

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2019-0075078 (43) 공개일자 2019년06월28일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 14/47</i> (2006.01) <i>A61K 38/00</i> (2006.01) <i>A61P 3/04</i> (2006.01) <i>C12N 9/12</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>C07K 14/4702</i> (2013.01) <i>A61K 38/00</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2019-7012900 (22) 출원일자(국제) 2017년10월05일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2019년05월03일 (86) 국제출원번호 PCT/US2017/055426 (87) 국제공개번호 WO 2018/067879 국제공개일자 2018년04월12일 (30) 우선권주장 62/404,727 2016년10월05일 미국(US) 62/510,417 2017년05월24일 미국(US)		(71) 출원인 악셀레론 파마 인코포레이티드 미국 02139 매사추세츠주 캄브리지 시드니 스트리트 128 (72) 발명자 쿠마르 라빈드라 미국, 매사추세츠 01720, 액톤, 알링턴 스트리트 421 그린버그 이스야 미국, 매사추세츠 02421, 렉싱턴, 폴렌 로드 37 (뒷면에 계속) (74) 대리인 강명구

전체 청구항 수 : 총 262 항

(54) 발명의 명칭 **ALK4:ActRIIB 이형다량체 및 이의 용도**

(57) 요약

특정 측면들에서, 본 명세서는ALK4 수용체의 세포외 도메인과 ActRIIB의 세포외 도메인이 포함된 가용성 이형화학적 폴리펩티드 복합체를 제공한다. 특정 측면들에서, 이러한 가용성 ALK4:ActRIIB 복합체는 예를 들면, 근육, 뼈, 연골, 지방, 신경 조직, 종양, 및/또는 암 세포의 성장을 조절(촉진 또는 억제)하는데 이용될 수 있다. 특정 측면들에서, 이러한 ALK4:ActRIIB 복합체는 근육 형성, 뼈 형성, 대사성 매개변수, 그리고 이들 조직, 세포 네트워크, 신장, 및 내분비계와 연관된 장애를 개선시키는데 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 19/04 (2018.01)

A61P 21/00 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 3/04 (2018.01)

C12N 9/12 (2013.01)

C12Y 207/1103 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C07K 2319/32 (2013.01)

(72) 발명자

사코 다이안 에스.

미국, 매사추세츠 02155, 메드포드, 미스틱 스트리트 14

카스통구야 로셀린

미국, 매사추세츠 02472, 워터타운, 제임스 스트리트 19

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 있어서, 이때 ALK4-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 (e.g., 아미노산 치환, 양이온화(cationization), 탈아미노화, 카르복실-말단 아미노산 이질성(heterogeneity), 포스포릴화, 및 당화)을 포함하며, 이는 ALK4-Fc 융합 단백질의 등전점(pI)을 변경시키거나 및/또는 the ActRIIB-Fc 융합 단백질은 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 이때:

- 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질과 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 사이에 pIs의 차이를 증가시키고;
- 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질과 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 사이에 pIs의 차이를 증가시키거나; 또는
- 상기 ALK4-Fc 융합 단백질에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질과 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 사이의 pIs 차이를 증가시키고, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질과 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 사이의 pIs 차이를 증가시키는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 이때:

- 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하고; 그리고
- 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 감소시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 4

청구항 1-3중 임의의 하나에 있어서, 이때 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이며, 그리고 이때 IgG1 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에

서 아미노산 치환.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N162R, N162K, 또는 N162H);
- b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D179R, D179K, 또는 D179H); 그리고
- c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N162R, N162K, or N162H) 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D179R, D179K, 또는 D179H).

청구항 8

청구항 7에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환(N162R);
- b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (D179R); 그리고
- c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (N162R) 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (D179R).

청구항 9

청구항 1-3중 임의의 한 항에 있어서, 이때 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG2 Fc 도메인이며, 그리고 이때 IgG2 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에 서 아미노산 치환.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

- a) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환(N160R, N160K, 또는 N160H);
- b) 서열 번호: 32의 D177 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D177R, D177K, 또는

D177H); 그리고 ; 그리고

c) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N160R, N160K, 또는 N160H) 그리고 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D177R, D177K, 또는 D177H).

청구항 13

청구항 1-3중 임의의 한 항에 있어서, 이때 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG3 Fc 도메인이며, 그리고 이때 IgG3 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 33의 N169에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 33의 N169에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 D186에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

- a) 서열 번호: 33의 N169에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환(S169R, S169K, 또는 S169H);
- b) 서열 번호: 33의 D186 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D186R, D186K, 또는 D186H); 그리고
- c) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (S169R, S169K, 또는 S169H) 그리고 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D186R, D186K, 또는 D186H).

청구항 17

청구항 1-3중 임의의 한 항에 있어서, 이때 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인이며, 그리고 이때 IgG4 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N166R, N166K, 또는 N166H);
- b) 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D183R, D183K, 또는 D183H); 그리고
- c) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N166R, N166K, 또는 N166H) 그리고 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D183R, D183K, 또는 D183H).

청구항 21

청구항 3에 있어서, 이때:

- a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 치환이 하나 또는 그 이상의 양으로 하전된 아미노산으로 치환된 것을 포함하고 [가령, 아르기닌 (R), 리신 (K), 또는 히스티딘 (H)]; 그리고
- b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 중성 또는 양으로 하전된 아미노산 치환이 하나 또는 그 이상의 음으로 하전된 아미노산 [가령, 아스파르트산 (E) 또는 글루탐산 (D)]을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 22

청구항 1-21중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG1 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상

의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K138E 또는 K138D);
- b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K217E 또는 K217D); 그리고
- c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K138E 또는 K138D) 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K217E 또는 K217D).

청구항 26

청구항 25에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K138E);
- b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 치환 (K217D); 그리고
- c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K138E) 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 치환 (K217D).

청구항 27

청구항 1-21중 임의의 한 항에 있어서 1-21, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG2 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG2 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K136E 또는 K136D);
- b) 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K215E 또는 K215D); 그리고
- c) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K136E 또는 K136D) 그리고 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K215E 또는 K215D).

청구항 31

청구항 1-21중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG3 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG3 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 이때 상기 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K145E 또는 K145D);
- b) 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K224E 또는 K224D); 그리고
- c) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K145E 또는 K145D) 그리고 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K224E 또는 K224D).

청구항 35

청구항 1-21중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인, 그리고 이때 상기 IgG4 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

- a) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

- a) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K142E 또는 K142D);
- b) 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K221E 또는 K221D); 그리고

c) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K142E 또는 K142D) 그리고 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K221E 또는 K221D).

청구항 39

청구항 2에 있어서, 이때:

a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하고; 그리고

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 이때 다음을 특징으로 하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 치환이 하나 또는 그 이상의 양으로 하전된 아미노산으로 치환된 것을 포함하고 [가령, 아르기닌 (R), 리신 (K), 또는 히스티딘 (H)]; 그리고

b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 중성 또는 양으로 하전된 아미노산 치환이 하나 또는 그 이상의 음으로 하전된 아미노산 [가령, 아스파르트산 (E) 또는 글루탐산 (D)]을 포함한다.

청구항 41

청구항 39 또는 40에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG1 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;

b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고

c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N162R, N162K, 또는 N162H);

b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환(D179R, D179K, 또는 D179H); 그리고

c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N162R, N162K, 또는

N162H) 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D179R, D179K, 또는 D179H).

청구항 45

청구항 44에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환(N162R);
- b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (D179R); 그리고
- c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (N162R) 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (D179R).

청구항 46

청구항 39 또는 40에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG2 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG2 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환(N160R, N160K, 또는 N160H);
- b) 서열 번호: 32의 D177 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D177R, D177K, 또는 D177H); 그리고 ; 그리고
- c) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N160R, N160K, 또는 N160H) 그리고 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D177R, D177K, 또는 D177H).

청구항 50

청구항 39 또는 40에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG3 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG3 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 51

청구항 50에 있어서, IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 33의 N169에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 33의 N169에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 D186에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 이때 상기 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 33의 S169 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (S169R, S169K, 또는 S169H);
- b) 서열 번호: 33의 D186 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D186R, D186K, 또는 D186H); 그리고
- c) 서열 번호: 33의 S169 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (S169R, S169K, 또는 S169H) 그리고 서열 번호: 33의 D186 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D186R, D186K, 또는 D186H).

청구항 54

청구항 39 또는 40에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG4 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 55

청구항 54에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N166R, N166K, 또는

N166H);

b) 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D183R, D183K, 또는 D183H); 그리고

c) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N166R, N166K, 또는 N166H) 그리고 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D183R, D183K, 또는 D183H).

청구항 58

청구항 2에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 감소시키는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 59

청구항 2 또는 39-40에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG1 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 61

청구항 59 또는 60에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 62

청구항 61에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K138E 또는 K138D);
- b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K217E 또는 K217D); 그리고
- c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K138E 또는 K138D) 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K217E 또는 K217D).

청구항 63

청구항 62에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K138E);
- b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 치환 (K217D); 그리고
- c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K138E) 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 치환 (K217D).

청구항 64

청구항 2 또는 39-40에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG2 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG2 Fc 도메인은 상기ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 66

청구항 64 또는 65에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 67

청구항 66에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

- a) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K136E 또는 K136D);
- b) 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K215E 또는 K215D); 그리고
- c) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K136E 또는 K136D) 그리고 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K215E 또는 K215D).

청구항 68

청구항 2 또는 39-40에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG3 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG3 Fc 도메인은 상기ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 69

청구항 68에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 70

청구항 68 또는 69에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 71

청구항 70에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

- a) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K145E 또는 K145D);
- b) 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K224E 또는 K224D); 그리고
- c) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K145E 또는 K145D) 그리고 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K224E 또는 K224D).

청구항 72

청구항 2 또는 39-40에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인이고, 그리고 이때 상기 IgG4 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 73

청구항 72에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 74

청구항 72 또는 73에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아미노산 치환;
- b) 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고
- c) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아미노산 치환.

청구항 75

청구항 74에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K142E 또는 K142D);
- b) 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K221E 또는 K221D); 그리고
- c) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K142E 또는 K142D) 그리고 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K221E 또는 K221D).

청구항 76

청구항 4-8 및 22-26중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

- a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 S132에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S132C) 그리고 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T144W); 그리고
- b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 세린 치환 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린 치환(Y185V)을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 77

청구항 4-8 및 22-26중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

- a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 S132에 상응하는 위치에 시스테인 치환

(S132C) 그리고 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T144W); 그리고

b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144 에 상응하는 위치에 세린 치환 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린 치환(Y185V)을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 78

청구항 41-45 및 59-63중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 S132에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S132C) 그리고 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T144W); 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144 에 상응하는 위치에 세린 치환 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린 치환(Y185V)을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 79

청구항 41-45 및 59-63중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 S132에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S132C) 그리고 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T144W); 그리고

b) 상기 변형된 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144 에 상응하는 위치에 세린 치환 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린 치환(Y185V)을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 80

청구항 9-12 및 27-30중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 S130에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S130C) 그리고 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T142W); 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142 에 상응하는 위치에 세린 치환 (T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린 치환(Y183V)을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 81

청구항 9-12 및 27-30중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 S130에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S130C) 그리고 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T142W); 그리고

b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142 에 상응하는 위치에 세린 치환 (T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린 치환(Y183V)을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 82

청구항 46-49 및 64-67중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 S130에 상응하는 위치에 시스테인 치환

(S130C) 그리고 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T142W); 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린 치환 (T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린 치환(Y183V)을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 83

청구항 46-49 및 64-67중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 S130에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S130C) 그리고 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T142W); 그리고

b) 상기 변형된 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린 치환 (T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린 치환(Y183V)을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 84

청구항 13-16 및 31-34중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 S139에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S139C) 그리고 서열 번호: 33의 T151에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T151W); 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 Y134에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y134C), 서열 번호: 33의 T151에 상응하는 위치에 세린 치환 (T151S), 서열 번호: 33의 L153에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L153A), 그리고 서열 번호: 33의 Y192에 상응하는 위치에 발린 치환(Y192V)을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 85

청구항 13-16 및 31-34중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 S139에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S139C) 그리고 서열 번호: 33의 T151에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T151W); 그리고

b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 Y134에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y134C), 서열 번호: 33의 T151에 상응하는 위치에 세린 치환 (T151S), 서열 번호: 33의 L153에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L153A), 그리고 서열 번호: 33의 Y192에 상응하는 위치에 발린 치환(Y192V)을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 86

청구항 50-53 및 68-71중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 S139에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S139C) 그리고 서열 번호: 33의 T151에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T151W); 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 Y134에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y134C), 서열 번호: 33의 T151에 상응하는 위치에 세린 치환 (T151S), 서열 번호: 33의 L153에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L153A), 그리고 서열 번호: 33의 Y192에 상응하는 위치에 발린 치환(Y192V)을 포함하는,

ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 87

청구항 50-53 및 68-71중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

- a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 S139에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S139C) 그리고 서열 번호: 33의 T151에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T151W); 그리고
- b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 Y134에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y134C), 서열 번호: 33의 T151에 상응하는 위치에 세린 치환 (T151S), 서열 번호: 33의 L153에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L153A), 그리고 서열 번호: 33의 Y192에 상응하는 위치에 발린 치환(Y192V)을 포함하는,
- ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 88

청구항 17-20 및 35-38중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

- a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 S136에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S136C) 그리고 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T148W); 그리고
- b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 치환 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린 치환(Y189V)을 포함하는,
- ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 89

청구항 17-20 및 35-38중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

- a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 S136에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S136C) 그리고 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T148W); 그리고
- b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 치환 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린 치환(Y189V)을 포함하는,
- ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 90

청구항 54-58 및 72-75중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

- a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 S136에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S136C) 그리고 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T148W); 그리고
- b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 치환 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린 치환(Y189V)을 포함하는,
- ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 91

청구항 54-58 및 72-75중 임의의 한 항에 있어서, 이때:

- a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 S136에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (S136C) 그리고 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판 치환을 포함하고 (T148W); 그리고
- b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인 치환 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 치환 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌 치환(L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린 치환(Y189V)을 포함하는,
- ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 92

청구항 22 또는 29에 있어서, 이때 상기 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호:66의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 93

청구항 92에 있어서, 이때 상기 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 66의 138에 상응하는 위치에서 글루탐산;
- b) 서열 번호: 66의 217에 상응하는 위치에서 아스파르트산;
- c) 서열 번호: 66의 138에 상응하는 위치에서 글루탐산; 그리고 서열 번호: 66의 217에 상응하는 위치에서 아스파르트산;.

청구항 94

청구항 92 또는 93에 있어서, 이때 상기 변형된 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 66의 132에 상응하는 위치에 시스테인과 서열 번호: 66의 144에 상응하는 위치에 트립토판을 더 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 95

청구항 4 또는 41에 있어서, 이때 상기 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호:67의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 96

청구항 95에 있어서, 이때 상기 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 67의 162에 상응하는 위치에 아르기닌;
- b) 서열 번호: 67의 179에 상응하는 위치에 아르기닌; 그리고
- c) 서열 번호: 67의 162에 상응하는 위치에 아르기닌 그리고 서열 번호: 67의 179에 상응하는 위치에 아르기닌.

청구항 97

청구항 95 또는 96에 있어서, 이때 상기 변형된 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 67의 127에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 67의 144에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 67의 146에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 67의 185에 상응하는 위치에 발린을 더 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

청구항 98

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조법 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31 의 S132에 상응하는 위치에 시스테인(S132C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판 (T144W), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함하고; 그리고
- b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31 의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인(Y127C), 서열 번호: 31 의 T144에 상응하는 위치에 세린 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌 (L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린(Y185V)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 99

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조법 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31 의 S132에 상응하는 위치에 시스테인(S132C), 서열 번호: 31 의 T144에 상응하는 위치에 트립토판 (T144W), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함하고; 그리고

b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31 의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 세린 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌 (L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린(Y185V)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 100

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31 의 S132에 상응하는 위치에 시스테인(S132C), 그리고 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판 (T144W); 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31 의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 세린 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌 (L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린(Y185V), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 101

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31 의 S132에 상응하는 위치에 시스테인(S132C), 그리고 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판 (T144W); 그리고

b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31 의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 세린 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌 (L146A), 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린(Y185V), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 102

청구항 98-101중 임의의 한 항에 있어서, 이때 서열 번호: 31의H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산인, 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 103

청구항 98-101중 임의의 한 항에 있어서, 이때 서열 번호: 31의H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산인, 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 104

청구항 98-103중 임의의 한 항에 있어서 이때 상기 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호:31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 105

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 의 S130에 상응하는 위치에 시스테인(S130C), 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판 (T142W), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함하고; 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 32의 T142

에 상응하는 위치에 세린 (T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린(Y183V)을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 106

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 의 S130에 상응하는 위치에 시스테인(S130C), 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판 (T142W), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함하고; 그리고
- b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린 (T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린(Y183V)을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 107

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 의 S130에 상응하는 위치에 시스테인(S130C), 그리고 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판 (T142W); 그리고
- b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린 (T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린(Y183V), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 108

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 의 S130에 상응하는 위치에 시스테인(S130C), 그리고 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판 (T142W); 그리고
- b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린 (T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린(Y183V), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 109

청구항 105-108중 임의의 한 항에 있어서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산인, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 110

청구항 105-108중 임의의 한 항에 있어서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산인, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 111

청구항 105-110중 임의의 한 항에 있어서 이때 상기 변형된 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호:32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 112

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35 의 S136에 상응하는 위치에 시스테인(S136C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판 (T148W), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함하고; 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35 의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인(Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌 (L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린(Y189V)을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 113

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35 의 S136에 상응하는 위치에 시스테인(S136C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판 (T148W), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함하고; 그리고

b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35 의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인(Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌 (L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린(Y189V)을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 114

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35 의 S136에 상응하는 위치에 시스테인(S136C), 그리고 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판 (T148W); 그리고

b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35 의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌 (L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린(Y189V), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 115

하기의 특징을 갖는, 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35 의 S136에 상응하는 위치에 시스테인(S136C), 그리고 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판 (T148W); 그리고

b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35 의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌 (L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린(Y189V), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함한다.

청구항 116

청구항 112-115중 임의의 한 항에 있어서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산인, 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 117

청구항 112-115중 임의의 한 항에 있어서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산인, 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 118

청구항 112-117중 임의의 한 항에 있어서 이때 상기 변형된 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호:35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 119

청구항 1-118중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 다음으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 ALK4 폴리펩티드 도메인을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) i) 서열 번호: 9의 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34 아미노산 중 임의의 하나에서 시작하고, 그리고
- ii) 서열 번호: 9의 아미노산 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나에서 종료되는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;
- b) 서열 번호: 9의 아미노산 34-101에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;.
- c) 서열 번호: 10에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;
- d) i) 서열 번호: 19의 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34 아미노산 중 임의의 하나에서 시작하고, 그리고
- ii) 서열 번호: 19의 아미노산 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나에서 종료되는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;
- e) 서열 번호: 19의 아미노산 34-101에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열; 그리고
- f) 서열 번호: 20에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열.

청구항 120

청구항 중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 다음으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) i) 서열 번호: 1의 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29 중 임의의 하나에서 시작하고, 그리고
- ii) 서열 번호: 1의 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나에서 종료되는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;
- b) 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;.
- c) 서열 번호: 1의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;.
- d) 서열 번호: 2에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;

e) 서열 번호: 3에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;

f) 서열 번호: 5에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열; 그리고

g) 서열 번호: 6에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열;

청구항 121

청구항 120에 있어서, 이때 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하지 않는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 122

청구항 1-121중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 상기 ALK4 도메인과 Fc 도메인 사이에 위치한 링커 도메인을 더 포함하고 및/또는 상기 ActRIIB 융합 단백질은 상기 ActRIIB 도메인과 Fc 도메인 사이에 위치한 링커 도메인을 더 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 123

청구항 122에 있어서, 이때 상기 링커 도메인은 다음에서 선택되는, ALK4:ActRIIB 이형다량체. TGGG (서열 번호: 17), TGGGG (서열 번호: 15), SGGGG (서열 번호: 16), GGGGS (서열 번호: 58), GGG (서열 번호: 13), GGGG (서열 번호: 14), SGGG (서열 번호: 18), 그리고 GGGGS (서열 번호: 58).

청구항 124

적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 76의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 72의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 125

청구항 124에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체:

a) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에 발린;

b) 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;

c) 서열 번호: 76의 D286에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;

d) 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;

e) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에 알라닌, 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에 발린(Y292V); 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;

f) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산; 그리고

g) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에 발린(Y292V); 서열

번호: 76의 269에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산; 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산.

청구항 126

청구항 124 또는 125에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체:

- a) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 시스테인, 그리고 서열 번호: 72의 위치 262에 트립토판;
- b) 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- c) 서열 번호: 72의 353에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- d) 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- e) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산;
- f) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산; 그리고
- g) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산; 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산.

청구항 127

서열 번호: 76의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ALK4-Fc 융합 단백질.

청구항 128

청구항 127에 있어서, 이때 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는, ALK4-Fc 융합 단백질.

- a) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에 발린;
- b) 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;
- c) 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;
- d) 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;
- e) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에 알라닌, 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에 발린 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산; 그리고
- f) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에 알라닌, 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에 발린; 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;
- g) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에 발린; 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산; 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산.

청구항 129

서열 번호: 72의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 130

청구항 129에 있어서, 이때 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는, ActRIIB-Fc 융합 단백질.

- a) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 시스테인, 그리고 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에 트립토판;
- b) 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- c) 서열 번호: 72의 353에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- d) 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- e) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산;
- f) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산; 그리고
- g) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산; 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산.

청구항 131

서열 번호: 74의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ALK4-Fc 융합 단백질.

청구항 132

청구항 131에 있어서, 이때 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는, ALK4-Fc 융합 단백질.

- a) 서열 번호: 74의 258에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 74의 275에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 74의 277에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 74의 316에 상응하는 위치에 발린;
- b) 서열 번호: 74의 293에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;
- c) 서열 번호: 74의 310에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;
- d) 서열 번호: 74의 293에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 74의 310에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;
- e) 서열 번호: 74의 258에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 74의 275에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 74의 277에 상응하는 위치에 알라닌, 서열 번호: 74의 316에 상응하는 위치에 발린 그리고 서열 번호: 74의 293에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산; 그리고
- f) 서열 번호: 74의 258에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 74의 275에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 74의 277에 상응하는 위치에 알라닌, 서열 번호: 74의 316에 상응하는 위치에 발린; 그리고 서열 번호: 74의 310에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산;
- g) 서열 번호: 74의 258에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 74의 275에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 74의 277에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 74의 316에 상응하는 위치에 발린; 서열 번호: 74의 293에 상응하는 위치에 양으로 하전된 아미노산; 그리고 서열 번호: 74의 310에 상응하는 위치에서 양으로

하전된 아미노산.

청구항 133

서열 번호: 70의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 134

청구항 133에 있어서, 이때 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는, ActRIIB-Fc 융합 단백질.

- a) 서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에 시스테인, 그리고 서열 번호: 70의 287에 상응하는 위치에 트립토판;
- b) 서열 번호: 70의 281에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- c) 서열 번호: 70의 360에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- d) 서열 번호: 70의 281에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 70의 360에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산;
- e) 서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 70의 287에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 70의 281에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산;
- f) 서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 70의 287에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 70의 360에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산; 그리고

서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 70의 287에 상응하는 위치에 트립토판, 그리고 서열 번호: 70의 281에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산; 그리고 서열 번호: 70의 360에 상응하는 위치에 음으로 하전된 아미노산.

청구항 135

청구항 125, 128, 그리고 132중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기는 변형된 또는 자연 발생적 (가령, R, K, 또는 H) 아미노산인, 이형다량체 또는 융합 단백질.

청구항 136

청구항 135에 있어서, 이때 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기는 R인, 이형다량체 또는 융합 단백질.

청구항 137

청구항 126, 130, 그리고 134 음으로 하전된 아미노산 잔기는 변형된 또는 자연 발생적 (가령, D 또는 E) 아미노산인, 이형다량체 또는 융합 단백질.

청구항 138

청구항 137에 있어서, 이때 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 D인, 이형다량체 또는 융합 단백질.

청구항 139

청구항 137에 있어서, 이때 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 E인, 이형다량체 또는 융합 단백질.

청구항 140

적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 48의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 80의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또

는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 141

청구항 140에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 48의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 48의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 48의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 48의 292에 상응하는 위치에서 발린을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 142

청구항 140 또는 141에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 80의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 80의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 80의 331에 상응하는 위치에 서 아르기닌을 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 143

서열 번호: 48의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ALK4-Fc 융합 단백질.

청구항 144

청구항 143에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 48의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 48의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 48의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 48의 292에 상응하는 위치에서 발린을 포함하는, ALK4-Fc 융합 단백질.

청구항 145

서열 번호: 80의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 146

청구항 145에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 80의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 80의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 80의 331에 상응하는 위치에 서 아르기닌을 포함하는, ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 147

서열 번호: 47의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ALK4-Fc 융합 단백질.

청구항 148

청구항 147에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 47의 258에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 47의 275에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 47의 277에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 47의 316에 상응하는 위치에서 발린을 포함하는, ALK4-Fc 융합 단백질.

청구항 149

서열 번호: 78의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 150

청구항 145에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 78의 275에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 78의 287에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 78의 356에 상응하는 위치에

서 아르기닌을 포함하는, ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 151

청구항 1-150중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 이형다량체 또는 융합 단백질은 당화된 아미노산, 폐길화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 바이오티닐화된 아미노산, 그리고 지질 모이어티에 접합된 아미노산에서 선택된 하나 또는 그 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체, ALK4-Fc 융합 단백질, 또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 152

청구항 151에 있어서, 이때 상기 이형다량체 또는 융합 단백질은 당화되며, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 계통에서 획득가능한 당화 패턴을 보유하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체, ALK4-Fc 융합 단백질, 또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 153

청구항 1-152에 있어서, 이때 상기 이형다량체 또는 융합 단백질은 액티빈 (가령, 액티빈 A 및/또는 액티빈 B), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10, 그리고 GDF3로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 리간드에 결합하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체, ALK4-Fc 융합 단백질, 또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 154

청구항 1-153에 있어서, 이때 상기 이형다량체 또는 융합 단백질은 BMP9에 실질적으로 결합하지 않는, ALK4:ActRIIB 이형다량체, ALK4-Fc 융합 단백질, 또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 155

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-154중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 대응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 BMP10에 결합하는, 이형다량체.

청구항 156

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-155중 임의의 한 항에 있어서, 상기 이형다량체는 대응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 BMP9에 결합하는, 이형다량체.

청구항 157

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-156에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 대응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 GDF3에 결합하는, 이형다량체.

청구항 158

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-157에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 액티빈 B에 결합하는, 이형다량체.

청구항 159

청구항 1-158, 이때 상기 이형다량체 또는 융합 단백질은 액티빈 (가령, 액티빈 A 및/또는 액티빈 B), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10, 그리고 GDF3로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 리간드에 의한 신호생성을 억제하는, ALK4:ActRIIB 이형다량체, ALK4-Fc 융합 단백질, 또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질.

청구항 160

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-154에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 BMP9 신호생성을 실질적으로 억제하지 않는, 이형다량체.

청구항 161

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-160에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비

교하여 BMP10 신호전달의 약한 억제제인, 이형다량체.

청구항 162

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-161에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 BMP9 신호전달의 약한 억제제인, 이형다량체.

청구항 163

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-162에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 GDF3 신호전달의 약한 억제제인, 이형다량체.

청구항 164

청구항 1-126, 135-142, 그리고 151-163에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 액티빈 B 신호전달의 강력한 억제제인, 이형다량체.

청구항 165

청구항 159-164에 있어서, 이때 상기 리간드 신호생성은 세포-기반 분석에서 측정되는, 이형다량체.

청구항 166

청구항 1-126, 135-142, 그리고 160-165에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 이형이량체인, 이형다량체.

청구항 167

청구항 1-166중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 pI를 최소한 0.1 (가령, 최소한 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.3, 1.5, 1.7, 2.0, 2.3, 2.5, 2.7, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 또는 최소한 4.0) 변경시키는, 상기 이형다량체 또는 Fc 융합 단백질.

