(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0028358
(43) 공개일자 2012년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/62 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7000112
(22) 출원일자(국제) 2010년06월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년01월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/037787
(87) 국제공개번호 WO 2010/151426
국제공개일자 2010년12월29일
(30) 우선권주장
61/268,420 2009년06월12일 미국(US)
61/280,543 2009년11월03일 미국(US)

(71) 출원인
악셀레론 파마 인코포레이티드
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128
(72) 발명자
세라, 자스비르
미국, 매사추세츠 02421-6818, 렉싱톤, 링컨 테라세 3
쿠마르, 라빈드라
미국, 매사추세츠 01720, 악톤, 알링톤 스트리트 421
(74) 대리인
강명구

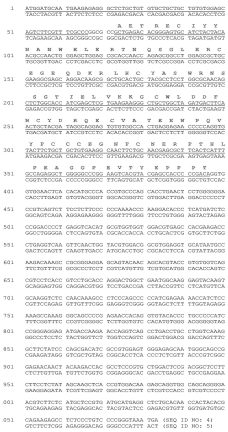
전체 청구항 수 : 총 39 항

(54) 발명의 명칭 **절두된 ＡｃｔＲＩＩＢ-ＦＣ 융합 단백질**

(57) 요 약

일정한 측면에서, 본 발명에서는 조직, 예를 들면, 뼈, 연골, 근육, 지방, 갈색 지방 및/또는 뉴런 조직의 성장을 조절하고(촉진하고 또는 저해하고), 그리고 대사 장애, 예를 들면, 당뇨병과 비만, 그리고 전술한 조직 중에서 한 가지와 연관된 질환을 치료하기 위한 조성물과 방법을 제시한다.

대 표 도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

엄밀도 조건 하에 서열 번호:6의 뉴클레오티드 73-396의 보체에 혼성화되는 핵산 서열을 포함하는 핵산.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 서열 번호:6의 뉴클레오티드 73-396을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 3

엄밀도 조건 하에 서열 번호:4의 뉴클레오티드 73-396의 보체에 혼성화되는 핵산 서열을 포함하는 핵산.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 서열 번호: 4의 뉴클레오티드 73-396을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 5

청구항 1 내지 4중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 배양된 세포.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 포유동물 세포인 것을 특징으로 하는 배양된 세포.

청구항 7

청구항 5에 있어서, CHO 세포인 것을 특징으로 하는 배양된 세포.

청구항 8

아래와 같이 구성된 군에서 선택되는 폴리펩티드:

a. 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 여기서 상기 아미노산 서열은 서열 번호:8의 서열 또는 5개 이하의 아미노산 위치에서 서열 번호:8과 상이한 아미노산 서열로 구성되고;

b. 포유동물 세포에서 서열 번호:4의 핵산 또는 엄밀도 조건 하에 이들의 보체에 혼성화되는 핵산의 발현에 의해 생산된 폴리펩티드;

c. 포유동물 세포에서 서열 번호:6의 핵산 또는 엄밀도 조건 하에 이들의 보체에 혼성화되는 핵산의 발현에 의해 생산된 폴리펩티드.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 파트 (a)의 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 파트 (b)의 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 파트 (c)의 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 12

청구항 8 내지 11중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드의 아미노 말단은 서열 ETR을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 13

청구항 8 내지 12중 어느 항 항에 있어서, 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 생쥐에서 제지방체중(lean body mass)의 통계학적으로 유의한 증가를 유발하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 평균 증가는 최소한 2 g의 제지방체중(lean tissue mass)인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 15

청구항 8 내지 14중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 지방량(fat mass)의 통계학적으로 유의한 감소를 유발하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 평균 감소는 최소한 5 g의 지방량인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 17

청구항 8 내지 16중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 혈청 트리글리세리드 수준의 통계학적으로 유의한 감소를 유발하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 평균 감소는 최소한 50 mg/dl 트리글리세리드인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 19

청구항 8 내지 18중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 혈청 유리 지방산 수준의 통계학적으로 유의한 감소를 유발하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 평균 감소는 최소한 500 마이크로몰/dl 유리 지방산인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 21

청구항 8 내지 20중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 혈청 인슐린 수준의 통계학적으로 유의한 감소를 유발하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 평균 감소는 최소한 1 ng/ml 인슐린인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 23

청구항 8 내지 22중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 최소한 하나의 N-연결된 당을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 24

청구항 8 내지 23중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 CHO 세포에서 생산되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 25

청구항 8 내지 24중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 청구항 8 내지 24중 어느 한 항의 두 번째 폴리펩티드

와 공유 결합되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 26

청구항 8 내지 24중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 두 번째 폴리펩티드와 공유 결합되어 동종이합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 27

ActRIIB로부터 유래된 부분 및 하나 이상의 이종기원성 부분을 포함하는 폴리펩티드에 있어서, ActRIIB로부터 유래된 부분은 서열 번호:1의 아미노산 25-131의 서열, 또는 5개 이하의 아미노산 위치에서 서열 번호:1의 아미노산 25-131의 서열과 상이한 아미노산 서열로 구성되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 이종기원성 부분은 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 29

청구항 27에 있어서, 이종기원성 부분은 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 30

청구항 27에 있어서, 이종기원성 부분은 인간 IgG1의 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 31

청구항 27 내지 30중 어느 한 항에 있어서, ActRIIB로부터 유래된 부분은 서열 번호:1의 아미노산 25-131의 서열로 구성되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 32

청구항 8 내지 31중 어느 한 항의 폴리펩티드를 포함하는 제약학적 제조물.

청구항 33

근육 상실 또는 불충분한 근육 성장과 연관된 질환을 앓는 개체를 치료하는 방법에 있어서, 청구항 32의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

개체에서 제지방량(lean mass)을 증가시키거나, 또는 제지방량의 상실 속도를 감소시키는 방법에 있어서, 청구항 32의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

개체에서 체지방 함량(body fat content)을 감소시키거나, 또는 체지방 함량의 증가 속도를 감소시키는 방법에 있어서, 청구항 32의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

개체에서 바람직하지 않은 체중 증가와 연관된 질환을 치료하는 방법에 있어서, 청구항 32의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

개체에서 대사 장애를 치료하는 방법에 있어서, 청구항 32의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 환자는 아래의 특징 중에서 한 가지 이상을 갖는 것을 특징으로 하는 방법:

a. 상승된 혈청 트리글리세리드 수준;

b. 상승된 유리 지방산 수준; 또는

c. 상승된 혈청 인슐린 수준.

청구항 39

청구항 37 또는 38에 있어서, 대사 장애는 2형 당뇨병, 대사 증후군, 인슐린 내성 및 비만으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2009년 6월 12일 제출된 U.S. Provisional Application Ser. Nos. 61/268,420, 그리고 2009년 11월 3일 제출된 61/280,543에 우선권을 주장한다. 이들 출원은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

배 경 기 술

[0003] 본 발명의 배경기술

[0004] 전환 성장 인자-베타(transforming growth factor-beta, TGF-beta) 슈퍼패밀리(superfamily)는 공통의 서열 요소(sequence element)와 구조 모티프(structural motif)를 공유하는 다양한 성장 인자를 포함한다. 이들 단백질은 척추동물과 무척추동물 둘 모두에서 다양한 세포 유형에 대한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 슈퍼패밀리의 구성원은 배 발생(embryonic development) 동안 패턴 형성(pattern formation)과 조직 특정화(tissue specification)에서 중요한 기능을 수행하고, 지방생성(adipogenesis), 근육발생(myogenesis), 연골형성(chondrogenesis), 심형성(cardiogenesis), 혈액생성(hematopoiesis), 신경생성(neurogenesis), 그리고 상피 세포 분화(differentiation)를 비롯한 다양한 분화 과정(differentiation process)에 영향을 줄 수 있다. 이러한 패밀리는 액티빈과 인히빈, TGF-베타, 성장 및 분화 인자(GDF), 그리고 골 형성 인자(BMP) 등으로 명명된 단백질로 대표된다. 이러한 패밀리의 다른 구성원, 예를 들면, Nodal 및 Lefty 역시 공지되어 있다. TGF-베타 패밀리의 구성원의 활성을 조종함으로써, 생물체 내에서 현저한 생리학적 변화를 유도하는 것이 종종 가능하다. 가령, 산록(piedmont)과 벨기에 블루 소(Belgian Blue cattle) 품종은 GDF8(일명, 미오스타틴(myostatin)) 유전자에서 기능 상실 돌연변이(loss-of-function mutation)를 보유하는데, 이는 근육량(muscle mass)에서 눈에 띄는 증가를 유도한다(Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4). 더 나아가, 인간에서, GDF8의 비활성 대립형질(allele)은 증가된 근육량, 그리고 보고된 바에 의하면, 특별한 체력(exceptional strength)과 연관된다(Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8).

[0005] 근육, 뼈, 지방, 연골 및 기타 조직에서 변화는 적절한 TGF-베타 패밀리 구성원에 의해 매개되는 신호전달을 항진하거나, 또는 길항함으로써 달성될 수 있다. 따라서 TGF-베타 패밀리 구성원에 의한 신호전달의 강력한 조절자로서 기능하는 작용제가 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 요약

[0007] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 신규한 ActRIIB 폴리펩티드, 특히 아미노-와 카르복시-말단 절두 및 서열 변경을 제시한다. 한 구체예에서, 인간 ActRIIB의 아미노산 25-131(서열 번호:1)을 포함하는 폴리펩티드 또는 이들의 변이체가 기술된다. 이들 폴리펩티드는 다양한 질환, 특히 비만, 인슐린 내성 및 기타 대사 장애와 연관된 질환의 치료에서 놀라운 효능을 갖는 것으로 증명된다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 예로써, 제지방체중을 증가시키거나, 흰색 지방량을 감소시키거나, 갈색 지방량을 증가시키거나, 혈청 트리글리세리드를

감소시키거나, 혈청 인슐린 수준을 감소시키거나, 또는 혈청 유리 지방산 수준을 감소시키는 것을 비롯하여, 환자에서 다양한 바람직한 효과를 나타내는데 이용될 수 있다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 근육과 신경근 질환(가령, 근이영양증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 그리고 근육 위축), 지방 조직 질환(가령, 비만, 지방 간 질환), 대사 장애(가령, 2형 당뇨병, 인슐린 내성, 대사 증후군), 신경퇴행성 질환, 그리고 노령과 연관된 근육 소모증(근육감소증), 전립선 암 요법(가령, 안드로겐 결핍 요법), 그리고 다양한 암과 연관된 악액질을 비롯한 다양한 질환 또는 장애의 치료에 이용될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드의 실례에는 서열 번호:8에서 제시되고 본 명세서에서 ActRIIB(25-131)-hFc로서 기술된 인간 ActRIIB-Fc 융합 단백질이 포함된다.

[0008] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 ActRIIB로부터 유래된 신규한 폴리펩티드(ActRIIB 폴리펩티드로 지칭됨)를 제시한다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 여기서 상기 아미노산 서열은 서열 번호:8의 서열, 또는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산 위치에서 서열 번호:8과 상이한 아미노산 서열로 구성되고; 포유동물 세포에서 서열 번호:4의 핵산 또는 엄밀도 조건 하에 이들의 보체에 혼성화되는 핵산의 발현에 의해 생산된 폴리펩티드; 포유동물 세포에서 서열 번호:6의 핵산 또는 엄밀도 조건 하에 이들의 보체에 혼성화되는 핵산의 발현에 의해 생산된 폴리펩티드로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 본 명세서에서 개시된 폴리펩티드는 ActRIIB로부터 유래된 부분 및 하나 이상의 이종기원성 부분을 포함할 수 있고, 여기서 ActRIIB로부터 유래된 부분은 서열 번호:1의 아미노산 25-131의 서열, 또는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 아미노산 이하의 위치에서 서열 번호:1의 아미노산 25-131의 서열과 상이한 아미노산 서열로 구성되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이종기원성 부분은 면역글로불린의 불변 도메인, 면역글로불린의 Fc 도메인 또는, 특히 인간 IgG1의 Fc 도메인을 포함할 수 있다(용어 "인간 IgG1"은 인간에서 이용하기 적합한 이런 Fc의 변이체를 포함하는 것으로 해석된다). ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호:1의 아미노산 25-131의 서열로 구성되는 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIB로부터 유래된 부분을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 아미노 말단이 서열 ETR을 보유할 수 있다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 생쥐에서 제지방체중의 통계학적으로 유의한 증가를 유발할 수 있다. 제지방체중의 평균 증가는 최소한 1, 2, 3, 4 또는 5 또는 그 이상의 gram일 수 있다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 지방량의 통계학적으로 유의한 감소를 유발할 수 있다. 지방량에서 평균 감소는 5, 7, 10, 15 또는 그 이상의 gram일 수 있다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 혈청 트리글리세리드 수준의 통계학적으로 유의한 감소를 유발할 수 있다. 혈청 트리글리세리드에서 평균 감소는 최소한 50, 75, 100, 125 또는 150 또는 그 이상의 mg/dl일 수 있다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 혈청 유리 지방산 수준의 통계학적으로 유의한 감소를 유발할 수 있다. 유리 지방산에서 평균 감소는 최소한 500, 750, 1000 또는 그 이상의 마이크로몰/dl 유리 지방산일 수 있다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 10 mg/kg의 복용량 수준에서 4주간 주 2회 치료후, 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 혈청 인슐린 수준의 통계학적으로 유의한 감소를 유발할 수 있다. 혈청 인슐린에서 평균 감소는 최소한 0.5, 1, 1.5, 2 또는 그 이상의 ng/ml 인슐린일 수 있다. 본 명세서에서, 용어 "통계학적으로 유의한"은 일반적으로, p 값 또는 >0.05를 지칭하지만, 유의성(significance)의 다른 척도가 상이한 유형의 통계학적 검사를 위하여 인정될 수 있고, 이러한 경우에 용어 "통계학적으로 유의한"은 데이터의 유의성을 평가하기 위한 가장 널리 이용되는 공식을 이용해야 한다. ActRIIB 폴리펩티드는 최소한 하나의 N-연결된 당을 포함할 수 있고, 그리고 1개, 2개 또는 그 이상의 N-연결된 당을 포함할 수 있다. 이들 폴리펩티드는 또한, O-연결된 당을 포함할 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드는 조작된 곤충 또는 효모 세포, 그리고 포유동물 세포, 예를 들면, COS 세포, CHO 세포, HEK 세포 및 NSO 세포를 비롯하여, 환자 이용에 적합한 방식으로 단백질을 당화시키는 다양한 세포주에서 생산될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드는 동종이합체를 비롯한 공유 또는 비-공유 이합체를 형성할 수 있다. 일반적으로, Fc 융합 단백질은 공유 연결되는 동종이합체를 형성하는 경향이 있다. 임의의 전술한 폴리펩티드는 제약학적 제조물 내로 함입(incorporation)될 수 있다.

[0009] 일정한 측면에서, 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 리간드, 예를 들면, GDF8, GDF11, 액티빈, BMP7, GDF3 또는 nodal에 결합한다. 선택적으로, ActRIIB 폴리펩티드는 10 마이크로몰 이하 또는 1 마이크로몰 이하, 100, 10, 1 또는 0.1 나노몰의 Kd로 ActRIIB 리간드에 결합한다. 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 자연 발생 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열(가령, 리간드-결합 도메인)에서 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 변경을 보유할 수 있다. 아미노산 서열에서 이러한 변경은 예로써, 포유동물, 곤충 또는 기타 진핵 세포에서 생산될 때 폴리펩티드의 당화를 변화시키거나, 또는 자연 발생 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하여 폴리펩티드의 단백분해 절단을 변화시킬 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드는 한 도메인으로서 ActRIIB

로부터 유래된 아미노산 서열(가령, ActRIIB의 리간드-결합 도메인 또는 이의 변이체), 그리고 바람직한 성질, 예를 들면, 향상된 약물동력학, 더욱 용이한 정제, 특정 조직에 표적화 등을 제공하는 하나 이상의 추가 도메인을 보유하는 융합 단백질일 수 있다. 가령, 융합 단백질의 도메인은 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡수/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 융합 단백질의 다합체화, 및/또는 정제 중에서 한 가지 이상을 증강시킬 수 있다. ActRIIB 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인(야생형 또는 돌연변이체) 또는 혈청 알부민을 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, ActRIIB-Fc 융합체는 Fc 도메인 및 세포외 ActRIIB 도메인 사이에 위치하는 상대적으로 조직화되지 않은 링커를 포함한다. 이러한 조직화되지 않은 링커는 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단 단부(“꼬리”)에서 대략 15개의 아미노산 조직화되지 않은 영역에 상응하거나, 또는 상대적으로 이차 구조(secondary structure)가 없는 5개 내지 15개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의 아미노산의 인공 서열일 수 있다. 링커는 글리신과 프롤린 잔기가 풍부하고, 그리고 예로써, 트레오닌/세린과 글리신의 반복 서열(가령, TG_4 또는 SG_4 반복부)을 내포할 수 있다. 서열 번호:8의 폴리펩티드의 배경에서, 선택적으로 하나 이상의 소형 잔기, 예를 들면, 알라닌, 트레오닌 또는 세린과 함께 짧은, 유연성 링커, 예를 들면, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 글리신 잔기를 이용하는 것이 유리할 것으로 생각된다. 융합 단백질은 정제 하위서열, 예를 들면, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열, 그리고 GST 융합을 보유할 수 있다. 선택적으로, ActRIIB 폴리펩티드는 당화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 그리고 유기 유도체화제에 접합된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 보유한다.

[0010] 일정한 측면에서, ActRIIB 폴리펩티드는 제약학적 제조물로서 조제될 수 있다. 제약학적 제조물은 바람직하게는, 발열원이 없을 것이다(이는 치료 용도를 위한 산물의 품질을 관리하는 규정에 의해 요구되는 정도까지 발열원이 없음을 의미한다). 제약학적 제조물은 또한, 하나 이상의 추가 화합물, 예를 들면, ActRIIB-연관된 질환을 치료하는데 이용되는 화합물을 포함할 수 있다.

[0011] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제시한다. 이런 핵산은 서열 번호:4의 73-396의 핵산 서열, 또는 엄밀도 조건 하에 서열 번호:4의 뉴클레오티드 73-396의 보체에 혼성화되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 핵산은 서열 번호:4의 서열을 포함하는 것일 수도 있다. 이런 핵산은 서열 번호:6의 73-396의 핵산 서열, 또는 엄밀도 조건 하에 서열 번호:6의 뉴클레오티드 73-396의 보체에 혼성화되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 핵산은 서열 번호:6의 서열을 포함하는 것일 수도 있다. 일정한 측면에서, ActRIIB 단백질은 환자(가축 환자의 가능성 포함)에서 바람직하지 않은 면역 반응의 가능성을 감소시키기 위하여 ActRIIB 단백질의 적절한 자연 당화를 매개하는 포유동물 세포주에서 발현될 수 있다. 인간과 CHO 세포주가 성공적으로 이용되었고, 그리고 다른 통상의 포유동물 발현 벡터가 유용할 것으로 기대된다. 따라서 본 발명에서는 본 명세서에서 개시된 핵산 중에서 한 가지를 포함하는 배양된 세포를 제시한다. 이런 세포는 CHO 세포, NSO 세포, HEK 세포 및 COS 세포를 비롯한 포유동물 세포일 수 있다. 다른 세포는 의도된 환자의 종류에 따라 선택될 수 있다. 다른 세포는 본 명세서에서 개시된다. 배양된 세포는 실험실 또는 기타 인위적 환경에서 유지되고(가령, 동결된, 또는 배지에서) 살아있는 생물체의 일부가 아닌 세포를 의미하는 것으로 해석된다.

[0012] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 ActRIIB 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제시한다. 이런 방법은 적절한 세포, 예를 들면, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포에서 본 명세서에 개시된 임의의 핵산(가령, SEQ ID NO: 4 또는 9, 그리고 엄밀도 조건 하에 이들에 혼성화되는 핵산)을 발현하는 단계를 포함한다. 이런 방법은 a) ActRIIB 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 세포를 배양하는 단계, 여기서 상기 세포는 ActRIIB 발현 구조체로 형질전환된다; b) 이렇게 발현된 ActRIIB 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다. ActRIIB 폴리펩티드는 세포 배양액으로부터 단백질을 획득하기 위한 임의의 널리 공지된 기술 및 본 명세서에서 기술된 기술을 이용하여 정제되지 않거나, 부분적으로 정제되거나, 또는 고도로 정제된 분획물(fraction)로서 회수될 수 있다.

[0013] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 근육 상실 또는 불충분한 근육 성장과 연관된 질환을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제시한다. 이런 방법은 임의의 전술한 ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0014] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 필요 개체에서 제지방량을 증가시키거나, 또는 제지방량의 감소 속도를 감소시키는 방법을 제시한다. 이런 방법은 임의의 전술한 ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0015] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 개체에서 체지방 함량을 감소시키거나, 또는 체지방 함량의 증가 속도를 감소시키는 방법을 제시한다. 이런 방법은 임의의 전술한 ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 제약학적 제조물의 효과량

을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0016] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 개체에서 바람직하지 않은 체중 증가와 연관된 질환을 치료하는 방법을 제시한다. 이런 방법은 임의의 전술한 ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0017] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 개체에서 대사 장애를 치료하는 방법을 제시한다. 이런 방법은 임의의 전술한 ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 제약학적 제조물의 효과량을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 치료에 적격인 환자는 아래의 특징: 상승된 혈청 트리글리세리드 수준; 상승된 유리 지방산 수준; 또는 상승된 혈청 인슐린 수준 중에서 한 가지 이상을 갖는다. 대사 장애의 실례에는 2형 당뇨병, 대사 증후군, 인슐린 내성 및 비만이 포함된다.

[0018] 일정한 측면에서, 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 근육 상실 또는 불충분한 근육 성장과 연관된 질환을 앓는 개체를 치료하는 방법에 이용될 수 있다. 이런 질환에는 근육 위축, 근이영양증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 그리고 근육 소모증 질환(가령, 악액질, 식욕부진, DMD 증후군, BMD 증후군, AIDS 소모 증후군, 근이영양증, 신경근 질환, 운동 뉴런 질환, 신경근 연접의 질환, 그리고 염증성 근병증)이 포함된다. 상기 방법은 ActRIIB 폴리펩티드의 효과량을 필요 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 일정한 측면에서, 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 체지방 함량을 감소시키거나 체지방 함량의 증가 속도를 감소시키고, 그리고 바람직하지 않은 체중 증가와 연관된 질환, 예를 들면, 비만, 비-인슐린 의존성 진성 당뇨병(NIDDM), 심혈관 질환, 암, 고혈압, 골관절염, 뇌졸중, 호흡 문제, 그리고 방광 질환을 치료하는 방법에 이용될 수 있다. 이들 방법은 ActRIIB 폴리펩티드의 효과량을 필요 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0020] 일정한 특정 측면에서, 본 명세서에서 개시된 ActRIIB 폴리펩티드는 GDF8의 비정상적 활성과 연관된 질환을 치료하는 방법에 이용될 수 있다. 이런 질환에는 대사 장애, 예를 들면, 2형 당뇨병, 내당능 장애, 대사 증후군(가령, 증후군 X), 그리고 외상(가령, 화상 또는 질소 불균형)에 의해 유도된 인슐린 내성; 지방 조직 질환(가령, 비만); 근이영양증(Duchenne 근이영양증 포함); 근위축성 측삭 경화증(ALS); 근육 위축; 장기 위축; 허약; 손목 굴 증후군; 울혈성 폐쇄성 폐 질환; 근육감소증, 악액질 및 기타 근육 소모 증후군; 골다공증; 글루코코르티코이드-유도된 골다공증; 골감소증; 골관절염; 골다공증-관련된 골절; 만성 글루코코르티코이드 치료에 기인한 적은 골량, 미성숙 성선부전, 안드로겐 억제, 비타민 D 결핍, 속발성 부갑상선 기능항진증, 영양 결핍, 그리고 신경성 식욕부진증이 포함된다. 상기 방법은 ActRIIB 폴리펩티드의 효과량을 필요 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0021] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 조직, 예를 들면, 뼈, 연골, 근육 및 지방의 성장을 촉진하는 작용제를 확인하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 a) ActRIIB 폴리펩티드와 경쟁적으로, ActRIIB 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인에 결합하는 검사 작용제를 확인하는 단계; 그리고 b) 조직의 성장에 대한 상기 작용제의 효과를 평가하는 단계를 포함한다.

[0022] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 세포 내에서 ActRIIB 폴리펩티드 또는 ActRIIB 리간드(가령, GDF8, GDF11, 액티빈, GDF3, BMP7, 그리고 Nodal)의 활성을 길항하는 방법을 제시한다. 이들 방법은 세포를 ActRIIB 폴리펩티드와 접촉시키는 단계를 포함한다. 선택적으로, ActRIIB 폴리펩티드 또는 ActRIIB 리간드의 활성은 예로써, 세포 증식을 모니터링함으로써 ActRIIB/ActRIIB 리간드 복합체에 의해 매개되는 신호전달에 의해 모니터링된다. 이들 방법의 세포에는 골아세포, 연골세포, 근세포, 지방세포 및 근육 세포가 포함된다.

[0023] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 ActRIIB 폴리펩티드의 용도를 제시한다.

과제의 해결 수단

[0024] 상세한 설명

[0025] 1. 개요

[0026] 일정한 측면에서, 본 발명은 ActRIIB 폴리펩티드에 관계한다. 본 명세서에서, 용어 "ActRIIB"는 임의의 종으로부터 유래된 액티빈 수용체 타입 IIB(ActRIIB) 단백질 및 ActRIIB-관련된 단백질의 패밀리를 지칭한다. ActRIIB 패밀리의 구성원은 일반적으로 모두, 시스테인-풍부한 영역을 보유하는 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 키나아제 특이성을 갖는 세포질 도메인으로 구성되는 막통과 단백질

이다.

[0027] 용어 "ActRIIB 폴리펩티드"는 ActRIIB 패밀리 구성원의 임의의 자연 발생 폴리펩티드, 그리고 유용한 활성을 유지하는 이들의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체, 그리고 펩티드모방체 형태 포함)를 포함하는 폴리펩티드를 지칭하는데 이용된다. 가령, ActRIIB 폴리펩티드에는 ActRIIB 폴리펩티드의 서열에 최소한 대략 80%, 그리고 바람직하게는 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 갖는 임의의 공지된 ActRIIB의 서열로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다.

[0028] 인간 ActRIIB 전구체는 아미노산 서열을 갖는데, 신호 펩티드는 밑줄로 표시되고, 세포외 도메인은 굵은 표시되고, 그리고 잠재적 N-연결된 당화 부위는 밑줄 및 굵게 표시된다(서열 번호: 1)(NM_001106, 512 aa).

[0029] MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHC**

[0030] **YASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE**

[0031] **AGGPEVTYEPPPTAPT**LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPG

[0032] PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFST

[0033] PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETMS

[0034] RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGD

[0035] THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLP

[0036] FEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAG

[0037] CVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

[0038] ActRIIB 폴리펩티드에는 ActRIIB 단백질의 임의의 자연 발생 세포외 도메인, 그리고 유용한 활성을 유지하는 이들의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 그리고 펩티드모방체 형태 포함)가 포함될 수 있다. 가령, ActRIIB 단백질의 세포외 도메인은 리간드에 결합하고 일반적으로 가용성이다. 신호 서열은 ActRIIB의 고유 신호 서열, 또는 다른 단백질로부터 신호 서열, 예를 들면, 조직 플라스미노겐 활성자(TPA) 신호 서열 또는 꿀벌 멜라틴(melatin)(HBM) 신호 서열일 수 있다.

[0039] 부분적으로, 본 발명에서는 ActRIIB로부터 유래된 부분이 서열 번호:1의 아미노산 25-131로부터 유래되도록 절두되는 신규한 ActRIIB 폴리펩티드를 제시한다. 본 명세서에서 확인되는 바와 같이, 이러한 유형의 폴리펩티드는 Fc 구조체, ActRIIB(25-131)-hFc로서 투여될 때, 제지방체중(주로 근육)의 형성 및 지방량의 상실을 촉진하고, 또한 대사 파라미터, 예를 들면, 혈청 트리글리세리드, 혈청 유리 지방산 및 혈청 인슐린 수준에 대한 현저한 바람직한 효과를 갖는다. 특히, ActRIIB(25-131)-hFc는 관련된 단백질, ActRIIB(20-134)보다 이들 대사 파라미터에 대한 훨씬 큰 효과를 나타낸다. 이들 데이터는 하기 실시예에서 제공된다.

[0040] TGF-β 신호는 I형과 II형 세린/트레오닌 키나아제 수용체(kinase receptor)의 이가동의 복합체(heteromeric complex)에 의해 매개되고, 이들은 리간드 자극 이후에 하류 Smad 단백질을 인산화시키고 활성화시킨다(Massague, 2000, Nat. Rev. MoI. Cell Biol. 1:169-178). 이들 I형과 II형 수용체 모두 시스테인-풍부 영역을 보유하는 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 특이성을 갖는 세포질 도메인으로 구성되는 막통과 단백질이다. I형 수용체는 신호전달에 필수적이다; II형 수용체는 리간드에 결합하고 I형 수용체의 발현을 위하여 필요하다. I형과 II형 액티빈 수용체는 리간드 결합 이후에 안정한 복합체를 형성하고, II형 수용체에 의한 I형 수용체의 인산화를 유발한다.

[0041] 2개의 관련된 II형 수용체, ActRIIA와 ActRIIB는 액티빈에 대한 II형 수용체로서 확인되었다(Mathews and Vale, 1991, 세포 65:973-982; Attisano et al., 1992, 세포 68: 97-108). 액티빈 이외에, ActRIIA와 ActRIIB는 BMP7, Nodal, GDF8과 GDF11을 비롯한 여러 다른 TGF-β 패밀리 단백질과 생화학적으로 상호작용할 수 있다(Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, MoI. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54).

[0042] 일정한 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드(가령, ActRIIB-Fc 폴리펩티드)로 ActRIIB 수용체의 리간드(일명, ActRIIB 리간드)를 길항하는 것에 관계한다. 따라서 본 발명의 조성물과 방법은 ActRIIB 수용체의 하나 이상의 리간드의 비정상적 활성과 연관된 질환을 치료하는데 유용하다. ActRIIB 수용체의 전형적인

리간드에는 일부 TGF-β 패밀리 구성원, 예를 들면, 액티빈, Nodal, GDF3, GDF8, GDF11, 그리고 BMP7이 포함된다.

[0043] 액티빈은 TGF-베타 슈퍼패밀리에 속하는 이합체(dimeric) 폴리펩티드 성장 인자이다. 2개의 밀접하게 관련된 β 아단위(subunit)의 동종이합체(homodimer)/이종이합체(heterodimer)($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$와 $\beta_A\beta_B$)인 3가지 액티빈(A, B와 AB)이 존재한다. TGF-베타 슈퍼패밀리에서, 액티빈은 난소와 태반 세포에서 호르몬 생산을 촉진하고, 신경세포 생존을 뒷받침하고, 세포 유형(cell type)에 따라 세포-주기 진행에 긍정적인 또는 부정적인 영향을 주고, 최소한 양서류 배(amphibian embryo)에서 중배엽 분화(mesodermal differentiation)를 유도할 수 있는 독특한 다중기능성 인자이다(DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). 게다가, 자극된 인간 단구성 백혈병 세포(monocytic leukemic cell)로부터 분리된 적혈구 분화 인자(erythroid differentiation factor, EDF)가 액티빈 A에 동일한 것으로 밝혀졌다(Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). 액티빈 A는 골수(bone marrow)에서 조혈(erythropoiesis)의 자연 조절로서 기능하는 것으로 제안되었다. 여러 조직에서, 액티빈 신호전달은 관련된 이종이합체, 인히빈에 의해 길항된다. 가령, 뇌하수체(pituitary)로부터 여포-자극 호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH)의 방출 동안, 액티빈은 FSH 분비와 합성을 촉진하는 반면, 인히빈은 FSH 분비와 합성을 예방한다. 액티빈 생물활성(bioactivity)을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질에는 하기에서 기술되는 폴라스타틴(follistatin, FS), 폴라스타틴-관련된 단백질(follistatin-related 단백질, FSRP), α2-마크로글로불린(macroglobulin), Cerberus, 그리고 엔도글린(endoglin)이 포함된다.

