 SEKEDPIKYN DYLEVQEMTD ITWLNPSQV AVVPWGLRV NWLKFYKGL
601 LPMYIISNGI DGLHAEDDQ LRVYMYQNYI NEALKAHILG GNLCGYFAY
651 SFNDRATPFI GLRYAADQF EPKASMKHYR KIIDSNGF*

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

1 MLGARLRMLV CALCSVCMS VLRAYPNASF LLGSSWGGLI HLYTATARN
51 YHLQIKHNGH VDGAPHQTIY SAIMIRSEDA GFVITGVMS RRYLDMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHTL ENGVDVHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PFPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLPKPRARMT
201 PAPASCQSLE PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAPK
251 IGTFFPDGFL WAGVSAAYQT EGGWQCHGKG ASIWDTFTHH PLAPFGDSRN
301 ASLPLGAPSP LQATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
351 LFNAGSAGVFN RGLRYRRL LERLELGVQ PVVTLVHWDL PQLQDAYGG
401 WANKALADHF RDYALCLFRH FGQGVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRILAP
451 IRGSPRLGLY VAHNLILLA KVMHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSXWNTFR
501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLWG FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDFTSE
551 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPMHKKF RQLESFNLRL LSWIDLEFN
601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLYKK FIMETLKAIK LDGVNIGVT
651 ANSLMDGFEE HRGYSIRGL FVYDFLSQDK MLPLKSSALF YQKLEKNGF
701 QGTFFPDGFL WAGVSAAYQT EGGWQCHGKG ASIWDTFTHH PLAPFGDSRN
751 SLPLGAPSP LQATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH RYFSISWARV
801 PFGSAGVFN RGLRYRRL LERLELGVQ PVVTLVHWDL PQLQDAYGG
851 ANKALADHF RDYALCLFRH FGQGVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRILAP
901 RSPRLGLY VAHNLILLA KVMHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSXWNTFR
951 WTDHSIKEC QKSLDFVLWG FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDFTSE
1001 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPMHKKF RQLESFNLRL LSWIDLEFN
1051 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLYKK FIMETLKAIK LDGVNIGVT
1101 WSLMDGFEE HRGYSIRGL FVYDFLSQDK MLPLKSSALF YQKLEKNGF

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

1 MLGARLRMLV CALCSVCMS VLRAYPNASF LLGSSWGGLI HLYTATARN
51 YHLQIKHNGH VDGAPHQTIY SAIMIRSEDA GFVITGVMS RRYLDMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHTL ENGVDVHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PFPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLPKPRARMT
201 PAPASCQSLE PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAPK
251 IGTFFPDGFL WAGVSAAYQT EGGWQCHGKG ASIWDTFTHH PLAPFGDSRN
301 ASLPLGAPSP LQATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
351 LFNAGSAGVFN RGLRYRRL LERLELGVQ PVVTLVHWDL PQLQDAYGG
401 WANKALADHF RDYALCLFRH FGQGVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRILAP
451 IRGSPRLGLY VAHNLILLA KVMHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSXWNTFR
501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLWG FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDFTSE
551 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPMHKKF RQLESFNLRL LSWIDLEFN
601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLYKK FIMETLKAIK LDGVNIGVT
651 ANSLMDGFEE HRGYSIRGL FVYDFLSQDK MLPLKSSALF YQKLEKNGF
701 QGTFFPDGFL WAGVSAAYQT EGGWQCHGKG ASIWDTFTHH PLAPFGDSRN
751 SLPLGAPSP LQATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH RYFSISWARV
801 PFGSAGVFN RGLRYRRL LERLELGVQ PVVTLVHWDL PQLQDAYGG
851 ANKALADHF RDYALCLFRH FGQGVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRILAP
901 RSPRLGLY VAHNLILLA KVMHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSXWNTFR
951 WTDHSIKEC QKSLDFVLWG FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDFTSE
1001 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPMHKKF RQLESFNLRL LSWIDLEFN
1051 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLYKK FIMETLKAIK LDGVNIGVT
1101 WSLMDGFEE HRGYSIRGL FVYDFLSQDK MLPLKSSALF YQKLEKNGF

【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)

```

1  gctccagacc  aagaacctcg  gggccgctgc  gcggtaggga  ggagttcccc  gaaccocggc
61  cgtcaagaaa  aggtctcttc  tccagcaagt  ccgaagagcc  tggcgggggt  gcccocgagc
121  gggaacaaga  gccgcgcgct  gccgcgccgg  gcccgaggag  ggggctgggg  ctggggccgg
181  aggcgggggt  tgaagtgggt  tgtgcggggg  gcgagagctt  gatgaatcc  cgataaagaaa
241  tggctggggt  tcttgggccc  ctaccggctg  ggcgcgtaa  gcgctaatat  ataaagctgc
301  cggccggggg  ccgcgcggcg  ctacagagcg  gaagcgttgc  tccagatct  aaggacaaga
361  ccatcccaac  ccgggaacta  cagcccgcca  gcgcctcccg  gtccgcgcgc  agcctccccc
421  acccccacgc  ccgagagacc  gccgaagacc  ccaggagagt  gccatgcgga  gggggttgtt
481  ggtggtccac  gtagtgatcc  tggccggcct  ctggctggcc  gtggccgggc  gccccctcgc
541  ctctcgctgc  gcggggcccc  acgicggccc  ccgctggggc  gaaccctacc  gctggaggga
601  cctgttaaac  tccggccccc  accggctctc  cagctgtctc  ctggcctacc  gtggcgagcg
661  cgtcgtggac  tggccggggg  gccagagcgc  gcacagtgtt  ctggagatca  agccagtcgc
721  tctggggaac  tgggccatca  agggcctgca  cagcgtgcgg  tacctctgca  tggggccgga
781  gccagcagtg  caggggcgct  ttacagcttc  ggaggaagac  tgtgtcttc  aggaaggagt
841  ccgcacagat  ggctacaagt  tttacagatc  cgagaagacc  cgcctcccg  tctctctgag
901  cagtgccaaa  cagcggcgac  tgtacaagaa  cagagagctt  ctccactct  ctcaatcttc
961  gcccatgctg  cccatggctc  cagagagccc  tggagacctc  aggggccaat  tgaattctga
1021  catattctct  tgcocctctg  aaacccagac  catgaacca  tcttgagctg  tccacagact
1081  ggagcgctg  agagttccca  gcttgagaa  gtaactgaga  ccacgcggcg  gccctctcac
1141  tggctccagg  ggtgttgta  cctgaagct  ggggacgctg  cttctacaag  aacagtctct
1201  agtccacgtt  cgttttagt  ttagaagaaa  aacatcagaa  gttgtacata  ttcaagattt
1261  tccattggca  gtccagattt  ctagccaata  gacttgtctg  atcataact  tgaaggctg
1321  tagttgccc  agtgcctgc  tgggcccoca  tctgtctccc  tccaggttgc  tggacaagt
1381  gctgcaactg  ctccagttct  cttaagaata  tccatcgat  ggaactcac  ttcctttgga
1441  aaaaattctt  tgtcaagctg  aaattctcta  attttttct  atcaactccc  caggagcagc
1501  cagaagaagc  cagatagttt  taatttcavt  aacagtgat  ccaacttgta  aaacagcgag
1561  taattttcac  tcaaccctat  gtygaagtt  atcatact  ctacttccg  ggaagacttg
1621  cctctccaaa  atccctccag  gccagactg  actggagag  gcatggccca  ccaggcttca
1681  ggagtagggg  aagctgggag  ccccactcca  gccctgggac  aacttccact  tctcccctga
1741  ggccagttct  gtaactggag  ctgcccggag  aataactgc  tgcctccggt  tccctgctt
1801  ccatctccca  gcccccagc  cctctgccta  cctctgccta  ctcttgctc  aaaaactcag  aaaaagaag
1861  cccagagccc  ccaactatgt  tcaacttcca  ctcttgctc  aaaaactcag  aaaaagaag
1921  atttgaagac  cccagacttt  gtaataact  tgcctgtggt  aagcagcggt  ggaagactta
1981  gaaccccttc  ggttttccaa  catgatatt  attagtatt  tattttgata
2041  tgcatacttc  ttattttct  acattattt  ttatatttat  tctgttaagt
2101  gaggttgtt  ttgtattata  aantggagt  tgtttttaa  aaaaaaaata  aaaaaaa