청구항 168

임의의 전술한 청구항에 있어서, 이때:

- 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질과 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 사이에 등전점의 차이를 증가시키고;
- 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질과 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 사이에 등전점의 차이를 증가시키거나; 또는
- 상기 ALK4-Fc 융합 단백질에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질과 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 사이의 등전점 차이를 증가시키고, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질과 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 사이의 등전점 차이를 증가시키는, ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 169

청구항 167에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질과 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 pI에서 최소한 0.7 차이 (가령, pI에서 최소한 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 최소한 4.0 또는 그 이상 차이)를 갖는, 이형다량체.

청구항 170

청구항 1-126, 135-142, 및 160-169중 임의의 한 항에 따른 이형다량체와 약학적으로 수용가능한 운반체를 포함하는 약학 제제.

청구항 171

청구항 170에 있어서, 이때 약학 제제는 실질적으로 발열원이 없는, 약학 제제.

청구항 172

청구항 170 또는 171에 있어서, 이때 약학 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 ALK4 동종다량체를 포함하는, 약학 제제.

청구항 173

청구항 170-172중 임의의 한 항에 있어서, 이때 약학 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 ActRIIB 동종다량체를 포함하는, 약학 제제.

청구항 174

청구항 1-169에서 기술된 바와 같은 ALK4-Fc 융합 단백질의 코딩 서열을 포함하는 재조합 핵산.

청구항 175

청구항 174에 있어서, 이때 상기 핵산은 서열 번호: 75에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 176

청구항 174에 있어서, 이때 상기 핵산은 서열 번호: 77에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 177

청구항 174에 있어서, 이때 상기 핵산은 서열 번호: 82에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 178

청구항 174에 있어서, 이때 상기 핵산은 서열 번호: 83에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 179

청구항 1-169에서 기술된 바와 같은 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 코딩 서열을 포함하는 재조합 핵산.

청구항 180

청구항 179에 있어서, 이때 상기 핵산은 서열 번호: 71에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 181

청구항 179에 있어서, 이때 상기 핵산은 서열 번호: 73에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 182

청구항 179에 있어서, 이때 상기 핵산은 서열 번호: 79에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 183

청구항 179에 있어서, 이때 상기 핵산은 서열 번호: 81에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 184

청구항 174-178의 ALK4 폴리펩티드의 코딩 서열에 작동가능하도록 연계된 프로모터 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드.

청구항 185

청구항 179-183의 ActRIIB 폴리펩티드의 코딩 서열에 작동가능하도록 연계된 프로모터 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드.

청구항 186

청구항 174-178중 임의의 한 항에 따른 ALK4 폴리펩티드와 청구항 179-183중 임의의 한 항에 따른 ActRIIB 폴리펩티드의 코딩 서열에 작동가능하도록 연계된 프로모터 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드.

청구항 187

청구항 174-186중 임의의 한 항에 있어서 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

청구항 188

청구항 174-186중 임의의 한 항에 따른 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 청구항 187에 따른 벡터로 형질변환된 세포.

청구항 189

청구항 186에 있어서, 이때 상기 세포는 CHO 세포인, 세포.

청구항 190

ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체를 만드는 방법에 있어서, 이 방법은 ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 세포를 배양하고, 이때, 상기 세포는 청구항 174-176중 임의의 한 항에 따른 재조합 폴리뉴클레오티드와 청구항 179-183중 임의의 한 항에 따른 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 191

ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체를 만드는 방법에 있어서, 이 방법은 ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 세포를 배양하고, 이때, 상기 세포는 청구항 186중 임의의 한 항에 따른 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 192

ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드가 포함된 이형다량체를 만드는 방법:

- ALK4 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 제 1 세포를 배양하고, 이때 상기 제 1 세포는 청구항 174-178중 임의의 한 항에 따른 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 그리고
- 발현된 ALK4 폴리펩티드를 회수하고;
- ActRIIB 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 제 2 세포를 배양하고, 이때 상기 제 2 세포는 청구항 179-183중 임의의 한 항에 따른 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 그리고
- 발현된 ActRIIB 폴리펩티드를 회수하고;
- ALK4:ActRIIB 이형다량체 형성에 적합한 조건하에 회수된 ALK4 폴리펩티드와 회수된 ActRIIB 폴리펩티드를

복합시킨다.

청구항 193

청구항 190-192중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 상기 이형다량체를 회수하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 194

청구항 190-193중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ALK4 폴리펩티드는 TPA 리더 서열을 이용하여 발현되는, 방법.

청구항 195

청구항 190-193중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 TPA 리더 서열을 이용하여 발현되는, 방법.

청구항 196

청구항 194 또는 195에 있어서, 이때 상기 TPA 리더는 서열 번호: 38의 코딩 서열을 포함하는, 방법.

청구항 197

청구항 190-196중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 세포는 CHO 세포인, 방법.

청구항 198

청구항 190-197중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 이형이량체인, 방법.

청구항 199

적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 76의 아미노산 서열에 대하여 최소한 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 72의 아미노산 서열에 대하여 최소한 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 200

청구항 199에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 76의 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 201

청구항 199에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 38의 리더 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 202

청구항 199-201중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 70의 아미노산 서열에 대하여 최소한 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 203

청구항 199-202중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 204

청구항 199-203중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 38의 리더 서열을 포함

하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 205

청구항 199-201중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 74의 아미노산 서열에 대하여 최소한 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 206

재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 있어서, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체.

청구항 207

청구항 1-126, 135-142, 151-169 및 199-206중 임의의 한 항에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 근육 소실 또는 불충분한 근육 성장과 연관된 장애를 가진 환자를 치료하는 방법

청구항 208

청구항 207에 있어서, 이때 환자는 근육 위축을 가진, 방법.

청구항 209

청구항 207에 있어서, 이때 환자는 근육 위축병을 가진, 방법.

청구항 210

청구항 208에 있어서, 이때 근육 위축병은 듀시엔 근육 위축병인, 방법.

청구항 211

청구항 210에 있어서, 이때 환자는 청소년이며, 듀시엔 근위축병으로 진단받은 1 내지 5년 이내에 치료를 시작하는 방법.

청구항 212

청구항 208에 있어서, 이때 이 때 근육 위축병은 Becker 근육 위축병인, 방법.

청구항 213

청구항 210-212중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있는, 방법: 에테플리르센, 코르티코스테로이드 (가령, 데플라사코르트), 스테로이드 (가령, 프레드니손), 혈압 및/또는 심장 약물(가령, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 베타 차단제, 이뇨제), 항-천식 (가령, 알부테롤), 비타민/영양제(가령, 아미노산, 카르니틴, 코엔자임 Q10, 크레아틴, 어유, 녹차 추출물, 비타민 E), 줄기 세포 치료, 유전자 요법, 인공 호흡, 수술, 물리 치료, 식이 요법 및/또는 운동

청구항 214

청구항 209에 있어서, 이때 근육 위축병은 안면건감상완 근육 위축병인, 방법. .

청구항 215

청구항 214에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 알부테롤, 언어 치료, 수술, 보행 보조기구, 등 받침대, T 세포 억제제(가령, 절두된 히스티딜-tRNA 합성효소), 줄기 세포 치료, 유전자 요법 및/또는 발지 장치중 하나 또는 그 이상의 조합과 함께 투여될 수 있는, 방법.

청구항 216

청구항 207에 있어서, 이때 환자는 근육위축성측색경화증을 갖고 있는 방법.

청구항 217

청구항 216에 있어서, 이때 상기 환자는 근위축성 측색 경화증으로 진단을 받은 후 치료를 받는, 방법.

청구항 218

청구항 216 또는 217에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있는 방법: 킬루줄, 에다라본, 마시티닙, 항산화제, 물리 치료법, 언어 치료법, 영양 보조, 호흡 보조 (가령, 비-침습적 인공 호흡기), 줄기 세포 치료, 및/또는 유전자 치료.

청구항 219

청구항 207에 있어서, 이때 상기 장애는 암 또는 암 요법과 연관된 악액질인, 방법.

청구항 220

청구항 207에 있어서, 이때 장애는 근육감소증인, 방법.

청구항 221

청구항 220에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 우로코르틴 II, 호르몬 대체 요법 (가령, 테스토스테론 또는 인간 성장 호르몬), 크레아틴, 비타민 D, 운동, 식이요법, 및/또는 체력 단련과 병용되는, 방법.

청구항 222

청구항 207에 있어서, 이때 장애는 산발성 봉입체 근염인, 방법.

청구항 223

청구항 222에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있는 방법: 코르티코스테로이드, 프레드니손, 옥산드로론, 메토티렉세이트, 마이코페놀레이트 모페틸, 정맥내 면역글로블린, 베타 인터페론-1a, 에타네르셉트, 알레무투수맙, 폴리스테틴, 리툼, 비마그루맙, 아리코클로몰, 라파마이신, 항산화제, 카르니틴, 코엔자임 Q10, 물리치료, 작업 요법, 줄기 세포 치료, 및/또는 유전자 치료.

청구항 224

청구항 1-126, 135-142, , 151-169 및 199-207중 임의의 한 항에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 신경퇴행과 연관된 장애를 가진 환자를 치료하는 방법

청구항 225

청구항 224에 있어서, 이때 장애는 근위축성측색경화증인, 방법.

청구항 226

청구항 225에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있는 방법: 킬루줄, 에다라본, 마시티닙, 항산화제, 물리 치료법, 언어 치료법, 영양 보조, 호흡 보조 (가령, 비-침습적 인공 호흡기), 줄기 세포 치료, 및/또는 유전자 치료.

청구항 227

청구항 1-126, 135-142, 151-169 및 199-207중 임의의 한 항에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 섬유증, 또는 섬유증과 연관된 장애를 가진 환자를 치료하는 방법.

청구항 228

청구항 227에 있어서, 이때 이때 섬유증과 연관된 장애 또는 상태는 폐 섬유증, 과민성 폐렴, 특발성 섬유증, 결핵, 폐렴, 낭포성 섬유증, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 기종, 신장 (콩팥) 섬유증, 신장 (콩팥) 부전, 만성 신장 (콩팥) 질환, 뼈 섬유증, 골수섬유증, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 경피증, 사르코이드증, 다발성 맥관염이 있는 육아종증, 페이로니 질환, 간 섬유증, 윌슨 질환, 글리코겐 저장 질환 (특히 유형 III, IV, IX, 및 X), 철-과부하, 고세 질환, 켈웨거 증후군, 비알코올성 및 알코올성 지방간염, 담즙 경화증, 경화담관염, 버드-키아리 증후군, 외과술-연관된 섬유증, 크론 질환, 듀프렌 경축, 종격 섬유증, 신장원발성 섬유증,

후복막 섬유증, 심방 섬유증, 심근내막 섬유증, 횡장 섬유증에서 선택되는, 방법.

청구항 229

청구항 227에 있어서, 이때 섬유증과 연관된 장애 또는 상태는 특발성 폐 섬유증인, 방법.

청구항 230

청구항 1-126, 135-142, 151-169, 그리고 199-207중 임의의 하나에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 환자의 체중을 감소시키는 방법..

청구항 231

청구항 1-126, 135-142, 151-169 및 199-207중임의의 하나에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 환자의 체중 증가를 줄이는 방법.

청구항 232

청구항 1-126, 135-142, 151-169, 그리고 199-207중 임의의 하나에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 당뇨병 치료 또는 예방 방법.

청구항 233

청구항 232에 있어서, 이때 상기 피험자는 유형 II 당뇨병을 가진, 방법.

청구항 234

청구항 1-126, 135-142, 151-169, 그리고 199-207중 임의의 하나에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 비만 치료 또는 예방 방법.

청구항 235

청구항 1-126, 135-142, 151-169, 그리고 199-207중 임의의 하나에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 지방 간 질환 치료 또는 예방 방법.

청구항 236

청구항 235에 있어서, 이때 상기 피험자는 비-알코올성 지방 간 질환을 가진, 방법.

청구항 237

청구항 1-126, 135-142, 151-169, 그리고 199-207중 임의의 하나에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 환자에서 콜레스테롤 및/또는 트리글리세리드를 감소시키는 방법..

청구항 238

청구항 230-237중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 피험자의 신체비만지수 (BMI)는 25 kg/m^2 또는 그 이상인, 방법.

청구항 239

청구항 230-237중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 피험자는 비만인, 방법.

청구항 240

청구항 239에 있어서, 이때 상기 피험자의 신체비만지수 (BMI)는 30 kg/m^2 또는 그 이상인, 방법.

청구항 241

청구항 230-240중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 피험자는 인슐린 저항성을 갖는, 방법.

청구항 242

청구항 230-241에 있어서, 이때 상기 피험자는 유형 2 당뇨병을 갖는, 방법.

청구항 243

청구항 230-242에 있어서, 이때 상기 피험자는 이상지질혈증, 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 낮은 HDL 혈청 수준, 높은 LDL 혈청 수준, 및 고중성지방혈증으로 구성된 집단에서 선택된 질환 또는 상태를 갖는, 방법.

청구항 244

청구항 230-243에 있어서, 이때 상기 피험자는 고혈압 (높은 혈압), 심근 경색, 말초 동맥 질환, 혈관조절 기능 이상, 동맥경화증, 울혈성 심장 부전, 죽상경화증, 관상 심장 질환, 또는 미세혈관 질환으로 구성된 집단에서 선택된 질환 또는 상태를 갖는, 방법.

청구항 245

청구항 230-244에 있어서, 이때 상기 피험자는 지방 간 질환을 갖는, 방법.

청구항 246

청구항 245에 있어서, 이때 상기 피험자는 비-알코올성 지방 간 질환을 가진, 방법.

청구항 247

청구항 1-126, 135-142, 151-169, 그리고 199-207중 임의의 한 항에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여, 바람직하지 않은 체중 증가 및/또는 대사 장애를 갖는 장애 또는 상태의 치료 또는 예방방법..

청구항 248

청구항 247에 있어서, 이때 장애 또는 상태는 고혈당, 지질 대사 질환, 장애, 이상지질혈증, 낮은 HDL 수준, 높은 LDL 수준, 높은 트리글리세리드 수준, 고지질혈증, 지단백질 일탈, 포도당 대사 질환, 포도당 과민증, 인슐린 저항성, 손상된 포도당 내성 (IGT), 손상된 공복 포도당 (IFG), 높은 요산 수준, NAFLD, 지방 간, NASH, 다낭포성 난소 증후군, 고인슐린혈증, 비만, 유형 II 당뇨병, 심장 질환, 높은 혈압, 죽상경화증, 증후군 X, 대사성 증후군, 및 고혈압으로 구성된 집단에서 선택된 질환 또는 상태를 갖는, 방법.

청구항 249

청구항 1-126, 135-142, 151-169, 그리고 199-207중 임의의 한 항에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하여 섬유증, 또는 섬유증과 연관된 장애 또는 상태를 가진 환자를 치료하는 방법.

청구항 250

청구항 248에 있어서, 이때 섬유증과 연관된 장애 또는 상태는 폐 섬유증, 과민성 폐렴, 특발성 섬유증, 결핵, 폐렴, 낭포성 섬유증, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 기종, 신장 (콩팥) 섬유증, 신장 (콩팥) 부전, 만성 신장 (콩팥) 질환, 뼈 섬유증, 골수섬유증, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 경피증, 사르코이도증, 다발성 맥관염이 있는 육아종증, 페이로니 질환, 간 섬유증, 윌슨 질환, 글리코젠 저장 질환 (특히 유형 III, IV, IX, 및 X), 철-과부하, 고세 질환, 켈웨거 증후군, 비알코올성 및 알코올성 지방간염, 담즙 경화증, 경화담관염, 버드-키아리 증후군, 외과술-연합된 섬유증, 크론 질환, 듀프렌 경축, 종격 섬유증, 신장원발성 섬유증, 후복막 섬유증, 심방 섬유증, 심근내막 섬유증, 횡장 섬유증에서 선택되는, 방법.

청구항 251

청구항 249에 있어서, 이때 섬유증과 연관된 장애 또는 상태는 특발성 폐 섬유증인, 방법.

청구항 252

청구항 1-126, 135-142, 151-169, 그리고 199-207중 임의의 한 항에 따른 이형다량체의 효과량을 이를 필요로

하는 환자에게 투여하여 신장 질환 또는 신장 질환 여병을 치료 또는 예방 방법.

청구항 253

청구항 252에 있어서, 이때 환자는 만성 신장 질환 또는 부전을 가진, 방법.

청구항 254

청구항 252에 있어서, 이때 환자는 급성 신장 질환 또는 부전을 가진 방법.

청구항 255

청구항 252에 있어서, 이때 환자는 단계 1, 단계, 2, 단계 3, 단계 4, 또는 단계 5의 신장 질환을 가진 방법.

청구항 256

청구항 255에 있어서, 이때 방법은 단계 1 에서 단계 2의 신장 질환, 단계 2 에서 단계 3의 신장 질환, 단계 3 에서 단계 4의 신장 질환, 또는 단계 4 에서 단계 5의 신장 질환으로의 진행을 지연 또는 방지하는 방법.

청구항 257

청구항 252-256에 있어서, 이때 방법은 신장 염증을 방지 또는 감소시키는, 방법.

청구항 258

청구항 252-257에 있어서, 이때 방법은 신장 조직 손상을 방지 또는 감소시키는, 방법.

청구항 259

청구항 252-258에 있어서, 이때 방법은 신장 섬유증을 방지 또는 감소시키는 방법.

청구항 260

청구항 252-259에 있어서, 이때 환자는 비-당뇨성 신장 질환, 사구체신염, 간질 신장염, 당뇨병 신장 질환, 당뇨병 신증, 사구체경화증, 급속 진행성 사구체신염, 신장 섬유증, 알포트 증후군, IDDM 신장염, 메산증 증식성 사구체신염, 막증식성 사구체신염, 초승달 사구체신염, 신장 간질 섬유증, 국소 분절 사구체경화증, 막성 신증, 미세변화 질환, 파우치-면역 급속 진행성 사구체신염, IgA 신증, 다낭포성 신장 질환, 텐트 질환, 네프로사이트노시스, 헤이만 신장염, 상염색체 우성 (성인) 다낭포성 신장 질환, 상염색체 열성 (소아) 다낭포성 신장 질환, 급성 신장 손상, 신증 증후군, 신장 허혈, 족세포 질환 또는 장애, 단백뇨, 사구체 질환, 막성 사구체신염, 국소 분절 사구체신염, 전-자간증, 자간증, 신장 병변, 콜라겐 맥관 질환, 양성 기립성 (체위성) 단백뇨, IgM 신증, 막성 신증, 사르코이드증, 진성 당뇨병, 약물로 인한 신장 손상, 파브리 질환, 아미노산뇨, 판코니 증후군, 고혈압 신장경화증, 간질 신장염, 겸상 세포 질환, 혈색소뇨, 미오글로빈뇨, 웨그너 육아종증, 글리코겐 저장 질환 유형 1, 만성 신장 질환, 만성 신부전, 낮은 사구체 여과율 (GFR), 신혈관경화증, 낭창 신장염, ANCA-양성 파우치-면역 초승달 사구체신염, 만성 동종이식편 신증, 신독성, 신장 독성, 신장 괴사, 신장 손상, 사구체 및 관상 손상, 신장 기능이상, 신장의 증후군, 급성 신부전 (급성 신장 손상), 만성 신부전, 근위 관 기능이상, 급성 신장 이식 거부, 만성 신장 이식 거부, 비-IgA 메산증증식성 사구체신염, 감염후 사구체신염, 임의 중요한 신장 관련 맥관염, 임의의 유전적 신장 질환, 임의의 간질 신장염, 신장 이식 부전, 신장 암, 다른 상태와 연관된 신장 질환 (가령, 고혈압, 당뇨병, 그리고 자가면역 질환), 텐트 질환, 네프로사이트노시스, 헤이만 신장염, 원발성 신장 질환, 허탈성 사구체병증, 밀도 침착 질환, 저온글로불린혈증-연합된 사구체신염, 헤노흐-췌라인 질환, 감염후 사구체신염, 세균성 심장 내막염, 현미경적 다발성혈관염, 척-스트라우스 증후군, 항-GBM-항체 매개된 사구체신염, 아밀로이드증, 단클론 면역글로불린 침착 질환, 원섬유 사구체신염, 면역이질결집집합체 사구체병증, 허혈성 관상 손상, 약물-유도된 관상-간질 신장염, 독성 관상-간질 신장염, 전염성 관상-간질 신장염, 세균성 신우신염, 폴리오마바이러스 감염 또는 HIV 감염으로 인한 바이러스성 전염성 관상-간질 신장염, 대사성-유도된 관상-간질 질환, 혼합 결합조직 질환, 캐스트 신증, 요산염 또는 옥살염 또는 약물-유도된 결정 침착으로 발생될 수 있는 결정 신증, 급성 세포성 관상-간질 동종이식편 거부, 림프종 또는 이식-후 림프증식성 질환으로 인한 종양성 침윤성 질환, 심장의 폐쇄성 질환, 맥관 질환, 혈전미세 혈관병, 신혈관경화증, 죽종색전증 질환, 혼합 결합조직 조직 질환, 결절성다발성동맥염, 칼씨네우린-억제제 유도된-맥관 질환, 급성 세포성 맥관 동종이식편 거부, 급성 체액성 동종이식편 거부, 초기 신장 기능 쇠퇴 (ERFD), 최종 단계 신장 질환 (ESRD),

신장 정맥 혈전증, 급성 관상 피사, 급성 간질 신장염, 확립된 만성 신장 질환, 신장 동맥 협착, 허혈성 신증, 요독증, 약물 및 독신-유도된 만성 관상간질 신장염, 역류 신증, 신장 결석, 궤양성 신증 증후군, 정상색소빈혈, 신장 빈혈, 당뇨병 만성 신장 질환, IgG4-관련된 질환, 폰 히펠-린다우 증후군, 결절성 경화증, 콩팥황폐증, 수질 낭포성 신장 질환, 신장 세포 암종, 선암, 신아세포종, 림프종, 백혈병, 저시알화 장애, 만성 사이클로스포린 신증, 신장 재관류 손상, 신장 형성장애, 질소혈, 양측 동맥 폐색, 급성 요산 신증, 저혈량증, 급성 양측 폐쇄성 요로병, 고칼슘혈증 신증, 용혈성 요독증성 증후군, 급성 뇨폐, 악성 신장경화증, 산후 사구체경화증, 경피증, 비-궤양성 신증 항-GBM 질환, 미세 결절성다발성동맥염, 알레르기성 육아종증, 급성 방사선 신장염, 연쇄상구균-감염후사구체신염, 발덴스트롬고분자글로불린혈증, 진통성 신증, 동정맥루, 동정맥 이식편, 투석, 이소성 신장, 수질 스폰지 신장, 신장 골형성장애, 홀기능 신장, 수신증, 미세알부민뇨, 요독증, 혈뇨, 고지질혈증, 저알부민혈증, 지질뇨, 산독증, 및 고칼륨증증 하나 또는 그 이상을 가진, 방법.

청구항 261

청구항 260에 있어서, 이때 상기 환자는 Alport 증후군을 가진, 방법.

청구항 262

청구항 261에 있어서, 이때 상기 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있는, 방법: 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 억제제 (가령, 베나제프릴, 씨라자프릴, 에날라프릴, 포시노프릴, 리시노프릴, 페리노프릴, 라마프릴 및 퀴나프릴), 안지오텐신 수용체 차단제 (가령, 칸데사르탄, 에프레사르탄, 이르베사르탄, 로사르탄, 텔미사르탄 및 발사르탄), 스테틴 (가령, 플루바스테틴), 비-디히드로피리딘 칼슘 통로 차단제 (가령, 딜티아젠클), 사이클로스포린, 및/또는 알도스테론 억제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원들에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2016년 10월 5일자로 제출된 미국 가출원 일련번호 62/404,727 및 2017년 5월 24일자로 제출된 미국 가출원 일련번호 62/510,417에 대한 우선권을 주장한다. 상기 출원 명세서에는 이의 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 형질변환 성장 인자-베타 (TGF-베타) 슈퍼패밀리는 공통의 서열 요소들과 구조적 모티프를 공유하는 다양한 성장 인자들을 함유한다. 이들 단백질은 척추동물과 비척추동물 모두에서 대규모 다양한 세포 유형에서 생물학적 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 슈퍼패밀리의 구성원들은 패턴 형성 및 조직 특화에 있어서 배발달 동안 중요한 기능을 수행하고, 지질생성, 근육 형성, 연골 형성, 심장 형성, 조혈, 신경 발생 및 상피 세포 분화를 비롯한 다양한 분화 과정에 영향을 줄 수 있다. 상기 패밀리는 두 개의 일반적인 계통 발생 군으로 나뉘어진다: 슈퍼패밀리의 가장 최근에 진화된 구성요소, 즉 TGF-베�타, 액티빈, 및 nodal 포함하는 구성요소, 그리고 상기 슈퍼패밀리의 더 관계가 먼 단백질 계통 군, BMPs 및 GDFs를 포함하는 구성요소. [Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860-1870]. TGF-베타 패밀리의 구성요소들은 다양한, 그리고 대개 상보적(complementary) 생물학적 효과들을 갖는다. TGF-베타 패밀리의 구성요소의 활성을 조절함으로써, 유기체에서 유의적인 생리학적 변화를 야기시키는 것이 대개 가능하다. 예를 들면, 피에몬테(Piedmontese) 및 벨기에 푸른 소(Blue cattle) 품종은 근육량의 상당한 증가를 야기하는 GDF8 (미오스타틴으로도 불림) 유전에 기능-소실 돌연변이를 유전한다. [Grobet *et al.* (1997) Nat Genet 17(1):71-4]. 더욱이, 인간에 있어서, GDF8의 비활성 대립유전자는 증가된 근육량과 연관있으며, 보고에 따르면 예외적으로 강한 힘과 관련있다. [Schuelke *et al.* (2004) N Engl J Med 350:2682-8].

[0005] 섬유증, 근육, 뼈, 지방 및 기타 조직의 변화는 TGF-베타 패밀리의 리간드에 의해 매개되는 세포내 신호 전달 (예: SMAD 1, 2, 3, 5 및/또는 8)을 강화하거나 억제함으로써 달성될 수 있다. 따라서, TGF-베타 슈퍼패밀리의 다양한 리간드의 활성을 조절하는 물질이 필요하다.

[0006] **발명의 요약**

[0007] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, ALK4:ActRIIB 이형이량체 단백질은 상응하는 ActRIIB 및 ALK4 동형이량체과 비교하여 상이한 리간드-결합 프로파일/선택성을 나타내는, TGF-베타 슈퍼패밀리의 리간드의 독특한 길항제임을 발견하였다. 구체적으로, 예시적인 ALK4:ActRIIB 이형이량체는 동형이량체와 비교하여 액티빈 B에 대하여 강화된 결합을 보이며, ActRIIB 동형이량체에서 관찰된 바와 같이, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11에 대하여 강력한 결합을 유지하고, 그리고 BMP9, BMP10, 및 GDF3에 대하여 실질적으로 감소된 결합을 나타낸다. 사실, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 BMP9에 대하여 낮은 친화력 또는 탐지불가능한 친화력을 나타내고, 한편 이 리간드는 ActRIIB 동형이량체에 강력하게 결합한다. 도 4 참고 따라서, 이 결과로부터 ALK4:ActRIIB 이형이량체는 ActRIIB 동형이량체와 비교하여 TGF-베타 슈퍼패밀리의 특정 리간드들에 대하여 더욱 선택적인 길항제 (억제제)라는 것이 실증된다. 따라서, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 특정 용도에서 ActRIIB 동형이량체보다 더 유용할 것이며, 이때 이러한 선택적 길항작용이 유익하다. 실시예는 하나 또는 그 이상의 액티빈(가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AC), GDF8, 및 GDF11의 길항작용을 유지하지만, 하나 또는 그 이상의 BMP9, BMP10, 및 GDF3의 길항작용은 감소시키는 것이 바람직한 치료 용도를 포함한다.

