



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107810201 A

(43)申请公布日 2018.03.16

(21)申请号 201580075428.5	C12N 15/62(2006.01)
(22)申请日 2015.12.02	A61K 38/18(2006.01)
(30)优先权数据	A61P 3/00(2006.01)
62/087,516 2014.12.04 US	A61P 13/12(2006.01)
(85)PCT国际申请进入国家阶段日	A61P 35/00(2006.01)
2017.08.03	A61P 21/00(2006.01)
(86)PCT国际申请的申请数据	A61P 25/00(2006.01)
PCT/IB2015/059294 2015.12.02	A61P 9/10(2006.01)
(87)PCT国际申请的公布数据	A61P 11/00(2006.01)
W02016/088059 EN 2016.06.09	A61P 19/10(2006.01)
(71)申请人 诺华股份有限公司	A61P 19/02(2006.01)
地址 瑞士巴塞尔	A61P 29/00(2006.01)
(72)发明人 郭冬林 C·伊贝邦乔	A61P 37/06(2006.01)
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所	A61P 9/12(2006.01)
11247	A61P 25/28(2006.01)
代理人 胡志君 黄革生	A61P 25/14(2006.01)
(51)Int.Cl.	A61P 27/12(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)	A61P 27/02(2006.01)
	A61P 3/10(2006.01)
	A61P 3/04(2006.01)

权利要求书3页 说明书93页 附图31页

(54)发明名称

使用KLOTHO变体多肽的方法和组合物

(57)摘要

本公开涉及与已经从C端缺失1个到多达约20个氨基酸、任选地还具有V563和/或K795处突变的 α sKlotho变体或片段相关的组合物和方法。本公开还涉及具有V563和/或K795处突变的 α sKlotho多肽变体或片段,其中所述多肽变体或片段是全长的,或任选地已经从C端缺失1个到多达约20个氨基酸。本公开还涉及融合多肽,所述融合多肽包含(a) α sKlotho,其中已经从C端缺失1个到多达约20个氨基酸,任选地还具有V563和/或K795处的突变;(b)接头;和(c)FGF23,任选地具有R179、C206和/或C244处的突变,或(c)血清白蛋白。

1. 一种组合物,其包含融合多肽,所述融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho,其中已经从C端缺失约20个氨基酸,任选地还具有V563和/或K795处的突变;(b) 接头;和(c) FGF23,任选地具有R179、C206和/或C244处的突变,或(c) 血清白蛋白。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有V563处的突变。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有K795处的突变。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有V563和K795处的突变。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO:77的序列。

6. 根据权利要求1所述的组合物,其中(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO:78的序列。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中(c) FGF23具有R179处的突变。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中(c) FGF23具有C206处的突变。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其中(c) FGF23具有C244处的突变。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中(c) FGF23具有R179处的突变和C206或C244处的突变。

11. 根据权利要求1所述的组合物,其中(c) FGF23具有R179、C206和C244处的突变。

12. 根据权利要求1所述的组合物,其中(c) FGF23具有YPNASPLLGSSWGGLIHLTYTATARN SYHLQIHKN GHVDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYL CMDFRGN IFGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPPPYSQLSRRNEIPLIHFNTPIPRRHT QSAEDDSERDPLNLVKPRARMTPAPASCSQELPSAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNTHAGGTGPEGCRPFAKFI的序列(SEQ ID NO:80的一部分)。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO:77或78的序列。

14. 根据权利要求12所述的组合物,其中(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO:77的序列。

15. 根据权利要求12所述的组合物,其中(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO:78的序列。

16. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述接头是多肽接头。

17. 根据权利要求18所述的组合物,其中多肽接头包含了包含接头的一个或多个拷贝的氨基酸序列,所述接头选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18。

18. 根据权利要求1所述的组合物,其中融合多肽还包含信号肽。

19. 根据权利要求1所述的组合物,其中融合多肽包含SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1至20中任一项所述的组合物,其还包含可药用载体。

21. 核酸,其包含编码权利要求1所述的融合多肽的序列。

22. 宿主细胞,其包含权利要求21所述的核酸。

23. 载体,其包含权利要求21所述的核酸。

24. 治疗或预防Klotho相关疾病的方法,所述方法包括步骤:向有需求的个体施用治疗有效量的包含融合多肽的组合物,所述融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho,其中已经从C端缺失约20个氨基酸,任选地还具有V563和/或K795处的突变;(b) 接头;和(c) FGF23,任选地具有R179、C206和/或C244处的突变。

25. 治疗或预防Klotho相关疾病的方法,所述方法包括步骤:向有需求的个体施用治疗有效量的权利要求1至21中任一项所述的组合物。

26. 根据权利要求24或25所述的方法,其中Klotho相关疾病选自:年龄相关的疾病、代谢疾病、高磷酸盐血症、钙质沉着症、慢性肾脏疾病、慢性肾衰竭、癌症、乳腺癌和肌肉萎缩。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中年龄相关的疾病选自肌少症、皮肤萎缩、肌肉耗损、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中代谢疾病选自II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症。

29. 组合物,包含其中已经从C端缺失约20个氨基酸,任选地还具有V563和/或K795处突变的 α sKlotho。

30. 根据权利要求29所述的组合物,其中已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有V563处的突变。

31. 根据权利要求29所述的组合物,其中已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有K795处的突变。

32. 根据权利要求29所述的组合物,其中已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有V563和K795处的突变。

33. 根据权利要求29所述的组合物,其中已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO:77的序列。

34. 根据权利要求29所述的组合物,其中已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO:78的序列。

35. 治疗或预防Klotho相关疾病的方法,所述方法包括步骤:向有需求的个体施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含(a) α sKlotho,其中已经从C端缺失约20个氨基酸,任选地还具有V563和/或K795处的突变。

36. 治疗或预防Klotho相关疾病的方法,所述方法包括步骤:向有需求的个体施用治疗有效量的权利要求29至34中任一项所述的组合物。

37. 根据权利要求35或36所述的方法,其中Klotho相关疾病选自:年龄相关的疾病、代谢疾病、高磷酸盐血症、钙质沉着症、慢性肾脏疾病、慢性肾衰竭、癌症、乳腺癌和肌肉萎缩。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述年龄相关的疾病选自肌少症、皮肤萎缩、肌肉耗损、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中代谢疾病选自II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症。

使用KLOTHO变体多肽的方法和组合物

1. 背景技术

[0001] 成纤维细胞生长因子 (FGF) 构成一个在许多生物中表达的同源多肽生长因子家族 (Ornitz和Itoh, *Genome Biol.* 2:reviews, 3005.1-3005.12 (2001))。在脊椎动物物种当中, FGF在基因结构和氨基酸序列方面高度保守, 彼此具有13%-71%之间的氨基酸同一性。在人类中, 存在22种已知的FGF家族成员 (FGF15是人FGF19的小鼠直向同源物, 因此不存在人FGF15)。在早期发育期间, FGF调节细胞增殖、迁移和分化, 但是在成年生物中, FGF维持稳态、组织修复中的功能并对损伤的响应。

[0002] FGF作为生长因子通过结合并因而激活细胞表面FGF受体来发挥作用。FGF受体 (FGFR) 是通过FGFR自我磷酸化、FRS2 (FGF受体底物2) 和ERK1/2 (胞外信号调节的蛋白激酶1/2) 的磷酸化和激活Egr-1 (早期生长反应-1) 而激活信号转导的酪氨酸激酶受体。FGF还对硫酸肝素蛋白聚糖具有高亲和力。与FGF结合时, 硫酸肝素增强FGFR的活化。

[0003] α -Klotho基因编码一种130kDa具有胞外结构域和短胞质结构域的I型单次跨膜蛋白。 α -Klotho蛋白的胞外结构域包含两个亚结构域, 称作KL-D1和KL-D2。这两个亚结构域与细菌和植物的 β -葡萄糖苷酶共有序列同源性。 α -Klotho蛋白的胞外结构域可以通过跨膜结构域与细胞表面结合或可以被剪切并释放入胞外环境。胞外结构域的剪切似乎受胞外局部低 Ca^{2+} 浓度促进。

[0004] 除 α -Klotho之外, 还已经鉴定了 α -Klotho的同源物 β -Klotho (Ito等人, *Mech. Dev.* 98:115-9 (2000))。 β -Klotho也是具有胞外亚结构域KL-D1和KL-D2的I型单次跨膜蛋白。

[0005] 已经展示对 α -Klotho表达的调节在哺乳动物中产生衰老相关的特征。对 α -Klotho基因中功能丧失突变纯合的小鼠形成类似于人类衰老的特征, 包括寿命缩短、皮肤萎缩、肌肉耗损、动脉硬化、肺气肿和骨质疏松症 (Kuro-o等人, *Nature*, 390:45-51 (1997))。相反, 相对于野生型小鼠, 小鼠中 α -Klotho基因的过量表达延长寿命并增加抗氧化应激性 (Kurosu等人, *Science* 309:1829-1833 (2005); Yamamoto等人, *J Biol Chem.* 280:38029-38034 (2005))。

[0006] 最近研究已经展示了FGF23缺陷小鼠和 α -Klotho缺陷小鼠之间惊人相似的生物学特征 (Shimada等人, *J. Clin. Invest.* 113:561-568 (2004); Yoshida等人, *Endocrinology* 143:683-689 (2002)), 提示FGF23和 α -Klotho之间的功能性交互作用。这些研究导致就借助其相应FGF受体的结合作用和信号传导而言, 鉴定了 α -Klotho作为FGF23的必备配偶体 (Urakawa等人, *Nature* 22:1524-6 (2007))。 α -Klotho基因主要在肾、甲状旁腺和脉络丛中表达。猜测 α -Klotho的组织特异性表达将FGF23信号传导的激活限于这些组织。

[0007] 类似于FGF23/ α -Klotho, 在借助其相应FGF受体的结合作用和信号传导方面, β -Klotho是FGF19和FGF21的必备配偶体 (Ogawa等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:7432-7 (2007); Lin等人, *J Biol Chem.* 282:27227-84 (2007); 和Wu等人, *J Biol Chem.* 282:29069-72 (2007))。这类研究还已经展示 β -Klotho参与调节组织特异性代谢活动。起初显示 β -Klotho与FGF21一起作为调节脂肪组织中糖和脂质代谢的辅因子发挥作用。 β -Klotho连同

FGF19一起调节肝中的胆汁酸代谢,因此解释了 β -Klotho缺陷小鼠中胆汁合成升高(Ito等人,J Clin Invest.2005Aug;115(8):2202-8)。

[0008] 美国专利号6,579,850描述了包含 α -Klotho多肽的多肽和组合物。公开了人和小鼠的 α -Klotho多肽。该专利也公开了包含所述多肽的组合物可用于治疗与过早衰老相似的综合征、治疗成体疾病和抑制衰老。

[0009] 美国专利号7,223,563描述了编码FGF23多肽序列的分离的核酸或包含这种分离的核酸的重组细胞。该专利进一步涉及诊断和治疗低血磷酸盐病和高血磷酸盐病、骨质疏松症、皮肤炎和冠状动脉病的方法。

[0010] 美国专利号7,259,248描述了编码FGF21多肽序列的分离的核酸。该专利进一步涉及诊断和治疗肝脏疾病、与胸腺功能相关疾病的方法和治疗睾丸疾病的方法。

[0011] 然而仍需要 α -Klotho、FGF23的新人工变体及包含这些组分的融合多肽。

[0012] 2. 本公开概述

[0013] 本公开涉及用多肽、融合多肽或可溶性多肽预防或治疗年龄相关的疾病或代谢疾病的方法、用途、试剂盒和组合物。

[0014] 本公开的多肽例如包含Klotho变体,如 α sKlotho Δ C-20 (其中已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸),其任选地还具有V563和/或K795处的突变。作为另一个例子,多肽是具有V563和/或K795处突变的 α sKlotho变体,所述 α sKlotho变体是全长的,或其中任选地已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸。任何这类多肽是Klotho C端缺失变体。这种Klotho C端缺失变体可以例如通过添加PEG和/或其他多肽融合进一步修饰。合适的融合多肽尤其包括FGF23或其变体、或血清白蛋白或其变体。因此作为一个非限制性例子,本公开的融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho Δ C-20 (其中已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸),其任选地还具有V563和/或K795处的突变;和(b) 另一种多肽,例如,FGF23 (无FGF23信号肽),任选地具有R179、C206和/或C244处的突变,或(b) 血清白蛋白;和任选地,(c) 间插在(a) 和(b) 之间的接头。因此作为一个非限制性例子,本公开的融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho变体,所述变体具有V563和/或K795处的突变并且任选地是全长的或是 Δ C-20 (其中已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸);和(b) 另一种多肽,例如,FGF23 (无FGF23信号肽),任选地具有R179、C206和/或C244处的突变,或(b) 血清白蛋白;和任选地,(c) 间插在(a) 和(b) 之间的接头。在一些实施方案中,融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho (例如,缺少跨膜结构域和任选地缺少信号肽的 α Klotho),其中已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸,任选地还具有V563和/或K795处的突变;(b) 接头(例如,长度为约10、约20、约30或约40个氨基酸);和(c) FGF23,任选地具有R179、C206和/或C244处的突变。在一些实施方案中,FGF23组分具有C206和/或C244处的突变。在这些融合物的一些实施方案中, α sKlotho具有V563和/或K795处的突变。在一些实施方案中,sKlotho Δ C-20由SEQ ID NO:77或78 (后者具有突变V563A和K795E) 代表。在一些实施方案中,融合多肽包含 α sKlotho N端的信号肽。在多个实施方案中,信号肽是Klotho信号肽。在一些实施方案中,信号肽由SEQ ID NO:81的粗体、加下划线部分代表。在多个实施方案中,接头是本领域已知的能够连接两种肽的任何类型接头。在多个实施方案中,接头包含一个或多个氨基酸。在多个实施方案中,接头包含SEQ ID NO:11至18的任何序列或其任何数目或组合。在

多个实施方案中,接头包含SEQ ID NO:12的1、2、3或更多个拷贝。在多个实施方案中,接头包含3拷贝的SEQ ID NO:12。在一些实施方案中,融合多肽由SEQ ID NO:79、80、81或82代表。

[0015] 本公开的多肽和融合多肽可以用于治疗或预防FGF23相关的或Klotho相关的疾病,如年龄相关的疾病(其选自肌少症(sarcopenia)、皮肤萎缩、肌肉耗损(muscle wasting)、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全(immunologic incompetence)、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失)、代谢疾病(选自II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症)、高磷酸盐血症、钙质沉着症、慢性肾脏疾病、慢性肾衰竭、癌症、乳腺癌和/或肌肉萎缩。在多个实施方案中,本公开的Klotho变体多肽和融合多肽可以用于治疗肾脏疾病的多种方法中。

[0016] 在融合多肽的一些实施方案中,FGF23是突变的。在一些实施方案中,融合多肽包含野生型FGF23。在一些实施方案中,融合多肽的FGF23组分由SEQ ID NO:42或43或由SEQ ID NO:79至82任一者的粗体部分或前述任一者的功能活性变体、片段或衍生物代表。在本公开的一个实施方案中,融合多肽包含:包含FGF23的功能活性变体的多肽,所述功能活性变体具有R179、Y154、C206和C244中任意处的突变。实施例7和实施例8和图13和图14中所示的数据显示,这些突变减少聚集、减少不希望的蛋白酶诱导的剪切和增加产生。FGF23 R179/Y154/C206/C244突变体产生更多的蛋白质,但是降解产物少得多并保留FGF23活性。

[0017] 在多个实施方案中,融合多肽还包含修饰的Fc片段,所述修饰的Fc片段具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期。例如,融合多肽可以包含Klotho变体[例如,Klotho或 α Klotho Δ C-20(其中已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸),其任选地还具有V563和/或K795处的突变;或具有V563和/或K795处突变的Klotho变体或 α Klotho变体,所述变体是全长的,或其中任选地已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸]以及修饰的Fc片段,所述修饰的Fc片段具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期。

[0018] 在一些实施方案中,本公开提供一种Klotho融合多肽,所述融合多肽包含Klotho蛋白或其活性片段或变体和成纤维细胞生长因子或其活性片段或变体。在一些实施方案中,融合多肽包含Klotho多肽、FGF(如FGF23)和修饰的Fc片段。Fc片段可以例如具有减少的Fc γ 受体结合作用和增加的血清半寿期。SEQ ID NO:46、47、48和49中描述了包含 α Klotho、FGF23和FcLALA(修饰的Fc片段,其具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期)的融合蛋白。

[0019] 在一些实施方案中,融合多肽或蛋白质包含FGF(例如,FGF23)或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体);和修饰的Fc片段或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)。SEQ ID NO:50、51、52和53中描述了包含FGF23和FcLALA的融合蛋白。在一些实施方案中,融合多肽具有在FGF23中减少聚集和/或蛋白酶介导的剪切作用的一个或多个突变。

[0020] 在第一方面,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域或其活性片段或变体和成纤维细胞生长因子或其活性片段或变体。在一些实

施方案中,融合物还包含修饰的Fc片段,所述修饰的Fc片段具有减少的Fc γ 受体亲和力(例如,减少的Ka或增加的Kd)和/或增加的血清半寿期。Klotho胞外结构域可以衍生自 α 或 β Klotho同工型。另外,虽然主要参考成纤维细胞生长因子-19、成纤维细胞生长因子-21和成纤维细胞生长因子-23描述了Klotho融合多肽的FGF组分,但构思了二十三种已知FGF的任一者可以用于实施本公开。本申请的读者可以认为,单独并且具体地构思了 α 或 β 胞外结构域与每种人FGF蛋白或其活性片段或变体的各自每种组合。

[0021] 根据本公开,Klotho蛋白的胞外结构域可以包括Klotho蛋白或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)的KL-D1结构域和KL-D2结构域的一者或两者。在一些实施方案中,本公开的Klotho融合多肽具有Klotho蛋白或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)的至少两个胞外亚结构域。例如,所述的至少两个胞外亚结构域可以是处于串联重复的至少两个KL-D1结构域、处于串联重复的至少两个KL-D2结构域或至少一个KL-D1结构域和至少一个KL-D2结构域。在多个实施方案中,本公开的融合多肽包含全长 α Klotho蛋白的氨基酸28-292或氨基酸28-982(SEQ ID NO:7)。在另一个实施方案中,本公开的融合多肽包含全长 β Klotho蛋白的氨基酸52-997。

[0022] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽的组分包含:(a)包含成纤维细胞生长因子23(FGF23)或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)的多肽,其中FGF23具有位置R179、Y154、Q156、C206和C244中一者或多者处的突变;和(b)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,或包含Klotho蛋白或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)的至少一个胞外亚结构域的多肽;以及任选地(c)接头。实施例8和图13和图14中所示的结果显示,FGF23 R179/Y154/C206/C244突变体产生更多的蛋白质,但是降解产物少得多,但保留明显的FGF23活性。

[0023] 并非FGF23突变的全部组合均同等有效。此外,并非特定位点处的全部突变均同等有效。S155处的突变比Y154处的突变产生多得多的降解产物。此外,突变Y154D比突变Y154H或Y154N产生较少降解产物。因此:

[0024] 在本公开的一个实施方案中,本公开提供一种包含融合多肽的组合物,所述融合多肽包含了:(a)包含具有R179、Y154、C206和C244处突变的FGF23功能活性变体的多肽,和(b)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,和任选地(c)接头,其中FGF23不具有S155处的突变。

[0025] 在本公开的一个实施方案中,本公开提供一种包含融合多肽的组合物,所述融合多肽包含了:(a)包含具有R179、Y154、C206和C244处突变的FGF23功能活性变体的多肽,和(b)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,和任选地(c)接头,其中Y154处的突变是Y154D。

[0026] 在本公开的一个实施方案中,本公开提供一种包含融合多肽的组合物,所述融合多肽包含了:(a)包含具有R179、Y154、C206和C244处突变的FGF23功能活性变体的多肽,和(b)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,和任选地(c)接头,其中Y154处的突变是Y154D并且其中FGF23不具有S155处的突变。

[0027] 下文公开了其他的额外实施方案。

[0028] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽的组分包含:(a)包含具有R179、Y154、C206和C244处突变的FGF23功能活性变体的多肽;和(b)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,或包含Klotho蛋白或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)的至少一个胞外亚结构域的多肽;以及任选地(c)接头。

[0029] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽的组分包含:(a)包含具有R179、Y154、C206和C244处突变的FGF23功能活性变体的多肽,和(b)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,和任选地(c)接头。

[0030] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽的组分包含:(a)包含具有R179Q、Y154D、C206S和C244S突变的FGF23功能活性变体的多肽,和(b)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,和任选地(c)接头。SEQ ID NO:70和74中提供这个实施方案的例子。

[0031] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽的组分包含:(a)包含具有R179Q、Y154C、C206S和C244S突变的FGF23功能活性变体的多肽,和(b)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,和任选地(c)接头。SEQ ID NO:72和76中提供这个实施方案的例子。

[0032] 所述组分可以例如通过肽键化学地连接或符合可读框地融合。它们还可以经接头连接。多肽接头的非限制性例子是SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17和18。这类接头可以包含SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17和18的至少一个和直至约30个重复。在另一个非限制性实施方案中,融合物包含(2)FGF或其活性片段或变体和(3)修饰的Fc片段。融合物的多个组分可以按任何顺序有效连接;多肽(1)可以有效连接至(2)或(3)的多肽的N端;多肽(2)可以有效连接多肽(1)或(3)的N端;多肽(3)可以有效连接多肽(1)或(2)的N端。

[0033] 根据本公开,Klotho蛋白的胞外亚结构域、成纤维细胞生长因子和(任选的)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段可以按多种取向和方式彼此有效连接。例如,Klotho蛋白的胞外亚结构域可以有效连接至成纤维细胞生长因子的N端,或备选地成纤维细胞生长因子可以有效连接至Klotho蛋白的胞外亚结构域的N端。

[0034] 在一个实施方案中,本公开提供了包含Klotho蛋白的sKlotho和接头的融合多肽。在另一个实施方案中,本公开提供了包含 α Klotho蛋白的sKlotho和接头的融合多肽。在另一个实施方案中,本公开提供了包含 β Klotho蛋白的sKlotho和接头的融合多肽。在又一个实施方案中,本公开提供了人FGF蛋白或其活性片段或变体(例如,无信号肽)和接头。在一个实施方案中,本公开提供用于治疗病理学疾病的疗法中或用作治疗病理学疾病的药物的融合蛋白、核酸分子或药物组合物。本公开还涵盖了包含本公开的融合蛋白的药物组合物及其用于治疗或预防年龄相关的疾病或代谢疾病的用途。在一些实施方案中,融合蛋白还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0035] 在一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含具有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho,其(直接或经接头间接)融合至FGF-23。在另一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含没有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho,其(直接或经接头间接)融合至FGF-23。在另一个实施方案中,本公开提供了具有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho(直接或经接头间接)融合至无信号肽的FGF-23。在另一个实施方案中,本公开提

供了融合多肽,所述融合多肽包含无信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho,其(直接或经接头间接)融合至无信号肽的FGF-23。在一些实施方案中,融合蛋白还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0036] 在另一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含具有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho,其(直接或经接头间接)融合至FGF-23 (R179Q) 变体。在另一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含没有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho,其(直接或经接头间接)融合至FGF-23 (R179Q) 变体。在另一个实施方案中,本公开提供了具有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho(直接或经接头间接)融合至无信号肽的FGF-23 (R179Q) 变体。在另一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含无信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho,其(直接或经接头间接)融合至无信号肽的FGF-23 (R179Q) 变体。在一些实施方案中,融合蛋白还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0037] 在一个实施方案中,本公开提供了一种融合多肽,所述融合多肽包含:(a) 包含成纤维细胞生长因子23 (FGF23) 或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)的多肽,其中FGF23具有位置Y154、Q156、C206和C244中一者或多者处的突变;和(b) 具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段,或包含Klotho蛋白或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)的至少一个胞外亚结构域的多肽;以及任选地(c) 接头。这类融合多肽在SEQ ID NO:54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67和68中公开。

[0038] 在一个实施方案中,本公开提供融合多肽,所述的融合多肽包含(1) 具有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体);(2) 接头;和(3) 无信号肽的FGF-23 (R179Q) 变体或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)。在另一实施方案中,本公开提供融合多肽,所述的融合多肽包含(1) 没有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体);(2) 接头;和(3) 无信号肽的FGF-23 (R179Q) 变体或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)。在一些实施方案中,本公开的融合多肽是糖基化的。在一些实施方案中,融合蛋白还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0039] 在一个实施方案中,本公开提供融合多肽,所述的融合多肽包含(1) 具有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho (SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45) 或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体);(2) 包含SEQ ID NO:11的接头;和(3) 无信号肽的FGF-23 (R179Q) 变体 (SEQ ID NO:43) 或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)。在另一个实施方案中,本公开提供融合多肽,所述的融合多肽包含(1) 没有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho (SEQ ID NO:7) 或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体);(2) 包含SEQ ID NO:11的接头;和(3) 无信号肽的FGF-23 (R179Q) 变体 (SEQ ID NO:43) 或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守

性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)。在一个实施方案中,本公开提供包含SEQ ID NO:19、20、40或41的氨基酸序列的融合多肽。在一些实施方案中,本公开的融合多肽是糖基化的。

[0040] 在一个实施方案中,本公开提供融合多肽,所述的融合多肽包含具有信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho(SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45)或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体);和包含SEQ ID NO:11的接头。在另一个实施方案中,本公开提供融合多肽,所述融合多肽包含无信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho(SEQ ID NO:7);和包含SEQ ID NO:11的接头。在一些实施方案中,本公开的融合多肽是糖基化的。在一些实施方案中,融合蛋白还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0041] 在一个实施方案中,本公开提供融合多肽,所述融合多肽包含人FGF蛋白或其活性片段或变体(例如,无信号肽);和包含SEQ ID NO:11的接头。在一些实施方案中,本公开的融合多肽是糖基化的。在一些实施方案中,融合蛋白还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0042] 在一个实施方案中,本公开提供融合多肽,所述融合多肽包含人FGF蛋白(例如,FGF23)或其活性片段或变体(例如,无信号肽);接头(例如,包含SEQ ID NO:11的接头);和sKlotho(具有或没有信号肽)或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)或Fc γ 受体(例如,FcLALA);其中FGF(例如,FGF23)具有以下这些残基处的一个或多个突变:R179、Y154、Q156、C206和/或C244。在多个实施方案中,突变是R179Q、Y154D、Q156A、C206S和/或C244S。即使这些突变在人、恒河猴、牛、小鼠和大鼠的FGF23中保守,但突变它们不阻碍FGF23活性。反而通过减少聚集、减少不利的蛋白酶诱导的剪切作用并增加蛋白质从细胞产生,对这些氨基酸的突变出乎意料地增强蛋白质的质量。在多个实施方案中,包含一个或多个FGF23突变的融合蛋白是糖基化的。

[0043] 在一个实施方案中,本公开提供一种药物组合物(例如,处于肌肉施用形式),所述组合物包含融合多肽(例如,糖基化或非糖基化)(例如,作为唯一药物活性成分),所述融合多肽包含了(1)无信号肽的FGF-23(R179Q)变体(SEQ ID NO:43)或其包含减少聚集和/或蛋白酶介导的剪切作用的额外突变的变体或功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体),(2)任选地,包含SEQ ID NO:11的接头;和(3)带信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho(SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45)或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)或具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段;以及该药物组合物在治疗病理学疾病(例如治疗和/或预防年龄相关的疾病如肌萎缩)的疗法中或用作治疗病理学疾病的药物的用途。在另一个实施方案中,本公开提供一种药物组合物(例如,处于肌肉施用形式),所述组合物包含融合多肽(例如,糖基化或非糖基化)(例如,作为唯一药物活性成分),所述融合多肽包含了(1)无信号肽的FGF-23(R179Q)变体(SEQ ID NO:43)或其包含减少聚集和/或蛋白酶诱导的剪切作用的额外突变的变体或功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体),(2)包含SEQ ID NO:11的接头;和(3)无信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho(SEQ ID NO:7)或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体)或

具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体);以及该药物组合物在治疗病理学疾病(例如治疗和/或预防年龄相关的疾病如肌萎缩)的疗法中或用作治疗病理学疾病的药物的用途。在一个实施方案中,本公开提供一种药物组合物(例如,处于肌肉施用形式),所述组合物包含融合多肽(例如,糖基化或非糖基化)(例如,作为唯一药物活性成分),所述融合多肽包含SEQ ID NO:19、20、40或41的氨基酸序列;以及该药物组合物在治疗病理学疾病(例如治疗和/或预防年龄相关的疾病如肌萎缩)的疗法中或用作治疗病理学疾病的药物的用途。

[0044] 在一个实施方案中,本公开提供一种药物组合物(例如,处于肌肉施用形式),所述组合物包含融合多肽(例如,糖基化或非糖基化)(例如,作为唯一药物活性成分),所述融合多肽包含了带信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho(SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45);和包含SEQ ID NO:11的接头;以及该药物组合物用于治疗/或预防年龄相关的疾病如肌萎缩的用途。在另一个实施方案中,本公开提供一种药物组合物(例如,处于肌肉施用形式),所述组合物包含融合多肽(例如,糖基化或非糖基化)(例如,作为唯一药物活性成分),所述融合多肽包含了无信号肽的 α Klotho蛋白的sKlotho(SEQ ID NO:7);和包含SEQ ID NO:11的接头;以及该药物组合物在治疗病理学疾病(例如治疗和/或预防年龄相关的疾病如肌萎缩)的疗法中或用作治疗病理学疾病的药物的用途。在一些实施方案中,融合蛋白还包含修饰的Fc片段。

[0045] 在一个实施方案中,本公开提供一种药物组合物,所述组合物包含融合多肽(例如,糖基化或非糖基化)(例如,作为唯一药物活性成分),所述融合多肽包含了人FGF蛋白或其活性片段或变体(例如,无信号肽);和包含SEQ ID NO:11的接头。

[0046] 本公开还涵盖了包含本公开的融合蛋白的药物组合物及其用在治疗病理学疾病(例如治疗或预防年龄相关的疾病(例如,肌肉萎缩)或代谢疾病(例如,糖尿病)的疗法中或用作治疗病理学疾病的药物的用途。

[0047] 在一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:19至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一的融合多肽。在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:20至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一的融合多肽。

[0048] 在一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:40至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一的融合多肽。在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:41至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一的融合多肽。

[0049] 在一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:46至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:47至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。

[0061] 在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:62至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。

[0062] 在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:63至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。

[0063] 在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:64至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。

[0064] 在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:65至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。

[0065] 在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:66至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。

[0066] 在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:67至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。

[0067] 在另一个实施方案中,本公开提供一种与SEQ ID NO:68至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的融合多肽。

[0068] 在一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含具有信号肽的 β Klotho蛋白的sKlotho,其与FGF-19或其活性片段或变体(直接或经接头间接)融合。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。在另一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含无信号肽的 β Klotho蛋白的sKlotho,其与FGF-19或其活性片段或变体(直接或经接头间接)融合。在另一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含具有信号肽的 β Klotho蛋白的sKlotho,其与FGF-21或其活性片段或变体(直接或经接头间接)融合。在另一个实施方案中,本公开提供了融合多肽,所述融合多肽包含无信号肽的 β Klotho蛋白的sKlotho,其与FGF-21或其活性片段或变体(直接或经接头间接)融合。

[0069] 本公开提供了编码本文所述的任何Klotho融合多肽的核酸序列和含有这些核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0070] 在一些实施方案中,本公开涵盖了编码本文所述的任何多肽的核酸。在一些实施方案中,本公开涵盖了编码本文所述的任何融合多肽的核酸。在一些实施方案中,本公开涵盖本文所述的任何Klotho或Klotho变体。在一些实施方案中,本公开涵盖本文所述的任何FGF或FGF23或者FGF或FGF23变体。

[0071] 本公开还提供了具有本文所构思的任何Klotho融合多肽的组合物。本公开的组合物还可以包括肝素。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增

加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0072] 本公开还提供了Klotho的变体。这些包括变体 α Klotho (缺少跨膜结构域和缺少信号肽,但保留Klotho结构域1和2(KL-D1和KL-D2)的可溶性Klotho,其中已经从C端缺失直至约20个氨基酸(delta C-20或 Δ C20)。SEQ ID NO:77中提供Klotho Δ C-20(α Klotho Δ C20)的非限制性例子。在多个实施方案中,Klotho Δ C-20可以任选地具有V563和/或K795处的突变。SEQ ID NO:78中提供具有V563和K795处突变的Klotho Δ C-20(α Klotho Δ C20)的非限制性例子。本公开还构思了包含Klotho Δ C-20的融合多肽。

[0073] 因此,本公开的多肽例如是 α Klotho Δ C-20 (其中已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸),其任选地还具有V563和/或K795处的突变。作为另一个例子,多肽是具有V563和/或K795处突变的 α Klotho变体,所述 α Klotho变体是全长的,或其中任选地已经从C端缺失1至约20个氨基酸、约20个氨基酸或20个氨基酸。任何这类多肽是Klotho C端缺失变体。这种Klotho C端缺失变体可以与其他多肽(如FGF23或其变体或血清白蛋白或其变体)融合。

[0074] 本公开还提供一种用于治疗或预防个体中年龄相关的疾病的方法。向个体(例如,人)施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物含有Klotho变体或包含Klotho变体的融合多肽,例如,具有Klotho蛋白(例如, α Klotho蛋白)或其活性片段或变体的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子或其活性片段或变体,从而治疗或预防年龄相关的疾病。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。特别地,本公开提供一种治疗或预防肌肉萎缩的方法,所述方法包括向个体(例如,人)施用治疗有效量的具有 α Klotho蛋白或其活性片段或变体的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子(或其活性片段或变体)的多肽或融合多肽。

[0075] 额外地,本公开提供一种用于治疗或预防个体中代谢疾病的方法。向个体施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物含有本公开的多肽或融合多肽,例如,具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子(或其活性片段或变体)的多肽或融合多肽,从而治疗代谢疾病。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。特别地,具有 β -Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子21的本公开融合多肽用于治疗代谢疾病。

[0076] 本公开的Klotho-FGF23融合多肽可以用于治疗或预防个体中的高磷酸盐血症或钙质沉着症。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。施用药理有效量的含有本公开的Klotho融合多肽的药物组合物以治疗或预防高磷酸盐血症或钙质沉着症,所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子。特别地,具有 α Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子23的本公开的Klotho融合多肽用于治疗高磷酸盐血症或钙质沉着症。

[0077] 本公开的Klotho-FGF23融合多肽可以用于治疗或预防个体中的慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。施用治疗有效量的含有本公开的Klotho融合多肽的药物组合物以治疗或预防慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭,所述融合多肽具有Klotho蛋白(例如, α Klotho蛋白)的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子。

[0078] 本公开的Klotho-FGF23融合多肽可以用于治疗或预防个体中的癌症(例如,乳腺

癌)。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。施用治疗有效量的含有本公开的Klotho融合多肽的药物组合物以治疗或预防癌症或乳腺癌,所述融合多肽具有Klotho蛋白(例如, α Klotho蛋白)的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子。

[0079] 本公开提供用于药物中的融合多肽,所述融合多肽包含Klotho蛋白或其活性片段或变体的至少一个胞外亚结构域和FGF或其活性片段或变体。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。在一个实施方案中,本公开提供用于治疗或预防肌肉萎缩的融合多肽,所述融合多肽包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域或其活性片段或变体和FGF或其活性片段或变体。本公开还提供一种治疗或预防年龄相关的疾病(例如,肌肉萎缩)的方法,所述方法包括向有需求的个体施用治疗有效量的包含本公开的多肽或融合多肽的药物组合物,例如,包含可溶性Klotho蛋白或其活性片段或变体的药物组合物。

[0080] 本公开还提供上述肽和融合多肽或包含所述肽的药物组合物用于个体中治疗病理学疾病,例如年龄相关的疾病、代谢疾病、高磷酸盐血症或钙质沉着症、慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭或用来防止癌症或乳腺癌的疗法中、用作前述用途的药物或用于前述用途。另外,本公开还提供本发明多肽、核酸或药物组合物在制造用于治疗病理学疾病、尤其治疗上文提到的病症、优选地年龄相关的疾病(如肌肉萎缩)的药物中的用途。

[0081] 本公开还包括用于治疗或预防个体中年龄相关的疾病或代谢疾病的试剂盒。该试剂盒包括使用说明书和纯化的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0082] 本公开还提供产生本公开的Klotho融合多肽的试剂盒。本公开的试剂盒包括使用说明书和编码Klotho融合多肽的核酸,所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0083] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽包含:(a)多肽,所述多肽包含成纤维细胞生长因子或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体);和(b)修饰的Fc片段或其功能活性变体或衍生物(例如,包含至少一个保守性氨基酸置换和/或至少一个氨基酸缺失的变体),其具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期。

[0084] 在本公开的一个实施方案中,多肽(a)和多肽(b)由多肽接头连接。接头可以重复1至30次或更多次。

[0085] 在本公开的一个实施方案中,多肽接头包含选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0086] 在本公开的一个实施方案中,多肽(a)通过肽键连接至所述多肽接头的N端,并且多肽(b)通过肽键连接至所述多肽接头的C端。

[0087] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽还包含信号肽。

[0088] 在本公开的一个实施方案中,信号肽是IgG信号肽。

[0089] 在本公开的一个实施方案中,成纤维细胞生长因子是成纤维细胞生长因子-23或成纤维细胞生长因子-23变体(R179Q)。

[0090] 在本公开的一个实施方案中,成纤维细胞生长因子是成纤维细胞生长因子-19或成纤维细胞生长因子-21。

[0091] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽包含与SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:53的氨基酸序列95%或更多同一的氨基酸序列。

[0092] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽包含SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

[0093] 在本公开的一个实施方案中,融合多肽包含FcLALA。

[0094] 3.附图简述

[0095] 图1显示本公开的Klotho融合多肽的几个不同实施方案。展示的融合多肽包括一个或多个与成纤维细胞生长因子有效连接的Klotho胞外亚结构域。含有一个或多个Klotho胞外亚结构域的多肽包括例如Klotho的胞外结构域(例如,人Klotho的氨基酸1至982)或Klotho的活性片段。

[0096] 图2显示本公开的几种Klotho融合多肽及其组分(例如,Klotho胞外结构域,FGF)的氨基酸序列和核酸序列。SEQ ID NO:46、47、48和49中描述了包含sKlotho、FGF23和FcLALA(修饰的Fc片段,其具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期)的融合蛋白。SEQ ID NO:50、51、52和53中描述了包含FGF23和FcLALA的融合蛋白。

[0097] 图3A-3C描述了sKlotho-FGF23融合蛋白的蛋白质表达。图3A显示通过采用抗FGF23抗体的蛋白质印迹法,在条件培养基中检测sKlotho-FGF23融合蛋白。图3B显示通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色,在条件培养基中检测sKlotho-FGF23融合蛋白。图3C显示通过SDS-PAGE分析和考马斯蓝染色分析的高度纯化的sKlotho-FGF23-6xHis融合蛋白。

[0098] 图4显示Egr-1萤光素酶测定法的结果,所述测定法在肝素(20 μ g/ml)不存在或存在下比较经条件培养基处理的细胞中Egr-1的活化水平,所述条件培养基含有Klotho融合多肽、仅FGF 23多肽、仅可溶性Klotho(sKlotho)多肽和与FGF 23多肽组合的可溶性Klotho多肽。

[0099] 图5A-5B显示Egr-1萤光素酶测定法的结果,所述测定法在肝素不存在或存在下比较经纯化的Klotho融合多肽、FGF23多肽或可溶性Klotho多肽处理的细胞中Egr-1的活化水平。图5A显示一项实验的结果,所述实验比较在肝素(20 μ g/ml)不存在或存在下经单独FGF23、sKlotho-His(10nM或20nM)以及FGF23和sKlotho-His(10nM或20nM)组合处理的细胞中Egr-1的活化水平。图5B显示经sKlotho-FGF23-His融合物(0nM、0.6nM、1.21nM、2.41nM、4.83nM、9.65nM和19.3nM)处理的细胞中的Egr-1萤光素酶报道分子活性。

[0100] 图6A-6B显示纯化的sKlotho融合多肽处理对C2C12肌肉细胞的影响。图6A显示在地塞米松(100 μ M)不存在或存在下,经IGF-1(10nM)、FGF2(20ng/ml)或纯化的Klotho融合多肽(20nM)处理的C2C12肌肉细胞中肌管直径的量值。图6B显示在雷帕霉素(40nM)不存在或存在下,IGF-1(10nM)、FGF2(20ng/ml)或纯化的Klotho融合多肽(20nM)对C2C12肌肉细胞中信号传导途径蛋白的磷酸化。

[0101] 图7显示EGR-1-luc报道基因被sKlotho-FGF23(R179Q)-FcLALA融合蛋白活化。

[0102] 图8显示EGR-1-luc报道基因被FGF23(R179Q)-FcLALA蛋白活化。

[0103] 图9显示FGF23 (R179Q) 与FGF23 (R179Q) -FcLALAv2的药代动力学特征。

[0104] 图10A和图10B显示sKlotho-FGF23融合物在地塞米松诱导的肌肉萎缩后增强肌肉生长的体内功效。

[0105] 图11. 该图显示EGR-1-luc报道基因被FGF23 (R179Q) -FcLALA和Q156A、C206S、C244S和C206S/C244S突变体活化。

[0106] 图12显示FGF23 (R179Q) -FcLaLa的WT (野生型)、Q156A、C206S、C244S和C206S/C244S突变体的蛋白质质量和二聚化。

[0107] 图13显示FGF23 (R179Q) -FcLaLa的WT、Y154D/C206S/C244S、Y154H/C206S/C244S、Y154N/C206S/C244S、S155A/C206S/C244S、S155T/C206S/C244S的蛋白质质量。本图中的全部FGF23变体(包括“WT”)均具有R179Q突变。

[0108] 图14显示Egr-1-luc报道基因被FGF23 (R179Q) -FcLALA和FGF23 (R179Q) -Y154D/C206S/C244S突变体活化。

[0109] 图15A和B显示各种构建体的结构。图15A显示构建sKlotho变体的策略,所述变体具有约20个、约40个、约60个、约80个、约100个、约120个、约140个、约160个、约180个、约200个、约220个、约240个、约260个、约280个、约300个、约320个、约340个、约360个、约380个、约400个、约420个、约440个、约460个、约480个氨基酸的C端缺失。使用引物P5 (SEQ ID NO:83) 作为5' 引物。一系列24种引物的任一者命名为C-20、C-40、C-60...C-480 (SEQ ID NO:84至107) 用来从C端截短约20个、约40个、约60个...约480个氨基酸。在全部sKlotho截短体当中,仅一个具有约20个氨基酸缺失的截短体(sKlotho del c-20)有效;产生这种sKlotho截短体和FGF23的融合物,如图15B中所示。图15B显示构建sKlotho (del c-20) -FGF23融合多肽的策略。P5引物与C-20引物组合用于PCR (聚合酶链反应) 中,以制备具有sKlotho截短体的片段。这个片段经限制性核酸内切酶切割并连接入编码FGF23的载体,以构建sKlotho (del c-20) -FGF23融合多肽。

[0110] 图16显示sKlotho突变体的Egr-1活性。条件培养基(CM)收集自多种Hek293细胞,所述细胞各自具有编码sKlotho截短体和FGF23的融合物的载体。仅使用来自产生可用量融合物的细胞的CM。使用的融合物:CM1:截短约20个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM7:截短约140个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM11:截短约220个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM12:截短约240个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM13:截短约260个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM23:截短约460个氨基酸(aa)的sKlotho截短体。阳性对照:来自产生sKlotho和FGF23的融合物的细胞的条件培养基[(+) CM];纯化的sKlotho和FGF23融合物[(+) 对照]。“unConc.”表示其中使用较少蛋白质的实验。阴性对照: (-) 对照。RLU,相对萤光素酶单位。这个实验显示,从C端缺失约20个氨基酸降低sKlotho的活性。

[0111] 图17显示,从sKlotho的C端缺失约20个氨基酸增加sKlotho-FGF23融合多肽的活性。图17A显示多种融合物的相对量的蛋白质印迹法,其中融合物包含sKlotho或sKlotho Δ C-20和FGF23。泳道1,sKlotho-FGF23融合物。泳道2,FGF23-sKlotho Δ C-20 (del c-20) 融合物。泳道3,sKlotho Δ C-20 (del c-20) -FGF23融合物。还显示了标志物的大小。使用针对Klotho的多克隆抗体。图17B显示这些融合多肽在Egr-1-Luc测定法中的活性。

[0112] 图18显示采用纯化的蛋白质的实验,重申以下发现:从sKlotho的C端缺失约20个氨基酸增加sKlotho-FGF23融合多肽的活性。图18A显示蛋白质凝胶,其显示sKlotho del

c-20-FGF23融合物的纯度(泳道2和3)。泳道1,标志物的大小。图18B显示使用纯化的sKlotho del c-20-FGF23融合物(sKF-T)和sKlotho-FGF23融合物(sKF)的Egr-1测定法。还显示蛋白质的EC₅₀。在这些附图和在本说明书中,术语sKF-T、Klotho del c-20-FGF23、sKlotho del c-20-FGF23、klotho (Δ C-20)-FGF23、 α sKlotho Δ C20-FGF23等均表示这样的融合多肽,所述融合多肽以N端至C端顺序包含从C末端截短约20个氨基酸的 α sKlotho、一个任选的接头和一个FGF23。

[0113] 4. 发明详述

[0114] 本公开涉及预防或治疗年龄相关的疾病和代谢疾病的方法、试剂盒和组合物;并涉及所述组合物在治疗病理学疾病的疗法中、用作治疗病理学疾病的药物或用于治疗病理学疾病的用途。本公开的多肽和融合多肽包含Klotho蛋白或其活性片段或变体。在一些实施方案中,本公开的多肽和融合多肽包含与成纤维细胞生长因子多肽或其活性片段或变体有效连接的Klotho蛋白或其活性片段或变体。

[0115] 作为一个非限制性例子,本公开的融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho Δ C-20(其中已经从C端缺失约20个氨基酸、20个氨基酸或从1直至约20个氨基酸);和(b) FGF23,任选地具有R179处的突变;和任选地,(c) 间插在(a)和(b)之间的接头。在一些实施方案中,融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho(例如,缺少跨膜结构域和信号肽的 α Klotho),其中已经从C端缺失约20个氨基酸;(b) 接头;和(c) FGF23,其任选地具有R179、C206和/或C244处的突变。在一些实施方案中,FGF23组分具有C206和/或C244处的突变。在这些融合物的一些实施方案中, α sKlotho具有V563和/或K795处的突变。在一些实施方案中,sKlotho Δ C-20由SEQ ID NO:77或78(后者具有突变V563A和K795E)代表。在一些实施方案中,融合多肽还包含 α sKlotho N端的信号肽。在多个实施方案中,信号肽是Klotho信号肽。在一些实施方案中,信号肽由SEQ ID NO:81的粗体、加下划线部分代表。在多个实施方案中,接头是本领域已知的能够连接两种肽的任何类型接头。在多个实施方案中,接头包含一个或多个氨基酸。在多个实施方案中,接头包含SEQ ID NO:11至18的任何序列或其任何数目或组合。在多个实施方案中,接头包含SEQ ID NO:12的1、2、3或更多个拷贝。在多个实施方案中,接头包含3拷贝的SEQ ID NO:12。在一些实施方案中,融合多肽由SEQ ID NO:79、80、81或82代表。

[0116] 在一些实施方案中,融合物还包含结合FcRn能力降低的和/或血清中稳定性增加的修饰的Fc片段。另一个实施方案中,融合多肽包含FGF(例如,FGF23)和结合FcRn能力降低的和/或血清中稳定性增加的修饰的Fc片段。

[0117] 本公开的融合蛋白或sKlotho可用于治疗和防止多种年龄相关的疾病,包括肌少症、皮肤萎缩、肌肉耗损、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失;和代谢疾病,包括II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症。

[0118] 本公开至少部分地基于以下发现:尽管存在物理约束(例如,Klotho多肽和FGF多肽的尺寸均大),Klotho-FGF融合多肽在激活FGF受体方面高度地有效。鉴于这两种蛋白质的融合物将或许干扰异二聚化并且因此干扰蛋白质活性,这个发现出乎意料;例如,蛋白质的结合结构域可能被融合物扰动,或如果按“顺”模式放在一起,蛋白质可能在空间上错误

取向。

[0119] 本文所述的融合多肽是有利的,因为它们允许单一治疗性蛋白的施用,所述施用与单独施用或作为独立多肽共同施用的Klotho或FGF相比,具有增强的活性。Klotho和FGF作为单一融合多肽而不是作为两种独立多肽(即,Klotho多肽和独立的FGF多肽)使用在激活FGF受体方面更有效。

[0120] 作为一个非限制性例子,本公开的融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho Δ C-20(其中已经从C端缺失约20个氨基酸、20个氨基酸或从1直至约20个氨基酸);和(b) FGF23,任选地具有R179、C206和/或C244处的突变;和任选地,(c) 间插在(a)和(b)之间的接头。在一些实施方案中,融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho(例如,缺少跨膜结构域和信号肽的 α Klotho),其中已经从C端缺失约20个氨基酸;(b) 接头;和(c) FGF23,其任选地具有R179、C206和/或C244处的突变。

[0121] 作为一个非限制性例子,本公开的融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho Δ C-20(其中已经从C端缺失约20个氨基酸、20个氨基酸或从1直至约20个氨基酸);和(b) 血清白蛋白;和任选地,(c) 间插在(a)和(b)之间的接头。在一些实施方案中,融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho(例如,缺少跨膜结构域和信号肽的 α Klotho),其中已经从C端缺失约20个氨基酸、20个氨基酸或从1直至约20个氨基酸;(b) 接头;和(c) 血清白蛋白。在多个实施方案中,血清白蛋白可以是人源、小鼠源或任何动物源的。SEQ ID NO:108中提供了包含人Klotho和小鼠血清白蛋白的融合物的非限制性例子。图19中显示包含Klotho和血清白蛋白的融合多肽的活性。可以实验地使用小鼠血清白蛋白的一个原因是人血清白蛋白在小鼠系统中不再循环,因此作为半寿期延长部分,它可能具有减少的功效。对于治疗性多肽,想要使用包含人血清白蛋白(或其变体)、和人Klotho变体(例如,人Klotho C端缺失变体;或具有V563和/或K795处突变的人Klotho;或具有C端缺失和V563和/或K795处突变的人Klotho变体)的融合多肽。

[0122] 如实施例9中所示那样,在 α sKlotho的C端进行各种缺失。这些sKlotho突变体从C端缺失约20个、约40个、约60个、约80个、约100个、约120个、约140个、约160个、约180个、约200个、约220个、约240个、约260个、约280个、约300个、约320个、约340个、约360个、约380个、约400个、约420个、约440个、约460个、约480个氨基酸。这些突变体分别命名为 Δ C-20、 Δ C-40、 Δ C-60等,并使用SEQ ID NO:84-107中列出的引物C-20、C-40、C-60等产生。如实施例9中所示,这些构建体中的许多构建体不表达可用量的sKlotho突变体。在表达可用量的那些构建体当中,测试C-20(也称作1)、C-140(7)、C-220(11)、C-240(12)、C-260(13)和C-460(23)的Klotho活性。Egr-1测定法中使用来自产生蛋白质的细胞的条件培养基,其中测量相对萤光素酶活性(RLA)。C-20显示一些Klotho活性,尽管低于来自条件培养基的野生型Klotho或纯化的野生型Klotho。其他的C端sKlotho缺失体(C-140、C-220、C-240、C-260和C-460)不显示明显的Klotho活性。

[0123] 即使 α sKlotho Δ C-20显示低于野生型sKlotho的活性,但在具有FGF23的融合物的背景下,前者比后者更有活性。

[0124] 换句话说,从sKlotho缺失约20个氨基酸减少sKlotho的活性,但是令人惊讶地增加sKlotho-FGF23融合物的活性。实施例9中显示这些意料之外的结果。如上文所示, α sKlotho Δ C-20的活性低于野生型 α sKlotho。但是, α sKlotho Δ C-20-FGF23融合物比 α

sKlotho (野生型) -FGF23融合物更有活性。这个图中所示的数据使用来自条件培养基的多肽。随后纯化 α sKlotho Δ C-20-FGF23融合多肽并且重复实验,并且该现象复现。图18使用了纯化的多肽,再次显示 α sKlotho Δ C-20-FGF23融合物比 α sKlotho (野生型) -FGF23融合物更有活性。

