



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0097310  
(43) 공개일자 2019년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)  
C07K 1/16 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/4702 (2013.01)  
A61K 38/17 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-7023598(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2006년11월22일  
심사청구일자 없음  
(62) 원출원 특허 10-2019-7000694  
원출원일자(국제) 2006년11월22일  
심사청구일자 2019년02월07일  
(85) 번역문제출일자 2019년08월12일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/045322  
(87) 국제공개번호 WO 2007/062188  
국제공개일자 2007년05월31일  
(30) 우선권주장  
60/739,462 2005년11월23일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

(71) 출원인  
악셀레론 파마 인코포레이티드  
미국 02139 매사추세츠주 캄브리지 시드니 스트리트 128  
(72) 발명자  
크노페, 존  
미국, 매사추세츠 01741, 칼리슬레, 로빈스 드라이브 147  
씨에라, 자스비르  
미국, 매사추세츠 02421-6818, 랙싱턴, 린콜린 테라세 3  
(74) 대리인  
강명구

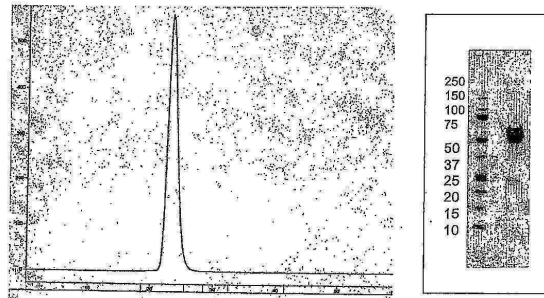
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 액티빈-ACTRIA 길항제 및 골 성장을 촉진하기 위한 이들의 용도

(57) 요약

특정 측면에서, 본 발명에서는 골 성장을 촉진하고 골 밀도를 증가시키기 위한 조성물과 방법을 제시한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C07K 1/16** (2013.01)

**C07K 19/00** (2013.01)

(30) 우선권주장

60/783,322 2006년03월17일 미국(US)

60/844,855 2006년09월15일 미국(US)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

연골 형성을 촉진, 골다공증 치료, 골절 치료, 연골 결손의 치료 또는 낮은 골 밀도 치료를 요하는 개체에서 연골 형성을 촉진, 골다공증 치료, 골절 치료, 연골 결손의 치료 또는 낮은 골 밀도 치료에 이용되는 다음에서 선택된 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물:

- a) 서열 번호:2에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- b) 서열 번호:3에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- c) 서열 번호:7에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 그리고
- d) 서열 번호:12에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

관련된 출원

[0002]

본 출원은 2005년 11월 23일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/739,462, 2006년 3월 17일자 제출된 60/783,322, 2006년 9월 15일자 제출된 60/844,855에 우선권을 주장하는데, 이들 출원은 본 명세서에서 순전히 참조로서 편입된다.

[0003]

본 발명의 기술 분야

[0004]

특정 측면에서, 본 발명에서는 골 성장을 촉진하고 골 밀도를 증가시키기 위한 조성물과 방법을 제시한다.

#### 배경 기술

[0005]

골다공증(osteoporosis)에서부터 골절(fracture)까지 골 질환은 효과적인 치료제가 거의 부재하는 일단의 병리학적 상태(pathological state)를 대표한다. 대신에, 치료는 부동화(immobilization), 운동(exercise) 및 식이 변화(changes in diet)를 비롯한 신체적 및 행동적 개입(intervention)에 집중한다. 다양한 골 질환을 치료하는 목적으로 골 성장을 촉진하고 골 밀도를 증가시키는 치료제를 확보하는 것이 유익할 것이다.

[0006]

골 성장과 무기화(mineralization)는 2가지 세포 유형, 파골세포(osteoclast)와 조골세포(osteoblast)의 활성화에 좌우되지만, 연골세포(chondrocyte) 및 맥관구조(vasculature)의 세포 역시 이들 과정의 중요한 단계에 참여한다. 발달적으로, 골 형성은 2가지 기전, 연골내 골화(endochondral ossification)와 막내 골화(intramembranous ossification)를 통하여 진행되는데, 전자는 장골(longitudinal bone) 형성을 담당하고, 후자는 위상적으로 편평골(flat bone), 예를 들면, 두개골의 형성을 담당한다. 연골내 골화는 조골세포, 파골세포, 맥관구조의 형성을 위한 주형(template)으로서 기능하는 성장판(growth plate) 내에서 연골성 구조(cartilaginous structure)의 순차적인 형성과 분해 및 후속의 무기화를 요구한다. 막내 골화 동안, 골은 연결 조직(connective tissue) 내에서 직접적으로 형성된다. 양쪽 과정은 조골세포의 침투(infiltration) 및 후속의 매트릭스 석회화(matrix deposition)를 필요로 한다.

[0007]

뼈의 골절과 다른 구조적 파괴는 연골성 조직의 형성 및 후속의 무기화를 비롯한 골 형성(osteogenesis)의 발달적 현상(developmental event)의 순서를 최소한 외견상으로 모방하는 과정을 통하여 치유된다. 골절 치유(fracture healing)의 과정은 2가지 방식으로 진행될 수 있다. 직접적인 또는 일차적인 골 치유는 캘러스 형성(callus formation) 없이 진행된다. 간접적인 또는 이차적인 골 치유는 캘러스 전구체 단계(callus precursor stage)와 함께 진행된다. 골절의 일차적인 치유는 밀집되게 배치된 파괴 전체에 기계적 연속성(mechanical continuity)의 재형성(reformation)을 수반한다. 적절한 조건 하에, 이러한 파괴를 둘러싸는 골-재흡수 세포는 터널링 재흡수 반응(tunnelling resorptive response)을 나타내고, 혈관의 침투와 후속의 치유를 위한 경로를 확립한다. 이차적인 골 치유는 염증(inflammation), 연성 캘러스 형성(soft callus formation), 캘러스 무기화

(callus mineralization) 및 캘러스 재형성(callus remodelling)의 과정을 수행한다. 염증 단계에서, 혈종(haematoma)과 출혈(haemorrhage) 형성은 손상 부위에서 골막(periosteal)과 골내막(endosteal) 혈관의 파괴에 기인한다. 염증 세포가 상기 부위를 침입한다. 연성 캘러스 형성 단계에서, 이들 세포는 새로운 혈관, 섬유아세포(fibroblast), 세포내 물질 및 지지 세포를 생산하고, 골절 단편(fracture fragment) 사이의 공간에 과립화 조직(granulation tissue)을 형성한다. 이러한 파괴 전체에 임상적 골융합(clinical union)이 섬유성 또는 연골성 조직(연성 캘러스)에 의해 확립된다. 조골세포가 형성되고, 이들 조골세포는 연성 캘러스의 무기화를 매개하고, 상기 연성 캘러스는 이후, 층판골(lamellar bone)에 의해 대체되고 정상적인 재형성 과정(remodeling process)에 종속된다.

[0008] 골 구조의 골절과 다른 물리적 파괴 이외에, 골 무기물 함량(bone mineral content)과 골량(bone mass)의 손실은 다양한 장애에 의해 유발될 수 있고, 상당한 의학적 문제점을 초래할 수도 있다. 골량에 변화는 개체의 수명 동안 상대적으로 예측가능한 방식으로 진행된다. 대략 30세까지, 남성과 여성 모두 골이 연골내 성장판(endochondral growth plate)의 선형 성장(linear growth) 및 방사성 성장(radial growth)을 통하여 최대량으로 성장한다. 대략 30세(소주골(trabecular bone), 예를 들면, 척추(vertebrae)와 골반(pelvis)과 같은 편평골의 경우)와 40세(치밀골(cortical bone), 예를 들면, 팔다리에서 발견되는 장골(long bone)) 이후에, 완전한 골 손실이 남성과 여성 모두에서 진행된다. 또한, 여성에서, 실질적인 골 손실의 최종 단계는 아마도, 폐경후 에스트로겐 결핍으로 인하여 진행된다. 이 단계 동안, 여성은 치밀골로부터 10%와 골주 구획(trabecular compartment)으로부터 25%의 골량을 추가로 상실한다. 진행성 골 손실이 골다공증과 같은 병리학적 장애를 유발하는 지의 여부는 개체의 최초 골량 및 악화 조건의 존재 여부에 상당 부분 좌우된다.

[0009] 골 손실은 때때로, 정상적인 골 재형성 과정에서 불균형(imbalance)으로 특성화된다. 건강한 골은 지속적으로 재형성된다. 재형성은 파골세포에 의한 골의 재흡수(resorption)로 시작된다. 재흡수된 골은 이후, 새로운 골 조직으로 대체되는데, 이는 조골세포에 의한 콜라겐 형성(collagen formation) 및 후속의 석회화(calcification)로 특성화된다. 건강한 개체에서, 재흡수와 형성의 비율은 균형을 이룬다. 골다공증은 재흡수로의 이동으로 구별되고, 골량과 골 무기화에서 전반적인 감소를 유발하는 만성 진행성 장애이다. 인간에서 골다공증은 임상적 골감소증(clinical osteopenia)(1 표준 편차(standard deviation)보다 크지만 젊은 성체 골에 대한 평균치(mean value)보다 2.5 이하 작은 표준 편차의 골 무기물 밀도)이 선행된다. 전세계적으로, 대략 75 백만 명이 골다공증의 위험에 노출되어 있다.

[0010] 따라서, 파골세포와 조골세포 활성 사이에 균형을 제어하는 방법은 골절과 다른 골 손상의 치유를 촉진하고 골량과 골 무기화의 손실과 연관된 질환, 예를 들면, 골다공증을 치료하는데 유용할 수 있다.

[0011] 골다공증과 관련하여, 에스트로겐(estrogen), 칼시토닌(calcitonin), 비타민 K와 조합된 오스테오칼신(osteocalcin), 또는 고용량의 식용 칼슘(dietary calcium) 모두 치료 개입(therapeutic intervention)으로서 이용되고 있다. 골다공증에 대한 다른 치료 접근법에는 비스포스포네이트(bisphosphonate), 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone), 칼슘유사제(calcimimetic), 스타틴(statin), 동화성 스테로이드(anabolic steroid), 란탄(lanthanum)과 스트론튬(strontium) 염, 불화나트륨(sodium fluoride) 등이 포함된다. 하지만, 이들 치료제는 종종, 바람직하지 않은 부작용과 연관된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 골 성장과 무기화를 촉진하기 위한 조성물과 방법을 제시하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 부분적으로, 본 발명은 액티빈 또는 ActRIIa 길항제 활성을 갖는 분자("액티빈 길항제"와 "ActRIIa 길항제")는 골 밀도를 증가시키고, 골 성장을 촉진하고 및/또는 골 강도를 증가시키는데 이용될 수 있음을 증명한다. 특히, 본 발명은 ActRIIa의 가용성 형태가 액티빈-ActRIIa 신호전달의 저해물질로서 기능하고 생체내에서 증가된 골 밀도, 골 성장과 골 강도를 촉진한다는 것을 증명한다. 골 성장을 촉진하거나 골 손실을 저해하는 대부분의 치료제는 이화작용 방지제(anti-catabolic agent)(일명, "이화작용제(catabolic agent)") (가령, 비스포스포네이트) 또는 동화작용제(anabolic agent)(가령, 부갑상선 호르몬, PTH, 적절히 처방될 때)인 반면, 가용성 ActRIIa 단백질은 이중 활성을 나타내고 이화 효과와 동화 효과를 모두 보유한다. 따라서, 본 발명은 액티빈-ActRIIa 신호전달 경로의 길항제가 골 밀도를 증가시키고 골 성장을 촉진하는데 이용될 수 있음을 확립한다. 가용성

ActRIIa가 액티빈 길항(antagonism) 이외의 기전을 통하여 골에 영향을 줄 수도 하지만, 그럼에도 불구하고, 본 발명은 바람직한 치료제가 액티빈-ActRIIa 길항제 활성화에 기초하여 선택될 수 있음을 증명한다. 이런 이유로, 특정 구체예에서, 본 발명에서는 낮은 골 밀도 또는 낮은 골 강도와 연관된 질환, 예를 들면, 골다공증을 치료하거나, 또는 필요 환자, 예를 들면, 골절 환자에서 골 성장을 촉진하기 위하여, 예로써, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드, 항-액티빈 항체, 항-ActRIIa 항체, 액티빈- 또는 ActRIIa-표적된 소형 분자, 압타머(aptamer) 등을 비롯한 액티빈-ActRIIa 길항제 및 액티빈과 ActRIIa의 발현을 감소시키는 핵산을 이용하는 방법을 제시한다. 부가적으로, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 근육량(muscle mass)에서 지속적으로 측정가능한 증가를 유발하지 않으면서 골 성장을 촉진한다.

[0014] 특정 측면에서, 본 발명에서는 액티빈에 결합하는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제시한다. ActRIIa 폴리펩티드는 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 제약학적 조성물로서 제제화된다. 적절하게는, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 1 이하 마이크로몰(micromolar), 또는 100, 10 또는 1 이하 나노몰(nanomolar)의  $K_D$ 로 액티빈에 결합한다. 선택적으로, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 GDF11 및/또는 GDF8에 비하여, 액티빈에 선택적으로 결합한다, 바람직하게는, GDF11 및/또는 GDF8에 비하여 액티빈에 최소한 10-배, 20-배 또는 50-배 낮은  $K_D$ 로 결합한다. 특정 작용 기전에 한정됨 없이, GDF11/GDF8 저해에 비하여 액티빈 저해에 대한 이러한 선택성은 근육에 대한 지속적으로 측정가능한 효과를 유발하지 않으면서 골에 선택적인 효과를 설명할 것으로 기대된다. 많은 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 골에서 바람직한 효과를 달성하는 용량으로, 근육에서 15% 이하, 10% 이하 또는 5% 이하의 증가를 유발하도록 선택될 것이다. 적절하게는, 조성물은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 평가에서, 다른 폴리펩티드 성분과 관련하여 최소한 95% 순수하다, 더욱 바람직하게는, 조성물은 최소한 98% 순수하다. 이런 조성물에 이용되는 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 본 명세서에 개시된 임의의 폴리펩티드, 예를 들면, SEQ ID NO: 2, 3, 7 또는 12에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 또는 13에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에는 자연 ActRIIa 폴리펩티드의 기능성 단편, 예를 들면, SEQ ID NO: 1-3에서 선택되는 서열, 또는 C-말단의 10개 내지 15개 아미노산("꼬리")이 부재하는 SEQ ID NO: 2의 서열의 최소한 10개, 20개 또는 30개 아미노산을 포함하는 기능성 단편이 포함된다.

[0015] 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열(가령, 리간드-결합 도메인)에서 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 변형된 ActRIIa 폴리펩티드의 실례는 WO 2006/012627, pp. 59-60에서 제공된다. 아미노산 서열에서 변형은 예로써, 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 포유동물, 곤충 또는 다른 진핵생물 세포에서 생산되는 폴리펩티드의 글리코실화(glycosylation)를 변화시키거나, 또는 폴리펩티드의 단백질 분해 절단(proteolytic cleavage)을 변화시킨다.

[0016] 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 한 도메인으로서 ActRIIa 폴리펩티드(가령, ActRIIa의 리간드-결합 부분) 및 개선된 약물동력학(pharmacokinetics), 더욱 용이한 정제, 특정 조직으로의 표적화 등과 같은 바람직한 특성을 제공하는 하나 이상의 다른 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 가령, 융합 단백질의 도메인은 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡수/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 융합 단백질의 다중화(multimerization) 및/또는 정제 중에서 하나 이상을 강화시킨다. 액티빈-결합 ActRIIa 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인(야생형 또는 변이체), 혈청 알부민, 또는 개선된 약물동력학, 개선된 용해도(solubility) 또는 개선된 안정성과 같은 바람직한 특성을 제공하는 다른 폴리펩티드 부분을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRIIa-Fc 융합은 Fc 도메인과 세포외 ActRIIa 도메인 사이에 위치하는 상대적으로 비구조적 링커를 포함한다. 이러한 비구조적 링커는 ActRIIa의 세포외 도메인의 C-말단 단부("꼬리")에서 거의 15개의 아미노산 비구조적 영역에 상응하거나, 또는 상기 비구조적 링커는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 아미노산, 또는 이차 구조가 상대적으로 부재하는 5개 내지 15개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의 아미노산, 또는 양쪽의 혼합물의 인공 서열일 수 있다. 링커는 글리신(glycine)과 프롤린(proline) 잔기가 풍부하고, 예로써, 트레오닌(threonine)/세린(serine)과 글리신(glycine)의 단일 서열 또는 트레오닌/세린과 글리신의 반복 서열(가령, TG<sub>4</sub> 또는 SG<sub>4</sub> 단일항(singlet) 또는 반복)을 포함한다. 융합 단백질은 정제 부분서열(suqsequence), 예를 들면, 에피토프 태그(epitope tag), FLAG 태그, 폴리히스티딘(polyhistidine) 서열, GST 융합체를 포함할 수 있다. 임의적으로, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르세일화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모이어티에 공액된 아미노산, 또는 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 공액된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함한다. 제약학적



조성물은 또한, 하나이상의 부가적인 화합물, 예를 들면, 골 질환을 치료하는데 이용되는 화합물을 포함한다. 적절하게는, 제약학적 조성물은 발열원(pyrogen)이 실질적으로 부재한다. 일반적으로, ActRIIa 단백질은 환자에서 부정적인 면역 반응(immune response)의 가능성을 최소화시키기 위하여 ActRIIa 단백질의 적절한 자연적 글리코실화를 매개하는 포유동물 세포주에서 발현시키는 것이 바람직하다. 인간과 CHO 세포주가 성공적으로 이용되고 있고, 다른 통상적인 포유동물 발현 시스템이 유용할 것으로 기대된다.

[0017] 본 명세서에 기술된 바와 같이, ActRIIa-Fc(ActRIIa 부분과 Fc 부분 사이에 최소 링커를 보유하는 형태)로 명명된 ActRIIa 단백질은 GDF8 및/또는 GDF11에 비하여 액티빈에 대한 선택성 결합, 높은 친화성 리간드 결합, 동물 모형에서 2주 이상 동안 혈청 반감기를 비롯한 바람직한 특성을 보유한다.

[0018] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa-Fc 폴리펩티드 및 이런 폴리펩티드와 제약학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 제약학적 조성물을 제시한다.

[0019] 특정 측면에서, 본 발명에서는 가용성 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제시한다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 앞서 기술된 바와 같은 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 가령, 분리된 핵산은 ActRIIa의 세포외 도메인(가령, 리간드-결합 도메인)을 코딩하는 서열 및 막통 도메인 또는 세포질 도메인 내에 위치하거나 세포외 도메인과 막통 도메인 또는 세포질 도메인 사이에 위치하는 종결 코돈(stop codon)을 제외하고 ActRIIa의 막통 도메인 및/또는 세포질 도메인의 일부 또는 전체를 코딩하는 서열을 포함한다. 가령, 분리된 폴리뉴클레오티드는 전장 ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들면, SEQ ID NO: 4 또는 5, 또는 부분적으로 절두된 이형을 포함하는데, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 이러한 폴리뉴클레오티드의 번역이 전장 ActRIIa의 절두된 부분에 임의적으로 융합된 세포외 도메인을 산출하도록 3'-말단 앞에 또는 다른 위치에 최소한 600개 뉴클레오티드의 전사 종결 코돈(transcription termination codon)을 더욱 포함한다. 선호되는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 14이다. 본 명세서에 개시된 핵산은 발현을 위하여 프로모터에 작동가능하게 연결되는데, 본 발명에서는 이런 재조합 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포를 제시한다. 적절하게는, 세포는 포유동물 세포, 예를 들면, CHO 세포이다.

[0020] 특정 측면에서, 본 발명에서는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제시한다. 이런 방법은 적절한 세포, 예를 들면, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포에서 본 명세서에 개시된 임의의 핵산(가령, SEQ ID NO: 4, 5 또는 14)을 발현하는 단계를 포함한다. 이런 방법은 가용성 ActRIIa 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 세포를 배양하는 단계, 여기서 상기 세포는 가용성 ActRIIa 발현 구조체로 형질 전환된다; b) 이렇게 발현된 가용성 ActRIIa 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 정제되지 않거나, 부분적으로 정제되거나, 또는 고도로 정제된 분획물(fraction)로서 회수된다. 정제는 예로써, 임의의 순서로 아래 중에서 한 가지, 두 가지 또는 세 가지 이상을 비롯한 일련의 정제 단계로 달성될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피(가령, Q 세파로오스), 소수성 상호작용 크로마토그래피(가령, 페닐세파로오스), 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피.

[0021] 특정 측면에서, 본 명세서에 개시된 액티빈-ActRIIa 길항제, 예를 들면, 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드가 개체에서 골 성장을 촉진하거나 골 밀도를 증가시키는 방법에 이용된다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 필요 환자에서, 낮은 골 밀도와 연관된 질환을 치료하거나 골 성장을 촉진하는 방법을 제시한다. 이런 방법은 액티빈-ActRIIa 길항제의 효과량을 필요 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에 기술된 질환이나 장애의 치료를 위한 약제를 제조하기 위한, 액티빈-ActRIIa 길항제의 용도를 제시한다.