[0008] 더욱이, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 이들 두 복합체의 차등적인 리간드 선택성에도 불구하고, ActRIIB 동형이량체와 놀라운 정도로 유사한 생물학적 효과를 만든다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 골격근 및 뼈에는 유익한 동화성(anabolic) 효과 뿐만 아니라, 지방 조직에는 이화성(catabolic) 효과를 발휘하는데, 이들은 ActRIIB-Fc 동형이량체의 효과와 매우 유사하다. 그러나, ActRIIB 동형이량체와 달리, ActRIIB:ALK4 이형이량체는 BMP9 및 BMP10에 매우 낮은 친화력 또는 일시적 결합만을 나타내고, 따라서 이들 리간드에 의해 매개되는 공정, 이를 테면 혈관신생을 동시에 거의 억제하지 않거나 또는 앓을 것이다. 이 신규한 선택성은 예를 들면, 근육과 뼈에는 자극 효과를, 그리고 변경된 혈관신생은 필요하지 않지만, 및/또는 지방에는 저해 효과를 필요로 하는 환자의 치료에 유용할 것이다. 또한, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 신장 질환의 마우스 모델, 특히 신장 손상, 염증, 및 섬유증의 치료 또는 예방에 있어서 다양한 유익한 효과를 가지고 있었다. 따라서, 특정 작용 이전에 결부되는 것을 원하지 않지만, 최소한 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 및 액티빈 AC), GDF8, 및/또는 GDF11에 결합하고/억제하는 ALK4:ActRIIB 이형다량체, 뿐만 아니라 이의 변이체들은 골격근과 뼈에 유익한 동화 작용(anabolic effects)을 촉진하고 지방 조직에 이화 작용(catabolic effects)을 촉진하며, 신장에 유익한 효과를 나타낼 수 있는 유용한 제제가 될 것이다.

[0009] 따라서, 본 명세서는 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드 및 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드 (ALK4:ActRIIB 이형다량체)를 포함하는 이형다량체 복합체 (이형다량체)에 부분적으로 관계한다. 바람직하게는, ALK4 폴리펩티드는 ALK4 수용체의 리간드-결합 도메인, 예를 들면, ALK4 세포의 도메인의 일부분을 포함한다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드는 일반적으로 ActRIIB 수용체의 리간드-결합 도메인, 예를 들면, ActRIIB 세포의 도메인의 일부분을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 ALK4 및 ActRIIB 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이의 생성된 이형다량체는 가용성이다. 바람직하게는, 이러한 ALK4 및 ActRIIB 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이의 생성된 이형다량체는 재조합 단백질이다. 바람직하게는, 이러한 ALK4 및 ActRIIB 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이의 생성된 이형다량체는 단리된 단백질이다.

[0010] 특정 측면들에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 9의 아미노산 24-34중 임의의 하나 (가령, 아미노산 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 및 34)에서 시작되고, 서열 번호: 9의 아미노산 101-126중 임의의 하나 (가령, 아미노산 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 및 126)에서 끝나는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ALK4 도메인을 포함한다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 9의 아미노산 34-101에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 9의 아미노산 24-126에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 10에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0011] 다른 측면들에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 19의 아미노산 24-34중 임의의 하나 (가령, 아미노산 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 및 34)에서 시작되고, 서열 번호: 9의 아미노산 101-126중 임의의 하나 (가령, 아미노산 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116,

117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 및 126)에서 끝나는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ALK4 도메인을 포함한다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 19의 아미노산 34-101에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 19의 아미노산 24-126에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 20에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0012] 특정 측면들에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 20-29중 임의의 하나 (가령, 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 및 29)에서 시작하고, 서열 번호:1의 아미노산 109-134 중 임의의 하나 (109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 및 134)에서 끝나는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIB 도메인을 포함한다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 2에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 3에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산 (가령, 자연 발생적 아미노산 E 또는 D, 또는 인공적인 산성 아미노산)이 포함된 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하지 않는다.

[0013] 다른 측면들에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 4의 아미노산 20-29중 임의의 하나 (가령, 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 및 29)에서 시작하고, 서열 번호:1의 아미노산 109-134 중 임의의 하나 (109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 및 134)에서 끝나는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIB 도메인을 포함한다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 4의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 4의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 5에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 6에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산 (가령, 자연 발생적 아미노산 E 또는 D, 또는 인공적인 산성 아미노산)이 포함된 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하지 않는다.

[0014] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, ALK4:ActRIIB 이형다량체 구조는 예를 들면, 이형이량체, 이형삼량체, 이형사량체, 이형오량체, 및 더 높은 차수의 복합체들을 포함한다. 가령, 도 6 참고. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 이형이량체이다.

[0015] 특정 측면들에서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4 폴리펩티드는 ALK4 폴리펩티드 도메인과 하나 또는 그 이상의 이중성 (비-ALK4) 폴리펩티드 도메인 (가령, ALK4-Fc 융합 단백질)을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 유사하게, 일부 구체예들에 있어서, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인과 하나 또는 그 이상의 이중성 (비-ActRIIB) 폴리펩티드 도메인 (ActRIIB-Fc 융합 단백질)을 포함하는 융합 단백질일 수 있다.

[0016] 일부 구체예들에 있어서, ALK4 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 유사하게, 일부 구체예들에 있어서, ActRIIB 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 전통적인 Fc 융합 단백질 및 항체는 비유도된 상호작용 쌍의 실례이고, 반면 다양한 가공된 Fc 도메인은 비대칭 상호작용 쌍으로서 설계되었다.[Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. 따라서, 본 명세서에서 설명된 제 1 구성요소 및/또는 제 2 구성요소는 면역글로불린의 불변 도메인, 예를 들면, 면역글로불린의 Fc 부분을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상호작용 쌍의 제 1 구성요소는 IgG (IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgA (IgA1 또는 IgA2), IgE, 또는 IgM 면역글로불린의 Fc 도메인으로부터 유도된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 면역글로불린 도메인은 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 (가령, 결손, 추가, 및/또는 치환)을 포함하여, ALK4:ActRIIB 이형다량체 형성을 촉진시킬 수 있다. 유사하게, 상호작용 쌍의 제 2 구성요소는 IgG (IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgA (IgA1 또는 IgA2), IgE, 또는 IgM의 Fc 도메인으로부터 유래되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 면역글로불린 도메인은 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 (가령, 결손, 추가, 및/또는 치환)을 포함하여, ALK4:ActRIIB 이형다량체 형성을 촉진시킬 수 있다. 예를 들면, 상호작용 쌍의 제 2 구성요소는 서열 번호: 23-37 중에서 한 가지에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 100%인 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 상기 서열로 구성될 수 있다. 일부 구체예에서, 상호작용 쌍의 첫 번째 구성원 및 두 번째 구성원은 동일한 면역글로불린 부류 및 아형으로부터 유래된 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 상호작용 쌍의 첫 번째 구성원 및 두 번째 구성원은 상이한 면역글로불린 부류 또는 아형으로부터 유래된 Fc 도메인을 포함한다.

[0017] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하는데, 이때 ALK4-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 (가령, 아미노산 치환, 양이온화(cationization), 탈아미노화, 카르복실-말단 아미노산 이질성(heterogeneity), 포스포틸화, 및 당화)을 포함하며, 이는 ALK4-Fc 융합 단백질의 등전점(pI)을 변경시키거나 및/또는 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질과 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 사이에 pIs의 차이를 증가시킨다. 다른 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질과 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 사이에 pIs의 차이를 증가시킨다. 다른 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질과 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 사이의 pIs 차이를 증가시키고, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질과 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 사이의 pIs 차이를 증가시킨다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 최소한 0.1 (가령, 최소한 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.3, 1.5, 1.7, 2.0, 2.3, 2.5, 2.7, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 또는 최소한 4.0)으로 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 최소한 0.1 (가령, 최소한 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.3, 1.5, 1.7, 2.0, 2.3, 2.5, 2.7, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 또는 최소한 4.0)으로 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 pI를 최소한 0.1 (가령, 최소한 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.3, 1.5, 1.7, 2.0, 2.3, 2.5, 2.7, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 또는 최소한 4.0)으로 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 pI를 최소한 0.1 (가령, 최소한 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.3, 1.5, 1.7, 2.0, 2.3, 2.5, 2.7, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 또는 최소한 4.0)으로 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질과 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 pI에서 최소한 0.7 차이 (가령, pI에서 최소한 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 최소한 4.0 또는 그 이상 차이)를 갖는다.

[0018] 특정 측면에서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 ALK4-Fc 융합 단백질; 그리고 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함한다. 예를 들면, ALK4-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 중성 또는 음으로 하전된 아미노산을 하나 또는 그 이상의 양으로 하전된 아미노산 [가령, 아르기닌 (R), 리신 (K), 또는 히스티딘 (H)].으로 대체함으로써, 변형될 수 있다. 유사하게, ActRIIB-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 중성 또는 양으로 하전된 아미노산을 하나 또는 그 이상의 음으로 하전된 아미노산 [가령, 아스파르트산 (E) 또는 글루탐산 (D)]으로 대체함으로써, 변형될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또

는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환, 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 (N162R, N162K, 또는 N162H); b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 (D179R, D179K, 또는 D179H); 그리고 c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N162R, N162K, 또는 N162H) 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D179R, D179K, 또는 D179H). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (N162R); b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (D179R); 그리고 c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (N162R) 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (D179R). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG2 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 321의 D177에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N160R, N160K, 또는 N160H); b) 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D177R, D177K, 또는 D177H); 그리고 c) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N160R, N160K, 또는 N160H) 그리고 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D177R, D177K, 또는 D177H). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG3 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (S169R, S169K, 또는 S169H); b) 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D186R, D186K, 또는 D186H); 그리고 c) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (S169R, S169K, 또는 S169H) 그리고 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D186R, D186K, 또는 D186H). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아미노산 치환, 그리고 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N166R, N166K, 또는 N166H); b) 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D183R, D183K, 또는 D183H); 그리고

c) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N166R, N166K, 또는 N166H) 그리고 서열 번호: 32의 D183에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D183R, D183K, 또는 D183H). 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환(K138E 또는 K138D); b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K217E 또는 K217D); 그리고 c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K138E 또는 K138D) 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K217E 또는 K217D). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K138E); b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K217D); 그리고 c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K138E) 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K217D). 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG2 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환(K136E 또는 K136D); b) 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K215E 또는 K215D); 그리고 c) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K136E 또는 K136D) 그리고 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K215E 또는 K215D). 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG3 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K145E 또는 K145D); b) 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K224E 또는 K224D); 그리고 c) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K145E 또는 K145D) 그리고 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K224E 또는 K224D). 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc

도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K142E 또는 K142D); b) 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K221E 또는 K221D); 그리고 c) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K142E 또는 K142D) 그리고 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K221E 또는 K221D).

[0019]

특정 측면에서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질; 그리고 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 ALK4-Fc 융합 단백질을 포함한다. 예를 들면, ActRIIB-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 중성 또는 음으로 하전된 아미노산을 하나 또는 그 이상의 양으로 하전된 아미노산 [가령, 아르기닌 (R), 리신 (K), 또는 히스티딘 (H)]으로 대체함으로써, 변형될 수 있다. 유사하게, ALK4-Fc 융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 중성 또는 양으로 하전된 아미노산을 하나 또는 그 이상의 음으로 하전된 아미노산 [가령, 아스파르트산 (E) 또는 글루탐산 (D)]으로 대체함으로써, 변형될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 (N162R, N162K, 또는 N162H); b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 (D179R, D179K, 또는 D179H); 그리고 c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N162R, N162K, 또는 N162H) 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D179R, D179K, 또는 D179H). 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (N162R); b) 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (D179R); 그리고 c) 서열 번호: 31의 N162에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (N162R) 그리고 서열 번호: 31의 D179에 상응하는 위치에서 아르기닌 치환 (D179R). 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG2 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N160R, N160K, 또는 N160H); b) 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D177R, D177K, 또는 D177H); 그리고 c) 서열 번호: 32의 N160에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N160R, N160K, 또는 N160H) 그리고 서열 번호: 32의 D177에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D177R, D177K, 또는 D177H). 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG3 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아르기

닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (S169R, S169K, 또는 S169H); b) 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D186R, D186K, 또는 D186H); 그리고 c) 서열 번호: 33의 S169에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (S169R, S169K, 또는 S169H) 그리고 서열 번호: 33의 D186에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D186R, D186K, 또는 D186H). 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 35의 N166에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 35의 D183에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N166R, N166K, 또는 N166H); b) 서열 번호: 35의 에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D183R, D183K, 또는 D183H); 그리고 c) 서열 번호: 35의 에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (N166R, N166K, 또는 N166H) 그리고 서열 번호: 35의 에 상응하는 위치에서 아르기닌, 리신, 또는 히스티딘 치환 (D183R, D183K, 또는 D183H). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아미노산 치환, 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환(K138E 또는 K138D); b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K217E 또는 K217D); 그리고 c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K138E 또는 K138D) 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K217E 또는 K217D). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG1 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K138E); b) 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K217D); 그리고 c) 서열 번호: 31의 K138에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K138E) 그리고 서열 번호: 31의 K217에 상응하는 위치에서 글루탐산 치환 (K217D). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG2 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG2 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환(K136E 또는 K136D); b) 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K215E 또는 K215D); 그리고 c) 서열 번호: 32의 K136에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K136E 또는 K136D) 그리고 서열 번호: 32의 K215에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K215E 또는 K215D). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG3 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 서열 번호: 33의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 33의

K145에 상응하는 위치에서 아미노산 치환 그리고 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG3 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K145E 또는 K145D); b) 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K224E 또는 K224D); 그리고 c) 서열 번호: 33의 K145에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K145E 또는 K145D) 그리고 서열 번호: 33의 K224에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K224E 또는 K224D). 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 상기 ALK4-Fc 융합 단백질의 pI를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 융합 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; b) 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아미노산 치환; 그리고 c) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아미노산 치환, 그리고 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아미노산 치환. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 IgG4 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K142E 또는 K142D); b) 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K221E 또는 K221D); 그리고 c) 서열 번호: 35의 K142에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K142E 또는 K142D) 그리고 서열 번호: 35의 K221에 상응하는 위치에서 아스파르트산 또는 글루탐산 치환 (K221E 또는 K221D).

[0020]

본원에서 기술된 바와 같이, ALK4-Fc 융합 단백질 및/또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 이형다량체 형성 (가령, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체화)을 촉진시키는 하나 또는 그 이상의 변형을 포함할 수 있다. 유사하게, ALK4-Fc 융합 단백질 및/또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 동종다량체 형성 (가령, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 동종이량체화)을 억제하는 하나 또는 그 이상의 변형을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, ALK4-Fc 융합 단백질 및/또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 이형다량체 형성을 촉진시키는 하나 또는 그 이상의 변형을 포함할 수 있고, 그리고 동종다량체 형성을 억제하는 하나 또는 그 이상의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 S132 위치에서 시스테인 치환(S132C)과 그리고 서열 번호: 31의 T144 위치에서 트립토판 치환 (T144W)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 갖는 ALK4-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 31의 Y127 위치에서 시스테인 치환 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144 위치에서 세린 치환 (T144S), 서열 번호: 31의 L146 위치에서 알라닌 치환 (L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185 위치에서 발린 치환 (Y185V)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 보유한 ActRIIB-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 31의 S132 위치에서 시스테인 치환(S132C)과 그리고 서열 번호: 31의 T144 위치에서 트립토판 치환 (T144W)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 갖는 ActRIIB-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 31의 Y127 위치에서 시스테인 치환 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144 위치에서 세린 치환 (T144S), 서열 번호: 31의 L146 위치에서 알라닌 치환 (L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185 위치에서 발린 치환 (Y185V)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 보유한 ALK4-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 S130 위치에서 시스테인 치환(S130C)과 그리고 서열 번호: 32의 T142 위치에서 트립토판 치환 (T142W)을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 갖는 ALK4-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 32의 Y125 위치에서 시스테인 치환 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142 위치에서 세린 치환 (T142S), 서열 번호: 32의 L144 위치에서 알라닌 치환 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183 위치에서 발린 치환 (Y183V)을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 보유한 ActRIIB-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 32의 S130 위치에서 시스테인 치환(S1320)과 그리고 서열 번호: 32의 T142 위치에서 트립토판 치환 (T142W)을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 갖는 ActRIIB-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 32의 Y125 위치에서 시스테인 치환 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142 위치에서 세린 치환 (T142S), 서열 번호: 32의 L144 위치에서 알라닌 치환 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183 위치에서 발린 치환 (Y183V)을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 보유한 ALK4-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 S139 위치에서 시스테인 치환(S139C)과 그리고 서열 번호: 33의 T151 위치에서 트립토판 치환 (T151W)을 포함하는 IgG3 Fc 도메인을 갖는 ALK4-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 33의 Y134 위치에서 시스테인 치환 (Y134C), 서열 번호: 33의 T151 위치에서 세린 치환 (T151S), 서열 번호: 33의 L153 위치에서 알라닌 치환 (L153A), 그리고 서열 번호: 33의 Y192 위치에서 발린 치환 (Y192V)을 포함하는 IgG3 Fc 도메인을 보유한 ActRIIB-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서,

ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 33의 S139 위치에서 시스테인 치환(S139C)과 그리고 서열 번호: 33의 T151 위치에서 트립토판 치환 (T151W)을 포함하는 IgG3 Fc 도메인을 갖는 ActRIIB-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 33의 Y134 위치에서 시스테인 치환 (Y134C), 서열 번호: 33의 T151 위치에서 세린 치환 (T151S), 서열 번호: 33의 L153 위치에서 알라닌 치환 (L153A), 그리고 서열 번호: 33의 Y192 위치에서 발린 치환 (Y192V)을 포함하는 IgG3 Fc 도메인을 보유한 ALK4-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 S136 위치에서 시스테인 치환(S136C)과 그리고 서열 번호: 35의 T148 위치에서 트립토판 치환 (T148W)을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 갖는 ALK4-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 35의 Y131 위치에서 시스테인 치환 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148 위치에서 세린 치환 (T148S), 서열 번호: 35의 L150 위치에서 알라닌 치환 (L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189 위치에서 발린 치환 (Y189V)을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 보유한 ActRIIB-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 35의 S136 위치에서 시스테인 치환(S136C)과 그리고 서열 번호: 35의 T148 위치에서 트립토판 치환 (T148W)을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 갖는 ActRIIB-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 35의 Y131 위치에서 시스테인 치환 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148 위치에서 세린 치환 (T148S), 서열 번호: 35의 L150 위치에서 알라닌 치환 (L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189 위치에서 발린 치환 (Y189V)을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 보유한 ALK4-Fc 융합 단백질.

[0021] 특정 측면에서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 66의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 Fc 도메인을 갖는 ALK4-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 67의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 Fc 도메인을 갖는 ActRIIB-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 66의 138에 상응하는 위치에 글루탐산; b) 서열 번호: 66의 217에 상응하는 위치에 아스파르트산; 그리고 c) 서열 번호: 66의 138에 상응하는 위치에 글루탐산, 그리고 서열 번호: 66의 217에 상응하는 위치에 아스파르트산. 임의선택적으로, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 66의 132에 상응하는 위치에 시스테인과 서열 번호: 66의 144에 상응하는 위치에 트립토판을 더 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 67의 162에 상응하는 위치에 아르기닌; b) 서열 번호: 67의 179에 상응하는 위치에 아르기닌; 그리고 c) 서열 번호: 67의 162에 상응하는 위치에 아르기닌, 그리고 서열 번호: 67의 179에 상응하는 위치에 아르기닌. 임의선택적으로, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 67의 127에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 67의 144에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 67의 146에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 67의 185에 상응하는 위치에 발린을 더 포함한다.

[0022] 특정 측면에서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음을 포함한다: a) 서열 번호: 66의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 Fc 도메인을 갖는 ActRIIB-Fc 융합 단백질; 그리고 b) 서열 번호: 67의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 Fc 도메인을 갖는 ALK4-Fc 융합 단백질. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 66의 138에 상응하는 위치에 글루탐산; b) 서열 번호: 66의 217에 상응하는 위치에 아스파르트산; 그리고 c) 서열 번호: 66의 138에 상응하는 위치에 글루탐산, 그리고 서열 번호: 66의 217에 상응하는 위치에 아스파르트산. 임의선택적으로, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 66의 132에 상응하는 위치에 시스테인과 서열 번호: 66의 144에 상응하는 위치에 트립토판을 더 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다: a) 서열 번호: 67의 162에 상응하는 위치에 아르기닌; b) 서열 번호: 67의 179에 상응하는 위치에 아르기닌; 그리고 c) 서열 번호: 67의 162에 상응하는 위치에 아르기닌, 그리고 서열 번호: 67의 179에 상응하는 위치에 아르기닌. 임의선택적으로, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 67의 127에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 67의 144에 상응하는 위치에 세린, 서열 번호: 67의 146에 상응하는 위치에 알라닌, 그리고 서열 번호: 67의 185에 상응하는 위치에 발린을 더 포함한다.

[0023] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31의 S132에 상응하는 위치에 시스테인 (S132C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판(T144W), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함하며; 그리고 b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인 (Y127C), 서열 번호: 31의

T144에 상응하는 위치에 세린 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌(L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린(Y185V)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0024]

특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조법 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31의 S132에 상응하는 위치에 시스테인 (S132C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판(T144W), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함하며; 그리고 b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 세린 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌(L146A), 그리고 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린(Y185V)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조법 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31의 S132에 상응하는 위치에 시스테인 (S132C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판(T144W), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함하며; 그리고 b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 세린 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌(L146A), 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린(Y185V), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조법 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31의 S132에 상응하는 위치에 시스테인 (S132C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 트립토판(T144W), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함하며; 그리고 b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 31의 Y127에 상응하는 위치에 시스테인 (Y127C), 서열 번호: 31의 T144에 상응하는 위치에 세린 (T144S), 서열 번호: 31의 L146에 상응하는 위치에 알라닌(L146A), 서열 번호: 31의 Y185에 상응하는 위치에 발린(Y185V), 그리고 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 31의 H213에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0025]

특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조법 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32

(S130C)의 S130에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판(T142W), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함하고; 그리고 b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린(T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린 (Y183V)을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때 : a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 (S130C)의 S130에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판(T142W), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함하고; 그리고 b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린(T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린 (Y183V)을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때 : a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 (S130C)의 S130에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판(T142W), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함하고; 그리고 b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린(T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린 (Y183V), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때 : a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32 (S130C)의 S130에 상응하는 위치에 시스테인, 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 트립토판(T142W), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함하고; 그리고 b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 32의 Y125에 상응하는 위치에 시스테인 (Y125C), 서열 번호: 32의 T142에 상응하는 위치에 세린(T142S), 서열 번호: 32의 L144에 상응하는 위치에 알라닌 (L144A), 그리고 서열 번호: 32의 Y183에 상응하는 위치에 발린 (Y183V), 그리고 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG2 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 32의 H211에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35의 S136에 상응하는 위치에 시스테인 (S136C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판(T148W), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함하며; 그리고 b) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌(L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린(Y189V)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35의 S136에 상응하는 위치에 시스테인 (S136C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판(T148W), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함하며; 그리고 b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌(L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린(Y189V)을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0031] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35의 S136에 상응하는 위치에 시스테인 (S136C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판(T148W), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함하며; 그리고 b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌(L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린(Y189V), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관계하며, 이때: a) 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35의 S136에 상응하는 위치에 시스테인 (S136C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 트립토판(T148W), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는 IgG4 Fc 도메인을 포함하며; 그리고 b) 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 35의 Y131에 상응하는 위치에 시스테인 (Y131C), 서열 번호: 35의 T148에 상응하는 위치에 세린 (T148S), 서열 번호: 35의 L150에 상응하는 위치에 알라닌(L150A), 그리고 서열 번호: 35의 Y189에 상응하는 위치에 발린(Y189V), 그리고 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치에 산성 아미노산을

포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 아스파르트산이다. 일부 구체예에서, 이때 서열 번호: 35의 H217에 상응하는 위치의 산성 아미노산은 글루탐산이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 35의 아미노산 서열에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 임의선택적으로, ALK4 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 이중성 도메인에 직접 연결(융합)되거나, 또는 ALK4 폴리펩티드의 아미노산 서열과 하나 또는 그 이상의 이중성 도메인 (가령, 면역글로블린의 Fc 도메인) 사이에 링커와 같은 개입 서열이 위치할 수 있다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 이중성 도메인에 직접 연결(융합)되거나, 또는 ActRIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열과 하나 또는 그 이상의 이중성 도메인 (가령, 면역글로블린의 Fc 도메인) 사이에 링커와 같은 개입 서열이 위치할 수 있다. 링커는 ActRIIB 또는 ALK4의 세포외 도메인의 C-말단 단부("꼬리")에 대략 15개의 아미노산으로 된 비구조 영역에 상응할 수 있으며, 또는 링커는 상대적으로 2차 구조가 없는 5 내지 15, 20, 30, 50, 100개 또는 그 이상의 아미노산으로 된 인공 서열일 수 있다. 링커는 글리신과 프롤린 잔기가 많고, 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 반복 서열을 함유할 수 있다. 링커의 예로는 서열 TGGG (서열 번호: 17), SGGG (서열 번호: 18), TGGGG (서열 번호: 15), SGGGG (서열 번호: 16), GGGGS (서열 번호: 58), GGGG (서열 번호: 14), 및 GGG (서열 번호: 13)을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0034] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관한 것으로, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 76의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 72의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다: a) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에서 발린; b) 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; c) 서열 번호: 76의 D286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; d) 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; e) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에서 발린 (Y292V), 그리고 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; f) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에서 발린, 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; 그리고 g) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에서 발린, 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산, 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다: a) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 그리고 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에서 트립토판; b) 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; c) 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; d) 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; e) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; f) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; 그리고 g) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산, 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산. 일부 구체예에서, 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기는 변형된 또는 자연 발생적 (가령, R, K, 또는 H) 아미노산이다. 일부 구체예에서, 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기는 R이다. 일부 구

체에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 변형된 또는 자연 발생적 (가령, D 또는 E) 아미노산이다. 일부 구체예에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 D이다. 일부 구체예에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 E이다.

[0035]

특정 측면에서, 본 명세서는 서열 번호: 76의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제조함 ALK4-Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다: a) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에서 발린; b) 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; c) 서열 번호: 76의 D286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; d) 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; e) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에서 발린 (Y292V), 그리고 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; f) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에서 발린, 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; 그리고 g) 서열 번호: 76의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 76의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 76의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 76의 292에 상응하는 위치에서 발린, 서열 번호: 76의 269에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산, 그리고 서열 번호: 76의 286에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산. 일부 구체예에서, 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기는 변형된 또는 자연 발생적 (가령, R, K, 또는 H) 아미노산이다. 일부 구체예에서, 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기는 R이다.

[0036]

특정 측면에서, 본 명세서는 서열 번호: 72의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제조함 ActRIIB-Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 융합 단백질은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다: a) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 그리고 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에서 트립토판; b) 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; c) 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; d) 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; e) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; f) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; 그리고 g) 서열 번호: 72의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 72의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 서열 번호: 72의 256에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산, 그리고 서열 번호: 72의 335에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산. 일부 구체예에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 변형된 또는 자연 발생적 (가령, D 또는 E) 아미노산이다. 일부 구체예에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 D이다. 일부 구체예에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 E이다.

[0037]

특정 측면에서, 본 명세서는 서열 번호: 74의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제조함 ALK4-Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다: a) 서열 번호: 74의 258에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 74의 275에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 74의 277에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 74의 316에 상응하는 위치에서 발린; b) 서열 번호: 74의 293에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; c) 서열 번호: 74의 310에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; d) 서열 번호: 74의 293에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 74의 310에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; e) 서열 번호: 74의 258에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 74의 275에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 74의 277에 상응하는 위치에서 알라닌, 서열 번호: 74의 316에 상응하는 위치에서 발린, 그리고 서열 번호: 74의 293에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산; f) 서열 번호: 74의 258에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 74의 275에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 74의 277에 상응하는 위치에서 알라닌, 서열 번호: 74의 316에 상응하는 위치에서 발린, 그리고 서열 번호: 74의 310에 상응하는 위치에서 양으로

로 하전된 아미노산; 그리고 g) 서열 번호: 74의 258에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 74의 275에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 74의 277에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 74의 316에 상응하는 위치에서 발린, 서열 번호: 74의 293에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산, 그리고 서열 번호: 74의 310에 상응하는 위치에서 양으로 하전된 아미노산. 일부 구체예에서, 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기는 변형된 또는 자연 발생적 (가령, R, K, 또는 H) 아미노산이다. 일부 구체예에서, 상기 양으로 하전된 아미노산 잔기는 R이다.

