



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0026047
 (43) 공개일자 2019년03월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/4702 (2013.01)
A61K 38/18 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7006082(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년02월01일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7020332
 원출원일자(국제) 2008년02월01일
 심사청구일자 2018년08월14일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2008/001354
- (87) 국제공개번호 WO 2008/100384
 국제공개일자 2008년08월21일
- (30) 우선권주장
 60/900,580 2007년02월09일 미국(US)
 (뒷면에 계속)

- (71) 출원인
악셀레론 파마 인코포레이티드
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128
- (72) 발명자
크노프, 존
 미국, 메사추세츠 01741, 칼라일, 로빈스 드라이브 147
시헤라, 자스비르
 미국, 메사추세츠 02421-6818, 렉싱턴, 링컨 테라스 3
쿠마르, 라빈드라
 미국, 메사추세츠 01720, 액톤, 아링톤 스트리트 421
- (74) 대리인
이경민, 강명구

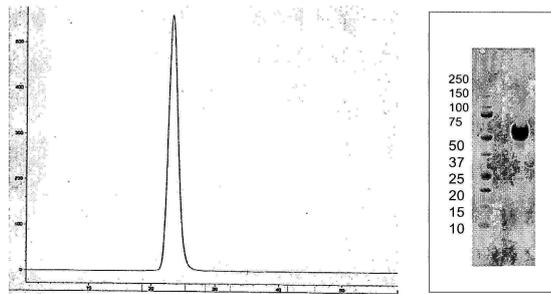
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 액티빈-Act R II A 길항제 및 암 환자에서 골 성장을 촉진시키기 위한 이의 용도

(57) 요약

특정 측면에서, 본 발명의 골 성장을 촉진시키고, 골 밀도를 증가시키는 것 뿐만 아니라 다발성 골수종 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 19/00 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

(30) 우선권주장

60/932,762	2007년05월31일	미국(US)
60/937,365	2007년06월26일	미국(US)
61/000,528	2007년10월25일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 환자의 다발성 골수종을 치료 또는 예방하는데 이용되는 항-액티빈 항체 또는 이의 단편을 포함하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원

[0002] 본 출원은 2007년 2월 9일 제출된 U.S. 가출원 No. 60/900,580; 2007년5월31일에 제출된 U.S. 가출원 No. 60/932,762; 2007년 6월26일에 제출된 U.S. 가출원 No.60/937,365; 2007년 10월 25일에 제출된 U.S. 가출원 No.60/000,528에 우선권을 주장하는데, 상기 출원은 본 명세서에 순전히 참조로서 편입된다.

배경 기술

[0003] 골다공증부터 골절까지 골 질환은 효과적인 약학 물질들이 거의 없는 병리학적 상태군을 나타낸다. 치료는 고정(immobilization), 운동 및 식이요법의 변화를 포함하는 물리적 그리고 거동적 중재에 초점을 둔다. 다양한 골 질환 치료를 목적으로 골 성장을 촉진시키고, 골 밀도를 증가시키는 치료제를 가지는 것이 유익할 것이다.

[0004] 골 성장 및 광화(mineralization)과정은 연골세포(chondrocyte)와 맥관구조 세포가 이들 과정중 중요 측면에 참여하기는 하지만, 두 가지 세포, 파골세포(osteoclast)와 골형성세포(osteoblast)의 활성화에 의존한다. 발생학적으로, 골 형성은 두 가지 기전, 연골내화골(endochondral ossification) 및 막내화골(intramembranous ossification)을 통하여 이루어지는데, 전자는 세로 골 형성을 담당하고, 후자는 두개골의 골와 같은 위상적으로(topologically) 편평골 형성을 담당한다. 연골내화골은 파골세포, 골형성세포, 맥관구조 형성 및 연이은 광화의 주형으로 작용하는 성장판에 연골 구조의 연속적인 형성과 분해를 요구한다. 막내화골 동안 골는 결합조직에서 직접적으로 형성된다. 이들 두 과정은 골형성세포의 침윤과 연속적인 매트릭스 침착(matrix deposition)을 요구한다.

[0005] 골절 및 골의 다른 구조적 파열은 최소한 피상적으로는 연골성 조직의 형성 및 연속적인 광화를 포함하는 발생학적인 골형성 과정의 순서를 닮은 과정을 통하여 치료된다. 골절 치료 과정은 두 가지 방법으로 일어날 수 있다. 직접적인 또는 유합조직(callus) 형성없이 1차 골 치유가 일어난다. 간접적인 또는 2차 골 치유는 유합조직 전구 단계와 함께 일어난다. 골절의 1차 치유는 밀접하게 봉괴된 것을 가로질러 기계적인 연속성을 재구성하는 것에 관련된다. 적절한 조건하에, 파괴 주변의 골-재흡수 세포는 터널식 흡수 반응을 보이고, 혈관 침투 및 연속 치유를 위한 경로를 확보한다. 골의 2차 치유는 염증, 연질 유합조직 형성, 유합조직 광화 및 유합조직 리모델링의 과정 후에 이어진다. 염증 상태에서, 혈종(haematoma) 및 출혈 형성은 손상 부위의 골막(periosteal) 및 골안(endosteal) 혈관의 파열로 결과한 것이다. 염증 세포가 이 부위를 침투한다. 연질 유합조직 형성 단계에서, 세포들은 새로운 혈관, 섬유아세포, 세포내 물질을 만들고, 골절 단편들 사이 공간에 세포를 보지하고, 육아조직(granulation tissue)을 형성한다. 섬유성 또는 연골성 조직(연질 유합조직)에 의해 파열부분을 가로질러 임상적인 결합이 이루어진다. 골형성 세포가 형성되고, 연질 유합조직의 광화를 중개하며, 그 다음 라멜라골로 대체되고, 정상적인 리모델링 과정을 겪게 된다.

[0006] 골절 및 골 구조의 다른 물리적인 파열에 추가하여, 골 미네랄 함량 손실 및 골량 손실은 광범위한 조건에 의해 일어나며 유의적인 의학적 문제를 결과할 수 있다. 골량의 변화는 개인의 일생에 걸쳐 상대적으로 예측가능한 방식으로 일어난다. 약 30세까지, 남성 및 여성 모두에서 골는 연골 성장판의 선형 성장 및 방사 성장을 통하여 최대량으로 성장한다. 약 30세 이후(지주골(trabecular bone)의 경우, 가령, 사지 등에서 볼 수 있는 장골) 및 40세(치밀골(cortical bone)의 경우, 척추 및 골반과 같은 편평골)는 남성 및 여성 모두에서 느린 골 손실이 일어난다. 여성의 경우, 실질적인 골 손실의 최종 상태는 아마도 폐경후 에스트로겐 결핍으로 일어난다. 이 상

태 동안, 여성은 치밀골로부터 추가 10% 골 손실과 지주골로부터 추가 25% 골 손실될 수 있다. 진행성 골 손실이 골다공증과 같은 병리적 상태를 결과하는지는 개인의 초기 골 손실량과 심각한 상태가 있는지에 따라 거의 좌우된다.

[0007] 골 손실은 정상적인 골 재구성 과정에서 불균형으로 특징화될 수도 있다. 건강한 골은 항상 재구성 대상이 된다. 재구성은 파골세포에 의한 골의 재흡수로 시작된다. 재흡수된 골은 새로운 골 조직으로 대체되고, 이는 골 형성세포에 의한 콜라겐 형성 및 연이은 석회화(calcification)를 특징으로 한다. 건강한 개체에서, 재흡수 및 형성의 비율은 균형을 이룬다. 골다공증(Osteoporosis)은 만성적, 진행성 질환으로 재흡수쪽으로 이동된 특징을 가지고 있어, 골량과 골 광화에 전반적인 감소를 결과한다. 사람에서 골다공증은 임상적 골감소증(골 미네랄 밀도는 젊은 성인 골의 경우 1 표준 변차보다는 크지만 2.5표준변차보다는 적은, 평균치 아래에 있다)이 선행된다. 세계적으로, 약 75백만 사람이 골다공증 위험에 처해있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 파골세포와 골형성세포 활성간에 균형 조절법은 골절 치유 및 골에 다른 손상의 치료를 촉진시키는 것 뿐만 아니라 골량 손실 및 골 광화와 연관된 질환들, 가령 골다공증의 치료를 촉진시키는데 유용할 것이다.

[0009] 골다공증에 있어서, 에스트로겐, 칼시토닌(calcitonin), 오스테오칼신(osteocalcin)과 비타민 K, 또는 고함량의 식이 칼슘을 모두 치료요법적 중재로 이용한다. 골다공증에 다른 치료요법적 방법에는 비스포스포네이트(bisphosphonates), 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone), 칼슘조절물질(calcimimetics), 스탠틴(statins), 동화성 스테로이드(anabolic steroids), 란탄(lanthanum) 및 스트론튬(strontium) 염, 그리고 플로오르나트륨이 포함된다. 그러나, 이와 같은 요법은 종종 원하지 않는 부작용이 수반된다. 따라서, 본 발명의 목적은 골 성장 및 광화를 촉진하는 조성물 및 그 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] **발명의 요약**

[0011] 일부에서, 본 명세서는 액티빈 또는 ActRIIa 길항 활성을 가진 분자(“액티빈 길항물질”, “ActRIIa 길항물질”, 집합적으로 “액티빈-ActRIIa 길항물질”)를 이용하여 골 밀도를 증가시키고, 골 성장을 촉진시키고 및/또는 골 강도를 증가시킬 수 있다. 특히, 명세서에서는 ActRIIa 가용형이 액티빈-ActRIIa 시그널링의 저해물질로 작용하여, *in vivo*에서 골 밀도, 골 성장, 및 골 강도 증가를 촉진한다는 것을 설명한다. 골 성장을 촉진시키거나 또는 골 손실을 저해하는 대부분의 약학 물질은 항-이화 물질(흔히 “이화제(catabolic agents)”라고도 함) (예를 들면, 비스포스포네이트) 또는 동화 물질(예를 들면, 적절하게 투여하였을 경우, 부갑상선 호르몬, PTH)로 작용하지만, 가용성, ActRIIa 단백질은 항-이화 및 동화 효과를 모두 가지는 이중 활성을 보인다. 따라서, 명세서에서는 액티빈-ActRIIa 시그널링 경로의 길항물질을 이용하여 골 밀도를 증가시키고, 골 성장을 촉진시키는데 이용할 수 있다는 것을 확증한다. 가용성 ActRIIa는 액티빈 기전 이외의 기전을 통하여 골에 영향을 줄 수도 있지만, 명세서에서는 바람직한 치료제는 액티빈-ActRIIa 길항물질 활성에 근거하여 선별될 수 있다는 것을 설명한다. 따라서, 특정 구체예에서, 명세서에서는 액티빈-ActRIIa 길항물질, 예를 들면, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드, 항-액티빈 항체들, 항-ActRIIa 항체들, 액티빈- 또는 ActRIIa-표적화된 소분자들 및 압타머(aptamers), 그리고 액티빈 및 ActRIIa의 발현을 감소시키는 핵산을 포함하는 길항물질을 이용하여, 골다공증과 같은 낮은 골 밀도 또는 낮은 골 강도와 연계된 질환을 치료하고, 이를 필요로 하는 환자 예를 들면 골절 환자에서 골 성장을 촉진시키는 방법을 설명한다. 명세서에서는 또한 액티빈-ActRIIa 길항물질은 다발성 골수종 종양 및 유방 종양으로 인한 골 손상을 예방하거나 및/또는 골 손상을 치료하는데 효과적이며, 그리고 추가적으로, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 다발성 골수종에서 종양 부하를 감소시킨다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 근육량에 측정가능한 증가없이도 골 성장을 촉진한다.

[0012] 특정 측면에서, 명세서에서는 액티빈에 결합하는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. ActRIIa 폴리펩티드는 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드와 제약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 제약학적 조합제(pharmaceutical preparation)로서 조제될 수 있다. 바람직하게는, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 1 마이크로몰(micromolar) 미만, 또는 100 나노몰(nanomolar) 미만, 10 나노몰 미만 또는 1 나노몰 미만의 K_D 로 액티빈에 결합한다. 임의적으로, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 GDF11 및/또는 GDF8에 대하여 액티빈에 선택적으로 결합하는데, 적절하게는, GDF11 및/또는 GDF8에서보다 액티빈에 대하여 최소한

10-배, 20-배 또는 50-배 낮은 K_D 를 갖는다. 특정 작용 기전에 한정됨 없이, GDF11/GDF8 저해보다 액티빈 저해에 대한 이러한 선택성(selectivity) 정도는 근육에 대한 지속적으로 측정가능한 효과 없이 선택적 효과를 설명할 것으로 기대된다. 많은 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 골에서 바람직한 효과를 달성하는 약량(dose)에서, 근육 내에서 15% 이하, 10% 이하 또는 5% 이하의 근육 증가를 유발하도록 선택될 것이다. 바람직하게는, 조성물은 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에 의한 평가에서, 다른 폴리펩티드 성분에 대하여 최소한 95% 순수하고, 좀더 바람직하게는, 상기 조성물은 최소한 98% 순수하다. 이런 조합제에 이용되는 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 본 명세서에 개시된 임의의 폴리펩티드, 예를 들면, SEQ ID NO: 2, 3, 7 또는 12에서 선택되는 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드, 또는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 또는 13에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드가 될 수 있을 것이다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에는 자연 ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 단편(functional fragment), 예를 들면, SEQ ID NO: 1-3, 또는 C-말단 10개 내지 15개 아미노산(“꼬리(tail)”)이 부재하는 SEQ ID NO: 2의 서열에서 선택되는 서열의 최소한 10개, 20개 또는 30개 아미노산을 포함하는 기능적 단편이 포함된다.

[0013] 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여, 아미노산 서열(가령, 리간드-결합 도메인)에서 하나 이상의 변경(alteration)을 보유한다. 변경된 ActRIIa 폴리펩티드의 실례는 WO 2006/012627, pp. 59-60에 제공되는데, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 편입된다. 아미노산 서열에서 변경은 예로써, 포유동물, 곤충 또는 다른 진핵 세포(eukaryotic cell)에서 생산될 때, 폴리펩티드의 글리코실화(glycosylation)를 변화시키거나, 또는 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 폴리펩티드의 단백분해 절단(proteolytic cleavage)을 변화시킨다.

[0014] 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 하나의 도메인(domain)으로서 ActRIIa 폴리펩티드(가령, ActRIIa의 리간드-결합 일부분)와 바람직한 특성, 예를 들면, 향상된 약물 동태(improved pharmacokinetics), 더욱 용이한 정제, 특정 조직으로 표적화 등의 성질을 제공하는 하나 이상의 부가적인 도메인을 포함하는 융합 단백질(fusion protein)일 수 있다. 가령, 융합 단백질의 도메인은 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡입/투여, 단백질 복합체의 조직 국지화 또는 분포, 형성, 융합 단백질의 다중화(multimerization) 및/또는 정제 중에서 한 가지 또는 그 이상을 향상시킬 수 있다. 이량체화 또는 다중화는 증가된 리간드-결합 친화성을 제공할 수도 있다. 액티빈-결합 ActRIIa 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인(야생형(wild-type) 또는 변이형(mutant)), 혈청 알부민, 또는 바람직한 특성, 예를 들면, 향상된 약물 동태, 향상된 용해도(solubility) 또는 향상된 안정성(stability)을 제공하는 다른 폴리펩티드 일부분을 포함할 수 있다. 일반적으로, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 동종이량체-복합체로 만들어질 것이다. 선택적으로, ActRIIa-Fc 융합체는 Fc 도메인과 세포외(extracellular) ActRIIa 도메인 사이에 배치된 상대적으로 체계화되지 않은 링커(unstructured linker)를 포함한다. 이러한 체계화되지 않은 링커는 ActRIIa의 세포외 도메인의 C-말단 단부(“꼬리”)에서 대략 15개의 아미노산 체계화되지 않은 영역에 상응하거나, 또는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 아미노산의 인공 서열(artificial sequence), 이차 구조가 상대적으로 없는 5개 내지 15개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의 아미노산의 길이, 또는 양쪽의 혼합을 보유할 수 있다. 링커는 글리신(glycine)과 프롤린(proline) 잔기가 풍부하고, 예로써, 트레오닌/세린과 글리신의 단일 서열(single sequence) 또는 트레오닌/세린과 글리신의 반복 서열(repeating sequence)(가령, TG₄ 또는 SG₄ 단일항(singlet) 또는 반복)을 보유할 수 있다. 융합 단백질은 정제 하위서열(purification subsequence), 예를 들면, 에피토프 태그(epitope tag), FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열(polyhistidine sequence), 그리고 GST 융합을 포함할 수 있다. 임의적으로, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드에는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모이어티(lipid moiety)에 공동된 아미노산, 그리고 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 공동된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기가 포함된다. 제약학적 조합제는 또한, 하나 이상의 추가 화합물, 예를 들면, 골 질환(bone disorder)을 치료하는데 이용되는 화합물을 포함할 수 있다. 적절하게는, 제약학적 조합제는 실질적으로, 발열원(pyrogen)이 없다. 일반적으로, ActRIIa 단백질은 환자에서 부정적인 면역 반응(immune response)의 가능성을 낮추기 위하여 ActRIIa 단백질의 자연적인 글리코실화를 적절하게 매개하는 포유동물 세포주(mammalian cell line)에서 발현시키는 것이 바람직하다. 인간과 CHO 세포주(cell line)가 성공적으로 이용되고 있고, 다른 통상적인 포유동물 발현 시스템(expression system)이 유용할 것으로 기대된다.

[0015] 본 명세서에 기술된 바와 같이, ActRIIa-Fc로 명명된 ActRIIa 단백질은 GDF8 및/또는 GDF11에 대비하여 액티빈에 대한 선택적인 결합, 높은 친화성 리간드 결합, 그리고 동물 모형에서 2주 이상의 혈청 반감기를 비롯한 바람직한 특성을 갖는다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa-Fc 폴리펩티드, 그리고 이들 폴리펩티드와 제

약학적으로 허용되는 부형제(pharmaceutically acceptable excipient)를 함유하는 제약학적 조합제를 제시한다.

[0016] 특정 측면에서, 본 발명에서는 가용성 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제시한다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 앞서 기술된 바와 같이, 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 가령, 분리된 핵산은 ActRIIa의 세포외 도메인(가령, 리간드-결합 도메인)을 코딩하는 서열과 ActRIIa의 막통과 도메인 및/또는 세포질 도메인의 일부 또는 전부를 코딩하지만 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 내에 배치된, 또는 세포외 도메인과 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 사이에 배치된 종결 코돈(stop codon)을 코딩하지 않는 서열을 보유할 수 있다. 가령, 분리된 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 4 또는 5와 같은 전장 ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열 또는 부분적으로 절두된 이형을 포함할 수 있고, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 3'-말단 앞에 최소한 600개 뉴클레오티드(nucleotide)에서, 또는 폴리뉴클레오티드의 번역이 전장 ActRII의 절두된 일부분에 임의적으로 융합된 세포외 도메인을 발생시키는 위치에 전사 종결 코돈(transcription termination codon)을 더욱 포함할 수 있다. ActRIIa에 바람직한 핵산 서열은 SEQ ID NO: 14이다. 본 명세서에 개시된 핵산은 발현을 위한 프로모터(promoter)에 작동가능하게 연결될 수 있고, 본 발명에서는 이런 재조합 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포를 제시한다. 적절하게는, 상기 세포는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포이다.

[0017] 특정 측면에서, 본 발명에서는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 만드는 방법을 제시한다. 이런 방법에는 적절한 세포, 예를 들면, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포에서 본 명세서에 개시된 임의의 핵산(가령, SEQ ID NO: 4, 5 또는 14)을 발현시키는 것이 포함될 수 있다. 이런 방법은 a) 가용성 ActRIIa 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에서 세포를 배양하고, 여기서 상기 세포는 가용성 ActRIIa 발현 구조체로 형질전환되고; b) 이렇게 발현된 가용성 ActRIIa 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 정제되지 않은, 부분적으로 정제된 또는 고도로 정제된 분취물(fraction)로서 회수될 수 있다. 정제는 예로써, 단백질 A 크로마토그래피(chromatography), 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)(가령, Q 세파로오스(sepharose)), 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography)(가령, 페닐세파로오스(phenylsepharose)), 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 그리고 양이온 교환 크로마토그래피(cation exchange chromatography) 중에서 임의의 순서로, 1가지, 2가지, 3가지 또는 그 이상을 비롯한 일련의 정제 단계에 의해 달성될 수 있다.

[0018] 특정 측면에서, 본 명세서에 개시된 액티빈-ActRIIa 길항물질, 예를 들면, 가용성, 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드가 개체에서 골 성장 또는 개체에서 골 밀도를 촉진시키는 방법에 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 이를 요하는 환자에서 낮은 골 밀도 관련된 질환을 치료하거나 또는 골 성장을 촉진시키는 방법을 제시한다. 이러한 방법은 치료를 요하는 개체에 효과량의 액티빈-ActRIIa 길항물질을 투여하는 단계를 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에 기술된 바와 같은 질환이나 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 액티빈-ActRIIa 길항물질의 용도를 제시한다.

[0019] 특정 측면에서, 본 발명에서는 골의 성장을 자극하는 또는 광화를 증가시키는 작용제를 확인하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 a) 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인에 결합하는 시험 작용제(test agent)를 확인하는 단계; b) 골의 성장 자극 또는 광화를 증가에 대한 상기 작용제의 효과를 평가하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[0020] 실시예 7과 8 및 도면에서 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1에서는 CHO 세포에서 발현된 ActRIIa-hFc의 정제를 도시한다. 상기 단백질은 완전하게 규정된 단일 피크로서 정화된다

도 2에서는 BiaCore™ 분석에 의한 측정에서, 액티빈과 GDF-11에 ActRIIa-hFc의 결합을 도시한다.

도 3은 A-204 리포터 유전자 검사 과정을 나타낸다. 도면에서 리포터 벡터pGL3(CAGA)12 (Denlner et al, 1998, EMBO 17: 3091- 3100.)를 보여준다. CAGA12 모티프는 TGF-Beta 반응 유전자(PAI-1 유전자)에 존재하여, 이 벡터는 Smad 2 및 3을 통하여 시그널링 인자로 일반적으로 이용된다.

도 4는 A-204 리포터 유전자 검사에서 GDF-8 시그널링에 ActRIIa-hFc(◆)와 ActRIIa-mFc(■)의 효과를 보여준다. 두 단백질 모두 피코몰 농도에서 GDF-8 매개된 시그널링을 실질적으로 저해하는 것으로 나타났다.

도 5에서는 A-204 리포터 유전자 검사에서 GDF-11 시그널링에 세 가지 상이한 ActRIIa-hFc 조제물의 효과를 보여준다.

도 6에서는 대조군과 ActRIIa-mFc-처리된 BALB/c 생쥐의 처리전(윗 패널)과 12주 처리후(하부 패널)의 DEXA 이미지의 예를 보여준다. 열은 음영은 골밀도가 증가되었음을 나타낸다.

도 7에서는 12주 기간에 걸쳐 BALB/c 생쥐에서 골 미네랄 밀도상에 ActRIIa-mFc의 효과를 정량화한 것을 보여준다. 처리는 대조군(◆), 2 mg/kg ActRIIa-mFc (■), 6 mg/kg ActRIIa-mFc (▲), 10 mg/kg ActRIIa-mFc (●)이다.

도 8에서는 12주 기간에 걸쳐 BALB/c 생쥐에서 골 미네랄 함량에 ActRIIa-mFc의 효과를 정량화한 것을 보여준다. 처리는 대조군(◆), 2 mg/kg ActRIIa-mFc (■), 6 mg/kg ActRIIa-mFc (▲), 10 mg/kg ActRIIa-mFc (●)이다.

도 9에서는 난소제거된(OVX) 또는 모조 실험된(SHAM) C57BL6 생쥐의 6주 처리 후에 지주골의 골 미네랄 밀도에 ActRIIa-mFc의 효과를 정량화한 것을 보여준다. 처리는 대조군(PBS) 또는 10 mg/kg의 ActRIIa-mFc (ActRIIa)이다.

도 10에서는 난소제거된(OVX) 또는 모조 실험된(SHAM) C57BL6 생쥐의 12주 처리 후에 지주골에 ActRIIa-mFc의 효과를 정량화한 것을 보여준다. 처리는 대조군(PBS: 흰막대) 또는 10 mg/kg의 ActRIIa-mFc (ActRIIa:검정막대)이다.

도 11에서는 모조 실험된 C57BL6 생쥐의 6주 또는 12주 처리 후에 지주골에 ActRIIa-mFc의 효과를 정량화한 것을 보여준다. 처리는 대조군(PBS: 흰막대) 또는 10 mg/kg의 ActRIIa-mFc (ActRIIa:검정막대)이다.

도 12에서는 처리 12주간에 걸쳐 난소제거된 생쥐에서 골 밀도의 pQCT 분석 결과를 보여준다. 처리는 대조군(PBS: 흰막대) 또는 ActRIIa-mFc (ActRIIa:검정막대)이다. y-axis: mg/ccm

도 13에서는 처리 12주간에 걸쳐 모조 실험된 생쥐에서 골 밀도의 pQCT 분석 결과를 보여준다. 처리는 대조군(PBS: 흰막대) 또는 ActRIIa-mFc (ActRIIa:검정막대)이다. y-axis; mg/ccm

도 14A와 14B에서는 (A) 12주 처리후에 전신 DEXA 분석을; (B)는 대퇴골의 체외(*ex vivo*) 분석을 나타낸 것이다. 밝은 부분은 골 밀도가 높은 지역을 나타낸다.

도 15에서는 12주 처리후에 대퇴부 중축의 생체외(*ex vivo*) pQCT 분석을 나타낸다. 처리는 비이클 대조군(PBS, 검은 막대)과 ActRIIa-mFc (흰 막대)이다. 좌측 4개 막대는 전체 골 밀도를, 우측 4개 막대는 피질(cortical) 골밀도를 나타낸다. 4개 막대 각 세트에 첫 한쌍의 막대는 난소제거된 생쥐로부터 얻은 데이터를 나타내고, 두 번째 쌍의 막대는 모조 실험한 생쥐로부터 얻은 데이터를 나타낸다.

도 16에서는 12주 처리후, 대퇴 중축의 골간 골 함량(diaphyseal bone content) 및 *ex vivo* pQCT 분석을 나타낸다. 처리는 비이클 대조군(PBS, 검은 막대) 또는 ActRIIa-mFc (흰 막대)이다. 좌측 4개 막대는 전체 골 밀도를, 우측 4개 막대는 피질(cortical) 골밀도를 나타낸다. 4개 막대 각 세트에 첫 한쌍의 막대는 난소제거된 생쥐로부터 얻은 데이터를 나타내고, 두 번째 쌍의 막대는 모조 실험한 생쥐로부터 얻은 데이터를 나타낸다.

도 17에서는 대퇴 중축 및 대퇴 피질 두께의 *ex vivo* pQCT 분석을 나타낸다. 처리는 비이클 대조군(PBS, 검은 막대) 또는 ActRIIa-mFc (흰 막대)이다. 좌측 4개 막대는 골속 환상(endosteal circumference)을, 우측 4개 막대는 골막 환상(periosteal circumference)을 나타낸다. 4개 막대 각 세트에 첫 한쌍의 막대는 난소제거된 생쥐로부터 얻은 데이터를 나타내고, 두 번째 쌍의 막대는 모조 실험한 생쥐로부터 얻은 데이터를 나타낸다.