[0125] 因此,从sKlotho缺失约20个氨基酸令人惊讶地减少分离的sKlotho的活性,但是增加sKlotho-FGF23融合多肽的活性。

[0126] 定义

[0127] 如本文所用,“Klotho多肽”、“Klotho蛋白”、或“Klotho”包括野生型“Klotho”的活性片段、衍生物、拟似物、变体和化学修饰的化合物或其杂合体。Klotho活性片段具有与FGF多肽结合的能力。通常,Klotho活性多肽至少含有Klotho亚结构域(例如,KL-D1和KL-D2)。野生型Klotho具有如自然界中存在的氨基酸序列。适合本公开使用的Klotho多肽例子包括 α -Klotho (SEQ ID NO:2) 和 β -Klotho (SEQ ID NO:4)。 α -Klotho和 β -Klotho的核苷酸序列和氨基酸序列分别以登录号NM_004795;NP_004786和NM_175737;NP_783864存在于GenBank数据库中。Klotho多肽包括在美国专利号6,579,850中描述的那些,所述文献的内容通过引用的方式完整并入本文。Klotho多肽还包括来自人类以外其他物种的那些,包括来自小鼠 (NP_038851)、大鼠 (NP_112626)、兔 (NP_001075692) 的 α -Klotho和来自小鼠 (NP_112457) 的 β -Klotho。预计具有 α -Klotho的物种包括黑猩猩 (XP_522655)、恒河猴 (XP_001101127)、马 (XP_001495662)、奶牛 (XP_001252500)、鸭嘴兽 (XP_001510981) 和鸡 (XP_417105)。预计具有 β -Klotho的物种包括黑猩猩 (XP_526550)、恒河猴 (XP_001091413)、马 (XP_001495248)、狗 (XP_536257)、大鼠 (XP_001078178)、鸭嘴兽 (XP_001512722) 和鸡 (XP_423224)。Klotho多肽具有这样的氨基酸序列,其与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列基本上同一;即,与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其活性片段或变体的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一。

[0128] 如本文所用,“融合多肽”或“融合蛋白”应当意指包含两个或更多个不同多肽或其在相同多肽中不天然存在的活性片段的多肽。在一些实施方案中,两个或更多个不同多肽有效地共价连接在一起,例如通过肽键化学连接或符合可读框融合。如本文所用,“Klotho融合多肽”是包括来自Klotho多肽或其活性片段或变体的氨基酸序列的融合多肽。作为非限制性例子,融合多肽可以包含Klotho (例如,sKlotho)、FGF (例如,FGF23),和(任选地)修饰的Fc片段 (例如,Fc γ 受体结合亲和力减少的和/或血清半寿期增加的修饰的Fc片段)。在SEQ ID NO:46至49中给出这种类型融合多肽的例子。在另一个实施方案中,融合蛋白包含FGF (例如,FGF23) 和修饰的Fc (例如,FcLALA)。SEQ ID NO:50、51、52和53中描述了包含FGF23和FcLALA的融合蛋白。FcLALA是具有LALA突变 (L234A、L235A) 的Fc片段,所述突变以降低的效率触发ADCC并且微弱地结合及激活人补体。Hessell等人,2007Nature 449:101-104。

[0129] “成纤维细胞生长因子”和“FGF”在本文中互换地使用并且应当指在动物(包括人类受试者)中调节细胞增殖、移行、分化、稳态、组织修复和损伤反应的多肽。FGF具有与成纤维细胞生长因子受体结合并调节其活性的能力,所述活性包括FGFR自我磷酸化、FRS2 (FGF受体底物2) 和ERK1/2 (胞外信号调节的蛋白激酶1/2) 的磷酸化和激活Egr-1 (早期生长反应-1)。术语“FGF”包括野生型“FGF”的活性片段、衍生物、拟似物、变体和化学修饰的化合物

或其杂合体,如本领域已知和如美国专利号7,223,563和美国专利号7,259,248中所述,所述文献的内容通过引用的方式完整并入。野生型FGF具有如自然界中存在的氨基酸序列。适合本公开使用的成纤维细胞生长因子的例子包括成纤维细胞生长因子-19 (FGF19; SEQ ID NO:31)、成纤维细胞生长因子-21 (FGF21; SEQ ID NO:33) 和成纤维细胞生长因子-23 (FGF23; SEQ ID NO:35)。FGF多肽还包括来自人类以外其他物种的那些,包括鼠FGF。通常,FGF多肽具有这样的氨基酸序列,其与SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:35的氨基酸序列基本上同一;即,具有与SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:35或其活性片段的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多或100%同一的氨基酸序列。SEQ ID NO:47的aa1002-1228;SEQ ID NO:49的aa 1002-1228;SEQ ID NO:51的aa 1-251和SEQ ID NO:53的aa 1-251;以及与这些序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一或100%同一的序列提供了FGF、尤其FGF23的额外非限制性例子。在SEQ ID NO:46、48、50和52中提供编码这些序列的核苷酸。

[0130] 术语“FGF”包括全长多肽的活性片段。能够与其相应FGF受体结合的FGF活性片段是本领域已知的并且也构思用于本公开中。本领域技术人员将领会,基于本文公开的序列,可以使用例如Sambrook等人(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) 和Ausubel等人(1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green&Wiley, New York) 中描述的标准重组技术生成FGF的重叠片段。本领域技术人员将领会,基于本文展示的本公开,可以通过本领域熟知和本文所述的方法测试FGF片段的生物学活性,包括与FGF受体的结合。类似地,可以用FGF片段转染拥有必需FGF信号转导装置(即FGF受体)的细胞培养物模型并且随后相对于野生型FGF,测试其FGF信号传导的改变。

[0131] 基于FGF核心同源结构域(长大约120个氨基酸)的同源性,将FGF分组成七个亚家族,所述核心同源结构域旁侧分布有在长度和一级序列方面高度可变(尤其在FGF亚家族之间)的N端和C端序列(Goetz等人, *Molecular and Cellular Biology*, 2007, Vol. 27, 3417-3428)。FGF活性多肽通常含有至少一个FGF核心同源结构域。在一些实施方案中,除FGF核心同源结构域之外,FGF活性多肽还可以含有可以赋予结合FGF受体的额外特异性的侧翼序列。FGF19、FGF21和FGF23分组于FGF19亚家族中,因为相对于其他FGF,这些配体的核心区共有高度序列同一性(FGF19与FGF21:38%同一性;FGF19与FGF23:36%同一性)。FGF19亚家族成员以类似于内分泌系统信号传导分子的方式发挥作用并且调节经典FGF不常见的多种生理过程(例如,FGF19:能量和胆汁酸稳态;FGF21:葡萄糖和脂质代谢;和FGF23:磷酸盐和维生素D稳态)。

[0132] 如本文所用,“成纤维细胞生长因子受体”和“FGFR”指本领域已知的FGFR1-4中的任一种或其剪接变体(例如,FGFR1c)。适合本公开使用的成纤维细胞生长因子受体的例子包括成纤维细胞生长因子受体-19(例如,FGFR4- β Klotho)、成纤维细胞生长因子受体-21(例如,FGFR1c- α Klotho)和成纤维细胞生长因子受体-23(例如,FGFR1c- α Klotho、FGFR3- α Klotho、FGFR4- α Klotho)。

[0133] 如本文所用,“胞外结构域”指跨膜蛋白的在细胞外部存在的片段(例如,不包含胞内区或跨膜区)。“Klotho蛋白的胞外结构域”、“可溶性Klotho”或“sKlotho”(例如,SEQ ID

NO:7;SEQ ID NO:39)指Klotho多肽的胞外结构域,所述胞外结构域能够结合成纤维细胞生长因子,和/或能够通过成纤维细胞生长因子结合,使得成纤维细胞生长因子与成纤维细胞生长因子受体结合成为可能。Klotho胞外结构域对应于全长 α Klotho序列(SEQ ID NO:2)的氨基酸残基28-982并且对应于全长 β Klotho序列(SEQ ID NO:4)的氨基酸残基52-997。

[0134] “Klotho蛋白的胞外亚结构域”和“Klotho蛋白质的胞外亚结构域”在本文中互换地使用并且应当指Klotho多肽的胞外结构域的区域,所述区域能够结合成纤维细胞生长因子和/或能够通过成纤维细胞生长因子结合,使得成纤维细胞生长因子与成纤维细胞生长因子受体结合成为可能。在多个实施方案中,融合物包含这样的多肽,所述多肽包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域;包含成纤维细胞生长因子的多肽;和任选地,具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。Klotho胞外结构域具有重复的两个同源亚结构域,即,KL-D1(SEQ ID NO:5)和KL-D2(SEQ ID NO:6)。KL-D1和KL-D2分别对应于全长 α Klotho多肽(SEQ ID NO:2)的氨基酸残基58-506和517-953并且对应于全长 β Klotho多肽(SEQ ID NO:4)的氨基酸残基77-508和571-967并且适合本公开中使用。通常,含有至少一个Klotho亚结构域的多肽是Klotho活性多肽。随本公开多肽一起使用的Klotho胞外亚结构域可以是 α Klotho或 β Klotho KL-D1结构域,所述结构域具有分别与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:37的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列。另外,Klotho KL-D1结构域可以具有与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一的氨基酸序列。Klotho胞外亚结构域也可以是分别与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:38的氨基酸序列基本上同一的 α 或 β Klotho KL-D2结构域。在又一个实施方案中,KL-D2结构域具有与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,融合物包含Klotho蛋白的至少两个胞外亚结构域(例如,KL-D1和KL-D2;处于串联重复的KL-D1和KL-D1;处于串联重复的KL-D2和KL-D2等)。

[0135] 如本文所用的“修饰的Fc片段”应当意指包含经修饰序列的抗体的Fc片段。Fc片段是包含CH2、CH3和铰链区部分的抗体的部分。修饰的Fc片段可以例如衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。FcLALA是具有LALA突变(L234A、L235A)的修饰的Fc片段,其以降低的效率触发ADCC并且微弱地结合及激活人补体。Hessell等人,2007Nature 449:101-104。例如美国专利号7,217,798中描述了对Fc片段的额外修饰。例如,在多种修饰的Fc片段中:(a)氨基酸残基250是谷氨酸并且氨基酸残基428是苯丙氨酸;或(b)氨基酸残基250是谷氨酰胺并且氨基酸残基428是苯丙氨酸;或(c)氨基酸残基250是谷氨酰胺并且氨基酸残基428是亮氨酸。在一些实施方案中,氨基酸残基250和428与未修饰Fc-融合蛋白中的残基不同,在于氨基酸残基250是谷氨酸或谷氨酰胺并且氨基酸残基428是亮氨酸或苯丙氨酸,并且其中氨基酸残基依据EU编号体系编号,如美国专利号7,217,798中所述。在一些实施方案中,修饰的Fc融合蛋白在pH6.0比pH 8.0具有更高的FcRn亲和力。优选地,修饰的Fc片段具有减少的FcRn亲和力和/或增加的血清半寿期。修饰的Fc片段的非限制性例子包含SEQ ID NO:47的aa(氨基酸)1234-1459;SEQ ID NO:49的aa 1234至1450;SEQ ID NO:51的aa 257至482和SEQ ID NO:53的aa 257至473;以及与这些序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一或100%同一的序列。在SEQ ID NO:46、48、50和52中提供编码这些序列的核苷酸。

[0136] 如本文所用,“信号肽”应当意指指导蛋白质翻译后运输至内质网并且可以被切下的肽链(长3-60个氨基酸)。适合本公开使用的信号肽的例子包括Klotho信号肽(SEQ ID NO:19)和IgG信号肽(SEQ ID NO:20)。注意一旦由生产细胞系分泌并剪切,则切下信号肽(例如,与SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20相对应的肽中的信号肽)。因此,在信号肽由生产细胞系分泌和剪切后,SEQ ID NO:19的肽将产生SEQ ID NO:41的肽。

[0137] 如本文所用,“接头”应当意指令两个或更多个多肽或核酸共价接合从而彼此连接的官能团(例如,化学物或多肽)。

[0138] 如本文所用,“肽接头”指用来将两种蛋白质偶联在一起(例如,用来将Klotho的胞外结构域和成纤维细胞生长因子-23偶联)的一个或多个氨基酸。适合本公开使用的肽接头包括但不限于具有下述氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18代表。

[0139] 多肽接头可以包含这些氨基酸序列的任一者的至少1个和直至约30个重复序列。

[0140] 如本文所用,“有效连接”应当意指两个或更多个生物分子如此连接,从而至少保留与生物分子相关的生物学功能、活性和/或结构。在提及多肽时,该术语意指两个或更多个多肽的连接产生融合多肽,所述融合多肽保留每个多肽组分的至少一些相应独立活性。两个或多个多肽可以直接连接或经接头连接。在提及核酸时,该术语意指第一多核苷酸与第二多核苷酸毗邻安置,所述第二多核苷酸在适宜分子(例如,转录激活蛋白)与第二多核苷酸结合时指导第一多核苷酸的转录。

[0141] 如本文所用,“特异性结合”应当指第一分子在它所暴露于的许多不同类型的分子当中结合靶分子的能力,原因在于第一分子采取有助于本身和另一个靶分子之间形成非共价相互作用的特定结构的能力。第一分子与靶结合,形成稳定复合体,同时第一分子与任何其他非特异性分子存在基本上没有的识别、接触或复合物形成。

[0142] 如本文所用,“多肽变体”或“蛋白质变体”指其中一个或多个氨基酸已经由来自参考序列的不同氨基酸置换的多肽。本领域充分理解,一些氨基酸可以由具有广泛相似特性的其他氨基酸置换,而不改变多肽活性的性质(保守性置换),如下文所述。这些术语还涵盖其中已经添加或缺失一个或多个氨基酸或将其替换为不同氨基酸的多肽,例如,蛋白质同工型。适合本公开使用的成纤维细胞生长因子-23变体的例子是成纤维母细胞生长因子-23变体(R179Q)。

[0143] 如本文所用,“药物组合物”应当意指含有可以施用以治疗或预防个体中疾病或病症的化合物(例如,本公开的融合多肽)的组合物。

[0144] 如本文所用,“个体或受试者”应当指哺乳动物,包括但不限于人类或非人类哺乳动物,如牛、马、犬、羊或猫科动物。

[0145] 如本文所用,“治疗”应当意指减少、抑制、减弱、削弱、停滞或稳定疾病的发展或进展。在本公开的背景下,施用本公开的多肽可以用来治疗年龄相关的疾病,包括肌少症、皮肤萎缩、肌肉耗损、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失;和代谢疾病,包括II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症。

[0146] 如本文所用,“预防”应当指受试者中病症的出现减少或获得病症或其相关症状的风险下降。在本公开的背景下,施用本公开的多肽可以用来预防年龄相关的疾病,包括肌少症、皮肤萎缩、肌肉耗损、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失;和代谢疾病,包括II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症。预防可以是完全的,例如,总体上不存在年龄相关的疾病或代谢疾病。预防也可以是部分的,从而受试者中出现年龄相关的疾病或代谢疾病的可能性比尚未接收本公开的受试者低。

[0147] 如本文所用,“疾病”应当意指破坏或干扰细胞、组织或器官正常功能的任何疾病或病症。

[0148] 如本文所用,“年龄相关的疾病”,应当意指群体中其发生率或个体中其严重程度与年龄进展相关的任何疾病或病症。在一个实施方案中,年龄相关的疾病是其发生率在大于60岁的人个体中相对于30-40岁之间的人个体和在超过100,000名个体的选定群体中至少1.5倍较高的疾病或病症。与本公开相关的年龄相关的疾病包括但不限于肌少症、皮肤萎缩、肌肉耗损、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失。

[0149] 如本文所用,“代谢疾病”应当意指通过影响细胞中能量的产生在或细胞、组织、器官或个体中毒素的蓄积,破坏或干扰细胞、组织或器官中正常功能的任何疾病或病症。与本公开相关的代谢疾病包括但不限于II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症。

[0150] “有效剂量”或“有效量”是足以实现有益或所需临床结果的量。在本公开的情况下,它是Klotho融合多肽或sKlotho的有效产生预期的药理结果、治疗结果或预防结果的量。治疗有效量导致防止或改善疾病或病症(例如,年龄相关的疾病或代谢疾病)的一个或多个症状。治疗有效量将根据正在治疗的受试者和疾病状况、受试者的重量和年龄、疾病的严重性、施用方式等变动,这可以由本领域技术人员轻易确定。

[0151] 如本文所用的“Klotho核酸分子”是编码Klotho蛋白的基因。人Klotho基因的例子在NM_004795(SEQ ID NO:1)提供。Klotho的额外非限制性例子以SEQ ID NO:47的aa 1-982和SEQ ID NO:49的aa 1-982提供;以及与这些序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一或100%同一的序列。

[0152] 如本文所用,“片段”指多肽或核酸分子的一部分。这个部分优选地含有参考核酸分子或多肽的整个长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。片段可以含有10、20、30、40、50、60、70、80、90个或100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000个或直至3000个核苷酸或氨基酸。

[0153] 术语“基本上同一的”指与参考氨基酸序列(例如,本文所述的氨基酸序列的任一个)或核酸序列(例如,本文所述的核酸序列的任一个)显示至少50%同一性的多肽或核酸分子。优选地,这种序列在氨基酸水平或核酸水平与用于比较的序列至少60%、70%、75%、80%或85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一。

[0154] 本公开涉及预防或治疗年龄相关的疾病和代谢疾病的方法、试剂盒和组合物;并涉及所述组合物在治疗病理学疾病的疗法中、用作治疗病理学疾病的药物或用于治疗病理

学疾病的用途。在一些实施方案中,本公开提供了具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽和融合多肽。在一些实施方案中,融合多肽还包含成纤维细胞生长因子、血清白蛋白、Fc或其他多肽,或其活性片段或变体。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。在其他实施方案中,融合物包含与修饰的Fc(例如,FcLALA)融合的FGF(例如,FGF19、FGF21、FGF23或FGF23变体R179Q)。FcLALA是具有LALA突变(L234A、L235A)的Fc片段,所述突变以降低的效率触发ADCC并且微弱地结合及激活人补体。Klotho胞外结构域可以衍生自 α 或 β Klotho同工型。另外,虽然主要参考成纤维细胞生长因子-19、成纤维细胞生长因子-21和成纤维细胞生长因子-23描述Klotho融合多肽的FGF组分,但构思了二十三种已知FGF或其活性片段或变体的任一者可以用于实施本公开。

[0155] Klotho蛋白的胞外结构域可以包括Klotho蛋白的KL-D1结构域和KL-D2结构域的一者或两者。在一些实施方案中,Klotho融合多肽具有Klotho蛋白的至少两个胞外亚结构域。例如,至少两个胞外亚结构域可以是处于串联重复的至少两个KL-D1结构域、处于串联重复的至少两个KL-D2结构域或至少一个KL-D1结构域和至少一个KL-D2结构域。

[0156] Klotho蛋白或其活性片段或变体的胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子(或其活性片段或变体)可以按多种取向和方式彼此有效连接。例如,Klotho蛋白的胞外亚结构域可以有效连接至成纤维细胞生长因子的N端,或备选地成纤维细胞生长因子可以有效连接至Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的N端。

[0157] 本公开的融合多肽可以包括Klotho胞外结构域(即,KL-D1(SEQ ID NO:5)和KL-D2(SEQ ID NO:6))的一者或两者。KL-D1和KL-D2分别对应于全长 α Klotho多肽(SEQ ID NO:2)的氨基酸残基58-506和517-953和分别对应于全长 β Klotho多肽(SEQ ID NO:4)的氨基酸残基77-508和571-967并且适合本公开使用。Klotho融合多肽可以具有 α Klotho多肽的KL-D1结构域,其具有与SEQ ID NO:5的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列,和 β Klotho多肽的KL-D1结构域,其具有与SEQ ID NO:37的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列。具体而言,Klotho融合多肽可以具有与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:37至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一的氨基酸序列。Klotho融合多肽可以具有 α Klotho多肽的KL-D2结构域,其具有与SEQ ID NO:6的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列,和 β Klotho多肽的KL-D2结构域,其具有与SEQ ID NO:38的氨基酸序列基本上同一的氨基酸序列。具体而言,Klotho融合多肽可以具有分别与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:38至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一的氨基酸序列。

[0158] 在一些实施方案中,本公开的Klotho融合多肽是可溶的并能够与FGF受体结合。

[0159] 本公开的Klotho融合多肽可以含有多肽接头,所述多肽接头将具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽和成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段连接。合适的接头是本领域熟知的并且通常含有几个Gly残基和几个Ser残基,例如,(Gly₄ Ser)₃(SEQ ID NO:11)、Gly₄ Ser多肽(SEQ ID NO:12)、Gly(SEQ ID NO:13)、Gly Gly(SEQ ID NO:14)、Gly Ser(SEQ ID NO:15)、Gly₂ Ser(SEQ ID NO:16)、Ala(SEQ ID NO:17)和Ala Ala(SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,接头将具有下述氨基酸序列的至少2个和直至约30个重复重复,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的任一个代表。

[0160] 当本公开的Klotho融合多肽中存在多肽接头时,具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽可以由肽键连接至接头多肽的N端,而FGF由肽键连接至多肽接头的C端。备选地,FGF可以由肽键连接至接头多肽的N端,而具有Klotho的至少一个胞外亚结构域的多肽由肽键连接至多肽接头的C端。化学接头也可以用来连接两个多肽。

[0161] 本公开的Klotho融合多肽可以包含信号肽。随Klotho融合多肽一起使用的信号肽的例子包括但不限于Klotho信号肽(SEQ ID NO:8)和IgG信号肽(SEQ ID NO:9)。

[0162] 在一些实施方案中,本公开提供FGF(例如,FGF19、FGF21、FGF23、或FGF23变体R179Q)和修饰的Fc(例如,FcLALA)之间的融合物。融合物还可以任选地包含在FGF部分和Fc部分之间的接头。融合物还可以任选地包含信号肽。在多个实施方案中,本公开涵盖编码这些融合多肽的核酸、包含这些核酸的载体和含有这些核酸的宿主细胞。

[0163] 4.1.Klotho和成纤维细胞生长因子多肽

[0164] 本公开的Klotho融合多肽预计显示与自然界中FGF可比的生物学活性,如与FGF受体结合及诱导FGF受体、FRS2(FGF受体底物2)和ERK1/2(胞外信号调节的蛋白激酶1/2)的磷酸化以及激活Egr-1(早期生长反应-1)基因。FGF是结合FGF受体的分泌型肽生长因子。FGF的氨基酸序列和核酸序列是本领域技术人员轻易可获得的。例如,FGF19、FGF21和FGF23的核苷酸序列的例子可以在GenBank数据库中分别按登录号NM_005117、NM_019113和NM_020638找到,并且本文中分别作为SEQ ID NO:30、32和34存在。FGF19、FGF21和FGF23的氨基酸序列的例子可以在GenBank数据库中分别按登录号NP_005108、NP_061986和NP_065689找到,并且本文中分别作为SEQ ID NO:31、35和35存在。额外地,FGF可以包括一个或多个辅助表达蛋白质的改变,例如,FGF23(R179Q)变体(SEQ ID NO:36)。

[0165] Klotho蛋白是一种130kDa具有胞外结构域和短胞质结构域的I型单次跨膜蛋白。Klotho的氨基酸序列和核酸序列是本领域技术人员轻易可获得的。例如, α -Klotho和 β -Klotho的核苷酸序列的例子可以在GenBank数据库中分别按登录号NM_004795和NM_175737找到,并且本文中分别作为SEQ ID NO:7和8存在。 α -Klotho和 β -Klotho的氨基酸序列的例子可以在GenBank数据库中分别按登录号NP_004786和NP_783864找到,并且本文中分别作为SEQ ID NO:2和4存在。

[0166] 本公开的Klotho融合多肽可以与成纤维细胞生长因子受体结合并且具有与成纤维细胞生长因子-19(SEQ ID NO:31)、成纤维细胞生长因子-21(SEQ ID NO:33)、成纤维细胞生长因子-23(SEQ ID NO:35)或其变体(包括成纤维细胞生长因子-23变体(R179Q)(SEQ ID NO:36))有效连接的 α -Klotho或 β -Klotho胞外结构域。

[0167] 具体而言,本公开的Klotho融合多肽可以包括与成纤维细胞生长因子-23(SEQ ID NO:35)或成纤维细胞生长因子-23变体(R179Q)(SEQ ID NO:36)有效偶联的 α -Klotho(SEQ ID NO:2)。额外地,本公开的Klotho融合多肽可以具有与成纤维细胞生长因子-19(SEQ ID NO:31)有效连接的 β -Klotho(SEQ ID NO:4)。本公开的Klotho融合多肽可以包括与成纤维细胞生长因子-21(SEQ ID NO:33)有效偶联的 β -Klotho(SEQ ID NO:4)。

[0168] 本公开包括多种Klotho基因和FGF基因和由这些基因编码的蛋白质的同源物。谈及基因时,“同源物”指在基因的至少部分范围内或与其互补链或其部分基本上同一的核苷酸序列,条件是核苷酸序列编码一种蛋白质,所述蛋白质具有与作为其同源物的基因编码的蛋白质基本上相同的活性/功能。可以依据推定性同源物的氨基酸序列或核苷酸序列

和它们所编码的基因或蛋白质的序列(例如,编码Klotho和FGF的基因的核苷酸序列或其互补链)之间的同一性百分数,鉴定本文所述的基因的同源物。可以例如通过视检或通过本领域已知的或如本文所述的使用各种计算机程序,确定同一性百分数。一般使用序列分析软件(例如,University of Wisconsin Biotechnology Center,1710University Avenue, Madison,Wis.53705的遗传学计算机组(Genetics Computer Group)的序列分析软件包、BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序),测量序列同一性。这类软件通过向各种置换、缺失和/或其他修饰赋予同源性程度,匹配相同或相似的序列。保守性氨基酸置换一般包括以下组内部的置换:

[0169] 甘氨酸和丙氨酸;

[0170] 缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸;

[0171] 天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;

[0172] 丝氨酸和苏氨酸;

[0173] 赖氨酸和精氨酸;和

[0174] 苯丙氨酸和酪氨酸。

[0175] 因此,甘氨酸突变成丙氨酸将是保守性氨基酸置换,丙氨酸突变成甘氨酸也将是这样;缬氨酸突变成异亮氨酸或亮氨酸将是保守性氨基酸置换,将异亮氨酸替换为缬氨酸或亮氨酸也是如此,将亮氨酸替换为缬氨酸或异亮氨酸也是如此等。本公开提供本文公开的全部氨基酸序列的具有至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0176] 在确定同一性程度的方法的一个例子中,可以使用BLAST程序,在 e^{-3} 和 e^{-100} 之间的概率评分表示密切相关的序列。

[0177] 在一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:19的融合多肽。

[0178] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:20的融合多肽。

[0179] 在一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:40的融合多肽。

[0180] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:41的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0181] 在一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:46的融合多肽。

[0182] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:47的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0183] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:48的融合多肽。

[0184] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:49的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0185] 在一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:50的融合多肽。

[0186] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:51的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0187] 在一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:52的融合多肽。

[0188] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:53的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0189] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:54的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0190] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:55的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0191] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:56的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0192] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:57的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0193] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:58的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0194] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:59的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0195] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:60的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0196] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:61的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0197] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:62的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0198] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:63的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0199] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:64的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0200] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:65的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0201] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:66的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0202] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:67的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0203] 在另一个实施方案中,本公开提供SEQ ID NO:68的融合多肽或其包含至少一个保守性氨基酸置换的变体。

[0204] 如本文所用,术语“同源性”和“同源的”不是限于指具有理论性共同遗传祖先的蛋白质,还包括遗传上可能不相关、然而已经演化成执行相似功能和/或具有相似结构的蛋白质。与本文所述的多种蛋白质的功能同源性还涵盖这样的蛋白质,所述蛋白质具有作为其同源物的相应蛋白质的活性。对于具有功能同源性的蛋白质,不要求它们在其氨基酸序列方面具有显著同一性,但是,具有功能同源性的蛋白质反而因具有相似或相同活性而如此定义。例如,对于Klotho分子,多肽应当具有与FGF多肽结合的功能特征并且能够实现FGF与FGFR的结合。对于FGF分子,多肽应当具有与FGFR结合并引起FGFR激活(例如,磷酸化)的功能特征。评估FGF与FGF受体的结合和/或FGF信号传导途径激活的测定法是本领域已知的并且在本文中描述(参见实施例2)。评估Klotho活性的测定法也是本领域已知的并且在本文中描述(例如,与FGF多肽的结合)。具有结构同源性的蛋白质定义为具有类似三级(或四级)结构,并且不必然地要求编码它们的基因的氨基酸同一性或核酸同一性。在某些情况下,结

构同源物可以包括仅在蛋白质活性部位或结合位点处维持结构同源性的蛋白质。

[0205] 除结构同源性和功能源性之外,本公开还涵盖与本文所述的各种Klotho和FGF氨基酸序列具有氨基酸同一性的蛋白质。为了确定两个氨基酸序列的同一性/源性百分数,将序列出于最佳比较目的对齐(例如,可以在一种蛋白质的氨基酸序列中引入空位,旨在与另一种蛋白质的氨基酸序列最佳对齐)。随后比较相应氨基酸位置处的氨基酸残基。当一个序列中的位置由另一个序列中相应位置处的相同氨基酸残基占据时,则所述分子在这个位置上是同一的。两个序列之间的同一性百分数随所述序列共有的相同位置数的变化而变化(即,同一性% = 相同位置数/位置总数乘以100)。

[0206] 本文所述的本公开分子的氨基酸序列具有与本文所述的氨基酸序列至少约60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一或同源的氨基酸序列。

[0207] 本文所述的本公开分子的核酸序列具有与本文所述的核苷酸序列杂交或与之至少约60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一或同源的核苷酸序列。

[0208] 适合用于本公开的融合多肽中的核酸分子可以具有Klotho或FGF核苷酸序列,所述核苷酸序列在严格条件下与分别编码Klotho或FGF的核酸分子的互补物杂交。如本文所用,术语“在严格条件下杂交”意在描述这样的杂交和洗涤条件,在所述条件下彼此至少约70%、80%、85%、90%或更多同源的核苷酸序列一般仍保持彼此杂交。此类严格条件是本领域技术人员已知的并且可以在Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York(2001),6.3.1-6.3.6中找到。具体的、非限制的严格杂交条件例子是在约45℃于6×氯化钠/柠檬酸钠(=SSC)中杂交,随后是在50℃-65℃于0.2×SSC、0.1%SDS中的一个或多个洗涤步骤。

[0209] 4.2.本公开的Klotho-FGF融合多肽

[0210] 在本公开的一些实施方案中,Klotho融合多肽具有这样的多肽链,所述多肽链具有Klotho多肽或其活性片段或变体的第一多肽序列和编码FGF或其活性片段或变体的第二多肽序列。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0211] 本公开包括与SEQ ID NO:19-28中给出的氨基酸序列至少约95%或更多同源的融合多肽。SEQ ID NO:19的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与FGF23(R179Q)变体(SEQ ID NO:36)N端连接的Klotho胞外结构域。SEQ ID NO:20的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与缺少信号肽的Klotho胞外结构域N端连接的IgG信号肽,所述胞外结构域与FGF23(R179Q)变体N端连接。SEQ ID NO:21的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与FGF23(R179Q)变体N端连接的KL-D1胞外亚结构域。SEQ ID NO:22的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与FGF23(R179Q)变体N端连接的KL-D2胞外亚结构域。SEQ ID NO:23的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与FGF23(R179Q)变体N端连接的两个KL-D1胞外亚结构域。SEQ ID NO:24的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与FGF23(R179Q)变体N端连接的两个KL-D2胞外亚结构域。SEQ ID NO:25的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与Klotho胞外结构域N端连接的FGF23(R179Q)变体。SEQ ID NO:26的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与KL-D1胞外亚结构域N端连接的FGF23(R179Q)变体。SEQ ID NO:27的氨基酸序列编码这样的Klotho

融合多肽,所述融合多肽具有与KL-D2胞外亚结构域N端连接的FGF23 (R179Q) 变体。SEQ ID NO:28的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与两个KL-D1胞外亚结构域N端连接的FGF23 (R179Q) 变体。SEQ ID NO:29的氨基酸序列编码这样的Klotho融合多肽,所述融合多肽具有与两个KL-D2胞外亚结构域N端连接的FGF23 (R179Q) 变体。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0212] 本公开的Klotho融合多肽可以包含与SEQ ID NO:7中所述的氨基酸序列至少约95%同一的氨基酸序列。SEQ ID NO:7的氨基酸序列编码缺少信号肽的Klotho胞外结构域。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。

[0213] 本文中描述了并且可以使用本领域已知的方法产生主题融合蛋白。例如,本公开的融合多肽可以如美国专利号6,194,177中所述那样构建。Klotho多肽的用途在美国专利号6,579,850中描述。FGF核酸分子的用途在美国专利号7,223,563中描述。

[0214] 在一些实施方案中,通过PCR克隆编码Klotho的核酸分子并将其符合可读框地与编码FGF的核酸分子连接。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。编码融合多肽的核酸与允许表达的启动子有效连接。随后将编码融合多肽的核酸分子转染入宿主细胞供表达。可以通过测序证实最终构建体的序列。

[0215] 当制备本公开的融合蛋白时,编码Klotho的胞外亚结构域的核酸分子以符合可读框方式与编码FGF的核酸分子和(任选地)编码修饰的Fc片段的核酸融合。所得核酸分子的表达导致Klotho的胞外亚结构域相对于FGF多肽的N端融合。下述融合物也是可能的,其中Klotho的胞外亚结构域相对于FGF多肽的C端融合。用于制备融合蛋白的方法是本领域熟知的。

[0216] 本公开的融合多肽具有共价连接的至少两条多肽,其中一条多肽来自一个蛋白质序列或结构域,例如Klotho,并且另一条多肽来自另一个蛋白质序列或结构域,例如FGF。在一些实施方案中,融合物还包含具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。在另一个实施方案中,本公开包含与修饰的Fc片段融合的FGF。可以通过本领域技术人员熟知的方法,连接本公开的融合多肽的Klotho和/或FGF和/或(任选的)修饰的Fc片段。这些方法包括化学手段和重组手段。

[0217] 可以使用重组遗传学领域的例行技术,获得编码待并入本公开的融合多肽中的结构域的核酸。公开在本公开中使用的一般方法的基础文本包括Sambrook和Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第3版2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 和 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人编著,1994-1999)。在编码本公开Klotho融合多肽的核酸中,可以使用编码分别由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3代表的 α -Klotho或 β -Klotho的核酸序列。在编码Klotho融合多肽的核酸中,可以使用编码分别由SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:34代表的FGF19、FGF21或FGF23的核酸序列。本文所述的本公开分子的核酸序列包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:34杂交或与之至少约60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一或同源的核苷酸序列。

[0218] 可以使用多种方法中的任何方法,获得编码融合物的各种组分[Klotho,和/或FGF肽和/或(任选的)修饰的Fc片段]的核酸序列。例如,编码多肽的核酸序列可以通过采用探针的杂交从cDNA和基因组DNA文库克隆,或使用扩增技术以寡核苷酸引物分离。更常见地,使用DNA或RNA模板,扩增技术用来扩增和分离Klotho序列和FGF序列(参见,例如,Dieffenbach和Dveksler,PCR Primers:A Laboratory Manual (1995))。备选地,可以合成地产生并接合重叠性寡核苷酸以产生一个或多个结构域。使用抗体作为探针,也可以从表达文库分离编码Klotho或FGF的核酸。

[0219] 根据本公开,融合物的多个组分[Klotho、和/或FGF和/或(任选的)修饰的Fc片段]可以直接连接或借助共价接头(包括氨基酸接头,如聚甘氨酸接头)或另一个类型的化学接头(包括糖接头、脂质接头、脂肪酸接头、聚醚接头如PEG等)连接(参见例如,Hermanson, Bioconjugate techniques (1996))。形成融合物/融合多肽的多肽一般按C端至N端连接,不过它们也可以按C端至C端、N端至N端、或N端至C端连接。一个或多个多肽结构域可以插在本公开融合多肽内部的内部位置处。融合蛋白的各多肽可以处于任何顺序。可以通过制备连续编码融合蛋白的重组多核苷酸,通过共价连接来自一个蛋白质序列(例如,Klotho的胞外亚结构域)的氨基酸链至来自另一个蛋白质序列(例如,FGF)的氨基酸链,产生融合多肽。融合蛋白中的不同氨基酸链可以直接剪接在一起或可以借助化学连接基团或氨基酸连接基团间接地剪接在一起。氨基酸连接基团可以长约200个或更多个氨基酸,或通常1至100个氨基酸。在一些实施方案中,向接头中并入脯氨酸残基以防止通过接头形成明显的二级结构元件。接头可以经常是作为重组融合蛋白的部分而合成的柔性氨基酸子序列。这类柔性接头是本领域技术人员已知的。

[0220] 根据本公开,融合物的氨基酸序列[Klotho的胞外亚结构域和/或FGF和/或(任选的)修饰的Fc片段]可以经肽接头连接。肽接头的例子是本领域熟知的并且在本文中描述。例如,肽接头通常包括几个Gly残基和几个Ser残基,如:(Gly₄ Ser)₃ (SEQ ID NO:11)、Gly₄ Ser多肽 (SEQ ID NO:12)、Gly (SEQ ID NO:13)、Gly Gly (SEQ ID NO:14)、Gly Ser (SEQ ID NO:15)、Gly₂ Ser (SEQ ID NO:16)、Ala (SEQ ID NO:17)和Ala Ala (SEQ ID NO:18)。具体而言,用于本公开融合蛋白中的肽接头可以充当柔性铰合部。

[0221] 可以在Klotho并入本公开的融合蛋白之前排除Klotho或FGF的信号序列。融合蛋白的Klotho或FGF的信号序列可以包括例如由SEQ ID NO:19代表的多肽。但是,也可以省略这类序列并将它们替换为不同蛋白质的信号序列,例如,IgG信号序列 (SEQ ID NO:9)。通常,本公开的药物组合物将含有成熟形式的Klotho和FGF。

[0222] 通常,在并入融合蛋白之前从Klotho部分或FGF部分之一或两者排除内含子。

[0223] 本公开的融合多肽可以包括与一个或多个反应性氨基酸侧链共价连接的一种或多种聚合物。以举例而非限制的方式,这类聚合物包括聚乙二醇 (PEG),所述聚乙二醇可以与一个或多个游离半胱氨酸的硫氢基残基连接,由此阻断蛋白质暴露于氧化条件时二硫键形成和聚集。此外,本公开的融合多肽的PEG化预计提供这类改善的特性,如增加的半寿期、溶解度和蛋白酶抗性。本公开的融合多肽可以备选地通过共价添加聚合物至游离氨基如赖氨酸ε或N端氨基进行修饰。用于共价修饰的具体特定半胱氨酸和赖氨酸将是不参与受体结合、肝素结合或蛋白质正确折叠的那些氨基酸。本领域技术人员将显而易见,根据需要,可以使用分析融合多肽的生物化学活性和/或生物学活性的方法,以确定修饰特定氨基酸残

基是否影响蛋白质的活性。构思了并且本领域已知其他相似合适的修饰。

[0224] 本公开也涉及表达与SEQ ID NO:19-28中给出的氨基酸序列至少约95%或更多同源的融合多肽。

[0225] 本公开涵盖融合多肽,所述融合多肽包含:(a)包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域或其功能活性变体或衍生物的多肽;(b)包含成纤维细胞生长因子或其功能活性变体或衍生物的多肽;和(c)具有减少的Fc γ 受体亲和力和/或增加的血清半寿期的修饰的Fc片段。“其功能活性变体或衍生物”意指与相应野生型多肽相比包含更长、更短或改变的氨基酸序列、同时保留生物学活性的变体或衍生物。因此,与Klotho蛋白的野生型胞外亚结构域或成纤维细胞生长因子相比,Klotho蛋白的胞外亚结构域或成纤维细胞生长因子的“功能活性变体或衍生物”包含更少、更多或改变的氨基酸序列,但是仍保留野生型多肽序列的至少一种生物学活性。本文公开的多肽的功能活性变体或衍生物还可以包含本文公开的多肽的相同氨基酸序列,但是在翻译后修饰(例如,PEG化,甲基化和/或糖基化)方面变动,或具有添加给它的额外部分或元件。在多个实施方案中,FGF23的变体或衍生物包含或不包含R179Q。

[0226] 在一个实施方案中,功能活性变体或衍生物多肽包括与本文公开的序列(例如,Klotho蛋白的至少一个胞外结构域或成纤维细胞生长因子)至少约60%同一的氨基酸序列。优选地,多肽与本文公开的序列至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多同一。

[0227] 如本文中所用,使用Karlin和Altschul(PNAS USA 87:2264-2268,1990,在PNAS USA 90:5873-5877,1993中改良的)算法确定两个氨基酸序列(或两个核酸序列)的百分序列同一性。该算法并入Altschul等人(J.Mol.Biol.215:403-410,1990)的NBLAST程序和XBLAST程序中。采用NBLAST程序,评分=100、字长度=12执行BLAST核苷酸检索。采用XBLAST程序,评分=50、字长度=3执行BLAST蛋白质检索。为了出于比较目的获得带空位的比对结果,如Altschul等人(Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997)中所述那样使用空位BLAST。当使用BLAST程序和空位BLAST程序时,使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数以获得与本发明核酸分子同源的核苷酸序列。

[0228] 同一性或同一的意味着氨基酸序列(或核酸序列)相似性并且具有本领域认可的含义。具有同一性的序列共有相同或相似的氨基酸(或核酸)。因此,与参考序列共有85%氨基酸序列同一性的候选序列要求在候选序列与参考序比对后,候选序列中85%的氨基酸与参考序列中的相应氨基酸相同,和/或构成保守性氨基酸变化。

[0229] 本文公开的多肽的功能活性变体保留原始多肽或片段的基本上相同的功能活性。天然存在的功能活性变体如等位变体和物种变体和非天然存在的功能活性变体纳入本发明并且可以通过例如诱变技术或通过直接合成过程产生。

[0230] 功能活性变体或衍生物与本文公开的多肽例如大约或至少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个或多个氨基酸残基不同。在这种比较需要对齐的情况下,将序列针对最大同源性对齐。可以在多肽的任何位置出现变异位点,只要活性基本上类似于本文公开的多肽即可。

[0231] Bowie等人,Science,247:1306-1310(1990)中提供了关于如何产生具有表型沉默的氨基酸置换的变体和衍生物的指导,所述文献教授了存在研究氨基酸序列对变化的耐受

性的两种主要策略。

[0232] 第一种策略利用因进化过程期间天然选择所致的氨基酸置换耐受性。通过比较不同物种中的氨基酸序列,可以鉴定物种之间保守的氨基酸位置。参见,例如,图5。这些保守的氨基酸或许对蛋白质功能重要。与之相反,其中置换耐受天然选择的氨基酸位置显示对蛋白质功能并非关键的位置。因此,可以修饰耐受氨基酸置换的位置,同时仍维持多肽的特异性结合活性。

[0233] 第二种策略使用基因工程在所克隆基因的特定位置引入氨基酸变化,以鉴定对蛋白质功能关键的区域。例如,可以使用位点定向诱变或丙氨酸扫描诱变(在分子中每个残基处引入单个丙氨酸突变)(Cunningham等人,Science,244:1081-1085(1989))。

[0234] 向蛋白质的氨基酸引入突变的方法是本领域技术人员熟知的。参见,例如,Ausubel(编著),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Inc.(1994);T.Maniatis,E.F.Fritsch和J.Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))。也可以使用市售试剂盒如“QuikChange™.位点定向诱变试剂盒”(Stratagene)引入突变。可以由本领域技术人员通过替换不影响多肽功能的氨基酸完成相对于某多肽产生多肽功能活性变体或衍生物。

[0235] 变体或衍生物可以例如具有一个或多个保守性置换,同时仍保留至少一种生物学活性。保守性置换是这样的置换,其中氨基酸由具有相似特性的另一种氨基酸置换,从而肽化学的领域技术人员预期多肽的二级结构和亲水性质基本上不改变。通常,以下组的氨基酸代表保守性变化:(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;和(5)phe、tyr、trp、his。

[0236] 变体和衍生物的具体例子包括但不限于下述包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体和衍生物,例如,包含Klotho胞外结构域(例如,SEQ ID NO:5或6)的至少约100、150、200、250、300、350、375、400或425个连续氨基酸的多肽,所述多肽背离野生型序列(如SEQ ID NO:5或6中公开)不超过约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个或更多个氨基酸残基差异,同时保留野生型多肽的至少一种生物学活性。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约100个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:5或6的至少约400个连续氨基酸的多肽。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约50个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:5或6的至少约400个连续氨基酸的多肽。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约25个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:5或6的至少约425个连续氨基酸的多肽。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约10个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:5或6的至少约425个连续氨基酸的多肽。在另一个例子中,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括包含SEQ ID NO:7的至少约100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、925、950或982个连续氨基酸的多肽,所述多肽背离野生型序列不超过约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或200个氨基酸残基差异。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约100个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:7的至少约500个连续氨基酸的多肽。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约100个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:7的至少约600个连续氨基酸的多肽。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约100个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:7的至少约700个连续氨基酸的多肽。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约100个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:7的至少约800个连续氨基酸的多肽。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约100个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:7的至少约900个连续氨基酸的多肽。例如,包含Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约50个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:7的至少约900个连续氨基酸的多肽。

[0237] 变体和衍生物的具体例子包括但不限于下述包含成纤维细胞生长因子的多肽的功能活性变体和衍生物,例如,包含成纤维细胞生长因子(例如,FGF19(SEQ ID NO:31)、FGF21(SEQ ID NO:33)或FGF23(SEQ ID NO:35))的至少约100、125、150、150、175、200、225或250个连续氨基酸的多肽,所述多肽背离(如SEQ ID NO:31、33或35中公开的)野生型序列不超过约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个或更多个氨基酸残基差异,同时保留野生型多肽的至少一种生物学活性。在多个实施方案中,变体或衍生物可以包含或不包含R179Q变异。例如,包含成纤维细胞生长因子的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约25个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:31、33或35的至少约150个连续氨基酸的多肽。例如,包含成纤维细胞生长因子的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约25个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:31、33或35的至少约175个连续氨基酸的多肽。例如,包含成纤维细胞生长因子的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约25个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:31、33或35的至少约200个连续氨基酸的多肽。例如,包含成纤维细胞生长因子的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约50个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:35的至少约225个连续氨基酸的多肽。例如,包含成纤维细胞生长因子的多肽的功能活性变体或衍生物包括具有不超过约25个氨基酸残基差异的包含SEQ ID NO:35的至少约225个连续氨基酸的多肽。

[0238] 4.3. 表达本公开的融合多肽

[0239] 为了表达本公开的融合蛋白,可以通过本领域熟知的技术,将通过本文所述的任何方法或本领域已知的那些方法获得的DNA分子插入适宜的表达载体。例如,可以通过同聚加尾法或通过涉及使用合成性DNA接头的限制性酶连接或通过平末端连接,将双链cDNA克隆入合适的载体。DNA连接酶通常用来连接DNA分子并且可以通过碱性磷酸酶处理避免不想要的连接。

[0240] 因此,本公开包括载体(例如,重组质粒和细菌噬菌体),所述载体包含如本文所述的核酸分子(例如,基因或编码基因的重组核酸分子)。术语“重组载体”包括这样的载体(例如,质粒、噬菌体、噬粒、病毒、粘粒、fosmid或其他纯化的核酸载体),所述载体已经过改变、修饰或工程化,从而它含有比衍生重组载体的天然或自然核酸分子中所含核酸序列更大、

更小或不同的核酸序列。例如，重组载体可以包括编码Klotho-FGF23融合物的核苷酸序列，所述核苷酸序列与如本文定义的调节序列（例如，启动子序列、终止子序列和/或人工核糖体结合位点（RBS））有效连接。允许其中所含基因或核酸表达的重组载体称作“表达载体。”

[0241] 对于真核宿主，取决于宿主的性质，可以使用不同的转录和翻译调节序列。它们可以衍生自其中调节信号与具有高水平表达的特定基因连接的病毒源，如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猿猴病毒等。例子包括但不限于疱疹病毒TK启动子、SV40早期启动子、酵母gal4基因启动子等。可以选择允许阻遏或激活的转录起始调节信号，从而可以调节基因的表达。

[0242] 在本文所述的本公开的一些分子中，具有编码融合多肽的一条或多条多肽链的核苷酸序列的一个或多个DNA分子与一个或多个调节序列有效连接，所述调节序列能够将目的DNA分子整合入宿主细胞。可以选择已经由引入的DNA稳定转化的细胞，例如，通过引入一个或多个允许选择含有表达载体的宿主细胞的标记进行选择。选择标记基因可以与待表达的核酸序列直接连接或通过共转染引入相同的细胞中。也可能需要额外元件以便最佳合成本文所述的蛋白质。使用哪些额外元件对本领域普通技术人员而言是显而易见的。

[0243] 选择特定质粒或病毒载体的重要因素包括但不限于从不含有载体的那些接受细胞中识别并且选出含有载体的接受细胞的难易度；特定宿主中所需的载体拷贝数；和是否需要能够使载体在不同物种的宿主细胞之间“穿梭”。

[0244] 一旦构建了包含DNA序列供表达的载体，可以通过本领域已知的多种合适方法中的一个或多个方法，将它引入适宜的宿主细胞，所述方法例如包括但不限于转化法、转染法、缀合法、原生质体融合法、电穿孔法、磷酸钙沉淀法、直接显微注射法等。

[0245] 宿主细胞可以是原核的或真核的。真核宿主细胞的例子例如包括哺乳动物细胞，如人、猴、小鼠和中国仓鼠卵巢（CHO）细胞。这类细胞促进蛋白质的翻译后修饰，例如，包括正确的折叠或糖基化。另外，也可以用酵母细胞来表达本公开的融合多肽。如同大部分的哺乳动物细胞，酵母细胞也能够实现蛋白质的翻译后修饰，例如，包括糖基化。存在多种重组DNA策略，所述策略利用可以用于酵母中产生蛋白质的强启动子序列和高拷贝数质粒。酵母转录和翻译装置可以识别在克隆的哺乳动物基因产物上的前导序列，因而能够分泌携带前导序列的肽（即，前肽）。高产率产生本公开融合多肽的具体方法是在DHFR缺陷型CHO细胞中利用二氢叶酸还原酶（DHFR）扩增、使用连续渐增水平的甲氨蝶呤，如美国专利号4,889,803中所述。获得的多肽可以处于糖基化形式。

[0246] 在引入一个或多个载体后，通常在选择含有载体的细胞生长的选择性培养基中生长宿主细胞。可以通过本领域已知或本文所述的任何方法，例如，涉及提取、沉淀、色谱和电泳的任何常规方法，实施重组蛋白的纯化。可以用于纯化蛋白质的其他纯化方法是使用结合靶蛋白的单克隆抗体的亲和色谱。通常，使得含有重组蛋白的粗制制备物穿过柱上固定有合适单克隆抗体的柱。蛋白质通常借助特异性抗体与柱结合，而杂质穿过。在洗涤柱后，例如通过改变pH或离子强度从凝胶洗脱蛋白质。

[0247] 4.4. 评估融合多肽活性的测定法

[0248] 本文所述的测定法（参见实施例2）和本领域已知的那些测定法可以用于检测本公开融合多肽的Klotho或FGF活性。合适的活性测定法包括受体结合测定法、细胞增殖测定法和细胞信号传导测定法。例如，可以用于确定融合多肽是否具有Klotho或FGF活性的结合测定法包括，测定融合多肽与FGF受体的结合。FGF受体结合测定法包括但不限于竞争性和非

竞争性测定法。例如,可以通过使表达FGF受体的细胞与标记的FGF(例如,放射活性的标记物)和渐增浓度的未标记Klotho-FGF融合多肽接触,检测FGF受体结合作用。将竞争与相同受体结合的两种配体添加至含有细胞的反应混合物。随后洗涤细胞并且测量标记的FGF。在未标记的融合多肽存在下,标记的FGF与其受体的量减少表示Klotho-FGF融合多肽与受体结合。备选地,可以标记Klotho-FGF融合多肽并且检测融合多肽与细胞的直接结合。