[0044] 골원성 단백질-1(OP-1)로 불리는 골 형성 단백질 7(BMP7)은 연골과 골 형성을 유도하는 것으로 널리 알려져 있다. 이에 더하여, BMP7은 다양한 생리학적 과정을 조절한다. 특히, BMP7은 갈색 지방세포 분화의 핵심 촉진자로서 최근에 확인되었다(Tseng et al., 2008, Nature 454:1000-1004). 본 연구에서, BMP7의 유전적 제거는 뮤린 배아에서 갈색 지방의 결핍 및 UCP1의 거의 완전한 부재를 유발하였다. 게다가, 아데노바이러스 투여에 의한 생쥐에서 BMP7 발현의 상향조절은 갈색 지방량 및 에너지 소비를 증가시켰다. 액티빈과 유사하게, BMP7은 II형 수용체, ActRIIA 및 ActRIIB에 결합한다. 하지만, BMP7과 액티빈은 이가동의 수용체 복합체 내로 상이한 I형 수용체를 동원한다. 관찰된 주요 BMP7 I형 수용체는 ALK2인 반면, 액티빈은 ALK4(ActRIIB)에 배타적으로 결합하였다. BMP7과 액티빈은 상이한 생물학적 반응을 유도하고 상이한 Smad 경로를 활성화시켰다(Macias-Silva et al., 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

[0045] Vg1-관련된 2로 알려져 있는 성장-및-분화 인자-3(GDF3)은 배 발달에서 중요한 역할을 수행하고, 그리고 성년 동안 지방생성(adipogenesis)에도 관여한다. 간단히 말하면, 흰색 지방 조직 내에서 GDF3의 발현은 체질량 또는 비만과 상관하고(Weisberg et al., 2003, J Clin Invest 112:1796-1808), 그리고 GDF3의 아데노바이러스-매개된 과다발현은 야생형 생쥐에서 고지방 식이 조건 하에 관찰되는 지방과다의 증가를 악화시켰다(Wang et al., 2004, Biochem Biophys Res Commun 321:1024-1031). 중요하게는, GDF3이 유전적 제거된 생쥐는 표준 식이에 유지될 때 건강하고 본질적으로 정상이지만, 고지방 식이에 유지될 때 비만으로부터 보호되고, 그리고 증가된 기초 대사율을 나타낸다(Shen et al., 2009, Mol Endocrinol 23:113-123). 종합하면, 이들 조사 결과는 구체적으로 식이-유도된 비만에서, 그리고 더욱 일반적으로 지방과다의 조절에서 GDF3을 관련시킨다.

[0046] Nodal 단백질은 중배엽과 내배엽 유도 및 형성, 그리고 초기 배아발생에서 축 구조(axial structure), 예를 들면, 심장과 위의 차후 조직화에서 기능을 갖는다. 발달 중인 척추동물 배아에서 등 조직은 척삭(notochord) 및 척삭앞판(pre-chordal plate)의 축 구조에 지배적으로 기여하고, 여기서 상기 조직은 주변 세포를 보충하여 비-축 배아 구조를 형성하는 것으로 밝혀졌다. Nodal은 I형과 II형 수용체 둘 모두, 그리고 Smad 단백질로 알려져 있는 세포내 작동체를 통해 신호하는 것으로 보인다. 최근의 연구는 ActRIIA 및 ActRIIB가 Nodal에 대한 II형 수용체로서 기능한다는 생각을 뒷받침한다(Sakuma et al., Genes Cells. 2002, 7:401-12). Nodal 리간드는 그들의 보조-인자(가령, cripto)와 상호작용하여 액티빈 I형과 II형 수용체를 활성화시키고, 이들 수용체가 Smad2를 인산화시키는 것으로 제안된다. Nodal 단백질은 중배엽 형성, 머리 패턴형성(anterior patterning), 그리고 왼쪽-오른쪽 축 지정(left-right axis specification)을 비롯하여, 초기 척추동물 배아에게 중요한 많은 사건에 관여한다. 실험적 증거는 Nodal 신호전달이 액티빈 및 TGF-베타에 특이적으로 반응하는 것으로 이전에 밝혀진 pAR3-Lux, 루시페라아제 리포터를 활성화시킨다는 것을 증명하였다. 하지만, Nodal은 골 형성 단백질에 특이적으로 반응하는 리포터인 pTlx2-Lux를 유도할 수 없다. 최근의 결과는 Nodal 신호전달이 양쪽 액티빈-TGF-베타 경로 Smad, Smad2와 Smad3에 의해 매개된다는 직접적인 생화학적 증거를 제공한다. 추가의 증거는 세포외 cripto 단백질이 Nodal 신호전달에 요구되고, 이것을 액티빈 또는 TGF-베타 신호전달과 달라지도록 만든다는 것을 증명하였다.

[0047] 성장 및 분화 인자-8(GDF8)은 또한, 미오스타틴으로 알려져 있다. GDF8은 골격 근육량의 음성 조절자이다. GDF8은 발달 중인 및 성인 골격 근육에서 고도로 발현된다. 유전자도입 생쥐에서 GDF8 눌 돌연변이(null mutation)는 골격 근육의 현저한 비대와 과형성으로 특징된다(McPherron et al., Nature, 1997, 387:83-90). 골격 근육량에서 유사한 증가는 소(Ashmore et al., 1974, Growth, 38:501-507; Swatland and Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38:752-757; McPherron and Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:12457-12461; 그리고 Kambadur et al., Genome Res., 1997, 7:910-915)에서, 그리고 특히 인간(Schuelke et al., N Engl J Med 2004;350:2682-8)에서 GDF8의 자연 발생 돌연변이에서 증거된다. 또한, 여러 연구에서 인간에서 HIV-감염과 연관된 근육 소모증은 GDF8 단백질 발현에서 증가를 동반하는 것으로 밝혀졌다(Gonzalez-Cadavid et al., PNAS, 1998, 95:14938-43). 이에 더하여, GDF8은 근육-특이적 효소(가령, 크레아틴 키나아제)의 생산을 조정하고 근아세포 세포 증식(WO 00/43781)을 조정할 수 있다. GDF8 프로펩티드는 성숙 GDF8 도메인 이합체에 비-공유 결합하여 이의 생물학적 활성을 비활성화시킬 수 있다(Miyazono et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) J. Biol. Chem., 263; 7646-7654; 그리고 Brown et al. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). GDF8 또는 구조적으로 관련된 단백질에 결합하고 그들의 생물학적 활성을 저해하는 다른 단백질에는 폴리스타틴, 그리고 잠재적으로, 폴리스타틴-관련된 단백질이 포함된다(Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

[0048] BMP11로 알려져 있는 성장 및 분화 인자-11(GDF11)은 분비된 단백질이다(McPherron et al., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11은 생쥐 발달 동안 꼬리 싹, 사지 싹, 상악과 하악 궁, 그리고 뒤뿌리 신경절에서 발현된다(Nakashima et al., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11은 중배엽과 신경 조직 둘 모두를 패턴형성하는데 독특한 역할을 수행한다(Gamer et al., 1999, Dev Biol., 208:222-32). GDF11은 발달 중인 병아리 사지에서 연골형성 및 근발생의 음성 조절자인 것으로 밝혀졌다(Gamer et al., 2001, Dev Biol. 229:407-20). 근육에서 GDF11의 발현은 또한, GDF8에 유사한 방식으로 근육 성장의 조절에서 이의 역할을 암시한다. 이에 더하여, 뇌내에서 GDF11의 발현은 GDF11이 신경계의 기능에 관련되는 활성 역시 갖는다는 것을 암시한다. 흥미롭게도, GDF11은 후각 상피에서 신경형성을 저해하는 것으로 밝혀졌다(Wu et al., 2003, Neuron. 37:197-207). 따라서 GDF11은 근육 질환 및 신경퇴행성 질환(가령, 근위축성 측삭 경화증)과 같은 질환의 치료에서 시험관내 및 생체내 적용을 가질 수 있다.

[0049] 일정한 측면에서, 본 발명은 전반적으로, ActRIIB 활성과 연관된 임의의 과정에서 ActRIIB 리간드의 신호전달을 길항하는 일정한 ActRIIB 폴리펩티드의 용도에 관계한다. 선택적으로, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 수용체의 하나 이상의 리간드, 예를 들면, 액티빈, Nodal, GDF8, GDF11, 그리고 BMP7을 길항할 수 있고, 따라서 추가 질환의 치료에 유용할 수 있다.

[0050] 이런 이유로, 본 발명에서는 ActRIIB 또는 ActRIIB 리간드의 비정상적 활성과 연관된 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는데 ActRIIB 폴리펩티드의 이용을 예기한다. ActRIIB 또는 ActRIIB 리간드는 많은 결정적인 생물학적 과정의 조절에 관여한다. 이들 과정에서 그들의 핵심 기능으로 인하여, 이들은 치료 개입(therapeutic intervention)을 위한 바람직한 표적일 수 있다. 가령, ActRIIB 폴리펩티드(가령, ActRIIB-Fc 폴리펩티드)는 인간 또는 동물 질환 또는 장애를 치료하는데 이용될 수 있다. 이런 질환 또는 장애의 실례에는 대사 장애, 예를 들면, 2형 당뇨병, 내당능 장애, 대사 증후군(가령, 증후군 X), 그리고 외상(가령, 화상 또는 질소 불균형)에 의해 유도된 인슐린 내성; 지방 조직 질환(가령, 비만); 근육과 신경근 질환, 예를 들면, 근이영양증(Duchenne 근이영양증 포함); 근위축성 측삭 경화증(ALS); 근육 위축; 장기 위축; 허약; 손목 굴 증후군; 울혈성 폐쇄성 폐 질환; 그리고 근육감소증, 악액질 및 기타 근육 소모 증후군이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다른 실례에는 특히 노인 및/또는 폐경후 여성에서 골다공증; 글루코코르티코이드-유도된 골다공증; 골감소증; 골관절염; 그리고 골다공증-관련된 골절이 포함된다. 또 다른 실례에는 만성 글루코코르티코이드 치료에 기인한 적은 골량, 미성숙 성선부전, 안드로겐 억제, 비타민 D 결핍, 속발성 부갑상선 기능항진증, 영양 결핍, 그리고 신경성 식욕부진증이 포함된다. 이들 질환 및 장애는 하기 “예시적인 치료 용도”에서 논의된다. 언급된 바와 같이, 본 명세서에서 개시된 절두된 ActRIIB 폴리펩티드는 대사 파라미터에 대한 특히 유익한 효과를 갖는 것으로 생각된다.

[0051] 본 명세서에 이용되는 용어는 일반적으로, 본 발명의 배경 내에서, 그리고 각 용어가 이용되는 특정 문맥에서, 당분야의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본 발명의 조성물과 방법, 그리고 이들을 만들고 이용하는 방법을 기술함에 있어 실시자(practitioner)에게 부가적인 보도(guidance)를 제공하기 위하여 하기에 또는 본 명세서의 다른 곳에서 논의된다. 이용되는 용어의 범위 또는 의미는 이러한 용어가 이용되는 특정 문맥으로부터 명백할 것이다.

[0052] 일반적으로, “대략”은 측정의 특성 또는 정확도를 고려할 때, 측정된 양에 대한 허용 오차(acceptable degree of error)를 의미한다. 전형적으로, 예시적인 허용 오차는 일정한 수치 또는 수치 범위의 20 퍼센트(%) 이내, 바람직하게는, 10% 이내, 더욱 바람직하게는, 5% 이내로 존재한다.

[0053] 대안으로, 특히 생물학적 시스템에서, “대략”은 일정한 수치의 1 크기 자릿수(order of magnitude) 이내, 바람직하게는, 5-배 이내, 더욱 바람직하게는, 2-배 이내의 수치를 의미한다. 본 명세서에 제공된 수치량(numerical quantity)은 달리 명시되지 않는 경우에 근사치(approximate)인데, 이는 “대략”이 명시되지 않는 경우에, 유추될 수 있음을 의미한다.

[0054] 본 발명의 방법은 서열을 서로 비교하는 단계, 예를 들면, 야생형 서열을 하나 이상의 돌연변이체(서열 변이체)와 비교하는 단계를 포함한다. 전형적으로, 이런 비교는 예로써, 당분야에 널리 공지된 서열 정렬 프로그램 및/또는 알고리즘(가령, BLAST, FASTA와 MEGALIGN)을 이용한 고분자 서열의 정렬을 포함한다. 당업자는 이런 정렬에서, 돌연변이가 잔기 삽입 또는 결실을 내포하는 경우에, 서열 정렬이 삽입되거나 결실된 잔기를 보유하지 않는 고분자 서열 내에 “갭(gap)”(전형적으로, 대시(dash), 또는 "A"로 표시됨)을 도입할 것임을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

[0055] “상동한(homologous)”은 모든 문법적 형태와 스펠링 변형에서, 동일한 종의 생물체에서 슈퍼패밀리로부터 단백질, 그리고 상이한 종의 생물체로부터 상동한 단백질을 비롯한, “공통의 진화적 기원(common evolutionary origin)”을 공유하는 두 단백질 사이의 상관관계를 지칭한다. 이들 단백질(또는 그들의 인코딩 핵산)은 동일성 퍼센트(percent identity)의 관점에서, 또는 특정 잔기 또는 모티프와 보존된 위치의 존재에 의해, 그들의 서열 유사성(sequence similarity)에 의해 반영되는 서열 상동성(sequence homology)을 갖는다.

[0056] “서열 유사성”은 모든 문법적 형태에서, 공통의 진화적 기원을 공유하거나 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 동일성 또는 일치성의 정도를 지칭한다.

[0057] 하지만, 통상적인 관례와 본 출원에서, “고도로”와 같은 부사로 수식될 때 “상동한”은 서열 유사성을 지칭하고, 공통의 진화적 기원에 관련되거나 관련되지 않는다.

[0058] 2. ActRIIB 폴리펩티드

[0059] 일정한 측면에서, 본 발명은 ActRIIB 폴리펩티드(가령, ActRIIB-Fc 폴리펩티드), 특히 서열 번호:1의 아미노산 25-131을 포함하는 폴리펩티드로 예시되는 절두된 형태, 그리고 이들의 변이체에 관계한다. 선택적으로, 이들 단편, 기능성 변이체, 그리고 변형된 형태는 그들의 상응하는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 유사한 또는 동일한 생물학적 활성을 갖는다. 가령, 본 발명의 ActRIIB 변이체는 ActRIIB 리간드(가령, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, Nodal, GDF8, GDF11 또는 BMP7)에 결합하고 이의 기능을 저해할 수 있다. 선택적으로, ActRIIB 폴리펩티드는 조직, 예를 들면, 뼈, 연골, 근육 또는 지방 또는 대사 파라미터, 예를 들면, 트리글리세리드, 유리 지방산 또는 인슐린의 성장을 조정한다. ActRIIB 폴리펩티드의 실례에는 인간 ActRIIB 전구체 폴리펩티드(서열 번호: 1), 그리고 Fc 융합 단백질, 예를 들면, 서열 번호: 3과 8이 포함된다. 이들 폴리펩티드에서 변형은 아래의 보도에 따라 제조될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드에서 아미노산의 넘버링은 고유 리더 서열이 이용되는 지에 상관없이, 서열 번호:1의 서열에 기초된다.

[0060] 본 발명은 ActRIIB의 기능성 활성 부분 및 변이체를 확인한다. 본 발명자들은 서열 번호: 1의 아미노산 64에 상응하는 위치에서 알라닌을 보유하는, Hilden et al., Blood. 1994 Apr 15;83(8):2163-70에서 개시된 서열을 갖는 Fc 융합 단백질(A64)은 액티빈 및 GDF-11에 대한 상대적으로 낮은 친화성을 갖는다는 것을 확인한다. 대조적으로, 위치 64에서 아르기닌을 보유하는 동일한 Fc 융합 단백질(R64)은 낮은 나노몰 내지 높은 피코몰 범위에서 액티빈 및 GDF-11에 대한 친화성을 갖는다. 이런 이유로, R64를 보유하는 서열은 본 발명에서 인간 ActRIIB에 대한 야생형 참고 서열로서 이용된다.

[0061] Attisano et al., Cell. 1992 Jan 10;68(1):97-108에서는 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단에서 프롤린 노트(knot)의 결실은 액티빈에 대한 수용체의 친화성을 감소시킨다는 것을 증명하였다. P129와 P130의 돌연변이는 리간드 결합을 실질적으로 감소시키지 못한다.

[0062] ActRIIB 리간드 결합 포켓은 잔기 Y31, N33, N35, L38 내지 T41, E47, E50, Q53 내지 K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 내지 N83, Y85, R87, A92, 그리고 E94 내지 F101에 의해 정의된다. 이들 위치에서, 보존성 돌연변이는 관용될 것으로 예상되는데, 비록 K74A 돌연변이가 충분히 관용되긴 하지만, R40A, K55A, F82A 및 위치

L79에서 돌연변이 역시 그러하다. R40은 손톱개구리속(Xenopus)에서 K이고, 이는 상기 위치에서 염기성 아미노산이 관용된다는 것을 지시한다. Q53은 소 ActRIIB에서 R이고 손톱개구리속 ActRIIB에서 K이고, 따라서 R, K, Q, N 및 H를 비롯한 아미노산은 상기 위치에서 관용될 것이다. 따라서 ActRIIB 단백질은 아미노산 25-131을 포함하고, 그리고 리간드 결합 포켓 내에서 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 보존성 아미노산 변화 및 리간드 결합 포켓 내에서 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에서 0개, 1개 또는 그 이상의 비-보존성 변경을 포함하는 것일 수 있다. 이런 단백질은 서열 번호:1의 아미노산 25-131의 서열에 80%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 유지할 수 있다. 가변성(variability)이 특히 관용되는 결합 포켓 외부의 부위에는 세포외 도메인의 아미노와 카르복시 말단(앞서 언급됨), 그리고 위치 42-46 및 65-73이 포함된다. 위치 65에서 아스파라긴에서 알라닌 변경(N65A)은 A64 배경에서 리간드 결합을 실질적으로 향상시키고, 따라서 R64 배경에서 리간드 결합에 대한 유해한 효과를 나타내지 않을 것으로 예상된다. 이러한 변화는 아마도, A64 배경에서 N65에서 당화를 제거하고, 따라서 이러한 영역에서 현저한 변화가 관용될 가능성이 높다는 것을 증명한다. R64A 변화는 불량하게 관용되는 반면, R64K는 충분히 관용되고, 따라서 다른 염기성 잔기, 예를 들면, H가 위치 64에서 관용될 수 있다.

[0063] ActRIIB는 거의 모든 척추동물에서 충분히 보존되는데, 세포외 도메인의 대형 스트레치는 완전하게 보존된다. 또한, ActRIIB에 결합하는 리간드 중에서 다수가 고도로 보존된다. 따라서 다양한 척추동물 생물체로부터 ActRIIB 서열의 비교는 변경될 수 있는 잔기에 대한 통찰력을 제공한다. 이런 이유로, 활성 인간 ActRIIB는 다른 척추동물 ActRIIB의 서열로부터 상응하는 위치에서 하나 이상의 아미노산을 보유하거나, 또는 인간 또는 기타 척추동물 서열에서와 유사한 잔기를 보유할 수 있다. 아래의 실례는 활성 ActRIIB 변이체를 정의하는 이러한 접근법을 예시한다. L46은 손톱개구리속 ActRIIB에서 발린이고, 따라서 상기 위치는 변경될 수 있고, 그리고 선택적으로, 다른 소수성 잔기, 예를 들면, V, I 또는 F, 또는 비-극성 잔기, 예를 들면, A로 변경될 수 있다. E52는 손톱개구리속에서 K이고, 이는 상기 부위가 극성 잔기, 예를 들면, E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y 및 아마도 A를 비롯하여, 매우 다양한 변화를 관용할 수 있다는 것을 지시한다. T93은 손톱개구리속에서 K이고, 이는 넓은 구조적 변형이 상기 위치에서 관용된다는 것을 지시하는데, 극성 잔기, 예를 들면, S, K, R, E, D, H, G, P, G 및 Y가 선호된다. F108은 손톱개구리속에서 Y이고, 따라서 Y 또는 기타 소수성 기, 예를 들면, I, V 또는 L이 관용될 것이다. E111은 손톱개구리속에서 K이고, 이는 D, R, K와 H, 그리고 Q와 N을 비롯한 하전된 잔기가 상기 위치에서 관용될 것이라는 것을 지시한다. R112는 손톱개구리속에서 K이고, 이는 R과 H를 비롯한 염기성 잔기가 상기 위치에서 관용된다는 것을 지시한다. 위치 119에서 A는 상대적으로 불량하게 보존되고, 그리고 설치류에서 P 및 손톱개구리속에서 V로서 나타나고, 따라서 본질적으로 임의의 아미노산이 상기 위치에서 관용될 것이다.

[0064] 추가의 N-연결된 당화 부위(N-X-S/T)는 ActRIIB 폴리펩티드에 추가되고, 그리고 ActRIIB(R64)-Fc 형태에 비하여 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. NX(T/S) 서열의 실례는 42-44(NQS) 및 65-67(NSS)에서 발견되지만, 후자는 위치 64에서 R로 효율적으로 당화되지 않을 수도 있다. N-X-S/T 서열은 일반적으로, 리간드 결합 포켓 외부의 위치에 도입될 수 있다. 비-내인성 N-X-S/T 서열의 도입에 특히 적합한 부위에는 아미노산 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 또는 129-134가 포함된다. N-X-S/T 서열은 또한, ActRIIB 서열 및 Fc 또는 기타 융합 성분 사이에 링커 내로 도입될 수 있다. 이런 부위는 기존의 S 또는 T에 대하여 정확한 위치 내에 N을 도입함으로써, 또는 기존의 N에 상응하는 위치에서 S 또는 T를 도입함으로써 최소 노력으로 도입될 수 있다. 따라서 N-연결된 당화 부위를 발생시키는 바람직한 변경은 A24N, R64N, S67N(아마도, N65A 변경과 합동), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S 및 R112T이다. 당화되는 것으로 예측되는 임의의 S는 당화에 의해 부여된 보호로 인하여 면역원성 부위를 발생시키지 않으면서 T로 변경될 수 있다. 유사하게, 당화되는 것으로 예측되는 임의의 T는 S로 변경될 수 있다. 따라서 변경 S67T 및 S44T가 예기된다. 유사하게, A24N 변이체에서, S26T 변경이 이용될 수 있다. 따라서 ActRIIB 변이체는 하나 이상의 추가, 비-내인성 N-연결된 당화 공통 서열을 보유할 수 있다.

[0065] 기술된 변형은 다양한 방식으로 합동될 수 있다. 추가적으로, 종종 보존하는데 유익한 ActRIIB 내에 아미노산 위치가 존재한다. 이들에는 위치 64(염기성 아미노산), 위치 80(산성 또는 소수성 아미노산), 위치 78(소수성, 그리고 특히 트립토판), 위치 37(산성, 그리고 특히, 아스파르트산 또는 글루탐산), 위치 56(염기성 아미노산), 위치 60(소수성 아미노산, 특히 페닐알라닌 또는 티로신)이 포함된다. 보존하는데 바람직할 수 있는 다른 위치는 아래와 같다: 위치 52(산성 아미노산), 위치 55(염기성 아미노산), 위치 81(산성), 98(극성 또는 하전된, 특히 E, D, R 또는 K).

[0066] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 치료 효능, 또는 안정성(가령, 탈체 저장 수명(ex vivo shelf life) 및 생체내에서 단백분해에 대한 내성)을 증강시키는 것과 같은 목적을 위하여 ActRIIB 폴리펩티드의 구조를 변형함으로

써 기능성 변이체를 만드는 것을 예기한다. 예로써, 변형된 ActRIIB 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실, 또는 부가에 의해 산출될 수도 있다. 가령, 류신의 이소류신 또는 발린으로의 고립된 치환, 아스파라긴산염의 글루타민산염으로의 고립된 치환, 트레오닌의 세린으로의 고립된 치환, 또는 구조적으로 관련된 아미노산으로 아미노산의 유사 치환(가령, 보존성 돌연변이)이 생성 분자의 생물학적 활성에 별다른 영향을 주지 않을 것으로 기대하는 것은 합당하다. 보존성 치환(conservative replacement)은 측쇄(side chain)에서 관련된 아미노산 패밀리 내에서 발생하는 치환이다. ActRIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화가 기능성 동족체(functional homolog)를 결과하는 지의 여부는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드에서와 유사한 방식으로 세포내 반응을 산출하거나, 또는 야생형과 유사한 방식으로 하나 이상의 리간드, 예를 들면, 액티빈, GDF-11 또는 미오스타틴에 결합하는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0067] 일정한 특정 구체예에서, 본 발명에서는 변이체(또는 돌연변이체) ActRIIB 폴리펩티드가 변화된 리간드-결합 활성(가령, 결합 친화성 또는 결합 특이성)을 갖도록 ActRIIB 폴리펩티드의 세포외 도메인(일명, 리간드-결합 도메인)에서 돌연변이를 만드는 것을 예기한다. 일정한 경우에, 이들 변이체 ActRIIB 폴리펩티드는 특정 리간드에 대한 변화된(상승된 또는 감소된) 결합 친화성을 갖는다. 다른 경우에, 변이체 ActRIIB 폴리펩티드는 그들의 리간드에 대한 변화된 결합 특이성을 갖는다.

[0068] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 폴리펩티드의 당화를 변화시키는 ActRIIB 폴리펩티드의 특이적인 돌연변이를 예기한다. 이런 돌연변이는 하나 이상의 당화 부위, 예를 들면, O-연결된 또는 N-연결된 당화 부위를 도입하거나 제거하기 위하여 선택된다. 아스파라긴-연결된 당화 인식 부위는 일반적으로, 적절한 세포 당화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트리펩티드(tripeptide) 서열, 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, "X"는 임의의 아미노산이다)을 포함한다. 이러한 변형은 야생형 ActRIIB 폴리펩티드의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기(O-연결된 당화 부위의 경우)의 추가 또는 이들 잔기에 의한 치환에 의해 달성될 수도 있다. 당화 인식 부위의 첫 번째 또는 세 번째 아미노산 위치의 한쪽 또는 양쪽에서 다양한 아미노산 치환 또는 결실(및/또는 두 번째 위치에서 아미노산 결실)은 변형된 트리펩티드 서열에서 비-당화를 유발한다. ActRIIB 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 총수를 증가시키는 다른 수단은 ActRIIB 폴리펩티드에 글리코시드(glycoside)의 화학적 또는 효소적 결합이다. 이용된 결합 양식(coupling mode)에 따라, 당은 (a) 아르기닌과 히스티딘; (b) 유리 카르복실 기; (c) 유리 설피드릴 기, 예를 들면, 시스테인 기; (d) 유리 히드록실 기, 예를 들면, 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린 기; (e) 방향족 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판 잔기; 또는 (f) 글루타민의 아미드 기에 부착될 수 있다. 이들 방법은 본 명세서에서 참조로서 편입되는, 1987년 9월 11일 공개된 WO 87/05330, 그리고 Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306에서 기술된다. ActRIIB 폴리펩티드 상에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈당화(deglycosylation)는 예로써, 화합물 트리플루오르메탄설폰산(trifluoromethanesulfonic acid), 또는 등가의 화합물에 ActRIIB 폴리펩티드의 노출을 수반한다. 이러한 처리는 아미노산 서열을 본래 상태로 유지하면서, 연결 당(linking sugar)(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 전체 당의 절단을 결과한다. 화학적 탈당화는 Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 및 Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131에 의해 더욱 기술된다. ActRIIB 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350에 기술된 바와 같이, 다양한 엔도-와 엑소-글리코시다아제의 이용으로 달성될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드의 서열은 포유동물, 효모, 곤충과 식물 세포 모두 상기 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 당화 패턴을 도입하기 때문에, 이용된 발현 시스템의 타입에 따라, 적절히 조정될 수 있다. 일반적으로, 인간에 이용되는 ActRIIB 단백질은 다른 포유동물 발현 세포주 역시 유용할 것으로 기대되긴 하지만, 적절한 당화를 제공하는 포유동물 세포주, 예를 들면, HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현될 것이다.

[0069] 본 발명에서는 변이체, 특히 선택적으로 절두 변이체를 비롯한 ActRIIB 폴리펩티드의 조합 변이체 세트를 산출하는 방법을 더욱 예기한다; 조합 돌연변이체의 집합은 기능적 변이체 서열을 확인하는데 특히 유용하다. 이런 조합 라이브러리(combinatorial library)를 선별하는 목적은 변화된 성질, 예를 들면, 변화된 약물동력학, 또는 변화된 리간드 결합을 갖는 ActRIIB 폴리펩티드 변이체를 산출하는 것이다. 다양한 선별 검사법(screening assay)이 아래에 제공되는데, 이들 검사법은 변이체를 평가하는데 이용될 수 있다. 가령, ActRIIB 폴리펩티드 변이체는 ActRIIB 폴리펩티드에 결합하거나, 또는 ActRIIB 폴리펩티드에 ActRIIB 리간드의 결합을 예방하는 능력에 대하여 선별될 수 있다.

[0070] ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 세포-기초된 또는 생체내 검사법으로 조사될 수도 있다. 가령, 골아세포 또는 전구체에서 골 생산에 관여하는 유전자의 발현에 대한 ActRIIB 폴리펩티드 변이체의 효과가 평가

될 수 있다. 이것은 필요에 따라, 하나 이상의 재조합 ActRIIB 리간드 단백질(가령, BMP7)의 존재에서 수행될 수 있고, 그리고 세포는 ActRIIB 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 그리고 선택적으로, ActRIIB 리간드를 생산하기 위하여 형질감염될 수 있다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드는 생쥐 또는 기타 동물에 투여될 수 있고, 그리고 하나 이상의 뼈 성질, 예를 들면, 밀도 또는 용적이 평가될 수 있다. 골절에 대한 치유 속도 역시 평가될 수 있다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 예로써, 하기에 기술된 바와 같은 검사법에 의해, 근육 세포, 지방세포, 그리고 뉴런 세포에서 이들 세포의 성장에 대한 효과에 대하여 조사될 수 있다. 이런 검사법은 널리 공지되어 있고 당분야에서 일과적이다. SMAD-반응성 리포터 유전자가 하류 신호전달에 대한 효과를 모니터링하기 위하여 이들 세포주에 이용될 수 있다.

[0071] 자연 발생 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하여 선별적 효능을 갖는 조합적으로-유도된 변이체가 산출될 수 있다. 이런 변이체 단백질은 재조합 DNA 구조체로부터 발현될 때, 유전자 요법 프로토콜에 이용될 수 있다. 유사하게, 돌연변이유발은 상응하는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 극적으로 상이한 세포내 반감기를 갖는 변이체를 산출할 수 있다. 가령, 변형된 단백질은 고유 ActRIIB 폴리펩티드의 파괴, 또는 비활성화(inactivation)를 유발하는 단백분해 변성 또는 다른 세포 과정에 더욱 안정한 또는 덜 안정하게 될 수 있다. 이런 변이체 및 이들을 인코딩하는 유전자는 ActRIIB 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 ActRIIB 폴리펩티드 수준을 변화시키는데 이용될 수 있다. 가령, 짧은 반감기는 더욱 일시적인 생물학적 효과를 유도할 수 있고, 그리고 유도성 발현 시스템의 일부일 때, 세포 내에서 재조합 ActRIIB 폴리펩티드 수준의 더욱 엄격한 제어를 가능하게 한다.