도 18에서는 12주 처리후 대퇴의 기계적 테스트 결과를 나타낸다. 처리는 비이클 대조군(PBS, 검은 막대) 또는 ActRIIa-mFc (흰 막대)이다. 좌측부터 2개 막대는 난소제거된 생쥐로부터 얻은 데이터를 나타내고, 나머지 두 개 막대는 모조 실험한 생쥐로부터 얻은 데이터를 나타낸다.

도 19에서는 지주골 골량에 ActRIIa-mFc의 효과를 나타낸다.

도 20에서는 말초 대퇴에 골주 구조(trabecular architecture)에 ActRIIa-mFc의 효과를 나타낸다.

도 21에서는 피질골(cortical bone)에서 ActRIIa-mFc의 효과를 나타낸다.

도 22에서는 골의 기계적 강도에 ActRIIa-mFc 효과를 나타낸다.

도 23에서는 상이한 세 가지 약량에서 골 특징에 ActRIIa-mFc의 상이한 약량의 효과를 보여준다.

도 24에서는 골 조직병리학에서 ActRIIa-mFc는 동화 및 항-재흡수의 이중 활성을 가진다는 것을 나타낸다는 것을 보여준다.

도 25에서는 추가적인 조직병리학 데이터를 보여준다.

도 26에서는 순수 생쥐와 종양을 가지는 생쥐에서 생쥐 대퇴 영상을 보여주고, 다발성 골수종(multiple myeloma) 모델에서 골 형태상에 ActRIIa-mFc의 효과를 보여준다. 다발성 골수종(5T2)을 가진 생쥐는 정상 생쥐에 비해 골에서 뚜렷한 피팅(구멍;pitting)과 퇴보가 나타났다. ActRIIa-mFc 로 처리하면 이와 같은 영향을 제거한다.

도 27에서는 실시예 5에서 설명하는 사람에서 임상 시험 결과를 나타내는데, 곡면 아래 면적(AUC)과 ActRIIa-mFc 의 투여된 양은 ActRIIa-mFc 가 정맥(i.v) 또는 피하(s.c)로 투여되었는지에 관계없이 선형 관계를 가진다.

도 28에서는 iv. 또는 sc.로 ActRIIa-mFc 투여를 받은 환자들에서 혈청 수준을 비교한 것을 나타낸다.

도 29에서는 상이한 약량 수준의 ActRIIa-mFc 에 반응한 골 알칼리 포스파타제(BAP)의 수준을 보여준다. BAP는 동화성 골 생장의 표식이다.

도 30에서는 생쥐에서 ActRIIa-mFc (RAP-011)과 비스포스포네이트 물질(조레드로네이트:zoledronate)의 협력 효과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022]

1. 개요

[0023]

전환 성장 인자(transforming growth factor)-베타(TGF-beta) 대과(superfamily)는 공통의 서열 요소(sequence element)와 구조 모티프(structural motif)를 공유하는 다양한 성장 인자를 포함한다. 이들 단백질은 척추동물과 무척추동물 모두에서 다양한 세포 유형에 대한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 대과의 구성원은 배 발생(embryonic development) 동안 패턴 형성(pattern formation)과 조직 특정화(tissue specification)에서 중요한 기능을 수행하고, 지방생성(adipogenesis), 근육발생(myogenesis), 연골형성(chondrogenesis), 심형성(cardiogenesis), 혈액생성(hematopoiesis), 신경생성(neurogenesis), 그리고 상피 세포 분화(differentiation)를 비롯한 다양한 분화 과정(differentiation process)에 영향을 줄 수 있다. 이러한 집단은 2가지 분과: BMP/GDF와 TGF-베타/액티빈/BMP10 분과로 분류되는데, 이들의 구성원은 다양하고, 종종 상보적인 효과를 나타낸다. TGF-베타 과의 구성원의 활성을 조종함으로써, 생물체 내에서 현저한 생리학적 변화를 유도하는 것이 종종 가능하다. 가령, 산록(piedmont)과 벨기에 블루 소(Belgian Blue cattle) 품종은 GDF8 (일명, 미오스타틴(myostatin)) 유전자에서 기능 상실 돌연변이(loss-of-function mutation)를 보유하는데, 이는 근육량(muscle mass)에서 눈에 띄는 증가를 유도한다(Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4). 더 나아가, 인간에서, GDF8의 비활성 대립형질(allele)은 증가된 근육량과 보고된 바에 의하면, 특별한 체력(exceptional strength)에 연관된다(Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8).

[0024]

액티빈(activin)은 TGF-베타 대과에 속하는 이합체(dimeric) 폴리펩티드 성장 인자이다. 2개의 밀접하게 관련된 β 아단위(subunit)의 동종이합체(homodimer)/이종이합체(heterodimer)(각각, $\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, $\beta_A\beta_B$)인 3가지 주요 액티빈 형태(A, B와 AB)가 존재한다. 인간 계놈은 또한, 액티빈 C와 액티빈 E를 인코딩하는데, 이들은 간에서 주로 발현된다. TGF-베타 대과에서, 액티빈은 난소와 태반 세포에서 호르몬 생산을 촉진하고, 신경 세포 생존을 뒷받침하고, 세포 유형(cell type)에 따라 세포-주기 진행에 긍정적인 또는 부정적인 영향을 주고, 최소한 양서류 배(amphibian embryo)에서 중배엽 분화(mesodermal differentiation)를 유도할 수 있는 독특한 다중 기능성 인자이다(DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). 게다가, 자극된 인간 단핵구 백혈병(monocytic leukemic) 세포로부터 분리된 적혈구 분화 인자(erythroid differentiation factor, EDF)가 액티빈 A와 동일한 것으로 밝혀졌다(Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). 액티빈 A는 골수에서 적혈구생성을 촉진하는 것으로 제안되었다. 여러 조직에서, 액티빈 신호전달은 관련된 동종이합체, 인히빈(inhibin)에 의해 길항된

다. 가령, 뇌하수체(pituitary)로부터 여포-자극 호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH)의 방출 동안, 액티빈은 FSH 분비와 합성을 촉진하는 반면, 인히빈은 FSH 분비와 합성을 예방한다. 액티빈 생물활성(bioactivity)을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질에는 폴리스타틴(follistatin, FS), 폴리스타틴-관련된 단백질(follistatin-related protein, FSRP)과 α_2 -마크로글로불린(macroglobulin)이 포함된다.

[0025] TGF- β 신호는 I형과 II형 세린/트레오닌 키나아제 수용체(kinase receptor)의 이가동의 복합체(heteromeric complex)에 의해 매개되는데, 이들은 리간드 자극 이후에 하류 Smad 단백질을 인산화시키고 활성화시킨다(Massague, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). 이들 I형과 II형 수용체는 시스테인-풍부 영역을 보유하는 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 특이성(specificity)을 갖는 세포질 도메인으로 구성되는 막통과 단백질(transmembrane protein)이다. I형 수용체는 신호전달에 필수적이다; II형 수용체는 리간드에 결합하고 I형 수용체의 발현을 위하여 필요하다. I형과 II형 액티빈 수용체는 리간드 결합 이후에 안정한 복합체를 형성하고, II형 수용체에 의한 I형 수용체의 인산화를 유도한다.

[0026] 2개의 관련된 II형 수용체(ActRII), ActRIIa와 ActRIIb는 액티빈에 대한 II형 수용체로서 확인되었다(Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, 세포 68: 97-108). 게다가, 액티빈, ActRIIa와 ActRIIb는 BMP7, Nodal, GDF8과 GDF11을 비롯한 여러 다른 TGF- β 집단 단백질과 생화학적으로 상호작용할 수 있다(Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, Mol. 세포 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4는 액티빈, 특히, 액티빈 A에 대한 일차적인 I형 수용체이고, ALK-7은 다른 액티빈, 특히, 액티빈 B에 대한 수용체로서 기능한다.

[0027] 본 명세서에서 증명된 바와 같이, 다른 TGF-베타 집단 구성원, 예를 들면, GDF8 또는 GDF11에 대비하여, 액티빈 A에 실질적으로 우선적인 결합을 보이는 가용성 ActRIIa 폴리펩티드(sActRIIa)는 생체내에서 적혈구 수준을 증가시키는데 효과적이다. 특정 기전에 한정됨 없이, sActRIIa의 이러한 효과는 이들 연구에 이용된 특정 sActRIIa 구조체(construct)에 의해 나타나는 매우 강한 액티빈 결합(피코몰(picomolar) 해리 상수(dissociation constant))을 고려할 때, 액티빈 길항물질 효과에 의해 주로 유도될 것으로 기대된다. 기전에 상관없이, 본 발명의 데이터로부터, ActRIIa-액티빈 길항물질이 정상 생쥐, 골다공증을 가진 생쥐 모델, 그리고 다발 골수종의 생쥐 모델에서 골 밀도를 증가시킨다는 것이 명백하다. 골은 골을 생산하고, 광화를 자극하는 인자(주로 골형성세포)와 골을 파괴하고, 탈광화시키는 인자(주로 파골세포)사이의 균형에 따라 밀도가 증가되거나 감소되고, 성장하고 수축되는 역동적인 조직이라는 것이다.

[0028] 골 성장 및 광화는 생산 인자에 의해 증가되거나, 파괴인자에 의해 감소되거나, 이들 양자에 의해 증가, 감소될 수 있다. “골 성장의 촉진” 및 “골 광화 증가”는 골에서 관측가능한 물리적 변화를 말하며, 이들 기전에 의해 골에서 일어나는 변화에 대해 중립적인 의도이다.

[0029] 여기에서 설명하는 골다공증 및 골 성장/밀도에 대한 생쥐 모델은 사람에서 효과의 상당한 지표로 간주될 수 있고, 따라서, 이 명세서에서는 사람에서 골 성장을 촉진시키고, 골 밀도를 증가시키는 ActRIIa 폴리펩티드 및 다른 액티빈-ActRIIa 길항물질을 이용하는 방법을 제공한다. 액티빈-ActRIIa 길항물질에는 예로써, 액티빈-결합 가용성 ActRIIa 폴리펩티드; 액티빈(특히, βA 또는 βB 로 지칭되는 액티빈 A 또는 B 아단위)에 결합하고 ActRIIa 결합을 교란시키는 항체; ActRIIa에 결합하고 액티빈 결합을 교란시키는 항체; 액티빈 또는 ActRIIa 결합을 위하여 선택된 비-항체 단백질(이들 단백질의 실례와 이들의 설계와 선택 방법은 WO/2002/088171, WO/2006/055689와 WO/2002/032925를 참조한다); 액티빈 또는 ActRIIa 결합을 위하여 선택되고 Fc 도메인에 중 중 부착되는 무작위화 펩티드(randomized peptide) 등이 포함된다. 액티빈 또는 ActRIIa 결합 활성을 갖는 2개의 상이한 단백질(또는 다른 모이어티(moiety)), 특히, I형(가령, 가용성 I형 액티빈 수용체)과 II형(가령, 가용성 II형 액티빈 수용체) 결합 부위를 각각 차단하는 액티빈 접합제(binder)는 이중기능성(bifunctional) 결합 분자를 산출하기 위하여 서로 연결될 수 있다. 핵산 압타머, 소형 분자와 액티빈-ActRIIa 신호전달 축을 저해하는 다른 작용제가 액티빈-ActRIIa 길항물질로서 포함된다. 인히빈(즉, 인히빈 알파 아단위; 하지만, 인히빈이 모든 조직에서 액티빈을 보편적으로 길항하는 것은 아니다), 폴리스타틴(follistatin)(가령, 폴리스타틴-288과 폴리스타틴-315), FSRP, 액티빈 C, 알파(2)-마크로글로불린, 그리고 M108A(108번 위치에서 메티오닌(methionine)에서 알라닌(alanine)으로 변화) 돌연변이체 액티빈 A를 비롯한 다양한 단백질이 액티빈-ActRIIa 길항물질 활성을 갖는다. 일반적으로, 액티빈의 대안적 형태, 특히, I형 수용체 결합 도메인에서 변형(alteration)을 보유하는 형태는 II형 수용체에 결합할 수 있지만 활성 3원 복합체(ternary complex)를 형성할 수 없기 때문에, 길항물질로서 기능한다. 부가적으로, 안티센스(antisense) 분자, siRNA 또는 액티빈 A, B, C

또는 E, 특히, ActRIIa 발현을 저해하는 리보자임(ribozyme)과 같은 핵산이 액티빈-ActRIIa 길항물질로서 이용될 수 있다. 바람직하게는 이용되는 이러한 액티빈-ActRIIa 길항물질은 TGF-베타 과의 다른 구성원, 특히, GDF8 과 GDF11에 대비하여, 액티빈-매개된 신호전달을 저해하는데 선택성을 나타낼 수 있다. 가용성 ActRIIb 단백질은 액티빈에 결합하나, 이와 같은 야생형 단백질은 GDF8/11에 대해 액티빈에 결합하는 것에 유의적인 선택성을 나타내지 않고, 예비 실험에서, 이 단백질은 골에서는 원하는 효과를 제공하지 못하고, 실질적인 근육 생장의 원인이 되지 않는 것으로 제안된다. 그러나, 상이한 결합 성질들을 가지는 변형된 형태의 ActRIIb가 확인되었고(참고 WO 2006/012627, pp. 55-59, 참조문헌으로 첨부됨), 이들 단백질들은 골에서 원하는 효과를 얻을 수 있을 것이다. 제 2, 액티빈-선택성 결합 물질로 커플링시켜 액티빈에 대한 선택성 추가를 위해, 고유 또는 변형된 ActRIIb가 제공될 수도 있다.

[0030] 본 명세서에 이용되는 용어는 일반적으로, 본 발명의 배경 내에서 각 용어가 이용되는 특정 상황에서, 당분야의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본 발명의 조성물과 방법, 그리고 이들을 만들고 이용하는 방법을 기술함에 있어 실시자(practitioner)에게 부가적인 보도(guidance)를 제공하기 위하여 하기에, 또는 본 명세서의 다른 곳에서 논의된다. 이용되는 용어의 범위 또는 의미는 이러한 용어가 이용되는 특정 상황으로부터 명백할 것이다.

[0031] 일반적으로, “대략”은 측정의 특성 또는 정확도를 고려할 때, 측정된 양에 대한 허용 오차(acceptable degree of error)를 의미한다. 전형적으로, 예시적인 허용 오차는 일정한 수치 또는 수치 범위의 20 퍼센트(%) 이내, 특히, 10% 이내, 더욱 바람직하게는, 5% 이내로 존재한다.

[0032] 대안으로, 특히, 생물학적 시스템에서, “대략”은 일정한 수치의 1 크기 자릿수(order of magnitude) 이내, 바람직하게는, 5-배 이내, 더욱 바람직하게는, 2-배 이내의 수치를 의미한다. 본 명세서에 제공된 수치량(numerical quantity)은 달리 명시되지 않는 경우에 근사치(approximate)인데, 이는 “대략”이 명시되지 않는 경우에, 추론될 수 있음을 의미한다.

[0033] 본 발명의 방법은 서열을 서로 비교하는 단계, 예를 들면, 야생형 서열을 하나 이상의 돌연변이체(서열 변이체)와 비교하는 단계를 포함한다. 전형적으로, 이런 비교는 예로써, 당분야에 널리 공지된 서열 정렬 프로그램 및/또는 알고리즘(가령, BLAST, FASTA와 MEGALIGN)을 이용한 고분자 서열의 정렬을 포함한다. 당업자는 이런 정렬에서, 돌연변이가 잔기 삽입 또는 결실을 내포하는 경우에, 서열 정렬이 삽입되거나 결실된 잔기를 보유하지 않는 고분자 서열 내에 “갭(gap)” (전형적으로, 대시(dash), 또는 "A"로 표시됨)을 도입할 것임을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

[0034] “상동한(homologous)”은 모든 문법적 형태와 변화된 스펠링에서, 동일한 종의 생물체에서 대과로부터 단백질과 상이한 종의 생물체로부터 상동한 단백질을 비롯한, “공통의 진화적 기원(common evolutionary origin)”을 공유하는 두 단백질 사이의 상관관계를 지칭한다. 이들 단백질(또는 이들의 인코딩 핵산)은 동일성 비율(percent identity)의 관점에서 또는 특정 잔기 또는 모티프와 보존된 위치의 존재에 의해, 그들의 서열 유사성(sequence similarity)에 의해 반영되는 서열 상동성(sequence homology)을 갖는다.

[0035] “서열 유사성”은 모든 문법적 형태에서, 공통의 진화적 기원을 공유하거나 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 동일성 또는 일치성의 정도를 지칭한다.

[0036] 하지만, 통상적인 관례와 본 출원에서, “고도로”와 같은 부사로 수식될 때 “상동한”은 서열 유사성을 지칭하고, 공통의 진화적 기원에 관련되거나 관련되지 않는다.

[0037] **2. ActRIIa 폴리펩티드**

[0038] 특정 측면에서, 본 발명은 ActRIIa 폴리펩티드에 관계한다. 본 명세서에서, "ActRIIa"는 임의의 종으로부터 액티빈 수용체 타입 IIa(ActRIIa) 단백질과 돌연변이유발(mutagenesis) 또는 다른 변형에 의해 이들 ActRIIa 단백질로부터 유래된 변이체의 집단을 지칭한다. 본 명세서에서 ActRIIa에 대한 언급은 현재 확인된 형태 중에서 한 가지 형태에 대한 언급인 것으로 간주된다. 일반적으로, ActRIIa 집단의 구성원은 시스테인-풍부한 영역을 보유하는 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 키나아제 활성을 갖는 세포질 도메인으로 구성되는 막통과 단백질이다.

[0039] “ActRIIa 폴리펩티드”에는 ActRIIa 집단 구성원의 자연 발생 폴리펩티드와 유용한 활성을 유지하는 이들의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체, 그리고 펩티드모방 형태(peptidomimetic form) 포함)를 포함하는 폴리펩티드가 포함된다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드에는 ActRIIa 폴리펩티드의 서열에 최소한 대략 80% 동일한 서열을 보유하고 임의적으로, 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는, 임의의 공지된 ActRIIa의 서열

로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 단백질 및/또는 액티빈에 결합하고 이의 기능을 저해한다. 적절하게는 ActRIIa 폴리펩티드는 골 성장과 골 광화를 촉진한다. ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 인간 ActRIIa 전구체 폴리펩티드(SEQ ID NO: 1)와 가용성 인간 ActRIIa 폴리펩티드(가령, SEQ ID NO: 2, 3, 7과 12)가 포함된다.

[0040] 인간 ActRIIa 전구체 단백질 서열은 아래와 같다:

MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**EMEVTQPTSNPVTPKPP**YYNILLYSLVPL
 MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLE
 VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
 ILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
 TMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGL
 ALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL
 VLVWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEIIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVL
 RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
 TEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL (SEQ ID NO: 1)

[0041]

[0042] 신호 펩티드는 단일 밑줄로 표시된다; 세포의 도메인은 굵은 글씨체로 표시되고, 잠재적 N-연결된 글리코실화 부위(glycosylation site)는 이중 밑줄로 표시된다.

[0043] 인간 ActRIIa 가용성(세포외), 가공된 폴리펩티드 서열은 아래와 같다:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

[0044]

[0045] 세포의 도메인의 C-말단 “꼬리”는 밑줄로 표시된다. 이러한 “꼬리”가 결실된 서열(Δ15 서열)은 아래와 같다:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EM (SEQ ID NO:3)

[0046]

[0047] 인간 ActRIIa 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다(Genbank entry NM_001616의 뉴클레오티드 164-1705):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTCCGCTTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGC
 TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTAAATGCTAATTGGGAAAAAG
 ACAGAACCAATCAAAGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT
 TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTGTTG

[0048]

GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG
 AAGTATATTTTTGTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTATTTTCCA
 GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCATTACAA
 CATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT
 TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTCCAACCTCAAGAC
 CCAGGACCACCCCACTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT
 GAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTCTGTGAAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG
 CTGTCAAATATTTCCAATACAGGACAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTAC
 AGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGG
 CACCAGTGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCACTAT
 CAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAAATGAAGTGTGCATATTGCAGAAACC
 ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA
 ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA
 CAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC
 GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC
 TATAAATTCCAAAGGGATGCATTTTGGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC
 TATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG
 CCATTTGAGGAGGAAATGGCCAGCATCCATCTCTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT
 GCATAAAAAAAGAGGCTGTTTAAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA
 TGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCAGCAGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT
 GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAATATTATTACCACAGA
 GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAACTA
 GTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

[0049]

[0050] 인간 ActRIIa 가용성(세포외) 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다:

ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATGGGAAAAAGA
 CAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT
 GTTTTGGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGG
 CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA
 AGTATATTTTTGTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTATTTTCCAG
 AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID
 NO: 5)

[0051]

[0052] 특정 구체예에서, 본 발명은 가용성 ActRIIa 폴리펩티드에 관계한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, “가용성 ActRIIa 폴리펩티드”는 일반적으로, ActRIIa 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 본 명세서에서, “가용성 ActRIIa 폴리펩티드”에는 ActRIIa 단백질의 자연 발생 세포외 도메인과 이의 변이체(돌연변이체, 단편과 펩티드모방 형태 포함)가 포함된다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 예로써, 액티빈, 특히 AA, AB 또는 BB 액티빈에 결합하는 능력을 유지하는 것이다. 바람직하게는, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 1 nM 또는 그 미만의 해리 상수로 액티빈 AA에 결합할 것이다. 사람 ActRIIa 전구 단백질의 아미노산 서열은 하기에서 제공한다. ActRIIa 단백질의 세포외 도메인은 액티빈에 결합하고, 일반적으로, 가용성이고, 따라서 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드로 명명될 수 있다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12와 13에 예시된 가용성 폴리펩티드가 포함된다. SEQ ID NO:7은 ActRIIa-hFc로 지칭되고, 실시예들에서 더욱 상세하게 기술된다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드의 다른 실례는 ActRIIa 단백질의 세포외 도메인 이외에 신호 서열, 예를 들면, 꿀벌 멜리틴(honey bee mellitin) 리더 서열 (SEQ ID NO: 8), 조직 플라스미노겐 활성화인자(tissue plasminogen activator, TPA) 리더(SEQ ID NO: 9) 또는 고유 ActRIIa 리더(SEQ ID NO: 10)를 포함한다. SEQ ID NO: 13에 예시된 ActRIIa-hFc 폴리펩티드는 TPA 리더를 이용한다.

[0053]

ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 활성 단편(functionally active fragment)은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 상응하는 단편으로부터 재조합 방식으로 생산된 폴리펩티드를 선별함으로써 취득될 수 있다. 이에 더하여, 단편은 전통적인 Merrifield 고형상(solid phase) f-Moc 또는 t-Boc 화학과 같은 당분야에 공지된 기술을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 이들 단편은 생산되고(재조합 방식으로 또는 화학적 합성에 의해), 액티빈에 의해 매개되는 ActRII 단백질 또는 신호전달의 길항물질(저해물질)로서 기능할 수 있는 펩티드 단편을 확

인하기 위하여 검사될 수 있다.

[0054] ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 활성 변이체는 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 상응하는 돌연변이된 핵산으로부터 재조합 방식으로 생산된 변형된 폴리펩티드의 라이브러리를 선별함으로써 획득될 수 있다. 이들 변이체는 생산되고, 액티빈에 의해 매개되는 ActRIIa 단백질 또는 신호전달의 길항물질(저해물질)로서 기능할 수 있는 변이체를 확인하기 위하여 검사될 수 있다. 특정 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 사례에서, 이러한 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 보유한다.

[0055] 기능적 변이체는 치료 효능(therapeutic efficacy), 또는 안정성(가령, 체외 반감기(*ex vivo* shelf life)와 생체내에서 단백질분해(protolytic degradation)에 대한 내성)를 강화시키는 것과 같은 목적을 위하여 ActRIIa 폴리펩티드의 구조를 변형함으로써 산출될 수도 있다. 이런 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 액티빈 결합을 유지하도록 선택될 때, 자연-발생 ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 등가체(functional equivalent)로 간주된다. 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 예로써, 아미노산 치환, 결실, 또는 부가에 의해 생산될 수 있다. 가령, 이소루이신 또는 발린으로 루이신의 분리된 치환, 글루타민산염으로 아스파라긴산염의 분리된 치환, 세린으로 트레오닌의 분리된 치환, 또는 구조적으로 관련된 아미노산으로 아미노산의 유사한 치환(가령, 보존성 돌연변이)은 결과의 분자의 생물학적 활성에 주요한 효과를 나타내지 않을 것으로 예상하는 것은 합당하다. 보존성 치환은 측쇄에 관련된 아미노산 집단 내에서 발생하는 치환이다. ActRIIa 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화가 기능적 동족체(functional homolog)를 결과하는 지의 여부는 야생형 ActRIIa 폴리펩티드에서와 유사한 방식으로 세포 내에서 반응을 유도하는 변이 ActRIIa 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0056] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 폴리펩티드의 글리코실화를 변화시키기 위하여 ActRIIa 폴리펩티드의 특이적인 돌연변이를 계획한다. 이들 돌연변이는 하나 이상의 글리코실화 부위, 예를 들면, O-연결된 또는 N-연결된 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하도록 선택된다. 아스파라긴-연결된 글리코실화 인식 부위는 일반적으로, 트리펩티드(tripeptide) 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린(여기서, "X"는 임의의 아미노산)을 포함하는데, 상기 서열은 적절한 세포 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식된다. 이러한 변형은 야생형 ActRIIa 폴리펩티드의 서열에서 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가에 의해 또는 이러한 잔기에 의한 치환에 의해 달성될 수 있다(O-연결된 글리코실화 부위의 경우에). 글리코실화 인식 부위(및/또는 두 번째 위치에서 아미노산 결실)의 첫 번째 또는 세 번째 아미노산 위치 중에서 한쪽 또는 양쪽에서 다양한 아미노산 치환 또는 결실은 변형된 트리펩티드 서열에서 비-글리코실화를 유도한다. ActRIIa 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 숫자를 증가시키는 다른 수단은 ActRIIa 폴리펩티드에 글리코시드의 화학적 또는 효소적 결합이다. 이용되는 결합 양식(coupling mode)에 따라, 당은 (a) 아르기닌과 히스티딘; (b) 유리 카르복실 기; (c) 유리 설피드릴 기, 예를 들면, 시스테인의 유리 설피드릴 기; (d) 유리 하이드록실 기, 예를 들면, 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린의 유리 하이드록실 기; (e) 방향족 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 방향족 잔기; 또는 (f) 글루타민의 아마이드 기에 부착될 수 있다. 이들 방법은 W087/05330(1987년 9월11일 공개) 그리고 Aplin and Wriston(1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp259-306-참고문헌으로 첨부됨)에서 설명되어 있다. ActRIIa 폴리펩티드 상에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 디글리코실화는 예로써, 트리플루오로메탄설포산(trifluoromethanesulfonic acid) 화합물, 또는 등가의 화합물에 ActRIIa 폴리펩티드의 노출을 수반한다. 이러한 처리는 아미노산 서열을 본래 상태로 유지하면서, 연결 당(linking sugar)(N-아세틸 글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 거의 또는 전체 당의 절단을 결과한다. ActRIIa 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350에 기술된 바와 같이, 다양한 엔도(endo)-와 엑소(exo)-글리코시다아제의 이용으로 달성될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드의 서열은 이용되는 발현 시스템의 유형에 따라 적절하게 조정될 수 있는데, 그 이유는 포유동물, 효모, 곤충과 식물 세포가 상기 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴을 도입하기 때문이다. 일반적으로, 인간에 이용되는 ActRIIa 단백질은 다른 포유동물 발현 세포주 역시 유용할 것으로 예상되긴 하지만, 적절한 글리코실화를 제공하는 포유동물 세포주, 예를 들면, HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현될 수 있다.

