

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0156979

(43) 공개일자 2022년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/179 (2013.01)

A61K 38/1796 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7039730(분할)

(22) 출원일자(국제) 2013년11월01일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2021-7021923

원출원일자(국제) 2013년11월01일

심사청구일자 2021년08월11일

(85) 번역문제출일자 2022년11월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/068009

(87) 국제공개번호 WO 2014/071158

국제공개일자 2014년05월08일

(30) 우선권주장

61/721,898 2012년11월02일 미국(US)

61/740,665 2012년12월21일 미국(US)

(71) 출원인

셀진 코퍼레이션

미합중국 뉴저지주 07901 쉐미트 모리스 애비뉴 86

워싱턴 유니버시티

미국 미주리 세인트 루이스 브루킹즈 드라이브 1 (우:63130)

(72) 발명자

슬로언 빅터 쇼어

미국 뉴저지주 08822 플레밍턴 크리스탈 글렌 씨티 3

루스카 키쓰

미국 미주리주 63130 세인트 루이스 윈 브루킹즈 드라이브

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

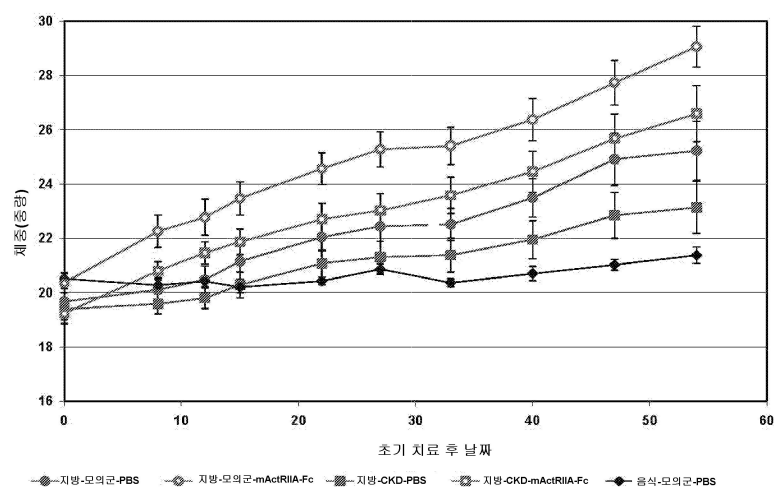
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 골 및 다른 장애를 치료하기 위한 액티빈-ACTRII 길항제 및 용도

(57) 요약

본원은 신장 질환과 관련된 골 장애를 치료하는 방법을 제공하는데, 이때 상기 방법은 액티빈(Activin)-ActRIIA 억제제를 상기 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본원은 낮은 교체 골 장애를 치료하는 방법 및 조성물도 제공하는데, 이때 상기 방법은 액티빈-ActRIIA 억제제를 상기 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또한, 신장 질환과 관련된 골 장애를 치료하기 위한 조성물, 및 낮은 교체 골 장애 및 혈관 석회화를 치료하기 위한 조성물도 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 13/12 (2018.01)

A61P 19/08 (2018.01)

A61P 19/10 (2018.01)

(72) 발명자

팡 이푸

미국 미주리주 63130 세인트 루이스 원 브루킹즈
드라이브

성 빅토리아

미국 캘리포니아주 94114 샌프란시스코 그랜드 뷰
애비뉴 109

스티븐스 랜달 엠

미국 매사추세츠주 01966 록포트 스트레이츠마우스
웨이 2

스미스 윌리엄

미국 뉴욕주 12498 우드스톡 글래스코 턴파이크
1521

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 무력성(adynamic) 골 장애를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 무력성 골 장애의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

대상체에서 무력성 골 장애 형태의 만성 신장 질환-미네랄 및 골 장애(CKD-MBD)를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 무력성 골 장애 형태의 CKD-MBD의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

무력성 골 장애가 미네랄화된 골 내로의 테트라사이클린 도입의 부재를 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

대상체에서 낮은 골 교체 형태의 CKD-MBD를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 낮은 골 교체 형태의 CKD-MBD의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

낮은 골 교체 형태의 CKD-MBD가 골연화증인, 방법.

청구항 6

대상체에서 고인산혈증을 특징으로 하는 골 장애를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 고인산혈증을 특징으로 하는 골 장애의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 7

대상체에서 혈관 석회화를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 죽상경화성 석회화의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 8

대상체에서 신장 질환을 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 신장 질환의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

신장 질환이 신장 섬유증인, 방법.

청구항 10

혈관 석회화로 진단받은 대상체에서 혈관 칼슘 수준을 감소시키는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 11

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

ActRII 억제제가 하기 아미노산 서열들로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드인, 방법:

- a. 서열번호 2와 90% 동일한 아미노산 서열;
- b. 서열번호 2와 95% 동일한 아미노산 서열;
- c. 서열번호 2와 98% 동일한 아미노산 서열;
- d. 서열번호 2;
- e. 서열번호 3과 90% 동일한 아미노산 서열;
- f. 서열번호 3과 95% 동일한 아미노산 서열;
- g. 서열번호 3과 98% 동일한 아미노산 서열;
- h. 서열번호 3;
- i. 서열번호 6과 90% 동일한 아미노산 서열;
- j. 서열번호 6과 95% 동일한 아미노산 서열;
- k. 서열번호 6과 98% 동일한 아미노산 서열;
- l. 서열번호 6;
- m. 서열번호 7과 90% 동일한 아미노산 서열;
- n. 서열번호 7과 95% 동일한 아미노산 서열;
- o. 서열번호 7과 98% 동일한 아미노산 서열;
- p. 서열번호 7;
- q. 서열번호 12와 90% 동일한 아미노산 서열;
- r. 서열번호 12와 95% 동일한 아미노산 서열;
- s. 서열번호 12와 98% 동일한 아미노산 서열;
- t. 서열번호 12;
- u. 서열번호 17과 90% 동일한 아미노산 서열;
- v. 서열번호 17과 95% 동일한 아미노산 서열;
- w. 서열번호 17과 98% 동일한 아미노산 서열;
- x. 서열번호 17;
- y. 서열번호 20과 90% 동일한 아미노산 서열;
- z. 서열번호 20과 95% 동일한 아미노산 서열;
- aa. 서열번호 20과 98% 동일한 아미노산 서열;
- bb. 서열번호 20;
- cc. 서열번호 21과 90% 동일한 아미노산 서열;
- dd. 서열번호 21과 95% 동일한 아미노산 서열;
- ee. 서열번호 21과 98% 동일한 아미노산 서열;
- ff. 서열번호 21;
- gg. 서열번호 23과 90% 동일한 아미노산 서열;

hh. 서열번호 23과 95% 동일한 아미노산 서열;
 ii. 서열번호 23과 98% 동일한 아미노산 서열;
 jj. 서열번호 23;
 kk. 서열번호 25와 90% 동일한 아미노산 서열;
 ll. 서열번호 25와 95% 동일한 아미노산 서열;
 mm. 서열번호 25와 98% 동일한 아미노산 서열; 및
 nn. 서열번호 25.

청구항 12

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
 ActRII 억제제가 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드인, 방법.

청구항 13

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
 ActRII 억제제가 비경구 투여되는, 방법.

청구항 14

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
 대상체가 18세 미만인, 방법.

청구항 15

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
 대상체의 키(height)를 증가시키는 방법.

청구항 16

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
 대상체가 말기 신장 질환을 갖는, 방법.

청구항 17

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 투석을 받는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 신장 질환과 관련된 골 장애, 예컨대, 만성 신장 질환-미네랄 및 골 장애("CKD-MBD")를 치료하는 방법을 제공하는데, 이때 상기 방법은 액티빈(Activin)-ActRII 억제제를 상기 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본원은 낮은 교체 골 장애를 치료하는 방법 및 조성물도 제공하는데, 이때 상기 방법은 액티빈-ActRII 억제제를 상기 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또한, 신장 질환과 관련된 골 장애를 치료하기 위한 조성물, 및 낮은 교체 골 장애 및 혈관 석회화를 치료하기 위한 조성물도 제공한다.

배경 기술

[0002] 본원은 2012년 11월 2일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/721,898호 및 2012년 12월 21일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/740,665호(이들 각각의 개시내용은 전체로서 본원에 참로로 도입됨)를 우선권 주장한다.

[0003] 골 성장 및 미네랄화는 2종의 세포들, 즉 파골세포 및 조골세포의 활성화에 의존하지만, 연골세포 및 혈관구조의 세포도 이들 과정들의 중추적인 양태에 참여한다. 발생학적으로, 골 형성은 두 기작, 즉 연골내 골화 및 막내

골화를 통해 일어나고, 이때 연골내 골화는 세로방향 골 형성을 담당하고, 막내 골화는 위상적으로 평평한 골, 예컨대, 두개골의 형성을 담당한다. 연골내 골화는 조골세포, 파골세포, 혈관구조 및 후속 미네랄화의 형성을 위한 주형으로서 작용하는 성장판에서 연골 구조의 순차적인 형성 및 분해를 요구한다. 막내 골화 동안 골은 결합 조직에서 직접 형성된다. 상기 두 과정들은 조골세포의 침윤 및 후속 매트릭스 침착을 요구한다.

[0004] 만성 신장 질환은 미네랄 항상성의 점진적인 악화, 인 및 칼슘의 정상 혈청 및 조직 농도의 파괴, 및 순환 호르몬, 예컨대, 부갑상선 호르몬, 25-하이드록시비타민 D, 1,25-다이하이드록시비타민 D, 다른 비타민 D 대사물질, 섬유모세포 성장 인자-23 및 성장 호르몬의 변화와 관련되어 있다. 문헌(Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD), Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group, In: Kidney Int Suppl. (2009) 76 (Suppl 113):S1-130, page S3)을 참조한다. 만성 신장 질환에서 파괴되는 미네랄 및 호르몬 항상성은 성장 동안 초기 골 형성(골 모델링), 및 성년 동안 골 구조 및 기능(골 리모델링)에 매우 중요하다. 결과적으로, 골 비정상은 만성 신장 질환을 갖는 환자에서 발견된다. 추가로, 유사하게 미네랄 및 내분비 기능의 파괴로 인해, 골외 석회화가 만성 신장 질환을 갖는 환자에서 발견될 수 있다. 이들 증후군은 만성 신장 질환 관련 미네랄 및 골 장애("CDK-MBD")로서 지칭된다.

[0005] 골은 연속적 교체를 겪는다. 골 교체는 골의 재흡수에 이어서 골의 교체가 일어나는 과정이다. 조골세포 및 파골세포는 골 교체에 필수적인 세포이다. 낮은 교체 및 무력성(adynamic) 골 질환은 골의 감소된 또는 존재하지 않는 재흡수 및 교체를 특징으로 한다. CKD-MBD는 낮은 교체 또는 무력성 골을 특징으로 할 수 있다 (Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD), Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group, In: Kidney Int Suppl. (2009) 76 (Suppl 113):S1-130, page S34).

[0006] 혈관구조에서의 증가된 칼슘 수준은 증가된 혈관 경직을 특징으로 하는 상태인 혈관 석회화를 유발할 수 있다. 혈관 석회화를 갖는 환자는 심근경색의 증가된 위험을 갖고, 혈관 석회화는 신장 질환, 예를 들면, CKD-MBD를 앓고 있는 환자에서 특히 우세하다. 예를 들면, 문헌(Shanahan et al., 2011, Circ. Res. 109:697-711)을 참조한다.

[0007] 2종의 관련된 II형 수용체들, 즉 ActRIIA 및 ActRIIB는 액티빈에 대한 II형 수용체로서 확인되었다(Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). ActRIIA 및 ActRIIB는 액티빈 이외에 BMP7, Nodal, GDF8 및 GDF11을 비롯한 여러 다른 TGF-베타 패밀리를 포함한 단백질들과 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, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK-4는 액티빈, 특히 액티빈 A에 대한 주요 I형 수용체이고, ALK-7도 액티빈, 특히 액티빈 B에 대한 수용체로서 작용할 수 있다.

발명의 내용

[0008] 일부 실시양태에서, 본원은 대상체에서 무력성 골 장애를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 무력성 골 장애의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 본원은 대상체에서 무력성 골 장애 형태의 CKD-MBD를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 무력성 골 장애 형태의 CKD-MBD의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법도 제공한다.

[0009] 일부 보다 구체적인 실시양태에서, 무력성 골 장애는 미네랄화된 골 내로의 테트라사이클린 도입의 부재를 특징으로 한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 본원은 대상체에서 낮은 골 교체 형태의 CKD-MBD를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 낮은 골 교체 형태의 CKD-MBD의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 낮은 골 교체 형태의 CKD-MBD는 골연화증이다.

[0011] 일부 실시양태에서, 본원은 대상체에서 고인산혈증을 특징으로 하는 골 장애를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 고인산혈증을 특징으로 하는 골 장애의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 본원은 대상체에서 죽상경화성 석회화를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 죽상경화성 석회화의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 본원은 대상체에서 신장 질환을 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 신장 질환의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 보다 구체적인 실시양태에서,

신장 질환은 신장 섬유증이다.

[0014] 구체적인 실시양태에서, 본원은 대상체에서 골의 석회화를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원은 대상체에서 골의 석회화를 예방하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 대상체에서 치료되거나 예방되는 골의 석회화는 혈관 석회화, 즉 대상체의 혈관구조에서의 칼슘 염의 축적, 예를 들면, 대상체의 동맥의 석회화이다.

[0015] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법에서 사용될 수 있는 ActRII 억제제는 서열번호 2와 90% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 2와 95% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 2와 98% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 2; 서열번호 3과 90% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 3과 95% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 3과 98% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 3; 서열번호 6과 90% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 6과 95% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 6과 98% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 6; 서열번호 7과 90% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 7과 95% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 7과 98% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 7; 서열번호 12와 90% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 12와 95% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 12와 98% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 12; 서열번호 17과 90% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 17과 95% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 17과 98% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 17; 서열번호 20과 90% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 20과 95% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 20과 98% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 20; 서열번호 21과 90% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 21과 95% 동일한 아미노산 서열; 서열번호 21과 98% 동일한 아미노산 서열; 및 서열번호 21로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 보다 구체적인 실시양태에서, ActRII 억제제는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 보다 구체적인 실시양태에서, ActRII 억제제는 비경구 투여된다.

[0016] 구체적인 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법에서 사용될 수 있는 ActRII 억제제는 ActRIIA 억제제이고, 이때 ActRIIA 억제제는 a. 서열번호 2와 90% 이상 동일한 폴리펩티드; b. 서열번호 2와 95% 이상 동일한 폴리펩티드; c. 서열번호 2와 98% 이상 동일한 폴리펩티드; d. 서열번호 2; e. 서열번호 3과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; f. 서열번호 3과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; g. 서열번호 3과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; h. 서열번호 3; i. 서열번호 6과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; j. 서열번호 6과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; k. 서열번호 6과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; l. 서열번호 6; m. 서열번호 7과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; n. 서열번호 7과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; o. 서열번호 7과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; p. 서열번호 7; q. 서열번호 12와 90% 이상 동일한 폴리펩티드; r. 서열번호 12와 95% 이상 동일한 폴리펩티드; s. 서열번호 12와 98% 이상 동일한 폴리펩티드; 및 t. 서열번호 12로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성된다. 구체적인 실시양태에서, ActRIIA 억제제는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드이다.

[0017] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 ActRII 억제제는 ActRIIB 억제제이고, 이때 ActRIIB 억제제는 a. 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; b. 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; c. 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; d. 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43; e. 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 또는 47과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; f. 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 또는 47과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; g. 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 또는 47과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; 및 h. 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 또는 47로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성된다. 구체적인 실시양태에서, ActRIIB 억제제는 서열번호 23을 포함하거나 서열번호 23으로 구성된 폴리펩티드이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, ActRIIB 억제제는 서열번호 25를 포함하거나 서열번호 25로 구성된 폴리펩티드이다.

[0018] 또 다른 구체적인 실시양태에서, ActRIIA 억제제 및 ActRIIB 억제제는 본원에서 제공된 방법에서 사용될 수 있고(예를 들면, ActRIIA 억제제 및 ActRIIB 억제제를 포함하는 조성물이 사용될 수 있거나; ActRIIA 억제제 및 ActRIIB 억제제 둘다가 본원에 기재된 방법에 따라 치료될 대상체에게 따로 투여될 수 있고), 이때 ActRIIA 억제제는 a. 서열번호 2와 90% 이상 동일한 폴리펩티드; b. 서열번호 2와 95% 이상 동일한 폴리펩티드; c. 서열번호 2와 98% 이상 동일한 폴리펩티드; d. 서열번호 2; e. 서열번호 3과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; f. 서열번호

호 3과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; g. 서열번호 3과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; h. 서열번호 3; i. 서열번호 6과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; j. 서열번호 6과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; k. 서열번호 6과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; l. 서열번호 6; m. 서열번호 7과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; n. 서열번호 7과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; o. 서열번호 7과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; p. 서열번호 7; q. 서열번호 12와 90% 이상 동일한 폴리펩티드; r. 서열번호 12와 95% 이상 동일한 폴리펩티드; s. 서열번호 12와 98% 이상 동일한 폴리펩티드; 및 t. 서열번호 12로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성되고; ActRIIB 억제제는 a. 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43과 90% 이상 동일한 폴리펩티드; b. 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43과 95% 이상 동일한 폴리펩티드; c. 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43과 98% 이상 동일한 폴리펩티드; d. 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43; e. 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 또는 47과 90% 동일한 폴리펩티드; f. 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 또는 47과 95% 동일한 폴리펩티드; g. 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 또는 47과 98% 동일한 폴리펩티드; 및 h. 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 또는 47로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성된다. 구체적인 실시양태에서, ActRIIA 억제제는 서열번호 7을 포함하거나 서열번호 7로 구성된 폴리펩티드이고, ActRIIB 억제제는 서열번호 23을 포함하거나 서열번호 23으로 구성된 폴리펩티드이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, ActRIIA 억제제는 서열번호 7을 포함하거나 서열번호 7로 구성된 폴리펩티드이고, ActRIIB 억제제는 서열번호 25를 포함하거나 서열번호 25로 구성된 폴리펩티드이다.

[0019] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법으로 치료될 대상체는 18세 미만의 대상체이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법으로 치료될 대상체는 말기 신장 질환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법으로 치료될 대상체는 투석을 받는다. 일부 실시양태에서, 본원은 대상체의 키(height)를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 본원은 대상체에서 고인산혈증, (인의 증가로 인한) 이차 부갑상선항진증, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화, 및 무력성 골 장애를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 고인산혈증, (인의 증가로 인한) 이차 부갑상선항진증, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화, 및 무력성 골 장애의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1: 부분적 신장절제 후 마우스 체중.
- 도 2: 마우스에서 부분적 신장절제 후 DEXA 스캔에 의한 BMD의 변화.
- 도 3: 마우스에서 부분적 신장절제 후 서열번호 7("mActRIIA-Fc") 적혈구용적률 변화의 뮤린 대응물.
- 도 4: 마우스에서 부분적 신장절제 후 대표적인 골의 마이크로CT 3D 영상.
- 도 5: mActRIIA-Fc 치료는 적혈구용적률을 증가시킨다.
- 도 6: mActRIIA-Fc는 골 미네랄 밀도를 증가시킨다.
- 도 7: 대퇴골의 대표적인 마이크로CT 스캔.
- 도 8: mActRIIA-Fc는 대퇴골 중간-골체의 피질 두께를 증가시킨다.
- 도 9: mActRIIA-Fc는 섬유주 골 부피를 증가시킨다.
- 도 10: mActRIIA-Fc는 원위 대퇴골의 섬유주 두께를 증가시킨다.
- 도 11: mActRIIA-Fc는 CKD 마우스 모델에서 대동맥 칼슘 수준의 감소를 야기한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 1.1 개요

[0023] 한 양태에서, 본원은 만성 신장 질환-미네랄 및 골 장애(CKD-MBD)를 치료하는 방법으로서, ActRII 억제제를 상기 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. ActRII 억제제는 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 억제제일 수 있다.

- [0024] CKD-MBD는 만성 신장 질환으로 인한 미네랄 및 골 대사의 전신 장애로서 진단될 수 있고, (1) 칼슘; 인; 칼슘 x 인 생성물; 알칼리성 포스파타제(총 또는 골 특이적); 바이카보네이트; 부갑상선 호르몬("PTH"); 1-84 PTH, 1-84-PTH/7-84 PTH 비; 오스테오칼신; 오스테오포로테그린; 타르트레이트 내성 산 포스파타제 동형체 5b("TRAP-5b"); 피리디놀린 및 데옥시피리디놀린; 전구콜라겐 1형 아미노-말단 연장 펩티드; C-말단 가교연결; 콜라겐의 C-말단 가교연결; 섬유모세포 성장 인자 23("FGF23"); 페툴린(Fetulin)-A; 또는 비타민 D 대사의 비정상; (2) 골 교체, 미네랄화, 부피, 선형 성장 또는 강도의 비정상; 및 (3) 혈관 또는 다른 연조직 석회화 중 하나 또는 이들의 조합으로 나타날 수 있다. 문헌(Nickolas, 2008, Kidney International 74:721-731) 및 문헌(Moe et al., 2006, Kidney International 69:1945-1953)을 참조한다. CKD-MBD의 진단을 위한 지침은 예를 들면, 만성 신장 질환-미네랄 및 골 장애(CKD-MBD)의 예방, 진단, 평가 및 치료를 위한 KDIGO 임상 실시 지침에서 발견될 수 있다(Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group, In: Kidney Int Suppl. (2009) 76 (Suppl 113):S1-130).
- [0025] 일부 실시양태에서, 본원은 낮은 골 교체 형태의 CKD-MBD를 치료하는 방법으로서, ActRII 억제제를 상기 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원은 고인산혈증 및/또는 고칼슘혈증을 특징으로 하는 CKD-MBD를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원은 골의 석회화, 예컨대, 죽상경화성 석회화(그러나, 이것으로 한정되지 않음)를 특징으로 하는 CKD-MBD를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 본원은 만성 신장 질환이 3기, 4기, 5기 또는 5D기에 도달한 CKD-MBD를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 신장 질환은 말기 신장 질환이다. 일부 실시양태에서, 본원은 성인에서 60 ml/분/1.73 m² 미만 또는 소아 환자에서 89 ml/분/1.73 m² 미만의 사구체 여과율을 특징으로 하는 CKD-MBD를 치료하는 방법을 제공한다. 문헌(Moe et al., 2006, Kidney International 69:1945-1953)을 참조한다. 일부 실시양태에서, 본원은 성인에서 50 ml/분/1.73 m², 40 ml/분/1.73 m², 30 ml/분/1.73 m², 20 ml/분/1.73 m² 또는 10 ml/분/1.73 m² 미만의 사구체 여과율을 특징으로 하는 CKD-MBD를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원은 소아 환자에서 80 ml/분/1.73 m², 70 ml/분/1.73 m², 60 ml/분/1.73 m², 50 ml/분/1.73 m², 40 ml/분/1.73 m², 30 ml/분/1.73 m², 20 ml/분/1.73 m² 또는 10 ml/분/1.73 m² 미만의 사구체 여과율을 특징으로 하는 CKD-MBD를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0027] 이론에 의해 구속받지 않지만, 성인 환자에서 60 ml/분/1.73 m² 미만 및 소아 환자에서 89 ml/분/1.73 m² 미만의 사구체 여과율은 칼슘 수준, 인 수준, PTH 수준 및 비타민 D 대사의 검출가능한 비정상치를 초과하고, 이들 마커들의 비정상적 수준은 골 질환을 초래한다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 본원은 만성 신장 질환과 관련된 골 병리, 즉 CKD-MBD를 치료하는 방법을 제공한다. 문헌(Moe et al., 2006, Kidney International 69:1945-1953)을 참조한다. 일부 실시양태에서, CKD-MBD는 낮은 교체 CKD-MBD이다. 낮은 교체 CKD-MBD는 하기 표 1에 기재된 조직학적 특징에 의해 진단될 수 있다. 국립 신장 재단(National Kidney Foundation)의 웹사이트에 있는 NKF KDOQI(National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) 지침을 참조한다.

표 1

낮은 교체 CKD-MBD의 조직학적 특징

특징	무력성	골연화증
골 형성		
섬유주 골 부피	정상, 낮음	변화가가능함 낮음, 정상 또는 높음
유골 부피	정상, 낮음	높음-매우 높음
유골조직 두께	정상, 낮음	높음-매우 높음
조골세포의 수	낮음	낮음
골 형성률	낮음-매우 낮음	낮음-매우 낮음
미네랄화 지연 시간	정상	연장됨
골 재흡수		
침식된 골 주위	정상, 낮음	변화가가능함
		종종 낮음, 높을 수 있음
파골세포의 수	낮음	낮음, 정상일 수 있거나 높을 수 있음
골수 섬유증	부재	부재

[0029]

[0030]

구체적인 실시양태에서, 본원은 대상체에서 골의 석회화를 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원은 대상체에서 골의 석회화를 예방하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 대상체에서 치료되거나 예방되는 골의 석회화는 혈관 석회화, 즉 대상체의 혈관구조에서의 칼슘 염의 축적, 예를 들면, 대상체의 동맥의 석회화이다.

[0031]

일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화의 치료 또는 예방 방법은 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓을 위험을 갖는 대상체에 대해 수행된다(즉, 상기 위험을 갖는 대상체는 본원에 기재된 방법에 따라 ActRII 억제제를 투여받는다). 구체적인 실시양태에서, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓을 위험을 갖는 대상체는 고콜레스테롤혈증을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓을 위험을 갖는 대상체는 고혈압을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓을 위험을 갖는 대상체는 당뇨병을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓을 위험을 갖는 대상체는 신장 질환(예를 들면, 말기 신장 질환)을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓을 위험을 갖는 대상체는 만성 신장 질환을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓을 위험을 갖는 대상체는 증가된 산화 스트레스, 예를 들면, 혈관구조에서 산화제 생성과 항산화제 활성 사이의 불균형을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓을 위험을 갖는 대상체는 석회화 억제제 결핍(예를 들면, 페투인(fetuin)-A, 매트릭스 gla 단백질(MGP) 및 오스테오포테게린(OPG) 중 하나 이상의 결핍)을 갖는다.

[0032]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 중막 석회화(몬케베르그(Monckeberg) 경화증 또는 중막 석회증으로서도 공지되어 있음)를 갖는다. 중막 석회화는 동맥 중간막 내의 확산된 미네랄 침착물을 특징으로 한다. 구체적인 실시양태에서, 중막 석회화를 앓고 있는 대상체는 노인이다. 구체적인 실시양태에서, 중막 석회화를 앓고 있는 대상체는 중막 석회화를 야기하는 장애, 예를 들면, 당뇨병 또는 신장 질환(예를 들면, CKD)을 갖는다.

[0033]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 내막 석회화를 갖는다. 내막 석회화는 죽상경화증과 관련되어 있고 죽상경화성 플라크가 진행됨에 따라 진행된다.

[0034]

일부 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험

을 갖는 대상체는 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있지 않거나 앓을 위험을 갖지 않는 대상체의 FGF23 수준에 비해 증가된 수준의 FGF23(감소된 기계적 적재, 골 형성의 감소 및 교환가능한 풀(pool) 중의 과도한 인에 반응하여 골세포에 의해 생성되는 호르몬(예를 들면, 문헌(Hruska and Mathew, 2011, *Advances in Chronic Kidney Disease* 18(2):98-104) 참조))을 갖는다. 대상체의 샘플, 예를 들면, 혈액 또는 혈청을 사용하여 당분야에서 공지되어 있는 방법, 예를 들면, ELISA로 FGF23의 수준을 검출할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 FGF23 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)은 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있지 않거나 앓을 위험을 갖지 않는 대상체의 FGF23 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)보다 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 50% 초과 수준만큼 더 크다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 FGF23 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)은 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있지 않거나 앓을 위험을 갖지 않는 대상체의 FGF23 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)보다 약 5% 내지 10%, 10% 내지 20%, 20% 내지 30%, 30% 내지 40%, 40% 내지 50%, 50% 내지 60%, 50% 내지 75%, 또는 75% 내지 100% 더 크다.

[0035] 일부 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 FGF23 수준은 본원에 기재된 방법, 예를 들면, 한 형태의 CKD-MBD를 치료하는 방법 및/또는 골외 석회화(예를 들면, 혈관 석회화)를 치료하는 방법의 효능을 모니터링하는 데에 사용될 수 있고, 이때 이러한 방법들은 본원에 기재된 치료 유효량의 ActRII 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법들 중 하나 이상의 방법에 따라 치료되는 대상체는 본원에 기재된 방법으로 치료되기 전에 상기 대상체에서 검출된 FGF23 수준에 비해 감소된 FGF23 수준(예를 들면, 대상체의 혈청에서 검출됨)을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법으로 치료되는 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 FGF23 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)은 본원에 기재된 방법을 사용한 치료 전에 상기 대상체에서 검출된 FGF23 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)에 비해 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 50% 초과 수준만큼 감소된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체에서 FGF23 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)은 본원에 기재된 방법을 사용한 치료 전에 상기 대상체에서 검출된 FGF23 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)에 비해 약 5% 내지 10%, 10% 내지 20%, 20% 내지 30%, 30% 내지 40%, 40% 내지 50%, 50% 내지 60%, 50% 내지 75%, 또는 75% 내지 100%만큼 감소된다.

[0036] 구체적인 실시양태에서, 본원은 (i) 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓는 개체에게 ActRII 억제제를 투여하는 단계; (ii) ActRII 억제제의 투여 후 상기 개체의 조직 샘플(예를 들면, 혈청)에서 FGF23의 양을 측정하는 단계; 및 (iii) 상기 조직 샘플에서 FGF23의 양이 ActRII 억제제의 투여 전 상기 개체의 동일한 종류의 조직 샘플(예를 들면, 동일한 개체의 상이한 혈청 샘플)에서 측정된 FGF23의 양에 비해 약 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25%, 또는 약 5% 내지 10%, 10% 내지 20% 또는 20% 내지 30% 이하만큼 감소된 경우, ActRII 억제제의 투여를 반복하는 단계를 포함하는, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, FGF23의 양이 ActRII 억제제의 투여 후 감소되지 않는 경우, 투여되는 ActRII 억제제의 용량을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, FGF23의 양이 ActRII 억제제의 투여 후 감소되지 않는 경우, 투여되는 ActRII 억제제의 투여 빈도를 증가시킬 수 있다.

[0037] 일부 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체는 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있지 않거나 앓을 위험을 갖지 않는 대상체의 스클레로스틴(sclerostin)(CKD-MBD를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체에서 증가되는 단백질(예를 들면, 문헌(Gracioli et al., 2010, *J Am Soc Nephrol* 21:774A) 참조))에 비해 증가된 스클레로스틴 수준을 갖는다. 대상체의 샘플, 예컨대, 혈액 또는 혈청을 사용하여 당분야에서 공지되어 있는 방법, 예를 들면, ELISA로 스클레로스틴 수준을 검출할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 스클레로스틴 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)은 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있지 않거나 앓을 위험을 갖지 않는 대상체의 스클레로스틴 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)보다 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 50% 초과 수준만큼 더 크다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 스클레로스틴 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)은 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골외 석회화,

예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있지 않거나 앓을 위험을 갖지 않는 대상체의 스크러로스틴 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)보다 약 5% 내지 10%, 10% 내지 20%, 20% 내지 30%, 30% 내지 40%, 40% 내지 50%, 50% 내지 60%, 50% 내지 75%, 또는 75% 내지 100%만큼 더 크다.

[0038] 일부 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 스크러로스틴 수준은 본원에 기재된 방법, 예를 들면, 한 형태의 CKD-MBD를 치료하는 방법 및/또는 골의 석회화(예를 들면, 혈관 석회화)를 치료하는 방법의 효능을 모니터링하는 데에 사용될 수 있고, 이때 이러한 방법들은 본원에 기재된 ActRII 억제제를 치료 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법들 중 하나 이상의 방법에 따라 치료되는 대상체는 본원에 기재된 방법으로 치료되기 전에 상기 대상체에서 검출된 스크러로스틴 수준에 비해 감소된 스크러로스틴 수준(예를 들면, 대상체의 혈청에서 검출됨)을 갖는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 스크러로스틴 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)은 본원에 기재된 방법을 사용한 치료 전 상기 대상체에서 검출된 스크러로스틴 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)에 비해 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 또는 50% 초과 수준만큼 감소된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 앓고 있거나 앓을 위험을 갖는 대상체의 스크러로스틴 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)은 본원에 기재된 방법을 사용한 치료 전 상기 대상체에서 검출된 스크러로스틴 수준(예를 들면, 혈청에서 검출가능한 수준)에 비해 약 5% 내지 10%, 10% 내지 20%, 20% 내지 30%, 30% 내지 40%, 40% 내지 50%, 50% 내지 60%, 50% 내지 75%, 또는 75% 내지 100%만큼 감소된다.

[0039] 구체적인 실시양태에서, 본원은 (i) 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 갖는 개체에게 ActRII 억제제를 투여하는 단계; (ii) ActRII 억제제의 투여 후 상기 개체의 조직 샘플(예를 들면, 혈청)에서 스크러로스틴의 양을 측정하는 단계; 및 (iii) 상기 조직 샘플에서 스크러로스틴의 양이 ActRII 억제제의 투여 전 상기 개체의 동일한 조직 샘플(예를 들면, 동일한 개체의 상이한 혈청 샘플)에서 측정된 스크러로스틴의 양에 비해 약 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25%, 또는 약 5% 내지 10%, 10% 내지 20% 또는 20% 내지 30% 이하만큼 감소된 경우, ActRII 억제제의 투여를 반복하는 단계를 포함하는, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 스크러로스틴의 양이 ActRII 억제제의 투여 후 감소되지 않는 경우, 투여되는 ActRII 억제제의 용량을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 스크러로스틴의 양이 ActRII 억제제의 투여 후 감소되지 않는 경우, 투여되는 ActRII 억제제의 투여 빈도를 증가시킬 수 있다.

[0040] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 18세 미만의 대상체이다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 13세 미만의 대상체이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 12세 미만, 11세 미만, 10세 미만, 9세 미만, 8세 미만, 7세 미만, 6세 미만 또는 5세 미만의 대상체이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 1세 내지 3세, 3세 내지 5세, 5세 내지 7세, 7세 내지 9세, 9세 내지 11세, 11세 내지 13세, 13세 내지 15세, 15세 내지 20세, 20세 내지 25세, 25세 내지 30세, 또는 30세 초과 대상체이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 30세 내지 35세, 35세 내지 40세, 40세 내지 45세, 45세 내지 50세, 50세 내지 55세, 55세 내지 60세 또는 60세 초과 대상체이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 60세 내지 65세, 65세 내지 70세, 70세 내지 75세, 75세 내지 80세 또는 80세 초과 대상체이다.

[0041] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 말기 신장 질환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 혈관 석회화를 앓고 있는 대상체는 투석을 받는다.

[0042] 일부 실시양태에서, 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화의 치료 또는 예방 효과는 당업자에게 공지되어 있는 하나 이상의 분석을 이용함으로써 평가된다. 예시적인 분석은 1.3(a)(iv) 단락에 기재되어 있다. 이러한 실시양태들에 따라, 당업자는 본원에 기재된 ActRII 억제제로 치료되는 대상체가 상기 분석의 결과에 근거하여 조절된 그의 치료 요법을 받을 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들면, 칼슘, 예를 들면, 혈관 칼슘(예를 들면, 동맥 칼슘) 수준의 증가를 나타내는, 본원에 기재된 방법에 의해 치료되는 대상체는 증가된 용량의 ActRII 억제제를 투여받을 수 있거나, ActRII 억제제를 보다 빈번하게 투여받을 수 있다(즉, 용량 투여 사이의 시간이 감소될 수 있다). 대조적으로, 칼슘, 예를 들면, 혈관 칼슘(예를 들면, 동맥 칼슘) 수준의 감소를 나타내는, 본원

에 기재된 방법에 의해 치료되는 대상체는 감소된 용량의 ActRII 억제제를 투여받을 수 있거나, 보다 덜 빈번하게 ActRII 억제제를 투여받을 수 있다(즉, 용량 투여 사이의 시간이 증가될 수 있다).

[0043] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법들은 하기 증상들 중 하나 이상의 증상을 개선한다: 고인산혈증, (인의 증가로 인한) 이차 부갑상선항진증, 및 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화. 이들 증상들의 정도를 측정하기 위해 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법을 본원에서 제공된 방법과 함께 이용할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 혈관 석회화의 하나 이상의 증상을 개선한다. 예시적인 증상은 혈관(예를 들면, 동맥) 칼슘 수준의 증가, 혈관 평활근세포의 증가된 아포토시스, 동맥 탄성의 손실, PWV(맥파 속도)의 증가, 좌심실 비대증의 발생, 관상 동맥 관류의 감소 및 심근 허혈증을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0044] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 대상체에서 혈관 칼슘, 예를 들면, 동맥 칼슘 수준을 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이상만큼 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 대상체에서 혈관 칼슘, 예를 들면, 동맥 칼슘 수준을 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%만큼 감소시킨다.

[0045] 구체적인 실시양태에서, 본원은 (i) 혈관 칼슘 수준의 감소가 필요한 대상체(예를 들면, 한 형태의 CKD-MBD 및/또는 골의 석회화, 예를 들면, 혈관 석회화를 갖는 대상체에게) ActRII 억제제를 투여하는 단계; (ii) ActRII 억제제의 투여 후 상기 대상체의 조직 샘플(예를 들면, 혈청)에서 혈관 칼슘의 양을 측정하는 단계; 및 (iii) 상기 조직 샘플에서 혈관 칼슘의 양이 ActRII 억제제의 투여 전 상기 대상체의 동일한 조직 샘플(예를 들면, 동일한 개체의 상이한 혈청 샘플)에서 측정된 혈관 칼슘의 양에 비해 약 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25%, 또는 약 5% 내지 10%, 10% 내지 20% 또는 20% 내지 30% 이하만큼 감소되는 경우, ActRII 억제제의 투여를 반복하는 단계를 포함하는, 대상체에서 혈관 칼슘 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 혈관 칼슘의 양이 ActRII 억제제의 투여 후 감소되지 않는 경우, 투여되는 ActRII 억제제의 용량을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 혈관 칼슘의 양이 ActRII 억제제의 투여 후 감소되지 않는 경우, 투여되는 ActRII 억제제의 투여 빈도를 증가시킬 수 있다.

[0046] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 혈관 석회화를 갖거나 발생시킬 위험을 갖는 대상체의 아갓스톤(Agastston) 점수의 진행을 감소시킨다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 혈관 석회화를 갖거나 발생시킬 위험을 갖는 대상체의 아갓스톤 점수를 본원에 기재된 방법에 따른 ActRII 억제제의 투여 전 상기 대상체의 아갓스톤 점수에 비해 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 또는 30% 초과 수준만큼 감소시킨다(예를 들면, 1.3(a)(iv) 단락 참조). 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 혈관 석회화를 갖거나 발생시킬 위험을 갖는 대상체의 아갓스톤 점수를 본원에 기재된 방법에 따른 ActRII 억제제의 투여 전 상기 대상체의 아갓스톤 점수에 비해 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%만큼 감소시킨다(예를 들면, 1.3(a)(iv) 단락 참조).