[0038] 특정 측면에서, 본 명세서는 서열 번호: 70의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제조함 ActRIIB-Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 다음에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다: a) 서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에서 시스테인, 그리고 서열 번호: 70의 287에 상응하는 위치에서 트립토판; b) 서열 번호: 70의 281에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; c) 서열 번호: 70의 360에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; d) 서열 번호: 70의 281에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산 그리고 서열 번호: 70의 360에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; e) 서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 70의 287에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 70의 281에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; f) 서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 70의 287에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 70의 360에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산; 그리고 g) 서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 70의 275에 상응하는 위치에서 트립토판, 서열 번호: 70의 281에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산, 그리고 서열 번호: 70의 360에 상응하는 위치에서 음으로 하전된 아미노산. 일부 구체예에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 변형된 또는 자연 발생적 (가령, D 또는 E) 아미노산이다. 일부 구체예에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 D이다. 일부 구체예에서, 상기 음으로 하전된 아미노산 잔기는 E이다.

[0039] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 제조함 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관한 것으로, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 48의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 80의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 48의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 48의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 48의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 48의 292에 상응하는 위치에서 발린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 80의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 80의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 80의 331에 상응하는 위치에서 아르기닌을 포함한다.

[0040] 특정 측면에서, 본 명세서는 서열 번호: 48의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제조함 ALK4-Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 48의 234에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 48의 251에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 48의 253에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 48의 292에 상응하는 위치에서 발린을 포함한다.

[0041] 특정 측면에서, 본 명세서는 서열 번호: 80의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제조함 ActRIIB-Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 80의 250에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 80의 262에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 80의 331에 상응하는 위치에서 아르기닌을 포함한다.

[0042] 특정 측면에서, 본 명세서는 서열 번호: 47의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 제조함 ALK4-Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 47의 258에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 47의 275에 상응하는 위치에서 세린, 서열 번호: 47의 277에 상응하는 위치에서 알라닌, 그리고 서열 번호: 47의 316에 상응하는 위치에서 발린을 포함한다.

- [0043] 특정 측면에서, 본 명세서는 서열 번호: 78의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 ActRIIB-Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질 Fc 도메인은 서열 번호: 78의 275에 상응하는 위치에서 시스테인, 서열 번호: 78의 287에 상응하는 위치에서 트립토판, 그리고 서열 번호: 78의 356에 상응하는 위치에서 아르기닌을 포함한다.
- [0044] 특정 측면에서, 본 명세서는 적어도 하나의 ALK4-Fc 융합 단백질 및 적어도 하나의 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 포함하는 재조합 ALK4:ActRIIB 이형다량체에 관한 것으로, 이때 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 76의 아미노산 서열에 대하여 최소한 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 이때 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 72의 아미노산 서열에 대하여 최소한 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 76의 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 70의 아미노산 서열에 대하여 최소한 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 38의 리더 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 70의 아미노산 서열에 대하여 최소한 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 ALK4-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 상기 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0045] 임의선택적으로, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 당화된 아미노산, 폐길화된(PEGylated) 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 바이오티닐화된 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 그리고 유기 유도화된 물질에 접합된 아미노산에서 선택된 하나 또는 그 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함한다. ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 최소한 하나의 N-연계된 당을 포함할 수 있고, 그리고 2, 3개 또는 그 이상의 N-연계된 당을 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 또한 O-연계된 당을 포함할 수 있다. ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 조작된 곤충 또는 효모 세포, 그리고 포유류 세포, 이를 테면 COS 세포, CHO 세포, HEK 세포 및 NSO 세포가 포함된 환자에게 사용하는 데 적합한 방식으로 단백질을 당화시키는 다양한 세포계통에서 생산될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 당화된 것이며, 중국 햄스터 난소 세포 계통으로부터 획득가능한 당화 패턴을 갖는다. 바람직하게는, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체 복합체는 포유류 (가령, 마우스 또는 인간)에서 최소한 4, 6, 12, 24, 36, 48, 또는 72 시간의 혈청 반감기를 나타낸다. 임의선택적으로, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 포유동물 (가령, 마우스 또는 인간)에서 최소한 6, 8, 10, 12, 14, 20, 25, 또는 30 일의 혈청 반감기를 전시할 수 있다.
- [0046] 특정 측면들에서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드에 결합한다. 임의선택적으로, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 또는 10^{-12} M와 대등한 또는 이보다 적은 K_D 로 하나 또는 그 이상의 이들 리간드에 결합한다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 A에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 AB에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 C에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 AC에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 BC에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 BC에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 BE에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 GDF11에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 GDF8에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 BMP6에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 GDF3에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 BMP10에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다.(가령, 10^{-8} 또는 10^{-7} 이거나 또는 그 이상의 K_D 로 결합한다). 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 강한 친화력(affinity)으로 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 GDF3에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 BMP10에 결합한다.

일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 BMP9에 결합한다.

[0047] 일반적으로, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 최소한 하나의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드의 하나 또는 그 이상의 활성을 길항(억제)하고, 이러한 변경은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것과 같은 세포-기반 분석(cell-based assay)을 포함하는 당분야에 공지된 다양한 분석에 의해 측정될 수 있다. 특정 측면들에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 예를 들면, 세포-기반 분석에서 하나 또는 그 이상의 TGF β 슈퍼패밀리 리간드에 의해 매개되는 신호전달(가령, Smad 2/3 및/또는 Smad 1/5/8 신호전달)을 억제하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 A 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 B 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 AB 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 C 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 AC 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 BC 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 E 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 AE 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 CE 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 GDF11 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 GDF8 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 BMP6 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 GDF3 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 BMP10 신호전달을 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포 기반 분석에서 BMP9 신호전달을 억제하지 않거나, 또는 실질적으로 억제하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 B 신호전달의 더욱 강력한 억제제다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 GDF3 신호전달의 더욱 약한 억제제다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 BMP10 신호전달의 더욱 약한 억제제다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 BMP9 신호전달의 더욱 약한 억제제다.

[0048] 본 명세서에서 설명된 임의의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 약학 제제(조성물)로 제형화될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 약학 제제는 약학적으로 수용가능한 운반체를 포함한다. 일부 구체예에서, 약학 제제는 발열원이 없으며(치료용으로 제품의 질을 관리하는 규정에서 요구하는 수준으로 발열원이 없다는 것을 의미한다). 약학 제제는 본 명세서에서 기술된 장애/상태를 치료하는 화합물과 같이 하나 또는 그 이상의 추가 화합물을 또한 포함할 수 있다. 일반적으로, ALK4:ActRIIB 이형다량체 약학 제제는 실질적으로 ALK4 및/또는 ActRIIB 동종다량체가 없다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 약학 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 ALK4 동종다량체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 약학 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만의, 또는 약 1% 미만의 ActRIIB 동종다량체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 약학 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 약 1% 미만의 ALK4 동종다량체와 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 ActRIIB 동종다량체를 포함한다.

[0049] 특정 측면들에서, 본 명세서는 본 명세서에서 기술된 바와 같이 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 예를 들면, ActRIIB 핵산은 서열 번호: 7의 뉴클레오티드 73-396의 서열에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산, 또는 서열 번호: 7의 뉴클레오티드 73-396의 보체에 엄격한 조건하에 혼성화되는 핵산을 포함한다. 이러한 핵산은 서열 번호: 8을 포함하는 것일 수 있다. 일부 구체예에서, ActRIIB 핵산은 서열 번호: 71에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, ActRIIB 핵산은 서열 번호: 73에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, ActRIIB 핵산은 서열 번호: 79에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드

드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, ActRIIB 핵산은 서열 번호: 81에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0050] 특정 측면들에서, 본 명세서는 본 명세서에서 기술된 바와 같이 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 예를 들면, ALK4 핵산은 서열 번호: 11의 뉴클레오티드 70-378의 서열에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산, 또는 서열 번호: 11의 뉴클레오티드 70-378의 보체에 엄격한 조건하에 혼성화되는 핵산을 포함하거나, 기본적으로 이로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 일부 구체예에서, ALK4 핵산은 서열 번호: 75에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, ALK4 핵산은 서열 번호: 77에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, ALK4 핵산은 서열 번호: 82에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, ALK4 핵산은 서열 번호: 83에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0051] 특정 측면들에서, 본 명세서는 ALK4 폴리펩티드의 코딩 서열과 ActRIIB 폴리펩티드의 코딩 서열이 포함된 핵산 서열을 제공한다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 핵산은 a) 서열 번호: 71, 73, 79, 및 77 중 임의의 하나에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 기본적으로 이로 구성된 또는 구성되고, 그리고 b) 서열 번호: 75, 77, 82, 그리고 83중 임의의 하나에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0052] 바람직하게는, ALK4 및/또는 ActRIIB 핵산은 단리된 및/또는 재조합 핵산이다. 본 명세서에서 개시된 핵산은 발현을 위해 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 본 명세서는 이러한 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 뿐만 아니라, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리뉴클레오티드, 뿐만 아니라 이러한 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리뉴클레오티드가 포함된 벡터를 포함하는 세포 (가령, CHO 세포), 바람직하게는 인간 또는 다른 척추동물 종으로부터 단리된 세포를 더욱 제공한다.

[0053] 특정 측면들에서, ALK4 폴리펩티드 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 포유류 세포 계통, 임의선택적으로 ActRIIB 또는 ALK4 단백질의 자연 당화를 적절하게 매개하는 세포 계통에서 발현되어, 환자(수의학적 환체일 가능성 포함)에서 바람직하지 못한 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 인간 및 CHO 세포 계통은 성공적으로 이용되어 왔으며, 다른 공통적인 포유류 발현 벡터가 유용할 것이다. 따라서, 본 명세서는 본 명세서에서 개시된 임의의 핵산이 포함된 배양된 세포를 제공한다. 이러한 세포는 CHO 세포, NSO 세포, HEK 세포 및 COS 세포가 포함된 포유류 세포일 수 있다. 다른 세포는 의도된 환자 종에 따라 선택될 수 있다. 다른 세포도 본원에서 공개된다. 배양된 세포란 실험실 또는 다른 인간이 만든 조건(가령 냉동 또는 배지)에서 유지된 세포를 의미하고, 살아있는 유기체의 일부는 아니다.

[0054] 특정 측면들에서, 본 명세서는 본 명세서에서 설명된 ALK4와 ActRIIB 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이러한 폴리펩티드가 포함된 ALK4:ActRIIB 이형다량체 복합체를 만드는 방법을 제공한다. 이런 방법은 본원에서 개시된 핵산 중에서 한 가지를 적합한 세포 (가령, CHO 세포 또는 COS 세포)에서 발현하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서 ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체를 만드는 방법은 다음을 포함한다: ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 세포를 배양하고, 이때 상기 세포는 ALK4 폴리뉴클레오티드와 ActRIIB 폴리뉴클레오티드를 포함하며; 임의선택적으로 발현된 이형다량체를 회수한다. 대안으로, ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체를 만드는 방법은 다음을 포함할 수 있다: a) ALK4 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 제1 세포를 배양하고, 이때 제1 세포는 ALK4 폴리뉴클레오티드를 포함하고; b) 발현된 ALK4 폴리펩티드를 회수하고; c) ActRIIB 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 제2 세포를 배양하고, 이때 제2 세포는 ActRIIB 폴리뉴클레오티드를 포함하고; d) 발현된 ActRIIB 폴리펩티드를 회수하고; e) 회수된 ALK4 폴리펩티드와 회수된 ActRIIB 폴리펩티드는 ALK4:ActRIIB 이형다량체 형성에 적합한 조건하에 복합시키고; 임의선택적으로 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 회수한다. 특정 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 TPA 리더 서열 (가령, 서열 번호: 38)을 이용하여 발현된다. 특정 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 CHO 세포에서 발현된다. 본 명세서에

서 기술된 ALK4와 ActRIIB 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이의 단백질 복합체는 세포 배양액으로부터 단백질을 획득하기 위한 널리 공지된 기술 중에서 한 가지를 이용하여, 미가공, 부분적으로 정제된, 또는 고도로 정제된 분획물로서 회수될 수 있다. 일반적으로, 이러한 방법으로 실질적으로 ALK4 및/또는 ActRIIB 동종다량체가 없는 ALK4:ActRIIB 이형다량체가 만들어진다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체를 만드는 방법은 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 ALK4 동종다량체를 만든다. 일부 구체예들에 있어서, 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체를 만드는 방법은 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 ActRIIB 동종다량체를 만든다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체를 만드는 방법은 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 ALK4 동종다량체와 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 ActRIIB 동종다량체를 만든다.

[0055] 본 명세서는 예를 들면, 근육, 뼈, 지방, 적혈구, 및 다른 조직과 연합된 다양한 ALK4:ActRIIB-연합된 질환 및 상태의 치료 또는 예방에 유용한 ALK4:ActRIIB 이형다량체 및 그 방법을 더 제공한다. 이러한 질환 및 장애는 근육 손실 또는 불충분한 근육 성장과 연합된 장애 (가령, 근육 위축; 듀시엔(Duchenne) 근육 위축병, 베커 근육 위축병, 및 안전견갑상완 근육 위축병을 포함하는 근육위축병; 근육위축성측색경화증; 산발적 봉입체 근염, 유전적 봉입체 근염; 그리고 악액질) 및 바람직하지 못한 체중 증가와 연합된 장애 (가령, 비만, 유형 2 당뇨병 또는 비-인슐린 의존성 진성 당뇨병 (NIDDM), 심혈관 질환, 고혈압, 골관절염, 뇌졸중, 호흡 곤란, 및 담낭 질환)를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 체지방 함량을 감소 또는 체지방 함량 증가 속도의 감소를 요하는 피험자에서 이용될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 환자에서 콜레스테롤 및/또는 트리글리세리드 수준을 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 섬유증 또는 섬유증-연합된 장애 또는 상태 (가령, 신부전, 만성 신장 질환, 낭포성 섬유증, 및 골수섬유증)을 치료 또는 방지하는데 이용될 수 있다.

[0056] 본 명세서는 예를 들면, 신장과 연합된 ALK4:ActRIIB-연합된 다양한 질환 및 상태를 치료 또는 방지하는데 이용하기 위한 ALK4:ActRIIB 이형다량체 및 그 방법을 더 제공한다. 이러한 질환 또는 상태는 다음을 포함한다: 예를 들면, 만성 신장 질환 또는 부전, 급성 신장 질환 또는 부전, 단계 1 신장 질환을 가진 환자, 단계 2 신장 질환을 가진 환자, 단계 3 신장 질환을 가진 환자, 단계 4 신장 질환을 가진 환자, 단계 5 신장 질환을 가진 환자, 비-당뇨성 신장 질환, 사구체신염, 간질 신장염, 당뇨성 신장 질환, 당뇨성 신증, 사구체경화증, 급속 진행성 사구체신염, 신장 섬유증, 알포트(Alport) 증후군, IDDM 신장염, 메산쥔(mesangial) 증식성 사구체신염, 막 증식성 사구체신염, 초승달(crescentic) 사구체신염, 신장 간질 섬유증, 국소 분절(focal segmental) 사구체경화증, 막성(membranous) 신증, 미세변화(minimal change disease) 질환, 파우치-면역(pauci-immune) 급속 진행성 사구체신염, IgA 신증, 다낭포성 신장 질환, 덴트(Dent's) 질환, 네프로사이트노시스(nephrocystinosis), 헤이만(Heymann) 신장염, 상염색체 우성 (성인) 다낭포성 신장 질환, 상염색체 열성 (소아) 다낭포성 신장 질환, 급성 신장 손상, 신증 증후군, 신장 허혈, 족세포 질환 또는 장애, 단백뇨, 사구체 질환, 막성 사구체신염, 국소 분절 사구체신염, 전-자간증, 자간증, 신장 병변, 콜라겐 맥관 질환, 양성 기립성 (체위성) 단백뇨, IgM 신증, 막성 신증, 사르코이도증, 진성 당뇨병, 약물로 인한 신장 손상, 파브리(Fabry's) 질환, 아미노산뇨, 판코니(Fanconi) 증후군, 고혈압 신장경화증, 간질 신장염, 겸상 세포 질환, 혈색소뇨, 미오글로빈뇨, 웨그너 육아종증(Wegener's 육아종증), 글리코겐 저장 질환 유형 1, 만성 신장 질환, 만성 신부전, 낮은 사구체 여과율 (GFR), 신혈관경화증, 낭창 신장염, ANCA-양성(positive) 파우치-면역 초승달 사구체신염, 만성 동종이식편 신증, 신독성, 신장 독성, 신장 괴사, 신장 손상, 사구체 및 관상 손상, 신장 기능이상, 신장의 증후군, 급성 신부전, 만성 신부전, 근위 관 기능이상, 급성 신장 이식 거부, 만성 신장 이식 거부, 비-IgA 메산쥔증식성 사구체신염, 감염후 사구체신염, 임의 중요한 신장 관련 맥관염, 임의의 유전적 신장 질환, 임의의 간질 신장염, 신장 이식 부전, 신장 암, 다른 상태와 연합된 신장 질환 (가령, 고혈압, 당뇨병, 및 자가면역 질환), 덴트 질환, 네프로사이트노시스, 헤이만 신장염, 원발성 신장 질환, 허탈성(collapsing) 사구체병증, 밀도 침착(dense deposit) 질환, 저온글로불린혈증-연합된 사구체신염, 헤노흐-쾨라인(Henoch-Schonlein) 질환, 감염후 사구체신염, 세균성 심장 내막염, 현미경적 다발성혈관염, 척-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군, 항-GBM-항체 매개된 사구체신염, 아밀로이드증, 단클론 면역글로불린 침착 질환, 원섬유 사구체신염, 면역이질결정집합체 사구체병증, 허혈성 관상 손상, 약물-유도된 관상-간질 신장염, 독성 관상-간질 신장염, 전염성 관상-간질 신장염, 세균성 신우신염, 폴리오마바이러스 감염 또는 HIV 감염을 초래하는 바이러스성 전염성 관상-간질 신장염, 대사성-유도된 관상-간질 질환, 혼합 결합조직 질환, 캐스트 신증, 요산염 또는 옥살염 또는 약물-유도된 결정 침착으로 야기하는 결정 신증, 급성 세포성 관상-간질 동종이식편 거부, 림프종 또는 이식-후 임파증식성 질환으로 인한 중앙성 림프관성 질환, 신장의 폐색 질환, 맥관 질환, 혈전미세 혈관병, 신혈관경화증, 족중색전증 질환, 혼합

결합조직 조직 질환, 결절성다발성동맥염, 칼씨네우린-억제제 유도된-맥관 질환, 급성 세포성 맥관 동종이식편 거부, 급성 체액성 동종이식편 거부, 초기 신장 기능 쇠퇴 (ERFD), 최종 단계 신장 질환 (ESRD), 신장 정맥 혈전증, 급성 관상 피사, 신장 폐색, 급성 간질 신장염, 확립된 만성 신장 질환, 신장 동맥 협착, 허혈성 신증, 요독증, 약물 및 독신-유도된 만성 관상간질 신장염, 역류 신증, 신장 결석, 굿패스츄어(Goodpasture's) 증후군, 정상색소빈혈, 신장 빈혈, 당뇨병 만성 신장 질환, IgG4-관련된 질환, 폰 히펠-린다우(von Hippel-Lindau) 증후군, 결절성 경화증, 콩팥황폐증, 수질 낭포성 신장 질환, 신장 세포 암종, 선암, 신아세포종, 림프종, 백혈병, 저시알화 장애, 만성 사이클로스포린 신증, 신장 재관류 손상, 신장 형성장애, 질소혈, 양측 동맥 폐색, 급성 요산 신증, 저혈량증, 급성 양측 폐쇄성 요로병, 고칼슘혈증 신증, 용혈성 요독증성 증후군, 급성 뇨폐, 악성 신장경화증, 산후 사구체경화증, 경피증, 비-굿패스츄어 항-GBM 질환, microscopic 결절성다발성동맥염, 알레르기성 육아종증, 급성 방사선 신장염, 연쇄상구균-감염후사구체신염, 발덴스트롬(Waldenstrom's) 고분자글로불린혈증, 진통성 신증, 동정맥루, 동정맥 이식편, 투석, 이소성(ectopic) 신장, 수질 스폰지 신장, 신장 골형성장애, 홀기능 신장, 수신증, 미세알부민뇨, 요독증, 혈뇨, 고지질혈증, 저알부민혈증, 지질뇨, 산독증, 및 고칼륨증. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 단계 1 에서 단계 2 신장 질환, 단계 2 에서 단계 3 신장 질환, 단계 3 에서 단계 4 신장 질환, 또는 단계 4 에서 단계 5 신장 질환의 진행을 지연 또는 방지하는 데 이용되는 ALK4:ActRIIB 길항제 및 방법을 더 제공한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 신장 염증의 방지 또는 감소에 이용하기 위한 ALK4:ActRIIB 이형다량체 및 그 방법을 더 제공한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 신장 손상의 방지 또는 감소에 이용하기 위한 ALK4:ActRIIB 이형다량체 및 그 방법을 더 제공한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 신장 섬유증의 방지 또는 감소에 이용하기 위한 ALK4:ActRIIB 이형다량체 및 그 방법을 더 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0057]

도 1은 다중 ActRIIB 및 ActRIIA 결정 구조의 복합 분석에 근거하여, 상자로 표시된 리간드와 직접 접촉하기 위하여, 본 명세서에서 예측된 잔기를 갖는 humActRIIA의 세포외 도메인(서열 번호: 49)과 humActRIIB의 세포외 도메인 (서열 번호: 2)의 정렬을 나타낸다.

도 2는 세포내 도메인없는 다양한 척추동물 ActRIIB 전구체 단백질(서열 번호: 50-55, 차례로), 세포내 도메인 없는 humActRIIA 전구체 단백질(서열 번호: 56), 그리고 콘센수스 ActRII 전구체 단백질 (서열 번호: 57)의 다중 서열 정렬을 나타낸다.

도 3은 Clustal 2.1을 이용하여 인간 IgG 아이소타입으로부터 Fc 도메인의 복수 서열 정렬을 보여준다. 힌지 영역은 점선 밑줄에 의해 표시된다. 이중 밑줄은 비대칭 사슬 짝짓기를 증진하기 위해 IgG1 Fc (서열 번호: 34)에서 조작될 수 있는 위치 및 다른 아이소타입 IgG2, IgG3 및 IgG4에 대하여 상응하는 위치의 실례를 나타낸다.

도 4는 ActRIIB-Fc 동형이량체와 ALK4-Fc 동형이량체와 비교하여 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체 단백질 복합체에 대한 비교 리간드 결합 데이터를 나타낸다. 각 단백질 복합체의 경우, 리간드는 리간드 신호전달 억제과 관련된 운동 상수인 k_{off} 에 의해 등급결정되며, 결합 친화력 (가장 단단하게 결합된 리간드가 상위에 열거됨)의 내림 순서로 열거된다. 왼쪽에서 노란색, 빨간색, 녹색 및 파란색 선은 해리 속도 상수의 크기를 나타낸다. 검정색 선은 동형이량체와 비교하여 이형이량체에 대한 결합이 강화되거나 변하지 않은 리간드를 나타내지만, 빨간색 점선은 동형이량체에 비해 결합이 실질적으로 감소한 것을 나타낸다. 나타낸 바와 같이, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 이들 동형이량체와 비교하여 액티빈 B에 강화된 결합을 보이고, ActRIIB-Fc 동형이량체에서 관찰된 바와 같이, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11에 강력한 결합을 유지하지만, BMP9, BMP10, 및 GDF3에 대해서 실질적으로 감소된 결합을 나타낸다. ActRIIB-Fc 동형이량체와 유사하게, 상기 이형이량체는 BMP6에 중간-수준 결합을 유지한다.

도 5는 다양한 척추동물 종으로부터 유도된 ALK4 세포외 도메인의 다중 서열 정렬(서열 번호: 59-65)을 나타낸다.

도 6a-6d는 ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체 단백질 복합체의 계략적인 예를 보여준다.

도시된 구체예들에 있어서, ALK4 폴리펩티드(좌에서 우로)는 상호작용 쌍의 제 1 구성요소 (" C_1 ")를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부이며, 그리고 ActRIIB 폴리펩티드는 상호작용 쌍의 제 2 구성요소 (" C_2 ")를 포함하는 융

합 폴리펩티드의 일부이다. 적합한 상호작용 쌍은 예를 들면, 중쇄 및/또는 경쇄 면역글로불린 상호작용 쌍, 절두(truncations), 및 본 명세서에서 설명된 바와 같은 이의 변이체들 [가령, Spiess et al (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106]을 포함한다. 각 융합 폴리펩티드에서, 링커는 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드와 상호작용 쌍의 상응하는 구성요소 사이에 위치할 수 있다. 상호작용 쌍의 제1과 제2 구성요소들은 비유도될 수 있는데, 이것은 상기 쌍의 구성원들이 실제적인 선호 없이 서로 연관되거나 또는 자가-연관될 수 있고, 그리고 따라서, 이들은 동일하거나 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 도 6a 참고. 대안으로, 상호작용 쌍의 첫 번째와 두 번째 구성원은 유도된(비대칭) 쌍일 수 있는데, 이것은 상기 쌍의 구성원들이 자가 연관보다는 서로에 선호적으로 연관된다는 것을 의미한다. 도 6b 참고. 더 높은 차수의 복합체도 생각해볼 수 있다. 도 6c 및 6d 참고.

도 7은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 A-204 Reporter 유전자분석에 의해 측정된 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체/ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체 비교 IC₅₀ 데이터를 나타낸다. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체와 유사하게 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11 신호전달 경로를 억제한다. 그러나, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 BMP9 및 BMP10 신호전달 경로 억제는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체와 비교하여 상당히 감소된 것이다. 이들 데이터는 ALK4:ActRIIB 이형이량체가 상응하는 ActRIIB:ActRIIB 동형이량체와 비교하였을 때, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11의 더 큰 선택적 길항 제임을 설명한다.

도 8a-8c는 한측면 수뇨관 폐색 (UUO)된 마우스 신장에서 섬유증 유전자 (Col1a1, 피브로넥틴, PAI-1, CTGF, 및 α-SMA), 염증 유전자 (TNF-알파, 및 MCP1), 사이토킨 유전자 (TGF-베타 1, GF-베타 2, TGF-베타 3, 및 액티빈 A), 신장 손상 유전자(NGAL), 저산소증-유도성 인자 1-알파 (HIF1a), 및 액티빈 A 수용체 (Acvr2A)의 유전자 발현 프로파일을 보여준다. 반대측 비-수술 신장의 시료를 대조군(Ctrl)으로 사용 하였다. 수술 후 17일차에 유전자발현 프로파일을 수득하였다. 마우스에게 수술 후 3, 7, 10, 및 14일차 시점에 PBS 또는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체가 투여되었다. (\$)는 ALK7-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체가 투여된 마우스에서 17일차 시점에 UUO 신장과 비교하여 오직 PBS만 투여된 마우스의 17일차 UUO 신장간의 통계학적 차이를 나타낸다. (@)는 전사체 탐지가 없음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

1. 개요

부분적으로, 본 명세서는 TGFβ 슈퍼패밀리 유형 I 수용체 폴리펩티드와 TGFβ 슈퍼패밀리 유형 II 수용체 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체, 이의 용도, 그리고 이러한 이형다량체를 만드는 방법에 관계한다. 가령, 도 6 참고. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 이형다량체는 TGFβ 슈퍼패밀리 유형 I 수용체 폴리펩티드의 세포외 도메인과 TGFβ 슈퍼패밀리 유형 II 수용체 폴리펩티드의 세포외 도메인을 포함한다. 구체적으로, 본 명세서는 ALK4 폴리펩티드와 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체를 제공한다. 바람직하게는 이러한 ALK4 폴리펩티드는 ALK4 수용체의 리간드-결합 도메인과 이러한 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 수용체의 리간드-결합 도메인을 포함한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 동종다량체의 상응하는 시료와 비교하였을 때(가령, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 ActRIIB:ActRIIB 동형이량체 또는 ALK4:ALK4 동형이량체와 비교됨), 변경된 TGFβ 슈퍼패밀리 리간드 결합 프로파일/특이성을 갖는다.

TGF-β 슈퍼패밀리는 TGF-베타, 액티빈, nodals, 뼈 형태발생 단백질 (BMPs), 성장 및 분화 인자 (GDFs), 그리고 항-Mullerian 호르몬 (AMH)을 포함하는 30가지 이상의 분비된 인자로 구성된다[Weiss et al. (2013) Developmental Biology, 2(1): 47-63]. 척추동물과 무척추동물 모두에서 발현되는 상기 슈퍼패밀리의 구성요소들은 동물의 평생 동안 발달의 가장 초기 단계에서 다양한 조직과 기능에 편재되어 발현된다. 게다가, TGF-β 슈퍼패밀리 단백질은 줄기 세포의 자가 재생, 생식기, 분화, 기관 형태 형성 및 성인 조직 항상성의 핵심 매개체이다. 이러한 편재된 활성과 일관되게, TGF-베타 슈퍼패밀리의 비정상 신호전달은 예를 들면, 자가면역 질환, 심혈관 질환, 섬유증 질환, 및 암이 포함된 다양한 인간 병리에 관련된다.