[0072] 일정한 구체예에서, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 변형 이외에, 번역후 변형을 더욱 포함한다. 이런 변형에는 아세틸화(acetylation), 카르복실화(carboxylation), 당화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 지질화(lipidation), 아실화(acylation) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 결과적으로, 변형된 ActRIIB 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 지질(lipid), 폴리- 또는 모노-사카라이드, 인산염을 포함한다. ActRIIB 폴리펩티드의 기능성에 대한 이런 비-아미노산 요소의 효과는 다른 ActRIIB 폴리펩티드 변이체에 대하여 본 명세서에 기술된 바와 같이 검사될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드가 ActRIIB 폴리펩티드의 초기 형태(nascent form)를 절단함으로써 세포 내에서 생산될 때, 번역후 가공(post-translational processing) 역시 상기 단백질의 정확한 접힘(folding) 및/또는 기능에 중요하다. 상이한 세포(가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이런 번역후 활성을 위한 특이적인 세포 조직(cellular machinery)과 특징적인 기전을 보유하고, 그리고 ActRIIB 폴리펩티드의 정확한 변형과 가공을 담보하도록 선택된다.

[0073] 일정한 측면에서, ActRIIB 폴리펩티드의 기능적 변이체 또는 변형된 형태에는 ActRIIB 폴리펩티드의 최소한 일부분 및 하나 이상의 융합 도메인을 보유하는 융합 단백질이 포함된다. 이런 융합 도메인의 널리 공지된 실례에는 폴리히스티딘(polyhistidine), Glu-Glu, 글루타티온 S 전달효소(glutathione S transferase, GST), 티오레독신(thioredoxin), 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토오스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 특성을 공여하도록 선택될 수 있다. 가령, 일부 융합 도메인은 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 분리에 특히 유용하다. 친화성 정제를 위하여, 친화성 크로마토그래피에 적합한 매트릭스(matrix), 예를 들면, 글루타티온-, 아밀라아제-, 그리고 니켈- 또는 코발트-접합된 수지가 이용된다. 대부분의 이들 매트릭스는 “키트” 형태, 예를 들면, Pharmacia GST 정제 시스템 및 (HIS_6) 융합 파트너와 함께 이용되는 QIAexpress™ 시스템(Qiagen)으로 가용하다. 다른 실례로써, 융합 도메인은 ActRIIB 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 선택된다. 이런 검출 도메인의 실례에는 다양한 형광 단백질(가령, GFP) 및 특이적인 항체가 가용한 일반적으로 짧은 펩티드 서열인 “에피토프 태그(epitope tag)”가 포함된다. 특이적인 단클론 항체가 용이하게 가용한 널리 공지된 에피토프 태그에는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(influenza virus haemagglutinin, HA), c-myc 태그 등이 포함된다. 일부 사례에서, 융합 도메인은 관련된 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 절단하여 이로부터 재조합 단백질을 유리할 수 있도록 하는 프로테아제 절단 부위, 예를 들면, 인자 Xa 또는 트롬빈(thrombin)에 대한 절단 부위를 보유한다. 유리된 단백질은 이후, 차후의 크로마토그래피 분리(chromatographic separation)에 의해 융합 도메인으로부터 분리될 수 있다. 바람직한 특정 구체예에서, ActRIIB 폴리펩티드는 생체내에서 ActRIIB 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인(“안정화제” 도메인)과 융합된다. “안정화”는 이러한 안정화가 감소된 파괴, 신장에 의한 감소된 제거, 또는 다른 약물동력학적 효과에 기인하는 지에 상관없이, 혈청 반감기를 증가시키는 무언가를 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 단백질에 바람직한 약물동력학적 특성을 공여하는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 융합이 바람직한 특성을 공여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 유형의 융합 도메인에는 다합체화(가령, 이합체화, 사합체화) 도메인 및 기능적 도메인(부가적인

생물학적 기능, 예를 들면, 골 성장의 추가적인 자극을 공여한다)이 포함된다.

[0074] 특정 실례로써, 본 발명에서는 Fc 도메인에 융합된 세포외(가령, GDF8-결합) 도메인을 포함하는 GDF8 길항약으로서 융합 단백질(가령, 서열 번호: 9)을 제시한다.

[0075] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*

[0076] 선택적으로, Fc 도메인은 Asp-265, 리신 322, Asn-434와 같은 잔기에서 하나 이상의 돌연변이를 보유한다. 일정한 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나 이상(가령, Asp-265 돌연변이)을 보유하는 변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fcɣ 수용체에 대한 결합 능력이 감소한다. 다른 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나 이상(가령, Asn-434 돌연변이)을 보유하는 변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC 클래스 I-관련된 Fc-수용체(FcRN)에 대한 결합 능력이 증가한다.

[0077] 이들 융합 단백질의 상이한 요소는 원하는 기능성(functionality)과 일치하는 방식으로 정렬될 수 있다. 가령, ActRIIB 폴리펩티드가 이종기원성 도메인에서 C-말단에 위치하거나, 또는 대안으로, 이종기원성 도메인이 ActRIIB 폴리펩티드에서 C-말단에 위치한다. ActRIIB 폴리펩티드 도메인 및 이종기원성 도메인은 융합 단백질 내에서 반드시 인접할 필요가 없고, 그리고 부가적인 도메인 또는 아미노산 서열이 한쪽 도메인에서 C- 또는 N-말단에, 또는 이들 도메인 사이에 포함될 수 있다.

[0078] 일정한 구체예에서, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 이상의 변형을 포함한다. 가령, 이런 변형은 ActRIIB 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 증강시키거나, ActRIIB 폴리펩티드의 순환 반감기(circulatory half-life)를 증강시키거나, 또는 ActRIIB 폴리펩티드의 단백분해 변성을 감소시킨다. 이런 안정화 변형에는 융합 단백질(가령, ActRIIB 폴리펩티드와 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질 포함), 당화 부위의 변형(가령, ActRIIB 폴리펩티드에 당화 부위의 추가 포함), 탄수화물 모이어티(carbohydrate moiety)의 변형(가령, ActRIIB 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거 포함) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 융합 단백질의 경우에, ActRIIB 폴리펩티드는 안정화제 도메인, 예를 들면, IgG 분자(가령, Fc 도메인)에 융합된다. 본 명세서에서, "안정화제 도메인"은 융합 단백질의 경우에서처럼 융합 도메인(가령, Fc)을 지칭할 뿐만 아니라, 탄수화물 모이어티와 같은 비-단백질성 변형, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비-단백질성 중합체를 포괄한다.

[0079] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIB 폴리펩티드의 분리된 및/또는 정제된 형태를 이용하는데, 이들은 다른 단백질로부터 분리되거나, 또는 다른 단백질이 실질적으로 부재한다.

[0080] 일정한 구체예에서, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드(변형되지 않은 또는 변형된)는 다양한 공지된 기술에 의해 생산될 수 있다. 가령, 이들 ActRIIB 폴리펩티드는 Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) 및 Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)에서 기술된 것들과 같은 표준 단백질 화학 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 이에 더하여, 자동화 펩티드 합성기는 상업적으로 구입가능하다(가령, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). 대안으로, ActRIIB 폴리펩티드, 단편 또는 이의 변이체는 당분야에 널리 공지된 바와 같은 다양한 발현 시스템(가령, 대장균(E. coli), 중국 햄스터 난소 세포, COS 세포, 배큘로바이러스)을 이용하여 재조합 방식으로 생산될 수 있다(하기 참조). 다른 구체예에서, 변형된 또는 변형되지 않은 ActRIIB 폴리펩티드는 예로써, 프로테아제, 예를 들면, 트립신(trypsin), 서몰리신(thermolysin), 키모트립신(chymotrypsin), 펩신(pepsin), 또는 쌍 염기성 아미노산 전환 효소(PACE)를 이용함으로써, 자연 발생 또는 재조합 생산된 전장 ActRIIB 폴리펩티드의 절단에 의해 생산될 수 있다. 단백분해 절단 부위를 확인하기 위하여 컴퓨터 분석(상업적으로 구입가능한 소프트웨어, 예를 들면, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)이 이용될 수 있다. 대안으로, 이들 ActRIIB 폴리펩티드는 예로써, 당분야에 공지된 표준 기술, 예를 들면, 화학적 절단(가령, 브롬화시안, 히드록실아민)에 의해, 자연 발생 또는 재조합 생산된 전장 ActRIIB 폴리펩티드로부터 생산될 수 있다.

[0081] 3. ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산

[0082] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에 기술된 ActRIIB 폴리펩티드 중에서 하나를 인코딩하는 분리된 및/또는 재조합 핵산을 제시한다. 가령, 서열 번호: 4는 ActRIIB(25-131)-hFc 전구체 폴리펩티드를 인코딩하고, 반면 서열 번호: 6은 대안적 서열을 갖지만 동일한 단백질을 인코딩하고, 그리고 서열 번호: 4와 6 각각의 뉴클레오티드 73-396은 인코딩된 단백질의 ActRIIB-유래된 부분을 인코딩한다. 본 발명의 핵산은 단일-가닥 또는 이중-가닥이다. 이런 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 이들 핵산은 예로써, ActRIIB 폴리펩티드를 제조하는 방법에서 이용된다.

[0083] 가령, 아래의 서열은 자연 발생 인간 ActRIIB 전구체 폴리펩티드(서열 번호: 2)(NM_001106의 뉴클레오티드 5-1543, 1539 bp)를 인코딩한다:

[0084] atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggctctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgcc
aactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctggagcgctgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggc
accatcgagctcgtgaagaagggctgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgc
tgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttcactcatttgccagaggctgggggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagcccccaccctgctc
acggtgctggcctactcactgctgcccatcgggggccttttccctcatcgtcctgctggccttttggatgtaccggcatcgcaagcccccctacggtcatgtg
gacatccatgaggaccctgggcctccaccaccatcccctctggtgggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcgggggcgctttggctgtgtc
tggaaggcccagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttcccactccaggacaagcagtcgtggcagagtgaacgggagatcttcagcacacctggc
atgaagcacgagaacctgctacagttcattgctgccgagaagcgaggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggctcc
ctcacggattacctcaaggggaacatcatcacatggaacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctcatacctgcatgaggatgtgccc
tggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgcccacagggactttaaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgacttt
ggcttggctgttcgatttgagccagggaaacctccaggggacacccacggacaggtaggcacgagacggtacatggctcctgaggtgctcgagggagccatc
aacttccagagagatgccttcctgcgcattgacatgtatgccatggggttggtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggacccgtggat
gagtacatgctgccctttgaggaagagattggccagcacccttcgttggaggagctgcaggaggtggtggtgcacaagaagatgaggcccaccattaaagat
cactggttgaaacacccgggcctggcccagctttgtgtgaccatcgaggagtgctgggaccatgatgcagaggctcgcttgtccgcgggctgtgtggaggag
cgggtgtccctgattcggaggtcggtcaacggcactacctcggactgtctcgtttccctggtgacctctgtcaccaatgtggacctgcccccctaaagagtca
agcatctaa

[0085] 아래의 서열은 인간 가용성(세포외) ActRIIB 폴리펩티드(서열 번호: 10)(348 bp)를 인코딩한다.

[0086] tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctggagcgctgcgaaggcgag
caggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggctgctggctagatgacttcaactgctacgat
aggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttcactcatttgccagaggctggg
ggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagcccccacc

[0087] 일정한 측면에서, ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 핵산에는 서열 번호: 4 또는 6의 변이체 핵산 역시 포함된다. 변이체 뉴클레오티드 서열에는 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 달라지는 서열, 예를 들면, 대립형질 변이체(allelic variant)가 포함되고, 이런 이유로, 서열 번호: 4 또는 6에서 지시된 코딩 서열의 뉴클레오티드 서열과 상이한 코딩 서열이 포함될 것이다.

[0088] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 서열 번호: 4 또는 6에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 분리된 또는 재조합 핵산 서열, 특히 ActRIIB로부터 유래된 이들의 일부분(뉴클레오티드 73-396)을 제시한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 서열 번호: 4 또는 6에 상보적인 핵산 서열 및 서열 번호: 4의 변이체 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 서열은 분리되고, 재조합되고 및/또는 이종 기원성 뉴클레오티드 서열과, 또는 DNA 라이브러리 내에 융합될 수 있다.

[0089] 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산에는 높은 엄밀도 조건(stringent condition) 하에 서열 번호: 4 또는 6에 열거된 뉴클레오티드 서열, 서열 번호: 4 또는 6의 보체 서열, 또는 이들의 단편(가령, 뉴클레오티드 73-396)에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열 역시 포함된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄밀도 조건은 변화될 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄밀도 조건은 변화될 수 있다. 가령, 대략 45℃에서 6.0 x 염화나트륨(sodium chloride)/구연산나트륨(sodium citrate)(SSC)에서 혼성화, 이후 50℃에서 2.0 x SSC의 세척을 수행할 수 있다. 가령, 세척 단계에서 염 농도는 50℃에서 대략 2.0 x SSC의 낮은 엄밀도 내지 50℃에서 대략 0.2 x SSC의 높은 엄밀도에서 선택될 수 있다. 이에 더하여, 세척 단계에서 온도는 실온(대략 22℃)에서 낮은 엄밀도 조건에서 대략 65℃에서 높은 엄밀도 조건으로 증가될 수

있다. 온도와 염 모두 변화되거나, 또는 다른 변수가 변하는 반면에 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명에서는 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄밀도 조건하에 혼성화되고, 이후 실온에서 2 x SSC에서 세척되는 핵산을 제시한다.

[0090] 유전자 코드에서 축중(degeneracy)으로 인하여 서열 번호: 4 또는 6에 열거된 핵산과 달라지는 분리된 핵산 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 가령, 다수의 아미노산이 하나 이상의 삼중항(triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 명기하는 코돈, 또는 동종이명(synonym)(가령, CAU와 CAC는 히스티딘의 동종이명(synonym)이다)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 "침묵" 돌연변이를 유발한다. 하지만, 본 발명의 단백질의 아미노산 서열에서 변화를 유발하는 DNA 서열 다형성(polymorphism)이 포유동물 세포 사이에 존재할 것으로 예상된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특정 단백질을 인코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드에서 이들 변이(뉴클레오티드의 최대 3-5%)가 자연적인 대립형질 변이로 인하여 소정의 종의 개체 사이에 존재할 수 있다. 이와 같은 뉴클레오티드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0091] 일정한 구체예에서, 본 발명의 재조합 핵산은 발현 구조체 내에서 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로, 발현에 이용되는 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포에 대한 다양한 유형의 적합한 발현 벡터와 조절 서열이 공지되어 있다. 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에는 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보좀 결합 부위, 전사 시작과 종결 서열, 번역 시작과 종결 서열, 인핸서 또는 활성인자 서열 등이 포함된다. 당분야에 공지된 구조성 또는 유도성 프로모터가 본 발명에 의해 예기된다. 이들 프로모터는 자연 발생 프로모터, 또는 하나 이상의 프로모터의 요소를 함입하는 하이브리드 프로모터이다. 발현 구조체는 세포 내에서 에피솜(episome), 예를 들면, 플라스미드(plasmid) 상태로 존재하거나, 또는 발현 구조체는 염색체 내로 삽입된다. 바람직한 구체예에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선별을 가능하게 하는 선별가능 마커 유전자를 포함한다. 선별가능 마커 유전자는 당분야에 널리 공지되어 있고 이용된 숙주 세포에 따라 변한다.

[0092] 본 발명의 일정한 측면에서, 본 발명의 핵산은 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 최소한 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 발현 벡터(expression vector)에서 제공된다. 조절 서열은 당분야에서 인지되고, ActRIIB 폴리펩티드의 발현을 주동하도록 선택된다. 따라서 조절 서열에는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소가 포함된다. 전형적인 조절 서열은 Goeddel; Gene expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 기술된다. 가령, 작동가능하게 연결되면 DNA 서열의 발현을 제어하는 다양한 발현 제어 서열은 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현하기 위하여 이들 벡터에 이용된다. 이런 유용한 발현 제어 서열에는 예로써, SV40의 초기와 후기 프로모터, tet 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 극초기 프로모터, RSV 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 프로모터(이의 발현은 T7 RNA 중합효소에 의해 주동된다), 파지 람다(phage lambda)의 주요 오퍼레이터와 프로모터 영역, fd 외피 단백질에 대한 제어 영역, 3-글리세르산인산 키나아제(phosphoglycerate kinase) 또는 다른 당분해(glycolytic) 효소에 대한 프로모터, 산성 포스파타아제(acid phosphatase)의 프로모터(가령, Pho5), 효모 α-교미 인자(mating factor)의 프로모터, 배큘로바이러스 시스템의 다면체(polyhedron) 프로모터, 원핵동물이나 진핵동물 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 알려져 있는 다른 서열, 이들의 다양한 조합 등이 포함된다. 발현 벡터의 설계는 형질전환되는 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되는 원하는 단백질의 타입과 같은 인자에 좌우된다. 게다가, 벡터의 사본수(copy number), 사본수를 제어하는 능력 및 상기 벡터에 의해 인코딩되는 임의의 다른 단백질, 예를 들면, 항생 마커(antibiotic marker)의 발현 역시 고려되어야 한다.

[0093] 본 발명의 재조합 핵산은 원핵동물 세포, 진핵동물 세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유류), 또는 둘 모두에서 발현에 적합한 벡터 내로, 클로닝된 유전자 또는 이의 일부분을 결찰함으로써 산출될 수 있다. 재조합 ActRIIB 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 운반체에는 플라스미드 및 다른 벡터가 포함된다. 가령, 원핵동물 세포, 예를 들면, 대장균(*E. coli*)에서 발현에 적합한 벡터에는 아래 유형의 플라스미드가 포함된다: pBR322-유래된 플라스미드, pEMBL-유래된 플라스미드, pEX-유래된 플라스미드, pBTac-유래된 플라스미드 및 pUC-유래된 플라스미드.

[0094] 일부 포유동물 발현 벡터는 세균 내에서 벡터의 증식을 용이하게 하는 원핵동물 서열 및 진핵동물 세포에서 발현되는 하나 이상의 진핵동물 전사 단위(transcription unit)를 모두 포함한다. pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo와 pHyg 유래된 벡터는 진핵동물 세포의 형질감염(transfection)에 적합한 포유동물 발현 벡터의 실례이다. 이들 벡터 중에서 일부는 원핵동물과 진핵동물 세포 둘 모두에서 복제와 내약성(drug resistance) 선별을 용이하게 하는 세균 플라스미드, 예를 들면, pBR322로부터 서열로 변형된다. 대안으로, 소 파필로마 바이러스(bovine papilloma virus)(BPV-1), 또는

엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus)(pHEBo, pREP-유래된 및 p205)와 같은 바이러스의 유도체가 진핵동물 세포에서 단백질의 일시적인 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 실례는 하기, 유전자 치료 전달 시스템의 설명에서 확인할 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 생물체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법이 당분야에 널리 공지되어 있다. 원핵동물과 진핵동물 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템 및 전반적인 재조합 절차는 *Molecular CloningLaboratory*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapter 16과 17을 참조한다. 일부 사례에서, 배큘로바이러스 발현 시스템의 이용으로 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직하다. 이런 배큘로바이러스 발현 시스템의 실례에는 pVL-유래된 벡터(가령, pVL1392, pVL1393과 pVL941), pAcUW-유래된 벡터(가령, pAcUW1), pBlueBac-유래된 벡터(가령, β-gal 보유 pBlueBac III) 등이 포함된다.

[0095] 바람직한 구체예에서, CHO 세포에서 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드의 생산을 위한 벡터, 예를 들면, Pcmv-Script 벡터(Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터(Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터(Promega, Madison, Wise)가 설계된다. 확인되는 바와 같이, 본 발명의 유전자 구조체는 예로써, 정제를 위한, 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생산하기 위하여 배양액 내에서 증식된 세포에서 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드의 발현을 유도하는데 이용될 수 있다.

[0096] 본 발명은 또한, 하나 이상의 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드에 대한 코딩 서열(가령, 서열 번호: 4 또는 6)을 비롯한 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 관계한다. 숙주 세포는 임의의 원핵동물 또는 진핵동물 세포이다. 가령, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 세균 세포(가령, 대장균(*E. coli*)), 곤충 세포(가령, 배큘로바이러스 발현 시스템 이용), 효모, 또는 포유동물 세포에서 발현된다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다.

[0097] 따라서 본 발명은 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드를 생산하는 방법에 관계한다. 가령, ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ActRIIB 폴리펩티드의 발현이 진행되도록 하는 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 세포와 배지의 혼합물로부터 분비되고 분리될 수 있다. 대안으로, ActRIIB 폴리펩티드는 세포질에 또는 막 분획(membrane fraction) 내에 유지되고, 세포는 수거되고 용해되며, 상기 단백질은 분리된다. 세포 배양액은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 함유한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과(ultrafiltration), 전기영동(electrophoresis), 그리고 ActRIIB 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체를 이용한 면역친화성(immunoaffinity) 정제를 비롯하여, 단백질을 정제하기 위한 당분야에 공지된 기술을 이용하여, 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 둘 모두로부터 분리될 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRIIB 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하는 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0098] 다른 구체예에서, 재조합 ActRIIB 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에서 정제 리더 서열, 예를 들면, 폴리-(His)/엔테로키나아제(enterokinase) 절단 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni^{2+} 금속 수지(metal resin)를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 가능하게 할 수 있다. 정제 리더 서열은 이후, 정제된 ActRIIB 폴리펩티드를 제공하기 위하여 엔테로키나아제 처리에 의해 차후에 제거될 수 있다(참조: Hochuli et al., (1987) J Chromatography 411:177; Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

[0099] 융합 유전자를 만드는 기술은 널리 공지되어 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합은 통상적인 기술에 따라, 결찰을 위한 평활-말단(blunt-ended terminus) 또는 갈지자-말단(stagger-ended terminus), 적절한 말단을 제공하는 제한 효소 절단(restriction enzyme digestion), 점착 말단(cohesive end)의 채움(filling-in), 원치 않는 결합을 차단하는 알칼리성 포스파타아제(alkaline phosphatase) 처리 및 효소 결찰(enzymatic ligation)을 이용하여 수행된다. 다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성장치를 비롯한 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 2개의 연속하는 유전자 단편 사이에 상보성 오버행(overhang)을 산출하는 앵커 프라이머(anchor primer)를 이용하여 수행될 수 있고, 이들 유전자 단편은 차후에 어닐링되어 키메라 유전자 서열을 산출할 수 있다(참조: Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

[0100] 5. 예시적인 치료 용도

[0101] 일정한 구체예에서, 본 발명의 조성물(가령, ActRIIB 폴리펩티드)은 ActRIIB 폴리펩티드 및/또는 ActRIIB 리간

드(가령, GDF8)의 비정상적 활성과 연관되는 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는데 이용될 수 있다. 이들 질환, 장애 또는 이상은 일반적으로, 본 명세서에서 "ActRIIB-연관된 질환"으로 지칭된다. 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 앞서 기술된 바와 같은 ActRIIB 폴리펩티드의 치료 효과량을 개체에 투여함으로써 필요 개체에서 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제시한다. 이들 방법은 특히, 동물, 특히 인간의 치료적 및 예방적 처치를 목표로 한다.

[0102] 본 명세서에서, 질환 또는 장애를 "예방"하는 치료제는 통계학적 샘플에서, 처리되지 않은 대조 시료에 비하여 처리된 시료에서 상기 질환 또는 장애의 발생을 감소시키거나, 또는 처리되지 않은 대조 시료에 비하여 상기 질환 또는 장애의 한 가지 이상의 증상의 발생을 지연시키거나 이들 증상의 심각도를 감소시키는 화합물을 지칭한다. 본 명세서에서 "치료"는 지정된 장애의 예방조처(prophylaxis), 또는 일단 확립된 장애의 향상 또는 제거를 포함한다.

[0103] ActRIIB/ActRIIB 리간드 복합체는 조직 성장 및 초기 발달 과정, 예를 들면, 다양한 구조의 정확한 형성에서, 또는 성적 발달, 뇌하수체 호르몬 생산, 그리고 뼈와 연골의 발생을 비롯한 하나 이상의 발달후 능력에서 본질적인 역할을 수행한다. 따라서 ActRIIB-연관된 질환에는 비정상적 조직 성장 및 발달 결함이 포함된다. 이에 더하여, ActRIIB-연관된 질환에는 세포 성장과 분화의 질환, 예를 들면, 염증, 알레르기, 자가면역 질환, 감염성 질환, 그리고 종양이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0104] 치료를 위한 예시적인 질환에는 신경근 질환(가령, 근이영양증 및 근육 위축), 울혈성 폐쇄성 폐 질환(및 COPD와 연관된 근육 소모증), 근육 소모 증후군, 근육감소증, 악액질, 지방 조직 질환(가령, 비만), 2형 당뇨병, 그리고 골 퇴행 질환(가령, 골다공증)이 포함된다. 다른 예시적인 질환에는 근육퇴행 및 신경근 질환, 조직 수복(가령, 상처 치유), 신경퇴행성 질환(가령, 근위축성 측삭 경화증), 면역학적 질환(가령, 림프구의 비정상적 증식 또는 기능에 관련된 질환), 그리고 지방세포의 비정상적 증식에 관련된 비만 또는 질환이 포함된다.

[0105] 일정한 구체예에서, 본 발명의 조성물(가령, ActRIIB-Fc 폴리펩티드)은 근이영양증의 치료제의 일부로서 이용된다. 용어 "근이영양증"은 골격 근육 및 때때로, 심장과 호흡 근육의 점진적인 약화와 악화로 특징되는 일군의 퇴행성 근육 질환을 지칭한다. 근이영양증은 근육에서 현미경적 변화로 시작되는 진행성 근육 소모증과 약화로 특징되는 유전 질환이다. 근육이 시간의 흐름에서 퇴행함에 따라서, 개체의 근력이 저하된다. 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 섭생(regimen)으로 치료될 수 있는 예시적인 근이영양증에는 Duchenne 근이영양증(DMD), Becker 근이영양증(BMD), Emery-Dreifuss 근이영양증(EDMD), Limb-Girdle 근이영양증(LGMD), Facioscapulohumeral 근이영양증(FSH 또는 FSHD)(일명, Landouzy-Dejerine), 근긴장성 이영양증(MMD)(일명, Steinert's Disease), 안인두 근이영양증(OPMD), 원위 근이영양증(DD), 선천성 근이영양증(CMD)이 포함된다.

[0106] Duchenne 근이영양증(DMD)은 1860년대에 프랑스 신경학자 Guillaume Benjamin Amand Duchenne에 의해 최초로 보고되었다. Becker 근이영양증(BMD)은 1950년대에 DMD의 이러한 변형을 최초로 보고한 독일 의사 Peter Emil Becker의 이름을 따서 명명된다. DMD는 남성에서 가장 빈번한 유전 질환 중의 하나이며, 3,500명당 1명씩 발병한다. DMD는 X 염색체의 짧은 팔에 위치하는 디스트로핀 유전자(dystrophin gene)가 파괴될 때 발생한다. 남성은 X 염색체의 1개 사본만을 보유하기 때문에, 디스트로핀 유전자의 1개 사본만을 보유한다. 디스트로핀 단백질이 없으면, 근육은 수축과 이완의 사이클 동안 쉽게 파괴된다. 질환 초기에는 근육이 재생으로 보충하지만, 후기에 근육 선조 세포는 지속되는 손상을 따라잡을 수 없고, 그리고 건강한 근육은 비-기능성 섬유-지방(fibro-fatty) 조직으로 대체된다.

[0107] BMD는 디스트로핀 유전자에서 상이한 돌연변이에 기인한다. BMD 환자는 얼마간의 디스트로핀을 보유하지만, 양이 불충분하거나 질이 불량하다. BMD를 앓는 개체에서 얼마간의 디스트로핀은 이들의 근육이 DMD을 앓는 개체만큼 심하게 또는 빠르게 퇴행하는 것으로부터 보호한다.

[0108] 가령, 최근의 연구는 생체내에서 GDF8(ActRIIB 리간드)의 기능 차단 또는 제거가 DMD 및 BMD 환자에서 최소한 일정한 증상을 효과적으로 치료할 수 있다는 것을 증명한다. 따라서 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 GDF8 저해 물질(길항약)로서 기능하고, 그리고 DMD 및 BMD 환자에서 생체내에서 GDF8 및/또는 ActRIIB의 기능을 차단하는 대안적 수단이 될 수 있다. 이러한 접근법은 본 명세서에서 제시된 데이터에 의해 확증되고 뒷받침되는데, 여기서 ActRIIB-Fc 단백질은 근이영양증의 생쥐 모형에서 근육량을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0109] 유사하게, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 근육 성장이 요구되는 다른 질환 상태에서 근육량을 증가시키는 효과적인 수단을 제공한다. 가령, 루게릭병으로 불리는 ALS(운동 뉴런 질환)는 뇌를 골격 근육에 연결하는 CNS의 성분인 운동 뉴런(motor neuron)을 공격하는 만성적이고, 치유불가능하고, 그리고 멈출 수 없는 CNS 질환이다.

ALS에서, 운동 뉴런은 악화되고 궁극적으로 사멸하고, 그리고 비록 뇌가 여전히 정상적으로 기능하고 기민한 상태에 있지만, 동작 명령이 근육에 결코 도달하지 못한다. ALS을 앓는 대부분의 환자는 40세 내지 70세이다. 약화되는 첫 번째 운동 뉴런은 팔 또는 다리에 이르는 뉴런이다. ALS를 앓는 환자는 보행에 문제가 있고, 물건을 떨어뜨리고, 넘어지고, 발음이 불분명하고, 그리고 통제할 수 없을 정도로 울거나 웃는다. 궁극적으로, 사지에서 근육은 이용되지 않음으로 인하여 위축되기 시작한다. 이러한 근육 약화는 몸을 쇠약하게 만들 것이고, 따라서 환자는 휠체어를 필요로 하거나, 또는 침대를 벗어나서 움직이지 못하게 될 것이다. 대부분의 ALS 환자는 발병으로부터 3-5년 이내에 호흡 부전(respiratory failure) 또는 폐렴과 같은 인공호흡기 보조(ventilator assistance)의 합병증으로 사망한다. 이러한 접근법은 본 명세서에서 제시된 데이터에 의해 확증되고 뒷받침되는데, 여기서 ActRIIB-Fc 단백질은 ALS의 생쥐 모형의 외관, 근육량 및 수명을 향상시키는 것으로 밝혀졌다.

[0110] ActRIIB 폴리펩티드-유도된 증가된 근육량은 또한, 근육 소모증 질환을 앓는 환자에게 유익할 수 있을 것이다. Gonzalez-Cadavid 등(supra)은 GDF8 발현이 인간에서 제지방량(fat-free mass)과 역으로 상관하고, 그리고 GDF8 유전자의 증가된 발현이 AIDS 소모 증후군을 앓는 남성에서 체중 감소와 연관된다는 것을 보고하였다. AIDS 환자에서 GDF8의 기능을 저해함으로써, AIDS의 최소한 일정한 증상은 완전하게 제거되진 않지만 완화되고, 따라서 AIDS 환자에서 삶의 질이 유의미하게 향상될 수 있다.

[0111] GDF8(ActRIIB 리간드) 기능의 상실 역시 영양 섭취의 감소 없이 지방 상실과 연관되기 때문에(Zimmers et al., supra; McPherron and Lee, supra), 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 비만 및 II형 당뇨병의 발생을 지연시키거나 예방하기 위한 치료제(therapeutic agent)로서 더욱 이용될 수 있다. 이러한 접근법은 본 명세서에서 제시된 데이터에 의해 확증되고 뒷받침되는데, 여기서 ActRIIB-Fc 단백질은 비만 생쥐에서 대사 상태를 향상시키는 것으로 밝혀졌다.