[0249] 也可以通过确定融合多肽是否诱导细胞反应,测量Klotho或FGF活性。例如,在一些实施方案中,用于检测Klotho-FGF融合多肽的生物学活性的测定法涉及:使表达FGF受体的细胞与融合多肽接触;测定细胞反应(例如,细胞增殖或Egr-1激活、C2C12细胞中的肌管直径)并且在融合多肽存在和不存在下比较细胞反应。相对于融合多肽复合物不存在时,在融合多肽复合物存在下细胞反应增加表示融合多肽具有生物学活性。另外,从受体起的下游信号传导事件增加也可以作为生物学活性的指标度量(例如,FGFR、FRS2、ERK1/2、p70S6K的磷酸化等)。

[0250] 4.5药物组合物 and 治疗方法

[0251] 本公开还涉及药物组合物,所述药物组合物含有一种或多种本公开的融合多肽和可药用的稀释剂或载体。药物组合物还可以包含药学有效量的肝素。这类药物组合物可以纳入试剂盒或容器中。这类试剂盒或容器可以随说明书一起包装,所述说明书涉及融合多肽的延长的体内半寿期或体外货架期。任选地,处于监管药物产品或生物产品制造、使用或销售的政府机构规定的形式的公告可以与这类试剂盒或容器相关性,所述公告反映该机构批准制造、使用和销售供人类施用。这类组合物可以用于通过以下方式,在患者、优选地哺乳动物和最优选地人类中治疗、防止或缓解疾病或疾病症状(例如,年龄相关的疾病或代谢疾病)的方法中:向患者施用包含本公开多肽或融合多肽的药物组合物。

[0252] 通常而言,本公开药物组合物的治疗有效量是约0.0001mg/kg至0.001mg/kg;0.001mg/kg至约10mg/kg体重或约0.02mg/kg至约5mg/kg体重。常见地,融合多肽的治疗有效量是例如约0.001mg至约0.01mg、约0.01mg至约100mg或约100mg至约1000mg。优选地,融合多肽的治疗有效量是约0.001mg/kg至2mg/kg。

[0253] 融合多肽的最佳药物制剂可以由一个或本领域普通技术人员根据施用途和所需剂量确定。(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(1990),Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,所述文献的完整公开内容因而通过引用的方式并入)。

[0254] 本公开的融合多肽可以作为可处于固态、液态或气态(气溶胶)形式的药物组合物施用。常见的施用途可以包括但不限于口服、局部用、肠胃外、舌下、直肠、阴道、皮内和鼻内施用。肠胃外施用包括皮下注射、静脉内、肌内、腹膜内、胸膜内、胸骨内注射或输注技术。优选地,肠胃外施用组合物。更优选地,静脉内施用组合物。本公开的药物组合物可以如此配制,从而允许本公开的多肽在施用组合物至受试者时是生物可利用的。组合物可以采取一种或多种剂量单位的形式,其中,例如,片剂可以是单一剂量单位,并且气溶胶形式的本公开多肽的容器可以容纳多个剂量单位。

[0255] 制备药物组合物中所用的材料可以在使用的量时无毒。本领域普通技术人员显而易见的是,药物组合物中有效成分的最佳剂量将取决于多种因素。有关的因素包括但不限于受试者类型(例如,人)、受试者的总体健康、需要治疗的受试者的年龄相关的疾病或代谢疾病的类型、组合物作为多药方案的组成部分的用法、本公开多肽的具体形式、施用方式和

所用的组合物。

[0256] 可药用载体或运载体可以是颗粒状,从而组合物例如处于片剂或粉末形式。载体可以为液态,组合物例如为口服糖浆剂或注射用液体。此外,载体可以为气态,从而提供例如可用于吸入施用的气溶胶组合物。

[0257] 术语“载体(carrier)”指与本公开多肽一起施用的稀释剂、辅助剂或赋形剂。这类药用载体可以是液体,如水和油,包括石油来源、动物来源、植物来源或合成来源的那些油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。载体可以是盐水、阿位伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、尿素等。此外,可以使用辅助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方案中,当施用至受试者时,本公开的多肽和可药用载体是无菌的。当静脉内施用本公开的多肽时,水是特殊载体。也可以使用盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油水溶液作为液态载体,特别用于可注射溶液剂。合适的药用载体还包括赋形剂,如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、甘醇、水、乙醇等。如果需要,本发明的组合物也可以含有微量的润湿剂或乳化剂、或pH缓冲剂。

[0258] 组合物可以意图用于口服施用,并且如果是这样,组合物优选地处于固态或液态形式,其中半固体、半液体、悬液和凝胶形式作为固体或液体纳入本文考虑的形式。

[0259] 作为口服施用的固态组合物,组合物可以配制成粉剂、颗粒剂、压缩片剂、丸剂、胶囊剂、咀嚼胶、糯米纸囊剂(wafer)等形式。这种固态组合物一般含有一种或多种惰性稀释剂。此外,可以存在以下一者或多者:粘合剂,如乙基纤维素、羧甲基纤维素、微晶纤维素或明胶;赋形剂,如淀粉、乳糖或糊精;崩解剂,如海藻酸、藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等;润滑剂,如硬脂酸镁或Sterotex;助流剂,如胶态二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;矫味剂,如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橙味矫味剂;和着色剂。

[0260] 当药物组合物处于胶囊剂形式(例如,明胶胶囊剂)时,除以上类型的材料之外,它可以还含有液态载体如聚乙二醇、环糊精或脂肪油。

[0261] 药物组合物可以处于液体形式,例如,酏剂、糖浆剂、溶液剂、乳剂或混悬剂。液体可以用于口服施用或通过注射递送。当意图用于口服施用时,组合物可以含有以下一种或多种:甜味剂、防腐剂、染料/色料和增味剂。在供注射施用的组合物中,也可以包含一种或多种表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂。

[0262] 本公开的液态组合物,无论它们为溶液剂、混悬剂或其他等形式,还可以包含以下一者或多者:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、优选地生理盐水、林格液、等渗氯化钠;不挥发性油,如可以充当溶剂或助悬介质的合成性单酰甘油和二酰甘油、聚乙二醇、丙三醇、环糊精、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或尼泊金甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的物质,如氯化钠或右旋糖。肠胃外组合物可以封闭在玻璃、塑料或其他材料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。生理盐水是具体的特定辅助剂。可注射组合物优选地无菌。

[0263] 药物组合物含有有效量的本公开化合物(例如,融合多肽),从而将获得合适的剂量。药物组合物可以含有如目前针对其各自相应病症所规定的已知有效量的化合物。

[0264] 有效防止、治疗、和/或管理年龄相关的疾病或代谢疾病的预防性和/或治疗性方案中使用的本公开多肽的施用途径可以基于目前针对本领域已知的其他治疗药所规定的

施用途。本公开的多肽可以通过任何便利的途径,例如通过输注或快速浓注(bolus injection)、通过经上皮或粘膜皮肤衬层(例如,口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等)吸收来施用。施用可以是全身性或局部性的。各种递送系统是已知的,例如,微粒子、微胶囊、胶囊等,并且可以用于施用本公开的多肽。可以向受试者施用多于一种本公开的多肽。施用方法可以包括但不限于口服施用和肠胃外施用;肠胃外施用包括但不限于皮内、肌肉、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、舌下、鼻内、脑内、心室内、鞘内、阴道内、经皮、直肠、通过吸入或通过耳、鼻、眼或皮肤局部施用。

[0265] 可以肠胃外地施用本公开的多肽。具体而言,可以静脉内施用本公开的多肽。

[0266] 也可以利用肺施用法,例如,通过使用吸入器或雾化器和含有雾化剂的制剂,或通过吸入氟烃或合成性肺表面活性剂中灌流。本公开的多肽也可以用常规粘合剂和载体如甘油三酯配制为栓剂。

[0267] 本公开的多肽可以在控释系统中递送。例如,可以使用泵(参见Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwald等人, Surgery 1980, 88:507; Saudek等人, N. Engl. J. Med. 1989, 321:574)。高分子材料也可以用于控释本公开的多肽(参见Medical Applications of Controlled Release, Langer和Wise(编著), CRC Pres., Boca Raton, FL, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen和Ball(编著), Wiley, New York, 1984; Ranger和Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 1983, 23, 61; 还参见Levy等人, Science 1985, 228, 190; During等人, Ann. Neurol., 1989, 25, 351; Howard等人, J. Neurosurg., 1989, 71, 105)。具体而言,可以将控释系统靠近本公开多肽的靶(例如,脑)布置,因此仅需要全身性剂量的一部分(参见,例如,Goodson, 引自Medical Applications of Controlled Release, 上文, 第2卷, 1984, 第115-138页)。可以使用在Langer的综述(Science 1990, 249, 1527-1533)中讨论的其他控释系统。

[0268] 用来实现本公开多肽控释或持续释放的高分子材料例如在美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;美国专利号5,912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公开号W099/15154;和PCT公开号W099/20253中公开。在持续释放制剂中使用的聚合物的例子包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-醋酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酞、聚(N-乙基吡咯烷酮)、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚乳酸(PLA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)和聚原酸酯。优选地,在持续释放制剂中使用的聚合物为惰性、不含可浸出杂质、储存时稳定、无菌并且生物可降解。

[0269] 通常而言,本公开药物组合物的治疗有效量是约0.0001mg/kg至0.001mg/kg; 0.001mg/kg至约10mg/kg体重或约0.02mg/kg至约5mg/kg体重。

[0270] 在其他实施方案中,预防性和/或治疗性方案涉及向患者施用一剂或多剂有效量的本公开多肽,其中有效量给药实现本公开多肽的至少0.01μg/mL到至少400μg/mL的血浆水平。

[0271] 预防性和/或治疗性方案可以涉及向患者施用多剂有效量的本公开多肽,其中多剂维持本公开多肽的至少0.01μg/mL到400μg/mL的血浆水平。可以将预防性和/或治疗性方案施用至少1天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月或9个月。

[0272] 预防性和/或治疗性方案可以涉及施用与一种或多种额外治疗药组合的本公开多肽。目前用于防止、治疗和/或管理年龄相关的疾病或代谢疾病的一种或多种治疗药的推荐剂量可以从本领域的任何参考文献获得,所述参考文献包括但不限于Hardman等人编著,Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics,第10版,McGraw-Hill,New York,2001;Physician's Desk Reference (第60版,2006),所述文献通过引用方式完整并入本文作为参考。

[0273] 本公开包括治疗需要Klotho蛋白和FGF的激动活性的病症的方法。本公开还包括所公开的蛋白质、融合蛋白、核酸分子或药物组合物在治疗病理学疾病的疗法中或作为治疗病理学疾病的药物的用途,在所述病理学疾病中需要Klotho蛋白和FGF的激动活性。本公开的这类方法或用途的例子包括但不限于年龄相关的疾病或代谢疾病。

[0274] 本公开包括用于治疗或预防个体中年龄相关的疾病的方法;和所公开的蛋白质(多肽)、融合蛋白、核酸分子或药物组合物在治疗或预防个体中年龄相关的疾病的疗法中或作为治疗或预防个体中年龄相关的疾病的药物的用途。向需要治疗的个体施用药理有效量的含有Klotho融合多肽的药物组合物,从而治疗或预防年龄相关的疾病,其中所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段。在一些实施方案中,Klotho融合多肽与药理有效量的肝素共施用。年龄相关的疾病包括肌少症、皮肤萎缩、肌肉耗损、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失。在一些实施方案中,Klotho融合多肽含有 α Klotho蛋白的至少一个胞外结构域。在一个具体实施方案中,将含有 α Klotho蛋白的至少一个胞外结构域和成纤维细胞生长因子23的Klotho融合蛋白施用至需要治疗肌肉萎缩的个体。

[0275] 本公开也涉及一种用于治疗或预防个体中代谢疾病的方法;并且还涉及所公开的蛋白质(多肽)、融合蛋白(多肽)、核酸分子或药物组合物在治疗或预防个体中代谢疾病的疗法中或作为治疗或预防个体中代谢疾病的药物的用途。向需要治疗的个体施用药理有效量的含有Klotho融合多肽的药物组合物,从而治疗或预防代谢疾病,其中所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子和(任选的)具有减少的FcRn结合作用和/或增加的血清半寿期和/或稳定性的修饰的Fc片段。在一些实施方案中,Klotho融合多肽与药理有效量的肝素共施用。该方法可以用于治疗或预防II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症。在一个具体实施方案中,将含有 β -Klotho蛋白的至少一个胞外结构域和成纤维细胞生长因子21的Klotho融合蛋白施用至需要治疗代谢疾病的个体。

[0276] 本公开还提供了用于治疗或预防个体中高磷酸盐血症或钙质沉着症的方法;和所公开的蛋白质、融合蛋白、核酸分子或药物组合物在治疗或预防个体中高磷酸盐血症或钙质沉着症的疗法中或作为治疗或预防个体中高磷酸盐血症或钙质沉着症的药物的用途。向需要治疗的个体施用药理有效量的含有Klotho融合多肽的药物组合物,从而治疗高磷酸盐血症或钙质沉着症,其中所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域、成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段。在一些实施方案中,Klotho融合多肽与药理有效量的肝素共施用。在一个具体实施方案中,将含有 α Klotho蛋白的至少一个胞外结构域和成纤维细胞生长因子23和(任选的)修饰的Fc片段的Klotho融合蛋白施用至需要治疗高磷酸

盐血症或钙质沉着症的个体。

[0277] 本公开也涉及一种用于治疗或预防个体中慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭的方法；并且还涉及所公开的蛋白质、融合蛋白、核酸分子或药物组合物在治疗或预防个体中慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭的疗法中或作为治疗或预防个体中慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭的药物的用途。向需要治疗的个体施用药理有效量的含有Klotho融合多肽的药物组合物，从而治疗慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭，其中所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域、成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段。在一些实施方案中，Klotho融合多肽与药理有效量的肝素共施用。在一些实施方案中，将含有 α Klotho蛋白的至少一个胞外结构域的Klotho融合蛋白施用至需要治疗慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭的个体。

[0278] 本公开还包括用于治疗或预防个体中癌症的方法；和所公开的蛋白质、融合蛋白、核酸分子或药物组合物在治疗或预防个体中癌症的疗法中或作为治疗或预防个体中癌症的药物的用途。向需要治疗的个体施用药理有效量的含有Klotho融合多肽的药物组合物，从而治疗癌症，其中所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域、成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段。该方法可以用于治疗或预防乳腺癌。在一些实施方案中，Klotho融合多肽与药理有效量的肝素共施用。在一些实施方案中，将含有 α Klotho蛋白的至少一个胞外结构域的Klotho融合蛋白施用至需要治疗癌症的个体。

[0279] 在通过施用含有Klotho变体或Klotho融合多肽的药物组合物治疗病症的方法中；或在疗法中使用含有Klotho变体或Klotho融合多肽的药物组合物时，Klotho融合多肽和(任选的)修饰的Fc片段具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域和成纤维细胞生长因子。在一个具体实施方案中，Klotho融合蛋白含有 β Klotho蛋白和成纤维细胞生长因子21的至少一个胞外结构域。

[0280] 在另一个实施方案中，融合物包含FGF(例如，FGF19、FGF21、FGF23或FGF23变体)和FcRn结合作用减少和/或血清稳定性增加的修饰的Fc片段。这种类型融合物可以用于如上文所述的多种疾病中，或用来治疗或预防本领域已知的任何FGF相关疾病。可以将融合物施用至有需求的个体。

[0281] 可以根据本领域技术人员已知和本文所述的任何施用方法施用融合多肽组合物。具体的特定施用方法包括皮下或静脉内施用。本文中描述了其他的有效施用模式。

[0282] 4.6. 治疗方法和评估功效的测定法

[0283] 提供向个体施用本文所述的融合多肽的本公开方法或用途可以用来治疗多种病症，包括年龄相关的疾病或代谢疾病。在不受任何具体理论限制的情况下，融合多肽可以用来治疗其中存在Klotho或FGF失调的疾病。疾病例子包括代谢疾病和年龄相关的疾病。例如，FGF23敲除小鼠或Klotho敲除小鼠显示多种相似的表型，包括体力活动少、生长迟缓、肌肉萎缩、皮肤萎缩、动脉粥样硬化、寿命短等。(参见Razzaque和Lanske, J. of Endocrinology, 194:1-10 (2007), 所述文献通过引用的方式并入本文)。

[0284] 特别地，本公开的融合多肽特别可用于治疗衰老相关的疾病，包括肌肉萎缩。在不受理论约束的情况下，Klotho和FGF23控制矿物质(例如，磷酸盐和钙)和维生素D稳态的能力可能是这些蛋白质借以调节衰老和肌肉萎缩的手段。

[0285] 在另一方面，本公开的融合多肽可以用于治疗代谢疾病。例如，已经显示 β -Klotho和FGF19通过调节胆固醇7- α -羟化酶(CYP7A1)控制胆汁酸稳态。胆汁稳态病症的非限制性

例子是胆汁淤积。已经显示 β -Klotho和FGF21在脂肪细胞中诱导脂解作用并且因此诱导脂肪储存减少和葡萄糖摄取增加。脂解作用/脂肪贮积病的非限制性例子是肥胖症和相关的代谢和心血管疾病。

[0286] 至少部分地基于FGF23能够刺激磷酸盐在尿中排泄并因而降低血清中磷酸盐水平的研究结果,本公开的Klotho-FGF23融合多肽可以用于治疗或预防个体中的高磷酸盐血症或钙质沉着症。例如,已经显示Klotho中导致患者Klotho缺陷的纯合错义突变可以造成重度肿瘤钙质沉着症和动脉钙化(Ichikawa等人,J.Clin.Invest.117:2684-2691(2007),所述文献通过引用的方式并入本文)。向个体施用药理有效量的含有Klotho融合多肽的药物组合物,从而治疗或预防高磷酸盐血症或钙质沉着症,其中所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域、成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段。特别地,含有 α Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域、成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段的Klotho融合多肽可用于治疗高磷酸盐血症或钙质沉着症。

[0287] 本公开的Klotho融合多肽也可以用于治疗或预防个体中的慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭。例如,已经显示与未患病的肾中相比,慢性肾衰竭患者的肾中Klotho表达减少(Koh等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.280:1015-1020(2001),所述文献通过引用的方式并入本文)。向个体施用药理有效量的含有Klotho融合多肽的药物组合物,从而治疗或预防慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭,其中所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域、成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段。特别地,含有 α Klotho蛋白或其变体的至少一个胞外亚结构域的Klotho多肽或融合多肽可用于治疗慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭。

[0288] 本公开的Klotho融合多肽也可以用于治疗或预防个体中的癌症。例如,已经显示与正常的乳腺组织相比,乳腺癌组织中Klotho表达减少(Wolf等人,Oncogene(2008)在线发表居先,所述文献通过引用的方式并入本文)。向个体施用药理有效量的含有Klotho融合多肽的药物组合物,从而治疗或预防癌症或乳腺癌,其中所述融合多肽具有Klotho蛋白的至少一个胞外亚结构域、成纤维细胞生长因子和(任选的)修饰的Fc片段。特别地,含有 α Klotho蛋白的至少一个胞外结构域的Klotho融合蛋白可用于治疗癌症或乳腺癌。

[0289] 用于评价本公开的Klotho融合多肽对年龄相关的疾病或代谢疾病的功效和/或确定其有效量的方法包括基于生物的测定法,例如,使用哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、灵长类、或某些其他非人类)或其他动物(例如,非洲爪蟾、斑马鱼或无脊椎动物如蝇或线虫)的测定法。可以将Klotho融合多肽向生物施用一次或作为(规范或不规范)治疗方案施用。随后评价生物的参数,例如,年龄相关参数。感兴趣的Klotho融合多肽导致参数相对于参考(例如,对照生物的参数)而变化。也可以评价其他参数(例如,与毒性、清除率和药代动力学相关的参数)。

[0290] 可以使用患有特定病症(例如,本文所述的病症,例如,年龄相关的疾病、代谢疾病)的动物,评价本公开的Klotho融合多肽。这些病症还可以提供致敏系统,其中可以观察测试多肽对生理学的影响。病症例子包括:去神经化、失用性萎缩;代谢疾病(例如,肥胖动物和/或糖尿病动物(如db/db小鼠和ob/ob小鼠)的病症);脑、肝局部缺血;顺铂/紫杉酚/长春新碱模型;多种组织(异种移植)移植物;转基因骨模型;疼痛综合征(包括炎性病症和神经病症);百草枯模型、遗传毒性模型和氧化应激模型;和肿瘤I模型。

[0291] 为了测量年龄相关的疾病,动物模型可以是当限制热量时具有表型改变的动物。

例如,F344大鼠提供了评价Klotho融合多肽的有用测定体系。当限制热量时,F344大鼠具有0%至10%的肾病发生率。但是,当自由饲喂时,它们具有60%至100%的肾病发生率。

[0292] 为了评价本公开的Klotho融合多肽,将它施用至动物(例如,F344大鼠或其他合适的动物)并评价动物的参数,例如,在一段时间后评价。动物可以自由进食或以正常方式饲喂(例如,不限制热量,尽管可以在这类条件下评价一些参数)。一般地,将这类动物的群组(cohort)用于该测定法。通常,如果测试多肽按照接受热量限制的相似动物的表型的方向影响参数,则可以将测试多肽显示为有利地改变动物中的寿命调节作用。这类测试多肽可以在不必剥脱生物摄入热量的情况下引起热量限制的寿命调节作用中的至少一些作用,例如,这类作用的子集。

[0293] 待测试的参数可以是年龄相关或疾病相关的参数,例如,与动物模型相关的疾病的症状。例如,可以将测试多肽施用至SH大鼠,并监测血压。有利显示的测试多肽可以相对于未经该多肽治疗的相似参考动物而言,引起症状的改善。与病症或与衰老相关的其他参数可以包括:抗氧化物质水平(例如,抗氧化酶水平或活性)、胁迫抗性(例如,百草枯抗性)、中心体温(core body temperature)、葡萄糖水平、胰岛素水平、促甲状腺激素水平、催乳素水平和促黄体生成激素水平。

[0294] 为了测量本公开的多肽治疗年龄相关的疾病的功效,可以使用Klotho表达减少的动物,例如,具有突变Klotho的小鼠;参见Kuroo等人,Nature,390:45(1997)和美国公开号2003/0119910,所述两份文献均通过引用方式完整并入本文。例如,将测试多肽施用至突变小鼠并且监测年龄相关性参数。有利显示的测试多肽可以相对于未经该多肽治疗的相似参考动物而言,引起症状的改善。可以通过测量体重、检查生殖能力的获得、测量血糖水平、观察寿命、观察皮肤、观察运动功能如行走等,评估与代谢疾病或与衰老相关的参数。也可以通过测量胸腺重量、观察胸腔内表面上形成的钙化结节的大小等,作出评估。另外,定量测定Klotho基因的mRNA或Klotho蛋白还可用于评估。

[0295] 另外,其他体内模型和生物测定法包括评价动物的代谢参数,例如,与胰岛素疾病(II型糖尿病)相关的参数。代谢参数例子包括:葡萄糖浓度、胰岛素浓度和胰岛素敏感性。

[0296] 系统的另一个例子涉及(例如,动物模型中的)肿瘤。肿瘤可以是自发的或诱导的。例如,肿瘤可以从具有多种遗传构成的细胞形成,例如,它们可以是p53+或p53-。还可能使用自身免疫疾病生物,例如,易患SLE的NZB小鼠。为了评价骨病的特征,例如可能使用接受卵巢切除术的动物作为例如骨质疏松症的模型。类似地,对于关节疾病,该模型可以基于佐剂性关节炎(例如,可以用软骨蛋白聚糖、高迁移率族蛋白质、链球菌细胞壁物质或胶原蛋白免疫小鼠);对于肾脏疾病,可以使用kd/kd小鼠。也可用认知动物模型,尤其学习和记忆的动物模型。也可用糖尿病和其并发症的动物模型,例如,链脲菌素模型。犬模型可以例如用于评价卒中和局部缺血。

[0297] 在评估测试多肽是否能够改变寿命调节作用时,可以监测或评价许多年龄相关参数或生物标记物。年龄相关参数例子包括:(i)细胞或生物的生命;(ii)具有生物学年龄依赖性表达模式的细胞或生物中基因转录物或基因产物的存在或丰度;(iii)细胞或生物对刺激的抗性;(iv)细胞或生物的一个或多个代谢参数(参数例子包括循环型胰岛素水平、血糖水平;脂肪含量;中心体温等);(v)生物中存在的细胞或一组细胞的增殖能力;和(vi)细胞或生物的物理外观或行为。

[0298] 术语“平均寿命”指一组生物的死亡年龄的平均数。在一些情况下,在受控环境条件下使用遗传相同的生物群组评定“平均寿命”。弃去因灾祸所致的死亡例。在平均寿命不能在受控环境条件下确定(例如,人)的情况下,可以使用足够大的群体的可靠统计信息(例如,来自寿险精算表)作为平均寿命。

[0299] 表征这两种生物(例如,一种参考生物和一种经Klotho融合多肽处理的生物)之间的分子差异可以揭示这些生物的生理状态差异。参考生物和处理的生物一般具有相同的时间年龄。如本文所用的术语“时间年龄”指自预选事件如受孕、确定的胚胎学或胎儿阶段或更优选地出生以来逝去的时间。多种标准可以用来确定生物是否具有用于对比分析的相同“时间年龄”。一般地,要求的准确度随野生型生物的平均寿命变化而变化。例如,对于秀丽隐杆线虫(*C.elegans*),其实验室野生型虫株N2在一些受控状态下平均存活约16天,相同年龄的生物可能已经活了相同的天数。对于小鼠,相同年龄的生物可能已经活了相同的周数或月数;对于灵长类或人类,活了相同的年数(或在2、3或5年范围内)等。通常,相同时间年龄的生物可能已经活了野生型生物物种的平均寿命的15%、10%、5%、3%、2%或1%范围内的时间量。优选地,生物是成年生物,例如,生物已经活了至少一个时间量,其中平均野生型生物已经成熟到它有能力繁殖的年龄。

[0300] 可以在生物显示出明显的衰老身体特征之前进行生物筛选分析法。例如,生物可以是这样的成体,所述成体已经活了相同物种的野生型生物的平均寿命的10%、30%、40%、50%、60%或70%。已经报道了代谢、免疫能力和染色体结构的年龄相关变化。可以在试验受试者(例如,对于基于生物的测定法)中或对患者(例如,经本文所述的治疗药治疗之前、期间或之后)评价这些变化中的任一者。

[0301] 也可以在筛选分析法的主题生物(或治疗的受试者)中评价与热量限制相关的标志物。尽管这些标志物可能不是年龄相关的,但是它们可以表示当调节Klotho途径时被改变的生理状态。标志物可以是其丰度在限制热量的动物中变化的mRNA或蛋白质。W001/12851和美国专利号6,406,853描述了标志物的例子。从本文所述或与本文所述动物模型类似的动物的细胞衍生的细胞模型可以用于基于细胞的测定法。

[0302] 评价测试多肽对肌肉萎缩的作用的模型包括:1)因去神经化(例如,通过在大腿中部切断右坐骨神经)所致的大鼠内侧腓肠肌肌肉质量损失;2)因固定(例如,通过以90度拐度固定右踝关节)所致的大鼠内侧腓肠肌肌肉质量损失;3)因后肢悬空所致的大鼠内侧腓肠肌肌肉质量损失;(参见,例如,U.S.2003-0129686);4)因恶病质性细胞因子—白介素-1(IL-1)处理所致的骨骼肌萎缩(R.N.Cooney,S.R.Kimball,T.C.Vary,Shock 7,1-16(1997));和5)因糖皮质激素—地塞米松处理所致的骨骼肌萎缩(A.L.Goldberg,J.Biol.Chem.244,3223-9(1969))。

[0303] AMD动物模型的例子包括:模拟渗出性(湿性)黄斑变性的激光诱导小鼠模型(Bora等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.,100:2679-84(2003));表达突变形式的组织蛋白酶D(导致与“地图样萎缩”形式的AMD相关的特征)的转基因小鼠(Rakoczy等人,Am.J.Pathol.,161:1515-24(2002));和在视网膜色素上皮中过量表达VEGF而导致CNV的转基因小鼠(Schwesinger等人,Am.J.Pathol.158:1161-72(2001))。

[0304] 帕金森病动物模型的例子包括通过多巴胺能神经毒素1甲基-4苯基1,2,3,6四氢吡啶(MPTP)处理而模拟帕金森病的灵长类(参见,例如,美国专利公开号20030055231和

Wichmann等人, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 991:199-213 (2003); 6-羟多巴胺损害的大鼠 (例如, *Lab. Anim. Sci.*, 49:363-71 (1999)); 和转基因无脊椎动物模型 (例如, Lakso等人, *J. Neurochem.* 86:165-72 (2003) 和 Link, *Mech. Ageing Dev.*, 122:1639-49 (2001))。

[0305] II型糖尿病的分子模型例子包括:具有缺陷性Nkx-2.2或Nkx-6.1的转基因小鼠 (美国专利号6,127,598); Zucker糖尿病性肥胖fa/fa (ZDF) 大鼠 (美国专利号6,569,832); 和自发形成肥胖症并随后往往进展成明显2型糖尿病的恒河猴 (Hotta等人, *Diabetes*, 50:1126-33 (2001)); 以及具有2型糖尿病样胰岛素抵抗的带显性失活的IGF-I受体 (KR-IGF-IR) 的转基因小鼠。

[0306] 神经病的动物模型和细胞模型例子包括:小鼠 (美国专利号5,420,112) 或兔 (Ogawa等人, *Neurotoxicology*, 21:501-11 (2000)) 中长春新碱所致感觉-运动神经病; 用于研究自主神经病的链脲菌素 (STZ) 糖尿病大鼠 (Schmidt等人, *Am. J. Pathol.*, 163:21-8 (2003)); 和进展性运动神经病 (pnm) 小鼠 (Martin等人, *Genomics*, 75:9-16 (2001))。

[0307] 高磷酸盐血症或肿瘤钙质沉着症的动物模型例子包括Klotho敲除小鼠和FGF23敲除小鼠 (Yoshida等人, *Endocrinology* 143:683-689 (2002))。

[0308] 慢性肾脏疾病或慢性肾衰竭的动物模型例子包括COL4A3+/-小鼠 (Beirowski等人, *J. Am. Soc. Nephrol.* 17:1986-1994 (2006))。

[0309] 癌症的动物模型例子包括向裸鼠移植或植入癌细胞或组织, 如本领域已知 (Giovannella等人, *Adv. Cancer Res.* 44:69-120 (1985))。例如, 乳腺癌的动物模型包括以乳腺癌细胞或组织移植或植入的裸鼠 (例如, Yue等人, *Cancer Res.* 54:5092-5095 (1994); Glinsky等人, *Cancer Res.* 56:5319-5324 (1996); Visonneau *Am. J. Path.* 152:1299-1311 (1998))。

[0310] 可以施用组合物至受试者, 例如, 成年受试者、尤其健康的成年受试者或患有年龄相关的疾病的受试者。在后一种情况下, 该方法可以包括评价受试者, 例如, 以表征年龄相关的疾病的症状或其他疾病标志物, 并且因而将受试者鉴定为患有神经变性病, 例如, 阿尔茨海默病或年龄相关的疾病, 或易患这种疾病。

[0311] 骨骼肌萎缩

[0312] 提供向个体施用Klotho多肽或融合多肽的本公开方法或用途可以用来治疗骨骼肌萎缩。肌肉萎缩包括许多神经肌肉性、代谢性、免疫性和神经系统病症和疾病以及饥饿、营养缺乏症、代谢性应激、糖尿病、衰老、肌营养不良或肌病。在老化过程期间出现肌肉萎缩。肌肉萎缩还因肌肉使用减少或失用所致。症状包括骨骼肌组织质量减少。在男性中, 肌肉质量在50岁和80岁之间减少三分之一。肌肉萎缩的一些分子特征包括泛素连接酶上调和肌原纤维蛋白损失 (Furuno等人, *J. Biol. Chem.*, 265:8550-8557, 1990)。可以例如通过测量3-甲基-组氨酸产生, 追踪这些蛋白质的分解, 所述的3-甲基-组氨酸是肌动蛋白的特异性组分并且在某些肌肉中是肌球蛋白的特异性组分 (Goodman, *Biochem. J.* 241:121-12, 1987 和 Lowell 等人, *Metabolism*, 35:1121-112, 1986; Stein 和 Schluter, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 272:E688-E696, 1997)。肌酸激酶 (细胞损伤标志物) (Jackson等人, *Neurology*, 41:101-104, 1991) 的释放也可以是指示性的。

[0313] 胰岛素非依赖性糖尿病

[0314] 提供向个体施用Klotho多肽或融合多肽的本公开方法或用途可以用来治疗胰岛

素非依赖性糖尿病。胰岛素非依赖性糖尿病也称作“成年发作型”糖尿病和2型糖尿病。2型糖尿病还包括“非肥胖2型”和“肥胖2型”。II型糖尿病可以表征为(1)胰腺-β-胰岛细胞分泌胰岛素降低,从而产生低于保持血糖水平处于平衡的必需量的胰岛素和/或(2)“胰岛素抵抗”,其中身体未能正常对胰岛素反应。(美国专利号5,266,561和美国专利号6,518,069)。例如,葡萄糖刺激的胰岛素水平一般不能上升高于4.0nmol/L。(美国专利号5,266,561)。II型糖尿病的症状例子包括:禁食时高血糖症(美国专利号5,266,561);疲乏;过度口渴;尿频;视力模糊;和感染率增加。II型糖尿病的分子指标包括胰中胰岛淀粉状蛋白沉积。

[0315] 神经病变

[0316] 神经病变可以包括由影响运动神经、感觉神经、感觉运动神经或植物神经的全身性疾病、遗传疾病或有毒物质引起的中枢和/或外周神经功能障碍(参见,例如,美国专利申请号20030013771)。症状可以根据神经损伤的病因和特定类型的受累神经变动。例如,运动神经病的症状包括执行身体任务时笨拙或作为肌肉虚弱、轻微用力后疲惫、站立或行走困难和神经肌肉反射衰减或不存在(美国专利申请号20030013771),自主神经病的症状包括便秘、心律异常和体位性低血压反射衰减(美国专利申请号20030013771),感觉神经病的症状包括疼痛和麻木;手、腿或足中刺痛;和对触碰极端敏感,并且视网膜病变的症状包括视力模糊、视力骤降、黑斑病和闪光感。

[0317] 阿尔茨海默病

[0318] 提供向个体施用Klotho多肽或融合多肽的本公开方法或用途可以用来治疗阿尔茨海默病(AD)。阿尔茨海默病是一种复杂的神经变性病,导致神经元的不可逆性损失。它仅提供也是年龄相关的疾病的神经变性病的一个例子。阿尔茨海默病的临床标志包括记忆、判断、物理环境中定向和语言的进展性损害。AD的神经病理学标志包括区域特异性神经元损失、淀粉样蛋白斑和神经原纤维缠结。淀粉样蛋白斑是含有淀粉样蛋白肽(也称作Ap、或Ap42)的胞外斑,所述的淀粉样蛋白肽是8-淀粉样蛋白前体蛋白(也称作APP)的剪切产物。神经原纤维缠结是由异常过度磷酸化的微管相关蛋白的纤丝组成的不溶性胞内聚集物,tau淀粉样蛋白斑和神经原纤维缠结可能有助于导致神经元因凋亡损失的次生事件(Clark和Karlavish, Ann. Intern. Med. 138 (5):400-410 (2003))。例如,p-淀粉样蛋白在培养的神经元中诱导胱天蛋白酶-2-依赖性凋亡(Troy等人, J Neurosci. 20 (4):1386-1392)。斑块的体内沉积可以触发近端神经元以相似方式凋亡。

[0319] 多种标准,包括遗传、生物化学、生理学和认知标准,可以用来评价受试者中的AD。AD的症状和诊断是医疗从业者已知的。下文展示AD症状和标志物的一些例子。可以使用关于这些适应症和其他已知与AD相关的适应症的信息作为“AD相关参数”。AD相关参数可以包括定性或定量信息。定量信息的例子是一种或多种尺度(例如,蛋白质浓度或断层摄影图)的数值。定性信息可以包括评估,例如,医师的评论或二元(“是”/“否”)等。AD相关参数包括显示受试者未诊断患有AD或没有特定AD适应症的信息,例如,非AD典型的认知试验结果或与AD不相关的APOE遗传多态性。

[0320] 渐进认知损害是AD的标志。这种损害可以表现为记忆、判断、决策、物理环境中定向和语言的下降(Nussbaum和Ellis, New Eng J. Med. 348 (14):1356-1364 (2003))。排除其他形式的痴呆可以辅助作出AD诊断。神经元死亡导致AD患者中进展性脑萎缩。成像技术(例如,磁共振成像或计算机辅助断层摄影术)可以用来检测脑中的AD相关损害和/或脑萎

缩。

[0321] AD患者可以显示出因疾病的病理学所致的生物化学异常结果。例如,AD患者的脑脊液中tau蛋白的水平升高(Andreassen,N.等人,Arch Neurol.58:349-350(2001))。

[0322] 淀粉样蛋白 β 42(A,B42)肽的水平可以在AD患者的CSF中降低。Ap42的水平可以在AD患者的血浆中增加(Ertekei-Taner,N.等人,Science 290:2303-2304(2000))。检测来自受试者的样品中生物化学异常的技术包括本领域已知的细胞法、免疫法和其他生物学方法。关于一般指导,参见,例如,下述文献中描述的技术Sambrook和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.(2001); Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.(1989)),(Harrow,E.和Lane,D.(1988) Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY)及其更新版本。

[0323] 例如,抗体、其他免疫球蛋白和其他特异性结合配体可以用来检测与AD相关的生物分子,例如,蛋白质或其他抗原。例如,一种或多种特异性抗体可以用来探测样品。多种样式是可能的,例如,ELISA、基于荧光的测定法、蛋白质印迹法和蛋白质阵列。本领域中描述了产生多肽阵列的方法,例如,在De Wildt等人(2000).Nature Biotech.18,989-994; Lucking等人(1999).Anal.Biochem.270,103-111;Ge,H.(2000).Nucleic Acids Res.28,第3版,I-VII;MacBeath,G.和Schreiber,S.L.(2000).Science 289,1760至1763;和W099/51773A1中描述。

[0324] 在一个测定法中,例如使用AD的非人类动物模型(例如,小鼠模型),以评价多肽或治疗性方案。例如,美国专利号6,509,515描述了这样一种模型动物,所述动物天然地能够用于学习和记忆测试。该动物在脑组织中以这样的水平表达淀粉样蛋白前体蛋白(APP)序列,从而动物在出生后的短时间内、通常在出生后的一年内、优选地在出生后的2至6个月内形成进展性神经系统病症。将APP蛋白序列在一个胚阶段、优选地在单细胞阶段或受精卵母细胞阶段并且通常不晚于约8细胞阶段引入动物或祖先动物。接合子或胚胎随后在作为养育雌性的假孕动物中发育直至出生。将淀粉样蛋白前体蛋白基因引入动物胚胎,从而以这样的状态并入染色体,所述状态导致脑皮质-边缘区(在进展性神经系统疾病状态如AD中受重大影响的脑区域)中淀粉样蛋白前体蛋白的超量内源表达和进展性神经系统疾病的形成。在神经系统疾病的受累转基因动物模型中具有神经胶质增生和临床表现。神经疾病的进展性方面以探索行为和/或移动行为削弱和脱氧葡萄糖摄取/利用削弱和脑皮质-边缘区中肥大性神经胶质增生为特征。另外,观察到与一些衰老动物中所见那些相似的变化。US 5,387,742;5,877,399;6,358,752;和6,187,992中还描述了其他动物模型。

[0325] 帕金森病

[0326] 提供向个体施用Klotho多肽或融合多肽的本公开方法或用途可以用来治疗帕金森病。帕金森病包括黑质中的多巴胺能神经元神经变性,导致调节运动功能的黑质纹状体多巴胺系统变性。这种病变转而导致运动功能障碍(参见,例如,和Lotharius等人,Nat.Rev.Neurosci.,3:932-42(2002))。运动症状的例子包括:运动不能、驼背姿势、步态困难、姿势不稳、僵直性昏厥、肌肉僵硬和颤栗。非运动症状的例子包括:抑郁、缺少动机、被动、痴呆和胃肠道功能障碍(参见,例如,Fahn,Ann.N.Y.Acad.Sci.,991:1-14(2003)和

Pfeiffer, *Lancet Neurol.*, 2:107-16 (2003))。已经在0.5%至1%的65岁至69岁的人中和1%至3%的80岁和更老的人当中观察到帕金森病(参见,例如, Nussbaum等人, *N.Engl. J. Med.*, 348:1356-64 (2003))。帕金森病的分子标记包括芳族L-氨基酸脱羧酶(AADC)减少(参见,例如, 美国申请号20020172664);和黑质纹状体神经元中多巴胺含量损失(参见,例如, Fahn, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 991:1-14 (2003) 和 Lotharius等人, *Nat. Rev. Neurosci.*, 3:932-42 (2002))。在一些家族性病例中, PD与编码 α -突触核蛋白和 parkin (一种E3泛素连接酶) 蛋白的单基因中的突变相关(例如, Riess等人, *J. Neurol.* 250 Suppl 1: I3-10 (2003) 和 Nussbaum等人, *N. Engl. J. Med.*, 348:1356-64 (2003))。神经元特异性C端泛素水解酶基因中的错义突变也与帕金森病相关(例如, Nussbaum等人, *N. Engl. J. Med.*, 348:1356-64 (2003))。

[0327] 亨廷顿病

[0328] 提供向个体施用Klotho多肽或融合多肽的本公开方法或用途可以用来治疗廷顿病。用于评价Klotho融合多肽对亨廷顿病的功效和/或确定其有效量的方法包括基于生物的测定法,例如,使用哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、灵长类、或一些其他非人类)或其他动物(例如,非洲爪蟾、斑马鱼或无脊椎动物如蝇或线虫)的测定法。亨廷顿病的多种动物模型系统是可获得。参见,例如, Brouillet, *Functional Neurology* 15 (4):239-251 (2000); Ona等人 *Nature* 399:263-267 (1999), Bates等人 *Hum Mol Genet.* 6 (10):1633-7 (1997); Hansson等人 *J. of Neurochemistry* 78:694-703; 和 Rubinsztein, D.C., *Trends in Genetics*, Vol. 15, No. 4, 第202-209页(关于HD的多种动物模型和非人类模型的综述)。

[0329] 这种动物模型的一个例子是作为R6/2系的转基因小鼠品系(Mangiarini等人, *Cell* 87:493-506 (1996))。R6/2小鼠是亨廷顿病转基因小鼠,其过量表达人HD基因的外显子1(受内源启动子控制)。R6/2人HD基因的外显子1具有扩充的CAG/多谷氨酰胺重复序列长度(平均150个CAG重复序列)。这些小鼠形成具有许多人亨廷顿病特征的进展性、最终致命的神经系统疾病。在R6/2小鼠中观察到部分由亨廷顿蛋白N端部分(由HD外显子1编码)构成的异常聚集物,在细胞的细胞质和胞核内均为45(Davies等人, *Cell* 90:537-548 (1997))。例如,转基因动物中的人亨廷顿蛋白由包含至少55个CAG重复序列和更优选地约150个CAG重复序列的基因编码。这些转基因动物可以形成亨廷顿病样表型。

[0330] 这些转基因小鼠以增重下降、寿命减少和运动损害为特征,所述运动损害以出生后8周至10周异常步态、静止性震颤、后肢扣紧和多动为特征(例如对于R6/2品系;参见 Mangiarini等人, *Cell* 87:493-506 (1996))。表型进行性加重成运动低下。这些转基因小鼠的脑还展示神经化学和组织学异常,如神经递质受体(谷氨酸、多巴胺受体)变化、N-乙酰天冬氨酸(神经元完整性的标志物)的浓度降低以及纹状体和脑尺寸减小。因此,评价可以包括评估与神经递质水平、神经递质受体水平、脑尺寸和纹状体尺寸相关的参数。此外,含有转基因的部分或全长人亨廷顿蛋白的异常聚集物存在于这些动物(例如, R6/2转基因小鼠品系)的脑组织中。参见,例如, Mangiarini等人 *Cell* 87:493-506 (1996); Davies等人 *Cell* 90:537-548 (1997); Brouillet, *Functional Neurology* 15 (4):239-251 (2000) 和 Cha等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6480-6485 (1998)。

[0331] 为了测试本申请中所述的测试多肽或已知多肽在动物模型中的作用,将不同浓度的测试多肽施用至转基因动物,例如通过注射测试多肽至动物的循环中。可以在动物中评

价亨廷顿病样症状。随后监测(例如,如上文对小鼠模型所述的)亨廷顿病样症状的进展,以确定测试多肽处理是否导致症状减少或延迟。在另一个测定法中,监测亨廷顿蛋白聚集物在这些动物中的解聚情况。随后可以处死动物并获得脑切片。随后对脑切片分析含有转基因人亨廷顿蛋白、其部分、或包含人亨廷顿蛋白的融合蛋白或其部分的聚集物的存在。这项分析可以例如包括:用抗亨廷顿蛋白抗体染色脑组织切片并且添加与FITC缀合的识别抗亨廷顿病抗体的第二抗体(例如,抗亨廷顿蛋白抗体是小鼠抗人抗体并且第二抗体对人抗体特异)并且通过荧光显微术,使蛋白质聚集物可视化。

[0332] 多种方法可用于评价和/或监测亨廷顿病。已知本疾病的多种临床症状和指标。亨廷顿病造成运动障碍、精神障碍和认知变化。这些症状的程度、发作年龄和表现可以变动。运动障碍可以包括快速、随机、舞蹈样运动,称作舞蹈病。

[0333] 运动评估的例子包括:眼追踪、扫视开始、扫视速度、构音困难、吐舌、敲指能力、俯卧/仰卧、拳手掌顺序、臂僵硬、运动迟缓、最大肌张力障碍(躯干、上肢和下肢)、最大舞蹈症(例如,躯干、面、上肢和下肢)、步态、交叉步伐和后退步态。示例治疗可以例如,在一年时间范围内引起总运动评分4(TMS-4)(UHDRS的子量表)的变化。

[0334] 癌症

[0335] 提供向个体施用Klotho多肽或融合多肽的本公开方法或用途可以用来治疗癌症。癌症包括由不适宜高水平的细胞分裂、不适宜低水平的凋亡或这两者引起或导致的任何疾病。癌症的例子包括但不限于白血病(例如,急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病、急性成髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性髓-单核细胞白血病、急性单核细胞性白血病、急性红细胞白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金病、非霍奇金病)、Waldenstrom巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,如肉瘤和癌(例如,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、Ewing肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilms肿瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤(oligodendroglioma)、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。也认定淋巴增生性疾病是增生性疾病。

[0336] 实施方案

[0337] 在一个实施方案中,本公开涉及一种包含融合多肽的组合物,所述融合多肽按N端至C端顺序包含:(a) α sKlotho,其中已经从C端缺失约20个氨基酸,任选地还具有V563和/或K795处的突变;(b) 接头;和(c) FGF23,任选地具有R179、C206和/或C244处的突变。

[0338] 在一个实施方案中,(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有V563处的突变。

[0339] 在一个实施方案中,(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有K795处的突变。

[0340] 在一个实施方案中,(a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有V563和K795处的突变。

[0341] 在一个实施方案中, (a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO: 77的序列。

[0342] 在一个实施方案中, (a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO: 78的序列。

[0343] 在一个实施方案中, (c) FGF23具有R179处的突变。

[0344] 在一个实施方案中, (c) FGF23具有C206处的突变。

[0345] 在一个实施方案中, (c) FGF23具有C244处的突变。

[0346] 在一个实施方案中, (c) FGF23具有R179处的突变和C206或C244处的突变。

[0347] 在一个实施方案中, (c) FGF23具有R179、C206和C244处的突变。

[0348] 在一个实施方案中, (c) FGF23具有
YPNASPLLGSSWGGLIHLTYTATARNSYHLQIHKNHVDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVTIGVMSRRYLCMDFRGN
IFGSHYFDPENCRFQHQTLNGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPPPYSQLSRRNEIPLIHFNTPIPRRHT
QSAEDDSERDPLNLVKPRARMTPAPASCSQELPSAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNTHAGGTGPEGCRPFAKFI的序
列 (SEQ ID NO:80的部分)。

[0349] 在一个实施方案中, (a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO: 77或78的序列。

[0350] 在一个实施方案中, (a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO: 77的序列。

[0351] 在一个实施方案中, (a) 已经从C端缺失约20个氨基酸的 α sKlotho具有SEQ ID NO: 78的序列。

[0352] 在一个实施方案中, 接头是多肽接头。

[0353] 在一个实施方案中, 多肽接头包含了包含一个或多个拷贝接头的氨基酸序列, 所述接头选自: SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18。

[0354] 在一个实施方案中, 融合多肽还包含信号肽。

[0355] 在一个实施方案中, 融合多肽包含SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82的氨基酸序列。

[0356] 在一个实施方案中, 组合物还包含可药用载体。

[0357] 在一个实施方案中, 本公开涉及核酸, 所述核酸包含编码本文所述的任何实施方案的融合多肽的序列。

[0358] 在一个实施方案中, 宿主细胞包含本文所述的任何实施方案的核酸。

[0359] 在一个实施方案中, 载体包含本文所述的任何实施方案的核酸。

[0360] 在一个实施方案中, 本公开涉及一种治疗或预防FGF23相关疾病的方法, 所述方法包括步骤: 向有需求的个体施用治疗有效量的包含融合多肽的组合物, 所述融合多肽按N端至C端顺序包含: (a) α sKlotho, 其中已经从C端缺失约20个氨基酸, 任选地还具有V563和/或K795处的突变; (b) 接头; 和 (c) FGF23, 任选地具有R179、C206和/或C244处的突变。

[0361] 在一个实施方案中, 本公开涉及一种治疗或预防FGF23相关疾病的方法, 所述方法包括步骤: 向有需求的个体施用治疗有效量的本文所述任何实施方案的组合物。

[0362] 在一个实施方案中, FGF23相关疾病选自: 年龄相关的疾病、代谢疾病、高磷酸盐血症、钙质沉着症、慢性肾脏疾病、慢性肾衰竭、癌症、乳腺癌和肌肉萎缩。

[0363] 在一个实施方案中,年龄相关的疾病选自肌少症、皮肤萎缩、肌肉耗损、脑萎缩、动脉粥样硬化、动脉硬化、肺气肿、骨质疏松症、骨关节炎、免疫不全、高血压、痴呆、亨廷顿病、阿尔茨海默病、白内障、年龄相关的黄斑变性、前列腺癌、卒中、预期寿命削减、记忆损失、皱纹、肾功能受损和年龄相关的听力损失。

[0364] 在一个实施方案中,代谢疾病选自II型糖尿病、代谢综合征、高血糖症和肥胖症。

[0365] 本文中引用的全部专利、专利申请和公开的参考文献因而通过引用的方式完整并入。尽管已经参考本公开的实施方案具体地显示并描述了本公开,本领域技术人员将理解,可以在其中进行形式和细节方面的多种改变而不脱离由所附权利要求书涵盖的本公开的范围。

5. 实施例

[0366] 实施例1.Klotho融合多肽的表达和纯化

[0367] Klotho融合多肽的表达

[0368] 通过用表达载体瞬时转染HEK293T细胞产生本公开的多肽,所述表达载体编码具有 α Klotho的胞外结构域和FGF23 (R179Q) 变体的Klotho融合多肽。通过瞬时转染Klotho、FGF23和Klotho-FGF23 (R179Q) 融合蛋白的相应表达质粒,产生含有已表达多肽的条件培养基。使用脂质转染胺2000 (Invitrogen, 目录号11668-019) 在6孔平板中进行转染。转染后五小时,将转染混合物更换为3ml DMEM加1%FBS。在添加3ml DMEM加1%FBS后72小时,收集条件培养基。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离来自多种瞬时转染的HEK293T细胞的条件培养基的样品,并通过蛋白质印迹法 (图3A) 或考马斯蓝染色法分析 (图3B)。

[0369] 对多种样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (泳道1, 对照;泳道2, FGF23;泳道3, sKlotho;泳道4-6, sKlotho-FGF23)。考马斯蓝染色揭示了一个在泳道1-3中不存在的高分子量 >180 kDa条带的表达 (图3B, 右侧箭头所示), 其中所述泳道1-3中含有未用编码Klotho融合多肽的载体转染的样品。通过蛋白质印迹法评价分泌入培养基的Klotho融合多肽的性质 (图3A)。使用抗FGF23大鼠单克隆IgG2A (R&D Systems, 目录号MAB26291) 作为蛋白质印迹法检测Klotho融合多肽的第一抗体。蛋白质印迹法确认考马斯染色的凝胶中观察到的额外条带是Klotho融合多肽。蛋白质印迹法确认Klotho融合多肽具有Klotho融合多肽的预期分子量。这项分析显示了Klotho-FGF23 (R179Q) 融合蛋白表达。