[0047] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 대상체의 혈관구조에서 칼슘 수준의 감소, 예를 들면, 대상체, 예를 들면, 혈관 석회화를 갖거나 발생시킬 위험을 갖는 대상체의 하나 이상의 동맥에서 칼슘 수준의 감소를 야기한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 대상체의 혈관구조에서 인 수준의 감소, 예를 들면, 대상체, 예를 들면, 혈관 석회화를 갖거나 발생시킬 위험을 갖는 대상체의 하나 이상의 동맥에서 인 수준의 감소를 야기한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 본원은 낮은 교체 골 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 낮은 골 교체는 하기 1.3(a) 단락에 기재된 검사를 이용함으로써 진단될 수 있다. 골 교체의 생화학적 마커는 혈청 또는 소변 콜라겐 가교연결(N-텔로펩티드 또는 C-텔로펩티드), 골 특이적 알칼리성 포스파타제, 혈청 오스테오칼신 및/또는 전구펩티드 1형 콜라겐, 25-하이드록시비타민 D 및 부갑상선 호르몬("PTH")을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 낮은 교체 골 장애는 무력성 골 장애이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법으로 치료될 환자는 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 이상의 골 교체 감소를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법으로 치료될 환자는 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 이하의 골 교체 감소를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법으로 치료될 환자는 10% 내지 25%, 20% 내지 35%, 30% 내지 45%, 40% 내지 55%, 50% 내지 65%, 60% 내지 75%, 70% 내지 85%, 80% 내지 95%, 또는 90% 내지 100%의 골 교체 감소를 갖는다. 일부 실시양태에서, 골 교체 감소는 동일한 환자의 병력 데이터와 비교된다. 다른 실시양태에서, 골 교체 감소는 골 장애를 갖지 않는 집단의 평균 골 교체와 비교된다. 골 장애를 갖지 않는 집단은 환자와 동일한 연령 및/또는 동일한 성별을 갖는 집단일 수 있다.

[0049] 구체적 실시양태에서, 본원은 (i) 낮은 교체 골 장애를 갖는 대상체에게 ActRII 억제제를 투여하는 단계; (ii) (예를 들면, 하기 1.3(a) 단락에 기재된 검사들 중 하나 이상의 검사를 이용하고/하거나 골 교체의 하나 이상의 생화학적 마커를 측정함으로써) ActRII 억제제의 투여 후 상기 대상체에서 골 교체 수준을 측정하는 단계; 및 (iii) 대상체의 골 교체 수준이 ActRII 억제제의 투여 전 상기 대상체의 골 교체 수준에 비해 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25%, 또는 약 5% 내지 10%, 10% 내지 20% 또는 20% 내지 30% 이하만큼 감소된 경우, ActRII 억제제의 투여를 반복하는 단계를 포함하는, 낮은 교체 골 장애, 예를 들면, 무력성 골 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 골 교체 수준이 ActRII 억제제의 투여 후 감소되지 않는 경우, 투여되는 ActRII 억제제의 용량을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 골 교체 수준이 ActRII 억제제의 투여 후 감소되지 않는 경우, 투여되는 ActRII 억제제의 투여 빈도를 증가시킬 수 있다.

[0050] 1.2 ActRII 억제제

[0051] (a) ActRIIA 억제제

[0052] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "ActRIIA"는 임의의 종으로부터 유래된 액티빈 수용체 IIa형(ActRIIA) 단백질의 패밀리, 및 돌연변이유발 또는 다른 변경에 의해 이러한 ActRIIA 단백질로부터 유도된 변이체를 지칭한다. 본원에서 ActRIIA의 언급은 현재 확인된 형태들 중 어느 한 형태를 언급하는 것으로서 이해된다. ActRIIA 패밀리의 구성원은 일반적으로 시스테인 풍부 영역을 갖는 리간드 결합 세포외 도메인, 경막 도메인, 및 예상된 세린/쓰레오닌 키나제 활성을 갖는 세포질 도메인으로 구성된 경막 단백질이다.

[0053] 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 액티빈 결합 가용성 ActRIIA 폴리펩티드; 액티빈 (특히, βA 또는 βB 로서도 지칭되는 액티빈 A 또는 B 서브유닛)에 결합하고 ActRIIA 결합을 파괴하는 항체; ActRIIA에 결합하고 액티빈 결합을 파괴하는 항체; 액티빈 또는 ActRIIA 결합에 대해 선택된 비-항체 단백질(예를 들면, 국제 특허출원 공개 제W02002/088171호, 제W02006/055689호, 제W02002/032925호 및 제W02005/037989호, 및 미국 특허출원 공개 제2003/0133939호 및 제2005/0238646호(이들 각각은 예를 들면, 이러한 단백질들, 및 이들의 디자인 및 선택 방법에 대하여 전체로서 본원에 도입됨); 및 Fc 도메인에 접합될 수 있는, 액티빈 또는 ActRIIA 결합에 대해 선택된 무작위화된 펩티드를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0054] 일부 실시양태에서, 액티빈 또는 ActRIIA 결합 활성을 갖는 2개 이상의 상이한 단백질들(또는 다른 모이어티들), 각각 I형(예를 들면, 가용성 I형 액티빈 수용체) 및 II형(예를 들면, 가용성 II형 액티빈 수용체) 결합 부위를 차단하는 액티빈 결합체는 함께 연결되어 ActRIIA를 억제하는 이기능성 또는 다기능성 결합 분자를 생성할 수 있으므로, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, ActRIIA를 억제하는 액티빈-ActRIIA 신호전달 축 길항제는 핵산 앵타머(aptamer) 및 소분자를 포함하고, 다른 물질들도 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용된다.

[0055] (i) ActRIIA 폴리펩티드를 포함하는 ActRIIA 억제제

[0056] 용어 "ActRIIA 폴리펩티드"는 ActRIIA 패밀리 구성원의 임의의 천연 폴리펩티드뿐만 아니라, 유용한 활성을 보유하는 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체 및 펩티도미메틱 형태를 포함함)도 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드는 ActRIIA 폴리펩티드의 서열과 약 80% 이상 동일한, 임의적으로 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 서열을 갖는 임의의 공지된 ActRIIA의 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드는 ActRIIA 단백질 및/또는 액티빈에 결합하여 이의 기능을 억제할 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드는 골 성장 및 골 미네랄화를 촉진하는 그의 능력에 대해 선택될 수 있다. ActRIIA 폴리펩티드의 예에는 인간 ActRIIA 전구체 폴리펩티드(서열번호 1) 및 가용성 인간 ActRIIA 폴리펩티드(예를 들면, 서열번호 2, 3, 7 및 12)가 포함된다. 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 ActRIIA 전구체 폴리펩티드에 대하여, 인간 ActRIIA 전구체 폴리펩티드의 신호 펩티드는 아미노산 위치 1-20에 위치하고, 세포외 도메인은 아미노산 위치 21-135에 위치하고, 인간 ActRIIA 전구체 폴리펩티드(서열번호 1)의 N-연결된 글리코실화 부위는 서열번호 1의 아미노산 위치 43-56에 위치한다. 서열번호 1의 인간 ActRIIB 전구체 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 4(진뱅크(Genbank) 엔트리 NM_001616의 뉴클레오타이드 164-1705)로서 개시되어 있다. 서열번호 2의 가용성 인간 ActRIIA 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 5로서 개시되어 있다. 상기 서열들의 설명에 대해서는 표 6을 참조한다.

[0057] 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 폴리펩티드는 가용성 ActRIIA 폴리펩티드이다. ActRIIA 단백질의 세포외 도메인은 액티빈에 결합할 수 있고 일반적으로 가용성을 가지므로, 가용성 액티빈 결합 ActRIIA 폴리펩티드로서 지칭될 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "가용성

ActRIIA 폴리펩티드"는 일반적으로 ActRIIA 단백질의 임의의 천연 세포의 도메인을 비롯한 ActRIIA 단백질의 세포의 도메인뿐만 아니라 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편 및 펩티도미메틱 형태를 포함함)도 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 가용성 ActRIIA 폴리펩티드는 액티빈에 결합할 수 있으나, 야생형 ActRIIA 단백질은 GDF8/11과의 결합에 비해 액티빈과의 결합에서 유의한 선택성을 나타내지 않는다. 천연 또는 변형된 ActRIIA 단백질을 제2 액티빈 선택적 결합제와 커플링시킴으로써 액티빈에 대한 특이성이 추가된 천연 또는 변형된 ActRIIA 단백질을 제공할 수 있다. 가용성 액티빈 결합 ActRIIA 폴리펩티드의 예에는 서열번호 2, 3, 7, 12 및 13에 예시된 가용성 폴리펩티드가 포함된다. 가용성 액티빈 결합 ActRIIA 폴리펩티드의 다른 예에는 ActRIIA 단백질의 세포의 도메인 이외에 신호 서열, 예를 들면, 꿀벌 멜리틴(mellitin) 리더 서열(서열번호 8), 조직 플라즈미노겐 활성화제(TPA) 리더(서열번호 9) 또는 천연 ActRIIA 리더(서열번호 10)가 포함된다. 서열번호 13에 예시된 ActRIIA-hFc 폴리펩티드는 TPA 리더를 사용한다.

[0058] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 항체의 Fc 부분에 연결된 ActRIIA의 액티빈 결합 도메인을 포함하는 접합체/융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 액티빈 결합 도메인은 연결체, 예를 들면, 펩티드 연결체를 통해 항체의 Fc 부분에 연결된다. 임의적으로, Fc 도메인은 잔기, 예컨대, Asp-265, Lys-322 및 Asn-434에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 일부 경우, 이들 돌연변이들 중 하나 이상의 돌연변이(예를 들면, Asp-265 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인에 비해 감소된 Fc γ 수용체 결합 능력을 갖는다. 다른 경우, 이들 돌연변이들 중 하나 이상의 돌연변이(예를 들면, Asn-434 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 MHC 클래스 I 관련 Fc 수용체(FcRN) 결합 능력을 갖는다. Fc 도메인에 융합된 ActRIIA 가용성 세포의 도메인을 포함하는 예시적인 융합 단백질은 서열번호 6, 7, 12 및 13에 기재되어 있다.

[0059] 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 항체의 Fc 부분에 연결된 ActRIIA 세포의 도메인 또는 이의 부분을 포함하고, 이때 상기 ActRIIA 억제제는 서열번호 6, 7, 12 및 13으로부터 선택된 아미노산 서열과 75% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 항체의 Fc 부분에 연결된 ActRIIA 세포의 도메인 또는 이의 부분을 포함하고, 이때 상기 ActRIIA 억제제는 서열번호 6, 7, 12 및 13으로부터 선택된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 절두된 형태의 ActRIIA 세포의 도메인을 포함한다. 절두는 ActRIIA 폴리펩티드의 카복시-말단 및/또는 아미노-말단에서의 절두일 수 있다. 일부 실시양태에서, 절두는 성숙 ActRIIB 폴리펩티드 세포의 도메인에 비해 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 아미노산만큼 길 수 있다. 일부 실시양태에서, 절두는 성숙 ActRIIA 폴리펩티드 세포의 도메인의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 N-말단 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 절두는 성숙 ActRIIA 폴리펩티드 세포의 도메인의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 C-말단 아미노산일 수 있다. 예를 들면, 절두된 형태의 ActRIIA는 아미노산 20-119; 20-128; 20-129; 20-130; 20-131; 20-132; 20-133; 20-134; 20-131; 21-131; 22-131; 23-131; 24-131; 및 25-131을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 이때 아미노산 위치는 서열번호 1에서의 아미노산 위치를 지칭한다.

[0061] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 ActRIIA 세포의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 아미노산 치환도 보유하는 절두된 형태의 ActRIIA 세포의 도메인을 포함한다.

[0062] 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 인간 ActRIIA 수용체의 세포의 도메인과 IgG1의 Fc 부분의 융합 단백질이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 인간 ActRIIA 수용체의 절두된 세포의 도메인과 IgG1의 Fc 부분의 융합 단백질이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 인간 ActRIIA 수용체의 절두된 세포의 도메인과 IgG1의 Fc 부분의 융합 단백질이고, 이때 상기 인간 ActRIIA 수용체의 절두된 세포의 도메인은 하나 이상의 아미노산 치환을 보유한다.

[0063] ActRIIA 폴리펩티드의 기능성 활성 단편은 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드를 코당하는 핵산의 상응하는 단편으로부터 재조합적으로 제조된 폴리펩티드를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 또한, 단편은 당분야에서 공지되

어 있는 기법, 예컨대, 통상적인 메리필드(Merrifield) 고체상 f-Moc 또는 t-Boc 화학반응을 이용함으로써 화학적으로 합성될 수 있다. 단편을 (재조합적으로 또는 화학적 합성으로) 제조하고 시험하여, ActRIIA 단백질 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항제(억제제)로서 작용할 수 있는 펩티드 단편을 확인할 수 있다.

[0064]

추가로, ActRIIA 폴리펩티드의 기능성 활성 변이체는 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드를 코딩하는 상응하는 돌연변이된 핵산으로부터 재조합적으로 제조된 변경된 폴리펩티드들의 라이브러리를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 상기 변이체를 제조하고 시험하여, ActRIIA 단백질 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항제(억제제)로서 작용할 수 있는 변이체를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, ActRIIA 폴리펩티드의 기능성 변이체는 서열번호 2 및 3으로부터 선택된 아미노산 서열과 75% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우, 상기 기능성 변이체는 서열번호 2 및 3으로부터 선택된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0065]

기능성 변이체는 예를 들면, 치료 효능 또는 안정성(예를 들면, 생체의 저장 수명 및 생체내 단백질용해성 분해에 대한 내성)의 향상과 같은 목적을 위해 ActRIIA 폴리펩티드의 구조를 변경시킴으로써 생성될 수 있다. 이러한 변경된 ActRIIA 폴리펩티드는 액티빈 결합을 보유하도록 선택될 때 천연 ActRIIA 폴리펩티드의 기능성 균등물로서 간주될 수 있다. 변경된 ActRIIA 폴리펩티드는 예를 들면, 아미노산 치환, 결실 또는 추가에 의해 제조될 수도 있다. 예를 들면, 이소류신 또는 발린에 의한 류신의 단리된 치환, 글루타메이트에 의한 아스파르테이트의 단리된 치환, 세린에 의한 스레오닌의 단리된 치환, 또는 구조적으로 관련된 아미노산에 의한 아미노산의 유사한 치환(예를 들면, 보존적 돌연변이)이 생성된 분자의 생물학적 활성에 현저한 영향을 미치지 않을 것임을 예상하는 것은 타당하다. 보존적 치환은 측쇄에서 관련되어 있는 아미노산들의 패밀리 내에서 일어나는 치환이다. ActRIIA 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화가 기능성 상동체를 발생시키지는 야생형 ActRIIA 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포에서 반응을 생성하는 변이체 ActRIIA 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 확인될 수 있다.

[0066]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 억제제는 ActRIIA 폴리펩티드의 글리코실화를 변경시킬 수 있는 하나 이상의 특정 돌연변이를 갖는 ActRIIA 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 하나 이상의 글리코실화 부위, 예컨대, O-연결된 또는 N-연결된 글리코실화 부위를 도입할 수 있거나 제거할 수 있다. 아스파라긴-연결된 글리코실화 인식 부위는 일반적으로 적절한 세포 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트라이펩티드 서열인 아스파라긴-X-스레오닌(또는 아스파라긴-X-세린)(이때, "X"는 임의의 아미노산임)을 포함한다. 상기 변경은 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우) 야생형 ActRIIA 폴리펩티드의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 스레오닌 잔기의 추가 또는 치환에 의해 만들어질 수도 있다. 글리코실화 인식 부위의 제1 아미노산 위치 및 제3 아미노산 위치 중 하나 또는 둘다에서의 다양한 아미노산 치환 또는 결실(및/또는 제2 위치에서의 아미노산 결실)은 변경된 트라이펩티드 서열에서 비-글리코실화를 야기한다. ActRIIA 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또 다른 수단은 글리코사이드와 ActRIIA 폴리펩티드의 화학적 또는 효소적 커플링이다. 이용되는 커플링 방식에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 자유 카복실 기; (c) 자유 설프하이드릴 기, 예컨대, 시스테인의 자유 설프하이드릴 기; (d) 자유 하이드록실 기, 예컨대, 세린, 스레오닌 또는 하이드록시프로린의 자유 하이드록실 기; (e) 방향족 잔기, 예컨대, 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판; 또는 (f) 글루타민의 아마이드 기에 부착될 수 있다. 이들 방법들은 1987년 9월 11일자로 공개된 국제 특허출원 공개 제W087/05330호 및 문헌(Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306)(본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있다. ActRIIA 폴리펩티드 상에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드를 화합물 트라이플루오로메탄설폰산 또는 균등한 화합물에 노출시키는 단계를 포함할 수 있다. 이 처리는 아미노산 서열을 온전한 상태로 남기면서 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 거의 또는 모든 당들의 절단을 야기한다. 화학적 탈글리코실화는 문헌(Hakimuddin et al., (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52) 및 문헌(Edge et al., (1981) Anal. Biochem. 118:131)에 더 기재되어 있다. ActRIIA 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 문헌(Thotakura et al., (1987) Meth. Enzymol. 138:350)에 기재된 바와 같이 다양한 엔도글리코시다제 및 엑소글리코시다제의 사용에 의해 달성될 수 있다. 포유동물, 효모, 곤충 및 식물 세포가 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴을 모두 도입할 수 있기 때문에, ActRIIA 폴리펩티드의 서열은 사용되는 발현 시스템의 종류에 따라 적절하게 조절될 수 있다. 일반적으로, 인간에서 사용될 ActRIIA 단백질은 적절한 글리코실화를 제공하는 포유동물 세포주, 예컨대, HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현될 수 있지만, 다른 발현 시스템, 예컨대, 다른 포유동물 발현 세포주, 조작된 글리코실화 효소를 갖는 효모 세포주 및 곤충 세포주도 유용할 것으로 예

상된다.

- [0067] 추가로, 본원은 돌연변이체, 특히 ActRIIA 폴리펩티드의 조합 돌연변이체 세트뿐만 아니라 절두 돌연변이체도 발생시키는 방법을 제공하고, 이때 조합 돌연변이체들의 풀은 기능성 변이체 서열의 확인에 특히 유용하다. 이러한 조합 라이브러리를 스크리닝하는 목적은 예를 들면, 작용제 또는 길항제로서 작용할 수 있거나, 대안적으로 모두 함께 신규 활성을 보유하는 ActRIIA 폴리펩티드 변이체들을 발생시키는 것일 수 있다. 다양한 스크리닝 분석들이 하기 제공되어 있고, 이러한 분석들은 변이체를 평가하는 데에 이용될 수 있다. 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드 변이체는 ActRIIA 리간드에 결합하는 능력, ActRIIA 리간드와 ActRIIA 폴리펩티드의 결합을 방해하는 능력, 또는 ActRIIA 리간드에 의해 야기된 신호전달을 방해하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0068] 천연 ActRIIA 폴리펩티드에 비해 선택적 또는 일반적으로 증가된 효능을 갖는 조합적으로 유도된 변이체를 발생시킬 수 있다. 마찬가지로, 돌연변이유발은 상응하는 야생형 ActRIIA 폴리펩티드와 현저히 상이한 세포내 반감기를 갖는 변이체를 발생시킬 수 있다. 예를 들면, 변경된 단백질은 천연 ActRIIA 폴리펩티드의 파괴 또는 다른 방식의 불활성화를 초래하는 단백질용해성 분해 또는 다른 세포 과정에 대한 보다 더 높은 안정성 또는 더 낮은 안정성을 갖게 될 수 있다. 이러한 변이체들, 및 이들을 코딩하는 유전자들은 ActRIIA 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 ActRIIA 폴리펩티드 수준을 변경시키는 데에 사용될 수 있다. 예를 들면, 짧은 반감기는 보다 일시적인 생물학적 효과를 발생시킬 수 있고, 환자 내에서 재조합 ActRIIA 폴리펩티드 수준의 엄격한 조절을 가능하게 할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 이 단백질의 반감기를 변경시키기 위해 (존재하는 경우) 연결제 및/또는 Fc 부분에서 돌연변이를 만들 수 있다.
- [0069] 조합 라이브러리는 잠재적 ActRIIA 폴리펩티드 서열의 적어도 부분을 각각 포함하는 폴리펩티드 라이브러리를 코딩하는 축퇴 유전자 라이브러리에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 잠재적 ActRIIA 폴리펩티드 뉴클레오타이드 서열의 축퇴 세트가 개별 폴리펩티드로서, 또는 대안적으로 (예를 들면, 파지 라이브러리의 경우) 보다 큰 융합 단백질 세트로서 발현될 수 있도록 효소를 사용하여 합성 올리고뉴클레오타이드들의 혼합물을 유전자 서열 내로 라이게이션시킬 수 있다.
- [0070] 축퇴 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 잠재적 상동체 라이브러리를 발생시킬 수 있는 많은 방법들이 존재한다. 축퇴 유전자 서열의 화학적 합성을 자동 DNA 합성기에서 수행할 수 있고, 그 다음 합성 유전자를 적절한 발현용 벡터 내로 라이게이션시킬 수 있다. 축퇴 올리고뉴클레오타이드의 합성은 당분야에서 잘 공지되어 있다(예를 들면, 문헌(Narang, S A (1983) Tetrahedron 39:3); 문헌(Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289); 문헌(Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323); 문헌(Itakura et al., (1984) Science 198:1056); 및 문헌(Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477) 참조). 이러한 기법은 다른 단백질의 유도된 진화에서 이용되어 왔다(예를 들면, 문헌(Scott et al., (1990) Science 249:386-390); 문헌(Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433); 문헌(Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406); 문헌(Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382)뿐만 아니라; 미국 특허 제5,223,409호, 제5,198,346호 및 제5,096,815호 또한 참조).
- [0071] 대안적으로, 다른 형태의 돌연변이유발을 이용하여 조합 라이브러리를 발생시킬 수 있다. 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드 변이체는 예를 들면, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 등(Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; and Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085); 연결제 스캐닝 돌연변이유발(Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); 포화 돌연변이유발(Meyers et al., (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이유발(Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 또는 화학적 돌연변이유발 등을 비롯한 무작위 돌연변이유발(Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; and Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)을 이용한 스크리닝에 의해 발생될 수 있고 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 특히 조합 셋팅에서 연결제 스캐닝 돌연변이유발은 절두된 (생체활성) 형태의 ActRIIA 폴리펩티드를 확인하는 흥미로운 방법이다.
- [0072] 점 돌연변이 및 절두에 의해 만들어진 조합 라이브러리의 유전자 생성물을 스크리닝하고 특정 성질을 갖는 유전자 생성물에 대해 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 매우 다양한 기법들이 당분야에서 공지되어 있다. 이러한 기법들은 ActRIIA 폴리펩티드의 조합 돌연변이유발에 의해 발생된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝을 위해

일반적으로 채택될 것이다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위해 가장 널리 이용되는 기법은 전형적으로 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 적절한 세포를 생성된 벡터 라이브러리로 형질전환시키는 단계, 및 원하는 활성의 검출이 검출된 생성물에 대한 유전자를 코딩하는 벡터의 상대적으로 용이한 단리를 용이하게 하는 조건 하에 조합 유전자를 발현하는 단계를 포함한다. 바람직한 분석은 액티빈 결합 분석 및 액티빈 매개 세포 신호전달 분석을 포함한다.

[0073] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물의 억제제로 사용되는 ActRIIA 폴리펩티드는 ActRIIA 폴리펩티드에 천연적으로 존재하는 임의의 번역 후 변경 이외의 번역 후 변경을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 변경은 아세틸화, 카복실화, 글리코실화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 결과적으로, 변경된 ActRIIA 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 폴리사카라이드 또는 모노사카라이드, 및 포스페이트를 함유할 수 있다. ActRIIA 폴리펩티드의 기능성에 대한 이러한 비-아미노산 요소의 효과는 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 시험될 수 있다. ActRIIA 폴리펩티드가 신생 형태의 ActRIIA 폴리펩티드의 절단에 의해 세포에서 생성될 때, 번역 후 프로세싱은 단백질의 정확한 폴딩 및/또는 기능에 중요할 수도 있다. 상이한 세포들(예컨대, CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 또는 HEK293)은 이러한 번역 후 활성을 위한 특정 세포 기구 및 특징적인 기작을 갖고, ActRIIA 폴리펩티드의 정확한 변경 및 프로세싱을 보장하도록 선택될 수 있다.

[0074] 일부 양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물의 억제제로 사용되는 ActRIIA 폴리펩티드의 기능성 변이체 또는 변경된 형태는 ActRIIA 폴리펩티드의 적어도 부분 및 하나 이상의 융합 도메인을 갖는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 융합 도메인의 잘 공지된 예에는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S 트랜스퍼라제(GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 원하는 성질을 부여하도록 융합 도메인을 선택할 수 있다. 예를 들면, 일부 융합 도메인들은 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리에 특히 유용하다. 친화성 정제를 목적으로, 친화성 크로마토그래피에 적절한 매트릭스, 예컨대, 글루타티온-접합된 수지, 아밀라제-접합된 수지, 및 니켈-접합된 또는 코발트-접합된 수지가 사용된다. 이러한 매트릭스들 대다수가 "키트" 형태로 입수될 수 있다(예컨대, (HIS6) 융합 파트너와 함께 유용한 파마샤(Pharmacia) GST 정제 시스템 및 쿼익스프레스(QIAexpress)TM 시스템(쿼젠(Qiagen))). 또 다른 예로서, ActRIIA 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 융합 도메인을 선택할 수 있다. 이러한 검출 도메인의 예에는 다양한 형광 단백질들(예를 들면, GFP)뿐만 아니라, 통상적으로 특이적 항체가 입수될 수 있는 짧은 펩티드 서열인 "에피토프 태그"도 포함된다. 특이적 단일클론 항체가 용이하게 입수될 수 있는 잘 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA) 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우, 융합 도메인은 적절한 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 분해하여 그로부터 제조할 단백질을 유리시킬 수 있게 하는 프로테아제 절단 부위, 예컨대, 인자 Xa 또는 트롬빈에 대한 절단 부위를 갖는다. 그 다음, 유리된 단백질을 후속 크로마토그래피 분리로 융합 도메인으로부터 단리할 수 있다. 일부 바람직한 실시양태에서, ActRIIA 폴리펩티드는 생체내에서 ActRIIA 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인("안정화제" 도메인)과 융합된다. "안정화"는 혈청 반감기의 증가가 감소된 파괴에 기인하는지, 신장에 의한 제거의 감소에 기인하는지, 아니면 다른 약동학적 효과에 기인하는지 관계없이 혈청 반감기를 증가시키는 것을 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 매우 다양한 단백질들에게 바람직한 약동학적 성질을 부여하는 것으로 공지되어 있다. 마찬가지로, 인간 혈청 알부민과의 융합은 바람직한 성질을 부여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 종류의 융합 도메인은 다량체화(예를 들면, 이량체화 또는 사량체화) 도메인, 및 (원하는 경우 추가 생물학적 기능, 예컨대, 골 성장 또는 근육 성장의 추가 자극을 부여하는) 기능성 도메인을 포함한다.

[0075] 융합 단백질의 상이한 요소들이 원하는 기능성과 일치하는 임의의 방식으로 배열될 수 있다는 것이 이해된다. 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드가 이중 도메인의 C-말단에 위치할 수 있거나, 대안적으로 이중 도메인이 ActRIIA 폴리펩티드의 C-말단에 위치할 수 있다. ActRIIA 폴리펩티드 도메인 및 이중 도메인은 융합 단백질에서 인접하여 존재할 필요가 없고, 추가 도메인 또는 아미노산 서열이 어느 한 도메인의 C-말단 또는 N-말단에서, 또는 도메인들 사이에서 포함될 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물의 억제제로 사용되는 ActRIIA 폴리펩티드는 ActRIIA 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 이상의 변경을 함유할 수 있다. 예를 들면, 이러한 변경은 ActRIIA 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 향상시킬 수 있거나, ActRIIA 폴리펩티드의 순환 반감기를 향상시킬 수 있거나, ActRIIA 폴리펩티드의 단백질용해성 분해를 감소시킬 수 있다. 이러한 안정화 변경은 융합 단백질(예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드 및 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함함), 글리코실화 부위의 변경(예를

들면, ActRIIA 폴리펩티드에의 글리코실화 부위의 추가를 포함함), 및 탄수화물 모이어티의 변경(예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드로부터의 탄수화물 모이어티의 제거를 포함함)을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 융합 단백질의 경우, ActRIIA 폴리펩티드는 안정화제 도메인, 예컨대, IgG 분자(예를 들면, Fc 도메인)에 융합된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "안정화제 도메인"은 융합 단백질의 경우에서와 같이 융합 도메인(예를 들면, Fc)을 지칭할 뿐만 아니라, 비-단백질성 변경, 예컨대, 탄수화물 모이어티, 또는 비-단백질성 중합체, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜도 포함한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 다른 단백질로부터 단리되거나 다른 단백질을 실질적으로 갖지 않는, 단리되고/되거나 정제된 형태의 ActRIIA 폴리펩티드가 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. ActRIIA 폴리펩티드는 일반적으로 재조합 핵산으로부터의 발현에 의해 생성될 수 있다.

[0078] 일부 양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIA 폴리펩티드는 본원에 개시된 단편, 기능성 변이체 및 융합 단백질을 비롯한 임의의 ActRIIA 폴리펩티드(예를 들면, 가용성 ActRIIA 폴리펩티드)를 코딩하는 단리된 및/또는 재조합 핵산의 사용에 의해 생성된다. 예를 들면, 서열번호 4는 천연 인간 ActRIIA 전구체 폴리펩티드를 코딩하는 반면, 서열번호 5는 ActRIIA의 프로세싱된 세포외 도메인을 코딩한다. 이러한 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 이 핵산은 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드의 제조 방법에서 사용될 수 있거나 (예를 들면, 유전자 요법에서) 직접적인 치료제로서 사용될 수 있다.

[0079] 일부 양태에서, ActRIIA 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열번호 4 또는 5의 변이체인 핵산을 포함할 수 있다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 추가 또는 결실에 의해 상이한 서열, 예컨대, 대립형질 변이체를 포함한다.

[0080] 일부 실시양태에서, ActRIIA 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 또는 재조합 핵산 서열은 서열번호 4 또는 5와 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일할 수 있다. 당업자는 서열번호 4 또는 5에 상보적인 핵산 서열, 및 서열번호 4 또는 5의 변이체가 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIA 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산 서열은 단리된 핵산 서열, 재조합 핵산 서열 및/또는 이중 뉴클레오티드 서열에 융합된 핵산 서열일 수 있거나, DNA 라이브러리로부터 유래될 수 있다.

[0081] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIA 폴리펩티드의 제조에 사용되는 핵산은 고도 엄격도 조건 하에 서열번호 4 또는 5로 표시된 뉴클레오티드 서열에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 4 또는 5의 상보체 서열, 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 당업자는 DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄격도 조건이 달라질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들면, 약 45°C에서 6.0배 나트륨 클로라이드/나트륨 시트레이트(SSC)에서 혼성화를 수행한 후, 50°C에서 2.0배 SSC로 세척을 수행할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서 염 농도는 50°C의 약 2.0배 SSC의 낮은 엄격도 내지 50°C의 약 0.2배 SSC의 높은 엄격도로부터 선택될 수 있다. 추가로, 세척 단계에서 온도는 실온(약 22°C)의 낮은 엄격도 조건부터 약 65°C의 높은 엄격도 조건까지 증가될 수 있다. 온도 및 염 둘다가 달라질 수 있거나, 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있는 반면, 다른 변수가 달라질 수 있다. 한 실시양태에서, 실온에서 6배 SSC의 낮은 엄격도 조건 하에 혼성화를 수행한 후 실온에서 2배 SSC로 세척하였을 때 혼성화하는 핵산이 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다.

[0082] 유전 코드의 축퇴성으로 인해 서열번호 4 또는 5에 기재된 핵산과 상이한 단리된 핵산도 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIA 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있다. 예를 들면, 다수의 아미노산들이 1개 초과 삼염기코돈(triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 특정하는 코돈, 또는 동의 코돈(예를 들면, CAU 및 CAC는 히스티딘에 대한 동의 코돈임)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 "침묵" 돌연변이를 초래할 수 있다. 그러나, 본 단백질의 아미노산 서열의 변화를 유발하는 DNA 서열 다형성이 포유동물 세포들 사이에 존재할 것으로 예상된다. 당업자는 특정 단백질을 코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드(최대 약 3% 내지 5%의 뉴클레오티드)에서의 이들 변이가 천연 대립형질 변이로 인해 주어진 종의 개체들 사이에 존재할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0083] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 발현 구축물에서 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로 발현을 위해 사용된 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포들에 대한 다수의 종류의 적절한 발현 벡터들 및 적합한 조절 서열들이 당분야에서 공지되어 있다. 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부

위, 전사 시작 서열 및 종결 서열, 번역 시작 서열 및 종결 서열, 및 인핸서 또는 활성화제 서열을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 당분야에서 공지되어 있는 항시성 또는 유도성 프로모터가 본원에서 고려된다. 상기 프로모터는 천연 프로모터, 또는 1개 초과와 프로모터의 요소들을 겸비하는 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 구축물은 세포에서 에피솜(episome), 예컨대, 플라스미드에 존재할 수 있거나, 발현 구축물은 염색체에 삽입될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하도록 선택 마커 유전자를 함유한다. 선택 마커 유전자는 당분야에서 잘 공지되어 있고, 사용된 숙주 세포에 따라 달라질 것이다.

[0084] 일부 양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIA 폴리펩티드의 제조에 사용되는 핵산은 ActRIIA 폴리펩티드를 코딩하고 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터 내에 제공될 수 있다. 조절 서열은 당분야에서 인식되어 있고 ActRIIA 폴리펩티드의 발현을 유도하도록 선택된다. 따라서, 용어 조절 서열은 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소를 포함한다. 예시적인 조절 서열은 문헌(Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))에 기재되어 있다. 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 발현하기 위해, DNA 서열에 작동가능하게 연결되었을 때 DNA 서열의 발현을 조절하는 매우 다양한 발현 조절 서열들 중 임의의 발현 조절 서열을 이 벡터에서 사용할 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은 예를 들면, SV40의 초기 프로모터 및 후기 프로모터, tet 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터, RSV 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, 발현이 T7 RNA 중합효소에 의해 유도되는 T7 프로모터, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코트 단백질에 대한 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 해당 효소에 대한 프로모터, 산 포스포타제의 프로모터, 예를 들면, Pho5, 효모 α -교배 인자의 프로모터, 바콜로바이러스 시스템의 폴리헤드론(polyhedron) 프로모터, 원핵 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 공지되어 있는 다른 서열, 및 이들의 다양한 조합을 포함한다. 발현 벡터의 디자인이 형질전환된 숙주 세포의 선택 및/또는 발현하고자 하는 단백질의 종류와 같은 인자에 의해 좌우될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 더욱이, 벡터의 카피 수, 이 카피 수를 조절하는 능력, 및 벡터에 의해 코딩된 임의의 다른 단백질, 예컨대, 항생제 마커의 발현도 고려되어야 한다.

[0085] 클로닝된 유전자 또는 이의 부분을 원핵 세포, 진핵 세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유동물), 또는 이들 둘다에서의 발현에 적합한 벡터 내로 라이게이션시킴으로써 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIA 폴리펩티드의 제조에 사용되는 재조합 핵산을 생성할 수 있다. 재조합 ActRIIA 폴리펩티드의 생성을 위한 발현 비히클은 플라스미드 및 다른 벡터를 포함한다. 예를 들면, 적합한 벡터는 하기 종류의 플라스미드를 포함한다: 원핵 세포, 예컨대, 이. 콜라이(*E. coli*)에서의 발현을 위한 pBR322 유래의 플라스미드, pEMBL 유래의 플라스미드, pEX 유래의 플라스미드, pBTac 유래의 플라스미드 및 pUC 유래의 플라스미드.

[0086] 일부 포유동물 발현 벡터는 세균에서의 상기 벡터의 증식을 용이하게 하기 위한 원핵 서열, 및 진핵 세포에서 발현되는 하나 이상의 진핵 전사 유닛 둘다를 함유한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유래의 벡터들이 진핵 세포의 형질감염에 적합한 포유동물 발현 벡터의 예이다. 이들 벡터들 중 일부는 원핵 세포 및 진핵 세포 둘다에서의 복제 및 약물 내성 선택을 용이하게 하기 위해 세균 플라스미드, 예컨대, pBR322의 서열에 의해 변경된다. 대안적으로, 바이러스, 예컨대, 소 파필로마(papilloma) 바이러스(BPV-1) 또는 엡스테인-바(Epstein-Barr) 바이러스(pHEBo, pREP 유래 및 p205)의 유도체가 진핵 세포에서의 단백질의 일시적 발현을 위해 사용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스를 포함함) 발현 시스템의 예는 하기 유전자 요법 전달 시스템의 설명에서 발견될 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 유기체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법들이 당분야에서 잘 공지되어 있다. 원핵 세포 및 진핵 세포 둘다를 위한 다른 적합한 발현 시스템, 및 일반적인 재조합 절차에 대해서는 문헌(Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001))을 참조한다. 일부 경우, 바콜로바이러스 발현 시스템을 사용하여 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 바콜로바이러스 발현 시스템의 예에는 pVL 유래의 벡터(예컨대, pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW 유래의 벡터(예컨대, pAcUW1), 및 pBlueBac 유래의 벡터(예컨대, β -gal 함유 pBlueBac III)가 포함된다.

[0087] 벡터는 CHO 세포에서 본 ActRIIA 폴리펩티드를 생성하도록 디자인될 수 있다(예컨대, Pcmv-Script 벡터(스트라타진(Stratagene), 미국 캘리포니아주 라 줄라 소재), pcDNA4 벡터(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 및 pCI-neo 벡터(프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)). 자명할 바와 같이, 본 유전자 구축물은 배양물에서 증식된 세포에서 본 ActRIIA 폴리펩티드의 발현을 야기하는 데에, 예를 들면, 정제

를 위해 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생성하는 데에 사용될 수 있다.

[0088] 하나 이상의 본 ActRIIA 폴리펩티드에 대한 코딩 서열(예를 들면, 서열번호 4 또는 5)을 포함하는 제조용 유전자로 형질감염된 숙주 세포가 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIA 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있다. 상기 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들면, 본원에서 제공된 ActRIIA 폴리펩티드는 세균 세포, 예컨대, 이. 콜라이(*E. coli*), 곤충 세포(예를 들면, 바콜로바이러스 발현 시스템을 사용함), 효모, 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 다른 적합한 숙주 세포가 당업자에게 공지되어 있다.