[0022] 특정 측면에서, 본 발명에서는 골 성장을 촉진하거나 골 무기화를 증가시키는 작용제(agent)를 확인하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 a) 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인에 결합하는 작용제를 확인하는 단계; b) 골 성장 또는 골 무기화에 대한 작용제의 효과를 평가하는 단계를 포함한다.

## 발명의 효과

[0023] BALB/c 암컷 생쥐에서, DEXA 스캔은 ActRIIa-mFc 치료의 결과로써, 골 무기물 밀도와 함량에서 현저한 증가(>20%)를 보였다(도 7과 8 참조).

[0024] 따라서, ActRIIa의 길항작용은 정상적인 암컷 생쥐에서 증가된 골 밀도와 함량을 유도하였다. 다음 단계로써, 골다공증의 생쥐 모형에서 골에 대한 ActRIIa-mFc의 효과를 조사하였다.

[0025] Andersson et al. (2001)에서는 난소 적출된 생쥐에서 상당한 골 손실(수술후 6주 시점에 소주골의 거의 50% 손

실)이 발생하고, 이들 생쥐에서 골 손실이 부갑상선 호르몬과 같은 후보 치료제와 관련될 수 있음을 확인하였다.

[0026] 출원인은 4-5주령에 난소 적출된(OVX) 또는 허위 수술된 C57BL6 암컷 생쥐를 이용하였다. 수술후 8주 시점에, ActRIIa-mFc(10 mg/kg, 주2회) 또는 대조(PBS)로 치료를 시작하였다. 골 밀도는 CT 스캐너로 측정하였다.

[0027] 도 9에 도시된 바와 같이, 치료되지 않고 난소 적출된 생쥐는 6주후, 허위 수술된 대조와 비교하여 소주 골 밀도의 현저한 손실을 보였다. ActRIIa-mFc 치료는 허위 수술된 생쥐의 수준까지 골 밀도를 회복시켰다. 6주와 12주의 치료에서, ActRIIa-mFc는 OVX 생쥐의 소주골에서 현저한 증가를 유도하였다(도 10 참조). 6주의 치료후, 골 밀도는 PBS 대조와 비교하여 24% 증가하였다. 12주후, 이러한 증가는 27%이었다.

[0028] 허위 수술된 생쥐에서도 ActRIIa-mFc는 소주골에서 현저한 증가를 유도하였다(도 11 참조). 6주와 12주후, 이러한 치료는 대조와 비교하여 35% 증가를 유도하였다.

[0029] 추가적인 일단의 실험에서, 앞서 기술된 바와 같이 난소 적출된(OVX) 또는 허위 수술된 생쥐는 12주 동안 ActRIIa-mFc(10 mg/kg, 주2회) 또는 대조(PBS)로 치료하였다. ActRIIa-mFc에 대하여 앞서 기술된 결과와 유사하게, ActRIIa-mFc를 섭취한 OVX 생쥐는 4주 시점에 소주 골 밀도에서 15% 증가 및 12주 치료후 25% 증가를 보였다(도 12). ActRIIa-mFc를 섭취하는 허위 수술된 생쥐는 유사하게, 4주 시점에 소주 골 밀도에서 22% 증가 및 12주 치료후 32% 증가를 보였다(도 13).

[0030] ActRIIa-mFc로 12주 치료후, 전신(whole body)과 체외 대퇴골 DEXA 분석에서, 이러한 치료가 난소 적출된 생쥐와 허위 수술된 생쥐 모두에서 골 밀도 증가를 유도하였다(각각, 도 14A와 14B). 이들 결과는 또한, ActRIIa-mFc로 12주 치료후 전체와 피질 골 밀도 모두에서 현저한 증가를 증명하는, 대퇴부 중간뼈골절의 체외 pQCT 분석 결과에 뒷받침된다. 운반제-치료된 대조 난소 적출된 생쥐는 운반제-치료된 대조 허위 수술된 생쥐에 필적하는 골 밀도를 보였다(도 15). 골 밀도 이외에, ActRIIa-mFc 치료후 골 함량이 증가하였다. 대퇴부 중간뼈골절의 체외 pQCT 분석 결과는 ActRIIa-mFc로 12주 치료후 전체와 치밀골 함량 모두 현저하게 증가하는 반면, 난소 적출된 운반제 대조-치료된 생쥐와 허위 수술된 운반제 대조-치료된 생쥐가 유사한 골 함량을 나타낸다는 것을 증명하였다(도 16). 대퇴부 중간뼈골절의 체외 pQCT 분석 결과는 또한, ActRIIa-mFc 치료된 생쥐가 골막 원주(perosteal circumference)에서 변화를 나타내지 않는다는 것을 증명하였다; 하지만, ActRIIa-mFc 치료는 뼈 안 원주(endosteal circumference)에서 감소를 유도하는데, 이는 대퇴골의 내부 표면(inner surface)에서 성장에 기인한 피질 두께의 증가를 지시한다(도 17).

[0031] 대퇴골의 기계적 검사에서, ActRIIa-mFc은 골의 내적 특성(극한 강도(ultimate strength))에서 현저한 증가에 기여하는 골의 외적 특성(최대 하중(maximal load), 강도(stiffness) 및 파괴 에너지(energy to break))을 증가시킬 수 있는 것으로 확인되었다. ActRIIa-mFc로 치료된 난소 적출된 생쥐는 허위 수술되고, 운반제 치료된 대조의 수준을 초과하는 수준까지 증가된 골 강도를 나타내는데, 이는 골다공증(osteoporotic) 표현형의 완전한 반전을 지시한다(도 18).

[0032] 이들 데이터는 액티빈-ActRIIa 길항제가 정상적인 암컷 생쥐에서 골 밀도를 증가시킬 수 있고, 더 나아가, 골다공증의 생쥐 모형에서 골 밀도, 골 함량 및 궁극적으로, 골 강도에서 결함을 보정할 수 있음을 증명한다.

[0033] 추가적인 일단의 실험에서, 생쥐는 4주 시점에 난소 적출하거나 허위 수술하고, 12주 시점부터 추가로 12주 기간 동안, 위약 또는 ActRIIa-mFc(2회/week, 10 mg/kg)(도 19-24에서 RAP-11로 지칭됨)를 투약하였다. 다양한 골 파라미터를 평가하였다. 도 19에 도시된 바와 같이, ActRIIa-mFc는 OVX 생쥐와 허위 수술된 생쥐 모두에서 전체 체적(total volume)에 대한 척추 소주골 체적(vertebral trabecular bone volume) 비율(BV/TV)을 증가시켰다. ActRIIa-mFc는 또한, 골주 구조(trabecular architecture)를 개선하고(도 20), 피질 두께를 증가시키고(도 21), 골 강도를 개선하였다(도 22). 도 23에 도시된 바와 같이, ActRIIa-mFc는 1 mg/kg 내지 10 mg/kg의 용량 범위에서 바람직한 효과를 유도하였다.

[0034] 허위 수술된 생쥐에서 2주 시점에, 골 조직형태계측(bone histomorphometry)을 수행하였다. 도 24에 제공된 이들 데이터는 ActRIIa-mFc가 이중 효과: 골 재흡수의 저해 및 골 성장의 촉진을 나타낸다는 것을 증명한다. 따라서, ActRIIa-mFc는 골 성장을 자극(동화 효과(anabolic effect))하고 골 재흡수를 저해(항-이화 효과(anti-catabolic effect))한다.

## 도면의 간단한 설명

[0035] 도 1에서는 CHO 세포에서 발현된 ActRIIa-hFc의 정제를 도시한다. 상기 단백질은 단일의 충분히 정의된 피크로

서 정화한다.

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

도 3에서는 A-204 리포터 유전자 측정검사의 개략도를 도시한다. 본 도면에서는 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12(Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100)를 도시한다. CAGA12 모티프는 TGF-Beta 반응성 유전자(PAI-1 유전자) 내에 존재하고, 따라서 상기 벡터는 Smad 2와 3을 통하여 신호하는 인자에 보편적으로 이용된다.

도 4에서는 A-204 리포터 유전자 측정검사에서 GDF-8 신호전달에 대한 ActRIIa-hFc(다이아몬드)와 ActRIIa-mFc(사각형)의 효과를 도시한다. 양쪽 단백질은 피코몰(picomolar) 농도에서 GDF-8 매개된 신호전달의 실질적인 저해를 나타냈다.

도 5에서는 A-204 리포터 유전자 측정검사에서 GDF-11 신호전달에 대한 ActRIIa-hFc의 3가지 상이한 제조물의 효과를 도시한다.

도 6에서는 12주 치료기간 이전(위쪽 패널)과 이후(아래쪽 패널), 대조-와 ActRIIa-mFc-치료된 BALB/c 생쥐의 DEXA 영상의 실례를 도시한다. 더욱 밝은 음영(shading)은 증가된 골 밀도를 지시한다.

도 7에서는 12주 기간 동안, BALB/c 생쥐에서 골 무기물 밀도에 대한 ActRIIa-mFc의 효과의 정량을 도시한다. 치료 물질은 대조(다이아몬드), 2 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(사각형), 6 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(삼각형) 및 10 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(원)이었다.

도 8에서는 12주 기간 동안, BALB/c 생쥐에서 골 무기물 함량에 대한 ActRIIa-mFc의 효과의 정량을 도시한다. 치료 물질은 대조(다이아몬드), 2 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(사각형), 6 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(삼각형) 및 10 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(원)이었다.

도 9에서는 6주 기간 이후, 난소 적출된(OVX) 또는 허위 수술된(sham operated)(SHAM) C57BL6 생쥐에서 소주골(trabecular bone)의 골 무기물 밀도에 대한 ActRIIa-mFc의 효과의 정량을 도시한다. 치료 물질은 대조(PBS) 또는 10 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(ActRIIa)이었다.

도 10에서는 12주 기간 동안, 난소 적출된(OVX) C57BL6 생쥐에서 소주골에 대한 ActRIIa-mFc의 효과의 정량을 도시한다. 치료 물질은 대조(PBS; 밝은 막대) 또는 10 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(ActRIIa; 어두운 막대)이었다.

도 11에서는 6주 또는 12주 치료기간 이후, 허위 수술된(sham operated)(SHAM) C57BL6 생쥐에서 소주골에 대한 ActRIIa-mFc의 효과의 정량을 도시한다. 치료 물질은 대조(PBS; 밝은 막대) 또는 10 mg/kg 용량의 ActRIIa-mFc(ActRIIa; 어두운 막대)이었다.

도 12에서는 12주 치료 동안, 난소 적출된 생쥐에서 골 밀도의 pQCT 분석의 결과를 도시한다. 치료 물질은 대조(PBS; 밝은 막대) 또는 ActRIIa-mFc(어두운 막대)이었다. y-축: mg/ccm

도 13에서는 12주 치료 동안, 허위 수술된 생쥐에서 골 밀도의 pQCT 분석의 결과를 도시한다. 치료 물질은 대조(PBS; 밝은 막대) 또는 ActRIIa-mFc(어두운 막대)이었다. y-축: mg/ccm.

도 14A와 14B에서는 12주 치료 이후 전신(whole body) DEXA 분석 결과(A) 및 대퇴골(femur)의 체외(ex vivo) 분석(B) 결과를 도시한다. 밝은 구역은 높은 골 밀도 구역을 표시한다.

도 15에서는 12주 치료 이후, 대퇴부 중간뼈골절(femoral midshaft)의 체외 pQCT 분석 결과를 도시한다. 치료 물질은 운반제 대조(PBS, 어두운 막대) 및 ActRIIa-mFc(밝은 막대)이었다. 좌측으로 4개의 막대는 전체 골 밀도를 나타내고, 오른쪽으로 4개의 막대는 피질골(cortical bone) 밀도를 나타낸다. 4개 막대의 각 세트에서 첫 번째 막대 쌍은 난소 적출된 생쥐로부터 데이터를 나타내는 반면, 두 번째 막대 쌍은 허위 수술된 생쥐로부터 데이터를 나타낸다.

도 16에서는 12주 치료 이후, 대퇴부 중간뼈골절의 체외 pQCT 분석 결과와 골간골(diaphyseal bone) 함량을 도시한다. 치료 물질은 운반제 대조(PBS, 어두운 막대) 또는 ActRIIa-mFc(밝은 막대)이었다. 좌측으로 4개의 막대는 전체 골 함량을 나타내고, 우측으로 4개의 막대는 치밀골 함량을 나타낸다. 4개 막대의 각 세트에서 첫 번째 막대 쌍은 난소 적출된 생쥐로부터 데이터를 나타내는 반면, 두 번째 막대 쌍은 허위 수술된 생쥐로부터 데이터를 나타낸다.

도 17에서는 대퇴부 중간뼈골절과 대퇴부 피질 두께의 체외 pQCT 분석 결과를 도시한다. 치료 물질은 대조(PBS,



어두운 막대)와 ActRIIa-mFc(밝은 막대)이었다. 좌측으로 4개의 막대는 뼈안 원주(endosteal circumference)를 나타내고, 우측으로 4개의 막대는 골막 원주(periosteal circumference)를 나타낸다. 4개 막대의 각 세트에서 첫 번째 막대 쌍은 난소 적출된 생쥐로부터 데이터를 나타내고, 두 번째 막대 쌍은 허위 수술된 생쥐로부터 데이터를 나타낸다.

도 18에서는 12주 치료 이후, 대퇴골(femur)의 기계적 검사의 결과를 도시한다. 치료 물질은 대조(PBS, 어두운 막대)와 ActRIIa-mFc(밝은 막대)이었다. 좌측으로 2개의 막대는 난소 적출된 생쥐로부터 데이터를 나타내고, 마지막 2개의 막대는 허위 수술된 생쥐로부터 데이터를 나타낸다.

도 19에서는 소주골 체적에 대한 ActRIIa-mFc의 효과를 도시한다.

도 20에서는 대퇴골 말단부(distal femur) 내에서 골주 구조(trabecular architecture)에 대한 ActRIIa-mFc의 효과를 도시한다.

도 21에서는 치밀골에 대한 ActRIIa-mFc의 효과를 도시한다.

도 22에서는 골의 기계적 강도에 대한 ActRIIa-mFc의 효과를 도시한다.

도 23에서는 3가지 상이한 용량에서 골 특징에 대한 상이한 용량의 ActRIIa-mFc의 효과를 도시한다.

도 24에서는 ActRIIa-mFc가 동화 활성과 항-재흡수 활성을 모두 보유한다는 것을 지시하는 골 조직형태측(bone histomorphometry)을 도시한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 1. 개요

전환 성장 인자(transforming growth factor)-베타(TGF-베타) 대과(superfamily)는 공통 서열 요소와 구조 모티프(structural motif)를 공유하는 다양한 성장 인자를 포함한다. 이들 단백질은 척추동물과 무척추동물 모두에서 다양한 유형의 세포 유형에 생물학적 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 대과의 구성원은 배아 발달(embryonic development) 동안 패턴 형성(pattern formation)과 조직 특수화(tissue specification)에서 중요한 기능을 수행하고, 자연발생(adipogenesis), 근분화(myogenesis), 연골세포분화(chondrogenesis), 발암(cardiogenesis), 조혈(hematopoiesis), 신경발생(neurogenesis), 상피 세포 분화를 비롯한 다양한 분화 과정(differentiation process)에 영향을 줄 수 있다. 상기 군은 2개의 포괄적 분과로 구분된다: BMP/GDF 및 TGF-beta/액티빈/BMP10 분과, 이들의 구성원은 다양하고, 종종 상보적인 효과를 갖는다. TGF-beta 집단의 구성원의 활성을 조작함으로써, 생물체에서 상당한 생리학적 변화를 유도하는 것이 종종 가능하다. 가령, 피에몬테 지방(Piedmontese)과 벨기에(Belgian) 블루 소(Blue cattle) 품종은 근육량에서 눈에 띄는 증가를 유도하는 GDF8(일명, 미오스타틴(myostatin)) 유전자에서 기능 상실(loss-of-function) 돌연변이를 보유한다(Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4). 더 나아가, 인간에서, GDF8의 비활성 대립유전자는 증가된 근육량 및 예외적인 강도와 연관된다(Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8).

액티빈은 TGF-beta 대과에 속하는 이합체 폴리펩티드 성장 인자다. 3가지 기본적인 액티빈 형태(A, B, AB)가 존재하는데, 이들은 2개의 밀접하게 관련된  $\beta$  소단위( $\beta_A\beta_A$ ,  $\beta_B\beta_B$ ,  $\beta_A\beta_B$ )의 동중/이형이합체이다. 이러한 인간 계통은 또한, 액티빈 C와 액티빈 E를 인코딩하는데, 이들은 간에서 일차적으로 발현된다. TGF-베타 대과에서, 액티빈은 난소와 태반 세포에서 호르몬 생산을 촉진하고, 신경 세포 생존을 뒷받침하고, 세포 유형에 따라 세포-주기 진행에 긍정적으로 또는 부정적으로 영향을 주고, 최소한 양서류 배아에서 중배엽 분화(mesodermal differentiation)를 유도할 수 있는 독특한 다기능성 인자다(DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). 게다가, 자극된 인간 단구성 백혈병 세포로부터 분리된 적혈구 분화 인자(erythroid differentiation factor, EDF)가 액티빈 A에 동일한 것으로 밝혀졌다(Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). 액티빈 A는 골수(bone marrow)에서 적혈구 생성(erythropoiesis)의 자연적인 양성 조절인자로서 기능하는 것으로 제안되었다. 여러 조직에서, 액티빈 신호전달은 관련된 이형이합체, 인히빈(inhibin)에 의해 길항된다. 가령, 뇌하수체(pituitary)로부터 난포선-자극 호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH)의 방출 동안, 액티빈은 FSH 분비와 합성을 촉진하는 반면, 인히빈은 FSH 분비와 합성을 차단한다. 액티빈 생물활성을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질에는 폴리스타틴(follistatin, FS), 폴리스타틴-관련된 단백질(follistatin-related protein, FSRP),  $\alpha_2$ -거대글로불린(macroglobulin), 케르베로스(Cerberus), 엔도글린

(endoglin) 등이 포함된다.

[0039] TGF- $\beta$  신호는 리간드 자극후 하류 Smad 단백질을 인산화시키고 활성화시키는 타입 I과 타입 II 세린/트레오닌 키나아제 수용체의 이형이합체 복합체에 의해 매개된다(Massague, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 : 169-178). 이들 타입 I과 타입 II 수용체는 시스테인-풍부한 영역을 포함하는 리간드-결합 세포의 도메인, 막통 도메인 및 예측된 세린/트레오닌 특이성을 보유하는 세포질 도메인으로 구성되는 막통 단백질이다. 타입 I 수용체는 신호전달에 필수적이다; 타입 II 수용체는 결합 리간드 및 타입 I 수용체 발현에 요구된다. 타입 I과 II 액티빈 수용체는 리간드 결합후 안정적인 복합체를 형성하고, 타입 II 수용체에 의한 타입 I 수용체의 인산화(phosphorylation)를 결과한다.

[0040] 2가지 관련된 타입 II 수용체, ActRIIa와 ActRIIb는 액티빈에 대한 타입 II 수용체로서 확인되었다(Mathews and Vale, 1991, Cell 65 : 973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). 액티빈 이외에, ActRIIa와 ActRIIb는 BMP7, Nodal, GDF8과 GDF11을 비롯한 여러 다른 TGF- $\beta$  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. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4는 액티빈, 특히, 액티빈 A에 대한 일차 타입 I 수용체이고, ALK-7 역시 액티빈, 특히, 액티빈 B에 대한 수용체로서 기능한다.

[0041] 본 명세서에서 예시된 바와 같이, 다른 TGF-베타 집단 구성원, 예를 들면, GDF8 또는 GDF11과 대조적으로, 액티빈 A에 대한 결합에서 실질적인 편애를 나타내는 가용성 ActRIIa 폴리펩티드(sActRIIa)는 생체내에서 골 성장을 촉진하고 골 밀도를 증가시키는데 유효하다. 임의의 특정 기전에 한정됨 없이, sActRIIa의 효과는 이들 연구에 이용된 특정 sActRIIa 구조체가 나타내는 매우 강한 액티빈 결합(피코몰 해리 상수)을 고려할 때, 액티빈 길항제 효과에 의해 일차적으로 유도되는 것으로 생각된다. 기전에 상관없이, 본 명세서에 제공된 데이터로부터, ActRIIa-액티빈 길항제가 정상 생쥐와 골다공증 생쥐 모형에서 골 밀도를 증가시킨다는 것은 명백하다. 골은 골을 생산하고 무기화를 촉진하는 인자(일차적으로, 조골세포) 및 골을 파괴하고 탈염시키는 인자(일차적으로, 파골세포)의 균형에 따라 성장하거나 수축하고 밀도가 증가하거나 감소하는 동적 조직이다. 골 성장과 무기화는 생산 인자(productive factor)를 증가시키거나, 파괴 인자(destructive factor)를 감소시키거나, 또는 둘 모두를 통하여 증가될 수 있다. "골 성장 촉진"과 골 무기화 증가"는 골에서 관찰가능한 신체 변화를 지칭하고, 골에서 변화가 진행되는 기전에는 중립적인 것으로 의도된다.