[0370] Klotho融合多肽的纯化

[0371] 从条件培养基纯化本公开的多肽,所述条件培养基来自表达载体瞬时转染的HEK293T细胞的培养物,所述表达载体编码具有 α Klotho的胞外结构域和FGF23 R179Q变体的Klotho融合多肽。为了产生条件培养基,将编码sKlotho-FGF23-6xHis的表达载体 (18ml OptiMEM 1 (GIBCO, 目录号11058) 与18ml 2 μ g/ml聚乙烯亚胺 (PEI) 的混合物中的500 μ g DNA) 转染入表达培养基中悬浮生长的HEK293细胞 (Freestyle 293表达培养基 (GIBCO, 目录号12338) 中的464ml HEK293T细胞,以 10^6 个细胞/ml悬浮)。在转染后,允许培养物生长 (120小时;37 $^{\circ}$ C在5%CO₂培养箱中;按125转/分钟振摇)。在温育结束时,通过离心收获条件培养基 (1000转/分钟,五分钟)。随后施加条件培养基至镍-琼脂糖柱。sKlotho-FGF23-6xHis与柱紧密结合并用50mM咪唑洗脱。随后在PBS中透析所得到的纯化材料以移除咪唑。通过SDS-PAGE分离纯化的sKlotho-FGF23-6xHis的样品 (泳道1, 纯化的sKlotho-FGF23-6xHis;泳道

2,分子量标记)并且通过考马斯蓝染色法分析(图3C)。染色的SDS-PAGE凝胶证实纯化的sKlotho-FGF23-6xHis具有预期分子量。不能在加载已纯化材料的泳道中检测全长sKlotho-FGF23-6xHis之外的蛋白质相对应的条带也显示sKlotho-FGF23-6xHis是纯化的。

[0372] 实施例2.评估Klotho融合多肽的活性的体外测定法。

[0373] Egr-1萤光素酶

[0374] 在Egr-1萤光素酶报道分子测定法中测试表达的αKlotho融合多肽的生物学活性。Klotho融合多肽与FGF23受体的结合导致Egr-1的下游激活及受Egr-1启动子调节的萤光素酶报道分子表达。基于Urakawa等人(Nature, 2006, Vol 444, 770-774)所报道,构建Egr-1-萤光素酶报道基因。将接种在48孔聚-D-赖氨酸平板中的HEK293T细胞用Egr-1-萤光素酶报道基因连同转染归一化报道基因(海肾萤光素酶)一并转染。转染Egr-1萤光素酶报道基因后五小时,将转染混合物更换为3ml DMEM加1%FBS。在添加3ml DMEM加1%FBS后72小时,收集条件培养基。五小时后,将转染混合物更换为待测试活性的样品。在初步实验中,在Egr-1-萤光素酶报道分子测定法中,在20μg/ml肝素(Sigma,目录号H8537;溶解于DMEM中作为2mg/ml母液)存在或不存在下测试50%条件培养基(仅培养基或含有Klotho、FGF23、Klotho和FGF23、以及Klotho-FGF23(R179Q)融合蛋白)和含1%FBS的50%DMEM(图4)。进一步的实验使用确定量的纯化多肽(图5A和图5B)。20小时后在被动裂解缓冲液(Promega,目录号E194A)中裂解细胞并使用Dual-Glo萤光素酶测定系统(Promega,目录号E2940)测定萤光素酶活性。

[0375] 在初步实验中,于未分级的条件培养基中展示了Klotho融合多肽活性。使用Egr-1-萤光素酶报道基因(图4),这些实验将萤光素酶报道分子表达的倍数变化定量。含有FGF23和Klotho蛋白胞外结构域的组组合的条件培养基激活Egr-1-萤光素酶,而仅含有FGF23的条件培养基或仅含有Klotho胞外结构域的条件培养基不激活Egr-1-萤光素酶。与含有单一FGF23或Klotho的条件培养基相反,含有融合蛋白sKlotho-FGF23(R179Q)的条件培养基激活Egr-1-萤光素酶报道基因。在这些实验中,含有融合蛋白sKlotho-FGF23(R179Q)的条件培养基比含有FGF23和Klotho组组合的条件培养基显著更好地激活Egr-1-萤光素酶报道基因。在肝素存在下,含有融合蛋白sKlotho-FGF23(R179Q)的条件培养基和含有FGF23和Klotho组组合的条件培养基显著增强诱导作用。表1列出了Egr-1-萤光素酶报道分子测定法中,条件培养基中多种FGF-Klotho融合多肽的相对表达和与多种FGF-Klotho融合多肽相对应的未分级的条件培养基的相对活性。

[0376] 表1.sKlotho-FGF23融合变体的表达和活性

[0377]

	sKlotho-FGF23 融合构建体	表达	Egr-1-luc 报道基因中的活性
1	sKlotho-FGF23	良好	是
2	IgG sp-sKlotho-FGF23	良好	是
3	sKL-D1-FGF23	良好	否

[0378]

4	sKL-D2-FGF23	否	n.a.
5	s(KL-D1)2-FGF23	良好	否
6	sKL-D1/D2-FGF23	否	n.a.
7	ssKlotho(Δ N-26)-FGF23	不良	无*
8	sKLD1-D2(Δ 692-965)-FGF23	不良	无*
9	sKL-D1-D2(Δ 507-798)-FGF23	不良	无*
10	FGF23-sKlotho	不良	无*

[0379] *活性的缺失可能是低表达所致。

[0380] 还使用确定量的蛋白质进行了Egr-1萤光素酶报道分子测定法,其中使用如实施例1中所述的纯化方法从条件培养基纯化所述蛋白质。与使用含有已表达多肽的未分级的条件培养基的先前结果一致,用纯化的FGF23和sKlotho组合处理产生萤光素酶报道分子活性,但是用纯化的FGF23单独处理则不产生前述活性(图5A)。来自纯化的FGF23和sKlotho组合的萤光素酶报道分子活性进一步取决于纯化的sKlotho的剂量,并且这种作用可以因存在肝素(20 μ g/ml)而增强。可以在Egr-1-萤光素酶报道分子测定法中,在低到约1.21nM(1.2倍变化)和至少直至约19.3nM(2.4倍变化)的浓度检测到sKlotho-FGF23-6xHis融合多肽对萤光素酶活性的影响(图5B)。sKlotho-FGF23-6xHis融合多肽对萤光素酶活性的影响在肝素(20 μ g/ml)存在下显著增强。在肝素存在下,可以在低到约0.6nM(2.0倍变化)的浓度检测到sKlotho-FGF23-6xHis融合多肽对萤光素酶活性的影响。结果显示,纯化的sKlotho-FGF23-6xHis以剂量依赖性方式诱导EGR-1-luc报道基因,并且sKlotho-FGF23-6xHis处理也是如此。

[0381] 实施例3. 评估Klotho融合多肽对肌细胞影响的体外测定法

[0382] 测试表达的Klotho融合多肽对C2C12成肌细胞的生物学影响。用IGF-1、FGF2或sKlotho-FGF23处理C2C12成肌细胞导致肌管生长和信号转导蛋白磷酸化。在6孔聚-D-赖氨酸和纤连蛋白包被的平板中,将C2C12成肌细胞以40,000个细胞/孔的密度接种在生长培养基(3份DMEM和1份F12)、10%FBS、1%Glut;1%P/S;1%亚油酸;0.1%ITS[胰岛素(10mg/ml)、转铁蛋白(5.5mg/ml)和硒(5ng/ml)]中。在成肌细胞达到汇合(3天)后,将培养基更换成分化培养基(含2%马血清的DMED;1%Glut;1%P/S)。

[0383] 对于肌管直径实验,汇合后三天,将培养基换成分化培养基,将细胞在分化培养基中在地塞米松(100 μ M)不存在或存在下,用IGF-1(10nM)、FGF2(20ng/ml)或sKlotho-FGF23(20nM)处理24小时。在处理结束时,将细胞用(PBS中的5%)戊二醛固定并收集多幅荧光图像。使用Pipeline Pilot程序,测量肌管直径以确定肥大或萎缩。

[0384] 对于信号转导蛋白磷酸化,汇合后三天,将培养基换成分化培养基,将细胞用无FBS的DMEM饥饿四小时并随后用IGF-1(10nM)、FGF2(20ng/ml)或sKlotho-FGF23(20nM)在雷帕霉素(40nM)不存在或存在下处理30分钟。在蛋白酶和磷酸酶抑制剂存在下,在RIPA缓冲

液中裂解细胞。实施蛋白质印迹分析并且用如图中所示的不同抗体探测膜并在x射线胶片上显影,对所述胶片扫描。

[0385] 这项研究的结果显示,与对照相比,sKlotho-FGF23导致肌管直径增加,并且引起与IGF-1和FGF2的结果相似的C2C12肌管肥大(图5A)。此外,基于肌管直径量值,用sKlotho-FGF23、IGF-1、和FGF2处理能部分地逆转由地塞米松诱导的肌管萎缩。在地塞米松不存在或存在下,在sKlotho-FGF23和FGF2之间(通过测量肌管厚度)未观察到肌管形态方面的差异。sKlotho-FGF23、IGF-1和FGF2的营养作用是统计显著的。

[0386] 与对C2C12肌管的影响一致,在C2C12肌管中,sKlotho-FGF23融合蛋白信号传导导致p70S6K和ERK的磷酸化,但是不导致AKT或FoxO的磷酸化(图5B)。sKlotho-FGF23对信号传导的影响类似于FGF2,但是不同于IGF-1。观察到由sKlotho-FGF23所致的ERK磷酸化程度低于IGF-1或FGF2。由sKlotho-FGF23所致的p70S6K磷酸化是雷帕霉素敏感的。在涉及C2C12细胞的实验中,不需要肝素激活信号传导。这些结果显示sKlotho-FGF23融合多肽激活C2C12肌管中的信号传导。

[0387] 实施例4. 包含sKlotho、FGF23和FcLALA的融合多肽

[0388] 使用sKlotho、FGF23和修饰的抗体Fc片段,构建多种融合多肽。这些修饰的Fc分子具有改变(降低的)的FcRn结合作用并且因此具有增加的血清半寿期。它们还在身体内具有改良的生物利用率和改变的至粘膜表面和其他靶的转运。在这个实施例中,FGF23和sKlotho与FcLALA融合,这在美国专利号7,217,798和Hessel等人,2007Nature 449:101-104中描述。接头间插在这些融合多肽的多个组分之间,如Lode等人,1998Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:2475-2480中所述。将这些融合物插入构建体(例如,pCDNA3.1(Invitrogen,Carlsbad,CA)和在HEK293细胞中表达。

[0389] A.sKlotho-FGF23-FcLALA v1

[0390] 构建了包含sKlotho、接头、FGF23、另一个接头和FcLALA的融合物。下文在SEQ ID NO:46和47中展示了这个实施方案,命名为sKlotho-FGF23-FcLALA v1。

[0391] 在SEQ ID NO:46中展示了sKlotho-FGF23-FcLALA v1的核苷酸序列(其中起始ATG作为1)。

[0392] 在SEQ ID NO:47中展示了sKlotho-FGF23-FcLALA v1的氨基酸序列。

[0393] 在这个序列中,融合物的多个组分如下:

[0394] sKlotho:1-982;接头1:983-1001;FGF23:1002-1228;接头2:1229-1233;FcLALA:1234-1459。

[0395] B.sKlotho-FGF23-FcLALA v2

[0396] 构建了包含sKlotho、接头、FGF23、另一个接头和FcLALA的融合物。将这个实施方案命名为sKlotho-FGF23-FcLALA v2并且下文展示为SEQ ID NO:48和49。

[0397] 在SEQ ID NO:48中展示了sKlotho-FGF23-FcLALA v2的核苷酸序列(其中起始ATG作为1)。

[0398] 在SEQ ID NO:49中展示了sKlotho-FGF23-FcLALA v2的氨基酸序列。

[0399] 在这个序列中,融合物的多个组分如下:

[0400] sKlotho:(aa或氨基酸)1-982;接头1:983-1001;FGF23:1002-1228;接头2:1229-1233;FcLALA:1234-1450。

[0401] 如本文所述或本领域已知,可以按各种组合通过组合FGF、Klotho、修饰的Fc片段、和(任选地)接头序列构建其他融合多肽及变体和衍生物。

[0402] 实施例5. 包含FGF23和FcLALA的融合多肽。

[0403] 如美国专利号7,217,798中所述,使用FGF23和修饰的抗体Fc片段,构建多种融合多肽。这些修饰的Fc分子具有改变(降低的)的FcRn结合作用并且因此具有增加的血清半寿期。它们还在身体内具有改良的生物利用率和改变的至粘膜表面和其他靶的转运。在这个实施例中,FGF23与FcLALA融合,接头间插在这些融合多肽的多个组分之间,如Lode等人,1998Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:2475-2480中所述。将这些融合物插入构建体(例如,pcDNA3.1(Invitrogen,Carlsbad,CA))并在HEK293细胞中表达。

[0404] C.FGF23-FcLALA v1

[0405] 构建了包含FGF23、接头和FcLALA的融合物。将这个构建体命名为FGF23-FcLALA v1并且下文展示为SEQ ID NO:50和51。

[0406] 下文在SEQ ID NO:50中展示了FGF23-FcLALA v1的核苷酸序列(其中起始ATG作为1)。

[0407] 在SEQ ID NO:51中展示了FGF23(R179Q)-FcLALAv1的氨基酸序列。

[0408] 在这个序列中,融合物的多个组分如下:

[0409] FGF23:(aa)1-251;接头:252-256;FcLALA:257-482。

[0410] D.FGF23-FcLALA v2

[0411] 构建了包含FGF23-FcLALA v2(其包含FGF23和FcLALA)的融合物。

[0412] 下文在SEQ ID NO:52中展示了FGF23-FcLALA v2的核苷酸序列(其中起始ATG作为1)。

[0413] 在SEQ ID NO:53中展示了FGF23(R179Q)-FcLALAv2的氨基酸序列。

[0414] 在这个序列中,融合物的多个组分如下:

[0415] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473。

[0416] 如本文所述或本领域已知,可以按各种组合通过组合FGF序列、修饰的Fc片段和(任选地)接头构建其他融合多肽及变体和衍生物。

[0417] E. 确定Egr-1-luc报道基因由sKlotho-FGF23(R179Q)-FcLALA融合蛋白激活;Egr-1-luc报道基因由FGF23(R179Q)-FcLALA蛋白激活和FGF23(R179Q)相对于FGF23(R179Q)-FcLALAv2的药代动力学特征。

[0418] 图7显示Egr-1-luc报道基因由sKlotho-FGF23(R179Q)-FcLALA融合蛋白活化。将HEK293T细胞用Egr-1-luc报道基因瞬时转染并且与所示的条件培养基在20 μ g/ml肝素不存在或存在下温育。随后18小时后,测定萤光素酶活性。结果显示,sKlotho-FGF23-FcLALA融合蛋白诱导报道基因活性。这些诱导作用在肝素存在下显著地增强。sKF-Fcv1:sKlotho-FGF23-FcLALAv1;sKF-Fcv2:sKlotho-FGF23-FcLALAv2

[0419] 图8显示Egr-1-luc报道基因由FGF23(R179Q)-FcLALA蛋白活化。将HEK293T细胞用Egr-1-luc报道基因连同全长跨膜形式的Klotho一起瞬时转染并且与所示的30%条件培养基温育。随后18小时后,测定萤光素酶活性。结果显示,FGF23-FcLALA融合蛋白以类似于FGF23的方式诱导报道基因活性。

[0420] 图9显示FGF23(R179Q)与FGF23(R179Q)-FcLALAv2的药代动力学特征。向每组四只

小鼠按2mg/kg皮下注射FGF23 (R179Q)-6xHis或FGF23 (R179Q)-FcLALAv2。在所示的时间,采集血清样品并通过ELISA分析FGF23。血清中的FGF23 (R179Q)-FcLALA浓度在24小时时间点保持升高,而FGF23 (R179Q)-6xHis返回基础水平。这个结果表明,添加FcLALA时,FGF23 (R179Q)的体内半寿期显著改善。

[0421] 实施例6.sKlotho-FGF23融合物在地塞米松诱导的肌肉萎缩后增强肌肉生长的体内功效。

[0422] 实验数据显示,在地塞米松诱导的肌肉萎缩后,肌肉注射sKlotho-FGF23显著地增强肌肉质量的生长。在这个实验中,使用与SEQ ID NO:41的肽相应的肽。

[0423] 图10显示腓肠肌-比目鱼肌-跖肌 (GSP) 的绝对重量 (A) 和重量变化% (B),表明在地塞米松 (DEX) 诱导的肌肉萎缩后,与肌肉注射sKlotho (sKLO) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 相比,肌肉注射sKlotho-FGF23 (KLOFGF) 显著地增强肌肉质量再生长。

[0424] 将15周龄的八十只雄性C57BL/6小鼠依据体重随机分配入8个组,每组10只小鼠。四个组接受无DEX的水 (W21d),而其他四个组按2.4mg/kg/日在饮用水中接受DEX三周 (D21d)。在三周后,停止DEX处理并且立即处死一个W21d组和一个D21d组以建立由DEX处理诱导的肌肉萎缩的程度。允许剩余三个组的W21d小鼠或D21d小鼠恢复另外14天 (R14d),在此期间,它们每两天分别接受肌肉注射2x50μl PBS、sKlotho-FGF23 (KLOFGF;1.6mg/ml)、或sKlotho (sKLO;1.6mg/ml) 至右腓肠肌-比目鱼肌-跖肌肌群中。在末次肌肉注射后24小时处死小鼠并且测定肌肉重量并表示为与W21d+PBS组相比的绝对重量 (A) 或变化百分数。

[0425] 这些数据显示了sKlotho-FGF23融合物在地塞米松诱导的肌肉萎缩后增强肌肉生长的体内功效。

[0426] 实施例7.融合蛋白的FGF23部分中减少聚集、减少不利蛋白酶诱导的剪切作用和增加生产的额外突变

[0427] 研究了在sKlotho-FGF23和FGF23-FcLaLa融合多肽的FGF23部分中的几个突变。这些突变包括Q156、C206和C244 (其中编号基于FGF23氨基酸序列)。各个突变的例子包括Q156A、C206S和C244S,并且这些位点中任何位点处的突变可以与R179处的突变 (例如, R179Q) 组合。在图2的SEQ ID NO:54至68中提供了序列例子。

[0428] 认为C206和C244参与二聚化;并且Q156是由发明人鉴定为蛋白酶敏感位点的位点。通过减少聚集、减少不利的蛋白酶诱导的剪切作用并增加蛋白质从细胞产生,将这些氨基酸突变成任何其他的氨基酸增强了蛋白质的质量,且干扰FGF23活性。这是个意料之外的结果,因为这三个位置在人类、恒河猴、牛、小鼠和大鼠中找到的FGF23蛋白中保守。下文在SEQ ID NO:35、109、110、111和112之间的比较中显示了这种保守,其中Q156、C206和C244为粗体、加下划线字体。

[0429]	hFGF23	MLGARLRLWVCALCSVCSMSVLRAYPNASPLLGSWSGGLIHLYTATARN SYHLQIHKN GH
	恒河猴	MLGARLRLWVCALCSVCSMSVIRAYPNASPLLGSWSGGLIHLYTATARN SYHLQIHKN GH
	牛	MLGARLGLWVCTLSCV-----VQAYPNSSPLLGSWSGGLTHLYTATARN SYHLQIHGD GH
	小鼠	MLGTCLRLLVGVLC TVCS LG TARAY PD TS PLLGSNWGSLTHLYTATART SYHLQIH RDGH
	大鼠	MLGACLRLLVGALCTVCSLG TARAY SD TS PLLGSNWGSLTHLYTATARN SYHLQIH RDGH
	hFGF23	VDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLCMDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQT L
	恒河猴	VDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLCMDFRGNIFGSHYFNPENCRFRHW L
	牛	VDGSPQQTIVYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLCMDFTGNIFGSHHFSPESCRFRQRT L
	小鼠	VDGTPHQTIYSALMITSEDAGSVVITGAMTRRFLCMDLHGNI FGSLH FSPENCKFRQW L
	大鼠	VDGTPHQTIYSALMITSEDAGSVVIIGAMTRRFLCMDLRGNI FGSYH FSPENCRFRQW L
	hFGF23	ENG YD VYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPPPY SQ FLSRNEIPLIHFNTP I -PRRHTR
	恒河猴	ENG YD VYHSPQH H FLVSLGRAKRAFLPGMNPPPY SQ FLSRNEIPLIHFNTP R -PRRHTR
	牛	ENG YD VYHSPQH R FLVSLGRAKRAFLPGTNPPPYA Q FLSRNEIPLPHFAATARPRRHTR
	小鼠	ENG YD VYLSQKH H YLVSLGRAKRIFQPGTNPPPF SQ FLARRNEVPLLHFYTV R -PRRHTR
	大鼠	ENG YD VYLSPKH H YLVSLGRSKRIFQPGTNPPPF SQ FLARRNEVPLLHFYTAR-PRRHTR
[0430]	hFGF23	SAEDDSERDPLNVLKPRARMT PAPAS <u>CS</u> QELPSAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNT HAGGT
	恒河猴	SAEDDSERDPLNVLKPRARMT PAPAS <u>CS</u> QELPSAEDNSPVASDPLGVVRGGRVNT HAGGT
	牛	SAHDSG--DPLSVLKPRARATPVPAAC <u>CS</u> QELPSAEDSGPAASDPLGVLRGHRLDV RAGSA
	小鼠	SAEDPFERDPLNVLKPRPRATPVVPS <u>CS</u> RELPSAEEGGPAASDPLGVLRGRGDARGGAG
	大鼠	SAEDPFERDPLNVLKPRPRATPIPVSC <u>CS</u> RELPSAEEGGPAASDPLGVLRGRGDARRGAG
	hFGF23	GPEG <u>CR</u> PFPAKFI (SEQ ID NO: 35)
	恒河猴	GPEAC <u>CR</u> PFPAKFI (SEQ ID NO: 109)
	牛	GAER <u>CR</u> PFPGFA (SEQ ID NO: 110)
	小鼠	GADR <u>CR</u> PFPRFV (SEQ ID NO: 111)
	大鼠	GTDR <u>CR</u> PFPRFV (SEQ ID NO: 112)

[0431] 图11中显示这三个突变不阻止FGF23活性的事实。该图显示Egr-1-luc报道基因由FGF23 (R179Q)-FcLALA和Q156A、C206S、C244S和C206S/C244S突变体活化。

[0432] 将HEK293T细胞用EGR-1-luc报道基因连同全长跨膜形式的Klortho和所示的FGF23-FcLaLa突变体一起瞬时转染。随后18小时后,测定萤光素酶活性。结果显示,突变体C206S、C244S、C206S/C244S(三个独立克隆)和Q156A(三个独立克隆)在激活EGR-1-Luc报道基因活性方面与FGF23-FcLALA融合蛋白同等有效。

[0433] 显示突变C244和C206改变FGF23二聚化和聚集的数据示于图12中。该图显示FGF23 (R179Q)-FcLaLa的WT、Q156A、C206S、C244S和C206S/C244S突变体的蛋白质质量。通过使用FGF23抗体的蛋白质印迹法分析来自HEK293T细胞的条件培养基,所述细胞用所示的FGF23-FcLaLa表达载体瞬时转染。结果显示,C206S/C244S突变防止蛋白质二聚化并且Q156A突变减少了蛋白酶解的片段。

[0434] 因此,令人惊讶地,即便这些Q156、C206和C244残基跨物种保守,但可以在不减少FGF23活性的情况下突变它们并且可以通过减少聚集和剪切作用和通过改善产生增强蛋白

质的质量。

[0435] 实施例8. 在融合蛋白的FGF23部分中产生更多蛋白质,但降解产物更少并允许FGF23活性的额外突变

[0436] 研究了在FGF23-FcLaLa融合多肽的FGF23部分中的几个额外突变。这些突变包括Y154和S155(其中编号基于FGF23氨基酸序列)。各个突变的例子包括Y154D、Y154H、S155A、S155T、C206S和C244S,并且这些位点中任何位点处的突变可以与R179处的突变(例如,R179Q)组合。在SEQ ID NO:69至76中提供序列例子。

[0437] 图13显示FGF23(R179Q)-FcLaLa的WT(R179Q)、Y154D/C206S/C244S、Y154H/C206S/C244S、Y154N/C206S/C244S、S155A/C206S/C244S、S155T/C206S/C244S的蛋白质质量。通过使用FGF23抗体的蛋白质印迹法分析来自HEK293细胞的并温育所示时间的条件培养基,所述细胞用所示的FGF23-FcLaLa表达载体瞬时转染。结果显示,FGF23R179Q/Y154D/C206S/C244S突变体产生更多的蛋白质,但是降解产物少得多。这个实验中使用的全部FGF23变体(包括“WT”)均具有R179Q突变。

[0438] 因此,当具有R179/Y154/C206/C244处突变的FGF23与具有R179/S155/C206/C244处突变的FGF23比较时,Y154处的突变产生的降解产物比S155处的突变少得多。另外,在这种情况下,突变Y154D产生的降解产物比突变Y154H或Y154N少得多。

[0439] 图14显示Egr-1-luc报道基因由FGF23(R179Q)-FcLALA和FGF23(R179Q)-Y154D/C206S/C244S突变体活化。将HEK293T细胞用Egr-1-luc报道基因连同全长跨膜形式的Klotho一起瞬时转染。转染后五小时,添加相应的纯化的蛋白质。随后18小时后,测定萤光素酶活性。结果显示,FGF23(R179Q)-Y154D/C206S/C244S突变体保留部分(约50%)活性。“WT”表示具有R179Q突变的FGF23。

[0440] 实施例9. 从sKlotho的C端缺失约20个氨基酸降低sKlotho的活性,但是增加sKlotho-FGF23融合多肽的活性。

[0441] 从sKlotho的C端产生多种截短体。图15A和B显示各种构建体的结构。图15A显示构建sKlotho变体的策略,所述变体具有约20个、约40个、约60个、约80个、约100个、约120个、约140个、约160个、约180个、约200个、约220个、约240个、约260个、约280个、约300个、约320个、约340个、约360个、约380个、约400个、约420个、约440个、约460个、约480个氨基酸的C端缺失。使用引物P5(SEQ ID NO:83)作为5'引物。命名为C-20、C-40、C-60...C-480(SEQ ID NOs:84至107)的一系列24种引物中的任一者用来从C端截短约20个、约40个、约60个...约480个氨基酸。全部sKlotho截短体当中,仅一个具有约20个氨基酸缺失的截短体(sKlotho del c-20)有效;产生这种sKlotho截短体和FGF23的融合物,如图15B中所示。图15B显示构建sKlotho(del c-20)-FGF23融合多肽的策略。P5引物与C-20引物组合用于PCR(聚合酶链反应)中,以制备具有sKlotho截短体的片段。这个片段经限制性核酸内切酶切割并连接入编码FGF23的载体,以构建sKlotho(del c-20)-FGF23融合多肽。

[0442] 测试来自sKlotho的C端的多种截短体的活性。从C端缺失约20个氨基酸降低sKlotho的活性,但这种构建体保留某种活性。图16显示sKlotho突变体的Egr-1活性。条件培养基(CM)采集自多种Hek293细胞,所述细胞各自具有编码sKlotho截短体和FGF23的融合物的载体。仅使用来自产生有用量融合物的细胞的CM。使用的融合物:CM1:截短约20个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM7:截短约140个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM11:截短约220

个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM12:截短约240个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM13:截短约260个氨基酸(aa)的sKlotho截短体;CM23:截短约460个氨基酸(aa)的sKlotho截短体。阳性对照:来自产生sKlotho和FGF23的融合物的细胞的条件培养基[(+) CM];纯化的sKlotho和FGF23融合物[(+) 对照]。“unConc.”表示其中使用较少蛋白质的实验。阴性对照: (-) 对照。RLU,相对萤光素酶单位。这个实验显示,从C端缺失约20个氨基酸降低sKlotho的活性。

[0443] 即使从sKlotho的C端缺失约20个氨基酸降低sKlotho活性,这种缺失增加sKlotho-FGF23融合多肽的活性。图17显示,从sKlotho的C端缺失约20个氨基酸增加sKlotho-FGF23融合多肽的活性。图17A显示包含sKlotho或sKlotho Δ C-20和FGF23的各种融合物的相对量的蛋白质印迹。泳道1,sKlotho-FGF23融合物。泳道2,FGF23-sKlotho Δ C-20 (del c-20) 融合物。泳道3,sKlotho Δ C-20 (del c-20) -FGF23融合物。还显示标志物的大小。使用针对Klotho的多克隆抗体。图17B显示这些融合多肽在Egr-1-Luc测定法中的活性。

[0444] 图18显示采用纯化的蛋白质的实验,重申以下研究结果:从sKlotho的C端缺失约20个氨基酸增加sKlotho-FGF23融合多肽的活性。图18A显示蛋白质凝胶,其显示sKlotho del c-20-FGF23融合物的纯度(泳道2和3)。泳道1,标志物的大小。图18B显示使用纯化的sKlotho del c-20-FGF23融合物(sKF-T)和sKlotho-FGF23融合物(sKF)的Egr-1测定法。还显示了蛋白质的EC₅₀。在这些附图和在本说明书中,术语sKF-T、Klotho del c-20-FGF23、sKlotho del c-20-FGF23、klotho (Δ C-20) -FGF23、 α sKlotho Δ C20-FGF23等均表示这样的融合多肽,所述融合多肽以N端至C端顺序包含从C末端截短约20个氨基酸的 α sKlotho、接头和FGF23。

[0445] 图19显示包含sKlotho del (缺失) C-20和小鼠血清白蛋白的融合多肽在Egr-1测定法中具有功效。融合多肽在采用编码融合多肽的表达质粒转染的HEK293细胞中表达。

[0446] 应当指出,尽管在图17和图18中所示的实验中使用的sKlotho Δ C-20 (del c-20) -FGF23融合物据预测具有SEQ ID NO:80的氨基酸序列,但融合物的氨基酸测序显示,它具有SEQ ID NO:82的氨基酸序列,所述氨基酸序列具有通过PCR步骤非有意引入的两个突变,即,V563A和K795E。这两个突变不存在于具有野生型sKlotho序列(除缺失之外)的sKlotho Δ C-20 (del c-20) 中。

[0447] 除非另外定义,否则本文所用的技术术语和科学术语具有与熟悉本公开所属技术领域的专业人员通常所理解的同意思。

[0448] 除非另外指明,否则如技术人员将显而易见,没有详细描述的全部方法、步骤、技术和操作可以按本身已知的方式进行并且已经按本身已知的方式进行。例如再次参考本文中提到的标准手册和一般背景技术并参考其中所引用的其他参考文献。

[0449] 对本发明的权利要求是非限制的并且在下文提供。

[0450] 虽然已经在本文中详细公开了具体实施方案和权利要求,但是这仅出于说明目的以举例方式进行,并且不意在限制所附权利要求书的范围或任何相应未来应用的权利要求的主题的范围。具体而言,发明人构思了可以对本公开作出各种替换、改变和修改而不脱离如权利要求书所定义的本公开的精神和范围。认为选择核酸起始材料或目的克隆是知晓本文所述的实施方案的本领域技术人员的例行工作。其他方面、优点和修改视为处于以下权利要求的范围内。对稍后提交的相应申请中权利要求书范围的重新起草可以归因于各个国

家的专利法的限制并且不应当解读为放弃权利要求的主题。

[0451] 序列表

[0452] 人Klotho核酸序列(NM_004795) (SEQ ID NO:1)

[0453] 蛋白质编码区:9-3047

[0454]

```
1  cgcgccagcat gccgcgcagc gcccgcgcgc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
61  cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
121  gcgcgcgcgc ctgcgcgcgc ttgcgcgcgc ctgcgcgcgc cggcgcgcgc ggcgcgcgcgc
181  aggcgcgcgc cgcgcgcgcgc ttgcgcgcgc cgcgcgcgcgc cggcgcgcgc cgcgcgcgcgc
241  gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc aaggcgcgcgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
301  tggcgcgcgc ggcgcgcgcgc cggcgcgcgc gtgcgcgcgc ggcgcgcgcgc tggcgcgcgc
361  aggcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
421  cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc actgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
481  cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc aggcgcgcgc ctgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
541  aggcgcgcgc ggcgcgcgcgc gtgcgcgcgc tggcgcgcgc gtgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
601  aggcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
661  attgcgcgcgc ggcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc caagtcgcgcgc atgcgcgcgc
721  aagtcgcgcgc cgcgcgcgcgc tggcgcgcgc aggcgcgcgc ggcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
781  ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc tacgcgcgcgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
841  tgcgcgcgcgc ctgcgcgcgc tgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc aggcgcgcgc ggcgcgcgcgc
901  taagtcgcgcgc ctgcgcgcgc cgcgcgcgcgc tggcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
961  aatgcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc attgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
1021  cgcgcgcgcgc gaagtcgcgcgc cgcgcgcgcgc ttgcgcgcgc tgcgcgcgcgc tgcgcgcgcgc
1081  agtcgcgcgcgc aggcgcgcgc ggcgcgcgcgc ctgcgcgcgc tggcgcgcgc tggcgcgcgc
1141  aatgcgcgcgc cgcgcgcgcgc aagtcgcgcgc aatgcgcgcgc tgcgcgcgcgc aggcgcgcgc
1201  ttgcgcgcgcgc tggcgcgcgc ttgcgcgcgc ctgcgcgcgc tgcgcgcgcgc aatgcgcgcgc
1261  ttgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc aggcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc aatgcgcgcgc
1321  tgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc atgcgcgcgc aggcgcgcgc tggcgcgcgc tgcgcgcgcgc
1381  ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
1441  atgcgcgcgcgc tgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
1501  aagtcgcgcgcgc aggcgcgcgc ggcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc aatgcgcgcgc ctgcgcgcgc
1561  cattgcgcgcgc tggcgcgcgc tggcgcgcgc ttgcgcgcgc cattgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
1621  tgcgcgcgcgc tggcgcgcgc aatgcgcgcgc tggcgcgcgc ccgcgcgcgc aaaagtcgcgcgc
1681  tgcgcgcgcgc tggcgcgcgc accgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ctgcgcgcgc ttgcgcgcgcgc
1741  tgcgcgcgcgc gatgcgcgcgc ctgcgcgcgc tggcgcgcgc acgcgcgcgc ttgcgcgcgcgc
1801  actgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ctgcgcgcgc aggcgcgcgc gaagtcgcgcgc atgcgcgcgcgc
1861  actgcgcgcgcgc catgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
1921  ggcgcgcgcgc gcgcgcgcgc caagtcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc
1981  agaagtcgcgcgc cgcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc aggcgcgcgc actgcgcgcgc caagtcgcgcgc
```


[0455]

```

2041 gccatcacgt caagcttttg ataacgatga atgagccgta tacaaggaat atgacataca
2101 gtgctggcca daacettctg aaggcccatt ccoctggett gcatgtgtac aatgaaaagt
2161 ttaggcattg tcagaatggg aaaatatcca tagcettgca ggctgattgg atagaacctg
2221 cctgcccctt ctcccaaaaag gacaaaagag tggccgagag agttttggaa tttgacattg
2281 gctggctggc tgagcccatt ttcggctctg gagattatcc atgggtgatg agggactggc
2341 tgaaccaaag aaacaatttt cttcttcctt atttcaactg agatgaaaaa aagctaattc
2401 agggtaacct tgaacttttg gctttaagcc attataccac catccttgta gactcagaaa
2461 aagaagatcc aataaaaatac aatgattacc tagaagtgca agaatgacc gacatcacgt
2521 ggctcaactc ccccagtcag gtggcggtag tgccctgggg gttgogcaaa gtgctgaact
2581 ggetgaagtt caagtaacga gacctcccca tgtacataat atccaacgga atcgatgacg
2641 ggctgcatgc tgaggacgac cagctgaggg tgtattatat gcagaattac ataaacgaag
2701 ctctcaaaag ccacatactg gatggtatca atctttgcgg atactttgct tattcgttta
2761 acgacccgac agctccgagg tttggcctct atcgttatgc tgcagatcag tttgagccca
2821 aggcattccat gaaacattac aggaaaatta ttgacagcaa tggtttcccg ggcccagaaa
2881 ctctggaaaag attttgtcca gaagaattca cctgtgtgac tgagtgcagt ttttttcaca
2941 cccgaaaagtc tttactggct ttcatagett ttctattttt tgcttctatt atttctctct
3001 ccttatattt ttaactactg aagaaaggca gaagaagtta caaatagttc tgaacatttt
3061 tctattcatt cattttgaaa taattatgca gacacatcag ctgttaacca tttgcacctc
3121 taagtgttgt gaaactgtaa atttcataca tttgacttet agaaaacatt tttgtggctt
3181 atgacagagg ttttgaaatg ggcatagggt atcgtaaaat attgaataat gcgaatagtg
3241 cctgaatttg ttctcttttt gggtgattaa aaaactgaca ggcactataa tttctgtaac
3301 acactaaca aagcatgaaa aataggaacc acaccaatgc aacatttttg agaaaatttg
3361 aatgacaaga ttagggaatat tttctctgac acccacttct aaattttaatg tttttctgga
3421 agtagtaatt gcaagagttc gaatagaaag ttatgtacca agtaaccatt tctcagctgc
3481 cataataatg cctagtggct tcccctctgt caaatctagt ttctatgga aaagaagatg
3541 gcagatacag gagagacgac agagggctct aggcctggaat gtctctttcg aaagcaatgc
3601 ttctatcaaa tactagtatt aatttatgta tctggttaat gacatacttg gagagcaaat
3661 tatggaaaatg tgtattttat atgatttttg aggtcctgtc taaacctgtg gtccctgagg
3721 gatctgtctc actggcatct tggtgagggc cttgcacata ggaaactttt gataagtatc
3781 tgcggaaaaa caaacatgaa tctgtgata ttgggctctt caggaagcat aaagcaattg
3841 tgaaatacag tataccgcag tggctctagg tggaggaaaag gaggaaaaag tgcttattat
3901 gtgcaacatt atgattaatc tgattataca ccatttttga gcagatcttg gaatgaatga
3961 catgaccttt cctagagaa taaggatgaa ataactactc attctatgaa cagtgcact
4021 actttctatt ctttagctgt actgtaattt ctttgagttg atagttttac aaattcttaa
4081 taggttcaaa agcaatctgg tctgaataac actggatttg tttctgtgat ctctgaggtc
4141 tattttatgt ttttgctgct actctgtgag aagtagcttt gaactagttt tactttgaac
4201 tttcacgctg aaacatgcta gtgatatcta gaaagggcta attaggtctc atcctttaat
4261 gccccttaaa taagtcttgc tgattttcag acagggaagt ctctctatta cactggagct
4321 gttttataga taagtcaata ttgtatcagg caagataaac caatgtcata acaggcattg
4381 ccaacctcac tgacacaggg tcatagtgtg taataatata ctgtactata taatatatca
4441 tcttttagagg tatgattttt tcatgaaaga taagcttttg gtaattattc ttttaaagtg
4501 gacttattaa aattggatgc tagagaatca agtttatttt atgtatatat ttttctgatt
4561 ataagagtaa tatatgttca ttgtaaaaat ttttaaaaca cagaaactat atgcaaagaa
4621 aaaataaaaa ttatctataa tctcagaacc cagaaatagc cactattaac atttctacg
4681 tattttattt tacatagatc atattgtata tagttagtat ctttattaat ttttattatg
4741 aaactttctt ttgtcattat tagtcttcaa aagcatgatt tttaatagtt gttgagtatt
4801 ccaccacagg aatgtatcac aacttaaccg ttcccgtttg ttagactagt ttcttattaa
4861 tgttgatgaa tgttgtttaa aaataatttt gttgctacat ttactttaat ttccttgact
4921 gtaaagagaa gtaattttgc tcttgataa agtattatat taataataaa tctgcctgca
4981 actttttgcc ttctttcata atc

```

[0456] Klotho氨基酸序列(NP_004786) (SEQ ID NO:2)

```

1 MPASAPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA PEAAGLFQGT
61 FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGASIW DTFTHHPLAP PGDSRNASLP LGAPSPLQPA
121 TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS ISWARVLPNG SAGVFNREGL RYRRLLERL
181 RELGVQPVVT LYHWDLPQRL QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP
241 YVVAWHGYAT GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGVFAKP VFIDGDYPES MKNNLSILP DFTSEKKFI
361 KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW IDLEFNHPQI FIVENGWFFS
421 GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD

```

[0457]

481 FLSQDKMLLP KSSALFYQKL IEKNGEPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ
541 FTDLNVYLWD VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL LAROGAWENP
661 YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG HNLLKAHALA WHVYNEKFRH
[0458] 721 AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ
781 RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN
841 SPSQVAVVPW GLRKVLNWLK FKYGDLPYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS NGFPGPETLE
961 RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLLAFIAFLF FASIISLSLI FYYSKKGRRS YK

[0459] β -Klotho核酸序列(NM_175737) (SEQ ID NO:3)

[0460] 蛋白质编码区:98-3232

[0461]

```
1 atcctcagtc tcccagttca agctaatacat tgacagagct ttacaatacac aagctttttac
61 tgaagcttttg ataagacagt ccagcagttg gtggcaaatg aagccaggtc gtgcggcagg
121 atctccaggg aatgaatgga ttttcttcag cactgatgaa ataaccacac gctataggaa
181 tacaatgtcc aaocgggggat tgcaaaagatc tgtcatcctg tcagcactta ttctgctacg
241 agctgttact ggattctctg gagatggaag agctatatgg tctaaaaate ctaattttac
301 tccggtaaat gaaagtcago tgtttctcta tgacactttc cctaaaaact ttttctgggg
361 tattgggaact ggagcattgc aagtgggaag gagttggaag aaggatggaa aaggaccttc
421 tatatgggat catttcatcc acacacacct taaaaatgtc agcagcacga atggttccag
481 tgacagttat atttttctgg aaaaagactt atcagccctg gattttatag gagtttcttt
541 ttatcaatth tcaatthcct ggccaaggct tttcccccgat ggaatagtaa cagttgccaa
601 cgcaaaaagg ctgcagtact acagtactct tctggacgct ctagtgctta gaaacattga
661 acctatagtt actttataacc actgggattt gcctttggca ctacaagaaa aatatggggg
721 gtggaaaaat gataccataa tagatatctt caatgactat gccacatact gtttccagat
781 gtttgggggac cgtgtcaaat attggattac aattcacaac ccatacttag tggcttggca
841 tgggtatggg acaggtatgc atgcccctgg agagaaggga aatttagcag ctgtctacac
901 tgtggggacac aacttgatca aggcctactc gaaagtttgg cataactaca acacacattt
961 cggcccacat cagaagggtt gggtatcgat caggttggga tctcattgga tcgagccaaa
1021 cgggtcggaa aacacgatgg atatattcaa atgtcaacaa tccatggttt ctgtgcttgg
1081 atggttttgc aacctatcc atggggatgg cgactatcca gaggggatga gaaagaagtt
1141 gttctccgtt ctacccattt tctctgaagc agagaagcat gagatgagag gcacagctga
1201 tttcttttgc ttttcttttg gaeccaacaa cttcaagccc ctaaacacca tggctaaaaat
1261 gggacaaaaat gtttcaacta atttaagaga agcgtgaac tggattaaac tgggaatacaa
1321 caacctctga atcttgattg ctgagaatgg ctgggtcaca gacagtcgtg tgaaaacaga
1381 agacaccacg gccatctaca tgatgaagaa tttcctcagc caggtgcttc aagcaataag
1441 gttagatgaa atacgagtgt ttggttatac tgccctggtc ctctggatg gctttgaatg
1501 gcaggatgct tacaccatcc gccgaggatt attttatgtg gattttaaca gtaaacagaa
1561 agagcggaaa cctaagtctt cagcacacta ctacaaacag atcatacagag aaaatggttt
1621 ttcttttaaaa gagtccacgc cagatgtgca gggccagttt ccctgtgact tctcctgggg
1681 tgtcaactgaa tctgttctta agcccgagtc tgtggcttcg tccccacagt tcagcgatcc
1741 tcatctgtac gtgtggaacg ccaactggca cagactgttg caccgagtgg aaggggtgag
1801 gctgaaaaaca cgacccgctc aatgcacaga ttttgtaaac atcaaaaaaac aacttgagat
1861 gttggcaaga atgaaagtca cccactaccg gtttgctctg gattgggctt cggctccttc
1921 cactggcaac ctgtccgagg tgaaccgaca ggccctgagg tactacaggt gcgtggtcag
1981 tgaggggctg aagcttggca tctcccgcat ggtcacctg tattatccga cccacgocca
```

[0462]

2041 cctaggcctc cccgagcctc tgttgcatgc cgacgggtgg ctgaacccat cgacggccga
2101 ggccttccag gcctacgctg ggctgtgctt ccaggagctg ggggacctgg tgaagctctg
2161 gatcaccatc aacgagccta accggctaag tgacatctac aaccgctctg gcaacgacac
2221 ctacggggcg ggcgacaacc tgctgggtgg ccacgccttg gcttggcgcc totacgaccg
2281 gcagttcagg ccttcacagc gcgggggcgt gtgcgtgtcg ctgcacgcgg actgggcgga
2341 acccgccaac ccttatgctg actgcactg gagggcgggc gagcgcttcc tgcagttcga
2401 gatcgcttgg ttgcgcgagc cgctcttcaa gaccggggac taccgcgcgg ccatgagggg
2461 atacattgcc tccaagcacc gaacgggggt ttccagctcg gccctgccgc gctcaccga
2521 ggccgaaagg aggtgtctca agggcacggt cgacttctgc gcgtcaacc acttcaccac
2581 taggttctgt atgcacgagc agctggccgg cagccgctac gactcggaca gggacatcca
2641 gttttctgcag gacatcaccg gcttgagctc ccccacgcgc ctggctgtga ttccctgggg
2701 ggtgcgcaag ctgctgcggt ggggtccggg gaactacggc gacatggaca ttacatcac
2761 cgccagtggc atcgacgacc aggtcttgga ggatgacgg ctcgggaagt actacctagg
2821 gaagtacctt caggaggtgc tgaaagcata cctgattgat aaagtcagaa tcaaaggcta
2881 ttatgcattc aaactggctg aagagaaatc taaaccaga tttggattct tcacatctga
2941 ttttaagct aaatcctcaa tacaatttta caacaaagt atcagcagca ggggcttccc
3001 ttttgagaac agtagttcta gatgcagtca gaccaagaa aatacagagt gcactgtctg
3061 cttattcctt gtgcagaaga aacctgat attcctgggt tgttgcttct tctccacct
3121 ggttctactc ttatcaattg ccatttttca aaggcagaag agaagaaagt tttggaaagc
3181 aaaaaactta caacacatac cattaagaa aggcaagaga gttgttagct aaactgatct
3241 gtctgcatga tagacagttt aaaaattcat cccagttcc

[0463] β-Klotho氨基酸序列(NP_783864) (SEQ ID NO:4)

[0464]

1 mkpgcaagsp gnewiffstd eittryrntm sngglqrsvi lsalillrav tgfsgdgrai
61 wsknnpnftpv nesqlflydt fpknffwgig tgalqvegs wkkdgkgpsiw dhfihthlkn
121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlfp dgivtvanak glqyystilld
181 alvlrniepi vtlyhwdlpl alqekyggwk ndtiidifnd yatycfcmfg drvkywiti
241 npylvawhgy gtgmhapsek gnlaavytv ghnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
301 gshwiepnrs entmdifkcc qsmvsvlgwf anpihgddgy pegmrkkkfs vlpifseak
361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgq nvslnlreal nwikleynnp riliaengwf
421 tdsrvktdet taiymknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglly
481 vdfnskqker kpkssahyyk qiirengfsl kestpdvqqg fpcdfswgvt esvlkpesva
541 sspqfsdphl yvwnatgnrl lhrvegvrk trpaqctdfv nikkqlmla rmkvthyrf
601 ldwasvlptg nlsavnrqal ryyrcvvsseg lklgisamvt lyyphahlg lpepllhag
661 wlnpstaeaf qayaglcfcg lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsndtyg aahnllvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfktg
781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrlkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgv kllrwvrrny gdmidiyas giddqaled
901 rlrkyylgky lgevlkayli dkvrikgya fklaeekskp rfgfftsdfk akssiqfynk
961 vissrgfpfe nsssrscqtg entectvcf lvqkkplifl gccffstlfl llsiaifqrq
1021 krrkfwkakn lqhiplkkkg rvvs

[0465] 人Klotho结构域1 (KL-D1) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)

- 58 qgt
- 61 fpdgflwavg saayqteggw qqhgkgasiw dtfthhplap pgdsrnaslp lgapsplqpa
 121 tgdvasdsyn nvfrdtealr elgvthyrfs iswarvlpng sagvpngregl ryyrrllerl
 181 relgvqpvt lyhwdlpqrl qdayggwanr aladhfrdya elcfrhfggg vkywitidnp
- [0466] 241 yvvawhgyat grlapgirgs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptq ggqvsialss
 301 hwinprrrmtd hsiqecqksl dfvlwgwfakp vfidgdypes mknnlssilp dftesekkfi
 361 kgtadffalc fgptlsfqll dphmkfrqle spnlrqllsw idlefnpqi fivengwfv
 421 gttkrddaky myylkkfime tlkaikldgv dvigytawsl mdgfewhrgy sirrglfyvd
 481 flsqdkmlp kssalfyqkl iekngf
- [0467] 人Klotho结构域2 (KL-D2) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)
 517 gtfp cdfawgvvdn yiqvdttsq
 541 ftdlnvylwd vhskrlikv dgvttkrks ycvdfaaiqp qiallqemhv thfrfsldwa
 601 lilplgnqsq vnhtilqyyr cmaselvrn itpvvalwqp mapnqglprl larqgawenp
- [0468] 661 ytalafaeya rlcqelghh vkwitmnep ytrnmtysag hnllkahala whvynkfrh
 721 aqngkisial qadwiepacp fsqkdkevae rvlefdigwl aepifgsgdy pwvmrdwlnq
 781 rnnflpyft edekklqgt fdfalshyt tilvdseked pikyndylev qemtditwln
 841 spsqvavpw glrkvlwkl fkygdipmyi isngiddglh aeddqlrvyy mqnyinealk
 901 ahildginlc gyfaysfndr taprfglyry aadqfepkas mkhyrkiids ngf
- [0469] Klotho胞外结构域(无信号肽)氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)
 28 epdgdaq twarfsrppa peaaglfqgt
 61 fpdgflwavg saayqteggw qqhgkgasiw dtfthhplap pgdsrnaslp lgapsplqpa
 121 tgdvasdsyn nvfrdtealr elgvthyrfs iswarvlpng sagvpngregl ryyrrllerl
 181 relgvqpvt lyhwdlpqrl qdayggwanr aladhfrdya elcfrhfggg vkywitidnp
 241 yvvawhgyat grlapgirgs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptq ggqvsialss
 301 hwinprrrmtd hsiqecqksl dfvlwgwfakp vfidgdypes mknnlssilp dftesekkfi
 361 kgtadffalc fgptlsfqll dphmkfrqle spnlrqllsw idlefnpqi fivengwfv
 421 gttkrddaky myylkkfime tlkaikldgv dvigytawsl mdgfewhrgy sirrglfyvd
- [0470] 481 flsqdkmlp kssalfyqkl iekngfpplp enqplegtfp cdfawgvvdn yiqvdttsq
 541 ftdlnvylwd vhskrlikv dgvttkrks ycvdfaaiqp qiallqemhv thfrfsldwa
 601 lilplgnqsq vnhtilqyyr cmaselvrn itpvvalwqp mapnqglprl larqgawenp
 661 ytalafaeya rlcqelghh vkwitmnep ytrnmtysag hnllkahala whvynkfrh
 721 aqngkisial qadwiepacp fsqkdkevae rvlefdigwl aepifgsgdy pwvmrdwlnq
 781 rnnflpyft edekklqgt fdfalshyt tilvdseked pikyndylev qemtditwln
 841 spsqvavpw glrkvlwkl fkygdipmyi isngiddglh aeddqlrvyy mqnyinealk
 901 ahildginlc gyfaysfndr taprfglyry aadqfepkas mkhyrkiids ngfpgpetle
 961 rfcpeeftvc tecsffhtrk sl
- [0471] Klotho信号肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)
- [0472] 1 mpasapprp rpppslsll lvllglgrr lra
- [0473] IgG信号肽氨基酸序列 (SEQ ID NO:9)
- [0474] 1 msvltqvlal lllwltgtrc rrlra
- [0475] (Gly₄ Ser)₃多肽接头核酸序列 (SEQ ID NO:10)
- [0476] 1 ggaggtggag gttcaggagg tggaggttca ggaggtggag gttca
- [0477] (Gly₄ Ser)₃多肽接头氨基酸序列 (SEQ ID NO:11)