```

FGF19 アミノ酸配列 (NP_005108) (配列番号: 31)

```

1  MRSGCVVVHV  WLALGLMLAV  AGRLPLAFSD  GPHVHYGWGD  PLRLHLYTSS  GPHGLSSCLF
61  RIRADGVVUC  ARGQSAHSLL  ELKAVALLRV  LKMGADGWMQ  GLLYSEEDC
121  AFEEELRPDS  IVTVNSKRRH  PLVLSLSARQ  LKGRNKLRF  PLSRLPLMLF  MYFPEFEDLR
181  GHLSEMDPFS  PLETSMDPFS  GLVLTGLAVR  SFEKFR

```

FGF21 核酸配列 (NM_019113) (配列番号: 32)

タンパク質コード領域 151-780

```

1  CTCTCAGCTG  AGCATCCAGC  CGAAGAGGGA  GCGAGCACT  CAGCCCACT  GAGTCTACTC
61  ACCTGACAGA  CTGAGATCGT  GCACCAATTC  TAAACCACTC  AGCTTCTCCG  AGCTACACAC
121  CCGSCGATCA  CTGACGAGCC  CAGCAGCATC  AGGACATCGG  ACAGACCGCG  CTGTCAGACC

```

【図 2 M】

```

1861  cattctgaac  aaactacaaa  natgtgactg  ggaagggggc  ttgagagac  tgggactgct
1921  ctgggttagg  tttctgtgtg  actgaaaaat  cgtgtccttt  tcttaaatg  aagtggcctc
1981  aagggccicg  ggggaagaaa  ctacggggac  atgtataga  agttatgaa  aagacccac
2041  atggtcagcg  tctgtctgr  ggtctctag  gctctgagc  agcagtgcg  ctgpatag
2101  taaaacctct  ccttagagca  cacatcggg  tctaatccc  ctggaaatt  ctgttgcat
2161  taagtgaagc  ctatcccact  tactcggtt  ctctctgtaa  gggggctcca  tttctctccc
2221  tctctttaa  tgaccactta  aaggaacgt  taatacaag  caagtgcgt  tcaacacag
2281  tctcttccca  gtaactttt  tttctccac  tgcatacga  taataacct  atacttgt
2341  ctattcttt  tgglttagag  aagaattgt  ggaactggt  tttactgat  agtttlaagc
2401  tgaacttgaa  ggaactgctt  ctattctgaa  acagtaaac  tatgtataat  agtatatagc
2461  catgcatgac  aaatatttta  atattctgt  ttcaattccc  tgttgaaat  atatatccgc
2521  ataatagcta  tggggcctc  ctcaagaaa  galcccaaaa  gpatitgt  ggaanaatag
2581  ttgtaacttc  acaactacac  caataccatc  aggggttttc  ttatgtgcaa  agccaanaata
2641  gctctacaaa  tttcttatat  cccctgcct  ggtgcagtat  ttatttatt  atttggaagt
2701  tctgcatatc  tctctatatt  atagatatt  ataaaagt  aaccctttt  tctctcttc
2761  tgtttaaat  aaaaataaaa  ttatctcag  ctctgttag  ctctactct  ttgtagact
2821  acttaaaag  atgtgpaat  atagaatna  aagaattat  gggagggaaa  cattaggaaa
2881  atccagaaa  ggcaaaact  aaaaaaagt  ttgaattat  taaattct  aaagattct
2941  tccattcata  aggaactata  atgatttaa  tgaactaga  cagaattat  taagtittat
3001  caattttgga  ttctcgt

```

FGF23 アミノ酸配列 (NP_065689) (配列番号: 35)

```

1  MLGARLRMLV  CALCSVCSMS  VLRYAPNAP  LLGSSWGGLI  HLYTATARN  YHLQHNKHG
61  VDGAPQHTY  SALMRSEDA  GPVVITVMS  RRYLCMFGR  NIFGSHYFD  ENCRFQHTL
121  ENGYDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKARFLPOM  PPYQSFLSR  RNEILPLHN  TPIPRHTBS
181  AEDDSEBDPL  NVLKPRAHMT  PAFASCQEL  PFAENRSPHA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG
241  PEGCRPFAPK  I

```

FGF23 (R179Q) アミノ酸配列 (配列番号: 36)

```

1  MLGARLRMLV  CALCSVCSMS  VLRYAPNAP  LLGSSWGGLI  HLYTATARN  YHLQHNKHG
61  VDGAPQHTY  SALMRSEDA  GPVVITVMS  RRYLCMFGR  NIFGSHYFD  ENCRFQHTL
121  ENGYDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKARFLPOM  PPYQSFLSR  RNEILPLHN  TPIPRHTBS
181  AEDDSEBDPL  NVLKPRAHMT  PAFASCQEL  PFAENRSPHA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG
241  PEGCRPFAPK  I