[0112] 일정한 구체예에서, 본 발명의 조성물(가령, ActRIIB 폴리펩티드)은 심혈관 질환 및 II형 진성 당뇨병의 발병 위험을 증가시키는 질환 및 위험 인자의 복합인 대사 증후군(일명, 증후군 X and 인슐린 내성 증후군)에 대한 치료제의 일부로서 이용된다. 대부분의 환자는 노령이고, 비만이고, 오래 앉아있고, 그리고 어느 정도의 인슐린 내성을 갖는다. 중심부(복부 또는 내장) 지방과다는 상기 증후군의 암시적인 특징이다.

[0113] 관련된 구체예에서, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드 및 기타 조성물은 인슐린 내성 및 상대적인 인슐린 결핍의 배경에서 상승된 혈당으로 특징되는 II형 진성 당뇨병(일명, 비-인슐린-의존성 진성 당뇨병 또는 성인-발병 당뇨병)에 대한 치료제의 일부로서 이용될 수 있다. 당뇨병에서 복잡하고 다원적인 대사 변화는 종종, 많은 장기, 가장 중요하게는 심혈관계의 손상과 기능적 장애를 유발한다. II형 진성 당뇨병은 종종, 비만(복부 또는 내장 지방과다), 고혈압, 상승된 콜레스테롤, 그리고 대사 증후군과 연관된다. II형 진성 당뇨병에 대한 중요한 위험 인자에는 노화, 고지방 식이, 그리고 오래 앉아있는 생활양식이 포함된다.

[0114] 다른 관련된 구체예에서, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드 및 기타 조성물은 종종 플라크(plaque)로 지칭되는 지방 침착물의 축적으로 인하여 동맥 벽이 두꺼워지는 만성 염증 질환인 동맥경화증에 대한 치료제의 일부로서 이용될 수 있다. 동맥경화증에 대한 위험 인자에는 노화, 진성 당뇨병, 이상지단백혈증, 비만(복부 또는 내장 지방과다), 그리고 오래 앉아있는 생활양식이 포함된다.

[0115] ActRIIB 폴리펩티드는 또한, 대사 증후군과 연관되는 경향이 있는 지질이영양(lipodystrophic) 질환에 이용될 수 있다. 심각한 인슐린 내성은 지질이영양증(lipodystrophy)의 유전적 및 후천적 형태 둘 모두로부터 기인할 수 있고, 이들 형태에는 후자의 경우에, 항레트로바이러스 요법으로 치료된 환자에서 인간 면역결핍 바이러스(HIV)-관련된 지질이영양증이 포함된다.

[0116] 암 식욕부진-악액질 증후군은 심신을 쇠약하게 만드는 암의 가장 치명적인 측면에 속한다. 암 식욕부진-악액질 증후군에서 진행성 체중 감소는 많은 유형의 암의 공통적인 특징이고, 그리고 불량한 삶의 질과 화학요법에 대한 불량한 반응뿐만 아니라, 체중 감소가 없는 필적하는 종양을 앓는 환자에서 관찰되는 것보다 더욱 짧은 생존 기간의 원인이 된다. 식욕부진, 지방과 근육 조직 소모, 심리학적 디스트레스(psychological distress), 그리고 더욱 낮은 삶의 질과 연관하여, 악액질은 암과 숙주 사이에 복잡한 상호작용으로부터 발생한다. 이것은 암 환자에서 사망의 가장 일반적인 원인 중의 하나이며 사망 시에 80%에서 나타난다. 이것은 단백질, 탄수화물, 그리고 지방 물질대사에 영향을 주는 대사 혼란(metabolic chaos)의 복합적인 실례이다. 종양은 직접적인 및 간접적인 비정상을 발생시키고, 식욕부진 및 체중 감소를 유발한다. 현재, 이러한 과정을 제어하거나 반전시키는 치료가 존재하지 않는다. 암 식욕부진-악액질 증후군은 사이토킨 생산, 지질-운동 및 단백분해-유도 인자의 방출, 그리고 중간 물질대사에서 변경에 영향을 준다. 비록 식욕부진이 일반적이긴 하지만, 감소된 음식 섭취 단독은 암 환자에서 관찰되는 신체 조성의 변화를 설명할 수 없고, 그리고 증가하는 영양 섭취는 소모 증후군을 반전시킬

수 없다. 악액질은 발병전 체중(premorbid weight)의 5% 이상의 비자발적인 체중 감소가 6-개월 기간 이내에 발생하는 경우에 암 환자에서 의심되어야 한다.

[0117] 성체 생쥐에서 GDF8의 전신 과다발현이 인간 악액질 증후군에서 관찰되는 것과 유사한 현저한 근육과 지방 상실을 유도하는 것으로 밝혀졌기 때문에(Zimmers et al., supra), 제약학적 조성물로서 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 근육 성장이 요망되는 악액질 증후군을 예방하거나, 치료하거나, 또는 이의 증상을 완화시키는데 유익하게 이용될 수 있다.

[0118] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 뼈 및/또는 연골 형성을 유도하거나, 골 상실을 예방하거나, 골 무기질화를 증가시키거나, 또는 골 탈무기질화를 예방하는 방법을 제시한다. 가령, 본 발명에서 확인된 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드와 화합물은 인간 및 기타 동물에서 골다공증을 치료하고, 그리고 골절 및 연골 결손을 치료하는데 적용된다. ActRIIB 폴리펩티드는 골다공증 발병에 대한 보호 척도(protective measure)로서, 무증상 낮은 골 밀도로 진단되는 환자에서 유용할 수 있다.

[0119] 특정한 구체예에서, 본 발명의 방법과 조성물은 인간 및 기타 동물에서 골절 및 연골 결손의 치유에서 의학적 유용성(medical utility)을 갖는다. 본 발명의 방법과 조성물은 또한, 폐쇄성과 개방성 골절 감소에서, 그리고 인공 관절의 향상된 고정에서 예방적 용도를 갖는다. 골원성 작용제에 의해 유도된 de novo 골 형성은 선천성, 외상-유도된, 또는 종양학적 절제 유발된 두부안면 결손(craniofacial defect)의 수복에 기여하고, 또한 미용성형 수술(cosmetic plastic surgery)에서 유용하다. 게다가, 본 발명의 방법과 조성물은 치주 질환(periodontal disease)의 치료에서, 그리고 다른 치아 복구 과정에서 이용될 수 있다. 일정한 경우에, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 골-형성 세포를 유인하거나, 골-형성 세포의 성장을 촉진하거나, 또는 골-형성 세포의 선조체의 분화를 유도하는 환경을 제공할 수 있다. 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드는 또한, 골다공증의 치료에 유용할 수 있다. 게다가, ActRIIB 폴리펩티드는 연골 결손 수복 및 골관절염의 예방/반전에 이용될 수 있다.

[0120] 다른 특정한 구체예에서, 본 발명에서는 연골 및/또는 골 결손 또는 치주 질환에 관련된 골절 및 기타 장애를 수복하기 위한 치료 방법과 조성물을 제시한다. 본 발명에서는 또한, 상처 치유 및 조직 수복을 위한 치료 방법과 조성물을 제시한다. 상처의 유형에는 화상, 절개 및 궤양이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다(참조: PCT Publication No. WO84/01106). 이들 조성물은 제약학적으로 허용되는 운반제, 담체 또는 매트릭스와 공동으로, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드 중에서 최소한 하나의 치료 효과량을 포함한다.

[0121] 다른 특정한 구체예에서, 본 발명의 방법과 조성물은 골 상실을 유발하는 질환, 예를 들면, 골다공증, 부갑상샘항진증, 쿠싱병, 갑상선중독증, 만성 설사 상태 또는 흡수불량, 신세뇨관 산증, 만성 신부전 또는 신경성 식욕부진증에 적용될 수 있다. 많이 알려진 바와 같이, 여성, 적은 체중, 그리고 오래 앉아있는 생활양식은 골다공증(골 무기질 밀도의 상실, 골절 위험 유발)에 대한 위험 인자이다. 하지만, 골다공증은 일정한 약물의 장기 복용으로부터 발생할 수도 있다. 약물 또는 다른 의학적 장애에 기인하는 골다공증은 이차 골다공증으로 알려져 있다. 쿠싱병으로 알려져 있는 질환에서, 신체에 의해 생산된 과도한 양의 코르티솔(cortisol)은 골다공증 및 골절을 유발한다. 이차 골다공증과 연관된 가장 일반적인 약물은 부신(adrenal gland)에 의해 자연적으로 생산되는 호르몬인 코르티솔과 유사하게 작용하는 약물 부류인 코르티코스테로이드(corticosteroid)이다. 비록 적절한 수준의 갑상선 호르몬(이것은 갑상선에 의해 생산된다)이 골격의 발달에 필요하긴 하지만, 과도한 갑상선 호르몬은 시간의 흐름에서 골량을 감소시킬 수 있다. 알루미늄을 포함하는 제산제는 신장에 문제가 있는 환자, 특히 투석을 받고 있는 환자에 의해 높은 복용량으로 섭취될 때 골 상실을 유발할 수 있다. 이차 골다공증을 유발할 수 있는 다른 약물에는 발작을 예방하는데 이용되는 페니토인(Dilantin) 및 바르비투르; 일부 형태의 관절염, 암, 그리고 면역 질환에 대한 약물인 메토트렉세이트(Rheumatrex, Immunex, Folex PFS); 일부 자가면역 질환을 치료하고 장기 이식 환자에서 면역계를 억제하는데 이용되는 약물인 시클로스포린(Sandimmune, Neoral); 전립선 암 및 자궁내막증을 치료하는데 이용되는 황체형성 호르몬-방출 호르몬 작동약(Lupron, Zoladex); 항응고 약물인 헤파린(Calciparine, Liquaemin); 그리고 높은 콜레스테롤을 치료하는데 이용되는 콜레스티라민(Questran) 및 콜레스티폴(Colestid)이 포함된다. 잇몸병은 골 상실을 유발하는데, 그 이유는 입내에 유해한 세균이 신체가 그들에 대하여 방어하도록 강제하기 때문이다. 이들 세균은 잇몸-라인 아래에 독소와 효소를 생산하고 만성 감염을 유발한다.

[0122] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 동물에서 체지방 함량을 조절하고, 그리고 이와 관련된 질환, 특히 이와 관련된 건강-약화 질환을 치료하거나 예방하기 위한 조성물과 방법을 제시한다. 본 발명에 따라, 체중을 조절(제어)하는 것은 체중의 감소 또는 증가, 체중 증가 속도의 감소 또는 증가, 또는 체중 감소 속도의 증가 또는 감소를 지칭할 수 있고, 또한 체중을 능동적으로 유지하거나, 또는 체중을 현저하게 변화시키지 않는(가령, 그렇

지 않으면 체중을 증가 또는 감소시키는 외부 또는 내부 영향에 대항하여) 것을 포함한다. 본 발명의 한 구체예는 ActRIIB 폴리펩티드를 필요 동물(가령, 인간)에 투여함으로써 체중을 조절하는 것에 관계한다.

[0123] 특정한 구체예에서, 본 발명은 동물에서 지방량을 감소시키고 및/또는 지방량의 증가를 감소시키고, 더욱 구체적으로, 비만의 위험이 있거나 비만을 앓고 있는 환자에서 비만을 치료하거나 완화시키는 방법과 화합물에 관계한다. 다른 특정한 구체예에서, 본 발명은 체중을 증가시키거나 체중을 유지할 수 없는 동물(가령, 소모 증후군을 앓는 동물)을 치료하기 위한 방법과 화합물에 관계한다. 이들 방법은 체중 및/또는 체질량을 증가시키거나, 또는 체중 및/또는 체질량 상실을 감소시키거나, 또는 바람직하지 않게 낮은(가령, 건강하지 않은) 체중 및/또는 체질량과 연관되거나 이에 의해 유발된 질환을 향상시키는데 효과적이다.

[0124] 7. 제약학적 조성물

[0125] 일정한 구체예에서, 본 발명의 화합물(가령, ActRIIB 폴리펩티드)은 제약학적으로 허용되는 담체로 조제된다. 가령, ActRIIB 폴리펩티드는 단독으로, 또는 제약학적 제제(치료 조성물)의 한 성분으로서 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 의학 또는 수의학에 이용하기 편의한 방식으로 투여를 위하여 조제된다.

[0126] 일정한 구체예에서, 본 발명의 치료 방법은 이식물(implant) 또는 장치로서 국소적으로, 전신적으로 또는 국지적으로 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 투여될 때, 본 발명에 이용되는 치료 조성물은 당연히, 발열원-없는, 생리학적으로 허용되는 형태를 취한다. 게다가, 조성물은 가급적, 표적 조직 부위(가령, 뼈, 연골, 근육, 지방 또는 뉴런), 예를 들면, 조직 손상을 입은 부위에 전달을 위한 점성 형태로 포집되거나 주입될 수 있다. 국소 투여는 상처 치유 및 조직 수복에 적합하다. 앞서 기술된 바와 같은 조성물에 선택적으로 포함되는, ActRIIB 폴리펩티드 이외의 치료제는 본 발명의 방법에서, 대안적으로 또는 부가적으로, 본 발명의 화합물(가령, ActRIIB 폴리펩티드)과 동시에 또는 순차적으로 투여된다.

[0127] 일정한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 치료 화합물(가령, ActRIIB 폴리펩티드)을 표적 조직 부위로 전달할 수 있는 기반(matrix)을 포함하는데, 이는 발달중인 조직에 대한 구조물을 제공하고 최적으로, 체내 재흡수될 수 있다. 가령, 기반은 ActRIIB 폴리펩티드의 느린 방출(slow release)을 제공한다. 이런 기반은 다른 이식된 의학 적용에 현재 이용되고 있는 물질로 형성될 수 있다.

[0128] 기반 물질(matrix material)의 선택은 생체적합성(bibcompatibility), 생물분해성(biodegradability), 기계적 특성, 미용적 외관(cosmetic appearance) 및 접촉면 특성(interface property)에 기초한다. 본 발명의 조성물의 특정 적용은 적절한 제제를 정의할 것이다. 이들 조성물에 적합한 잠재적인 기반은 생물분해가능하고 화학적으로 정의된 황산칼슘(calcium sulfate), 트리칼슘포스페이트(tricalciumphosphate), 수산화인회석(hydroxyapatite), 폴리락트산(polylactic acid)과 폴리무수물(polyanhydride)이다. 다른 잠재적인 물질은 생물분해가능하고 생물학적으로 충분히 정의된 물질, 예를 들면, 골 또는 피부 콜라겐이다. 추가의 기반은 순수한 단백질 또는 세포외 기반 성분으로 구성된다. 다른 잠재적인 기반은 생물분해불가능하고 화학적으로 정의된 물질, 예를 들면, 소결된 수산화인회석(sintered hydroxyapatite), 바이오글라스(bioglass), 알루미네이트(aluminate), 또는 다른 세라믹이다. 기반은 앞서 언급된 유형의 물질의 조합, 예를 들면, 폴리락트산과 수산화인회석, 또는 콜라겐과 트리칼슘포스페이트로 구성될 수도 있다. 바이오세라믹(bioceramic)은 칼슘-알루미네이트-포스페이트(calcium-aluminate-phosphate)에서처럼 조성(조성물), 그리고 구멍 크기, 입자 크기, 입자 형태와 생물분해성(biodegradability)을 변경하는 가공(processing)에서 변화될 수 있다.

[0129] 일정한 구체예에서, 본 발명의 길항물질은 예로써, 캡슐, 교갑(cachet), 알약(pill), 정제(tablet), 마름모꼴 정제(lozenge)(방향성 기부(flavored basis), 통상적으로, 수크로오스(sucrose)와 아카시아(acacia) 또는 트래거캔스(tragacanth) 이용), 분말, 과립, 또는 수용성이나 비-수용성 액체에 담긴 용액이나 현탁액, 또는 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 액상 에멀젼, 또는 엘릭시르 또는 시럽, 또는 향정(pastille)(불활성 기부(inert base), 예를 들면, 젤라틴(gelatin)과 글리세린(glycerin), 또는 수크로오스와 아카시아 이용) 및/또는 구강세정제(mouth wash) 등의 형태로 경구 투여될 수 있고, 이들 각각은 미리 결정된 양의 작용제를 활성 성분으로 함유한다. 작용제는 거환약(bolus), 연질약(electuary) 또는 페이스트(paste)로 투여될 수도 있다.

[0130] 경구 투여용 고형 약형(캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 본 발명의 하나 이상의 치료 화합물은 한 가지 이상의 제약학적으로 허용되는 담체, 예를 들면, 구연산나트륨 또는 이인산칼슘 및/또는 (1) 충전제 또는 증량제, 예를 들면, 전분, 락토오스, 수크로오스, 글루코오스, 만니톨, 또는 규산; (2) 접합제, 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로오스, 또는 아카시아; (3) 보습제, 예를

들면, 글리세롤; (4) 붕해제, 예를 들면, 아가-아가, 탄산칼슘, 감자나 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 또는 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예를 들면, 파라핀; (6) 흡수 가속화제, 예를 들면, 4가 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 예를 들면, 세틸 알코올과 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예를 들면, 고령토와 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예를 들면, 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 소디움 라우릴 설페이트, 또는 이들의 혼합물; (10) 착색제와 혼합된다. 캡슐, 정제와 알약의 경우에, 제약학적 조성물은 완충제를 함유할 수도 있다. 유사한 유형의 고형 조성물은 또한, 락토오스 또는 유당과 같은 부형제 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용한 연성과 경성-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제(filler)로 사용될 수 있다.

[0131] 경구 투여용 액상 제형에는 제약학적으로 허용되는 에멀젼, 마이크로에멀젼, 용액, 현탁액, 시럽과 엘릭시르가 포함된다. 활성 성분 이외에, 액상 제형은 당분야에 통상적으로 이용되는 불활성 희석제, 예를 들면, 물 또는 다른 용매, 용해제(solubilizing agent)와 유화제(emulsifier), 예를 들면, 에틸 알코올(ethyl alcohol), 이소프로필 알코올(이소프로필 알코올), 에틸 카보네이트(ethyl carbonate), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 벤질 알코올(benzyl alcohol), 벤질 벤조에이트(benzyl benzoate), 프로필렌 글리콜(프로필렌 글리콜), 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 점(germ), 올리브, 피마자와 참깨 기름), 글리세롤(glycerol), 테트라하이드로푸릴 알코올(tetrahydrofuryl alcohol), 소르비탄의 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 지방산 에스테르(지방산 ester), 또는 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 습윤제, 유화제와 현탁제, 감미료, 풍미제, 착색제, 방향제, 보존제 등과 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다.

[0132] 현탁액은 활성 화합물 이외에, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올(ethoxylated isostearyl alcohol), 폴리옥시에틸렌 소르비톨(polyoxyethylene sorbitol)과 소르비탄 에스테르(sorbitan ester), 미세결정성 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 알루미늄 메타히드록시드(aluminum metahydroxide), 벤토나이트(bentonite), 아가-아가(agar-agar)와 트래거캔스(tragacanth), 이들의 혼합물 등과 같은 현탁제를 함유할 수 있다.

[0133] 본 명세서에서 기술된 일정한 조성물은 피부 또는 점막에 국소 투여될 수 있다. 국소 제제는 피부 또는 각질층 침투 증강제로서 효과적인 것으로 알려져 있는 매우 다양한 작용제 중에서 하나 이상을 더욱 포함할 수 있다. 이들의 실례는 2-피롤리돈, N-메틸-2-피롤리돈, 디메틸아세트아미드, 디메틸포름아미드, 프로필렌 글리콜, 메틸 또는 이소프로필 알코올, 디메틸 설폭시드, 그리고 아존이다. 제제가 미용적으로 수용될 수 있도록 만드는 추가의 작용제가 더욱 포함될 수 있다. 이들의 실례는 지방, 왁스, 오일, 염료, 방향, 보존제, 안정화제, 그리고 표면활성제이다. 당분야에 공지된 것들과 같은 각질용해제(keratolytic agent) 역시 포함될 수 있다. 실례는 살리실산 및 황이다.

[0134] 국소 또는 경피 투여용 제형에는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 용액, 패치, 그리고 흡입제가 포함된다. 활성 화합물은 무균 조건 하에, 제약학적으로 허용되는 담체, 그리고 필요에 따라 임의의 보존제, 완충제, 또는 추진제와 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 겔은 본 발명의 화합물(가령, ActRIIB 폴리펩티드) 이외에, 부형제, 예를 들면, 동물성과 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트래거캔스, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 활석과 산화아연, 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0135] 분말과 스프레이는 본 발명의 화합물 이외에, 부형제, 예를 들면, 락토오스, 활석, 규산, 수산화알루미늄, 규산칼슘, 그리고 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물을 포함할 수 있다. 스프레이는 통상의 추진제, 예를 들면, 클로로플루오로탄화수소(chlorofluorohydrocarbon) 및 치환되지 않은 휘발성 탄화수소, 예를 들면, 부탄과 프로판을 추가로 포함할 수 있다.

[0136] 일정한 구체예에서, 비경구 투여에 적합한 제약학적 조성물은 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 무균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액(dispersion), 현탁액(suspension)이나 에멀젼(emulsion), 또는 사용 직전에 무균 주사가능 용액이나 분산액으로 재구성되는 무균 분말(sterile powder)과의 조합으로 하나 이상의 ActRIIB 폴리펩티드를 함유하고, 항산화제(antioxidant), 완충제(buffer), 정균제(bacteriostat), 의도된 수용자의 혈액과 제제가 등장성이 되도록 하는 용매, 현탁제, 또는 농후제(thickening agent)를 포함할 수 있다. 본 발명의 제약학적 조성물에 이용될 수 있는 적절한 수성과 비-수성 담체의 실례에는 물, 에탄올, 폴리올(가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)과 이들의 적절한 혼합물, 식물성 오일(vegetable oil)(가령, 올리브 오일(olive oil)), 그리고 주사가능 유기 에스테르(injectable organic ester)(가령, 에틸 올레이트(ethyl oleate))가 포함된다. 적절한 유동성(fluidity)은 예로써, 레시틴(lecithin)과 같은 코팅 물질의 이용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다.

[0137] 본 발명의 조성물은 또한, 보존제, 습윤제, 유화제와 분산제(dispersing agent)와 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다. 미생물의 작용 예방은 다양한 항균제와 항진균제, 예를 들면, 파라벤(paraben), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀 소르빈산(phenol sorbic acid) 등의 내포에 의해 담보될 수 있다. 또한, 등장성화제(isotonic agent), 예를 들면, 당, 염화나트륨 등을 조성물 내로 포함시키는 것이 바람직하다. 이에 더하여, 주사가능 제약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트(aluminum monostearate)와 젤라틴의 내포로 달성될 수 있다.

[0138] 투약 섭생(dosage regimen)은 본 발명의 화합물(가령, ActRIIB 폴리펩티드)의 작용을 변화시키는 다양한 인자를 고려하여 담당 의사에 의해 결정될 것이다. 이들 다양한 인자는 치료되는 질환에 좌우될 것이다.

[0139] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIB 폴리펩티드 또는 본 명세서에서 기술된 다른 화합물의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 제시한다. 이런 요법은 앞서 열거된 질환에 관련된 세포 또는 조직 내로 ActRIIB 폴리뉴클레오티드 서열의 도입에 의해 치료 효과를 달성하게 된다. ActRIIB 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 키메라 바이러스와 같은 재조합 발현 벡터, 또는 콜로이드성 분산 시스템을 이용하여 달성될 수 있다. ActRIIB 폴리뉴클레오티드 서열의 치료적 전달(therapeutic delivery)에는 표적화된 리포좀(liposome)의 이용이 바람직하다.

[0140] 본 명세서에 교시된 바와 같이 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터에는 아데노바이러스(adenovirus), 포진 바이러스(herpes virus), 우두(vaccinia), 또는 바람직하게는, 레트로바이러스(retrovirus)와 같은 RNA 바이러스가 포함된다. 바람직하게는, 레트로바이러스 벡터는 뮤린 또는 조류 레트로바이러스의 유도체이다. 단일 외래 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 실례에는 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV), Harvey 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스(MuMTV), 그리고 Rous 육종 바이러스(RSV)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다수의 부가적인 레트로바이러스 벡터는 복수 유전자를 함입할 수 있다. 이들 모든 벡터는 형질도입된 세포가 확인되고 산출될 수 있도록 선별가능 마커에 대한 유전자를 전달하거나 함입할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예로써, 당, 당지질(glycolipid), 또는 단백질을 부착함으로써 표적-특이적으로 만들어질 수 있다. 바람직한 표적화는 항체를 이용함으로써 달성된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특정한 폴리뉴클레오티드 서열은 레트로바이러스 게놈 내로 삽입되거나, 또는 ActRIIB 폴리뉴클레오티드를 포함하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적인 전달을 가능하게 하는 바이러스 외피(viral envelope)에 부착될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 벡터는 뼈, 연골, 근육 또는 뉴런 세포/조직에 표적화된다.

[0141] 대안으로, 조직 배양 세포는 전통적인 인산칼슘(calcium phosphate) 형질감염(transfection)에 의해, 레트로바이러스 구조 유전자 gag, pol과 env를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포는 이후, 목적 유전자를 포함하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성된 세포는 배양 배지 내로 레트로바이러스 벡터를 방출한다.

[0142] ActRIIB 폴리뉴클레오티드에 대한 다른 표적화된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템에는 거대분자 복합체, 나노캡슐(nanocapsule), 마이크로캡슐(microsphere), 비드(bead), 그리고 지질-기초된 시스템(가령, 수중유 에멀젼, 미셀(micell), 혼합된 미셀, 리포좀 등)이 포함된다. 본 발명에서 바람직한 콜로이드성 시스템은 리포좀이다. 리포좀은 시험관내와 생체내에서 전달 운반체(delivery 운반제)로서 유용한 인공 막 소포(membrane vesicle)이다. RNA, DNA와 원형 비리온(virion)은 수성 내부에 포집될 수 있고, 그리고 생물학적 활성 형태로 세포에 전달될 수 있다(참조: Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). 리포좀 소포를 이용한 효율적인 유전자 전달 방법은 당분야에 공지되어 있다(참조: Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988). 리포좀의 조성은 통상적으로, 스테로이드(steroid), 특히 콜레스테롤(cholesterol)과 공동으로 인지질(phospholipid)의 조합이다. 다른 인지질 또는 다른 지질 역시 이용될 수 있다. 리포좀의 물리적 특징은 pH, 이온 강도(ionic strength)와 이가 양이온(divalent cation)의 존재에 좌우된다.

[0143] 리포좀 생산에 유용한 지질의 실례에는 포스파티딜(phosphatidyl) 화합물, 예를 들면, 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol), 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜세린(phosphatidyl세린), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 스핑고지질(sphingolipid), 세레브로시드(cerebroside) 및 강글리오시드(ganglioside)가 포함된다. 예시적인 인지질에는 난 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine), 그리고 디스테아로일포스파디틸콜린(distearoylphosphatidylcholine)이 포함된다. 또한, 리포좀의 표적화는 예로써, 장기-특이성(organ-specificity), 세포-특이성(cell-specificity), 그리고 세포소기관-특이성(organelle-specificity)에 기초되고 당분야에 공지되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0144] 도면의 간단한 설명

도 1에서는 ActRIIB(25-131)-hFc에 대한 완전한 가공되지 않은 아미노산 서열(서열 번호:3)을 도시한다. TPA 리더(잔기 1-22) 및 이중-절두된 ActRIIB 세포외 도메인(잔기 24-131, 서열 번호:1에서 고유 서열에 기초된 넘버링 이용)은 각각 밑줄로 표시된다. 염기서열분석에 의해 성숙 융합 단백질의 N-말단 아미노산인 것으로 확인된 글루타메이트는 강조되고, 이는 서열 번호:1에 관하여 위치 25에 존재한다.

도 2에서는 ActRIIB(25-131)-hFc를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 도시한다(코딩 가닥은 위쪽, 서열 번호:4에서 도시되고, 그리고 보체는 아래쪽 3' -5' , 서열 번호:5에서 도시된다). TPA 리더를 인코딩하는 서열(뉴클레오티드 1-66) 및 ActRIIB 세포외 도메인을 인코딩하는 서열(뉴클레오티드 73-396)은 밑줄로 표시된다. ActRIIB(25-131)에 대한 상응하는 아미노산 서열 역시 도시된다.

도 3에서는 ActRIIB(25-131)-hFc를 인코딩하는 대안적 뉴클레오티드 서열을 도시한다(코딩 가닥은 위쪽, 서열 번호:6에서 도시되고, 그리고 보체는 아래쪽 3' -5' , 서열 번호:7에서 도시된다). 이러한 서열은 최초 형질전환체에서 더욱 높은 수준의 단백질 발현을 공여하고, 세포주 개발을 더욱 신속한 과정으로 만든다. TPA 리더를 인코딩하는 서열(뉴클레오티드 1-66) 및 ActRIIB 세포외 도메인을 인코딩하는 서열(뉴클레오티드 73-396)은 밑줄로 표시되고, 그리고 ECD의 야생형 뉴클레오티드 서열(**도 2** 참조)에서 치환은 강조된다. ActRIIB(25-131)에 대한 상응하는 아미노산 서열 역시 도시된다.

도 4에서는 생쥐에서 제지방체중에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc로 4주 치료의 효과를 보여준다. 운반제는 Tris-완충된 염수(TBS)이었다. 데이터는 평균(군당 n = 10) ± SEM이었다. **, 이표본 t-검정에 의해 $P < 0.01$ vs. TBS. ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 제지방체중을 명백한 용량-의존성 방식으로 증가시켰다.

도 5에서는 생쥐에서 흉근 근육량에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc로 4주 치료의 효과를 보여준다. 운반제는 Tris-완충된 염수(TBS)이었다. 데이터는 평균(군당 n = 10) ± SEM이었다. *, $P < 0.05$; **, 이표본 t-검정에 의해 $P < 0.01$ vs. TBS. ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 흉근 근육량을 명백한 용량-의존성 방식으로 증가시켰다.

도 6에서는 생쥐에서 악력에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 효과를 보여준다. 운반제는 Tris-완충된 염수(TBS)이었다. 데이터는 평균(군당 n = 10)이었다. **, 이표본 t-검정에 의해 $P < 0.01$ vs. TBS. ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 악력을 용량-의존성 방식으로 증가시켰다.

도 7에서는 안드로겐 결핍의 생쥐 모형에서 제지방체중에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc로 4주 치료의 효과를 보여준다. 운반제는 Tris-완충된 염수(TBS)이었다. 정소적출(ORX)된 생쥐 또는 가짜-수술된 생쥐에 대한 데이터는 평균(군당 n = 10) ± SD이었다. ***, $P < 0.001$ vs. TBS 대조. ActRIIB(25-131)-hFc는 전장 대응물 ActRIIB(20-134)-mFc 만큼 효과적으로 제지방체중을 증가시켰다.

도 8에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 제지방체중에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc의 효과를 보여준다. 운반제는 Tris-완충된 염수(TBS)이었다. 데이터는 평균 (군당 n = 9-10)이다. ***, $P < 0.001$ vs. TBS 대조. ActRIIB(25-131)-hFc는 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 제지방체중을 효과적으로 증가시켰다.

도 9에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 지방량에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc의 효과를 보여준다. 운반제는 Tris-완충된 염수(TBS)이었다. 데이터는 평균(군당 n = 9-10) ± SD이다. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ vs. TBS 대조. 운반제와 비교하여, 12주 동안 ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 고지방 식이가 급식된 생쥐에서 지방량을 대략 절반으로 감소시켰다.