- [0478] 1 GGGGSGGGGS GGGGS
- [0479] (Gly₄ Ser) 多肽接头氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)
- [0480] 1 GGGGS
- [0481] (Gly) 多肽接头氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)
- [0482] 1 G
- [0483] (Gly Gly) 多肽接头氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)
- [0484] 1GG
- [0485] (Gly Ser) 多肽接头氨基酸序列 (SEQ ID NO:15)
- [0486] 1 GS
- [0487] (Gly₂ Ser) 多肽接头氨基酸序列 (SEQ ID NO:16)
- [0488] 1 GGS
- [0489] (Ala) 多肽接头氨基酸序列 (SEQ ID NO:17)
- [0490] 1 A
- [0491] (Ala Ala) 多肽接头氨基酸序列 (SEQ ID NO:18)
- [0492] 1 AA
- [0493] Klotho信号肽-Klotho胞外结构域-FGF23 (R179Q)
- [0494] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:19)
- 1 MPASAPPRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
[0495] 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCERHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFEVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGIFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
[0496] 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 TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
1001 KYPNASPLL GSSWGGLIHL TATARNYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRNE IPLIHFNTP
1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

[0497] IgG信号肽-Klotho胞外结构域-FGF23 (R179Q)

[0498] 氨基酸序列 (SEQ ID NO:20)

```

1 MSVLTVQLAL LLLWLTGLGG RRLRAEPGDG AQTWARFSRP PAPEAAGLFQ
51 GTFPDGFLWA VGSAAAYQTEG GWQQHKGKGAS IWDTFTHHPL APPGDSRNAS
101 LPLGAPSPLQ PATGDVASDS YNNVFRDTEA LRELGVTHYR FSISWARVLP
151 NGSAGVPNRE GLRYYRRLLE RLRELGVQPV VTLYHWDLPQ RLQDAYGGWA
201 NRALADHFRD YAEICFRHFG GQVKYWITID NPYVVAWHGY ATGRLAPGIR
251 GSPRLGYLVA HNLLLAHAKV WHLYNTSFRP TGGQVSIASL SSHWINPRRM
301 TDHSIKECQK SLDFVLGWFA KPVFIDGDYP ESMKNNLSSI LPDFTESEKK
351 FIKGTADFFA LCFGPTLSFQ LLDPHMKFRQ LESPNIQLL SWIDLEFNHP
401 QIFIVENGWF VSGTTRDDA KYMYLKKFI METLKAIKLD GVDVIGYTAW
451 SLMDGFEWHR GYSIRGLFY VDFLSQDKML LPKSSALFYQ KLIKNGFPP
[0499] 501 LPENQPLEGT FPCDFAWGVV DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLLI
551 KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI QPQIALLOEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ
601 SQVNHTILQY YRCMASELVR VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAW
651 NPYTALAFAE YARLCFQELG HHVKLWITMN EPYTRNMTYS AGHNLLKAHA
701 LAWHVYNEKE RHAQNGKISI ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLEFDIG
751 WLAEPFSGG DYPWVMRDWL NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ GTFDFLALSH
801 YTTILVDSEK EDPIKYNDYL EVQEMTDITW LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW
851 LKFKYGDLP YIISNGIDDG LHAEDDQLRV YMQNYINEA LKAHILDGIN
901 LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY RYAADQFEPK ASMKHYRKII DSNFGPGPET
951 LERFCPEEFT VCTECSEFHT RKSLSGSGGGG SGGGGSGGGG SLKYPNASPL
1001 LGSSWGGLIH LYTATARN SYHLQIHKNHV DGAPHQTIYS ALMIRSEDAG
1051 FVVITGVMSR RYLCMDFRGN IFGSHYFDPE NCRFQHQTL NGYDVYHSPQ
[0500] 1101 YHFLVSLGRA KRAFLPGMNP PPYSQFLSRR NEIPLIHFT PIPRRHTQSA
1151 EDDSERDPLN VLKPRARMTP APASCSQELP SAEDNSPMAS DPLGVVRGGR
1201 VNTHAGGTGP EGCRPFKFI *
```

[0501] KL-D1-FGF23 (R179Q) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:21)

```

1 MPASAPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QHKGKGASIW DTFTTHHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCERHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIASLSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
[0502] 351 DTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFEV GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGSGG GSGGGGSGG GSSLKYPNAS PLLGSSWGGL
551 IHLYTATARN SYHLQIHKNV HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVVITGVM
601 SRRYLCMDFR GNIFGSHYFD PENCRFQHQTL LENGVDVYHS PQYHFLVSLG
651 RAKRAFLPGM NPPYSQFLS RRNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDDSERDP
701 LNVLKPRARM TPAPASCSQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT
751 GPEGCRPFK FI*
```

[0503] KL-D2-FGF23 (R179Q) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:22)

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LPLPENQPLE GTFPCDFAWG
 51 VVDNYIQVDT TLSQFTDLNV YLWDVHHSKR LIKVDGVVTK KRKSYCVDFA
 101 AIQPQIALLO EMHVTHFRFS LDWALILPLG NQSQVNHTIL QYYRCMASEL
 151 VRVNITPVVA LWQPMAPNQG LPRLLARQGA WENPYTALAF AEYARLCFQE
 201 LGHHVKLWIT MNEPYTRNMT YSAGHNLLKA HALAWHVYNE KFRHAQNGKI
 251 SIALQADWIE PACPFSQKDK EVAERVLEFD IGWLAEPFIG SGDYPWVMRD
 301 WLNQRNNFLL PYFTEDEKKL IQGTFDFLAL SHYTTILVDS EKEDPIKYND
 351 YLEVQEMTDI TWLNPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFYKGD LPMYIISNGID
 401 DGLHAEDDQL RYVYMQNYIN EALKAHILDG INLCGYFAYS FNDRTAPRFG
 451 LYRYAADQFE PKASMKHYRK IIDSNGFPGP ETLERFCPEE FTVCTECSFF
 501 HTRKSLGSGG GSGGGGSGG GGSLLKYPNAS PLLGSSWGGL IHLYTATARN
 551 SYHLQIHKNG HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVVITGVM SRRYLCMDFR
 601 GNIFGSHYFD PENCRCFQHT LENGVDVYHS PQYHFLVSLG RAKRAFLPGM
 651 NPPPYSQLS RRNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDDSERDP LNVLKPRARM
 701 TPAPASCSQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTAGGT GPEGCRPFAK
 751 FI*

[0505] (KL-D1)₂-FGF23 (R179Q) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:23)

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QOHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLESGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QOHGKGASIW
 551 DTFTHHPLAP PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR

601 ELGVTHYRFS ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLRLERL RELGVQPVVT
 651 LYHWDLPQRL QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP
 701 YVVAWHGYAT GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ
 751 GGQVSIALSS HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES
 801 MKNLSSILP DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE
 851 SPNLRQLLSW IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME
 901 TLKAIKLDGV DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP
 951 KSSALFYQKL IEKNGFPEFG SGGGGSGGGG SGGGGSLKYP NASPLLSSW
 1001 GGLIHLYTAT ARNSYHLQIH KNGHVDGAPH QTIYSALMIR SEDAGFVVIT
 1051 GVMSRRYLCM DERGNIFGSH YFDPENCRCFQ HOTLENGYDV YHSPQYHFLV
 1101 SLGRAKRAFL PGMNPPYSQ FLSRRNEIPL IHFNTPIPR HTQSAEDDSE
 1151 RDPLNVLKPR ARMTAPASC SQELPSAEDN SPMASDPLGV VRGGRVNTA
 1201 GGTGPEGCRP FAKFI*

[0507] (KL-D2)₂-FGF23 (R179Q) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:24)

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSLL LVLLGLGGRR LPLPENQPLE GTFPCDFAWG
51 VVDNYIQVDT TLSQFTDLNV YLWDVHHSKR LIKVDGVVTK KRKSYCVDFE
101 AIQPQIALLO EMHVOTHERFS LDWALILPLG NQSQVNHTIL QYYRCMASEL
151 VRVNITPVVA LWQPMAPNQG LPRLLARQGA WENPYTALAF AEYARLCFQE
201 LGHHVKLWIT MNEPYTRNMT YSAGHNLLKA HALAWHVYNE KFRHAQNGKI
251 SIALQADWIE PACPFSQKDK EVAERVLEFD IGWLAEPFEG SGDYPWVMRD
301 WLNQRNNFLL PYFTEDEKKL IQGTFDFLAL SHYTTILVDS EKEDPIKYND
351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFYKGD LPMYIISNGID
[0508] 401 DGLHAEDDQL RVYYMQNYIN EALKAHILDG INLCGYFAYS FNDRTAPRFG
451 LYRYAADQFE PKASMKHYRK IIDSNGFPGP ETLERFCPEE FTVCTECSFF
501 HTRKSLGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD VHHSKRLIKV
551 DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA LILPLGNQSQ
601 VNHTILOYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL LARQGAWENP
651 YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG HNLLKAHALA
701 WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE RVLEFDIGWL
751 AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT FDFLALSHYT
801 TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW GLRKVLNWLK
851 FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK AHILDGINLC
901 GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS NGFGSGGGGS
951 GGGGSGGGGS LKYPNASPLL GSSWGGLIHL YTATARN SYH LQIHKNGHVD
[0509] 1001 GAPHQTIYSA LMIRSEDAGF VVITGVMSRR YLCMDFRGNI EGSHYFDPEN
1051 CRFQHQTLEN GYDVYHSPQY HFLVSLGRAK RAFLPGMNPP PYSQFLSRRN
1101 EIPLIHFNTP IPRRHTQSAE DDSERDPLNV LKPRARMTPA PASCSQELPS
1151 AEDNSPMASD PLGVVRGGRV NTHAGGTGPE GCRPFAKFI*
[0510] FGF23 (R179Q) -Klotho胞外结构域氨基酸序列 (SEQ ID NO:25)

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 PEGCRPFAKF
 251 IGSGGGGSGG GSGGGGSLK EPGDGAQTWA RFSRPPAPEA AGLFQGTFFD
 301 GFLWAVGSAA YQTEGGWQQH GKGASIWDTF THHPLAPPGD SRNASLPLGA
 351 PSPLQPATGD VASDSYNNVF RDTEALRELG VTHYRFSISW ARVLPNGSAG
 401 VPNREGLRYY RLLERLREL GVQPVVTLYH WDLFQRLQDA YGGWANRALA
 451 DHFRDYAELC FRHFGGQVKY WITIDNPYVW AWHGYATGRL APGIRGSPRL
 501 GYLVAHNLLL AHAKVWHLYN TSFRPTQGGQ VSIALSSHWI NPRRMTDHSI
 551 KECQKSLDFV LGWFAKPVFI DGDYPEMKN NLSSILPDFT ESEKKFIKGT
 [0511] 601 ADFFALCEGP TLSFQLLDPH MKFRQLESPN LRQLLSWIDL EFNHPQIFIV
 651 ENGWFVSGTT KRDDAKYMY LKKFIMETLK AIKLDGVDVI GYTAWSLMDG
 701 FEWHRGYSIR RGLFYVDFLS QDKMLLPKSS ALFYQKLIK NGFPPLPENQ
 751 PLEGTFFCDF AWGVVDNYIQ VDTTLSQFTD LNVYLWDVHH SKRLIKVDGV
 801 VTKKRKSYCV DFAAIQPIA LLQEMHVTHF RFSLDWALIL PLGNQSQVNH
 851 TILQYYRCMA SELVRVNITP VVALWQPMAP NQGLPRLLAR QGAWENPYTA
 901 LAFAEYARLC FQELGHHVKL WITMNEPYTR NMTYSAGHNL LKAHALAWHV
 951 YNEKFRHAQN GKISIALQAD WIEPACPFSS KDKEVAERVL EFDIGWLAEP
 1001 IFGSGDYPWV MRDWNQRNN ELLPYFTEDE KKLIQGTFFD LALSHYTTIL
 1051 VDSEKEDPIK YNDYLEVQEM TDITWLNPS QVAVVPWGLR KVLNWLKFKY
 1101 GDLPMYIISN GIDDGLHAED DQLRVYMQN YINEALKAHI LDGINLCGYF
 1151 AYSFNDRTAP RFGLYRYAAD QFEPKASKH YRKIIDSNGF PGPETLERFC
 1201 PEEFTVCTEC SFFHTRKSL*

[0512] FGF23 (R179Q) -KL-D1氨基酸序列 (SEQ ID NO:26)

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKNHG VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 [0513] 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IQGTFFDGF L WAVGSAAYQT EGGWQHGKG ASIWDTFTHH PLAPPGDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQPATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
 351 LPNGSAGVPN REGLRYRRL LERLRELGVQ PVVTLYHWDL PQLQDAYGG
 401 WANRALADHF RDYAELCFRH FGGQVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRLAPG
 451 IRGSPRLGYL VAHNLLLAHA KVWHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSSHWINPR
 501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLGW FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDFTSE
 [0514] 551 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPHMKF RQLESPNLQ LLSWIDLEFN
 601 HPQIFIVENG WFVSGTTKRD DAKYMYLKK FIMETLKAIK LDGVDVIGYT
 651 AWSLMDGFEW HRGYSIRRL FYVDFLSQDK MLLPKSSALF YQKLIKNGF
 652 *

[0515] FGF23 (R179Q) -KL-D2氨基酸序列 (SEQ ID NO:27)

[0516]

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 PEGCRPFAKF
 251 IGTFPCDFAW GVVDNYIQVD TTLSQFTDLN VYLWDVHHSK RLIKVDGVVT
 301 KKRKSYCVDF AAIQPQIALI QEMHVTHFRF SLDWALILPL GNQSQVNHTI
 351 LQYYRCMASE LVRVNITPVV ALWQPMAPNQ GLPRLLARQG AWENPYTALA
 401 FAEYARLCFQ ELGHHVKLWI TMNEPYTRNM TYSAGHNLLK AHALAWHVYN
 451 EKFRHAQNGK ISIALQADWI EPACPFSSQKD KEVAERVLEF DIGWLAEPF
 501 GSGDYPWVMR DWLNQRNNFL LPYFTEDEKK LIQGTDFDLA LSHYTTILVD
 551 SEKEDPIKYN DYLEVQEMTD ITWLNSPSQV AVVPWGLRKV LNWLKFKYGD
 601 LPMYIISNGI DDGLHAEDDQ LRVYYMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
 651 SFNDRTAPRF GLYRYAADQF EPKASMKHYR KIIDSNGF*

[0517] FGF23 (R179Q) - (KL-D1) 2氨基酸序列 (SEQ ID NO:28)

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 PEGCRPFAKF
 251 IQGTFPDGFL WAVGSAAYQT EGGWQQHGKG ASIWDTFTHH PLAPPGDSRN
 301 ASLPLGAPSP LQPATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
 351 LPNGSAGVPN REGLRYRRL LERLRELGVQ PVVTLYHWDL PQLQDAYGG
 401 WANRALADHF RDYAELCFRH FGGQVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRLAPG
 451 IRGSPRLGYL VAHNLLLAHA KVVHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSSHWINPR
 501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLGW FAKPVFIDGD YPESMKNNLS SILPDFTESE
 551 KFKIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPHMKF QLESPLNRQ LLSWIDLEFN
 601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLKK FIMETLKAIK LDGVDVIGYT
 651 AWSLMDGFEE HRGYSIRRG L FYVDFLSQDK MLLPKSSALF YQKLIKENG
 701 QGTFPDGFLW AVGSAAYQTE GGWQQHGKGA SIWDTFTHHP LAPPGDSTRNA
 751 SLPLGAPSPL QPATGDVASD SYNNVFRDTE ALRELGVTHY RFSISWARVL
 801 PNGSAGVPRN EGLRYRRL L ERLRELGVQP VVTLYHWDLP QRLQDAYGGW

[0518]

851 ANRALADHFR DYAEELCFRHF GGQVKYWITI DNPYVVAWHG YATGRLAPGI
 901 RGSPRLGYLV AHNLLLAHAK VVHLYNTSEF PTQGGQVSI LSSHWINPRR
 951 MTDHSIKECQ KSLDFVLGWF AKPVFIDGDY PESMKNNLSS ILPDFTESEK
 1001 KFIKGTADFF ALCFGPTLSF QLLDPMKFR QLESPLNRQL LSWIDLEFNH
 1051 PQIFIVENGW FVSGTTRKDD AKYMYLKKF IMETLKAIKL DGVDVIGYTA
 1101 WSLMDGFEEH RGYSIRRG L FYVDFLSQDK MLLPKSSALFY QKLIKENG*

[0519]

[0520] FGF23 (R179Q) - (KL-D2) 2氨基酸序列 (SEQ ID NO:29)

1 MLGARLRRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKNHG VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIEGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGTFFCDFAW GVVDNYIQVD TTLSQFTDLN VYLWDVHHSK RLIKVDGVVT
 301 KKRKSYCVDF AAIQPQIAL L QEMHVTFRF SLDWALILPL GNQSQVNHTI
 351 LQYYRCMASE LVRVNITPVV ALWQPMAPNQ GLPRLARQG AWENPYTALA
 401 FAEYARLCFQ ELGHHVKLWI TMNEPYTRNM TYSAGHNLK AHALAHVYN
 451 EKFRHAQNGK ISIALQADWI EPACPFSSQKD KEVAERVLEF DIGWLAEPIF
 501 GSGDYPWVMR DWLNQRNNFL LPYFTEDEKK LIQGTDFDLA LSHYTTILVD
 [0521] 551 SEKEDPIKYN DYLEVQEMTD ITWLNPSQV AVVPWGLRKV LNWLFKFKYGD
 601 LPMYIISNGI DDGLHAEDDQ LRVYYMONEY NEALKAHILD GINLCGYFAY
 651 SFNDRTAPRF GLYRYAADQF EPKASKHYR KIIDSNGFGT FPCDFAWGVV
 701 DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLLI KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI
 751 QPQIALQEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ SQVNHTILQY YRCMASELVR
 801 VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAW NPYTALAF AE YARLCFQELG
 851 HHVKLWITMN EPYTRNMTYS AGHNLKKAHA LAHVYNEKF RHAQNGKISI
 901 ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLEFDIG WLAEPFGSG DYPWVMRDWL
 951 NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ GTFDFLALSH YTTILVDSEK EDPIKYNDYL
 1001 EVQEMTDITW LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW LKFKYGDLP YIISNGIDDG
 1051 LHAEDDQLRV YMYONYINEA LKAHILDGIN LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY
 1101 RYAADQFEPK ASMKHYRKII DSNGF*

[0522] FGF19核酸序列(NM_005117) (SEQ ID NO:30)

[0523] 蛋白质编码区(464-1114)

1 gctcccagcc aagaacctcg gggccgctgc ggggtgggga ggagttcccc gaaacccggc
 61 cgctaagcga ggcctcctcc tcccgagat ccgaacggcc tgggcgggggt caccocggct
 121 gggacaagaa gccgcgcgct gcctgccggg gcccggggag ggggtgggg ctggggccgg
 181 aggcgggggtg tgagtgggtg tgtgcggggg gggagggtt gatgcaatcc cgataagaaa
 241 tgctcgggtg tcttgggcac ctaccgctgg ggcgcgtaag ggcctactat ataagggtgc
 301 cggcccgag cgcgcgcgcc gtcagagcag ggcgcgtgcg tccaggatct agggccacga
 [0524] 361 ccatcccaac ccggcactca cagcccgca ggcgcacccg gtcgcgcgcc agcctcccg
 421 acccccatcg ccggagctgc gccgagagcc ccaggagggt gccatgcgga ggggtgtgt
 481 ggtggtccac gtatggatcc tggcggcct ctggtggcc gtggccgggc gccccctcgc
 541 cttctcgga cgggggccc acgtgcacta cggtggggg gaccccatcc gcctgcggca
 601 cctgtacacc tccggccccc acgggtcttc cagctgcttc ctgcgcaccc gtgcgcacgg
 661 cgtcgtggac tgcgcgcggg gccagagcgc gcacagtttg ctggagatca aggcagtcgc
 721 tctgcggacc gtggccatca agggcgtgca cagcgtgcg tacctctgca tgggcgcgga

781 cggcaagatg caggggctgc ttcagtactc ggaggaagac tgtgctttcg aggaggagat
 841 cggcccagat ggctacaatg tgtaccgato cgagaageac cgccctccgg totccctgag
 901 cagtgcacaa cagcggcagc tgtacaagaa cagaggcttt cttccactot ctcatttccot
 961 gcccattgctg cccatggctc cagaggagcc tgaggacctc agggggccact tgggaatctga
 1021 catgtttctct tcgcccctgg agaccgacag catggaccca tttgggcttg tccacggact
 1081 ggaggccgtg aggagtccca gctttgagaa gtaactgaga ccatgcccgg gcctcttcac
 1141 tgctgccagg ggctgtggtta cctgcagcgt gggggacgtg ottctacaag aacagtccctg
 1201 agtccacgtt ctgttttagct ttaggaagaa acatctagaa gttgtacata ttcagagttt
 1261 tccattggca gtgccagttt ctagccaata gacttgctg atcataacat tgtaagcctg
 1321 tagcttgccc agctgctgcc tgggcccaca ttctgctccc tcgaggttgc tggacaagct
 1381 gctgcactgt ctcagttctg attgaatacc tccatcgatg gggaaactac ttcccttggga
 [0525] 1441 aaaattctta tgtcaagctg aaattctcta atttttctc atcacttccc caggagcagc
 1501 cagaagacag gcagtagttt taatttcagg aacagggtat ccaactctgta aaacagcagg
 1561 taaatttcac tcaaccccat gtgggaattg atctatatct ctacttccag ggaccatttg
 1621 ccttcccaa atccctccag gccagaactg actggagcag gcatggccca ccaggettca
 1681 ggagtagggg aagcctggag ccccaactca gccctgggac aacttgagaa tccccctga
 1741 ggccagttct gtcattgatg ctgtcctgag aataacttgc tgtcccggtg tcacctgctt
 1801 ccatctccca gccaccagc cctctgccca cctcacatgc ctcccatgg attggggcct
 1861 cccaggcccc ccaccttatg tcaacctgca ctcttgttc aaaaatcagg aaaagaaaag
 1921 atttgaagac cccaagtctt gtcaataact tgctgtgtgg aagcagcggg ggaagacctt
 1981 gaaccctttc ccagcactt ggttttccaa catgatatat atgagtaatt tattttgata
 2041 tgtacatctc ttattttctt acattattta tgccccaaa ttatatattat gtatgtaagt
 2101 gaggtttggt ttgtatatta aaatggagtt tgtttgtaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

[0526] FGF19氨基酸序列 (NP_005108) (SEQ ID NO:31)

1 MRSGCVVHV WILAGLWLV AGRPLAFSDA GPHVHYGWGD PIRLRHLYTS GPHGLSSCFL
 [0527] 61 RIRADGVVDC ARGQSAHSL EIKAVLRV AIKGVHSVRY LCMGADGKMQ GLLQYSEEDC
 121 AFEEEEIRPDG YNVYRSEKHR LPVSLSSAKQ RQLYKNRGFL PLSHFLPMLP MVPEEPEDLR
 181 GHLESDMFSS PLETDSMPDF GLVTGLEAVR SPSFEK

[0528] FGF21核酸序列 (NM_019113) (SEQ ID NO:32)

[0529] 蛋白质编码区151-780

1 CTGTCAGCTG AGGATCCAGC CGAAAGAGGA GCCAGGCACT CAGGCCACCT GAGTCTACTC
 61 ACCTGGACAA CTGGAATCTG GCACCAATTC TAAACCACTC AGCTTCTCCG AGCTCACACC
 121 CCGGAGATCA CCTGAGGACC CGAGCCATTG ATGGACTCGG ACGAGACCGG GTTCGAGCAC
 181 TCAGGACTGT GGGTTTCTGT GCTGGCTGGT CTTCTGCTGG GAGCCTGCCA GGCACACCCC
 241 ATCCCTGACT CCAGTCCTCT CCTGCAATTC GGGGGCCAAG TCCGGCAGCG GTACCTCTAC
 301 ACAGATGATG CCCAGCAGAC AGAAGCCCAC CTGGAGATCA GGGAGGATGG GACGGTGGGG
 361 GGCGCTGCTG ACCAGAGCCC CGAAAGTCTC CTGCAGCTGA AAGCCTTGAA GCCGGGAGTT
 [0530] 421 ATTCAAATCT TGGGAGTCAA GACATCCAGG TTCCTGTGCC AGCGGCCAGA TGGGGCCCTG
 481 TATGGATCGC TCCACTTTGA CCCTGAGGCC TGCAGCTTCC GGGAGCTGCT TCTTGAGGAC
 541 GGATACAATG TTTACCAGTC CGAAGCCCAC GGCCTCCCGC TGCACCTGCC AGGGAACAAG
 601 TCCCCACACC GGGACCCTGC ACCCGGAGGA CCAGCTCGCT TCCTGCCACT ACCAGGCCTG
 661 CCCCCGCAC TCCCGGAGCC ACCCGGAATC CTGGCCCCCC AGCCCCCGCA TGTGGGCTCC
 721 TCGGACCCTC TGAGCATGGT GGGACCTTCC CAGGGCCGAA GCCCCAGCTA CGCTTCCTGA
 781 AGCCAGAGGC TGTTTACTAT GACATCTCCT CTTTATTTAT TAGGTTATTT ATCTTATTTA
 841 TTTTTTTATT TTTCTTACTT GAGATAATAA AGAGTTCCAG AGGAGAAAAA AAAAAAAAAA
 901 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

[0531] FGF21氨基酸序列 (NP_061986) (SEQ ID NO:33)

1 MDSDETFEH SGLWVSVLAG LLLGACQHP IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDAQQTEAH
 [0532] 61 LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGL YGSLHFDPEA
 121 CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI
 181 LAPQPPDVG SDPLSMVGPS QGRSPSYAS

[0533] FGF23核酸序列 (NM_020638) (SEQ ID NO:34)

[0534] 蛋白质编码区147-902

[0535]

```

1  cggtcaaaaag gaggggaatcc agtctaggat cctcacacca gctacttgca agggagaagg
61  aaaaggccag taaggcctgg gccaggagag tcccgacagg agtgtcagggt ttcaatctca
121  gcaccagcca ctcagagcag ggcaogatgt tgggggcccg cctcaggctc tgggtctgtg
181  ccttgtgcag cgtctgcagc atgagcgtcc tcagagccta tcccaatgcc tcccactgc
241  tcggctccag ctgggggtggc ctgatccacc tgtacacagc cacagccagg aacagctacc
301  acctgcagat ccacaagaat ggccatgtgg atggcgccacc ccatcagacc atctacagtg
361  ccctgatgat cagatcagag gatgctgggt ttgtgggtgat tacagggtgtg atgagcagaa
421  gatacctctg catggatttc agaggcaaca tttttggatc acactatttc gaccgggaga
481  actgcagggt ccaacaccag aogctggaaa acgggtacga cgtctaccac tctcctcagt
541  atcaacttct ggctcagtctg ggccggggcga agagagcctt cctgccaggc atgaacccac
601  ccccgtaact ccagttcctg tcccgaggga acgagatccc cctaattcac ttcaacaccc
661  ccataaccag gcggcacacc cggagcgccg aggacgactc ggagcgggac ccctgaacg
721  tgotgaagcc cggggcccg atgaaccccg ccccgccctc ctgttcacag gagctccga
781  gcgcogagga caacagcccg atggccagtg acccattagg ggtgggtcagg ggcggtcgag
841  tgaacacgca cgctggggga acgggcccgg aaggtgcccg ccccttcgcc aagttcatct
901  aggggtcgctg gaagggcacc ctctttaacc catccctcag caaacgcagc tcttcccaag
961  gaccagggtc cttgacgttc cgaggatggg aaaggtgaca ggggcatgta tggattttgc
1021  tgcttctctg ggttcccttc cacaggaggt cctgtgagaa ccaacctttg agggcccaagt
1081  catgggggtt caccgcttc ctcactecat atagaacacc tttcccaata ggaaacccca
1141  acaggtaaac tagaaatttc ccttcatga aggtagagag aaggggtctc tcccaacata
1201  tttctcttcc ttgtgctct cctctttatc acttttaagc ataaaaaaaa aaaaaaaaaa
1261  aaaaaaaaaa aaaagcagtg ggttctgag ctcaagactt tgaagggtga ggaagagga
1321  aactggagat ccagaagct tctccactgc cctatgcatt tatgttagat gcccogatcc
1381  cactggtcatt tgagtgtgca aaccttgaca ttaacagctg aatggggcaa gttgatgaaa
1441  acactacttt caagccttcg ttcttctctg agcatctctg gggaagagct gtcaaaagac
1501  tgggtggtagg ctggtgaaaa cttgacagct agacttgatg cttgctgaaa tgaggcagga
1561  atcataatag aaaactcagc ctccctacag ggtgagcacc ttctgtctcg ctgtctcct
1621  ctgtgcagcc acagccagag ggcccagaat ggcccactc tgttcccaag cagttcatga
1681  tacagcctca ccttttgccc ccatctctgg tttttgaaaa tttgggtctaa ggaataaata
1741  gcttttacac tggctcacga aaatctgccc tgctagaatt tgcttttcaa aatggaaata
1801  aattccaact ctctaagag gcattttaatt aaggtctctac ttccagggtg agtaggaatc
1861  cattctgaac aaactacaaa aatgtgactg ggaagggggc tttgagagac tgggactgct
1921  ctgggttagg tttctctgtg actgaaaaat cgtgtccttt tctctaaatg aagtggcatc
1981  aaggactcag ggggaaagaa atcaggggac atgttataga agttatgaaa agacaaccac
2041  atggtcaggc tcttctctgt ggtctctagg gctctgcagc agcagtggct cttcgattag
2101  ttaaaactct cctaggctga cacatctggg tctcaatccc cttggaaatt cttggtgcat
2161  taaatgaagc cttaccccat tactgcggtt cttcctgtaa gggggctcca ttttctccc
2221  tctctttaa tgaccaccta aaggacagta tattaacaag caaagtcgat tcaacaacag
2281  cttcttccca gtcacttttt tttttctcac tgccatcaca tactaacctt atactttgat
2341  ctattctttt tggttatgag agaaaatgtg ggcaactgtt tttacctgat ggttttaagc
2401  tgaacttgaa ggaactggtc ctattctgaa acagtaaaac tatgtataat agtatatagc
2461  catgcatggc aaatatttta atatttctgt tttcatttcc tgttggaat attatcctgc
2521  ataatagcta ttggaggctc ctcagtgaat gatcccaaaa ggattttggt ggaactag
2581  ttgtaatctc acaaaactca cactaccatc aggggttttc tttatggcaa agccaaaata
2641  gctcctacaa tttcttatat cctcgtcat gtggcagtat ttatttattt atttggaagt
2701  ttgctatctc ttctatatat atagatatat ataaaaatgt aacccctttt tctttcttc
2761  tgitttaaaat aaaaataaaa tttatctcag cttctgttag cttatcctct ttgtagtact
2821  acttaaaagc atgtcggaat ataagaataa aaaggattat gggaggggaa cattagggaa
2881  atccagagaa ggcaaaattg aaaaaagat tttagaattt taaaattttc aaagatttct
2941  tccattcata aggagactca atgattttta ttgatctaga cagaattatt taagttttat
3001  caatattgga tttctggg

```

[0536] FGF23氨基酸序列 (NP_065689) (SEQ ID NO:35)

```

1  MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs YHLQIHKNHG
61  VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHOTL
121  ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
181  AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241  PEGCRPFAKE I

```

[0539] FGF23 (R179Q) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:36)

- [0540] 1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S YHLQIHKNHG
61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
121 ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241 PEGCRPFAKF I
- [0541] 人β-Klotho结构域1 (b-KL-D1) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:37)
77 ydt fpknffwgig tgalqvegs w kkdgkgsi w dhfihthlkn
121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlfp dgivtvanak glqyystlld
181 alvlrniepi vtlyhwdlpl alqekyggwk ndtiidifnd yatycfqmfg drvkywiti h
241 npylvawhgy gtgmhapsek gnlaavytv g hnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
- [0542] 301 gshwiepnrs entmdifkco qsmvsvlgwf anpihg dgy pegmrkklfs vlpifseaek
361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgq nvslnlreal nwikley nnp riliaengwf
421 tdsrvktedt taiymmknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglfy
481 vdfnskqker kpkssahyyk qiirengf
- [0543] 人β-Klotho结构域2 (b-KL-D2) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:38)
571 trpaqctdfv nikkqlemla rmkvthyrfa
601 ldwasvlptg nlsavnrqal ryyrcvvs eg lklgisamvt lypthahlg lpepllhadr
661 wlnpstaeaf qayaglc fqe lgdlvklwit inepnrldi ynrs gndtyg aahnllvaha
- [0544] 721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfktg
781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrllkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgvr kllrwvrrny gdm diyitas giddqaledd
901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrkgyya fkl aeekskp rfgfftsdfk akssiqfynk
961 vissrgf
- [0545] β-Klotho胞外结构域 (无信号肽) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:39)
52 gfs g dgrai
61 wsknpnftpv nesqlflydt fpknffwgig tgalqvegs w kkdgkgsi w dhfihthlkn
121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlfp dgivtvanak glqyystlld
181 alvlrniepi vtlyhwdlpl alqekyggwk ndtiidifnd yatycfqmfg drvkywiti h
241 npylvawhgy gtgmhapsek gnlaavytv g hnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
- [0546] 301 gshwiepnrs entmdifkco qsmvsvlgwf anpihg dgy pegmrkklfs vlpifseaek
361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgq nvslnlreal nwikley nnp riliaengwf
421 tdsrvktedt taiymmknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglfy
481 vdfnskqker kpkssahyyk qiirengfsl kestpdvqgq fpcdfswgvt esvlkpesva
541 sspqfsdphl yvwnatgnrl lhrvegvr lk trpaqctdfv nikkqlemla rmkvthyrfa
601 ldwasvlptg nlsavnrqal ryyrcvvs eg lklgisamvt lypthahlg lpepllhadr
661 wlnpstaeaf qayaglc fqe lgdlvklwit inepnrldi ynrs gndtyg aahnllvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfktg
- [0547] 781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrllkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgvr kllrwvrrny gdm diyitas giddqaledd
901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrkgyya fkl aeekskp rfgfftsdfk akssiqfynk
961 vissrgfpfe nsssrcsq tq entectvc lf lvqkkpl
- [0548] sKlotho无信号肽-FGF23氨基酸序列 (无信号肽) (SEQ ID NO:40)

EPGDGAQ TWARFSRPPA

51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVERDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL 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 YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
 [0549] 601 LILPLGNQSQ VNHTILOYYR 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 MKHYRKIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSEFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHNTPI
 1151 PRRHTRSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

[0550] sKlotho无信号肽-FGF23 (R179Q) (无信号肽) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:41)

EPGDGAQ TWARFSRPPA

51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVERDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 [0551] 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV

- 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIK V DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOQEMHV THERFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAYEA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AONGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 [0552] 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARN SYHL QIHKNHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRNE IPLIHFNTP
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPF AKFI*
- [0553] FGF23无信号肽 (SEQ ID NO:42)
- YPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN SYHLQIHKNH
 61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
 [0554] 121 ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
 181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
 241 PEGCRPFAKE I
- [0555] FGF23 (R179Q) 无信号肽 (SEQ ID NO:43)
- YPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN SYHLQIHKNH
 61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
 [0556] 121 ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
 181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
 241 PEGCRPFAKE I
- [0557] 具Klotho信号肽的sKlotho (SEQ ID NO:44)
- 1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLOPA TGDVASDSYN NVERDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 [0558] 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFSV GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIK V DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOQEMHV THERFSLDWA

[0559]

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 TECSEFFHTRK SL

[0560] 具IgG信号肽的sKlotho (SEQ ID NO:45)

[0561]

1 MSVLTQVLAL LLLWLTGLGG RRLRAEPGDG AQTWARFSRP PAPEAAGLFQ
 51 GTFPDGFLEWA VGSAAYQTEG GWQOHGKGAS IWDTFTHHPL APPGDSRNAS
 101 LPLGAPSPLQ PATGDVASDS YNNVFRDTEA LRELGVTHYR FSISWARVLP
 151 NGSAGVPNRE GLRYRRLLE RLRELGVQPV VTLYHWDLPQ RLQDAYGGWA
 201 NRALADHFRD YAELECFRHEG GOVKYWITID NPYVVAWHGY ATGRLAPGIR
 251 GSPRLGYLVA HNLLLAHAKV WHLYNTSFRP TGGGQVSIAL SSHWINPRRM
 301 TDHSIKECQK SLDFVLGWEA KPVFIDGDYP ESMKNNLSSI LPDFTESEKK
 351 FIKGTADFFA LCFGPTLSFQ LLDPHMKFRQ LESPRLRQLL SWIDLEFNHP
 401 QIFIVENGWF VSGTTKRDDA KYMYLKKFI METLKAIKLD GVDVIGYTAW
 451 SLMDGFEWHR GYSIRRGFLY VDFLSQDKML LPKSSALFYQ KLIKNGFPP
 501 LPENQPLEGT FPCDFAWGVV DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLI
 551 KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI QPQIALLOEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ
 601 SQVNHTILQY YRCMASELVR VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAWE
 651 NPYTALAFAE YARLCFQELG HHVKLWITMN EPYTRNMTYS AGHNLLKAHA
 701 LAWHVYNEKF RHAQNGKISI ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLEFDIG
 751 WLAEPFGSG DYPWVMRDWL NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ GTFDFLALSH
 801 YTTILVDSEK EDPIKYNDYL EVQEMTDITW LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW
 851 LKFKYGDLPY YIISNGIDDG LHAEDDQLRV YYMQNYINEA LKAHILDGIN
 901 LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY RYAADQFEPK ASMKHYRKII DSNGFPGPET
 951 LERFCPEEFT VCTECSEFFHT RKSL*

[0562] sKlotho-FGF23-FcLALA v1 (SEQ ID NO:46)

[0563]

1 ATGCCCCGCA GCGCCCCGCC GCGCCGCCCG CGGCCGCCGC CGCCGTCGCT GTCGCTGCTG
 61 CTGGTGCTGC TGGGCCTGGG CGGCCGCCGC CTGCGTGCGG AGCCGGGCGA CGGCGCGCAG
 121 ACCTGGGCCC GTTCTCTCGG GCCTCCTGCC CCCGAGGCCG CGGGCCTCTT CCAGGGCACC
 181 TTCCCCGACG GCTTCTCTCG GGCCGTGGGC AGCGCCGCCT ACCAGACCGA GGGCGGCTGG
 241 CAGCAGCACG GCAAGGGTGC GTCCATCTGG GATACGTTCA CCCACCACCC CCTGGCACCC
 301 CCGGGAGACT CCCGGAACGC CAGTCTGCCG TTGGGCGCCC CGTCGCCGCT GCAGCCCGCC
 361 ACCGGGGACG TAGCCAGCGA CAGCTACAAC AACGTCTTCC GCGACACGGA GCGCTGCGC
 421 GAGCTCGGGG TCACTACTA CCGCTTCTCC ATCTCGTGGG CGCGAGTGCT CCCCAGTGGC
 481 AGCGCGGGCG TCCCCAACCG CGAGGGGCTG CGCTACTACC GCGCCTGCTG 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 CCGGGGCGAGC

[0564]

781 CCGCGGCTCG GGTACCTGGT GGCGCACAAC CTCCTCCTGG CTCATGCCAA AGTCTGGCAT
841 CTCTACAATA CTTCTTTCCG TCCCCTCAG GGAGGTCAGG TGTCATTGC CCTAAGCTCT
901 CACTGGATCA ATCCTCGAAG AATGACCGAC CACAGCATCA AAGAATGTCA AAAATCTCTG
961 GACTTTGTAC TAGGTTGGTT TGCCAAACCC GTATTTATTG ATGGTGACTA TCCCGAGAGC
1021 ATGAAGAATA ACCTTTCATC TATTCTGCCT GATTTTACTG AATCTGAGAA AAAGTTCATC
1081 AAAGGAACTG CTGACCTTTT 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 ACCTTAAAAG CCATCAAGCT GGATGGGGTG GATGTCATCG GGTATACCGC ATGGTCCCTC
1381 ATGGATGGTT TCGAGTGGCA CAGAGGTTAC AGCATCAGGC GTGGACTCTT CTATGTTGAC
1441 TTTCTAAGCC AGGACAAGAT GTTGTGGCCA AAGTCTTCAG CCTTGTCTA CCAAAAGCTG
1501 ATAGAGAAAA ATGGCTTCCC TCCTTTACCT GAAAATCAGC CCCTAGAAGG GACATTTCCC
1561 TGTGACTTTG CTGGGGAGT TGTGACAAC TACATTCAAG TAGATACCAC TCTGTCTCAG
1621 TTTACCGACC TGAATGTTTA CCTGTGGGAT GTCCACCACA GTAAAAGGCT TATTAAAGTG
1681 GATGGGGTTG TGACCAAGAA GAGGAAATCC TACTGTGTTG ACTTTGCTGC CATCCAGCCC
1741 CAGATCGCTT TACTCCAGGA AATGCACGTT ACACATTTTC GCTTCTCCCT GGACTGGGCC
1801 CTGATTCTCC CTCTGGGTAA CCAGTCCCAG GTGAACCACA CCATCCTGCA GTACTATCGC
1861 TGCAATGGCA GCGAGCTTGT CCGTGTCAAC ATCACCCAGC TGGTGGCCCT GTGGCAGCCT
1921 ATGGCCCCGA ACCAAGGACT GCCGCGCCTC CTGGCCAGGC AGGGCGCCTG GGAGAACCCC
1981 TACACTGCCC TGGCCTTTGC AGAGTATGCC CGACTGTGCT TTCAAGAGCT CGGCCATCAC
2041 GTCAAGCTTT GGATAACGAT GAATGAGCCG TATACAAGGA ATATGACATA CAGTGCTGGC
2101 CACAACCTTC TGAAGGCCCA TGCCCTGGCT TGGCATGTGT ACAATGAAAA GTTTAGGCAT
2161 GCTCAGAATG GGAATAATC CATAGCCTTG CAGGCTGATT GGATAGAACC TGCTTGCCT
2221 TTCTCCAAA AGGACAAAGA GGTGSCGAG AGAGTTTTG AATTGACAT TGGCTGGCTG
2281 GCTGAGCCCA TTTTCGGCTC TGGAGATTAT CCATGGGTGA TGAGGGACTG GCTGAACCAA
2341 AGAAACAATT TTCTTCTTCC TTATTTCACT GAAGATGAAA AAAAGCTAAT CCAGGTACCC
2401 TTTGACTTTT TGGCTTTAAG CCATTATACC ACCATCCTTG TAGACTCAGA AAAAGAAGAT
2461 CCAATAAAAT ACAATGATTA CCTAGAAGTG CAAGAAATGA CCGACATCAC GTGGCTCAAC
2521 TCCCCAGTC AGGTGGCGGT AGTGCCCTGG GGGTTGCGCA AAGTGCTGAA CTGGCTGAAG
2581 TTCAAGTACG GAGACCTCCC CATGTACATA ATATCCAACG GAATCGATGA CGGGCTGCAT
2641 GCTGAGGACG ACCAGCTGAG GGTGTATTAT ATGCAGAAAT ACATAAACGA AGCTCTCAAA
2701 GCCCACATAC TGGATGGTAT CAATCTTTGC GGATACTTTG CTTATTCTGT TAACGACCGC
2761 ACAGCTCCGA GGTTTGGCCT CTATCGTTAT GCTGCAGATC AGTTTGAGCC CAAGGCATCC
2821 ATGAAACATT ACAGGAAAAT TATTGACAGC AATGGTTTCC CGGGCCCGA AACTCTGGAA
2881 AGATTTTGTC CAGAAGAATT CACCGTGTGT ACTGAGTGCA GTTTTTTTCA CACCCGAAAG
2941 TCTTTAGGAT CCGGAGGTGG AGGTTCAAGG GGTGGAGGTT CAGGAGGTGG AGGTTCACTT
3001 AAGTATCCCA ATGCCCTCCC ACTGCTCGGC TCCAGCTGGG GTGGCCTGAT CCACCTGTAC
3061 ACAGCCACAG CCAGGAACAG CTACCACCTG CAGATCCACA AGAATGGCCA TGTGGATGGC
3121 GCACCCCATC AGACCATCTA CAGTGCCCTG ATGATCAGAT CAGAGGATGC TGGCTTTGTG
3181 GTGATTACAG GTGTGATGAG CAGAAGATAC CTCTGCATGG ATTTGAGAGG CAACATTTTT
3241 GGATCACACT ATTTCGACCC GGAGAACTGC AGGTTCCAAC ACCAGACGCT GGAACCGGG
3301 TACGACGTCT ACCACTCTCC TCAGTATCAC TTCCTGGTCA GTCTGGGCCG GGCGAAGAGA
3361 GCCTTCCTGC CAGGCATGAA CCCACCCCG TACTCCAGT TCCTGTCCC GAGGAACGAG
3421 ATCCCCCTAA TTCACCTCAA CACCCCAATA CCACGGCGGC ACACCCAGAG CGCCGAGGAC

3481 GACTCGGAGC GGGACCCCTT GAACGTGCTG AAGCCCCGGG CCCGGATGAC CCCGGCCCCG
 3541 GCCTCCTGTT CACAGGAGCT CCCGAGCGCC GAGGACAACA GCCCGATGGC CAGTGACCCA
 3601 TTAGGGGTGG TCAGGGGCGG TCGAGTGAAC ACGCACGCTG GGGGAACGGG CCCGGAAGGC
 3661 TGCCGCCCTT TCGCCAAGTT CATCGGAGGT GGAGGTTCAA AAACCCACAC GTGTCTCTCT
 3721 TGTCTGCCC CAGAAGCAGC AGGTGGTCCA TCAGTTTTTC TTTTCCCTCC CAAACCCAAG
 3781 GATACGCTGA TGATCTCTCG CACGCCTGAG GTGACATGCG TCGTAGTAGA CGTGAGCCAC
 3841 GAAGATCCCG AGGTGAAGTT CAATTGGTAT GTGGACGGAG TAGAAGTGCA TAACGCGAAA
 [0565] 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 TGTTTTCTCT CTCTGTCATG
 4321 CATGAAGCGC TGCATAATCA CTATACCCAG AAGTCTCTGA GCTTGAGCCC AGGCAAGTAA

[0566] sKlotho-FGF23-FcLALA v1 (SEQ ID NO:47)

1 MPASAPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLOPA 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 MKNNLSSILP
 351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWVVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLEYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNFGPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTLSQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 [0567] 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 MKHYRKIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSEFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLL GSSWGGLIHL TATARNYHL QIHKNHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHENTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFKFIGG GSKTHTCPP CPAPEAAGGP
 1251 SVFLFPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 1301 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 1351 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE

[0568] 1401 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
1451 KSLSLSPGK*

[0569] sKlotho-FGF23-FcLALA v2 (SEQ ID NO:48)

1 ATGCCCGCCA GCGCCCGCC GCGCCCGCCG CGGCCGCGCG CGCCGTGCGT GTCGCTGCTG
61 CTGGTGCTGC TGGGCCTGGG CGGCCGCGCG CTGCGTGCGG AGCCGGGCGA CGGCGCGCAG
121 ACCTGGGCCC GTTCTCGCG GCCTCCTGCC CCCGAGGCGG CGGGCCTCTT CCAGGGCACC
181 TTCCSCGACG GCTTCCTCTG GGCCGTGGGG AGCGCGCGCT ACCAGACCGA GGGCGGCTGG
241 CAGCAGCACG GCAAGGGTGC GTCCATCTGG GATACGTTCA CCCACCACCC CCTGGCACCC
301 CCGGGAGACT CCCGGAACGC CAGTCTGCCG TTGGGCGCCC CGTCGCGCGT GCAGCCCGCC
361 ACCGGGGACG TAGCCAGCGA CAGCTACAAC AACGTCTTCC GCGACACGGA GGCCTGCGC
421 GAGCTCGGGG TCACTCACTA CCGCTTCTCC ATCTCGTGGG CGCGAGTGCT CCCCATGGC
481 AGCGCGGGCG TCCCCAACCG CGAGGGGCTG CGCTACTACC GCGCCTGCT 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 GSTACCTGGT GGCGCACAAAC CTCCTCCTGG CTCATGCCAA AGTCTGGCAT
841 CTCTACAATA CTTCTTTCCG TCCCACTCAG GGAGGTCAGG TGTCCATTGC CCTAAGCTCT
901 CACTGGATCA ATCCTCGAAG AATGACCGAC CACAGCATCA AAGAATGTCA AAAATCTCTG
961 GACTTTGTAC TAGGTGGTT TGCCAAACCC GTATTTATTG ATGGTGACTA TCCCAGAGC
1021 ATGAAGAATA ACCTTTCATC TATTCTGCCT GATTTTACTG AATCTGAGAA AAAGTTCATC
1081 AAAGGAAGTG CTGACTTTTT TGCTCTTTGC TTTGGACCCA CCTTGAGTTT TCAACTTTTG
1141 GACCCTCACA TGAAGTTCCG CCAATTGGAA TCTCCCAACC TGAGGCAACT GCTTTCCTGG
[0570] 1201 ATTGACCTTG AATTAAACCA TCCTCAAATA TTTATTGTGG AAAATGGCTG GTTTGTCTCA
1261 GGGACCACCA AGAGAGATGA TGCCAAATAT ATGTATTACC TCAAAAAGTT CATCATGGAA
1321 ACCTTAAAAG CCATCAAGCT GGATGGGGTG GATGTCATCG GGTATACCGC ATGGTCCCTC
1381 ATGGATGGTT TCGAGTGGCA CAGAGGTTAC AGCATCAGGC GTGGACTCTT CTATGTTGAC
1441 TTTCTAAGCC AGGACAAGAT GTTGTGGCCA AAGTCTTCAG CCTTGTCTTA CCAAAAGCTG
1501 ATAGAGAAAA ATGGCTTCCC TCCTTTACCT GAAAATCAGC CCTAGAAGG GACATTTCCC
1561 TGTGACTTTG CTTGGGGAGT TGTGACAAC TACATTCAAG TAGATACCAC TCTGTCTCAG
1621 TTTACCGACC TGAATGTTTA CCTGTGGGAT GTCCACCACA GTAAAAGGCT TATTAAAGTG
1681 GATGGGGTTG TGACCAAGAA GAGGAAATCC TACTGTGTTG ACTTTGCTGC CATCCAGCCC
1741 CAGATCGCTT TACTCCAGGA AATGCACGTT ACACATTTTC GCTTCTCCCT GGACTGGGCC
1801 CTGATTCTCC CTCTGGGTAA CCAGTCCCAG GTGAACCACA CCATCCTGCA GTACTATCGC
1861 TGCATGGCCA GCGAGCTTGT CCGTGTC AAC ATCACCACAG TGGTGGCCCT GTGGCAGCCT
1921 ATGGCCCCGA ACCAAGGACT GCCGCGCCTC CTGGCCAGGC AGGCGCCTG GGAGAACCCC
1981 TACACTGCCC TGGCCTTTGC AGAGTATGCC CGACTGTGCT TTCAAGAGCT CGGCCATCAC
2041 GTCAAGCTTT GGATAACGAT GAATGAGCCG TATACAAGGA ATATGACATA CAGTGCTGGC
2101 CACAACCTTC TGAAGGCCA TGCCCTGGCT TGGCATGTGT ACAATGAAAA GTTTAGGCAT
2161 GCTCAGAATG GGAAAATATC CATAGCCTTG CAGGCTGATT GGATAGAACC TGCCTGCCCT
2221 TTCTCCCAA AGGACAAAGA GGTGGCCGAG AGAGTTTGG AATTGACAT TGGCTGGCTG
2281 GCTGAGCCCA TTTTCGGCTC TGGAGATTAT CCATGSGTGA TGAGGGACTG GCTGAACCAA
2341 AGAAACAATT TTCTTCTTCC TTATTTCACT GAAGATGAAA AAAAGCTAAT CCAGGGTACC
2401 TTTGACTTTT TGGCTTTAAG CCATTATACC ACCATCCTG 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 AGCTCTCAA
 2701 GCCCACATAC TGGATGGTAT CAATCTTTGC GGATACTTTG CTTATTCTGT TAACGACCGC
 2761 ACAGCTCCGA GGTTTGGCCT CTATCGTTAT GCTGCAGATC AGTTTGAGCC CAAGGCATCC
 2821 ATGAAACATT ACAGGAAAAT TATTGACAGC AATGGTTTCC CGGGCCCGAGA AACTCTGGAA
 2881 AGATTTTGTG CAGAAGAATT CACCGTGTGT ACTGAGTGCA GTTTTTTTTCA CACCCGAAAG
 2941 TCTTTAGGAT CCGGAGGTGG AGGTTCAAGG GGTGGAGGTT CAGGAGGTGG AGGTTCACTT
 3001 AAGTATCCCA ATGCCTCCCC ACTGCTCGGC TCCAGCTGGG GTGGCCTGAT CCACCTGTAC
 3061 ACAGCCACAG CCAGGAACAG CTACCACCTG CAGATCCACA AGAATGGCCA TGTGGATGGC
 3121 GCACCCCATC AGACCATCTA CAGTGCCCTG ATGATCAGAT CAGAGGATGC TGGCTTTGTG
 3181 GTGATTACAG GTGTGATGAG CAGAAGATAC CTCTGCATGG ATTTTCAGAGG CAACATTTTT
 3241 GGATCACAAT ATTTTCGACCC GGAGAACTGC AGGTTCCAAC ACCAGACGCT GGAAAACGGG
 3301 TACGACGTCT ACCACTCTCC TCAGTATCAC TTCCTGGTCA GTCTGGGCCG GGCGAAGAGA
 [0571] 3361 GCCTTCCTGC CAGGCATGAA CCCACCCCGC TACTCCCAGT TCCTGTCCCG GAGGAACGAG
 3421 ATCCCCCTAA TTCACTTCAA CACCCCCATA CCACGGCGGC ACACCCAGAG CGCCGAGGAC
 3481 GACTCGGAGC GGGACCCCTT GAACGTGCTG AAGCCCCGGG CCCGGATGAC CCCGGCCCCG
 3541 GCCTCCTGTT CACAGGAGCT CCCGAGCGCC GAGGACAACA GCCCGATGGC CAGTGACCCA
 3601 TTAGGGGTGG TCAGGGGCGG TCGAGTGAAC ACGCACGCTG GGGGAACGGG CCCGGAAGGC
 3661 TGCCGCCCTT TCGCCAAGTT CATCGGAGGT GGAGGTCAG CCCAGAAAGC AGCAGGTGGT
 3721 CCATCAGTTT TTCTTTTCCC TCCCAAACCC AAGGATACGC TGATGATCTC TCGCACGCCT
 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 GAGAACAAC ACAAGACAAC ACCCCCGGTG
 4201 CTGGATAGTG ACGGATCTTT CTTTCTCTAC TCAAAGCTGA CCGTGGATAA GTCCAGGTGG
 4261 CAGCAGGGAA ACGTGTTTTC CTGCTCTGTC ATGCATGAAG CGCTGCATAA TCACTATACC
 4321 CAGAAGTCTC TGAGCTTGAG CCCAGGCAAG TAA