```

ヒトバクテロドメイン 1 (b-KL-D1) アミノ酸配列 (配列番号: 37)

```

77  ydt  fknffwgi  tgalqwegw  kkdgkpaiv  dhfithlkn
121  vaaagssds  yilekdlaa  ldfiqvfyq  fsewprifp  dgivvanak  qllyystlld
181  alvlrniepi  vtylhwldpl  alqekyggw  ndtiidifnd  yatycofmfg  drvkyvithi
241  nplyvawhgy  gtmhagpek  gnaaavtytg  hnliakshk  whnythfrp  hqkqwsilc
301  gahwlepnrc  entmdlfcq  qmwovlvgf  amphlddgy  pegmrklfs  vlpifseak
361  hemrgtdidf  afsgpnnfk  plntmakmq  nvslnireal  nwikleyonn  riliasegnf
421  tdsrvktedt  tsaymnknfl  sqvlqaird  elrfgvtaw  slldgfewd  aytirrglyf
481  vdsnkqker  kpkasahyik  qilrengf

```

ヒトバクテロドメイン 2 (b-KL-D2) アミノ酸配列 (配列番号: 38)

```

571  trpeqctdfv  nikkllemla  rmkvthryfa
601  ldwaevlptg  nisavnrgal  ryzrcvswg  lkligsamvt  lyyphahlg  lpepllhag
661  wlnptaeaf  qayqglcfge  lgdlvkwit  ynrengdyg  aahnlvaha
721  lawrydrqf  rpaqrgaval  alhadwaepa  npyadshwa  seefiqeila  wfaepflktg

```

【図 2 L】

```

181  TCAGGACTGT  GGGTTTCTGT  GCTGGCTGGT  CTCCTGCTGG  GAGCCTGCCA  GGACACCCCC
241  ATCCCTGACT  CCACTCCCTCT  CCGTCAATTC  GGGGGCCAAG  TCCGGCAGCG  GTACCTCTAC
301  ACAGATGATG  CCAAGCAGAC  AGAACCCAC  CTGAGAGATG  GAGAGAGATG  GAGCGTGGGG
361  GGGCTGCTGT  ACCAGGCTCT  CGAATCTCT  CTCAGCTGAA  AAGCTTASAA  GCGGAGTT
421  ATTCAATCTT  TGGAGTCAA  GACATCCAG  TTCTGTGCC  AGCCGCCAGA  TGGGGCCCTG
481  TATGATGCGC  TCCACTTTGA  CCGTAGGCC  TGCAGCTGCT  GGAGCTGTGT  TCTTGAAGAG
541  GGATTCATGT  TTTACAGCT  CGAAGCCAC  GGCCTCCCG  TGACCTGCGC  AGGAGAACAG
601  TCCCGCAGCA  CCGAGGAGCA  CGAGCTGACT  TCTGCGCACT  ACAGGCGCT  ACAGGCGCT
661  CCCCCGAC  TCCCGGAGCC  ACCCGAATC  CTGCCCCCTC  AGCCCCCCCA  TGTGGCTCTC
721  TCGGACCTCT  TGAGCATGCT  GGGACCTCT  CAGGCGCGAA  GCCCCAGCTA  CGCTTCTCTA
781  AGCCAGAGGC  TGTTTACTAT  GACATCTCT  CTTTATTAT  TAGGTATTAT  ATCTATTATA
841  TTTTATTAT  TTTCTACTT  GAGATAATA  AGAGTTCAG  AGGACAAAAA  AAAAAAAA
901  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA  AAAAAAAA

```

FGF21 アミノ酸配列 (NP_061986) (配列番号: 33)

```

1  MDSDETFEHE  SGLMVSVLAG  LLLGACQAHF  IPDSPLPLQF  GGOVRQRYLY  TDDAQOTEAH
61  LEIREDTGTV  GAADQSPESL  LQLKALPGV  IQLIGVTSR  FLQCRPDAGL  YGSLHFDPEA
121  CSFRELLLED  GYVYQSEAH  GLPLHLPOK  SPHRDPATRG  PARFLPLPGL  PFALPEPPGI
181  LAFQPPVDS  SDPLSHVGS  QRSPSYAS

```

FGF21 核酸配列 (NM_020638) (配列番号: 34)

タンパク質コード領域 147-902

```

1  cggcaaaaaag  gagggaatcc  agtttagat  cctcaaccca  gctacttgca  agggagaagg
61  aaaaaggocag  tccagcctgg  gccaggagag  tcccagagag  agtgcaggt  ttoactctca
121  gccaccagcca  ctacagagac  ggcacgatgt  tccggggccc  cctcagctg  tgggtctgltg
181  cctgttgag  cgtctgagc  atgagctccc  tgaagactca  tcccaactgac  tcccaactgc
241  tgggtccag  ctgggtgag  ctgactccc  tgtacacag  cagacggagg  aacagctacc
301  aactcgagat  ccaacaagat  ggcctatgg  atgcgcacc  atctacagt  atctacagt
361  cctgatgat  cagatcagag  gatgctgt  tltgtgtgt  lacagtggt  atgagcagaa
421  gatacctct  catgatttc  agagacacca  atttggatc  cactatttc  agaccgaga
481  atctgaggt  ccaacacag  agcgtgaaa  agcgttaca  gctctacac  tctctcagt
541  atcaactcc  ggtcagctg  ggcggcgga  agagagctt  ctgcagagc  atgacccac
601  ccccttact  ccagttctg  tccggagga  acgagactcc  cctaattac  ttaacaccc
661  ccaaccacg  cgggacaccc  cggagcgcc  aggaacact  ggagcgagc  cccctgaca
721  tctgaagcc  cgggcggcg  atgaccccg  ccccgctc  ctgttcaag  gagctccga
781  ggcggagga  caagcgccg  atggcgagt  accatattg  gggcgtagc  ggcgtcgag
841  tgaacacaga  cgtcgaggga  agcggcgcc  aagctgcgc  tctctccg  aacttctct
901  agggctgctg  gaagggaacc  cttctaac  cactccac  caaacgagc  tcttccagc
961  gaccagctc  cagctgctc  cagagatgg  aaggtgaca  gggcctgta  tggaaattgc
1021  tggctctg  ggtccctc  ccaagaggt  agcttgaga  cacttgtag  tctccaaa
1081  catcgact  gactgtgca  acactgaca  ctacagctc  atgagagct  gttgatgaa
1141  acaggtaac  tagaatttc  cctctatga  aggtagag  aagggtctc  tccaactaa
1201  tttctcttc  ttgtgctct  ccttttat  acttttaag  ctcaagact  tgaagtgtg
1261  aaaaaaaaa  aaaaagagt  ggttctgag  ctcaagact  tgaagtgtg  ggaagagga
1321  aatcgagat  cccagagct  tctccactg  cctagact  taigtatag  tctccagc
1381  catcgact  gactgtgca  ctacagctc  atgagagct  gttgatgaa  gttgatgaa
1441  acaactatt  caagctctg  tcttctct  agactctg  ggaagagct  gtaaacagc
1501  tggtagtag  ctgtagaaa  ctgacagct  agacttgt  ctgtgtgaa  tgaagcaga
1561  atcataatg  aaaaactc  ctccatcag  gttgagac  tctgtctct  ctgtctctc
1621  ctgtgacac  acagcagag  ggcacagct  gttcccaat  tctgtccag  cagttcatg
1681  lacagcgct  ccttctctg  ttttgaaa  tttgtgtg  tttgtgtg  tttgtgtg
1741  gtttttacc  tggctcaga  aaactgcc  tgttagatt  tgttttcaa  aatgaaata
1801  aattccact  ctcttaag  gacttaatt  aagctctac  tccaggttg  agtagaact