도 10에서는 60일 동안 식이 및 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 함수로서 생쥐에서 혈청 트리글리세리드 농도를 도시한다. 데이터는 평균 ± SEM이다. ***, $P < 0.001$. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-hFc는 트리글리세리드 농도를 50% 이상 감소시키고, 따라서 트리글리세리드를 표준-식이 대조에서 관찰되는 수준으로 정상화시켰다.

도 11에서는 60일 동안 식이 및 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 함수로서 생쥐에서 혈청 유리 지방산 (FFA) 농도를 도시한다. 데이터는 평균 ± SEM이다. ***, $P < 0.001$. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-hFc가 FFA 농도를 거의 55% 감소시키고, 따라서 FFA를 표준-식이 대조에서 관찰되는 수준으로 정상화시켰다.

도 12에서는 60일 동안 식이 및 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 함수로서 생쥐에서 혈청 고밀도 지단백(HDL) 농도를 도시한다. 데이터는 평균 ± SEM이다. ***, $P < 0.001$. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-

hFc는 HDL 농도를 거의 50% 감소시키고, 따라서 HDL을 표준-식이 대조에서 관찰되는 수준으로 정상화시켰다.

도 13에서는 60일 동안 식이 및 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 함수로서 생쥐에서 혈청 저밀도 지단백(LDL) 농도를 도시한다. 데이터는 평균 ± SEM이다. *, P < 0.05. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-hFc는 LDL 농도를 40% 이상 감소시켰다.

도 14에서는 60일 동안 식이 및 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 함수로서 생쥐에서 혈청 인슐린 농도를 도시한다. 데이터는 평균 ± SEM이다. **, P < 0.01. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-hFc는 인슐린 농도를 60% 이상 감소시키고, 따라서 인슐린을 표준-식이 대조에서 관찰되는 수준으로 정상화시켰다.

도 15에서는 60일 동안 식이 및 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 함수로서 생쥐에서 혈청 아디포넥틴 농도를 도시한다. ELISA 측정은 모든 주요 올리고머 동종형(총 아디포넥틴)을 검출하고, 그리고 데이터는 평균 ± SEM이다. **, P < 0.01; ***, P < 0.001. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-hFc는 아디포넥틴 농도를 75% 이상 증가시키고, 심지어 아디포넥틴을 표준-식이 대조에서 관찰되는 수준보다 훨씬 높게 증가시켰다.

도 16에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 60일 동안 ActRIIB(25-131)-hFc 치료에 의한 정소상체 흰색 지방 조직 내에서 유도된 산열 조직학적 변화를 보여준다. 모든 현미경적 이미지는 동일한 확대도에서 도시된다. 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색은 지방 방울 크기를 감소시키고 갈색 지방의 다방성 지방세포(화살표) 특징의 클러스터를 유도하는 ActRIIB(25-131)-hFc의 능력을 지시한다. 비-인접 섹션의 면역염색은 다방성 및 단방성 지방세포 둘 모두에서 UCP1(녹색 형광)의 광범위한 세포질 유도를 드러낸다.

도 17에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 정소상체 흰색 지방에서 UCP1 mRNA 수준에 대한 60일 동안 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 효과를 보여준다. 상대 단위(relative unit, RU)로 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 획득된 데이터는 평균 ± SEM이다; 군당 n = 6-7; *, p < 0.05. ActRIIB(25-131)-hFc는 갈색 지방에 대한 이러한 선별 마커를 인코딩하는 mRNA에서 60-배 증가를 유발하고, 따라서 이러한 흰색 지방 저장소 내에서 산열 능력의 상향조절을 지시하였다.

도 18에서는 60일 동안 식이 및 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 함수로서 생쥐의 정소상체 흰색 지방에서 아디포넥틴 mRNA의 수준을 도시한다. 상대 단위(RU)로 RT-PCR 데이터는 평균 ± SEM이다; 군당 n = 7; *, p < 0.05. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-hFc는 아디포넥틴 mRNA 수준을 60% 이상 증가시키고, 따라서 이들 생쥐에서 순환 아디포넥틴의 상승된 농도에 기여하였다.

도 19에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 지방 간 침착물(간 지방증)에 대한 60일 동안 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 효과를 보여준다. Oil Red O로 염색된 간 섹션(이들 모두 동일한 확대도에서 도시됨)은 고지방 식이 조건 하에 현저한 지방 침착을 나타내지만 대조 조건 하에서는 그렇지 않다. 화살표는 많은 밀집된 지방 방울 중에서 몇 개를 지시하는데, 이들은 밝은 적색으로 염색되지만 흑백 이미지에서 식별하기가 어렵다. ActRIIB(25-131)-hFc는 이런 지방 방울의 형성을 저해하고, 그리고 간 조직의 외관을 표준 식이가 급식된 생쥐의 것에 가깝게 수복하였다.

도 20에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 복부 지방의 분포에 대한 35일 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 내장 및 피하 지방 저장소는 검출되고, 그리고 척수 조각 T13-L5를 포함하는 미세-전산화 단층촬영(microCT)에 의해 생체내에서 구별되었다. 군당 N = 4; 축척 막대 = 5 mm. 고지방 식이가 급식된 대조와 비교하여, ActRIIB(25-131)-mFc 치료는 복부 지방의 내장과 피하 저장소 둘 모두의 용적을 감소시켰다.

도 21에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 microCT에 의해 측정될 때, 내장 지방의 용적에 대한 60일 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM이다; 군당 n = 4; ***, P < 0.001. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-mFc는 운반제와 비교하여 내장 지방의 용적을 60% 이상 감소시켰다.

도 22에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 microCT에 의해 측정될 때 복부 피하 지방의 용적에 대한 60일 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM이다; 군당 n = 4; ***, P < 0.001. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-mFc는 운반제와 비교하여 피하 지방의 용적을 거의 60% 감소시켰다.

도 23에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 60일 동안 식이 및 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 함수로서 견갈곱사이 갈색 지방 저장소의 양측 쌍의 사진을 도시한다. 고지방 식이는 이들 저장소의 크기를 증가시키고 색을 밝게 하는 반면, ActRIIB(25-131)-mFc는 이들 변화를 거의 반전시켰다.

도 24에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 견갈곱사이 갈색 지방의 질량에 대한 60일 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 통합된 왼쪽과 오른쪽 저장소에 대한 평균 ± SEM이다; ***, p < 0.001. ActRIIB(25-131)-mFc는 이러한 갈색 지방 저장소의 질량에 대한 고지방 식이의 효과를 반전시켰다.

도 25에서는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 microCT에 의해 측정될 때, 견갈곱사이 갈색 지방의 밀도에 대한 60일 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터(평균 ± SEM)는 골 무기질 수산화인회석(HA)에 대한 양성 값 및 물에 대한 0의 값에 기초된 표준화 단위(standardized unit)로 표시된다; 이런 이유로, 지방 값은 음성이고, 흰색 지방에 대한 값은 전형적으로 -120에 가깝다. **, p < 0.01. ActRIIB(25-131)-mFc는 이러한 갈색 지방 저장소의 밀도에 대한 고지방 식이의 효과를 완전하게 반전시켰다.

도 26에서는 복수 시점에서 핵자기 공명(NMR) 분석에 의해 노화의 생쥐 모형에서 측정될 때, 제지방체중에 대한 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 시점마다 군당 10-15마리 생쥐의 평균이다; ***, 동일한 시점에서 P < 0.001 vs. 운반제. 7주 투약후, ActRIIB(25-131)-mFc로 치료된 노화된 생쥐에서 제지방체중은 운반제-치료된 대조에서 본질적으로 변하지 않은 값에 대조적으로, 기준선으로부터 거의 20% 증가하였다.

도 27에서는 노화의 생쥐 모형에서 복수 시점에서 측정될 때, 앞다리 악력에 대한 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 시점마다 군당 13-15마리 생쥐의 평균이다; **, 동일한 시점에서 P < 0.01 vs. 운반제. ActRIIB(25-131)-mFc로 치료된 생쥐는 동일한 간격에서 운반제 대조에서 관찰된 악력에서 저하에 대조적으로, 연구 내내 증가하는 악력의 전반적인 추세를 보였다.

도 28에서는 노화의 생쥐 모형에서 이중 에너지 방사선 흡수 계측법(dual energy x-ray absorptiometry, DEXA)에 의한 측정에서, 골 무기질 밀도에 대한 8주 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM이다; *, P < 0.05. ActRIIB(25-131)-mFc로 치료된 노화된 생쥐(n = 10)에서 골 무기질 밀도는 운반제-치료된 대조(n = 14)와 비교하여 현저하게 증가하였다.

도 29에서는 노화의 생쥐 모형에서 복수 시점에서 NMR 분석에 의해 측정될 때, 전신 지방량에 대한 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 시점마다 군당 10-15마리 생쥐의 평균이다. ***, 동일한 시점에서 P < 0.001 vs. 운반제. 7주 투약후, ActRIIB(25-131)-mFc로 치료된 노화된 생쥐에서 지방량은 운반제-치료된 대조에서보다 2배 이상으로, 기준선으로부터 감소 퍼센트를 보였다.

도 30에서는 노화의 생쥐 모형에서 혈청 인슐린 농도에 대한 8주 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM이다; *, P < 0.05. ActRIIB(25-131)-mFc(n = 10)로 치료된 노화된 생쥐에서 인슐린 농도는 운반제-치료된 대조(n = 14)에 비하여 40% 이상 감소하였다.

도 31에서는 순환 당화혈색소(A1C) 농도에 대한 8주 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM이다; 군당 n = 5-6; **, P < 0.01. ActRIIB(25-131)-mFc는 연장된 기간 동안, 평균 혈당 농도의 널리 인정되는 지시자인 당화혈색소의 농도를 유의미하게 감소시켰다.

도 32에서는 암 악액질의 생쥐 모형에서 NMR 분석에 의해 측정될 때, 제지방체중에 대한 5주 동안 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 효과를 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM이다; ***, P < 0.001. 종양-이식된 생쥐에서, 운반제 치료(n = 7)는 제지방체중에서 7% 감소와 연관되는 반면, ActRIIB(25-131)-hFc 치료(n = 12)는 기준선으로부터 제지방체중의 27% 증가를 유발하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0145] **실시예**

[0146] 본 발명은 앞서 전반적으로 기술되었고, 아래의 실시예를 참조하면 더욱 용이하게 이해될 수 있는데, 이들 실시예는 본 발명의 특정 측면과 구체예를 예시하는 목적으로 포함되고 본 발명을 한정하지 않는다.

[0147] **실시예 1. 대안적 뉴클레오티드 서열로 ActRIIB(25-131)-hFc의 산출**

[0148] ActRIIB(25-131)-hFc를 산출하기 위하여, N-말단 및 C-말단 절두를 보유하는 인간 ActRIIB 세포외 도메인(고유 단백질의 잔기 25-131)은 고유 ActRIIB 리더를 대체하는 TPA 리더 서열과 N-말단 융합되고, 그리고 최소 링커(3개의 글리신 잔기)에 의해 인간 Fc 도메인과 C-말단 융합되었다(도 1). 이러한 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 도 2에 도시된다. 본 발명자들은 이들 코돈을 변형하고, 그리고 최초 형질전환체의 발현 수준

에서 실질적인 향상을 제공하는 ActRIIB(25-131)-hFc 단백질을 인코딩하는 변이체 핵산을 발견하였다(도 3). 성숙 단백질은 아래와 같은 아미노산 서열을 갖는다(N-말단 염기서열분석에 의해 확증된 N-말단)(서열 번호: 8):

[0149] ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

[0150] KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV

[0151] TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

[0152] VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

[0153] WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ

[0154] VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV

[0155] DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

[0156] 아미노산 1-107은 ActRIIB로부터 유래된다.

[0157] 발현된 분자는 임의의 순서로 아래 중에서 3가지 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계를 이용하여 정제되었다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다.

[0158] **실시예 2. ActRIIB(25-131)-hFc에 의한 높은-친화성 리간드 결합**

[0159] ActRIIB(25-131)-hFc 및 이의 전장 대응물 ActRIIB(20-134)-hFc에 대한 몇몇 리간드의 친화성은 시험관내에서 Biacore™ 기구로 평가되고, 그리고 이들 결과는 하기 표에서 요약된다. Kd 값은 복합체의 매우 급속한 결합과 해리로 인한 안정-상태 친화성 맞춤(steady-state affinity fit)에 의해 획득되었는데, 이는 k_{on} 및 k_{off}의 정확한 측정을 방해하였다. ActRIIB(25-131)-hFc는 높은 친화성으로 액티빈 A, 액티빈 B, 그리고 GDF11에 결합하였다. 흥미롭게도, ActRIIB(25-131)-hFc는 ActRIIB(20-134)-hFc보다는 GDF3에 대하여 더욱 높은 친화성을 나타내는 것으로 보인다(데이터 제시되지 않음).

[0160] **ActRIIB-hFc 형태의 리간드 친화성:**

[0161] 융합 구조체	액티빈 A(e-11)	액티빈 B(e-11)	GDF11(e-11)
[0162] ActRIIB(20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
[0163] ActRIIB(25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1

[0164] **실시예 3. ActRIIB(25-131)-hFc는 생체내에서 근육량 및 근력을 증가시킨다**

[0165] 본 발명자들은 생쥐에서 근육량 및 근력을 증가시키는 ActRIIB(25-131)-hFc의 능력을 조사하였다. 수컷 생쥐(군당 n = 10)는 운반제(Tris-완충된 염수) 또는 5가지 복용량중 하나의 ActRIIB(25-131)-hFc로 주 2회 피하 치료되었다. ActRIIB(25-131)-hFc로 4주간 치료는 전신 핵자기 공명(NMR) 스캐닝에 의해 측정될 때, 제지방체중에서 명백한 용량-의존성 증가를 산출하였다(도 4). 증가된 근육량은 흉근(도 5), 대퇴직근, 그리고 비복근을 비롯한 특정 근육에 대한 연구 종결 시점에서 확인되었다. 중요하게는, 증가된 근육량은 운반제와 비교하여, 악력(grip strength)에 의해 평가될 때, 증가된 근력을 동반하였다(도 6). 이들 결과는 ActRIIB(25-131)-hFc가 생체내에서 근육량과 근력 둘 모두를 증가시킨다는 명백한 증거를 제공한다.

[0166]

[0167] **실시예 4. ActRIIB(25-131)-hFc는 안드로겐 결핍의 생쥐 모형에서 근육 상실을 예방한다.**

[0168] 본 발명자들은 남성에서 진행된 전립선암에 대한 표준 치료적 개입(standard therapeutic intervention)인 안드로겐 결핍의 생쥐 모형에서 근육 상실을 예방하는 ActRIIB(25-131)-hFc의 능력을 조사하였다. 수컷 생쥐(군당 n = 10)는 정소적출(ORX)되거나 가짜-수술되고, 그리고 TBS 운반제, 10 mg/kg에서 ActRIIB(25-131)-hFc, 또는 10 mg/kg에서 이의 전장 뮤린 대응물 ActRIIB(20-134)-mFc로 주 2회 피하 치료되었다. 제지방체중은 전신 NMR 스캔

에 의해 측정되었다. 이들 ActRIIB-Fc 형태 중에서 어느 한쪽으로 4주 동안 치료된 ORX 생쥐는 기준선으로부터 제지방체중에서 증가를 나타냈는데, 이는 상기 기간 동안 ORX 대조에서 관찰된 감소와 비교하여 매우 유의미하였다(도 7). 유사한 매우 유의미한 증가는 생식선-완전한 조건 하에, 가짜 대조와 비교하여 양쪽 ActRIIB-Fc 형태에 대하여 관찰되었다(도 7). 이들 결과는 ActRIIB(25-131)-hFc가 이러한 안드로겐 결핍 모형에서 전장 대응물 ActRIIB(20-134)-mFc와 만큼 효과적으로 제지방체중을 증가(근육 상실을 예방)시킬 수 있다는 것을 증명한다.

[0169] **실시예 5. ActRIIB(25-131)-hFc는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 신체 조성을 향상시킨다**

[0170] 본 발명자들은 또한, 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 근육량을 증가시키고 지방량을 감소시키는 ActRIIB(25-131)-hFc의 능력을 조사하였다. 수컷 생쥐(군당 n = 10)는 표준 식이 또는 고지방 식이가 급식되고, 그리고 10 mg/kg에서 TBS 운반제 또는 ActRIIB(25-131)-hFc로 주 2회 복막내 치료되었다. 제지방체중 및 지방량은 전신 NMR 스캔에 의해 측정되었다. 4주 동안 ActRIIB(25-131)-hFc로 고지방 식이 생쥐의 치료는 운반제 치료에서 2% 증가와 비교하여 제지방체중에서 25% 이상의 증가를 결과하였다(도 8). 대조 식이 생쥐에서 운반제와 비교하여 ActRIIB(25-131)-hFc에서 유사한 결과가 획득되었다(도 8). 게다가, 지속된 치료는 지방과다를 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 운반제와 비교하여, 12주 동안 ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 대조 식이 생쥐에서뿐만 아니라 고지방 식이 생쥐에서 지방량을 대략 절반으로 감소시켰다(도 9).

[0171] 종합하면, 이들 데이터는 ActRIIB(25-131)-hFc가 안드로겐 결핍 및 고지방 섭취를 비롯한 다양한 조건 하에, 생체내에서 신체 조성을 향상시키는데 이용될 수 있다는 것을 증명한다.

[0172] **실시예 6: ActRIIB(25-131)-hFc는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 혈청 지질, 인슐린, 그리고 아디포넥틴을 정상화시킨다.**

[0173] 본 발명자들은 고지방 식이가 급식된 수컷 생쥐에서 임상적으로 중요한 지질, 인슐린, 아디포넥틴의 혈청 농도, 그리고 기타 대사 종점(metabolic endpoint)에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc의 효과를 조사하였다. 10주령 C57BL/6 생쥐는 중량 매치되고, 그리고 10 mg/kg에서 ActRIIB(25-131)-hFc(n = 10) 또는 Tris-완충된 염수(TBS) 운반제(n = 7)로 60일 동안 주 2회 s.c. 치료되었다. 이러한 기간 동안, 생쥐는 4.5% 지방을 내포하는 표준 식이가 아닌 58% 지방을 내포하는 식이에 무제한으로 접근하였다.

[0174] ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 일단의 주목할 만한 대사 효과(metabolic effect)를 유발하였다. 고지방 식이가 급식된 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-hFc는 트리글리세리드, 유리 지방산, 고밀도 지단백(HDL), 그리고 저밀도 지단백(LDL)의 병리학적으로 상승된 혈청 농도를 감소시키고(도 10-13), 대부분의 경우에 이들 파라미터를 표준 식이가 급식된 생쥐에서 관찰되는 수준으로 정상화시켰다. 중요하게는, ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 또한, 고지방 식이 생쥐에서 인슐린 농도를 정상화시키고(도 14), 그리고 표준 식이가 급식된 생쥐에서 훨씬 높게 아디포넥틴의 농도를 증가시켰다(도 15). 아디포넥틴은 순환 아디포넥틴 수준이 지방량/비만과 역으로 변하는 것으로 알려져 있고, 그리고 아디포넥틴이 표적 조직 내에서 인슐린 민감도를 증강시키기 때문에, 신체 조성의 핵심적인 생물마커이다. ActRIIB(25-131)-hFc는 또한, 지방세포 상태의 다른 주요한 지시자인 렙틴의 혈청 농도를 거의 50% 감소시켰다($P < 0.05$). 최종적으로, 전술한 효과는 기준선 및 Day 48에서 핵자기 공명(NMR)에 의해 측정될 때, 신체 조성에서 유익한 변화를 동반하였다. 고지방 식이 조건 하에, 운반제-치료된 대조에서 총 지방량은 이러한 48-일 기간 동안 3배로 증가하고, 그리고 ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 이러한 증가를 거의 40% 감소시켰다. Day 48까지, 총 지방량은 ActRIIB-Fc-치료된 생쥐에서 체중의 27% 대(對) 대조 생쥐에서 39%인 반면, 제지방체중은 ActRIIB(25-131)-hFc-치료된 생쥐에서 체중의 59% 대(對) 대조 생쥐에서 55%이었다. 따라서 최종 결과는 고지방 식이의 조건 하에서 더욱 건강한 신체 조성이었다.

[0175] 전술한 혈청 파라미터에 대하여, ActRIIB(25-131)-hFc는 ActRIIB(20-134)-hFc를 지속적으로 능가하였는데, ActRIIB(20-134)-hFc 역시 동일한 연구에서 평가되었다. 따라서 ActRIIB(25-131)-hFc는 동일한 복용량에서 ActRIIB(20-134)-hFc에 비하여 트리글리세리드 수준을 거의 6배, FFA 수준을 거의 2배, HDL 수준을 거의 4배, 인슐린 수준을 거의 2배, 그리고 아디포넥틴 수준을 거의 1.5배 향상시켰다.

[0176] **실시예 7: ActRIIB(25-131)-hFc는 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 흰색 지방에서 산열 성질을 유도한다**

[0177] 앞서 기술된 연구(실시예 6)에서, 본 발명자들은 또한, 흰색 지방 조직의 산열 성질에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc의 효과를 조사하였다. 고지방 식이 조건 하에, ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 산열 능력과 일치하는 흰색 지방 조직에서 조직학적 변화 및 유전자 발현 프로필을 유발하였다. 도 16에서 도시된 바와 같이, 정소상체 흰색 지방의 조직학적 검사는 ActRIIB(25-131)-hFc가 지방 방울 크기(lipid droplet size)를 감소시키고, 그리고 갈색 지방의 특질(hallmark)인 다방성 지방세포의 클러스터의 형성을 유발한다는 것을 지시하였다. 게다가, 이러한 조직의 면역조직화학적 분석은 ActRIIB(25-131)-hFc 치료의 결과로서 다방성 및 단방성 지방세포 둘 모두에서 UCP1의 광범위한 세포질 유도를 확인하였다(도 16).

[0178] 정량적 RT-PCR(역전사 중합효소 연쇄 반응)에 의해 측정될 때, 정소상체 흰색 지방에서 핵심적인 산열 및 대사 조절 유전자의 발현에서 현저한 변화가 이들 조직학적 변화에 동반된다. 고지방 식이 생쥐에서, ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 운반제에 비하여 UCP1 mRNA 수준을 60-배 이상 증가시켰는데(도 17), 이것은 이러한 계통의 생쥐가 다른 생쥐 계통에 비하여 핵심적인 흰색 지방 저장소 내에서 UCP1 및 갈색 지방세포의 매우 둔감한 유도를 나타낸다는 점에서, 특히 인상적인 변화이었다 (Guerra et al., 1998, J Clin Invest 102:412-420; Xue et al., 2007, J Lipid Res 48:41-51). 이에 더하여, ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 고지방 식이에 의해 유도된 대사 손상(metabolic damage)으로부터 보호하고 (Pfluger et al., 2008, Proc Natl Acad Sci USA 105:9793-9798) 지방산 동원의 중요한 제어 수단으로서 관련되는 (Rodgers et al., 2008, FEBS Lett 582:46-53) 에너지-민감성 마스터 조절자(탈아세틸화)인 시르투인 SIRT-1(silent information regulator two, homolog 1)을 인코딩하는 mRNA의 수준을 증가시켰다. 유의미하게는, ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 또한, SIRT-1의 널리 보고된 표적인 PGC-1α(페록시솜 증식인자-활성화된 수용체 감마 보조활성인자-1α)를 인코딩하는 mRNA의 수준을 증가시키고, 이것은 차례로, 갈색 지방 조직에서 미토콘드리아 생물발생 및 산열 능력에 필요한 많은 유전자의 발현을 제어한다 (Uldry et al., 2006, Cell Metab, 3:333-341). 특히, 흰색 지방세포에서 PGC-1α의 강제된 발현은 갈색 지방세포에서와 매우 유사한, UCP1을 비롯한 유전자 발현의 산열 프로그램을 유도하는 것으로 밝혀졌다 (Hansen et al., 2006, Biochem J 398:153-168). 본 연구에서, ActRIIB(25-131)-hFc는 고지방 식이 조건 하에 흰색 지방 조직에서 PGC-1α 유전자 발현을 표준 식이가 급식된 생쥐에서 수준과 구별되지 않는 수준으로 복원하였다.

[0179] 치료와 연관된 추가의 변화는 흰색 지방 조직에서 변화된 발현 프로필 및 유익한 호르몬과 대사 효과 사이에 현저한 링크를 구성한다. 따라서 정소상체 흰색 지방에서, ActRIIB(25-131)-hFc는 SIRT-1의 표적일 뿐만 아니라 아디포넥틴 발현의 핵심 유도물질인 전사 인자(transcription factor) Foxo-1(forkhead 박스-포함, 단백질 O 하위패밀리-1)을 인코딩하는 mRNA의 수준을 증가시켰다 (Qiao et al., 2006, J Biol Chem 281:39915-39924). Foxo-1 mRNA 유도와 일관되게, ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 흰색 지방에서 아디포넥틴 mRNA의 수준을 상승시키고(도 18), 이것은 이들 동물에서 아디포넥틴의 증가된 순환 수준(도 15, 실시예 6), 표적 조직에서 증강된 인슐린 민감도, 그리고 정상화된 인슐린 농도(도 14, 실시예 6)를 설명하는데 도움을 준다. 요약하면, 고지방 식이 조건 하에 ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 산열 능력과 일관되는, 흰색 지방 조직에서 1) 조직학적 변화 및 유전자 발현 프로필, 그리고 2) 광범위한 호르몬과 대사 파라미터에서 유익한 변화를 결과하였다.

[0180]

[0181] **실시예 8: 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 간과 근육에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc의 효과**

[0182] 비알코올성 지방 간 질환(NAFLD)은 대사 증후군의 간 표현(hepatic manifestation)인 것으로 간주되고, 그리고 종종 유해한 효과와 함께, 간에서 지방 축적(지방증, 지방증)으로 특징되는 점점 빈발하는 다양한 간 질환이다. NAFLD 환자의 부분집합은 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)으로 지칭되는 염증 질환이 발생하고, 이는 간섬유증, 간경변, 그리고 간세포 암종으로 더욱 진행될 수 있다 (Perlemuter et al., 2007, Nat Clin Pract Endocrinol Metab 3:458-469). 앞서 기술된 연구(실시예 6-7)에서, 본 발명자들은 ActRIIB(25-131)-hFc가 고지방 식이와 연관된 간 지방증을 저해할 수 있는 지를 조사하였다. 연구 완결 시점에, 고지방 식이가 급식된 생쥐의 간 조직은 Oil Red O로 염색에 의해 평가될 때, 다수의 밀집된 지방 방울을 보이는 반면, 표준 식이가 급식된 생쥐는 간 지방 침착물의 증거를 보이지 않았다(도 19). ActRIIB(25-131)-hFc로 치료는 간 지방 침착을 거의 완전하게 반전시키고 고지방 식이에도 불구하고 간 조직의 외관을 정상화시켰다. 따라서 ActRIIB(25-131)-hFc는 고지방 식이에 의해 유발된 간 지방증의 효과적인 저해물질이었다.

[0183] ActRIIB(25-131)-hFc 치료는 또한, 다른 모형에서 조사 결과와 일관되게, 식이-유도된 비만의 모형에서 근육량을 증가시켰다(실시예 3-5). 구체적으로, ActRIIB(25-131)-hFc는 고지방 식이 대조에 비하여 흉근 질량을 70% 이상($P < 0.001$), 비복근 질량을 거의 40%($P < 0.001$), 그리고 대퇴직근 질량을 25% 이상($P < 0.001$) 증가시켰다. 근육량에서 이들 변화는 비복근 조직에서 RT-PCR에 의해 측정될 때, 근육 유전자 발현에서 변화를 동반하였

다. 고지방 식이 대조에 비하여, ActRIIB(25-131)-hFc는 비복근에서 PGC-1α mRNA 수준 및 Foxo-1 mRNA 수준을 각각 대략 50% 증가시켰다($P < 0.05$).

[0184] **실시예 9: 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 내장 흰색 지방에 대한 ActRIIB(25-131)-mFc의 효과**

[0185] 피하 지방과 대조적으로, 내장 지방의 축적은 심혈관 질환 및 비만-관련된 질환, 예를 들면, 진성 당뇨병, 고지질혈증, 고혈압, 그리고 대사 증후군의 발생에서 결정적인 역할을 수행한다 (Matsuzawa et al., 2006, FEBS Lett 580:2917-2921). 내장(또는 복강내) 지방은 그 위치로 인하여, 간 문맥 순환(hepatic portal circulation)에 의해 간에 쉽게 접근하고, 여기서 지방은 물질대사에 영향을 주고, 인슐린 내성을 촉진하고, 그리고 지방증을 유발할 수 있다. 이런 이유로, 앞서 기술된 것(실시예 6-8)과 유사한 연구에서, 본 발명자들은 고지방 식이 조건 하에 내장 지방 vs. 복부 피하 지방의 양에 대한 절두된 변이체 ActRIIB(25-131)-mFc의 효과를 조사하였다. 9주령 C57BL/6 생쥐는 10 mg/kg에서 ActRIIB(25-131)-mFc(n = 20) 또는 Tris-완충된 염수(TBS) 운반제(n = 10)로 60일 동안 주 2회 s.c. 치료되었다. 투약을 시작하기 7일전부터, 생쥐는 4.5% 지방을 내포하는 표준 식이가 아닌 58% 지방을 내포하는 식이에 무제한적으로 접근하였다. 표준 식이에 유지된 추가의 생쥐 군(n = 10) 역시 TBS 운반제로 치료되고 식이 대조로서 추적되었다. 지방 용적(fat volume)은 핵자기 공명(NMR) 분석에 의한 측정에서 총 체지방의 백분율이 군 평균에 가장 가까운 생쥐 부분집합(군당 n = 4)(모든 생쥐가 NMR 분석에 종속되었다)에 대한 microCT에 의해 측정되었다.

[0186] 내장 지방 및 복부 피하 지방 둘 모두 식이 및 ActRIIB(25-131)-mFc 치료에 의해 크기가 현저하게 변하였다. 본 연구(35일)를 통해 어느 정도까지 획득된 microCT 이미지의 3차원 재구성은 내장 지방 및 피하 지방의 저장소 둘 모두 고지방 식이의 결과로써 확장되고, 그리고 ActRIIB(25-131)-mFc가 이들 증가를 거의 반전시킨다는 것을 증명한다(도 20). 연구 종결 시점(60일)에 정량적으로 분석될 때, 고지방 식이 단독에 비하여 ActRIIB(25-131)-mFc의 효과는 내장 지방(도 21) 및 복부 피하 지방(도 22) 둘 모두에서 매우 유의미하였다.

[0187] **실시예 10: 식이-유도된 비만의 생쥐 모형에서 갈색 지방 성질에 대한 ActRIIB(25-131)-mFc의 효과**

[0188] 실시예 9에서 기술된 연구에서, 본 발명자들은 또한, 고지방 식이 조건 하에 견갑골사이 갈색 지방 저장소의 성질에 대한 ActRIIB(25-131)-mFc의 효과를 조사하였다. 표준 식이에 비하여, 고지방 식이는 갈색 지방 조직의 견갑골사이 저장소에서 몇몇 변화를 유발하였고, 그리고 ActRIIB(25-131)-mFc 치료는 이들 각 변화를 완전하게 또는 거의 반전시켰다. 구체적으로, 고지방 식이는 견갑골사이 저장소를 현저하게 확대시키고 이의 색을 적색에서 연분홍색으로 밝게 하였다(도 23). 이러한 식이-유도된 확대는 갈색 지방 저장소의 질량 배증(도 24) 및 밀도 감소(도 25)를 반영하였다. 저장소 밀도는 핵자기 공명(NMR) 분석에 의한 측정에서 총 체지방의 백분율이 군 평균에 가장 가까운 생쥐 부분집합(군당 n = 4)(모든 생쥐가 NMR 분석에 종속되었다)에 대한 in situ 미세-전산화 단층촬영(micro-computed tomography, microCT)에 의해 측정되었다. ActRIIB(25-131)-mFc 치료는 갈색 지방량에서 식이-유도된 변화(도 24) 및 밀도(도 25)를 완전하게 반전시키고, 그리고 저장소의 크기와 색에서 식이-유도된 변화(도 23)를 거의 반전시켰다. 이들 결과는 고지방 식이 조건 하에 ActRIIB(25-131)-mFc가 건강한 갈색 지방 기능과 상관하는 것으로 생각되는 성질을 거의 또는 완전하게 복원하고, 따라서 갈색 지방의 질을 향상시킨다는 것을 지시하는데, 그 이유는 ActRIIB(25-131)-mFc가 갈색 지방 저장소의 전반적인 크기를 감소시키기 때문이다.