[0572] sKlotho-FGF23-FcLALA v2 (SEQ ID NO:49)

1 MPASAPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRRLRLR RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 201 QDAYGGWANR ALADHERDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
 [0573] 251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
 301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
 351 DFTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
 401 IDLEFNHPQI FIVENGWFSV GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDEAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD

551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV 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 TECSEFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 [0574] 1001 KYPNASPLLG SSWGGGLIHL Y TATARN SYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRNE IPLIHFNTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFIGG GGSAPAAAGG PSVFLFPKP
 1251 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 1301 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 1351 VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFPYSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
 1401 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
 1451 *

[0575] FGF23-FcLALA v1 (SEQ ID NO:50)

1 ATGTTGGGGG CCCGCCTCAG GCTCTGGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG CAGCATGAGC
 61 GTCCTCAGAG CCTATCCCAA TGCCTCCCA 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 GGTTCCAACA CCAGACGCTG
 361 GAAAACGGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG TCTGGGCCGG
 421 GCGAAGAGAG CTTCTCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCGT ACTCCAGTT CCTGTCCCGG
 481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAC CACGGCGGCA CACCCAGAGC
 541 GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTG AACGTGCTGA AGCCCGGGC CCGGATGACC
 601 CCGGCCCCGG CCTCCTGTTC ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG CCCGATGGCC
 661 AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG GGGAAACGGGC
 [0576] 721 CCGGAAGGCT GCCGCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTCAA AACCACACG
 781 TGTCTCCTT GTCTGCCCC AGAAGCAGCA GGTGGTCCAT CAGTTTTTCT TTTCCCTCCC
 841 AAACCAAGG 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 AAGGCACTTC CCGCGCCTAT TGAGAAAACA ATCTCCAAGG CGAAGGGACA ACCAAGAGAA
 1141 CCTCAGGTTT ACACTCTCCC GCCTTCCAGG GAAGAGATGA CCAAAAATCA AGTTTCCCTG
 1201 ACTTGCCTCG TCAAAGGATT CTACCCTTCC GACATTGCTG TTGAATGGGA AAGCAATGGA
 1261 CAACCAGAGA ACAACTACAA GACAACACCC CCGGTGCTGG ATAGTGACGG ATCTTTCTTT
 1321 CTCTACTCAA AGCTGACCGT GGATAAGTCC AGGTGGCAGC AGGGAAACGT GTTTTCTCTG
 1381 TCTGTCTATG ATGAAGCGCT GCATAATCAC TATACCCAGA AGTCTCTGAG CTTGAGCCCA
 [0577] 1441 GGCAAGTAA

[0578] FGF23 (R179Q)-FcLALAv1 (SEQ ID NO:51)

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 PEGCRPFAPK
[0579] 251 IGGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
301 VSHEDPEVKE NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*

[0580] FGF23-FcLALA v2 (SEQ ID NO:52)

[0581]

1 ATGTTGGGGG CCCGCCTCAG GCTCTGGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG CAGCATGAGC
61 GTCCTCAGAG CCTATCCCAA TGCTTCCCA 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 AACATTTTTG GATCACACTA TTTCGACCCG GAGAACTGCA GGTTCCAACA CCAGACGCTG
361 GAAAACGGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG TCTGGGCCGG
421 GCGAAGAGAG CCTTCCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCCGT ACTCCCAGTT CCTGTCCCGG
481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAC CACGGCGGCA CACCCAGAGC
541 GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTG AACGTGCTGA AGCCCCGGGC CCGGATGACC
601 CCGGCCCCCG CCTCCTGTTC ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG CCCGATGGCC
661 AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG GGAACGGGC
721 CCGGAAGGCT GCCGCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTCAGC CCCAGAAGCA
781 GCAGGTGGTC CATCAGTTTT TCTTTTCCCT CCCAAACCCA AGGATACGCT GATGATCTCT
841 CGCACGCCCTG AGGTGACATG CGTCGTAGTA GACGTGAGCC ACGAAGATCC CGAGGTGAAG
901 TTCAATTGGT ATGTGGACGG AGTAGAAGTG CATAACGCGA AAATAAGCC GCGCGAGGAA
961 CAATATAACA GTACTTACAG GGTGGTATCC GTGCTCACAG TCCTGCACCA GGAATGGCTG
1021 AACGGTAAGG AATACAAGTG CAAAGTAAGC AACAAAGGCAC TTCCCGCGCC TATTGAGAAA
1081 ACAATCTCCA AGGCGAAGGG ACAACCAAGA GAACCTCAGG TTTACTACTCT CCCGCCCTCC
1141 AGGGAAGAGA TGACCAAAAA TCAAGTTTCC CTGACTTGCC TCGTCAAAGG ATTCTACCCT
1201 TCCGACATTG CTGTTGAATG GGAAAGCAAT GGACAACCAG AGAACAATA CAAGACAACA
1261 CCCCCGGTGC TGGATAGTGA CGSATCTTTC TTTCTCTACT CAAAGCTGAC CGTGGATAAG
1321 TCCAGGTGGC AGCAGGGAAA CGTGTTTTCC TGCTCTGTCA TGCATGAAGC GCTGCATAAT
1381 CACTATACCC AGAAGTCTCT GAGCTTGAGC CCAGGCAAGT AA

[0582] FGF23 (R179Q)-FcLALAv2 (SEQ ID NO:53)

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNHG VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
[0583] 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT

201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 [0584] 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

[0585] sKlotho-FGF23 (R1156Q,C1183S)的氨基酸序列 (SEQ ID NO:54)

[0586] sKlotho:aa[氨基酸]1-982;接头1:aa 983-1001;FGF23:aa 1002-1228

1 MPASAPRRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QOHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLRLERL 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 FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
 451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
 551 VHHSKRLIKV DGVVTKRKS YCVDFAAIQF QIALLOEMHV THERESLDWA
 [0587] 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 IARQGAWENP 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 NGFFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSI
 1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNASYHL QIHKNGHVDG APHOTIYSAL
 1051 MISEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHOTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHNTPI
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASSSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

[0588] sKlotho-FGF23 (R1156Q,C1221S)的氨基酸序列 (SEQ ID NO:55)

[0589] sKlotho:1-982;接头1:983-1001;FGF23:1002-1228;

1 MPASAPRRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QOHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
 151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLRLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
 [0590] 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 FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV

[0591]

451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
 501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP 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 FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 PDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPREGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSEFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLL G SSWGGGLIHL TATARN SYHL QIHKN GHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHOTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YS~~Q~~FLSRRNE IPLIHFNTP I
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG SRPF~~A~~KFI*

[0592] sKlotho-FGF23 (R1156Q,Q1133A)的氨基酸序列 (SEQ ID NO:56)

[0593] sKlotho:1-982;接头1:983-1001;FGF23:1002-1228

[0594]

1 MPASAPPRRP RPPPPSLSL LVLLGLGGR LRAEPDGAQ TWARESRPPA
 51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QOHGKGASIW DTFTHHPLAP
 101 PGDSRNASLP LGAPSPQLQA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRES
 151 ISWARVLPNG SAGVFNREGL 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 YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA
 601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
 651 LARQGAWENP YTALAFAYEA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
 701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 PDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPREGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSEFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 1001 KYPNASPLL G SSWGGGLIHL TATARN SYHL QIHKN GHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHOTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YS~~A~~FLSRRNE IPLIHFNTP I
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPF~~A~~KFI*

[0595] sKlotho-FGF23 (R1156Q,C1183S,C1221S)的氨基酸序列 (SEQ ID NO:57)

[0596] sKlotho:1-982;接头1:983-1001;FGF23:1002-1228

```

1 MPASAPRRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
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 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 DGVVTKRKS YCVDFAAIQP QIALQEMHV THERFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNO RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINIC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSEFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHL TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRRNE IPLIHNTPTI
1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASSSQELPSA EDNSPMASDP
1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG SRPFAKFI*

```

[0598] sKlotho-FGF23 (R1156Q,C1183S,C1221S,Q1133A)的氨基酸序列 (SEQ ID NO:58)

[0599] sKlotho:1-982;接头1:983-1001;FGF23:1002-1228

```

1 MPASAPRRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
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 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 DGVVTKRKS YCVDFAAIQP QIALQEMHV THERFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE

```

[0600]

- 751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
 801 EDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
 851 GLRKVLNLWK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
 901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
 951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSEFFHTRK SLGSGGGGSG GGGSGGGGSL
 [0601] 1001 KYPNASPLL G SSWGGLIHL TATARN SYHL QIHKN GHVDG APHQTIYSAL
 1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
 1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPF YSAFLSRNE IPLIHFNTP
 1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASSQELPSA EDNSPMASDP
 1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG SRPFAKFI*
- [0602] FGF23 (R179Q;C206S) -FcLALAv1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:59)
- [0603] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-482
- 1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKN GH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENG YDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 [0604] 201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 301 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVSV LTVLHQDWLN
 351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 401 TCLVKGEYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*
- [0605] FGF23 (R179Q,C244S) -FcLALAv1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:60)
- [0606] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-482
- 1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKN GH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENG YDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 [0607] 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
 251 IGGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 301 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVSV LTVLHQDWLN
 351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 401 TCLVKGEYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK*
- [0608] FGF23 (R179Q,Q156A) -FcLALAv1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:61)
- [0609] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-482
- 1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
 51 YHLQIHKN GH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENG YDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 [0610] 151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGGSKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD

[0611] 301 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 351 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 401 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK*

[0612] FGF23 (R179Q,C206S,C244S)-FcLALAv1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:62)

[0613] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-482

[0614] 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 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK*

[0615] FGF23 (R179Q,C206S,C244S,Q156A)-FcLALAv1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:63)

[0616] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-482

[0617] 1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKNHG VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYS~~A~~FLSR 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 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
 451 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK*

[0618] FGF23 (R179Q,C206S)-FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:64)

[0619] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473

[0620] 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 IGGGGSAP~~E~~A AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

[0621] FGF23 (R179Q,C244S)-FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:65)

[0622] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
 [0623] 251 IGGGSAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

[0624] FGF23 (R179Q, Q156A) -FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:66)

[0625] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 [0626] 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 PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

[0627] FGF23 (R179Q, C206S, C244S) -FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:67)

[0628] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 [0629] 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 PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*

[0630] FGF23 (R179Q, C206S, C244S, Q156A) -FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:68)

[0631] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 [0632] 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGyDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPYSAFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 201 PAPASSSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF

- 251 IGGGGSAP~~E~~A AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 [0633] 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*
- [0634] 在以下序列中,FGF23中的某些突变(例如,Y154D,Y154C,C206S,C244S) 加下划线
- [0635] FGF23 (R179Q,Y154D)-FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:69):
- [0636] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473
- 1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKN~~G~~H VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQT~~L~~ ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPP~~D~~SQFLSR RNEIPLIHFN TP~~I~~PRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 [0637] 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGGSAP~~E~~A AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*
- [0638] FGF23 (R179Q,Y154D,C206S,C244S)-FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:70)
- [0639] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473
- 1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKN~~G~~H VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQT~~L~~ ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPP~~D~~SQFLSR RNEIPLIHFN TP~~I~~PRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 [0640] 201 PAPASSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGSRPFAKF
 251 IGGGGSAP~~E~~A AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*
- [0641] FGF23 (R179Q,Y154C)-FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:71)
- [0642] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473
- 1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
 51 YHLQIHKN~~G~~H VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
 101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQT~~L~~ ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
 151 PPPCSQFLSR RNEIPLIHFN TP~~I~~PRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
 [0643] 201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
 251 IGGGGSAP~~E~~A AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 301 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
 351 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
 401 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
 451 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK*
- [0644] FGF23 (R179Q,Y154C,C206S,C244S)-FcLALAv2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:72):

[0645] FGF23:1-251;接头:252-256;FcLALA:257-473

```

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

```

[0646]

[0647] FGF23 (R179Q,Y154D) -FcLALAv2的核苷酸序列 (SEQ ID NO:73)

```

1      ATGTTGGGGG CCCGCCTCAG GCTCTGGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG CAGCATGAGC
61     GTCCTCAGAG 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 TTTCAGAGGC
301    AACATTTTTG GATCACACTA TTTGACCCG GAGAACTGCA GGTTCACAAC CCAGACGCTG
361    GAAAACGGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG TCTGGGCCGG
421    GCGAAGAGAG CTTTCCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCGG ACTCCAGTT CCTGTCCCGG
481    AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAC CACGGCGGCA CACCCAGAGC
541    GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTG AACGTGCTGA AGCCCGGGC CCGGATGACC
601    CCGGCCCGCG CCTCCTGTTC ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG CCCGATGGCC
661    AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG GGAACGGGC
721    CCGGAAGGCT GCCGCCCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTCAGC CCCAGAAGCA
781    GCAGGTGGTC CATCAGTTTT TCTTTTCCCT CCCAAACCCA AGGATACGCT GATGATCTCT
841    CGCACGCCTG AGGTGACATG CGTCGTAGTA GACGTGAGCC ACGAAGATCC CGAGGTGAAG
901    TTCAATTGGT ATGTGGACGG AGTAGAAGTG CATAACGCGA AACTAAGCC GCGCGAGGAA
961    CAATATAACA GTACTTACAG GGTGGTATCC GTGCTCACAG TCCTGCACCA GGAAGTGGCTG
1021   AACGGTAAGG AATACAAGTG CAAAGTAAGC AACAAGGCAC TTCCCSCGCC TATTGAGAAA
1081   ACAATCTCCA AGGCGAAGGG ACAACCAAGA GAACCTCAGG TTACACTCTT CCCGCCTTCC
1141   AGGGAAGAGA TGACCAAAAA TCAAGTTTCC CTGACTTGCC TCGTCAAAGG ATTCTACCCT
1201   TCCGACATTG CTGTTGAATG GGAAAGCAAT GGACAACCAG AGAACAACCA CAAGACAACA
1261   CCCCCGGTGC TGGATAGTGA CGGATCTTTC TTTCTCTACT CAAAGCTGAC CGTGGATAAG
1321   TCCAGGTGGC AGCAGGGAAA CGTGTTTTTC TGCTCTGTCA TGCATGAAGC GCTGCATAAT
1381   CACTATACCC AGAAGTCTCT GAGCTTGAGC CCAGGCAAGT AA

```

[0648]

[0649] FGF23 (R179Q,Y154D,C206S,C244S) -FcLALAv2的核苷酸序列 (SEQ ID NO:74)

```

1      ATGTTGGGGG CCCGCCTCAG GCTCTGGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG CAGCATGAGC
61     GTCCTCAGAG CCTATCCCAA TGCCTCCCCA CTGCTCGGCT CCAGCTGGGG TGGCCTGATC
121    CACCTGTACA CAGCCACAGC CAGGAACAGC TACCACCTGC AGATCCACAA GAATGGCCAT
181    GTGGATGGCG CACCCCATCA GACCATCTAC AGTGCCCTGA TGATCAGATC AGAGGATGCT

```

[0650]

241 GGCTTTGTGG TGATTACAGG TGTGATGAGC AGAAGATACC TCTGCATGGA TTTCAGAGGC
301 AACATTTTTG GATCACACTA TTTCGACCCG GAGAACTGCA GGTTCACAACA CCAGACGCTG
361 GAAAACSGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG TCTGGGCCGG
421 GCGAAGAGAG CCTTCCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCGG ACTCCCAGTT CCTGTCCCAG
481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAC CACGGCGGCA CACCCAGAGC
541 GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTG AACGTGCTGA AGCCCGGGC CCGGATGACC
601 CCGGCCCGG CCTCCTCTT ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG CCCGATGGCC
661 AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG GGGAACGGGC
721 CCGGAAGGCT CCCGCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTCAGC CCCAGAAGCA
[0651] 781 GCAGGTGGTC CATCAGTTTT TCTTTTCCCT CCCAAACCCA AGGATACGCT GATGATCTCT
841 CGCACGCCTG AGGTGACATG CGTCGTAGTA GACGTGAGCC ACGAAGATCC CGAGGTGAAG
901 TTCAATTGGT ATGTGGACGG AGTAGAAGTG CATAACGCGA AAATAAGCC GCGCGAGGAA
961 CAATATAACA GTACTTACAG GGTGGTATCC GTGCTCACAG TCCTGCACCA GGACTGGCTG
1021 AACGGTAAGG AATAACAAGT CAAAGTAAGC AACAAAGGCAC TTCCCGCGCC TATTGAGAAA
1081 ACAATCTCCA AGGCGAAGGG ACAACCAAGA GAACCTCAGG TTTACACTCT CCCGCCTTCC
1141 AGGGAAGAGA TGACCAAAAA TCAAGTTTCC CTGACTTGCC TCGTCAAAGG ATTCTACCCT
1201 TCCGACATTG CTGTTGAATG GGAAAGCAAT GGACAACCAG AGAACAACCTA CAAGACAACA
1261 CCCCCGGTGC TGGATAGTGA CGGATCTTTC TTTCTCTACT CAAAGCTGAC CGTGGATAAG
1321 TCCAGGTGGC AGCAGGGAAA CGTGTTTTTC TGCTCTGTCA TGCATGAAGC GCTGCATAAT
1381 CACTATACCC AGAAGTCTCT GAGCTTGAGC CCAGGCAAGT AA

[0652] FGF23 (R179Q,Y154C)-FcLALAv2的核苷酸序列 (SEQ ID NO:75)

1 ATGTTGGGGG CCGCCTCAG GCTCTGGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG CAGCATGAGC
61 GTCCCTCAGAG CCTATCCCAA TGCTTCCCA 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 AACATTTTTG GATCACACTA TTTCGACCCG GAGAACTGCA GGTTCACAACA CCAGACGCTG
361 GAAAACSGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG TCTGGGCCGG
421 GCGAAGAGAG CCTTCCIGCC AGGCATGAAC CCACCCCGT GCTCCCAGTT CCTGTCCCAG
481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAC CACGGCGGCA CACCCAGAGC
541 GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTG AACGTGCTGA AGCCCGGGC CCGGATGACC
601 CCGGCCCGG CCTCCTGTT ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG CCCGATGGCC
[0653] 661 AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG GGGAACGGGC
721 CCGGAAGGCT GCCGCCCTT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTCAGC CCCAGAAGCA
781 GCAGGTGGTC CATCAGTTTT TCTTTTCCCT CCCAAACCCA AGGATACGCT GATGATCTCT
841 CGCACGCCTG AGGTGACATG CGTCGTAGTA GACGTGAGCC ACGAAGATCC CGAGGTGAAG
901 TTCAATTGGT ATGTGGACGG AGTAGAAGTG CATAACGCGA AAATAAGCC GCGCGAGGAA
961 CAATATAACA GTACTTACAG GGTGGTATCC GTGCTCACAG TCCTGCACCA GGACTGGCTG
1021 AACGGTAAGG AATAACAAGT CAAAGTAAGC AACAAAGGCAC TTCCCGCGCC TATTGAGAAA
1081 ACAATCTCCA AGGCGAAGGG ACAACCAAGA GAACCTCAGG TTTACACTCT CCCGCCTTCC
1141 AGGGAAGAGA TGACCAAAAA TCAAGTTTCC CTGACTTGCC TCGTCAAAGG ATTCTACCCT
1201 TCCGACATTG CTGTTGAATG GGAAAGCAAT GGACAACCAG AGAACAACCTA CAAGACAACA
1261 CCCCCGGTGC TGGATAGTGA CGGATCTTTC TTTCTCTACT CAAAGCTGAC CGTGGATAAG
1321 TCCAGGTGGC AGCAGGGAAA CGTGTTTTTC TGCTCTGTCA TGCATGAAGC GCTGCATAAT
1381 CACTATACCC AGAAGTCTCT GAGCTTGAGC CCAGGCAAGT AA

[0654] FGF23 (R179Q,Y154C,C206S,C244S)-FcLALAv2的核苷酸序列 (SEQ ID NO:76) :

[0655] FGF23 (R179Q,Y154C,C206S,C244S)-FcLALAv2的核苷酸序列 (SEQ ID NO:76) :

[0656]

1 ATGTTGGGGG CCCGCTCAG GCTCTGGGTC TGTGCCTTGT GCAGCGTCTG CAGCATGAGC
 61 GTCCTCAGAG CCTATCCCAA TGCCCTCCCA 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 TTTTCGACCCG GAGAACTGCA GGTTCACACA CCAGACGCTG
 361 GAAAACGGGT ACGACGTCTA CCACTCTCCT CAGTATCACT TCCTGGTCAG TCTGGGCCGG
 421 GCGAAGAGAG CCTTCCTGCC AGGCATGAAC CCACCCCCGT GCTCCCAAGTT CCTGTCCCGG
 481 AGGAACGAGA TCCCCCTAAT TCACTTCAAC ACCCCCATAC CACGGCGGCA CACCCAGAGC
 541 GCCGAGGACG ACTCGGAGCG GGACCCCTTG AACGTGCTGA AGCCCCGGGC CCGGATGACC
 601 CCGGCCCGGG CCTCCTCTT ACAGGAGCTC CCGAGCGCCG AGGACAACAG CCCGATGGCC
 661 AGTGACCCAT TAGGGGTGGT CAGGGGCGGT CGAGTGAACA CGCACGCTGG GGGAACGGGC
 721 CCGGAAGGCT CCCGCCCCCT CGCCAAGTTC ATCGGAGGTG GAGGTTCAGC CCCAGAAGCA
 781 GCAGGTGGTC CATCAGTTTT TCTTTTCCCT CCCAAACCCA AGGATACGCT GATGATCTCT
 841 CGCACGCCTG AGGTGACATG CGTCGTAGTA GACGTGAGCC ACGAAGATCC CGAGGTGAAG
 901 TTCAATTGGT ATGTGGACGG AGTAGAAGTG CATAACGCGA AAATAAGCC GCGCGAGGAA
 961 CAATATAACA GTACTTACAG GGTGGTATCC GTGCTCACAG TCCTGCACCA GGACTGGCTG
 1021 AACGGTAAGG AATACAAGTG CAAAGTAAGC AACAAAGGCAC TTCCCGCGCC TATTGAGAAA
 1081 ACAATCTCCA AGGCGAAGGG ACAACCAAGA GAACCTCAGG TTTACACTCT CCCGCCTTCC
 1141 AGGGAAGAGA TGACCAAAAA TCAAGTTTCC CTGACTTGCC TCGTCAAAGG ATTCTACCCT
 1201 TCCGACATTG CTGTTGAATG GGAAAGCAAT GGACAACCAG AGAACAATA CAAGACAACA
 1261 CCCCCGGTGC TGGATAGTGA CGGATCTTTC TTTCTCTACT CAAAGCTGAC CGTGGATAAG
 1321 TCCAGGTGGC AGCAGGGAAA CGTGTTTTCC TGCTCTGTCA TGCATGAAGC GCTGCATAAT
 1381 CACTATACCC AGAAGTCTCT GAGCTTGAGC CCAGGCAAGT AA

[0657] Klotho Δ C-20: asKlotho Δ C20

[0658]

EPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFPDGLWAVGSAAYQTEGGWQQHKGASIWDTFTHHPLAPPGDSRNASLP
 LGAPSPLQPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRLLERLRELGVQP
 VVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFQGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLG
 YLVAHNLLLAAKVVHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRMTDHSIKECQKSLDFVLGWFAPVFIIDGDYPESM
 KNNLSSILPDTFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLDPHMKFRQLESPNLRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWF
 VSGTTKRDDAKYMYLKKFIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFWEHRGYSIRRGLFYVDFLSQDKMLLPKSSAL
 FYQKLIKNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVDNYIQVDTTLSQFTDLNVYLWDVHHSKRLIKVDGVVTKKRKSYC
 VDFAAIQPQIALQLQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQSQVNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPR
 LLARQGAWENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQNGKI
 SIALQADWIEPACPFSSQKDKEVAERVLEFDIGWLAEPFGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLLPYFTEDEKKLIQGTDFD
 LALSHYTTILVDSEKEDIKYNDYLEVQEMTDITWLNSPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPYIISNGIDDGLH
 AEDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAYSFNDRTAPRFGLYRYAADQFEPKASMKHYRKIIDSNGFPGPE
 TLERF (SEQ ID NO:77)

[0659] 带两个突变的Klotho Δ C-20:带V563A和K795E(加下划线)的asKlotho Δ C20

[0660]

EPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFPDGLWAVGSAAYQTEGGWQQHGKGASIWDTFTHHPLAPPGDSRNASLP
LGAPSPLQPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRLLERLRELGVQP
VVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFQGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLG
YLVAHNLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVLGWFAPVFDGDYPESM
KNNLSSILPDTFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLDPHMKFRQLESPNLRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWF
VSGTTKRDDAKYMYYLKKFIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGIFYVDFLSQDKMLLPKSSAL
FYQKLIKNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDLNVYLWDVHHSKRLIKVDGAVTKKRKSYC
VDFAAIQPQIALQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQSQVNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPR
LLARQGAWENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQNGKI
SIALQADWIEPACPFSSQKDKEVAERVLEFDIGWLAEPFIGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLLPYFTEDEKELIQGTDFD
LALSHYTTILVDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDITWLNSPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPYIISNGIDDGLH
AEDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAYSFNDRTPRFGLYRYAADQFEPKASMKHYRKIIDSNFGPGPE
TLERF (SEQ ID NO: 78)

[0661] Klotho Δ C-20-FGF23: asKlotho Δ C20 (无加粗或无斜体); 接头 (斜体); FGF23
R179Q (粗体、无斜体)

[0662]

EPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFPDGLWAVGSAAYQTEGGWQQHGKGASIWDTFTHHPLAPPGDSRN
ASLPLGAPSPLQPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRLLER
LRELGVQPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFQGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGR
LAPGIRGSPRLGLYLVAHNLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVLG
WFAKPVFDGDYPESMKNLSSILPDTFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLDPHMKFRQLESPNLRQLL
SWIDLEFNHPQIFIVENGWFVSGTTKRDDAKYMYYLKKFIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYS
IRRGIFYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLIKNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDL
NVYLWDVHHSKRLIKVDGVVTKKRKSYCVDFAAIQPQIALQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQSQVNHTILQ
YYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLLARQGAWENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEP
YTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSSQKDKEVAERVLEFDIGWLAEP
FIGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLLPYFTEDEKKLIQGTDFDLALSHYTTILVDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDI
TWNLSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPYIISNGIDDGLHAEDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINL
CGYFAYSFNDRTPRFGLYRYAADQFEPKASMKHYRKIIDSNFGPGPETLERFGSGGGGSGGGGSGGGGSLKY
PNASPLLGSWGLIHLYTATARNSYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYLCMDF
RGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPPPYSQLSRNEIPLIHFN
PIPRRHTQSAEDDSERDPLNVLKPRARMTAPASCSQELPSAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNTHAGGTGPEGC
RPFAKFI (SEQ ID NO: 79)

[0663] Klotho-FGF23: asKlotho (无加粗或无斜体); 接头 (斜体); FGF23 R179Q (粗体、无
斜体)

[0664]

EPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFFDGFLWAVGSAAYQTEGGWQQHKGASIWDTFTTHHPLAPPGDSRN
ASLPLGAPSPLQPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTYHRSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRLLER
LRELGVPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFQGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGR
LAPGIRGSPRLGYLVAHNLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVLG
WFAKPVFIDGDYPESMKNNLSSILPDFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLDPHMKERQLESPLNRQLL
SWIDLEFNHPQIFIVENGWVFSGTTKRDDAKYMYLKKFIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYS
IRRGLEYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLIKNGFPPLENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDL
NVYLWDVHHSKRLIKVDGVVTKKRKSYCVDFAAIQFPQIALLQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQSQVNHTILQ
YYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLRLARQGAWENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEP
YTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSSQKDKEVAERVLEFDIGWLAEP

[0665]

IFGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLLPYFTEDEKKLIQGTDFDLALSHYTTILVDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDI
TWNLSPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPYIISNGIDDGLHAEDDQLRVYMQNYINEALKAHILDGINL
CGYFAYSFNDRTPRFGLYRYAADQFEPKASKMKHYRKIIDSNFGPGPETLERFCPEEFTVCTECSEFFHTRKSL
GSGGGGSGGGGSGGGGSLKYPNASPLLGSWGGLIHLYTATARNSYHLQIHKNHGVHDGAPHQTIYSALMIRSE
DAGFVVITGVMSRRYL CMDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNP
PPYSQFLSRNEIPLIHFNTPIPRRHTQSAEDDSERDPLNVLKPRARMT PAPASCSQELPSAEDNSPMASDPL
GVVRGGRVNTHAGGTGPEGCRPFAKFI (SEQ ID NO: 80)

[0666] Klotho (带两个突变)-FGF23:Klotho信号肽(粗体、斜体);带V563A和K795E(加下划线)的αKlotho(无加粗或无斜体);接头(斜体);FGF23 R179Q(粗体、无斜体)

[0667]

MPASAPRRRPPPPPSLSLLLVLLGLGGRRLRAEPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFFDGFLWAVGSAAY
QTEGGWQQHKGASIWDTFTTHHPLAPPGDSRNASLPLGAPSPLQPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVT
YRFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRLLERLRELGVPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDY
AELCFRHFQGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLGYLVAHNLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGG
QVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVLGWFAPKPVFIDGDYPESMKNNLSSILPDFTESEKKFIKGTAD
FFALCFGPTLSFQLLDPHMKFRQLESPLNRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWVFSGTTKRDDAKYMYLKKFI
METLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGLEYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLIKNGFPPLE
NQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDLNVYLWDVHHSKRLIKVDGAVTKKRKSYCVDFAAIQFPQIAL
LQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQSQVNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLRLARQGA
ENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQNGKISIAL
QADWIEPACPFSSQKDKEVAERVLEFDIGWLAEP
IFGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLLPYFTEDEKELIQGTDFDLALSHYTTILVDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDIT
WNLSPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPYIISNGIDDGLHAEDDQLRVYMQNYINEALKAHILDGINL
CGYFAYSFNDRTPRFGLYRYAADQFEPKASKMKHYRKIIDSNFGPGPETLERFGSGGGGSGGGGSGGGGSLKYPNASPLLGSWGGLIHLYTATARNSYHLQIHKNHGVHDGAP
HQTIIYSALMIRSE**DAGFVVITGVMSRRYL CMDFRGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSL**
GRAKRAFLPGMNP**PPYSQFLSRNEIPLIHFNTPIPRRHTQSAEDDSERDPLNVLKPRARMT PAPASCSQELP**
SAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNTHAGGTGPEGCRPFAKFI (SEQ ID NO: 81)

[0668] Klotho-FGF23:Klotho信号肽(粗体、斜体);具有V563A和K795E(加下划线)的αKlotho(无加粗或无斜体);接头(斜体);FGF23 R179Q(粗体、无斜体)

[0669]

EPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFFDGLWAVGSAAYQTEGGWQQHKGASIWDTFTHHPLAPPGDSRN
ASLPLGAPSPLQPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRLLER
LRELGVQPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFEGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGR
LAPGIRGSPRLGYLVAHNLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRMTDHSIKECQKSLDFVLG
WFAKPVFIDGDYPESMKNLSSILPDFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLDPHMKFRQLESPLNRQLL
SWIDLEFNHPQIFIVENGWFFVSGTTKRDDAKYMYLLKKFIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYS
IRRGLEYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLIKNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDL
NVYLWDVHHSKRLLIKVDGAVTKKRKSYCVDFAAIQPQIALQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQSQVNHTILQ
YYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLARQGAWENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEP
YTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSSQKDEVAERVLEFDIGWLAEP
IFGSGDYPWVMRDWLNQRNFFLPYFTEDEKELIQGTDFELASHYTTILVDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDI
TWNLSQSVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPMYIISNGIDDGLHAEDDQLRVYMQNYINEALKAHILDGINL
CGYFAYSFNDRITAPRFGFLYRYAADQFEPKASKMKHYRKIIDSNFGPGPETLERFGSGGGGSGGGGSGGGGSLKY
PNASPLLGSSWGGLIHLYTATARNSYHLQIHKNGHVDGAPHQTIYSALMIRSEDAGFVVITGVMSRRYL CMDF
RGNIFGSHYFDPENCRFQHQTLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPPPYSQLSRNEIPLIHNT

[0670]

PIPRRHTQSAEDDSERDPLNVLKPRARMTAPASCSQELPSAEDNSPMASDPLGVVRGGRVNTHAGGTGPEGC
RPF AKFI (SEQ ID NO: 82)

[0671] 引物

[0672] 5' 引物:

[0673] P5;gacggcgcgacagacctgggc (SEQ ID NO:83)

[0674] 3' 引物:

[0675] C-20;TAGCTCTAGACTAAAATCTTTCCAGAGTTTCTG (SEQ ID NO:84)

[0676] C-40;TAGCTCTAGACTATTTTCATGGATGCCTTGGGCT (SEQ ID NO:85)

[0677] C-60;TAGCTCTAGACTAAGCTGTGCGGTCGTTAAACG (SEQ ID NO:86)

[0678] C-80;TAGCTCTAGACTAGTGGGCTTTGAGAGCTTCGT (SEQ ID NO:87)

[0679] C-100;TAGCTCTAGACTACTCAGCATGCAGCCGTCAT (SEQ ID NO:88)

[0680] C-120;TAGCTCTAGACTACTTGAACCTTCAGCCAGTTCA (SEQ ID NO:89)

[0681] C-140;TAGCTCTAGACTAGGGGGAGTTGAGCCACGTGA (SEQ ID NO:90)

[0682] C-160;TAGCTCTAGACTATATTGGATCTTCTTTTCTG (SEQ ID NO:91)

[0683] C-180;TAGCTCTAGACTAGTCAAAGGTACCCTGGATTA (SEQ ID NO:92)

[0684] C-200;TAGCTCTAGACTAGTTTCTTTGGTTCCAGCCAGT (SEQ ID NO:93)

[0685] C-220;TAGCTCTAGACTACTCAGCCAGCCAGCCAATGT (SEQ ID NO:94)

[0686] C-240;TAGCTCTAGACTAGGAGAAAGGGCAGGCAGGTT (SEQ ID NO:95)

[0687] C-260;TAGCTCTAGACTACTGAGCATGCCTAACTTTT (SEQ ID NO:96)

[0688] C-280;TAGCTCTAGACTAGTTGTGGCCAGCACTGTATG (SEQ ID NO:97)

[0689] C-300;TAGCTCTAGACTACTTGACGTGATGGCCGAGCT (SEQ ID NO:98)

[0690] C-320;TAGCTCTAGACTAAGTGTTAGGGGTTCTCCAGG (SEQ ID NO:99)

[0691] C-340;TAGCTCTAGACTAGGCCATAGGCTGCCACAGGG (SEQ ID NO:100)

[0692] C-360;TAGCTCTAGACTACATGCAGCGATAGTACTGCA (SEQ ID NO:101)

[0693] C-380;TAGCTCTAGACTAAATCAGGGCCAGTCCAGGG (SEQ ID NO:102)

[0694] C-400;TAGCTCTAGACTAGATCTGGGGCTGGATGGCAG (SEQ ID NO:103)

[0695] C-420;TAGCTCTAGACTACCCATCCACTTTAATAAGCC (SEQ ID NO:104)

[0696] C-440;TAGCTCTAGACTAGGTAACTGAGACAGAGTGG (SEQ ID NO:105)

[0697] C-460;TAGCTCTAGACTAGTCACAGGGAAATGTCCCTT (SEQ ID NO:106)

[0698] C-480;TAGCTCTAGACTACTCTATCAGCTTTTGGTAGA (SEQ ID NO:107)

[0699] Klotho-血清白蛋白融合物:人可溶性Klotho和小鼠血清白蛋白融合蛋白:人Klotho信号肽(粗斜体,始于MPAS (SEQ ID NO:116));人Klotho(无粗体或无斜体,始于EPGD (SEQ ID NO:117));接头(斜体,始于GSGG (SEQ ID NO:113));小鼠白蛋白(粗体,加下划线,始于LKEA (SEQ ID NO:114))

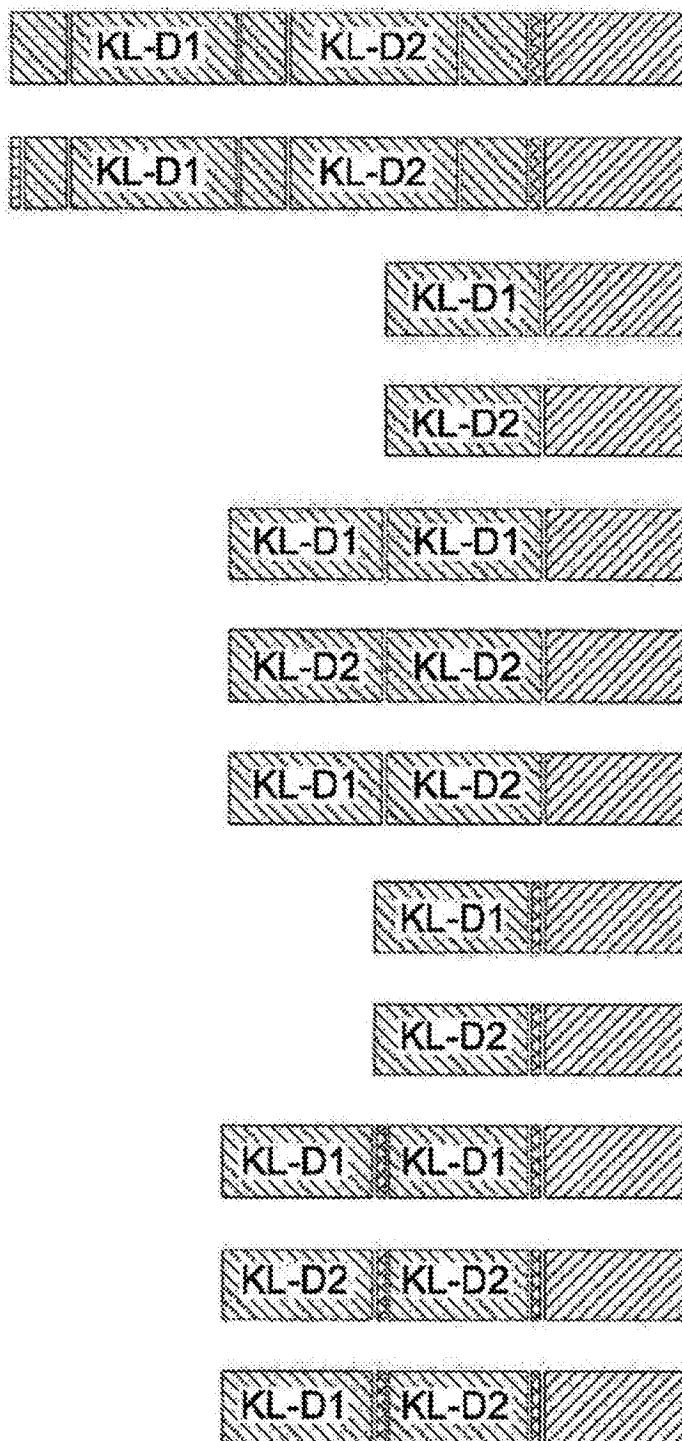
[0700]

MPASAPPRRRPRPPPSLSLLLVLLGLGGRRLRAEPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLEFQGTFFPDGFLWAVGSAAYQT
EGGWQQHKGKASIWDTFTHHPLAPPGDSRNASLPLGAPSPLOPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTHYRFSIS
WARVLPNGSAGVPNREGLRYRLLERLRELGVQPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDYAELCFRHF
GQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGRLLAPGIRGSPRLGYLVAHNLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWIN
PRRMTDHSIKECQKSLDFVLGWFAKPVFIDGDYPESMKNLSSILPDEFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLL
DPHMKFRQLESPLNRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWVSGTTKRDDAKYMYLKKFIMETLKAIKLDGVDVIGYT
AWSLMDGFWEHRGYSIRRGLFYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLIKNGFPPLPENQPLEGTFFPCDFAWGVVDNYI
QVDTTLSQFTDLNVYLWDVHHSKRLIKVDGVVTKKRKSYCVDFAAIQPQIALQEMHVTHFRFSLDWALILPLGNQ
SQVNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLLARQGAWENPYTALAFAEYARLCFQELGHVKKLW

[0701]

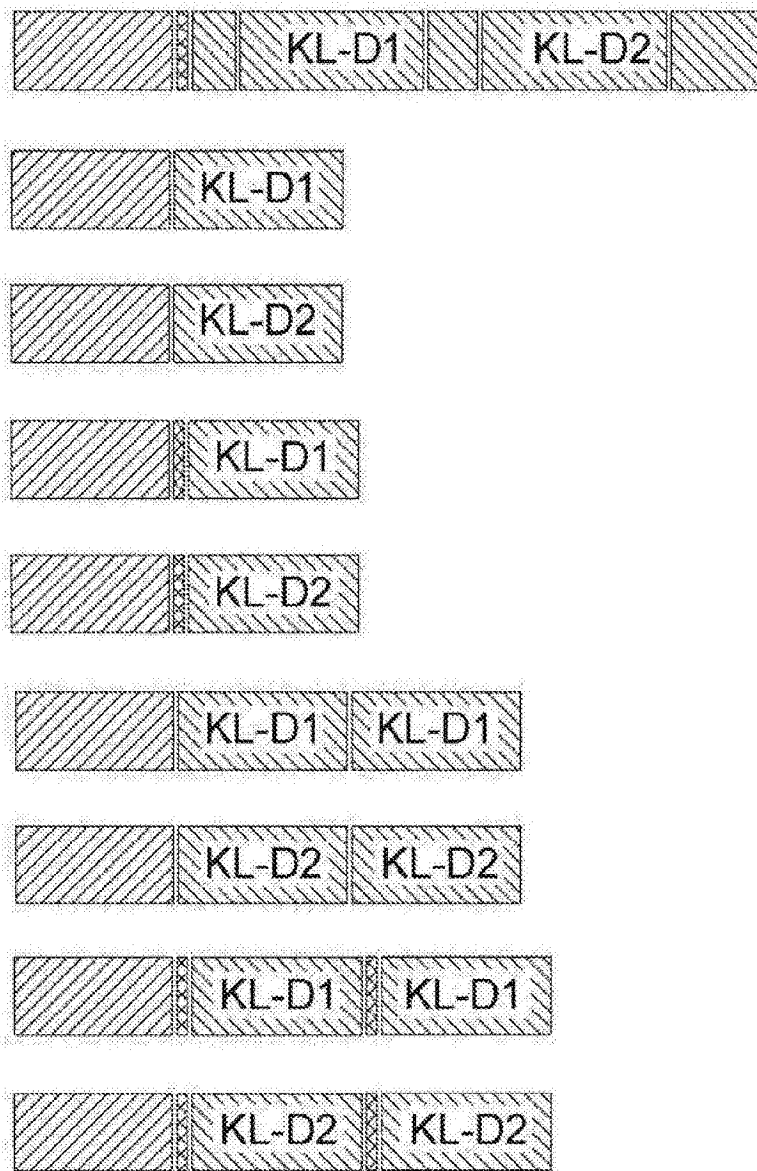
ITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHALAWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSSQKDKEVAERVLFEFDIGWL
AEPFIFGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLLPYFTEDEKKLIQGTDFDLALSHYTTILVDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDI
TWNLSPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPYIIISNGIDDGLHAEDDQLRVYMQNYINEALKAHILDGINLCGY
FAYSFNDRTAPRFGLYRYAADQFEPKASMKHYRKIIDSNGFPGPETLERFCPEEFTVCTECSFFHTRKSLGSGGGG
SGGGGSGGGGSLKEAHKSEIAHRYNALGEQHFKGLVLIAFSQYLQKASYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCD
KSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYL
HEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQEGERAFKAWA
VARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRALAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLS
EVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPP
ACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPED
QRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSICTLPEK
EKQIKKQTALAEVLKHKPKATAEQLKTVMDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRAKDALA (SEQ ID NO:

108)



▨ : Klotho (胞外结构域) 或者 Klotho 的活性片段 ;

▨ : FGF23 (R179Q), FGF23, FGF 19, FGF21; ▨ : 接头; ▨ : IgG 信号肽 ;



▨ : Klotho (胞外结构域) 或者 Klotho 的活性片段 ;

▨ : FGF23 (R179Q), FGF23, FGF 19, FGF21; ▨ : 接头; ▨ : IgG 信号肽 ;

图1

人Klotho核酸序列(NM_004795) (SEQ ID NO: 1) 蛋白质编码区: 9-3047

```

1  cgcgcagcat  gccgcgcagc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  cgcgcgcgtg
61  cgcgcgcgtg  ggcgcgcgtg  ggcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  cgcgcgcgcg
121  gccgcgcgcg  cgcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
181  agggcacctt  cccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
241  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
301  tggcaccccc  gggagacccc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
361  agccgcgcgc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
421  cgcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
481  ccaatggcag  cgcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
541  agcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
601  agcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
661  attacgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
721  acaaccccta  cgcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
781  ggggcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
841  tctggcgcgc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
901  taagctctca  cgcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
961  aatctctgga  cgcgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1021  ccgagagcat  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1081  agttcatcaa  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1141  aacttttgga  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1201  tttcctggat  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1261  ttgtctcagg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1321  tcatggaaac  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1381  ggtccctcat  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1441  atgttgactt  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1501  aaaaagctgat  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1561  catctccctg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1621  tgtctcagtt  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1681  ttaaagtggg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1741  tccagcccca  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1801  actgggcctt  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1861  actatcgttg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1921  ggcagcccat  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
1981  agaaccctta  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2041  gccatcacgt  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2101  gtgtgggcca  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2161  ttaggcatgc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2221  cctgcctctt  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2281  gctgggtggc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2341  tgaaccaaag  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2401  aggttacctt  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2461  aagaagatcc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2521  ggctcaactc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2581  ggctgaagtt  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2641  ggctgcagtc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2701  ctctcaagac  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2761  acgacgcgac  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2821  aggcacccat  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2881  ctctggaaag  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
2941  cccgaaagtc  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg
3001  ccccttatatt  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg  gccgcgcgcg

```



```

3061 tctatttcatt cattttgaaa taattatgca gacacatcag ctgttaacca tttgcacctc
3121 taagtgttgt gaaactgtaa atttcataca tttgacttct agaaaaacatt tttgtggctt
3181 atgacagagg ttttgaaatg ggcatagggtg atcgtaaaat attgaataat gcgaatagtg
3241 cctgaatttg ttctcttttt ggggtgattaa aaaactgaca ggcactataa tttctgtaac
3301 acactaacia aagcatgaaa aalaggaacc acaccaatgc aacatttggtg cagaaatttg
3361 aatgacaaga ttaggaatat tttctctctgc aocccacttct aaattttaatg tttttctgga
3421 agtagtaatt gcaagagttc gaatagaaaag ttatgtacca agtaaccatt tctcagctgc
3481 cataataatg cctagtggtt tccctctctgt caaatctagt ttccctatgga aaagaagatg
3541 gcagatacag gagagacgac agaggggtcct aggcctggaat gtccctttctg aaagcaatgc
3601 ttctatcaaa tactagtatt aatttatgta tctggttaat gacatacttg gagagcaaat
3661 tatggaaatg tgtattttat atgatttttg aggtcctgtc taaacctgtg gtccctgagg
3721 gatctgtctc actggcatct tgttgagggtc cttgcacata ggaaactttt gataagtatc
3781 tgcggaaaaa caaacatgaa tccctgtgata ttgggtctct caggaagcat aaagcaattg
3841 tgaaatacag tataccgcag tggctctagg tggaggaaaag gaggaaaaag tgcttattat
3901 gtgcaacatt atgattaatc tgattataca ccatttttga gcagatcttg gaatgaatga
3961 catgaccttt ccctagagaa taaggatgaa ataateactc attctatgaa cagtgcact
4021 actttctatt ctttagctgt actgtaattt ctttgagttg atagttttac aaattcttaa
4081 taggttcaaa agcaatctgg tctgaataac actggatttg tttctgtgat ctctgaggtc
4141 tatttttatgt ttttgcgtct acttctgtgg aagtagcttt gaactagttt tactttgaac
4201 tttcacgctg aaacatgcta gtgatatcta gaaagggtc attaggtctc atcccttaat
4261 gccccttaaa taagtcttgc tgattttcag acagggaagt ctctctatta cactggagct
4321 gttttataga taagtcataa ttgtatcagg caagataaac caatgtcata acaggcattg
4381 ccaacctcac tgacacaggg tcatagtgtg taataatata ctgtactata taatatatca
4441 tcttttagag tatgattttt tcatgaaaga taagcttttg gtaatatcca ttttaagtg
4501 cacttattaa aattggatgc tagagaatca agtttatttt atgtatatat ttttctgatt
4561 ataagagtaa tatatgttca ttgtaaaaat ttttaaaaca cagaaactat atgcaaagaa
4621 aaaataaaaa ttatctataa tctcagaacc cagaaatagc cactattaac atttctacg
4681 tattttatatt tacatagatc atattgtata tagttagtat ctttattaat ttttattatg
4741 aaactttcct ttgtcattat tagtcttcaa aagcatgatt tttaatagtt gttgagtatt
4801 ccaccacagg aatgtatcac aacttaaccg ttcccgtttg ttagactagt ttcttattaa
4861 tggtgatgaa tggtgtttta aaataatttt gttgctacat ttactttaat ttcttgact
4921 gtaaagagaa gtaattttgc tcttgataa agtattatat taataataaa tctgctgca
4981 actttttgco ttctttcata atc