```

【図 2 N】

```

781  dypaamreyl  askhriglas  salprteae  rllkgvdf  calnhftrf  vmbaglagar
841  ydsdrdiql  qdrlaspt  rliavpwgr  klirwvrrn  gdmidiytas  gidqaledd
901  rllkylgky  lqevikayli  dkvrkigya  klleakesp  rfgiftdsf  aksaiqfynk
961  vissrgf

```

バクテロドメイン 1 (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  gfsdgdrai
61  wknfnfipv  neaqfllydt  fknffwgi  tgalqwegw  kkdgkpaiv  dhfithlkn
121  vaaagssds  yilekdlaa  ldfiqvfyq  fsewprifp  dgivvanak  qllyystlld
181  alvlrniepi  vtylhwldpl  alqekyggw  ndtiidifnd  yatycofmfg  drvkyvithi
241  nplyvawhgy  gtmhagpek  gnaaavtytg  hnliakshk  whnythfrp  hqkqwsilc
301  gahwlepnrc  entmdlfcq  qmwovlvgf  amphlddgy  pegmrklfs  vlpifseak
361  hemrgtdidf  afsgpnnfk  plntmakmq  nvslnireal  nwikleyonn  riliasegnf
421  tdsrvktedt  tsaymnknfl  sqvlqaird  elrfgvtaw  slldgfewd  aytirrglyf
481  vdsnkqker  kpkasahyik  qilrengf  kstpdvagg  fpdfswagt  esvlkepaav
541  sspqfsdphl  yvwnatgnrl  lhrvegvrk  trpaqctdf  nikkllemla  rmkvthryfa
601  ldwaevlptg  nisavnrgal  ryzrcvswg  lkligsamvt  lyyphahlg  lpepllhag
661  wlnptaeaf  qayqglcfge  lgdlvkwit  ynrengdy  aahnlvaha
721  lawrydrqf  rpaqrgaval  alhadwaepa  npyadshwa  seefiqeila  wfaepflktg
781  dypaamecyi  askhriglas  salprteae  rllkgvdf  calnhftrf  vmbaglagar
841  ydsdrdiql  qdrlaspt  rliavpwgr  klirwvrrn  gdmidiytas  gidqaledd
901  rllkylgky  lqevikayli  dkvrkigya  klleakesp  rfgiftdsf  aksaiqfynk
961  vissrgfpe  nssacscqk  entactvif  lvqkpl

```

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

(配列番号: 40)

```

51  PEANLPGCT  PPGFTMAVG  SARYCTGSG  QGKRSASTN  PFTTHPLAF  EFGDQAG  TWARFSRPPA
101  PGDSRHASLP  LGAPSLQPA  TGDVADSDYN  NVFRDEALM  ELGVTHRF  RELGVQPVV  VLYHWLDPL
151  ISWARVLENG  SAGVENREGL  RYVRLLERL  RELGVQPVV  VLYHWLDPL  VLYHWLDPL  VLYHWLDPL
201  QDAYCGWANN  ALADHFEDYA  ELCFRHFQCG  VKYWTIDNE  VYVWAGHAT  VYVWAGHAT  VYVWAGHAT
251  GRAPGIRGS  PRGLYVANN  LLARAKVNH  LYNTSRFTG  QGVSTALS  QGVSTALS  QGVSTALS
301  HRINFRMTO  HSKKCKSL  DFULWFAK  VELDGYDF  KHNLSILP  KHNLSILP  KHNLSILP
351  DTRSEKKPI  KGTADFPALC  FGPTLSPLL  DPMHPLGL  SPNLQLLNL  SPNLQLLNL  SPNLQLLNL
401  IDLEFNHPQI  FIVENGWFS  GTKRDDAKY  MYLLKFTME  TLKALKLDG  TLKALKLDG  TLKALKLDG
451  DVIGYTAWSL  MDGFHWIRGY  SIRKGLFYD  FLSDQMLLP  KSSALFYOKL  KSSALFYOKL  KSSALFYOKL
501  IERNGFPLP  ENQLEPTGF  CDFAGVVDN  YICVDITLS  FTLMLVYLD  FTLMLVYLD  FTLMLVYLD
551  VHSKALIKV  GUVYKRRS  YCVFAIOP  GIALDEMY  THRSLEWA  THRSLEWA  THRSLEWA
601  LILPLNQSQ  VNHITLYOY  CMASLEVYN  IFPVVALOP  WAFNGLPL  WAFNGLPL  WAFNGLPL
651  LARGAWENP  YALAFABYA  RLCEFLGHH  VKLIMTNE  VMBEGLSAG  VMBEGLSAG  VMBEGLSAG
701  HNLLKHALA  WHVYNEKFRH  AQNKISIAL  QADNIEPAC  FSGDKKEVA  FSGDKKEVA  FSGDKKEVA
751  RVLEFDIGWL  AEPFSGSDY  PWWHRDLWG  RNFLLPXT  EDEKLLIGT  EDEKLLIGT  EDEKLLIGT
801  FDFALSQMT  TILVDSKED  PIKYNDLY  QSMDFTWL  SPQVAVPW  SPQVAVPW  SPQVAVPW
851  GLRKVLNML  KYGDFPMY  ISNGIDDL  AEDDLRYTY  MNYINLEAK  MNYINLEAK  MNYINLEAK
901  ARILDGILN  GFAYSFND  TAPRFLYR  AADFEPPK  MKRYKIDS  MKRYKIDS  MKRYKIDS
951  NGGFPETLE  RECPETVTC  TSCSFHTK  SLGSGGGSG  GGGSGGGSL  GGGSGGGSL  GGGSGGGSL
1001  KYPNAPSLG  SSGNGDLHL  TATARNYHL  ITHKNGHWD  AFHQITBAL  AFHQITBAL  AFHQITBAL
1051  MISEDADPY  GDMYDMRY  GSHFDYMG  RFGHGLNG  RFGHGLNG  RFGHGLNG  RFGHGLNG
1101  YDVHSPQYH  FLVSLGRAN  AFLPMNFP  YSOFLSRNE  IPIHFNTE  IPIHFNTE  IPIHFNTE
1151  PRHRTSAED  DSEROPLNL  KPRAMTPAP  ASCSQLESA  EDNSPMSDP  EDNSPMSDP  EDNSPMSDP
1201  LGVVRGVRN  THAGCTGEG  CRPFAKI*

```

【図 2 O】

シグナルペプチドを有さない s クロトー -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)