[0089] 따라서, 본원은 ActRIIA 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ActRIIA 폴리펩티드의 발현이 일어날 수 있도록 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. ActRIIA 폴리펩티드는 분리될 수 있고 세포와 ActRIIA 폴리펩티드 함유 배지의 혼합물로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, ActRIIA 폴리펩티드는 세포질 또는 막 분획에서 보유될 수 있고, 세포를 회수하고 용해시킬 수 있고 단백질을 분리할 수 있다. 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에서 잘 공지되어 있다. 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동, ActRIIA 폴리펩티드의 특정 에피토프에 대한 특이적 항체를 사용한 면역친화성 정제, 및 ActRIIA 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 물질을 사용한 친화성 정제(예를 들면, 단백질 A 컬럼을 사용하여 ActRIIA-Fc 융합체를 정제할 수 있음)를 비롯한, 당분야에서 공지되어 있는 단백질 정제 기법을 이용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포 또는 이들 둘다로부터 본 ActRIIA 폴리펩티드를 분리할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, ActRIIA 폴리펩티드는 그의 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다. 한 실시양태에서, 정제는 예를 들면, 하기 크로마토그래피들 중 3종 이상의 크로마토그래피들을 임의의 순서로 포함하는 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계들에 의해 달성된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로스 크로마토그래피, 페닐 세파로스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과 및 완충제 교환으로 완결될 수 있다. 본원에서 입증된 바와 같이, ActRIIA-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정될 때 98% 초과 순도로 정제되었고 SDS-PAGE에 의해 측정될 때 95% 초과 순도로 정제되었다. 이 순도 수준은 마우스에서 골에 대한 바람직한 효과를 달성하고 마우스, 래트 및 비-인간 영장류에서 허용가능한 안전성 프로파일을 달성하는 데에 충분하였다.

[0090] 또 다른 실시양태에서, 제조용 ActRIIA 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에서 정제 리더 서열, 예컨대, 폴리-(His)/엔테로키나제 절단 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni^{2+} 금속 수지를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 가능하게 할 수 있다. 그 다음, 상기 정제 리더 서열을 엔테로키나제로 처리하여 후속적으로 제거함으로써 정제된 ActRIIA 폴리펩티드를 제공할 수 있다(예를 들면, 문헌(Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177); 및 문헌(Janknecht et al., PNAS USA 88:8972) 참조).

[0091] 융합 유전자의 제조 기법은 잘 공지되어 있다. 본질적으로, 라이게이션을 위한 블런트(blunt)-말단 또는 스테거(stagger)-말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한효소 분해, 적절한 경우 코헤시브(cohesive) 말단의 충전, 바람직하지 않은 연결을 피하기 위한 알칼리성 포스포타제 처리 및 효소적 라이게이션을 이용하는 통상적인 기법에 따라 상이한 폴리펩티드 서열들을 코딩하는 다양한 DNA 단편들의 연결을 수행한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 유전자는 자동 DNA 합성기를 포함하는 통상적인 기법에 의해 합성될 수 있다. 대안적으로, 추후에 어닐링되어 키메라 유전자 서열을 발생시킬 수 있는 2개의 연속 유전자 단편들 사이에 상보적인 오버행(overhang)을 발생시키는 앵커 프라이머를 사용하여 유전자 단편의 PCR 증폭을 수행할 수 있다(예를 들면, 문헌(Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992) 참조).

[0092] 서열번호 9의 조직 플라스미노겐 리더 서열을 사용하여 안정하게 형질감염된 CHO-DUKX B1 1 세포에서 pAID4 벡터(SV40 ori/인핸서, CMV 프로모터)로부터 ActRIIA-Fc 융합 단백질을 발현할 수 있다. Fc 부분은 서열번호 7로 제시된 인간 IgG1 Fc 서열이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 발현 시 ActRIIA-Fc 융합 단백질 분자 당 평균 약 1.5 내지 2.5 몰의 시알산을 갖는다.

[0093] 일부 실시양태에서, ActRIIA-Fc 융합체의 긴 혈청 반감기는 인간 환자에서 25일 내지 32일일 수 있다. 추가로, CHO 세포에서 발현된 물질은 인간 293 세포에서 발현된 ActRIIA-hFc 융합 단백질에 대해 보고된 친화성보다 더 높은 액티빈 B 리간드에 대한 친화성을 가질 수 있다(del Re et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17; 279(51):53126-35). 추가로, 이론에 의해 구속받고자 하지 않지만, TPA 리더 서열의 사용은 다른 리더 서열보다 더 많은 생성을 제공하였고, 천연 리더로 발현된 ActRIIA-Fc와 달리 고도로 순수한 N-말단 서열을 제공할 수 있다. 천연 리더 서열의 사용은 상이한 N-말단 서열을 각각 갖는 ActRIIA-Fc의 2개 주요 종들을 발생시킬 수

있다.

[0094] (b) ActRIIB 억제제

[0095] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "ActRIIB"는 임의의 종으로부터 유래된 액티빈 수용체 IIB형(ActRIIB) 단백질의 패밀리, 및 돌연변이유발 또는 다른 변경에 의해 이러한 ActRIIB 단백질로부터 유도된 변이체를 지칭한다. 본원에서 ActRIIB의 언급은 상기 수용체의 현재 확인된 형태들 중 어느 한 형태의 언급인 것으로 이해된다. ActRIIB 패밀리의 구성원은 일반적으로 시스테인 풍부 영역을 갖는 리간드 결합 세포의 도메인, 경막 도메인, 및 예상된 세린/쓰레오닌 키나제 활성을 갖는 세포질 도메인으로 구성된 경막 단백질이다.

[0096] 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 액티빈 결합 가용성 ActRIIB 폴리펩티드; 액티빈 (특히, βA 또는 βB 로서도 지칭되는 액티빈 A 또는 B 서브유닛)에 결합하고 ActRIIB 결합을 파괴하는 항체; ActRIIB에 결합하고 액티빈 결합을 파괴하는 항체; 액티빈 또는 ActRIIB 결합에 대해 선택된 비-항체 단백질; 및 Fc 도메인에 접합될 수 있는, 액티빈 또는 ActRIIB 결합에 대해 선택된 무작위화된 펩티드를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0097] 일부 실시양태에서, 액티빈 또는 ActRIIB 결합 활성을 갖는 2종 이상의 상이한 단백질들(또는 다른 모이어티들), 특히 각각 I형 결합 부위(예를 들면, 가용성 I형 액티빈 수용체) 및 II형 결합 부위(예를 들면, 가용성 II형 액티빈 수용체)를 차단하는 액티빈 결합제들은 서로 연결되어 ActRIIB를 억제하는 이기능성 또는 다기능성 결합 분자를 생성하므로 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, ActRIIB를 억제하는 액티빈-ActRIIB 신호전달 축 길항제는 핵산 앵커 및 소분자를 포함하고, 다른 물질도 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용된다.

[0098] (i) ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 ActRIIB 억제제

[0099] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "ActRIIB 폴리펩티드"는 ActRIIB 패밀리 구성원의 임의의 천연 폴리펩티드뿐만 아니라 유용한 활성을 보유하는 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체 및 펩티도미메틱 형태를 포함함)도 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드의 서열과 약 80% 이상 동일한, 임의적으로 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 서열을 갖는 임의의 공지된 ActRIIB 수용체의 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 단백질 및/또는 액티빈에 결합하여 이의 기능을 억제할 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드의 예에는 인간 ActRIIB 전구체 폴리펩티드(서열번호 16 또는 28)가 포함된다. 서열번호 16 또는 28로서 기재된 아미노산 서열을 갖는 ActRIIB 전구체 폴리펩티드(즉, 인간 ActRIIB 전구체 폴리펩티드)에 대하여, 상기 ActRIIB 전구체 폴리펩티드의 신호 펩티드는 아미노산 1-18에 위치하고, 세포외 도메인은 아미노산 19-134에 위치하고, 잠재적 N-연결된 글리코실화 부위는 아미노산 위치 42 및 65에 위치한다. 서열번호 16의 인간 ActRIIB 전구체 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 19로서 개시되어 있다(서열번호 19는 아미노산 위치 64에 상응하는 코돈에서 알라닌을 제공하지만, 당업자는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 이용하여 아미노산 위치 64에 상응하는 코돈에서 알라닌 대신에 아르기닌을 제공하도록 서열번호 19를 용이하게 변경시킬 수 있다). 상기 서열들의 설명에 대해서는 표 6을 참조한다.

[0100] 달리 구체적으로 표시되어 있지 않은 한, 본원에 기재된 ActRIIB 관련 폴리펩티드들 전부에 대한 아미노산의 넘버링은 (위치 64에서 발현된 아미노산에서만 상이한) 서열번호 16 및 28에 대한 아미노산 넘버링에 근거한다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드가 아미노산 위치 79에서 치환/돌연변이를 갖는 것으로서 기재되어 있는 경우, 위치 79는 ActRIIB 폴리펩티드의 유도에 사용된 서열번호 16 또는 28에서 79번째 아미노산을 지칭한다는 것을 이해해야 한다. 마찬가지로, ActRIIB 폴리펩티드가 아미노산 위치 64에서 알라닌 또는 아르기닌을 갖는 것으로서 기재되어 있는 경우, 위치 64는 ActRIIB 폴리펩티드의 유도에 사용된 서열번호 16 또는 28에서 64번째 아미노산을 지칭한다는 것을 이해해야 한다.

[0101] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 ActRIIB의 액티빈 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, ActRIIB의 액티빈 결합 도메인은 ActRIIB 세포외 도메인 또는 이의 부분을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, ActRIIB 세포외 도메인 또는 이의 부분은 가용성을 갖는다. 예시적인 변경된 형태의 ActRIIB 폴리펩티드는 미국 특허출원 공개 제20090005308호 및 제20100068215호(이들의 개시내용은 전체로서 본원에 참고로 도입됨)에 개시되어 있다.

[0102] 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드이다. 용어 "가용성 ActRIIB 폴리펩티드"는 일반적으로 ActRIIB 단백질의 임의의 천연 세포외 도메인

을 비롯한 ActRIIB 단백질의 세포외 도메인뿐만 아니라 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편 및 펩티도미메틱 형태를 포함함)도 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 가용성 ActRIIB 폴리펩티드는 액티빈에 결합할 수 있으나, 야생형 ActRIIB 단백질은 GDF8/11과의 결합에 비해 액티빈과의 결합에서 유의한 선택성을 나타내지 않는다. 일부 실시양태에서, 상이한 결합 성질을 갖는 변경된 형태의 ActRIIB는 본원에서 제공된 방법에서 사용될 수 있다. 이러한 변경된 형태는 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제W02006/012627호 및 제W02010/019261호(이들의 개시내용은 전체로서 본원에 참고로 도입됨)에 개시되어 있다. 천연 또는 변경된 ActRIIB 단백질을 제2 액티빈 선택적 결합제와 커플링시킴으로써 액티빈에 대한 특이성이 추가된 천연 또는 변경된 ActRIIB 단백질을 제공할 수 있다. 예시적인 가용성 ActRIIB 폴리펩티드는 인간 ActRIIB 폴리펩티드의 세포외 도메인을 포함한다(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 및 43).

[0103] ActRIIB 전구체 아미노산 서열, 즉 서열번호 16의 아미노산 64에 상응하는 위치에서 알라닌(본원에서 "A64"로서 지칭됨)을 갖는, 문헌(Hilden et al., Blood, 1994, 83(8):2163-70)에 개시된 ActRIIB 세포외 서열을 갖는 Fc 융합 단백질은 액티빈 및 GDF-11에 대한 상대적으로 낮은 친화성을 보유한다는 것이 입증되었다. 대조적으로, ActRIIB 전구체 아미노산 서열의 위치 64에서 아르기닌(본원에서 "R64"로서 지칭됨)을 갖는 Fc 융합 단백질은 낮은 나노몰 내지 높은 피코몰 범위에서 액티빈 및 GDF-11에 대한 친화성을 갖는다(예를 들면, 미국 특허출원 공개 제20100068215호(이의 개시내용은 전체로서 본원에 도입됨) 참조). 위치 64에서 아르기닌을 갖는 ActRIIB 전구체 아미노산 서열은 서열번호 28로 제시되어 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 (i) ActRIIB 전구체 아미노산 서열, 즉 서열번호 16의 아미노산 64에 상응하는 위치에서 알라닌; 또는 (ii) ActRIIB 전구체 아미노산 서열, 즉 서열번호 28의 위치 64에서 아르기닌을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 전구체 아미노산 서열, 즉 서열번호 16 또는 28의 아미노산 64에 상응하는 위치에서 알라닌 또는 아르기닌이 아닌 아미노산을 포함할 수 있다.

[0104] ActRIIB 세포외 도메인의 C-말단에서의 프롤린 매듭(knot)의 결실은 액티빈에 대한 수용체의 친화성을 감소시킨다는 것이 밝혀졌다(예를 들면, 문헌(Attisano et al., Cell, 1992, 68(1):97-108) 참조). 서열번호 28의 아미노산 20-119(즉, 서열번호 32)를 함유하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질인 "ActRIIB(20-119)-Fc"는 프롤린 매듭 영역 및 완전한 막근접(juxtamembrane) 도메인을 포함하는, 서열번호 28의 아미노산 20-134(즉, 서열번호 31)를 함유하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질인 "ActRIIB(20-134)-Fc"에 비해 GDF-11 및 액티빈과의 감소된 결합을 갖는다. 그러나, 서열번호 28의 아미노산 20-129를 함유하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질인 "ActRIIB(20-129)-Fc"는 비록 프롤린 매듭 영역이 파괴되어 있다 하더라도 ActRIIB의 비-절두된 세포외 도메인에 비해 유사하지만 다소 감소된 활성을 보유한다. 따라서, 서열번호 28(또는 서열번호 16)의 아미노산 134, 133, 132, 131, 130 또는 129에서 중단된 세포외 도메인을 포함하는 ActRIIB 폴리펩티드들은 모두 활성을 가질 것으로 예상되지만, 아미노산 134 또는 133에서 중단되는 구조물이 가장 높은 활성을 가질 수 있다. 유사하게, 서열번호 28의 P129 및 P130의 돌연변이가 리간드 결합을 실질적으로 감소시키지 않는다는 사실에 의해 시사된 바와 같이, 잔기 129 내지 134 중 임의의 잔기에서의 돌연변이는 큰 차이로 리간드 결합 친화성을 변경시킬 것으로 예상되지 않는다. 따라서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 서열번호 28(또는 서열번호 16)의 아미노산 109(즉, 최종 시스테인)만큼 이른 부위에서 종결될 수 있으나, 서열번호 28(또는 서열번호 16)의 아미노산 위치 109 및 119에서 또는 이들 사이에서 종결되는 형태는 감소된 리간드 결합 능력을 가질 것으로 예상된다.

[0105] 서열번호 16 및 28의 아미노산 29는 ActRIIB 전구체 서열에서 최초 시스테인을 나타낸다. 서열번호 16 또는 28의 N-말단의 아미노산 29에서 시작되거나 이 아미노산 위치 앞에서 시작되는 ActRIIB 폴리펩티드는 리간드 결합 활성을 보유할 것으로 예상된다. 서열번호 16 또는 28의 위치 24에서 아스파라긴으로의 알라닌의 돌연변이는 리간드 결합에 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 N-연결된 글리코실화 서열을 도입한다. 이것은 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20-29에 상응하는, 신호 절단 펩티드와 시스테인 가교연결된 영역 사이의 영역에서의 돌연변이가 잘 용인된다는 것을 확인시켜준다. 구체적으로, 서열번호 16 또는 28의 아미노산 위치 20, 21, 22, 23 또는 24에서 시작되는 ActRIIB 폴리펩티드는 활성을 보유할 것이고, 서열번호 16 또는 28의 아미노산 위치 25, 26, 27, 28 또는 29에서 시작되는 ActRIIB 폴리펩티드도 활성을 보유할 것으로 예상된다. 서열번호 16 또는 28의 아미노산 위치 22, 23, 24 또는 25에서 시작되는 ActRIIB 폴리펩티드는 가장 높은 활성을 가질 것이다.

[0106] 종합하건대, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 따라 사용되는 ActRIIB 전구체 단백질(즉, 서열번호 16 또는 28)의 활성 부분(즉, ActRIIB 폴리펩티드)은 일반적으로 서열번호 16 또는 28의 아미노산 29-109를 포함할 것이고, 이러한 ActRIIB 폴리펩티드는 예를 들면, 서열번호 16 또는 28의 아미노산 19 내지 29 중 어느 한 아미노산에

상응하는 잔기에서 시작될 수 있고, 서열번호 16 또는 28의 아미노산 109 내지 134 중 어느 한 아미노산에 상응하는 위치에서 종결될 수 있다. 본원에 포함되는 ActRIIB 폴리펩티드의 구체적인 예에는 서열번호 16 또는 28의 19 내지 29, 20 내지 29 또는 21 내지 29의 아미노산 위치에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 119 내지 134, 119 내지 133, 129 내지 134 또는 129 내지 133의 아미노산 위치에서 종결되는 ActRIIB 폴리펩티드가 포함된다. 본원에 포함되는 ActRIIB 폴리펩티드의 다른 구체적인 예에는 서열번호 16 또는 28의 20 내지 24(또는 21 내지 24 또는 22 내지 25)의 아미노산 위치에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 109 내지 134(또는 109 내지 133), 119 내지 134(또는 119 내지 133) 또는 129 내지 134(또는 129 내지 133)의 아미노산 위치에서 종결되는 ActRIIB 폴리펩티드가 포함된다. 이들 범위 내에 속하는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드, 특히 서열번호 16 또는 28의 상응하는 부분에 대한 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성 또는 서열 상동성을 갖는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드도 고려된다.

[0107] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 절두된 형태의 ActRIIB 세포외 도메인을 포함한다. 절두는 ActRIIB 폴리펩티드의 카복시-말단 및/또는 아미노-말단에서의 절두일 수 있다. 일부 실시양태에서, 절두는 성숙 ActRIIB 폴리펩티드 세포외 도메인에 비해 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 아미노산만큼 길 수 있다. 일부 실시양태에서, 절두는 성숙 ActRIIB 폴리펩티드 세포외 도메인의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 N-말단 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 절두는 성숙 ActRIIB 폴리펩티드 세포외 도메인의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 C-말단 아미노산일 수 있다. 예를 들면, 절두된 형태의 ActRIIB는 아미노산 20-119; 20-128; 20-129; 20-130; 20-131; 20-132; 20-133; 20-134; 20-131; 21-131; 22-131; 23-131; 24-131; 및 25-131을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 이때 아미노산 위치는 서열번호 16 또는 28에서의 아미노산 위치를 지칭한다.

[0108] 추가 예시적인 절두된 형태의 ActRIIB는 (i) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 21 내지 29 중 임의의 아미노산에서 시작되고(임의적으로 서열번호 16 또는 28의 아미노산 22 내지 25 중 임의의 아미노산에서 시작되고) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 109 내지 134 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (ii) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20 내지 29 중 임의의 아미노산에서 시작되고(임의적으로 서열번호 16 또는 28의 아미노산 22 내지 25 중 임의의 아미노산에서 시작되고) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 109 내지 133 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (iii) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20 내지 24 중 임의의 아미노산에서 시작되고(임의적으로 서열번호 16 또는 28의 아미노산 22 내지 25 중 임의의 아미노산에서 시작되고) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 109 내지 133 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (iv) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 21 내지 24 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 109 내지 134 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (v) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20 내지 24 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 118 내지 133 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (vi) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 21 내지 24 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 118 내지 134 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (vii) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20 내지 24 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 128 내지 133 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (viii) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20 내지 24 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 128 내지 133 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (ix) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 21 내지 29 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 118 내지 134 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (x) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20 내지 29 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 118 내지 133 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; (xi) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 21 내지 29 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 128 내지 134 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드; 및 (xii) 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20 내지 29 중 임의의 아미노산에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 128 내지 133 중 임의의 아미노산에서 종결되는 폴리펩티드를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열번호 16 또는 28의 아미노산 위치 28에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 아미노산 위치 131에서 종결되는 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이러한 아미노산 서열로 구성되거나, 또는 이러한 아미노산 서열로 구성된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43의 아미노산 서열로 구성되거나 본질적으로 이러한 아미노산 서열로 구성된다.

[0109] 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들 중 임의의 ActRIIB 폴리펩티드는 동종이량체

로서 생성될 수 있다. 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들 중 임의의 ActRIIB 폴리펩티드는 IgG 중쇄의 불변 영역, 예컨대, Fc 도메인을 포함하는 이중 부분을 갖는 융합 단백질로서 제제화될 수 있다. 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들 중 임의의 ActRIIB 폴리펩티드는 임의적으로 서열번호 16 또는 28에 비해 하나 이상의 추가 아미노산 치환, 결실 또는 삽입과 함께 서열번호 16 또는 28의 위치 79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산을 포함할 수 있다.

[0110] 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 하나 이상의 아미노산 치환/돌연변이를 갖는 ActRIIB의 세포외 도메인을 포함한다. 이러한 아미노산 치환/돌연변이는 예를 들면, 서열번호 16 또는 28의 아미노산 위치 79에서 산성 아미노산, 예컨대, 아스파르트산 또는 글루탐산에 의한 류신의 치환일 수 있다. 예를 들면, 서열번호 16 또는 28의 위치 79는 변경된 액티빈-미요스타틴(GDF-11) 결합 성질을 부여하도록 ActRIIB 세포외 도메인 폴리펩티드에서 변경될 수 있다. L79A 및 L79P 돌연변이는 액티빈 결합보다 더 큰 정도로 GDF-11 결합을 감소시킨다. L79E 및 L79D 돌연변이는 크게 감소된 액티빈 결합을 나타내면서 GDF-11 결합을 보유한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 아미노산 치환, 예를 들면, 서열번호 16 또는 28의 아미노산 위치 79에서 산성 아미노산, 예컨대, 아스파르트산 또는 글루탐산에 의한 류신의 치환도 보유하는 절두된 형태의 ActRIIB 세포외 도메인을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는, 아미노산 치환도 보유하는 절두된 형태의 ActRIIB 폴리펩티드 세포외 도메인은 서열번호 23이다. 절두되고/되거나 하나 이상의 아미노산 치환을 보유하는 형태의 ActRIIB는 상기 논의된 바와 같이 항체의 Fc 도메인에 연결될 수 있다.

[0112] ActRIIB 폴리펩티드의 기능성 활성 단편은 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 상응하는 단편으로부터 재조합적으로 제조된 폴리펩티드를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 또한, 단편은 당분야에서 공지되어 있는 기법, 예컨대, 통상적인 메릴필드 고체상 f-Moc 또는 t-Boc 화학반응을 이용함으로써 화학적으로 합성될 수 있다. 단편을 (재조합적으로 또는 화학적 합성으로) 제조하고 시험하여, ActRIIB 단백질 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항제(억제제)로서 작용할 수 있는 펩티드 단편을 확인할 수 있다.

[0113] 또한, ActRIIB 폴리펩티드의 기능성 활성 변이체는 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 상응하는 돌연변이된 핵산으로부터 재조합적으로 제조된 변경된 폴리펩티드들의 라이브러리를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 상기 변이체를 제조하고 시험하여, ActRIIB 단백질 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항제(억제제)로서 작용할 수 있는 변이체를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, ActRIIB 폴리펩티드의 기능성 변이체는 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 및 43으로부터 선택된 아미노산 서열과 75% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 기능성 변이체는 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 및 43으로부터 선택된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0114] 기능성 변이체는 예를 들면, 치료 효능 또는 안정성(예를 들면, 생체의 저장 수명 및 생체내 단백질용해성 분해에 대한 내성)의 향상과 같은 목적을 위해 ActRIIB 폴리펩티드의 구조를 변경함으로써 제조될 수 있다. 이러한 변경된 ActRIIB 폴리펩티드는 액티빈 결합을 보유하도록 선택될 때 천연 ActRIIB 폴리펩티드의 기능성 균등물로서 간주될 수 있다. 변경된 ActRIIB 폴리펩티드는 예를 들면, 아미노산 치환, 결실 또는 추가에 의해 제조될 수도 있다. 예를 들면, 이소류신 또는 발린에 의한 류신의 단리된 치환, 글루타메이트에 의한 아스파르트산의 단리된 치환, 세린에 의한 트레오닌의 단리된 치환, 또는 구조적으로 관련된 아미노산에 의한 아미노산의 유사한 치환(예를 들면, 보존적 돌연변이)이 생성된 분자의 생물학적 활성에 현저한 영향을 미치지 않을 것임을 예상하는 것은 타당하다. 보존적 치환은 측쇄에서 관련되어 있는 아미노산들의 패밀리 내에서 일어나는 치환이다. ActRIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화가 기능성 상동체를 발생시키지는지 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포에서 반응을 생성하는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 확인될 수 있다.

[0115] ActRIIB 폴리펩티드 돌연변이체, 특히 ActRIIB 폴리펩티드의 조합 돌연변이체 세트뿐만 아니라 절두 돌연변이체도 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있고, 조합 돌연변이체들의 풀은 기능성 변이체 서열의 확인에 특히 유용하다. 이러한 조합 라이브러리를 스크리닝하는 목적은 예를 들면, 작용제 또는 길항제로서 작용할 수 있거나 대안적으로 모두 함께 신규 활성을 보유하는 ActRIIB 폴리펩티드 변이체들을 발생시키는 것일 수 있다.

[0116] ActRIIB의 리간드 결합 포켓이 서열번호 16 또는 28의 잔기 Y31, N33, N35, L38 내지 T41, E47, E50, Q53 내지

K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 내지 N83, Y85, R87, A92, 및 E94 내지 F101에 의해 정의된다는 것이 입증되었다. 이들 위치들에서 K74A 돌연변이가 잘 용인되지만 R40A, K55A, F82A 및 위치 L79에서의 돌연변이와 마찬가지로 보존적 돌연변이가 용인될 것임이 예상된다. R40은 제노푸스(Xenopus)에서 K인데, 이것은 이 위치에서의 염기성 아미노산이 용인될 것임을 시사한다. Q53은 소 ActRIIB에서 R이고 제노푸스 ActRIIB에서 K이므로, R, K, Q, N 및 H를 비롯한 아미노산들이 이 위치에서 용인될 것이다. 따라서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 ActRIIB 폴리펩티드에 대한 일반식은 서열번호 16 또는 28의 아미노산 29-109를 포함하되 임의적으로 서열번호 16 또는 28의 20 내지 24 또는 22 내지 25의 아미노산 위치에서 시작되고 서열번호 16 또는 28의 129 내지 134의 아미노산 위치에서 종결되고 리간드 결합 포켓에서 1개, 2개, 5개 또는 15개 이하의 보존적 아미노산 변화를 포함하고 리간드 결합 포켓에서 서열번호 16 또는 28의 아미노산 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에서 0개, 1개 또는 더 많은 수의 비-보존적 변경을 포함하는 ActRIIB 폴리펩티드이다. 이러한 ActRIIB 폴리펩티드는 서열번호 16 또는 28의 아미노산 29-109의 서열에 대한 80%, 90%, 95% 또는 99% 초과와 서열 동일성 또는 서열 상동성을 보유할 수 있다. 가변성이 특히 잘 용인될 수 있는 결합 포켓 외부의 부위는 ActRIIB 세포외 도메인의 아미노-말단 및 카복시-말단, 및 위치 42-46 및 65-73을 포함한다. 서열번호 16 또는 18의 위치 65에서의 알라닌으로의 아스파라긴의 변경(N65A)은 A64 배경에서 리간드 결합을 사실상 개선하므로, R64 배경에서 리간드 결합에 유해한 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다. 이 변화는 아마도 A64 배경에서 N65의 글리코실화를 제거하므로, 이 영역에서의 유의한 변화가 용인될 가능성 있음을 입증한다. R64A 변화는 잘 용인되지 않지만, R64K는 잘 용인되므로, 또 다른 염기성 잔기, 예컨대, H는 위치 64에서 용인될 수 있다.

[0117] 리간드 결합 도메인에서 돌연변이를 갖는 ActRIIB 폴리펩티드의 구체적인 예로서, ActRIIB의 리간드 결합 도메인의 양으로 하전된 아미노산 잔기 Asp(D80)는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드가 GDF8에 우선적으로 결합하고 액티빈에 결합하지 않도록 상이한 아미노산 잔기로 돌연변이될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, D80 잔기는 비-하전된 아미노산 잔기, 음성 아미노산 잔기 및 소수성 아미노산 잔기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기로 변화된다. 보다 구체적인 예로서, 소수성 잔기 L79는 GDF11 결합을 보유하면서 액티빈 결합을 크게 감소시키도록 산성 아미노산인 아스파르트산 또는 글루탐산으로 변경될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 바와 같이, 기재된 돌연변이, 변이체 또는 변경의 대다수가 핵산 수준에서 만들어질 수 있거나, 일부 경우 번역 후 변경 또는 화학적 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 기법들은 당분야에서 잘 공지되어 있다.

[0118] 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 항체의 Fc 부분에 연결된 ActRIIB 수용체의 세포외 도메인(예를 들면, 액티빈 결합 도메인)을 포함하는 접합체/융합 단백질을 포함한다. 이러한 접합체/융합 단백질은 본원에 개시된 임의의 ActRIIB 폴리펩티드(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 및 43 중 임의의 서열번호), 당분야에서 공지되어 있는 임의의 ActRIIB 폴리펩티드, 또는 당분야에서 공지되어 있고/있거나 본원에서 제공된 방법의 이용을 통해 제조된 임의의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0119] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 연결체, 예를 들면, 펩티드 연결체를 통해 항체의 Fc 부분에 연결된다. 예시적인 연결체는 짧은 폴리펩티드 서열, 예컨대, 2개 내지 10개, 2개 내지 5개, 2개 내지 4개, 또는 2개 또는 3개의 아미노산 잔기(예를 들면, 글리신 잔기), 예를 들면, Gly-Gly-Gly 연결체를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 연결체는 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly(GGG)를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 연결체는 아미노산 서열 Thr-Gly-Gly-Gly(TGGG)를 포함한다. 임의적으로, Fc 도메인은 잔기, 예컨대, Asp-265, Lys-322 및 Asn-434에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 일부 경우, 이들 돌연변이들 중 하나 이상의 돌연변이(예를 들면, Asp-265 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인에 비해 감소된 Fc γ 수용체 결합 능력을 갖는다. 다른 경우, 이들 돌연변이들 중 하나 이상의 돌연변이(예를 들면, Asn-434 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인에 비해 증가된 MHC 클래스 I 관련 Fc 수용체(FcRN) 결합 능력을 갖는다. Fc 도메인에 융합된 ActRIIB 가용성 세포외 도메인을 포함하는 예시적인 융합 단백질은 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 및 47에 기재되어 있다.

[0120] 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 항체의 Fc 부분에 연결된 ActRIIB 세포외 도메인 또는 이의 부분을 포함하고, 이때 상기 ActRIIB 억제제는 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 및 47로부터 선택된 아미노산 서열과 75% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 항체의 Fc 부분에 연결된 ActRIIB 세포외 도메인 또는 이의 부분을 포함하고, 이때 상기 ActRIIB 억제제는 서열번호 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46 및 47로부터 선택된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

- [0121] 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 인간 ActRIIB 수용체의 세포외 도메인과 IgG1의 Fc 부분의 융합 단백질이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 인간 ActRIIB 수용체의 절두된 세포외 도메인과 IgG1의 Fc 부분의 융합 단백질이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 인간 ActRIIB 수용체의 절두된 세포외 도메인과 IgG1의 Fc 부분의 융합 단백질이고, 이때 상기 인간 ActRIIB 수용체의 절두된 세포외 도메인은 서열번호 16 또는 28의 아미노산 79에 상응하는 아미노산 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 한 실시양태에서, 서열번호 16 또는 28의 아미노산 79에 상응하는 아미노산 위치에서 아미노산 치환은 아스파르트산에 의한 류신의 치환(즉, L79D 돌연변이)이다.
- [0122] 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 인간 ActRIIB 수용체의 세포외 도메인과 IgG1의 Fc 부분의 융합 단백질을 나타내는 서열번호 24 또는 25이고, 이때 상기 ActRIIB 세포외 도메인은 L79D 돌연변이를 갖는 서열번호 28의 아미노산 25-131을 포함한다. 서열번호 24의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 25로 제시되어 있다.
- [0123] 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRIIB 억제제는 인간 ActRIIB 수용체의 세포외 도메인과 IgG1의 Fc 부분의 융합 단백질을 나타내는 서열번호 34 또는 35이고, 이때 상기 ActRIIB 세포외 도메인은 L79D 돌연변이를 갖는 서열번호 16의 아미노산 25-131을 포함한다.
- [0124] 아스파라긴-연결된 글리코실화 인식 부위는 일반적으로 적절한 세포 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트라이펩티드 서열인 아스파라긴-X-쓰레오닌(또는 아스파라긴-X-세린)(이때, "X"는 임의의 아미노산임)을 포함한다. 상기 변경은 (0-연결된 글리코실화 부위의 경우) 야생형 ActRIIB 폴리펩티드의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 쓰레오닌 잔기의 추가 또는 치환에 의해 만들어질 수도 있다. 글리코실화 인식 부위의 제1 아미노산 위치 및 제3 아미노산 위치 중 하나 또는 둘다에서의 다양한 아미노산 치환 또는 결실(및/또는 제2 위치에서의 아미노산 결실)은 변경된 트라이펩티드 서열에서 비-글리코실화를 야기한다. ActRIIB 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또 다른 수단은 글리코사이드와 ActRIIB 폴리펩티드의 화학적 또는 효소적 커플링이다. 이용되는 커플링 방식에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 자유 카복실 기; (c) 자유 설프하이드릴 기, 예컨대, 시스테인의 자유 설프하이드릴 기; (d) 자유 하이드록실 기, 예컨대, 세린, 쓰레오닌 또는 하이드록시프롤린의 자유 하이드록실 기; (e) 방향족 잔기, 예컨대, 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판; 또는 (f) 글루탐인의 아미드 기에 부착될 수 있다. 이들 방법들은 1987년 9월 11일자로 공개된 국제 특허출원 공개 제W087/05330호 및 문헌(Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306)(본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있다. ActRIIB 폴리펩티드 상에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드를 화합물 트라이플루오로메탄설폰산 또는 균등한 화합물에 노출시키는 단계를 포함할 수 있다. 이 처리는 아미노산 서열을 온전한 상태로 남기면서 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 거의 또는 모든 당들의 절단을 야기한다. 화학적 탈글리코실화는 문헌(Hakimuddin et al., (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52) 및 문헌(Edge et al., (1981) Anal. Biochem. 118:131)에 더 기재되어 있다. ActRIIB 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 문헌(Thotakura et al., (1987) Meth. Enzymol. 138:350)에 기재된 바와 같이 다양한 엔도글리코시다제 및 엑소글리코시다제의 사용에 의해 달성될 수 있다. 포유동물, 효모, 곤충 및 식물 세포가 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴을 모두 도입할 수 있기 때문에, ActRIIB 폴리펩티드의 서열은 사용되는 발현 시스템의 종류에 따라 적절하게 조절될 수 있다. 일반적으로, 인간에서 사용될 ActRIIB 단백질은 적절한 글리코실화를 제공하는 포유동물 세포주, 예컨대, HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현될 것이지만, 다른 발현 시스템, 예컨대, 다른 포유동물 발현 세포주, 조작된 글리코실화 효소를 갖는 효모 세포주 및 곤충 세포도 유용할 것으로 예상된다.
- [0125] 구체적 실시양태에서, ActRIIB(R64)-Fc 형태에 비해 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 증가시키는 추가 N-연결된 글리코실화 부위(N-X-S/T)의 추가를 포함하는 돌연변이된 ActRIIB 폴리펩티드가 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 서열번호 16 또는 28의 위치 24에서의 아스파라긴의 도입(A24N)은 보다 긴 반감기를 부여하는 NXT 서열을 생성한다. 다른 NX(T/S) 서열이 42-44(NQS) 및 65-67(NSS)에서 발견될 수 있지만, 65-67(NSS)은 위치 64(즉, R64 폴리펩티드)의 R 때문에 효율적으로 글리코실화되지 않을 수 있다. N-X-S/T 서열은 일반적으로 상기 상세히 기재된, ActRIIB의 리간드 결합 포켓 외부의 위치에서 도입될 수 있다. 비-내재성 N-X-S/T 서열의 도입에 특히 적합한 부위는 서열번호 16 또는 28의 아미노산 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 또는 129-134를 포함한다. N-X-S/T 서열은 ActRIIB 서열과 Fc 또는 다른 융합 성분 사이의 연결체 내로 도입될 수도 있다. 이러한 부위는 기존 S 또는 T에 대하여 정확한 위치

에서 N을 도입하거나, 기존 N에 상응하는 위치에서 S 또는 T를 도입함으로써 최소한의 노력으로 도입될 수 있다. 따라서, N-연결된 글리코실화 부위를 생성할 바람직한 변경은 A24N, R64N, S67N(가능하게는 N65A 변경과 조합됨), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S 및 R112T(서열번호 16 또는 28에서 발견될 수 있는 위치들에 상응하는 모든 아미노산 위치들)이다. 글리코실화될 것으로 예상되는 임의의 S는 글리코실화에 의해 부여된 보호 때문에 면역원성 부위를 생성하지 않으면서 T로 변경될 수 있다. 마찬가지로, 글리코실화될 것으로 예상되는 임의의 T는 S로 변경될 수 있다. 따라서, 변경 S67T 및 S44T가 본원에 포함된다. 마찬가지로, A24N 변이체에서 S26T 변경이 사용될 수 있다. 따라서, ActRIIB 폴리펩티드는 하나 이상의 추가 비-내재성 N-연결된 글리코실화 컨센서스 서열을 포함할 수 있다.

[0126] 다양한 스크리닝 분석들이 ActRIIB 폴리펩티드 변이체를 평가하는 데에 사용될 수 있다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드 변이체는 ActRIIB 리간드에 결합하는 능력, ActRIIB 리간드와 ActRIIB 폴리펩티드의 결합을 방해하는 능력, 또는 ActRIIB 리간드에 의해 야기된 신호전달을 방해하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 세포-기체 분석 또는 생체내 분석에서 시험될 수도 있다.

[0127] 천연 ActRIIB 폴리펩티드에 비해 선택적 또는 일반적으로 증가된 효능을 갖는 조합-유도된 변이체를 발생시킬 수 있다. 마찬가지로, 돌연변이유발은 상응하는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 현저히 상이한 세포내 반감기를 갖는 변이체를 발생시킬 수 있다. 예를 들면, 변경된 단백질은 천연 ActRIIB 폴리펩티드의 파괴 또는 다른 방식의 불활성화를 초래하는 단백질용해성 분해 또는 다른 세포 과정에 대한 더 높은 안정성 또는 더 낮은 안정성을 갖게 될 수 있다. 이러한 변이체들, 및 이들을 코딩하는 유전자들은 ActRIIB 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 ActRIIB 폴리펩티드 수준을 변경시키는 데에 사용될 수 있다. 예를 들면, 짧은 반감기는 보다 일시적인 생물학적 효과를 발생시킬 수 있고, 환자 내에서 재조합 ActRIIB 폴리펩티드 수준의 엄격한 조절을 가능하게 할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 이 단백질의 반감기를 변경시키기 위해(존재하는 경우) 연결체 및/또는 Fc 부분에서 돌연변이를 만들 수 있다.