[0042] 본 명세서에 기술된 연구에 이용된 골다공증 및 골 성장/밀도에 대한 생쥐 모형은 인간에서 효능을 고도로 예측하는 것으로 간주되고, 따라서, 본 발명에서는 인간에서 골 성장을 촉진하고 골 밀도를 증가시키기 위하여 ActRIIa 폴리펩티드와 다른 액티빈-ActRIIa 길항제를 이용하는 방법을 제시한다. 액티빈-ActRIIa 길항제에는 예로써, 액티빈-결합 가용성 ActRIIa 폴리펩티드, 액티빈(특히, 액티빈 A 또는 B 아단위;  $\beta$ A 또는  $\beta$ B)에 결합하고 ActRIIa 결합을 파괴하는 항체, ActRIIa에 결합하고 액티빈 결합을 파괴하는 항체, 액티빈 또는 ActRIIa 결합을 위하여 선택된 비-항체 단백질(이들 단백질의 실례 및 이들을 설계하고 선별하는 방법은 WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, US 2003/0133939, US 2005/0238646을 참조한다), 액티빈 또는 ActRIIa 결합을 위하여 선택된 무작위화된 펩티드(randomized peptide)가 포함되고, 이들은 종종 Fc 도메인에 부착된다. 액티빈 또는 ActRIIa 결합 활성을 보유하는 2가지 상이한 단백질(또는 다른 모이어티(moiety)), 특히, 타입 I(가령, 가용성 타입 I 액티빈 수용체)과 타입 II(가령, 가용성 타입 II 액티빈 수용체) 결합 부위를 각각 차단하는 액티빈 결합제(binder)는 서로 연결되어 이중기능성 결합 분자를 산출할 수 있다. 핵산 압타머, 소형 분자 및 액티빈-ActRIIa 신호전달 축을 저해하는 다른 작용제. 인히빈(즉, 인히빈 알파 아단위(inhibin alpha subunit))(하지만, 인히빈이 모든 조직에서 액티빈을 예외 없이 중화하는 것은 아니다), 폴리스타틴(가령, 폴리스타틴-288과 폴리스타틴-315), 케르베로스, FSRP, 엔도글린, 액티빈 C, 알파(2)-거대글로불린, M108A(108 위치에서 메티오닌에서 알라닌으로 변화) 변이체 액티빈 A를 비롯한 다양한 단백질이 액티빈-ActRIIa 길항제 활성을 보유한다. 일반적으로, 대안적 형태의 액티빈, 특히, 타입 I 수용체 결합 도메인 내에서 변형을 포함하는 액티빈은 타입 II 수용체에 결합할 수 있고 활성 3차원 복합체를 형성하지 못하고, 따라서 길항제로서 기능한다. 부가적으로, 액티빈 A, B, C 또는 E, 또는, 특히, ActRIIa 발현을 저해하는 핵산, 예를 들면, 안티센스 분자(antisense molecule), siRNA 또는 리보자임은 액티빈-ActRIIa 길항제로서 이용될 수 있다. 적절하게는, 이용되는 액티빈-ActRIIa 길항제는 TGF-베타 집단의 다른 구성원, 특히, GDF8과 GDF11에 비하여 액티빈-매개된 신호전달을 저해하는데 선택성을 보일 것이다. 가용성 ActRIIb 단백질이 액티빈에 결합하지만, 이러한 야생형 단백질은 GDF8/11에 비하여 액티빈에 대한 결합에서 현저한 선택성을 나타내지 않고, 예비 실험에서 상기 단백질은 골에 원하는 효과를 제공하지는 못하면서 상당한 근육 성장을 유발하는 것

으로 밝혀졌다. 하지만, 상이한 결합 특성을 보유하는 변형된 형태의 ActRIIb가 확인되었는데(참조: WO 2006/012627, pp. 55-59), 이들 단백질은 골에서 원하는 효과를 달성할 수 있다. 고유 ActRIIb 또는 변형된 ActRIIb는 이차 액티빈-선택성 결합제와의 결합으로, 액티빈에 대한 추가적인 특이성이 제공될 수 있다.

[0043] 본 명세서에 이용된 용어는 일반적으로, 본 발명의 배경 및 각 용어가 이용되는 특정 상황에서 통상적인 의미를 갖는다. 본 명세서에서 언급된 특정 용어는 본 발명의 조성물과 방법 및 이들을 제조하고 이용하는 방법을 기술함에 있어 실시자에게 추가적인 보도(guidance)를 제공한다. 이용되는 용어의 범위 또는 의미는 상기 용어가 이용되는 특정 상황으로부터 명백할 것이다.

[0044] "대략"은 일반적으로, 측정의 성격 또는 정밀도(precision)를 고려할 때 측정된 양에 대한 오차의 수용가능 정도를 의미한다. 전형적으로, 오차 정도는 주어진 수치 또는 수치 범위의 20% 이내, 바람직하게는, 10% 이내, 더욱 바람직하게는, 5% 이내이다.

[0045] 대안으로, 특히, 생물학적 시스템에서, "대략"은 주어진 수치의 1 크기 자릿수(order of magnitude) 이내, 바람직하게는, 5-배 이내, 더욱 바람직하게는, 2-배 이내의 수치를 의미한다. 본 명세서에 제공된 수치량은 달리 명시하지 않는 경우에 근사치인데, 이는 "대략"이 명기되지 않을 때 추량될 수 있음을 의미한다.

[0046] 본 발명의 방법은 야생형 서열을 하나이상의 변이체(서열 변이체)에 비교하는 것을 비롯하여 서열을 서로 비교하는 단계를 포함한다. 이런 비교는 전형적으로, 예로써, 당분야에 널리 공지된 서열 정렬 프로그램 및/또는 알고리즘(가령, BLAST, FASTA, MEGALIGN 등)을 이용한 중합체 서열의 정렬을 포함한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 돌연변이가 잔기 삽입(insertion) 또는 결실(deletion)을 포함하는 이런 정렬에서, 서열 정렬은 삽입되거나 결실된 잔기를 포함하지 않는 중합체 서열 내에 "갭(gap)"(전형적으로, 대시(dash), 또는 "A"로 표시됨)을 도입한다.

[0047] "상동한(homologous)"은 모든 문법적 형태와 스펠링 이형에서, 동일한 생물체 종에서 대과로부터 단백질 및 상이한 생물체 종으로부터 상동성 단백질을 비롯하여, "공통의 진화적 기원"을 보유하는 두 단백질 사이에 상관관계를 지칭한다. 이런 단백질(및 이들의 인코딩 핵산)은 동일성 비율(percent identity)의 측면에서, 또는 특정 잔기 또는 모티프와 보존된 위치에 의해, 그들의 서열 유사성(sequence similarity)에 의해 반영되는 서열 상동성(homology)을 보유한다.

[0048] "서열 유사성"은 모든 문법적 형태에서, 공통의 진화적 기원을 공유하거나 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 동일성 또는 상응성(correspondence)의 정도를 지칭한다.

[0049] 하지만, 통상적으로, 그리고 본 명세서에서, "고도로"와 같은 부사로 수식되는 "상동한"은 서열 유사성을 지칭하고, 공통의 진화적 기원에 관련되거나 관련되지 않는다.

## [0050] 2. ActRIIa 폴리펩티드

[0051] 특정 측면에서, 본 발명은 ActRIIa 폴리펩티드에 관계한다. 본 명세서에서, "ActRIIa"는 임의 종으로부터 액티빈 수용체 타입 IIa(ActRIIa) 단백질의 집단 및 돌연변이유발(mutagenesis) 또는 다른 변형에 의해 이런 ActRIIa 단백질로부터 유래된 변이체를 지칭한다. 본 명세서에서 ActRIIa에 대한 언급은 현재까지 확인된 형태 중에서 하나에 대한 언급인 것으로 이해되어야 한다. ActRIIa 집단의 구성원은 일반적으로, 시스템인-풍부한 영역을 포함하는 리간드-결합 세포의 도메인, 막통 도메인 및 예측된 세린/트레오닌 키나아제 활성을 보유하는 세포질 도메인으로 구성되는 막통 단백질이다.

[0052] "ActRIIa 폴리펩티드"에는 ActRIIa 집단 구성원의 임의의 자연 발생 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 및 유용한 활성을 유지하는 이들의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체, 펩티드유사 형태(peptidomimetic form) 포함)가 포함된다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드에는 ActRIIa 폴리펩티드 서열에 최소한 80% 동일한, 바람직하게는, 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 갖는, 임의의 공지된 ActRIIa의 서열로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 단백질 및/또는 액티빈에 결합하고 이들의 기능을 저해한다. 적절하게는, ActRIIa 폴리펩티드는 골 성장과 골 무기화를 촉진한다. ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 인간 ActRIIa 전구체 폴리펩티드(SEQ ID NO: 1) 및 가용성 인간 ActRIIa 폴리펩티드(가령, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12).

[0053] 인간 ActRIIa 전구체 단백질 서열은 아래와 같다:

MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTN  
QTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCY  
DRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTQPTSNP  
VTPKPPYYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVL  
VPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEY  
VAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTS  
VDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLA  
YLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGLA  
LKFEAGKSAGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQORDAFLRIDM  
YAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEIEIGQHPSLEDMQE  
VVVHKKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAG  
CVGERITQMORLTNIITTEDIVTVVMTVNTVDFPPKESL  
(SEQ ID NO: 1)

[0054]

[0055] 신호 펩티드는 단일선으로 표시된다; 세포외 도메인은 굵게 표시되고, 잠재적인 N-연결된 글리코실화 부위는 이 중선으로 표시된다.

[0056] 인간 ActRIIa 가용성(세포외), 처리된 폴리펩티드 서열은 아래와 같다:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT  
WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCE  
GNMCNEKFSYFPMEVQTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

[0058]

[0059] 세포외 도메인의 C-말단 "꼬리"는 밑줄로 표시된다. "꼬리" 결실된 서열(Δ15 서열)은 아래와 같다:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFAT  
WKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCE  
GNMCNEKFSYFPME (SEQ ID NO:3)

[0060]

[0061] 인간 ActRIIa 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다(Genbank entry NM\_001616의 뉴클레오타이드 164-1705):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGCTCTTCTTATCTCCTGTTCTT  
CAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGC  
TAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAACCGTGTATGGT  
GACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTT  
CCATTGAAATAGTGAAACAAGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGA  
CAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGTGTC  
TGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAG  
TCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCCTATTACACAT  
CCTGCTCTATTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGT  
GCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCCTCCTGTACTGTTC  
CAACTCAAGACCCAGGACCACCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACC  
ACTGCGATTATTAGAAGTGAAAGCAAGGGAAGATTTGGTTGTGCTGGAAA  
GCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACA  
AACAGTCATGGCAAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCA  
TGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACCAAGTGTGAT  
GTGGATCTTTGGCTGATCAGCATTTTATGAAAAGGGTTCATATCAGACT  
TTCTTAAGGCTAATGTGCTCTCTTGAATGAACGTGTGCATATTGCAGAAAC  
CATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAGAT  
GGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGT

[0062]



TGAAAAACAACCTGACAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATT  
TGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGG  
TACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGTATAAACTTCCAAAGGGATGCAT  
TTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCCATGGGAACTGGCTTC  
TCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAG  
GAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGC  
ATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAAT  
GGCAATGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCC  
AGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAA  
CAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAA  
TGTTGACTTTTCCTCCCAAGAATCTAGTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

[0063]

[0064]

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

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGCTTTTCTTTAATGCTAATTGGG  
AAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGA  
TAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAA  
ATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTG  
ATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGTGCTGTGAGGG  
CAATATGTGTAAAGTATTTCTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAG  
CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID NO: 5)

[0065]

[0066]

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 임의의 자연 발생 세포외 도메인 및 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 펩티드 유사 형태 포함)가 포함된다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 액티빈, 특히, 액티빈 AA, AB 또는 BB에 결합하는 능력을 유지하는 폴리펩티드다. 적절하게는, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 1 nM 이하의 해리 상수로 액티빈 AA에 결합한다. 인간 ActRIIa 전구체 단백질의 아미노산 서열은 하기에 제공된다. ActRIIa 단백질의 세포외 도메인은 액티빈에 결합하고, 일반적으로 가용성이며, 따라서, 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드로 명명될 수 있다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12, 13에 예시된 가용성 폴리펩티드가 포함된다. SEQ ID NO: 7은 ActRIIa-hFc로 지칭되고, 실시예에서 더욱 구체적으로 기술된다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드의 다른 실례는 ActRIIa 단백질의 세포외 도메인 이외에, 신호 서열, 예를 들면, 꿀벌 멜리틴(melittin) 리더 서열(SEQ ID NO: 8), 조직 플라미노겐 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.

[0067]

ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 활성 단편은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 상응하는 단편으로부터 재조합 방식으로 생산된 폴리펩티드를 선별함으로써 획득될 수 있다. 이에 더하여, 단편은 당분야에 공지된 기술, 예를 들면, 통상적인 Merrifield 고체상(solid phase) f-Moc 또는 t-Boc 화학을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 이들 단편은 생산하고(재조합 방식으로 또는 화학적 합성으로) 검사하여, ActRIIa 단백질, 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항제(저해물질)로서 기능할 수 있는 펩티드 단편을 확인할 수 있다.

[0068]

ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 활성 변이체는 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 상응하는 돌연변이된 핵산으로부터 재조합 방식으로 생산된 변형된 폴리펩티드의 라이브러리(library)를 선별함으로써 획득될 수 있다. 이들 변이체는 생산하고 검사하여, ActRIIa 단백질, 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항제(저해물질)로서 기능할 수 있는 변이체를 확인할 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, 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0069]

기능적 변이체는 치료 효능(therapeutic efficacy), 또는 안정성(가령, 체외 반감기 및 생체내 단백질 분해 변성에 대한 내성)의 강화와 같은 목적을 위하여 ActRIIa 폴리펩티드의 구조를 변형함으로써 산출되는데, 액티빈 결합을 유지하도록 선택되는 이런 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 자연-발생 ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 등가물(functional equivalent)로 간주된다. 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 예로써, 아미노산 치환, 결실, 또는 부가에



의해 산출될 수도 있다. 가령, 루이신(leucine)의 이소루이신(isoleucine) 또는 발린(valine)으로의 고립된 치환, 아스파라긴산염(aspartate)의 글루타민산염(glutamate)으로의 고립된 치환, 트레오닌(threonine)의 세린(serine)으로의 고립된 치환, 또는 구조적으로 관련된 아미노산으로 아미노산의 유사 치환(가령, 보존성 돌연변이(conservative mutations))이 생성 분자의 생물학적 활성에 별다른 영향을 주지 않을 것으로 기대하는 것은 합당하다. 보존성 치환(conservative replacement)은 측쇄(side chain)에서 관련된 아미노산 집단 내에 위치하는 아미노산간 치환이다. ActRIIa 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화가 기능성 동족체(functional homolog)를 결과하는 지의 여부는 야생형 ActRIIa 폴리펩티드에서와 유사한 방식으로 세포내 반응을 산출하는 변이체 ActRIIa 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0070] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 폴리펩티드의 글리코실화를 변화시키기 위하여 ActRIIa 폴리펩티드의 특이적인 돌연변이를 고려한다. 이런 돌연변이는 하나이상의 글리코실화 부위, 예를 들면, O-연결된 또는 N-연결된 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하기 위하여 선택된다. 아스파라긴-연결된 글리코실화 인식 부위는 일반적으로, 적절한 세포 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트리펩티드(tripeptide) 서열, 아스파라긴-X-트레오닌(또는 아스파라긴-X-세린)(여기서, "X"는 임의의 아미노산이다)을 포함한다. 이러한 변형은 야생형 ActRIIa 폴리펩티드의 서열에 하나이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 추가 또는 이런 잔기에 의한 치환(O-연결된 글리코실화 부위의 경우)에 의해 달성될 수도 있다. 글리코실화 인식 부위의 첫 번째 또는 세 번째 아미노산 위치의 한쪽 또는 양쪽에서 다양한 아미노산 치환 또는 결실(및/또는 두 번째 위치에서 아미노산 결실)은 변형된 트리펩티드 서열에서 비-글리코실화를 유발한다. ActRIIa 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 총수를 증가시키는 다른 수단은 ActRIIa 폴리펩티드에 글리코시드(glycoside)의 화학적 또는 효소적 결합이다. 이용된 결합 양식(coupling mode)에 따라, 당은 (a) 아르기닌(arginine)과 히스티딘(histidine); (b) 유리 카르복시기(free carboxyl group); (c) 유리 설피드릴 기(free sulfhydryl group), 예를 들면, 시스테인; (d) 유리 하이드록실기(free hydroxyl group), 예를 들면, 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린(hydroxyproline); (e) 방향족 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 또는 트립토판(tryptophan); 또는 (f) 글루타민(glutamine)의 아마이드기(amide group)에 부착될 수 있다. 이들 방법은 1987년 9월 11일자 공개된 WO 87/05330 및 Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306에서 기술된다. ActRIIa 폴리펩티드 상에 존재하는 하나이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화(deglycosylation)는 예로써, 화합물 트리플루오르메탄설포산(trifluoromethanesulfonic acid), 또는 등가의 화합물에 ActRIIa 폴리펩티드의 노출을 수반한다. 이러한 처리는 아미노산 서열 원래 상태로 유지하면서, 연결 당(linking sugar)(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 전체 당의 절단을 결과한다. 화학적 탈글리코실화는 Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 및 Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131에서 더욱 상세하게 기술된다. ActRIIa 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350에 기술된 바와 같이, 다양한 엔도-와 엑소-글리코시다아제의 이용으로 달성될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드의 서열은 포유동물, 효모, 곤충과 식물 세포 모두 상기 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴을 도입하기 때문에, 이용된 발현 시스템의 타입에 따라, 적절히 조정될 수 있다. 일반적으로, 인간에 이용되는 ActRIIa 단백질은 다른 포유동물 발현 세포주, 가공된 글리코실화 효소를 포함하는 효모 세포주 및 곤충 세포 역시 유용할 것으로 기대되긴 하지만, 적절한 글리코실화를 제공하는 포유동물 세포주, 예를 들면, HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현된다.

[0071] 본 발명에서는 돌연변이체, 특히, ActRIIa 폴리펩티드의 조합 돌연변이체(combinatorial mutant) 세트 및 절두 돌연변이체(truncation mutant)를 산출하는 방법을 더욱 고려한다; 조합 돌연변이체의 집합은 기능적 변이체 서열을 확인하는데 특히 유용하다. 이런 조합 라이브러리(combinatorial library)를 선별하는 목적은 예로써, 항진제(agonist) 또는 길항제로서 기능할 수 있거나, 또는 대안으로, 새로운 활성을 보유하는 ActRIIa 폴리펩티드 변이체를 산출하는 것이다. 다양한 선별 검사법(screening assay)이 아래에 제공되는데, 이들 검사법은 변이체를 평가하는데 이용될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 변이체는 ActRIIa 리간드에 결합하거나, ActRIIa 폴리펩티드에 ActRIIa 리간드의 결합을 예방하거나, 또는 ActRIIa 리간드에 의해 유발된 신호전달을 간섭하는 능력에 대하여 선별될 수 있다.

[0072] ActRIIa 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성 역시 세포내-기초된 또는 생체내 검사법으로 조사될 수 있다. 가령, 골 생산 또는 골 파괴에 관여하는 유전자의 발현에 대한 ActRIIa 폴리펩티드 변이체의 효과가 평가된다. 이는 필요한 경우에, 하나이상의 재조합 ActRIIa 리간드 단백질(가령, 액티빈)의 존재에서 수행되고, 세포는 ActRIIa 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 그리고 임의적으로, ActRIIa 리간드를 생산하기 위하여 형질감염된다. 유사하게, ActRIIa 폴리펩티드는 생쥐 또는 다른 동물에 투여되고, 하나이상의 골 특성, 예를 들

면, 밀도 또는 체적이 평가된다. 골 골절의 치유 속도 역시 평가될 수 있다. 이중-에너지 X-선 흡광광도법(Dual-energy x-ray absorptiometry, DEXA)은 동물에서 골 밀도를 평가하기 위한 널리-확립된 비-침해성 정량 기술이다. 인간에서 중심 DEXA 시스템을 이용하여 척주와 골반에서 골 밀도를 평가할 수 있다. 이들은 전체 골 밀도의 최고 예측인자다. 말단 DEXA 시스템을 이용하여 예로써, 손, 손목, 발목과 발의 골을 비롯한 말단골(peripheral bone)에서 골 밀도를 평가할 수 있다. CAT 스캔을 비롯한 전통적인 x-선 조영 시스템(imaging system)을 이용하여 골 성장과 골절 치유를 평가할 수 있다. 골의 기계적 강도 역시 평가될 수 있다.

[0073] 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 선택성 또는 전반적으로 증가된 효능을 보유하는 조합적으로-유도된 변이체가 산출될 수 있다. 유사하게, 돌연변이유발은 상응하는 야생형 ActRIIa 폴리펩티드와 극적으로 상이한 세포내 반감기를 보유하는 변이체를 산출할 수 있다. 가령, 변형된 단백질은 고유 ActRIIa 폴리펩티드의 파괴, 또는 비활성화(inactivation)를 유발하는 단백질 분해 변형 또는 다른 세포 과정에 더욱 안정한 또는 덜 안정하게 될 수 있다. 이런 변이체 및 이들을 인코딩하는 유전자는 ActRIIa 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 ActRIIa 폴리펩티드 수준을 변화시키는데 이용될 수 있다. 가령, 짧은 반감기는 더욱 일시적인 생물학적 효과를 유도할 수 있고, 환자 내에서 재조합 ActRIIa 폴리펩티드 수준의 더욱 엄격한 제어를 가능하게 한다. Fc 융합 단백질에서, 돌연변이는 상기 단백질의 반감기를 변화시키기 위하여 링커 및/또는 Fc 부분 내에서 수행될 수 있다.