```

51  PEAAGLFGGT  FPDGFLWAVG  SAAYQTEGGW  EPGDGAQ  TWARFSRPPA
101 PGDSRNASLP  LGAPSPLOPA  TGDVASDSYN  NVFRDTEALR  ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG  SAGVPNREGI  RYRRRLERL  RELGVQPVVT  LYHMDLPQRL
201 QDAYGGMWNR  ALADHFRDYA  ELCFRHFGGQ  VKYWTIDNP  YVVAWHGYAT
251 GRAPGIRGS  PRLGYLVAHN  LLLAAKVMH  LINTSRPTQ  GGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD  HSIKECQKSL  DFVLCWFAK  VFDGQDPES  MKNNLSLILP
351 DFTSEKKFI  KGTADFFALC  GPTLSFQL  DPHMKFRQLE  SPNLKQLLSW
401 IDLEFNHFQI  FIVENGWFS  GTTKRDDAKY  MYLKKFIME  TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL  MDGFENHGY  SIRRGLFYVD  FLSQDRMLLP  KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP  ENQPLEGTFP  CDFAMGVVDN  YIQVDTTISQ  FTDLMVILWD
551 VHSKRLIKV  DGVVTKKRS  YCVDFAAIQ  QIALLOEMHV  TFRFSLDWA
601 LILPLGNQSO  VNHTILQYYR  CMASELVRVN  ITPVVALWQP  MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP  YTALAFAYYA  RLCFQELGHH  VKLWITMNEP  YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA  WHVYNEKFRH  AQNGKISIAL  QADWIEPACP  FSQKDKEVAE
751 RVLEFDIGWL  AEPIFGSGDY  PWMVRDWLWQ  RNNLLPYFT  EDEKKLIQST
801 FDFLALSHYT  TILVDSEKED  PIKYNIDLEV  QEMTIDTWLN  SPQVAVVFW
851 GLRVLNWLK  PKYQDLPMYI  ISNGIDDGLH  AEDDQLRVY  MQNYINEALK
901 AHILDGINLC  GYFAYSFNDR  TAPRFGLYRY  AADQFEPKAS  MKHYRKTIIS
951 NGFPFGPETLE  RFCPEEFVTC  TECSFHTFRK  SL
1001 KYPNASPLLG  SSWGGLIHL  Y  TATARNSTYH  QIHNQHVDD  APOHOTIYAL
1051 MIRSEDAGFV  VITGVMSRRY  LCMDFRGNIF  GSHYFDPENC  RFQHQTLENG
1101 YDVHNSFVTH  FLVSLGRARR  AFLPGMHPFP  ISQFLSRNNE  IPLIHNTFI
1151 PRRTQSAED  DSEKDLNVL  KPRAMTEPAP  ASCSQELFSA  EDNSPMASDP
1201 LGVVRGGRVN  THAGGTCPEG  CRPFAKFI*

```

シグナルペプチドを有さない FGF23 (SEQ ID NO:42)

```

61  VDGAHPQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFRG  NIFGSHYFDP  ENCRFOHOTL
121 ENGVDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGMN  PPYSQFLSR  RNEIFLIHFN  TPIPRRHTQS
181 AEDDSEKDFL  NVLKPARNMT  PAPASCQSEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG
241 PEGCRPFPAKF  I

```

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

```

61  VDGAHPQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFRG  NIFGSHYFDP  ENCRFOHOTL
121 ENGVDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGMN  PPYSQFLSR  RNEIFLIHFN  TPIPRRHTQS
181 AEDDSEKDFL  NVLKPARNMT  PAPASCQSEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG
241 PEGCRPFPAKF  I

```

【図 2 P】

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  MPASAPPRRP  RPPPPSLSL  LVLLGLGRR  LRAEPGDGAQ  TWARFSRPPA
51  PEAAGLFGGT  FPDGFLWAVG  SAAYQTEGGW  QHCKGASIW  DTTFTHPLAP
101 PGDSRNASLP  LGAPSPLOPA  TGDVASDSYN  NVFRDTEALR  ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG  SAGVPNREGI  RYRRRLERL  RELGVQPVVT  LYHMDLPQRL
201 QDAYGGMWNR  ALADHFRDYA  ELCFRHFGGQ  VKYWTIDNP  YVVAWHGYAT
251 GRAPGIRGS  PRLGYLVAHN  LLLAAKVMH  LINTSRPTQ  GGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD  HSIKECQKSL  DFVLCWFAK  VFDGQDPES  MKNNLSLILP
351 DFTSEKKFI  KGTADFFALC  GPTLSFQL  DPHMKFRQLE  SPNLKQLLSW
401 IDLEFNHFQI  FIVENGWFS  GTTKRDDAKY  MYLKKFIME  TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL  MDGFENHGY  SIRRGLFYVD  FLSQDRMLLP  KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP  ENQPLEGTFP  CDFAMGVVDN  YIQVDTTISQ  FTDLMVILWD
551 VHSKRLIKV  DGVVTKKRS  YCVDFAAIQ  QIALLOEMHV  TFRFSLDWA
601 LILPLGNQSO  VNHTILQYYR  CMASELVRVN  ITPVVALWQP  MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP  YTALAFAYYA  RLCFQELGHH  VKLWITMNEP  YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA  WHVYNEKFRH  AQNGKISIAL  QADWIEPACP  FSQKDKEVAE
751 RVLEFDIGWL  AEPIFGSGDY  PWMVRDWLWQ  RNNLLPYFT  EDEKKLIQST
801 FDFLALSHYT  TILVDSEKED  PIKYNIDLEV  QEMTIDTWLN  SPQVAVVFW
851 GLRVLNWLK  PKYQDLPMYI  ISNGIDDGLH  AEDDQLRVY  MQNYINEALK
901 AHILDGINLC  GYFAYSFNDR  TAPRFGLYRY  AADQFEPKAS  MKHYRKTIIS
951 NGFPFGPETLE  RFCPEEFVTC  TECSFHTFRK  SL