[0128] 조합 라이브러리는 잠재적 ActRIIB 폴리펩티드 서열의 적어도 부분을 각각 포함하는 폴리펩티드 라이브러리를 코딩하는 축퇴 유전자 라이브러리에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 잠재적 ActRIIB 폴리펩티드 뉴클레오타이드 서열의 축퇴 세트가 개별 폴리펩티드로서, 또는 대안적으로 (예를 들면, 파지 라이브러리의 경우) 보다 큰 융합 단백질 세트로서 발현될 수 있도록 효소를 사용하여 합성 올리고뉴클레오타이드들의 혼합물을 유전자 서열 내로 라이게이션시킬 수 있다.

[0129] 축퇴 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 잠재적 상동체 라이브러리를 발생시킬 수 있는 많은 방법들이 존재한다. 축퇴 유전자 서열의 화학적 합성을 자동 DNA 합성기에서 수행할 수 있고, 그 다음 합성 유전자를 적절한 발현용 벡터 내로 라이게이션시킬 수 있다. 축퇴 올리고뉴클레오타이드의 합성은 당분야에서 잘 공지되어 있다(예를 들면, 문헌(Narang, S A (1983) Tetrahedron 39:3); 문헌(Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289); 문헌(Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323); 문헌(Itakura et al., (1984) Science 198:1056); 및 문헌(Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477) 참조). 이러한 기법은 다른 단백질의 유도된 진화에서 이용되어 왔다(예를 들면, 문헌(Scott et al., (1990) Science 249:386-390); 문헌(Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433); 문헌(Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406); 문헌(Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382)뿐만 아니라; 미국 특허 제5,223,409호, 제5,198,346호 및 제5,096,815호 또한 참조).

[0130] 대안적으로, 다른 형태의 돌연변이유발을 이용하여 조합 라이브러리를 발생시킬 수 있다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드 변이체는 예를 들면, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 등(Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; and Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085); 연결체 스캐닝 돌연변이유발(Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); 포화 돌연변이유발(Meyers et al., (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이유발(Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 또는 화학적 돌연변이유발 등을 비롯한 무작위 돌연변이유발(Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; and Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)을 이용한 스크리닝에 의해 발생될 수 있고 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 특히 조합 셋팅에서 연결체 스캐닝 돌연변이유발은 절두된 (생체활성) 형태의 ActRIIB 폴리펩티드를 확인하는 흥미로운 방법

이다.

[0131] 점 돌연변이 및 절두에 의해 만들어진 조합 라이브러리의 유전자 생성물을 스크리닝하고 특정 성질을 갖는 유전자 생성물에 대해 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 매우 다양한 기법들이 당분야에서 공지되어 있다. 이러한 기법들은 ActRIIB 폴리펩티드의 조합 돌연변이유발에 의해 발생된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝을 위해 일반적으로 채택될 것이다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위해 가장 널리 이용되는 기법은 전형적으로 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 적절한 세포를 생성된 벡터 라이브러리로 형질전환시키는 단계, 및 원하는 활성의 검출이 검출된 생성물에 대한 유전자를 코딩하는 벡터의 상대적으로 용이한 단리를 용이하게 하는 조건 하에 조합 유전자를 발현하는 단계를 포함한다. 바람직한 분석은 액티빈 결합 분석 및 액티빈 매개 세포 신호전달 분석을 포함한다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드에 천연적으로 존재하는 임의의 번역 후 변경 이외의 번역 후 변경을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 변경은 아세틸화, 카복실화, 글리코실화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 결과적으로, 변경된 ActRIIB 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 폴리사카라이드 또는 모노사카라이드, 및 포스페이트를 함유할 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드의 기능성에 대한 이러한 비-아미노산 요소의 효과는 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 시험될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드가 신생 형태의 ActRIIB 폴리펩티드의 절단에 의해 세포에서 생성될 때, 번역 후 프로세싱은 단백질의 정확한 폴딩 및/또는 기능에 중요할 수도 있다. 상이한 세포들(예컨대, CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 또는 HEK293)은 이러한 번역 후 활성을 위한 특정 세포 기구 및 특징적인 기작을 갖고, ActRIIB 폴리펩티드의 정확한 변경 및 프로세싱을 보장하도록 선택될 수 있다.

[0133] 일부 양태에서, ActRIIB 폴리펩티드의 기능성 변이체 또는 변경된 형태는 ActRIIB 폴리펩티드의 적어도 부분 및 하나 이상의 융합 도메인을 갖는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 융합 도메인의 잘 공지된 예에는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S 트랜스퍼라제(GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 원하는 성질을 부여하도록 융합 도메인을 선택할 수 있다. 예를 들면, 일부 융합 도메인들은 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리에 특히 유용하다. 친화성 정제를 목적으로, 친화성 크로마토그래피에 적절한 매트릭스, 예컨대, 글루타티온-접합된 수지, 아밀라제-접합된 수지, 및 니켈-접합된 또는 코발트-접합된 수지가 사용된다. 이러한 매트릭스들 대다수가 "키트" 형태로 입수될 수 있다(예컨대, (HIS6) 융합 파트너와 함께 유용한 파마사 GST 정제 시스템 및 쿼익스프레스™ 시스템(쿼이젠)). 또 다른 예로서, ActRIIB 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 융합 도메인을 선택할 수 있다. 이러한 검출 도메인의 예에는 다양한 형광 단백질들(예를 들면, GFP)뿐만 아니라, 통상적으로 특이적 항체가 입수될 수 있는 짧은 펩티드 서열인 "에피토프 태그"도 포함된다. 특이적 단일클론 항체가 용이하게 입수될 수 있는 잘 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA) 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우, 융합 도메인은 적절한 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 분해하여 그로부터 재조합 단백질을 유리시킬 수 있게 하는 프로테아제 절단 부위, 예컨대, 인자 Xa 또는 트롬빈에 대한 절단 부위를 갖는다. 그 다음, 유리된 단백질을 후속 크로마토그래피 분리로 융합 도메인으로부터 단리할 수 있다. 일부 바람직한 실시양태에서, ActRIIB 폴리펩티드는 생체내에서 ActRIIB 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인("안정화제" 도메인)과 융합될 수 있다. "안정화"는 혈청 반감기의 증가가 감소된 파괴에 기인하는지, 신장에 의한 제거의 감소에 기인하는지, 아니면 다른 약동학적 효과에 기인하는지 관계없이 혈청 반감기를 증가시키는 것을 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 매우 다양한 단백질들에게 바람직한 약동학적 성질을 부여하는 것으로 공지되어 있다. 마찬가지로, 인간 혈청 알부민과의 융합은 바람직한 성질을 부여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 종류의 융합 도메인은 다량체화(예를 들면, 이량체화 또는 사량체화) 도메인, 및 (원하는 경우 추가 생물학적 기능, 예컨대, 골 성장 또는 근육 성장의 추가 자극을 부여하는) 기능성 도메인을 포함한다.

[0134] 융합 단백질의 상이한 요소들이 원하는 기능성과 일치하는 임의의 방식으로 배열될 수 있다는 것이 이해된다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드가 이중 도메인의 C-말단에 위치할 수 있거나, 대안적으로 이중 도메인이 ActRIIB 폴리펩티드의 C-말단에 위치할 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드 도메인 및 이중 도메인은 융합 단백질에서 인접하여 존재할 필요가 없고, 추가 도메인 또는 아미노산 서열이 어느 한 도메인의 C-말단 또는 N-말단에서, 또는 도메인들 사이에서 포함될 수 있다.

[0135] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 이상의 변경을 함유한다. 예를 들면, 이러한 변경은 ActRIIB 폴리펩티드의 시험관내

반감기를 향상시키거나, ActRIIB 폴리펩티드의 순환 반감기를 향상시키거나, ActRIIB 폴리펩티드의 단백질용해성 분해를 감소시킨다. 이러한 안정화 변경은 융합 단백질(예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드 및 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함함), 글리코실화 부위의 변경(예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드에의 글리코실화 부위의 추가를 포함함), 및 탄수화물 모이어티의 변경(예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드로부터의 탄수화물 모이어티의 제거를 포함함)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 융합 단백질의 경우, ActRIIB 폴리펩티드는 안정화제 도메인, 예컨대, IgG 분자(예를 들면, Fc 도메인)에 융합된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "안정화제 도메인"은 융합 단백질의 경우에서와 같이 융합 도메인(예를 들면, Fc)을 지칭할 뿐만 아니라, 비-단백질성 변경, 예컨대, 탄수화물 모이어티, 또는 비-단백질성 중합체, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜도 포함한다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 단리되거나 정제된 형태의 ActRIIB 폴리펩티드를 사용한다. 즉, 다른 단백질로부터 단리되거나 다른 단백질을 실질적으로 갖지 않는 ActRIIB 폴리펩티드가 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드는 일반적으로 재조합 핵산으로부터의 발현에 의해 생성될 것이다.

[0137] 일부 양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 본원에 개시된 단편, 기능성 변이체 및 융합 단백질을 비롯한 단리된 및/또는 재조합 핵산에 의해 코딩된다. 예를 들면, 서열번호 19는 천연 인간 ActRIIB 전구체 폴리펩티드를 코딩한다. 본 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 이 핵산은 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드의 제조 방법에서 사용될 수 있거나 (예를 들면, 유전자 요법에서) 직접적인 치료제로서 사용될 수 있다.

[0138] 일부 양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIB 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있는 핵산은 서열번호 19의 변이체인 핵산뿐만 아니라 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43을 코딩하는 핵산)의 변이체도 포함하는 것으로도 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 추가 또는 결실에 의해 상이한 서열, 예컨대, 대립형질 변이체를 포함한다.

[0139] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIB 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있는 단리된 또는 재조합 핵산 서열은 서열번호 19, 또는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43을 코딩하는 핵산)과 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 이상 동일하다. 당업자는 서열번호 19, 또는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43을 코딩하는 핵산)에 상보적인 핵산 서열; 및 서열번호 19, 또는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43을 코딩하는 핵산)의 변이체가 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 추가 실시양태에서, 상기 핵산 서열은 단리된 핵산 서열, 재조합 핵산 서열 및/또는 이중 뉴클레오티드 서열에 융합된 핵산 서열일 수 있거나, DNA 라이브러리에 존재할 수 있다.

[0140] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIB 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있는 핵산은 고도 엄격도 조건 하에 서열번호 19에 기재된 핵산 서열, 또는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43을 코딩하는 핵산)에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열; 서열번호 19, 또는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43을 코딩하는 핵산)의 상보체 서열; 또는 이들의 단편을 포함한다. 당업자는 DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄격도 조건이 달라질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들면, 약 45℃에서 6.0배 나트륨 클로라이드/나트륨 시트레이트(SSC)에서 혼성화를 수행한 후, 50℃에서 2.0배 SSC로 세척을 수행할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서 염 농도는 50℃의 약 2.0배 SSC의 낮은 엄격도 내지 50℃의 약 0.2배 SSC의 높은 엄격도로부터 선택될 수 있다. 추가로, 세척 단계에서 온도는 실온(약 22℃)의 낮은 엄격도 조건부터 약 65℃의 높은 엄격도 조건까지 증가될 수 있다. 온도 및 염 둘다가 달라질 수 있거나, 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있는 반면, 다른 변수가 달라질 수 있다. 한 실시양태에서, 실온에서 6배 SSC의 낮은 엄격도 조건 하에 혼성화를 수행한 후 실온에서 2배 SSC로 세척하였을 때 혼성화하는 핵산이 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다.

[0141] 유전 코드의 축퇴성으로 인해 서열번호 19에 기재된 핵산, 또는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43을 코딩하는 핵산)과 상이한 단리된 핵산도 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIB 폴리펩티드의 제조에 사용될

수 있다. 예를 들면, 다수의 아미노산들이 1개 초과와 삼염기코돈에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 특정하는 코돈, 또는 동의 코돈(예를 들면, CAU 및 CAC는 히스티딘에 대한 동의 코돈임)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 "침묵" 돌연변이를 초래할 수 있다. 그러나, 본 단백질의 아미노산 서열의 변화를 유발하는 DNA 서열 다형성이 포유동물 세포들 사이에 존재할 것으로 예상된다. 당업자는 특정 단백질을 코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드(최대 약 3% 내지 5%의 뉴클레오티드)에서의 이들 변이가 천연 대립형질 변이로 인해 주어진 종의 개체들 사이에 존재할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 임의의 모든 이러한 뉴클레오티드 변이 및 생성된 아미노산 다형성이 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다.

[0142] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIB 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있는 제조합 핵산은 발현 구축물에서 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로 발현을 위해 사용된 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포들에 대한 다수의 종류의 적절한 발현 벡터들 및 적합한 조절 서열들이 당분야에서 공지되어 있다. 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 시작 서열 및 종결 서열, 번역 시작 서열 및 종결 서열, 및 인핸서 또는 활성화제 서열을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 당분야에서 공지되어 있는 항시성 또는 유도성 프로모터가 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. 상기 프로모터는 천연 프로모터, 또는 1개 초과와 프로모터의 요소들을 겸비하는 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 구축물은 세포에서 에피솜, 예컨대, 플라스미드에 존재할 수 있거나, 발현 구축물은 염색체에 삽입될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하도록 선택 마커 유전자를 함유한다. 선택 마커 유전자는 당분야에서 잘 공지되어 있고, 사용된 숙주 세포에 따라 달라질 것이다.

[0143] 일부 양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIB 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있는 핵산은 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하고 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터 내에 제공된다. 조절 서열은 당분야에서 인식되어 있고 ActRIIB 폴리펩티드의 발현을 유도하도록 선택된다. 따라서, 용어 조절 서열은 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소를 포함한다. 예시적인 조절 서열은 문헌(Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))에 기재되어 있다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 발현하기 위해 DNA 서열에 작동가능하게 연결되었을 때 DNA 서열의 발현을 조절하는 매우 다양한 발현 조절 서열들 중 임의의 발현 조절 서열을 이 벡터에서 사용할 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은 예를 들면, SV40의 초기 프로모터 및 후기 프로모터, tet 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터, RSV 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, 발현이 T7 RNA 중합효소에 의해 유도되는 T7 프로모터, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코트 단백질에 대한 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 해당 효소에 대한 프로모터, 산 포스포타제의 프로모터, 예를 들면, Pho5, 효모 α -교배 인자의 프로모터, 마콜로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터, 원핵 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 공지되어 있는 다른 서열, 및 이들의 다양한 조합을 포함한다. 발현 벡터의 디자인이 형질전환된 숙주 세포의 선택 및/또는 발현하고자 하는 단백질의 종류와 같은 인자에 의해 좌우될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 더욱이, 벡터의 카피 수, 이 카피 수를 조절하는 능력, 및 벡터에 의해 코딩된 임의의 다른 단백질, 예컨대, 항생제 마커의 발현도 고려되어야 한다.

[0144] 제조합 핵산은 클로닝된 유전자 또는 이의 부분을 원핵 세포, 진핵 세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유동물), 또는 이들 둘다에서의 발현에 적합한 벡터 내로 라이게이션시킴으로써 생성될 수 있다. 제조합 ActRIIB 폴리펩티드의 생성을 위한 발현 비히클은 플라스미드 및 다른 벡터를 포함한다. 예를 들면, 적합한 벡터는 하기 종류의 플라스미드를 포함한다: 원핵 세포, 예컨대, 이. 콜라이에서의 발현을 위한 pBR322 유래의 플라스미드, pEMBL 유래의 플라스미드, pEX 유래의 플라스미드, pBTac 유래의 플라스미드 및 pUC 유래의 플라스미드.

[0145] 일부 포유동물 발현 벡터는 세균에서의 상기 벡터의 증식을 용이하게 하기 위한 원핵 서열, 및 진핵 세포에서 발현되는 하나 이상의 진핵 전사 유닛 둘다를 함유한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유래의 벡터들은 진핵 세포의 형질감염에 적합한 포유동물 발현 벡터의 예이다. 이들 벡터들 중 일부는 원핵 세포 및 진핵 세포 둘다에서의 복제 및 약물 내성 선택을 용이하게 하기 위해 세균 플라스미드, 예컨대, pBR322의 서열에 의해 변경된다. 대안적으로, 바이러스, 예컨대, 소 파필로마 바이러스(BPV-1) 또는 엠스테인-바 바이러스(pHEBo, pREP 유래 및 p205)의 유도체가 진핵 세포에서의 단백질의 일시적 발현을 위해 사용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스를 포함함) 발현 시스템의 예는 하기 유전자 요법 전달 시스템의 설명에서 발견될 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 유

기체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법들이 당분야에서 잘 공지되어 있다. 원핵 세포 및 진핵 세포 둘다를 위한 다른 적합한 발현 시스템, 및 일반적인 재조합 절차에 대해서는 문헌(Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001))을 참조한다. 일부 경우, 바콜로바이러스 발현 시스템을 사용하여 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 바콜로바이러스 발현 시스템의 예에는 pVL 유래의 벡터(예컨대, pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW 유래의 벡터(예컨대, pAcUW1), 및 pBlueBac 유래의 벡터(예컨대, β -gal 함유 pBlueBac III)가 포함된다.

[0146] 한 실시양태에서, 벡터는 CHO 세포에서 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드를 생성하도록 디자인될 수 있다(예컨대, Pcmv-Script 벡터(스트라타진, 미국 캘리포니아주 라 졸라 소재), pcDNA4 벡터(인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 및 pCI-neo 벡터(프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)). 자명할 바와 같이, 본 유전자 구축물은 배양물에서 증식된 세포에서 본 ActRIIB 폴리펩티드의 발현을 야기하는 데에, 예를 들면, 정제를 위해 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생성하는 데에 사용될 수 있다.

[0147] 하나 이상의 본 ActRIIB 폴리펩티드에 대한 코딩 서열(예를 들면, 서열번호 19, 또는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, 서열번호 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 또는 43을 코딩하는 핵산))을 포함하는 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포가 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되기에 적합한 ActRIIB 폴리펩티드의 제조에 사용될 수 있다. 상기 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드는 세균 세포, 예컨대, 이. 콜라이, 곤충 세포(예를 들면, 바콜로바이러스 발현 시스템을 사용함), 효모, 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 다른 적합한 숙주 세포가 당업자에게 공지되어 있다.

[0148] 따라서, 본원은 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ActRIIB 폴리펩티드의 발현이 일어날 수 있도록 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드는 분리될 수 있고 세포와 ActRIIB 폴리펩티드 함유 배지의 혼합물로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, ActRIIB 폴리펩티드는 세포질 또는 막 분획에서 보유될 수 있고, 세포를 회수하고 용해시킬 수 있고 단백질을 분리할 수 있다. 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에서 잘 공지되어 있다. 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동, ActRIIB 폴리펩티드의 특정 에피토프에 대한 특이적 항체를 사용한 면역친화성 정제, 및 ActRIIB 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 물질을 사용한 친화성 정제(예를 들면, 단백질 A 컬럼을 사용하여 ActRIIB-Fc 융합체를 정제할 수 있음)를 비롯한, 당분야에서 공지되어 있는 단백질 정제 기법을 이용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포 또는 이들 둘다로부터 본 ActRIIB 폴리펩티드를 분리할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, ActRIIB 폴리펩티드는 그의 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다. 바람직한 실시양태에서, 정제는 예를 들면, 하기 크로마토그래피들 중 3종 이상의 크로마토그래피들을 임의의 순서로 포함하는 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계들에 의해 달성된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로스 크로마토그래피, 페닐세파로스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과 및 완충제 교환으로 완결될 수 있다. 본원에서 입증된 바와 같이, ActRIIB-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정될 때 98% 초과 순도로 정제되었고 SDS-PAGE에 의해 측정될 때 95% 초과 순도로 정제되었다. 이 순도 수준은 마우스에서 골에 대한 바람직한 효과를 달성하고 마우스, 래트 및 비-인간 영장류에서 허용가능한 안전성 프로파일을 달성하는 데에 충분하였다.

[0149] 또 다른 실시양태에서, 재조합 ActRIIB 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에서 정제 리더 서열, 예컨대, 폴리-(His)/엔테로키나제 절단 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni^{2+} 금속 수지를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 가능하게 할 수 있다. 그 다음, 상기 정제 리더 서열을 엔테로키나제로 처리하여 후속적으로 제거함으로써 정제된 ActRIIB 폴리펩티드를 제공할 수 있다(예를 들면, 문헌(Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177); 및 문헌(Janknecht et al., PNAS USA 88:8972) 참조).

[0150] 융합 유전자의 제조 기법은 잘 공지되어 있다. 본질적으로, 라이게이션을 위한 블런트-말단 또는 스테거-말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한효소 분해, 적절한 경우 코헤시브 말단의 충전, 바람직하지 않은 연결을 피하기 위한 알칼리성 포스파타제 처리 및 효소적 라이게이션을 이용하는 통상적인 기법에 따라 상이한 폴리펩티드 서열들을 코딩하는 다양한 DNA 단편들의 연결을 수행한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 유전자는 자동 DNA 합성기를 포함하는 통상적인 기법에 의해 합성될 수 있다. 대안적으로, 추후에 어닐링되어 키메라 유전자 서열을

발생시킬 수 있는 2개의 연속 유전자 단편들 사이에 상보적인 오버행을 발생시키는 앵커 프라이머를 사용하여 유전자 단편의 PCR 증폭을 수행할 수 있다(예를 들면, 문헌(Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992) 참조).

[0151] 서열번호 8의 조직 플라스미노겐 리더 서열을 사용하여 안정하게 형질감염된 CHO-DUKX B1 1 세포에서 pAID4 벡터(SV40 ori/인헨서, CMV 프로모터)로부터 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 발현할 수 있다. Fc 부분은 서열번호 7에 제시된 인간 IgG1 Fc 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질은 발현 시 ActRIIB-Fc 융합 단백질 분자 당 평균 약 1.5 내지 2.5 몰의 시알산을 갖는다.

[0152] 일부 실시양태에서, ActRIIB-Fc 융합체의 긴 혈청 반감기는 인간 환자에서 25일 내지 32일일 수 있다. 추가로, CHO 세포에서 발현된 물질은 인간 293 세포에서 발현된 ActRIIB-hFc 융합 단백질에 대해 보고된 친화성보다 더 높은 액티빈 B 리간드에 대한 친화성을 가질 수 있다(del Re et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17; 279(51):53126-35). 추가로, 이론에 의해 구속받고자 하지 않지만, TPA 리더 서열의 사용은 다른 리더 서열보다 더 높은 생성을 제공하였고, 천연 리더로 발현된 ActRIIB-Fc와 달리 고도로 순수한 N-말단 서열을 제공할 수 있다. 천연 리더 서열의 사용은 상이한 N-말단 서열을 각각 갖는 ActRIIB-Fc의 2개 주요 종들을 발생시킬 수 있다.

[0153] (ii) 다른 ActRII 수용체 억제제

[0154] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRII 수용체 억제제는 핵산 화합물이다.

[0155] ActRII 수용체를 억제하는 핵산 화합물의 카테고리의 예에는 안티센스 핵산, siRNA 또는 RNAi 구축물 및 촉매 핵산 구축물이 포함된다. 핵산 화합물은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥 화합물은 오버행 또는 비-상보성 영역도 포함할 수 있고, 이때 가닥들 중 한 가닥 또는 다른 가닥은 단일 가닥이다. 단일 가닥 화합물은 자가-상보성 영역을 포함할 수 있는데, 이것은 상기 화합물이 이중 나선형 구조의 영역과 함께 소위 "헤어핀" 또는 "줄기-루프" 구조를 형성할 수 있다.

[0156] 일부 실시양태에서, ActRII 수용체를 억제하는 핵산 화합물은 전체 길이 ActRII 수용체 핵산 서열 또는 액티빈 핵산 서열(예를 들면, βA 또는 βB 로서도 지칭되는 액티빈 A 또는 액티빈 B 서브유닛의 핵산 서열)의 1000개 이하, 500개 이하, 250개 이하, 100개 이하, 또는 50개, 35개, 30개, 25개, 22개, 20개 또는 18개 이하의 뉴클레오티드로 구성된 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 상보성 영역은 8개 이상의 뉴클레오티드, 임의적으로 10개 이상 또는 15개 이상의 뉴클레오티드, 임의적으로 15개 내지 25개의 뉴클레오티드일 것이다. 상보성 영역은 표적 전사체의 인트론, 코딩 서열 또는 비-코딩 서열, 예컨대, 코딩 서열 부분 내에 포함될 수 있다. 일반적으로, ActRII 수용체를 억제하는 핵산 화합물은 길이에 있어서 약 8개 내지 약 500개 뉴클레오티드 또는 염기쌍의 길이를 가질 것이고, 임의적으로 상기 길이는 약 14개 내지 약 50개 뉴클레오티드일 것이다. ActRII 수용체를 억제하는 핵산 화합물은 (특히 안티센스로서 사용되는 경우) DNA, RNA, 또는 RNA:DNA 하이브리드일 수 있다. 어느 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물뿐만 아니라, DNA 또는 RNA로서 용이하게 분류될 수 없는 변경된 형태도 포함할 수 있다. 마찬가지로, 이중 가닥 핵산 화합물은 DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA일 수 있고, 어느 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물뿐만 아니라, DNA 또는 RNA로서 용이하게 분류될 수 없는 변경된 형태도 포함할 수 있다.

[0157] ActRII 수용체를 억제하는 핵산 화합물은 골격(천연 핵산에서 뉴클레오티드간 연결을 포함하는 당-포스페이트 부분) 또는 염기 부분(천연 핵산의 퓨린 또는 피리미딘 부분)에 대한 하나 이상의 변경을 포함하는 다양한 변경들 중 임의의 변경을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 핵산 화합물은 약 15개 내지 약 30개 뉴클레오티드의 길이를 가질 것이고, 일부 특성, 예컨대, 혈청에서의 안정성, 세포에서의 안정성, 또는 화합물이 전달될 가능성이 있는 장소, 예컨대, 경구 전달된 화합물의 경우 위 및 흡입된 화합물의 경우 폐에서의 안정성을 개선하기 위한 하나 이상의 변경을 종종 함유할 것이다. RNAi 구축물의 경우, 표적 전사체에 상보적인 가닥은 일반적으로 RNA 또는 이의 변경물일 것이다. 다른 가닥은 RNA, DNA 또는 임의의 다른 변이체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥 또는 단일 가닥 "헤어핀" RNAi 구축물의 이중체 부분은, 이것이 다이서(Dicer) 기질로서 작용하는 한, 길이에 있어서 18개 내지 40개 뉴클레오티드, 임의적으로 길이에 있어서 약 21개 내지 23개 뉴클레오티드의 길이를 가질 수 있다. 촉매 또는 효소 핵산은 리보자임 또는 DNA 효소일 수 있고 변경된 형태도 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, ActRII 수용체를 억제하는 핵산 화합물은 생리학적 조건 하에 넌센스 또는 센스 조절이 영향을 거의 또는 전혀 미치지 않는 농도에서 그의 표적의 발현을 약 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상만큼 억제할 수 있다. 핵산 화합물의 효과를 시험하기 위한 농도는 1, 5 또는 10 마이크로몰 이상을 포함한다.

- [0158] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRII 수용체 억제제는 항체이다. 이러한 항체는 액티빈(특히, βA 또는 βB 로서도 지칭되는 액티빈 A 또는 액티빈 B 서브유닛)에 결합하고 ActRII 수용체 결합을 파괴하는 항체; 및 ActRII 수용체 폴리펩티드(예를 들면, 가용성 ActRIIA 또는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드)에 결합하고 액티빈 결합을 파괴하는 항체를 포함한다.
- [0159] ActRII 수용체 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드로부터 유도된 면역원을 사용함으로써 표준 프로토콜(예를 들면, 문헌(Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)) 참조)로 항-단백질/항-펩티드 항혈청 또는 단일클론 항체를 제조할 수 있다. 포유동물, 예컨대, 마우스, 햄스터 또는 토끼를, 면역원성 형태의 ActRII 수용체 폴리펩티드 항체 반응을 유발할 수 있는 항원성 단편, 또는 융합 단백질로 면역화시킬 수 있다. 단백질 또는 펩티드에게 면역원성을 부여하는 기법은 담체와의 접합, 또는 당분야에서 잘 공지되어 있는 다른 기법을 포함한다. ActRII 수용체 또는 액티빈 폴리펩티드의 면역원성 부분은 항원보강제(adjuvant)의 존재 하에 투여될 수 있다. 혈장 또는 혈청에서 항체 역가를 검출하여 면역의 진행을 모니터링할 수 있다. 항체의 수준을 평가하기 위해 항원으로서 면역원과 함께 표준 ELISA 또는 다른 면역분석을 이용할 수 있다.
- [0160] 동물을 ActRII 수용체 폴리펩티드의 항원성 제제로 면역화시킨 후, 항혈청을 수득할 수 있고 원하는 경우 혈청으로부터 다중클론 항체를 분리할 수 있다. 단일클론 항체를 제조하기 위해, 면역화된 동물로부터 항체 생성 세포(림프구)를 회수할 수 있고 표준 체세포 융합 절차로 불멸화 세포, 예컨대, 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 생성할 수 있다. 이러한 기법은 당분야에서 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 하이브리도마 기법(문헌(Kohler and Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497)의 저자에 의해 최초로 개발됨), 인간 B 세포 하이브리도마 기법(Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72), 및 인간 단일클론 항체를 생성하는 EBV-하이브리도마 기법(Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)을 포함한다. ActRII 수용체 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체의 생성에 대해 하이브리도마 세포를 면역화학적으로 스크리닝할 수 있고 이러한 하이브리도마 세포를 포함하는 배양물로부터 단일클론 항체를 분리할 수 있다.
- [0161] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 본 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 그의 단편도 포함하기 위한 것이다. 통상적인 기법을 이용하여 항체를 단편화할 수 있고, 전체 항체에 대해 전술된 방식과 동일한 방식으로 유용성에 대해 단편을 스크리닝할 수 있다. 예를 들면, 항체를 펩신으로 처리하여 F(ab)2 단편을 발생시킬 수 있다. 생성된 F(ab)2 단편을 처리하여 이황화 가교를 환원시킴으로써 Fab 단편을 생성할 수 있다. 항체는 항체의 하나 이상의 CDR 영역에 의해 부여된 ActRII 수용체 또는 액티빈 폴리펩티드에 대한 친화성을 갖는 이중 특이적 분자, 단일 쇠 분자, 키메라 분자, 인간화된 분자 및 전체 인간 분자도 포함하기 위한 것이다. 항체는 그에 부착되어 검출될 수 있는 표지를 추가로 포함할 수 있다(예를 들면, 표지는 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자일 수 있다).
- [0162] 일부 실시양태에서, 항체는 재조합 항체이고, 이 용어는 CDR-이식된 또는 키메라 항체, 라이브러리-선택된 항체 도메인으로부터 조립된 인간 또는 다른 항체, 단일 쇠 항체 및 단일 도메인 항체(예를 들면, 인간 VH 단백질 또는 낙타 VHH 단백질)를 포함하는, 부분적으로 분자생물학 기법에 의해 생성된 임의의 항체를 포괄한다. 일부 실시양태에서, 항체는 단일클론 항체일 수 있다. 예를 들면, ActRII 수용체 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생성하는 방법은 검출가능한 면역 반응을 자극하기에 효과적인 항원 폴리펩티드를 포함하는 소정량의 면역원성 조성물을 마우스에게 투여하는 단계, 마우스로부터 항체 생성 세포((예를 들면, 비장으로부터의 세포)를 수득하고 항체 생성 세포를 골수종 세포와 융합시켜 항체 생성 하이브리도마를 수득하는 단계, 및 항체 생성 하이브리도마를 시험하여 항원에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일단 수득되면, 세포 배양물, 임의적으로 하이브리도마 유래의 세포가 항원에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생성하는 배양 조건에서 하이브리도마를 증식시킬 수 있다. 세포 배양물로부터 단일클론 항체를 정제할 수 있다.
- [0163] 항체의 언급에서 사용된 어구 "특이적으로 반응하는"는 당분야에서 일반적으로 이해되는 바와 같이 항체가 최소한 특정 종류의 생물학적 샘플에서 관심있는 항원의 존재를 검출하기에 유용할 정도로 관심있는 항원(예를 들면, ActRII 수용체 폴리펩티드)과 관심없는 다른 항원 사이에 충분한 선택성을 갖는다는 것을 의미하기 위한 것이다. 항체를 사용하는 일부 방법, 예컨대, 치료 적용에서, 고도의 결합 특이성이 바람직할 수 있다. 단일클론 항체는 일반적으로 원하는 항원과 교차반응 폴리펩티드를 효과적으로 구별하는 (다중클론 항체에 비해) 더 큰 경향을 갖는다. 항체:항원 상호작용의 특이성에 영향을 미치는 한 특성은 항원에 대한 항체의 친화성이다.

원하는 특이성이 다양한 상이한 친화성과 함께 도달될 수 있지만, 일반적으로 바람직한 항체는 약 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 또는 10^{-9} 이하의 친화성(해리 상수)을 가질 것이다. 액티빈과 ActRII 수용체 사이의 엄청나게 강한 결합을 고려할 때, 중화 항-액티빈 또는 항-ActRII 수용체 항체는 일반적으로 10^{-10} 이하의 해리 상수를 가질 것으로 예상된다.

[0164] 또한, 원하는 항체를 확인하기 위해 항체를 스크리닝하는 데에 이용되는 기법은 수득된 항체의 성질에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들면, 항체가 용액 중의 항체와 결합하기 위해 사용되어야 하는 경우, 용액 결합을 시험하는 것이 바람직할 수 있다. 다양한 상이한 기법들이 항체와 항원 사이의 상호작용을 시험하여 특히 바람직한 항체를 확인하는 데에 이용될 수 있다. 이러한 기법은 ELISA, 표면 플라스몬 공명 결합 분석(예를 들면, 비아코어(Biacore)TM 결합 분석, 비아코어 아베(Biacore AB)(스웨덴 업살라 소재)), 샌드위치 분석(예를 들면, IGEN 인터내셔널 인코포레이티드(IGEN International, Inc.)(미국 매릴랜드주 게이더스버그 소재)의 상자성 비드 시스템), 웨스턴 블롯, 면역침전 분석 및 면역조직화학을 포함한다.

[0165] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRII 수용체 억제제는 대안적 형태의 액티빈을 포함하고, 특히 I형 수용체 결합 도메인에서 변형을 갖는 대안적 형태의 액티빈은 II형 수용체에 결합할 수 있고 활성 삼원 복합체를 형성하지 못할 수 있다. 일부 실시양태에서, 액티빈 A, B, C 또는 E, 또는 특히 ActRII 수용체 발현을 억제하는 핵산, 예컨대, 안티센스 분자, siRNA 또는 리보자임이 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용될 수 있다.

[0166] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRII 수용체 억제제는 인히빈(inhibin)(즉, 인히빈 알파 서브유닛), 폴리스타틴(follistatin)(예를 들면, 폴리스타틴-288 및 폴리스타틴-315), 서버루스(Cerberus), 폴리스타틴 관련 단백질("FSRP"), 엔도글린(endoglin), 액티빈 C, 알파(2)-마크로글로불린, 및 M108A(위치 108에서 알라닌으로의 메티오닌의 변화) 돌연변이체 액티빈 A를 포함하는, ActRII 수용체 길항제 활성을 갖는 비-항체 단백질이다.

[0167] 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRII 수용체 억제제는 액티빈 생체활성을 길항하고/하거나 액티빈에 결합하는 폴리스타틴 폴리펩티드이다. 용어 "폴리스타틴 폴리펩티드"는 임의의 천연 폴리스타틴 폴리펩티드뿐만 아니라 유용한 활성을 보유하는 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체 및 펩티도미메틱을 포함함)도 포함하는 폴리펩티드를 포함하고, 폴리스타틴의 임의의 기능성 단량체 또는 다량체를 추가로 포함한다. 액티빈 결합 성질을 보유하는 폴리스타틴 폴리펩티드의 변이체는 폴리스타틴 및 액티빈 상호작용을 수반하는 종래 연구에 근거하여 확인될 수 있다. 예를 들면, 전체로서 본원에 참고로 포함되는 국제 특허출원 공개 제W02008/030367호는 액티빈 결합에 중요한 것으로 밝혀진 특이적 폴리스타틴 도메인("FSD")을 개시한다. 폴리스타틴 폴리펩티드는 폴리스타틴 폴리펩티드의 서열과 약 80% 이상 동일한, 임의적으로 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 서열을 갖는 임의의 공지된 폴리스타틴 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다. 폴리스타틴 폴리펩티드의 예에는 예를 들면, 전체로서 본원에 참고로 포함되는 국제 특허출원 공개 제W02005/025601호에 기재된 바와 같이 성숙 폴리스타틴 폴리펩티드, 또는 인간 폴리스타틴 전구체 폴리펩티드의 보다 짧은 동형체 또는 다른 변이체가 포함된다.

[0168] 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용되는 ActRII 수용체 억제제는 액티빈 생체활성을 길항하고/하거나 액티빈에 결합하는 폴리스타틴 유사 관련 유전자(FLRG)이다. 용어 "FLRG 폴리펩티드"는 임의의 천연 FLRG 폴리펩티드뿐만 아니라 유용한 활성을 보유하는 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체 및 펩티도미메틱을 포함함)도 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 상용적인 방법을 이용하여 FLRG 및 액티빈 상호작용을 분석함으로써 액티빈 결합 성질을 보유하는 FLRG 폴리펩티드의 변이체를 확인할 수 있다. 예를 들면, 전체로서 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,537,966호를 참조한다. FLRG 폴리펩티드는 FLRG 폴리펩티드의 서열과 약 80% 이상 동일한, 임의적으로 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 서열을 갖는 임의의 공지된 FLRG 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다.

[0169] 일부 실시양태에서, 폴리스타틴 폴리펩티드 및 FLRG 폴리펩티드의 기능성 변이체 또는 변경된 형태는 폴리스타틴 폴리펩티드 또는 FLRG 폴리펩티드의 적어도 부분 및 하나 이상의 융합 도메인, 예를 들면, 상기 폴리펩티드의 단리, 검출, 안정화 또는 다량체화를 용이하게 하는 도메인을 갖는 융합 단백질을 포함한다. 적합한 융합 도메인은 ActRIIA 폴리펩티드 및 ActRIIB 폴리펩티드와 관련하여 위에서 상세히 논의되어 있다. 한 실시양태에서, ActRII 수용체 억제제는 Fc 도메인에 융합된 폴리스타틴 폴리펩티드의 액티빈 결합 부분을 포함하는 융합 단백질이다. 또 다른 실시양태에서, ActRII 수용체 억제제는 Fc 도메인에 융합된 FLRG 폴리펩티드의 액티빈 결

합 부분을 포함하는 융합 단백질이다.