[0074] 조합 라이브러리는 최소한, 잠재적인 ActRIIa 폴리펩티드 서열의 일부분을 각각 포함하는 폴리펩티드 라이브러리를 인코딩하는 유전자의 축퇴 라이브러리(degenerate library)에 의해 산출될 수 있다. 가령, 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물은 잠재적인 ActRIIa 폴리펩티드 뉴클레오타이드 서열의 축퇴 세트가 개별 펩티드로서 발현되거나, 또는 대안으로, 더욱 큰 융합단백질의 한 세트(가령, 파지 전시(phage display)의 경우)로서 발현되도록 유전자 서열 내에 효소적으로 결합될 수 있다.

[0075] 잠재적인 동족체의 라이브러리가 축퇴 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 산출될 수 있는 많은 방법이 존재한다. 축퇴 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기 내에서 수행될 수 있고, 합성 유전자는 이후, 발현을 위한 적절한 벡터 내로 결합될 수 있다. 축퇴 올리고뉴클레오타이드의 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 지향된 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, 5,198,346, 5,096,815).

[0076] 대안으로, 조합 라이브러리를 산출하기 위하여 다른 형태의 돌연변이유발이 이용될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 변이체는 예로써, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발(alanine scanning mutagenesis) 등(Ruf et al., (1994) Biochemistry 33: 1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; 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 돌연변이유발(saturation mutagenesis)(Meyers et al., (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이유발(Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 또는 화학적 돌연변이 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 이용한 선별에 의해 라이브러리로부터 산출되고 분리될 수 있다. 특히 조합 세팅(combinatorial setting)에서 링커 스캐닝 돌연변이유발(linker scanning mutagenesis)은 절두된(생물활성) 형태의 ActRIIa 폴리펩티드를 확인하기 위한 매력적인 방법이다.

[0077] 점 돌연변이(point mutation)와 절두(truncation)에 의해 산출된 조합 라이브러리의 유전자 산물을 선별하고, 특히, 특정 특성을 보유하는 유전자 산물에 대한 cDNA 라이브러리를 선별하기 위한 다양한 기술이 당분야에 공지되어 있다. 이런 기술은 일반적으로, ActRIIa 폴리펩티드의 조합 돌연변이유발(combinatorial mutagenesis)에 의해 산출된 유전자 라이브러리의 신속한 선별에 적용된다. 대형 유전자 라이브러리를 선별하는데 가장 널리 이용되는 기술은 전형적으로, 이러한 유전자 라이브러리를 복제가능 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 생성된 라이브러리 벡터로 적절한 세포를 형질전환하는 단계; 원하는 활성의 탐지가 산물이 탐지된 유전자를 인코딩하는

벡터의 상대적으로 용이한 분리를 가능하게 하는 조건 하에 이들 조합 유전자(combinatorial gene)를 발현하는 단계를 포함한다. 바람직한 검사법에는 액티빈 결합 검사법 및 액티빈-매개된 세포 신호전달 검사법이 포함된다.

[0078] 특정 구체예에서, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드 자연적으로 존재하는 변형 이외에 번역 후 변형을 추가로 포함한다. 이런 변형에는 아세틸화(acetylation), 카르복실화(carboxylation), 글리코실화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 지질화(lipidation), 아실화(acylation) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 결과적으로, 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 지질(lipid), 폴리- 또는 모노-사카라이드, 인산염을 포함한다. ActRIIa 폴리펩티드의 기능성에 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 가공(post-translational processing) 역시 상기 단백질의 정확한 접힘(folding) 및/또는 기능에 중요하다. 상이한 세포(가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이런 번역후 활성을 위한 특이적인 세포 조직(cellular machinery)과 특징적인 기전을 보유하고, ActRIIa 폴리펩티드의 정확한 변형과 가공을 담보하도록 선택된다.

[0079] 특정 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 변이체 또는 변형된 형태에는 ActRIIa 폴리펩티드의 최소한 일부 분 및 하나이상의 융합 도메인을 갖는 융합 단백질이 포함된다. 이런 융합 도메인의 널리 공지된 실례에는 폴리히스티딘(polyhistidine), Glu-Glu, 글루타티온 S 전달효소(glutathione S transferase, GST), 티오레독신(thioredoxin), 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토오스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 특성을 공여하도록 선택될 수 있다. 가령, 일부 융합 도메인은 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 분리에 특히 유용하다. 친화성 정제를 위하여, 친화성 크로마토그래피에 적합한 매트릭스(matrix), 예를 들면, 글루타티온-, 아밀라아제-, 그리고 니켈- 또는 코발트-공액된 수지가 이용된다. 대부분의 이들 매트릭스는 "키트" 형태, 예를 들면, Pharmacia GST 정제 시스템 및 (HIS<sub>6</sub>) 융합 파트너와 유용한 QIAexpress™ 시스템(Qiagen)으로 가용하다. 다른 실례로써, 융합 도메인은 ActRIIa 폴리펩티드의 탐지를 용이하게 하도록 선택된다. 이런 탐지 도메인의 실례에는 다양한 형광 단백질(가령, GFP) 및 특이적인 항체가 가용한 일반적으로 짧은 펩티드 서열인 "에피토프 태그(epitope tag)"가 포함된다. 특이적인 단클론 항체가 용이하게 가용한 널리 공지된 에피토프 태그에는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(influenza virus haemagglutinin, HA), c-myc 태그 등이 포함된다. 일부 사례에서, 융합 도메인은 관련된 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 절단하여 이로부터 재조합 단백질을 유리할 수 있도록 하는 프로테아제 절단 부위, 예를 들면, 인자 Xa 또는 트롬빈(thrombin)에 대한 절단 부위를 보유한다. 유리된 단백질은 이후, 차후의 크로마토그래피 분리(chromatographic separation)에 의해 융합 도메인으로부터 분리될 수 있다. 바람직한 특정 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 생체내에서 ActRIIa 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인("안정제" 도메인)과 융합된다. "안정화"는 이러한 안정화가 감소된 파괴, 신장에 의한 감소된 제거, 또는 다른 약물동력학적 효과에 기인하는 지에 상관없이, 혈청 반감기를 증가시키는 무언가를 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 단백질에 바람직한 약물동력학적 특성을 공여하는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 융합이 바람직한 특성을 공여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 유형의 융합 도메인에는 다합체화(가령, 이합체화, 사합체화) 도메인 및 기능적 도메인(원하는 경우에, 부가적인 생물학적 기능, 예를 들면, 골 성장 또는 근육 성장의 추가적인 자극을 공여한다)이 포함된다.

[0080] 특정 실례로써, 본 발명에서는 Fc 도메인에 융합된 ActRIIa의 가용성 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질(가령, SEQ ID NO: 6)을 제시한다.

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A) VSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKAL  
 FVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGPFYLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHN(A) HYT  
 QKSLSLSPGK\*

[0081]

[0082] 임의적으로, Fc 도메인은 Asp-265, 리신 322, Asn-434와 같은 잔기에서 하나이상의 돌연변이를 보유한다. 특정 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나이상(가령, Asp-265 돌연변이)을 보유하는 변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 대한 결합 능력이 감소한다. 다른 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나이상(가령, Asn-434 돌연변이)을 보유하는 변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC 클래스 I-관련된 Fc-수



용체(FcRN)에 대한 결합 능력이 증가한다.

- [0083] 이들 융합 단백질의 상이한 요소는 원하는 기능성(functionality)과 일치하는 방식으로 정렬될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드가 이질성 도메인에서 C-말단에 위치하거나, 또는 대안으로, 이질성 도메인이 ActRIIa 폴리펩티드에서 C-말단에 위치한다. ActRIIa 폴리펩티드 도메인 및 이질성 도메인은 융합 단백질 내에서 반드시 인접할 필요가 없고, 부가적인 도메인 또는 아미노산 서열이 한쪽 도메인에서 C- 또는 N-말단, 또는 이들 도메인 사이에 포함된다.
- [0084] 특정 구체예에서, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나이상의 변형을 포함한다. 가령, 이런 변형은 ActRIIa 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 강화시키거나, ActRIIa 폴리펩티드의 순환 반감기(circulatory half-life)를 강화시키거나, 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 단백질 분해 변성을 감소시킨다. 이런 안정화 변형에는 융합 단백질(가령, ActRIIa 폴리펩티드와 안정제 도메인을 포함하는 융합 단백질), 글리코실화 부위의 변형(가령, ActRIIa 폴리펩티드에 글리코실화 부위의 추가), 탄수화물 모이어티(carbohydrate moiety)의 변형(가령, ActRIIa 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거) 등이 포함된다. 융합 단백질의 경우에, ActRIIa 폴리펩티드는 IgG 분자(가령, Fc 도메인)와 같은 안정제 도메인에 융합된다. 본 명세서에서, "안정제 도메인"은 융합 단백질의 경우에서 융합 도메인(가령, Fc)을 지칭할 뿐만 아니라, 탄수화물 모이어티와 같은 비-단백질성 변형, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비-단백질성 중합체를 포괄한다.
- [0085] 특정 구체예에서, 본 발명은 ActRIIa 폴리펩티드의 분리된 및/또는 정제된 형태를 가용하게 하는데, 이들은 다른 단백질로부터 분리되거나, 또는 다른 단백질이 실질적으로 부재한다. ActRIIa 폴리펩티드는 일반적으로, 재조합 핵산으로부터 발현으로 생산된다.
- [0086] 3. ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산
- [0087] 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 또는 이중-가닥이다. 이런 핵산은 DNA 또는 RNA 분자다. 이들 핵산은 예로써, ActRIIa 폴리펩티드를 제조하는 방법에, 또는 직접적인 치료제(가령, 유전자 치료법에서)로서 이용된다.
- [0088] 특정 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 핵산에는 SEQ ID NO: 4 또는 5의 변이체 핵산 역시 포함된다. 변이체 뉴클레오티드 서열에는 하나이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 구별되는 서열, 예를 들면, 대립형질 변이체가 포함된다.
- [0089] 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 및 SEQ ID NO: 4 또는 5의 변이체 역시 본 발명의 범위 내에 속한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 서열은 분리되거나, 재조합되거나 및/또는 이질성 뉴클레오티드 서열과, 또는 DNA 라이브러리 내에 융합될 수 있다.
- [0090] 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산에는 높은 엄밀도 조건(stringent condition) 하에 SEQ ID NO: 4 또는 5에 열거된 뉴클레오티드 서열에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열, SEQ ID NO: 4 또는 5의 보체 서열, 또는 이들의 단편이 포함된다. 앞서 언급된 바와 같이, 당업자는 DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄밀도(stringency) 조건이 변화될 수 있음을 용이하게 이해할 것이다. 당업자가 인지하는 바와 같이, DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄밀도 조건은 변화될 수 있다. 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.
- [0091] 유전자 코드에서 축퇴로 인하여 SEQ ID NO: 4 또는 5에 열거된 핵산과 차별되는 분리된 핵산 역시 본 발명의 범위 내에 속한다. 가령, 다수의 아미노산이 하나이상의 삼중항(triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 명기하는 코돈, 또는 동종이명(synonym)(가령, CAU와 CAC는 히스티딘의 동종이명(synonym)이다)은 단백질의 아미

노산 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 하나이상의 뉴클레오티드에서 이들 변이(뉴클레오티드의 최대 3-5%)가 자연적인 대립형질 변이로 인하여 특정한 종의 개체 사이에 존재할 수 있다. 이와 같은 뉴클레오티드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 내에 속한다.

[0092] 특정 구체예에서, 본 발명의 재조합 핵산은 발현 구조체 내에서 하나이상의 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 하나이상의 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 하나이상의 프로모터의 요소를 통합하는 하이브리드 프로모터이다. 발현 구조체는 세포 내에서 에피솜(episome), 예를 들면, 플라스미드(plasmid) 상태로 존재하거나, 또는 발현 구조체는 염색체 내로 삽입된다. 바람직한 구체예에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선별을 가능하게 하는 선별가능 마커 유전자를 포함한다. 선별가능 마커 유전자는 당분야에 널리 공지되어 있고, 이용된 숙주 세포에 따라 변한다.

[0093] 본 발명의 특정 측면에서, 본 발명의 핵산은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 최소한 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 발현 벡터(expression vector)에 담겨 제공된다. 조절 서열은 당분야에서 인지되고, ActRIIa 폴리펩티드의 발현을 관리하도록 선택된다. 따라서, 조절 서열에는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소가 포함된다. 전형적인 조절 서열은 Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 기술된다. 가령, 작동가능하게 연결되면 DNA 서열의 발현을 제어하는 다양한 발현 제어 서열은 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, 바쿨로바이러스(baculovirus) 시스템의 다면체(polyhedron) 프로모터, 원핵동물이나 진핵동물 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 알려져 있는 다른 서열, 이들의 다양한 조합 등이 포함된다. 발현 벡터의 설계는 형질전환되는 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되는 원하는 단백질의 타입과 같은 인자에 좌우된다. 게다가, 벡터의 사본수(copy number), 사본수를 제어하는 능력 및 상기 벡터에 의해 인코딩되는 임의의 다른 단백질, 예를 들면, 항생 마커(antibiotic marker)의 발현 역시 숙고되어야 한다.

[0094] 본 발명의 재조합 핵산은 원핵동물 세포, 진핵동물 세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유류), 또는 둘 모두에서 발현에 적합한 벡터 내로, 클론된 유전자 또는 이의 일부분을 결찰함으로써 산출될 수 있다. 재조합 ActRIIa 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 벡터에는 플라스미드 및 다른 벡터가 포함된다. 가령, 원핵동물 세포, 예를 들면, 대장균(*E. coli*)에서 발현에 적합한 벡터에는 아래 유형의 플라스미드가 포함된다: pBR322-유래된 플라스미드, pEMBL-유래된 플라스미드, pEX-유래된 플라스미드, pBTac-유래된 플라스미드 및 pUC-유래된 플라스미드.

[0095] 일부 포유동물 발현 벡터는 세균 내에서 벡터의 증식을 용이하게 하는 원핵동물 서열 및 진핵동물 세포에서 발현되는 하나이상의 진핵동물 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 진핵동물 세포의 형질감염(transfection)에 적합한 포유동물 발현 벡터의 실례이다. 이들 벡터 중에서 일부는 원핵동물과 진핵동물 세포 모두에서 복제와 내약성(drug resistance) 선별을 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 진핵동물 세포에서 단백질의 일시적인 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 실례는 하기, 유전자 치료 전달 시스템의 설명에서 확인할 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 생물체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법이 당분야에 널리 공지되어 있다. 원핵동물과 진핵동물 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템 및 전반적인 재조합 절차는 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001을 참조한다. 일부 사례에서, 바쿨로바이러스 발현



시스템의 이용으로 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직하다. 이런 바쿨로바이러스 발현 시스템의 실패에는 pVL-유래된 벡터(가령, pVL1392, pVL1393과 pVL941), pAcUW-유래된 벡터(가령, pAcUW1), pBlueBac-유래된 벡터(가령,  $\beta$ -gal 보유 pBlueBac III)가 포함된다.

[0096] 바람직한 구체예에서, CHO 세포에서 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드의 생산을 위한 벡터, 예를 들면, Pcmv-Script vector(Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터(Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터(Promega, Madison, Wise)가 설계된다. 확인되는 바와 같이, 본 발명의 유전자 구조체는 예로써, 정제를 위한, 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생산하기 위하여 배양액 내에서 증식된 세포에서 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드의 발현을 유도하는데 이용될 수 있다.

[0097] 본 발명은 또한, 하나이상의 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 원핵동물 또는 진핵동물 세포이다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 세균 세포(가령, 대장균(*E. coli*)), 곤충 세포(가령, 바쿨로 바이러스 발현 시스템 이용), 효모, 또는 포유동물 세포에서 발현된다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다.

[0098] 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, 배지 및 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 가령, 임의의 순서로 아래 중에서 3가지 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계로 달성된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. 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 생쥐의 골에서 바람직한 효과 및 생쥐, 쥐와 비-인간 영장류에서 허용가능 안전성 프로파일(acceptable safety profile)을 달성하는데 충분하였다.

[0099] 다른 구체예에서, 재조합 ActRIIa 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에서 정제 리더 서열, 예를 들면, 폴리-(His)/엔테로키나아제(enterokinase) 절단 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는  $\text{Ni}^{2+}$  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).

[0100] 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 및 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).

[0101] 4. 대안적 액티빈과 ActRIIa 길항제

[0102] 본 명세서에 제공된 데이터는 액티빈-ActRIIa 신호전달의 길항제가 골 성장과 골 무기화를 촉진하는데 이용될 수 있음을 증명한다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드, 특히, ActRIIa-Fc가 선호되는 길항제이고, 이런 길항제가 액

티빈 길항작용(antagonism) 이외의 기전(가령, 액티빈 저해는 아마도, TGF-beta 대과의 다른 구성원을 비롯한 광범위한 분자의 활성을 저해하는 작용제의 추세의 지표이고, 이런 집단적인 저해는 골에 바람직한 효과를 유도한다)을 통하여 골에 영향을 줄 수 있긴 하지만, 항-액티빈(가령, A, B, C 또는 E) 항체, 항-ActRIIa 항체, 안티센스, ActRIIa의 생산을 저해하는 RNAi 또는 리보자임 핵산 및 액티빈 또는 ActRIIa의 다른 저해물질, 특히, 액티빈-ActRIIa 결합을 파괴하는 저해물질을 비롯한 다른 유형의 액티빈-ActRIIa 길항제 역시 유용할 것으로 기대된다.

[0103] ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 리간드에 경쟁적으로 결합하거나 ActRIIa-매개된 신호전달을 저해하는 항체는 ActRIIa 폴리펩티드 활성의 길항제로서 이용될 수 있다. 유사하게, 액티빈 A 폴리펩티드와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 결합을 파괴하는 항체가 길항제로서 이용될 수 있다.

[0104] ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드로부터 유래된 면역원(immunogen)을 이용함으로써, 항-단백질/항-펩티드 항혈청(antisera) 또는 단클론 항체는 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 ActRIIa 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 공액(conjugation) 또는 당분야에 널리 공지된 다른 기술이 포함된다. ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드의 면역원성 부분이 어쥬번트(adjuvant)의 존재 하에 투여될 수 있다. 면역 과정은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가(antibody titer)의 탐지에 의해 모니터링될 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역검사법은 상기 면역원을 항원으로 하여 항체 수준을 평가하는데 이용될 수 있다.

[0105] ActRIIa 폴리펩티드의 항원성 제조물로 동물의 면역이후, 항혈청을 수득할 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.

[0106] 본 명세서에서, "항체"는 본 발명의 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체 단편을 포괄하는 것으로 의도된다. 항체는 통상적인 기술을 이용하여 단편화될 수 있고, 이들 단편은 완전 항체에서 앞서 기술된 바와 동일한 방식으로 유용성에 대하여 선별될 수 있다. 가령, F(ab)<sub>2</sub> 단편은 항체를 펩신(pepsin)으로 처리함으로써 산출될 수 있다. 생성된 F(ab)<sub>2</sub> 단편은 이황화 가교(disulfide bridge)가 환원되도록 처리하여 Fab 단편을 생산할 수 있다. 본 발명의 항체는 상기 항체의 최소한 하나의 CDR 영역에 의해 공여된, ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드에 대한 친화성을 보유하는 이중특이적인, 단일-사슬, 키메라, 인간화와 완전 인간 분자 역시 포괄하도록 의도된다. 더 나아가, 항체는 그들에 부착되고 탐지될 수 있는 라벨(label)을 포함한다(가령, 라벨은 방사성동위원소(radioisotope), 형광 화합물(fluorescent compound), 효소 또는 효소 보조인자일 수 있다).

[0107] 특정 구체예에서, 항체는 재조합 항체인데, 상기 용어는 부분적으로, 분자 생물학 기술에 의해 산출된 항체, 예를 들면, CDR-합체된 또는 키메라 항체, 라이브러리-선택된 항체 도메인으로부터 조합된 인간 또는 다른 항체, 단일 사슬 항체 및 단일 도메인 항체(가령, 인간 V<sub>H</sub> 단백질 또는 camelid V<sub>H</sub> 단백질)를 포괄한다. 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 탐지가능한 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, 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.

[0108] 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 샘플의 내에서 목적 항원의 존재를 탐지하는데 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 보유한다. 액티빈과 ActRIIa 사이에 이례적으로 강한 결합을 고려하면, 중화 항-액티빈 또는 항-ActRIIa 항체는  $10^{-10}$  이하의 해리 상수를 보유하는 것으로 예상된다.

[0109] 이에 더하여, 바람직한 항체를 확인하기 위하여 항체를 선별하는데 이용되는 기술은 수득된 항체의 특성에 영향을 줄 수 있다. 가령, 항체가 용해 중인 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.