```

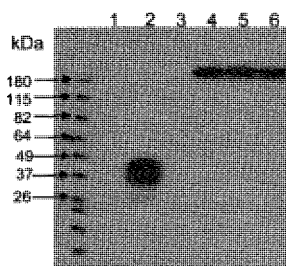
IgG シグナルペプチドを有する s クロトー (配列番号: 45)

```

1  MSLVLTQVLAL  LLNLITGLCG  RRLRAEPDGD  AQTWARFSRP  PAPEAAGLFQ
51  GTFPLGFLWA  VGSAAQTEG  GWQHQHGKAS  IWTTFTHPL  APPGDSRNAS
101 LPLGAPSPLO  PATGCVASDS  YNNVFRDTEA  LRELGVTHYR  FSISWARVLP
151 NGSAGVPNRE  GLRYRRLLE  RRELGVQPV  VTLYHMDLPQ  RLQDAYGGMW
201 NRALADHERD  YALCEFRHFG  GQVYKWTID  NPYVVAWHGY  ATGLAPGIR
251 GSRLGYLVA  HNLLAAKVM  WHLYNTSRP  TQGGQVSIAL  SSHWINPRRM
301 TDHSIKECQK  SLDFVLGWE  KPVFIDGDP  ESMKNLSSI  LPDFTSEKK
351 FKGTADFFA  LCGPFLSFQ  LLDPHMKFR  LSPNLRLQL  SWIDLEFNHP
401 QIFIVENGWF  VSGTKRDDA  KYMYLKKFI  METLKAIKLD  GVDVIGTAW
451 SLMDGFENH  GYSIRRGLEY  VDFLSQDKML  LPKSSALFYQ  KLIENGFPP
501 LPENQPLEGT  FPCDFANGVV  DNYIQVDTT  SQFTDLNVYL  WDVHHSKRLI
551 KVDGVVTKKR  KSYCVDFAAI  PQIALLQEM  HVTHFRFSLD  WALILPLGNQ
601 SQVNHTILQY  YRCMASELVR  VNIPTPVVAL  WPMAPNQGLP  RLARQGAWE
651 NPYTALAFAY  YARLCFQELG  HHVKLWITM  EPYTRNMTYS  AGHNLLKAHA
701 LAHWYNEKFI  RHAGNGKISI  ALQADWIEP  ACPFSQKDEK  AERVLEFDIG
751 WLAEPFSGG  DYPWMVRDWL  NORNNFLFY  FTDEKKLIQ  GTFDLALSH
801 YTTILVDSEK  EDPIKYNDYL  EQEMTIDTW  LNSPQVAVV  PWGLRKLWN
851 LKFKYGDLP  YIISNGIDD  LHAEDDQLRV  YMQNYINEA  LKAIHLDGIN
901 LCGYFAYSFN  DRTAPRFGLY  RYAADQFEK  ASMKHYRKII  DSNGFPGPET
951 LERFCPEEFT  VCTECSEFHT  RKSL*

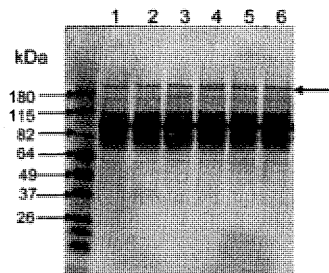
```

【図 3 A】



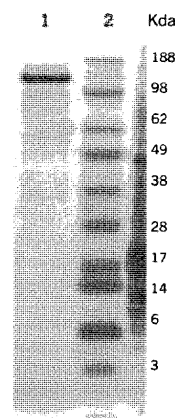
レーン 1, Ctrl; レーン 2, FGF23; レーン 3, s クロトー; レーン 4-6, s クロトー-FGF23

【図 3 B】



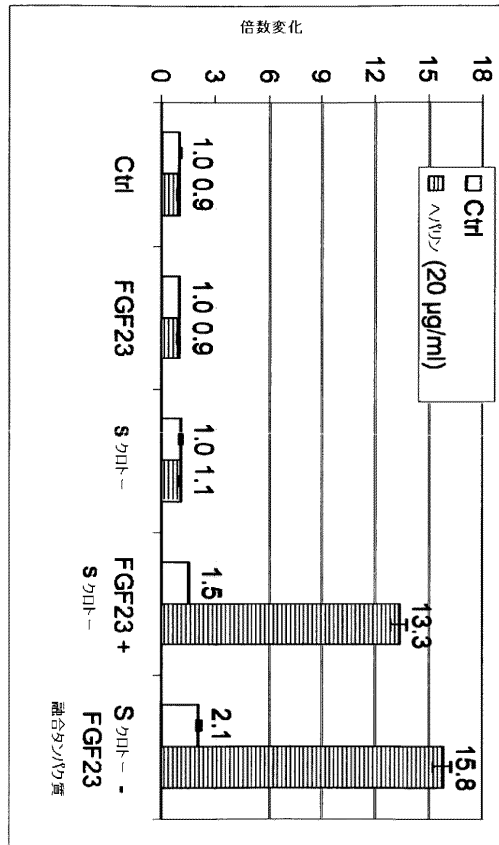
レーン 1, Ctrl; レーン 2, FGF23; レーン 3, s クロトー; レーン 4-6, s クロトー-FGF23