[0170] 1.3 분석

[0171] (a) 진단 분석

[0172] (i) 골 교체

[0173] 골 교체의 다양한 순환 마커들을 사용하여 골 장애, 예컨대, 낮은 골 교체를 진단할 수 있다. 골 교체의 순환 마커는 골 형성의 마커, 예컨대, 골 특이적 알칼리성 포스파타제(bAP), 오스테오칼신, 전구콜라겐 I형 C-말단 전구펩티드(PICP) 및 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1), 골 재흡수의 일부 마커, 예컨대, 피리디놀린, 데옥시피리디놀린, 타트레이트 내성 산 포스파타제(TRAP), TRAP 5b형 및 전구콜라겐 I형 C-말단 텔로펩티드(ICTP), 혈청 또는 소변 콜라겐 교차연결(N-텔로펩티드 또는 C-텔로펩티드), 및 25-하이드록시비타민 D이다. 전체 부갑상선 호르몬(PTH) 분자를 측정하는 분석도 이용할 수 있다. 당업자는 골 미네랄 밀도(BMD)의 평가를 가능하게 하는 영상화 방법을 알고 있다. 예를 들면, 문헌(Tilman B. Drueke and Sharon M. Moe, Disturbances of bone and mineral metabolism in chronic kidney disease: an international initiative to improve diagnosis and treatment, Nephrol Dial Transplant (2004) 19: 534-536); 문헌(Okuno S, Inaba M., Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Dialysis and bone metabolic marker, Clin Calcium. 2009 Aug; 19(8):1084-91); 문헌(Herberth J, Monier-Faugere MC, Mawad HW, Branscum AJ, Herberth Z, Wang G, Cantor T, Malluche HH, The five most commonly used intact parathyroid hormone assays are useful for screening but not for diagnosing bone turnover abnormalities in CKD-5 patients, Clin Nephrol. 2009 Jul; 72(1):5-14); 문헌(Lehmann G, Ott U, Kaemmerer D, Schuetze J, Wolf G., Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in patients with chronic kidney disease Stages 3 - 5, Clin Nephrol. 2008 Oct; 70(4):296-305); 문헌(Drueke TB., Is parathyroid hormone measurement useful for the diagnosis of renal bone disease?, Kidney Int. 2008 Mar; 73(6):674-6); 및 문헌(Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, Shidara K, Imanishi Y, Ishimura E, Nishizawa Y., Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption marker in patients with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction., Clin Endocrinol (Oxf). 2008 Aug; 69(2):189-96. Epub 2008 Jan 23). 문헌(Paul D. Miller, Diagnosis and Treatment of Osteoporosis in Chronic Renal Disease, 2009)도 참조한다.

[0174] 경미한 신장 기능장애를 갖는 CKD 환자에서 골 재흡수를 모니터링하기 위한 또 다른 마커는 I형 콜라겐 N-텔로펩티드(S-NTX)의 혈청 농도이다. 예를 들면, 문헌(Hamano T, Fujii N, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, Okada N, Imai E, Horio M, Ito T., Serum NTX is a practical marker for assessing antiresorptive therapy for glucocorticoid treated patients with chronic kidney disease., Bone. 2006 Nov; 39(5):1067-72. Epub 2006 Jun 16)을 참조한다.

[0175] 정량 컴퓨터 단층촬영(QCT)을 이용하여 골 교체를 측정할 수도 있다.

[0176] (ii) 무력성 골 장애 모델

[0177] 신장 환경에서 무력성 골 질환에 대한 마우스 모델은 2.2 및 2.3 단락에서 사용된 마우스 신장절제 모델, 예컨대, 5/6 신장절제 모델을 사용하는 것이고, 이때 마우스들은 포스페이트가 낮은 정규식을 공급받는다.

[0178] 또 다른 마우스 모델에서 마우스들은 한 신장의 전기소작 및 다른 신장의 신장절제를 받는다. 상기 마우스들은 포스페이트가 낮고 칼시트라이올로 보충된 음식을 공급받는다. 예를 들면, 문헌(Lund et al., 2004, J Am Soc Nephrol 15:349-369)을 참조한다.

[0179] (iii) 골의 테트라사이클린 표지부착

[0180] CKD와 관련된 골 질환의 종류를 확인하기 위해 이용될 수 있는 진단 시험은 이중 테트라사이클린 표지부착을 이용한 장골 능선 골 생검 및 골 조직형태측정 분석이다. 예를 들면, 국립 신장 재단의 NKF KDOQI 지침을 참조한다.

[0181] (iv) 혈관 석회화

[0182] 관상 동맥 석회화(CAC)의 정도를 영상화하기 위한 비-조영 컴퓨터 단층촬영(CT) 및 비-침습 관상 혈관조영(CTA)을 위한 조영 CT는 폐쇄성 관상 질환을 진단하는 데에 일반적으로 이용되는 방법이다. 진단 및 예후 심장 평가를 위한 방사성 핵종 스트레스 검사, 관상 동맥 칼슘 스캐닝 및 비-침습 관상 혈관조영도 이용할 수 있다.

문헌(Berman DS, Shaw LJ, Hachamovitch R, Friedman JD, Polk DM, Hayes SW, Thomson LE, Germano G, Wong ND, Kang X, Rozanski A., Comparative use of radionuclide stress testing, coronary artery calcium scanning, and noninvasive coronary angiography for diagnostic and prognostic cardiac assessment, Semin Nucl Med. 2007 Jan; 37(1):2-16)을 참조한다.

[0183] 무증상 환자로부터의 관상 칼슘 스크리닝 결과를 비교로서 사용할 수 있다. 예를 들면, 혈관 석회화가 신장 질환과 관련되어 있을 때 신장 질환의 발병 전에 수득된 칼슘 스크리닝 결과를 비교로서 사용할 수 있다.

[0184] 관상 동맥 석회화(CAC)를 검출하고 정량하는 가능한 방법은 x-선 컴퓨터 단층촬영 및 심근 관류 단일 광자 방사 컴퓨터 단층촬영(SPECT)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 문헌(Moser KW, O'Keefe JH Jr, Bateman TM, McGhie IA., Coronary calcium screening in asymptomatic patients as a guide to risk factor modification and stress myocardial perfusion imaging, J Nucl Cardiol. 2003 Nov-Dec; 10(6):590-8)을 참조한다. 다중-검출제 컴퓨터 단층촬영(MDCT)을 이용하여 혈관 석회화를 검출할 수도 있다(예를 들면, 문헌(Burrill et al., 2007, Postgrad. Med. J. 83(985):698-704) 참조).

[0185] 혈관 석회화에 대한 또 다른 진단 방법은 병용된 양전자 방사 단층촬영(PET)/컴퓨터 단층촬영(CT)에서 흉부 대 동맥 벽에서의 불소 18 플루오로데옥시글루코스(FDG) 섭취이다. 문헌(Tatsumi M, Cohade C, Nakamoto Y, Wahl RL., Fluorodeoxyglucose uptake in the aortic wall at PET/CT: possible finding for active atherosclerosis, Radiology. 2003 Dec; 229(3):831-7. Epub 2003 Oct 30)을 참조한다.

[0186] 또 다른 실시양태에서, 초고속 CT를 이용하여 죽상경화성 관상 질환의 존재를 검출할 수 있다. 예를 들면, 문헌(Breen JF, Sheedy PF 2nd, Schwartz RS, Stanson AW, Kaufmann RB, Moll PP, Rumberger JA, Coronary artery calcification detected with ultrafast CT as an indication of coronary artery disease, Radiology. 1992 Nov; 185(2):435-9)을 참조한다.

[0187] 전자-빔 컴퓨터 단층촬영 스캐닝을 이용하여 관상 동맥 질환을 진단할 수도 있다. 문헌(Schmermund A, Baumgart D, Sack S, Mohlenkamp S, Gronemeyer D, Seibel R, Erbel R., Assessment of coronary calcification by electron-beam computed tomography in symptomatic patients with normal, abnormal or equivocal exercise stress test, Eur Heart J. 2000 Oct; 21(20):1674-82)을 참조한다.

[0188] 혈관 석회화에 대한 또 다른 검사는 열기형성성 폐 고혈압 및 혈전색전성 폐 고혈압에서 플라크 조성을 평가한다. 만성 혈전색전성 폐 고혈압은 글리코포린 풍부 반유동성 코어를 갖는 죽상경화성 플라크와 관련되어 있고, 열기형성성 폐 고혈압은 섬유성 플라크와 관련되어 있다. 혈전색전성 물질은 반유동성 코어(적혈구 막 유래의 글리코포린이 이의 주요 성분임)의 형성에 있어서 중추적인 역할을 수행한다. 이에 따라, 만성 혈전색전성 폐 고혈압 및 열기형성성 폐 고혈압(일차 및 이차(에이센멘거(Eisenmenger) 증후군))이 연구되고 있다. 문헌(Arbustini E, Morbini P, D'Armini AM, Repetto A, Minzioni G, Piovela F, Viganò M, Tavazzi L, Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation, Heart. 2002 Aug; 88(2):177-82)을 참조한다.

[0189] 침착된 칼슘 플라크의 밀도 측정에 근거한 칼슘 점수화 시스템인 아갓스톤 점수화를 이용하여 혈관 석회화를 정량할 수 있다. 이 시스템에서, 혈관 석회화의 수준을 다중-검출제 컴퓨터 단층촬영(MDCT)로 측정할 수 있고, 아갓스톤 점수에서 진행 속도의 약화를 평가할 수 있다(예를 들면, 문헌(Sharma et al., 2010, Vasc. Health Risk Manag. 6:603-611) 참조).

[0190] 추가로, 문헌(Adragao et al., 2004, Nephrol. Dial. Transplant 19:1480-1488)에 기재된 방법을 이용하여 혈관 석회화를 평가할 수 있다.

[0191] 대상체에서 혈관 석회화를 정량하는 데에 이용되는 또 다른 분석은 관상 동맥 석회화에 대한 CT 검사로부터 비롯된 칼슘 측정 방법을 포함하는 병변 특이적 칼슘 점수이다. 이 방법은 예를 들면, 문헌(Akram and Voros, 2008, Int. J. cardiovasc. Imaging 14:743-749)에 기재되어 있다.

[0192] (v) 신장 질환

[0193] 사구체 여과율을 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법으로 측정하여 신장 질환을 확인할 수 있다. 국립 신장 재단의 웹사이트를 참조한다.

[0194] (vi) 이차 부갑상선항진증

- [0195] 이차 부갑상선항진증은 부갑상선이 너무 낮은 칼슘 수준 또는 증가된 인 수준으로 인해 너무 많은 부갑상선 호르몬(PTH)을 생성할 때 발생한다. 혈액 샘플로부터 칼슘, 인 및 PTH 수준을 측정할 수 있다.
- [0196] **(vii) 고인산혈증**
- [0197] 혈액에서 포스페이트의 비정상적으로 상승된 수준을 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법으로 측정할 수 있다.
- [0198] **(b) 스크리닝 분석**
- [0199] 다양한 ActRII 폴리펩티드 변이체 또는 가용성 ActRII 폴리펩티드 변이체를 ActRII를 억제하는 그의 능력에 대해 시험할 수 있다. 추가로, 화합물을 ActRII를 억제하는 그의 능력에 대해 시험할 수 있다. ActRII 활성의 억제제가 일단 확인되면, 이 화합물을 본원에서 제공된 방법에서 사용할 수 있다. ActRII는 ActRIIA 또는 ActRIIB일 수 있다. 하기 분석들은 ActRIIA에 대해 기재되어 있으나 ActRIIB에 대해 유사하게 수행될 수 있다.
- [0200] 예를 들면, 골 생성 또는 골 파괴에 관여하는 유전자의 발현에 대한 ActRIIA 폴리펩티드 변이체의 효과를 평가할 수 있다. 필요한 경우, 이것을 하나 이상의 재조합 ActRIIA 리간드 단백질(예를 들면, 액티빈)의 존재 하에 수행할 수 있고, ActRIIA 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 및 임의적으로 ActRIIA 리간드를 생성하도록 세포를 형질감염시킬 수 있다. 마찬가지로, ActRIIA 폴리펩티드를 마우스 또는 다른 동물에게 투여할 수 있고, 하나 이상의 골 성질, 예컨대, 밀도 또는 부피를 평가할 수 있다. 골 골절에 대한 치유율도 평가할 수 있다. 이중 에너지 x-선 흡수측정(DEXA)은 동물에서 골 밀도를 평가하는 잘 확립된 비-침습적 정량 기법이다. 인간에서, 중추 DEXA 시스템을 이용하여 척추 및 골반에서 골 밀도를 평가할 수 있다. 이들은 전체 골 밀도의 가장 우수한 예측자이다. 말초 DEXA 시스템을 이용하여 예를 들면, 손, 허리, 발목 및 발의 골을 포함하는 말초 골에서 골 밀도를 평가할 수 있다. CAT 스캔을 포함하는 전통적인 x-선 영상화 시스템을 이용하여 골 성장 및 골절 치유를 평가할 수 있다. 추가로, 정량 컴퓨터 단층촬영(qCT)을 이용하여 골 밀도를 측정할 수 있다. 골의 기계적 강도도 평가할 수 있다.
- [0201] 일부 양태에서, 본원은 액티빈-ActRIIA 신호전달 경로의 작용제 또는 길항제인 화합물(물질)을 확인하기 위한 ActRIIA 폴리펩티드(예를 들면, 가용성 ActRIIA 폴리펩티드) 및 액티빈 폴리펩티드의 용도를 제공한다. 이 스크리닝을 통해 확인된 화합물들을 시험하여 시험관내에서 골 성장 또는 미네랄화를 조절하는 그들의 능력을 평가할 수 있다. 임의적으로, 이들 화합물들을 동물 모델에서 시험하여 생체내에서 조직 성장을 조절하는 그들의 능력을 평가할 수도 있다.
- [0202] 액티빈 및 ActRIIA 폴리펩티드를 표적화함으로써 조직 성장을 조절하는 치료제를 스크리닝하는 다수의 방법들이 존재한다. 일부 실시양태에서, 화합물의 고처리율 스크리닝을 수행하여 골에 대한 액티빈 또는 ActRIIA 매개 효과를 방해하는 물질을 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 분석을 수행하여 ActRIIA 폴리펩티드와 액티빈의 결합을 특이적으로 억제하거나 감소시키는 화합물을 스크리닝하고 확인한다. 대안적으로, 상기 분석을 이용하여 ActRIIA 폴리펩티드와 액티빈의 결합을 향상시키는 화합물을 확인할 수 있다. 추가 실시양태에서, 화합물들을 액티빈 또는 ActRIIA 폴리펩티드와 상호작용하는 그들의 능력으로 확인할 수 있다.
- [0203] 다양한 분석 포맷들이 충분할 것이지만, 그럼에도 불구하고 본 개시내용에 비추어 볼 때, 본원에 명확히 기재되지 않은 분석 포맷들이 당업자에 의해 인식될 것이다. 본원에 기재된 바와 같이, 본원에서 사용된 시험 화합물(물질)은 임의의 조합 화학적 방법에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 본 화합물은 생체내에서 또는 시험관내에서 합성된 천연 생체분자일 수 있다. 조직 성장의 조절제로서 작용하는 능력에 대해 시험되는 화합물(물질)은 예를 들면, 세균, 효모, 식물 또는 다른 유기체에 의해 생성될 수 있거나(예를 들면, 천연 생성물), 화학적으로 생성될 수 있거나(예를 들면, 펩티도미메틱을 비롯한 소분자), 또는 재조합적으로 생성될 수 있다. 본원에서 고려되는 시험 화합물은 비-펩티딜 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티도미메틱, 당, 호르몬 및 핵산 분자를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 시험 물질은 약 2,000 달톤 미만의 분자량을 갖는 유기 소분자이다.
- [0204] 시험 화합물은 단일 별개의 물질로서 제공될 수 있거나, 예컨대, 조합 화학에 의해 제조된 보다 복잡한 라이브러리로 제공될 수 있다. 이 라이브러리는 예를 들면, 알코올, 알킬 할라이드, 아민, 아마이드, 에스터, 알데하이드, 에테르 및 다른 클래스의 유기 화합물을 포함할 수 있다. 시험 화합물은 특히 초기 스크리닝 단계에서 단리된 형태 또는 화합물들의 혼합물로서 시험 시스템에 제공될 수 있다. 임의적으로, 화합물은 다른 화합물로 유도체화될 수 있고, 화합물의 단리를 용이하게 하는 유도체화 기를 가질 수 있다. 유도체화 기의 비-한정적인 예에는 바이오틴, 플루오레세인, 다이곡시게닌, 녹색 형광 단백질, 동위원소, 폴리히스티딘, 자성 비드, 글루타

티온 S 트랜스퍼라제(GST), 광활성화가능한 가교연결제 또는 이들의 임의의 조합물이 포함된다.

- [0205] 화합물 및 천연 추출물의 라이브러리를 시험하는 많은 약물 스크리닝 프로그램에서, 주어진 시간 이내에 조사되는 화합물의 수를 최대화하기 위해 고처리율 분석이 바람직할 수 있다. 예컨대, 정제된 또는 반정제된 단백질로 유도될 수 있는 세포 무함유 시스템에서 수행되는 분석들은 이들이 시험 화합물에 의해 매개되는 분자 표적의 변경의 신속한 현상 및 상대적으로 용이한 검출을 허용하도록 발생될 수 있다는 점에서 종종 "일차" 스크린으로서 선호된다. 더욱이, 시험 화합물의 세포 독성 또는 생체이용가능성의 효과를 시험관내 시스템에서 일반적으로 무시할 수 있고, 대신에 상기 분석은 ActRIIA 폴리펩티드와 액티빈 사이의 결합 친화성의 변경에서 나타날 수 있는 분자 표적에 대한 약물의 효과에 주로 초점을 맞춘다.
- [0206] 단지 예시하기 위해, 예시적인 스크리닝 분석에서, 관심있는 화합물을 액티빈에 통상적으로 결합할 수 있는 단리되고 정제된 ActRIIA 폴리펩티드와 접촉시킨다. 그 다음, ActRIIA 리간드를 함유하는 조성물을 상기 화합물과 ActRIIA 폴리펩티드의 혼합물에 첨가한다. ActRIIA/액티빈 복합체의 검출 및 정량은 ActRIIA 폴리펩티드와 액티빈 사이의 복합체 형성을 억제하는(또는 증강시키는) 데에 있어서 화합물의 효능을 측정하기 위한 수단을 제공한다. 다양한 농도의 시험 화합물을 사용하여 수득한 데이터로부터 용량 반응 곡선을 발생시킴으로써 화합물의 효능을 평가할 수 있다. 나아가, 대조 분석을 수행하여 비교를 위한 기준을 제공할 수도 있다. 예를 들면, 대조 분석에서, 단리되고 정제된 액티빈을 ActRIIA 폴리펩티드 함유 조성물에 첨가하고, ActRIIA/액티빈 복합체의 형성을 시험 화합물의 부재 하에 정량한다. 일반적으로 반응물이 혼합될 수 있는 순서가 달라질 수 있고 동시에 혼합될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 더욱이, 정제된 단백질 대신에 세포 추출물 및 용해물을 사용하여 적합한 세포 무함유 분석 시스템을 만들 수 있다.
- [0207] ActRIIA 폴리펩티드와 액티빈 사이의 복합체 형성을 다양한 기법들로 검출할 수 있다. 예를 들면, 복합체 형성의 조절은 예를 들면, 검출가능하게 표지된 단백질, 예컨대, 방사성 표지부착된(예를 들면, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C 또는 ³H), 형광 표지부착된(예를 들면, FITC) 또는 효소 표지부착된 ActRIIA 폴리펩티드 또는 액티빈의 사용에 의해, 면역분석에 의해, 또는 크로마토그래피 검출에 의해 정량될 수 있다.
- [0208] 일부 실시양태에서, ActRIIA 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 상호작용 정도를 직접적으로 또는 간접적으로 측정하는 데에 있어서 형광 편광 분석 및 형광 공명 에너지 전달(FRET) 분석의 사용이 본원에서 고려된다. 추가로, 다른 검출 방식, 예컨대, 광학 파장(국제 특허출원 공개 제WO96/26432호 및 미국 특허 제5,677,196호), 표면 플라즈몬 공명(SPR), 표면 전하 센서 및 표면 힘 센서에 근거한 검출 방식이 본원에 기재된 많은 실시양태들과 양립가능하다.
- [0209] 나아가, "투 하이브리드(two hybrid) 분석"으로서도 공지되어 있는 상호작용 포획 분석을 이용하여 ActRIIA 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 상호작용을 파괴하거나 증강시키는 물질을 확인할 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,283,317호; 문헌(Zervos et al., (1993) Cell 72:223-232); 문헌(Madura et al., (1993) J Biol Chem 268:12046-12054); 문헌(Bartel et al., (1993) Biotechniques 14:920-924); 및 문헌(Iwabuchi et al., (1993) Oncogene 8:1693-1696)을 참조한다. 구체적인 실시양태에서, ActRIIA 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 상호작용을 해리시키는 화합물(예를 들면, 소분자 또는 펩티드)을 확인하기 위한 역(reverse) 투 하이브리드 시스템의 사용이 본원에서 고려된다. 예를 들면, 문헌(Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29); 문헌(Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81); 및 미국 특허 제5,525,490호, 제5,955,280호 및 제5,965,368호를 참조한다.
- [0210] 일부 실시양태에서, 본 화합물은 ActRIIA 또는 액티빈 폴리펩티드와 상호작용하는 그의 능력에 의해 확인된다. 상기 화합물과 ActRIIA 또는 액티빈 폴리펩티드 사이의 상호작용은 공유 또는 비-공유 상호작용일 수 있다. 예를 들면, 광-가교연결, 방사성 표지부착된 리간드 결합 및 친화성 크로마토그래피를 포함하는 시험관내 생화학적 방법을 이용하여 이러한 상호작용을 단백질 수준에서 확인할 수 있다(Jakoby W B et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). 일부 경우, 기작에 근거한 분석, 예컨대, 액티빈 또는 ActRIIA 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 검출하는 분석에서 화합물을 스크리닝할 수 있다. 이것은 고체상 또는 유체상 결합 사건을 포함할 수 있다. 대안적으로, 레포터 시스템(예를 들면, β -갈락토시다제, 루시페라제 또는 녹색 형광 단백질)을 사용하여 액티빈 또는 ActRIIA 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 세포 내로 형질감염시킬 수 있고, 바람직하게는 고처리율 스크리닝 또는 라이브러리의 개별 구성원으로 라이브러리에 대해 스크리닝할 수 있다. 기작에 근거한 다른 결합 분석, 예를 들면, 자유 에너지의 변화를 검출하는 결합 분석을 이용할 수 있다. 웰, 비드 또는 칩에 고정된, 또는 고정된 항체에 의해 포획된, 또는 모세관 전기영동에 의해 해상된 표적을 사용하여 결합 분석을 수행할 수 있다. 통상적으로 비색, 형광 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 결합된 화합물을 검출할 수

있다.

- [0211] 일부 양태에서, 본원은 골 형성을 조절(자극 또는 억제)하고 골 질량을 증가시키는 방법 및 물질을 제공한다. 따라서, 확인된 임의의 화합물을 전체 세포 또는 조직에서, 시험관내에서 또는 생체내에서 시험하여 골 성장 또는 미네랄화를 조절하는 그의 능력을 확인할 수 있다. 당분야에서 공지되어 있는 다양한 방법들이 이 목적을 위해 이용될 수 있다. 특히, 골 교체를 증가시키는 능력에 대해 화합물을 시험할 수 있다.
- [0212] 예를 들면, 세포-기체 분석에서 Msx2의 유도 또는 조골세포로의 골전구체 세포의 분화를 측정함으로써 골 또는 연골 성장에 대한 ActRIIA 또는 액티빈 폴리펩티드 또는 시험 화합물의 효과를 측정할 수 있다(예를 들면, 문헌(Daluiski et al., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino et al., Front Biosci. 2004, 9:1520-9) 참조). 세포-기체 분석의 또 다른 예에는 중간엽 전구체 세포 및 조골세포에서 본 ActRIIA 또는 액티빈 폴리펩티드 및 시험 화합물의 골생성 활성을 분석하는 것이 포함된다. 예시하기 위해, 액티빈 또는 ActRIIA 폴리펩티드를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 구축하여 다분화능 중간엽 전구체 C3H10T1/2 세포, 전구조골 C2C12 세포 및 조골 TE-85 세포를 감염시킬 수 있다. 그 다음, 알칼리성 포스파타제, 오스테오칼신 및 매트릭스 미네랄화의 유도를 측정함으로써 골생성 활성을 측정한다(예를 들면, 문헌(Cheng et al., J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52) 참조).
- [0213] 본원은 골 또는 연골 성장을 측정하는 생체내 분석도 제공한다. 예를 들면, 문헌(Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001))은 골절 후 초기 동안 골 회복이 연구되는 래트 골다공증 모델을 개시한다. 문헌(Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999))도 골절 후 후기 동안 골 회복이 연구되는 래트 골다공증 모델을 개시한다. 문헌(Andersson et al., J. Endocrinol. 170:529-537)은 마우스가 난소 절제되고, 이것이 섬유주 골로 하여금 약 50%의 골 미네랄 밀도를 손실하게 하면서 마우스로 하여금 상당한 골 미네랄 함량 및 골 미네랄 밀도를 손실하게 하는 마우스 골다공증 모델을 기술한다. 골 밀도는 인자, 예컨대, 부갑상선 호르몬의 투여에 의해 난소절제된 마우스에서 증가될 수 있다. 일부 양태에서, 당분야에서 공지되어 있는 골절 치유 분석을 이용할 수 있다. 이 분석은 예를 들면, 골절을 야기할 뿐만 아니라 골절의 정도를 측정하기 위한 실험 프로토콜, 및 회복 과정의 개시내용에 대해 전체로서 참고로 도입되는 미국 특허 제6,521,750호에 기재되어 있는 골절 기법, 조직학적 분석 및 생체기계적 분석을 포함한다.
- [0214] **1.4 용량**
- [0215] 본원은 CKD-MBD 및/또는 낮은 교체 골 질환을 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 ActRII 억제제를 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다(1.2 단락 참조). 일부 실시양태에서, ActRII 억제제는 1.2(a) 단락에 기재된 ActRIIA 억제제이다. 다른 실시양태에서, ActRII 억제제는 1.2(b)에 기재된 ActRIIB 억제제이다. 일부 실시양태에서, ActRII 억제제는 ActRIIA 억제제와 ActRIIB 억제제의 조합물이다.
- [0216] 일부 실시양태에서, 치료 유효량의 ActRII 억제제는 CKD-MBD의 한 증상을 호전시키기에 충분하다. 일부 실시양태에서, 치료 유효량의 ActRII 억제제는 CKD-MBD의 하나 이상의 증상이 악화되는 것을 예방하기에 충분하다.
- [0217] 일부 실시양태에서, 치료 유효량의 ActRII 억제제는 신장 기능을 개선하거나 안정화시킨다. 신장 기능은 사구체 여과율에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, 1.4(a)(iv) 단락을 참조한다. 일부 실시양태에서, ActRII 억제제의 치료 유효량은 ActRII 억제제를 사용한 치료 지속기간 및 3개월, 6개월, 9개월 또는 12개월 이상 동안 CKD-MBD 환자의 사구체 여과율을 안정화시키기에 충분한 1일 용량이다. 일부 실시양태에서, ActRIIA 억제제의 치료 유효량은 사구체 여과율을 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이상만큼 증가시키기에 충분한 1일 용량이다.
- [0218] 일부 실시양태에서, ActRII 억제제의 치료 유효량은 환자에서 적혈구 세포 수준 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시킨다.
- [0219] 일부 실시양태에서, ActRII 억제제의 치료 유효량은 (a) 환자에서 적혈구 세포 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시키고; (b) 환자에서 골의 질 및/또는 골의 미네랄 밀도를 개선하고; (c) 환자에서 신장 기능을 개선하기에 효과적이다.
- [0220] 일부 실시양태에서, ActRII 억제제의 치료 유효량은 (a) 환자에서 적혈구 세포 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시키고; (b) 환자에서 골 교체를 증가시키고; (c) 환자에서 신장 기능을 개선하기에 효과적이다.
- [0221] 일부 실시양태에서, ActRII 억제제는 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 이상의 혈청 농도를 달성하기에 충분한 간격 및 양으로 투약되고, 1 또는 2 $\mu\text{g/kg}$ 이상의 혈청 수준이 골 밀도 및 강도에 대한 유의한 효과를 달성하는 데에 바람직할 수 있

다. 투약 요법은 0.2 내지 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 임의적으로 1 내지 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 혈청 농도에 도달하도록 디자인될 수 있다. 인간에서, 0.1 mg/kg 이상의 단회 용량으로 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 혈청 수준을 달성할 수 있고, 0.3 mg/kg 이상의 단회 용량으로 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 혈청 수준을 달성할 수 있다. 분자의 관찰된 혈청 반감기는 대다수의 Fc 융합 단백질들보다 실질적으로 더 긴 약 20일 내지 30일이므로, 예를 들면, 0.2 내지 0.4 mg/kg을 매주 또는 2주마다 투약함으로써 지속된 효과적인 혈청 수준을 달성할 수 있거나, 투약 사이의 보다 긴 간격과 함께 보다 높은 용량을 사용할 수 있다. 예를 들면, 1 내지 3 mg/kg의 용량을 매달 또는 2개월마다 사용할 것이고, 골에 대한 효과는 투약이 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 9개월 또는 12개월 이상마다 1회만 필요할 정도로 충분히 지속될 수 있다.

[0222] 1.5 약학 조성물

[0223] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위해 액티브-ActRII 길항제(예를 들면, ActRII 폴리펩티드)를 약학적으로 허용가능한 담체로 제제화한다. 예를 들면, ActRII 폴리펩티드를 단독으로 투여할 수 있거나 약학 제제(치료 조성물)의 성분으로서 투여할 수 있다. 본 화합물을 인간 또는 수의학 의약에서 사용하기 위해 임의의 편리한 방식으로 투여용으로 제제화할 수 있다. ActRII는 ActRIIA 또는 ActRIIB일 수 있다.

[0224] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 치료 방법은 조성물을 전신적으로, 또는 이식물 또는 장치로서 국소적으로 투여하는 단계를 포함한다. 투여될 때, 본원에서 사용된 치료 조성물은 발열원 무함유 생리학적으로 허용가능한 형태로 존재할 수 있다. 전술된 조성물에 임의적으로 포함될 수도 있는, ActRIIA 길항제 이외의 치료적으로 유용한 물질은 본 화합물(예를 들면, ActRII 폴리펩티드, 예컨대, ActRIIA 폴리펩티드 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드)와 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다(1.2 단락 참조).

[0225] 전형적으로, ActRIIA 길항제는 비경구 투여될 것이다. 비경구 투여에 적합한 약학 조성물은 항산화제, 완충제, 정균제, 제제가 의도된 수용자의 혈액에 대한 등장성을 띠게 만드는 용질, 현탁제 또는 증점제를 함유할 수 있는, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 멸균 등장성 수성 또는 비-수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액, 또는 사용 직전에 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 함께 하나 이상의 ActRII 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 방법에서 사용되는 약학 조성물에서 사용될 수 있는 적합한 수성 담체 및 비-수성 담체의 예에는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대, 올리브유, 및 주사가 가능한 유기 에스터, 예컨대, 에틸 올레레이트가 포함된다. 적절한 유동성은 예를 들면, 코팅 물질, 예컨대, 레시틴의 사용, 분산액의 경우 요구된 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0226] 추가로, 조성물은 표적 조직 부위(예를 들면, 골)로 전달될 형태로 캡슐화될 수 있거나 주사될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에서 사용되는 조성물은 하나 이상의 치료 화합물(예를 들면, ActRIIA 폴리펩티드)을 표적 조직 부위(예를 들면, 골)로 전달할 수 있고 발달 조직을 위한 구조를 제공할 수 있고 최적으로 신체 내로 재흡수될 수 있는 매트릭스를 포함할 수 있다. 예를 들면, 매트릭스는 ActRIIA 폴리펩티드의 서방출을 제공할 수 있다. 이러한 매트릭스는 다른 이식되는 의학 제품을 위해 현재 사용되는 물질로 형성될 수 있다.

[0227] 매트릭스 물질의 선택은 생체적합성, 생체분해성, 기계적 성질, 미용 외관 및 계면 성질에 근거한다. 본 조성물의 구체적인 적용은 적절한 제제를 한정할 것이다. 상기 조성물을 위한 잠재적 매트릭스는 생체분해가능할 수 있고 화학적으로 정의된 칼슘 설페이트, 트라이칼슘 포스페이트, 하이드록시아파타이트, 폴리락트산 및 폴리무수물일 수 있다. 다른 잠재적 물질은 생체분해가능하고 생물학적으로 잘 정의된 물질, 예컨대, 골 및 피부 콜라겐이다. 추가 매트릭스는 순수한 단백질 또는 세포외 매트릭스 성분으로 구성된다. 다른 잠재적 매트릭스는 생체분해가능하고 화학적으로 정의된 물질, 예컨대, 소결된 하이드록시아파타이트, 생체유리, 알루미네이트 또는 다른 세라믹이다. 매트릭스는 상기 언급된 종류의 물질들 중 임의의 물질들, 예컨대, 폴리락트산과 하이드록시아파타이트, 또는 콜라겐과 삼칼슘 포스페이트의 조합물로 구성될 수 있다. 생체세라믹은 조성, 예컨대, 칼슘-알루미네이트-포스페이트, 및 공극 크기, 입자 크기, 입자 형태 및 생체분해가능성을 변경시키기 위한 프로세싱에서 변경될 수 있다.

[0228] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에서 사용되는 조성물은 예를 들면, 예정된 양의 약제를 활성 성분으로서 각각 함유하는 캡슐제, 카세제, 환제, 정제, 로젠지(풍미 기제, 통상적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸스를 사용함), 산제, 과립제, 수성 또는 비-수성 액체 중의 용액 또는 현탁액, 수중유 또는 유중수 액체 유화액, 엘릭시르 또는 시럽, 또는 향정(불활성 기제, 예컨대, 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아를 사용함) 및/또는 구강 세척제 등의 형태로 경구 투여될 수 있다. 약제는 볼루스, 연약 또는 페이스트로서 투여될 수도 있다.

- [0229] 경구 투여를 위한 고체 제형(캡슐제, 정제, 환제, 당의정, 산제, 과립제 등)에서, 본원에 기재된 방법에서 사용되는 하나 이상의 치료 화합물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대, 나트륨 시트레이트 또는 이 칼슘 포스페이트, 및/또는 하기 물질들 중 임의의 물질과 혼합될 수 있다: (1) 충전제 또는 증량제, 예컨대, 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산; (2) 결합제, 예를 들면, 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 보습제, 예컨대, 글리세롤; (4) 붕해제, 예컨대, 한천-한천, 칼슘 카보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 일부 실리케이트 및 나트륨 카보네이트; (5) 용액 지연제, 예컨대, 파라핀; (6) 흡수 가속화제, 예컨대, 4급 암모늄 화합물; (7) 습윤화제, 예를 들면, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예컨대, 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대, 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트, 및 이들의 혼합물; 및 (10) 착색제. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우, 약학 조성물은 완충제도 포함할 수 있다. 유사한 종류의 고체 조성물은 락토스 또는 유당과 같은 부형제뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하는 연질-충진된 젤라틴 캡슐제 및 경질-충진된 젤라틴 캡슐제에서 충전제로서 사용될 수도 있다.
- [0230] 경구 투여용 액체 제형은 약학적으로 허용가능한 유화액, 미세유화액, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 액체 제형은 활성 성분 이외에 당분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예컨대, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참깨유), 글리세롤, 테트라하이드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스터, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 경구 조성물은 불활성 희석제 이외에 보조제, 예컨대, 습윤화제, 유화제, 현탁제, 감미제, 풍미제, 착색제, 방항제 및 보존제도 포함할 수 있다.
- [0231] 현탁액은 활성 화합물 이외에 현탁제, 예컨대, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 및 소르비탄 에스터, 미세결정성 셀룰로스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸스, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0232] 본원에 기재된 방법에서 사용되는 조성물은 보조제, 예컨대, 보존제, 습윤화제, 유화제 및 분산제도 함유할 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 포함에 의해 보장될 수 있다. 등장제, 예컨대, 당, 나트륨 클로라이드 등을 조성물 내에 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 추가로, 주사가 가능한 약학 제형의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 물질, 예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 포함에 의해 달성될 수 있다.
- [0233] 투약 요법은 본원에 기재된 방법에서 사용되는 본 화합물(예를 들면, ActRII 폴리펩티드, 예컨대, ActRIIA 폴리펩티드 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드(1.2 단락 참조))의 작용을 변경시키는 다양한 인자들을 고려하여 주치의에 의해 결정될 것이라는 것이 이해된다. 상기 다양한 인자들은 형성하고자 하는 골 중량의 양, 골 밀도 손실의 정도, 골 손상의 부위, 손상된 골의 상태, 환자의 연령, 성별 및 식습관, 골 손실에 기여할 수 있는 임의의 질환의 중증도, 투여 시간, 및 다른 임상 인자를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 임의적으로, 용량은 재구성에서 사용되는 매트릭스의 종류, 및 조성물 중의 화합물의 종류에 따라 달라질 수 있다. 최종 조성물물의 다른 공지된 성장 인자의 첨가도 용량에 영향을 미칠 수 있다. 진행은 골 성장 및/또는 회복의 주기적 평가, 예를 들면, x-선(DEXA를 포함함), 조직형태측정 및 테트라사이클린 표지부착에 의해 모니터링될 수 있다.
- [0234] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 ActRII 폴리펩티드의 생체내 생성을 위한 유전자 요법을 포함한다. 이러한 요법은 상기 나열된 장애를 갖는 세포 또는 조직 내로 ActRII 폴리뉴클레오티드 서열을 도입함으로써 그 치료 효과를 달성할 것이다. 재조합 발현 벡터, 예컨대, 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산 시스템을 사용하여 ActRII 폴리뉴클레오티드 서열의 전달을 달성할 수 있다. 표적화된 리포솜의 사용이 ActRII 폴리뉴클레오티드 서열의 치료 전달을 위해 바람직하다. ActRII 폴리펩티드는 ActRIIA 폴리펩티드 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드일 수 있다(1.2 단락 참조).
- [0235] 본원에 교시된 바와 같이 유전자 요법을 위해 사용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터들은 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 백시니아 또는 바람직하게는 RNA 바이러스, 예컨대, 레트로바이러스를 포함한다. 바람직하게는, 레트로바이러스 벡터는 무린 또는 조류 레트로바이러스의 유도체이다. 단일 외래 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 예에는 몰로니 무린 백혈병 바이러스(MoMuLV), 하베이(Harvey) 무린 육종 바이러스(HaMuSV), 무린 유전 종양 바이러스(MuMTV), 및 라우스 육종 바이러스(RSV)가 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 다수의 추가 레트로바이러스 벡터들이 다수의 유전자들을 도입할 수 있다. 모든 이들 벡터들은 형질 도입된 세포가 확인될 수 있고 발생될 수 있도록 선택 마커에 대한 유전자를 전달할 수 있거나 도입할 수 있다.