[0189]

[0190] **실시예 11: 노화의 생쥐 모형에서 근육, 뼈, 지방, 그리고 대사 호르몬에 대한 ActRIIB(25-131)-mFc의 효과**

[0191] 신체 조성은 노화됨에 따라서 예측가능한 방식으로 변한다. 근육감소증으로 알려져 있는 근육량 및 근력에서 정상적인 연령-의존성 저하는 대략 30세에 시작되고 60세 이후에 가속화된다 (Stenholm et al, 2008, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 11:693-700). 골량 및 골강도는 노화됨에 따라서 유사한 저하를 나타내고 노인에서 골다공증의 증가된 위험을 야기한다. 전신 지방량은 대략 70세까지 노화됨에 따라서 증가하고, 이후 절대항(absolute term)에서 감소하지만 총체질량(total body mass) 중에서 거의 불변하는 비율로 유지된다 (Cartwright et al., 2007, Exp Gerontol 42:463-471). 다른 모형에서 관찰되고 본 명세서에서 기술된 효능에 기초하여, 본 발명자들은 노화의 생쥐 모형에서 근육, 뼈, 지방, 그리고 인슐린 수준에 대한 ActRIIB(25-131)-mFc의 효과를 조사하였다. 19개월령 수컷 C57BL/6 생쥐는 표준 식이에 무제한적으로 접근하였고 10 mg/kg에서 ActRIIB(25-131)-mFc(n = 16) 또는 TBS 운반제(n = 15)로 8주 동안 주 2회 s.c.로 치료되었다. 참고 프레임으

로서, 이러한 생쥐 계통에서 평균 기대 수명(median life expectancy)은 표준 식이 조건 하에 대략 27개월인 것으로 이전에 밝혀졌다 (Turturro et al., 2002, J Gerontol A Biol Sci Med Sci 57:B379-389).

[0192] ActRIIB(25-131)-mFc 치료는 이들 노화된 생쥐에서 신체 조성 및 대사 호르몬 효과에서 일련의 현저한 변화를 발생시켰다. 전신 NMR 분석에 의해 측정될 때, 제지방체중은 연구의 경과 동안 대조 생쥐에서 본질적으로 불변하는 반면, ActRIIB(24-131)-mFc-치료된 생쥐에서 제지방체중은 7주 시점에 기준선을 초과하여 거의 20%까지 점진적으로 증가하였다(도 26). 이러한 전신 효과와 일관되게, ActRIIB(25-131)-mFc는 또한, 8주 시점에 운반제-치료된 대조에 비하여 흉근(증가된 55%), 대퇴직근(40%), 삼두근(40%), 그리고 비복근(28%)을 비롯한 개별 근육 그룹의 질량을 유의미하게 증가시켰다. 중요하게는, ActRIIB(25-131)-mFc 치료는 확립된 프로토콜(http://jaxservices.jax.org/phenotyping/gripstrength_protocol.html)에 따른 앞다리 악력 검사에 의해 측정될 때, 신경근 기능을 향상시켰다(도 27).

[0193] 노화된 생쥐에서 몇몇 뼈-관련된 파라미터가 ActRIIB(25-131)-mFc 치료로 향상되었다. 기준선 및 8-주 시점에서 DEXA 분석에 의해 측정될 때, ActRIIB(25-131)-mFc는 연구의 경과 동안 전신 골 무기질 밀도를 증가시키는 반면, 대조는 본질적으로 불변하였다(도 28). 이에 더하여, 근위 경골(proximal tibia)의 microCT 분석은 8주 동안 ActRIIB(25-131)-mFc 치료가 대조와 비교하여 근위 경골의 골 용적 분획(bone volume fraction)을 배증시킨다는 것을 증명하였다($P < 0.01$).

[0194] ActRIIB(25-131)-mFc는 노화된 생쥐에서 지방에 대한 주요한 효과를 발휘하였다. 복수 시점에서 NMR 분석에 의해 측정될 때, 연구의 경과 동안 운반제-치료된 대조에서 전신 지방량이 점진적으로 감소하였는데(도 29), 이것은 진전된 노령의 인간으로부터 조사 결과와 일치하였다. ActRIIB(25-131)-mFc 치료는 이러한 변화를 가속화시키고 대조에서 관찰된 크기의 2배의 감소를 유발하였다(각각, -44% vs. -19%)(도 29). 종결 시점까지, ActRIIB(25-131)-mFc는 흰색 지방의 개별 정소상체, 서혜부, 그리고 복막뒤 저장소의 질량을 48-54% 범위의 양으로 유의미하게 감소시켰다. 흥미롭게도, ActRIIB(25-131)-mFc 치료는 또한, 견갈곱사이 갈색 지방 저장소의 질량을 거의 45% 감소시켰는데($P < 0.05$), 이것은 식이 비만의 생쥐 모형에서 이러한 조직에 대하여 획득된 결과와 유사하였다(실시예 10). 최종적으로, 각 군으로부터 대표적인 생쥐 부분집합($n = 4$)에서 microCT 분석에 의해 측정될 때, ActRIIB(25-131)-mFc는 복부 지방의 내장 성분의 용적을 65% 감소시키고($P < 0.01$), 그리고 복부 지방의 피하 성분을 49% 감소시켰다($P < 0.01$). 따라서 상기 결정적인 내장 지방 구획은 이러한 노화 모형에서 ActRIIB(25-131)-mFc에 의해 강하게 표적화되었다.

[0195] ActRIIB(25-131)-mFc는 또한, 노화된 생쥐에서 중요한 대사 호르몬에서 유익한 변화를 발생시켰다. ActRIIB(25-131)-mFc로 8주간 치료는 순환 아디포넥틴 농도를 거의 배증시키고($P < 0.001$) 순환 인슐린 농도를 40% 이상 감소시켰다(도 30). 상승된 금식 인슐린 농도(고인슐린혈증)는 인슐린 내성의 폭넓게 인정되는 대리 척도이고 (Weyer et al., 2000, Diabetes 49:2094-2101), 그리고 증가된 아디포넥틴 농도는 본 연구에서 향상된 인슐린 민감도에 기여할 것으로 생각된다. 당화혈색소(glycated hemoglobin, A1C) 농도는 본 연구에서 ActRIIB(25-131)-mFc에 의해 유의미하게 감소하였는데(도 31), 이것은 이러한 노화 모형에서 ActRIIB(25-131)-mFc 치료로 향상된 글루코오스 조절에 대한 추가적인 증거를 제공하였다.

[0196] **실시예 12: 암 악액질의 생쥐 모형에서 제지방 조직에 대한 ActRIIB(25-131)-hFc의 효과**

[0197] 악액질은 근육과 지방 조직의 상실에 기인하는 원하지 않는 체중 감소이다. 많은 종양이 식욕 상실 및 심각한 근육 상실과 연관되고, 그리고 악액질을 보이는 환자는 비-악액질 환자보다 예후가 불량하다. 결장-암 세포주 CT26이 생쥐에서 현저한 악액질을 유도하기 때문에, ActRIIB(25-131)-hFc는 이종이식편-유도된 악액질에 대한 잠재적 효과에 대하여 이러한 생쥐 모형에서 조사되었다. 8주령 BALB/c 생쥐는 생쥐마다 10^6개 결장-26 선암종(CT26) 세포가 피하 주입되었다. 종양 이식(tumor implantation)후 2주 시점에, 10 mg/kg에서 ActRIIB(25-131)-hFc($n = 15$) 또는 Tris-완충된 염수(TBS) 운반제($n = 13$)로 주 2회 s.c. 치료가 시작되었다. BALB/c 생쥐의 추가 군은 CT26 세포가 주입되지 않았지만 상기와 같이 ActRIIB(25-131)-hFc 또는 운반제로 치료되었다. ActRIIB(25-131)-hFc로 치료는 체중에서 유의미한 증가를 결과하였고, 이러한 증가는 연구 내내 유지되었다. 종양 이식후 5주 시점에, 운반제-치료된 생쥐는 NMR 분석에 의해 측정될 때, 기준선으로부터 제지방체중의 7% 상실을 보이는 반면, ActRIIB(25-131)-hFc로 치료된 생쥐는 기준선으로부터 제지방량의 27% 증가를 보였다(도 32). 지방량은 이들 군 간에 별다른 차이가 없었다. 이들 결과는 ActRIIB(25-131)-hFc가 종양-보유 생쥐에서 악액질을 완화시킬 수 있고, 그리고 암 환자에서 악액질을 치료하기 위한 효과적인 치료제가 될 수 있음을 증명한

다.

[0198] 종합하면, 이들 데이터는 ActRIIB(25-131)-hFc 융합 단백질이 식이-유도된 비만과 연관된 많은 병리학적 대사 변화를 반전시키고, 따라서 고칼로리 섭취에 의해 악화된 대사 장애를 치료하는, TGF-패밀리 리간드에 의한 신호전달의 길항약으로서 이용될 수 있다는 것을 지시한다. 더 나아가, ActRIIB(25-131)-hFc는 노화 또는 암 악액질과 연관된 병리학적 대사 변화를 치료하는데 이용될 수 있다.

[0199] 참조로서 편입

[0200] 본 명세서에 언급된 모든 간행물과 특허는 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0201] 요부(subject matter)의 특정 구체예가 논의되긴 했지만, 상기 명세서는 설명을 목적으로 하고, 본 발명을 한정하지 않는다. 본 명세서 및 하기 특허청구범위를 검토한 이후, 다수의 개변은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 특허청구범위 및 이의 균등한 범위, 그리고 명세서 및 이의 개변에 기준하여 결정될 것이다.

도면

도면1

```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAA▒TREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
 51  EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV
101  YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151  PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201  KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251  KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301  ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351  QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)
```

도면2

```
   1    ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
        TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                                    A  E  T   R  E  C   I  Y  Y
  51    AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
        TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

        N  A  N  W   E  L  E   R  T  N   Q  S  G  L   E  R  C
 101    ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
        TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

         E  G  E   Q  D  K  R   L  H  C   Y  A  S   W  R  N  S
 151    GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
        CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

          S  G  T   I  E  L   V  K  K  G   C  W  L   D  D  F
 201    CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
        GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCGAT CTACTGAAGT

        N  C  Y  D   R  Q  E   C  V  A   T  E  E  N   P  Q  V
 251    ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
        TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

         Y  F  C   C  C  E  G   N  F  C   N  E  R   F  T  H  L
 301    TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
        ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

          P  E  A   G  G  P   E  V  T  Y   E  P  P   P  T
 351    GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
        CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

 401    GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
        CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

 451    CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
        GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

 501    CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
        GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

 551    CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
        GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

 601    AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
        TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 651    CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
        GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 701    GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
        CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

 751    AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
        TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

 801    CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
        GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

 851    GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
        CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901    GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
        CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951    CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
        GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001    ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
        TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051    CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 4)
        GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 5)
```

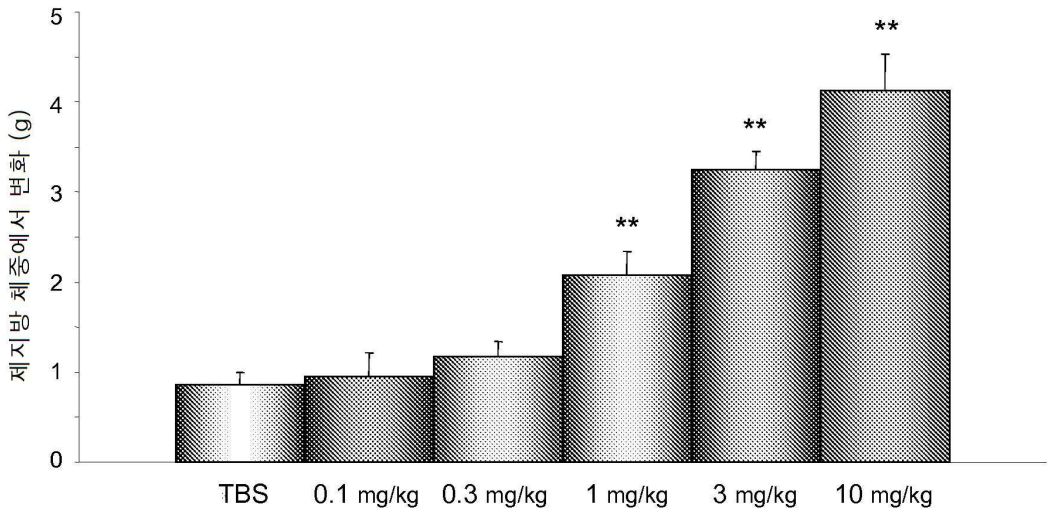
도면3a

```
   1    ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
        TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                                  A  E  T   R  E  C   I  Y  Y
  51    AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
        TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT

        N  A  N  W   E  L  E   R  T  N   Q  S  G  L   E  R  C
 101    ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT
        TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

         E  G  E   Q  D  K  R   L  R  C   Y  A  S   W  R  N  S
 151    GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC
        CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

           S  G  T   I  E  L   V  K  K  G   C  W  L   D  D  F
 201    CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GACGATTTCA
        GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCGAC CTGCTAAAGT

        N  C  Y  D   R  Q  E   C  V  A   T  E  E  N   P  Q  V
 251    ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
        TAACAATACT GGCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

         Y  F  C   C  C  E  G   N  F  C   N  E  R   F  T  R  L
 301    TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
        ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

           P  E  A   G  G  P   E  V  T  Y   E  P  P   P  T
 351    CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACCGGTG
        GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

 401    GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
        CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

 451    CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
        GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

 501    CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
        GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

 551    CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
        GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

 601    AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
        TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 651    CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
        GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 701    GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
        CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
```

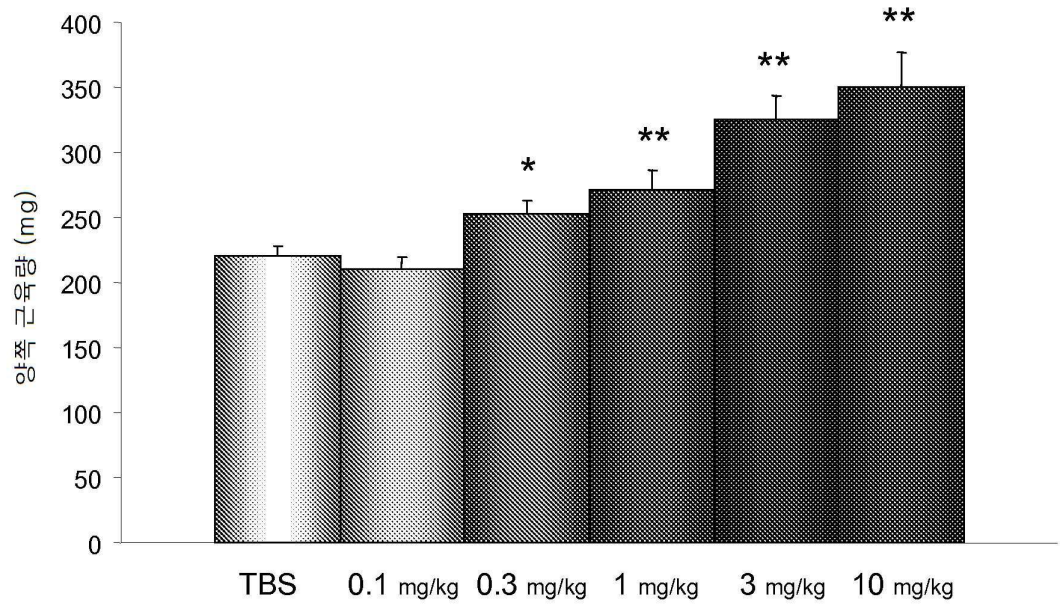
도면3b

```
 751    AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
        TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

 801    CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
        GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

 851    GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
        CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901    GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
        CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951    CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
        GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001    ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
        TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051    CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 6)
        GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 7)
```

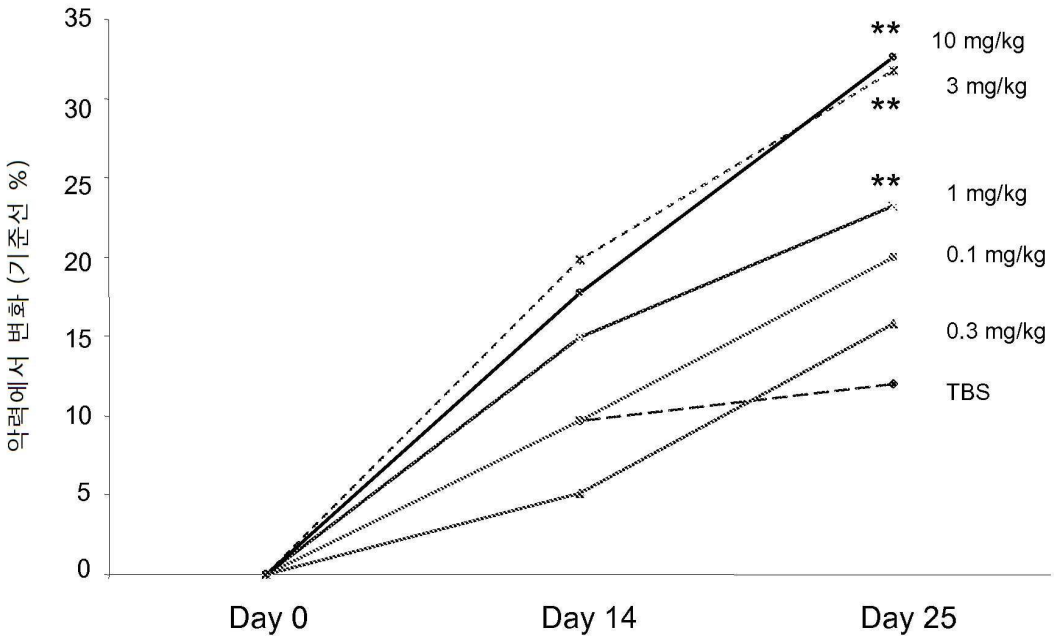
도면4



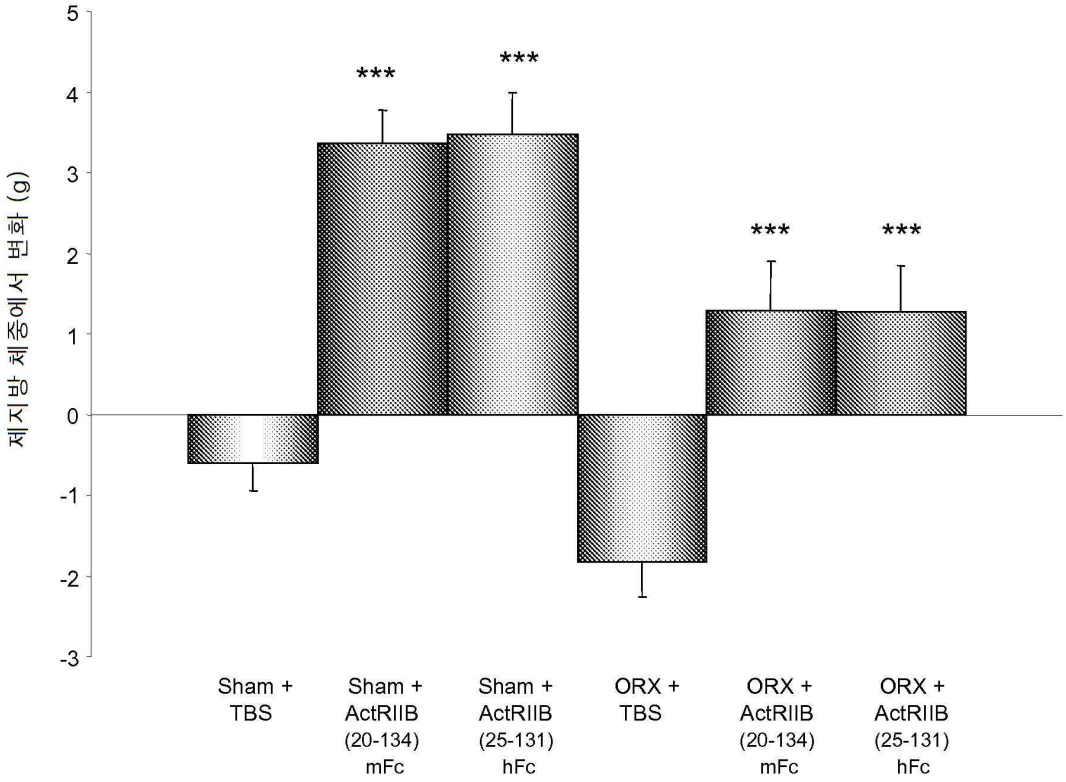
도면5


400
350
300
250
200
150
100
50
0
양쪽 근육량 (mg)
*
**
**
**
TBS
0.1 mg/kg
0.3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg

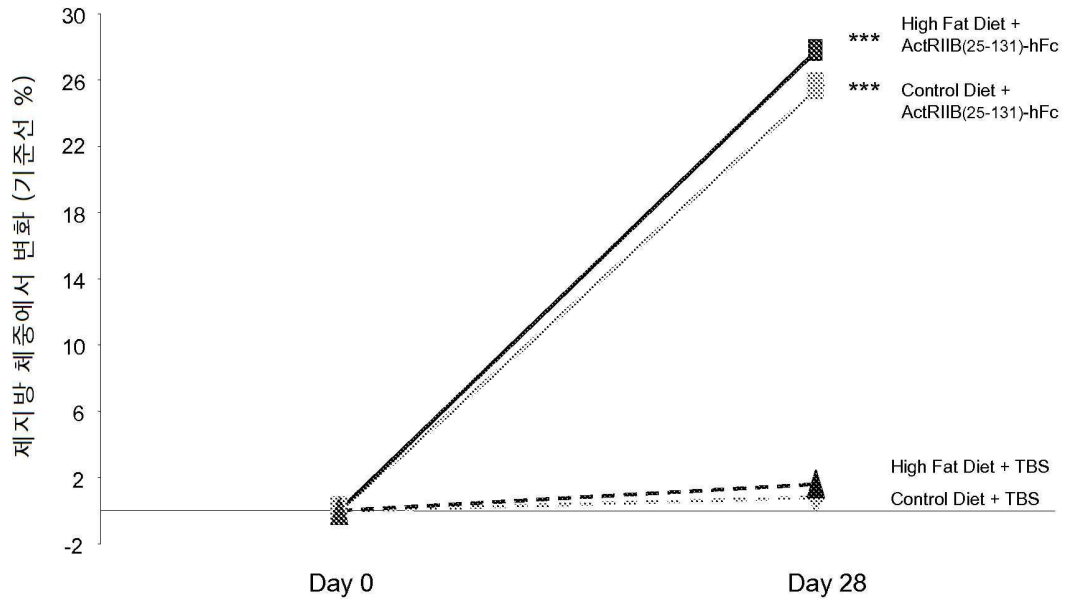
도면6


35
30
25
20
15
10
5
0
악력에서 변화 (기준선 %)
**
**
**
10 mg/kg
3 mg/kg
1 mg/kg
0.1 mg/kg
0.3 mg/kg
TBS
Day 0
Day 14
Day 25

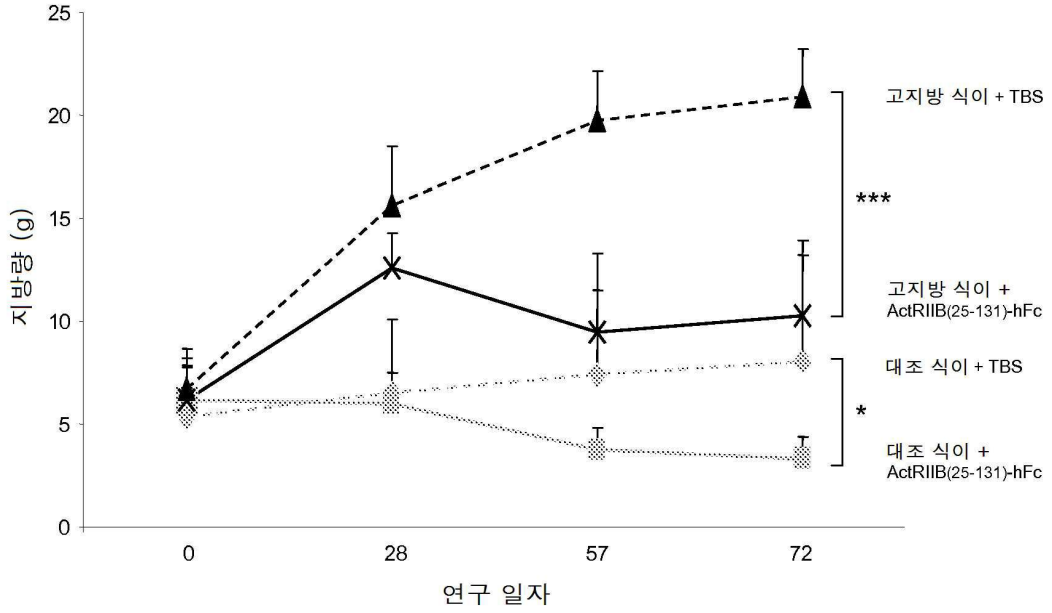
도면7


제지방 체중에서 변화 (g)
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
***
***
***
***
Sham + TBS
Sham + ActRIIB (20-134) mFc
Sham + ActRIIB (25-131) hFc
ORX + TBS
ORX + ActRIIB (20-134) mFc
ORX + ActRIIB (25-131) hFc

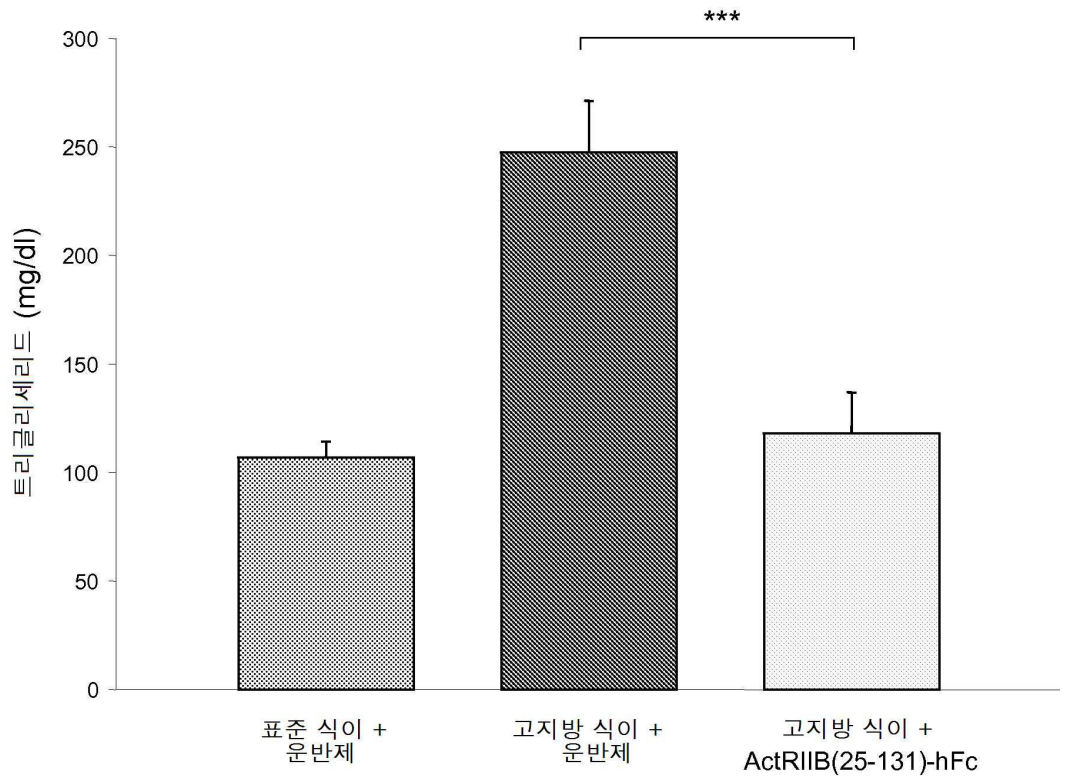
도면8


제지방 체중에서 변화 (기준선 %)
30
26
22
18
14
10
6
2
-2
***
High Fat Diet + ActRIIB(25-131)-hFc
***
Control Diet + ActRIIB(25-131)-hFc
High Fat Diet + TBS
Control Diet + TBS
Day 0
Day 28

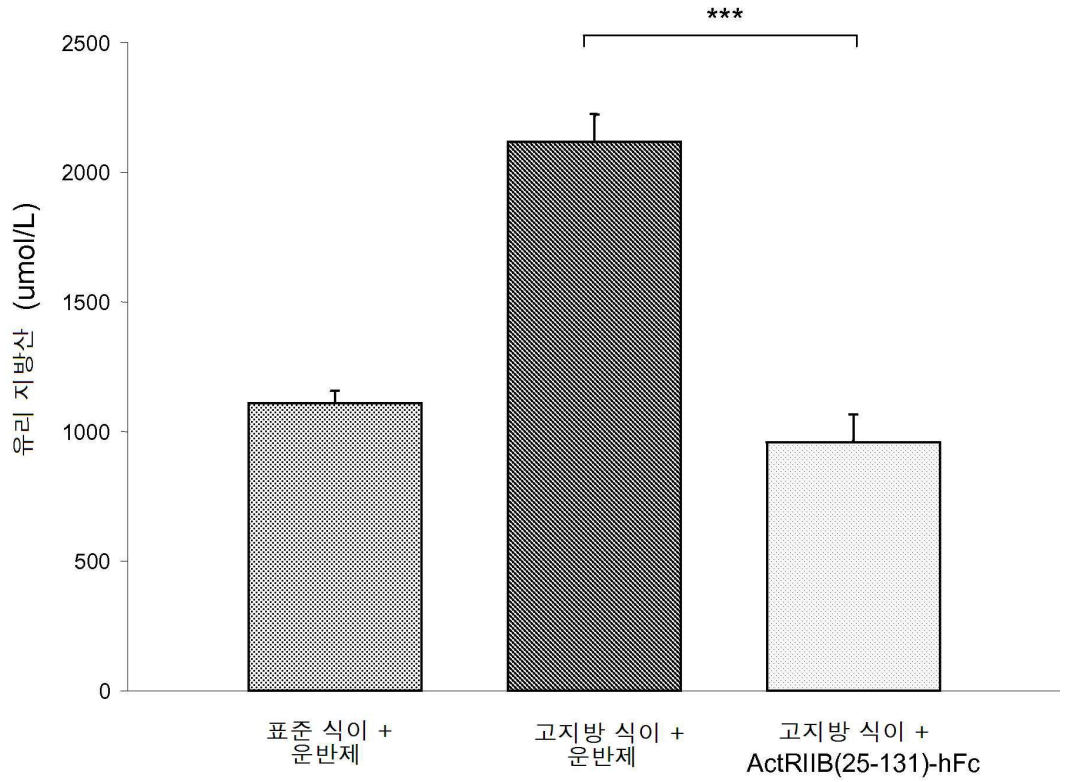
도면9


25
20
15
10
5
0
지방량 (g)
0
28
57
72
연구 일자
고지방 식이 + TBS
***
고지방 식이 +
ActRIIB(25-131)-hFc
대조 식이 + TBS
*
대조 식이 +
ActRIIB(25-131)-hFc