【図 3 C】

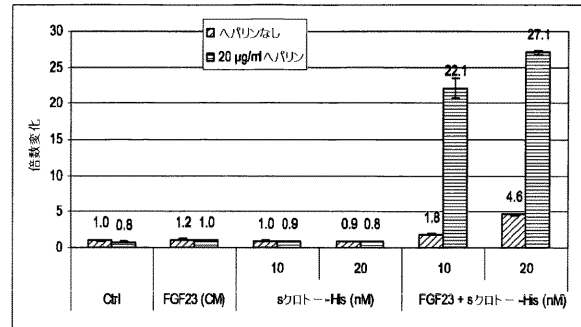


レーン 1, 精製された s クロトー-FGF23-6xHis;
レーン 2, 分子量マーカー

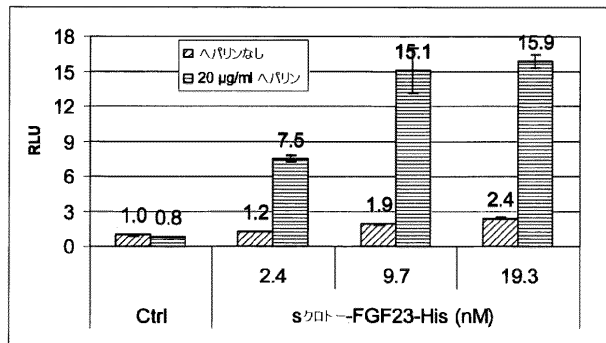
【図 4】



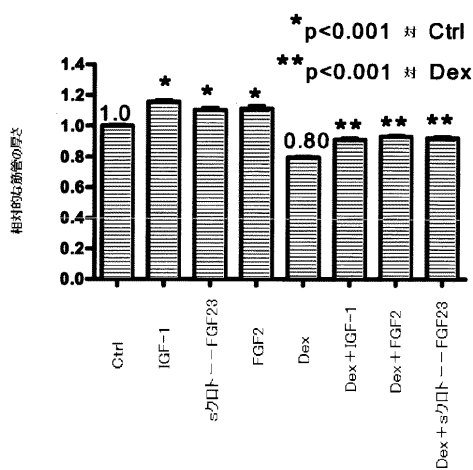
【図 5 A】



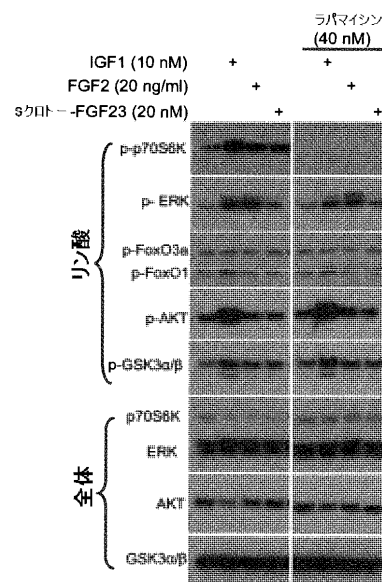
【図 5 B】



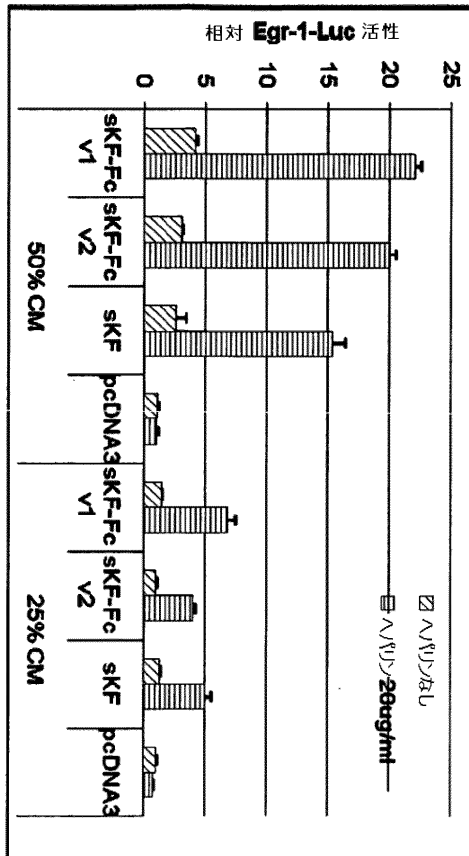
【図 6 A】



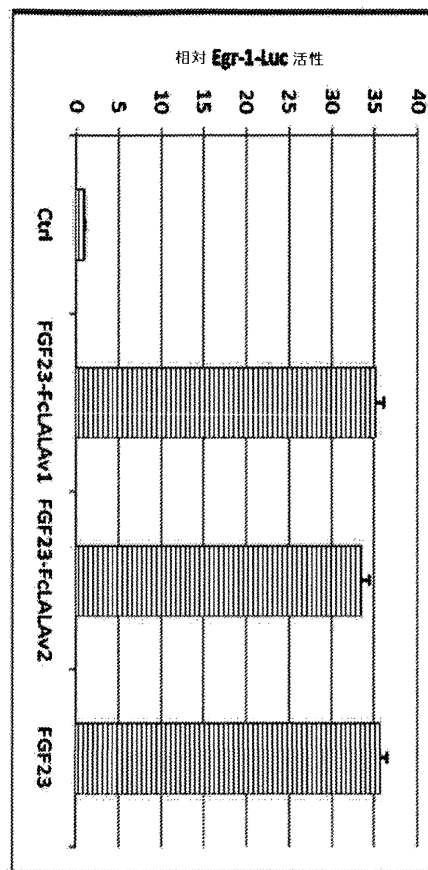
【図 6 B】



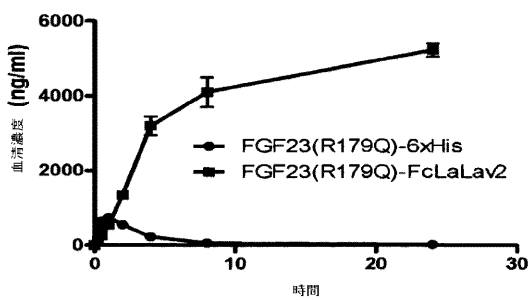
【図 7】



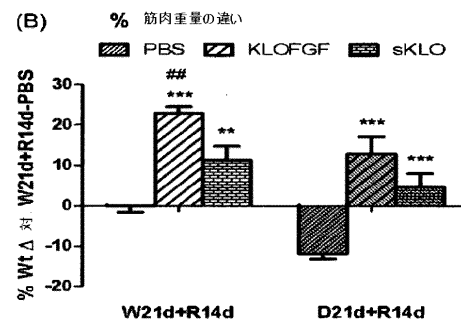
【図 8】



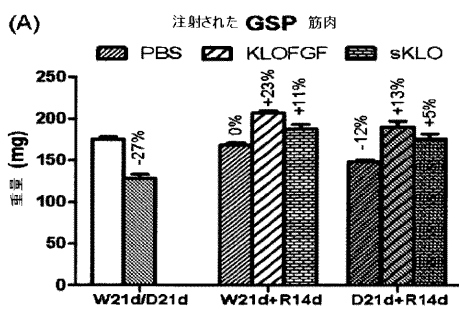
【図 9】



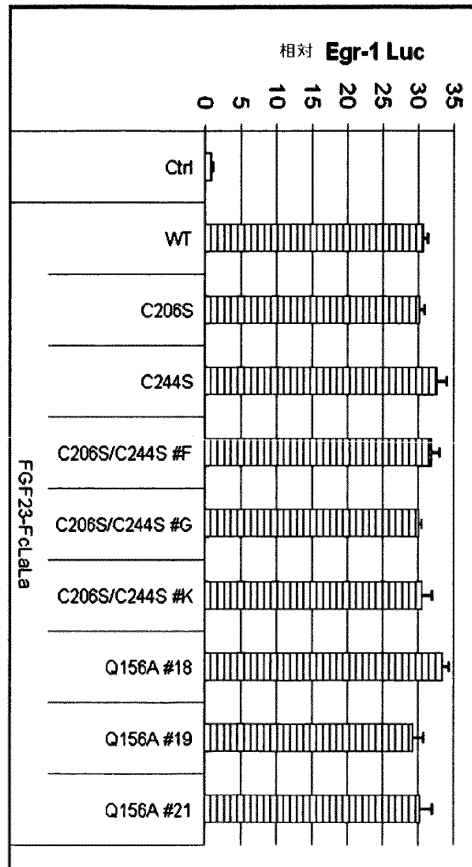
【図 10 B】



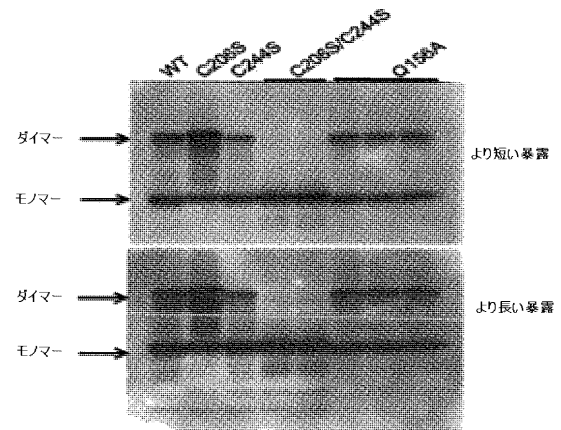
【図 10 A】



【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 3 3】

451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL S 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  HLYTATARN S
51 YHLQIHKN GH  VDGAPHQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFR G
101 NIFGSHYF DP  ENCRFQHQT L  ENGYDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGM N
151 PPPYSAFLSR  RNEIPLIHF N  TPIPRRHTQ S  AEDDSE RDPL  NVLKPRARMT
201 PAPASSSQEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG  PEGCRPF AKE
251 IGGGSAPEA  AGGPSVFLFP  PKPKDTLMIS  RTPEVTCVVV  DVSHEDPEV K
301 FNWYVDGVE V  HNAKTKPRE E  QYNSTYRVVS  VLTVLHQDWL  NGKEYKCKV S
351 NKALPAPIE K  TISKAKGQP R  EPQVYTLPPS  REEMTKNQVS  LTCLVKGFY P
401 SDIAVEWES N  GQPENNYKT T  PPVLDSDGSF  FLYSKLTVDK  SRWQQGNVFS
451 CSVMHEALHN  HYTQKSLSL S  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  HLYTATARN S
51 YHLQIHKN GH  VDGAPHQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFR G
101 NIFGSHYF DP  ENCRFQHQT L  ENGYDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGM N
151 PPPYSQFLSR  RNEIPLIHF N  TPIPRRHTQ S  AEDDSE RDPL  NVLKPRARMT
201 PAPASSSQEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG  PEGSRPFAKE
251 IGGGSAPEA  AGGPSVFLFP  PKPKDTLMIS  RTPEVTCVVV  DVSHEDPEV K
301 FNWYVDGVE V  HNAKTKPRE E  QYNSTYRVVS  VLTVLHQDWL  NGKEYKCKV S
351 NKALPAPIE K  TISKAKGQP R  EPQVYTLPPS  REEMTKNQVS  LTCLVKGFY P
401 SDIAVEWES N  GQPENNYKT T  PPVLDSDGSF  FLYSKLTVDK  SRWQQGNVFS
451 CSVMHEALHN  HYTQKSLSL S  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  HLYTATARN S
51 YHLQIHKN GH  VDGAPHQTIY  SALMIRSEDA  GFVVITGVMS  RRYLCMDFR G
101 NIFGSHYF DP  ENCRFQHQT L  ENGYDVYHSP  QYHFLVSLGR  AKRAFLPGM N
151 PPPYSAFLSR  RNEIPLIHF N  TPIPRRHTQ S  AEDDSE RDPL  NVLKPRARMT
201 PAPASSSQEL  PSAEDNSPMA  SDPLGVVRGG  RVNTHAGGTG  PEGSRPFAKE
251 IGGGSAPEA  AGGPSVFLFP  PKPKDTLMIS  RTPEVTCVVV  DVSHEDPEV K
301 FNWYVDGVE V  HNAKTKPRE E  QYNSTYRVVS  VLTVLHQDWL  NGKEYKCKV S
351 NKALPAPIE K  TISKAKGQP R  EPQVYTLPPS  REEMTKNQVS  LTCLVKGFY P
401 SDIAVEWES N  GQPENNYKT T  PPVLDSDGSF  FLYSKLTVDK  SRWQQGNVFS

```

【表 3 4】