[0057] 본 발명에서는 돌연변이체, 특히, ActRIIa 폴리펩티드의 조합 돌연변이체(combinatorial mutant)의 세트와 절두 돌연변이체(truncation mutant)를 산출하는 방법을 계획한다; 조합 돌연변이체의 집합은 기능적 변이체 서열을 확인하는데 특히 유용하다. 이런 조합 라이브러리(combinatorial library)를 선별하는 목적은 예로써, 항진물질 또는 길항물질로 작용할 수 있는 이들 모두 함께 신규한 활성을 보유하는 ActRIIa 폴리펩티드 변이체를 만들기

위함이다. 다양한 선별 분석(screening assay)이 하기에 제시되는데, 이들 분석은 변이체를 평가하는데 이용될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 변이체는 ActRIIa 리간드에 결합하거나, ActRIIa 폴리펩티드에 ActRIIa 리간드의 결합을 예방하거나, 또는 ActRIIa 리간드에 의해 유도된 신호전달을 간섭하는 능력에 대하여 선별된다.

[0058] ActRIIa 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 또한, 세포 내에서-기초된 또는 생체내 분석에 의해 검사될 수 있다. 가령, 골 생산 또는 파괴에 관여하는 유전자들의 발현에 ActRIIa 폴리펩티드 변이체의 표과를 평가할 수 있다. 이는 필요에 따라, 하나 이상의 재조합 ActRIIa 리간드 단백질(가령, 액티빈)의 존재에서 수행되고, 세포는 ActRIIa 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 그리고 임의적으로, ActRIIa 리간드를 생산하기 위하여 형질감염(transfection)될 수 있다. 유사하게, ActRIIa 폴리펩티드는 생쥐 또는 다른 동물에 투여되고, 하나 이상의 골 성질 예를 들면 밀도 또는 용적이 평가될 수 있다. 골절에 대한 치유 속도도 평가될 수 있다. 이중에너지 방사선 흡수법(Dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA))은 동물에서 골 밀도를 평가하기 위한 잘 정립된 비-침투성 정량 기술이다. 사람의 경우 중앙 DEXA 시스템을 이용하여 척추 및 골반에서 골 밀도를 측정할 수 있다. 이들은 전반적인 골 밀도의 최고 예측 물질이다. 말초 DEXA 시스템을 이용하여 머리, 손목, 발목 및 발을 포함하는 말초 골에서 골 밀도를 측정할 수도 있다. CAT 스캔을 포함하는 통상적인 x-선 이미징 시스템을 이용하여 골 성장 및 골절 치유를 측정할 수 있다. 골의 기계적인 강도도 물론 측정할 수 있다.

[0059] 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드에 비하여 선택적인 또는 전반적으로 증가된 효능을 갖는 조합-유래된 변이체(combinatorially-derived variants)가 산출될 수 있다. 유사하게, 돌연변이유발(mutagenesis)은 상응하는 야생형 ActRIIa 폴리펩티드와 극히 상이한 세포내 반감기를 갖는 변이체를 산출할 수 있다. 가령, 변경된 단백질은 고유 ActRIIa 폴리펩티드의 파괴, 또는 불활성화를 유발하는 단백질 분해 변성 또는 다른 세포 과정에 더욱 안정화되거나 또는 덜 안정화될 수 있다. 이들 변이체와 이들을 인코딩하는 유전자는 ActRIIa 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 ActRIIa 폴리펩티드 수준을 변화시키는데 이용될 수 있다. 가령, 짧은 반감기는 더욱 일과성 생물학적 효과를 발생시키고, 유도성 발현 시스템의 일부일 때, 세포 내에서 재조합 ActRIIa 폴리펩티드 수준의 더욱 엄격한 제어를 가능하게 할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 돌연변이는 상기 단백질의 반감기를 변화시키기 위하여 링커(존재하면) 및/또는 Fc 부분에서 발생될 수 있다.

[0060] 조합 라이브러리는 잠재적 ActRIIa 폴리펩티드 서열의 최소한 일부분을 각각 포함하는 폴리펩티드의 라이브러리를 인코딩하는 유전자의 축퇴 라이브러리(degenerate library)에 의해 산출될 수 있다. 가령, 합성 올리고뉴클레오티드의 혼합물은 잠재적 ActRIIa 폴리펩티드 뉴클레오티드 서열의 축퇴 세트(degenerate set)가 개별 폴리펩티드로서, 또는 대안으로, 더욱 큰 융합 단백질의 세트(가령, 파지 전시(phage display)의 경우에)로서 발현 되도록 하기 위하여, 유전자 서열 내로 효소적으로 결합될 수 있다.

[0061] 축퇴 올리고뉴클레오티드 서열로부터 잠재적 동족체의 라이브러리를 산출할 수 있는 여러 방법이 존재한다. 축퇴 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성장치에서 수행될 수 있고, 이들 합성 유전자는 이후, 발현을 위한 적절한 벡터 내로 결합될 수 있다. 축퇴 올리고뉴클레오티드의 합성은 당분야에 널리 공지되어 있다(참조: Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). 이들 기술은 다른 단백질의 방향적 진화(directed evolution)에 이용되고 있다(참조: Scott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; U.S. Patent No: 5,223,409, 5,198,346과 5,096,815).

[0062] 대안으로, 조합 라이브러리를 산출하기 위하여 다른 형태의 돌연변이유발이 이용될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 변이체는 예로써, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발(alanine scanning mutagenesis) 및 이와 유사한 것(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; Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085); 링커 스캐닝 돌연변이유발(linker scanning mutagenesis)(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 돌연변이(saturation mutagenesis)(Meyers et al., (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이(Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 또는 화학적 돌연변이유발(chemical mutagenesis) 등을 비롯한 무작위 돌연변이유발(random mutagenesis)(Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; Greener et al., (1994) Strategies in Mol

Biol 7:32-34)을 선별하여, 라이브러리로부터 산출되고 분리될 수 있다. 링커 스캐닝 돌연변이유발, 특히, 조합 설정(combinatorial setting)에서 링커 스캐닝 돌연변이유발은 절두된(생물활성) 형태의 ActRII 폴리펩티드를 확인하기 위한 매력적인 방법이다.

[0063] 점 돌연변이(point mutation)와 절두(truncation)에 의해 만들어진 조합 라이브러리의 유전자 산물을 선별하고, 그 문제에 관해서, 일정한 특성을 갖는 유전자 산물에 대한 cDNA 라이브러리를 산출하기 위한 폭넓은 범위의 기술이 당분야에 공지되어 있다. 이들 기술은 일반적으로, ActRIIa 폴리펩티드의 조합 돌연변이유발에 의해 산출된 유전자 라이브러리의 신속한 선별을 위하여 개조될 수 있다. 광범위한 유전자 라이브러리를 선별하는데 가장 널리 이용되는 기술은 전형적으로, 유전자 라이브러리를 복제가능 발현 벡터로 클로닝하는 단계, 결과의 벡터 라이브러리로 적절한 세포를 형질전환시키는 단계, 그리고 원하는 활성의 검출이 생성물이 검출된 유전자를 인코딩하는 벡터의 상대적으로 용이한 분리를 가능하게 하는 조건 하에 조합 유전자를 발현하는 단계를 포함한다. 바람직한 분석에는 액티빈 결합 분석과 액티빈-매개된 세포 신호전달 분석이 포함된다.

[0064] 특정 구체예에서, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 변형 이외에, 추가의 번역후 변형(post-translational modification)을 포함할 수 있다. 이들 변형에는 에로써, 아세틸화(acetylation), 카르복실화(carboxylation), 글리코실화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 지질화(lipidation)와 아실화(acylation)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 결과로써, 이러한 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 지질(lipid), 폴리사카라이드(polysaccharide) 또는 모노사카라이드(monosaccharide), 그리고 인산염(phosphate)을 포함할 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드의 기능성(functionality)에 대한 이런 비-아미노산 요소의 효과는 다른 ActRIIa 폴리펩티드 변이체에 대하여, 본 명세서에 기술된 바와 같이 검사될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드가 ActRIIa 폴리펩티드의 초기 형태(nascent form)를 절단함으로써 세포 내에서 생산될 때, 번역후 처리(post-translational processing) 역시 단백질의 정확한 접힘(folding) 및/또는 기능에 중요하다. ActRIIa 폴리펩티드의 정확한 변형과 처리를 담보하기 위하여, 이런 번역후 활성을 위한 특이적인 세포 기구와 특이적인 기전을 보유하는 상이한 세포(가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)가 선택될 수 있다.

[0065] 특정 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 변이체 또는 변형된 형태에는 ActRIIa 폴리펩티드의 최소한 일부 분과 하나 이상의 융합 도메인을 보유하는 융합 단백질이 포함된다. 이런 융합 도메인의 널리 공지된 실례에는 폴리히스티딘(polyhistidine), Glu-Glu, 글루타티온 S 전이효소(glutathione S transferase, GST), 티오레독신(thioredoxin), 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토오스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 특성을 공여하도록 선택된다. 가령, 일부 융합 도메인은 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의한 융합 단백질의 분리에 특히 유용하다. 친화성 정제를 위하여, 친화성 크로마토그래피에 적합한 매트릭스(matrix), 예를 들면, 글루타티온-, 아밀라아제-, 그리고 니켈- 또는 코발트-공동된 수지가 이용된다. 이들 매트릭스 중에서 대부분은 “키트” 형태, 예를 들면, Pharmacia GST 정제 시스템과 (His)₆ 융합 상대와 함께 이용되는 QIAexpress™ 시스템(Qiagen)으로 가용하다. 다른 실례로서, 융합 도메인은 ActRII 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 선택된다. 이런 검출 도메인의 실례에는 다양한 형광 단백질(가령, GFP)과 “에피토프 태그(epitope tag)”가 포함되는데, 이들 태그는 통상적으로, 특이적인 항체가 가용한 짧은 펩티드 서열이다. 특이적인 단클론 항체가 용이하게 가용한 널리 공지된 에피토프 태그에는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(influenza virus haemagglutinin, HA)과 c-myc 태그가 포함된다. 일부 사례에서, 융합 도메인은 프로테아제 절단 부위(protease cleavage site), 예를 들면, 인자 Xa 또는 트롬빈(thrombin)에 대한 프로테아제 절단 부위를 보유하는데, 상기 부위는 관련된 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 절단하여, 이로부터 재조합 단백질이 유리될 수 있도록 한다. 유리된 단백질은 이후, 차후의 크로마토그래피 분리(chromatographic separation)에 의해 융합 도메인으로부터 분리될 수 있다. 특정의 바람직한 구체예에서, ActRII 폴리펩티드는 생체내에서 ActRII 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인(“안정화” 도메인)과 융합된다. “안정화”는 이러한 안정화가 감소된 파괴, 신장에 의한 감소된 소거, 또는 다른 약동학적 효과에 기인하는 지에 상관없이, 혈청 반감기를 증가시키는 무언가를 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 범위의 단백질에 바람직한 약동학적 특성을 공여하는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 융합은 바람직한 특성을 공여할 수 있다. 선택되는 다른 유형의 융합 도메인에는 다중화(multimerizing)(가령, 이합화(dimerizing), 사합화(tetramerizing)) 도메인과 기능성 도메인(추가적인 생물학적 기능, 예를 들면, 근육 성장의 추가적인 자극 공여)이 포함된다.

[0066] 특정 실례로서, 본 발명에서는 Fc 도메인에 융합된 ActRIIa의 가용성 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질(가령, SEQ ID NO: 6)을 제시한다.

THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPPIEKTKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN (A) HYTQKLSLSLSPGK*

[0067]

[0068]

임의적으로, Fc 도메인은 Asp-265, 리신 322와 Asn-434와 같은 잔기에서 하나 이상의 잔기를 보유한다. 특정 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나 이상(가령, Asp-265 돌연변이)을 보유하는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 대한 감소된 결합 능력을 갖는다. 다른 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나 이상(가령, Asn-434 돌연변이)을 보유하는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC 클래스 I-관련된 Fc-수용체(FcRN)에 대한 증가된 결합 능력을 갖는다.

[0069]

특정 구체예에서, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 이상의 변형을 보유한다. 가령, 이들 변형은 ActRIIa 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 강화시키거나, ActRIIa 폴리펩티드의 순환 반감기(circulatory half life)를 강화시키거나, 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 단백질 분해 변성을 감소시킨다. 이와 같은 안정화 변형에는 융합 단백질(예로써, ActRIIa 폴리펩티드와 안정화 도메인을 포함하는 융합 단백질 포함), 글리코실화 부위의 변형(예로써, ActRIIa 폴리펩티드에 글리코실화 부위의 추가 포함), 그리고 탄수화물 모이어티의 변형(예로써, ActRIIa 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거 포함)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에서, “안정화 도메인”은 융합 단백질의 경우에서처럼 융합 도메인(가령, Fc)을 지칭할 뿐만 아니라 비-단백질성 변형(nonproteinaceous modification), 예를 들면, 탄수화물 모이어티, 또는 비-단백질성 모이어티, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜을 포괄한다.

[0070]

특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드의 분리된 및/또는 정제된 형태를 가능하게 하는데, 이들은 다른 단백질로부터 분리되거나, 또는 다른 단백질이 실질적으로 존재하지 않는다. ActRIIa 폴리펩티드는 일반적으로, 재조합 핵산으로부터 발현에 의해 생산될 것이다.

[0071]

3. ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산

[0072]

특정 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에 개시된 단편, 기능적 변이체와 융합 단백질을 비롯한 임의의 ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)를 인코딩하는 분리된 및/또는 재조합 핵산을 제시한다. 가령, SEQ ID NO: 4는 자연 발생 인간 ActRIIa 전구체 폴리펩티드를 인코딩하는 반면, SEQ ID NO: 5는 ActRIIa의 가공된 세포외 도메인을 인코딩한다. 본 발명의 핵산은 단일 가닥(single-strand) 또는 이중 가닥(double strand)이다. 이들 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 이들 핵산은 예로써, ActRIIa 폴리펩티드를 제조하는 방법에, 또는 직접적인 치료제(가령, 유전자 치료법에서)로서 이용될 수 있다.

[0073]

특정 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 핵산은 SEQ ID NO: 4 또는 5의 변이체 핵산을 포괄하는 것으로 간주된다. 변이체 뉴클레오티드 서열에는 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 구별되는 서열, 예를 들면, 대립형질 변이체(allelic variant)가 포함된다.

[0074]

특정 구체예에서, 본 발명에서는 SEQ ID NO: 4 또는 5에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 분리된 또는 재조합 핵산 서열을 제시한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, SEQ ID NO: 4 또는 5에 상보적인 핵산 서열, 그리고 SEQ ID NO: 4 또는 5의 변이체 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 서열은 분리되고, 재조합되고 및/또는 이질성 뉴클레오티드 서열과 융합되거나 DNA 라이브러리 내에 융합될 수 있다.

[0075]

다른 구체예에서, 본 발명의 핵산에는 SEQ ID NO: 4 또는 5에 열거된 뉴클레오티드 서열에 고도로 엄밀한 조건하에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열, SEQ ID NO: 4 또는 5의 보체 서열, 또는 이들의 단편 역시 포함된다. 앞서 언급된 바와 같이, 당업자는 DNA 혼성화(hybridization)를 촉진하는 적절한 엄밀도(stringency) 조건이 변화될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 당업자는 DNA 혼성화(hybridization)를 촉진하는 적절한 엄밀도(stringency) 조건이 변화될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 가령, 대략 45°C에서 6.0 x 염화나트륨(sodium chloride)/시트르산나트륨(sodium citrate)(SSC)에서 혼성화, 이후 50°C에서 2.0 x SSC의 세척을 수행할 수 있다. 가령, 세척 단계에서 염 농도는 50°C에서 대략 2.0 x SSC의 낮은 엄밀도 내지 50°C에서 대략 0.2 x SSC의 높은 엄밀도에서 선택될 수 있다. 이에 더하여, 세척 단계에서 온도는 실온(대략 22°C)에서 낮은 엄밀도 조건에서 대략 65°C에서 높은 엄밀도 조건으로 증가될 수 있다. 온도와 염 모두 변화되거나, 또는 다른 변수가 변하는 반면에 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명은 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄밀도 조건하에 혼성화되고, 이후 실온에서 2 x SSC에서 세척되는 핵산을 제시한다.

[0076] 유전자 코드(genetic code)에서 축퇴(degeneracy)로 인하여 SEQ ID NO: 4 또는 5에 열거된 핵산과 차별되는 분리된 핵산 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 가령, 다수의 아미노산이 하나 이상의 삼중항(triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 명기하는 코돈, 또는 동종이명(synonym)(가령, CAU와 CAC는 히스티딘에 대한 동종이명(synonym)이다)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 “침묵” 돌연변이를 유도한다. 하지만, 본 발명의 단백질의 아미노산 서열에서 변화를 유발하는 DNA 서열 다형성(polymorphism)이 포유동물 세포 사이에 존재할 것으로 예상된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특정 단백질을 인코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드에서 이들 변이(뉴클레오티드의 최대 3-5%)가 자연적인 대립형질 변이(allelic variation)로 인하여 특정한 종의 개체 사이에 존재할 수 있다. 이와 같은 모든 뉴클레오티드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0077] 특정 구체예에서, 본 발명의 재조합 핵산은 발현 구조체(expression construct) 내에서 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로, 발현에 이용되는 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포에 대한 다양한 유형의 적합한 발현 벡터와 조절 서열이 공지되어 있다. 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에는 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 시작과 종결 서열, 번역 시작과 종결 서열, 인핸서 또는 활성인자 서열 등이 포함된다. 당분야에 공지된 구조성 또는 유도성 프로모터가 본 발명에 의해 고려된다. 이들 프로모터는 자연 발생 프로모터, 또는 하나 이상의 프로모터의 요소를 통합하는 하이브리드 프로모터이다. 발현 구조체는 세포 내에서 에피솜(episome), 예를 들면, 플라스미드(plasmid) 상에 존재하거나, 또는 발현 구조체는 염색체 내로 삽입된다. 바람직한 구체예에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 선택가능 마커 유전자를 포함한다. 선택가능 마커 유전자는 당분야에 널리 공지되어 있고, 이용된 숙주 세포에 따라 변한다.

[0078] 본 발명의 특정 측면에서, 본 발명의 핵산은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 최소한 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 발현 벡터(expression 벡터)에 담겨 제공된다. 조절 서열은 당분야에서 인지되고, ActRIIa 폴리펩티드의 발현을 관리하도록 선택된다. 따라서 조절 서열에는 프로모터, 인핸서와 다른 발현 제어 요소가 포함된다. 전형적인 조절 서열은 Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 기술된다. 가령, 작동가능하게 연결되면 DNA 서열의 발현을 제어하는 다양한 발현 제어 서열은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현하기 위하여 이들 벡터에 이용된다. 이런 유용한 발현 제어 서열에는 예로써, SV40의 초기와 후기 프로모터, *tet* 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 극초기 프로모터, RSV 프로모터, *lac* 시스템, *trp* 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 프로모터(이의 발현은 T7 RNA 중합효소에 의해 관리된다), 파지 람다(phage lambda)의 주요 오퍼레이터와 프로모터 영역, *fd* 외피 단백질에 대한 제어 영역, 3-글리세르산인산 키나아제(phosphoglycerate kinase) 또는 다른 당분해(glycolytic) 효소에 대한 프로모터, 산성 인산가수분해효소(acid phosphatase)의 프로모터(가령, Pho5), 효모 α-교미 인자(mating factor)의 프로모터, 배큘로바이러스(baculovirus) 시스템의 다면체(polyhedron) 프로모터, 원핵이나 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 알려져 있는 다른 서열, 이들의 다양한 조합 등이 포함된다. 발현 벡터의 설계는 형질전환되는 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되는 원하는 단백질의 타입과 같은 인자에 좌우된다. 게다가, 벡터의 사본수(copy number), 사본수를 제어하는 능력과 상기 벡터에 의해 인코딩되는 임의의 다른 단백질, 예를 들면, 항생제 마커(antibiotic marker)의 발현 역시 숙고되어야 한다.

[0079] 본 발명의 재조합 핵산은 원핵 세포, 진핵 세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유류), 또는 둘 모두에서 발현에 적합한 벡터 내로, 클론된 유전자 또는 이의 일부분을 결합함으로써 산출될 수 있다. 재조합 ActRIIa 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 벡터에는 플라스미드 및 다른 벡터가 포함된다. 가령, 원핵 세포, 예를 들면, 대장균(*E. coli*)에서 발현에 적합한 벡터에는 아래 유형의 플라스미드가 포함된다: pBR322-유래된 플라스미드, pEMBL-유래된 플라스미드, pEX-유래된 플라스미드, pBTac-유래된 플라스미드와 pUC-유래된 플라스미드.

[0080] 일부 포유동물 발현 벡터는 세균 내에서 벡터의 증식을 용이하게 하는 원핵 서열, 그리고 진핵 세포에서 발현되는 하나 이상의 진핵 전사 단위(transcription unit)를 모두 포함한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo와 pHyg 유래된 벡터는 진핵 세포의 형질 감염(transfection)에 적합한 포유동물 발현 벡터의 실례이다. 이들 벡터 중에서 일부는 원핵과 진핵 세포 모두에서 복제와 내약성(drug resistance) 선택을 용이하게 하는 세균 플라스미드, 예를 들면, pBR322로부터 서열로 변형된다. 대안으로, 소 파필로마 바이러스(bovine papilloma virus)(BPV-I), 또는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus)(pHEBo, pREP-유래된, p205)와 같은 바이러스의 유도체가 진핵 세포에서 단백질의 일시적인 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 실례는 하기, 유전자 치료 전달

시스템의 설명에서 확인할 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 생물체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법이 당분야에 널리 공지되어 있다. 원핵과 진핵 세포 둘 모두에 적합한 다른 발현 시스템 및 전반적인 제조할 절차는 *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001을 참조한다. 일부 사례에서, 배콜로바이러스 발현 시스템의 이용으로 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직하다. 이런 배콜로바이러스 발현 시스템의 실례에는 pVL-유래된 벡터(가령, pVL1392, pVL1393과 pVL941), pAcUW-유래된 벡터(가령, pAcUW1), 그리고 pBlueBac-유래된 벡터(가령, β-gal 보유 pBlueBac III)가 포함된다.

[0081] 바람직한 구체예에서, CHO 세포에서 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드의 생산을 위한 벡터, 예를 들면, Pcmv-Script 벡터(Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)와 pCI-neo 벡터(Promega, Madison, Wise)가 설계된다. 확인되는 바와 같이, 본 발명의 유전자 구조체는 예로써, 정제를 위한, 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생산하기 위하여 배양으로 증식된 세포에서 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드의 발현을 유도하는데 이용될 수 있다.

[0082] 본 발명은 또한, 하나 이상의 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드에 대한 코딩 서열(가령, SEQ ID NO: 4 또는 5)을 비롯한 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 관계한다. 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포이다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 세균 세포(가령, 대장균(*E. coli*)), 곤충 세포(가령, 배콜로바이러스 발현 시스템 이용), 효모, 또는 포유동물 세포에서 발현된다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다.

[0083] 따라서, 본 발명은 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드를 생산하는 방법에 관계한다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ActRIIa 폴리펩티드의 발현이 진행되도록 하는 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 세포와 배지의 혼합물로부터 분리되고 분리될 수 있다. 대안으로, ActRIIa 폴리펩티드는 세포질에 또는 막 분획(membrane fraction) 내에 유지되고, 세포는 수거되고 용해되며, 상기 단백질은 분리된다. 세포 배양액은 숙주 세포, 배지와 다른 부산물을 함유한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과(ultrafiltration), 전기영동(electrophoresis), ActRIIa 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체를 이용한 면역친화성(immunoaffinity) 정제 및 ActRIIa 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 작용제(가령, ActRIIa-Fc 융합체를 정제하는데 단백질 A 칼럼이 이용될 수 있다)를 이용한 친화성 정제를 비롯한, 단백질을 정제하기 위한 당분야에 공지된 기술을 이용하여, 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 둘 모두로부터 분리될 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하는 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 바람직한 구체예에서, 정제는 예로써, 임의의 순서로 아래 중에서 3가지 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계로 달성된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로스 크로마토그래피, 페닐세파로스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. 본 명세서에서 증명된 바와 같이, ActRIIa-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 결정에서 >98% 및 SDS PAGE에 의한 결정에서 >95%의 순도로 정제되었다. 이러한 수준의 순도는 생쥐, 쥐와 비-인간 영장류에서 바람직한 효과를 달성하는데 충분하였다.