[0110] 액티빈 또는 ActRIIa 길항제인 핵산 화합물 종류의 실례에는 안티센스 핵산, RNAi 구조체 및 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 ActRIIa 핵산 서열 또는 액티빈  $\beta$ A 또는 액티빈  $\beta$ B 핵산 서열의 1000개 이하, 500개 이하, 250개 이하, 100개 이하, 또는 50개, 35개, 30개, 25개, 22개, 20개 또는 18개 이하의 뉴클레오티드로 구성되는 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상보성 영역은 적절하게는, 최소한 8개 뉴클레오티드, 임의적으로, 최소한 10개 또는 최소한 15개 뉴클레오티드, 임의적으로, 15개 내지 25 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 염기쌍의 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 혼합물을 포함하고, DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 갖는다. 유사하게, 이중 가닥 화합물은 DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA이고, 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물을 포함하고, DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 갖는다. 핵산 화합물은 골격(뉴클레오티드 내 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, 혈청 내에서, 세포 내에서, 또는 화합물이 전달될 가능성이 높은 위치, 예를 들면, 경구 전달된 화합물의 경우에 위 및 흡입된 화합물의 경우에 폐에서 안정성과 같은 특성을 개선하는 하나 이상의 변형을 종종 포함한다. RNAi 구조체의 경우에, 표적 전사체에 대한 가닥 상보성은 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 바람직하게는, 18개 내지 40개 뉴클레오티드 길이, 임의적으로, 대략 21개 내지 23개 뉴클레오티드를 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) 제어가 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 성장과 무기화에 대한 효과에 대하여 검사될 수 있다.

## [0111] 5. 선별 검사

[0112] 특정 측면에서, 본 발명은 액티빈-ActRIIa 신호전달 경로의 항진제 또는 길항제인 화합물(작용제)을 확인하기 위한 ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)와 액티빈 폴리펩티드의 용도에 관계한다. 이러한



선별을 통하여 확인된 화합물은 시험관내에서 골 성장 또는 무기화를 조절하는 능력을 평가할 수 있다. 임의적으로, 이들 화합물은 생체내에서 조직 성장을 조절하는 능력을 평가하는 동물 모형에서 더욱 검사될 수 있다.

[0113] 액티빈과 ActRIIa 폴리펩티드를 표적함으로써 조직 성장을 조절하는 치료제의 선별을 위한 다수의 접근법이 존재한다. 특정 구체예에서, 화합물의 고속 선별(high-throughput screening)은 골에 대한 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.

[0114] 다양한 검사 양식(assay format)이 만족스럽지만, 그럼에도 불구하고, 본 발명의 개시에 비추어, 본 발명에서 명시적으로 기술되지 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 산출될 수 있다. 대안으로, 요부 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, 펩티드유사체(peptidomimetic)를 비롯한 소형 분자), 또는 재조합 방식으로 생산될 수 있다. 본 발명에서 고려되는 검사 화합물에는 비-펩티딜 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드유사체, 당, 호르몬, 핵산 분자 등이 포함된다. 특정 구체예에서, 검사 작용제는 대략 2,000 달톤(dalton) 이하의 분자량(molecular weight)을 보유하는 소형 유기 분자다.

[0115] 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 형태에서 또는 화합물의 혼합물로서 수행될 수 있다. 임의적으로, 화합물은 다른 화합물로 임의적으로 유도체화되고, 화합물의 분리를 용이하게 하는 유도체화기(derivatizing group)를 보유한다. 유도체화기의 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 임의의 조합이 포함된다.

[0116] 화합물과 천연 추출물의 라이브러리를 검사하는 많은 약물 선별 프로그램에서, 정해진 기간 내에 조사되는 화합물의 수를 극대화시키기 위하여 고속 검사법이 바람직하다. 정제된 또는 반-정제된 단백질로 유래된 것과 같은 세포-없는 시스템에서 수행되는 검사법은 종종, "일차" 스크린으로서 선호되는데, 그 이유는 이들이 검사 화합물에 의해 매개되는 분자 표적(molecular target) 내에서 변형의 신속한 발생과 상대적으로 용이한 탐지를 가능하도록 산출될 수 있기 때문이다. 게다가, 검사 화합물의 세포 독성 또는 생체이용효율(bioavailability)의 효과는 시험관내 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있고, 이러한 검사법은 그 대신에, ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 결합 친화성의 변형으로 확인되는, 분자 표적에 대한 약제의 효과에 일차적으로 집중한다.

[0117] 예로써, 본 발명의 전형적인 스크리닝 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 탐지와 정량은 ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 복합체 형성을 저해하는(또는 강화하는) 화합물의 효능을 결정하는 수단을 제공한다. 화합물의 효능은 다양한 농도의 검사 화합물을 이용하여 획득된 데이터로부터 용량 반응 곡선(dose response curve)을 산출함으로써 평가할 수 있다. 게다가, 비교를 위한 기준선(baseline)을 제공하기 위하여 대조 검사(control assay) 역시 수행될 수 있다. 가령, 대조 검사에서, 분리되고 정제된 액티빈이 ActRIIa 폴리펩티드를 함유하는 조성물에 추가되고, ActRIIa/액티빈 복합체의 형성은 검사 화합물의 부재 하에 정량된다. 일반적으로, 반응물이 혼합되는 순서는 변경될 수 있고, 동시에 혼합될 수 있다. 게다가, 적절한 세포-없는 검사 시스템을 제공하기 위하여 정제된 단백질 대신에, 세포 추출물과 용해물(lysate)이 이용될 수도 있다.

[0118] ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 복합체 형성은 다양한 기술로 탐지될 수 있다. 가령, 복합체 형성의 조절은 예로써, 탐지가가능하게 표지된 단백질, 예를 들면, 방사성표지된(가령,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  또는  $^3\text{H}$ ), 형광 표지된(가령, FITC), 또는 효소 표지된 ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈을 이용하여, 면역검사(immunoassay)에 의해,

또는 크로마토그래피 탐지(chromatographic detection)에 의해 정량될 수 있다.

[0119] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 상호작용 정도를 직접적으로 또는 간접적으로 측정하는데 있어 형광 편광(fluorescence polarization) 검사 및 형광 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 검사의 이용을 고려한다. 더 나아가, 광도파(optical waveguide)(PCT Publication WO 96/26432; U.S. Pat. No. 5,677,196), 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR), 표면 전하 센서(surface charge sensor), 표면 포스 센서(surface force sensor)에 기초한 것들과 같은 다른 탐지 양식이 본 발명의 다수 구체예에 적합하다.

[0120] 게다가, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 상호작용을 파괴하거나 강화시키는 작용제를 확인하기 위한, "이중 하이브리드 검사(two hybrid assay)"로 알려져 있는 상호작용 트랩 검사(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).

[0121] 특정 구체예에서, 요부 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 및 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 검사(mechanism based assay), 예를 들면, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 탐지하는 검사에서 선별된다. 이는 고체상(solid phase) 또는 액체상(fluid phase) 결합 현상을 포함할 수 있다. 대안으로, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자는 리포터 시스템(가령,  $\beta$ -갈락토시다아제, 루시페라제, 또는 녹색 형광 단백질)으로 세포 내로 형질감염되고, 가급적 고속 선별에 의해 라이브러리에 대하여 또는 상기 라이브러리의 개별 구성원으로 선별된다. 다른 기전 기초된 결합 검사, 예를 들면, 자유 에너지(free energy)에서 변화를 탐지하는 결합 검사가 이용될 수도 있다. 결합 검사는 웰, 비드 또는 칩에 고정되거나, 고정된 항체에 의해 포획되거나, 또는 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)에 의해 분해되는 표적으로 수행될 수 있다. 결합된 화합물은 비색(colorimetric) 또는 형광 또는 표면 플라스몬 공명을 이용하여 통상적으로 탐지된다.

[0122] 특정 측면에서, 본 발명에서는 골 형성을 조절(자극 또는 저해)하고 골량을 증가시키기 위한 방법과 작용제를 제시한다. 이런 이유로, 확인된 화합물은 골 성장 또는 무기화를 조절하는 능력을 확증하기 위하여, 전체 세포 또는 조직에서, 시험관내 또는 생체내 검사될 수 있다. 당분야에 공지된 다양한 방법이 이러한 목적에 이용될 수 있다.

[0123] 가령, 골 또는 연골 성장에 대한 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드 또는 검사 화합물의 효과는 세포 기초된 검사에서 골전구세포(osteoprogenitor)의 조골세포로의 Msx2 또는 분화의 유도를 측정함으로써 결정될 수 있다(참조: Daluiski et al., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino et al., Front Biosci. 2004, 9:1520-9). 세포-기초된 검사의 다른 실행에는 간엽조직 전구체(mesenchymal progenitor)와 조골 세포에서 본 발명의 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드 및 검사 화합물의 골원성(osteogenic) 활성을 분석하는 것이 포함된다. 예를 들어, 전능(pluripotent) 간엽조직 전구체 C3H10T1/2 세포, 전조골(preosteoblastic) C2C12 세포 및 조골 TE-85 세포를 감염시키는, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드를 발현하는 재조합 아데노바이러스가 작제될 수 있다. 골원성 활성은 이후, 알칼리성 포스파타아제, 오스테오칼신(osteocalcin)의 유도 및 매트릭스 무기화(matrix mineralization)를 측정함으로써 결정된다(참조: Cheng et al, J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52).

[0124] 본 발명에서는 또한, 골 또는 연골 성장을 측정하는 생체내 검사를 고려한다. 가령, Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001)에서는 골절후 초기 단계 동안 골 회복이 연구되는 쥐 골다공증 모형을 개시한다. Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999)에서는 골절후 후기 단계 동안 골 회복이 연구되는 쥐 골다공증 모형을 개시한다. Andersson et al., J. Endocrinol. 170:529-537에서는 난소 적출된 생쥐 골다공증 모형을 기술하는데, 난소 적출된 생쥐는 실질적인 골 무기물 함량과 골 무기물 밀도를 상실하는



데, 소주골이 골 무기물 밀도의 거의 50%를 상실한다. 골 밀도는 부갑상선 호르몬과 같은 인자의 투여에 의해, 난소 적출된 생쥐에서 증가될 수 있다. 특정 측면에서, 본 발명에서는 당분야에 공지된 골절 치유 검사(fracture healing assay)를 이용한다. 이들 검사에는 예로써, U.S. Pat. No. 6,521,750에 기술된 골절 기술, 조직학적 분석 및 생물역학적 분석(biomechanical analysis)이 포함되는데, 상기 특허는 골절을 유발하고 골절의 정도와 회복 과정을 측정하기 위한 실험 프로토콜(experimental protocol)의 개시 목적으로 본 명세서에 참조로서 편입된다.

[0125] 6. 전형적인 치료 용도

[0126] 특정 구체예에서, 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항제(가령, ActRIIa 폴리펩티드)는 예로써, 파열, 손실 또는 탈염화를 통한 골 손상과 연관된 질환이나 이상을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 액티빈-ActRIIa 길항제, 특히, ActRIIa 폴리펩티드의 치료 효과량을 필요 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 골 손상을 치료하거나 예방하는 방법을 제시한다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 액티빈-ActRIIa 길항제, 특히, ActRIIa 폴리펩티드의 치료 효과량을 필요 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 골 성장 또는 무기화를 촉진하는 방법을 제시한다. 이들 방법은 바람직하게는, 동물, 더욱 바람직하게는, 인간의 치료적 처치와 예방적 처치를 목적으로 한다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 낮은 골 밀도 또는 감소된 골 강도와 연관된 질환의 치료를 위한 액티빈-ActRIIa 길항제(특히, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드 및 액티빈 또는 ActRIIa를 표적하는 중화 항체(neutralizing antibody))의 용도를 제시한다.

[0127] 본 명세서에서, 질환이나 이상을 "예방"하는 치료제는 통계학적 표본(statistical sample)에서, 치료되지 않은 대조 표본과 비교하여 치료된 표본에서 질환이나 이상의 발생률(occurrence)을 감소시키거나, 또는 치료되지 않은 대조 표본과 비교하여 이러한 질환이나 이상의 발병을 지연시키거나 상기 질환이나 이상의 하나 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 의사에 제공된 진단 및 치료제의 투여의 의도된 결과에서 분별된다.

[0128] 본 발명에서는 골 및/또는 연골 형성을 유도하거나, 골 손실을 예방하거나, 골 무기화를 증가시키거나, 또는 골의 탈염화를 예방하는 방법을 제시한다. 가령, 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항제는 인간과 다른 동물에서 골다공증을 치료하고 골 골절과 연골 결함을 치료하는데 이용된다. ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드는 골다공증의 발생에 대한 예방 조치로서, 무증상(subclinical)의 낮은 골 밀도로 진단된 환자에서 유용하다.

[0129] 특정 구체예에서, 본 발명의 방법과 조성물은 인간과 다른 동물에서 골절과 연골 결함 모두의 치유에서 의학적 유용성(medical utility)을 갖는다. 본 발명의 방법과 조성물은 또한, 폐쇄성 골절(closed fracture)과 개방성 골절(open fracture) 감소 및 인공 관절(artificial joint)의 향상된 고정에서 예방적 용도를 갖는다. 골원성제(osteogenic agent)에 의해 유도된 새로운 골 형성은 선천성(congenital), 외상-유도된(trauma-induced), 또는 종양 절제(oncologic resection) 유도된 두개와 안면(craniofacial) 결함의 회복에 기여하고, 또한, 미용 성형 수술(cosmetic plastic surgery)에 유용하다. 특정 사례에서, 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항제는 골-형성 세포를 유인하거나, 골-형성 세포의 성장을 자극하거나, 또는 골-형성 세포의 선조세포(progenitor)의 분화를 유도하는 환경을 제공한다. 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항제는 골다공증의 치료에도 유용하다.

[0130] 본 발명의 방법과 조성물은 골 손실로 특성화되거나 골 손실을 유발하는 이상, 예를 들면, 골다공증(이차성 골다공증 포함), 부갑상선기능항진증(hyperparathyroidism), 쿠싱병(Cushing's disease), 패제트병(Paget's disease), 갑상선 중독증(thyrototoxicosis), 만성적인 설사 상태(chronic diarrheal state) 또는 흡수장애(malabsorption), 신세뇨관성 산증(renal tubular acidosis), 또는 신경성 식욕부진증(anorexia nervosa)에 적용될 수 있다.

[0131] 골다공증은 다양한 인자에 의해 유발되거나 다양한 인자와 연관된다. 여성, 특히, 폐경후 여성, 낮은 체중 및 앉아있는 생활양식 모두 골다공증(골절 위험을 유발하는 골 무기물 밀도의 상실)의 위험 인자이다. 아래의 프로필을 갖는 사람은 ActRIIa 길항제 치료의 후보다: 에스트로겐 또는 다른 호르몬 대체요법을 복용하지 않는 폐경후 여성; 둔부 골절의 부계 또는 모계 병력이 있거나 흡연하는 사람; 키가 크거나(5 피트 7 인치 이상) 야윈(125 파운드 이하) 폐경후 여성; 골 손실과 연관된 임상 질환이 있는 남성; Prednisone™과 같은 코르티코스테로이드(corticosteroid), Dilantin™과 특정 바르비투르산염(barbiturate)과 같은 다양한 항-경련제, 또는 고용량 갑상선 대체제(thyroid replacement drug)를 비롯하여 골 손실을 유발하는 것으로 알려져 있는 약제를 복용하는 사람; 1형 당뇨병, 간 질환, 신장 질환, 또는 골다공증의 가족력(family history)이 있는 사람; 골 교체율(bone turnover)이 높은 사람(가령, 소변 샘플에서 과도한 콜라겐); 갑상선 질환(thyroid condition), 예를

들면, 갑상선기능항진증(hyperthyroidism)이 있는 사람; 경미한 외상후에 골절을 경험한 사람; 척추 골절(vertebral fracture) 또는 골다공증의 다른 징후가 x-선으로 확인된 사람.

[0132]

앞서 언급된 바와 같이, 골다공증은 다른 질환과 연관된 이상으로서 발생하거나, 또는 특정 약제의 이용에 기인할 수 있다. 약물 또는 다른 의학적 이상에 기인하는 골다공증은 이차성 골다공증으로 알려져 있다. 쿠싱병(Cushing's disease)으로 알려져 있는 질환에서, 신체에 의해 생산된 과량의 코르티솔(cortisol)이 골다공증과 골절을 유발한다. 이차성 골다공증과 연관된 가장 일반적인 약제는 부신(adrenal gland)에 의해 자연적으로 생산되는 호르몬인 코르티솔과 유사하게 작용하는 일군의 약제, 코르티코스테로이드이다. 골격의 발달을 위하여 적당한 수준의 갑상선 호르몬(thyroid hormone)(이는 갑상선(thyroid gland)에 의해 생산된다)이 필요하긴 하지만, 과도한 갑상선 호르몬은 시간이 흐름에 따라 골량을 감소시킬 수 있다. 알루미늄을 포함하는 제산제(antacid)는 신장 문제가 있는 사람, 특히, 투석(dialysis)을 받고 있는 사람이 고용량으로 복용하면 골 손실을 유발할 수 있다. 이차성 골다공증을 유발할 수 있는 다른 약제에는 발작을 예방하는데 이용되는 페니토인(phenytoin)(Dilantin)과 바르비투르산염(barbiturate); 일부 관절염, 암과 면역 질환용 치료제, 메토트렉세이트(methotrexate)(Rheumatrex, Immunex, Folex PFS); 일부 자가면역 질환을 치료하고 장기 이식 환자에서 면역 시스템을 억제하는데 이용되는 약제, 사이클로스포린(cyclosporine)(Sandimmune, Neoral); 전립선암(prostate cancer)과 자궁내막증(endometriosis)을 치료하는데 이용되는 황체 형성 호르몬-유리 호르몬(luteinizing hormone-releasing hormone) 항진제(Lupron, Zoladex); 항응고 약제(anticlotting medication), 헤파린(heparin)(Calciparine, Liquaemin); 높은 콜레스테롤을 치료하는데 이용되는 콜레스티라민(cholestyramine)(Questran)과 콜레스티폴(colestipol)(Colestid)이 포함된다. 암 치료에 기인하는 골 손실은 널리 인정되고 있고, 암 치료 유도된 골 손실(CTIBL)로 명명된다. 골 전이는 골 내에 구멍을 발생시킬 수 있는데, 이는 액티빈-ActRIIa 길항제 치료에 의해 회복될 수 있다.

[0133]

바람직한 구체예에서, 본 명세서에 개시된 액티빈-ActRIIa 길항제, 특히, 가용성 ActRIIa가 암 환자에 이용된다. 특정 종양(가령, 전립선, 유방, 다발성 골수종, 또는 부갑상선기능항진증을 유발하는 임의의 종양)을 지니고 있는 환자는 종양-유도된 골 손실 및 골 전이와 치료제로 인하여 골 손실의 위험이 높다. 이런 환자는 골 손실 또는 골 전이의 증거가 없어도, 액티빈-ActRIIa 길항제로 치료될 수 있다. 환자는 또한, 골 손실 또는 골 전이의 증거에 대하여 모니터되고, 지표가 증가된 위험을 암시하는 경우에 액티빈-ActRIIa 길항제로 치료될 수 있다. 일반적으로, 골 밀도에서 변화를 평가하기 위하여 DEXA 스캔이 이용되는 반면, 골 전이의 가능성을 평가하기 위하여 골 재형성의 지표가 이용된다. 혈청 마커가 모니터된다. 골 특이적인 알칼리성 포스포타아제(BSAP)는 조골세포 내에 존재하는 효소다. BSAP의 혈액 수준은 증가된 골 재형성을 유발하는 골 전이와 다른 이상을 나타내는 환자에서 증가한다. 오스테오칼신과 프로콜라겐 펩티드(procollagen peptide) 역시 골 형성과 골 전이에 연관된다. BSAP에 증가는 전립선암에 의해 유발된 골 전이를 나타내는 환자에서 몇 정도는 덜하지만, 유방암으로부터 골 전이에서 탐지되었다. 골 형태형성(morphogenetic) 단백질-7(BMP-7) 수준은 골로 전이된 전립선암에서는 높게 나타나지만 방광, 피부, 간, 또는 폐암에 기인한 골 전이에서는 그렇지 않다. 타입 I 카르복시-말단 텔로펩티드(telopeptide)(ICTP)는 골의 재흡수 동안 형성되는 콜라겐에서 관찰되는 가교결합(crosslink)이다. 골은 지속적으로 파괴되고 재형성되기 때문에, ICTP는 전신에서 관찰될 것이다. 하지만, 골 전이의 부위에서, 이러한 수준은 정상 골의 부위에서보다 현저하게 높을 것이다. ICTP는 전립선암, 폐암과 유방암에 기인한 골 전이에서 높은 수준으로 관찰되었다. 다른 콜라겐 가교결합, 타입 I N-말단 텔로펩티드(NTx)는 골 교체 동안 ICTP를 따라 생산된다. NTx의 양은 폐암, 전립선암과 유방암을 비롯한 여러 다양한 유형의 암에 의해 유발되는 골 전이에서 증가한다. 또한, NTx의 수준은 골 전이의 진행과 함께 증가한다. 이런 이유로, 상기 마커는 전이를 탐지하고 상기 질환의 정도를 측정하는데 이용될 수 있다. 재흡수의 다른 마커에는 피리디놀린(pyridinoline)과 데옥시피리디놀린(deoxypyridinoline)이 포함된다. 재흡수 마커 또는 골 전이 마커에서 증가는 환자에서 액티빈-ActRIIa 길항제 요법의 필요성을 지시한다.