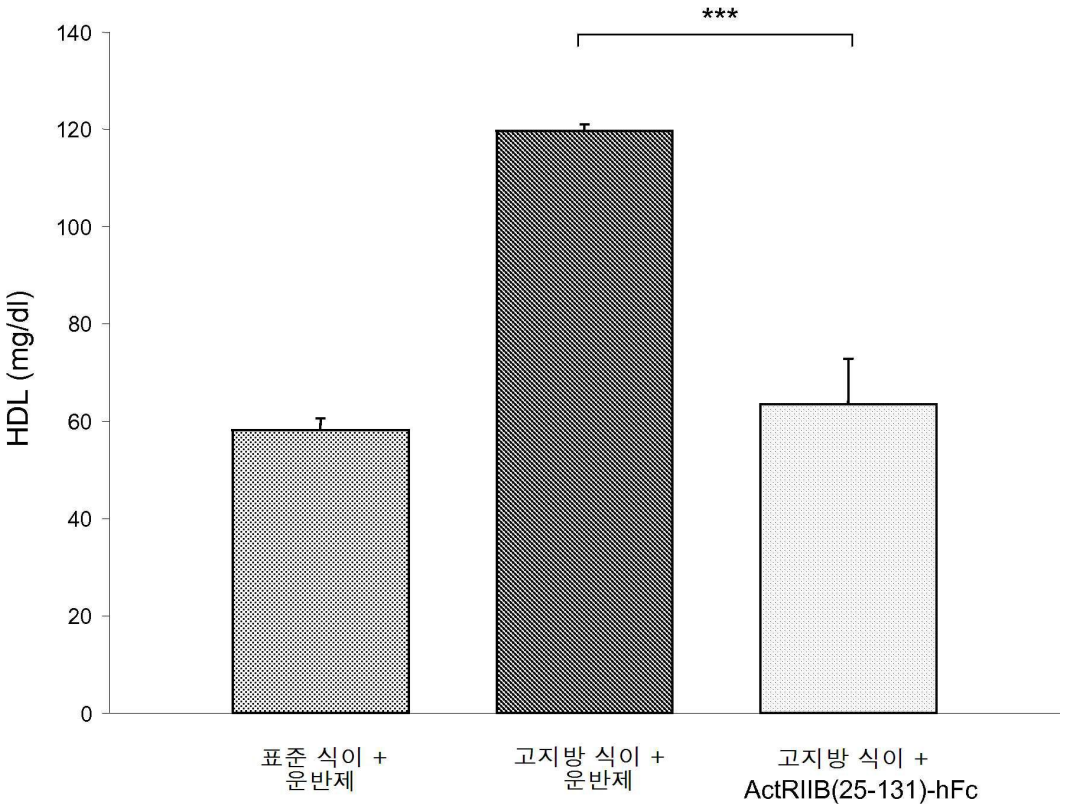
도면10


***
300
250
200
150
100
50
0
트리글리세리드 (mg/dl)
표준 식이 +
운반제
고지방 식이 +
운반제
고지방 식이 +
ActRIIB(25-131)-hFc

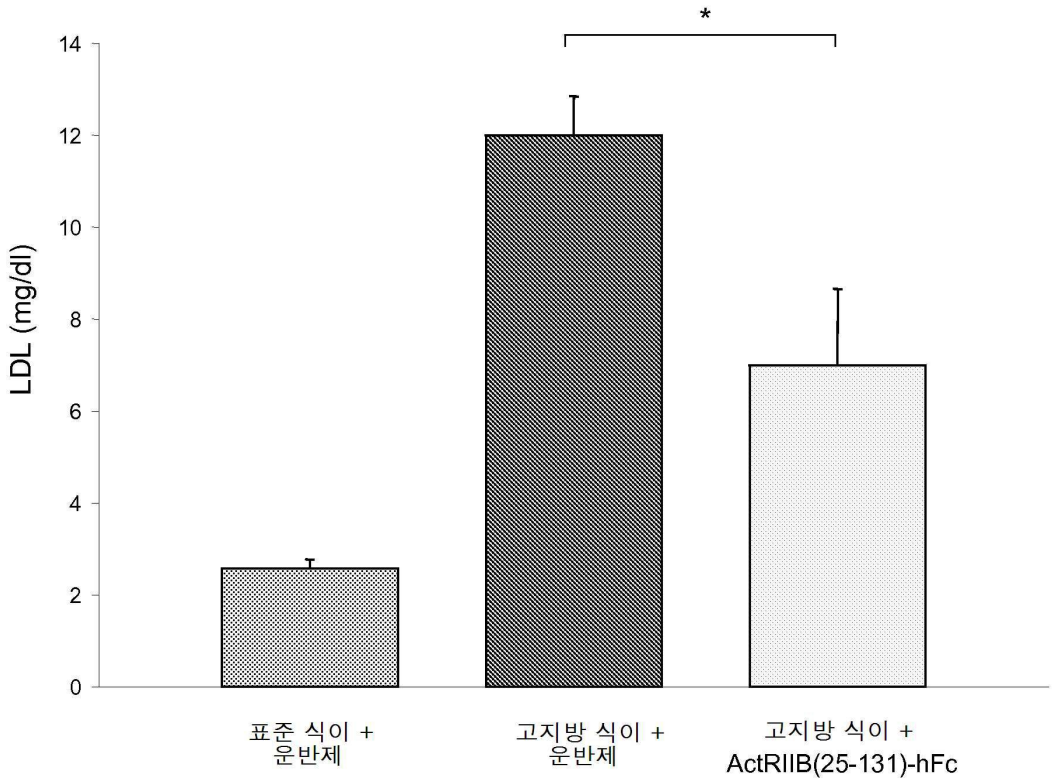
도면11


***
2500
2000
1500
1000
500
0
유리 지방산 (umol/L)
표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-hFc

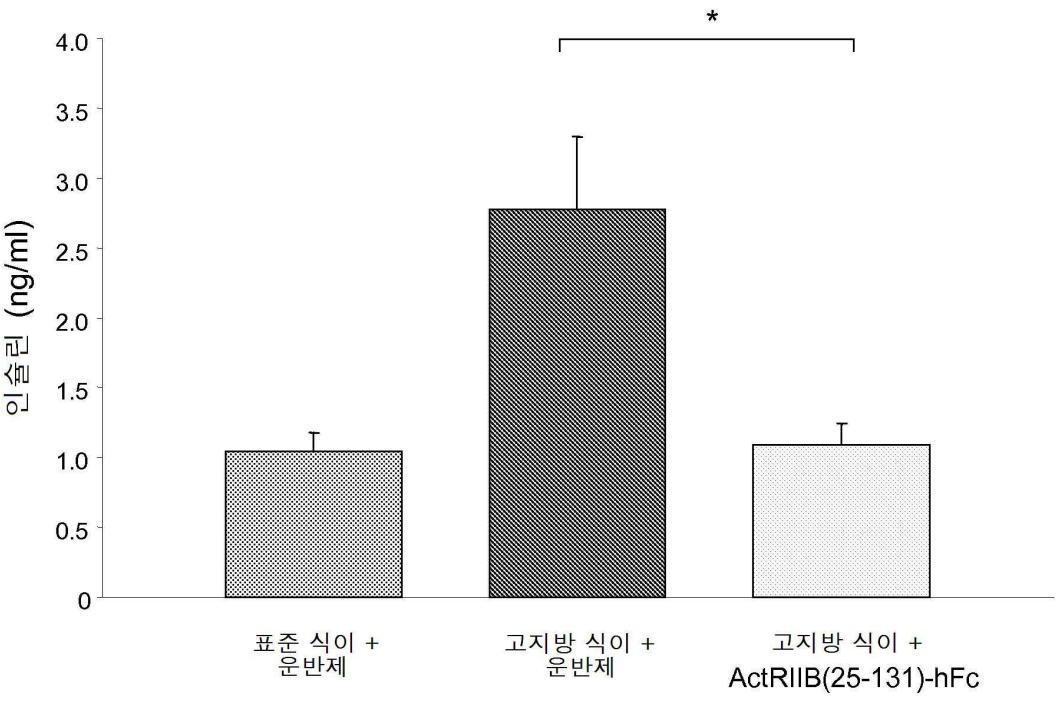
도면12


***
140
120
100
80
60
40
20
0
HDL (mg/dl)
표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-hFc

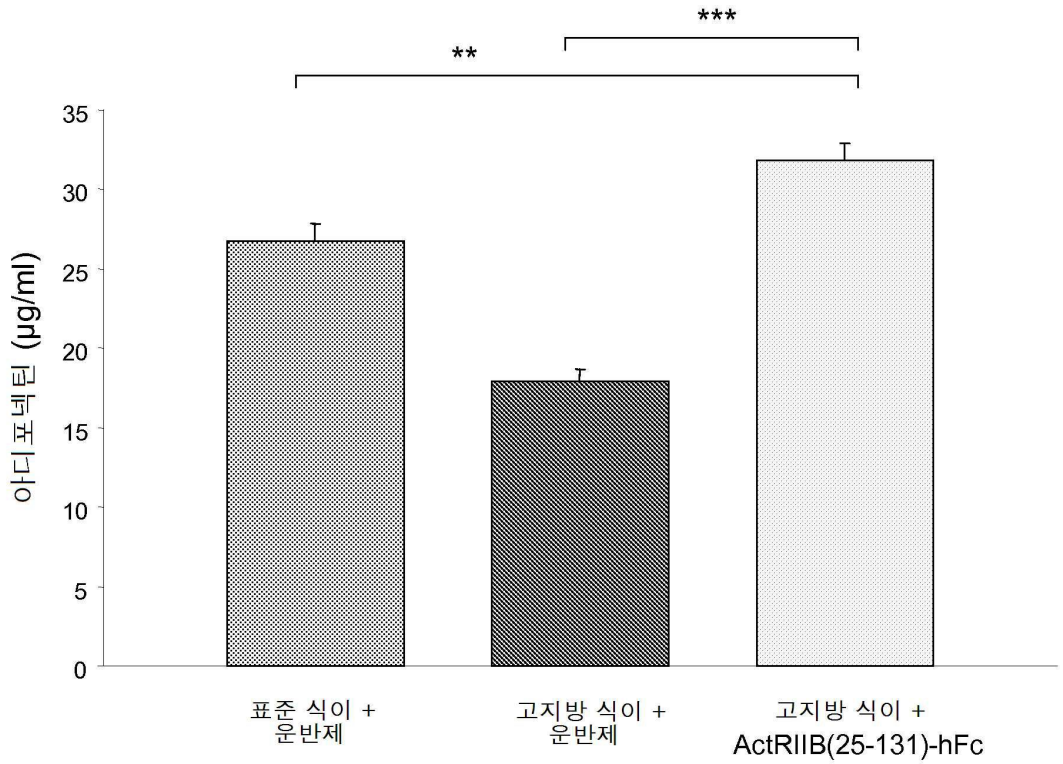
도면13


*
14
12
10
8
6
4
2
0
LDL (mg/dl)
표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-hFc

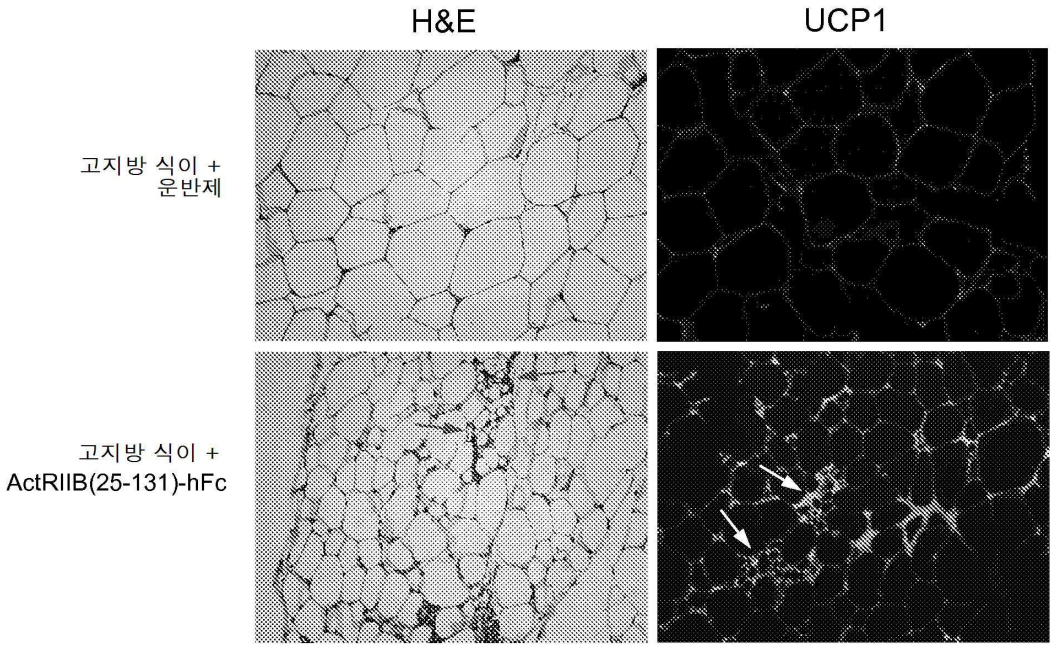
도면14


*
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
인슐린 (ng/ml)
표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-hFc

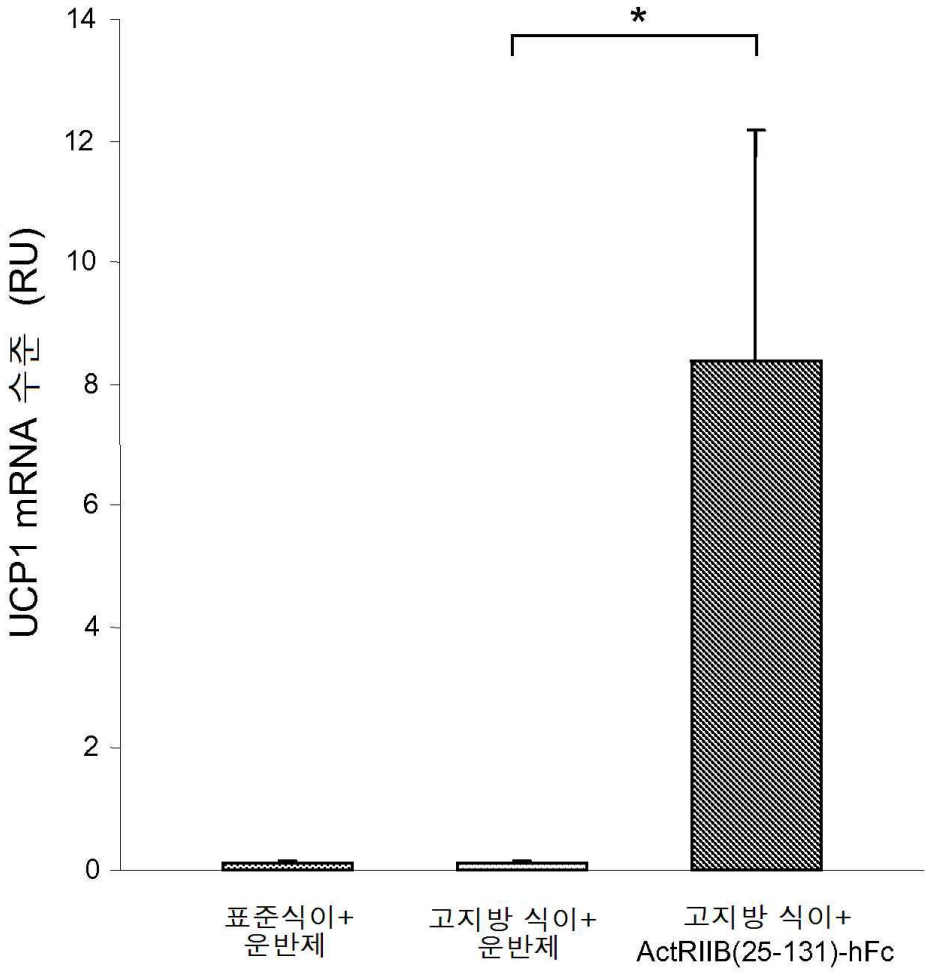
도면15


***
**
35
30
25
20
15
10
5
0
아디포넥틴 (μg/ml)
표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-hFc

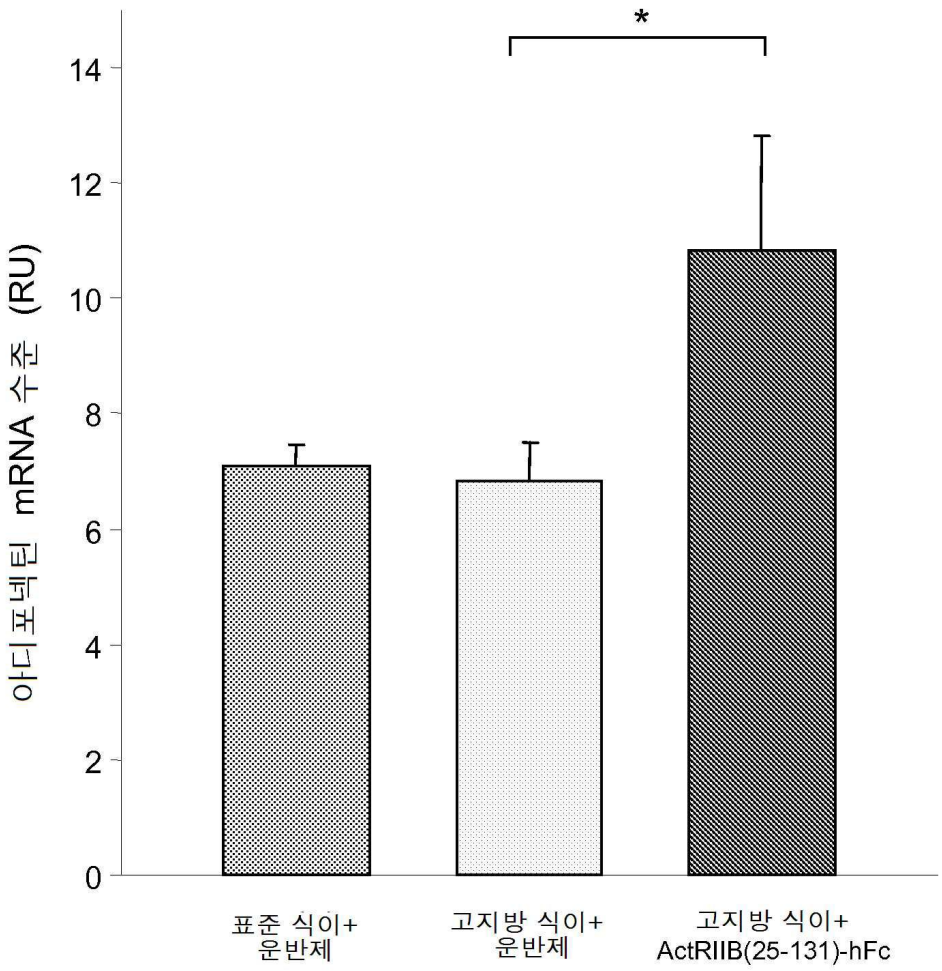
도면16


H&E
UCP1
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-hFc

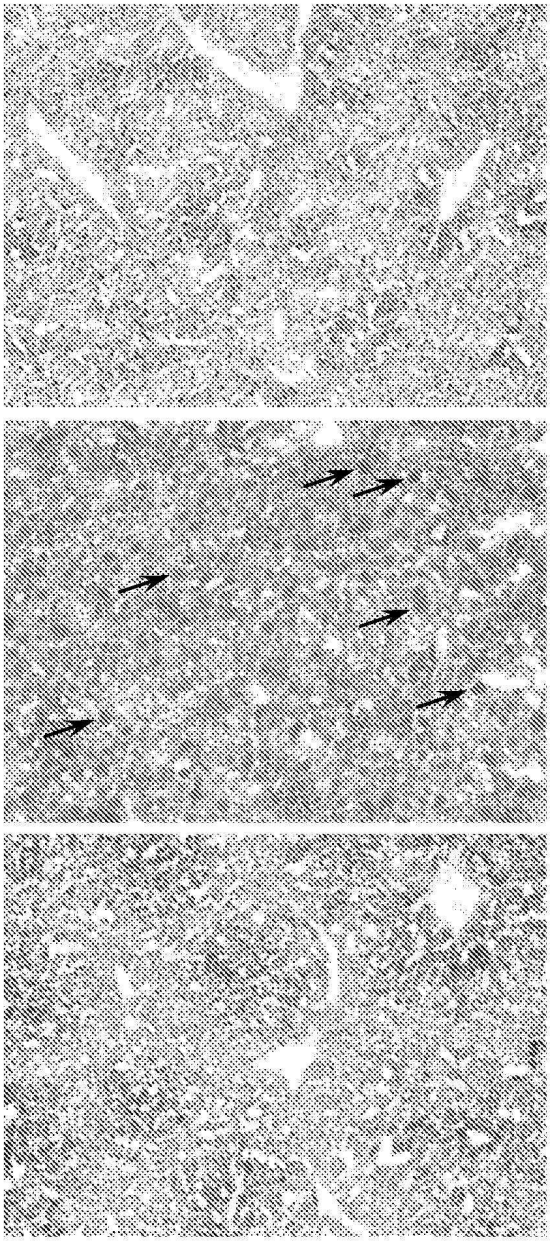
도면17


14
12
10
8
6
4
2
0
UCP1 mRNA 수준 (RU)
*
표준식이+
운반제
고지방 식이+
운반제
고지방 식이+
ActRIIB(25-131)-hFc

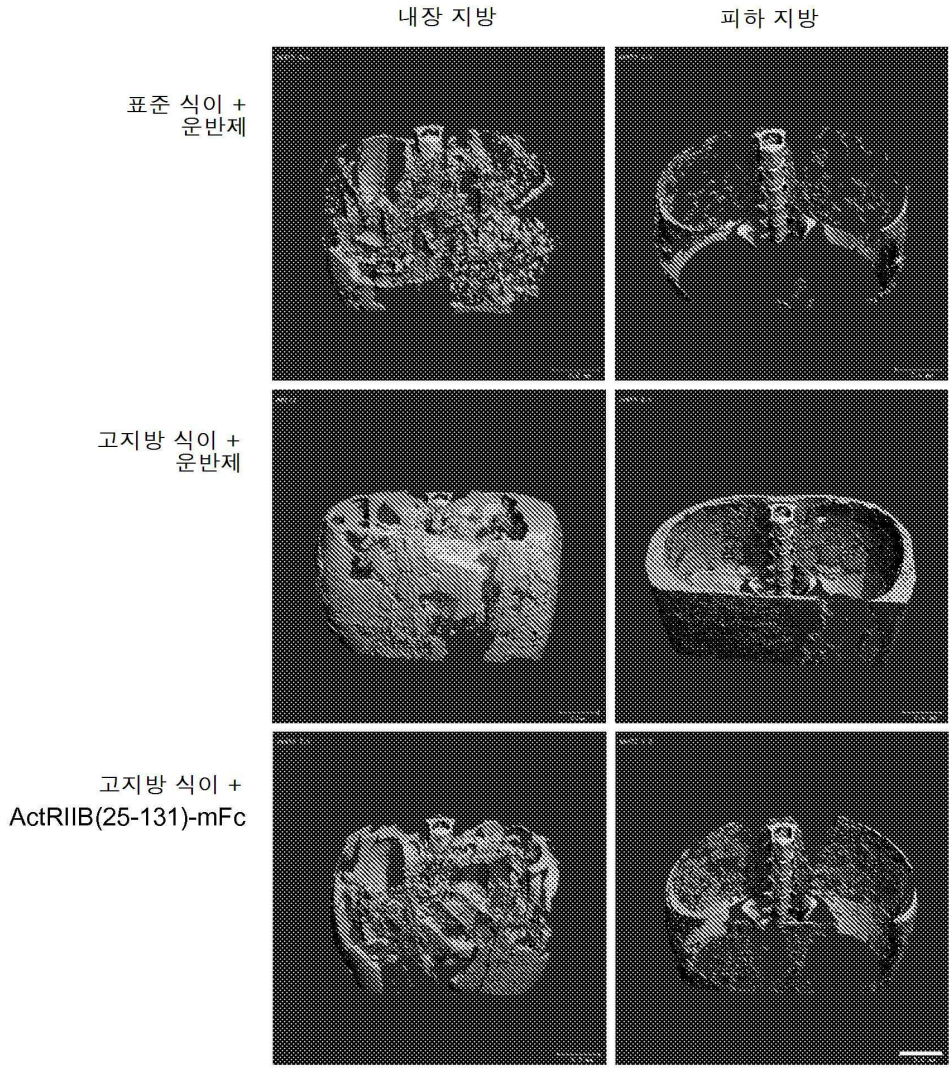
도면18


*
14
12
10
8
6
4
2
0
아디포넥틴 mRNA 수준 (RU)
표준 식이+
운반제
고지방 식이+
운반제
고지방 식이+
ActRIIB(25-131)-hFc