TGF-베타 슈퍼패밀리의 리간드들은 하나의 단량체의 중심 3-1/2 회전 나선이 다른 단량체의 베타-가닥에 의해 형성된 오목한 표면을 채우는 동일한 이량체 구조를 공유한다. 대다수의 TGF-베타 패밀리 구성요소들은 분자 내 이황화 결합으로 더욱 안정화된다. 이 디설파이드 결합은 다른 2 개의 디설파이드 결합에 의해 형성된 고리를 통과하는데, 이로써 '시스테인 매듭 (cysteine knot)'모티프로 불리는 것을 생성된다[Lin et al. (2006)

Reproduction 132: 179-190; 그리고 Hinck et al. (2012) FEBS Letters 586: 1860-1870].

[0063] TGF-베타 슈퍼패밀리 신호전달은 리간드 자극 시 하류 SMAD 단백질 (가령, SMAD 단백질 1, 2, 3, 5, 및 8) 을 인산화시키고, 활성화시키는 이형화학적 복합체 of 유형 I 및 유형 II 세린/트레오닌 키나제 수용체에 의해 매개된다[Massagué (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178]. 이들 유형 I 및 유형 II 수용체는 시스테인-풍부한 영역을 갖는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 특이성을 갖는 세포질 도메인으로 구성된 막경유 단백질이다. 일반적으로, 유형 I 수용체는 세포내 신호전달을 중재하고, 유형 II 수용체는 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드의 결합에 필요하다. 유형 I 및 II 수용체는 리간드 결합 후 안정적 복합체를 형성하여, 유형 II 수용체에 의한 유형 I 수용체가 인산화된다.

[0064] TGF-베타 패밀리는 그들이 결합하는 I 형 수용체와 그들이 활성화시키는 Smad 단백질을 기반으로 두 가지 계통 발생 가지로 나눌 수 있다. 하나는 좀더 최근에 전개된 가지로써, 가령, TGF-베타, 액티빈, GDF8, GDF9, GDF11, BMP3 및 nodal을 포함하며, Smads 2 및 3을 활성화시키는 유형 I 수용체를 통하여 신호전달한다 [Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860-1870]. 다른 가지는 슈퍼패밀리의 좀더 거리가 있는 관련 단백질을 포함하는데, 가령, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF1, GDF5, GDF6, 및 GDF7을 포함하며, 이들은 Smads 1, 5, 및 8을 통하여 신호전달한다.

[0065] 액티빈은 TGF-베타 슈퍼패밀리의 구성요소이며, 구성원이며 처음에는 난포-자극 호르몬의 분비 조절제로 밝혀졌지만, 이후 다양한 생식 및 비 생식-기능이 규명되었다. 2개의 밀접하게 관련된 β 소단위 ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, 및 $\beta_A\beta_B$, 차례로)의 동형/이형이량체인 3가지 주요 액티빈 형태(A, B, 및 AB)가 있다. 인간 계놈은 또한 주로 간에서 발현되는 액티빈 C 및 액티빈 E 를 인코딩하고, 그리고 β_C 또는 β_E 를 함유하는 이형이량체 형태 또한 공지되어 있다. TGF-베타 슈퍼패밀리에서, 액티빈은 난소 및 태반 세포에서 호르몬 생성을 자극하고, 신경 세포 생존을 지원하고, 세포 유형에 따라 세포주기 진행에 긍정적 또는 부정적 영향을 미칠 수 있고, 그리고 적어도 양서류 태아에서 중배엽 분화를 유도할 수 있는 독특하고 다기능적 요소다[DePaolo et al. (1991) Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al. (1997) Curr Biol. 7:81-84; 그리고 Woodruff (1998) Biochem Pharmacol. 55:953-963]. 몇몇 조직에서, 액티빈 신호전달은 이것의 관련된 이형이량체, 인히빈에 의해 길항된다. 예를 들면, 뇌하수체로부터 난포-자극 호르몬 (FSH) 분비 조절에 있어서, 액티빈은 FSH 합성 및 분비를 촉진시키지만, 한편 인히빈은 FSH 합성 및 분비를 감소시킨다. 액티빈 생활성을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질은 폴리스테틴 (FS), 폴리스테틴-관련된 단백질 (FSRP, 또한 FLRG 또는 FSTL3으로도 알려짐), 및 α_2 -마크로글로불린을 포함한다.

[0066] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 단리된 β_A 소단위 또는 이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_A$ 동형이량체 또는 $\beta_A\beta_B$ 이형이량체)에서 "액티빈 A"에 결합하는 물질은 β_A 소단위에 특이적으로 결합하는 물질이다. 이형이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_B$ 이형이량체)의 경우, "액티빈 A"에 결합하는 물질은 β_A 소단위 안에 존재하는 에피토프 (epitopes)에 특이적이지만, 이 복합체의 비- β_A 소단위 (가령, 복합체의 β_B 소단위) 안에 존재하는 에피토프에는 결합하지 않는다. 유사하게, "액티빈 A"를 길항(억제)하는 것으로 본 명세서에서 공개된 물질은 단리된 β_A 소단위 또는 이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_A$ 동형이량체 또는 $\beta_A\beta_B$ 이형이량체)에서 β_A 소단위에 의해 중개되는 하나 또는 그 이상의 활성을 억제하는 물질이다. $\beta_A\beta_B$ 이형이합체의 경우에, "액티빈 A"를 저해하는 작용제는 β_A 아단위의 하나 또는 그 이상의 활성을 특이적으로 저해하지만, 복합체의 비- β_A 아단위 (가령, 복합체의 β_B 아단위)의 활성을 저해하지 않는 작용제이다. 이러한 원리는 "액티빈 B", "액티빈 C" 및 "액티빈 E"에 결합하고 및/또는 이를 저해하는 작용제에도 적용된다. "액티빈 AB"에 길항작용하는 본원에서 개시된 작용제는 β_A 아단위에 의해 매개된 하나 또는 그 이상의 활성 및 β_B 아단위에 의해 매개된 하나 또는 그 이상의 활성을 저해하는 작용제이다. 이 원리는 또한 "액티빈 B", "액티빈 C", 및 "액티빈 E"에 결합하고, 및/또는 억제하는 물질들에 적용된다.

[0067] BMPs 및 GDFs는 함께, TGF-베타 슈퍼패밀리의 특징적인 폴드(characteristic fold)를 공유하는 시스테인-매듭 사이토키닌의 패밀리를 형성한다. [Rider et al. (2010) Biochem J., 429(1):1-12]. 이 패밀리는 예를 들면, BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP2a, BMP3, BMP3b (GDF10로도 알려짐), BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP8a, BMP8b, BMP9 (GDF2로도 알려짐), BMP10, BMP11 (GDF11로도 알려짐), BMP12 (GDF7로도 알려짐), BMP13 (GDF6로도 알려짐), BMP14 (GDF5로도 알려짐), BMP15, GDF1, GDF3 (VGR2로도 알려짐), GDF8 (미오스테틴로도 알려짐),

GDF9, GDF15, 및 decapentaplegic을 포함한다. 뼈 형성을 유도 할 수 있는 능력(이로 인하여 BMPs로 불림) 외에도, BMP/GDF는 광범위한 조직의 발생에 형태형성적 활성을 보여준다. BMP/GDF 동중-이량체 및 이형-이량체는 I 형과 II 형의 수용체 이량체의 조합과 상호작용하여, 여러 가지 가능한 신호 생성 복합체를 생성하고, SMAD 전사 인자의 두 경쟁 세트 중 하나의 활성화를 유도한다. BMP/GDFs는 매우 특이적이며, 국소화된 기능을 갖는다. 이들은 다양한 방식으로 조절되는데, BMP/GDF 발현의 발생 제한, 그리고 사이토킨에 고친화력으로 결합하는 몇 가지 특이적인 BMP 길항 단백질의 분비를 통하여 조절된다. 신기하게도, 다수의 이들 길항제들은 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드들을 닮았다.

[0068] 성장 및 분화 인자-8 (GDF8)은 또한 미오스타틴으로 알려져 있다. GDF8은 골격근량의 음성 조절인자로서, 발생 중인 그리고 성인 골격근에서 상당히 발현된다. 유전자삽입 마우스에서 GDF8 null 돌연변이는 골격근의 눈에 띄는 비대 및 다형성을 특징으로 한다 [McPherron *et al.* Nature (1997) 387:83-90]. 소에서 GDF8의 자연 발생 돌연변이에서 골격근량의 비슷한 증가가 있고, 그리고 인간에서 현저하게 나타난다 [Ashmore *et al.* (1974) 성장, 38:501-507; Swatland and Kieffer, J. Anim. Sci. (1994) 38:752-757; McPherron and Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:12457-12461; Kambadur *et al.* Genome Res. (1997) 7:910-915; 그리고 Schuelke *et al.* (2004) N Engl J Med, 350:2682-8]. 연구에 따르면, 사람의 HIV 감염과 관련된 근육 소모는 GDF8 단백질 발현 증가를 수반한다[Gonzalez-Cadavid *et al.*, PNAS (1998) 95:14938-43]. 또한, GDF8은 근육 특이적 효소 (예: 크레아틴 키나제)의 생산을 조절하고, 근섬유 세포 증식을 조절할 수 있다.[International Patent Application Publication No. WO 00/43781]. GDF8 프로펩티드(propeptide)는 성숙한 GDF8 도메인 이량체에 비공유 결합하여, 그 생물학적 활성을 불활성화시킬 수 있다. [Miyazono *et al.* (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield *et al.* (1988) J. Biol. Chem., 263; 7646-7654; 그리고 Brown *et al.* (1990) Growth Factors, 3: 35-43]. GDF8 또는 구조적으로 관련된 단백질에 결합하고, 이들의 생물학적 활성을 억제시키는 다른 단백질은 폴리스테틴, 그리고 잠재적으로, 폴리스테틴-관련된 단백질을 포함한다.[Gamer *et al.* (1999) Dev. Biol., 208: 222-232].

[0069] BMP11로도 알려진, GDF11은 ,마우스 발생 동안 꼬리썩(tail bud), 팔다리썩(limb bud), 상악 및 하악 아치, 그리고 후근 신경절에서 발현되는 분비 단백질이다. [McPherron *et al.* (1999) Nat. Genet., 22: 260-264; 그리고 Nakashima *et al.* (1999) Mech. Dev., 80: 185-189]. GDF11은 중배엽 및 신경 조직 모두에서 패턴화에 독특한 역할을 한다. [Gamer *et al.* (1999) Dev Biol., 208:222-32]. GDF11은 병아리 날개 발달에 있어서 연골 형성 및 근형성의 음성 조절자인 것으로 나타났다. [Gamer *et al.* (2001) Dev Biol., 229:407-20]. 근육에서 GDF11의 발현은 GDF8과 유사한 방식으로 근육 성장을 조절하는 역할을 암시한다. 또한, 뇌에서 GDF11의 발현은 GDF11이 또한 신경계의 기능과 관련된 활성을 가질 수 있음을 시사한다. 흥미로운 것은, GDF11은 후각 상피의 신경 발생을 억제하는 것으로 밝혀졌다.[Wu *et al.* (2003) Neuron., 37:197-207]. 따라서, 억제제 GDF11은 근육 질환 및 신경 퇴행성 질환(가령, 근위축성 측색 경화증)과 같은 질병의 치료에서 시험관내 및 생체내 적용될 수 있다.

[0070] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 비교 결합 데이터는 ALK4:ActRIIB 이형이량체가 상응하는 ActRIIB 또는 ALK4 동형이량체와 비교하였을 때, 변경된 결합 프로파일 (리간드 선택성)을 갖는다는 것을 실증한다. 구체적으로, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 동형이량체와 비교하여 액티빈 B에 대하여 강화된 결합을 보이며, ActRIIB ActRIIB-Fc 동형이량체에서 관찰된 바와 같이, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11에 대하여 강력한 결합을 유지한다. 그러나, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 ActRIIB 동형이량체와 비교하여 BMP9, BMP10, 및 GDF3에 대하여 실질적으로 감소된 결합을 나타낸다. 구체적으로, BMP9는 ALK4:ActRIIB 이형이량체에 대하여 낮은 친화력 또는 탐지불가능한 친화력을 나타내고, 한편 이 리간드는 ActRIIB 동형이량체에 강력하게 결합한다.

[0071] 이들 데이터는 ALK4:ActRIIB 이형이량체가 상응하는 ActRIIB 동형이량체와 비교하였을 때, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11의 더 큰 선택적 길항제임을 설명한다. 따라서, ALK4:ActRIIB 이형이량체는 특정 용도에서 ActRIIB 동형이량체보다 더 유용할 것이며, 이때 이러한 선택적 길항작용이 유익하다. 실시예는 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AC, 액티빈 AB) GDF8, 및 GDF11의 길항작용을 유지하지만, 하나 또는 그 이상의 BMP9, BMP10, 및 BMP6의 길항작용은 최소화시키는 것이 바람직한 치료 용도를 포함한다.

[0072] 더욱이, ALK4:ActRIIB 이형이량체, 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 골격근 및 뼈에는 유익한 동화성(anabolic) 효과를, 그리고 지방 조직에는 이화성(catabolic) 효과를 발휘하는데, 이들은 ActRIIB 동형이량체의 효과와 매우 유사하다. 그러나, ActRIIB 동형이량체와는 달리, ActRIIB:ALK4 이형이량체는 BMP9 및 BMP10에 오직 낮은 친화력 또는 일시적 결합만을 나타내고, 따라서 이들 리간드에 의해 매개되는 공정, 이를 테면 혈관신생을 동시에 억제하지는 않거나, 또는 거의 않을 것이다. 이 신규한 선택성은 예를 들면, 근육과 뼈에는 자극

효과를, 그리고 변경된 혈관신생은 필요하지 않지만, 지방에는 저해 효과를 필요로 하는 환자의 치료에 유용할 것이다.

[0073] 이 명세서에서 사용된 용어는 일반적으로 본 개시 내용 및 각 용어가 사용되는 특정 상황에서 당해 분야의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 명세서의 구성 및 방법을 설명하고, 이를 작성하고 사용하는 방법에 대해 당업자에게 추가 지침을 제공하기 위해 아래 또는 다른 곳에서 논의된다. 어떤 용어의 사용의 범위나 의미는 그것이 사용되는 특정 상황에서 명백해질 것이다.

[0074] 용어 "이형태(heteromer)" 또는 "이형다량체(heteromultimer)"는 최소한 제 1 폴리펩티드 쇠와 제 2 폴리펩티드 쇠를 포함하는 복합체이며, 이때 제 2 폴리펩티드 쇠는 제 1 폴리펩티드 쇠의 서열에서 최소한 하나의 아미노산 잔기가 상이하다. 상기 이형태는 제 1 폴리펩티드 쇠와 제 2 폴리펩티드 쇠에 의해 형성된 "이형이량체"를 포함하거나, 또는 제 1 폴리펩티드와 제 2 폴리펩티드에 추가하여 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드 쇠가 존재하는 더 큰 차수의 구조를 만들 수 있다. 이형다량체의 예시적인 구조는 이형이량체, 이형삼량체, 이형사량체 및 추가 올리고머 구조를 포함한다. 이형이량체는 본 명세서에서 X:Y로 표현되거나, 또는 대등하게 X-Y로 표현되는데, 이때 X는 제 1 폴리펩티드 쇠를 나타내고, Y는 제 2 폴리펩티드 쇠를 나타낸다. 고차 이형태와 올리고머 구조는 본 명세서에서 상응하는 방식으로 명시된다. 특정 구체예들에 있어서, 이형다량체는 재조합에 의한 (가령, 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드 구성요소들이 재조합 단백질일 수 있다), 단리된 및/또는 정제된 것일 수 있다.

[0075] 모든 문법적 형태 및 단어 변이에서 "상동성(Homologous)"이란 동일한 유기체 중에서 슈퍼패밀리의 단백질을 포함하는 "공통적인 진화 기원"을 포함하는 두개 단백질간의 상관관계를 지칭하거나, 뿐만 아니라 상이한 유기체 종의 상동성 단백질을 지칭한다. 이러한 단백질 (및 이의 인코딩 핵산)은 서열 상동성을 갖고, 동일성 (%) 또는 특정 잔기 또는 모티프 및 보존된 위치의 존재 여부와 관계없이, 서열 유사성에 의해 반영되는 바와 같은 서열 상동성을 갖는다. 그러나, 일반적인 용도 및 당해 출원에서, "상동성"이라는 용어는 "매우"와 같은 부사로 수식될 때 서열 유사성을 지칭할 수 있고, 일반적인 진화적 기원과 관련 될 수도 있고 또는 그렇지 않을 수도 있다.

[0076] 용어 "서열 유사성(sequence similarity)"은 모든 문법적 형태에서 일반적인 진화론적 기원을 공유하거나 공유하지 않을 수 있는 핵산 또는 아미노산 서열 간의 동일성 또는 일치 정도를 의미한다.

[0077] 기준 폴리펩티드 (또는 뉴클레오타이드) 서열에 대한 "서열 동일성 백분율(%)"은 후보 서열의 아미노산 잔기(또는 핵산)이 기준 폴리펩티드(뉴클레오타이드) 서열에의 아미노산 잔기(또는 핵산)와 동일한 아미노산 잔기 (또는 핵산)의 백분율로 정의되는데, 이때 서열을 정렬시킨 후 최대 서열 동일성 백분율을 얻기 위하여 필요하다면 갭을 도입하고, 보존적 치환은 상기 서열의 동일성의 일부분으로 간주되지 않는다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방법으로 성취될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 (핵산) 서열 동일성 %값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에 의해 작성되었으며, 소스 코드(source code)는 미국 저작권청 (Washington D.C., 20559)에 사용자 문서로 제출되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코의 Genentech, Inc.에서 공개적으로 입수할 수 있으며, 소스 코드에서 컴파일할 수도 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 체제에서 사용하도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 가변적이지 않다.

[0078] "항진하다(agonize)"는 모든 문법적 형태로 단백질 및/또는 유전자를 활성화 (예 : 단백질의 유전자 발현을 활성화 또는 증폭하거나 비활성 단백질을 활성화 상태로 유도함으로써)하거나 단백질 및 단백질을 증가시키는 과정을 의미한다.

[0079] "길항하다(antagonize)"는 모든 문법적 형태로 단백질 및/또는 유전자를 억제(예 : 단백질의 유전자 발현을 억제 또는 감소시키거나 활성 단백질을 비활성화 상태로 유도함으로써)하거나 단백질 및 단백질을 감소시키는 과정을 의미한다.

[0080] 명세서 및 청구 범위에 걸쳐 수치와 관련하여 사용되는 용어 "약(약)" 및 "대략(approximately)"이란 당업자에게 친숙하고 수용가능한 정확도의 구간을 나타낸다. 일반적으로, 이러한 정확도 구간은 $\pm 10\%$ 이다. 대안으로,

그리고 특히 생물학적 계통에서, 용어 "약" 및 "대략"은 주어진 값의 크기의 차수, 바람직하게는 ≤ 5 배, 보다 바람직하게는 ≤ 2 배 이내의 값을 의미 할 수 있다.

[0081] 여기에 개시된 수치 범위는 범위를 정의하는 수치를 포함한다.

[0082] 용어 "a" 및 "an"은 용어가 사용된 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 복수형을 포함한다. 용어 "하나 또는 이상의" 및 "최소 하나의"는 물론 호환할 수 있는 용어로 "하나"(또는 "하나")라는 용어를 사용할 수 있다. 더욱이, 본 명세서에서 사용된 "및/또는"이란 둘 또는 그 이상의 특정 특징 또는 구성 요소의 각각의 구체적인 설명으로서 취해질 것이다. 따라서, 구절에서 사용된 용어 "및/또는", 이를 테면 "A 및/또는 B"는 "A와 B", "A 또는 B", "A" (단독), 및 "B" (단독)을 포함한다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 문구에 사용된 "및/또는"이라는 용어는 다음 각 측면을 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A와 C; A와 B; B와 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

[0083] 2. ALK4:ActRIIB 이형다량체

[0084] 특정 측면들에서, 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 ALK4 수용체 폴리펩티드 (가령, 서열 번호: 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47, 48, 74, 및 76)와 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 수용체 폴리펩티드 (가령, 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45, 46, 70, 72, 78, 및 80)를 포함하는 이형다량체에 관계하는데, 이들은 일반적으로 본 명세서에서 "ALK4:ActRIIB 이형다량체 복합체" 또는 "ALK4:ActRIIB 이형다량체"로 지칭된다. 바람직하게는, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 가용성이며, 예를 들면, 이형다량체는 ALK4 수용체의 가용성 부분(도메인)과 ActRIIB 수용체의 가용성 부분(도메인)을 포함할 수 있다. 일반적으로, ALK4와 ActRIIB의 세포외 도메인은 이들 수용체의 가용성 부분에 상응한다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 이형다량체는 ALK4 수용체의 세포외 도메인과 ActRIIB의 세포외 도메인 수용체를 포함한다. 예시적인 세포외 도메인 ALK4와 ActRIIB 수용체는 도메인은 본 명세서에서 설명되며, 뿐만 아니라 이의 단편들, 기능성 변이체들 그리고 변형된 형태들이 본 명세서의 발현에 따라 이용될 수 있다 (가령, ALK4:ActRIIB 이형다량체 조성물들 및 이의 용도들). 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 가령, 이형이량체, 이형삼량체, 이형사량체, 및 고차 올리고머 구조를 포함한다. 가령, 도 6 참고. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 이형다량체는 ALK4:ActRIIB 이형이량체이다.

[0085] 바람직하게는, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AC, 액티빈 AB, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE), GDF8, GDF11, BMP6, GDF3, 및 BMP10에 결합할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 A에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 C에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 E에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 AB에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 AC에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 AE에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 BC에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 액티빈 BE에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 GDF11에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 GDF8에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 BMP6에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 GDF3에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 BMP10에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다(가령, BMP9 및 ALK4:ActRIIB 이형다량체 사이의 일시적인 성질로 인하여 명확하지 않은(indeterminate) K_a 또는 K_d 를 가진다). 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 강한 친화력으로 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 GDF3에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 BMP9에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 더 약한 친화력으로 BMP10에 결합한다. 임의선택적으로, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 하나 또는 그 이상의 BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP7, BMP8a, BMP8b, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF9b/BMP15, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty 중 하나 또는 그 이상에 결합할 수 있다.

[0086] 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 하나 또는 그 이상의 TGF β 슈퍼패밀리 리간드의해 매개되는 신호전달 (가령, Smad 2/3 및/또는 Smad 1/5/8 신호전달)을 억제(길항)하는데 이용될 수 있다. 구체적으로, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 예를 들면, 세포-기반 분석에서 하나 또는 그 이상의 TGF β 슈퍼패밀리 리간드에 의해 매개되는 신호전달을 저해하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AC, 액티빈 AB, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE), GDF8, GDF11, BMP6, GDF3, 및 BMP10에 의해 매개되는 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 A 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 B 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 C 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 D 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 E 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 AB 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 AC 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 BC 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 AE 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 액티빈 BE 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 GDF11 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 GDF8 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 BMP6 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 GDF3 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 BMP9 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포 기반 분석에서 BMP9 신호전달을 억제하지 않거나, 또는 실질적으로 억제하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동형이량체와 비교하여 세포-기반 분석에서 액티빈 B 신호전달의 더욱 강력한 억제제다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 세포-기반 분석에서 BMP10 신호전달의 약한 억제제다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 세포-기반 분석에서 GDF3 신호전달의 더 강한 억제제다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 상응하는 ActRIIB 동종다량체와 비교하여 세포-기반 분석에서 BMP9 신호전달의 더 강한 억제제다. 임의선택적으로, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 세포-기반 분석에서 하나 또는 그 이상의 BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP7, BMP8a, BMP8b, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF9b/BMP15, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty에 의한 세포내 신호전달을 더 억제할 수 있다.

[0087] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "ActRIIB"는 임의의 종으로부터 그리고 이 유발 또는 다른 변형에 의해 그러한 ActRIIB 단백질로부터 유래된 변이체로부터 액티빈 수용체 유형 IIB (ActRIIB) 단백질의 패밀리를 나타낸다. ActRIIB에 대한 언급은 현재 확인된 형태중 하나를 참조로 한다. ActRIIB 패밀리의 구성요소는 시스템 인-풍부 영역을 갖는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 및 예상 세린/트레오닌 키나제 활성을 갖는 세포질 도메인을 포함하는 막경유 단백질이다.

[0088] 용어 "ActRIIB 폴리펩티드"는 뿐만 아니라 ActRIIB 패밀리 구성원의 자연 발생적 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 뿐만 아니라, 유용한 활성을 보유하는 그의 임의의 변이체 (돌연변이 체, 단편, 융합체 및 펩티드 유사체를 포함함)를 포함한다. 이러한 변이체 ActRIIB 폴리펩티드들의 예는 본 명세서 뿐만 아니라 국제 특허 출원 공개 번호. WO 2006/012627, WO 2008/097541, 및 Wo 2010/151426에서 제공되며, 이들은 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다. 본원에 기술된 모든 ActRIIB 관련 폴리펩티드에 대한 아미노산의 넘버링은 달리 명시하지 않는 한, 하기에 제공된 인간 ActRIIB 전구체 단백질 서열 (서열 번호: 1)의 번호에 기초한다.

[0089] 인간 ActRIIB 전구체 단백질 서열은 다음과 같다:

```

1  MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
51  GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPT TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNELCHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDWLKHHPGL
451 AQLCVTIEEC WDHDAAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV

```

[0090] 501 TNVDLPPKES SI (서열 번호: 1)

[0091] 신호 펩타이드는 단일 밑줄로 표시되어 있고; 세포의 영역은 굵은 체로 표시되며; 잠재적인 내인성 N-연계된 당화 부위는 이중 밑줄로 표시된다.

[0092] 프로세스된 세포의 ActRIIB 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:

[0093] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (서열 번호: 2)

[0094] 일부 구체예들에 있어서, N-말단에 "SGR..." 서열을 갖는 상기 단백질이 만들어질 수 있다. 세포의 도메인의 C-말단 "꼬리(tail)"는 단일 밑줄로 나타낸다. 결손된 "꼬리"를 갖는 서열($\Delta 15$ 서열)은 다음과 같다:

[0095] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (서열 번호: 3)

[0096] 서열 번호: 1의 위치 64에 알라닌 (A64)을 갖는 ActRIIB 형태 또한 문헌에 보고되었다. 가령, Hilden *et al.* (1994) Blood, 83(8): 2163-2170 참고. A64 치환을 갖는 ActRIIB의 세포의 도메인을 포함하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 액티빈과 GDF11에 대하여 상대적으로 낮은 친화력을 갖는다는 출원인이 확인하였다. 대조적으로, 위치 64에 아르기닌 (R64)을 갖는 동일한 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 액티빈과 GDF11에 대하여 낮은 나노몰에서 높은 피코몰 범위의 친화력을 갖는다. 따라서, R64를 갖는 서열은 본 명세서에서 인간 ActRIIB의 "야생형" 기준 서열로 이용된다.

[0097] 위치 64에 알라닌을 갖는 ActRIIB 형태 는 다음과 같다:

[0098] 1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE

[0099] 51GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY

[0100] 101FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPT TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS

[0101] 151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR

[0102] 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA

[0103] 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNELCHV AETMSRGLSY

[0104] 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK

[0105] 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC

[0106] 401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDWLKHHPGL

[0107] 451 AQLCVTIEEC WDHDAAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV

[0108] 501 TNVDLPPKES SI (서열 번호: 4)

[0109] 신호 펩타이드는 단일 밑줄로 표시되어 있고; 세포의 영역은 굵은 체로 표시된다.