```

Klotho氨基酸序列(NP_004786) (SEQ ID NO: 2)

```

1 MPASAPRRRP RPPPPSLSL LVLGLGGR LRAEPGDAQ TWARFSRPPA PEAAGLEQGT
61 FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHCKCASIW DTFTHHPLAP PGDSRNASLP LGAPSPLQPA
121 TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRLLERL
181 RELGVQPVVT LYHWDLPQRL QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP
241 YVVAWHGYAT GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGOVSIALSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAPK VFIDGDYPES MKNLSSILP DFTSEKKFI
361 KGTADFFALC FGPTLSEQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW IDLEFNHPQI FIVENGWFS
421 GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD
481 FLSQDKMLLP KSSALFYQKL IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ
541 FTDLNVYLWD VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THERFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL LARQGAWENP
661 YTALAFAEYA RLCEQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAC HNLLKAHALA WHVYNEKFRH
721 AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ
781 RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN
841 SPSQVAVVPW GLRKVENWLK FRKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS NGFPGPETLE
961 RCFPEEFTVC TECSFFHTRK SLLAFIAFLF FASTISLSLI FYYSKKGRS YK

```

β -Klotho 核酸序列(NM_175737) (SEQ ID NO: 3)
蛋白质编码区: 98-3232

```
1 atcctcagtc tcccagttca agctaatacat tgacagagct ttacaatcac aagctttttac
61 tgaagctttg ataagacagt ccagcagttg gtggcaaatg aagccaggct gtgcggcagg
121 atctccaggg aatgaatgga ttttcttcag caatgatgaa ataaccacac gctataggaa
181 tacaatgtcc aacgggggat tgcaaagatc tgatcatctg tcagcactta ttctgctacg
241 agctgttact ggattctctg gagatggaag agctatatgg tctaaaaatc ctaattttac
301 tccggtaaat gaaagtcagc tgtttctcta tgacactttc cctaaaaact ttttctgggg
361 tattgggaact ggagcattgc aagtgggaag gaggttggaag aaggatggaa aaggaccttc
421 tatatgggat catttcatcc acacacacct taaaaatgtc agcagcacga atggttccag
481 tgacagttat atttttctgg aaaaagactt atcagccctg gattttatag gattttcttt
541 ttatcaattt tcaatttctt ggccaaggct tttcccgat ggaatagtaa cagttgccaa
601 cgcaaaaggt ctgcagtact acagtaactt tctggacgct ctagtgtcta gaaaattga
661 acctatagtt accttatacc actgggattt gcctttggca ctacaagaaa aatatggggg
721 gtggaaaaat gataccataa tagatatctt caatgactat gccacatact gtttccagat
781 gtttggggac cgtgtcaaat attggattac aattcacac ccatacttag tggcttggca
841 tgggtatggg acaggtatgc atgccccctg agagaaggga aatttagcag ctgtctacac
901 tgtgggacac aacttgatca aggcctactc gaaagtgttg cataactaca acacacattt
961 cggccacact cagaagggtt ggttatcgat cagcttggga tctcattgga tctgacccaa
1021 ccggtcgcaa aacacgatgg atatatctca atgtcaacaa tccatgggtt ctgtcttggg
1081 atgggtttgc aacctatcc atggggatgg cgactatcca gaggggatga gaaagaagtt
1141 gttctccgtt ctacccaatt totetgaagc agagaagcat gagatgagag gcacagctga
1201 tttcttttgc ttttcttttg gacccaacaa cttcaagccc ctaaacacca tggctaaaat
1261 gggacaaaaa gtttcaacta atttaagaga agcgtgaac tggattaaac tggaaataca
1321 caacctctga atcttgattg ctgagaatgg ctggttcaca gacagtctgt tgaaaacaga
1381 agacaccacg gccatctaca tgatgaagaa tttcctcagc cagggtgctt aagcaataag
1441 gttagatgaa atacgagtggt ttggttatac tgcctggtct ctctgggatg gctttgaatg
1501 gcaggatgct tacaccatcc gcgaggattt attttatgtg gattttaaca gtaaacagaa
1561 agagcggaaa cctaagtctt cagcacacta ctacaaacag atcatcacag aaaatgggtt
1621 ttctttaaaa gagtccacgc cagatgtgca gggccagttt cctgtgactt tctctgggg
1681 tgtcaactgaa tetgttctta agcccgagtc tgtggtctcg tccccacagt tccagcatcc
1741 tcatctgtac gtgtggaacg ccactggcaa cagactgttg caccgagtgg aaggggtgag
1801 gctgaaaaaa cgacccgctc aatgcacaga ttttgtaaac atcaaaaaac aacttgagat
1861 gttggcaaga atgaaagtca cccactacgc gtttgctctg gattgggect cggctcttcc
1921 cactggcaac ctgtccgcgg tgaaccgaca ggccctgagg tactacaggt gcgtggtcag
1981 tgaggggctg aagcttggca tctcccgcat ggtcaccctg tattatccga cccacgcccc
2041 cctaggcctc cccgagcctc tgttgcatgc cgacgggtgg ctgaacccat cgacggccga
2101 ggcttccag gccacgctg ggtgtgtgtt ccaggagctg ggggaacctg tgaagctctg
2161 gatcaccatc aacgagccta accggctaag tgacatctac aaccgctctg gcaacgacac
2221 ctacggggcg gcgcacaacc tgetggtggc ccacgcccct gectggcgcc totacgaccg
2281 gcagttcagg ccctcacagc ggggggcgt gtgctgtctg ctgcaecgg actgggcgga
2341 aaccgccaac cctatgctg actgcactg gagggcgcc gagcgcttc tgcagttga
2401 gatgcctgg ttgcgcagc cgtcttctaa gacggggac taccgcggc coatgagga
2461 atacattgct tccaaagcac gaegggggtt ttccagctcg gccctgcgc gctcaccga
2521 ggccgaaaag aggcctgctc agggcacggt cgacttctgc gcgtcaaac acttcaccac
2581 taggttcgtg atgcacgagc agctggcgg cagccgctac gactcggaca gggacatcca
2641 gtttctgcag gadatcacc gccctgagct cccacgcgc ctggctgtga ttccctgggg
2701 ggtgcgcaag ctgctgcggt gggctcggag gaactacggc gacatggaca tttaacatca
2761 cgcagtggtc atgcacgacc aggcctctga ggatgaccgg ctccggaagt actacctagg
2821 gaagtacctt caggaggtgc tgaagcata cctgattgat aaagtcagaa tcaaaaggcta
2881 ttatgcattc aaactggctg aagagaaatc taaacccaga tttggattct tcaatctga
2941 ttttaaagct aaatcctcaa tacaatttta caacaaagt atcagcagca ggggcttccc
3001 ttttgagaac agtagttcta gatgcagtca gaccacagaa aatacagagt gcactgtctg
3061 cttattcctt gtgcagaaga aaccactgat attcctgggt tgttgcctct tctccacct
3121 ggttctaact ttatcaattg ccatttttca aaggcagaag agaagaaagt tttggaaagc
```

3181 aaaaaactta caacacatac cattaagaa aggcaagaga gtgttagct aaactgatct
3241 gtotgcatga tagacagttt aaaaattcat ccagttcc

β -Klotho氨基酸序列(NP_783864) (SEQ ID NO: 4)

1 mkpgcaagsp gnewiffstd eittryrntm sngglqrsvi lsallllrav tgfsgdgrai
61 wsknpnftpv nesqlflydt fpknffwgig tgalqvegsw kkdgkgpsiw dhfihtlkn
121 vstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlfp dgivtvanak glqyystlld
181 alvlrniepi vtlyhwdlpl alqekyggwk ndtiidifnd yatycfgmfg drvkywitih
241 npylvawbgv gtgmhapsek gnlaavytvg hnlikahskv whnynthfrp bqkgwlsitl
301 gshwiepnrs entmdifkcg qsmvsvlgwf anpihgddgy pegmrkkkfs vlpifseaek
361 hemrgtadff afsfgpnfk plntmakmgg nvslnlreal nwikleynnp riliaengwf
421 tdsrvktedf taiymknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglfy
481 vdfnskqker kpkssahyyk qiirengfsl kestdpvggq fpcdfswgvt esvlkpesva
541 sspqfsdphl yvwnatgnrl lhrvegvrk trpaqctdfv nikkglemla rmkvthyrf
601 ldwasvltg nlsavnrqal ryyrcvsvseg lklgisamvt lypthahlg lpeplihadg
661 wlpstaeaf gayaglcfe lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsqndtyg aahnllvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfktg
781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrlkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgv kllrwvrrny gdmidiyitas giddqaledd
901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrkgya fklaeekskp rfgfftsdfk akssigfynk
961 vissrgfpfe nsssrscqtg entectvclf lvqkkplfl gccffstlvl llsiaifqrq
1021 krrkfwkakn lqhiplkkkgk rvvs

人Klotho结构域1 (KL-D1)氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)

58 ggt
61 fpdgflwavg saayqteggw qghgkgasiw dtfthhplap pgdsrnaslp lgapsplqpa
121 tgdvasdsyn nvfrdtealr elgvthyrfis iswarvlpng sagvpnregl ryyrrillerl
181 relgvqpvt lyhwdlpqrl qdayggwanr aladhfrdya elcfrhfggq vkywitidnp
241 yvawhgyat grlapgirs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptq ggqvsialss
301 hwinprmt dhsiaceqksl dfvlgwafak vfidgdypes mknnlssilp dftesekkkfi
361 kgtadffaic fgptlsfql dphmkfrgle spnlrqlisw idlefnpqi fivengwfv
421 gttkrddaky myylkkfime tlkaikldgv dvigytawsl mdgfewhrgy sirrgifyvd
481 flsqdkmlp kssalfyqkl iekngf

人Klotho结构域2 (KL-D2)氨基酸序列(SEQ ID NO: 6)

517 gtfp cdfawgvvdn yiqvdttlsc
541 ftdlnvylwd vhhskrlikv dgvttkrks ycvdfaaiqp qiallgemhv thfrfslawa
601 lilplngsq vnhtilqyyr cmaselvrn itpvvalwqp mapnqglprl larcgawenp
661 ytalafaeya rlcfeqelghh vklwitmep ytrnmtysag hnllkahala whvnyekfrh
721 aqngkisial qadwiepacp fsqkdkevae rvlefdigwl aepifgsgdy pwvmrdwlnq
781 rnnflipyft edekklqgt fdflalshyt tilvdseked pikyndylev qemttditwn
841 spsqvavpw glrkvlwlik fkygdipmyi isngiddglh aeddqlrvyy mqnyinealk
901 ahildginlc gyfaysfndr taprfglyry aadqfepkas mkhyrkiids ngf

Klotho胞外结构域(无信号肽)氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)

28 epdgag twarfsrppa peaaglfqgt
61 fpdgflwavg saayqteggw qghgkgasiw dtfthhplap pgdsrnaslp lgapsplqpa
121 tgdvasdsyn nvfrdtealr elgvthyrfis iswarvlpng sagvpnregl ryyrrillerl
181 relgvqpvt lyhwdlpqrl qdayggwanr aladhfrdya elcfrhfggq vkywitidnp

```

241 yvvawhgyat grlapgirgs prlgylvahn lllahakvwh lyntsfrptq ggqvsialss
301 hwinprmtd hsihecqksl dfvlgwfkp vfidgdypes mknnlssilp dftesekkfi
361 kgtadffalc fgptlsfqll dphmkfrqle spnlrqllsw idlefhnbpqi fivengwfvv
421 gttkrddaky myylkkfime tlkaikldgv dvigytawsl mdgfewhrqy sirrglfyvd
481 flsqdkmlp kssalfyqkl iekngfpplp engplegtfp cdfawgvvdn yiqvdtllsq
541 ftdlnvylwd vhhskrlkv dgvvtkrks yovdfaaiqp qiallqembv thfrfslawa
601 lilplgogsq vnhtllqyyr cmaselvrva itpvvalwqp mapnqglprl larqgawenp
661 ytalafaeay rlcfgelghh vklwitmneq ytrnmtysag hnlkahlala whvynekfrh
721 aqngkisial qadwiepacp fsqkdkevas rvlef digwl aepifgsgdy pwvmdwlnq
781 rnnflipyft edekklqgt fdflalshyt tilvdseked pikyndylev qemtditwln
841 spsqvavvpw glrkvlwlv fkygdipmyi isngiddglh aeddqlrvyy mqnyinealk
901 ahildginlc gyfaysfndr taprfglyxy aadqfepkas mkhyrkiids ngfpgpetle
961 rfcpeeftvc tecsffhtrk sl

```

Klotho 信号肽氨基酸序列(SEQ ID NO: 8)

```
1 mpsapprrp rpppslsll llllglgrr ira
```

IgG 信号肽氨基酸序列(SEQ ID NO: 9)

```
1 msvltqvial lllwltgtre rrira
```

(Gly₄ Ser)₃ 多肽接头核酸 序列(SEQ ID NO: 10)

```
1 ggaggtggag gttcaggagg tggaggttca ggaggtggag gtcca
```

(Gly₄ Ser)₃ 多肽接头氨基酸序列(SEQ ID NO: 11)

```
1 GGGGSGGGGS GGGGS
```

(Gly₄ Ser) 多肽接头氨基酸序列(SEQ ID NO: 12)

```
1 GGGGS
```

(Gly) 多肽接头氨基酸序列(SEQ ID NO: 13)

```
1 G
```

(Gly Gly) 多肽接头氨基酸序列(SEQ ID NO: 14)

```
1 GG
```

(Gly Ser) 多肽接头氨基酸序列(SEQ ID NO: 15)

```
1 GS
```

(Gly₂ Ser) 多肽接头氨基酸序列(SEQ ID NO: 16)

```
1 GGS
```

(Ala)多肽接头氨基酸序列(SEQ ID NO: 17)

1 A

(Ala Ala)多肽接头氨基酸序列(SEQ ID NO: 18)

1 AA

**Klotho 信号肽-Klotho 胞外结构域-FGF23 (R179Q)
氨基酸序列(SEQ ID NO: 19)**

```

1 MPASAPPPRRP RPPPPSLSL LVLGLGLGRR LRAEPGDCAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGCW QQHKGASIW DTFTHHPLAP
101 PGDSRNASLP LCAPSPLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVFNREGL RYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGCGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFQCG VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS FRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFLGWFAKP VFIDGDYPES MKNLSSILP
351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPQLSFQLL DPHMKFRQL SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWTFV GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRCY SIRRGLEYVD FLSDQKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV TFRFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILOYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTALAFAYE RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
751 RVLEFDICWL AEPIFGSDY PWVMDWLNO RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSFFHTRK SLGSGGGGSG GCGSGGGGSL
1001 KYPNASPLL GSSWGSLIHL TATARNSYHL QIHKNGHVDG APHQTIIYSAL
1051 MIRSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPF YSQFLSKRNE IPLIHENTPI
1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTPAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

```

**IgG 信号肽-Klotho 胞外结构域-FGF23 (R179Q)
氨基酸序列(SEQ ID NO: 20)**

```

1 MSVLTQVLAL LLLWLTGLGG RRLRAEPGDG AQTWARFSRP PAPEAAGLFQ
51 GTFPDGFLWA VGSAAYQTEG GWQQHKGAS IWDTFTHHPL APPCDSRNAS
101 LPLGAPSPLQ PATGDVASDS YNNVFRDTEA LRELGVTHYR FSISWARVLP
151 NGSAGVFNRE GLRYRRLLE RLRELGVQPV VTLYHWDLPQ RLQDAYGCGWA
201 NRALADHFRD YALCFRHFQ GQVKYWITID NPYVVAWHGY ATCRLAPGIR
251 GSPRLGYLVA HNLLLAHAKV WHLYNTSFRP TQGGQVSIAL SSHWINPRRM
301 TDHSIKECQK SLDFVLGWEA KPVFIDGDYP ESMKNLSSI LPDFTSEKK
351 FIKGTADFFA LCFGPQLSFQ LLDPHMKFRQ LESPNLRQLL SWIDLEFNHP
401 QIFIVENGWF VSGTTKRDDA KYMYLKKFI METLKAIKLD GVDVIGYTAW
451 SLMDGFEWHR GYSIRRGLEY VDFLSQDKML LPKSSALFYQ KLIKNGFPF
501 LPENQPLEGT FPCDFAWGVV DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLI
551 KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI QPQIALLOEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ

```

```

601 SQVNHTILQY YRCMASELVR VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAWE
651 NPYTALAF AE YARLCFQELG HHVKLWITMN EPYTRNMTYS ACHNLLKAHA
701 LAWHVYNEKF RHAQNGKISI ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLEFDIG
751 WLAEPIFCSC DYPWVMRDWL NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ CTFDFLALSH
801 YTTILVDSEK EDPIKYNDYL EVQEMTDITW LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW
851 LKFKYGDLP YIISNGIDDG LHAEDDQLRV YYMQNYINEA LKAHILDGIN
901 LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY RYAADQFE PK ASMKHYRKII DSNGFPGPET
951 LERFCPEEFT VCTECSEFHT RKSLGSGGGG SGGGGSGGGG SELKYPNASPL
1001 LGSSWGGLIH LYTATARN SY HLQIHKNCHV DGAPHQTIYS ALMIRSEDAG
1051 FVVITGVMSR RYLCMDFR CN IFGSHYFDPE NCRFQHOTLE NGYDVYHSPQ
1101 YHFLVSLGRA KRAFLPGMNP PPYSQFLSRR NEIPLIHENT PIPRRHTQSA
1151 EDDSERDPLN VLKPRARMTP APASC SQELP SAEDNSPMAS DPLGVVRGR
1201 VNTHAGGTGP EGCRPF AKFI *

```

KL-D1-FGF23 (R179Q)氨基酸序列(SEQ ID NO: 21)

```

1 MPASAPRRP RPPPPSLSLL LVLLGLGGR LRAEPGDCAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAYG SAAYQTEGGW QOHGKGASIW DTFTHHPLAP
101 PGDSRNASLP LCAPSPLQPA TGDVASDSYN NVERDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVPNREG L RYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGCWANR ALADHERDYA ELCEPHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGWEAKP VFIDGDYPES MKNNSLSILP
351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWEVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGFWEHRGY SIRRGLEYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGSGG GSGGGGSGG GGSLLKYPNAS PLLGSSWGGL
551 IHLYTATARN SYHLQIHKN HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVVITGVM
601 SRRYLCMDFR GNIFGSHYFD PENC RFQHOT LENG YDVYHS PQYHFLVSLG
651 RAKRAFLPGM NPPPY SQFLS RRNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDDSERDP
701 LNVLKPRARM TPAPASC SQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT
751 GPEGCRPFAK FI*

```

KL-D2-FGF23 (R179Q)氨基酸序列(SEQ ID NO: 22)

```

1 MPASAPRRP RPPPPSLSLL LVLLGLGGR LPLPENQPLE GTFPCDFAWG
51 VVDNYIQVDT TLSQETDENV YLWDVHHSKR LIKVDGVVTK KRKSYCVDF A
101 AIQPCIALLEQ EMHVTHFRFS LDWALILPLG NQSQVNHTIL QYYRCMASEL
151 VRVNITPVVA LWQPMAPNQ LPRLLARQGA WENPYTALAF AEYARLCFQE
201 LGHHVKLWIT MNEPYTRNMT YSAGHNLKA HALAWHVYNE KFRHAQNGKI
251 SIALQADWIE PACPFSQKDK EVAERVLEFD IGWLAEPIFG SGDYPWVMRD
301 WLNQRNNFLL PYFTEDEKKL IQGTFDFLAL SHYTTILVDS EKEDPIKYND
351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFKYCDL PMYIISNCID
401 DGLHAEDDQL RVYYMQNYIN EALKAHILDG INLCGYFAYS FNDRTAPRFG
451 LYRYAADQFE PKASMKHYRK IIDSNGFPGP ETLERFCPEE ETVCTECSEF
501 HTRKSLGSGG GSGGGGSGG GGSLLKYPNAS PLLGSSWGGL IHLYTATARN
551 SYHLQIHKN HVDGAPHQTI YSALMIRSED AGFVVITGVM SRRYLCMDFR
601 GNIFGSHYFD PENC RFQHOT LENG YDVYHS PQYHFLVSLG RAKRAFLPGM
651 NPPPY SQFLS RRNEIPLIHF NTPIPRRHTQ SAEDDSERDP LNVLKPRARM
701 TPAPASC SQE LPSAEDNSPM ASDPLGVVRG GRVNTHAGGT GPEGCRPFAK
751 FI*

```

(KL-D1)₂-FGF23 (R179Q)氨基酸序列(SEQ ID NO: 23)

```

1 MPASAPRRP RPPPPSLSLL LVLLGLGGR LRAEPGDCAQ TWARFSRPPA

```

```

51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTTHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPFLQPA 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 MKNNLSSILP
351 DTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFROLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGSGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW
551 DTFTTHPLAP PGDSRNASLP LGAPSPFLQPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR
601 ELGVTHYRFS ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRLLERL RELGVQPVVT
651 LYHWDLPQRL QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP
701 YVVAWHGYAT GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ
751 GGQVSIALSS HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES
801 MKNNLSSILP DTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFROLE
851 SPNLRQLLSW IDLEFNHPQI FIVENGWFVS GTTKRDDAKY MYYLKKFIME
901 TLKAIKLDGV DVIGYTAWSL MDGFEWHRGY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP
951 KSSALFYQKL IEKNGFPPLP SGGGGSGGGG SGGGGSLKYP NASPLLSSW
1001 GGLIHLTYAT ARNSYHLQIH KNCHVDGAPH QTIYSALMIR SEDAGFVVIT
1051 GVMSRRYLCM DFRGNIFGSH YFDPENCRFQ HQTLENGYDV YHSPQYHFLV
1101 SLGRAKRAFL PGMNPPYSQ FLSRRENIPL IHENTPIPRR HTQSAEDDSE
1151 RDPLNVLPKR ARMTAPAPASC SQELPSAEDN SPMASDPLGV VRGGRVNTHA
1201 GGTGPEGCRP FAKFI*

```

(KL-D2)₂-FGF23 (R179Q)氨基酸序列(SEQ ID NO: 24)

```

1 MPASAPRRP RPPPSLSLL LVLLGLGGR LPLPENQPLE GTFPCDFAWG
51 VVDNYIQVDT TLSQFTDLNV YLWDVHHSKR LIKVDGVVTK KRKSYCVDF
101 AIQPIALLO EMHVTHFRFS LDWALILPLG NQSQVNHTIL QYYRCMASEL
151 VRVNITPVVA LWQPMAPNQG LPRLLARQGA WENPYTALAF AEYARLCFQE
201 LGHHVKLWIT MNEPYTRNMT YSAGHNLKA HALAWHVYNE KFRHAQNGKI
251 SIALQADWIE PACPFSQDKD EVAERVLEFD IGWLAEPFEG SGDYPWVMRD
301 WLNQRNNFLL PYFTEDEKKL IQCTFDLAL SHYTTILVDS EKEDPIKYND
351 YLEVQEMTDI TWLNSPSQVA VVPWGLRKVL NWLKFYGD LPMYIISNGID
401 DGLHAEDDQL RVYVMQNYIN EALKAHILDG INLCGYFAYS FNDRTAPRFG
451 LYRYAADQFE PKASMKHYRK IIDSNGFPGP ETLERFCPEE FTVCTECSEF
501 HTRKSLGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTLSQ FTDNLVYLWD VHHSKRLIKV
551 DGVVTKKRKS YCVDFAAIQP QIALLOEMHV THFRFSLDWA LILPLGNQSQ
601 VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL LARQGAWENP
651 YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG HNLLKAHALA
701 WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE RVLEFDIGWL
751 AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT FDFLALSHYT
801 TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW GLRKVLNWLK
851 FKYGDLPMYI ISNGIDDLH AEDDQLRVYV MQNYINEALK AHILDGINLC
901 GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS NGFGSGGGGS
951 GGGSGGGGS LKYPNASPLL GSSWGGLIHL YTATARNYSY LQIHKNCHVD
1001 GAPHQTIYSA LMIRSEDAGF VVITGVMSRR YLCMDFRGNI FGSYHFDPEN
1051 CRFQHQTLN GYDVYHSPQY HFLVSLGRAK RAFLPGMNPP PYSQFLSRRN
1101 EIPLIHENTP IPRRHQSAE DDSERDPLNV LKPRARMTA PASCSQELPS
1151 AEDNSPMASD PLGVVRGGRV NTHAGGTGPE GCRPFAKFI*

```

FGF23 (R179Q)-Klotho 胞外结构域氨基酸序列(SEQ ID NO: 25)

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN

```



```

51 YHLQIHKNKGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTLENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHEN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGC RVNTHAGGTG PEGCRPFKEF
251 IGSGGGGSGG GSGGGGSLK EPGDCAQTWA RFSRPPAPEA AGLEQGTFFD
301 GFLWAVGSAA YQTEGQWQCH GKGASIWDTF THHPLAPPGD SRNASLPLGA
351 PSPLQPATGD VASDSYNNVF RDTEALRELG VTHYRFSISW ARVLPNGSAG
401 VPNREGLRYY RRLERLREL GVQPVVTLYH WDLFQRLQDA YCGWANRALA
451 DHERDYAELC FRHFGGQVKY WITIDNPYVV AWHGYATGRL APGIRGSPRL
501 GYLVAHNLLL AHAKVWHLYN TSFRPTQGGQ VSIALSSHWI NFRMTDHSI
551 KECQSLDFV LGWFAKPVFI DGDPESMKN NLSSILPDEF ESEKFIKGT
601 ADFFALCFGP TLSFQLLDPH MKFRQLESPN LRQLLSWIDL EFNHPQIFIV
651 ENGWFVSGTT KRDDAKYMY LKKFIMETLK AIKLDGVDVI GYTAWSLMDG
701 FEWHRGYSIR RGLFYVDFLS QDKMLLPKSS ALFYOKLIEK NCFPLPENQ
751 PLEGTFPCDF AWGVVDNYIQ VDTTLSQFTD LNVYLWDVHH SKRLIKVDGV
801 VTKKRKSVCV DFAAIQPIA LLQEMHVTHF RPSLDWALIL PLCNQSQVNH
851 TILQYYRCMA SELVRVNITP VVALWQPMAP NQGLPRLLAR QCWENPYTA
901 LAFAEYARLC FQELCHHVKL WITMNEPYTR NMTYSAGHNL LKAHALAWHV
951 YNEKFRHAQN GKISIALQAD WIEPACPFSSQ KDEVAERVL EFDIGWLAEP
1001 IFGSGDYFWV MRDWNQQRN FLLPYFTEDE KKLIQGTFFD LALSHYTTIL
1051 VDSEKEDPIK YNDYLEVQEM TDITWLNPS QVAVVPWGLR KVLNWLKFKY
1101 GDLPYIISN GIDDGLHAED DQLRVYYMOW YINEALKAHI LDCINLCGYF
1151 AYSFNDRTAP RFGLYRYAAD QFEPKASKMH YRKIIDSNCF PGPETLERFC
1201 PEEFTVCTEC SFHTRKSL*

```

FGF23 (R179Q)-KL-D1 氨基酸序列(SEQ ID NO: 26)

```

1 MLGARERLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASF LLGSSWGGLI HLYTATARN
51 YHLQIHKNKGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTLENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHEN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGC RVNTHAGGTG PEGCRPFKEF
251 IQGTFFDGLF WAVGSAAYQT EGGWQQHCKG ASIWDTFTTH PLAPPGDSRN
301 ASLPLCAPSP LQPATGDVAS DSYNNVFRDT EALRELGVTH YRFSISWARV
351 LPNGSAGVPN REGLRYRRL LERLRELGVQ PVVTLYHWDL FQRLQDAYGG
401 WANRALADHF RYAELOFRH FGGQVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGRLAPG
451 IRGSPRLCYL VAHNLLLAHA KVVHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSSHWINPR
501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLCW FAKPVFIDGD YPESMKNLS SILPDEFTESE
551 KKFIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPHMKF RQLESPNLRQ LLSWIDLEFN
601 HPQIFIVENG WFSVGTTRKD DAKYMYLKK FIMETLKAIK LDCVDVIGYT
651 AWSLMDGFEW HRCYSIRREL FYVDFLSQDK MLLPKSSALF YQKLIKNGF
652 *

```

FGF23 (R179Q)-KL-D2 氨基酸序列(SEQ ID NO: 27)

```

1 MLGARERLWV CALCSVCSMS VLRAYPNASF LLGSSWGGLI HLYTATARN
51 YHLQIHKNKGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTLENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHEN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGC RVNTHAGGTG PEGCRPFKEF
251 IGTFFCDFAW GVVDNYIQVD TTLSQFTDLN VYLWDVHHSK RLKVDGVVT
301 KKRKSVCVDF AAIQPIALL QEMHVTHFRF SLDWALILPL GNQSQVNHTI
351 LQYYRCMASE LVRVNITPVV ALWQPMAPNQ GLPRLLARQG AWENPYTALA
401 FAEYARLCFQ ELGHHVKLWI TMNEPYTRNM TYSAGHNLK AHALAWHVYN
451 EKFRHAQNGK ISIALQADWI EPACPFSSQKD KEVAERVLEF DIGWLAEPF

```



```

501 GSGDYPWVMR DWLNQQRNNFL LPYFTEDEKK LIQGTDFDLA LSHYTTILVD
551 SEKEDPIKYN DYLEVQEMTD ITWLNPSQV AVVPWGLRKV LNWLKFKYGD
601 LPMYIISNGI DDGLHAEDDQ LRVYYMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
651 SFNDRTAPRF GLYRYAADQF EPKASKHYR KIIDSNGF*

```

FGF23 (R179Q) -(KL-D1)₂ 氨基酸序列(SEQ ID NO: 28)

```

1 MLGARLRWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNCH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGCTG PEGCRPFKAF
251 IQGTFFDGF L WAVGSAAYQT EGGWQOHGKG ASIWDTFTHH PLAPPGDSRN
301 ASLPLCAPSP LQPATGDVAS DSYNNVERDT EALRELCVTH YRFSISWARV
351 LPNGSAGVPM REGLRYRRL LERLRELCVQ PVVTLYHWDL PQLQDAYGG
401 WANRALADHF RYAEELCFRH FCGQVKYWIT IDNPYVVAWH GYATGR LAPG
451 IRGSPRLGYL VAHNLLLAHA KVWHLYNTSF RPTQGGQVSI ALSSHWINPR
501 RMTDHSIKEC QKSLDFVLCW FAKPVFIDGD YPESMKNNLS SILPDETESE
551 KKFIKGTADF FALCFGPTLS FQLLDPHMKF RQLESPNLRO LLSWIDLEFN
601 HPQIFIVENG WFSCTTKRD DAKYMYLKK FIMETLKAIK LDCVDVIGYT
651 AWSLMDGFEW HRGYSIRRG L FYVDFLSQDK MLLPKSSALF YQKLIKNGF
701 QGTFFDGF L WAVGSAAYQT EGGWQOHGKG ASIWDTFTHH LAPPGDSRNA
751 SLPLGAPSL QPATGDVAS DSYNNVERDT EALRELCVTH RFSISWARVL
801 PNGSAGVPMR EGLRYRRL L ERLRELCVQ PVVTLYHWDLP QRLQDAYGGW
851 ANRALADHFR DYAEELCFRH FCGQVKYWIT IDNPYVVAWHG YATGR LAPGI
901 RGSPLRGYLV AHNLLLAHA KVWHLYNTSF RPTQGGQVSI LSSHWINPRR
951 MTDHSIKEC Q KSLDFVLCWF AKPVFIDGDY PESMKNNLSS ILPDETESEK
1001 KFIKTADFF ALCFGPTLS FQLLDPHMKF RQLESPNLRL LSWIDLEFNH
1051 PQIFIVENGW FVSGTTKRD DAKYMYLKKF IMETLKAIKL DQVDVIGYTA
1101 WSLMDGFEWH RGYSIRRG L FYVDFLSQDK MLLPKSSALFY QKLIKNGF*

```

FGF23 (R179Q) -(KL-D2)₂ 氨基酸序列(SEQ ID NO: 29)

```

1 MLGARLRWV CALCSVCSMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNs
51 YHLQIHKNCH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
101 NIFGSHYFDP ENCRFQHQTl ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
151 PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
201 PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGCTG PEGCRPFKAF
251 IGTFPCDFAW GVVDNYIQVD TTLSQFTDLN VYLWDVHHSK RLIKVDGVVT
301 KKRKSYCVDF AAIQPQIAL QEMHVTHFRF SLDWALILPL GNQSQVNHTI
351 LQYYRCMASE LVRVNITPVV ALWQPMAPNQ GLPRLLARQG AWENPYTALA
401 FAEYARLCFQ ELGHVHKLWI TMNEPYTRNM TYSAGHNLK AHALAWHVYN
451 EKFRHAQNGK ISIALQADWI EPACPFQSKD KEVAERVLEF DIGWLAEPIF
501 GSGDYPWVMR DWLNQQRNNFL LPYFTEDEKK LIQGTDFDLA LSHYTTILVD
551 SEKEDPIKYN DYLEVQEMTD ITWLNPSQV AVVPWGLRKV LNWLKFKYGD
601 LPMYIISNGI DDGLHAEDDQ LRVYYMQNYI NEALKAHILD GINLCGYFAY
651 SFNDRTAPRF GLYRYAADQF EPKASKHYR KIIDSNGF* FPCDFAWGVV
701 DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLL KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI
751 QPQIALLOEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ SQVNHTILQY YRCMASELVR
801 VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAWE NPYTALAF AE YARLCFOELG
851 HHVKLWITMN EPYTRNMTYS AGHNLK AHA LAWHVYNEKF RHAQNGKISI
901 ALQADWIEPA CPFQSKDKEV AERVLEFDIG WLAEPFGSG DYPWVMRDWL
951 NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ GTDFDLALSH YTTILVDSEK EDPIKYN DYL
1001 EVQEMTDITW LNPSQVAVV PWGLRKVLNW LKFKYGD LPM YIISNGIDDG
1051 LHAEDDQLRV YYMQNYINEA LKAHILDGIN LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY
1101 RYAADQFEPK ASMKHYRKII DSNF*

```

FGF19核酸序列(NM_005117) (SEQ ID NO: 30)**蛋白质编码区 (464-1114)**

```

1  gctcccagcc aagaacotcg gggccgctgc gcggtgggga ggagttcccc gaaacccggc
61  cgctaagcga ggccctccctc tcccgcagat ccgaacggcc tgggcggggg cccccggct
121  gggacaagaa gccgcgcgct gcctgcccgg gcccggggag ggggctgggg ctggggccgg
181  aggcgggggt tgagtgggtg tgtgccccgg gcggaggctt gatgcaatcc cgataagaaa
241  tgctcgggtg tcttgggcac ctaccctgtg ggcctcgtta gcgtactatc ataaggctgc
301  cggcccgag cgcgcgcgct gtcagagcag gagecgtgcg tccaggatct agggccacga
361  ccatcccaac ccggcactca cagccccgca gcgcattccc gtcgcgcgcc agcctcccgc
421  acccccattc cgggagctgc gccgagagcc ccaggagggt gccatgcgga gcgggtgtgt
481  ggtggtccac gtatggatcc tggccggcct ctggctggcc gtggccgggc gccccctcgc
541  cttctcggac gcggggcccc acgtgcacta cggctggggc gaccccattc gcctgcggca
601  cctgtacacc tccggccccc acgggctctc cagctgcttc ctgcgcattc gtgcgcacgg
661  cgtcgtggac tgcgcgcggg gccagagcgc gcacagtctt ctggagatca aggcagtcgc
721  tctgcggacc gtggccatca agggcgtgca cagcgtgcgg tactcttgca tgggcgcgga
781  cggcaagatg caggggctgc ttcagtactc ggaggaagac tgtgctttcg aggaggagat
841  ccgcccagat ggctacaatg tgtaccgacc cgagaagcac cgcctcccgg totcccigag
901  cagtgcacaa cagcggcagc tgtacaagaa cagaggcttt ctccactctc ctcatcttct
961  gcccatgctg cccatggctc cagaggagcc tgaggacctc aggggcccac tggaaatctg
1021  catgttctct tcgccccctg agaccgacag catggaccca tttgggcttg taccggactc
1081  ggaggccgtg aggagtccca gctttgagaa gtaactgaga ccattgcccc gctctctcac
1141  tgctgcacag ggctgtggta cctgcagcgt gggggacgtg cttctacaag aacagtcctg
1201  agtcacagtt ctgttttagc ttaggaagaa acatctagaa gttgtacata ttcagagttt
1261  tccattggca gtgccagttt ctagccaata gaattgtctg atcataacat tgtaagcctg
1321  tagcttgccc agctgctgcc tgggccccca ttctgctccc tcgaggttgc tggacaagct
1381  gctgcactgt ctcagttctg cttgaatacc tccatcgatg gggaaactca ttcctttgga
1441  aaaattctta tgtcaagctg aaattctcta atttttctc atcaactccc caggagcagc
1501  cagaagacag gcagtagttt taatttcagg aacagggtat ccactctgta aaacagcagg
1561  taaatttcac taaaccccat gtgggaattg atctatatct ctacttccag ggaccatttg
1621  cccttcccaa atccctccag gccagaactg actggagcag gcattggcca ccaggcttca
1681  ggagtagggg aagcctggag ccccaactca gccctgggac aacttgagaa ttccccctga
1741  ggccagttct gtcattggat cctgctgagc aataacttgc tgtcccggtg taccctgctt
1801  ccattctcca cccaccagc cctctgccc cctcacatgc ctccccatgg attggggcct
1861  ccaggcccc ccaccttatg tcaacctgca cttcttgttc aaaaatcagg aaaagaaaag
1921  atttgaagac cccaagtctt gtcaataact tgcgtgtgtg aagcagcggg ggaagacctc
1981  gaacccttct cccagcactt ggttttccaa catgatattt atgagtaatt tattttgata
2041  tgtacatctc ttattttctt acattattta tgcctccaaa ttatatttat gtatgtaagt
2101  gaggtttgtt ttgtatatta aaatggagtt tgtttgtaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

FGF19氨基酸序列(NP_005108) (SEQ ID NO: 31)

```

1  MRSGCVVHVH WILACLWLAV AGRPLAFSDA GPHVHYGWCD FRLRLHLYTS GPHCLSSCFL
61  RIRADGVVDC ARQSAHSLL EIKAVALLRTV AIKGVHSVRY LCMGADGKMQ GLLQYSEEDC
121  AFEEEIRPDC YNVYRSEKHR LPVSLSSAKQ RQLYKNRGFL PLSHFLPMLP MYPEEPEDLR
181  GHLESDFSS PLETDSMDFF GLVTGLEAVR SPSEFK

```

FGF21核酸序列(NM_019113) (SEQ ID NO: 32)**蛋白质编码区151-780**

```

1  CTGTCAAGCTG AGGATCCAGC CGAAAGAGGA GCCAGGCACT CAGGCCACCT GAGTCTACTC
61  ACCTGGACAA CTGGAATCTG GCACCAATTC TAAACCACTC AGCTTCTCCG AGCTCACACC
121  CCGGAGATCA CCTGAGGACC CGAGCCATTG ATGGACTCGG ACSAGACCGG GTTCGAGCAC

```

```

181 TCAGGACTGT GGGTTTCTGT GCTGGCTGGT CTTCTGCTGG GAGCCTGCCA GGCACACCCC
241 ATCCCTGACT CCAGTCCTCT CCTGCAATTC GGGGGCCAAG TCCGGCAGCG CTACCTCTAC
301 ACAGATGATG CCCAGCAGAC AGAAGCCAC CTGGAGATCA GGGAGGATGG GACGGTGGGG
361 GCGCTGCTG ACCAGAGCCC CGAAAGTCTC CTGCAGCTGA AAGCCTTGAA CCCCCAGTT
421 ATTCAAATCT TGGGAGTCAA GACATCCAGG TTCTGTGCC AGCGGCCAGA TGGGGCCCTG
481 TATGGATCGC TCCACTTTGA CCCTGAGGCC TGCAGCTTCC GGGAGCTGCT TCTTGAGGAC
541 GGATACAATG TTTACCAATC CGAAGCCAC GGCCTCCCGC TGCACCTGCC AGGGAACAAG
601 TCCCCACACC GGGACCCTGC ACCCCGAGGA CCAGCTCGCT TCCTGCCACT ACCAGCCCTG
661 CCCCCCGCAC TCCCCGAGCC ACCCGGAATC CTGGCCCCCC AGCCCCCGA TGTGGCTCC
721 TCGCACCTTC TGACCATGCT GGGACCTTCC CAGGCCCCAA CCCCAGCTA CGCTTCCTGA
781 AGCCACAGGC TGTTTACTAT GACATCTCCT CTTTATTTAT TAGGTTATTT ATCTTATTTA
841 TTTTCTTATT TTTCTTACTT GAGATAATAA AGACTTCCAG AGCAGAAAAA AAAAAAAA
901 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

FGF21氨基酸序列(NP_061986) (SEQ ID NO: 33)

```

1 MDSDETGFEH SCLWVSVLAC LLLGACQAHF IPDSSPLLQF GGQVRQRYLY TDDAQQTEAH
61 LEIREDGTVG GAADQSPESL LQLKALKPGV IQILGVKTSR FLCQRPDGL YGSLHFDPEA
121 CSFRELLLED GYNVYQSEAH GLPLHLPGNK SPHRDPAPRG PARFLPLPGL PPALPEPPGI
181 LAPQPPDVGS SDPLSMVGPS QGRSPSYAS

```

FGF23核酸序列(NM_020638) (SEQ ID NO: 34)

蛋白质编码区 147-902

```

1 cggcaaaaag gaggggaatcc agtctaggat cctcacacca gctacttgcg aggggagaagg
61 aaaaggccag taaggcctgg gccaggagag tcccgcacagg agtgtcaggt ttcaatctca
121 gcaccagcca ctacagagcag ggcacgatgt tgggggcccg cctcaggctc tgggtctgtg
181 ccttgtgcag cgtctgcagc atgagcgttc tcagagccta tcccaatgoc tcccactgc
241 tcggctccag ctggggtggc ctgatccacc tgtacacagc cacagccagg aacagctacc
301 acdtgcagat ccacaagaat ggccatgttg atgggcgacc ccatcagacc atctacagtg
361 ccctgatgat cagatcagag gatgctggct ttgtggtgat tacagggtgt atgagcagaa
421 gatacctctg catggatttc agaggcaaca tttttggatc acactatttc gacccggaga
481 actgcagggt ccaacaccag acgctggaaa acgggtacga cgtctaccac tctctcagt
541 atcacttctt ggtagctctg ggccggggcg agagagcctt cctgccaggc atgaaccac
601 ccccgtaact ccagttcctg tcccggagga acgagatccc cctaattcac tccaacacce
661 ccataccacg gcggcacacc cggagcgccg aggacgactc ggagcgggac cccctgaacg
721 tgetgaagcc cggggcccgg atgaccccgg ccccggcctc ctgttcacag gagctccoga
781 gcgccgagga caacagcccg atggccagtg acccattagg ggtggtcagg ggcggtcag
841 tgaacacgca cgtgggggga acgggcccgg aaggctgccc ccccttcgce aagttcatct
901 agggctgctg gaagggcacc ctctttaacc catccctcag caaacgcagc tottcccaag
961 gaccaggctc cttagcgttc cgaggatggg aaagggtgaca ggggcagtga tgggaatttgc
1021 tgcttctctg ggggtccctt cacaggaggt cctgtgagaa ccaacctttg agggcccaagt
1081 catgggggtt caccgccttc ctcaactccat atagaacacc ttcccaataa ggaaacccca
1141 acaggtaaac tagaaatttc cccttcattg aggtagagag aaggggtctc tcccaacata
1201 tttctcttcc ttgtgectct cctctttatc acttttaagc ataaaaaaa aaaaaaaa
1261 aaaaaaaa aaaagcagtg ggttctctgag ctcaagactt tgaagggtga ggggaaggga
1321 aatcggagat ccagaagct tctccactgc cctatgcatt tatgttagat gcccagatcc
1381 cactggcatt tgagtgtgca aaccttgaca ttaacagctg aatggggcaa gttgatgaaa
1441 acactacttt caagccttcg ttcttctctg agcatctctg gggaagagct gtcaaaagac
1501 tgggtgtagg ctggtgaaaa cttagacagct agacttgatg ctgtctgaaa tgaggcagga
1561 atcataatag aaaactcagc ctccctacag ggtgagcacc ttctgtctcg ctgtctccct
1621 ctgtgcagcc acagccagag ggcccagaat ggcccactc tgttcccaag cagtctcatga
1681 tacagcctca ctttttgcc ccatctctgg tttttgaaaa tttgtctaaa ggaataaata
1741 gcttttacac tggctcacga aaatctgccc tgetagaatt tgcttttcaa aatggaaata
1801 aattccaact ctctaagag gcatttaatt aagctctac ttccagggtg agtaggaatc

```

```

1861 cattctgaac aaactacaaa aatgtgactg ggaagggggc tttagagagac tgggactgct
1921 ctgggttagg tttctgtgg actgaaaaat cgtgtccttt tctotaaatg aagtggcatc
1981 aaggactcag ggggaaagaa atcaggggac atgttataga agttatgaaa agacaaccac
2041 atggtcaggc tctgtctgt ggtctctagg gctctgcagc agcagtggct cttcgattag
2101 ttaaaactct cctaggctga cacatctggg tctcaatccc cttggaaaat cttgggtgat
2161 taaatgaagc cttaccccat tactgcggtt cttcctgtaa gggggctcca ttttctccc
2221 tctctttaaa tgaccaccta aaggacagta tatlaacaag caaagtcgat tcaacaacag
2281 cttcttccca gtcacttttt tttttctcac tgccatcaca tactaacctt atactttgat
2341 ctattctttt tggttatgag agaaaatgtt ggcaactglt ttacctgat ggttttaagc
2401 tgaacttgaa ggactggte ctattctgaa acagtataac tatgtataat agtatatagc
2461 catgcattggc aaatatttta atattctgtt tttcatttcc tgttggaat attactctgc
2521 ataatagcta ttggaggctc ctcagtgaag gatcccaaaa ggatttttgt ggaactag
2581 ttgtaatctc acaaaactcaa cactaccatc aggggttttc tttatggcaa agccaaaata
2641 gctcctacaa tttcttatat cctcgtcat gtggcagtat ttatttattt atttgaagt
2701 ttgctatccc ttctatattt atagatatatt ataaaaatgt aacctttttt tctttcttc
2761 tgttttaaaat aaaaataaaa ttatctcag cttctgttag cttatctctt ttgtagtact
2821 acttaaaagc atgtcggaa atagaataaa aaaggattat gggaggggaa cattagggaa
2881 atccagagaa ggcaaaattg aaaaaagat tttagaattt taaaattttc aaagatttct
2941 tccattcata aggagactca atgattttta ttgattotaga cagaattatt taagttttat
3001 caatattgga tttctggt

```

FGF23氨基酸序列(NP_065689) (SEQ ID NO: 35)

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S YHLQIHKNHG
61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIEGSHYFDP ENCRFQHQL
121 ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241 PEGCRPFAKF I

```

FGF23 (R179Q)氨基酸序列(SEQ ID NO: 36)

```

1 MLGARLRLWV CALCSVCMS VLRAYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN S YHLQIHKNHG
61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIEGSHYFDP ENCRFQHQL
121 ENGYDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG
241 PEGCRPFAKF I

```

人 β -Klotho 结构域1 (h-KL-D1)氨基酸序列(SEQ ID NO: 37)

```

77 ydt fpknffwgig tgalqvegs w kkdgkgsiw dhfihthlkn
121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyg fsiswprlfp dgivtvanak glqyystlld
181 alvlrniepi vtlyhwdipl algekyggwk ndtiidifnd yatycfmgf drvkywiti
241 npylvawhgy gtgmhapgek gnlaavytvq hnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
301 gshwiepnrs entmdifkeq gsmvsvlgwf anpihgdydy pegmrklfs vlpifseak
361 hemrgtadff afsfgpnfk plntmakmgq nvslnlreal nwikleynnp riliaengwf
421 tdsrvktedt taiymknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglly
481 vdfnskqker kpkssahyyk qiirengf

```

人 β -Klotho 结构域2 (h-KL-D2)氨基酸序列(SEQ ID NO: 38)

```

571 trpaqctdfv nikkglemla rmkvthyrf
601 ldwasviptg nlsavnrgal ryyrcvsvseg lklgisamvt lyyptahlig lpepiihadg
661 wlnpstaeaf qayaglcfcg lgdlvklwit inepnrldi ynrsqndtyg aabnllvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl sihadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfktg

```

```

781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrllkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrlsept rlavipwgvr kllrwvrrny gdm diyitas giddgaled
901 rlrkyylgky lgevikayli dkvrkgyya fklaeekskp rfgfftsdfk akssiqfynk
961 vissrgf

```

β -Klotho 胞外结构域(无信号肽)氨基酸序列(SEQ ID NO: 39)

```

52                                     gfsdgrai
61 wsknpnftpv nesqlflydt fpknffwgig tgalqvegsw kkdgkpsiw dhfihthlkn
121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlfp dgivtvanak glqyystlld
181 alvlrniepi vtlyhwdlpl algekyggwk ndtiidifnd yatycfmgf drvkywiti
241 npylvawhgy gtgmhapsek golaavytvg hnlikahskv whnynthfrp hqkgwlsitl
301 gshwiepnrs entmdifkcg qsmvsvlgwf anpihgdydy pegmrklfs vlpifseaek
361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakngq nvslnlreal nwikleynnp riliaengwf
421 tdsrvktedt taiymknfl sgylqairld eirvfgytaw slldgfewqd aytirrglly
481 vdfnskqker kpkssahyyk qilrengfsl kestpdvqqg fpcdfswgvt esvlkpesva
541 sspqfsdphl yvwnatgnrl lhrvegvrk trpaqctdfv nikkglemla rmkvthyrf
601 ldwasvlptg nlsavnrqal ryyrcvwsq lklgisamvt lyyptahalg lpeplihadg
661 wlnpstaef gayaglcfe lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsndtyg aahnllvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl shadwaepa npyadshwa aerflopeia wfaepflktg
781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrllkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrlsept rlavipwgvr kllrwvrrny gdm diyitas giddgaled
901 rlrkyylgky lgevikayli dkvrkgyya fklaeekskp rfgfftsdfk akssiqfynk
961 vissrgfpfe nssrcsqtg entectvcif lvqkkpl

```

sKlotho 无信号肽-FGF23 氨基酸序列(无信号肽) (SEQ ID NO: 40)

```

51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGCW QQHCKGASIW DTFTTHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLOPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGGWANR ALADHFRDYA ELCFRHFGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
351 DFTSEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFSV GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGFWEHRCY SIKRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLIKV DGVVTKRRKS YCVDFAAIQP QIALLQEMHV THFRFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTAFAFAEYA RLCFOELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
751 RVLEFDIGWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYFT EDEKKLIQGT
801 EDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
951 NGFPGPETLE RFCPEFTVC TECSPFHTRK SLCSGGGCSG CCGSCGGCSL
1001 KYPNASPLLQ SSWGGLIHLY TATARNSYHL QIHKNHVDG APHQTIYSAL
1051 MIRSEDACFV VITGVMSRRY LCMDFRGNI F GSHYFDPENC RFQHQTLENG
1101 YDVYHSPQYH FLVSLGRAKR AFLPGMNPPP YSQFLSRANE IPLIHENTPI
1151 PRRHTRSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
1201 LGVVRGCRVN THAGGTGPEG CRPPAKFI*