예를 들면, 당, 당지질 또는 단백질을 부착시킴으로써 레트로바이러스 벡터가 표적 특이성을 갖게 할 수 있다. 항체를 사용하여 바람직한 표적화를 달성한다. 당업자는 특정 폴리뉴클레오티드 서열을 레트로바이러스 게놈 내로 삽입하거나 바이러스 외피에 부착시켜, ActRIIA 폴리뉴클레오티드를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적 전달을 가능하게 할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 벡터는 골 또는 연골로 표적화된다.

[0236] 대안적으로, 통상적인 칼슘 포스페이트 형질감염으로 레트로바이러스 구조 유전자 gag, pol 및 env를 코딩하는 플라스미드를 사용하여 조직 배양 세포를 직접 형질감염시킬 수 있다. 그 다음, 관심있는 유전자를 함유하는 벡터 플라스미드를 사용하여 이들 세포를 형질감염시킨다. 생성된 세포는 레트로바이러스 벡터를 배양 배지 내로 방출한다.

[0237] ActRIIA 폴리뉴클레오티드에 대한 또 다른 표적화된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 및 지질 기체 시스템(수중유 유화액, 마이셀, 혼합된 마이셀 및 리포솜을 포함함)을 포함한다. 사용될 수 있는 한 콜로이드성 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 시험 관내에서 및 생체내에서 전달 비히클로서 유용한 인공 막 소포이다. RNA, DNA 및 온전한 비리온은 수성 내부에 캡슐화될 수 있고 생물학적 활성 형태로 세포에게 전달될 수 있다(예를 들면, 문헌(Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981) 참조). 리포솜 비히클을 사용한 효율적인 유전자 전달 방법은 당분야에서 공지되어 있다(예를 들면, 문헌(Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988) 참조). 리포솜의 조성은 통상적으로 스테로이드, 특히 콜레스테롤과 조합된, 통상적으로 인지질들의 조합이다. 다른 인지질 또는 다른 지질도 사용될 수 있다. 리포솜의 물리적 특성은 pH, 이온 강도 및 2가 양이온의 존재에 의해 좌우된다.

[0238] 리포솜 생성에 유용한 지질의 예에는 포스파티딜 화합물, 예컨대, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 스펅고지질, 세레브로사이드 및 강글리오사이드가 포함된다. 예시적인 인지질은 알 포스파티딜콜린, 다이팔미토일포스파티딜콜린 및 다이스테아로일포스파티딜콜린을 포함한다. 예를 들면, 장기 특이성, 세포 특이성 및 세포소기관 특이성에 근거한 리포솜의 표적화도 가능하고 당분야에서 공지되어 있다.

[0239] 일부 실시양태에서, ActRIIA 억제제는 약학 조성물에서 실질적으로 순수하다. 구체적으로, 약학 조성물에서 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.1% 또는 0.05% 이하의 화합물이 ActRII 억제제 및 약학적으로 허용가능한 담체 이외의 화합물이다.

[0240] 2. 실시예

[0241] 2.1 실시예 1

[0242] (a) ActRIIA-Fc 융합 단백질

[0243] 최소 연결제에 의해 인간 또는 마우스 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIA의 세포외 도메인을 갖는 가용성 ActRIIA 융합 단백질이 기재되어 있다. 상기 구축물은 각각 ActRIIA-hFc 및 mActRIIA-Fc로서 지칭된다. ActRIIA-hFc는 서열번호 7로서 제공되어 있다. mActRIIA-Fc는 서열번호 7의 무린 대응물이다.

[0244] ActRIIA-hFc 및 mActRIIA-Fc 단백질을 CHO 세포주에서 발현시켰다. 3개의 상이한 리더 서열들을 고려하였다:

[0245] (i) 꿀벌 멜리틴(HBML): 서열번호 8

[0246] (ii) 조직 플라스미노겐 활성화제(TPA): 서열번호 9

[0247] (iii) 천연 ActRIIA: 서열번호 10

[0248] 선택된 형태는 TPA 리더를 사용하고 서열번호 13에 기재된 하기 프로세싱되지 않은 아미노산 서열을 갖는다. 이 폴리펩티드는 서열번호 14에 의해 코딩된다.

[0249] (b) ActRIIB-Fc 융합 단백질

[0250] 인간 Fc 도메인 및 액티빈에 융합된 인간 ActRIIB의 세포외 도메인의 공-결정 구조는 리간드 결합에 있어서 상기 세포외 도메인의 최종(C-말단) 15개 아미노산(본원에서 "꼬리"로서 지칭됨)에 대한 어떠한 역할도 보여주지 않았다. 이 서열은 결정 구조를 설명하지 못하였는데, 이것은 이들 잔기들이 결정에서 균일하게 패킹되지 않은 유연성 루프에 존재한다는 것을 암시한다(Thompson et al., EMBO J. 2003 Apr 1; 22(7):1555-66). 또한, 이 서열은 ActRIIB와 ActRIIA 사이에 잘 보존되어 있지 않다. 따라서, 이들 잔기들은 기본 또는 배경 ActRIIB-Fc 융합 구축물에서 누락되었다. 추가로, A64R 대립형질이 천연적으로 발생하지만, 배경 형태에서 위치 64는 알라

닌에 의해 점유되고, 이것은 일반적으로 "야생형" 형태로서 간주된다. 따라서, 배경 ActRIIB-Fc 융합체는 서열 번호 21로서 개시된 서열을 갖는다.

[0251] 놀랍게도, C-말단 꼬리는 액티빈 및 GDF-11 결합을 향상시키는 것으로 발견되었으므로, ActRIIB-Fc의 바람직한 버전은 서열번호 20의 서열을 갖는다.

[0252] 본원에 기재된 방법에 따라 사용될 수 있는 다양한 ActRIIB 변이체들이 전체로서 본원에 참고로 도입되는 국제 특허출원 공개 제W02006/012627호(예를 들면, 제59면 및 제60면 참조)에 기재되어 있다.

[0253] 2.2 만성 신장 질환의 마우스 모델에서 mActRIIA 억제제의 효과

[0254] 이 연구는 최소 연결체를 통해 마우스 Fc에 융합된 가용성 마우스 ActRIIA(서열번호 15)가 만성 신장 질환 및 CKD-MBD의 마우스 모델에서 혈액 및 골 파라미터의 치료에 미치는 효과를 연구하기 위해 디자인되었다.

[0255] 만성 신장 질환(CKD)을 갖는 환자는 빈혈을 갖게 될 수 있고 골감소증도 갖게 될 수 있다. 부분적 신장절제(5/6 신장절제)를 갖는 마우스들을 CKD의 모델로서 사용하여 이 모델에서 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 효과를 시험하였다. 마우스들은 1) 한 신장을 완전히 제거하고, 2) 남은 신장에서 3개의 신장 동맥들 중 2개의 신장 동맥을 연결시키기 위해 2종의 수술을 제공받았다. 모의 수술을 받은 마우스들도 대조군으로서 포함시켰다. 모의 또는 5/6 신장절제 수술을 찍은 라보라토리스(Jackson Laboratories)에서 수행하였다.

[0256] 마우스들을 제공받은 후, 연구의 지속기간 동안 고지방 정규식을 이들에게 공급하였다. 최종 수술로부터 2주 후, 마우스들을 군들(모의군 및 CKD 군)로 나누고 8주 동안 주 당 2회 10 mg/kg의 비히클(PBS) 또는 mActRIIA-Fc를 사용하는 투약을 시작하였다. 빈혈을 평가하기 위해 연구 동안 완전한 혈액 카운트(CBC)를 주기적으로 수행하였다.

[0257] 이중 에너지 x-선 흡수측정(DEXA, PIXIMus)을 이용하여 골 미네랄 밀도를 측정하였다. 연구의 말기에 부검을 수행하여 뒷다리 및 주요 장기의 장골을 채취하였다. 조직학 프로세싱 및 H&E 또는 트라이크롬 염료를 사용한 염색을 위해 남은 신장을 보냈다. 대퇴골을 uCT(스캔코(Scanco))로 스캐닝하여 골 미세구조를 확인하였다.

[0258] 마우스들은 연구 기간 전체에 걸쳐 정상 상태이고 건강한 것으로 보였고 연구가 진행됨에 따라 체중이 증가하였다(도 1). 골 미네랄 밀도는 모든 4개의 마우스 군들에서 증가하였으나, mActRIIA-Fc로 치료된 마우스들(모의 군 및 CKD 군)은 비히클 치료군보다 더 큰 증가를 가졌다(도 2). CKD 마우스들에서 mActRIIA-Fc 치료는 연구의 말기까지 모의군-비히클 치료 마우스들과 동등하거나 이 마우스들을 능가하는 골 미네랄 밀도를 가졌다. CKD 마우스들은 연구의 말기까지 빈혈도 갖게 되었으나(HCT < 40%), mActRIIA-Fc 치료는 CKD 군에서 빈혈을 예방하였다(HCT > 40%; 도 3). 모의군에서 mActRIIA-Fc 치료 마우스들은 비히클 대조군에 비해 HCT의 증가도 보였다. 해부 후 대퇴골의 마이크로CT 분석은 mActRIIA-Fc 치료 마우스들에서 섬유주 골의 증가를 보였으나, 질환 진행에 있어서 이 시점에서 모의군과 CKD 비히클 치료군 사이에 현저한 차이는 없었다. 부검 시, mActRIIA-Fc 치료 마우스들이 지방 패드 중량의 미미한 증가를 가졌지만, 장기 중량의 현저한 차이는 관찰되지 않았다. 트라이크롬으로 염색된 남은 신장의 조직학적 절편은 CKD 마우스들에서 연구의 이 시점에서 널리 퍼진 섬유증을 표시하지 않았다.

[0259] 2.3 mActRIIA 억제는 확립된 신장 질환의 치료 모델에서 빈혈 및 골 손실을 예방한다.

[0260] 설치류에서의 5/6 신장절제 수술은 만성 신장 질환을 모델링하기 위해 이용되는, 통상적으로 수행되는 실험 프로토콜이다. 이 2-단계 수술에서 무균 수술 절차를 이용하여 한 신장의 2/3 및 반대쪽 완전한 신장을 제거한다. 수술의 결과로서 동물은 손상된 신장 기능을 경험하고 만성 신장 질환을 갖는 인간과 유사한 생리학적 거동을 나타낸다.

[0261] 모의 또는 5/6 신장절제 수술을 표준 수술 절차에 따라 찍은 라보라토리스에서 수행하였다. 동물들을 수술로부터 회복시킨 후 운반하였다. 첫번째 측정을 수행하기 전에 최소 48시간 동안 동물들을 실험 조건에 적응시켰다. 이 기간 동안 동물을 연구로부터 배제시킬 임상 비정상의 임의의 징후에 대해 모든 동물들을 관찰하였다. 동물들은 그들의 우리 카드 상에 연구 번호를 배정받았고 귀 노칭(notching)에 의해 독특하게 식별되었다.

[0262] 멸균 PBS를 사용하여 ActRIIA-mIgG2aFc를 2.0 mg/ml의 농도까지 희석하였다. 투약 농도는 2.0 mg/ml이었다. ActRIIA-mIgG2aFc를 -65°C ± 15°C에서 저장하였는데, 이 물질은 실온에서 해동될 수 있거나 4°C에서 밤새 해동될 수 있다. 해동된 단백질을 사용할 때까지 젖은 얼음 위에서 보관하였다.

[0263] 30마리의 C57BL/6 암컷 마우스들(10주령)이 5/6 신장절제 수술을 받았고, 이때 한 신장이 완전히 제거된 후, 2 주 후 남은 신장에서 연결된 3개의 신장 정맥들 중 2개의 신장 정맥들이 연결되었다. 30마리의 C57BL/6 암컷들에 대한 모의 수술도 수행하였는데, 이때 동물들은 신장의 제거 없이 동일한 복부 수술 절차를 받았다. 제2 수술로부터 회복 후, 동물들을 운반하고 최소 48시간 동안 실험 조건에 적응시켰다. 제2 수술로부터 2개월 후, 마우스들을 군 당 15마리의 마우스들을 갖는 4개의 치료군들 중 하나로 무작위로 배정하였다(표 2). 마우스들의 체중을 측정하고 총 8주 동안 mActRIIA-Fc 또는 PBS를 주 당 2회 마우스들에게 투약하였다. 골 미네랄 밀도(BMD) 및 혈액학적 파라미터의 세로방향 측정을 연구의 기준 시점, 중간 시점 및 말기에 수행하였다. 부검 시, 골을 채취하고 조직학적 검사를 위해 또는 마이크로CT 스캐닝에 의한 분석을 위해 저장하였다.

표 2

군	N	마우스	정규식	치료	수술	농도	경로
1	15	C57BL/6	음식	PBS	모의 수술	부피	피하
2	15	C57BL/6	음식	mActRIIA-Fc	모의 수술	10 mg/kg	피하
3	15	C57BL/6	음식	PBS	5/6 신장절제	부피	피하
4	15	C57BL/6	음식	mActRIIA-Fc	5/6 신장절제	10 mg/kg	피하

[0265] (a) 실험 절차

[0266] (i) 수술 변경

[0267] 5/6 신장절제 또는 동등한 모의 수술을 달성하기 위해 2-단계 수술을 10주령의 암컷 C57BL/6 마우스들에게 제공하였다.

[0268] (ii) 동물 투약

[0269] 본 연구에서 5/6 신장절제 수술의 완료로부터 1개월 후 투약을 시작하였다. 마우스들의 체중을 측정하고 10 mg/kg의 PBS 또는 mActRIIA-Fc를 피하 주사로 주 당 2회 마우스들에게 투여하였다.

[0270] (iii) DXA 스캐닝

[0271] DXA 스캐닝(루나(Lunar) PIXIMus, 지이 메디칼 시스템스(GE Medical Systems))를 이용하여 BMD의 세로방향 측정을 마취된 마우스에 대해 매달 수행하였다. BMD의 DXA 스캔 분석 동안 마우스 머리를 관심있는 영역으로부터 제거하여 두개골과 관련된 정량 인공적 결과를 방지하였다.

[0272] (iv) 혈액 채취

[0273] 매달 턱밑 출혈에 의해 채취된 혈액에 대한 완전한 혈액 카운트(HM2, 베티스캔(VetScan))의 세로방향 측정을 수행하였다. 연구의 말기에 말단 채혈을 수행하고, 혈액을 채취하고 CBC 분석용 EDTA 함유 튜브 또는 혈청 채취용 혈청 분리 튜브 내로 나누었다. 추후 분석을 위해 혈청을 -80℃에서 동결시켰다.

[0274] (v) 혈청 분석

[0275] 동결된 혈청을 해동시키고 베티스캔 VS2 분석기(아박시스 인코포레이티드(Abaxis, Inc.))를 이용하여 100 μ l를 분석하였다. 포괄적 진단 로터를 이용하여 혈청 알부민(ALB), 알칼리성 포스파타제(ALP), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아밀라제(AMY), 총 빌리루빈(TBIL), 혈액 우레아 질소(BUN), 총 칼슘(Ca⁺⁺), 인(PHOS), 크레아티닌(CRE), 글루코스(GLU), 나트륨(NA⁺), 칼륨(K⁺), 총 단백질(TP) 및 글로불린(GLOB)에 대해 샘플을 분석하였다.

[0276] (vi) 부검

[0277] 연구의 말기에 마우스들을 CO₂ 흡입으로 안락사시켰다. 신장 및 비장을 제거하고 중량을 측정하고 10% 포르말린에서 저장하였다. 경골 및 대퇴골을 채취하고 70% 에탄올에서 저장하였다.

[0278] (vii) 마이크로CT 분석

- [0279] 실험의 말기에 각각의 마우스로부터 좌측 대퇴골 및 경골을 해부하고 70% 에탄올에서 고정시켰다. 55 kV, 145 마이크로A 및 20 μm 의 화적소 크기에서 스캔코 마이크로CT(VivaCT75, 스캔코)를 이용하여 골을 스캐닝하였다. 도입된 스캔코 소프트웨어를 이용하여 스캐닝된 영상을 재구성하였다. 대퇴골의 원위 첨단(distal tip)으로부터 200 μm 떨어져 위치한 골의 400 μm 절편에서 섬유주 골 부피(BV/TV) 및 섬유주 두께(Tb.Th)를 평가하였다. 대퇴골의 중간선의 중심에 있는 200 μm 골 절편에서 피질 두께를 측정하였다.
- [0280] (viii) 데이터 분석
- [0281] 마이크로소프트 엑셀을 이용하여 스튜던트 t-검정으로 mActRIIA-Fc 치료 마우스 및 조직과 비히클 치료 마우스 및 조직의 비교를 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 표현된다.
- [0282] (b) 결과
- [0283] 본 발명자들은 만성 신장 질환의 마우스 모델에서 빈혈 및 골 손실을 예방하는 mActRIIA-Fc의 능력을 조사하였다. 5/6 신장절제 수술(0일째 날) 후 2개월의 질환 진행 후, 5/6 신장절제된 마우스들(CKD)은 모의군에 비해 적혈구용적률의 유의한 감소를 나타내었다(-5.4%, $P<0.01$). 세로방향 혈액 샘플링 및 후속 CBC 분석은 CKD 군 및 모의군 둘다에서 mActRIIA-Fc 치료 마우스들이 4주 및 8주의 치료 후 그들의 비히클 치료 대응군에 비해 적혈구용적률의 유의한 증가를 나타내었다는 것을 보여주었다(도 5).
- [0284] 5/6 신장절제 수술(0일째 날) 후 2개월의 질환 진행 후, 5/6 신장절제된 마우스들(CKD)은 모의군에 비해 BMD의 유의한 감소를 나타내었다(-5.4%, $P<0.01$). 6주의 치료 동안 mActRIIA-Fc로 치료된 모의군 및 CKD 군은 그들의 비히클 치료 대응군에 비해 유의하게 더 큰 BMD를 가졌다(도 6).
- [0285] 연구의 말기에 뒷다리를 채취하고 70% 에탄올에서 고정시켰다. 우측 대퇴골을 마이크로CT로 스캐닝하여(VivaCT 75, 스캔코) 피질 및 섬유주 골 구조를 정량하였다. 도 7은 각각의 치료군으로부터의 대퇴골의 횡단면 영상을 보여준다. 신장절제된 마우스들은 감소된 피질 두께를 나타내었고, 섬유주 골 구조의 분명한 변화를 나타내지 않았다.
- [0286] mActRIIA-Fc 치료 마우스들은 피질 두께 및 섬유주 골 부피 둘다의 증가를 나타내었다. 대퇴골 중간-골체의 분석을 이용하여 각각의 군에서 평균 피질 두께를 정량하였다(도 8). CKD 마우스들은 비히클 군($P<0.01$) 및 mActRIIA-Fc 군($P<0.01$) 둘다에서 그들의 모의 대응 마우스들보다 더 얇은 피질 골을 가졌다. mActRIIA-Fc 치료 마우스들은 그들 각각의 비히클 치료 마우스들에 비해 모의군(+17%, $P<0.01$) 및 CKD 군(+19.2%, $P<0.01$) 둘다에서 피질 두께의 유의한 증가를 가졌다. 도 7에서 샘플 영상에 의해 입증된 바와 같이, 원위 대퇴골의 분석은 mActRIIA-Fc 치료 마우스들에서 섬유주 골 부피 및 두께의 현저한 증가를 보여주었다. mActRIIA-Fc는 모의군 및 CKD 군 둘다에서 비히클 치료 마우스들에 비해 섬유주 골 부피(도 9) 및 섬유주 두께(도 10)를 유의하게 증가시킬 수 있었다. 섬유주 골 부피의 측정은 mActRIIA-Fc 치료 마우스들이 그들 각각의 비히클 치료 마우스들에 비해 모의군(+549%, $P<0.001$) 및 CKD 군(+827%, $P<0.001$) 둘다에서 섬유주 골 부피의 유의한 증가를 가졌다는 것을 8주째 시점에서 입증하였다. 섬유주 두께의 측정은 mActRIIA-Fc 치료 마우스들이 그들 각각의 비히클 치료 마우스들에 비해 CKD 군(+62%, $P<0.001$)에서 섬유주 두께의 유의한 증가를 가졌다는 것을 8주째 시점에서 입증하였다.
- [0287] 말기 희생 시, 전혈을 모든 동물들로부터 채취하고 혈청을 수득하기 위해 프로세싱하였다. 포괄적 프로파일 로터를 이용하는 베트스캔 VS2 분석기(아박시스 인코포레이티드)를 이용하여 혈청 샘플을 분석하였다. 각각의 군으로부터의 분석물에 대한 평균 값이 표 3에 제시되어 있다. 모의군과 CKD 비히클 대조군의 비교는 손상된 신장 기능으로 인해 예상된 바와 같이 혈액 우레아 질소(BUN) 및 크레아티닌(CRE)의 증가를 보였다. 추가로, ALT 및 아밀라제(AMY)는 변경된 신장 기능으로 인해 CKD 마우스들에서 증가되었거나 신장절제가 간 기능도 변경시킨다는 것을 암시하였다. 칼슘(CA++) 및 총 알칼리성 포스파타제(ALP) 수준도 증가된 골 교체로 인해 예상된 바와 같이 증가되었다. mActRIIA-Fc 치료는 약물의 골 동화작용 성질로 인해 모의군 및 CKD 마우스들 둘다에서 ALP 수준을 증가시켰다. CKD 마우스들에서 mActRIIA-Fc 치료는 알부민(ALB), 총 단백질(TP) 및 CRE 수준을 CKD-비히클 대조군에 비해 감소시켰으나, 모의군 마우스들과 상이하지 않았다. 이들 변화는 이 점에서 모델 또는 치료와 관련되어 있는 것으로 생각되지 않는다.

표 3

		모의군 비히클	모의군 mActRIIA-Fc	CKD 비히클	CKD mActRIIA-Fc
AMY	U/ℓ	865.45 ± 39.41	803.38 ± 66.06	1486.18 ± 53.82	1418.42 ± 36.68
TBIL	mg/dℓ	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.01 ⁺⁺
BUN	mg/dℓ	27.92 ± 1.39	29.20 ± 1.26	52.75 ± 2.66	51.50 ± 2.10
CA ⁺⁺	mg/dℓ	10.18 ± 0.16	10.38 ± 0.12	11.00 ± .13	11.33 ± 0.13
PHOS	mg/dℓ	8.58 ± 0.17	8.96 ± 0.28	8.28 ± 0.36	7.96 ± 0.26
CRE	mg/dℓ	0.33 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.31 ± 0.02 ⁺⁺
GLU	mg/dℓ	198.50 ± 6.52	260.90 ± 28.79*	223.67 ± 13.53	260.86 ± 14.98
NA ⁺	mmol/ℓ	156.50 ± 0.77	157.60 ± 0.73	158.58 ± 2.37	155.64 ± 0.34
K ⁺	mmol/ℓ	7.65 ± 0.14	7.85 ± 0.15	7.98 ± 0.14	7.77 ± 0.13
TP	g/dℓ	5.66 ± 0.05	5.42 ± 0.057*	5.73 ± 0.08	5.47 ± 0.07 ⁺⁺
GLOB	g/dℓ	1.79 ± 0.08	1.67 ± 0.06	1.73 ± 0.07	1.97 ± 0.06 ⁺⁺

* = 모의군 비히클과 대비하여 P<0.05; ++ = CKD 비히클과 대비하여 P<0.05

(c) 결론

mActRIIA-Fc를 사용한 치료는 만성 신장 질환의 5/6 신장절제 모델에서 빈혈 및 골 손실을 예방할 수 있었다. CKD 마우스들은 모의 대응 마우스들에 비해 빈혈을 가졌고 보다 낮은 BMD 및 대퇴골에서의 보다 얇은 피질 골 구조를 가졌다. CKD 마우스들의 mActRIIA-Fc 치료는 비히클 치료 마우스들에 비해 적혈구용적률, BMD 및 피질 골 구조를 유의하게 증가시켰다. 나아가, mActRIIA-Fc는 모의군 및 CKD 군 둘다에서 CKD 마우스들의 섬유주 골 부피 및 섬유주 두께를 비히클 치료 마우스들보다 더 큰 값까지 증가시킬 수 있었다. 이들 데이터는 mActRIIA-Fc 투여에 의한 액티빈 수용체 IIA 신호전달의 차단이 만성 신장 질환의 5/6 신장절제 모델에서 빈혈 및 골 손실을 예방할 수 있다는 것을 입증한다.

2.4 예상 실시예 - CDK와 관련된 무력성 골 질환을 치료하기 위한 mActRIIA 억제

마우스들은 한 신장의 전기소작 및 다른 신장의 신장절제를 받는다. 포스페이트가 낮고 칼시트라이올로 보충된 음식을 상기 마우스들에게 공급한다. 예를 들면, 문헌(Lund et al., 2004, J Am Soc Nephrol 15:349-369)을 참조한다.

이 연구는 최소 연결제를 통해 마우스 Fc에 융합된 가용성 마우스 ActRIIA(서열번호 15)가 무력성 골 장애의 마우스 모델에서 혈액 및 골 파라미터의 치료에 미치는 효과를 연구하기 위해 디자인된다.

한 신장의 전기소작 및 다른 신장의 신장절제를 받은 마우스들을 CKD와 관련된 무력성 골("ADB") 모델로서 사용하여 이 모델에서 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 효과를 시험한다. 마우스들은 1) 한 신장을 완전히 제거하고 2) 다른 신장의 전기소작을 위해 2종의 수술을 제공받는다. 모의 수술을 받은 마우스들도 대조군으로서 포함시킨다. 수술을 문헌(Lund et al., 2004, J Am Soc Nephrol 15:349-369)에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

포스페이트가 낮고 칼시트라이올로 보충된 정규식을 한 마우스 군에게 공급한다. 정상 정규식을 또 다른 마우스 군에게 공급한다. 최종 수술로부터 2주 후, 마우스들을 군들(모의군 및 ADB 군)로 나누고 8주 동안 주 당 2 회 10 mg/kg의 비히클(PBS) 또는 mActRIIA-Fc를 사용하여 투여를 시작한다. 빈혈을 평가하기 위해 연구 동안 완전한 혈액 카운트(CBC)를 주기적으로 수행한다.

이중 에너지 x-선 흡수측정(DEXA, PIXIMus)을 이용하여 골 미네랄 밀도를 측정한다. 연구의 말기에 부검을 수행하여 뒷다리 및 주요 장기의 장골을 채취한다. 조직학 프로세싱 및 H&E 또는 트라이크롬 염료를 사용한 염색

을 위해 남은 신장을 보낸다. 대퇴골을 uCT(스캔코)로 스캐닝하여 골 미세구조를 확인한다. 정량 컴퓨터 단층 촬영(QCT)을 이용하여 골 교체를 측정할 수도 있다.

[0297] 2.5 혈관 석회화에 대한 ActRIIA 억제제의 효과

[0298] 이 실시예는 ActRIIA의 억제제 대상체의 혈관구조에서 칼슘 수준을 감소시키는 데에 효과적이므로 혈관 석회화를 치료하는 수단을 대표한다는 것을 입증한다.

[0299] 고지방 정규식을 공급받은 14주령의 *ldlr*^{-/-} 마우스(C57Bl/6J 배경; 잭슨 라보라토리스)에서 3기 만성 신장 질환(CKD)을 유도하였다("CKD 마우스"). 저밀도 지단백질 수용체(*ldlr*)는 지질 제거에 관여하는 것으로 공지되어 있고, *ldlr* 녹아웃 마우스는 죽상경화증의 모델을 대표한다. 고지방/콜레스테롤 정규식을 공급받은 *ldlr* 결핍 마우스는 죽상경화증, 및 신장절제에 의해 유도된 CKD에 의해 자극된 대동맥 플라크 관련 석회화를 발생시킨다. CKD를 5/6 신장절제로 *ldlr*^{-/-} 마우스에서 유도하였다(상기 참조). 전술된 바와 같이, 5/6 신장절제는 한 신장의 완전한 제거 후 남은 신장에서 3개의 신장 정맥들 중 2개의 신장 정맥의 연결을 포함한다.

[0300] 화학적 석회화 정량에 의해 확인될 때, 22주까지 혈관 석회화가 CKD 마우스에서 확립된다. 요약하면, 희생시, 마우스의 심장 및 대동맥을 해부하고, 해부 현미경 하에 블런트 해부로 모든 관련없는 조직을 제거한다. 조직을 55°C에서 20시간 내지 24시간 동안 건조하고 중량을 측정하고 막자사발을 이용하여 분말로 분쇄한다. 칼슘을 4°C에서 24시간 동안 10% 포름산(10:1 부피/중량)으로 용출한다. 크레솔프탈레인 콤플렉손(cresolphthalein complexone) 방법(시그마, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재)을 제조자의 설명서에 따라 사용하여 용출물의 칼슘 함량을 분석하고, 결과를 건조 조직 중량에 대해 보정한다.

[0301] CKD 마우스들을 2개의 실험군으로 나누었다: (i) mActRIIA-Fc 치료 마우스들; 및 (ii) mActRIIA-Fc 조성물의 비히클 부분만을 투여받은 CKD-3-비히클 마우스들(즉, 이 마우스들은 mActRIIA-Fc를 갖지 않는 식염수 조성물을 투여받았다). 6주 동안 10 mg/kg의 mActRIIA-Fc(n=5)를 mActRIIA-Fc 치료 마우스들에게 주 당 2회 투여하였다. mActRIIA-Fc를 mActRIIA-Fc 치료 마우스들에게 투여한 날과 동일한 날에 비히클만을 CKD-3-비히클 마우스들(n=6; 비히클=식염수)에게 투여하였다. 야생형 마우스들(n=6; C57Bl/6J 배경) 및 모의군 마우스들(n=8; C57Bl/6J 배경)을 음성 대조군으로서 사용하였다. 모의군 마우스들은 수술을 받았지만 CKD가 유도되지 않은(예를 들면, 신장절제가 수행되지 않은) *ldlr*^{-/-} 마우스들로 구성되었다. 4개의 치료군들(CKD-3-비히클 군; mActRIIA-Fc 치료군; 모의군; 및 야생형 군) 각각에서 대동맥 칼슘 수준을 평가하기 위해 28주째 시점에서 모든 마우스들을 안락사시켰다.

[0302] 하기 표 4는 연구에서 사용된 각각의 마우스에서 관찰된 대동맥 칼슘 수준(제2열)뿐만 아니라, 모의군, CKD-3-비히클 연구군, mActRIIA-Fc 연구군 및 야생형 연구군 각각에 대한 평균 칼슘 수준도 제공한다(제3열). 결과는 도 11에서 그래프 형태로 제시되어 있다. 데이터에 의해 입증된 바와 같이, 대동맥 칼슘의 명확한 감소가 비히클 치료군에 비해 mActRIIA-Fc 치료군에 속하는 마우스들에서 관찰되었다. mActRIIA-Fc로 치료된 5마리의 CKD 마우스들 중 4마리의 CKD 마우스들에서 대동맥 칼슘의 수준은 2개의 음성 대조군(야생형 및 모의군 마우스들)에서 관찰된 수준에 필적할만하였다.

[0303] 상승된 혈관(예를 들면, 동맥) 칼슘 수준은 혈관 석회화와 관련되어 있는 것으로 공지되어 있다(예를 들면, 문헌(Raggi P et al., Clin J Am Soc Nephrol 2008; 3: 836-843) 참조). 따라서, 상기 결과는 ActRIIA 억제제가 혈관 석회화의 치료 및 예방에 적합한 방법을 대표한다는 것을 시사한다.

표 4

대동맥 칼슘 수준

실험군	대상체의 구체적인 Ca^{2+} 수준(mg/g)	평균 Ca^{2+} mg/g
야생형(n = 6)	0.25, 0.11, 0.26, 0.36, 0.31, 0.35	0.27 ± 0.09
모의군(n = 8)	0.28, 0.18, 0.24, 0.16, 0.13, 0.25, 0.26, 0.27	0.22 ± 0.06
CKD-3-비히클(n = 6)	0.58, 0.17, 0.51, 0.56, 0.31, 0.99	0.52 ± 0.28
mActRIIA-Fc(n = 5)	0.83, 0.28, 0.19, 0.13, 0.04	0.29 ± 0.31

[0304]

[0305]

2.6 혈관 석회화에 대한 ActRIIA 억제 효과

[0306]

이 실시예는 만성 신장 질환을 갖는 대상체에서 혈관 석회화에 대한 ActRII 억제 효과의 연구를 기술한다.

[0307]

이전 실시예들에 기재된 초기 CKD-MBD의 마우스 모델을 사용할 수 있다. 이 모델에서, 신장절제를 LDL 수용체인 *ldlr*의 유전적 결핍에 추가하고, 고지방 고콜레스테롤 정규식을 마우스들에게 공급한다. 3기 CKD에서, 동물들은 혈관 석회화의 CKD 유도된 자극, 골 형성의 감소, 상승된 FGF23 수준, 고인산혈증 및 상승된 PTH 수준을 갖는다.

[0308]

(a) 재료 및 방법

[0309]

동물 및 정규식: C57B1/6J 배경 상의 LDL 수용체 널(*null*)(*LDLR*^{-/-}) 마우스들 또는 야생형 C57B1/6J 마우스들은 잭슨 라보라토리스(미국 메인주 바 하버 소재)로부터 구입될 수 있고 발열원 부재 환경에서 사육될 수 있다. 3주째 시점에서 지방으로서 6.75% 칼로리를 갖는 정규식으로 동물들을 이주시킬 수 있다. 10주째 시점에서, 일부 동물들은 지방으로서 42% 칼로리를 함유하는 고콜레스테롤(0.15%) 정규식(할란 테크라드(Harlan Teklad), 미국 위스콘신주 매디슨 소재, 제품 번호 TD88137)(이 유전적 배경에서 혈관 석회화를 갖는 죽상경화증을 발생시키는 것으로 밝혀진 정규식)을 시작할 수 있다(예를 들면, 문헌(Towler et al., 1998, J Biol Chem 273:30427-30434) 참조). 모든 정규식들에서 칼슘 함량은 0.6%일 수 있다. 동물들은 임의로 물에 접근할 수 있고 주립 동물 보호 지침 및 국립 동물 보호 지침에 따라 유지될 수 있다. mActRIIA-Fc를 매주 2회 복강내(10 mg/kg) 투여할 수 있다.

[0310]

수술 절차: 전술된 바와 같이 2-단계 절차를 이용하여 CKD를 발생시킬 수 있다(예를 들면, 문헌(Davies et al., 2003, J Am Soc Nephrol 14:1559-1567); 및 문헌(Davies et al., 2005, J Am Soc Nephrol 16:917-928) 참조). 요약하건대, 생후 10주째 시점에서 2 cm 측면 절개를 통해 전기소작을 우측 신장에 적용한 후, 2주 후 유사한 절개를 통해 좌측 전체 신장절제를 수행할 수 있다. 대조군 동물들은 적절한 신장이 노출되고 이동되지 임의의 다른 방식으로 치료되지 않는 모의 수술을 제공받을 수 있다. 모든 절차를 위해 복강내 마취(자일라진 13 mg/kg 및 케타민 87 mg/kg)를 이용할 수 있다. 수술 후 기준 신장 기능을 평가하기 위해 이차 수술 후 1주째 시점에서 복제 정맥 혈액 샘플을 채취할 수 있다. 심장내 천자로 혈액을 채취한 후 군에 따라 20주째 또는 26주째 시점에서 마취 하에 동물들을 희생시킬 수 있다. 심장 및 대동맥을 일괄적으로 해부할 수 있다.

[0311]

조직 준비: 절제된 표본을 포르말린에서 고정시킨 후 다음과 같이 나눌 수 있다: 심장, 상행 대동맥 및 대동맥궁을 하행 대동맥으로부터 분리할 수 있고 대동맥 유출관을 통해 시상으로 이등분할 수 있다. 하행 대동맥을 그의 길이를 따라 대략 중간에서 관상으로 이등분할 수 있다. 모든 4개의 조각들을 동일한 왁스 블록 내에 포매시킬 수 있다. 슬라이스(5 μm 두께)를 절단할 수 있고 헤마톡실린 및 에오신, 트라이크롬, 알리자린 레드(Alizarin Red) 및 본 코사(von Kossa)로 염색할 수 있다.

[0312]

면역조직화학: 조직 절개를 전술된 바와 같이 제조하고 자일렌에서 파라핀을 제거하고 등급화된 에탄올에서 재수화시킬 수 있다. 3% 과산화수소(시그마, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재)에서 항온처리하여 내재성 퍼록시다제 활성을 차단할 수 있고, PBS 중의 전매특허 카세인 용액('배경 SNIPER', 바이오케어 메디칼(BioCare Medical), 미국 캘리포니아주 월넷 크릭 소재)과 함께 10분 동안 항온처리하여 비-특이적 결합을 차단할 수 있

다. 100℃에서 시트레이트 완충제('데클로아커(Decloaker)') 바이오케어 메디칼, 미국 캘리포니아주 월넛 크릭 소재)와 함께 5분 동안 항온처리하여 항원 회수를 수행할 수 있다. 절편을 마우스 오스테오칼신(OC)에 대한 친화성-정제된 염소 다중클론 항체(바이오제네시스 인코포레이티드(Biogenesis Inc.), 미국 뉴햄프셔주 브렌트우드 소재)와 함께 항온처리한 후, 스트렙타비딘-접합된 퍼옥시다제 염색 전에 10분 동안 바이오티닐화된 마우스 항-염소 이차 항체와 함께 항온처리할 수 있고(모든 시약들, 바이오케어 메디칼, 미국 캘리포니아주 월넛 크릭 소재) 0.1% 헤마톡실린(시그마)으로 반대염색할 수 있다.

[0313] **RT-PCR:** RNAqueous-4PCR 키트(암비온(Ambion))를 제조자의 설명서에 따라 사용하여 조직 샘플로부터 RNA를 추출할 수 있다. 1-단계 RT-PCR 키트(퀴아젠, 미국 캘리포니아주 발렌시아 소재)를 제조자의 설명서에 따라 사용하여 RT-PCR을 수행할 수 있다. 조건은 다음과 같을 수 있다: 30분 동안 50℃; 15분 동안 95℃; 이어서 1분 동안 94℃, 1분 동안 60℃ 및 1분 동안 72℃로 구성된 35회 내지 40회 주기; 이어서 10분 동안 72℃. 뮤린 오스테오칼신 및 뮤린 GAPDH에 대한 특이적 프라이머를 선택할 수 있다.

[0314] **화학적 석회화 정량:** 희생 시, 심장 및 대동맥을 해부할 수 있고, 해부 현미경 하에 블런트 해부로 모든 관련없는 조직들을 제거할 수 있다. 조직을 55℃에서 20시간 내지 24시간 동안 건조하고 중량을 측정하고 막자사발을 이용하여 분말로 분쇄할 수 있다. 칼슘을 4℃에서 24시간 동안 10% 포름산(10:1 부피/중량)으로 용출할 수 있다. 크레솔프탈레인 콤플렉스 방법(시그마, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재)을 제조자의 설명서에 따라 사용하여 용출물의 칼슘 함량을 분석할 수 있고, 결과를 건조 조직 중량에 대해 보정할 수 있다.