- [0110] 대체 A64 형태의 프로세스된 세포의 ActRIIB 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:
- [0111] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGG PEVTYEPPPTAPT (서열 번호: 5)
- [0112] 일부 구체예들에 있어서, N-말단에 "SGR..." 서열을 갖는 상기 단백질이 만들어질 수 있다. 세포의 도메인의 C-말단 "꼬리"는 단일 밑줄로 나타낸다. 결손된 "꼬리"를 갖는 서열($\Delta 15$ 서열)은 다음과 같다:
- [0113] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (서열 번호: 6)
- [0114] 인간 ActRIIB 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 하기에 나타내며(서열 번호: 7), 이는 Genbank 기준 서열 NM_001106.3의 뉴클레오타이드 25-1560을 나타내며, 이것은 ActRIIB 전구체의 아미노산 1-513를 인코딩한다. 나타낸 바와 같이, 서열은 위치 64에 아르기닌을 제공하며, 대신 알라닌을 제공하기 위하여 변형될 수 있다. 신호 서열은 밑줄로 표시된다.
- [0115] 1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
- [0116] 51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
- [0117] 101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
- [0118] 151 GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
- [0119] 201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
- [0120] 251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
- [0121] 301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
- [0122] 351 AGAGGCTGGG GGCCCGAAG TCACGTACGA GCCACCCCG ACAGCCCCA
- [0123] 401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCATCGG GGGCCTTTC
- [0124] 451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCTA
- [0125] 501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
- [0126] 551 TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
- [0127] 601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
- [0128] 651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
- [0129] 701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
- [0130] 751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
- [0131] 801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
- [0132] 851 GGAACGAAGT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTCACGAGG CCTCTCATAC
- [0133] 901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
- [0134] 951 TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
- [0135] 1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTGA GCCAGGGAAA
- [0136] 1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
- [0137] 1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
- [0138] 1151 TTGACATGTA TGCCATGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
- [0139] 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
- [0140] 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGACA

- [0141] 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTGAAACA CCCGGGCCTG
- [0142] 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
- [0143] 1401 TCGCTGTGCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
- [0144] 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
- [0145] 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (서열 번호: 7)
- [0146] 프로세스된 세포의 인간 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다 (서열 번호: 8). 나타낸 바와 같이, 서열은 위치 64에 아르기닌을 제공하며, 대신 알라닌을 제공하기 위하여 변형될 수 있다.
- [0147] 1 GGGCGTGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACGTG
- [0148] 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
- [0149] 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCACAACAG CTCTGGCACC
- [0150] 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
- [0151] 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT
- [0152] 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
- [0153] 301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC
- [0154] (서열 번호: 8)
- [0155] 인간 ActRIIB 세포의 도메인과 인간 ActRIIA 세포의 도메인의 아미노산 서열 배열은 도 3에 도시된다. 이 정렬은 ActRII 리간드에 직접적으로 접촉하는 것으로 보이는 두 수용체 안에 아미노산 잔기들을 나타낸다. 예를 들면, 상기 복합 ActRII 구조에서 ActRIIB-리간드 결합 포켓은 잔기 Y31, N33, N35, L38 내지 T41, E47, E50, Q53 내지 K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 내지 N83, Y85, R87, A92, 및 E94 내지 F101에 의해 부분적으로 한정됨을 나타낸다. 이들 위치에서, 보존 돌연변이가 용인될 것으로 예상된다.
- [0156] 또한, ActRIIB는 척추동물간에 잘-보존되며, 세포의 도메인의 큰 스트레치(stretches)는 완벽하게 보존된다. 예를 들면, 도 2는 다양한 ActRIIB 오르소로그(orthologs)와 비교하여 인간 ActRIIB 세포의 도메인의 다중-서열 배열을 도시한다. ActRIIB에 결합하는 많은 리간드들이 매우 보존되어 있다. 따라서, 이들 배열로부터, ActRIIB-리간드 결합의 정상적 활성화에 중요한 리간드 결합 도메인 안에 주요 아미노산 위치를 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 정상 ActRIIB-리간드 결합 활성을 크게 변화시키지 않으면서 치환을 용인할 수 있는 아미노산 위치를 예측할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 활성을 가진 인간 ActRIIB 변이체 폴리펩티드는 다른 척추 동물 ActRIIB의 서열의 상응하는 위치에 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 인간 또는 다른 척추 동물 서열에서와 유사한 잔기를 포함 할 수 있다. 다음 실시예들은 활성 ActRIIB 변이체를 정의하는 접근법을 설명하지만, 이에 제한하고자 함은 아니다. 인간 세포의 도메인 (서열 번호: 53)의 L46은 제노푸스(*xenopus*) ActRIIB (서열 번호: 55)에서 발린이며, 따라서 이 위치는 변경될 수 있고, 임의선택적으로 또다른 소수성 잔기, 이를 테면 V, I 또는 F로 변경될 수 있거나, 또는 비-극성 잔기 이를 테면 A로 변경될 수 있다. 인간 세포의 도메인에서 E52는 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 부위가 다양한 광범위한 변화, 가령, 극성 잔기, 이를 테면 E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y 그리고 아마도 A를 포함하는 변화를 용인할 것임을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 T93은 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 다양한 구조적 변이를 용인하는데, 극성 잔기, 이를 테면 S, K, R, E, D, H, G, P, G 및 Y를 선호함을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 F108은 제노푸스에서 Y이며, 따라서 Y 또는 다른 소수성 기, 이를 테면 I, V 또는 L이 용인되어야 함을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 E111은 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 D, R, K 및 H, 뿐만 아니라 Q와 N을 포함하는 하전된 잔기가 용인될 수 있음을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 R112는 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 R 및 H를 포함하는 염기성 잔기가 용인됨을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 위치 119의 A는 상대적으로 덜 보존되며, 설치류에서는 P이고, 제노푸스에서는 V이며, 따라서 이 위치는 기본적으로 임의의 아미노산이 용인되어야 함을 나타낸다.
- [0157] 더욱이, ActRII 단백질은 당해 분야에서 구조적 및 기능적 특징, 특히 리간드 결합에 관해 특징 지워져 왔다 [Attisano *et al.* (1992) Cell 68(1):97-108; Greenwald *et al.* (1999) Nature Structural Biology 6(1): 18-22; Allendorph *et al.* (2006) PNAS 103(20: 7643-7648; Thompson *et al.* (2003) The EMBO Journal 22(7):

1555-1566; 뿐만 아니라 U.S. 특허 번호: 7,709,605, 7,612,041, 및 7,842,663]. 본원의 교시 외에도, 이들 참고 문헌은 하나 또는 그 이상의 정상 활성 (예: 리간드 결합 활성)을 보유하는 ActRIIB 변이체를 생성하는 방법에 대한 충분한 지침을 제공한다.

[0158] 3 개의 핑거-독신 폴드(three-finger toxin fold)로 알려진 구조적 모티프는 타입 I 및 타입 II 수용체에 의한 리간드 결합에 중요하며, 각각의 단량체 수용체의 세포외 도메인 안에 다양한 위치에 보존된 시스테인 잔기에 의해 형성된다. [Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; 그리고 Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. 따라서, 이러한 보존된 시스테인의 가장 바깥쪽에 의해 경계가 표시되는 인간 ActRIIB의 핵심 리간드-결합 도메인은 서열 번호 1(ActRIIB 전구체)의 29-109 위치에 상응한다. 따라서, 이러한 시스테인으로 경계가 표시되는 코어 서열에 인접한 구조적으로 덜 규칙적인 아미노산은 반드시 리간드 결합을 바꾸지 않고도 N-말단에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28개 잔기 및/또는 C-말단에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 잔기가 절두될 수 있다. N-말단 및/또는 C-말단 절두에 대한 예시적인 ActRIIB 세포외 도메인은 서열 번호: 2, 3, 5, 및 6을 포함한다.

[0159] Attisano et al.는 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단에서 프롤린 매듭의 결손은 액티빈에 대한 수용체의 친화력을 감소 시킨다는 것을 보여 주었다. 본 서열 번호: 1의 아미노산 20-119를 함유하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질, "ActRIIB(20-119)-Fc"는 ActRIIB(20-134)-Fc와 비교하여 GDF11 및 액티빈에 감소된 결합을 가지며, 이는 프롤린 매듭 영역과 완벽한 막에 인접한(juxtamembrane) 도메인을 포함한다 (가령, U.S. 특허 번호. 7,842,663 참고). 그러나, ActRIIB(20-129)-Fc 단백질은 비록 프롤린 매듭 영역이 파괴되었지만, 야생형에 비교하여 유사하지만, 다소 감소된 활성을 유지한다.

[0160] 따라서, 아미노산 134, 133, 132, 131, 130 및 129 (서열 번호: 1에 대하여)에서 종료되는 ActRIIB 세포외 도메인은 모두 활성인 것으로 예상되지만, 134 또는 133에서 종료되는 구조체는 대부분 활성일 것이다. 유사하게, 잔기 129-134(서열 번호: 1에 대하여)중 임의의 위치에서 돌연변이는 큰 폭으로 리간드-결합 친화력을 변경시키지 않을 것으로 예상된다. 이를 뒷받침하는 것으로, P129 및 P130 (서열 번호: 1에 대하여)의 돌연변이는 실질적으로 리간드 결합을 감소시키지 않는 것으로 알려져있다. 따라서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 아미노산 109 (최종 시스테인)와 같이 빨리 종료될 수 있지만, 그러나, 109와 119에서 또는 그 사이 (가령, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119)에서 종료되는 형태는 감소된 리간드 결합을 갖는 것으로 예상된다. 아미노산 119 (서열 번호: 1에 대하여)은 잘 보존되지 않고, 따라서 용이하게 변경 또는 절두된다. 128 (서열 번호: 1에 대하여)에서 또는 그 이후에 종료되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 리간드-결합 활성을 유지해야만 한다. 서열 번호: 1에 대하여 119와 127에서 또는 그 사이 (가령, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 또는 127)에서 종료되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 중간 결합 능력을 가질 것이다. 이들중 임의의 것은 임상 또는 실험 환경에 따라 바람직하게 사용될 수 있다.

[0161] ActRIIB의 N-말단에서, 아미노산 29 또는 그 전에 (서열 번호: 1에 대하여) 시작하는 단백질은 리간드-결합 활성을 보유하는 것으로 예상된다. 아미노산 29는 초기 시스테인을 나타낸다. 위치 24 (서열 번호: 1에 대하여)에서 알라닌-에서-아스파라긴으로의 돌연변이는 리간드 결합에 실질적인 영향없이 N-연계된 당화 서열을 도입한다[U.S. 특허 번호. 7,842,663]. 이로써 신호 절단(cleavage) 펩티드와 아미노산 20-29에 상응하는 시스테인 교차(cross)-연계된 영역에서 돌연변이는 잘 용인된다는 것이 확인된다. 구체적으로, 위치 20, 21, 22, 23, 및 24 (서열 번호: 1에 대하여)에서 시작하는 ActRIIB 폴리펩티드들은 전반적으로 리간드-결합 활성을 유지해야만 하고, 및 ActRIIB 폴리펩티드들 beginning at 위치 25, 26, 27, 28, 및 29 (서열 번호: 1에 대하여)에서 시작하는 ActRIIB 폴리펩티드들 또한 리간드-결합 활성을 유지하는 것으로 예상된다. 22, 23, 24, 또는 25에서 시작되는 ActRIIB 구조체가 최고 활성을 가질 것이라고 가령, U.S. 특허 번호. 7,842,663에서 설명하고 있다.

[0162] 이와 함께, ActRIIB의 일반적인 활성 부분(가령, 리간드-결합 부분)은 서열 번호: 1의 아미노산 29-109를 포함한다. 따라서 ActRIIB 폴리펩티드들은 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 20-29중 임의의 하나에 대응하는 잔기 (가령, 서열 번호: 1의 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 임의의 하나의 아미노산 109-134에 대응하는 잔기 (가령, 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나에서 끝나는)에서 끝나는 ActRIIB의 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 다른 예로는 서열 번호: 1의 위치 20-29 (가령, 위치 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나) 또는 21-29 (가령, 위치 21, 22, 23, 24, 25, 26,

27, 28, 또는 29중 임의의 하나)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 위치 119-134 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나), 119-133 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 또는 133중 임의의 하나), 129-134 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134), 또는 129-133 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 또는 133중 임의의 하나)에서 끝나는 폴리펩티드들을 포함한다. 다른 예로는 서열 번호: 1의 위치 20-24 (가령, 위치 20, 21, 22, 23, 또는 24중 임의의 하나), 21-24 (가령, 위치 21, 22, 23, 또는 24중 임의의 하나), 또는 22-25 (가령, 위치 22, 23, 또는 25중 임의의 하나)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 위치 109-134 (가령, 위치 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나), 119-134 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나) 또는 129-134 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나)에서 종료되는 구조체들을 포함한다. 이 범위 안에 변이체들, 특히, 서열 번호: 1의 대응하는 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 변이체들이 특히 고려된다.

[0163] 본 명세서에 설명된 변형은 다양한 방식으로 결합될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ActRIIB 변이체는 리간드-결합 포켓 안에 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15개의 보존 아미노산을 포함하고, 리간드-결합 포켓에서 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에 0, 1, 또는 그 이상의 비-보존 변경을 포함한다. 가변성이 특히 잘 용인될 수 있는 결합 포켓 외부의 위치는 세포외 도메인의 아미노 및 카르복시 말단 (상기 언급 한 바와 같음) 및 위치 42-46 및 65-73 (서열 번호: 1과 관련)을 포함한다. 위치 65에서 아스파라긴에서-알라닌으로의 변경 (N65A)은 A64 배경에서 리간드 결합을 실질적으로 개선시키고, 따라서 R64 배경에서 리간드 결합에 유해한 효과를 가지지 않는 것으로 예상된다[U.S. 특허 번호. 7,842,663]. 이 변화는 아마도 A64 배경에서 N65의 당화를 제거하여, 이 영역에서의 중요한 변화가 용인될 수 있음을 보여준다. R64A 변화가 잘 용인되지는 않지만, R64K는 잘 용인되고, 따라서 H와 같은 또 다른 염기성 잔기는 64번 위치에서 용인될 수 있다[U.S. 특허 번호. 7,842,663]. 추가적으로, 당업계에 기술된 돌연변이 유발 프로그램의 결과는 ActRIIB에서 종종 보존에 유익한 아미노산 위치들이 있음을 나타낸다. 서열 번호: 1에 있어서, 이들은 위치 80 (산성 또는 소수성 아미노산), 위치 78 (소수성, 특히 트립토판), 위치 37 (산성, 특히 아스파르트산 또는 글루탐산), 위치 56 (염기성 아미노산), 위치 60 (소수성 아미노산, 특히 페닐알라닌 또는 티로신)을 포함한다. 따라서, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드들에서 보존될 수 있는 아미노산 틀을 제공한다. 보존되는 것이 바람직할 수 있는 기타 위치는 다음과 같다: 모두 서열 번호:1에 대하여 위치 52 (산성 아미노산), 위치 55 (염기성 아미노산), 위치 81 (산성), 98 (극성 또는 하전된, 특히 E, D, R 또는 K).

[0164] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체에 관계하며, 여기에는 이의 단편들, 기능성 변이체들 그리고 변형된 형태들이 포함된다. 바람직하게는 본 명세서 발명에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 가용성이다 (가령, ActRIIB의 세포외 도메인). 다른 바람직한 구체예들에서, 본 명세서에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드들에 결합한다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드들의 활성 (가령, Smad 신호생성 억제)을 억제(길항)한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 20-29에 대응하는 잔기 (가령, 서열 번호: 1의 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나에서 시작)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 아미노산 109-134에 대응하는 위치 (가령, 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나에서 종료되는)에서 종료되는 ActRIIB의 부분에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 특정 바람직한 구체예에서, 본 명세서의 이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 기본적으로 구성된 적어도 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 명세서의 이형다량체 복합체는 서열 번호: 1의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 기본적으로 구성된 적어도 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 이형다량체는 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 39, 41, 45, 또는 46중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 본 명세서의 이형다량체는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하며, 이때 서열 번호: 1의 L79에 대응하는 위치의 아미노산은 산성 아미노산(가령, 자연 발생적 D 또는 E 아미노산 잔기가 아니거나, 또는 인공적인 산성 아미노산이 아니다).

[0165] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 ALK4 폴리펩티드를 포함하는 단백질 복합체들에 관계한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "ALK4"는 임의의 종으로부터 그리고 이 유발 또는 다른 변형에 의해 그러한 ALK4 단백질로부터 유래된 변이체로부터 액티빈 수용체-유사 키나제-4 단백질의 패밀리를 나타낸다. ALK4에 대한 언급은 현재 확인된 형태중 하나를 참조로 한다. ALK4 패밀리의 구성요소는 시스테인-풍부 영역을 갖는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 및 예상 세린/트레오닌 키나제 활성을 갖는 세포질 도메인을 포함하는 막경유 단백질이다.

[0166] 용어 "ALK4 폴리펩티드"는 뿐만 아니라 ALK4 패밀리 구성원의 자연 발생적 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 뿐만 아니라, 유용한 활성을 보유하는 그의 임의의 변이체 (돌연변이체, 단편, 융합체 및 펩티드 유사체를 포함함)를 포함한다. 본원에 기술된 모든 ALK4-관련 폴리펩티드에 대한 아미노산의 넘버링은 달리 명시하지 않는 한, 하기에 제공된 인간 ALK4 전구체 단백질 서열 (서열 번호: 9)의 번호에 기초한다.

[0167] 인간 ALK4 전구체 단백질 서열 (NCBI Ref Seq NP_004293)는 다음과 같다:

```

1  MAESAGASSF FPLVVLLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG ACMVSIFNLD
61  GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSEDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS GHLKEPEHPS
121 MWGFVELVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE MCLSKDKTLQ
181 DLVYDLSTSG SGSGPLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD VAVKIFSSRE
241 ERSWFREAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK DNGTWTQLWL VSDYHEHGSL FDYLNRYTVT
301 IEGMIKLALS AASGLAHLHM EIVGTQGKPG IAHRDLKSKN ILVKKNGMCA IADLGLAVRH
361 DAVTDTIDIA PNQRVGTKRY MAPEVLDETI NMKFHDSFKC ADIYALGLVY WEIARRCNSG
421 GVHEEYQLPY YDLVPSDPSI EEMRKVVCDQ KLRPNIPNWW QSYEALRVMG KMMRECWYAN
481 GAARLTALRI KKTLSQLSVQ EDVKI (서열 번호: 9)

```

[0168]

[0169] 신호 펩타이드는 단일 밑줄로 표시되어 있고; 세포외 영역은 굵은 체로 표시된다.

[0170] 프로세스된 세포외 인간 ALK4 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:

[0171] SGPRGVQALLCACTSC~~L~~QANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPFYCLSS~~ED~~LRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPV E (서열 번호: 10)

[0172] 인간 ALK4 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 하기에 나타내며(서열 번호: 11), 이는 Genbank 기준 서열 NM_004302.4의 뉴클레오티드 78-1592에 상응한다. 신호 서열은 단일 밑줄로 표시되어 있고; 세포외 영역은 굵은 체로 표시된다.

[0173] ATGGCGGAGTCGGCCGAGCCTCCTCCTTCTCCCCCTTGTTGCTCCTGCTCGCCGGCAGCGGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGACCACTGAGTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTCATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACC TGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAAC AGGATGCACTTGAGGGTGCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCGGTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGCCGGGTGTTCTCCTGTTCTCATCATCATCATTGTTTCTTGTCATTAACTATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGTGAG ATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTACCCCTCTTGTGCCAGCGCACAGTGGCC CGAACCATCGTTTTACAAGAGATTATTGGCAAGGGTCGGTTTGGGGAAGTATGGCGGGCCGCTGGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCTCT

CGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCAGAGATATACCAGACGGTCATGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGATAAT
GGCACCTGGACACAGCTGTGGCTTGTCTGACTATCATGAGCACGGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAAG
CTGGCCTTGTCTGCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCACCAAGGGAAGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAAC
ATTCTGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCTGGCTGTCCGTCATGATGCAGTCACTGACACCATTGACATTGCCCGAATCAGAGG
GTGGGACCAAAACGATACATGGCCCCTGAAGTACTTGATGAAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGATATTTATGCCCTCGGGCTT
GTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCTCTGACCCTTCCATTGAGGAA
ATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATGGGAAGATGATGCGAGAGTGT
TGGTATGCCAACGGCGCAGCCCCTGACGGCCCTGCGCATCAAGAAGACCCTCTCCAGCTCAGCGTGAGGAAGACGTGAAGATC (서열 번호:
11)

[0174] 세포의 ALK4 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다:

[0175] TCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCTGCATGGTTTCCATTTTC
AATCTGGATGGGATGGAGACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGAGCTGGTCCCTGCCGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGC
AACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCAGTGGTCACTCAAGGAGCCTGAGACCCGTCCATGTGGGGCCCGGTG
GAG (서열 번호: 12)

[0176] 인간 ALK4 전구체 단백질 서열의 대체 아이소폼, 아이소폼 C (NCBI Ref Seq NP_064733.3)은 다음과 같다:

1 MAESAGASSF FPLVVL LLAG SGGSGFRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG ACMVSIFNLD

61 GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS GHLKEPEHPS

121 MWGPVELVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE MCLSKDKTLQ

181 DLVYDLSTSG SGSGLPFLVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD VAVKIFSSRE

241 ERSWFREAEI YQTVMLRHN ILGFIAADNK ADCSFLTLPW EVVMVSAAPK LRSLRLQYKG

301 GRGRARFLFP LNNGTWTQLW LVSDYHEHGS LFDYLNRYTV TIEGMIKLAL SAASGLAHLH

361 MEIVGTQGKP GIAHRDLKSK NILVKKNGMC AIADLGLAVR HDAVTDITDI APNQRVGTGR

421 YMAPEVLDET INMKHFDSFK CADIYALGLV YWEIARRCNS GGVHEEYQLP YYDLVPSDPS

481 IEEMRKVVCD QKLRPNIPNW WQSYEALRVM GKMMRECWYA NGAARLTALR IKKTLSQLSV

541 QEDVKI (서열 번호 19)

[0177]

[0178] 신호 펩타이드는 단일 밑줄로 표시되어 있고; 세포의 영역은 굵은 체로 표시된다.

[0179] 프로세스된 세포의 ALK4 폴리펩티드 서열 (아이소폼 C)는 다음과 같다:

[0180] SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPFYCLSSDLRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPV
E (서열 번호: 20)

[0181] 인간 ALK4 전구체 단백질(아이소폼 C)을 인코딩하는 핵산 서열은 하기에 나타내며(서열 번호: 21), 이는
Genbank 기준 서열 NM_020328.3의 뉴클레오타이드 78-1715에 상응한다. 신호 서열은 단일 밑줄로 표시되어 있고;
세포의 영역은 굵은 체로 표시된다.

[0182] ATGGCGGAGTCGGCCGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTGTCTCCTGCTCGCCGGCAGCGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGT
GCGTGACACAGCTGCTCCAGGCCAACTACAGTGTGAGACAGATGGGGCTGCATGGTTTCCATTTCAATCTGGATGGGATGGAGACCATGTGCGCACC
TGCATCCCCAAAGTGAGCTGGTCCCTGCCGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAAC
AGGATCGACTTGAGGGTGCCAGTGGTCACTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCGGTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTC
CTCCTGTTCTCATCATCATATTGTTTTCTTGTCATTAATACTATCATCAGCGTGTCTATCAACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGTGAG

ATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTACCCCTCTTTGTCCAGCGCACAGTGGCC
CGAACCATCGTTTTACAAGAGATTATTGGCAAGGGTCGGTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCGCTGGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCTTCT
CGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGAAGCAGAGATATACCAGACGGTCATGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGCAGAC
TGCTCATTCTCATTGCCATGGGAAGTTGTAATGGTCTCTGCTGCCCCAAGCTGAGGAGCCTTAGACTCCAATACAAGGGAGGAAGGGGAAGAGCAAGA
TTTTTATTCCCACTGAATAATGGCACCTGGACACAGCTGTGGCTTGTCTGACTATCATGAGCACGGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTG
ACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTCTGCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCACCCAAGGGAAGCCTGGAATTGCTCAT
CGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTCTGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCTGGCTGTCCGTCATGATGCAGTCACTGACACCATT
GACATTGCCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAACGATACATGGCCCCTGAAGTACTTGTATGAAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCT
GATATTTATGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCC
TCTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATG
GGGAAGATGATGCGAGAGTGTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCTGACGGCCTGCGCATCAAGAAGACCCTCTCCAGCTCAGCGTGCAAGAACAGCTG
AAGATC (서열 번호: 21)

[0183] 세포의 ALK4 폴리펩티드(아이소폼 C)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다:

[0184] TCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCTGCATGGTTTCCATTTTC
AATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGAAGCCCTTCTACTGCGTGAGCTCGGAGGACCTGCGC
AACCCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGGAGGTGCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCATGTGGGGCCCGGTG
GAG (서열 번호: 22)

[0185] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체에 관계하며, 여기
에는 이의 단편들, 기능성 변이체들 그리고 변형된 형태들이 포함된다. 바람직하게는 본 발명의 용도에 이용되
는 ALK4 폴리펩티드들 (가령, ALK4 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체들과 이의 용도들)은 가용성 (가령, ALK4
의 세포외 도메인)이다. 다른 바람직한 구체예들에서, 본 발명의 용도에 이용되는 ALK4 폴리펩티드들은 하나
또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드들에 결합하고 및/또는 활성 (가령, Smad 신호생성)을 억제(길항)한
다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 이형다량체는 서열 번호: 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47, 48, 74, 또
는 76중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,
92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티
드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 이형다량체는 서열 번호: 9, 10, 19, 20, 42, 44, 47,
48, 74, 그리고 76중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,
90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 최소한 하나의
ALK4 폴리펩티드로 구성되거나, 또는 기본적으로 구성된다.

[0186] ALK4는 척추동물간에 잘-보존되며, 세포외 도메인의 큰 스트레치(stretches)는 완벽하게 보존된다. 예를 들면,
도 5는 다양한 ALK4 오르소로그(orthologs)와 비교하여 인간 ALK4 세포외 도메인의 다중-서열 배열을 도시한다.
ALK4에 결합하는 많은 리간드들이 매우 보존되어 있다. 따라서, 이들 배열로부터, ALK4-리간드 결합의 정상적
활성에 중요한 리간드 결합 도메인 안에 주요 아미노산 위치를 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 정상 ALK4-리간드
결합 활성을 크게 변화시키지 않으면서 치환을 용인할 수 있는 아미노산 위치를 예측할 수 있다. 따라서, 본원
에 개시된 방법에 따라 유용한 활성을 가진 인간 ALK4 변이체 폴리펩티드는 다른 척추 동물 ALK4의 서열의 상응
하는 위치에 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 인간 또는 다른 척추 동물 서열에서와 유
사한 잔기를 포함 할 수 있다. 다음 실시예들은 활성 ALK4 변이체를 정의하는 접근법을 설명하지만, 이에 제한
하고자 함은 아니다. 인간 ALK4 세포외 도메인 (서열 번호: 59)에서 V6은 무스 무쿨루스(*mus musculus*) ALK4
(서열 번호: 63)에서 이소류신이며, 따라서 이 위치는 변경될 수 있고, 임의선택적으로 또다른 소수성 잔기 이
를 태면 L, I, 또는 F, 또는 갈루스 갈루스(*gallus gallus*) ALK4 (서열 번호: 62)에서 관찰된 바와 같이, 비-
극성 잔기 이를 태면 A로 변경될 수 있다. 인간 세포외 도메인의 E40은 갈루스 갈루스(*gallus gallus*) ALK4에
서 K이며, 이것은 이 부위가 극성 잔기, 이를 태면 E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y, 그리고 아마도 비-극성 잔
기 이를 태면 A가 포함된 다양한 변화에 내성이 있음을 나타낸다. S15 in the 인간 세포외 도메인의 S15는 갈
루스 갈루스(*gallus gallus*) ALK4에서 D이고, 이는 이 위치가 선회되는 극성 잔기, 이를 태면 S, T, R, E, K,
H, G, P, G 및 Y로 광범위한 구조적 변이를 용인한다는 것을 나타낸다. 인간 세포외 도메인에서 E40은 갈루스
갈루스(*gallus gallus*) ALK4에서 K이며, 이는 D, R, K, H, 뿐만 아니라 Q 및 N를 포함하는 하전된 잔기가 이
위치에서 용인됨을 나타낸다. 인간 세포외 도메인에서 R80은 콘딜루라 크리스타타(*condylura cristata*) ALK4
(서열 번호: 60)에서 K이며, 이것은 이 위치에서 R, K, 및 H를 포함하는 염기성 잔기가 용인된다는 것을 나타낸
다. 인간 세포외 도메인의 Y77은 수스 스크로파(*sus scrofa*) ALK4 (서열 번호: 64)에서 F이며, F, W, 및 Y를

포함하는 방향족 잔기가 이 위치에서 용인됨을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 P93은 상대적으로 잘 보존되지 않은 것으로써, *에리나세우스 유로파에우스(erinaceus europaeus)* ALK4 (서열 번호: 61)에서 S이며, 그리고 *갈루스 갈루스(gallus gallus)* ALK4에서 N이고, 따라서 기본적으로 임의의 아미노산이 이 위치에서 용인되어야 한다.