[0084] 다른 구체예에서, 재조합 ActRIIa 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에서 정제 리더 서열, 예를 들면, 폴리-(His)/엔테로키나아제(enterokinase) 절단 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni²⁺ 금속 수지(metal resin)를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의한, 발현된 융합 단백질의 정제를 가능하게 할 수 있다. 정제 리더 서열은 이후, 정제된 ActRIIa 폴리펩티드를 제공하기 위하여 엔테로키나아제 처리에 의해 차후에 제거될 수 있다(참조: Hochuli et al., (1987) J Chromatography 411:177; Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

[0085] 융합 유전자를 만드는 기술은 널리 공지되어 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합은 통상적인 기술에 따라, 결합을 위한 평활-말단(blunt-ended termini) 또는 갈지자-말단(stagger-ended termini), 적절한 말단을 제공하는 제한 효소 절단(restriction enzyme digestion), 점착 말단(cohesive end)의 채움(filling-in), 원치 않는 결합을 차단하는 알칼리성 포스파타아제(alkaline phosphatase) 처리, 그리고 효소 결합(enzymatic ligation)을 이용하여 수행된다. 다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성장치를 비롯한 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 2개의 연속하는 유전자 단편 사이에 상보성 오버행(overhang)을 산출하는 앵커 프라이머(anchor primer)를 이용하여 수행될 수 있는데, 이들 유전자 단편은 차후에 어닐링되어 키메라 유전자 서열을 산출할 수 있다(참조: Current Protocols in

Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. 대안적 액티빈과 ActRIIa 길항물질

- [0086]
- [0087] 본 명세서에 제공된 데이터는 액티빈-ActRIIa 신호전달의 길항물질이 골 성장 및 골 광화를 촉진시키는데 이용될 수 있음을 설명한다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드, 특히, ActRIIa-Fc가 선호되는 길항물질이고, 이런 길항물질이 액티빈 길항작용(antagonism) 이외의 기전(가령, 액티빈 저해는 아마도, TGF-beta 대과의 다른 구성원을 비롯한 광범위한 분자의 활성을 저해하는 작용제의 주제의 지표이고, 이런 집단적인 저해는 골에 바람직한 효과를 유도한다)을 통하여 골에 영향을 줄 수 있긴 하지만, 항-액티빈(가령, 액티빈 A, B, C 또는 E) 항체, 항-ActRIIa 항체, 안티센스, ActRIIa의 생산을 저해하는 RNAi 또는 리보자임 핵산, 그리고 액티빈 또는 ActRIIa의 다른 저해물질, 특히, 액티빈-ActRIIa 결합을 파괴하는 저해물질을 비롯한, 다른 유형의 액티빈-ActRIIa 길항물질 역시 유용할 것으로 기대된다.
- [0088] ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 리간드에 경쟁적으로 결합하거나 ActRIIa-매개된 신호전달을 저해하는 항체는 ActRIIa 폴리펩티드 활성의 길항물질로서 이용될 수 있다. 유사하게, 액티빈 A 폴리펩티드와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 결합을 파괴하는 항체가 길항물질로서 이용될 수 있다.
- [0089] ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드로부터 유래된 면역원(immunogen)을 이용함으로써, 항-단백질/항-펩티드 항혈청(antisera) 또는 단클론 항체가 표준 프로토콜(standard protocol)에 의해 제조될 수 있다(참조: Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). 포유동물, 예를 들면, 생쥐, 햄스터 또는 토끼는 액티빈, ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드의 면역원성 형태(immunogenic form), 항체 반응(antibody response)을 유도할 수 있는 항원 단편, 또는 융합 단백질로 면역될 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성(immunogenicity)을 공여하는 기술에는 담체(carrier)에 배합(conjugation) 또는 당분야에 널리 공지된 다른 기술이 포함된다. ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드의 면역원성 부분이 어쥬반트(adjuvant)의 존재 하에 투여될 수 있다. 면역화의 진행은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가(antibody titer)의 검출에 의해 모니터링될 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역분석은 상기 면역원을 항원으로 하여 항체 수준을 평가하는데 이용될 수 있다.
- [0090] ActRIIa 폴리펩티드의 항원성 조합제로 동물의 면역이후, 항혈청이 수득될 수 있고, 원하는 경우에, 다클론 항체가 혈청으로부터 분리될 수 있다. 단클론 항체를 생산하기 위하여, 항체-생산 세포(립프구)를 면역된 동물로부터 수거하고 표준 체세포 융합 절차에 의해 영속 세포(immortalizing cell), 예를 들면, 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마(hybridoma) 세포를 산출할 수 있다. 이런 기술은 당분야에 널리 공지되어 있는데, 여기에는 예로써, 하이브리도마 기술(Kohler와 Milstein에 의해 최초로 개발됨((1975) Nature, 256: 495-497)), 인간 B 세포 하이브리도마 기술(Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72), 인간 단클론 항체를 생산하는 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96) 등이 포함된다. 하이브리도마 세포는 ActRIIa 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체 및 이런 하이브리도마 세포를 포함하는 배양액으로부터 분리된 단클론 항체의 생산을 위하여 면역화학적으로 선별될 수 있다.
- [0091] 본 명세서에서, “항체”는 본 폴리펩티드와 선택적으로 반응할 수 있는 이의 단편을 포함하는 의도를 가진다. 항체들은 통상적인 기술을 이용하여 단편화될 수 있고, 완전 항체(whole antibody)에서 설명된 것과 동일한 방식으로 이용하기 위해 스크리닝된다. 예를 들면, F(ab)₂ 단편은 펩신을 항체로 처리하면 만들 수 있다. 생성된 F(ab)₂ 단편을 이황화결합을 환원시키기 위해 추가 처리하며 Fab 단편을 만들 수도 있다. 본 발명의 항체는 이 중특이성, 단일-쇄 및 항체의 최소 한 개 CDR 부분에 의해 부여되는 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드에 대한 친화성을 가지는 키메라 및 인화 항체를 포함한다. 적절한 구체예에서, 항체는 추가로 이에 부착된 라벨을 포함하여, 감지가 가능할 수 있다(예를 들면, 라벨은 방사능동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소-공인자가 될 수 있다).
- [0092] 특정 구체예에서, 항체는 재조합 항체이며, 이 용어는 분자 생물학 기술에 의해 일부 생산된 임의 항체, 예를 들면, CDR-그래프트 또는 키메라 항체들 또는 바리브리리-선별된 항체 도메인, 단일 쇠 항체들, 단일 도메인 항체로부터 어셈블리된 사람 또는 다른 항체들(예를 들면, 사람 V_H 단백질 또는 카멜리드 V_H 단백질)을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항체는 단클론 항체이고, 특정 구체예에서, 본 발명은 신규한 항체를 산출하는 방법을 제시한다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 산출하는 방법은 검출가능한 면역 반응을 자극하는데 효과적인 항원 폴리펩티드를 함유하는 면역 조성물

(immunogenic composition)의 일정량을 생쥐에 투여하는 단계, 생쥐로부터 항체-생산 세포(가령, 비장으로부터 유래된 세포)를 수득하는 단계, 항체-생산 세포를 골수종 세포와 융합하여 항체-생산 하이브리도마를 수득하는 단계, 그리고 항체-생산 하이브리도마를 검사하여 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하는 단계를 포함한다. 일단 수득된 하이브리도마는 임의적으로, 하이브리도마-유래된 세포가 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 배양 조건 하에 세포 배양액에서 증식될 수 있다. 단클론 항체는 세포 배양액으로부터 정제될 수 있다.

[0093] 항체와 관련하여 이용된 형용사 “특이적으로 반응하는”은 당분야에서 일반적으로 이해되는 바와 같이, 상기 항체가 목적 항원(가령, ActRIIa 폴리펩티드)과 목적하지 않는 다른 항원 사이에 충분히 선택적이고, 상기 항체가 최소한, 특정 타입의 생물학적 시료의 내에서 목적 항원의 존재를 검출하는데 유용하다는 것을 의미한다. 치료 적용과 같은 상기 항체를 이용하는 특정 방법에서, 더욱 높은 수준의 결합 특이성이 바람직하다. 단클론 항체는 일반적으로, 원하는 항원과 교차-반응성(cross-reacting) 폴리펩티드를 효과적으로 구별하는데 더욱 높은 추세(다클론 항체와 비교하여)를 갖는다. 항체-항원 상호작용의 특이성에 영향을 주는 한 가지 특징은 항원에 대한 항체의 친화성이다. 원하는 특이성이 일정한 범위의 상이한 친화성으로 달성될 수도 있지만, 일반적으로 선호되는 항체는 대략 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 또는 그 이하의 친화성(해리 상수)을 갖는다. 액티빈과 ActRIIa 사이에 특별한 긴밀한 결합이 있다면, 항-액티빈 또는 항-ActRIIa 항체를 중화시키는 것은 일반적으로 10^{-10} 또는 그 미만의 해리상수를 갖는 것으로 기대된다.

[0094] 이에 더하여, 바람직한 항체를 확인하기 위하여 항체를 선별하는데 이용되는 기술은 수득된 항체의 특성에 영향을 줄 수 있다. 가령, 항체가 용해 상태에서 항원에 결합하는데 이용된다면, 용액 결합(solution binding)을 검사하는 것이 바람직하다. 항체와 항원 사이에 상호작용을 검사하여 특히 바람직한 항체를 확인하기 위하여 여러 다양한 기술이 가용하다. 이런 기술에는 ELISA, 표면 플라즈몬 공명 결합 검사(가령, Biacore™ 결합 검사, Biacore AB, Uppsala, Sweden), 샌드위치 검사(sandwich assay)(가령, 상자성 비드(paramagnetic bead) 시스템, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), 웨스턴 블랏(western blot), 면역침전 검사(immunoprecipitation assay), 면역조직화학법(immunohistochemistry) 등이 포함된다.

[0095] 액티빈 또는 ActRIIa 길항물질인 핵산 화합물 종류의 실례에는 안티센스 핵산, RNAi 구조체와 촉매 핵산 구조체가 포함된다. 핵산 화합물은 단일 또는 이중 가닥이다. 이중 가닥 화합물은 오버행 또는 비-상보성 영역 역시 포함할 수 있는데, 여기서 이들 가닥의 한쪽 또는 다른 쪽은 단일 가닥이다. 단일 가닥 화합물은 자기-상보성(self-complementarity) 영역을 포함할 수 있는데, 이는 상기 화합물이 이중 나선 구조의 영역을 포함하는 소위, “헤어핀(hairpin)” 또는 “스텝-루프(stem-loop)” 구조를 형성한다는 것을 의미한다. 핵산 화합물은 전장 ActRII 핵산 서열 또는 액티빈 β_A 또는 β_B 핵산 서열의 1000개 이하, 500개 이하, 250개 이하, 100개 이하, 또는 50개, 35개, 25개, 22개, 20개 또는 18개 이하의 뉴클레오티드로 구성되는 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함할 수도 있다. 상보성 영역은 적절하게는, 최소한 8개 뉴클레오티드, 선택적으로 최소 10개 또는 최소 15개, 그리고 임의적으로, 대략 15개 내지 25개 뉴클레오티드이다. 상보성 영역은 표적 전사체(target transcript)의 인트론(intron), 코딩 서열 또는 비-코딩 서열, 예를 들면, 코딩 서열 부분 내에 존재한다. 일반적으로, 핵산 화합물은 대략 8개 내지 대략 500개 뉴클레오티드 또는 염기쌍 길이를 보유하는데, 임의적으로, 상기 길이는 대략 14개 내지 대략 50개 뉴클레오티드이다. 핵산은 DNA(특히, 안티센스로서 이용됨), RNA 또는 RNA:DNA 하이브리드이다. 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함한다. 유사하게, 이중 가닥 화합물은 DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA이고, 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함한다. 핵산 화합물은 골격(뉴클레오티드내 연쇄(interaucleotide linkage)를 비롯한, 자연 핵산에서 당-인산염 부분) 또는 염기 부분(자연 핵산의 퓨린 또는 피리미딘 부분)에 하나 이상의 변형을 비롯한 임의의 다양한 변형을 포함한다. 안티센스 핵산 화합물은 바람직하게는, 대략 15개 내지 대략 30개의 뉴클레오티드 길이를 갖고, 혈청에서, 세포에서, 또는 화합물이 전달될 가능성이 높은 위치, 예를 들면, 경구 전달된 화합물의 경우에 위와 흡입된 화합물의 경우에 폐에서 안정성과 같은 특성을 향상시키는 하나 이상의 변형을 종종 포함한다. RNAi 구조체의 경우에, 표적 전사체에 상보적인 가닥은 일반적으로, RNA 또는 이의 변형이다. 다른 가닥은 RNA, DNA 또는 임의의 다른 변형일 수 있다. 이중 가닥 또는 단일 가닥 “헤어핀” RNAi 구조체의 이중나선 부분은 일반적으로, 18개 내지 40개 뉴클레오티드 길이, 임의적으로, 대략 21개 내지 23개 뉴클레오티드 길이를 갖는데, 여기서 이는 Dicer 기질(substrate)로서 기능한다. 촉매 또는 효소 핵산은 리보자임 또는 DNA 효소이고, 변형된 형태 역시 포함된다. 핵산 화합물은 생리 조건하에 난센스(nonsense) 또는 센스(sense) 제어 가 거의 또는 전혀 영향을 주지 않는 농도에서 세포와 접촉할 때, 대략 50%, 75%, 90% 또는 그 이상으로 표적의

발현을 저해한다. 핵산 화합물의 효과를 검사하는데 선호되는 농도는 1, 5와 10 마이크로몰(micromolar)이다. 또한, 핵산 화합물은 예로써, 골 성장 및 광화에 대한 효과에 대하여 검사될 수 있다.

[0096] 5. 선별 검사

[0097] 특정 측면에서, 본 발명은 액티빈-ActRIIa 신호전달 경로의 항진물질 또는 길항물질인 화합물(작용제)을 확인하기 위한 ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)와 액티빈 폴리펩티드의 용도에 관계한다. 이러한 선별을 통하여 확인된 화합물은 생체내에서 또는 시험관내에서 골 성장 또는 광화를 조절하는 능력을 평가하도록 테스트될 수 있다. 선택적으로, 이들 화합물은 예로써, 동물 모형에서 *in vivo* 조직 성장을 조절하는 능력에 대해서 추가 검사될 수 있다.

[0098] 액티빈과 ActRIIa 폴리펩티드를 표적함으로써 조직 성장을 조절하는 치료제를 선별하는 다수의 접근법이 존재한다. 특정 구체예에서, 화합물의 고속 선별(high-throughput screening)은 골에 액티빈 또는 ActRIIa-매개된 효과를 교란시키는 작용제를 확인하기 위하여 수행될 수 있다. 특정 구체예에서, 이러한 검사는 액티빈에 대한 ActRIIa 폴리펩티드의 결합을 특이적으로 저해하거나 감소시키는 화합물을 선별하고 확인하기 위하여 수행된다. 대안으로, 상기 검사는 액티빈에 대한 ActRIIa 폴리펩티드의 결합을 강화시키는 화합물을 확인하는데 이용될 수 있다. 다른 구체예에서, 화합물은 액티빈, 또는 ActRIIa 폴리펩티드와 상호작용하는 능력으로 확인될 수 있다.

[0099] 다양한 검사 양식(assay format)이 만족스럽지만, 그럼에도 불구하고, 본 발명의 개시에 비추어, 본 명세서에서 명시되지 않은 것들 역시 당업자에 의해 이해될 것이다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 본 발명의 검사 화합물(작용제)은 임의의 조합 화학 방법(combinatorial chemical method)으로 만들어질 수 있다. 대안으로, 본 발명의 화합물은 생체내에서 또는 시험관내에서 합성된 자연 발생 생물분자이다. 조직 성장의 조절인자(modulator)로서 기능하는 능력에 대하여 검사되는 화합물(작용제)은 예로써, 세균, 효모, 식물 또는 다른 생물체에 의해 생산되거나(가령, 자연 산물), 화학적으로 생산되거나(가령, 펩티드모방체(peptidomimetic)를 비롯한 소형 분자), 또는 재조합 방식으로 생산될 수 있다. 본 발명에서 고려되는 검사 화합물에는 비-펩티딜 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드모방체, 당, 호르몬, 핵산 분자 등이 포함된다. 특정 구체예에서, 검사 작용제는 대략 2,000 달톤(dalton) 이하의 분자량(molecular weight)을 보유하는 소형 유기 분자다.

[0100] 본 발명의 검사 화합물은 단일의 구별된 존재로서 제공되거나, 또는 예로써, 조합 화학(combinatorial chemistry)으로 만들어진 더욱 복잡한 라이브러리에 담겨 제공될 수 있다. 이들 라이브러리는 예로써, 알코올, 알킬 할라이드, 아민, 아마이드, 에스테르, 알데히드, 에테르 및 다른 종류의 유기 화합물을 포함할 수 있다. 검사 시스템에 검사 화합물의 제공은 특히, 최초 선별 단계에서 분리된 형태로 또는 화합물의 혼합물로서 달성될 수 있다. 임의적으로, 화합물은 다른 화합물로 임의적으로 유도체화되고, 화합물의 분리를 용이하게 하는 유도체화 기(derivatizing group)를 보유한다. 유도체화 기의 무제한적 실례에는 비오틴(biotin), 플루오레세인(fluorescein), 디곡시제닌(digoxigenin), 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein), 동위원소(isotope), 폴리히스티딘(polyhistidine), 자성 비드(magnetic beads), 글루타티온 S 전달효소(glutathione S transferase, GST), 광활성화가능 가교제(photoactivatable crosslinker) 또는 이들의 조합이 포함된다.

[0101] 화합물과 천연 추출물의 라이브러리를 검사하는 많은 약물 선별 프로그램에서, 정해진 기간 내에 조사되는 화합물의 수를 극대화시키기 위하여 고속 분석법이 바람직하다. 정제된 또는 반-정제된 단백질로 유도된 것과 같은 세포-없는 시스템에서 수행되는 분석법은 종종, “일차” 스크린으로서 선호되는데, 그 이유는 이들이 검사 화합물에 의해 매개되는 분자 표적(molecular target) 내에서 변형의 신속한 발생과 상대적으로 용이한 검출을 가능하도록 산출될 수 있기 때문이다. 게다가, 검사 화합물의 세포 독성 또는 생체이용효율(bioavailability)의 효과는 시험관내 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있는데, 이러한 분석법은 그 대신에, ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 결합 친화성의 변형으로 확인되는, 분자 표적에 대한 약제의 효과에 일차적으로 집중한다.

[0102] 예로써, 본 발명의 전형적인 선별 검사에서, 목적 화합물은 액티빈에 통상적으로 결합할 수 있는 분리되고 정제된 ActRIIa 폴리펩티드와 접촉한다. 이후, 상기 화합물과 ActRIIa 폴리펩티드의 혼합물에 ActRIIa 리간드를 함유하는 조성물이 추가된다. ActRIIa/액티빈 복합체의 검출과 정량은 ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 복합체 형성을 저해하는(또는 강화하는) 화합물의 효능을 결정하는 수단을 제공한다. 화합물의 효능은 다양한 농도의 검사 화합물을 이용하여 획득된 데이터로부터 약량 반응 곡선(dose response curve)을 산출함으로써 평가할 수 있다. 게다가, 비교를 위한 기준선(baseline)을 제공하기 위하여 대조 분석(control assay) 역시 수행될 수 있다. 가령, 대조 분석에서, 분리되고 정제된 액티빈이 ActRIIa 폴리펩티드를 함유하는 조성물에 추가되고, ActRIIa/액티빈 복합체의 형성이 검사 화합물의 부재 하에 정량된다. 일반적으로, 반응물이 혼합되는 순서는 변경될 수 있고, 동시에 혼합될 수 있다. 게다가, 적절한 세포-없는 분석 시스템을 제공하기 위하여 정제된 단백질

질 대신에, 세포 추출물과 용해물(lysate)이 이용될 수도 있다.

- [0103] ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 복합체 형성은 다양한 기술로 검출될 수 있다. 가령, 복합체 형성의 조절은 예로써, 검출가능하게 표지된 단백질, 예를 들면, 방사성표지된(가령, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C 또는 ³H), 형광 표지된(가령, FITC), 또는 효소 표지된 ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈을 이용하여, 면역분석(immunoassay)에 의해, 또는 크로마토그래피 검출(chromatographic detection)에 의해 정량될 수 있다.
- [0104] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 상호작용 정도를 직접적으로 또는 간접적으로 측정하는데 있어 형광 편광(fluorescence polarization) 분석 및 형광 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 분석의 이용을 고려한다. 더 나아가, 광도파(optical waveguide)(PCT Publication WO 96/26432; U.S. Pat. No. 5,677,196), 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR), 표면 전하 센서(surface charge sensor), 그리고 표면 포스 센서(surface force sensor)에 기초한 것들과 같은 다른 검출 양식이 본 발명의 다수 구체예에 적합하다.
- [0105] 게다가, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 상호작용을 파괴하거나 강화시키는 작용제를 확인하기 위한, “이중 하이브리드 분석(two hybrid assay)”으로 알려져 있는 상호작용 트랩 분석(interaction trap assay)의 이용을 고려한다(참조: U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 상호작용을 분리시키는 화합물(가령, 소형 분자 또는 펩티드)을 확인하는 역 이중 하이브리드 시스템(reverse two hybrid system)의 이용을 고려한다(참조: Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; U.S. Pat. No. 5,525,490; 5,955,280; 5,965,368).
- [0106] 특정 구체예에서, 본 발명의 화합물은 본 발명의 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드와 상호작용하는 능력으로 확인된다. 상기 화합물과 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드 사이에 상호작용은 공유 또는 비-공유이다. 가령, 이런 상호작용은 광-가교연결(photo-crosslinking), 방사성표지된 리간드 결합, 그리고 친화성 크로마토그래피를 비롯한 시험관내 생화학적 방법을 이용하여 단백질 수준에서 확인될 수 있다(Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). 특정 사례에서, 이들 화합물은 기전 기초된 분석(mechanism based assay), 예를 들면, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 검출하는 분석에서 선별된다. 이는 고체상(solid phase) 또는 액체상(fluid phase) 결합 현상을 포함할 수 있다. 대안으로, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자는 리포터 시스템(가령, β-갈락토시다아제, 루시페라제, 또는 녹색 형광 단백질)으로 세포 내로 형질감염되고, 임의적으로 고속 선별에 의해 라이브러리에 대하여 또는 상기 라이브러리의 개별 구성원으로 선별된다. 다른 기전 기초된 결합 분석, 예를 들면, 자유 에너지(free energy)에서 변화를 검출하는 결합 분석이 이용될 수도 있다. 결합 분석은 웰, 비드 또는 칩에 고정되거나, 고정된 항체에 의해 포획되거나, 또는 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)에 의해 분해된 표적으로 수행될 수 있다. 결합된 화합물은 통상적으로, 비색(colorimetric) 또는 형광 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 검출된다.
- [0107] 특정 측면에서 본 발명은 골 형성 및 골량을 조절(자극 또는 저해)하는 방법 및 그 물질들을 제공한다. 따라서, 확인된 임의 화합물은 *in vitro* 또는 *in vivo* 전체 세포 또는 조직에서 골생장 또는 광화를 조절하는 능력이 있는지를 확인하는 테스트를 받을 수 있다. 이와 같은 목적으로 당분야에 공지된 다양한 방법들이 이용될 수 있다.
- [0108] 예를 들면, 골 또는 연골 성장에서 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드의 효과는 세포계 검사에서 골형성세포로 골-전구세포(osteoprogenitor cell)의 분화 Msx2의 유도를 측정함으로써 결정될 수 있다(see, e.g., Daluiski et al., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino et al., Front Biosci. 2004, 9:1520-9). 세포계 검사의 또 다른 예로는 당해 간엽전구세포 및 골형성 세포에서 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드와 테스트 화합물의 골형성 활성을 분석하는 것이 포함된다. 설명을 위해, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드를 발현시키는 재조합 아데노바이러스를 작제하여 만능(pluripotent) 간엽 전구세포 C3H10T1/2 세포, 전골형성세포 C2C12, 및 골형성세포 TE-85 세포를 감염시켰다. 골형성 활성은 알카리 포스포타제, 오스테오칼신 및 매트릭스 미네랄화의 유도를 측정함으로써 결정된다(see, e.g., Cheng et al., J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52).
- [0109] 본 발명은 또한 골 또는 연골 성장을 측정하는 *in vivo* 검사를 고려한다. 예를 들면, Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001)는 골절후 초기 기간 동안 골 재생을 연구한 쥐 골다공증 모델을 설명한다. Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999)는 또한 골절후 후기 동안 골 재생을 연구

한 생쥐 골다공증 모델을 설명한다. Andersson et al., J. Endocrinol. 170:529-537는 생쥐에서 난소제거하여 생쥐가 골 미네랄 밀도의 대략 50%를 상실한 지주골을 가지는 실질적으로 골 미네랄 함량 및 골 밀도 상실하도록 된 생쥐 골다공증 모델을 설명하였다. 난소제거된 생쥐에서 골 밀도는 부갑상선 호르몬과 같은 인자들을 투여함으로써 증가시킬 수 있다. 특정 측면에서, 본 발명은 당업자에 공지된 골절 치유 검사를 이용한다. 이들 검사에는 골절 기술, 조직학적 검사 및 생역학 분석 등이 포함되는데, 예를 들면, U.S. Pat. No. 6,521,750에서는 골절의 원인 뿐만 아니라 그 정도, 재생 과정에 관한 실험 프로토콜을 설명한다.

[0110] 6. 전형적인 치료 용도

[0111] 특정 구체예에서, 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항물질(가령, ActRIIa 폴리펩티드)은 부러짐, 손실 또는 탈광화 등의 골 손상과 연관된 질환 또는 이상을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있을 것이다. 여기에서 설명된 것과 같이, 액티빈-ActRIIa 길항물질, 특히 ActRIIa-Fc 구조는 암-관련된 골 손실을 치료 또는 예방하는데 효과적이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 액티빈-ActRIIa 길항물질, 특히, ActRIIa 폴리펩티드의 치료 효과량을 필요 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 골 손상을 치료하거나 예방하는 방법을 제시한다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 액티빈-ActRIIa 길항물질, 특히, ActRIIa 폴리펩티드의 치료 효과량을 필요 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 골 성장 또는 광화를 촉진하는 방법을 제시한다. 이들 방법은 포유동물, 특히, 인간의 치료적 처치와 예방적 처치에 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 명세서에서는 액티빈-ActRIIa 길항물질(특히 가용성 ActRIIa 폴리펩티드 및 액티빈 또는 ActRIIa를 표적화하는 중화 항체)를 낮은 골 밀도 또는 골 강도가 감소된 것과 연관된 질환 치료에 이용하는 용도를 제공한다.

[0112] 본 명세서에서, 질환이나 이상을 “예방” 하는 치료제는 통계학적 표본(statistical sample)에서, 처리되지 않은 대조 표본과 비교하여 처리된 표본에서 질환이나 이상의 발생률(occurrence)을 감소시키거나, 또는 처리되지 않은 대조 표본과 비교하여 이러한 질환이나 이상의 발병을 지연시키거나 상기 질환이나 이상의 한가지 이상의 증상의 심각도(severity)를 감소시키는 화합물을 지칭한다. 본 명세서에서, “치료”는 지명된 이상의 예방, 또는 확립된 이상의 완화 또는 제거를 포괄한다. 어느 경우든, 예방 또는 치료는 의사 또는 다른 건강관리 제공자에 의해 제공된 진단 및 치료제 투여의 의도된 결과에서 구별될 수 있다.

[0113] 본 명세서에서는 골 및/또는 연골 형성을 유도하고, 골 손실을 예방하고, 골 광화를 증가시키거나 골의 탈광화를 방지하는 방법들을 제공한다. 예를 들면, 본 액티빈-ActRIIa 길항물질은 사람 및 다른 동물들에서 골 다공증 치료, 골 골절의 치유 및 연골 결함 치료에 용도를 가진다. ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드는 골 다공증 발생에 대한 보호 측도로써 부임상적으로 낮은 골 밀도로 진단된 환자들에서 유용할 수 있다.

[0114] 한 특정 구체예에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 사람 및 다른 동물들에서 골 골절 및 연골 결함에 의학적 용도를 발견할 수 있을 것이다. 본 발명의 방법 및 조성물은 단힌 골절 및 개방 골절 감소에 예방학적 용도, 그리고 인공 관절의 고정 개선에 예방학적 용도를 가질 수 있다. 골형성 물질에 의해 유도된 처음(De novo) 골 형성은 본태성, 외상-유도된 또는 종양학적 절개로 유도된 안면 결함의 치료에 기여하며, 그리고 성형외과술에도 유용할 것이다. 특정 경우에, 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항물질은 골-형성 세포들을 유인하고, 골-형성 세포들의 성장을 촉진시키거나 골-형성 세포의 조상물질의 분화를 유도하는 환경을 제공할 수 있다. 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항물질은 골 다공증 치료에 유용할 것이다. 본 발명의 방법 및 조성물을 골다공증(2차 골다공증 포함), 부갑상선기능항진증(hyperparathyroidism), Cushing 질환, Paget 질환, 갑상샘중독증(thyrototoxicosis), 만성 설사 상태 또는 흡수불량(malabsorption), 신세뇨관성 산증(renal tubular acidosis), 또는 신경성 식욕 감퇴와 같은 골 손실에 의한 또는 이의 원인이 되는 질환에 이용할 수 있을 것이다.