[0134]

액티빈-ActRIIa 길항제는 다른 치료제와 공동으로 투여될 수 있다. 공동 투여(Conjoint administration)는 단일 보조-제형(single co-formulation)의 투여, 동시 투여, 또는 별개의 시점에 투여로 달성될 수 있다. 액티빈-ActRIIa 길항제는 다른 골-활성제(bone-active agent)와 함께 투여되는 경우에 특히 유리하다. 환자는 액티빈-ActRIIa 길항제 및 칼슘 보충제, 비타민 D, 적절한 운동 및/또는, 일부 사례에서, 다른 약제를 공동으로 취함으로써 혜택을 얻을 수 있다. 다른 약제의 실례에는 비스포스포네이트(알렌드로네이트(alendronate), 이반드로네이트(ibandronate)와 리세드로네이트(risedronate)), 칼시토닌, 에스트로겐, 부갑상선 호르몬과 랄록시펜(raloxifene)이 포함된다. 비스포스포네이트(알렌드로네이트, 이반드로네이트와 리세드로네이트), 칼시토닌, 에스트로겐 및 랄록시펜은 골 재형성 주기(bone remodeling cycle)에 영향을 주고, 항-재흡수 약제로서 분류된다. 골 재형성은 2가지 상이한 단계로 구성된다: 골 재흡수와 골 형성. 항-재흡수 약제는 골-재형성 주기의 골-재흡

수 부분을 지연시키거나 중단시키지만 이러한 주기의 골-형성 부분을 지연시키지 않는다. 결과적으로, 새로운 형성이 골 재흡수보다 빠른 속도로 지속되고, 골 밀도가 시간이 흐름에 따라 증가한다. 부갑상선 호르몬 형태인 테리파라티드(teriparatide)는 골 재형성 주기에서 골 형성 속도를 증가시킨다. 알렌드로네이트(alendronate)는 폐경후 골다공증의 예방(일일1회 5 mg 또는 주1회 35 mg)과 치료(일일1회 10 mg 또는 주1회 70 mg) 목적으로 모두 승인되었다. 알렌드로네이트는 골 손실을 감소시키고, 골 밀도를 증가시키고, 척추, 손목과 둔부 골절의 위험을 감소시킨다. 알렌드로네이트는 글루코코르티코이드 약제(즉, 프레드니손(prednisone)과 코르티손(cortisone))의 장기적인 이용에 기인한 남성과 여성에서 글루코코르티코이드-유도된 골다공증의 치료 및 남성에서 골다공증의 치료에 승인되었다. 알렌드로네이트 + 비타민 D는 폐경후 여성의 치료(주1회 70 mg + 비타민 D) 및 골다공증을 앓는 남성에서 골량을 개선하는 치료에 승인되었다. 이반드로네이트(ibandronate)는 폐경후 골다공증의 예방과 치료에 승인되었다. 월1회 알약(150 mg)으로 복용되는 이반드로네이트는 매일 동일자에 복용해야 한다. 이반드로네이트는 골 손실을 감소시키고 골 밀도를 증가시키고 척추 골절의 위험을 감소시킨다. 리세드로네이트(risedronate)는 폐경후 골다공증의 예방과 치료에 승인되었다. 일일1회(5 mg 용량) 또는 주1회(35 mg 용량, 또는 칼슘과 함께 35 mg 용량) 복용되는 리세드로네이트는 골 손실을 지연시키고 골 밀도를 증가시키고 척추와 비-척추 골절의 위험을 감소시킨다. 리세드로네이트는 남성과 여성에서 글루코코르티코이드 약제(즉, 프레드니손 또는 코르티손)의 장기적인 이용에 기인하는 글루코코르티코이드-유도된 골다공증의 예방 및/또는 치료에 승인되었다. 칼시토닌은 칼슘 조절(calcium regulation)과 골 대사(bone metabolism)에 관여하는 자연 발생 호르몬이다. 폐경후 5년 이상 경과한 여성에서, 칼시토닌은 골 손실을 지연시키고, 척추 골 밀도를 증가시키고, 골 골절과 연관된 통증을 완화시킬 수 있다. 칼시토닌은 척추 골절의 위험을 감소시킨다. 칼시토닌은 주사제(일일 50-100 IU) 또는 비강 스프레이(일일 200 IU)로서 가용하다. 에스트로겐 요법(ET)/호르몬 요법(HT)이 골다공증의 예방에 승인되었다. ET는 골 손실을 감소시키고, 척추와 둔부 모두에서 골 밀도를 증가시키고, 폐경후 여성에서 둔부와 척추 골절의 위험을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. ET는 통상적으로, 일일 대략 0.3 mg의 저용량 또는 일일 대략 0.625 mg의 표준 용량을 전달하는 알약 또는 피부 패치(skin patch)의 형태로 투여되고, 70세 이후에 시작하는 경우에도 효과적이다. 에스트로겐이 단독으로 복용되면, 이는 여성에서 자궁내막(uterine lining) 암(endometrial cancer)의 발명 위험을 증가시킬 수 있다. 이러한 위험을 배제하기 위하여, 건강관리 제공자(healthcare provider)는 원래 상태의 자궁을 갖는 여성의 경우에 에스트로겐과의 조합으로 호르몬 프로게스틴(progestin)(호르몬 대체요법 또는 HT)을 처방한다. ET/HT는 폐경후 증상을 완화시키고, 골 건강에 유의한 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 부작용은 질 출혈(vaginal bleeding), 유방 압통(breast tenderness), 정서 장애(mood disturbance)와 방광 질환(gallbladder disease)이다. 탈록시펜(일일1회 60 mg)은 폐경후 골다공증의 예방과 치료에 승인되었다. 이는 잠재적인 부작용 없이 에스트로겐의 유의한 효과를 제공하기 위하여 개발된, 선택성 에스트로겐 수용체 조절인자(SERM)로 불리는 일군의 약제이다. 탈록시펜은 골량을 증가시키고 척추 골절의 위험을 감소시킨다. 탈록시펜이 둔부와 다른 비-척추 골절의 위험을 감소시킬 수 있음을 증명하는 데이터는 아직 없다. 부갑상선 호르몬 형태인 테리파라티드(teriparatide)는 폐경후 여성 및 골절의 위험이 높은 남성에서 골다공증의 치료에 승인되었다. 상기 약제는 새로운 골 형성을 자극하고, 골 무기물 밀도를 현저하게 증가시킨다. 폐경후 여성에서, 골절 감소가 척추, 둔부, 발, 늑골과 손목에서 확인되었다. 남성에서, 골절 감소가 척추에서 확인되었지만 다른 부위에서 골절 감소를 평가하기에는 데이터가 불충분하였다. 테리파라티드는 최대 24개월 동안 일일1회 주사제로서 자가-투여된다.

[0135] 7. 제약학적 조성물

[0136] 특정 구체예에서, 본 발명의 액티브-ActRIIa 길항제(가령, ActRIIa 폴리펩티드)는 제약학적으로 허용되는 담체로 제제화된다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드는 단독으로, 또는 제약학적 제형(치료 조성물)의 한 성분으로서 투여될 수 있다. 요부 화합물은 의학 또는 수의학에 이용하기 편의한 방식으로 투여를 위하여 제제화된다.

[0137] 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, 생리학적으로 허용되는 형태를 취한다. 앞서 기술된 바와 같은 조성물에 임의적으로 포함되는, ActRIIa 길항제 이외의 다른 치료제는 본 발명의 방법에서, 요부 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)과 동시에 또는 순차적으로 투여된다.

[0138] 전형적으로, ActRIIa 길항제는 비경구(parental) 투여된다. 비경구 투여에 적합한 제약학적 조성물은 하나이상의 제약으로 허용되는 무균 등장성 수용액이나 비-수용액, 분산액(dispersion), 현탁액(suspension) 또는 에멀전(emulsion), 또는 사용 직전에 무균 주사가능 용액이나 분산액으로 재구성되는 무균 분말(sterile powder)과의 조합으로 하나이상의 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하고, 항산화제(antioxidant), 완충제(buffer), 정균제



(bacteriostat), 의도된 수용자의 혈액과 제형이 등장성이 되도록 하는 용매, 현탁제, 또는 농후제(thickening agent)를 포함할 수 있다. 본 발명의 제약학적 조성물에 이용될 수 있는 적절한 수성과 비-수성 담체의 실례에는 물, 에탄올, 폴리올(가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)과 이들의 적절한 혼합물, 식물성 오일(vegetable oil)(가령, 올리브 오일(olive oil)) 및 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.

[0139] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 표적 조직 부위(가령, 골)로의 전달을 위한 형태로 내포되거나 주입될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나이상의 치료 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)을 표적 조직 부위(가령, 골)로 전달 할 수 있는 매트릭스(matrix)를 포함하는데, 이는 발달중인 조직에 대한 구조물을 제공하고 최종적으로 체내 재흡수될 수 있다. 가령, 매트릭스는 ActRIIa 폴리펩티드의 지연 방출(slow release)을 제공한다. 이런 매트릭스는 다른 이식된 의학 적용에 현재 이용되고 있는 물질로 형성될 수 있다.

[0140] 매트릭스 재료의 선택은 생체적합성(biocompatibility), 생물분해성(biodegradability), 기계적 특성, 미용적 외관(cosmetic appearance) 및 간섭 특성(interface property)에 기초한다. 요부 조성물의 특정 적용은 적절한 제형을 정의할 것이다. 이들 조성물에 적합한 잠재적인 매트릭스는 생물분해가능하고 화학적으로 정의된 황산칼슘(calcium sulfate), 트리칼슘포스페이트(tricalciumphosphate), 수산화인회석(hydroxyapatite), 폴리락트산(poly-lactic acid) 및 폴리안하이드라이드(polyanhydride)이다. 다른 잠재적인 물질은 생물분해가능하고 생물학적으로 충분히 정의된 물질, 예를 들면, 골 또는 피부 콜라겐이다. 추가의 매트릭스는 순수한 단백질 또는 세포 외 매트릭스 성분으로 구성된다. 다른 잠재적인 매트릭스는 생물분해불가능하고 화학적으로 정의된 물질, 예를 들면, 소결된 수산화인회석(sintered hydroxyapatite), 생체유리(bioglass), 알루미늄산염(aluminate), 또는 다른 세라믹이다. 매트릭스는 앞서 언급된 유형의 물질의 임의의 조합, 예를 들면, 폴리락트산과 수산화인회석, 또는 콜라겐과 트리칼슘포스페이트로 구성될 수도 있다. 생체세라믹(bioceramic)은 칼슘-알루미늄산염-인산염(calcium-aluminate-phosphate)에서처럼 조성(composition) 및 구멍 크기, 입자 크기, 입자 형태와 생물분해성(biodegradability)을 변경하는 가공(processing)에서 변경될 수 있다.

[0141] 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 트랜저캔스(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.

[0142] 경구 투여용 고형 약형(캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 본 발명의 하나이상의 치료 화합물은 한가지이상의 제약학적으로 수용가능한 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, 파라핀; (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, 소디움라우릴 설페이트, 또는 이들의 혼합물; (10) 착색제와 혼합된다. 캡슐, 정제, 알약의 경우에, 제약학적 조성물은 완충제를 함유할 수도 있다. 유사한 유형의 고형 조성물 역시 락토오스 또는 유당과 같은 부형제 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용한 연성과 경성-충진된 젤라틴 캡슐에서 충전제로 사용될 수 있다.

[0143] 경구 투여용 액체 제형에는 제약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 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, 피마자, 참깨 기름), 글리세롤(glycerol),

테트라하이드로푸릴 알코올(tetrahydrofuryl alcohol), 소르비탄의 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 지방산 에스테르(fatty acid ester), 또는 이들의 혼합물을 함유한다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 습윤제, 유화제와 현탁제, 감미료, 조미료, 착색제, 방향제, 보존제 등과 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다.

[0144] 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 등을 함유한다.

[0145] 본 발명의 조성물은 또한, 보존제, 습윤제, 유화제와 분산제(dispersing agent)와 같은 어쥬번트를 함유한다. 미생물의 작용 예방은 다양한 항균제와 항진균제, 예를 들면, 파라벤(paraben), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀 솔빈산(phenol sorbic acid) 등의 내포에 의해 담보될 수 있다. 또한, 등장성제(isotonic agent), 예를 들면, 당, 염화나트륨 등을 조성물 내로 포함하는 것이 바람직하다. 이에 더하여, 주사가능 제약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면, 스테아린산알루미늄(aluminum monostearate)과 젤라틴의 내포로 달성될 수 있다.

[0146] 투약 섭생(dosage regimen)은 본 발명의 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)의 작용을 변화시키는 다양한 인자를 고려하여 담당 의사에 의해 결정될 것이다. 다양한 인자에는 형성되어야 하는 골 무게(bone weight)의 양, 골 밀도 손실의 정도, 골 손상의 부위, 손상된 골의 상태, 환자의 연령, 성별과 식이, 골 손실의 원인이 되는 질환의 심각도, 투여 시간 및 다른 임상적 인자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 임의적으로, 용량은 재구성에 이용되는 매트릭스의 타입 및 조성물 내에서 화합물의 유형에 따라 달라진다. 최종 조성물에 다른 공지된 성장 인자(growth factor)의 추가 역시 용량에 영향을 준다. 진행은 골 성장 및/또는 회복의 주기적 평가(periodic assessment), 가령, X-선(DEXA 포함), 조직형태측정학적(histomorphometric) 결정 및 테트라사이클린 라벨링(tetracycline labeling)에 의해 모니터될 수 있다.

[0147] 생쥐를 이용한 실험은 화합물이 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  또는 그 이상의 혈청 농도(serum concentration)를 달성할 만큼 충분한 간격과 양으로 투약될 때 골에 대한 ActRIIa-Fc의 효과가 탐지되고, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  또는 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  또는 그 이상의 혈청 수준(serum level)이 골 밀도와 강도에 대한 현저한 효과를 달성하는데 바람직하다는 것을 증명하였다. 더욱 높은 용량의 ActRIIa-Fc가 부작용으로 인하여 바람직하지 않다는 지시가 없긴 하지만, 투약 섭생은 0.2 내지 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 임의적으로, 1 내지 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 혈청 농도에 도달하도록 설계된다. 인간에서, 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 혈청 수준은 0.1 mg/kg 또는 그 이상의 단일 투약(single dose)으로 달성되고, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 혈청 수준은 0.3 mg/kg 또는 그 이상의 단일 투약으로 달성된다. 상기 분자의 관찰된 혈청 반감기는 대부분의 Fc 용합 단백질보다 훨씬 긴 대략 20 내지 30일이고, 따라서, 예로써, 주1회 또는 격주 기초에서 0.2-0.4 mg/kg으로 투약함으로써 지속적으로 효과적인 혈청 수준이 달성되거나, 또는 더욱 높은 용량이 투약 간에 더욱 긴 간격과 함께 이용될 수 있다. 가령, 1-3 mg/kg의 용량은 월1회 또는 격월 기초에서 이용될 수 있고, 골에 대한 효과는 투약이 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 그 이상의 개월에 한 번씩 필요할 만큼 충분히 지속적이다.

[0148] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 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.

[0149] 본 명세서에 교시된 바와 같이 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터는 아데노바이러스(adenovirus), 포진 바이러스(herpes virus), 우두(vaccinia), 또는 바람직하게는, 레트로바이러스(retrovirus)와 같은 RNA 바이러스다. 적절하게는, 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) 및 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 선별가능 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 표적된다.

[0150] 대안으로, 조직 배양 세포는 통상적인 인산칼슘(calcium phosphate) 형질감염(transfection)에 의해, 레트로바이러스 구조 유전자 gag, pol과 env를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포는 이후, 목적 유전자를 포함하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성된 세포는 배양 배지 내로 레트로바이러스 벡터를 방출한다.

[0151] ActRIIa 폴리뉴클레오티드에 대한 다른 표적된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템에는 거대분자 복합체, 나노캡슐(nanocapsule), 마이크로캡슐(microsphere), 비드(bead) 및 지질-기초된 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, DNA 및 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 집형(combination)이다. 다른 인지질 또는 다른 지질 역시 이용될 수 있다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온 강도(ionic strength) 및 이가 양이온(divalent cation)의 존재에 좌우된다.

[0152] 리포솜 생산에 유용한 지질의 실례에는 포스파티딜(phosphatidyl) 화합물, 예를 들면, 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol), 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 스펅고지질(sphingolipid), 세레브로사이드(cerebroside) 및 강글리오사이드(ganglioside)가 포함된다. 예시적인 인지질에는 난 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine) 및 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine)이 포함된다. 또한, 리포솜의 표적화는 예로써, 장기-특이성(organ-specificity), 세포-특이성(cell-specificity) 및 세포기관-특이성(organelle-specificity)에 기초하고, 당분야에 공지되어 있다.

[0153] [실시예]

[0154] 본 발명은 전반적으로 기술되었고, 본 발명의 특정 구체예를 예시하는 목적으로 포함되고 본 발명을 한정하지 않는 아래의 실시예를 참조하면 더욱 용이하게 이해될 것이다.

[0155] 실시예 1: ActRIIa-Fc 융합 단백질

[0156] 출원인은 인간 또는 생쥐 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIa의 세포외 도메인을 포함하고 이들 사이에 최소 링커(minimal linker)가 존재하는 가용성 ActRIIa 융합 단백질을 작제하였다. 이들 구조체는 각각, ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc로 지칭된다.

[0157] 아래에 도시된 ActRIIa-hFc는 CHO 세포주로부터 정제된다(SEQ ID NO: 7):

[0158] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSI  
EIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV  
TQPTSNPVTPKPPTGGGTHICPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0159] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3가지 상이한 리더 서열(leader sequence)이 고려되었다:

[0161] (i) 꿀벌 멜리틴(mellitin)(HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)

[0162] (ii) 조직 플라스미노겐 활성화인자(TPA): MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)

[0163] (iii) 코유: MGAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).

[0164] 선택된 형태는 TPA 리더를 이용하고 아래의 가공되지 않은 아미노산 서열을 갖는다:

```
MDAMKRGLCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQT
GVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKD
SPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTVQPTSNPVTPKPTGGGTHTCP CPA
PELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)
```

[0165]

[0166] 상기 폴리펩티드는 아래의 핵산 서열에 의해 인코딩된다:

```
ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGAG
CAGTCTTCGTTTCGCCCGGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAG
GAGTGTCTTTTAAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAC
TGGTGTGTAACCGTGTATGTTGACAAAGATAAACGCGGCATTGTTTG
CTACCTGGAAGAATATTCTGTTCCATTGAATAGTGAACAAGGTTGTT
GGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAA
AGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGTGTGAGGCAATATGTGTAATG
AAAAGTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAAT
CCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGAAGTACACATGCCAC
CGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC
```

[0167]

```
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCCTACCGTCCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCAGTCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT
ACAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAT
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCTACACGCAGAAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAAATTC (SEQ ID NO:14)
```

[0168]

[0169] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 둘 모두 재조합 발현이 상당히 용이하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 단백질은 단백질의 단일한 충분히-정의된 피크로서 정제되었다. N-말단 염기서열분석(sequencing)에서 -ILGRSETQE의 단일 서열(SEQ ID NO: 11)이 확인되었다. 정제는 예로써, 임의의 순서로 아래 중에서 3가지 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계로 달성될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. ActRIIa-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 결정에서 >98% 및 SDS PAGE에 의한 결정에서 >95%의 순도로 정제되었다.

[0170]

ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc는 리간드, 특히, 액티빈 A에 대한 높은 친화성을 보였다. GDF-11 또는 액티빈 A("ActA")는 표준 아민 결합 절차를 이용하여 Biacore CM5 칩 상에 고정시켰다. ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 상기 시스템으로 적하하고, 결합을 측정하였다. ActRIIa-hFc는  $5 \times 10^{-12}$ 의 해리 상수( $K_D$ )로 액티빈에 결합하고, 상기 단백질은  $9.96 \times 10^{-9}$ 의  $K_D$ 로 GDF11에 결합하였다(도 2 참조). ActRIIa-mFc는 유사하게 작용하였다.

[0171]

A-204 리포터 유전자 측정검사를 이용하여 GDF-11과 액티빈 A에 의한 신호전달에 대한 ActRIIa-hFc 단백질의 효과를 평가하였다. 세포주: 인간 횡문근육종(Rhabdomyosarcoma)(근육으로부터 유래됨). 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12(Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100에서 기술됨)(도 3 참조). CAGA12 모티프가 TGF-Beta 반응성 유전자(responsive gene)(PAI-1 유전자) 내에 존재하고, 따라서, 상기 벡터는 Smad2와 3을 통하여 신호하는 인자에 보편적으로 이용된다.