[0187] 더욱이, ALK4 단백질은 당해 분야에서 구조적 및 기능적 특징, 특히 리간드 결합에 관해 특징 지워져 왔다[가령, Harrison et al. (2003) J Biol Chem 278(23):21129-21135; Romano et al. (2012) J Mol Model 18(8):3617-3625; 그리고 Calvanese et al. (2009) 15(3):175-183]. 본원의 교시 외에도, 이들 참고 문헌은 하나 또는 그 이상의 정상 활성 (예: 리간드 결합 활성)을 보유하는 ALK4 변이체를 생성하는 방법에 대한 충분한 지침을 제공한다.

[0188] 3 개의 핑거-독신 폴드(three-finger toxin fold)로 알려진 구조적 모티프는 타입 I 및 타입 II 수용체에 의한 리간드 결합에 중요하며, 각각의 단량체 수용체의 세포의 도메인 안에 다양한 위치에 보존된 시스테인 잔기에 의해 형성된다. [Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; 그리고 Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. 따라서, 이러한 보존된 시스테인의 가장 바깥쪽에 의해 경계가 표시되는 인간 ALK4의 핵심 리간드-결합 도메인은 서열 번호 9 (ALK4 전구체)의 34-101 위치에 상응한다. 따라서, 이러한 시스테인으로 경계가 표시되는 코어 서열에 인접한 구조적으로 덜 규칙적인 아미노산은 반드시 리간드 결합을 바꾸지 않고도 N-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 잔기 및/또는 C-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26개 잔기가 절두될 수 있다. N-말단 및/또는 C-말단 절두에 대한 예시적인 ALK4 세포의 도메인은 서열 번호: 10 및 20을 포함한다.

[0189] 이와 함께, ALK4의 일반적인 활성 부분(가령, 리간드-결합 부분)은 서열 번호: 1의 아미노산 34-101을 포함한다. 따라서 ALK4 폴리펩티드는 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 24-34중 임의의 하나 (가령, 아미노산 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34중 임의의 하나에서 시작하고) 그리고 서열 번호: 9의 아미노산 101-126중 임의의 하나에 상응하는 위치에서 끝나는 (가령, 아미노산 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나에서 끝나는) ALK4의 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 기본적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 다른 예들은 서열 번호: 9의 24-34 (가령, 위치 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34중 임의의 하나), 25-34 (가령, 위치 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34중 임의의 하나), 또는 26-34 (가령, 위치 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34중 임의의 하나)에서 시작하고, 그리고 서열 번호: 9의 위치 101-126 (가령, 위치 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나), 102-126 (가령, 위치 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나), 101-125 (가령, 위치 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 또는 125중 임의의 하나), 101-124 (가령, 위치 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 또는 124중 임의의 하나), 101-121 (가령, 위치 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 또는 121중 임의의 하나), 111-126 (가령, 위치 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나), 111-125 (가령, 위치 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 또는 125중 임의의 하나), 111-124 (가령, 위치 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 또는 124중 임의의 하나), 121-126 (가령, 위치 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나), 121-125 (가령, 위치 121, 122, 123, 124, 또는 125중 임의의 하나), 121-124 (가령, 위치 121, 122, 123, 또는 124중 임의의 하나), 또는 124-126 (가령, 위치 124, 125, 또는 126중 임의의 하나)에서 끝나는 구조체를 포함한다. 이 범위 안에 변이체들, 특히, 서열 번호: 9의 대응하는 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 변이체들이 특히 고려된다.

[0190] 본 명세서에 설명된 변형은 다양한 방식으로 결합될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4 변이체는 리간드-결합 포켓 안에 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15개의 보존 아미노산을 포함한다. 가변성이 특히 잘 용인될 수 있는 결합 포켓 외부의 위치는 세포의 도메인의 아미노 및 카르복시 말단 (상기 언급 한 바와 같음)을 포함한다.

- [0191] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ALK4 폴리펩티드 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 구조를 변형시킴으로써 기능적 변이체를 만드는 것을 고려한다. 아미노산 치환, 결손, 추가, 또는 이의 조합들에 의해 변이체들이 만들어질 수 있다. 예를 들면, 류신을 이소류신 또는 발린으로 치환, 아스파르테이트를 글루탐산염으로 치환, 트레오닌을 세린으로 치환, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산 (가령, 보존 돌연변이)으로 단리된 치환은 생성 분자의 생물학적 활성에 주요한 영향을 주지 않을 것으로 합리적으로 예측할 수 있다. 보존 치환은 아미노산 측쇄가 관련된 아미노산 패밀리 안에서 일어나는 것이다. 본 명세서의 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화로 기능적 동소체가 생성되는 지의 여부는 생성된 변이체 폴리펩티드가 이의 야생형 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포 안에서 반응을 만드는 능력, 또는 예를 들면, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty을 포함하는 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드들에 결합하는 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.
- [0192] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 치료 효과 또는 안정성을 강화시킬 목적으로(가령, 반감기 증가 및/또는 단백질분해에 대한 저항성 증가), ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 구조를 변경시켜 기능적 변이체의 제조를 고려한다.
- [0193] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 상기 폴리펩티드의 당화를 변경하기 위해 ALK4 폴리펩티드 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 특정한 돌연변이를 고려한다. 이러한 돌연변이는 하나 또는 그 이상의 당화 부위, 이를테면 O-연계된 또는 N-연계된 당화 부위를 도입 또는 제거하도록 선택될 수 있다. 아스파라긴-연계된 당화 인지 부위는 일반적으로 적절한 세포의 당화 효소에 의해 특이적으로 인지되는 삼펩티드 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린 (여기에서 "X"는 임의의 아미노산임)이다. 이러한 변형은 하나 또는 그 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 상기 폴리펩티드(O-연계된 당화 부위의 경우)에 추가 또는 치환시켜 만들 수도 있다. 당화 인지 부위의 제1 또는 제3 아미노산 위치중 하나 또는 둘 모두에서 다양한 아미노산 치환 또는 결손 (및/또는 제 2 위치에서 아미노산 결손)으로 변형된 삼펩티드 서열에서 비-당화가 초래된다. 폴리펩티드의 탄소화물 모이어티의 수를 증가시키는 다른 수단은 상기 단백질에 화학 또는 효소적으로 글리코시드를 결합시키는 것이다. 이용되는 결합 방식에 따라, 이들 당(들)은 (a) 아르키닌 및 히스티딘; (b) 자유 카복실기; (c) 자유 술폰히드릴기, 이를테면 시스테인의 기; (d) 자유 히드록실기, 이를테면 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린; (e) 방향족 잔기, 이를테면 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 기; 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착될 수 있다. 폴리펩티드 상에 있는 하나 또는 그 이상의 탄소화물 모이어티는 화학적 및/또는 효소적으로 제거될 수 있다. 화학적 탈당화는 예를 들면, 트리플루오로메탄설폰산 또는 이에 등가의 화합물에 대한 폴리펩티드의 노출을 필요할 수 있다. 이 처리는 아미노산 서열을 손상시키지 않으면서, 연계당 (N-아세틸 글루코사민 또는 N-아세틸 갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당을 절단하게 된다. 폴리펩티드상의 탄소화물 모이어티의 효소 절단은 Thotakura *et al.* [Meth. Enzymol. (1987) 138:350].에서 설명된 바와 같이, 다양한 엔도-및 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 이루어질 수 있다. 포유류, 효모, 곤충 및 식물 세포는 모두 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 당화 패턴을 도입시킬 수 있기 때문에 폴리펩티드의 서열은 이용되는 발현계 유형에 따라 적절하게 조정될 수 있다. 일반적으로, 인간에 사용하기 위한 본 명세서의 이형화학적 복합체는 적절한 당화를 제공하는 포유류 세포계, 이를테면 HEK293 또는 CHO 세포계에서 발현될 수 있지만, 다른 포유류 발현 세포계 또한 마찬가지로 유용할 것으로 예상된다.
- [0194] 본 명세서는 돌연변이체, 특히 본 명세서의 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 복합 돌연변이체, 뿐만 아니라 절두 돌연변이체를 만드는 방법을 더 고려한다. 복합 돌연변이체의 푸울은 기능적으로 활성인 (가령, TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드 결합) ALK4 및/또는 ActRIIB 서열을 동정하는데 특히 유용하다. 이러한 복합 라이브러리들을 스크리닝하는 목적은 변경된 성질, 이를테면 변경된 약동학적 또는 변경된 리간드 결합을 갖는 폴리펩티드들 변이체를 만들기 위함일 수도 있다.. 다양한 스크리닝 분석이 하기에 제공되며, 이러한 분석을 이용하여 변이체들을 평가할 수 있다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 복합체 변이체들은 TGF-베타 슈퍼패밀리 수용체에 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드가 결합하는 능력을 방해하고, 및/또는 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드에 의해 야기되는 신호 전달을 간섭하기 위하여 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드에 결합하는 능력에 대하여 스크리닝될 수 있다.
- [0195] ALK4:ActRIIB 이형다량체 활성은 예를 들면, 세포-기반 또는 생체내 분석에서 또한 테스트될 수 있다. 예를 들면, 근육 세포에서 근육 생성과 관련된 유전자의 발현 또는 단백질의 활성에 있어서 ALK4:ActRIIB 이형다량체의

효과가 평가될 수 있다. 이 평가는 필요에 따라 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드 존재하에서 실행될 수 있고, 세포는 ALK4:ActRIIB 이형다량체, 그리고 임의선택적으로, TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드를 만들기 위하여 형질감염될 수 있다. 유사하게, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 마우스 또는 다른 동물에게 투여될 수 있으며, 하나 또는 그 이상의 측정, 이를 테면 근육 형성 및 강도는 당분야에서 인지된 방법들을 이용하여 평가될 수 있다. 유사하게, ALK4:ActRIIB 이형다량체, 또는 이의 변이체들의 활성은 골모세포, 지방세포, 및/또는 이들 세포의 생성에 임의의 효과를 위한 신경 세포에서 예를 들면, 본 명세서에서 설명된 바와 같이 분석과 당분야의 공통적인 지식에 의해 테스트될 수 있다. SMAD-반응성 리포터 유전자를 이러한 세포계에서 이용하여 하류 신호생성에 대한 효과를 모니터링할 수 있다.

[0196] 기준 ALK4:ActRIIB 이형다량체와 비교하여 선택성이 증가된 또는 전반적으로 효능이 증가된 복합-유도된 변이체가 만들어질 수 있다. 이러한 변이체들은 재조합 DNA 구조체로부터 발현될 때, 유전자 요법 프로토콜에 이용될 수 있다. 돌연변이유발은 대응하는 변형안된 ALK4:ActRIIB 이형다량체와 상당히 상이한 세포내 반감기를 갖는 변이체를 만들 수 있다. 예를 들면, 변형된 단백질은 변형되지 않은 폴리펩티드의 파괴 또는 그렇지 않으면 불활성화를 초래하는 단백질분해 또는 다른 세포 과정에 더 안정적이거나 덜 안정적이 될 수 있다. 이러한 변이체 및 이들을 코딩하는 유전자는 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 폴리 펩타이드 복합체 수준을 변경 시키는데 이용 될 수 있다. 예를 들면, 짧은 반감기는 더욱 일시적인 생물학적 효과를 일으킬 수 있고, 유도성 발현 시스템의 일부는 세포 안에 재조합 폴리펩티드 복합체 수준을 더 엄밀하게 조절할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 예를 들면, 면역원성, 반감기, 및 용해도를 포함하는 ALK4:ActRIIB 이형다량체의 하나 또는 그 이상의 활성을 변경시키기 위하여 링커(존재한다면) 및/또는 Fc 부분에 돌연변이를 만들 수 있다.

[0197] 잠재적 ALK4 및/또는 ActRIIB 서열의 최소한 일부분을 포함하는 각 폴리펩티드의 라이브러리를 인코딩하는 유전자의 축중 라이브러리에 의해 복합 라이브러리가 만들어질 수 있다. 예를 들면, 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물은 유전자 서열에 효소적으로 결합되어, 잠재적 ALK4 및/또는 ActRIIB를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 축중 세트는 개별 폴리펩티드로 발현되거나, 또는 대안으로, 더 큰 융합 단백질 (가령, 과아지 디스플레이의 경우)로 발현가능하다.

[0198] 잠재적 상동체(homologs)의 라이브러리는 축중 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 만들어질 수 있는 많은 방법들이 있다. 축중 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기에서 실행될 수 있고, 그 다음 합성 유전자는 적절한 발현 벡터 안에 결합될 수 있다. 축중 올리고뉴클레오타이드 합성은 당분야에 공지되어 있다 [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; 그리고 Ike *et al.* (1983) Nucleic Acid Res. 11:477]. 이러한 기술은 다른 단백질의 유도된 진화에 이용되어 왔다. [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; 뿐만 아니라 U.S. Patent Nos: 5,223,409, 5,198,346, 및 5,096,815].

[0199] 대안으로, 다른 형태의 돌연변이유발을 이용하여 조합 라이브러리를 만들 수 있다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 이형다량체가 만들어지고, 예를 들면, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 이용한 스크리닝[가령, 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; 그리고 Cunningham *et al.* (1989) Science 244:1081-1085], 링커 스캐닝 돌연변이유발 [가령, Gustin *et al.* (1993) Virology 193:653-660; 그리고 Brown *et al.* (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight *et al.* (1982) Science 232:316], 포화 돌연변이유발 [가령, Meyers *et al.*, (1986) Science 232:613]; PCR 돌연변이유발 [가령, Leung *et al.* (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19]; 또는 화학적 돌연변이유발을 포함하는 무작위 돌연변이유발[가령, Miller *et al.* (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 그리고 Greener *et al.* (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34]에 의해 단리될 수 있다. 링커 스캐닝 돌연변이유발은 특히 복잡한 환경에서 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 절두된 (생물 활성) 형태를 확인하는 매력적인 방법이다.

[0200] 점 돌연변이 및 절두에 의해 만들어진 복합 라이브러리의 유전자 산물을 스크리닝하기 위한, 그리고 이와 같은 경우, 특정 성질을 갖는 유전자 산물의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 광범위한 기술이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 기술은 ALK4:ActRIIB 이형다량체의 복합 돌연변이유발에 의해 생성된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝에 일반적으로 적합할 것이다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하는 가장 광범위하게 이용되

는 기술은 전형적으로 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터에 클로닝하고, 적절한 세포를 벡터의 생성 라이브러리로 형질전환시키고, 원하는 활성의 탐지는 해당 유전자의 산물이 탐지되는 해당 유전자를 인코딩하는 벡터를 상대적으로 용이하게 분리할 수 있는 조건하에 복합 유전자를 발현시키는 것을 포함한다. 바람직한 분석에는 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty) 결합 분석 및/또는 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드-매개된 세포 신호생성 분석이 포함된다.

[0201] 특정 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 것에 더하여 번역후 변형을 더욱 포함할 수 있다. 이러한 변형은 아세틸화, 카르복실화, 당화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그 결과, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 비-아미노산 원소, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 다당류 또는 단당류 및 인산염을 포함할 수 있다. 다른 이형다량체 변이체의 기능에 대하여 본 명세서에 기재된 바와 같이 이형다량체 복합체의 기능에서 이러한 비-아미노산 요소들의 효과를 테스트할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드가 초기 형태의 폴리펩티드를 절단함으로써 세포에서 생산되는 경우, 해독 후 가공은 또한 단백질의 정확한 폴딩 및/또는 기능에 중요할 수 있다. 상이한 세포들 (가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)은 이러한 해독후 활성에 대하여 특이적 세포 기전 및 특징들을 보유하고, 그리고 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드들 뿐만 아니라 이를 포함하는 이형다량체의 정확한 변형 및 프로세싱을 확보하도록 선택될 수 있다.

[0202] 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 공개된 이형다량체는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드와 공유적으로 또는 비-공유적으로 연합된 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함한다. 바람직하게는 본 명세서의 폴리펩티드들은 이형다량체성 복합체를 형성하지만, 더욱 고차의 이형다량체 복합체들, 이를 테면, 이형삼량체, 이형사량체, 및 추가 올리고머 구조를 포함하나, 이에 한정되지 않은 것들이 포함된다 (가령, 도 6). 일부 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 최소한 하나의 다량체화 도메인을 포함한다. 본 명세서에서 공개된 바와 같이, 용어 "다량체화 도메인(multimerization domain)"은 최소한 제 1 폴리펩티드와 최소한 제 2 폴리펩티드 사이에 공유 또는 비-공유 상호작용을 촉진시키는 아미노산 또는 아미노산 서열을 지칭한다. 본 명세서의 폴리펩티드들은 다량체화 도메인에 공유적 또는 비-공유적으로 결합될 수 있다. 바람직하게는 다량체화 도메인은 이형다량체 형성 (가령, 이형다량체 형성)을 촉진시키고, 임의선택적으로 동형다량체 형성 (가령, 동형다량체 형성)을 방해 또는 그렇지 않으면 이의 형성을 선호하지 않고, 이로 인하여 원하는 이형다량체가 증가되도록 하기 위하여, 제 1 폴리펩티드 (가령, ALK4 폴리펩티드)와 제 2 폴리펩티드 (가령, ActRIIB 폴리펩티드) 간의 상호작용을 촉진시킨다(가령, 도 2 참조).

[0203] 당업계에 공지된 많은 방법을 사용하여 본 발명의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 생성시킬 수 있다. 예를 들면, 제 1 폴리펩티드 (가령, ALK4 폴리펩티드)에 있는 자연 발생적 아미노산을 자유 티올-함유하는 잔기, 이를 테면 시스테인으로 대체하여, 이러한 자유 티올이 제 2 폴리펩티드 (가령, ActRIIB 폴리펩티드)에 있는 또다른 자유 티올-함유하는 잔기와 반응하고, 이황화결합이 제 1 폴리펩티드와 제 2 폴리펩티드들 사이에 형성되도록 함으로써, 비-자연 발생적 이황화결합이 구축될 수 있다. 이형다량체 형성을 촉진시키는 상호작용의 추가 예로는 Kjaergaard *et al.*, WO2007147901에서 설명된 이온 상호작용; Kannan *et al.*, U.S.8,592,562에서 설명된 정전기적 스티어링; Christensen *et al.*, U.S.20120302737에서 설명된 코일드-코일 상호작용; Pack & Plueckthun, (1992) Biochemistry 31: 1579-1584에서 설명된 류진 지퍼; Pack *et al.*, (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277에서 설명된 나선-턴-나선 모티프를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 다양한 세그먼트(segments)의 연계는 가령, 공유 결합 이를 테면 화학적 교차-연계, 펩티드 링커, 이황화물 다리 등을 통하여 얻어지거나, 또는 친화력 상호작용, 이를 테면 아비딘-비오틴 또는 류신 지퍼 기술에 의해 획득될 수 있다.

[0204] 특정 측면들에 있어서, 다량체화 도메인은 상호작용 쌍의 하나의 성분을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 폴리펩티드들은 단백질 복합체들은 제 2 폴리펩티드와 공유 또는 비-공유적으로 연합된 제 1 폴리펩티드를 포함하는 단백질 복합체를 형성할 수 있으며, 이때 제 1 폴리펩티드는 ALK4 폴리펩티드와 상기 상호작용 쌍(pair)의 제 1 구성요소의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고 제 2 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열과 상기 상호작용 쌍의 제 2 구성요소의 아미노산 서열을 포함한다. 상기 상호작용 쌍은 복합체, 구체적으로, 이형다량체 복합체 복합체를 형성하기 위하여 상호작용하는 임의의 2개 폴리펩티드 서열일 수 있지만, 작업 구체예에서는 또한 동형다량체 복합체를 형성하는 상호작용 쌍이 이용될 수도 있다. 상기 상호작용 쌍의 하나의 구성요소는 예를 들면, 서열 번호: 2, 3, 5, 6, 10, 및 20중 임의의 하나의 서열에 대하여 최소

한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 기본적으로 이로 구성된 또는 구성된 폴리펩티드 서열이 포함된, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 개선된 성질/활성 이를 태면, 증가된 혈청 반감기를 부여하거나, 또는 개선된 성질/활성을 제공하기 위하여 또다른 모이어티가 부착된 어댑터로 작용하는 상호작용 짝이 선택될 수 있다. 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 개선된 성질/활성, 이를 태면 개선된 혈청 반감기를 제공하기 위하여 상호작용 짝의 한 성분 또는 양쪽 성분에 부착될 수 있다.

[0205] 상호작용 짝의 제 1 및 제 2 구성요소는 비대칭 짝일 수도 있는데, 이것은 구성요소들이 자가-연합보다는 서로 선호적으로 연합된다는 것을 의미한다. 따라서, 비대칭 상호작용 짝의 제 1 및 제2 구성요소들은 이형이량체 복합체를 만들 수 있다. (가령, 도 6 참고). 대안으로, 상호작용 쌍은 비유도될 수 있는데, 이것은 상기 쌍의 구성원들이 실제적인 선호 없이 서로 연관되거나 또는 자가-연관될 수 있고, 그리고 따라서, 동일하거나 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 비유도된 상호작용 쌍의 첫 번째와 두 번째 구성원은 연관하여 동중이합체성 복합체 또는 이형이합체성 복합체를 형성할 수 있다. 임의선택적으로, 상호작용 짝(가령, 비대칭 짝 또는 비유도 상호작용 짝)의 제 1 구성 요소는 상호작용 짝의 제 2 구성요소와 공유적으로 연합한다. 임의선택적으로, 상호작용 짝(가령, 비대칭 짝 또는 비유도 상호작용 짝)의 제 1 구성 요소는 상호작용 짝의 제 2 구성요소와 비-공유적으로 연합한다.

[0206] 특정한 실례로서, 본 발명은 면역글로불린의 불변 도메인, 예를 들면, 면역글로불린의 CH1, CH2 또는 CH3 도메인 또는 Fc를 포함하는 폴리펩티드에 융합된 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로부터 유도된 Fc 도메인이 본 명세서에서 제공된다. CDC 또는 ADCC 활성을 감소시키는 다른 돌연변이들이 공지되어 있고, 집합적으로 이들 임의의 변이체는 본 명세서에 포함되며, 본 명세서의 이형이량체 복합체의 유익한 성분으로 이용될 수 있다. 임의선택적으로, 서열 번호: 31의 IgG1 Fc 도메인은 잔기, 이를 태면 Asp-265, Lys-322, 및 Asn-434 (대응하는 전장 IgG1에 따라 번호매김됨)에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 갖는다. 특정 경우들에서, 하나 또는 그 이상의 이들 돌연변이 (가령, Asp-265 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 대한 결합 능력이 감소된다. 다른 경우들에서, 하나 또는 그 이상의 이들 돌연변이 (가령, Asn-434 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC 부류 I-관련된 Fc-수용체 (FcRN)에 결합하는 능력이 증가된다.

[0207] 인간 IgG1 (G1Fc)의 Fc 부분에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열은 하기에 예시된다 (서열 번호: 31). 접선은 힌지 영역을 나타내며, 직선은 자연 발생적 변이체를 갖는 위치를 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 31에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다. G1Fc에서 자연 발생적 변이체는 서열 번호: 31에서 이용된 넘버링 체계에 따라 E134D 및 M136L을 포함할 수 있다(Uniprot P01857 참고).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (서열 번호: 31)

```

[0208]

[0209] 인간 IgG2의 Fc 부분 (G2Fc)에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열은 하기에 예시된다 (서열 번호: 32). 접선은 힌지 영역을 나타내며, 이중 밑줄은 이 서열에서 데이터 베이스가 충돌하는 위치를 나타낸다 (UniProt P01859). 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 32에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

```

1  VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMEALHN HTQKSLSLG PGK (서열 번호: 32)

```

[0210]

[0211]

인간 IgG3의 Fc 부분 (G3Fc)에 이용될 수 있는 2가지 예시 아미노산 서열을 하기에 나타낸다. G3Fc의 힌지 영역은 다른 Fc쇄의 길이의 최대 4배가 될 수 있고, 유사한 17개-잔기 세그먼트를 앞세우고, 3개의 동일한 15개-잔기 세그먼트를 포함한다. 하기에 나타낸 제 1 G3Fc 서열(서열 번호: 33)은 단일 15개-잔기 세그먼트로 구성된 짧은 힌지 영역을 포함하며, 반면 제 2 G3Fc 서열(서열 번호: 34)은 전장 힌지 영역을 포함한다. 각 경우에서, 점선은 힌지 영역을 나타내며, 직선은 UniProt P01859에 따른 자연 발생적 변이체를 갖는 위치를 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 33 및 34에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

```

1  EPKSCDTPPP CPRCPAPPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVS LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (서열 번호: 33)

```

```

1  ELKTPLGDDT HTPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLISRTP ETCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVSVLTV LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK (서열 번호: 34)

```

[0212]

[0213]

G3Fc (예를 들면, Uniprot P01860)에서 자연 발생적 변이체들은 서열 번호: 33에 이용된 넘버링 체계로 전환될 때 E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y를 포함하며, 본 명세서는 이들 변이 중 하나 또는 그 이상을 함유하는 G3Fc 도메인이 포함된 융합 단백질을 제공한다. 또한, 인간 면역글로불린 IgG3 유전자 (*IGHG3*)는 상이한 힌지 길이에 의해 특징화되는 구조적 다형성을 나타낸다[Uniprot P01859]. 특히, 변이체 WIS는 대부분의 V 영역과 모든 CH1 영역이 부족하다. 힌지 영역에 정상적으로 존재하는 11개에 추가하여 위치 7에 여분의 쇠간 이황화결합이 있다. 변이체 ZUC는 대부분의 V 영역, 모든 CH1 영역, 그리고 일부 힌지가 부족하다. 변이체 OMM은 대립형질 형태 또는 또다른 감마쇄 하위부류를 나타낼 수 있다. 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 이들 변이체를 함유하는 G3Fc 도메인이 포함된 추가적인 융합 단백질을 제공한다.

[0214]

인간 IgG4의 Fc 부분 (G4Fc)에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열은 하기에 예시된다 (서열 번호: 35). 점선은 힌지 영역을 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 35에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