[0115] 골다공증은 다양한 요인들에 의해 발생되거나 연관될 수 있다. 여성, 특히 폐경기 여성, 체중이 적게 나가는 여성의 경우, 그리고 주로 앉아서 생활하는 경우 등은 모두 골다공증(골 미네랄 밀도의 손실, 골절 위험 유도)의 위험 인자들이다. 다음의 프로파일 중 임의의 것을 가지는 사람은 ActRIIa 길항물질 치료에 후보자가 될 수 있다: 에스트로겐을 복용하지 않거나 또는 다른 호르몬 대체요법을 받지 않는 폐경기 여성; 본인 또는 모계에서 영당이 골절 또는 흡연력이 있는 자; 키가 크거나(5피트7인치 이상) 또는 야윈(125파운드 미만) 폐경기 여성; 골 손실과 연관된 임상적 이상을 가진 남성; 골 손실의 원인으로 알려진 약물 예를 들면, Prednisone™와 같은 코르티코스테로이드계, Dilantin™ 와 같은 다양한 항-발작제 약물, 그리고 특정 바르비투르산염(barbiturates), 또는 고약량의 타이로이드 대체 약물을 포함한 약물을 이용한 자; 타입 I 당뇨병, 신장 질환 또는 골다공증 가족력을 가진 자; 높은 골교체(bone turnover)(가령, 뇨 샘플에서 과도한 콜라겐)를 가진 자; 갑상선항진증과 같은 갑상선 질환을 가진 자; 경미한 외상후에 골절을 경험한 적이 있는 자; 척추 골절 또는 다른 골다공증 징후가 x-선 사진으로 나타난 자.

[0116] 상기에서 언급한 바와 같이, 골다공증은 또 다른 질환과 연관된 질환의 결과이거나 또는 특정 약물의 사용으로 결과될 수 있다. 약물 또는 다른 의학적 이상으로 인한 골다공증을 이차성 골다공증이라 한다. Cushing 질환으로 알려진 상태에서, 신체에 의해 생산되는 코르티솔의 과량이 골다공증 및 골절을 결과한다. 이차 골다공증과 연관된 가장 흔한 약물이 코르티코스테로이드로써, 아드레날린에 의해 자연적으로 생산되는 호르몬인 코르티솔과 같은 작용을 하는 약물류이다. 적절한 수준의 갑상선 호르몬(갑상선에 의해 생산됨)은 골격근 발생에 필수적이나, 과량의 갑상선 호르몬은 시간이 경과함에 따라 골량을 감소시킬 수 있다. 신장에 문제가 있는 사람, 특히 투석을 하는 사람이 알루미늄을 포함하는 제산제를 과량으로 복용하면 골량이 감소된다. 2차성 골다공증의 원인이 되는 다른 약물에는 발작을 예방하는데 이용되는 페니토인(Dilantin)과 바르비투르산염; 관절염, 암 및 면역 질환용 약물인 메토틱세이트(methotrexate)(Rheumatrex, Immunex, Folex PFS); 일부 자가면역 질환 치료 및 기관 이식 환자에서 면역계를 억제하는데 이용되는 약물인 사이클로스포린(cyclosporine)(Sandimmune, Neoral); 전립선 암 및 자궁내막증을 치료하는데 이용되는 황체화호르몬-방출 호르몬 항진제(Lupron, Zoladex); 항-응혈 약물인 헤파린(Calciparine, Liquaemin); 그리고 고콜레스테롤을 치료하는데 이용되는 콜레스티라민(Questran) 및 콜레스티폴(Colestid)이 포함된다. 암 요법으로 인한 골 손실이 광범위하게 인지되고 있으며, 이를 암 요법에 의해 유도된 골 손실(CTIBL: cancer therapy induced bone loss)이라고 한다. 골 전이는 골에 구멍을 만드는데, 이는 액티빈-ActRIIa 길항물질 치료로 교정될 수 있을 것이다.

[0117] 적절한 구체예에서, 여기에서 설명된 액티빈-ActRIIa 길항물질, 특히 가용성 ActRIIa은 암 환자에 이용될 수 있을 것이다. 특정 종양(가령, 전립선, 유방, 다발 골수종 또는 부갑상선기능항진증의 원인이 되는 임의 종양)을 가진 환자들이 종양 유도된 골 손실 뿐만 아니라, 골 전이 및 치료제로 인한 골 손실 위험이 높다. 이와 같은 환자들은 골 손실 또는 골 전이 증거가 없더라도 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료할 수 있다. 골 손실 또는 골 전이에 대한 증거를 위해 환자를 모니터링할 수도 있고, 표지 물질로 위험이 증가되었음을 제시하는 경우에, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료할 수도 있다. 일반적으로, DEXA 스캔을 이용하여 골 밀도에 변화를 측정하고, 골 재구성 표지물질들을 이용하여 골 전이 가능성을 평가할 수 있다. 혈청 표지물질들을 모니터링할 수도 있다. 골 특이적인 알칼리 포스포타제(BSAP)는 골 형성세포에 존재하는 효소이다. BSAP의 혈액 수준은 골 전이 및 골 재구성의 증가를 결과하는 다른 질환이 있는 환자들에서 증가된다. 오스테오칼신 및 프로콜라겐 펩티드 또한 골 형성 및 골 전이와 연관있다. 전립선 암으로 인한 골 전이가 있는 환자 및 다소 정도는 약하지만, 유방암으로 인한 골 전이가 있는 환자에서 BSAP가 증가되었음을 확인하였다. 골 형성 단백질-7 (BMP-7) 수준은 골로 전이된 전립선 환자에서는 높으나, 방광, 피부, 간 또는 폐암으로 인한 골 전이에서는 높지 않다. 타입 I 카르복시-말단 텔로펩티드(ICTP)는 골 재흡수동안에 형성되는 콜라겐에서 발견되는 교차결합(crosslink)이다. 골은 항상 분해되고 재형성되기 때문에, ICTP는 전신을 통하여 발견될 수 있다. 그러나, 골 전이 부위에서, 그 수준은 정상 골에서보다 상당히 더 높을 것이다. 전립선, 폐, 그리고 유방암으로 인한 골 전이에서는 높은 수준의 ICTP가 발견되었다. 또 다른 콜라겐 교차 결합인 타입 I N-말단 텔로펩티드(NTx)는 골교체동안에 ICTP와 함께 만들어진다. 폐, 전립선 및 유방암을 포함하는 상이한 많은 타입의 암으로 인한 골 전이에서 NTx의 양이 증가된다. 또한, NTx의 수준은 골 전이의 진행과 함께 증가된다. 따라서, 이와 같은 표지물질들을 이용하여 전이의 감지뿐만 아니라 질병의 정도를 측정할 수 있을 것이다. 재흡수의 또 다른 표지물질에는 피리디노린(pyridinoline)과 데옥시피리디노린(deoxypyridinoline)이 포함된다. 재흡수 표지물질의 임의 증가 또는 골 전이의 표지물질의 임의 증가는 환자에서 액티빈-ActRIIa 길항물질 요법이 필요하다는 것을 나타낸다.

[0118] 액티빈-ActRIIa 길항물질을 다른 약물과 연합하여 투여할 수 있다. 연합 투여(Conjoint administration)는 단일 공동-조제(single co-formulation), 동시 투여 또는 별도의 시간에 투여 등으로 이루어질 수 있을 것이다. 액티빈-ActRIIa 길항물질은 다른 골-활성 성분들과 함께 투여할 때 특히 유익할 것이다. 환자는 액티빈-ActRIIa 길항물질과 칼슘 보충제, 비타민 D, 적절한 운동 및/또는 일부 경우에는 다른 약물을 함께 제공받을 경우 잇점을 얻을 것이다. 다른 약물의 예를 들면, 비스포스포네이트(알렌드로네이트, 이반드로네이트 및 리세드로네이트), 칼시토닌, 에스트로겐, 부갑상선 호르몬 및 탈옥시펜이 포함된다. 비스포스포네이트(알렌드로네이트, 이반드로네이트 및 리세드로네이트), 칼시토닌, 에스트로겐 및 탈옥시펜이 골 재구성 사이클에 영향을 주로, 이들은 항흡수성 약물로 분류된다. 골 재구성은 두 개의 별개 단계로 구성된다: 골 재흡수 및 골 형성. 항흡수성 약물은 골 재구성 사이클의 골-재흡수 부분을 늦추거나 중단시키나 사이클의 골 형성 부분을 늦추지는 않는다. 그 결과, 골 재흡수보다는 더 큰 비율로 새로운 골가 지속적으로 형성되고, 골 밀도는 시간의 경과에 따라 증가될 수 있다. 부갑상선 호르몬의 한 형태인 테리파라타이드(Teriparatide)는 골 재구성 사이클에서 골 형성 속도를 증가시킨다. 알렌드로네이트(Alendronate)는 폐경기 골다공증의 예방(일일 5mg 또는 1주 1회 35mg) 및 치료(일일 10mg 또는 1주 1회 70mg)에 사용 승인받았다. 알렌드로네이트는 골 손실을 감소시키고, 골 밀도를 증가시키고, 척추, 손목 및 엉덩이 골절 위험을 감소시킨다. 알렌드로네이트는 또한 장기 약물 복용(예를 들면, 프레드

니손 및 코르티손)으로 인하여 결과된 남녀에 글루코코르티코이드-유도된 골다공증 치료 및 남성의 골다공증 치료에 사용 승인받았다. 알렌드로네이트와 비타민 D는 폐경기 여성의 골다공증 치료(비타민 D와 함께 1주일 1회 70mg)에 사용 승인받았고, 골다공증이 있는 남성에게 골량 개선 치료에 사용 승인받았다. 이반드로네이트(Ibandronate)는 폐경기 골다공증 예방 및 치료에 사용 승인받았다. 1달에 한 알(150mg)을 복용하는데, 이반드로네이트는 매일 동일한 날에 복용해야만 한다. 이반드로네이트는 골 손실을 감소시키고, 골 밀도를 증가시키고, 척추 골절 위험을 감소시킨다. 리세드로네이트(Risedronate)는 폐경기 여성 골다공증 치료 및 예방에 사용 승인받았다. 매일(5mg 약량) 또는 매주(35mg 또는 35mg+칼슘) 복용하면, 리세드로네이트는 골 손실을 감소시키고, 골 밀도를 증가시키고, 척추 및 비-척추 골절 위험을 감소시킨다. 리세드로네이트는 또한 장기 약물 복용(예를 들면, 프레드니손 및 코르티손)으로 인하여 결과된 남녀에 글루코코르티코이드-유도된 골다공증 치료 및/예방에도 사용 승인받았다. 칼시토닌은 칼슘 조절 및 골 대사에 관여하는 자연 발생 호르몬이다. 월경이 중지된 후 5년 이상이 된 여성에서 칼시토닌은 골 손실을 늦추고, 척추 골 밀도를 증가시키고, 골 골절과 연관된 통증을 완화시킬 수 있다. 칼시토닌은 척추 골절 위험을 감소시킨다. 칼시토닌은 주사(일일 50-100 IU) 또는 비강 분무(매일 200 IU)로 이용할 수 있다. 에스트로겐 요법(ET)/호르몬 요법 (HT)도 골다공증 예방에 승인된다. ET는 폐경기 여성에서 골 손실을 감소시키고, 척추 및 엉덩이 모두에서 골밀도를 증가시키고, 엉덩이 및 척추 골절 위험을 감소시킨다. ET는 가장 흔하게는 알약으로 또는 매일 0.3mg의 낮은 약량 또는 매일 약 0.625mg의 표준 약량을 운반하는 피부 패취로 투여될 수 있고, 70세 이후에 시작해도 효과가 있다. 에스트로겐만 취하는 경우, 여성의 자궁내막(endometrial cancer) 암 발생 위험이 증가될 수 있다. 이와 같은 위험을 감소시키기 위해, 건강관리자는 고유 자궁을 보유하는 여성의 경우, 에스트로겐과 복합하여 프로게스테론 호르몬(호르몬 대체 요법 또는 HT)을 처방한다. ET/HT는 폐경 증후를 완화시키고, 골 건강에도 유익한 효과를 가지는 것으로 나타났다. 부작용에는 질 출혈, 유방의 유연함 및 기분장애(mood disturbances) 및 당뇨병이 포함된다. 탈옥시펜(Raloxifene), 1일 60 mg은 폐경기 골다공증 치료 및 예방에 승인된 것이다. 이것은 잠재적인 단점없이 에스트로겐의 유익한 효과를 제공하기 위해 개발된 선택성 에스트로겐 수용체 조절물질(SERMs)로 불리는 약물군이다. 탈옥시펜은 골량을 증가시키고, 척추 골절 위험을 감소시킨다. 탈옥시펜이 엉덩이 및 다른 비-척추 골절 위험을 감소시킬 수 있다는 것을 설명하는 데이터는 없다. 부갑상선 호르몬의 한 형태인 테리파라타이드(Teriparatide)는 폐경기 여성 및 골절 위험이 있는 남성에서 골다공증 치료로 승인되었다. 이 약물은 새로운 골 형성을 자극하고 골 미네랄 밀도를 상당히 증가시킨다. 폐경기 여성에서 척추, 엉덩이, 발, 늑골 및 손목에서 골절이 감소되었으나 다른 부위들에서 골절 감소를 평가할만한 데이터는 충분하지 못하다. 테리파라타이드는 최대 24개월까지 매일 주사로 투여된다.

[0119] 7. 제약학적 조성물

[0120] 특정 구체예에서, 본 발명의 액티브-ActRIIa 길항물질(가령, ActRIIa 폴리펩티드)은 제약학적으로 허용되는 담체로 제제화된다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드는 단독으로, 또는 제약학적 제형(치료 조성물)의 한 성분으로서 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 의학 또는 수의학에 이용하기 편의한 방식으로 투여를 위하여 제제화된다.

[0121] 특정 구체예에서, 본 발명의 치료 방법은 이식물(implant) 또는 장치로서 전신적으로 또는 국소적으로 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 투여될 때, 본 발명에 이용되는 치료 조성물은 당연히, 발열원-없는, 생리학적 허용되는 형태를 취한다. 앞서 기술된 바와 같은 조성물에 임의적으로 포함되는, ActRIIa 길항물질 이외의 치료제는 본 발명의 방법에서, 본 발명의 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)과 동시에 또는 순차적으로 투여된다.

[0122] 전형적으로, ActRIIa 길항물질은 비경구(parental), 특히 정맥내 또는 피하내로 투여된다. 비경구 투여에 적합한 제약학적 조성물은 하나 이상의 제약으로 허용되는 무균 등장성 수용액이나 비-수용액, 분산액(dispersion), 현탁액(suspension)이나 에멀전(emulsion), 또는 사용 직전에 무균 주사가능 용액이나 분산액으로 재구성되는 무균 분말(sterile powder)과의 조합으로 하나 이상의 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하고, 항산화제(antioxidant), 완충제(buffer), 정균제(bacteriostat), 의도된 수용자의 혈액과 제형이 등장성이 되도록 하는 용질(solute), 현탁제, 또는 농후제(thickening agent)를 포함할 수 있다. 본 발명의 제약학적 조성물에 이용될 수 있는 적절한 수성과 비-수성 담체의 실례에는 물, 에탄올, 폴리올(가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)과 이들의 적절한 혼합물, 식물성 오일(vegetable oil)(가령, 올리브 오일(olive oil)), 그리고 주사가능 유기 에스테르(injectable organic ester)(가령, 올레인산에틸(ethyl oleate))가 포함된다. 적절한 유동성(fluidity)은 예로써, 레시틴(lecithin)과 같은 코팅 물질의 이용에 의하여, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의하여, 그리고 계면활성제의 이용에 의하여 유지될 수 있다.

[0123] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 표적 조직 부위(가령, 골)로의 전달을 위한 형태로 내포되거나 주입될 수 있다.

특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 치료 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)을 표적 조직 부위(가령, 골)로 전달할 수 있는 매트릭스(matrix)를 포함하는데, 이는 발달중인 조직에 대한 구조물을 제공하고 최적으로, 체내 재흡수될 수 있다. 가령, 매트릭스는 ActRII 폴리펩티드의 느린 방출(slow release)을 제공한다. 이런 매트릭스는 다른 이식된 의학 적용에 현재 이용되고 있는 물질로 형성될 수 있다.

[0124] 매트릭스 물질의 선택은 생체적합성(biocompatibility), 생물분해성(biodegradability), 기계적 특성, 미용적 외관(cosmetic appearance) 및 접촉면 특성(interface property)에 기초한다. 본 발명의 조성물의 특정 적용은 적절한 제형을 정의할 것이다. 이들 조성물에 적합한 잠재적인 매트릭스는 생물분해가능하고 화학적으로 정의된 황산칼슘(calcium sulfate), 트리칼슘포스페이트(tricalciumphosphate), 수산화인회석(hydroxyapatite), 폴리락트산(polylactic acid)과 폴리안하이드라이드(polyanhydride)이다. 다른 잠재적인 물질은 생물분해가능하고 생물학적으로 충분히 정의된 물질, 예를 들면, 골 또는 피부 콜라겐이다. 추가의 매트릭스는 순수한 단백질 또는 세포외 매트릭스 성분으로 구성된다. 다른 잠재적인 매트릭스는 생분해불가능하고 화학적으로 정의된 물질, 예를 들면, 소결된 수산화인회석(sintered hydroxyapatite), 생체유리(bioglass), 알루미늄산염(aluminate), 또는 다른 세라믹이다. 매트릭스는 앞서 언급된 유형의 물질의 조합, 예를 들면, 폴리락트산과 수산화인회석, 또는 콜라겐과 트리칼슘포스페이트로 구성될 수도 있다. 생체세라믹(bioceramic)은 칼슘-알루미늄산염-인산염(calcium-aluminate-phosphate)에서 처럼 조성(composition), 그리고 구멍 크기, 입자 크기, 입자 형태와 생물분해성(biodegradability)을 변경하는 가공(processing)에서 변경될 수 있다.

[0125] 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 예로써, 캡슐, 교갑(cachet), 알약(pill), 정제(tablet), 마름모꼴 정제(lozenge)(방향성 기부(flavored basis), 통상적으로, 수크로오스(sucrose)와 아카시아(acacia) 또는 트랜거캔스(tragacanth) 이용), 분말, 과립, 또는 수용성이나 비-수용성 액체에 녹인 용액이나 현탁액, 또는 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 액체 에멀전, 또는 엘릭시르 또는 시럽, 또는 향정(pastille)(불활성 기부(inert base), 예를 들면, 젤라틴(gelatin)과 글리세린(glycerin), 또는 수크로오스와 아카시아 이용) 및/또는 구강세정제(mouth wash) 등의 형태로 경구 투여될 수 있는데, 이들 각각은 미리 결정된 양의 작용제를 활성 성분으로 함유한다. 작용제는 거환약(bolus), 연질약(electuary) 또는 페이스트(paste)로 투여될 수도 있다.

[0126] 경구 투여용 고형 약형(캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 본 발명의 하나 이상의 치료 화합물은 한가지이상의 제약학적으로 허용되는 담체, 예를 들면, 구연산나트륨 또는 이인산칼슘 및/또는 (1) 충전제 또는 증량제, 예를 들면, 전분, 락토오스, 수크로오스, 글루코오스, 만니톨, 또는 규산; (2) 접착제, 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로오스, 또는 아카시아; (3) 습윤제, 예를 들면, 글리세롤; (4) 붕해제, 예를 들면, 아가-아가, 탄산칼슘, 감자나 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 또는 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예를 들면, 과립판; (6) 흡수 가속화제, 예를 들면, 4급 암모늄 화합물; (7) 보습제, 예를 들면, 세틸 알코올과 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예를 들면, 고령토와 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예를 들면, 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 소듐라우릴 설페이트, 또는 이들의 혼합물; (10) 착색제와 혼합된다. 캡슐, 정제와 알약의 경우에, 제약학적 조성물은 완충제를 함유할 수도 있다. 유사한 유형의 고형 조성물은 또한, 락토오스 또는 유당과 같은 부형제 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용한 연성과 경성-충진된 젤라틴 캡슐에서 충전제로 사용될 수 있다.

[0127] 경구 투여용 액체 제형에는 제약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽과 엘릭시르가 포함된다. 활성 성분 이외에, 액체 제형은 당분야에 통상적으로 이용되는 불활성 희석제, 예를 들면, 물 또는 다른 용매, 용해제(solubilizing agent)와 유화제(emulsifier), 예를 들면, 에틸 알코올(ethyl alcohol), 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 에틸 카보네이트(ethyl carbonate), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 벤질 알코올(benzyl alcohol), 벤질 벤조에이트(benzyl benzoate), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 점(germ), 올리브, 피마자과 참깨 기름), 글리세롤(glycerol), 테트라하이드로푸릴 알코올(tetrahydrofuryl alcohol), 소르비탄의 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 지방산 에스테르(fatty acid ester), 또는 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 습윤제, 유화제와 현탁제, 감미료, 조미료, 착색제, 방향제, 보존제 등과 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다.

[0128] 현탁액은 활성 화합물 이외에, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올(ethoxylated isostearyl alcohol), 폴리옥시에틸렌 소르비톨(polyoxyethylene sorbitol)과 소르비탄 에스테르(sorbitan ester), 미세결정성 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 알루미늄 메타하이드록시드(aluminum metahydroxide), 벤토나이트(bentonite),

아가-아가(agar-agar)와 트랜거캔스(tragacanth), 이들의 혼합물 등과 같은 현탁제를 함유할 수 있다.

- [0129] 본 발명의 조성물은 또한, 보존제, 습윤제, 유화제와 분산제(dispersing agent)와 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다. 미생물의 작용 예방은 다양한 항균제와 항진균제, 예를 들면, 파라벤(paraben), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀 소르빈산(phenol sorbic acid) 등의 내포에 의해 담보될 수 있다. 또한, 등장성제(isotonic agent), 예를 들면, 당, 염화나트륨 등을 조성물 내로 포함시키는 것이 바람직하다. 이에 더하여, 주사가능 제약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면, 스테아린산알루미늄(aluminum monostearate)과 젤라틴의 내포로 달성될 수 있다.
- [0130] 투약 섭생(dosage regimen)은 본 발명의 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)의 작용을 변화시키는 다양한 인자를 고려하여 담당 의사에 의해 결정될 것이다. 다양한 인자에는 환자의 적혈구 수, 헤모글로빈 수준 또는 다른 진단 척도, 원하는 표적 적혈구 수, 환자의 연령, 성별과 식이, 감소된 적혈구 수준의 원인이 되는 질환의 심각도, 투여 기간, 그리고 다른 임상 인자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 최종 조성물에 다른 공지의 성장인자의 추가가 약량에 영향을 줄 수 있다. 진행 과정은 골 성장 및/또는 복구를 주기적으로 평가하는데 예를 들면, X-선(DEXA 포함), 조직형태학적 평가 및 테트라사이클린 라벨링으로 모니터링될 수 있다.
- [0131] 영장류와 인간으로 실험으로 골에 ActRIIa-Fc의 효과는 0.3mg/kg의 약량 또는 곡면 아래 면적으로 이에 등가인 약량에서 발생하는 동화성 골 생체표식의 반값의 최대(half-maximal) 효과와 함께 대략 200 ng/ml 이상의 혈청 농도를 달성할 만큼 충분한 간격과 양으로 투약될 때, 검출될 수 있음을 증명한다. 사람에게서, 0.1mg/kg 또는 그 이상의 단일 약량으로 200ng/ml 혈청 수준을 얻을 수 있으며, 0.3mg/kg 또는 그 이상의 단일 약량으로 1000ng/ml 혈청 수준을 얻을 수 있을 것이다. 이 분자의 관측된 혈청 반감기는 약 25 내지 35일로, 대부분 Fc 용합 단백질보다 실질적으로 더 길며, 따라서, 매주 또는 2주마다 약 0.05 내지 0.5mg/kg의 약량으로 지속되는 효과적인 혈청 수준을 얻을 수 있고, 또는 이들 약량 범위에서 더 긴 간격과 더 높은 약량을 이용할 수 있을 것이다. 예를 들면, 0.1mg/kg, 0.3mg/kg, 0.5mg/kg, 0.7mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg 또는 3mg/kg 또는 이들 범위내 약량으로 매달 또는 두달간격으로 이용될 수 있을 것이고, 투약이 매 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 더 많은 개월마다 한번씩만 해도 골에 주는 효과가 충분히 지속적일 수 있다. 이들 투약량 범위내에 더 긴 투약 주기는 혈청에서 약물이 지속되는 것보다 더 긴 약동학적(pharmacodynamic) 효과의 지속에 의해 추가적으로 뒷받침된다. 환자가 사람인 경우, PD 효과는 최소 120일간 관찰된다.
- [0132] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드의 생체내 생산을 위한 유전자 요법도 제시한다. 이런 요법은 앞서 열거된 바와 같은 질환을 나타내는 세포 또는 조직 내로 ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 도입에 의해 치료 효과를 달성하게 된다. ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산 시스템과 같은 재조합 발현 벡터를 이용하여 달성될 수 있다. ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 치료적 전달(therapeutic delivery)에는 표적된 리포솜(liposome)의 이용이 바람직하다.
- [0133] 본 명세서에 교시된 바와 같이 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터에는 아데노바이러스(adenovirus), 포진 바이러스(herpes virus), 우두(vaccinia), 또는 레트로바이러스(retrovirus)와 같은 RNA 바이러스가 포함된다. 레트로바이러스 벡터는 뮤린 또는 조류 레트로바이러스의 유도체다. 단일 외래 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 실례에는 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV), Harvey 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스(MuMTV), 그리고 Rous 육종 바이러스(RSV)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다수의 부가적인 레트로바이러스 벡터는 복수 유전자를 통합할 수 있다. 이들 모든 벡터는 형질도입된 세포가 확인되고 산출될 수 있도록 선택가능 마커에 대한 유전자를 전달하거나 통합할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예로써, 당, 당지질(glycolipid), 또는 단백질을 부착함으로써 표적-특이적으로 만들어질 수 있다. 바람직한 표적화는 항체를 이용함으로써 달성된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특이적인 폴리뉴클레오티드 서열은 레트로바이러스 게놈 내로 삽입되거나, 또는 ActRIIa 폴리뉴클레오티드를 포함하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적인 전달을 가능하게 하는 바이러스 외피(viral envelope)에 부착될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 벡터는 골 또는 연골로 표적화된다.
- [0134] 대안으로, 조직 배양 세포는 통상적인 인산칼슘(calcium phosphate) 형질감염(transfection)에 의해, 레트로바이러스 구조 유전자 *gag*, *pol*과 *env*를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포는 이후, 목적 유전자를 포함하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성된 세포는 배양 배지내로 레트로바이러스 벡터를 방출한다.
- [0135] ActRIIa 폴리뉴클레오티드에 대한 다른 표적된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템에는 거대분자 복합체, 나노캡슐(nanocapsule), 마이크로캡슐(microsphere), 비드(bead), 그리고 지질-기초

된 시스템(가령, 수중유 에멀전, 미셀(micell), 혼합된 미셀, 리포솜 등)이 포함된다. 본 발명에서 바람직한 콜로이드성 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 시험관내와 생체내에서 전달 운반체(delivery vehicle)로서 유용한 인공 막 소포(membrane vesicle)이다. RNA, DNA와 원형 비리온(virion)은 수성 내부에 내포될 수 있고, 생물학적 활성 형태로 세포에 전달될 수 있다(참조: Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). 리포솜 소포를 이용한 효율적인 유전자 전달 방법은 당분야에 공지되어 있다(참조: Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988). 리포솜의 조성은 통상적으로, 스테로이드(steroid), 특히, 콜레스테롤(cholesterol)과 조합된 인지질(phospholipid)의 조합이다. 다른 인지질 또는 다른 지질 역시 이용될 수 있다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온 강도(ionic strength)와 이가 양이온(divalent cation)의 존재에 좌우된다.