451 CSVMHEALHN HYTQKSLSL S 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 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

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、ポリペプチドリリンカーにより連結している、[1] に記載の融合ポリペプチド。

[5]

ポリペプチドリリンカーが、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]

ポリペプチドリリンカーが、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 3 0 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、該ポリペプチドリリンカーの 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、該ポリペプチドリリンカーの 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、該ポリペプチドリリンカーの 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、該ポリペプチドリリンカーの 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。

[1 0]

(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。

[1 1]

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、[1 0] に記載の融合ポリペプチド。

[1 2]

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、[1 0] に記載の融合ポリペプチド。

[1 3]

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、[1 0] に記載の融合ポリペプチド。

[1 4]

(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-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 Ig 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-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-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 変異体 (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-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、[3 0]に記載の方法。

[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、[3 0]に記載の方法。

[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、[3 1]に記載の方法。

[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。

[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、[3 4]に記載の方法。

[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、[3 4]に記載の方法。

[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。

[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、[3 7]に記載の方法。

[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。

[4 0]

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、[3 9] に記載の方法。

[4 1]

(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、個体における癌を処置または予防するための方法。

[4 2]

癌が乳癌である、[4 1] に記載の方法。

[4 3]

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、[4 1] に記載の方法。

[4 4]

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。

[4 5]

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。

[4 6]

配列番号 : 4 7 または配列番号 : 4 9 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。

[4 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、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 0 2 1 3 9 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 1 0 0 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 0 2 1 3 9 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 1 0 0 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