- [0172] Day 1: A-204 세포를 48-웰 평판 내로 분할한다.
- [0173] Day 2: A-204 세포를 10  $\mu$ g pGL3(CAGA)12 또는 pGL3(CAGA)12(10  $\mu$ g)+ pRLCMV(1  $\mu$ g) 및 Fugene으로 형질감염시킨다.
- [0174] Day 3: 인자(배지에 회석됨 + 0.1 % BSA)를 추가한다. 저해물질은 세포에 추가에 앞서 1시간동안 인자와 함께 사전 배양해야 한다. 세포는 PBS로 씻어내고 용해시킨다.
- [0175] 이후, 루시페라제 검사(Luciferase assay)를 수행한다. 전형적으로, 이러한 검사에서, 임의의 저해물질의 부재 하에 액티빈 A는 리포터 유전자 발현의 거의 10배 자극 및 ED50 ~ 2 ng/ml를 나타낸다. GDF-11: 16배 자극, ED50: ~ 1.5 ng/ml. GDF-8은 GDF-11과 유사한 효과를 나타낸다.
- [0176] 도 4에 도시된 바와 같이, ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc는 피코몰(picomolar) 농도에서 GDF-8 매개된 신호전달을 저해한다. 도 5에 도시된 바와 같이, ActRIIa-hFc의 3가지 상이한 제조물은 대략 200 pM의 IC50으로 GDF-11 신호전달을 저해하였다.
- [0177] ActRIIa-hFc는 약물동력학 연구에서 매우 안전하였다. 쥐는 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg의 ActRIIa-hFc 단백질을 투약하고, 24시간, 48시간, 72시간, 144시간과 168시간에서 상기 단백질의 혈장 수준을 측정하였다. 별개의 연구에서, 쥐는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg을 투약하였다. 쥐에서, ActRIIa-hFc는 11-14일 혈청 반감기를 보였고, 상기 약제의 순환 수준(circulating level)은 2주후 매우 높았다(1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 최초 투여에서, 각각 11  $\mu$ g/ml, 110  $\mu$ g/ml 또는 304  $\mu$ g/ml). 필리핀 원숭이(cynomolgus monkey)에서, 상기 약제의 혈장 반감기는 14일보다 훨씬 크고, 순환 수준은 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 최초 투여에서, 각각 25  $\mu$ g/ml, 304  $\mu$ g/ml 또는 1440  $\mu$ g/ml이었다. 인간에서 예비 결과는 혈청 반감기가 대략 20 내지 30일임을 암시한다.
- [0178] 실시예 2: ActRIIa-mFc는 생체내에서 골 성장을 촉진한다
- [0179] 정상적인 암컷 생쥐(BALB/c)는 1 mg/kg/1회분, 3 mg/kg/1회분 또는 10 mg/kg/1회분의 수준에서 ActRIIa-mFc를 주2회 투약하였다. 골 무기물 밀도와 골 무기물 함량은 DEXA로 결정하였다(도 6 참조).
- [0180] BALB/c 암컷 생쥐에서, DEXA 스캔은 ActRIIa-mFc 치료의 결과로써, 골 무기물 밀도와 함량에서 현저한 증가(>20%)를 보였다(도 7과 8 참조).
- [0181] 따라서, ActRIIa의 길항작용은 정상적인 암컷 생쥐에서 증가된 골 밀도와 함량을 유도하였다. 다음 단계로써, 골다공증의 생쥐 모형에서 골에 대한 ActRIIa-mFc의 효과를 조사하였다.
- [0182] Andersson et al. (2001)에서는 난소 적출된 생쥐에서 상당한 골 손실(수술후 6주 시점에 소주골의 거의 50% 손실)이 발생하고, 이들 생쥐에서 골 손실이 부갑상선 호르몬과 같은 후보 치료제와 관련될 수 있음을 확인하였다.
- [0183] 출원인은 4-5주령에 난소 적출된(OVX) 또는 허위 수술된 C57BL6 암컷 생쥐를 이용하였다. 수술후 8주 시점에, ActRIIa-mFc(10 mg/kg, 주2회) 또는 대조(PBS)로 치료를 시작하였다. 골 밀도는 CT 스캐너로 측정하였다.
- [0184] 도 9에 도시된 바와 같이, 치료되지 않고 난소 적출된 생쥐는 6주후, 허위 수술된 대조와 비교하여 소주 골 밀도의 현저한 손실을 보였다. ActRIIa-mFc 치료는 허위 수술된 생쥐의 수준까지 골 밀도를 회복시켰다. 6주와 12주의 치료에서, ActRIIa-mFc는 OVX 생쥐의 소주골에서 현저한 증가를 유도하였다(도 10 참조). 6주의 치료후, 골 밀도는 PBS 대조와 비교하여 24% 증가하였다. 12주후, 이러한 증가는 27%이었다.
- [0185] 허위 수술된 생쥐에서도 ActRIIa-mFc는 소주골에서 현저한 증가를 유도하였다(도 11 참조). 6주와 12주후, 이러한 치료는 대조와 비교하여 35% 증가를 유도하였다.
- [0186] 추가적인 일단의 실험에서, 앞서 기술된 바와 같이 난소 적출된(OVX) 또는 허위 수술된 생쥐는 12주 동안 ActRIIa-mFc(10 mg/kg, 주2회) 또는 대조(PBS)로 치료하였다. ActRIIa-mFc에 대하여 앞서 기술된 결과와 유사하게, ActRIIa-mFc를 섭취한 OVX 생쥐는 4주 시점에 소주 골 밀도에서 15% 증가 및 12주 치료후 25% 증가를 보였다(도 12). ActRIIa-mFc를 섭취하는 허위 수술된 생쥐는 유사하게, 4주 시점에 소주 골 밀도에서 22% 증가 및 12주 치료후 32% 증가를 보였다(도 13).
- [0187] ActRIIa-mFc로 12주 치료후, 전신(whole body)과 체외 대퇴골 DEXA 분석에서, 이러한 치료가 난소 적출된 생쥐와 허위 수술된 생쥐 모두에서 골 밀도 증가를 유도하였다(각각, 도 14A와 14B). 이들 결과는 또한, ActRIIa-

mFc로 12주 치료후 전체와 피질 골 밀도 모두에서 현저한 증가를 증명하는, 대퇴부 중간뼈골절의 체외 pQCT 분석 결과에 뒷받침된다. 운반제-치료된 대조 난소 적출된 생쥐는 운반제-치료된 대조 허위 수술된 생쥐에 필적하는 골 밀도를 보였다(도 15). 골 밀도 이외에, ActRIIa-mFc 치료후 골 함량이 증가하였다. 대퇴부 중간뼈골절의 체외 pQCT 분석 결과는 ActRIIa-mFc로 12주 치료후 전체와 치밀골 함량 모두 현저하게 증가하는 반면, 난소 적출된 운반제 대조-치료된 생쥐와 허위 수술된 운반제 대조-치료된 생쥐가 유사한 골 함량을 나타낸다는 것을 증명하였다(도 16). 대퇴부 중간뼈골절의 체외 pQCT 분석 결과는 또한, ActRIIa-mFc 치료된 생쥐가 골막 원주(perioosteal circumference)에서 변화를 나타내지 않는다는 것을 증명하였다; 하지만, ActRIIa-mFc 치료는 뼈 안 원주(endosteal circumference)에서 감소를 유도하는데, 이는 대퇴골의 내부 표면(inner surface)에서 성장에 기인한 피질 두께의 증가를 지시한다(도 17).

[0188] 대퇴골의 기계적 검사에서, ActRIIa-mFc은 골의 내적 특성(극한 강도(ultimate strength))에서 현저한 증가에 기여하는 골의 외적 특성(최대 하중(maximal load), 강도(stiffness) 및 파괴 에너지(energy to break))을 증가시킬 수 있는 것으로 확인되었다. ActRIIa-mFc로 치료된 난소 적출된 생쥐는 허위 수술되고, 운반제 치료된 대조의 수준을 초과하는 수준까지 증가된 골 강도를 나타내는데, 이는 골다공증(osteoporotic) 표현형의 완전한 반전을 지시한다(도 18).

[0189] 이들 데이터는 액티빈-ActRIIa 길항제가 정상적인 암컷 생쥐에서 골 밀도를 증가시킬 수 있고, 더 나아가, 골다공증의 생쥐 모형에서 골 밀도, 골 함량 및 궁극적으로, 골 강도에서 결함을 보정할 수 있음을 증명한다.

[0190] 추가적인 일단의 실험에서, 생쥐는 4주 시점에 난소 적출하거나 허위 수술하고, 12주 시점부터 추가로 12주 기간 동안, 위약 또는 ActRIIa-mFc(2회/week, 10 mg/kg)(도 19-24에서 RAP-11로 지칭됨)를 투약하였다. 다양한 골 파라미터를 평가하였다. 도 19에 도시된 바와 같이, ActRIIa-mFc는 OVX 생쥐와 허위 수술된 생쥐 모두에서 전체 체적(total volume)에 대한 척추 소주골 체적(vertebral trabecular bone volume) 비율(BV/TV)을 증가시켰다. ActRIIa-mFc는 또한, 골주 구조(trabecular architecture)를 개선하고(도 20), 피질 두께를 증가시키고(도 21), 골 강도를 개선하였다(도 22). 도 23에 도시된 바와 같이, ActRIIa-mFc는 1 mg/kg 내지 10 mg/kg의 용량 범위에서 바람직한 효과를 유도하였다.

[0191] 허위 수술된 생쥐에서 2주 시점에, 골 조직형태측정(bone histomorphometry)을 수행하였다. 도 24에 제공된 이들 데이터는 ActRIIa-mFc가 이중 효과: 골 재흡수의 저해 및 골 성장의 촉진을 나타낸다는 것을 증명한다. 따라서, ActRIIa-mFc는 골 성장을 자극(동화 효과(anabolic effect))하고 골 재흡수를 저해(항-이화 효과(anti-catabolic effect))한다.

[0192] 실시예 4: 대안적인 ActRIIa-Fc 단백질

[0193] 대안적인 한 구조체는 C-말단 꼬리(ActRIIa의 세포외 도메인의 최종 15개 아미노산)가 결실된다. 이런 구조체의 서열이 아래에 제공된다(Fc 부분은 밑줄로 표시됨)(SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRNTQGTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSI  
EIVKQGCWLDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTG  
GGTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKK  
VSNKALPVPPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSLKLTVDKSRWQOGNVSFCS  
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0194]

[0195] **참고문헌의 편입**

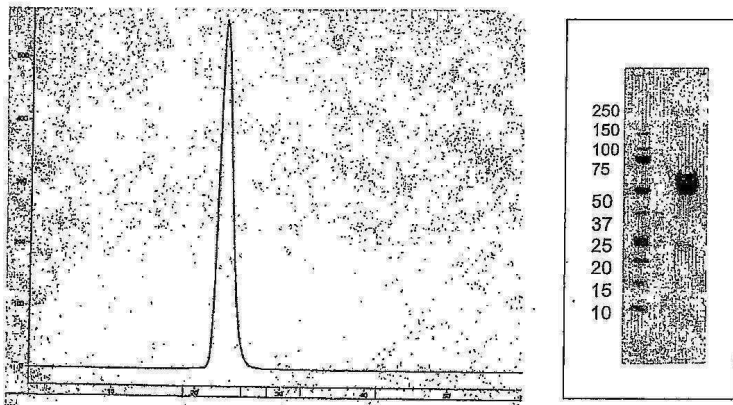
[0196] 본 명세서에 언급된 모든 간행물과 특허는 순전히 참조로서 편입된다.

[0197] 본 발명의 요부(subject matter)의 특정 구체제가 기술되긴 했지만, 이러한 명세는 예시일 뿐이며 본 발명을 제한하지 않는다. 이러한 명세 및 하기의 특허청구범위를 고려할 때, 다수의 균등한 변형이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 이러한 균등한 변형과 함께, 본 발명의 명세서와 특허청구범위에 관련하여 결정된다.