[0136] 리포솜 생산에 유용한 지질의 실례에는 포스파티딜(phosphatidyl) 화합물, 예를 들면, 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol), 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 스펅고지질(sphingolipid), 세레브로시드(cerebroside) 및 강글리오시드(ganglioside)가 포함된다. 예시적인 인지질에는 난 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine), 그리고 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine)이 포함된다. 또한, 리포솜의 표적화는 예로써, 장기-특이성(organ-specificity), 세포-특이성(cell-specificity), 그리고 세포소기관-특이성(organelle-specificity)에 기초하고, 당분야에 공지되어 있다.

[0137] [실시예]

[0138] 본 발명은 앞서 전반적으로 기술되었고, 아래의 실시예를 참조하면 더욱 용이하게 이해될 수 있는데, 이들 실시예는 본 발명의 특정 구체예를 예시하는 목적으로 포함되고 본 발명을 한정하지 않는다.

[0139] **실시예 1: ActRIIa-Fc 융합 단백질**

[0140] 본 발명자들은 사이에 위치하는 최소 링커로 인간 또는 생쥐 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIa의 세포외 도메인을 포함하는 가용성 ActRIIa 융합 단백질을 작제하였다. 이들 구조체는 각각, ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc로 지칭된다.

[0141] CHO 세포주로부터 정제된 ActRIIa-hFc는 하기에 도시된다(SEQ ID NO: 7):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRITDCVEKDKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT
 PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSPVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALP
 VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPTPLDSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

[0142]

[0143] 여기서 ActRIIa-Fc 융합 단백질은 2개의 폴리펩티드로 형성된 이량체(dimer)이고, 각 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2, 3 또는 7의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 ActRIIa-Fc 융합 단백질은 3개 또는 그 이상의 시알산 모이어티(sialic acid moiety)를 포함한다. 또는, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:2의 최소 50개 연속(consecutive) 아미노산을 포함하는 폴리펩티드로 구성된다. 적절하게는, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 3개 내지 5개의 시알산 모이어티를 포함한다. 또는, 상기 이량체 펩티드중 한 개 또는 둘다 SEQ ID NO:7에 나타낸 것보다 아미노 또는 카르복시 말단에서 최소 한 개의 아미노산이 적다.

[0144] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3가지 상이한 리더(leader) 서열이 고려되었다:

[0145] (i) 꿀벌 멜리틴(mellitin)(HBML): MKFLVNVLFVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)

[0146] (ii) 조직 플라스미노겐 활성화인자(TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)

[0147] (iii) 고유: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).

[0148] 선택된 형태는 TPA 리더를 이용하고, 아래의 가공되지 않은 아미노산 서열을 보유한다:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCY
GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG
NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPK

[0149] DTLMSRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

[0150] 상기 폴리펩티드는 아래의 핵산 서열에 의해 인코딩된다:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
TCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTT
TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGT
ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
TTCCATTGAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAAACCTGCTATGACA
GGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGTA
GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
CCCACCTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGAACCTCACACAT
GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC
CCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

[0151] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 둘 모두 제조함 발현이 상당히 용이하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 상기 단백질은 완전하게 규정된 단일 피크로서 정화되었다. N-말단 염기서열분석에서, -ILGRSETQE의 단일 서열(SEQ ID NO: 11)이 밝혀졌다. 정제는 예로써, 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피 중에서 임의의 순서로, 3가지 또는 그 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계에 의해 달성될 수 있다. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. ActRIIa-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 측정에서 >98%, 그리고 SDS PAGE에 의한 측정에서 >95%의 순도로 정제하였다.

[0152] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc는 리간드, 특히, 액티빈 A에 대한 높은 친화성을 보였다. GDF-11 또는 액티빈 A("ActA")는 표준 아민 결합 절차(standard amine coupling procedure)를 이용하여 Biacore CM5 칩에 고정시켰다. ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 상기 시스템으로 적하하고, 결합을 측정하였다. ActRIIa-hFc는 5×10^{12} 의 해리 상수(dissociation constant, K_D)로 액티빈에 결합하고, 상기 단백질은 9.96×10^{-9} 의 K_D 로 GDF11에 결합하였다(도 2 참조). ActRIIa-mFc는 유사하게 행동하였다.

[0153] A-204 리포터 유전자 검사를 이용하여 GDF-11 및 액티빈 A에 의한 시그널링에 ActRIIa-hFc 단백질의 효과를 평가하였다. 세포주: 사람 Rhabdomyosarcoma (근육으로부터 유도). 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12 (Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091- 3100.) 도 3 참고. CAGA12 모티프는 TGF-Beta 반응성 유전자에 존재하여(PAI-I 유전자), 이와 같은 벡터는 일반적으로 Smad2와 3을 통한 시그널링 인자로 일반적으로 이용된다.

[0154] Day 1: 48-웰 플레이트상으로 A-204 세포를 나눔(split).

[0155] Day 2: $10 \mu\text{g}$ pGL3(CAGA)12 또는 $pGL3(CAGA) 12(10 \mu\text{g}) + pRLCMV (1 \mu\text{g})$ 및 Fugene으로 A-204 세포를 형질 감염시

김.

- [0158] Day 3: 인자 추가(배지+ 0.1 % BSA로 희석됨). 세포에 첨가하기 전 1시간 동안 인자들로 저해물질을 사전 항온 처리함. 6시간 후에, 세포를 PBS로 세척하고, 세포를 용해시킴.
- [0159] 그 다음 루시페라제 검사를 한다. 이와 같은 검사에서 일반적으로, 임의 저해물질 없이, 액티빈A는 리포터 유전자 발현을 10배 자극하는 것으로 나타났고, ED50 ~ 2 ng/ml이다. GDF-11: 16배 자극, ED50: ~ 1.5 ng/ml. GDF-8은 GDF-11과 유사한 효과를 가진다.
- [0160] 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc는 피크몰 농도에서 GDF-8 중개된 시그널링을 저해한다. 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 세 가지 상이한 농도로 준비된 ActRIIa-hFc 제제는 약 200pM의 IC₅₀으로 GDF-11의 시그널링을 저해하였다.
- [0161] ActRIIa-hFc는 약동학 연구에서 매우 안정하였다. 쥐는 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg의 ActRIIa-hFc 단백질을 투여하고, 24시간, 48시간, 72시간, 144시간과 168시간 시점에 상기 단백질의 혈장 수준을 측정하였다. 별도의 연구에서, 쥐는 1mg/kg, 10mg/kg 또는 30mg/kg을 투여하였다. 쥐에서, ActRIIa-hFc는 11-14일 혈청 반감기를 나타내고, 상기 약물의 순환 수준(circulating level)은 2주후 매우 높았다(1mg/kg, 10mg/kg 또는 30mg/kg의 최초 투여의 경우에 각각, 11 μ g/ml, 110 μ g/ml 또는 304 μ g/ml). 키노몰구스 원숭이에서, 혈장 반감기는 14일보다 훨씬 크고, 상기 약물의 순환 수준은 1mg/kg, 10mg/kg 또는 30mg/kg의 최초 투여의 경우에 각각, 25 μ g/ml, 304 μ g/ml 또는 1440 μ g/ml이었다. 사람에서 예비 결과로 혈청 반감기가 약 20일 내지 30일 사이라는 것이 제안된다.
- [0162] **실시예 2: ActRIIa-mFc는 *in vivo*에서 골 성장을 촉진한다.**
- [0163] 정상적인 암컷 생쥐(BALB/c)에 1주일 2회씩 1 mg/kg/dose, 3 mg/kg/dose 또는 10 mg/kg/dose의 수준으로 ActRIIa-mFc를 투약하였다. 골 미네랄 밀도 및 골 미네랄 함량은 도 6에서 볼 수 있는 것과 같이 DEXA로 결정하였다.
- [0164] BALB/c 암컷 생쥐에서, ActRIIa-mFc 처리 결과로 DEXA 스캔에서 골 미네랄 밀도 및 함량에서 상당한 증가(>20%)가 나타났다. 도 7 및 8 참고.
- [0165] 따라서, ActRIIa의 길항기전은 정상적인 암컷 쥐에서 골 밀도와 함량의 증가 원인이 되었다. 그 다음 단계로, 골다공증 생쥐 모델에서 ActRIIa-mFc의 효과를 테스트하였다.
- [0166] Andersson et al. (2001)는 난소제거된 생쥐가 실질적인 골 손실을 겪고(수술후 6주에 지주골의 대략 50% 손실), 부갑상선 호르몬과 같은 후보 치료제로 생쥐 골 손실이 보정될 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0167] 출원인은 C57BL/6 암컷 생쥐를 이용하여 4-5주령에서 난소제거하거나(OVX) 모조(sham) 수술하였다. 연구 시작시에, 수술 후 8주째에 ActRIIa-mFc(10mg/kg, 주 2회) 또는 대조군(PBS)로 처리를 시작하였다. 골 밀도는 CT스캔으로 측정하였다.
- [0168] 도 9에서 볼 수 있는 것과 같이, 처리안된 난소제거된 생쥐는 6주 후에 모조 실험 대조군에 비하여 지주골 골 밀도가 실질적으로 손실되었다. ActRIIa-mFc 처리로 모조 실험된 생쥐의 골 밀도 수준까지 골 밀도가 복원되었다. 처리 6주와 12주에 ActRIIa-mFc로 OVX 생쥐의 지주골에서 실질적인 증가를 결과하였다. 도 10 참고. 처리 6주후에, 골 밀도는 PBS 대조군에 비교하여 24% 증가되었다. 12주후에, 27% 증가되었다.
- [0169] 모조 실험 생쥐에서도 ActRIIa-mFc 처리로 지주골의 실질적인 증가를 결과하였다. 도 11 참고. 6주와 12주후에, 처리로 인하여 대조군에 비교하여 35% 증가되었다.
- [0170] 추가 일련의 실험에서, 상기와 같이 난소제거된(OVX) 또는 모조 실험받은 생쥐를 12주에 걸쳐 ActRIIa-mFc(10 mg/kg, 주당 2회) 또는 대조군(PBS) 으로 처리하였다. ActRIIa-mFc의 경우, 상기에서 설명된 것과 같은 유사하게, ActRIIa-mFc를 제공받은 OVX 생쥐는 첫 4주와 같이 초기에 지주골 골 밀도의 15%가 증가되었고, 처리 12주후에는 25% 증가되었다. (도 12). ActRIIa-mFc를 제공받은 모조 실험을 받은 생쥐에서도 첫 4주와 같이 초기에 지주골 골 밀도의 22%가 증가되었고, 처리 12주후에는 32% 증가되었다. (도 13).
- [0171] ActRIIa-mFc로 처리후 12주에, 전신 및 체외(ex vivo) 대퇴 분석에서 처리는 난소제거된 생쥐와 모조 실험을 받은 생쥐 모두에서 골 밀도 증가를 유도하였다(각각 도 14A 및 14B)는 것을 알 수 있다. 이와 같은 결과들은 대퇴 중축의 체외 pQCT 분석으로도 뒷받침되는데, 이 분석에서는 ActRIIa-mFc로 처리 12주후에 전체 골밀도 및 피질 골밀도 모두에서 상당한 증가가 있었다는 것을 설명한다. 난소제거, 비이클-처리된 대조군 생쥐에서는 모조

실험받은, 비이클-처리된 대조군 생쥐와 필적하는 골 밀도를 나타내었다(도 15). 골 밀도에 추가하여, ActRIIa-mFc 처리후에 골 함량도 증가되었다. 대퇴 중축의 체외 pQCT 분석에 따르면, ActRIIa-mFc 처리 12주후에 전체 골 함량 및 피질 골 함량에서 상당한 증가가 있었고, 난소제거된 생쥐와 모조 실험을 받은 생쥐 모두에서 비이클 처리된 경우에도 필적할 정도의 골량 증가가 나타났다(도 16). 대퇴 중축의 체외 pQCT 분석에 따르면, ActRIIa-mFc 처리된 생쥐는 골막 주변에서는 변화가 없음을 보여주었으나, ActRIIa-mFc 처리로 골 주변이 감소를 결과하여, 이는 대퇴 내면상에 성장으로 인하여 증가가 있음을 나타내는 것이다(도 17). 대퇴의 기계적인 테스트로, ActRIIa-mFc가 골의 외인성 성질(최대 부하, 단단함 및 부러지기 위한 에너지)을 증가시킬 수 있으며, 이는 골의 본질적 특징(궁극적인 강도)에 있어서 상당한 증가에 기여할 수 있었다는 것으로 판단하였다. 난소제거된 생쥐에 ActRIIa-mFc 처리로 모조 실험을 받은, 비이클 처리된 대조군의 골 강도 수준이상으로 골 강도를 증가시켰고, 이는 골다공증 표현형의 완전한 역전을 나타낸다(도 18). 이들 데이터로 액티빈-ActRIIa 길항 물질은 정상적인 암컷 생쥐에서 골 밀도를 증가시킬 수 있으며, 나아가 골다공증 생쥐 모델에서, 골 밀도, 골 함량 및 궁극적인 골 강도에 결합도 보정할 수 있다는 것이 설명된다.

[0172] 추가적인 일련의 실험에서, 생쥐를 4주째에 난소를 제거하거나 모조수술하고, 12주째에 플라시보 또는 ActRIIa-mFc (2 times/week, 10mg/kg)(도 19-24에서 RAP-11로도 언급됨)를 추가 12주간 투여하기 시작하였다, 다양한 골 변수들을 평가하였다. 도 19에서 볼 수 있는 것과 같이, ActRIIa-mFc는 OVX 및 SHAM 수술된 생쥐 모두에서 전체 용적 비율에 대해 척추 지주골 골량(BT/TV)이 증가되었다. ActRIIa-mFc는 또한 지주골 구조를 개선시켰고(도 20), 피질 두께를 증가시켰고(도 21), 그리고 골 강도를 개선시켰다(도 22). 도 23에서 볼 수 있는 바와 같이, ActRIIa-mFc는 1mg/kg 내지 10mg/kg의 약량 범위에서 바람직한 효과를 내었다.

[0173] 모조 실험을 받은 생쥐에서 2주째에 골 조직형태측법(histomorphometry)을 실행하였다. 도 24에서 제시한 이들 데이터로, ActRIIa-mFc는 골 재흡수를 저해하고, 골 성장을 촉진시키는 이중 효과를 가진다는 것이 설명된다. 따라서, ActRIIa-mFc는 골 성장 (동화 효과)을 촉진시키고, 골 흡수(항-이화 효과)를 저해하였다. BV = 골량; TV = 총 조직량. BV/TV는 광화된 골량의 비율 단위이다. ES = 침식면(Eroded surface); BS = 골 표면. ES/BS는 골 침식 단위이고, RAP-011에 의한 감소는 항-재흡수 또는 항-이화 효과를 설명한다. Ms/Bs는 광화 표면/골 표면 비율로써, 골 성장, 또는 동화 효과의 지표다. 유사하게, 1일 골 표면당 무기질 축적률(mineral apposition rate:MAR) 및 골 형성률(BFR/BSd)는 골 성장을 나타낸다. 골형성세포(Nob/BPm)와 과골세포(Noc/BPm)는 작용 기전을 규명하기 위한 측량이다.

[0174] 12주령이 시작되는 암컷 C57BL/6 생쥐에서 제2 골 조직형태측법을 실행하였다. 주당 2회 2주간, 4주간, 8주간 또는 12주간 매주 2회씩 생쥐의 복막내로 10mg/kg ActRIIa-mFc를 투약하였다.

[0175] 각군의 쥐들을 최종 투약후 5일째에 희생시키고, 분석을 위하여 골을 취하였다. 안락사 전 9일과 2일에 생쥐를 칼세인(calcein)으로 라벨시켰다. 도 25에서 볼 수 있는 것과 같이, 매트릭스는 ActRIIa-mFc가 골 성장 및 광화를 촉진시키고, 동화와 항-이화 효과를 모두 가진다는 것을 보여준다. 예를 들면 BV/TV 비율, ES/BS 비율 및 MS/BS 비율. 동화 효과는 투약 섭생을 통하여 지속되는 것으로 보이며, 항-재흡수 효과를 생쥐에서 더 짧은 것으로 나타났다.

[0176] **실시예 3: ActRIIa-mFc는 다발성 골수종 무린 모델에서 골 손상을 경감 또는 예방시킨다.**

[0177] 다발성 골수종(Multiple myeloma) 환자들은 과골 세포 활성화는 증가되고, 골형성 세포에 의한 골 형성은 감소된 특징을 가지는 골 손실 질환을 보인다. 생쥐의 골수종 5T2MM 모델은 나이든 쥐에서 발달되는 자발성 종양 타입으로부터 종양 세포(5T2MM cells)를 이용한 것에 근거하며, 생쥐에서 사람의 다발성 골수종에서 볼 수 있는 것과 유사한 결과의 원인이 된다. (Vanderkerken et al., Methods Mol Biol. 2005;113:191-205 참조). 이 모델에서 ActRIIa-mFc의 효과를 테스트하였다.

[0178] 5T2MM 세포를 C57Bl/KaLwRij 생쥐로 주사하면 과골세포 표면의 증가, 골다공증 병소 형성을 촉진시켰고, 골 면적의 감소를 결과하였다. 골 질환은 골 형성 세포의 수, 골형성세포의 표면 감소 및 광화 감소와 연관된다. 5T2MM 세포들을 가지는 생쥐에게 5T2MM주입 시기부터 총 12주간 ActRIIa-mFc (RAP-01 1) (10mg/kg, i.p. 주 2회), 또는 비이클로 처리하였다. 전단 경골 및 요척추의 마이크로 CT 분석에서, 고유 생쥐와 비교하였을 때, 5T2MM 보유 생쥐에서 망상조직 골량(cancellous bone volume)이 39% 및 21% 감소(p<0.001 및 p<0.01), 그리고 해면수(trabecular number)가 37% 및 15% 감소(p<0.01 및 p<0.05)된 것으로 설명되었다. RAP-011은 비이클 처리된 생쥐와 비교하였을 때, 경골(p<0.001 및 p<0.05) 및 척추(p<0.01 및 p<0.05) 모두에서 해면량과 수에서 5T2MM에 의해 유도된 감소를 완벽하게 저해하였다. 고유 생쥐와 비교하여, RAP-011처리된 생쥐에서 골량은 경골에서 19% 더 높았고(p=168), 척추에서는 12% 더 높았다. RAP-011은 골다공증 골 병소 발생을 저해시켰다

($p < 0.05$). 도 26에서 이와 같은 효과를 설명한다. 데이터의 예비 평가에서는 본 연구에서 혈청 파라 단백질(다발성 골수종 종양세포의 바이오마커)에 또는 골수종 부하에 유의적인 효과를 확인하지는 못하였으나, 추가 분석에서 혈청 파라 단백질은 처리된 동물들중 하나를 제외하고 모든 동물에서 실질적으로 감소되었고, 그리고 건강한 골수 용량이 실질적으로 증가되었음이 나타났고, 이는 골수종 종양 세포 부하가 감소되었음을 나타낸다.

[0179] 따라서, ActRIIa-hFc는 다발성 골수종으로 인한 골 질환의 영향을 감소시키고, 종양 세포 자체를 치료하는데 이용될 수 있을 것이다.

[0180] **실시예 4: ActRIIa-hFc 단백질의 특징**

[0181] ActRIIa-hFc 융합 단백질은 SEQ ID NO:9의 조직 플라즈미노겐 리더 서열을 이용하여, pAID4 벡터 (SV40 ori/enhancer, CMV 프로모터)로부터 안전하게 형질 감염된 CHO-DUKX B11에서 발현되었다. 실시예 1에서 설명된 것과 같이 정제된 단백질은 SEQ ID NO:7의 서열을 갖는다. Fc 부분은 SEQ ID NO:7에서 볼 수 있는 것과 같이 사람 IgG1 Fc 서열이다. 시알산 분석에서, 단백질에는 ActRIIa-hFc 융합 단백질분자당 평균 약 1.5 몰 내지 2.5몰의 시알산을 포함하는 것으로 나타났다.

[0182] 이와 같은 정제된 단백질은 사람의 경우에 25-32일의 반감기를 포함한 테스트된 모든 동물에서 상당히 긴 혈청 반감기를 가지는 것으로 나타났다(하기 실시예 5 참조). 추가로, 사람 293 세포에서 발현된 ActRIIa-hFc 융합 단백질에서 보고된 것보다 CHO 세포에서 발현된 물질이 액티빈 B 리간드에 대해 더 높은 친화력을 가진다(de l Re et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35.). 추가로, tPa 리더 서열을 이용하면 다른 리더 서열보다 더 큰 생산성을 제공하는데, 고유 리더로 발현된 ActRIIa-Fc와는 달리 매우 순수한 N-말단 서열을 제공한다. 고유 리더 서열을 이용하면 두 가지 주요 ActRIIa-Fc가 결과되는데, 각각은 상이한 N-말단 서열을 보유한다.

[0183] **실시예 5: 인체 임상 시험**

[0184] 건강한, 폐경기 여성에서 주로 단백질의 안정성을 평가하기 위해 진행되는 무작위, 이중-맹검, 플라시보-조절된 연구에서 사람 환자에 실시예 4에서 설명된 단백질을 투여하였다. 48명의 피검자를 6명으로된 군으로 무작위 배분하고, 각 단일 약량의 ActRIIa-hFc 또는 플라시보(5 활성: 1 플라시보)를 제공받았다. 약량 범위는 정맥 투여(i.v)의 경우 0.01 내지 3.0mg/kg, 그리고 피하 투여의 경우(s.c) 0.03 내지 0.1 mg/kg이다. 120일간 모든 개체를 추적하였다. 연구 6개월 이내에 골 대사에 영향을 주는 약물을 복용한 개체는 연구에서 배제되었다. 약량의 단계적 확장을 결정하기 위해 각 군에서 안정성 평가를 실행하였다. 약동학(PK) 분석에 추가하여, 골 형성, 재흡수의 바이오마커 측정 및 FSH 수준 측정으로 ActRIIa-hFc의 생물학적 활성도 평가하였다.

[0185] 이 연구에서 심각한 부작용의 경우가 보고되지는 않았다. 부작용(AE)은 일반적으로 약하거나 일과적인 것이었다. AE의 예비 분석에는 두통, 실험 수치의 상승, 감기 증상, 구토(emesis 또는 vomiting), 정맥 침윤 및 주사 부위의 혈종이 포함된다.

[0186] ActRIIa-hFc의 PK분석에서 약량과 선형 프로파일, 약 25-32일의 평균 반감기를 나타낸다. ActRIIa-hFc의 곡선 아래 면적(AUC)은 약량에 대해 선비례하고, SC 투약후에 흡수는 기본적으로 완벽하다(도 27 및 28). 이 데이터에서, IV 투약후 첫 몇일간 혈청에서 약물 농도가 급상승하는 것과 비교하여, SC는 약물의 증가의 생체이용성 및 반감기를 제공하기 때문에, SC가 투약에 바람직한 방법이라는 것을 알 수 있다. (도 28). ActRIIa-hFc는 동화성 골 생장의 마커인 골 특이적 알칼리 포스파타제(BAP)의 혈청 수준에서 신속하고, 지속적인 약량-의존성 증가의 원인이 되며, 그리고 골 재흡수의 마커가 되는 C-말단 타입 I 콜라겐 텔로펩티드과 타르타르산염-내인성산 포스파타제 5b 수준의 약량-의존적인 감소의 원인이 된다. PINP와 같은 다른 마커는 결론을 내지 못하는 결과를 보여주었다. BAP 수준은 약물의 최대 약량에서 거의 포화 효과를 나타내는데, 이는 이와 같은 동화성 골 바이오마커에 최대 절반 효과는 0.3 mg/kg의 약량에서 얻을 수 있으며, 최대 3 mg/kg 범위까지 증가될 것임을 나타낸다. 약물에 AUC에 대한 약동학적 효과의 상관관계로 계산하였을 때, EC50은 51,465 (day*ng/ml)이다. 도 29 참고. 이들 골 바이오마커 변화는 테스트된 최대 약량 수준에서 약 120일간 지속되었다. 또한, 액티빈 저해와 연관되는 혈청 FSH 수준에서 약량-의존성 감소도 있었다.

[0187] 건강한 폐경기 여성에 제공된 단일 약량의 ActRIIa-hFc는 테스트된 약량 수준 범위내에서 안전하고, 잘 용인되었다. 연장된 PK 및 약동학 효과로 간헐적 투약이 미래 연구에 적절할 것이라고 제안된다. 예를 들면, 혈청 반감기에 근거한 투약을 월 단위로 실행하거나 매2주, 매3주, 매4주, 매5주 또는 매6주에 1회로 실행될 수도 있다. 추가로, 약동학 효과는 약물의 혈청 잔류를 증가하여 연장되기 때문에, 투약은 약동학적 효과에 근거하여 실행될 수 있는데, 이는 환자에서 원하는 효과를 얻기 위하여, 매3개월 또는 매2개월, 매3개월, 매4개월, 매5개

월, 매6개월 또는 12개월 투약도 효과적일 수 있다는 것을 의미한다. 이와 같은 임상 시험에서 사람의 경우, ActRIIa-hFc가 골 형성의 증가 및 골 재흡수의 감소 모두에 대한 생물학적 증거를 가진 골 동화성 물질이라는 것을 설명한다.

[0188] **실시예 6: ActRIIa-mFc 및 비스포스포네이트의 공동 투여**

[0189] 비스포스포네이트는 골다공증, 암-관련 골 손실을 포함하는 낮은 골 미네랄 밀도와 연관된 질환 치료에 널리 사용되는 약물군이다. 비스포스포네이트는 파골세포를 저해하는 강력한 항-재흡수 활성을 가진다. 아마도 파골 세포는 골 파괴와 골 성장에 모두 필요하기 때문에, 비스포스포네이트는 동화 골 성장 물질로만 공지된 것중에 하나인 부갑상선 호르몬(PTH)의 영향을 감소시키는 것으로 보인다(Black et al., N Engl J Med. 2003 Sep 25;349(13):1207-15; Samadfam et al., Endocrinology. 2007 Jun;148(6):2778-87.) 비스포스포네이트를 이전에 제공받았거나 부수적으로 비스포스포네이트 또는 다른 항-재흡수 요법을 제공받은 환자들에서 ActRIIa-Fc 치료의 유용성을 테스트하기 위하여, ActRIIa-mFc 와 조레드로네이트를 복합한, 비스포스포네이트 화합물로 생쥐를 테스트하였다. 다음과 같이, 12주령의 C57BL/6N 생쥐를 처리하였다:

[0190] 1군 PBS

[0191] 2군 ActRIIa-mFc (RAP-011)(10 mg/kg), 주1회(3, 4군과 함께)

[0192] 3군 조레드논산 (ZOL), 단일 약량(20 mg/kg)

[0193] 4군 4 ZOL (1 dose), 3일 후 ActRIIa-mFc (RAP-011)(1mg/kg), 주2회

[0194] 5군 ZOL (1 dose), 3일 후 ActRIIa-mFc (RAP-011)(10mg/kg), 주2회

[0195] 총 BMD는 투약전과 처리 3주와 8주에 DEXA 스캔(PIXI)으로 측정하였다.