[0315] **골 조직형태측정:** 골 형성 속도를 이중 형광 표지부착으로 측정할 수 있다. 모든 마우스들은 희생되기 7일 및 2일 전에 복강내 칼세인(20 mg/kg)을 제공받을 수 있다. 동물들을 희생시킨 시점에서 양쪽 대퇴골을 해부하여 70% 에탄올에 넣을 수 있다. 표본을 플라스틱 포매 키트 H7000(에너지 빔 사이언시스(Energy Beam Sciences))에서 탈회되지 않은 상태로 이식할 수 있다. JB-4 박절기(에너지 빔 사이언시스)를 이용하여 전두면을 통해 골을 10 μm 절편으로 세로방향으로 절개할 수 있다. 염색되지 않은 절편을 칼세인-표지부착된 형광 분석에 이용할 수 있다. 오스테오메저(Osteomeasure) 영상 분석기(오스테오메트릭스(Osteometrics), 미국 조지아주 아틀란타 소재)에 부착된 레이즈(Leitz) 현미경으로 400배 확대율에서 슬라이드를 검사할 수 있다. 성장판으로부터 150 μm 떨어져 위치하는 원위 대퇴골의 10개 인접 0.0225 mm² 시야를 동물마다 검사할 수 있다.

[0316] **부갑상선 호르몬의 측정 및 혈청 화학:** CKD의 2주째 및 8주째 시점에서 복제 정맥의 모세관 흡입으로 혈액 샘플을 수득하고 희생 시(CKD의 12주째 시점) 상이한 절차(심장내 천자)로 혈액 샘플을 수득하고, 혈액 샘플을 헤파린으로 처리된 튜브 내로 옮길 수 있다. 원심분리(5분 동안 400X g) 후, 혈장을 제거하고 분취하고 -80℃에서 동결시킬 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 키트(임뮤토픽스(Immutopics), 미국 캘리포니아주 산 클레멘트 소재)를 사용하여 2-부위 면역방사측정 분석(IRMA)으로 온전한 PTH 수준을 측정할 수 있다(요구된 혈액의 부피 때문에 희생 시에만 수행됨). 표준 멀티채널 분석기 기법을 이용하여 혈액 우레아 질소(BUN), 혈청 칼슘 및 인을 측정할 수 있다.

[0317] **FGF23의 측정:** FGF23 뮤린 ELISA 분석을 카이노스(Kainos)사로부터 구입할 수 있다.

[0318] **DKK1 및 오스테오칼신의 측정:** DKK1 및 과소카복실화된 오스테오칼신에 대한 상업적 ELISA 분석을 이용할 수 있다.

[0319] **OPG 및 sRANKL의 측정:** OPG 대 RANKL의 비를 혈청 분석에서 측정할 수 있다. 이들 분석은 골 교체 및 과도한 골 재흡수와 높은 상관관계를 갖는 것으로 밝혀져 있다(예를 들면, 문헌(Geusens et al., 2006, Arthritis & Rheumatism 54:1772-17775) 참조). 혈청 중의 sRANKL의 수준을 방사면역분석(린코 리서치(Linco Research), 미국 미조리주 세인트 루이스 소재)으로 측정할 수 있다. 혈청 OPG의 수준을 ELISA 방법(오스테오메디칼 엔엘(OSTEOmedical NL), 네덜란드 마리쇼프 소재)으로 측정할 수 있다. 분석내 및 분석간 변동 계수(CV)는 제조자에 따라 상기 두 검사에 대해 10% 미만이다. sRANKL에 대한 검출 한계는 0.08 pmol/ℓ 이고 OPG에 대한 검출 한계는 0.14 pmol/ℓ 이다.

[0320] **골 교체 마커의 측정:** 혈청 P1NP 및 오스테오칼신을 조골세포 활성의 마커로서 사용할 수 있고, 타르트레이트 내성 산 포스파타제 형태 5b(TRACP 5b)(마우스트랩(mouseTRAP), 아이디에스 리미티드(IDS Ltd.), 영국 볼턴 소재)를 파골세포 수준의 마커로서 사용할 수 있다.

[0321] **염증 마커의 측정:** TNF 알파 및 c 반응성 단백질에 대한 혈청 분석을 이용하여 염증의 수준 및 mActRIIA-Fc에 대한 반응을 추적할 수 있다.

[0322] **통계적 분석:** ANOVA를 이용하여 통계적 유의성($P < 0.05$)에 대해 데이터를 분석할 수 있다. 비히클로 치료된 동물들(대조군)과 mActRIIA-Fc로 치료된 동물들을 비교할 수 있다. 모의 수술을 제공받은 마우스들과 비히클 및 mActRIIA-Fc로 치료된 CKD 마우스들도 비교할 수 있다. SPSS 11.0 통계 패키지(니드햄 하이츠(Needham Heights), 미국 매사추세츠주 소재)를 사용하여 이들 분석들을 수행할 수 있다.

[0323] **(b) 연구 파라미터**

[0324] 연구에서 사용된 마우스들을 하기 표 5에 제시된 8개의 군들 중 하나에 배치할 수 있다.

표 5

군	군의 설명	# 동물
A	야생형	10
B	LDLR 고지방/CKD 비히클 치료, 22 주째에서 안락사	10
C	LDLR 고지방/CKD RAP-011 치료, 22 주째에서 안락사	10
D	LDLR 고지방/CKD 비히클 치료, 28 주째에서 안락사	10
E	LDLR 고지방/CKD RAP-011 치료, 28 주째에서 안락사	10
F	LDLR 고지방/모의 수술, 28 주째에서 안락사	10
G	LDLR 고지방/모의 수술, 20 주째에서 안락사	10
H	LDLR 고지방/CKD, 14 주째에서 안락사	10

[0325]

[0326] 치료 시작 시 기준 혈관 석회화를 측정하고 조직형태측정을 수행하기 위해 14주째 시점에서 1개 동물 군(표 5의 군 H)을 희생시킬 수 있다. 군 C 및 E를 사용하여 변화가 가능한 CKD 기간에 걸쳐 비히클 치료군(군 B 및 D)에 비해 mActRIIA-Fc를 사용한 치료의 효능을 평가할 수 있다. 군 F 및 G는 CKD 효과에 대한 대조군으로서 사용될 수 있는, 모의 수술을 제공받고 고지방을 공급받은 연령 일치된 동물들이다. 치료군으로의 무작위 배정 후 군 당 10마리 동물이라는 군 크기는 통계적 유의성을 획득하기에 충분할 수 있다.

[0327] 16주째 내지 18주째 시점에서, 인슐린을 마우스에게 주사하고 그의 소변을 측정함으로써 사구체 여과율(GFR)을 측정할 수 있다. 안락사 시, 심장내 천자로 혈액을 채취하고, 혈청 칼슘, Pi, 혈액 우레아 질소(BUN), 글루코스 및 콜레스테롤 수준과 함께 혈청 DKK1, FGF23, 오스테오칼신, PTH 및 칼시트라이올 수준을 측정할 수 있다.

[0328] 고지방을 공급받은 *ldlr*^{-/-} CKD 동물들의 대동맥을 분석할 수 있다. 총 대동맥 칼슘 수준 및 본 코사로 염색된 현미경 절편을 획득할 수 있다. 대동맥을 프로세싱하여 대동맥 유전자 발현의 분석을 위한 RNA를 획득할 수 있다. 면역조직화학을 위해 대동맥을 프로세싱할 수 있다. 전술된 CKD 모델에서 22주째 시점(군 B 및 C에 대한 안락사 연령)에서 혈관 석회화가 확립되고, 이차 부갑상선항진증에도 불구하고 무력성 골 장애가 존재한다. 22주째 내지 28주째 시점에서 혈관 석회화가 진행되고 있고, 부갑상선 호르몬의 존재의 효과가 조골세포 표면을 증가시키기 시작한다.

[0329] 이 실시예에 기재된 연구는 CKD를 갖는 대상체에서 관찰된 혈관 석회화, 골 리모델링 속도 및 이차 부갑상선항진증에 대한 ActRII 억제제의 효과를 측정하는 데에 이용될 수 있다.

표 6

서열 번호	설명	서열
1	인간 ActRIIA 전구체 폴리펩티드	MGAALKAFVFLISCSGAILGRSETQECLEFFNANWEKDRNTQTVGEP YGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEV YFCCCEGNCNEKFSYFPMEVTOPTSNPTPKPPYNYLLYSVLPLMLI AGIVICAFWYRHHKMAVPPVLPVTPQDPGPPPPPLGLKPLQLLEVKAR GRFGCVKQALLNEYAVKIFPIQDKQSWQNEYEYVSLPGMKHENILQFI GAEKRGTSVDVDLWLIITAFHEKGSLSDFLKANVSVWNELCHEIAETMARG AYLHEDIPLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGALKFEAG KSAGDTHGVQVTRRYMAPEVLEGAINFOADFLRIDMYAMGLVLWELASR CTAADGPVDEYMLPFEEIIGQHPSELEDMQEVVVKRPVLRDYNQKHAG MAMLCETIECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQLTNIITTEDIVTVVTM VTNVDFPPKESL
2	인간 ActRIIA 가용성(세포외) 폴리펩티드 서열	ILGRSETQECLEFFNANWEKDRNTQTVGEPYCYGDKDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFP EVTQPTSNPTPKPP
3	C-말단 15개 아미노산이 결실된 인간 ActRIIA 가용성(세포외) 폴리펩티드 서열	ILGRSETQECLEFFNANWEKDRNTQTVGEPYCYGDKDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFP EVTQPTSNPTPKPP
4	인간 ActRIIA 전구체 단백질을 코딩하는 핵산 서열	ATGGGAGCTGCTGCAAGTTGGCGTCTTTCTTATCTCCTGTTTC TTCAGGTGCTATACCTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTA ATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAACCGTGT TATGGTGACAAAGATAACGGCGGCAATGTTTGTCTACCTGGAGAAATAT TTCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAAGTTGTTGGCTGGATGATATCA ACTGCTATGACAGGACTGATGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTA TATTTTGTGCTGTGAGGCAATATGTGAATGAAAGTTTCTTATTT TCCAGAGTGAAGTACACAGCCCACTCAATCCAGTTACACCTAAGC CACCCATTACAAACATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTTATGTTAATT GCGGGATTGTGCTGTCATTTGGGTGTACAGGATCACAAGATGGC CTACCCCTCTGTACTTGTCCAACTCAAGACCCAGGACCCACCCCTT CTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAGTGAAGCAAGG GGAAGATTGGTTGTGCTGGAAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGC TGTCAAAATATTTCCAAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAATGAATACG AAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTTCATT

[0330]

서열 번호	설명	서열
		GGTCAGAAAAACGAGSCACCAGTGTGTGATGTGATCTTTGGCTGATCAC AGCATTTTCATGAAAAGGGTTCACTATCAGACTTCTTAAGGCTAATGTGG TCTCTTGGAAATGAAGTGTGTCAATATGCAGAAACCATGGCTAGAGGATG GCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCCTAAAGATGGCCACAAACCTGC CATATCTCAGAGGACATCAAAAGTAAAAATGTCTGTGAAAAACAACC TGACAGCTTGCTGCTGACTTTGGGTGGCCCTTAAAAATTTGAGGCTGGC AAGCTCGAGGCGATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGC TCCAGAGGTATTAGAGGTGCTATAAACTTCGAAAGGATGCATTTTGA GGATAGATATGATGCCATGGATAGTCTCTATGGGAACCTGGCTTCTCGC TGACTGCTGAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAGGA GGAATTTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTC ATAAAAAAGAGGCGCTGTTTAAAGAGATTATGGCAGAAACATGCTGGA ATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAGATGTTGGGATCAGCAGCGAGA AGCCAGGTTATCAGCTGGATGTAGGTGAAGAATTACCCAGATGCAGA GACTAACAAATATTATTACCCACAGAGGACATGTAACAGTGTCAATG GTGACAAATGTTGACTTCTCTCCCAAGAACTCTAGTCTATGA ATACTTGTGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATG GGAAGAACACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAAACCGTGTATGGTGACA AAGATAACGGCGCATTTTGTCTACCTGGAAGAAATATTCTGTGTTCC ATTGAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGA CAGGACTGATTTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAAGTATATTTTGT GCTGTGAGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCAGAGATG GAAGTCACACAGCCCACTCAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC THTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPPKDTLMI SRTPEVTCVVVD (A) VSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCK (A) VSNKALPVP I E K T I S K A G Q P R E P Q V Y T L P P S R E M T K N Q V S L T CLVKGFPYPSDIAVWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGPFYFLYSLKLTVDKSR WQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPCK * ILGRSETQECLEFFFNANWKEKDRNTQGVGPECYGDKDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGGWLDD INCYDRDTCVEKDSPEVYFCCCEGNMCKEFSYFPEM EVTQPTSNPTPKPTGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP I E K T I S K A G Q P R E P Q V Y T L P P
5	인간 ActRIIA 가용성(세포외) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열	
6	Fc 도메인에 융합된 가용성 ActRIIA 세포외 도메인을 포함하는 융합 단백질	
7	인간 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIA 세포외 도메인	

[0331]

서열 번호	설명	서열
		SREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	폴벌 펠리틴의 리더 서열(HBML)	MKFLVNVALVFMVVYIYIA
9	조직 플라스미노겐 활성화제의 리더 서열(TPA)	MDAMKRGCLCCVLLLCGAVFVSP
10	천연 ActRIIA 리더	MGAALKAFVFLISCSSGA
11	ActRIIA-hFc 및 ActRIIA-mFc N-말단 서열	ILGRSETQE
12	ActRIIA 세포외 도메인의 C-말단 15개 아미노산이 결실된 ActRIIA-Fc 단백질	ILGRSETQECLEFFNANWEKDRNTQTGVEPCYGDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLLDDINCYDRDCVEKDSPEVYFCCCEGNMCMNEKFSYFPEM TGGGTHTCPAPPELLGSPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPKEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	TPA 리더 서열을 갖는 프로세싱되지 않은 ActRIIA-hFc	MDAMKRGCLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLEFFNANWEKDRNTQT GVEPCYGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRDCVEKK DSPEVYFCCCEGNMCMNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVPKPPPTGGGTHTCP CPAPPELLGSPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKAL PVPKEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	TPA 리더 서열을 갖는 프로세싱되지 않은 ActRIIA-hFc를 코딩하는 해산 서열	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGCTGCTGTGTGGAGC AGTCTTCGTTTCGCCGCCGCCGCTACTACTTGGTAGATCAGAACTCAGG AGTGTCTTTTAAATGCTAATGGGAAAAGACAGAACCAATCAAACTG GTGTTGAACCGGTGTTATGGTGACAAAGATAAACCGCGGCATTTGTTGCT ACCTGGAAGAATATTTCTGGTCCATTGAATAGTGAACAAGGTTGTTGG CTGGATGATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGA CAGCCCTGAAGTATATTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAAATGAA AGTTTCTTATTTCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAATCCA GTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGAACACTCACACATGCCACCGTG

[0332]

서열 번호	설명	서열
		CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCGCCAA AACCAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGACGTGAGCCACGAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGT GGACGCGTGAGGTGATATGCAAGCAAAAGCGCGGAGGAGCAGT ACAACAGCAGTACCGTGTGTCAGGTCCTCACCGTCTGCACAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCC AGTCCCATCGAAGAAACCATCTCCAAGCCAAAGGAGGACCCCGAGAAC CACAGGTACACCTGCCCTGCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAG GTAGCTGACCTGCTGCTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCGCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCGGAGAACAACTACAAGACACGCGCTC CCGTGTGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTATAGCAAGTCAACCGTG GACAAGAGCAGTGGCGAGCAGGGGAACTCTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCAACAACCTACACGACGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAATGAGAAATTC
15	EC 도메인의 N-말단 6 개 아미노산 및 EC 도메인의 C-말단 4 개 아미노산이 결실되었고(서열번호 28의 아미노산 25-130) L79D 돌연변이를 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열	ETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGWDDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPP
16	인간 ActRIIB 전구체 단백질 서열(A64)	MTAPWVALALLWGLW PGSGGEAETRECIY NANWELERTNQSLER CEGEQDKRLHCYASWA NSSGTIELVKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTLLTLVLAISLL PIGGLSLIVLLAFWY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPSPLVGLKPLQL LEIKARGRFGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLGKNIITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGLAVRFEFGKPP GDTHGQVGTRRYMAPE VLEGAINFQDAFLRI DMYAMGLVLWELYSRC KAADGPVDEYMLPFEE EICQHPSELELQEVV HKMRPTIKDHWLKHG GLAQICVTIEECWDHD AEARLSAGCVERVSL IRRSVNGTTSDCLVSL VTSVTNVDLPPKESI
17	인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된	SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG

[0333]

서열 번호	설명	서열
	폴리펩티드 서열(서열번호 16의 아미노산 19-134)	TIELVKKGWLDDEFNCYDRQECVATENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
18	C-말단 15개 아미노산이 결실된 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 16의 아미노산 19-119)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGWLDDEFNCYDRQECVATENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
19	인간 ActRIIB(A64) 전구체 단백질질을 코딩하는 핵산 서열	ATGACGGGCGCCTGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGCC CGGCTCTGGGCGTGGGAGGCTGAGCACGAGGAGTGCTACTACTACAG CCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACAGAGCGGCTGGAGCGCTGCGAA GGCAGAGGACAAAGCGCTGCTACTACGCTCTCTGGCCACAGCTC TGGCACATCGAGCTCGTGAAGAAGGCTGTGGCTAGATGACTTCAACT GCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCGAGGTGTAC TTCTGCTGTGAAGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCC AGAGCTGGGGCCCCGGAAGTACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCA CCCTGCTACGGTGTGGCTACTACTGCTGCCCTCGCCACTGGGGGCTTTCC CTCATGCTGCTGTGGCTTTTGGATGTACCGGCATCGAAGCCCCCTTA CGGTCACTGGACATCCATGAGGACCTGGGCTCCACCACTCCCTC TGTGGGCTGAAGCCACTGAGCTGCTGAGATCAAGGCTCGGGGGCGC TTTGGCTGTGTGGAGGCCCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGTGTCAA GATCTCCCACTCCAGGACAGCAGTCTGTGGCAGAGTGAACGGGAGATCT TCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGTACAGTTCACTGTCTGCC GAGAAGCGAGGCTCCAACTCGAAGTAGAGCTGTGGCTCATACGGGCTTT CCATGACAAGGCTCCCTCAGGATTAACCTCAAGGGGAACATCATCACAT GGAACGAACTGTGTATAGCAGAGACGATGTACGAGGCTCTCATAC CTGATGAGATGTCCCTGGTGGCGAGGGCCACAAGCGCTCTAT TGCCCCAGGGACTTTAAAGTAAGATGTAATTGCTGAAGAGCGACCTCA CAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCTTTCGATTTGAGCCAGGGAAA CCTCCAGGGACACCCAGGACAGGTAGGACGAGCGGTACATGGCTCC TGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCACTCCAGAGAGATGCCTTCTTGGCA TTGACATGTATGCCATGGGTTGGTGTGGAGCTTGTCTCTGGCTGC AAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGATACATGCTGCCCTTTGAGGAAGA GATTGGCCAGACCCCTTCTGTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGTTGTTGCACA AGAAAGATGAGGGCCCCACCATTAAGATCACTGTTGAAACACCGGGGCTG GCCCAGCTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGTGGGACCATGATGTCAGAGGC

[0334]

서열 번호	설명	서열
		TCGTTGTCCGCGGGCTGTGTGGAGGCGGGTGCCTGATTCGAGGT CGGTCAACGGGACTACCTCGGACTGCTGCTGTTCCCTGGTGACCTCTGTC ACCAATGTGGACCTGCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA
20	Fc 도메인에 융합된 ActRIIB 가용성 세포외 도메인(A64; 서열번호 17)을 포함하는 융합 단백질	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHLCYASWANSSG TIELVKKGWLDLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVYFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	Fc 도메인에 융합된, C-말단 15개 아미노산이 결실된 ActRIIB(A64) 가용성 세포외 도메인(서열번호 18)을 포함하는 융합 단백질	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHLCYASWANSSG TIELVKKGWLDLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVIIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVYFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	EC 도메인의 N-말단 6개 아미노산 및 EC 도메인의 C-말단 5개 아미노산이 결실되었고(서열번호 28의 아미노산 25-129) L79D 돌연변이를 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSGTIELV KKGWDDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPT
23	EC 도메인의 N-말단 6개 아미노산 및 EC 도메인의 C-말단 3개 아미노산이 결실되었고(서열번호 28의 아미노산 25-131) L79D 돌연변이를 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSGTIELV KKGWDDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPT
24	EC 도메인의 N-말단 6개 아미노산 및 EC 도메인의 C-말단 3개 아미노산이 결실되었고(서열번호 28의 아미노산 25-131) L79D 돌연변이 및 TPA 리더 서열을 갖는	MDAMKRGCLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHLCYASWRNSSGTIELVKKGWDDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPVETVYPPPTGGTHTCPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

[0335]

서열 번호	설명	서열
	프로세싱되지 않은 ActRIIB-Fc 융합 단백질	KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
25	EC 도메인의 N-말단 6개 아미노산 및 EC 도메인의 C-말단 3개 아미노산이 결합되었고(서열번호 28의 아미노산 25-131) L79D 돌연변이를 갖는 프로세싱된 ActRIIB-Fc 융합 단백질	ETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK KGCWDDDFNCYDRQCVATEENPQVYFCCCEGNCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTGGTHTCCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWVDGVEVHNKTKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQFENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTIV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 16의 아미노산 20- 134)	GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDLDFNCYDRQCVATEENPQVYFCCCEGNCNERFTHLPE AGGPEVTEPPPTAPT
27	C-말단 15개 아미노산이 결실된 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 16의 아미노산 20-119)	GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDLDFNCYDRQCVATEENPQVYFCCCEGNCNERFTHLPE A
28	인간 ActRIIB 전구체 단백질 서열(R64)	MTAPWVALALLWGSLW PGSGRGEAETRECIY NNANWELERTNQSLER CEGEQDKRLHCYASWR NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQCVATEEN PQVYFCCCEGNCNER FTHLPEAGGPEVTEP PPTAPTLITVLAYSLL PIGGLSLIVLLAFWMY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPPSPVLGKPLQL LEIKARGRGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFTAAEKGRSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGLAVRFEFGKPP GDTHGQVGTTRYMAPE VLEGAINFQDAFLRI DMYAMGLVLWELVSRC KAADGVPDEYMLPFEE EIGQHPSLEELQEVVY HKMRPTIKDHWLKHG GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTSDCLVSL VTSVTNVLDLPPKESSI
29	인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 28의 아미노산 19- 134)	SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDLDFNCYDRQCVATEENPQVYFCCCEGNCNERFTHLPE AGGPEVTEPPPTAPT
30	C-말단 15개 아미노산이 결실된 인간 ActRIIB	SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG

[0336]

서열 번호	설명	서열
	가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 28의 아미노산 19-119)	TIELVKKGCLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE A
31	인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 28의 아미노산 20- 134)	GRGEATRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCHYASWRNSSG TIELVKKGCLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTIEPPPTAPT
32	C-말단 15개 아미노산이 결실된 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 28의 아미노산 20-119)	GRGEATRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCHYASWRNSSG TIELVKKGCLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE A
33	EC 도메인의 N-말단 6개 아미노산 및 EC 도메인의 C-말단 3개 아미노산이 결실되었고(서열번호 16의 아미노산 25-131) L79D 돌연변이를 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCHYASWRNSSG KKGWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPT
34	EC 도메인의 N-말단 6개 아미노산 및 EC 도메인의 C-말단 3개 아미노산이 결실되었고(서열번호 16의 아미노산 25-131) L79D 돌연변이 및 TPA 리더 서열을 갖는 인간 프로세싱되지 않은 ActRIIB-Fc 용합 단백질	MDAMKRGCLCCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERCE GEQDKRLHCHYASWRNSSGTIELVKKGCLDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGFCNERFTHLPEAGGPEVTIEPPPTGGGTHCPCPAPPELLGG PSVFLPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREQYNSTYRVSVLTVLHQDLNGLKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGPPEPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSPGK*
35	EC 도메인의 N-말단 6개 아미노산 및 EC 도메인의 C-말단 3개 아미노산이 결실되었고(서열번호 16의 아미노산 25-131) L79D 돌연변이를 갖는 프로세싱된 ActRIIB-Fc 용합 단백질	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCHYASWRNSSGTIELVK KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTGGGTHCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGLKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK*
36	L79D 돌연변이를 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 28의 아미노산 20-134)	GRGEATRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCHYASWRNSSG TIELVKKGCLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTIEPPPTAPT

[0337]

서열 번호	설명	서열
37	L79D 돌연변이를 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 16의 아미노산 20-134)	GRGEATRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
38	GGG 연결제에 의해 Fc 도메인에 융합된, L79D 돌연변이를 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 28의 아미노산 20-134)	GRGEATRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
39	Fc 도메인에 융합된, L79D 돌연변이를 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 16의 아미노산 20- 134)	GRGEATRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
40	Fc 도메인에 융합되어 있고 L79D 돌연변이 및 TPA 리더 서열을 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드 서열(서열번호 28의 아미노산 20-134)	MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
41	Fc 도메인에 융합되어 있고 L79D 돌연변이 및 TPA 리더 서열을 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 프로세싱된 폴리펩티드	MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE

[0338]

서열 번호	설명	서열
	서열(서열번호 16의 아미노산 20-134)	AGGPEVTYEPPTAPTGGTHTCCPCPAPELLGG PSVFLFPKPKDITLMISTRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHQDLWNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK*
42	변이체 C-말단 서열(국제 특허출원 공개 제 W02007/053775 호에 개시됨)을 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 폴리펩티드 서열	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCHYASWRNSSGT IELVKKGWLDLDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCEGFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQSGGALWLCLEGPAHE
43	L79D 돌연변이를 갖는 변이체 C-말단 서열(국제 특허출원 공개 제 W02007/053775 호에 개시됨)을 갖는 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 폴리펩티드 서열	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCHYASWRNSSGT IELVKKGWLDLDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCEGFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQSGGALWLCLEGPAHE
44	L79D 돌연변이를 갖는 변이체 C-말단 서열(국제 특허출원 공개 제 W02007/053775 호에 개시됨)을 갖고 TGGG 연결제에 의해 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIB 가용성(세포외) 폴리펩티드 서열	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCHYASWRNSSGT IELVKKGWLDLDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCEGFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQSGGALWLCLEGPAHE TGGGTHCCPCPAPELLGG PSVFLFPKPKDITLMISTRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHQDLWNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK*
45	서열번호 24를 코딩하는 핵산 서열	ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTCG TATGCGTCGT GGAGGAACCTC CTCCGGGACG ATTGAACCTG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTCA ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTCTCTGT GTTGCAGGGG

[0339]

서열 번호	설명	서열
		GAATTCTGT AATGAACGGT TTACCACCTT CCGGAAGCC GGCGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CCACCCGGTG GTGGAACCTA CACATGCCCA CCGTGCCCG CACTGAACCT CCTGGGGGA CCGTCACTCT TCCTCTTCCC CCAAAACCC AAGGACACC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGAGG CCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAG CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCAGGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACG GTCCTGCACC AGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGTCTC CAACAAGCC CTCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCG AGAACCCAG GTGTACACC TGCCCCCATC CCGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGCTCTTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCTGTC CCGGGTAA TGA
46	Fc 도메인에 융합된 ActRIIB 가용성 세포의 도메인(R64; 서열번호 29)을 포함하는 융합 단백질	SRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGWLDDEFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVEIKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVYFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	Fc 도메인에 융합된, C-말단 15개 아미노산이 결실된 ActRIIB 가용성 세포의 도메인(R64)(서열번호 30)을 포함하는 융합 단백질	SRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGWLDDEFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVEIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVYFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0340]

서열 번호	설명	서열
48	프로세싱되지 않은 전체 길이 전구체 단백질 GDF11, 즉, GDF11 예비전구단백질	MVLAAPLLLLGLFLLLALELRPRGEAAEGPAAAAAAGVGGERSR PAP SVAPEPDGCPVCVVRQHSRELRLSEIKSILSKRLKEAPNISREVVKQL LPK APPLQQIILDLDHDFQDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDPAVQTD GSP LCCHFHSFKVMFTKVLKAQLWVYLRPVPRPATVYLQILRLKPLTGEFTA GGG GGRRRHIRIRSLKIELHSRSHWQSIDFKVLHSWFRQPQSNWNGIEINAF DPS GTDLAVTSLGPAGELHPFMELRVLENTKRRLNLGLDCDEHSSERCCR YPL TVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFQKYPHTHLVQQANPRGSA GPC CTPTKMSPINMLYFNDKQIIFYGKIPGMVVDRCGS
49	서열번호 48 을 코딩하는 핵산 서열	ATGGTGCTCGGGCCCCGCTGCTGGGCTTCCTGCTCCTCGCCCTG GAGCTGGGCCCCGGGGAGGCGGAGGGCGCCGCGGGGGGCGGCG CGGGCGGGGGGGGGGAGCGGGGGGGTGGGGGGGAGCGCTCC AGCCGGCCAGCCCGTCCGTGGCGCCGAGCCGCGGCTGCCCGTG TGCCTTGGCGGAGCAGCAGCCGCGAGCTGCGCTAGAGAGCATCAAG TCGAGATCTTGAGCAACTGCGGCTCAAGAGGCGCCCAACATCAGC CGGAGGTGTGAAGCAGCTGCTGCCAAGGCGCGCGCTGCAGCAG ATCCTGGACCTACAGACTTCCAGGGCAGCGCTGACGCCGAGGAC TTCTTGAGGAGGACGAGTACCACGCCACCACCGAGACCGTCAATAGC ATGGCCCCAGGAGACGGACCCAGCAGTACAGACAGATGGCAGCCCTC TGCTGCCATTTTCACTTACGCCCAAGGTGATGTTACAAAGGTACTG AAGGCCAGCTGTGGGTGTACCTACGCCCTGTACCCCGCCAGCCACA GTCTACCTGCAGATCTTGCAGCTAAACCCCTAATGGGGGAAGGACC GCAGGGGAGGGGGCGGAGCGCGCTCACATCCGTATCCGCTCACTG AAGATTGAGCTGCACTCAGCTCAGGCCATTGGCAGAGCATCGACTTC AAGCAAGTGCTACACAGTGGTTCGCCAGCCACAGAGCAACTGGGGC ATCGAGATCAACGCCCTTTGATCCAGTGGCACAGACCTGGCTGTCAAC TCCCTGGGGCGGGAGCGGAGGGGCTGCATCCATTCATGGAGCTTCGA

서열 번호	설명	서열
50	인간 GDF11 단백질의 GDF11 전구펩티드	GTCTAGAGAACACAAAAAGCTTCCGGCGGAAACCTGGGTCTGGACTGC GACGAGCACTCAAGCGAGTCCCGTGGCTGCTGCCGATATCCCTCAGAGTG GACTTTGAGGCTTTTCGGCTGGGACTGGATCATCGCACCTAAGCGCTAC AAGGCCAACTACTGCTCGGCCAGTCGAGTACATGTTCATGCAAAAA TATCCGCATACCCATTTGGTGACAGGCCAATCCAAGAGGCTCTGCT GGGCCCTGTTGTACCCCAAGATGTCCCAATCAACATGCTCTAC TTCAATGACAAGCAGCATTTATCTAGGGCAAGATCCCTGGCATGGTG GTGGATCGCTGTGCTGCTCT
51	서열번호 50을 코딩하는 핵산 서열	AEGPAAAAAAGVGGERSRPAPSVAPEDGCPVCVVRQHSR ELRLSEIKSILSKRLKEAPNISREVVKQLLPKAPPLQIILDHDFQ GDALQPEDFLEEDYHATETVI SMAQETDPAVQTDGSLCCHFHFSF KVMFTKVLKAQLWVLPVPVPATVYLIQLRLPLTGGTAGGGGGR RHIRIRSLKIELHSRSHWQSIDFKQVLSWFRQPSNWWGIEINAFDP SGTDLAVTSLGPGAELHPFMELRVLENTKRSRR GCCGAGGCCCGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGAGCG GCGGGGTGCGGGGGGAGCGCTCCAGCCGGCCAGCCCCGTCCGTGGCG CCCGAGCGGACGGCTGCCCGCTGTGCGTTTGGCGGACGACAGCCGC GAGTGGCCCTAGAGCATCAAGTCGAGATCTTGAGCAAACTGCGG CTCAAGGAGGCGCCCAACATCAGCCGCGAGGTGGTGAAGCAGCTGCTG CCCAAGGCGCGCGCTGACGAGATCTTGACCTACACGACTTCCAG GCGACGCGCTGCAGCCGAGGACTTCTTGAGGAGGACGAGTACCAC GCCACCACGAGACCGTCATTAGCATGGCCCGAGGAGACGACCCAGCA GTACAGACAGATGGACGCCCTCTGCTGCCATTTTCACTTACGCCCC AAGGTGATGTTTCAAAAGGTACTGAAGGCCAGCTGTGGGTGTACCTA CGGCCTGTACCCCGCCAGCCACAGTACCTGCAGATCTTGCGACTA AAACCCCTAACTGGGGAAGGACCGCAGGGGGAGGGGGCGGAGGCCGG CGTCACATCCGTA TCCGCTCACTGAAGATTGAGCTGCACTCACGCTCA GGCCATTGGCAGAGCATCGACTTCAAGCAAGTGTACACAGCTGTTTC CGCCAGCCACAGAGCAACTGGGGCATCGAGATCAACGCCCTTTGATCCC AGTGGCACAGACCTGGCTGTCACTCCCTGGGGCGGGGAGCGAGGGGG CTGCATCCATTTCAATGGAGCTTCGAGTCTCTAGAGAACACAAAAAGTTCC CGCGCG
52	성숙 인간 GDF11 단백질	NLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFAFGWDWI IAPKRYKANYCSGQCE

[0342]

서열 번호	설명	서열
53	서열번호 52를 코딩하는 핵산 서열	YMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTRKMSPINMLYFNDKQQLIYG KIPGMVVDRCGS AACCTGGGTCTGGACTGCGACGAGCACTCAAGCGAGTCCCGCTGCTGC CGATATCCCTCACAGTGGACTTTGAGGCTTTCGGCTGGGACTGGATC ATCGCACCTAAGCGCTACAAGGCCAACTACTGCTCCGGCCAGTCCGAG TACATGTTTCATGCAAAATATCCGCATACCCATTGTTGGTGCAGAGGCC AATCCAAGAGGCTCTGCTGGGCCCTGTTGTACCCCCACCAAGATGTCC CCAATCAACATGCTCTACTTCAATGACAAGCAGAGATTATCTACGGC AAGATCCCTGGCATGGTGGTGGATCGCTGTGGCTGCTCT
54	뮤린 Fc 도메인에 융합된 뮤린 ActRIIA 세포외 도메인("mActRIIA-Fc")	서열번호 7의 뮤린 대응물은 ActRIIA 세포외 도메인에 융합된 뮤린 IgG2a를 포함한다.

[0343]

[0344]

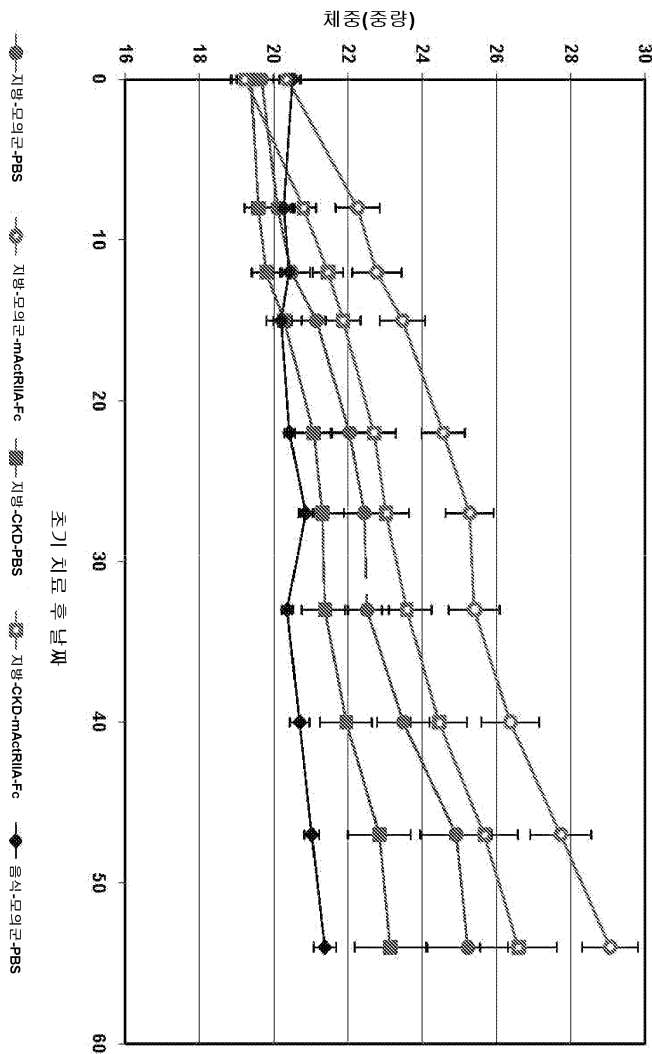
본 발명이 그의 구체적인 실시양태들에 관하여 상세히 기재되어 있지만, 기능적으로 균등한 변경이 본 발명의 범위 내에 있다는 것을 이해할 것이다. 사실상, 본원에 제시되고 기재된 변경 이외의 본 발명의 다양한 변경들이 상기 설명 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 명확해질 것이다. 이러한 변경은 첨부된 특허청구범위 내에 속한다. 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 구체적인 실시양태에 대한 많은 균등물들을 과도한 실험 없이 인식할 것이거나 확인할 수 있다. 이러한 균등물들은 하기 특허청구범위에 의해 포괄된다.

[0345]

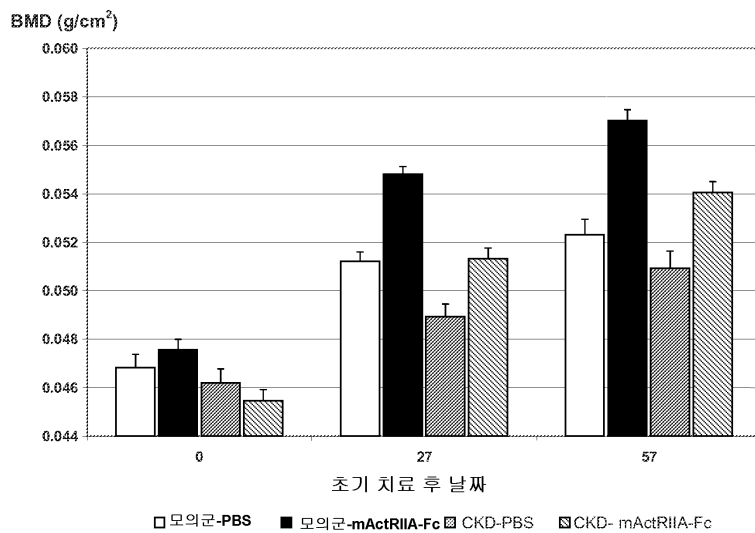
본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌들, 특허들 및 특허출원들은 각각의 개별 공개문헌, 특허 또는 특허출원이 전체로서 본원에 참고로 도입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시되어 있는 것처럼 동일한 정도로 본 명세서에 참고로 도입된다.