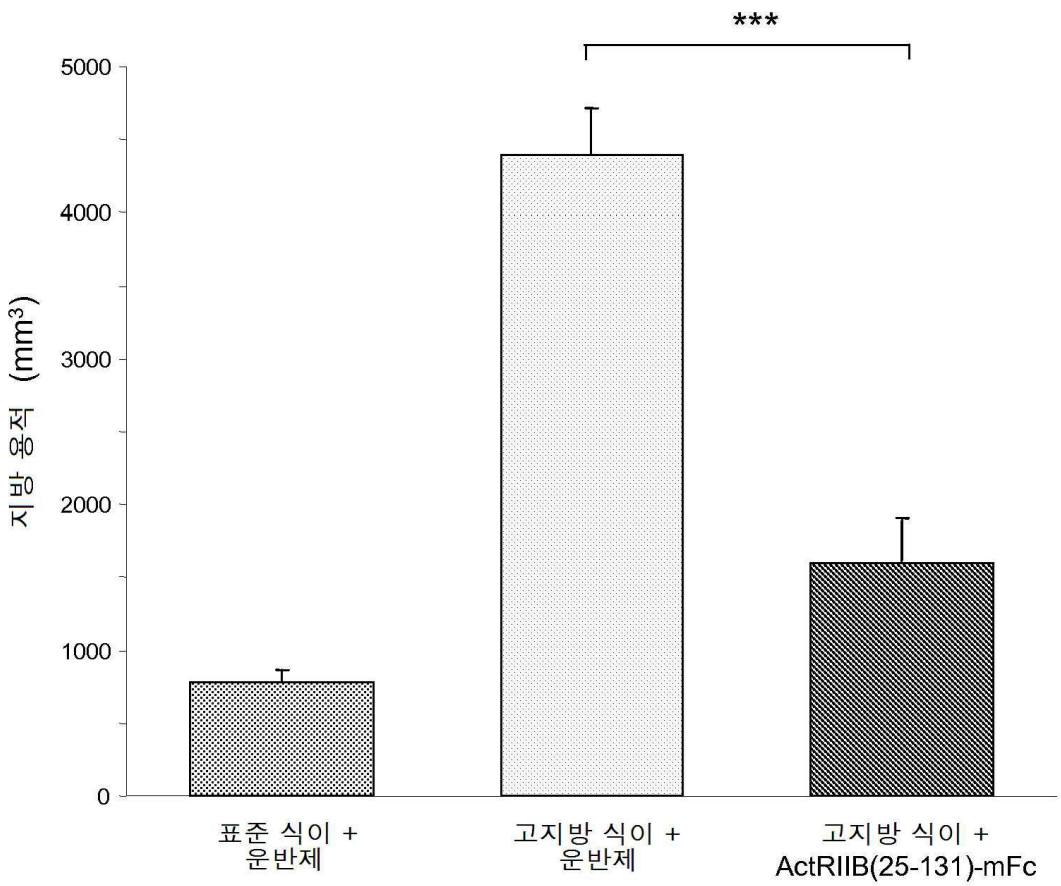
도면19



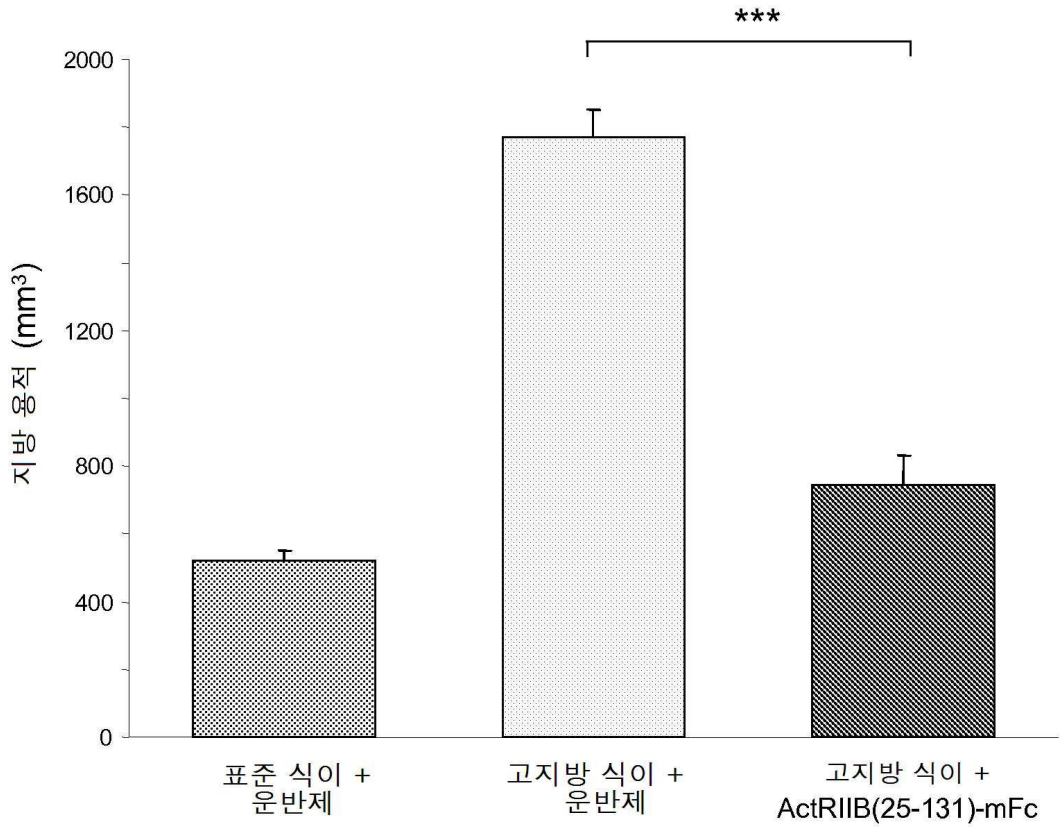
도면20



도면21

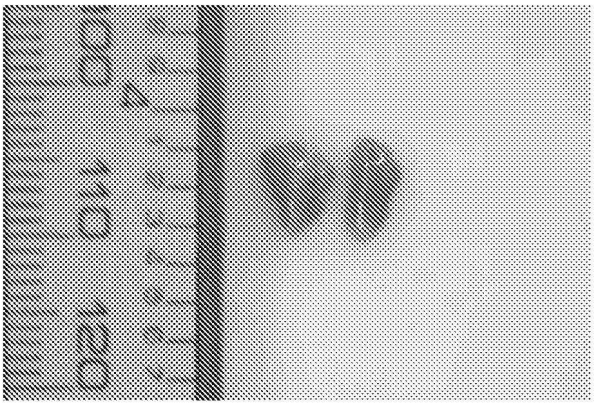

***
5000
4000
3000
2000
1000
0
지방 용적 (mm3)
표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-mFc

도면22


***
2000
1600
1200
800
400
0
지방 용적 (mm3)
표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-mFc

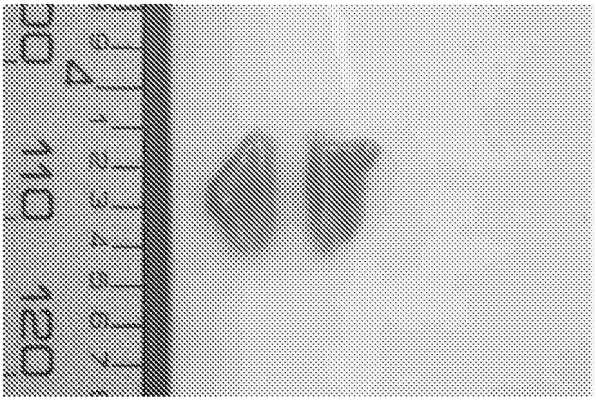
도면23

표준 식이 +
운반제

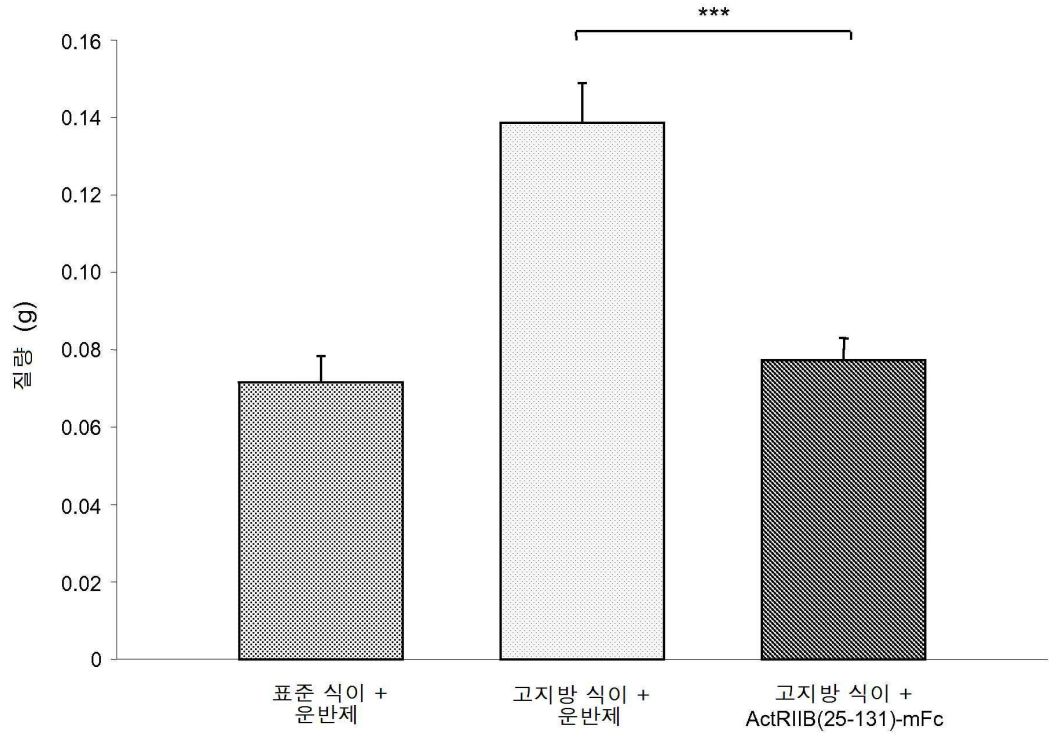


고지방 식이 +
운반제

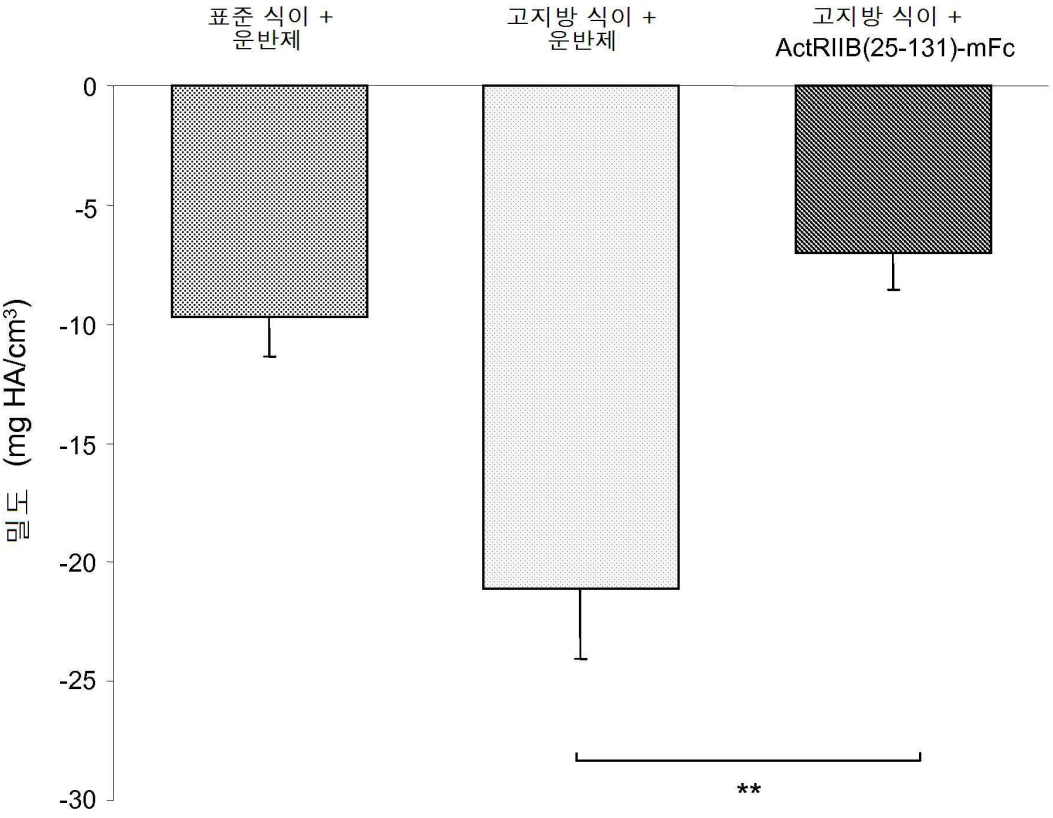
고지방 식이 +
ActRIIB(25-131)-mFc



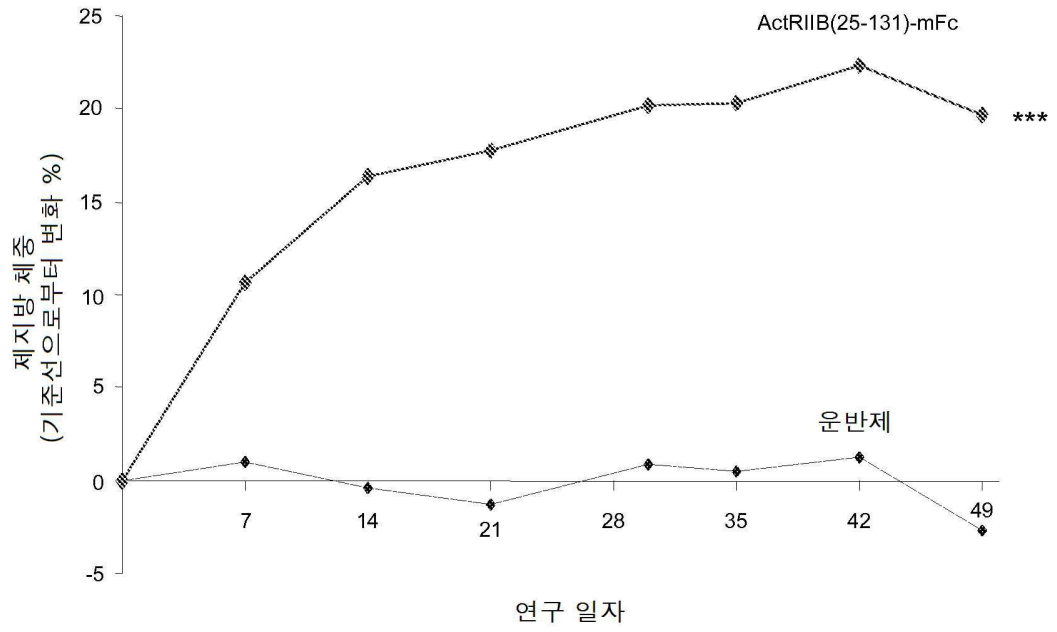
도면24


***
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0
질량 (g)
표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-mFc

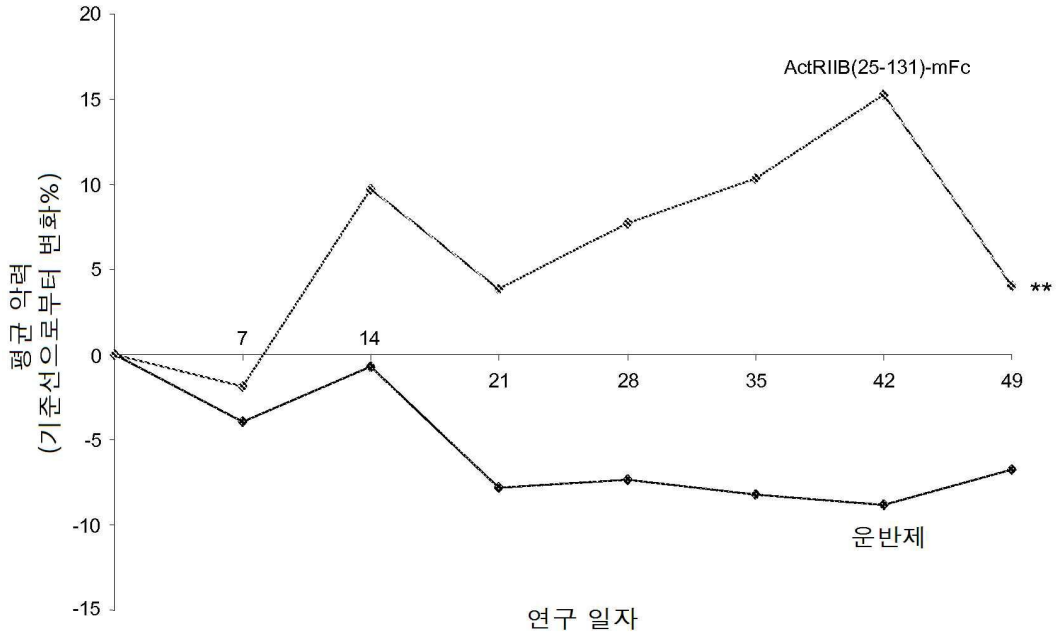
도면25


표준 식이 + 운반제
고지방 식이 + 운반제
고지방 식이 + ActRIIB(25-131)-mFc
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
밀도 (mg HA/cm³)
**

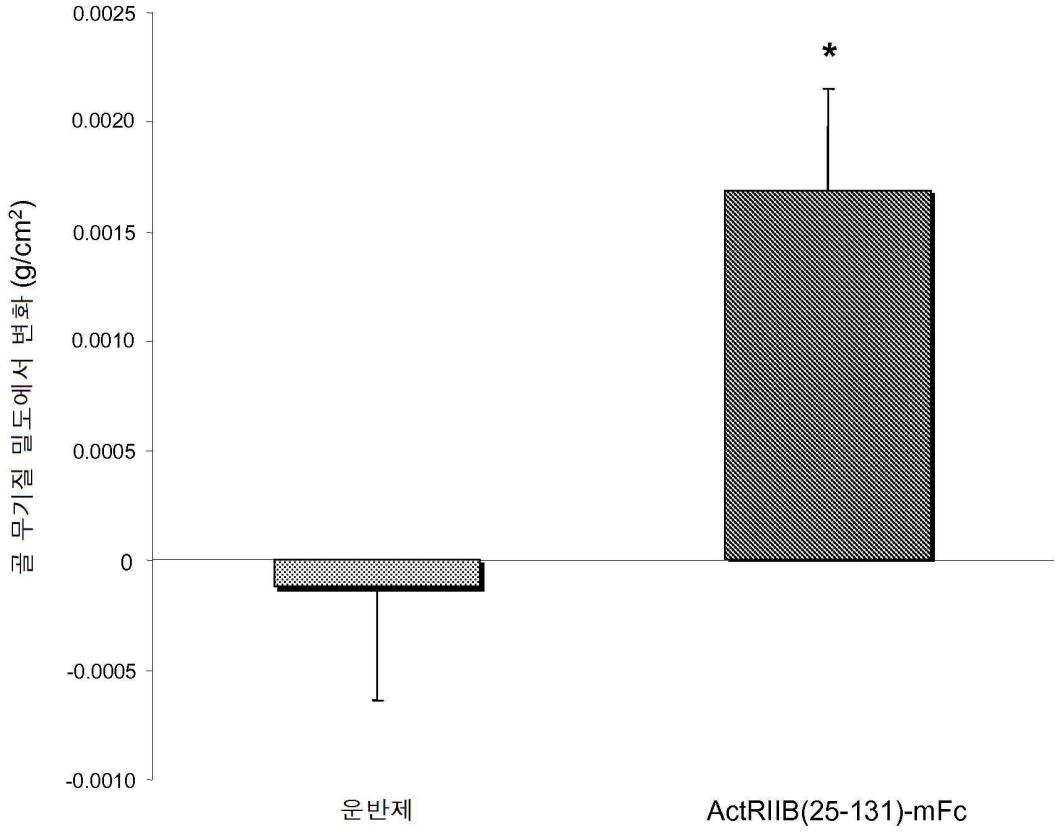
도면26


ActRIIB(25-131)-mFc
***
운반제
제지방 체중
(기준선으로부터 변화 %)
25
20
15
10
5
0
-5
7
14
21
28
35
42
49
연구 일자

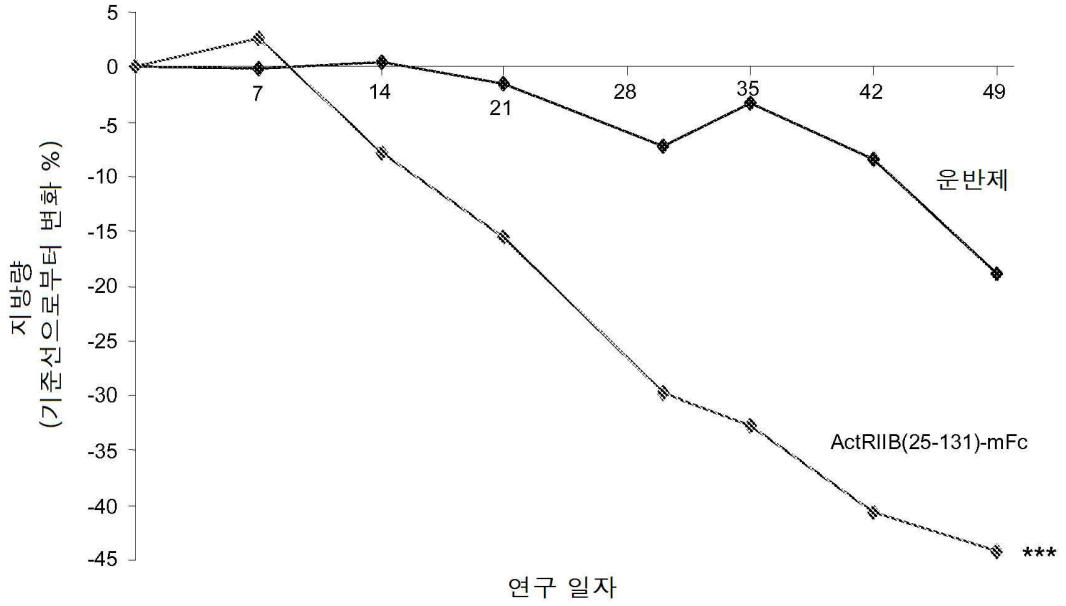
도면27


ActRIIB(25-131)-mFc
**
운반제
평균 악력
(기준선으로부터 변화%)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
7
14
21
28
35
42
49
연구 일자

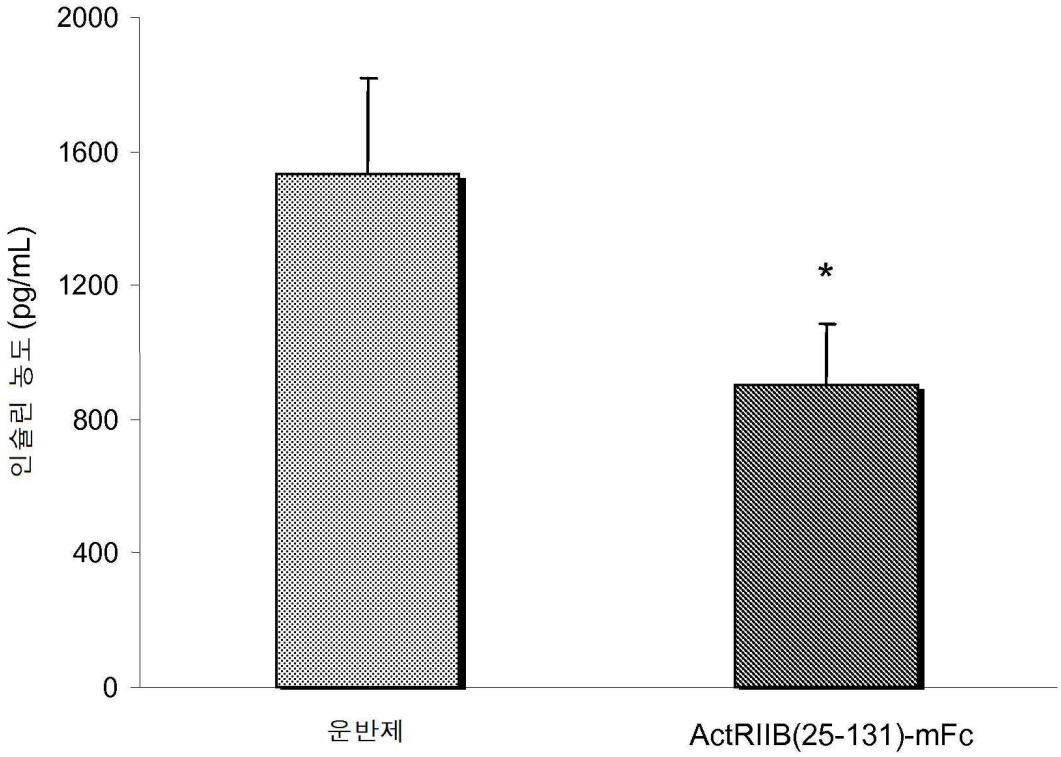
도면28


0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0
-0.0005
-0.0010
골 무기질 밀도에서 변화 (g/cm²)
*
운반제
ActRIIB(25-131)-mFc

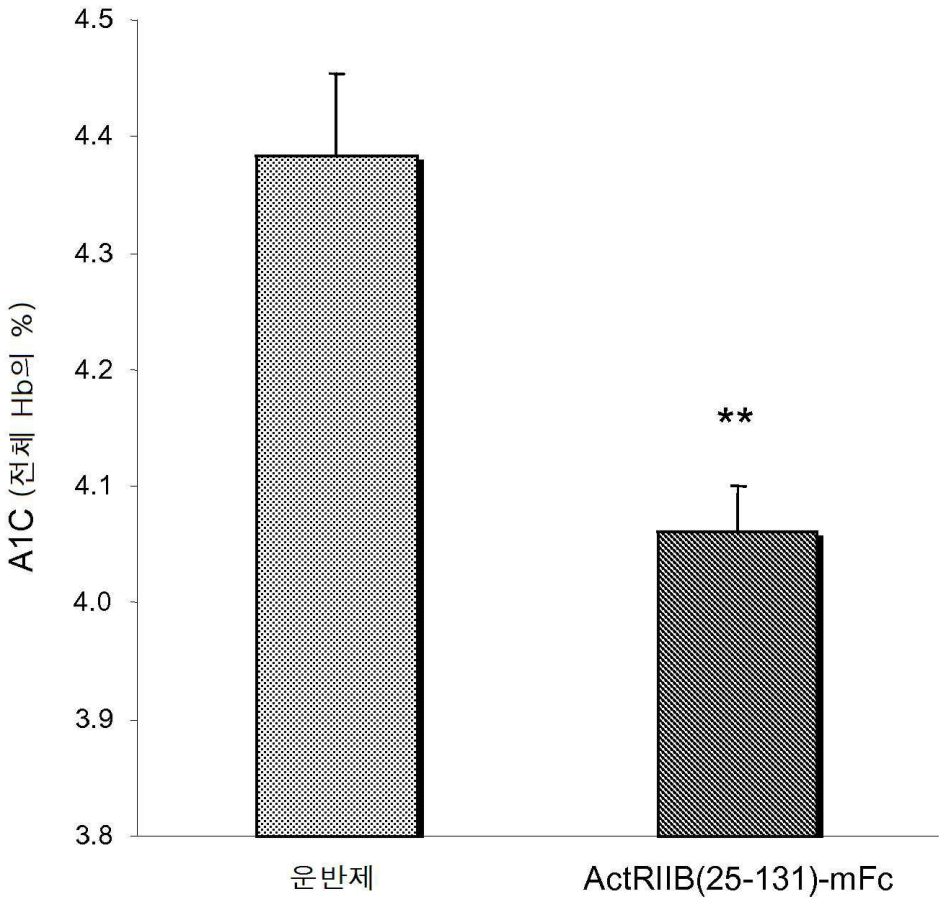
도면29


5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
-40
-45
7
14
21
28
35
42
49
지방량
(기준선으로부터 변화 %)
운반제
ActRIIB(25-131)-mFc
***
연구 일자

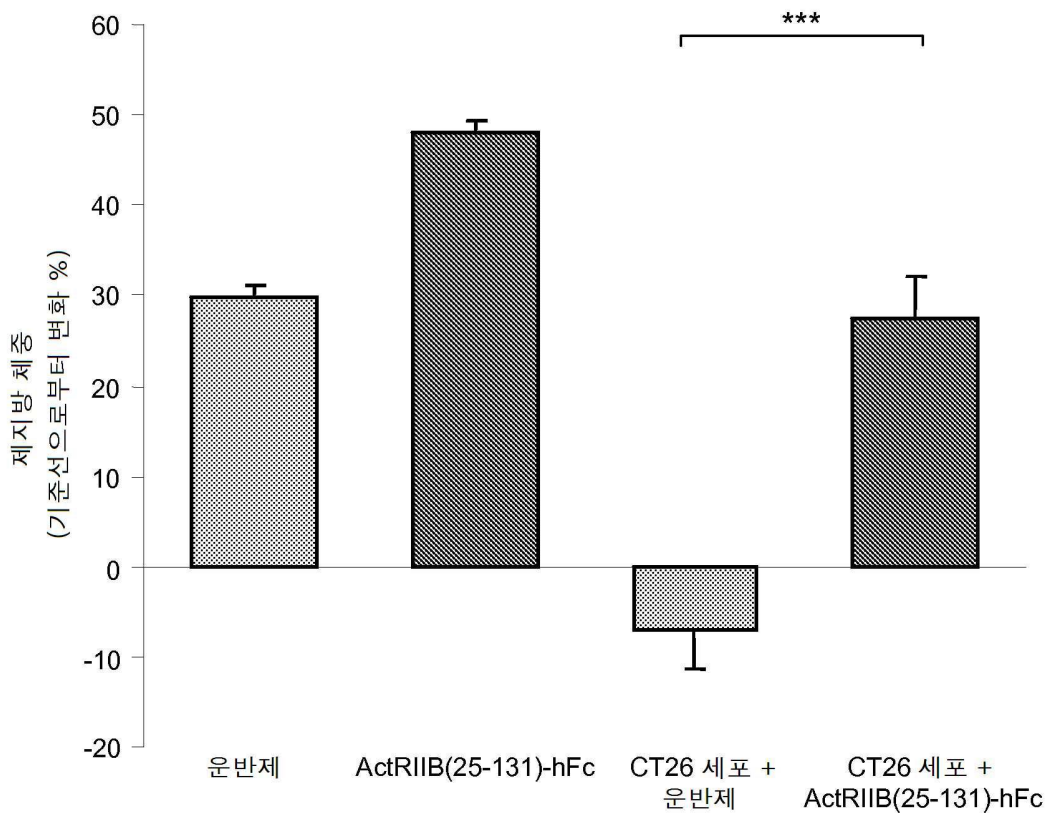
도면30


2000
1600
1200
800
400
0
인슐린 농도 (pg/mL)
*
운반제
ActRIIB(25-131)-mFc

도면31


4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
3.8
A1C (전체 Hb의 %)
**
운반제
ActRIIB(25-131)-mFc

도면32



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> TRUNCATED ACTRIIB-FC FUSION PROTEINS

<130> PHPH-045-WO1

<140> PCT/US2010/037787

<141> 2010-06-08

<150> 61/280,543

<151> 2009-11-03

<150> 61/268,420

<151> 2009-06-12

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
1 5 10 15

Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
145 150 155 160

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
165 170 175

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
180 185 190

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
210 215 220

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
245 250 255
Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
275 280 285
His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
290 295 300
Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
305 310 315 320
Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
340 345 350
Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
355 360 365
Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
370 375 380
Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
405 410 415
Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
420 425 430
His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
435 440 445
Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
465 470 475 480
Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu

485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile

500 505 510

<210> 2

<211> 1539

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60

cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcatc tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120

accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180

gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat 240

gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccaggtgtac 300

ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatttgcc agaggctggg 360

ggcccggaag tcacgtacga gccacccccg acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420

tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480

cggcatcgca agccccccta cggtcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540

ccatcccctc tggtgggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc 600

tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660

ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtgaa cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720

cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780

ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac 840

atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900

ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg 960

gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020

ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acacccacgg acaggtaggc 1080

acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140

ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc 1200

aaggctgcag acggacccgt ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag 1260

caccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt 1320

aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gcccagcttt gtgtgaccat cgaggagtgc 1380

tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440

attcggaggt cggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500

accaatgtgg acctgccccc taaagagtca agcatctaa 1539

<210> 3

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 3

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr

20 25 30

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu

35 40 45

Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp

50 55 60

Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu

65 70 75 80

Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu

85 90 95

Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu

100 105 110

Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu

115 120 125

Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

195 200 205
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

260 265 270
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

325 330 335
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 4
<211> 1083
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide
<220><221> CDS
<222> (73)..(396)

<400> 4

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccggcg cc gct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg 111
Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp
1 5 10

gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag 159
Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu
15 20 25

cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc 207

Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly
30 35 40 45

acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc 255
Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys
50 55 60

tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac 303
Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr

65 70 75

ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg 351
Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu
80 85 90

cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca 396
Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
95 100 105

ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 456
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 516
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 576
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 636
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 696
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 756

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 816

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 876

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 936

tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 996

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1056

agcctctccc tgtccccggg taaatga 1083

<210> 5

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 5

tcatttaccc ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gagcctcatg 60

catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtgagctt 120

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct tgtagttgtt 180

ctccggctgc ccattgctct cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240

caggcaggtc aggctgacct ggttcttggt catctcctcc cgggatgggg gcagggtgta 300

cacctgtggt tctcggggct gcccctttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360

gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctccttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420

gacggtgagg acgctgacca cacggtacgt gctgttgtac tgctcctccc gcggctttgt 480

cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc 540

gtggctcacg tccaccacca cgcatgtgac ctcaggggtc cgggagatca tgagggtgtc 600

cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggtcccccc aggagttcag gtgctgggca 660

cggtgggcat gtgtgagttc caccacctgt cgggggtggc tcgtacgtga cttccgggcc 720

cccagcctct ggcaaatgag tgaagcgctc gttgcagaag ttgccttcac agcagcagaa 780

gtacacctgg gggttctcct cagtggccac acactcctgc ctatcgtagc agttgaagtc 840

atctagccag cagcccttct tcacgagctc gatggtgcca gagctgttgc gccaggaggc 900

gtagcagtgc agccgcttgt cctgctcgcc ttcgcagcgc tccaggccgc tctggttggt 960

gcgctccagc tcccagttgg cgttgtagta gatgcactcc cgtgtctcag cggcgccggg 1020

cgaaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080

cat 1083

<210> 6

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<220><221> CDS

<222> (73)..(396)

<400> 6

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccggcg cc gcc gaa acc cgc gaa tgt att tat tac aat gct aat tgg 111

Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp

1 5 10

gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa 159

Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu

15 20 25

cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tcg tgg agg aac tcc tcc ggg 207

Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly

30 35 40 45

acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg ctg gac gat ttc aat tgt 255

Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys

50 55 60

tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat 303

Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr

65 70 75

ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac ctc 351

Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu

80 85 90

ccc gaa gcc ggc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc 396

Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr

95 100 105

ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 456

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 516

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 576

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 636

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 696

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 756

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 816

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 876

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 936

tccgacggct ccttcttcct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 996

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1056

agcctctccc tgtccccggg taaatga 1083

<210> 7

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 7

tcatttaccc ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gagcctcatg 60

catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtgagctt 120

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct tgtagttgtt 180

ctccggctgc ccattgctct cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240

caggcaggtc aggctgacct ggttcttggt catctcctcc cgggatgggg gcagggtgta 300

cacctgtggt tctcggggct gcccttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360

gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctccttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420

gacggtgagg acgctgacca cacggtacgt gctgttgtac tgctcctccc gcggctttgt 480

cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc 540

gtggctcacg tccaccacca cgcatgtgac ctcaggggtc cgggagatca tgagggtgtc 600

cttgggtttt gggggggaaga ggaagactga cggtcccccc aggagttcag gtgctgggca 660

cggtgggcat gtgtgagttc caccaccggt gggcgggggt tcataggtca cctcgggccc 720

gccggcttcg gggaggtggg taaaccgttc attacagaaa ttcccctcgc aacaacagaa 780

atagacctgc ggattctctt cggtcgcgac acattcctgg cggtcataac aattgaaatc 840

gtccagccag cacccttttct tgaccagttc aatcgtcccg gaggagttcc tccacgacgc 900

atagcaatgg aggcgtttat cctgttcccc ctcacaccgt tcgagcccgg attggttcgt 960

ccgttcgagt tcccaattag cattgtaata aatacattcg cgggtttcgg cggcgccggg 1020

cgaaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080

cat 1083

<210> 8

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 8

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30

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

Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His
100 105 110

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

130 135 140

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

165 170 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

180 185 190

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

195 200 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

210 215 220

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

225 230 235 240

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

245 250 255

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

260 265 270

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

275 280 285

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

290 295 300

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330 335

<210> 9

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (43)..(43)

<223> Asp or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (100)..(100)

<223> Lys or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (212)..(212)

<223> Asn or Ala

<

400> 9

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
50 55 60

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95

Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
165 170 175

Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
195 200 205
Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220
Lys
225

<210> 10
<211> 348
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 10
tctgggcgtg gggaggctga gacacgggag tgcatctact acaacgccaa ctgggagctg 60
gagcgcacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcggctgcac 120
tgctacgcct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180

ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg ccactgagga gaacccccag 240
gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttcactca tttgccagag 300
gctgggggcc cggaagtcac gtacgagcca cccccgacag cccccacc 348

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 11
Thr Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 12

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 13

His His His His His His

1 5

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 14

Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu

1 5 10 15

Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys

20 25 30

Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu

35 40 45

Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg

50 55 60

Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys

65 70 75 80

Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala

85 90 95

Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr

100 105

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 15

Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu
1 5 10 15

Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys
20 25 30

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

Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg
50 55 60

Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys
65 70 75 80

Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala
85 90 95

Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105