[0197] 도 30에서 볼 수 있는 것과 같이, 모든 처리군에서 전체 BMD가 상당히 증가되었고, ZOL와 ActRIIa-mFc를 복합한 경우 최대 효과를 내었다. 이들 결과로 ActRIIa-Fc 단백질은 이미 비스포스포네이트 요법을 제공받은 환자들에서도 골 밀도를 증가시키는데 이용될 수 있다는 것을 설명한다.

[0198] **실시예 7: ActRIIa-Fc는 유방암 전이로 기인된 골 손실을 경감 또는 방지한다.**

[0200] 유방암의 65 내지 75%는 골로 전이되어 골 구조에 실질적인 손상과, 골절 위험을 증가시키고, 통증 및 다른 부작용의 원인이 되는 것으로 추정한다. 우리는 골로 전이된 유방암 생쥐 모델에서 ActRIIa-Fc 효과를 테스트하였다. 사람 유방암 하위 세포주 MDA-MB-231 (클론 2287)를 *in vitro*에서 배양하고, 세포는 5×10^6 cells/ml의 밀도에서 세포를 수거하였다. MDA-MB-231는 골로 집중하는데 매우 유능하고, 골 전이로 인한 골 손상의 원인이 되는 세포주이다. 10 ml 세포를 6주령의 나이든, 갑상선이 제거된 누드 암컷 생쥐의 경골에 연구 첫날(0일)에 주입하였다. 연구 10일째에, 10마리 생쥐에게 ActRIIa-mFc (10 mg/kg/ 주 2회/ 피하) (n=8) 또는 PBS 비이클 (n=7)을 제공하였다. 주단위로 이중 에너지 x-선 흡수계측(PIXIMus)을 실시하여 질병 진행을 평가하였다. 생쥐는 4주간 ActRIIa-mFc로 처리하고, 그 다음 희생시킨 후 경골(중양이 주사된 것과 주사안된 것 모두)을 각 동물로부터 수거하였다. 그 다음 경골을 처리하고, 마이크로CT와 조직 분석을 위해 준비하였다. 갑상선이 제거된 누드 생쥐로 MDA-MB-231 세포의 경골내 주입으로, 반대쪽 다리와 비교하였을 때, 주입된 경골에서 골다공증 골 병소 발생이 촉진되었다. 가까운 경골의 마이크로CT분석에서, MDA-MB-231를 가진 경골은 PBS 비이클 처리된 생쥐의 중양이 투여안된 경골과 비교하였을 때, 해면 골량이 62% 감소된 것으로 설명된다. ActRIIa-mFc 처리는, 비이클과 비교하였을 때, 고유 또는 중양을 가진 경골에서 70% 또는 147% 증가를 이끌었다(둘 다 $P < 0.01$) 중양을 가진 경골을 ActRIIa-mFc 처리로 VEH 처리된 생쥐의 고유 경골과 유사한 해면 골 밀도를 가졌다. ($p=0.39$).

[0201] 따라서, ActRIIa-mFc는 골에서 유방 종양 세포의 존재와 연관된 골 손상을 제거할 수 있다.

[0202] **실시예 8: 대안 ActRIIa-Fc 단백질**

[0203] 대안 구조는 C-말단 꼬리를 결손시킨(ActRIIa의 세포외 도메인의 마지막 15개 아미노산)것일 수 있다. 이와 같은 구조의 서열은 다음과 같다(밑줄은 Fc 부분)(SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPENTGGGTHTCPPCPA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPVPPIEKTKAKKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0204]

[0205]

[0206]

[0207]

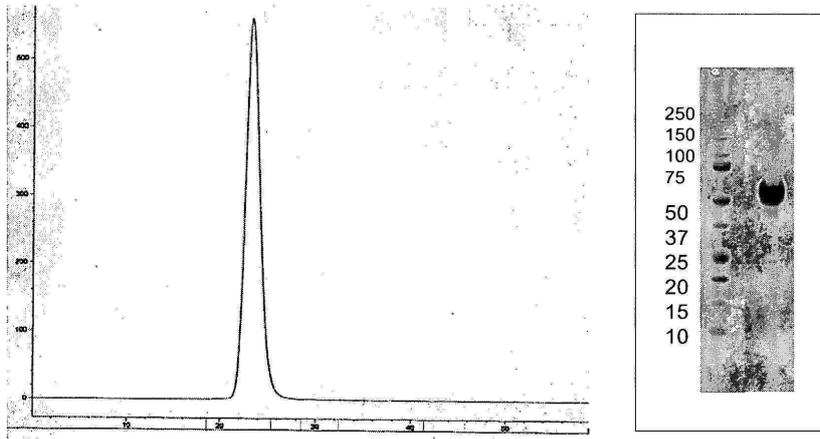
참조로서 편입

본 명세서에 언급된 모든 간행물과 특허는 각 개별 간행물 또는 특허가 특정하게 개별적으로 참고문헌으로 편입되는 것처럼 순전히 참조로서 편입된다.

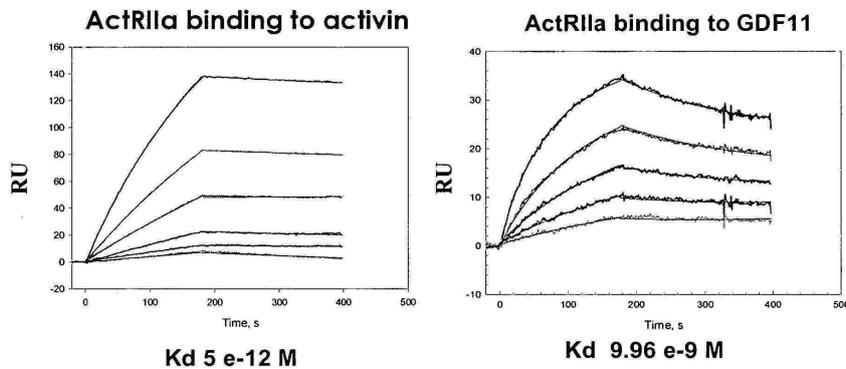
요부(subject matter)의 특정 구체예가 논의되긴 했지만, 상기 명세서는 설명을 목적으로 하고, 본 발명을 한정하지 않는다. 상기 명세서와 하기 특허청구범위를 검토한 이후에, 다수의 변이는 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 특허청구범위와 이의 균등한 범위, 그리고 명세서와 이의 변이에 기준하여 결정되어야 한다.