도면

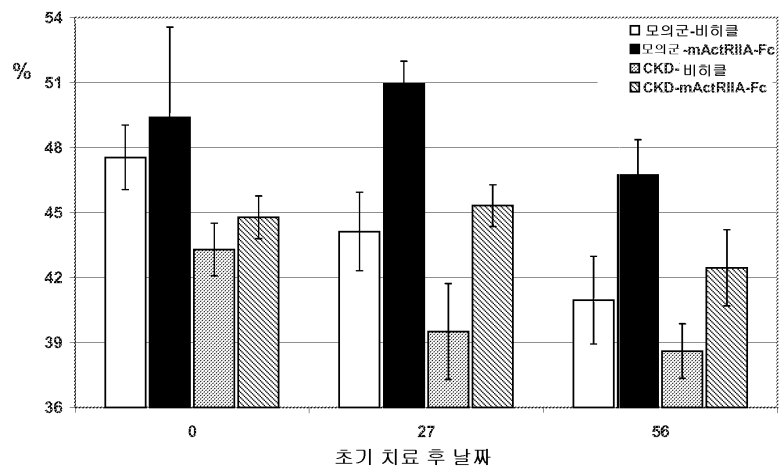
도면1



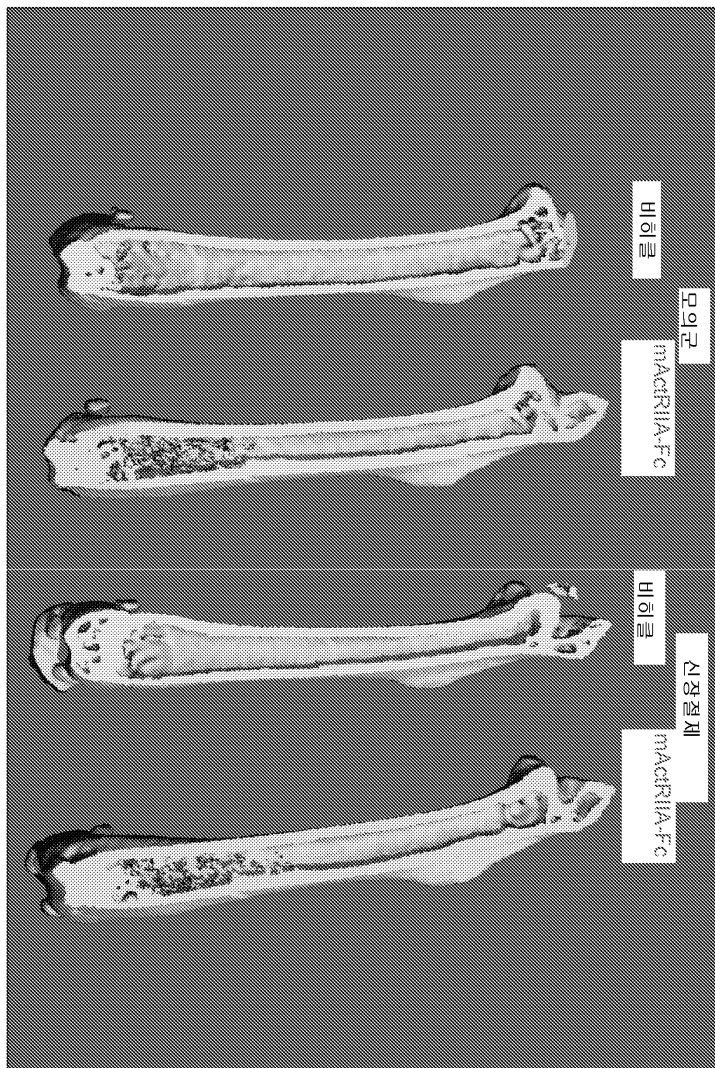
도면2



도면3

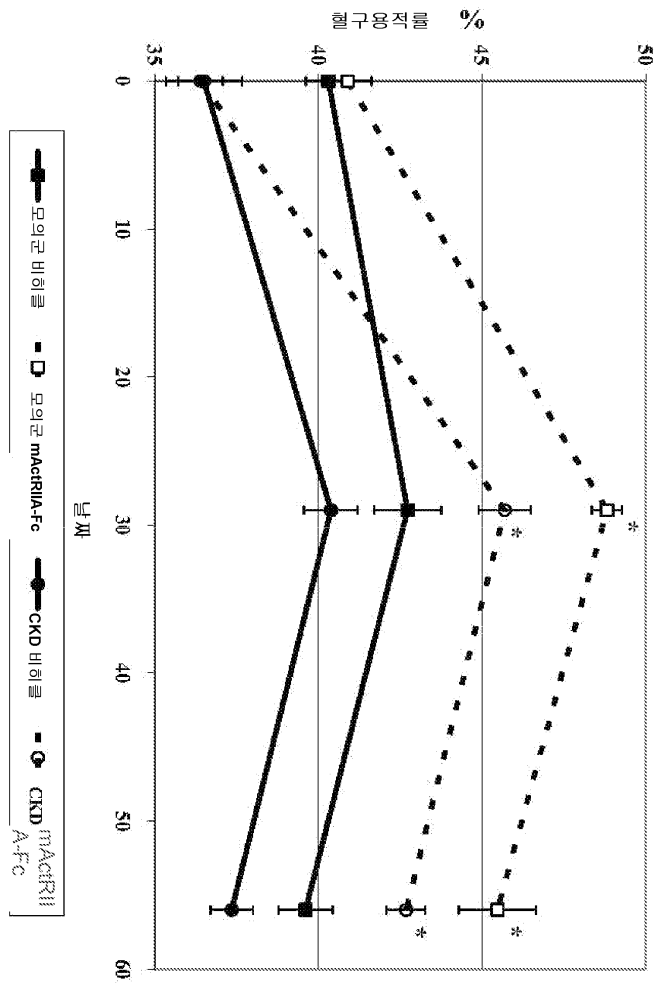


도면4

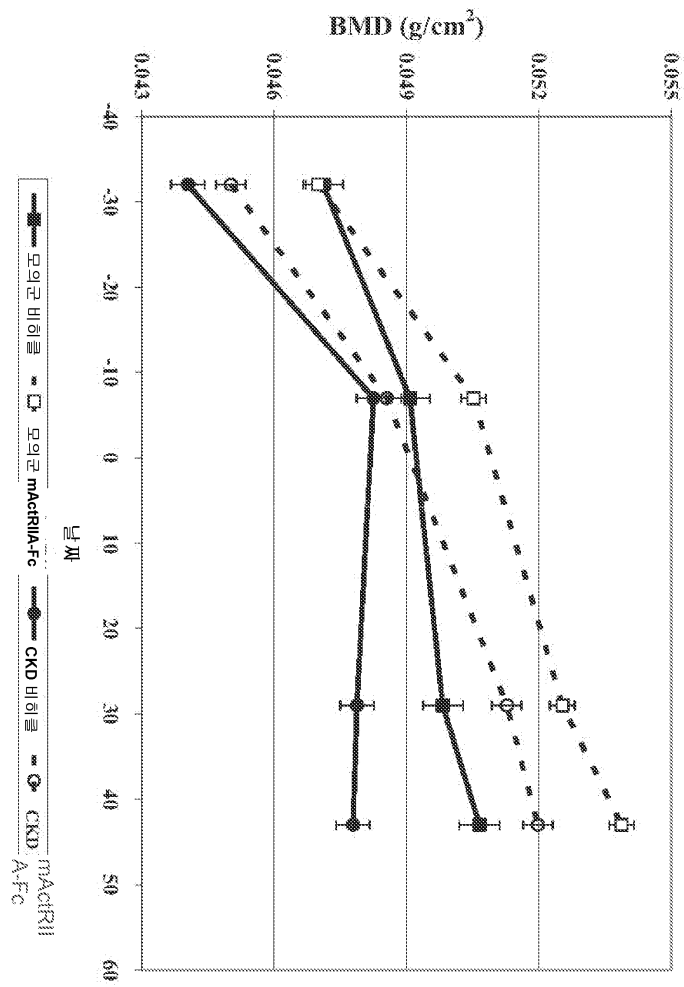


도면5

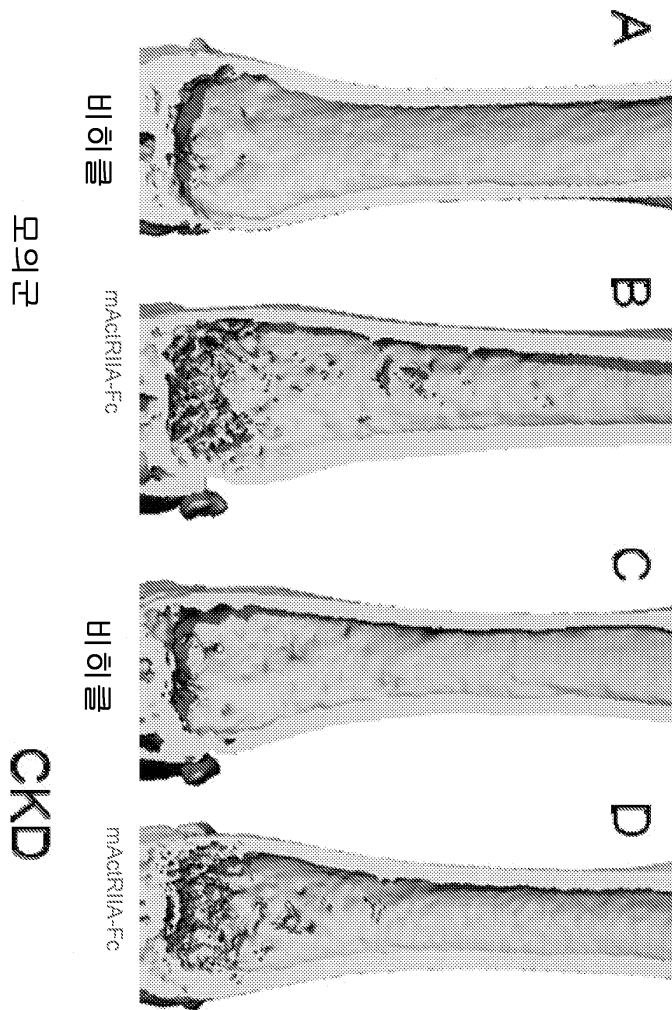
*= 비이클과 대비하여 p≤0.01



도면6

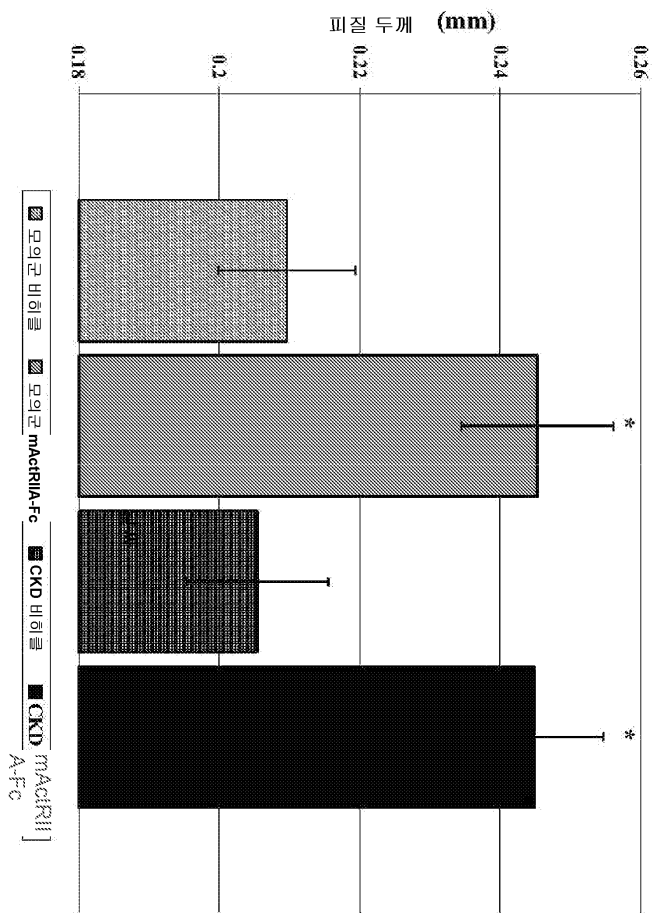


도면7

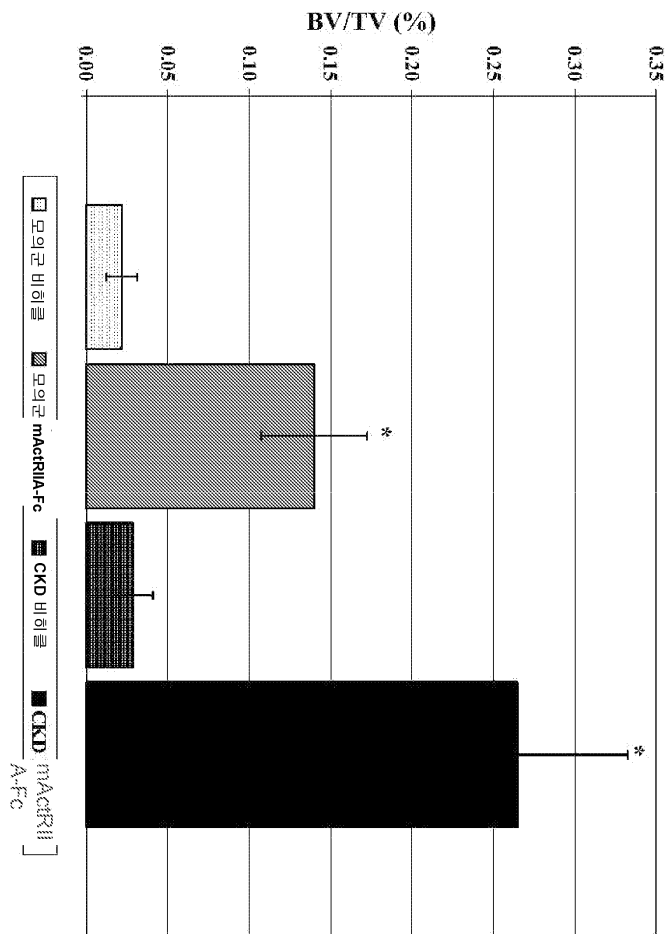


도면8

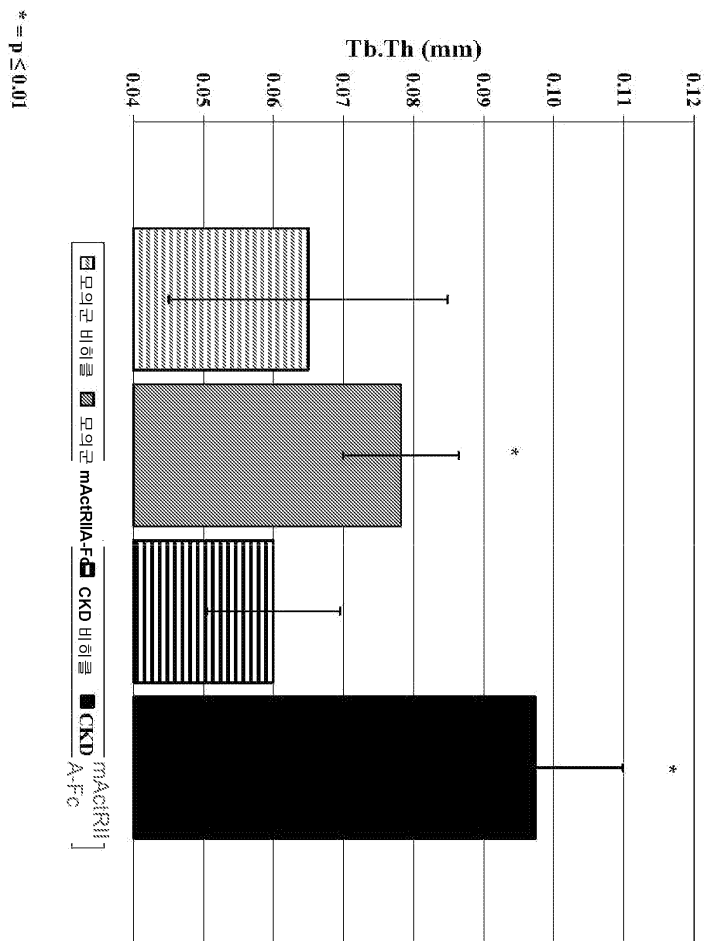
*=비히클과 대비하여 p<0.01



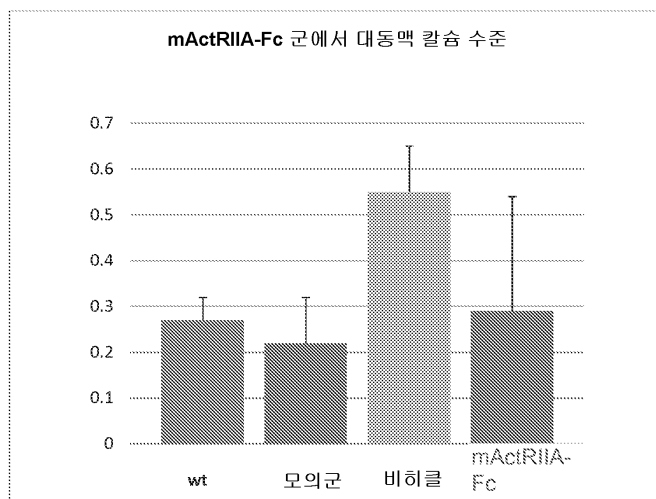
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Celgene Corporation, Washington University, Victor Schorr Sloan, Keith Hruska, Yifu Fang

<120> ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR TREATING

BONE AND OTHER DISORDERS

<130> 12827-375-228

<140> PCT/US2013/068009

<141> 2013-11-01

<150> US 61/721,898

<151> 2012-11-02

<150> US 61/740,665

<151> 2012-12-21

<160> 53

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIA precursor polypeptide

<400> 1

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys

1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe

20 25 30

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu

35 40 45

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp

50 55 60

Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu

65 70 75 80

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp

85 90 95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu

100 105 110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn

115	120	125
Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu		
130	135	140
Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val		
145	150	155
Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln		
165	170	175
Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu		
180	185	190
Gln Leu Leu Glu Val Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys		
195	200	205
Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln		
210	215	220
Asp Lys Gln Ser Trp Gln Asn Glu Tyr Glu Val Tyr Ser Leu Pro Gly		
225	230	235
Met Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Ile Gly Ala Glu Lys Arg Gly		
245	250	255
Thr Ser Val Asp Val Asp Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Glu Lys		
260	265	270
Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu		
275	280	285
Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His		
290	295	300
Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His		
305	310	315
Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala		
325	330	335
Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser		
340	345	350
Ala Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro		
355	360	365

Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg
370 375 380

Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Ala Ser Arg
385 390 395 400

Cys Thr Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu
405 410 415

Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Asp Met Gln Glu Val Val
420 425 430

Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His
435 440 445

Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His
450 455 460

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

Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
485 490 495

Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
500 505 510

Leu

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIA soluble (extracellular), processed polypeptide

<400> 2

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser

35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn

50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val

65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr

85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro

100 105 110

Lys Pro Pro

115

<210> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIA soluble (extracellular), processed polypeptide
with the C-terminal 15 amino acids deleted

<400> 3

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn

1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly

20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser

35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn

50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val

65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr

85 90 95

Phe Pro Glu Met

100

<210> 4

<

211> 1542

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIA precursor

<400> 4

```

atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60
atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120
agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180
tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 240
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300
tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360

gaagtcacac agccacttc aaatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg 420
ctctattcct tggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480
tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttggtc caactcaaga cccaggacca 540
ccccacctt ctccattact aggggtgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600
ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660
tttccaatac aggacaaaca gtcatggcaa aatgaatacg aagtctacag ttgcctgga 720
atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780
gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840

gctaattgtg tctcttgaa tgaactgtgt catattgcag aaacatggc tagaggattg 900
gcataattac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960
agggacatca aaagtaaaaa tgtgtgtgtg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac 1020
tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgatacca tggacagggt 1080
ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt cgaaagggat 1140
gcatttttga ggatagatat gtatgcatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200
tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260
cagcatccat ctctgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320

ttaagagatt atggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380

```

tggtgggac acgacgcaga agccagggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440
cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500
gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga 1542

<210> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIA soluble (extracellular) polypeptide

<400> 5

atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120

tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 180
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
tatttttggt gcgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacc 345

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct - fusion protein comprising a soluble
extracellular domain of ActRIIA fused to an Fc domain

<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> 6

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> 7
 <211> 344
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct - Extracellular domain of human ActRIIA

fused to a human Fc domain

<400> 7

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn

1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly

20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser

35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn

50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val

65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr

85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

165 170 175

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

180 185 190

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

195 200 205

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320

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

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<220>

<223> Leader sequence of Honey bee mellitin

<400> 8

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ile Tyr Ala
 20

<210> 9

<211>

> 22

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Leader sequence of Tissue Plasminogen Activator (TPA)

<400> 9

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

20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Native ActRIIA leader

<400> 10

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys

1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala

20

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct - ActRIIA-hFc and ActRIIA-mFc N-terminal
sequence

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu

1 5

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct - ActRIIA-Fc Protein with deletion of the
C-terminal 15 amino acids of the extracellular domain of ActRIIA

<400> 12

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn

1 5 10 15
Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly

20 25 30
Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser

35 40 45
Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn

50 55 60
Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val

65 70 75 80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr

85 90 95
Phe Pro Glu Met Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

115 120 125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

130 135 140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

145 150 155 160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

165 170 175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

180 185 190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

195 200 205
Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 13

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct - Unprocessed ActRIIA-hFc with TPA

leader sequence

<400> 13

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 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr
 20 25 30
 Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn
 35 40 45
 Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His
 50 55 60
 Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys
 65 70 75 80

Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys
85 90 95

Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
100 105 110

Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr
115 120 125

Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly
130 135 140

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
145 150 155 160

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
165 170 175

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
180 185 190

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
210 215 220

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
225 230 235 240

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
245 250 255

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
260 265 270

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
275 280 285

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
290 295 300

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
305 310 315 320

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

325	330	335
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
340	345	350
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
355	360	365

Lys

<210> 14

<211> 1114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct - Unprocessed ActRIIA-hFc with TPA leader sequence

<400> 14

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
 tcgcccggcg ccgctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120
 attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata 180
 aacggcggca ttgttttctt acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240
 aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300

cagccctgaa gtatatcttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360
 ttttcggag atggaagtca cacagccac ttcaaataca gttacaccta agccaccac 420
 cgggtggtgga actcacacat gccacccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
 agtcttcctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt 540
 cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 600
 ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660
 gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720
 caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtcccatc gagaaaacca tctcaaagc 780

caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840
 caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 900
 ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
 ctccgacggc tcctttctcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
 ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080

gagcctctcc ctgtctccgg gtaaagaga attc

1114

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic construct - human ActRIIB soluble (extracellular), processed

polypeptide sequence with the N-terminal 6 amino acid of the EC domain

deleted and the C-terminal 4 amino acids of the EC domain deleted

<400> 15

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 Asp 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

100 105

<210> 16

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIB precursor protein

<400> 16

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 Ala

 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> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide

<400> 17

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ala Pro Thr

115

<210> 18

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
sequence with the C-terminal 15 amino acids deleted

<400> 18

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala

1 5 10 15
Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu

20 25 30
Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser

35 40 45
Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe

50 55 60
Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln

65 70 75 80
Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr

85 90 95
His Leu Pro Glu Ala

100

<210> 19

<211> 1539

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIB (A64) precursor

<400> 19

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180
gcctcctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat 240

gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccagggtgtac 300
ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatTTGCC agaggctggg 360
ggcccgaag tcacgtacga gccacccccg acagccccca cctgctcac ggtgctggcc 420
tactcactgc tgeccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480
cggcatcgca agcccccta cggatcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540
ccatccctc tggTGGGCCT gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcggggggcg 600
tttggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660

ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720

cacgagaacc tgctacagtt cattgtgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgccacacag 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgtgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc 1080
acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtctc 1200

aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320
aaagatcact ggttgaacaa cccgggcctg gccagcttt gtgtgacat cgaggagtgc 1380
tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgtcc ggggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggaggt cggtaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

<210> 20

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> Synthetic construct - fusion protein comprising a soluble

extracellular domain of ActRIIB fused to an Fc domain

<400> 20

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
 65 70 75 80
 Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
 85 90 95
 His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
 100 105 110

 Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175

 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 195 200 205
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240

 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300

 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

305					310						315					320
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
				325					330					335		
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
			340													
<210>	21															
<211>	329															
<212>	PRT															
<213>	Artificial Sequence															
<220>																
<223>	Synthetic construct - fusion protein comprising a soluble extracellular domain of ActRIIB (A64) with the C-terminal 15 amino acids deleted fused to an Fc domain															
<400>	21															
Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala	
1				5					10					15		
Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys	Glu	
			20					25					30			
Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Asn	Ser	
			35				40					45				
Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	
	50					55					60					
Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	
65				70					75					80		
Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	
				85				90					95			
His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
			100					105					110			
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
			115					120					125			
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
	130					135						140				

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

305 310 315 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 22

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
with the N-terminal 6 amino acids of the EC domain
deleted and the C-terminal 5 amino acids of the EC domain

deleted and with an L79D mutation

<400> 22

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 Asp 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			
100	105		

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
sequence with the N-terminal 6 amino acids of the EC domain
deleted and the C-terminal 3 amino acids of the EC domain

deleted and with an L79D mutation

<400> 23

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 Asp 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

100

105

<210> 24

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Unprocessed ActRIIB-Fc fusion protein with the N-terminal 6

amino acids of the EC domain deleted and the C-terminal 3

amino acids of the EC domain deleted and with an L79D

mutation and with TPA leader sequence

<400> 24

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 Asp

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> 25

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Processed ActRIIB-Fc fusion protein with the N-terminal 6
amino acids of the EC domain deleted and the C-terminal 3
amino acids of the EC domain deleted and with an L79D mutation

<400> 25

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 Asp 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> 26

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular) processed polypeptide

<400> 26

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110
 Ala Pro Thr
 115

<210> 27

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular) processed polypeptide

sequence with the C-terminal 15 amino acids deleted

<400> 27

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala

100

<210> 28

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIB precursor protein

<400> 28

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> 29

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular) processed polypeptide

<400> 29

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ala Pro Thr

115

<210> 30

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
with the C-terminal 15 amino acids deleted

<400> 30

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr

85 90 95

His Leu Pro Glu Ala

100

<210>

> 31

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide

<400> 31

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

1 5 10 15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110

Ala Pro Thr
 115

<210> 32

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
 with the C-terminal 15 amino acids deleted

<400> 32

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser

35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

Leu Pro Glu Ala
100

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
sequence with the N-terminal 6 amino acids of the EC domain
deleted and the C-terminal 3 amino acids of the EC domain
deleted and with an L79D mutation

<400> 33

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 Ala Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp 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
100 105

<210> 34

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Unprocessed ActRIIB-Fc fusion protein with the N-terminal 6 amino acids of the EC domain deleted and the C-terminal 3 amino acids of the EC domain deleted and with an L79D mutation and with TPA leader sequence

<400> 34

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	
Ala Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp			

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
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> 35

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Processed ActRIIB-Fc fusion protein with the N-terminal 6
amino acids of the EC domain deleted and the C-terminal 3
amino acids of the EC domain deleted and with an L79D mutation

<400> 35

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 Ala Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45
 Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp 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> 36

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
 sequence with L79D mutation

<400> 36

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110
 Ala Pro Thr

115

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
sequence with L79D mutation

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Pro Thr

115

<210> 38

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
sequence with L79D mutation fused to an Fc domain with a
GGG linker

<400> 38

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

1 5 10 15
Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
20 25 30
Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
35 40 45
Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
50 55 60
Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val

65 70 75 80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95
Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
100 105 110
Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
115 120 125
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

130 135 140
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145 150 155 160
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
165 170 175
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
180 185 190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

260 265 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

275 280 285

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

290 295 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

305 310 315 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

340

<210> 39

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
sequence with L79D mutation fused to an Fc domain

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

165 170 175

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

180 185 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

195 200 205

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

210 215 220

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

225 230 235 240

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

260 265 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

275 280 285

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

290 295 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

305 310 315 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

 <210> 40
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
 sequence with L79D mutation fused to an Fc domain and with
 TPA leader sequence
 <400> 40
 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 Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
 20 25 30

 Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
 35 40 45
 Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
 50 55 60
 Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
 65 70 75 80
 Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
 85 90 95

 Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
 100 105 110
 Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
 115 120 125
 Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr
 130 135 140
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

[illegible]

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
sequence with L79D mutation fused to an Fc domain and with
TPA leader sequence

<400> 41

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 Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
20 25 30

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

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

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

Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
85 90 95

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

Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
115 120 125

Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr
130 135 140

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
145 150 155 160

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
165 170 175

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
180 185 190

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
195 200 205

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 210 215 220
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 225 230 235 240
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 245 250 255
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 260 265 270

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 340 345 350
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 42

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
 having a variant C-terminal sequence

<400> 42

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

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

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu

130 135 140

<210> 43

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide
having a variant C-terminal sequence having an L79D mutation

<400> 43

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

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

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

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
50 55 60

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

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu
130 135 140

<210> 44

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human ActRIIB soluble (extracellular), processed polypeptide

sequence having a variant C-terminal sequence having an L79D
mutation fused to an Fc domain with a TGGG linker

<400> 44

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

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

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

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
50 55 60

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

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu Thr Gly Gly
130 135 140

Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
165 170 175

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
180 185 190

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
195 200 205

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
210 215 220

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
225 230 235 240

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
245 250 255

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
260 265 270

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
275 280 285

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
290 295 300

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
305 310 315 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
325 330 335

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
340 345 350

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

355

360

365

Gly Lys

370

<210> 45

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Unprocessed ActRIIB-Fc fusion protein with the N-terminal 6

amino acids of the EC domain deleted and the C-terminal 3

amino acids of the EC domain deleted and with an L79D

mutation and with TPA leader sequence

<400> 45

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccgcg ccgccgaac ccgcgaatgt atttattaca atgctaattg ggaactcgaa 120

cggacgaacc aatccgggct cgaacgggtgt gagggggaac aggataaacg cctccattgc 180

tatgcgtcgt ggaggaactc ctccgggacg attgaactgg tcaagaaagg gtgctgggac 240

gacgatttca attgttatga ccgccaggaa tgtgtcgcga ccgaagagaa tccgcaggtc 300

tatttctgtt gttgcgaggg gaatttctgt aatgaacggt ttaccacact ccccgaaagg 360

ggcgggcccc aggtgacctt tgaacccccg ccacccggtg gtggaactca cacatgcccc 420

ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 480

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 540

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 600

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 660

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 720

ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 780

gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 840

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 900

gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt cttcctctat 960

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg 1020

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 1080

tga

1083

<210> 46

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fusion protein comprising a soluble extracellular domain of
ActRIIB fused to an Fc domain

<400> 46

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

165 170 175

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
180 185 190
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
195 200 205
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
210 215 220
Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

225 230 235 240
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
245 250 255
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
260 265 270
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
275 280 285
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

290 295 300
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
305 310 315 320
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
325 330 335
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 47

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fusion protein comprising a soluble extracellular domain of

ActRIIB (R64) with the C-terminal 15 amino acids deleted fused
to an Fc domain

<400> 47

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala

1 5 10 15
 Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
 35 40 45
 Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe

 50 55 60
 Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
 65 70 75 80
 Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
 85 90 95
 His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

 115 120 125
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

 180 185 190
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

 245 250 255

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

305 310 315 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 48

<211> 407

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> full-length, unprocessed precursor protein GDF11

(GDF11 preproprotein)

<400> 48

Met Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15
Glu Leu Arg Pro Arg Gly Glu Ala Ala Glu Gly Pro Ala Ala Ala Ala
20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Gly Gly Glu Arg Ser
35 40 45

Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly Cys Pro Val
50 55 60

Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu Ser Ile Lys
65 70 75 80

Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro Asn Ile Ser
85 90 95

Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln
100 105 110

Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln Pro Glu Asp
 115 120 125
 Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Val Ile Ser
 130 135 140
 Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly Ser Pro Leu
 145 150 155 160

Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr Lys Val Leu
 165 170 175
 Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr
 180 185 190
 Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly Glu Gly Thr
 195 200 205
 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu
 210 215 220

Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser Ile Asp Phe
 225 230 235 240
 Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly
 245 250 255
 Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu Ala Val Thr
 260 265 270
 Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met Glu Leu Arg
 275 280 285

Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys
 290 295 300
 Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 325 330 335
 Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys
 340 345 350

Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala

355 360 365
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 370 375 380
 Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val
 385 390 395 400
 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser

405

<210> 49

<211> 1221

<212> DNA

<213> Unknown

<220

>

<223> full-length, unprocessed precursor protein GDF11

(GDF11 preproprotein)

<400> 49

atggtgctcg cgccccgct gctgctgggc ttctgtctcc tcgccctgga gctgcggccc 60
 cggggggagg cggccgaggg ccccgcggcg gcggcggcgg cggcggcggc ggccggcagcg 120
 gcgggggtcg ggggggagcg ctccagccgg ccagccccgt ccgtggcgcc cgagccggac 180
 ggctgccccg tgtgcgtttg gcggcagcac agccgcgagc tgcgcctaga gagcatcaag 240
 tcgcagatct tgagcaaacg gcggctcaag gaggcgcccc acatcagccg cgagggtggtg 300
 aagcagctgc tgcccaaggc gccgcgctg cagcagatcc tggacctaca cgacttcag 360

ggcgacgcgc tgcagccga ggacttctg gaggaggacg agtaccacgc caccaccgag 420
 accgtcatta gcatggccca ggagacggac ccagcagtac agacagatgg cagccctctc 480
 tgctgccatt ttacttcag cccaaggtg atgttcacaa aggtactgaa ggcccagctg 540
 tgggtgtacc tacggctgt accccgcca gccacagtct acctgcagat ctitcgacta 600
 aaaccctaa ctggggaagg gaccgcaggg ggagggggcg gaggccggcg tcacatccgt 660
 atccgctcac tgaagattga gctgactca cgctcaggcc attggcagag catcgacttc 720
 aagcaagtgc tacacagctg gtccgccag ccacagagca actggggcat cgagatcaac 780
 gcctttgatc ccagtggcac agacctggct gtcacctccc tggggccggg agccgagggg 840

ctgcatccat tcatggagct tcgagtecta gagaacacaa aacgttcccg gcggaacctg 900
 ggtctggact gcgacgagca ctcaagcgag tcccgtgct gccgatatcc cctcacagtg 960
 gactttgagg ctttcggctg ggactggatc atcgaccta agcgtacaa ggccaactac 1020

tgctcggcc agtgcgagta catgttcacg caaaaatata cgcatacca ttgggtgcag 1080
caggccaatc caagaggctc tgctgggccc tgtgtaccc ccaccaagat gtccccaatc 1140
aacatgctct acttcaatga caagcagcag attatctacg gcaagatccc tggcatggtg 1200
gtggatcgct gtggctgctc t 1221

<210

> 50

<211> 274

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> GDF11 propeptide of human GDF11 protein

<400> 50

Ala Glu Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

Ala Gly Val Gly Gly Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala

20 25 30

Pro Glu Pro Asp Gly Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg

35 40 45

Glu Leu Arg Leu Glu Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg

50 55 60

Leu Lys Glu Ala Pro Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu

65 70 75 80

Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln

85 90 95

Gly Asp Ala Leu Gln Pro Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His

100 105 110

Ala Thr Thr Glu Thr Val Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala

115 120 125

Val Gln Thr Asp Gly Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro

130 135 140

Lys Val Met Phe Thr Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu

145 150 155 160

Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu

165 170 175

Lys Pro Leu Thr Gly Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg

180 185 190

Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser

195 200 205

Gly His Trp Gln Ser Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe

210 215 220

Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro

225 230 235 240

Ser Gly Thr Asp Leu Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly

245 250 255

Leu His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser

260 265 270

Arg Arg

<210> 51

<211> 822

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> GDF11 propeptide of human GDF11 protein

<400> 51

gccgagggcc ccgcgggcgc ggcgggcgcg gcggcgggcg cggcagcggc gggggtcggg 60

ggggagcgct ccagccggcc agccccgtcc gtggcgcccg agccggacgg ctgccccgtg 120

tgcgtttggc ggcagcacag ccgcgagctg cgcctagaga gcatcaagtc gcagatcttg 180

agcaaactgc ggctcaagga ggcgcccaac atcagccgcg aggtggtgaa gcagctgctg 240

cccaaggcgc cgccgctgca gcagatctg gacctacag acttcaggcg cgacgcgctg 300

cagcccgagg acttcctgga ggaggacgag taccacgcca ccaccgagac cgtcattagc 360

atggcccagg agacggaccc agcagtacag acagatggca gccctctctg ctgccatctt 420

cattcagcc ccaaggtgat gttcacaag gtactgaagg ccagctgtg ggtgtaccta 480

cggcctgtac cccgcccagc cacagtctac ctgcagatct tgcgactaaa acccctaact 540

ggggaaggga ccgcaggggg agggggcgga ggccggcgtc acatccgtat ccgctcactg 600

aagattgagc tgcactcacg ctcaggccat tggcagagca tcgacttcaa gcaagtgcta 660
cacagctggt tccgccagcc acagagcaac tggggcatcg agatcaacgc ctttgatccc 720
agtggcacag acctggctgt cacctccctg ggccggggag ccgaggggct gcatccattc 780
atggagcttc gattcctaga gaacacaaaa cgttcccggc gg 822

<210> 52

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Mature human GDF11 protein

<400> 52

Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys

1 5 10 15

Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile

20 25 30

Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu

35 40 45

Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala

50 55 60

Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser

65 70 75 80

Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly

85 90 95

Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser

100 105

<210> 53

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> GDF11 propeptide of human GDF11 protein

<400> 53

```

aacctgggtc tggactgcga cgagcactca agcgagtccc gctgctgccg atatccctc 60
acagtggact ttgaggcttt cggctgggac tggatcatcg cacctaagcg ctacaaggcc 120
aactactgct ccggccagtg cgagtacatg ttcatgcaaa aatatccgca tacccatttg 180

gtgcagcagg ccaatccaag aggcctctgct gggccctgtt gtacccccac caagatgtcc 240
ccaatcaaca tgctctactt caatgacaag cagcagatta tctacggcaa gatccctggc 300
atggtggtgg atcgctgtgg ctgctct                                     327

```