```

sKlotho无信号肽-FGF23(R179Q)(无信号肽)氨基酸序列 (SEQ ID NO: 41)

```

EPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHKGASIW DTFTHHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLOPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRES
151 ISWARVLPNG SAGVPNREGL RYYRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGCWANR ALADHFRDYA ELCFRHFEGGQ VKYWITIDNE YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLGYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ GGQVSIALSS
301 HWINPRMTD HSIKECQKSL DEVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNLSSILP
351 DTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWEVS GTTKRDDAKY MYYLKKEIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYTAWSL MDGFEWHRCY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFP CDFAWGVVDN YIQVDTTLSQ FTDLNVYLWD
551 VHHSKRLIKV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQF QIALLQEMHV THFRFSLEWA
601 LILPLCNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITPVVALWQP MAPNOGLPRL
651 LAPQCAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDEKVAE
751 RVLEFDICWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYET EDEKKLIQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDCINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIIDS
951 NGFPGPETLE RFCPEEFTVC TECSEFFHTRK SLGSGGGGSG GCGSGGGGSL
1001 KYPNASPLLG SSWGGLIHLY TATARNHYHL QIHKNGHVDG APHQTIYSAL
1051 MIRSSEDAGFV VITGVMSRRY LCMDFRGNIF GSHYFDPENC RFQHQTLENG
1101 YDVYHSPQYH FLVSLGAKR AFLPGMNPFF YSQFLSRBNE IPLIHNTPI
1151 PRRHTQSAED DSERDPLNVL KPRARMTAP ASCSQELPSA EDNSPMASDP
1201 LGVVRGGRVN THAGGTGPEG CRPFAKFI*

```

FGF23无信号肽(SEQ ID NO:42)

```

YPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNY YHLQIHKNGH
61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
121 ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGCTG
241 PEGCRPFAPK I

```

FGF23(R179Q)无信号肽(SEQ ID NO:43)

```

YPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARNY YHLQIHKNGH
61 VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL
121 ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS
181 AEDDSERDPL NVLKPRARMT PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGCTG
241 PEGCRPFAPK I

```

具有Klotho信号肽的sKlotho(SEQ ID NO:44)

```

1 MPASAPPPRRP RPPPPSLSL LVLGLGLGRR LRAEPGDGAQ TWARFSRPPA
51 PEAAGLEFQGT FPDGFLWAVG SAAYQTEGGW QQHGKGASIW DTFTHHPLAP
101 PGDSRNASLP LGAPSPLOPA TGDVASDSYN NVFRDTEALR ELGVTHYRFS
151 ISWARVLENG SACVPNREGI RYYRRLLERL RELGVQPVVT LYHWDLPQRL
201 QDAYGCWANE ALADHFRDYA ELCEFRHEGGQ VKYWITIDNP YVVAWHGYAT
251 GRLAPGIRGS PRLCYLVAHN LLLAHAKVWH LYNTSFRPTQ CGQVSIALSS
301 HWINPRRMTD HSIKECQKSL DFVLGWFAKP VFIDGDYPES MKNNLSSILP
351 DTTESEKKFI KGTADFFALC FGPTLSFQLL DPHMKFRQLE SPNLRQLLSW
401 IDLEFNHPQI FIVENGWFSV GTTKRDDAKY MYLKKFIME TLKAIKLDGV
451 DVIGYPAWSL MDGFEWHRCY SIRRGLFYVD FLSQDKMLLP KSSALFYQKL
501 IEKNGFPPLP ENQPLEGTFF CDFAWGVVDN YIQVDTTSLQ FTDLNVYLWD
551 VHHSKRRLIRV DGVVTKKRKS YCVDFAAIQF QIALLOEMHV THERFSLDWA
601 LILPLGNQSQ VNHTILQYYR CMASELVRVN ITFVVALWQP MAPNQGLPRL
651 LARQGAWENP YTALAFAEYA RLCFQELGHH VKLWITMNEP YTRNMTYSAG
701 HNLLKAHALA WHVYNEKFRH AQNGKISIAL QADWIEPACP FSQKDKEVAE
751 RVLEFDICWL AEPIFGSGDY PWVMRDWLNQ RNNFLLPYET EDEKKLIQGT
801 FDFLALSHYT TILVDSEKED PIKYNDYLEV QEMTDITWLN SPSQVAVVPW
851 GLRKVLNWLK FKYGDLPMYI ISNGIDDGLH AEDDQLRVYY MQNYINEALK
901 AHILDGINLC GYFAYSFNDR TAPRFGLYRY AADQFEPKAS MKHYRKIDS
951 NGFPGPETLE RCPPEEFTVC TECSFFHTRK SL

```

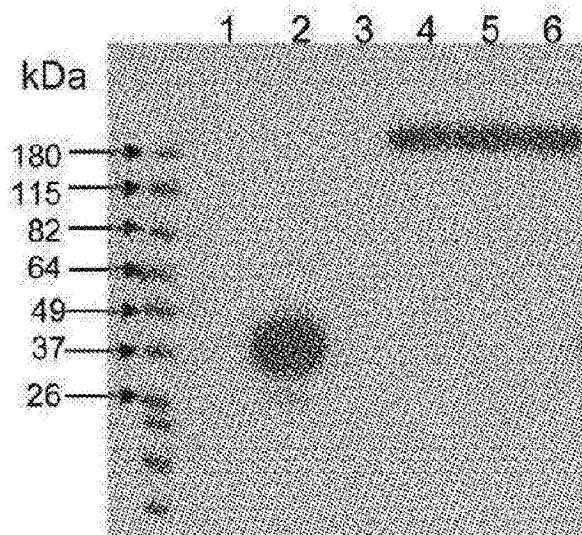
具有IgG信号肽的sKlotho(SEQ ID NO:45)

```

1 MSVLTQVLAL LLLWLTGLGG RRLRAEPGDG AQTWARFSRP PAPEAAGLEFQ
51 GTFPDGFLWA VCSAAYQTEG CWQQHGKGAS IWDFTTHHPL APPGDSRNAS
101 LPLGAPSPLO PATGDVASDS YNNVFRDTEA LRELGVTHYR FSISWARVLP
151 NGSAGVPNRE GLFYRRLLLE RLRELGVQPV VTLYHWDLPQ RLQDAYGCWA
201 NRALADHFRD YAELEFRHFG GQVKYWITID NPYVVAWHGY ATGRLAPGIR
251 GSPRLGYLVA HNLLAHAKV WHLYNTSFRP TQGGQVSIAL SSHWINPRRM
301 TDHSIRECQK SLDVFLGWFA KPVFIDGDYP ESMKNNLSSI LPDFTESEKK
351 FIKGTADFFA LCFGPTLSFQ LLDPHMKFRQ LESFNLEQLL SWIDLEFNHP
401 QIFIVENGWF VSGTTKRDDA KYMYLKKFI METLKAIKLD GVDVIGYTAW
451 SLMDGFEWHR GYSIRRGLFY VDFLSQDKML LPKSSALFYQ KLIKNGFPP
501 LPENQPLEGT FPCDFAWGVV DNYIQVDTTL SQFTDLNVYL WDVHHSKRLI
551 KVDGVVTKKR KSYCVDFAAI QPQIALLOEM HVTHFRFSLD WALILPLGNQ
601 SQVNHTILQY YRCMASELVR VNITPVVALW QPMAPNQGLP RLLARQGAWE
651 NPYTALAFAE YARLCFQELG HHVKLWITMN EPYTRNMTYS AGHNLLKAHA
701 LAWHVYNEKF RHAQNGKISI ALQADWIEPA CPFSQKDKEV AERVLEFDIG
751 WLAEPFGSCG DYPWVMRDWL NQRNNFLLPY FTEDEKKLIQ GTFDFLALSH
801 YTTILVDSEK EDPIKYNDYL EVQEMTDITW LNSPSQVAVV PWGLRKVLNW
851 LKFKYGDLPY YIISNGIDDG LHAEDDQLRV YMQNYINEA LKAHILDGIN
901 LCGYFAYSFN DRTAPRFGLY RYAADQFEPK ASMKHYRKII DSNFGPGPET
951 LERFCPEEFT VTECSFFHT RKSL*

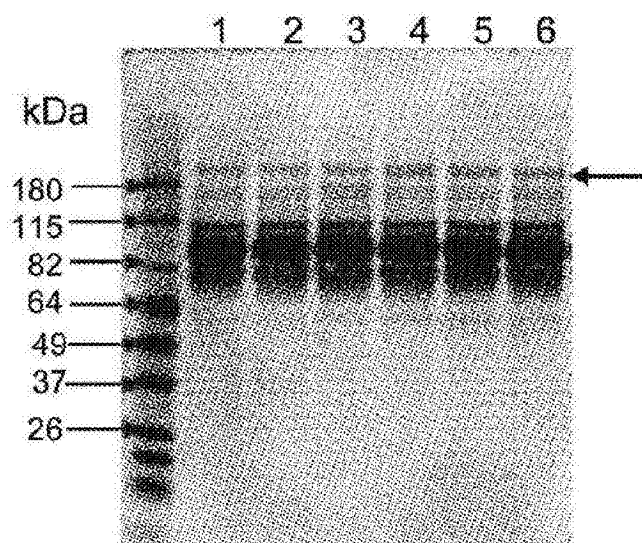
```

图2



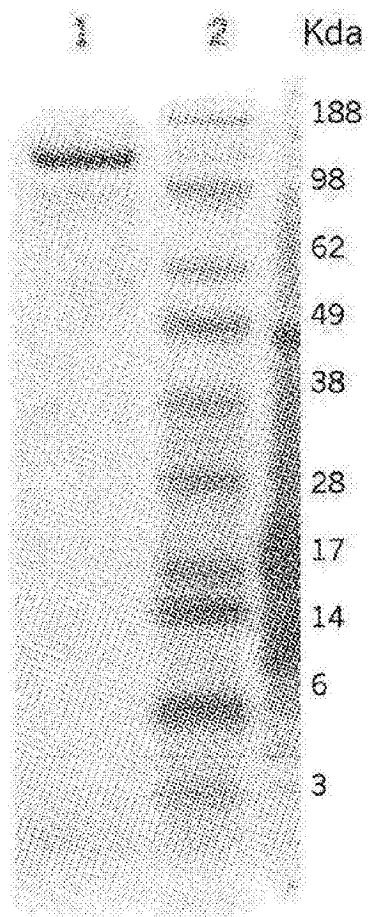
泳道1,对照;泳道2, FGF23;泳道3, sKlotho;泳道 4-6, sKlotho-FGF23

图3A



泳道1,对照;泳道2, FGF23;泳道3, sKlotho;泳道 4-6, sKlotho-FGF23

图3B



泳道1, 纯化的sKlotho-FGF23-6xHis; 泳道2, 分子量标志

图3C

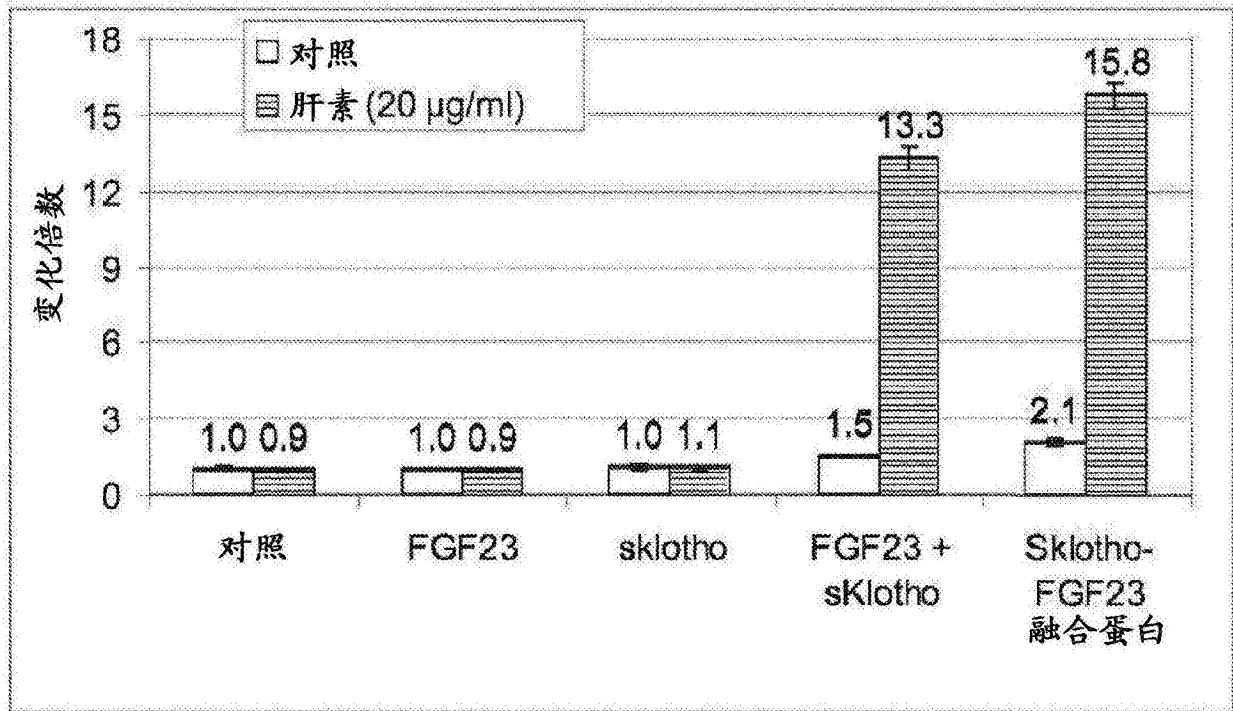


图4

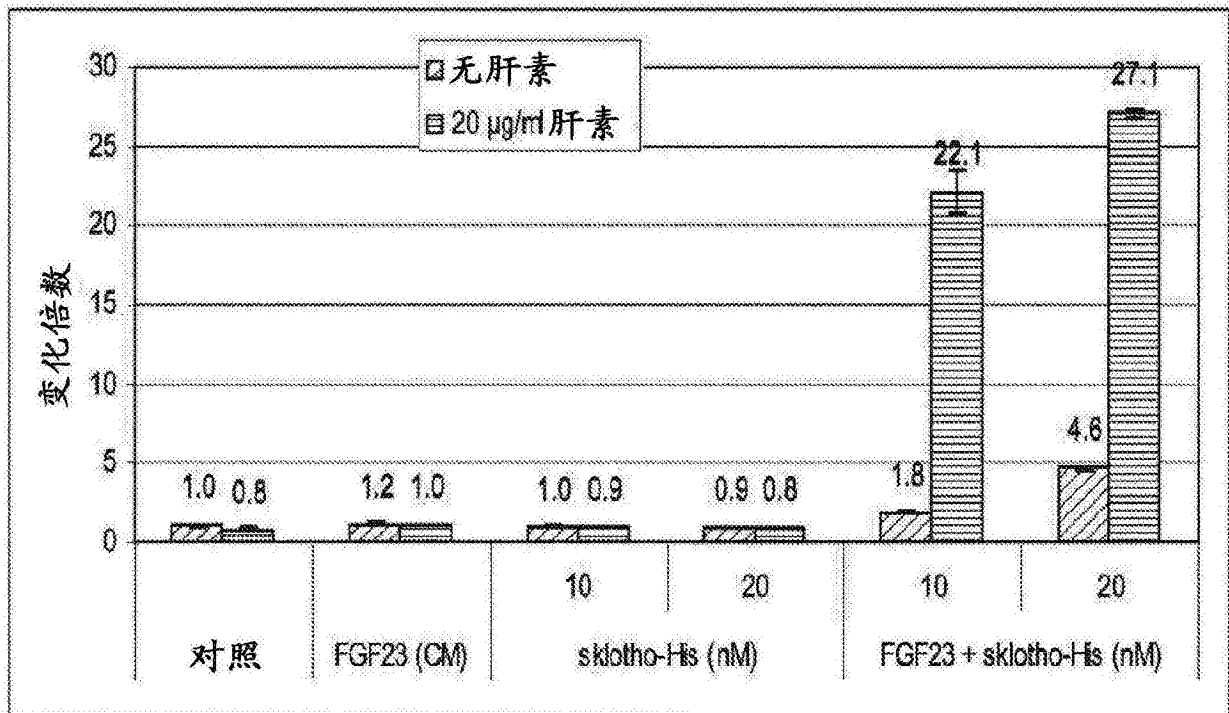


图5A

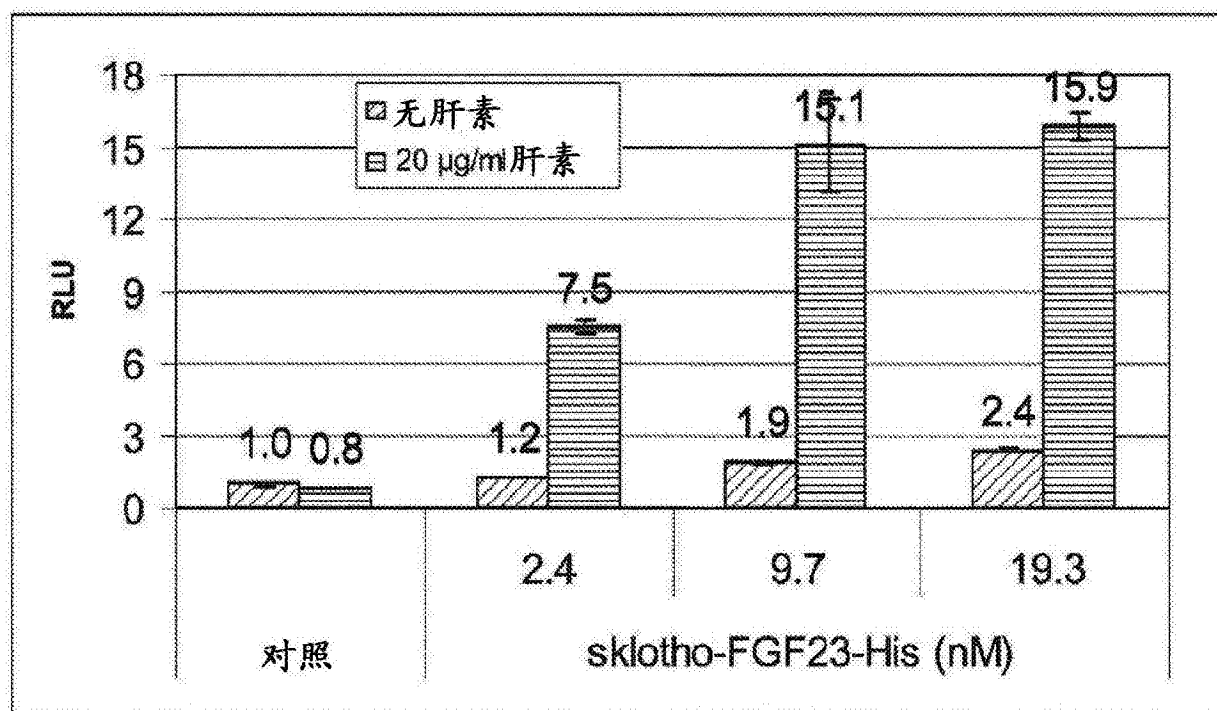
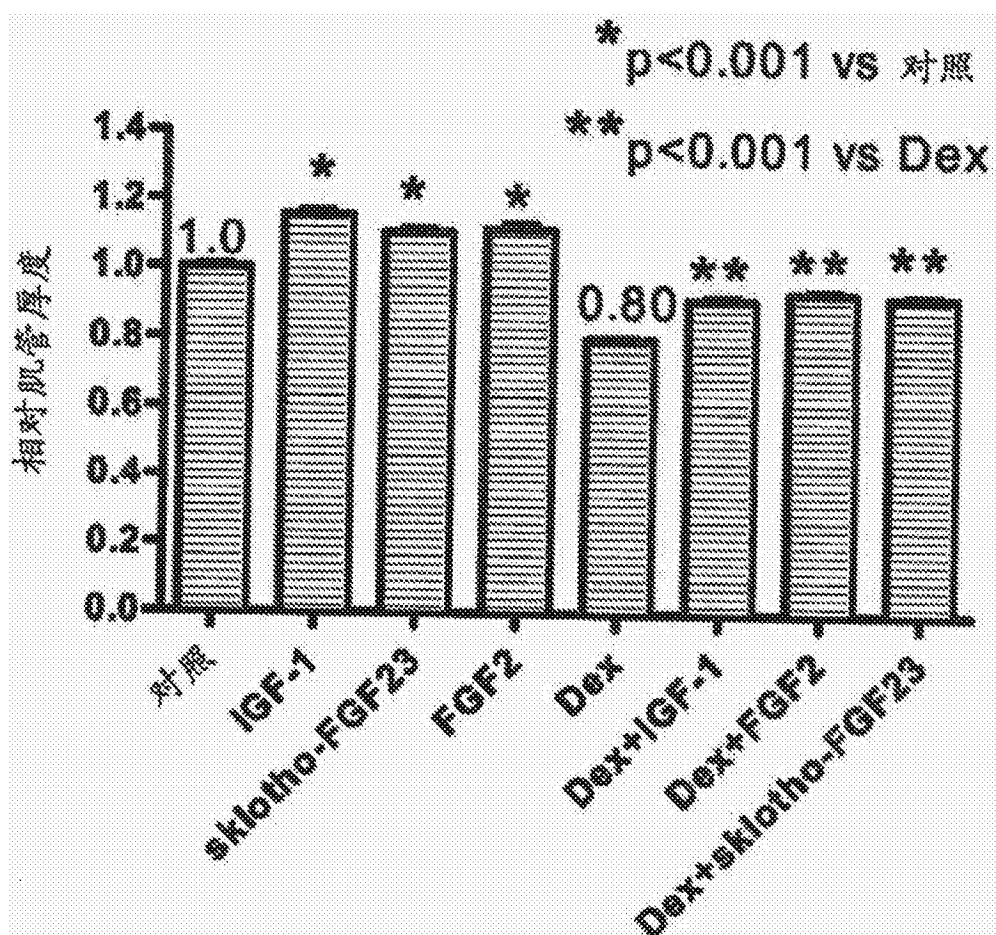
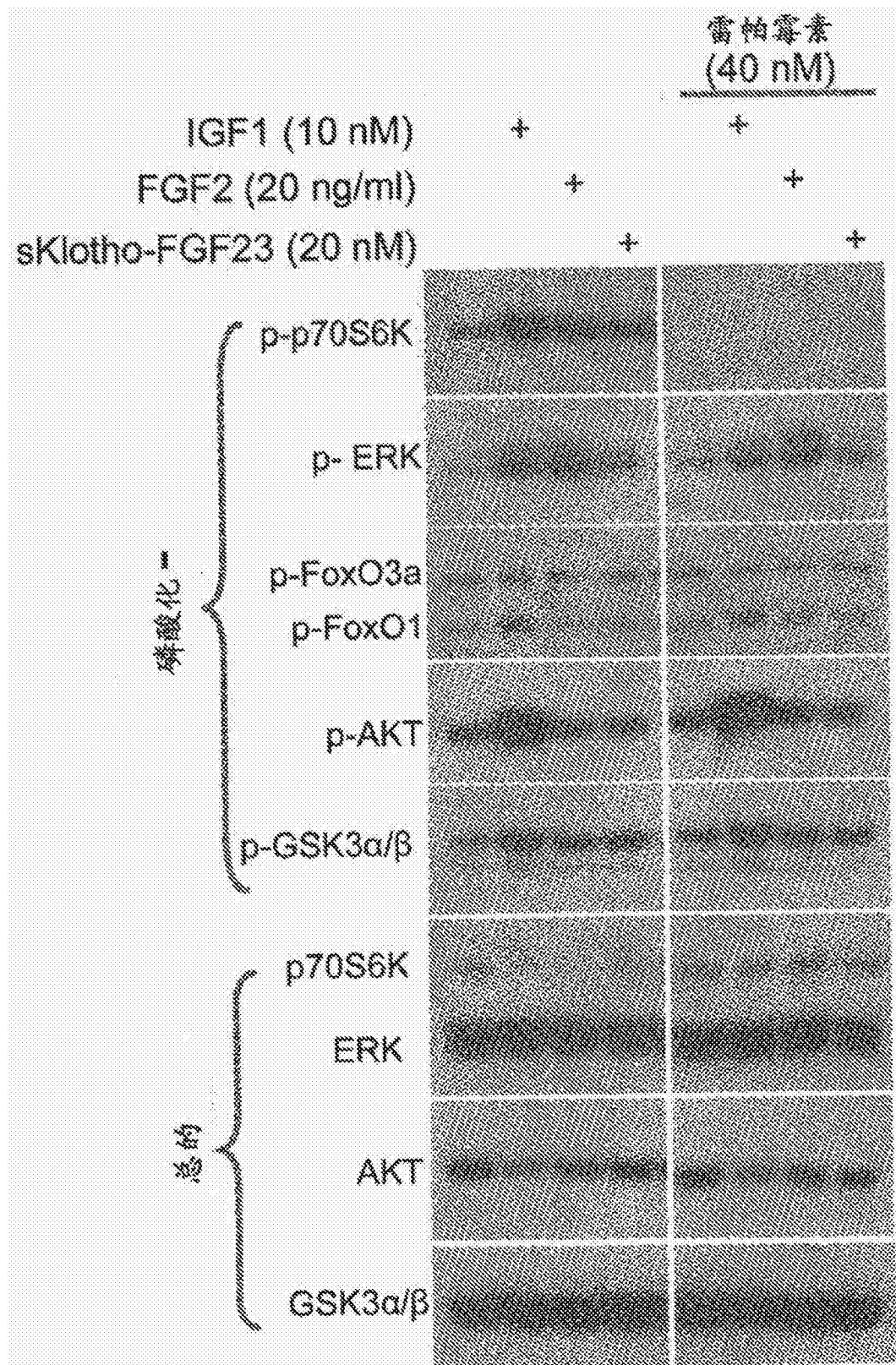


图5B





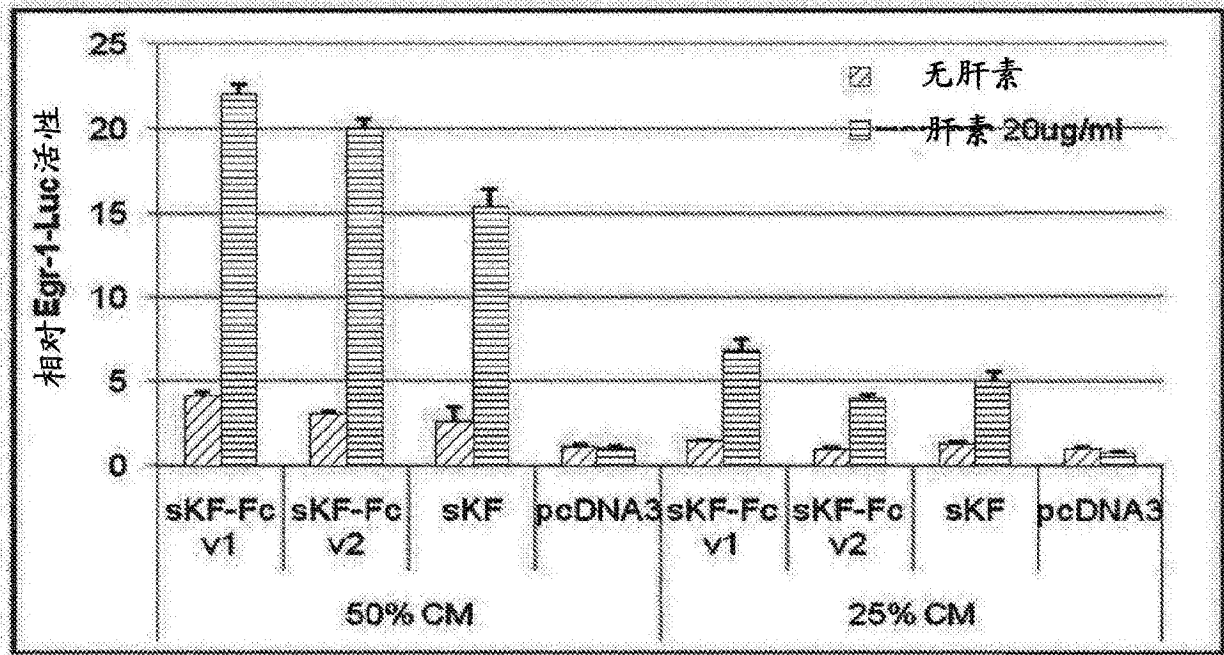


图7

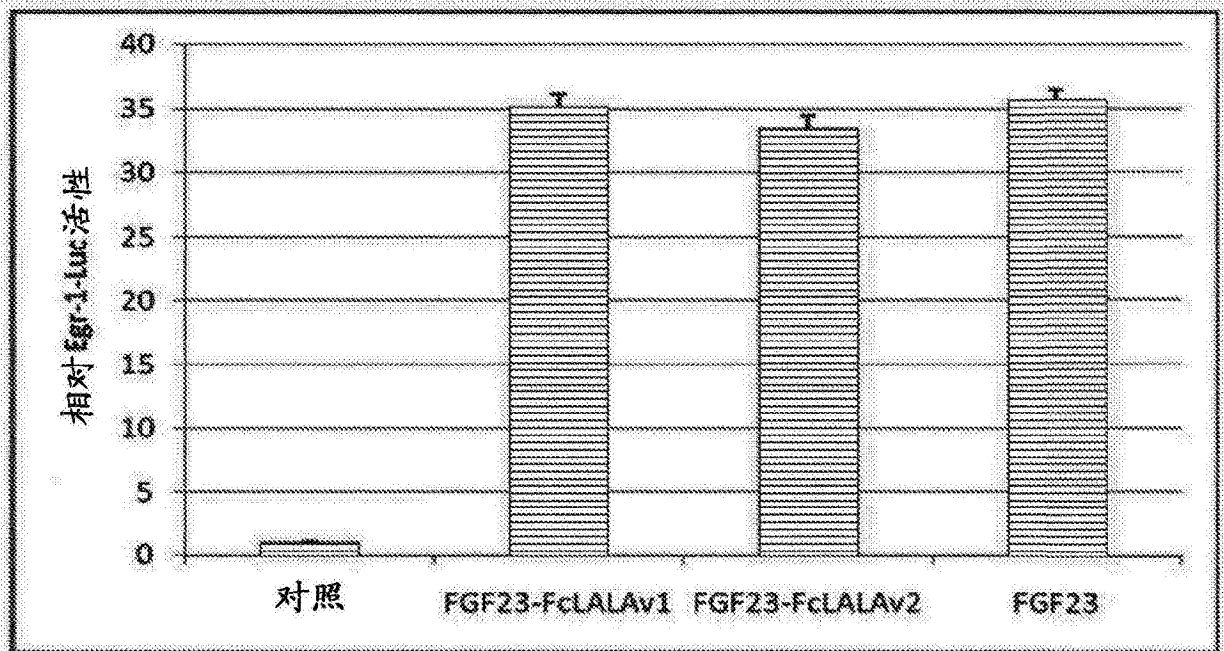


图8

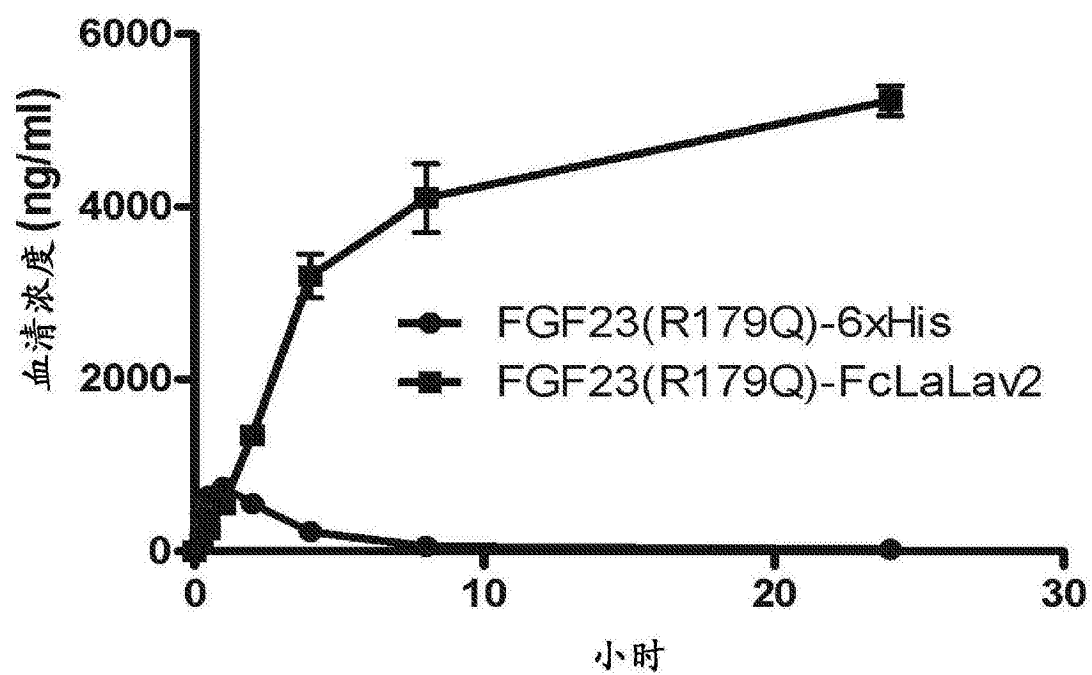


图9

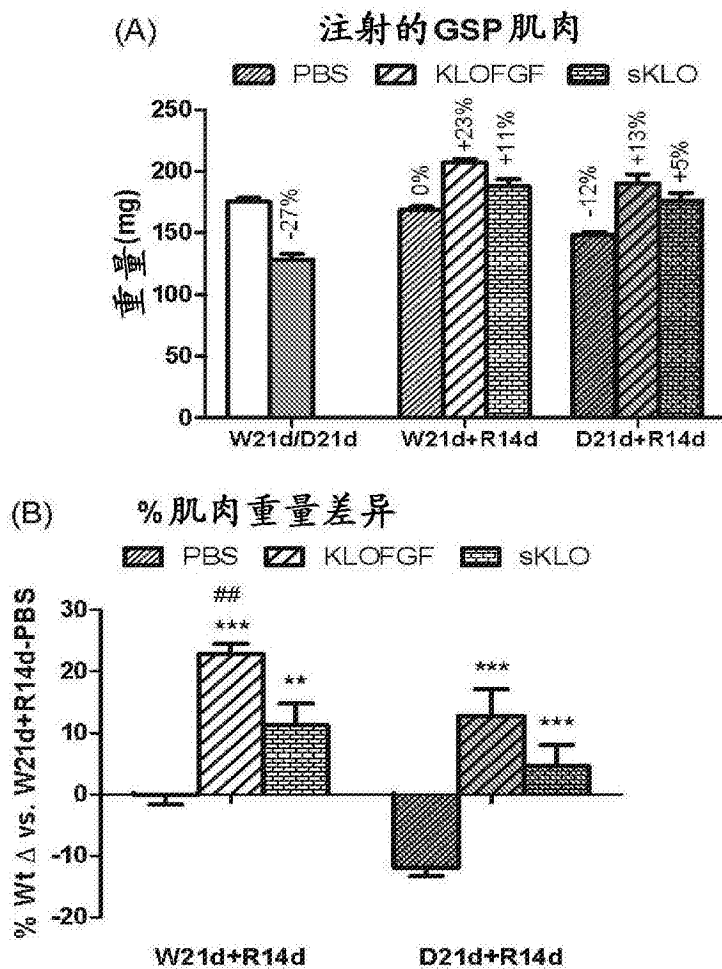


图10

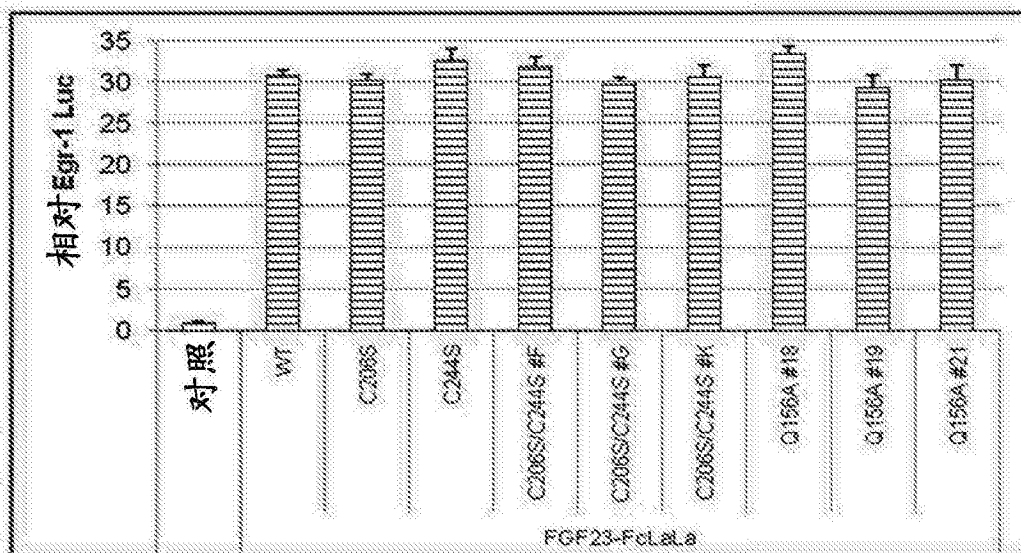


图11

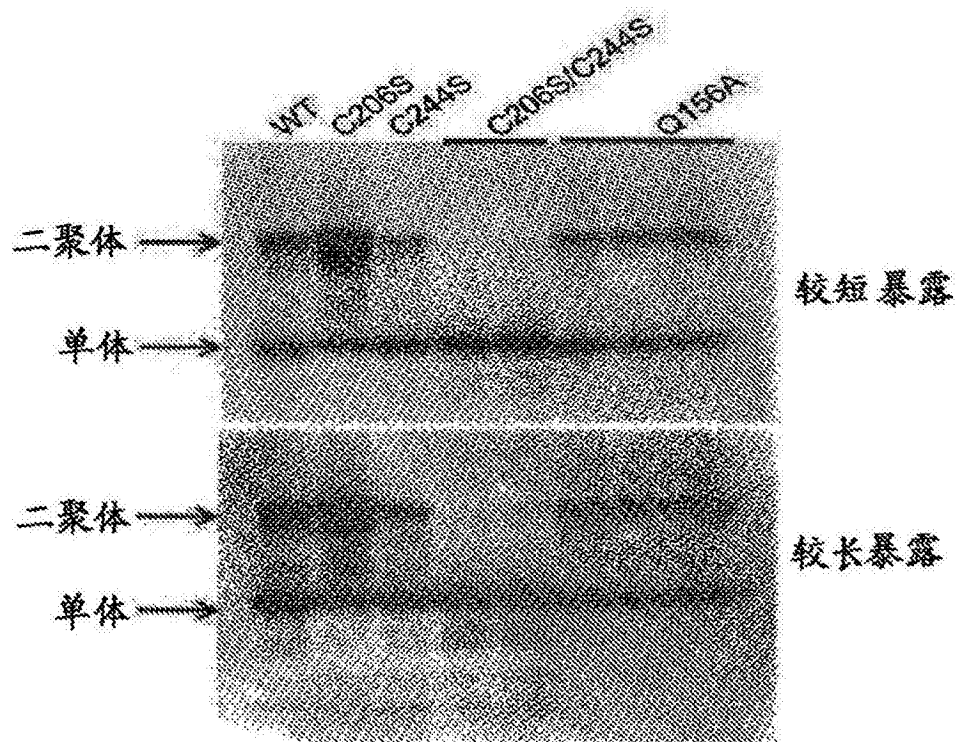


图12

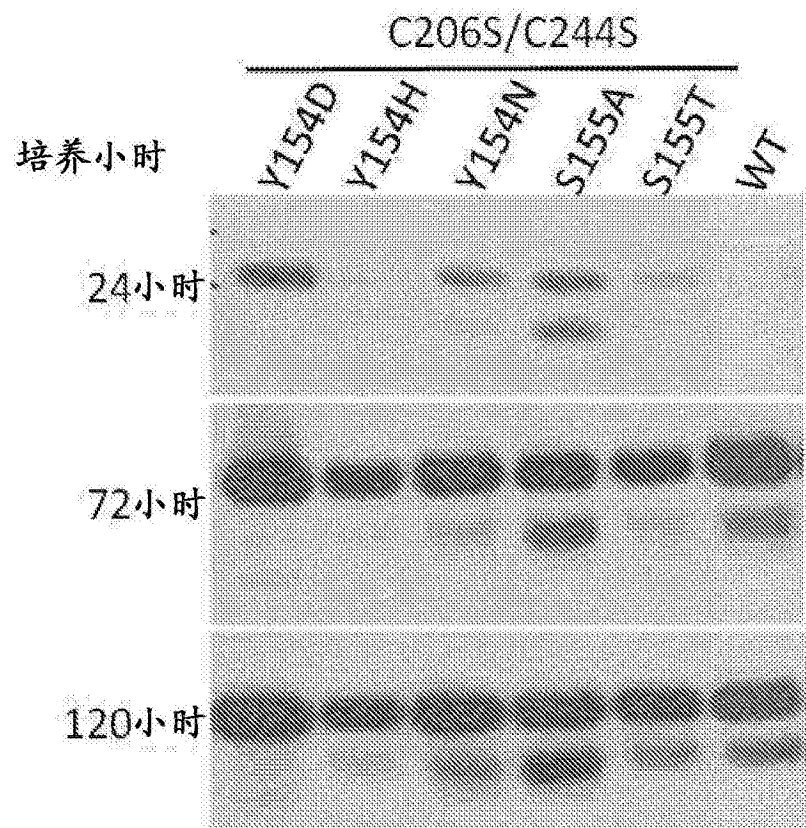


图13

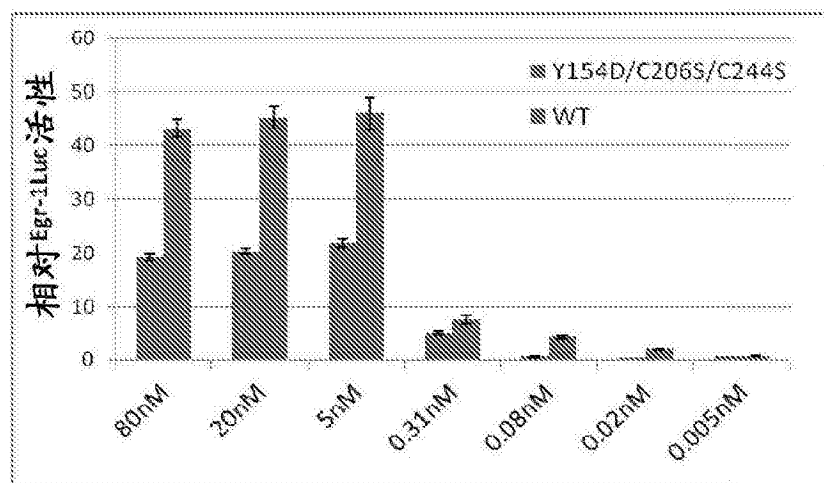


图14

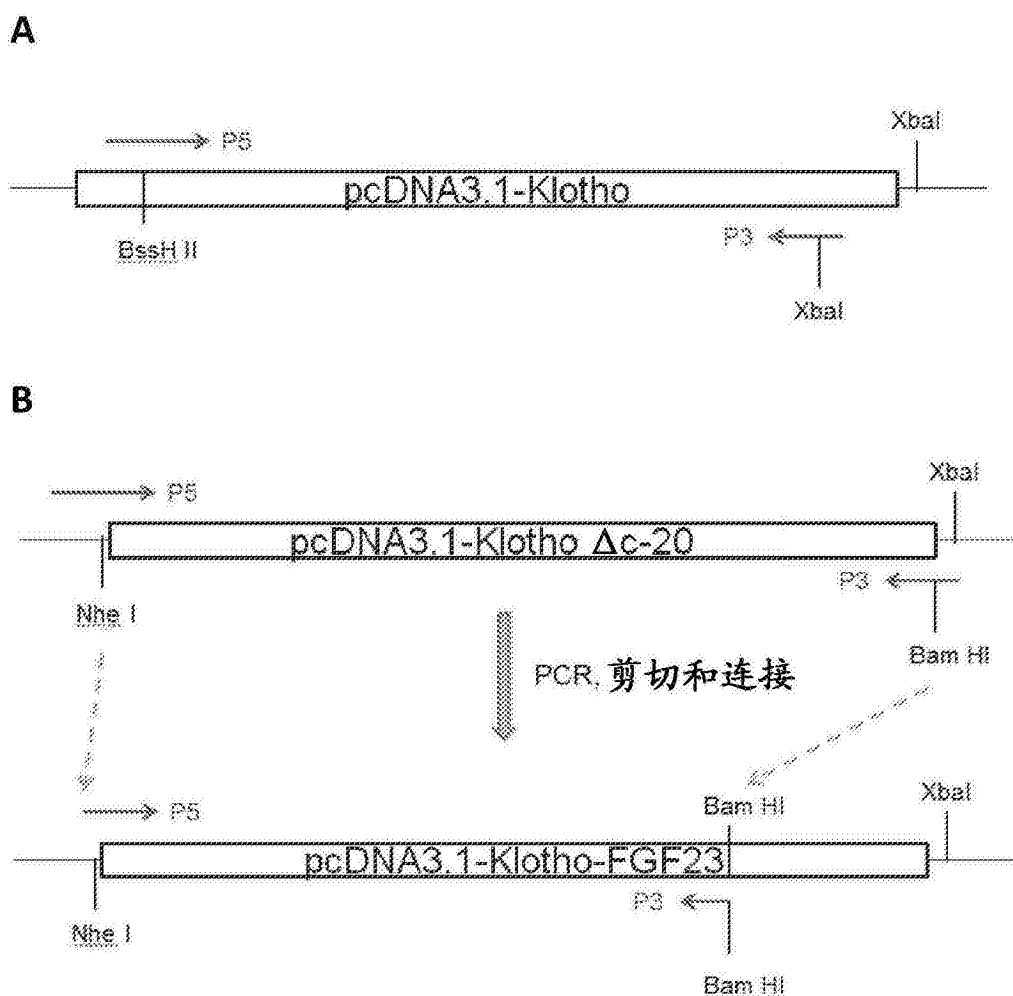


图15

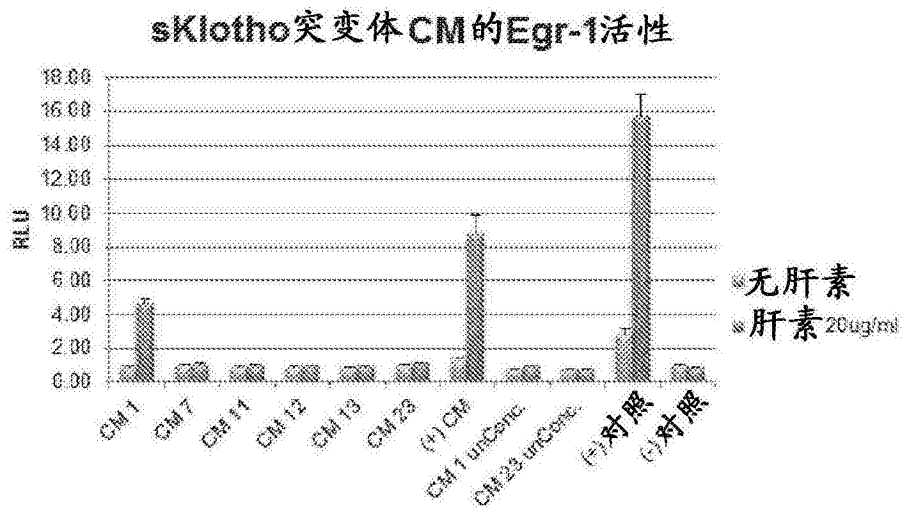
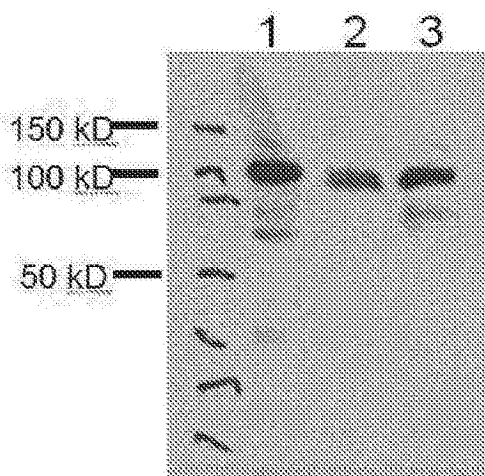


图16

A

1. pcDNA3.1-sKlotho-FGF23
2. pcDNA3.1-FGF23-sKlotho(del c-20)
3. pcDNA3.1-sKlotho(del c-20)-FGF23



B

**sKloFGF23和突变体
CM的Egr-1-Luc活性**

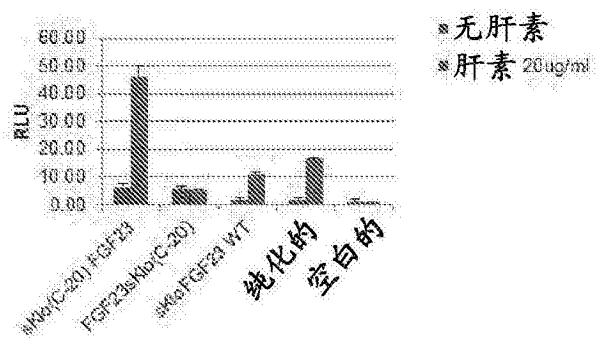


图17

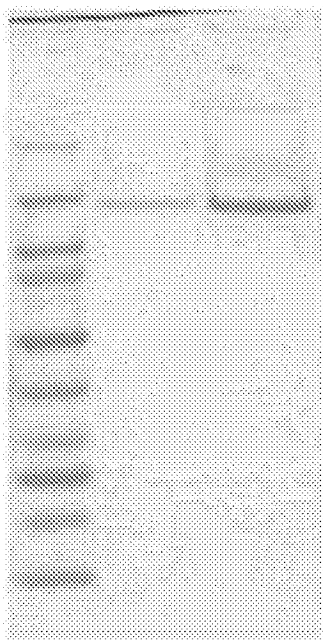
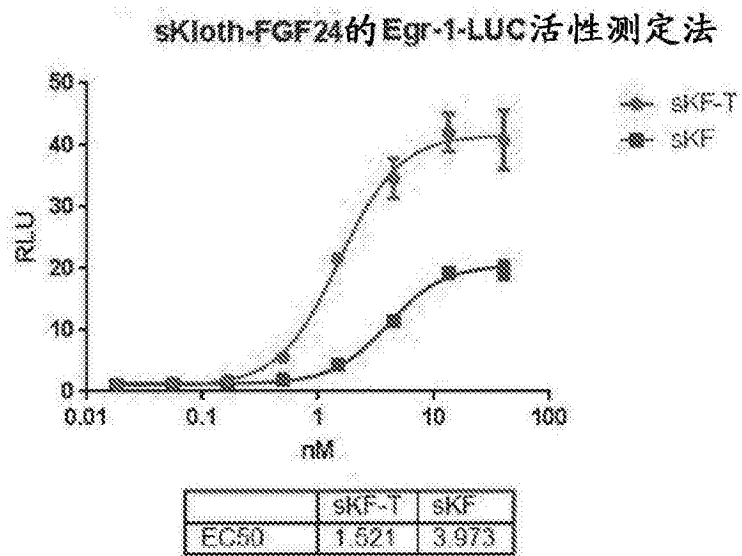
A**B**

图18

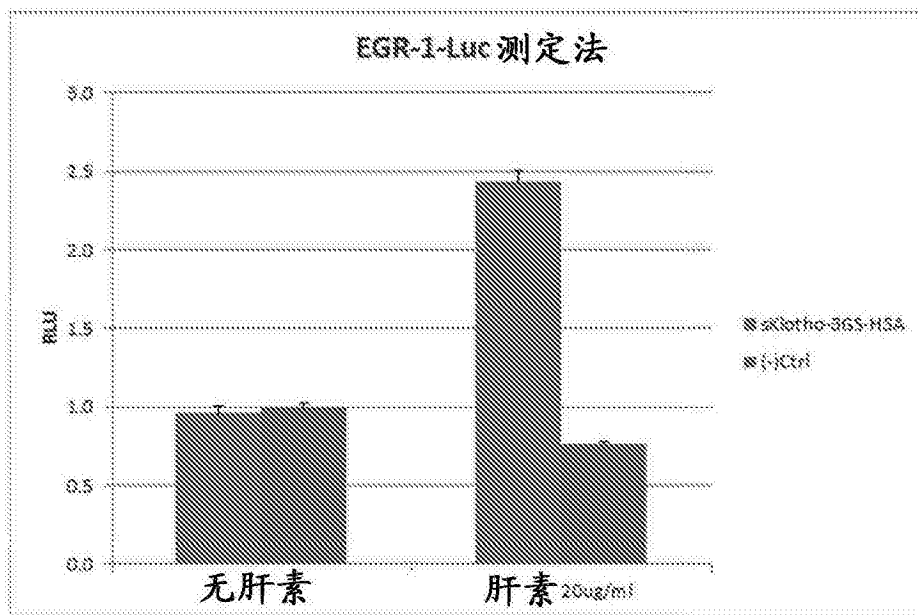


图19