도면

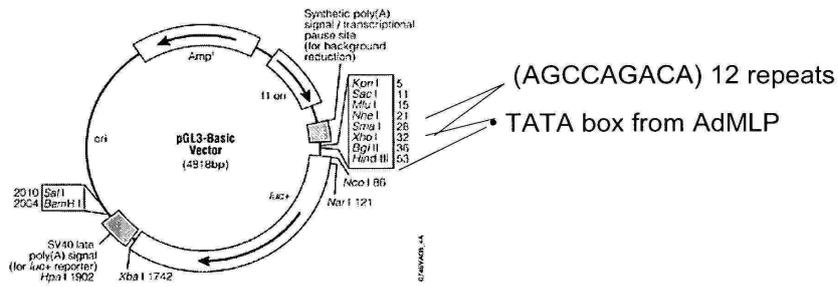
도면1



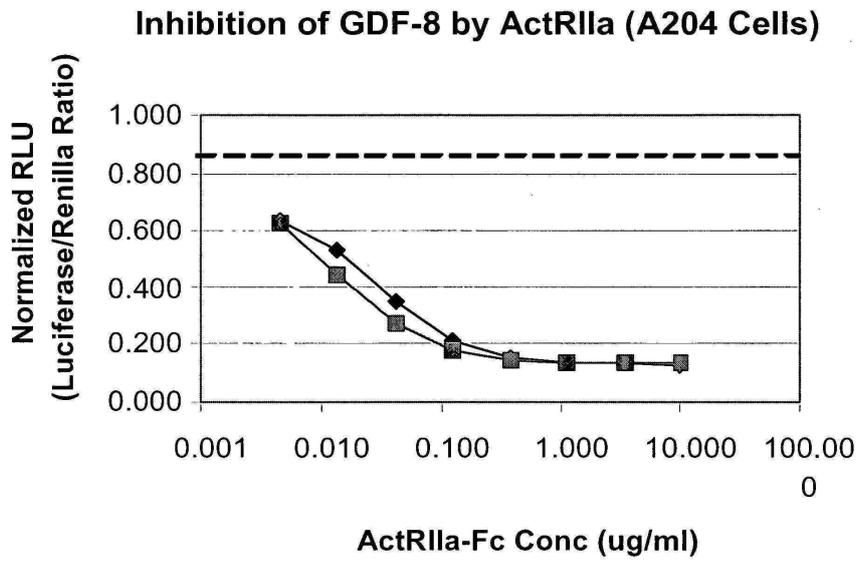
도면2



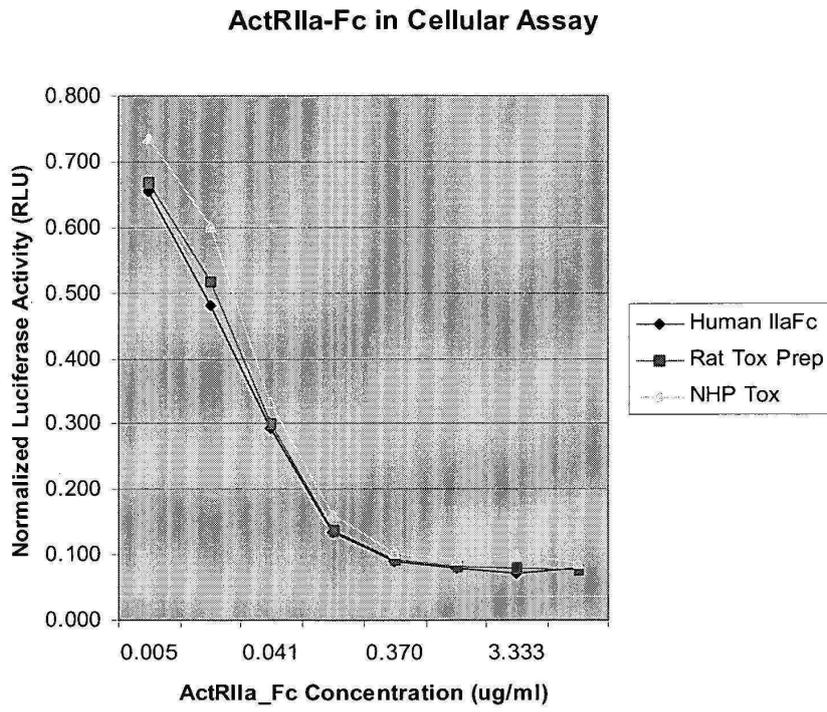
도면3



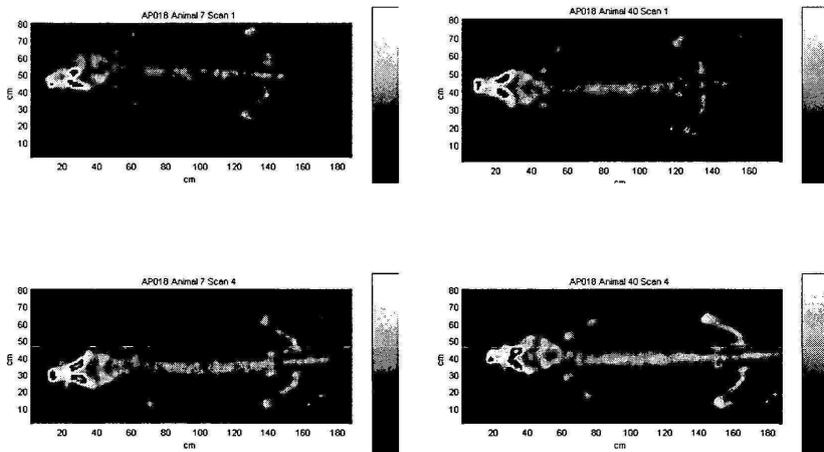
도면4



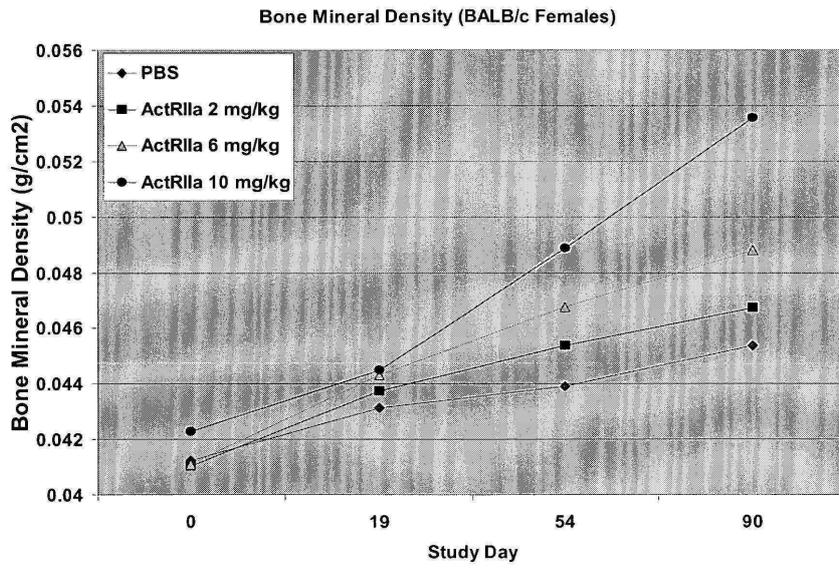
도면5



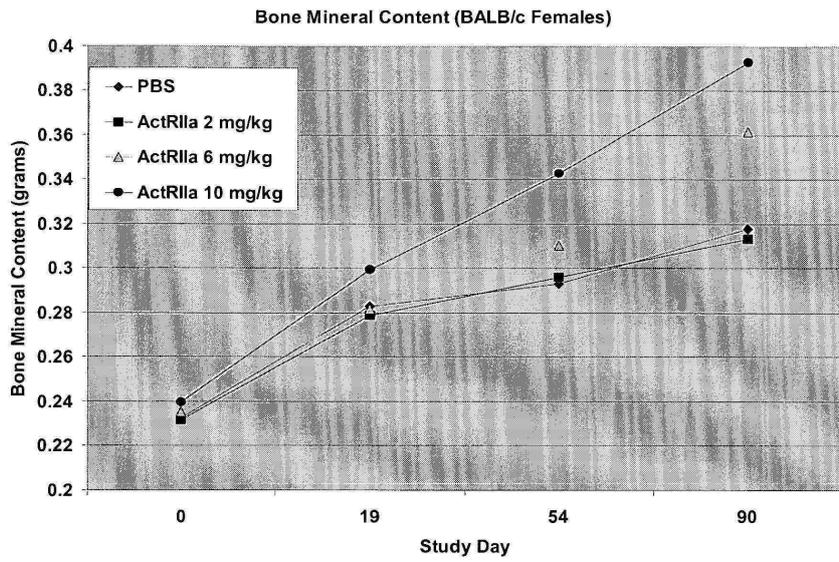
도면6



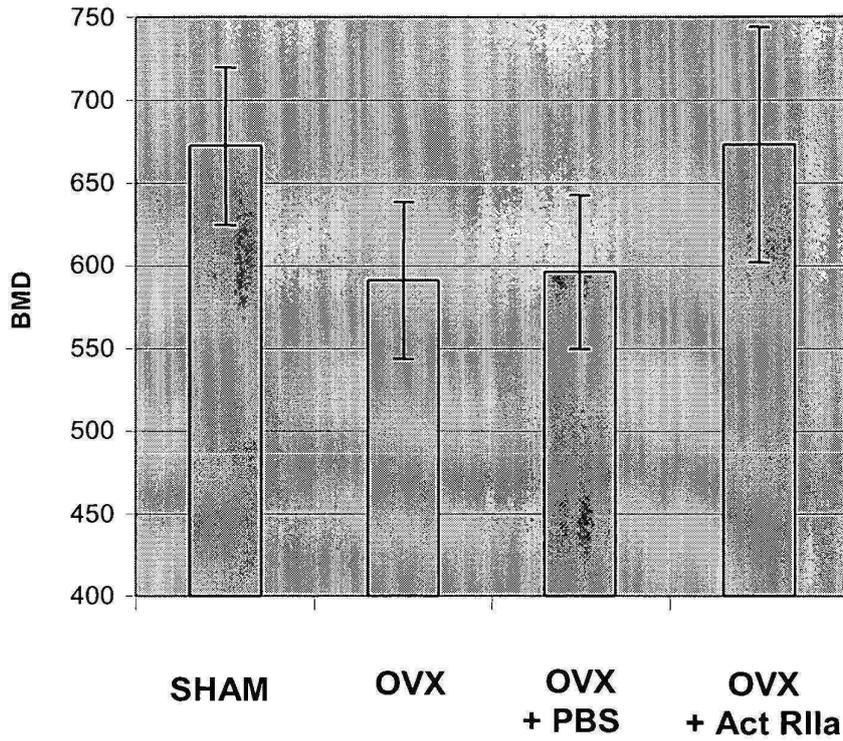
도면7



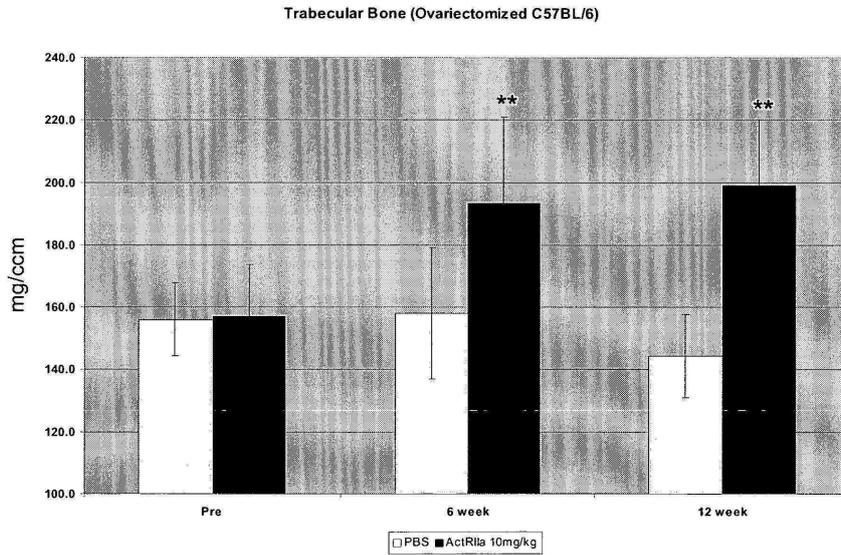
도면8



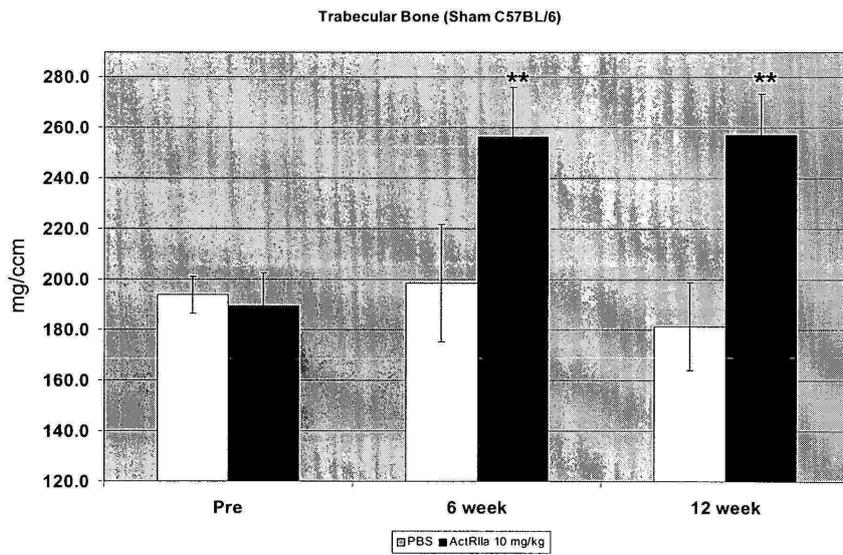
도면9



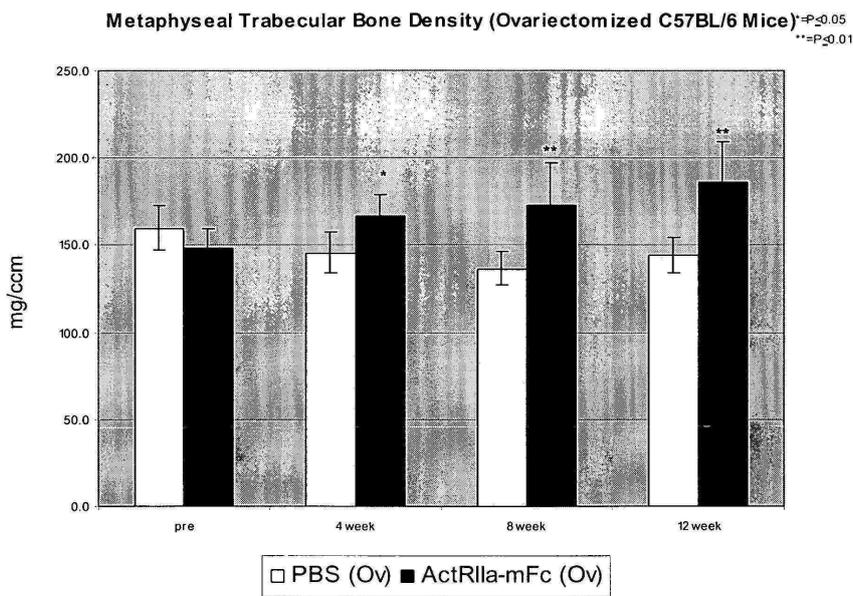
도면10



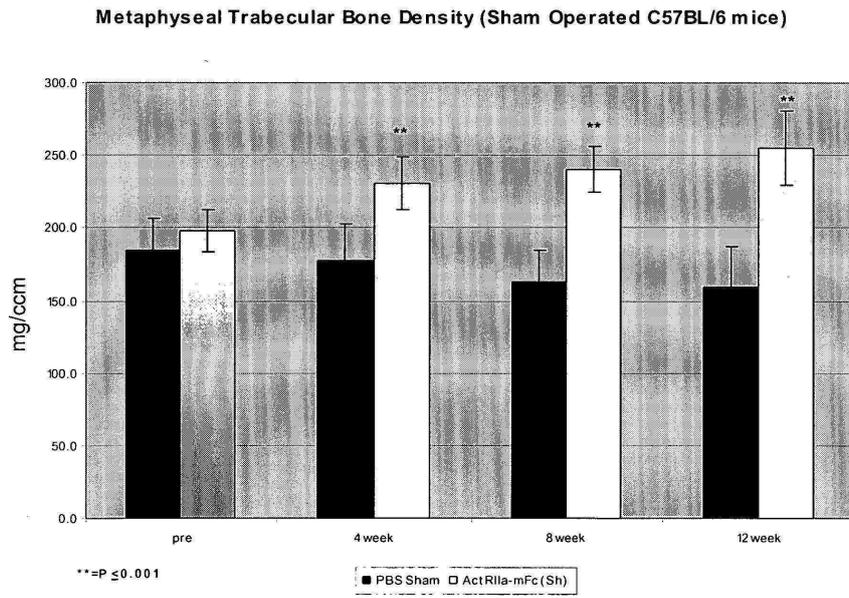
도면11



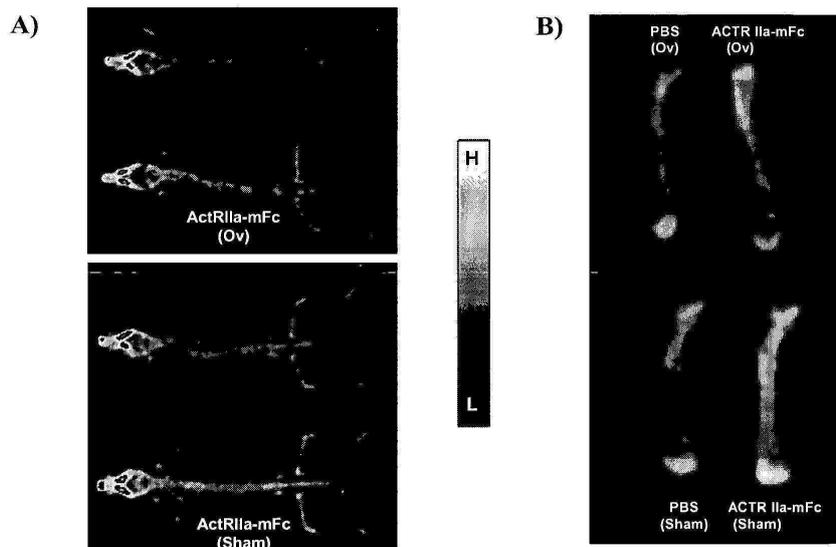
도면12



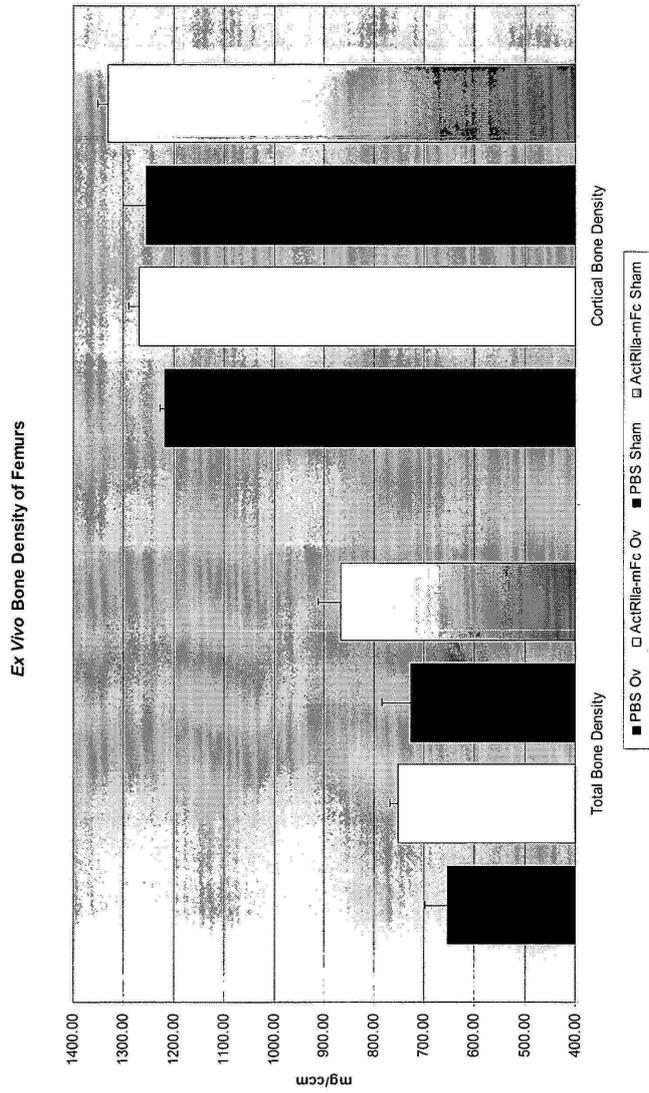
도면13



도면14

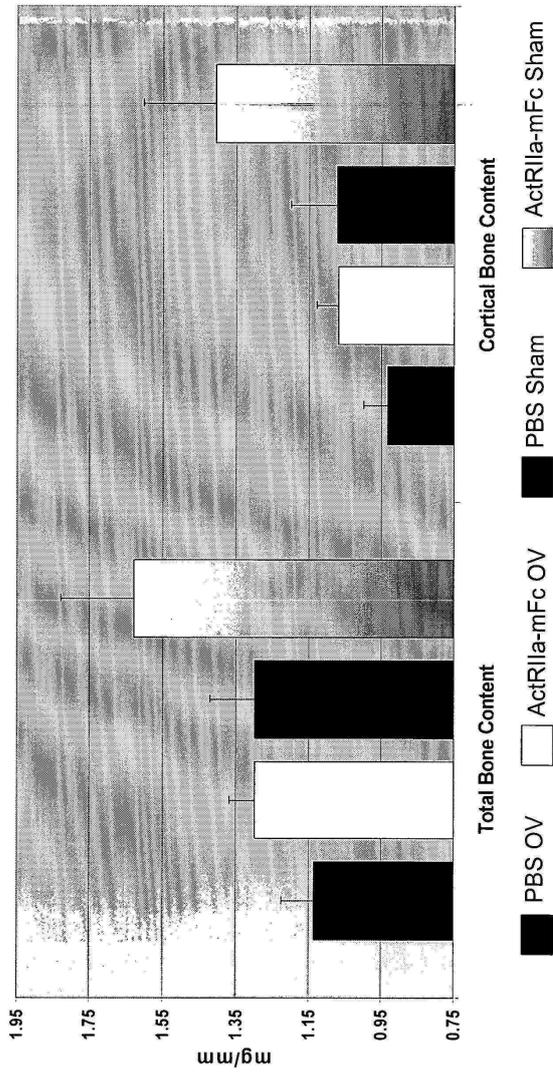


도면15

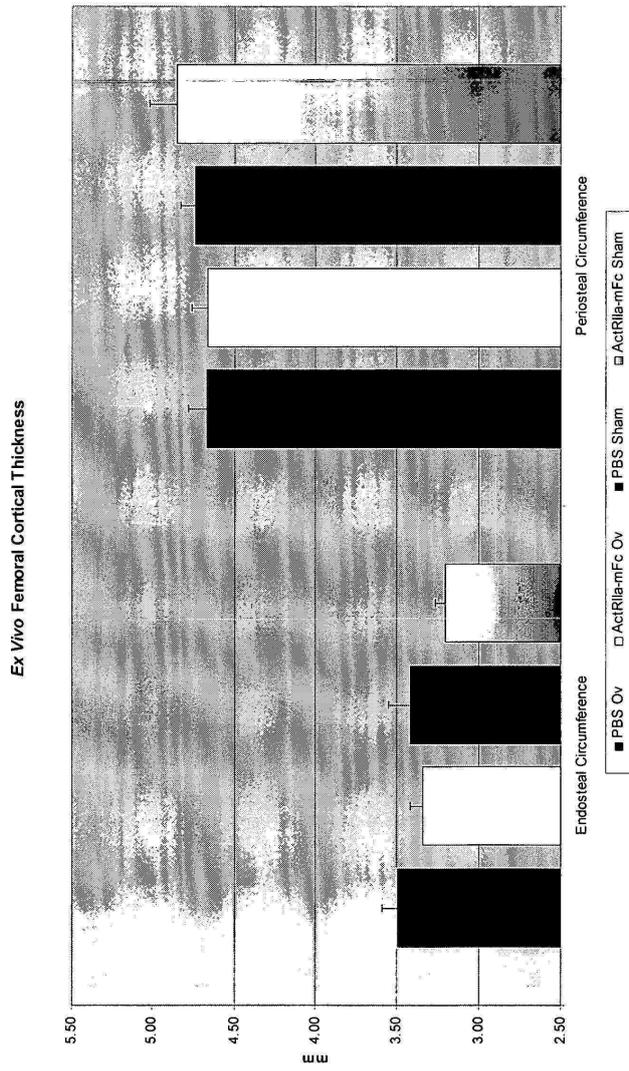


도면16

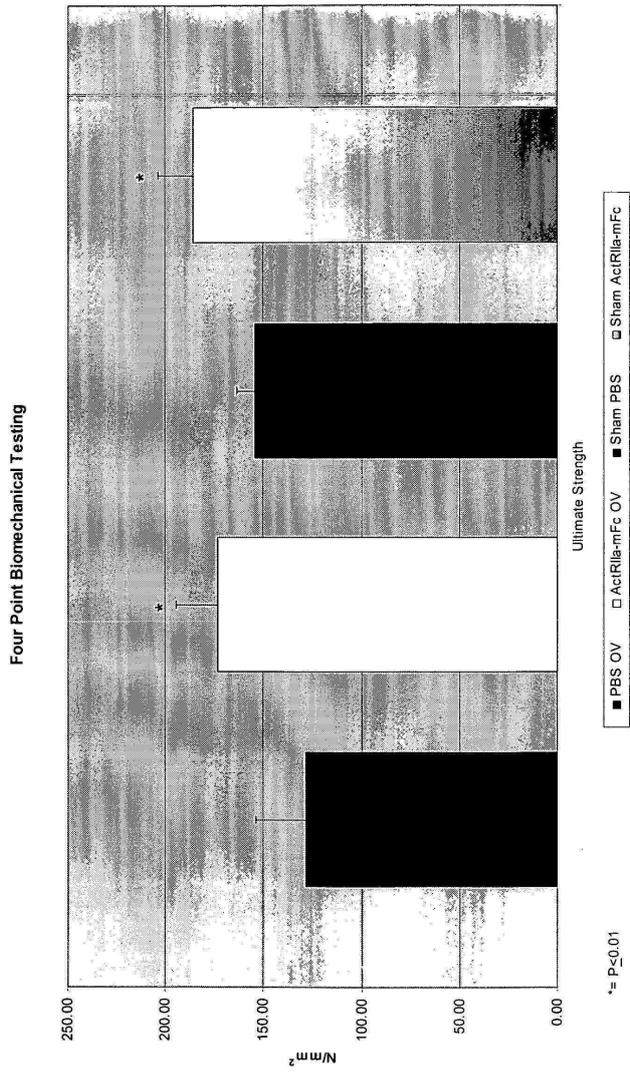
Diaphyseal Bone Content of Femurs



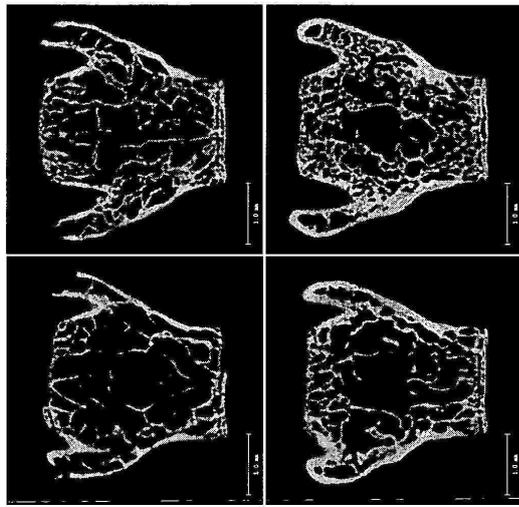
도면17



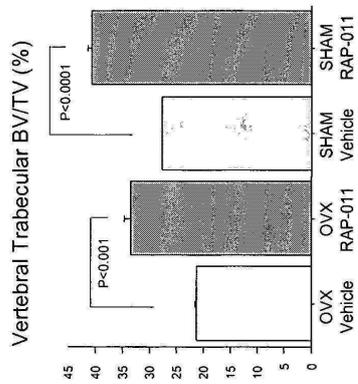
도면18



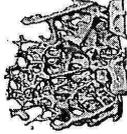
도면19



microCT data shown at end of study (age 24 wks)

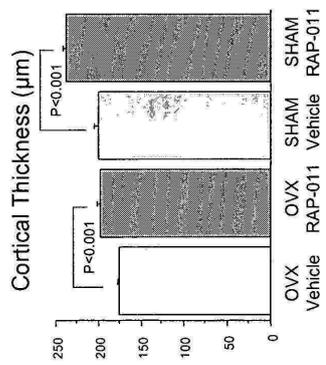
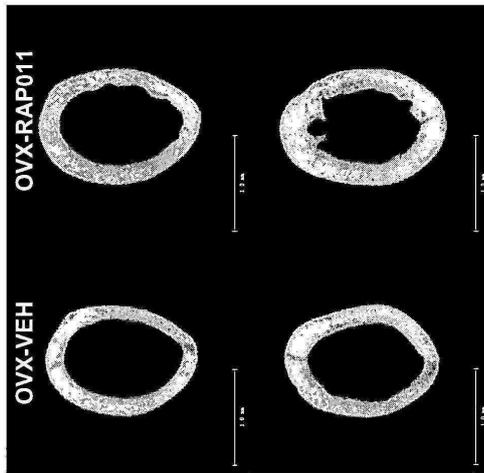


도면20

	OVX-VEH	OVX-RAP-011	SHAM-VEH	SHAM-RAP-011
				
@ 12 weeks	OVX-VEH	OVX-RAP-011	SHAM-VEH	SHAM-RAP-011
Tb N (mm ⁻¹)	2.1 ± 0.3	3.5 ± 0.2 **	3.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2 **
Tb Sp (µm)	486.2 ± 79	283.9 ± 21 **	332.4 ± 25	230.2 ± 12 **
Conn D (mm ⁻³)	8.4 ± 6	85.1 ± 13.7 **	41.4 ± 14.8	131.2 ± 16.5 **

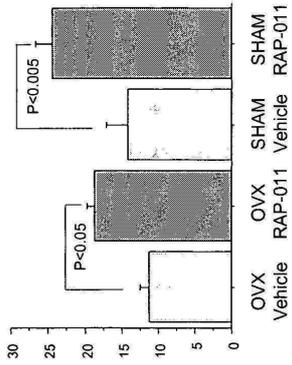
** p<0.01 vs VEH

도면21

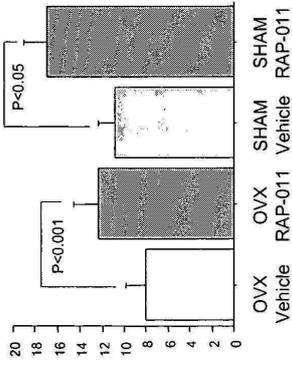


도면22

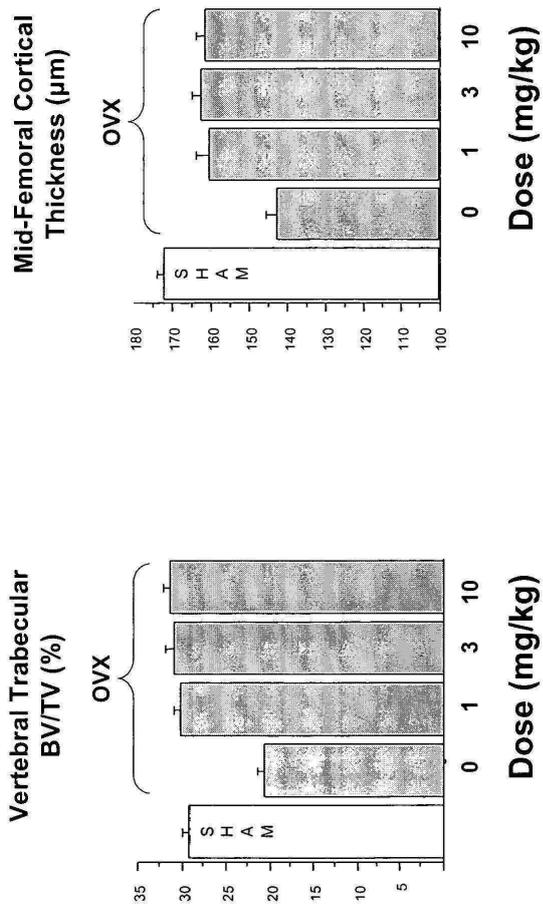
Femoral Energy-to-Failure (N·mm)



Vertebral Energy-to-Failure (N·mm)



도면23



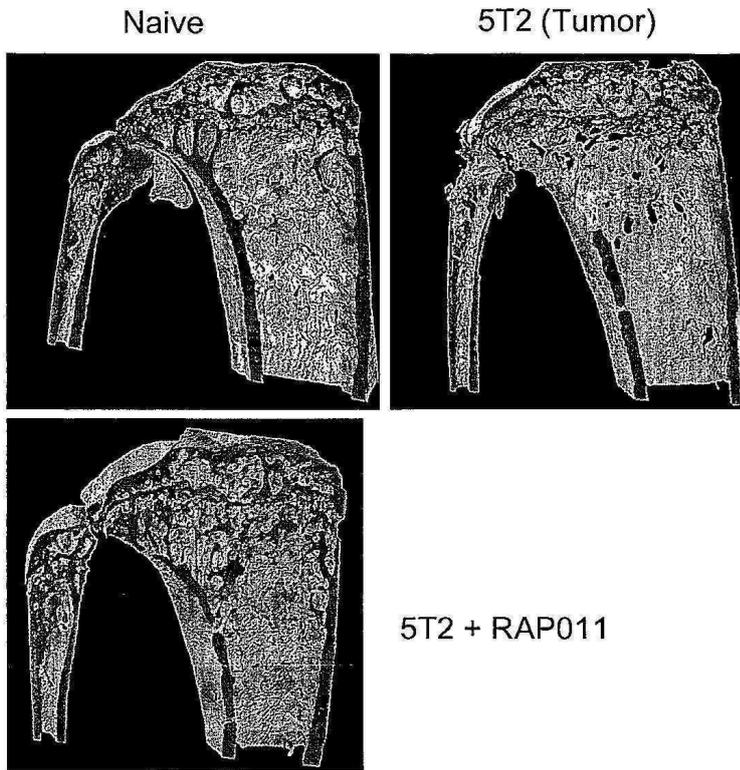
도면24

	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/mm)	Noc/BPm (/mm)	Ms/BS (%)	MAR (um/day)	BFR/BSd (um ³ /um ² /day)
PBS mean	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
RAP-011 mean	10.88	13.93	40.89	5.34	7.546	0.852	0.065
<i>P value</i>	0.002	0.03	0.02	0.01	0.008	0.03	0.002

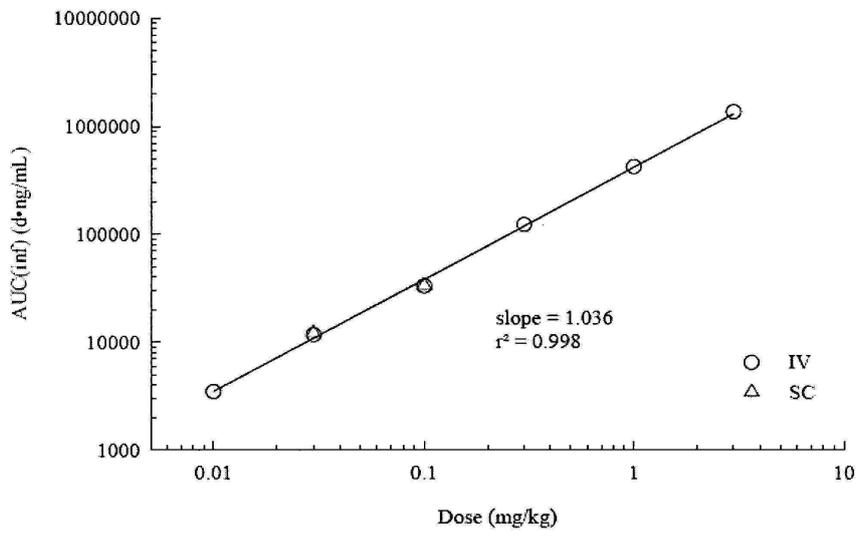
도면25

Parameter	2 week VEH (N=6)	2 week RAP-011 (N=6)	4 week VEH (N=6)	4 Week RAP-011 (N=6)	6 week VEH (N=6)	6 Week RAP-011 (N=6)	12 week VEH (N=6)	12 week RAP-011 (N=6)
Bone volume (BV/TV), %	7.53 ± 0.35	10.88 ± 0.46*	7.04 ± 0.51	15.57 ± 1.38*	6.14 ± 0.41	14.31 ± 0.53*	4.39 ± 0.42	15.24 ± 1.08*
Osteoid surface (OS/BS), %	4.86 ± 0.34	5.32 ± 0.49	3.95 ± 0.51	3.65 ± 0.36	3.26 ± 0.34	3.31 ± 0.42	2.1 ± 0.46	1.91 ± 0.08
Eroded Surface (ES/BS), %	17.36 ± 0.99	13.93 ± 0.96 *	13.61 ± 1.6	12.01 ± 1.39	12.38 ± 1.31	11.89 ± 0.77	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Number of osteoblasts/area (Ob/Tar), no./mm	429.89 ± 25.33	455.31 ± 28.29	411.84 ± 44.61	567.78 ± 33.13*	405.22 ± 24.2	634.61 ± 35.39*	238.69 ± 14.2	521.86 ± 22.77*
Osteoblast surface/bone surface (Obs/BS), %	36.12 ± 2.42	29.43 ± 1.52*	33.5 ± 2.53	29.14 ± 1.93	35.5 ± 1.27	35.92 ± 1.29	28.46 ± 1.32	30.24 ± 1.5
Osteoblast on bone perimeter (Nob/BPm), %	49.33 ± 2.52	40.89 ± 1.46*	48.52 ± 4.16	41.33 ± 3.25	49.61 ± 2.87	49.2 ± 3.26	39.4 ± 2.03	36.64 ± 2.53
Number of osteoclasts/area (Oc/Tar), no./mm	65.81 ± 4.97	59.62 ± 5.89	51.42 ± 3.58	65.68 ± 8.18	45.23 ± 3.88	62.95 ± 5.18 *	28.07 ± 1.85	61.15 ± 1.87*
Osteoclast on bone perimeter (Noc/BPm), %	7.55 ± 0.53	5.34 ± 0.45*	6.25 ± 0.66	4.78 ± 0.59	5.74 ± 0.58	4.86 ± 0.4	4.65 ± 0.32	4.49 ± 0.17
Osteoclast surface/bone surface (Ocs/BS), %	8.78 ± 0.78	6.23 ± 0.5*	6.86 ± 0.67	5.36 ± 0.62	6.38 ± 0.67	5.8 ± 0.46	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Trabecular Thickness (TbTh), -m	13.69 ± .48	15.42 ± 0.45*	13.11 ± 0.46	17.68 ± 0.75*	12.04 ± 0.5	17.28 ± 0.35*	11.18 ± 0.52	17.49 ± 1.02*
Trabecular number (TbN), no./mm	167.74 ± 5.88	127.57 ± 7.25*	175.98 ± 9.3	98.61 ± 6.95*	187 ± 7.13	104.26 ± 3.42*	251.79 ± 18.14	96.07 ± 4.27*
Trabecular separation (TbSp), -m	5.55 ± 0.19	7.09 ± 0.36*	5.34 ± 0.23	8.73 ± 0.5*	3.6 ± 0.56	7.97 ± 0.73*	3.89 ± 0.27	8.7 ± 0.29*
Mineralizing surface (MS/BS), %	4.21 ± 0.7	7.55 ± 0.73*	4.15 ± 1.02	8.84 ± 0.77*	5.07 ± 0.22	8.27 ± 0.22*	3.86 ± 0.4	6.66 ± 0.51*
Mineral apposition rate (mm/day)	0.704 ± 0.049	0.852 ± 0.028*	0.566 ± 0.042	0.642 ± 0.014	0.517 ± 0.02	0.602 ± 0.016*	0.425 ± 0.009	0.533 ± 0.013*
Bone formation rate (-m ³ /mm ² /day)	0.029 ± 0.004	0.065 ± 0.008*	0.025 ± 0.008	0.057 ± 0.005*	0.019 ± 0.003	0.048 ± 0.004*	0.016 ± 0.002	0.035 ± 0.002*

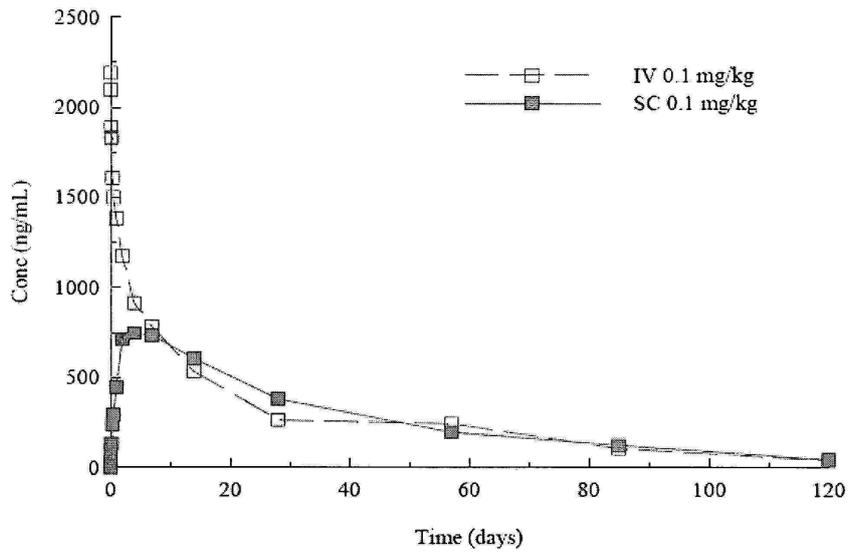
도면26



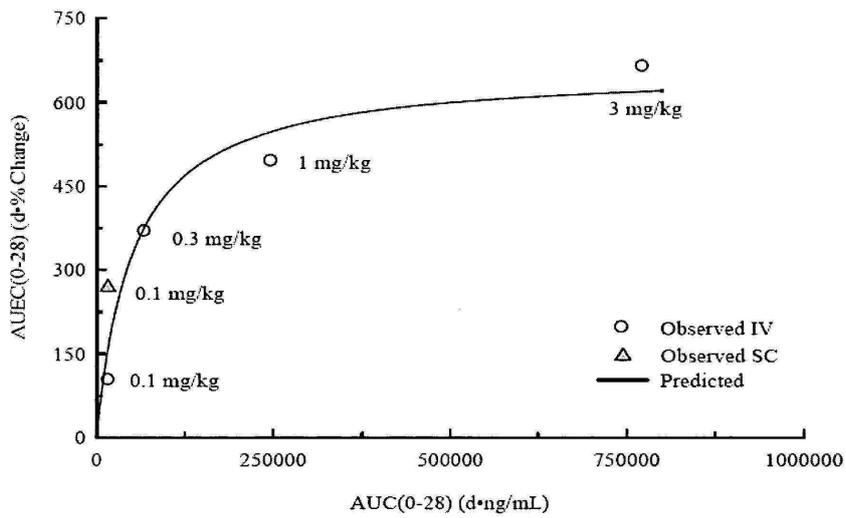
도면27



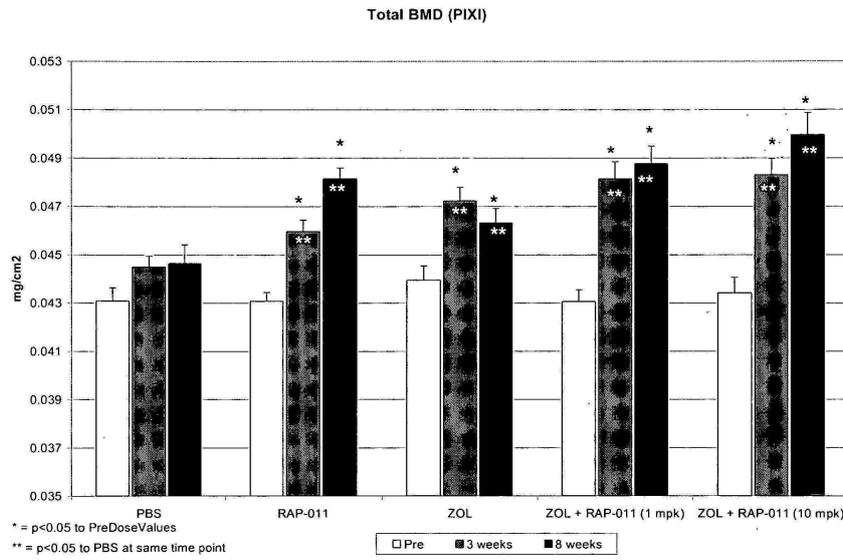
도면28



도면29



도면30



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> KNOPF, JOHN
- KUMAR, RAVINDRA
- SEEHRA, JASBIR
- <120> ACTIVIN-ACTRIIA ANTAGONISTS AND USES FOR PROMOTING BONE GROWTH IN CANCER PATIENTS
- <130> PHPH-025-W01
- <140> PCT/US2008/001354
- <141> 2008-02-01
- <150> 60/900,580
- <151> 2007-02-09
- <150> 60/932,762
- <151> 2007-05-31
- <150> 60/937,365
- <151> 2007-06-26
- <150> 61/000,528
- <151> 2007-10-25
- <160> 18
- <170> Patent In Ver. 3.3
- <210> 1
- <211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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
 145 150 155 160
 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

225 230 235 240
 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

 305 310 315 320
 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

<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> Homo sapiens

<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

<400> 4

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

 gaagtcacac agcccacttc aaatccagt acacctaagc caccctatta caacatcctg 420
 ctctattcct tggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480
 tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttgttc caactcaaga cccaggacca 540
 cccccacctt ctccattact aggggtgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600
 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660
 tttccaatac aggacaaca gtcattggca aatgaatagc aagtctacag tttgcctgga 720

atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780

giggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840

gctaattgtg tctcttggaa tgaactgtgt catattgcag aaaccatggc tagaggattg 900

gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960

aggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac 1020

tttgggttg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgatacca tggacaggtt 1080

ggtaccggga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140

gcatttttga ggatagatat gtatgccatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200

tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260

cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320

ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380

tgttgggatc acgacgcaga agccagggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440

cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500

tgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtetat ga 1542

<210> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60

agaaccaate aaactggigt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120

tttgcacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 180

gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag cctgaagta 240

tatttttgtt gctgtgagg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300

gaagtcacac agcccacttc aaatecagtt acacctaage cacc 345

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43)

<223> Asp or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (100)

<223> Lys or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (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

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

<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 Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Tissue Plasminogen

Activator

<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 Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Native peptide

<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> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu

1 5

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
construct

<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> Description of Artificial Sequence: Synthetic
construct

<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

aacggcggca ttgttttctgct acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaca 240
 aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300
 cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360

ttttccggag atggaagtca cacagccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccac 420
 cgggtggtgga actcacacat gccaccctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
 agtcttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga ccctgaggt 540
 cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 600
 ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660
 gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtctgaat gcaaggagta 720
 caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca tctcaaagc 780

caaagggcag ccccgagaac cacagtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840
 caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 900
 ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
 ctccgacgge tcttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
 ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
 gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgaga attc 1114

<210> 15

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 15

agccagacaa gccagacaag ccagacaagc cagacaagcc agacaagcca gacaagccag 60
 acaagccaga caagccagac aagccagaca agccagacaa gccagaca 108

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

Thr Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 17

<211> 5

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 17

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 18

His His His His His His

1 5