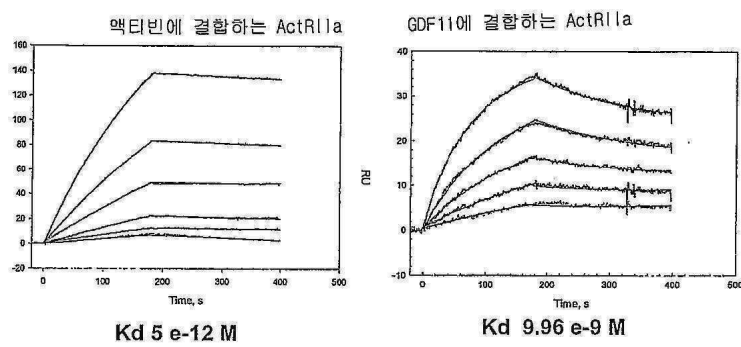


## 도면

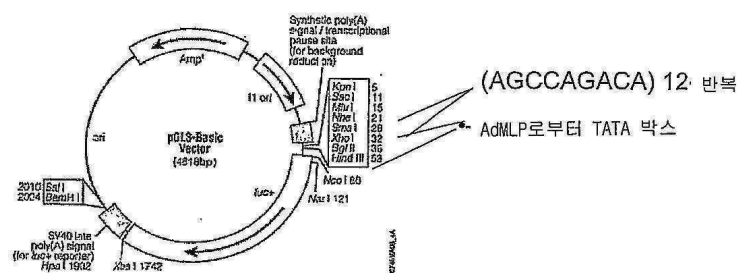
### 도면1



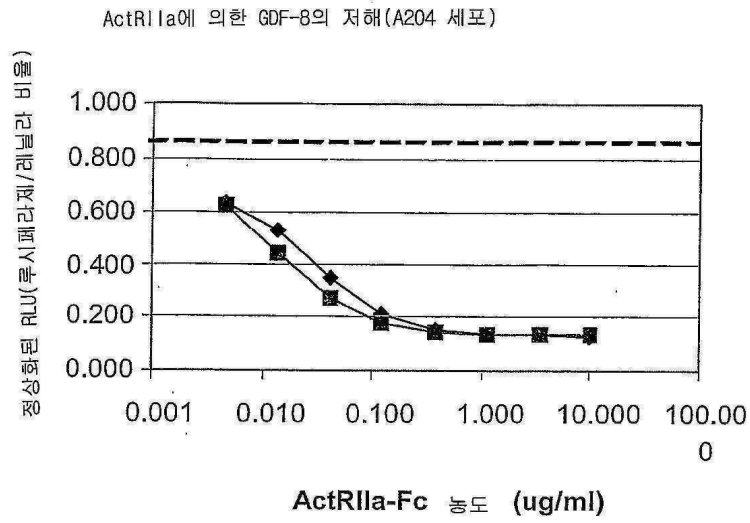
### 도면2



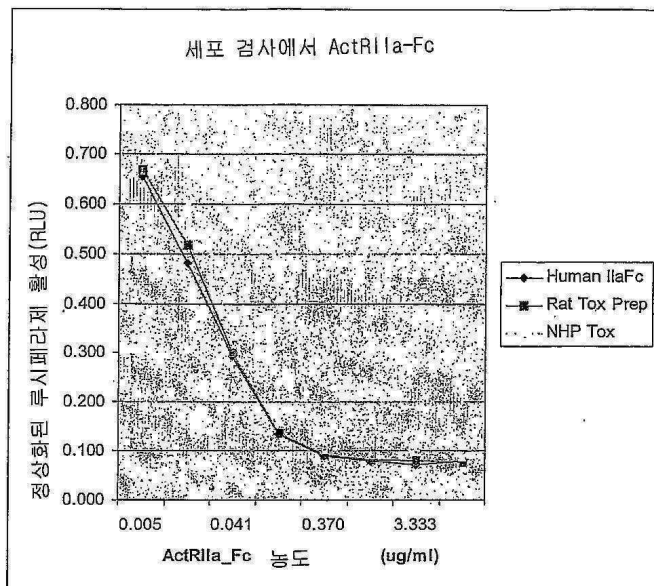
### 도면3



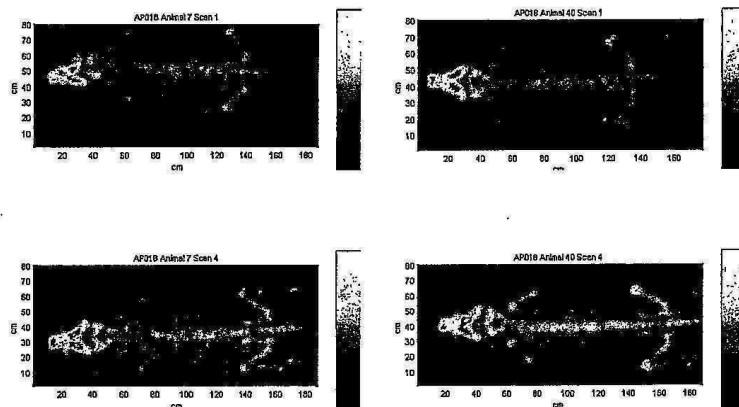
도면4



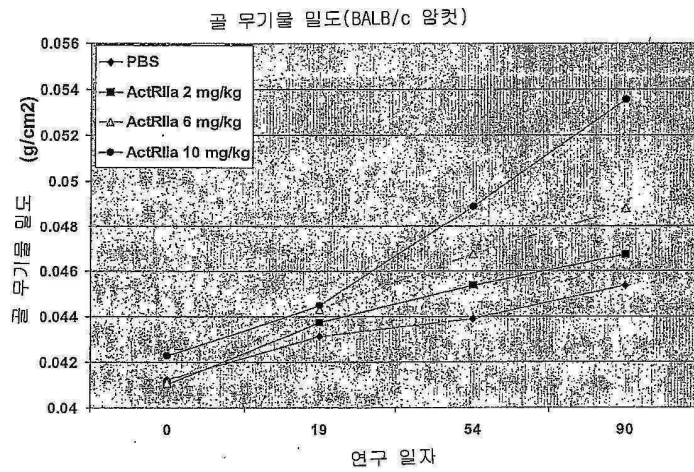
도면5



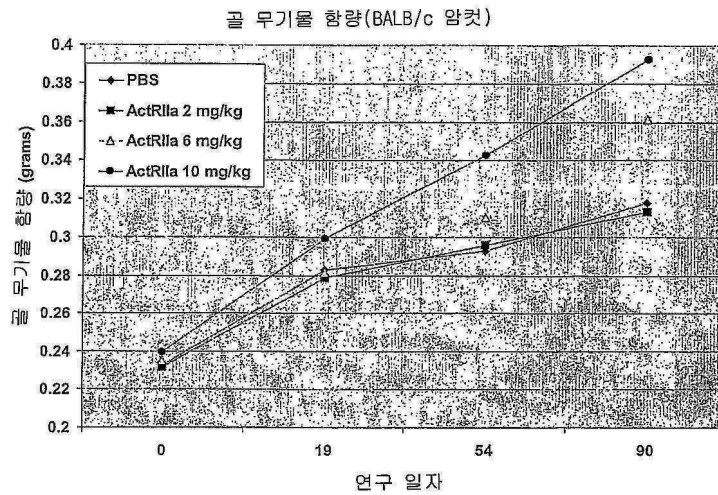
도면6



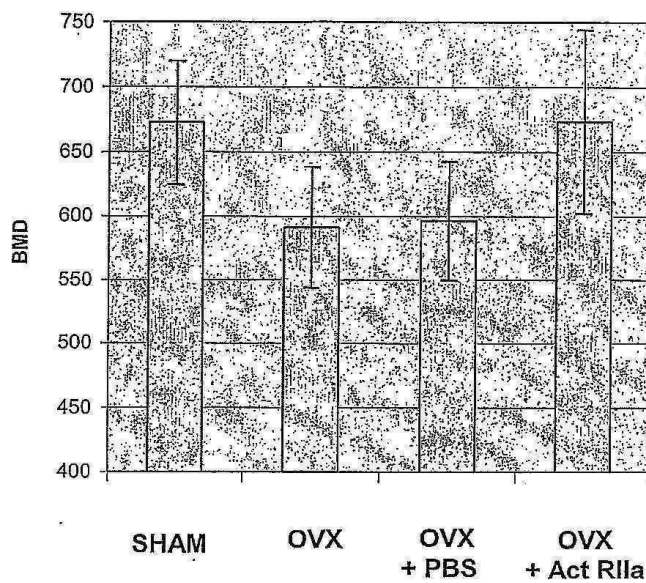
도면7



도면8

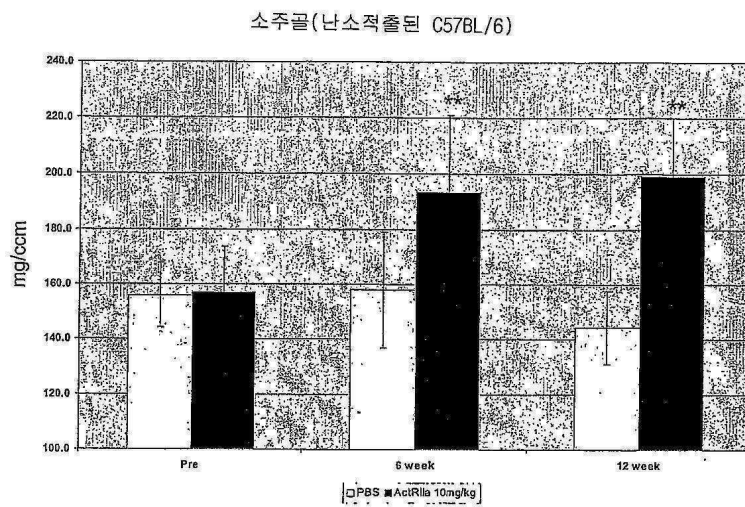


도면9

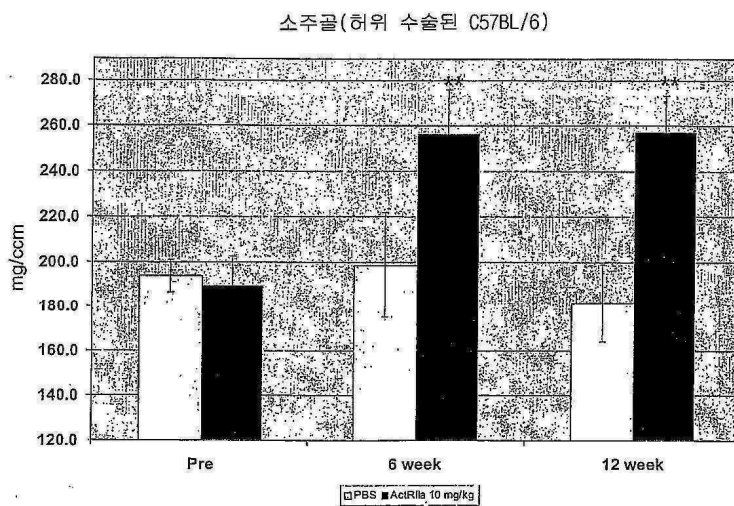




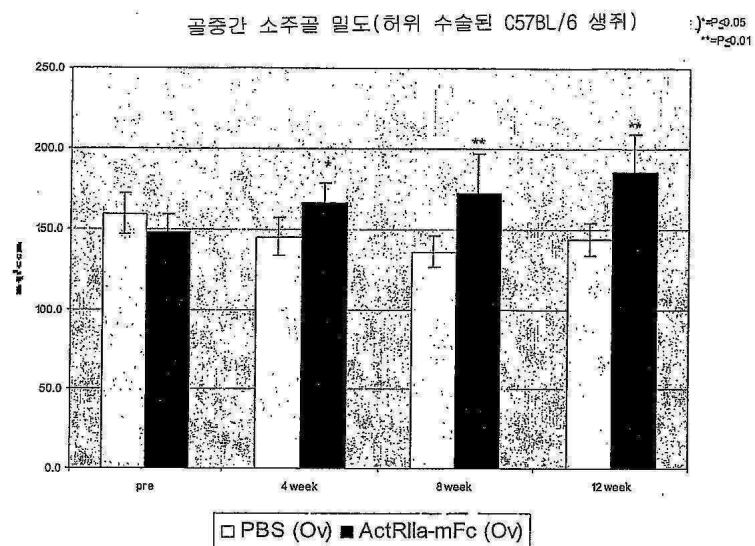
도면10



도면11



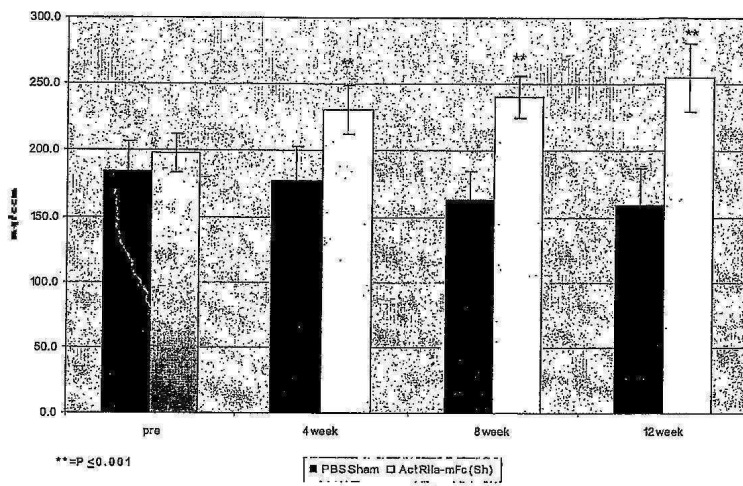
도면12



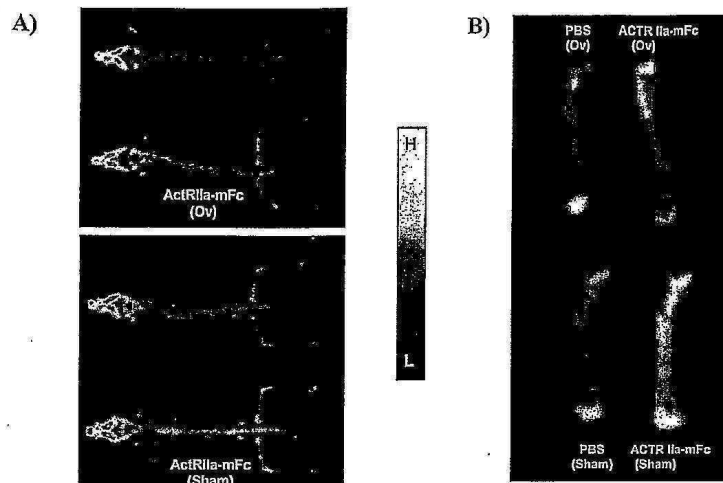


### 도면13

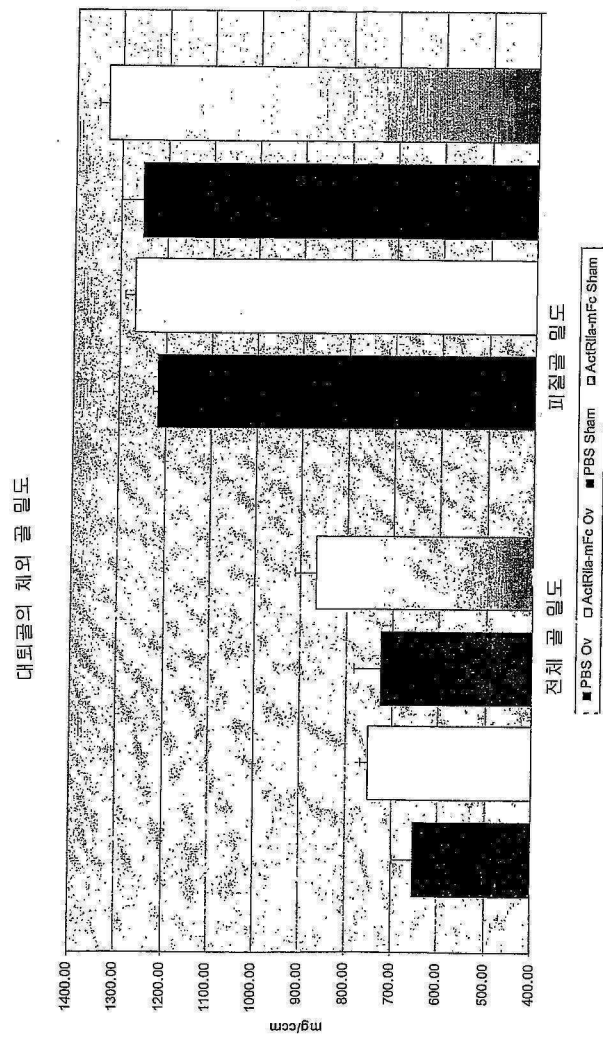
골중간 소주골 밀도(난소적출된 C57BL/6 생쥐)



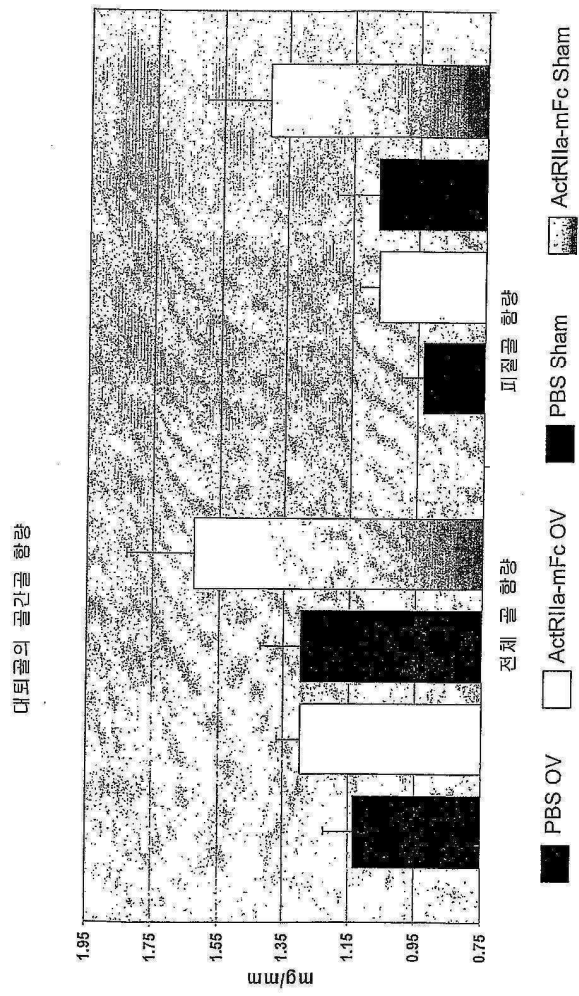
### 도면14



도면15

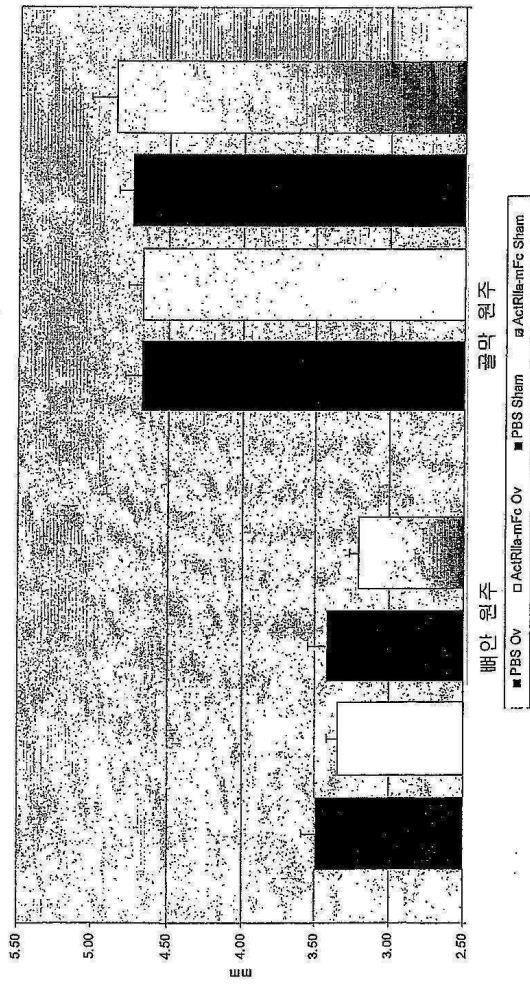


도면16



도면17

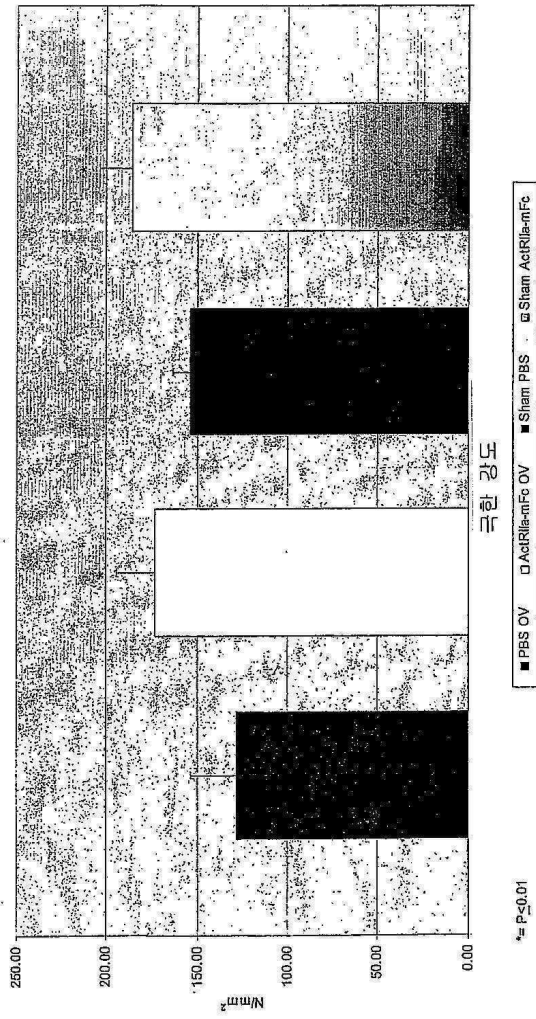
체외 대퇴부 피질 두께



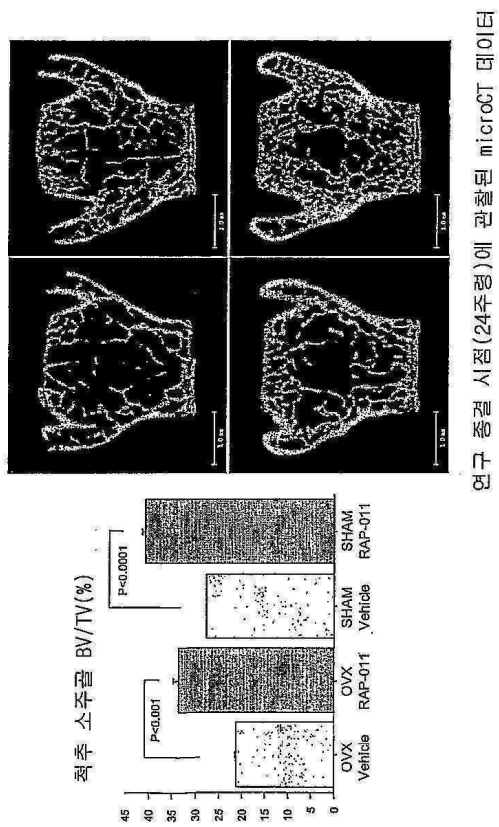


도면18

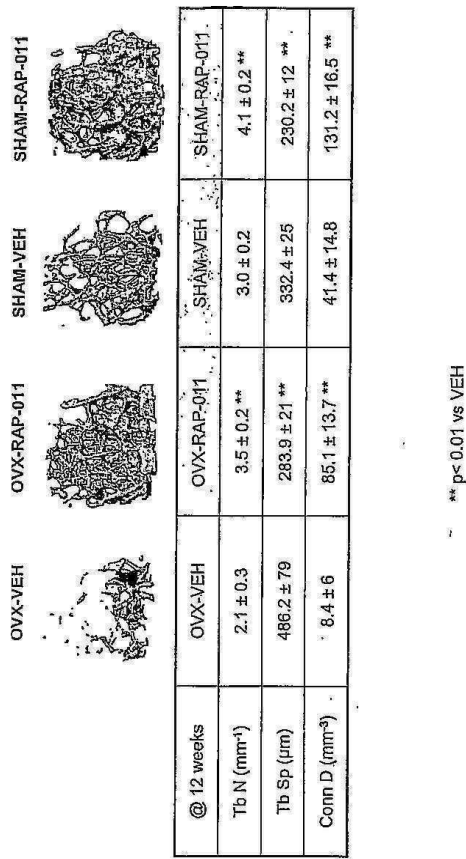
4개 지점 생물역학적 검사



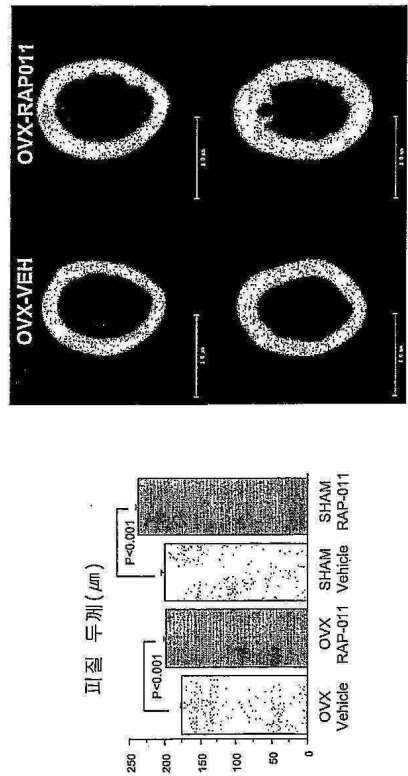
도면19



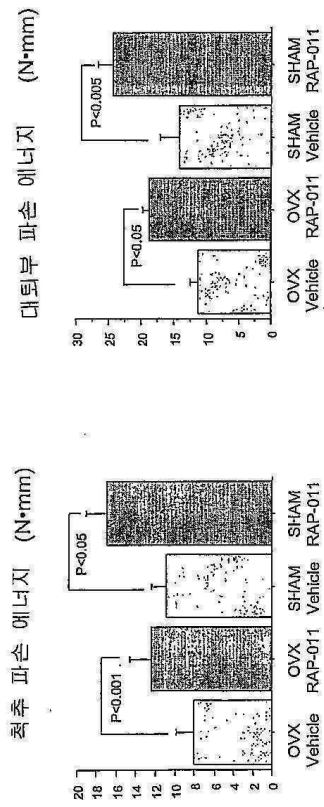
도면20



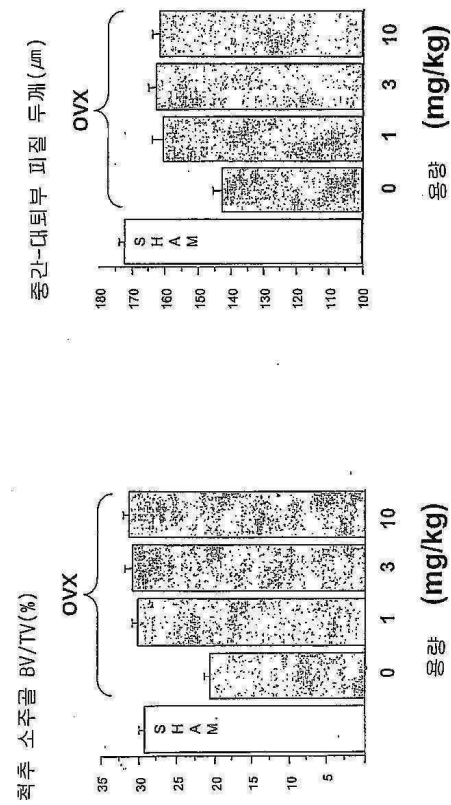
도면21



도면22



도면23





도면24

	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/mm)	Noc/BPm (/mm)	Ms/BS (%)	MAR (um/day)	BFR/BSd (um <sup>3</sup> /um <sup>2</sup> /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
P value	0.002	0.03	0.02	0.01	0.008	0.03	0.002

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Acceleron Pharma Inc.

Knopf, John

Seehra, Jasbir

<120> ACTIVIN-ACTRIIA ANTAGONISTS AND USES FOR  
PROMOTING BONE GROWTH

<130> PHPH-PWO-019

<140> PCT/US06/045322

<141> 2006-11-22

<150> US 60/739,462

<151> 2005-11-23

<150> US 60/783,322

<151> 2006-03-17

<150> US 60/844,855

<151> 2006-09-15

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<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 ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60

atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120

agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180

tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 240

gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300

tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360

gaagtcacac agcccaacttc aaatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg 420  
 ctctattcct tgggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480  
 tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttggtc caactcaaga cccaggacca 540  
 cccccacctt ctccattact aggggttgaac ccactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600  
 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660

tttccaatac aggacaaaca gtcatggcaa aatgaatacg aagtctacag tttgcctgga 720  
 atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780  
 gtggatcttt ggctgatcac agcatttcac gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840  
 gctaattgtg tctcttgaa tgaactgtgt catattgcag aaaccatggc tagaggattg 900  
 gcataattac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960  
 agggacatca aaagtaaaaa tgtgtgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgtctgac 1020  
 tttgggttg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgataacca tggacaggtt 1080  
 ggtaccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140

gcatttttga ggatagatat gtatgcatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200  
 tgtactgctg catagtgacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260  
 cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320  
 ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380  
 tgttgggac acgacgcaga agccagggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440  
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500  
 tgacaaatg ttgactttcc tccaaagaa tctagtctat ga 1542

<210

> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atacttggta gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60  
 agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120  
 ttgtctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 180  
 gatgatata actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag cctgaagta 240  
 ttttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300  
 gaagtcacac agcccaacttc aaatccagtt acacctaagc cacc 345

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> 43

<223> Position 43 may also be Ala

<220><221> VARIANT

<222> 100

<223> Position 100 may also be Ala

<220><221> VARIANT

<222> 212

<223> Position 212 may also be 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 Asp 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 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

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

Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
195 200 205

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
210 215 220

Lys

225

<210> 7

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
35 40 45

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

50

55

60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr  
85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro  
100 105 110



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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

340

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu

1 5

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> Homo sapiens  
 <400> 13  
  
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
   1                      5                      10                      15  
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr  
                                  20                      25                      30  
  
 Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn  
                                  35                      40                      45  
 Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His  
                                  50                      55                      60  
 Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys



85

90

95

Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly

100

105

110

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

115

120

125

Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly

130

135

140

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

340

345

350

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

355

360

365

Lys

<210> 14

<211> 1114

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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