```

1  ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLISRTP ETCVVVDVSQ
51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSVSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (서열 번호: 35)

```

[0215]

[0216]

Fc 도메인 안에 다양하게 조작된 돌연변이는 G1Fc 서열 (서열 번호: 31)에 대하여 나타내며, G2Fc, G3Fc, 및 G4Fc에서 유사 돌연변이는 도 3에서 G1Fc와의 배열로부터 유도될 수 있다. 부등한 힌지 길이로 인해, 아이소타입 정렬 (도 3)에 근거된 유사한 Fc 위치는 서열 번호: 31, 32, 33, 34 및 35에서 상이한 아미노산 번호를 소

유한다. 힌지, C_H2, 및 C_H3 영역 (가령, 서열 번호: 31, 32, 33, 34, 또는 35)으로 구성된 면역글로불린 서열에서 주어진 아미노산 위치는 Uniprot 데이터베이스와 같이, IgG1 중쇄 불변 도메인 (C_H1, 힌지, C_H2, 및 C_H3 영역으로 구성됨) 전체를 포괄할 때, 동일한 위치가 아닌 상이한 번호로 확인될 것이라는 것을 또한 인지할 수 있을 것이다 예를 들면, 인간 G1Fc 서열 (서열 번호: 31), 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 (Uniprot P01857), 및 인간 IgG1 중쇄에서 선택된 C_H3 위치 간의 대응성은 다음과 같다.

상이한 넘버링 체계에서 C _H 3 위치의 대응성		
G1Fc (넘버링은 힌지 영역의 첫번째 트레오닌에서 시작한다)	IgG1 중쇄 불변 도메인 (넘버링은 C _H 1 에서 시작한다)	IgG1 중쇄 (Kabat et al., 1991*의 EU 넘버링 체계)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
K138	K243	K360
T144	T249	T366
L146	L251	L368
N162	N267	N384
K170	K275	K392
D177	D282	D399
D179	D284	D401
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409
H213	H318	H435
K217	K322	K439
* Kabat et al. (eds) 1991; pp. 688-696 in <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5 th ed., Vol. 1, NIH, Bethesda, MD.		

[0217]

[0218]

단일 세포계로부터 비대칭 면역글로불린-기반의 단백질의 대량 생산에서 발생하는 문제는 "쇄 연합 문제"로 알려져 있다. 이중특이적 항체의 생산에서 주로 직면하는 바와 같이, 쇄 연합 문제는 상이한 중쇄 및/또는 경쇄가 단일 세포주에서 생성될 때 본질적으로 얻어지는 다수의 조합 중에서 원하는 다중 결합 단백질을 효율적으로 생산하려는 도전에 관한 것이다 [Klein et al (2012) mAbs 4:653-663 참고]. 이 문제는 두 개의 다른 중쇄와 두 개의 다른 경쇄가 동일한 세포에서 생산될 때 가장 심각한데, 이 경우 일반적으로 단 하나만을 원할 때, 총 16 개의 가능한 사슬 조합이 있다 (비록 일부는 동일하지만). 그럼에도 불구하고, 동일한 원리는 오직 2 개의 상이한 (비대칭) 중쇄를 혼입시키는 원하는 다중쇄 융합 단백질의 수율 감소를 설명한다.

[0219]

허용가능한 수율로 바람직한 비대칭 융합 단백질을 생산하기 위해 단일 세포주에서 Fc-함유 융합 폴리펩티드 쇄의 바람직한 페어링을 증가시키는 다양한 방법이 당업계에 공지되어있다[Klein et al (2012) mAbs 4:653-663; 및 Spiess et al (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106 참고]. Fc-함유 쇄들의 바람직한 페어링을 얻는 방법은 하전-기반의 페어링 (정전기적 스티어링), "노브-인투-홀(knobs-into-holes)" 입체적 페어링, SEEDbody 페어링, 및 류신 지퍼-기반의 페어링을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.[[Ridgway et al (1996) Protein Eng 9:617-621; Merchant et al (1998) Nat Biotech 16:677-681; Davis et al (2010) Protein Eng Des Sel 23:195-202; Gunasekaran et al (2010); 285:19637-19646; Wranik et al (2012) J Biol Chem 287:43331-43339; US5932448; WO 1993/011162; WO 2009/089004, 및 WO 2011/034605 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 이들 방법을 이용하여 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형다량체 복합체를 만들 수 있다. 도 6 참고.

[0220]

예를 들면, 이를 테면 Arathoon et al., U.S.7,183,076 및 Carter et al., U.S.5,731,168에서 설명된 바와 같

이, 구멍에 맞는 돌기(protuberance-into-cavity) (노브-인투-홀) 상보적 영역을 작제함으로써 특정 폴리펩티드 간의 상호작용이 촉진될 수 있다. "돌기(Protuberances)"는 제 1 폴리펩티드 (가령, 제 1 상호작용 짝)의 경계면의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄 (가령, 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 구축된다. 상기 돌기에 동일한 또는 더 작은 크기의 상보적 "구멍"은 제 2 폴리펩티드 (가령, 제 2 상호작용 짝)의 경계면에서 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄 (가령, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 임의선택적으로 만든다. 제 1 또는 제 2 폴리펩티드의 경계면에 적절하게 위치되고, 적합한 크기의 돌기 또는 구멍이 존재하는 경우, 인접한 경계면에서 각각 대응하는 구멍 또는 돌기만 제조하면 된다.

[0221] 중성 pH (7.0)에서, 아스파르트산 및 글루탐산은 음으로 하전되며, 리신, 아르기닌 및 히스티딘은 양으로 하전된다. 이들 하전된 잔기를 이용하여 이형이량체 형성을 촉진시키고, 동시에 동형이량체 형성을 방해할 수 있다. 인력 상호작용은 반대 하전 간에 일어나며, 척력 상호작용은 유사한 하전 사이에 발생된다. 부분적으로, 본 명세서에서 공개된 단백질 복합체들은 하전된 경계면 잔기의 부위 지향된 돌연변이유발을 실행함으로써, 이형다량체 형성 (가령, 이형이량체 형성)을 촉진시키는 인력 상호작용, 그리고 임의선택적으로 동형이량체 형성 (가령, 동형이량체 형성)을 방해하는 척력 상호작용을 이용한다.

[0222] 예를 들면, IgG1 CH3 도메인 경계면은 도메인-도메인 상호작용: Asp356-Lys439', Glu357-Lys370', Lys392-Asp399', 및 Asp399-Lys409' [제 2 쇠에서 잔기 넘버링은 (')로 표시됨]에 관여하는 4가지 독특한 하전 잔기 짝을 포함한다. IgG1 CH3 도메인에서 잔기를 지정하기 위해 여기에 사용된 넘버링 체계는 Kabat의 EU 번호 체계에 부합함을 유의해야 한다. CH3-CH3 도메인 상호 작용에 존재하는 2-배 대칭 때문에, 각각의 독특한 상호 작용은 구조에서 두 번 나타난다 (가령, Asp-399-Lys409' 및 Lys409-Asp399'). 야생형 서열에서, K409-D399'는 이형이량체와 동형이량체 형성을 모두 선호한다. 제 1 쇠에서 전하 극성을 전환시키는 단일 돌연변이 (예 : K409E; 양전하를 음전하로)는 제 1 쇠 동형이량체 형성에 바람직하지 않은 상호 작용을 유도한다. 부적절한 상호 작용은 동일한 전하 사이에 발생하는 척력 작용으로 인해 발생한다(음성-음성; K409E-D399'과 D399-K409E'). 제 2 쇠에서 전하 극성을 전환시키는 유사한 돌연변이 (D399K'; 음전하를 양전하로)는 제 2 쇠 동형이량체 (K409'-D399K'와 D399K-K409') 형성에 바람직하지 않은 상호 작용을 유도한다. 그러나, 동시에 이들 두 돌연변이 (K409E와 D399K')는 이형이량체 형성(K409E-D399K'와 D399-K409')에 대한 우호적인 상호작용을 유도한다.

[0223] 이형이량체 형성 및 동형이량체 방지에 있어서 정전기 스테어링 효과는 추가적인 전하 잔기의 돌연변이에 의해 추가로 강화될 수 있는데, 이들은 제 2 쇠에서 예를 들면, Arg355 및 Lys360을 포함하는 반대 하전된 잔기와 페어링되거나, 또는 되지 않을 수 있다. ALK4:ActRIIB 이형다량체 형성을 향상시키기 위해 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있는 가능한 전하 변화 돌연변이를 열거한다.

이형이량체 형성을 강화시키기 위한 짝을 형성하는 하전된 잔기 돌연변이의 예시			
제 1 쇠에서 위치	제 1 쇠에서 돌연변이	제 2 쇠에서 상호작용 위치	제 2 쇠에서 대응하는 돌연변이
Lys409	Asp or Glu	Asp399'	Lys, Arg, 또는 His
Lys392	Asp 또는 Glu	Asp399'	Lys, Arg, 또는 His
Lys439	Asp 또는 Glu	Asp356'	Lys, Arg, 또는 His
Lys370	Asp 또는 Glu	Glu357'	Lys, Arg, 또는 His
Asp399	Lys, Arg, 또는 His	Lys409'	Asp 또는 Glu
Asp399	Lys, Arg, 또는 His	Lys392'	Asp 또는 Glu
Asp356	Lys, Arg, 또는 His	Lys439'	Asp 또는 Glu
Glu357	Lys, Arg, 또는 His	Lys370'	Asp 또는 Glu

[0224]

[0225] 일부 구체예들에 있어서, 본 출원의 융합 단백질에서 CH3-CH3 경계면을 만드는 하나 또는 그 이상의 잔기는 하전된 아미노산으로 대체되고, 따라서 상호작용은 정전기적으로 비선호적으로 된다. 예를 들면, 경계면에 있는 양-하전된 아미노산 (가령, 리신, 아르기닌, 또는 히스티딘)은 음으로 하전된 아미노산 (가령, 아스파르트산 또는 글루탐산)으로 대체된다. 전술한 치환에 대한 대안으로, 또는 이와 복합되어, 경계면에서 음으로-하전된 아미노산은 양으로-하전된 아미노산으로 대체된다. 특정 구체예들에 있어서, 상기 아미노산은 원하는 하전 특정

을 갖는 비-자연 발생적 아미노산으로 대체된다. 음으로 하전된 잔기 (Asp 또는 Glu)를 His으로 돌연변이시키면, 측쇄 부피가 증가되고, 이는 입체적 문제를 야기할 수 있음을 주지해야 한다. 더욱이, His 양성자 공여자-및 수용자-형태는 국소 환경에 따라 달라진다. 이러한 문제는 설계 전략과 함께 고려되어야 한다. 경계면 잔기는 인간 및 마우스 IgG 하위부류에서 매우 보존되어 있기 때문에, 본 명세서에서 공개된 정전기 스티어링 효과는 인간 및 마우스 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4에 적용될 수 있다. 이 전략은 또한 CH3 도메인 경계면에서 하전되지 않은 잔기를 하전된 잔기로 변형시키는 것으로 확장될 수 있다.

[0226]

부분적으로, 본 명세서는 전하 페어링 (정전기적 스티어링)에 근거하여 상보적으로 작제된 Fc 서열을 이용한 비대칭 Fc-함유 폴리펩티드 쌍들의 바람직한 페어링을 제공한다. 정전 상보성을 갖는 한 쌍의 Fc 서열 중에서 하나는 임의선택적 링커가 있거나 또는 없이, 구조체의 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드에 임의적으로 융합되어 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 산출할 수 있다. 이 단일 쌍은 원하는 다중쇄 구조체(가령, ALK4:ActRIIB 이형다량체) 생성을 선호하는 제1 Fc에 상보적인 Fc 서열과 함께 선택 세포에서 공동발현될 수 있다. 정전기적 스티어링에 기반을 둔 본 실시예에서, 서열 번호: 23 [인간 G1Fc(E134K/D177K)] 및 서열 번호: 24 [인간 G1Fc(K170D/K187D)]는 상보적 Fc 서열의 예가 되며, 이때 조작된 아미노산 치환은 이중 밑줄로 나타내며, 구조체의 TGF-베타 슈퍼패밀리 타입 I 또는 타입 II 수용체 폴리펩티드는 서열 번호: 23 또는 서열 번호: 24에 융합될 수 있지만, 이들 모두에 융합되지는 않는다. 고유의 hG1Fc, 고유의 hG2Fc, 고유의 hG3Fc, 및 고유의 hG4Fc 간에 아미노산 동일성 수준이 높다면, hG2Fc, hG3Fc, 또는 hG4Fc의 대응하는 위치에서 아미노산 치환 (도 3)으로 상보적 Fc 짝이 생성되며, 이는 하기 상보적 hG1Fc 짝(서열 번호: 22 및 23)을 대신하여 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRKEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPFVLKSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK          (서열 번호: 23)

```

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYD TTPFVLDSGD SFFLYSDLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK          (서열 번호: 24)

```

[0227]

[0228]

부분적으로, 본 명세서는 입체적 상보성에 근거하여 상보적으로 작제된 Fc 서열을 이용한 비대칭 Fc-함유 폴리펩티드 쌍들의 바람직한 페어링을 제공한다. 부분적으로, 본 명세서는 입체적 상보성의 예로써 노브-인투-홀 페어링(knobs-into-holes pairing)을 제공한다. 입체(steric) 상보성을 갖는 한 쌍의 Fc 서열 중에서 하나는 임의선택적 링커가 있거나 또는 없이, 구조체의 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드에 임의적으로 융합되어 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 산출할 수 있다. 이 단일 쌍은 원하는 다중-쇄 구조체 생성을 선호하는 제1 Fc에 상보적인 Fc 서열과 함께 선택 세포에서 공동-발현될 수 있다. 노브-인투-홀 대함에 근거된 이러한 실례에서, 서열 번호: 25 [인간 G1Fc(T144Y)] 및 서열 번호: 26 [인간 G1Fc(Y185T)]는 상보성 Fc 서열의 실례인데, 여기서 가공된 아미노산 치환은 이중 밑줄 표시되고, 그리고 구조체의 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 25 또는 서열 번호:26에 융합될 수 있지만, 둘 모두에 융합되지는 않는다. 고유의 hG1Fc, 고유의 hG2Fc, 고유의 hG3Fc, 및 고유의 hG4Fc 간에 아미노산 동일성 수준이 높다면, hG2Fc, hG3Fc, 또는 hG4Fc의 대응하는 위치에서 아미노산 치환 (도 3)으로 상보적 Fc 짝이 생성되며, 이는 하기 상보적 hG1Fc 짝(서열 번호: 22 및 23)을 대신하여 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLYCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (서열 번호: 25)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (서열 번호: 26)

[0229]

[0230]

조작된 이항화결합과 복합된 노브-인투-홀 페어링에 근거한 Fc 상보성의 예는 서열 번호: 27 [hG1Fc(S132C/T144W)] 및 서열 번호: 28 [hG1Fc(Y127C/T144S/L146A/Y185V)]에서 공개된다. 상기 조작된 아미노산 치환은 이중 밀줄로 나타내며, 구조체의 TGF-베타 슈퍼패밀리 타입 I 또는 타입 II 수용체 폴리펩티드는 서열 번호: 27 또는 서열 번호: 28에 융합될 수 있지만, 이들 모두에 융합되지는 않는다. 고유의 hG1Fc, 고유의 hG2Fc, 고유의 hG3Fc, 및 고유의 hG4Fc 간에 아미노산 동일성 수준이 높다면, hG2Fc, hG3Fc, 또는 hG4Fc의 대응하는 위치에서 아미노산 치환 (도 3)으로 상보적 Fc 짝이 생성되며, 이는 하기 상보적 hG1Fc 짝(서열 번호: 22 및 23)을 대신하여 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PCREEMTKNQ VSLWCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (서열 번호: 27)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (서열 번호: 28)

[0231]

[0232]

부분적으로, 본 명세서는 인간 IgG의 β -가닥 세그먼트와 IgA C_H3 도메인이 서로 맞물리게 되도록 작제된 Fc 서열을 이용한 비대칭 Fc-함유 폴리펩티드 쌍들의 바람직한 페어링을 제공한다. 이러한 방법들은 가닥-교환 조작된(engineered) 도메인 (SEED) C_H3 이형이량체를 이용하여 SEEDbody 융합 단백질이 형성되는 것을 포함한다 [Davis et al (2010) Protein Eng Design Sel 23:195-202 참고]. SEEDbody 상보성을 갖는 한 쌍의 Fc 서열 중에서 하나는 임의선택적 링커가 있거나 또는 없이, 구조체의 ALK4 또는 ActRIIB에 임의적으로 융합되어 ALK4 또는 ActRIIB 융합 폴리펩티드를 산출할 수 있다. 이 단일 쌍은 원하는 다중-쌍 구조체 생성을 선호하는 제1 Fc에 상보적인 Fc 서열과 함께 선택 세포에서 공동-발현될 수 있다. SEEDbody (Sb) 대합에 근거된 이러한 실례에서, 서열 번호: 29 [hG1Fc(Sb_{AG})] 및 서열 번호: 30 [hG1Fc(Sb_{GA})]은 상보성 IgG Fc 서열의 실례인데, 여기서 IgA Fc로부터 가공된 아미노산 치환은 이중 밀줄 표시되고, 그리고 구조체의 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 29 또는 서열 번호: 30에 융합될 수 있지만 둘 모두에 융합되지는 않는다. 고유의 hG1Fc, 고유의 hG2Fc, 고유의 hG3Fc, 및 고유의 hG4Fc 간에 아미노산 동일성 수준이 높다면, hG1Fc, hG2Fc, hG3Fc, 또는 hG4Fc의 대응하는 위치에서 아미노산 치환 (도 3 참고)으로 Fc 단량체가 생성되며, 이는 하기 상보적 IgG-IgA 쌍(서열 번호: 29 및 30)을 대신하여 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PFRPEVHLPSREEMTKNQ VSLTCLARGF
 151 YPKDIAVEWE SNGQPENNYK TTPSRQEPSQ GTTTFAVTSK LTVDKSRWQQ
 201 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK TISLSPGK (서열 번호: 29)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSEELALNE LVTLTCLVKG
 151 FYPSDIAVEW ESNGQELPRE KYLTWAPVLD SDGSFFLYSI LRVAAEDWKK
 201 GDTFSCSVMH EALHNHYTQK SLDRSPGK (서열 번호: 30)

[0233]

[0234]

부분적으로, 본 명세서는 Fc C_H3 도메인의 C-말단에 부착된 절단가능한 류신 지퍼 도메인을 갖는 비대칭 Fc-함유 폴리펩티드 쌍의 바람직한 페어링을 제공한다. 류신 지퍼의 부착은 이형이량체성 항체 중쇄들의 선호적 어셈블리를 제공하는데 충분하다. [Wranik et al (2012) J Biol Chem 287:43331-43339]. 본 명세서에서 개시된 바와 같이, 류신 지퍼-형성 가닥에 부착된 Fc 서열 쌍중 하나는 하나의 임의선택적 링커가 있거나 또는 없이, 구조체의 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드에 임의적으로 융합되어, ALK4 또는 ActRIIB 융합 폴리펩티드를 산출할 수 있다. 이 단일 쌍은 원하는 다중-쇄 구조체 생성을 선호하는 상보적 류신 지퍼-형성 가닥에 부착된 Fc 서열과 함께 선택 세포에서 공동-발현될 수 있다. 정제 후 박테리아 엔도단백질분해효소 Lys-C로 이 구조체의 단백질분해성 절단으로 류신 지퍼 도메인이 방출되며, 고유의 Fc의 구조와 동일한 Fc 구조체가 생성된다. 류신 지퍼 페어링에 기반을 둔 본 실시예에서, 서열 번호: 36 [hG1Fc-Ap1 (산성)] 및 서열 번호: 37 [hG1Fc-Bp1 (염기성)]는 상보적 IgG Fc 서열의 예가 되며, 이때 조작된 상보적 류신 지퍼 서열은 밑줄로 표시되며, 이 구조체의 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 36 또는 서열 번호: 37에 융합될 수 있지만, 이들 모두에 융합되지는 않는다. 고유의 hG1Fc, 고유의 hG2Fc, 고유의 hG3Fc, 및 고유의 hG4Fc 간에 아미노산 동일성 수준이 높다면, hG1Fc, hG2Fc, hG3Fc, 또는 hG4Fc에 임의선택적 링커와 함께 또는 링커없이 부착된 류신 지퍼-형성 서열(도 3 참고)은 하기 상보적 류신 지퍼-형성 쌍(서열 번호: 36 및 37)에 이용될 수 있는 Fc 단량체를 만들 수 있음을 인지할 것이다.

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGSQA LEKELQALEK ENALQLEWELQ
 251 ALEKELAQGA T (서열 번호: 36)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGSQA LKKKLQALKK KNAQLKWKLQ
 251 ALKKKLAQGA T (서열 번호: 37)

[0235]

[0236]

특정 측면에서, 본 명세서는 상기 ALK4 폴리펩티드의 등전점(pI)를 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 ALK4 폴리펩티드 (가령, ALK4-Fc 융합 단백질) 및/또는 상기 ActRIIB 폴리펩티드의 등전점을 변경시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는 ActRIIB 폴리펩티드 (가령, ActRIIB-Fc 융합 단백질)에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 약 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 또는 9.0보다 더 높은 pI 값을 보유한 하나 또는 그 이상의 후보 도메인은 온전한(full) 다중도메인 단백질의 구축으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 약 9.0, 8.5, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 또는 5.0보다 더 적은 pI 값을 보유한 하나 또는 그 이상의 후보 도메인은 온전한(full) 다중도메인 단백질의 구축으로부터 선택된다. 단일 단백질이 다수의 전하 형태를 가질 것이라는 것은 당업자에게 이해될 것이다. 임의의 특정 이론에 구속되지를 바라지 않고, 단백질의 전하가 아미노산 치환, 양이온화, 탈아미노화, 카르복실-말단 아미노산 이질성, 포스포릴화 및 당

화를 포함하나, 이에 국한되지 않은 다수의 상이한 메카니즘에 의해 변형될 수 있다.

[0237]

단백질의 pI는 등전점 조절(isoelectric focusing) 및 다양한 컴퓨터 알고리즘을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다 (예를 들면 Bjellqvist et al., 1993, Electrophoresis 14:1023 참고). 한 구체예에서, pI는 다중 온도 냉동 배스 재순환 유닛 및 EPS 3501 XL 전원 공급 장치를 갖춘 Pharmacia Biotech Multiphor 2 전기 영동 시스템을 사용하여 측정한다. 프리-캐스트 앰포린 겔 (예 : Amersham Biosciences, pI 범위 2.5-10)에 단백질 시료를 엮는다. 광범위한 범위의 pI 표식 표준 (예를 들어, Amersham, pI 범위 3-10, 8 .mu.L)을 사용하여 단백질에 대한 상대적인 pI를 결정한다. 전기 영동은 예를 들어, 1500V, 50mA에서 105분 동안 수행된다. 예를 들면, 상기 겔은 정제수로 희석된 Sigma 고정액 (5 배)을 사용하여 1x 착색으로 실행되는 데, 예를 들면, Simply Blue 착색(Invitrogen)을 이용하여 하룻밤 동안 실온에서 실행된다. 탈색(Destaining)은 예를 들어 25 % 에탄올, 8 % 아세트산 및 67 % 정제수로 구성된 용액으로 수행된다. 등전점은 표준의 검량선과 관련하여, 예를 들어 Bio-Rad Densitometer를 사용하여 결정된다. 하나 이상의 매트릭스는 상이한 pH 값, 상이한 온도, 상이한 전단 응력 및 상이한 동결/해동 사이클로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 상이한 조건 하에서의 도메인의 안정성을 특성화하는 매트릭스를 더 포함할 수 있다.

[0238]

부분적으로, 본 명세서는 원하는 이형 종의 정제를 용이하게 하기 위하여, Fc 도메인에 추가 돌연변이와 함께 복합되어, 상기 기술된 방법에 의하여 비대칭 Fc-함유 폴리펩티드 쌍의 바람직한 페어링을 제공한다. 실시예는 하나의 Fc-함유 폴리펩티드 쌍에서 2개의 음전하 아미노산(아스파르트산 또는 글루탐산)과 상보적 Fc-함유 폴리펩티드 쌍에서 2개의 양전하 아미노산(가령, 아르기닌)의 추가 치환과 함께 (서열 번호: 66-67), 서열 번호: 27-28에 기재된 바와 같이, 조작된 이황화결합과 복합하여 노브-인투-홀 페어링에 기초하여 Fc 도메인의 상보성이다. 이러한 4 가지 아미노산 치환은 등전점 또는 순(net) 분자 전하의 차이에 기초하여, 이중 폴리펩티드 혼합물로부터 원하는 이종(heteromeric) 융합 단백질의 선택적 정제를 용이하게 한다. 상기 조작된 아미노산 치환은 이중 밀줄로 나타내며, 구조체의 상기 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 66 또는 서열 번호: 67에 융합될 수 있지만, 이들 모두에 융합되지는 않는다. 고유의 hG1Fc, 고유의 hG2Fc, 고유의 hG3Fc, 및 고유의 hG4Fc 간에 아미노산 동일성 수준이 높다면, hG2Fc, hG3Fc, 또는 hG4Fc의 대응하는 위치에서 아미노산 치환 (도 3 참고)으로 상보적 Fc 짝이 생성되며, 이는 하기 상보적 hG1Fc 짝(서열 번호: 66-67)을 대신하여 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

```

1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PCREEMTENQ VSLWCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQDSLS LSPGK      (서열 번호: 66)

```

```

1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
151 YPSDIAVEWE SRGQPENNYK TTPVLDSSRG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK      (서열 번호: 67)

```

[0239]

[0240]

또다른 실시예는 하나의 Fc-함유 폴리펩티드 쌍 (서열 번호: 68)의 위치 213에서 히스티딘을 아르기닌으로 치환과 함께, 서열 번호: 27-28에 기술된 바와 같이, 조작된 이황화결합과 복합된 노브-인투-홀 페어링에 기초한 Fc 도메인의 상보성과 관련된다. 이 치환 (Kabat et al.의 번호매김 시스템에서 H435R)은 단백질 A에 대한 친화력 차이에 근거하여 바람직하지 못한 동종이량체로부터 원하는 이형이량체의 분리를 용이하게 한다. 조작된 아미노산 치환은 이중 밀줄로 나타내며, 그리고 이 구조체의 ALK4, 또는 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 68 또는 서열 번호: 28에 융합될 수 있지만, 이들 모두에 융합되지는 않는다. 고유의 hG1Fc, 고유의 hG2Fc, 고유의 hG3Fc, 및 고유의 hG4Fc 간에 아미노산 동일성 수준이 높다면, hG2Fc, hG3Fc, 또는 hG4Fc의 대응하는 위치에서 아미노산 치환 (도 3 참고)으로 상보적 Fc 짝이 생성되며, 이는 서열 번호:68(하기)과 서열 번호:28의 상보적 hG1Fc 짝을 대신하여 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PCREMTKNQ VSLWCLVKGF
 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
 201 FSCSVMEAL HNR^YYTQKSL^S LSPGK (서열 번호: 68)

[0241]

[0242]

Fc 도메인 안에 다양하게 조작된 돌연변이는 G1Fc 서열 (서열 번호: 31)에 대하여 상기에 나타낸다. G2Fc, G3Fc, 및 G4Fc에서 유사 돌연변이는 도 3에서 G1Fc와의 배열로부터 유도될 수 있다. 부등한 흰지 길이로 인해, 아이소타입 정렬 (도 3)에 근거된 유사한 Fc 위치는 다음의 표에 요약된 바와 같이, 서열 번호: 31, 32, 33, 34, 그리고 35에서 상이한 아미노산 번호를 소유한다.

인간 Fc 아이소 타입의 C _H 3 위치 간의 상관 관계*			
IgG1	IgG4	IgG2	IgG3
서열 번호: 31	서열 번호: 35	서열 번호: 32	서열 번호: 33
번호매김은 THT...에서 시작한다	번호매김은 ESK...에서 시작한다	번호매김은 VEC...에서 시작한다	번호매김은 EPK...에서 시작한다
Y127	Y131	Y125	Y134
S132	S136	S130	S139
E134	E138	E132	E141
K138	K142	K136	K145
T144	T148	T142	T151
L146	L150	L144	L153
N162	N166	N160	S169
K170	K174	K168	N177
D177	D181	D175	D184
D179	D183	D177	D186
Y185	Y189	Y183	Y192
K187	R191	K185	K194
H213	H217	H211	R220
K217	K221	K215	K224
* 도 3에 나타난 다중 서열 정렬에 기초한 번호매김			

[0243]

[0244]

융합 단백질의 상이한 요소들(가령, 면역글로불린 Fc 융합 단백질)은 원하는 기능성과 일관된 방식으로 정렬될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들면, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인은 이중성 도메인의 C 말단에 배치될 수 있거나, 또는 대안으로, 이중성 도메인은 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인의 C 말단에 배치될 수 있다. ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인과 이중성 도메인은 융합 단백질 내에서 인접할 필요가 없고, 그리고 추가 도메인 또는 아미노산 서열이 어느 한쪽 도메인의 C-또는 N 말단에 또는 이들 도메인 사이에 포함될 수 있다.

[0245]

예를 들면, ALK4 및/또는 ActRIIB 수용체 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있다. B 부분은 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인에 상응한다. A와 C 부분은 독립적으로 0, 1, 또는 하나 또는 이상의 아미노산일 수 있고, A와 C 부분 모두 존재하는 경우 B에 대하여 이중성(heterologous)이다. A 및/또는 C 부분은 B 부분에 링커 서열을 경유하여 부착될 수 있다. 링커는 글리신 (가령, 2-10개, 2-5개, 2-4개, 2-3개 글리신 잔기)이 많거나, 또는 글리신과 프롤린 잔기가 많을 수 있고, 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 단

일 서열 또는 트레오닌/세린 및/또는 글리신의 반복 서열을 포함할 수 있고, 가령, GGG (서열 번호: 13), GGGG (서열 번호: 14), TGGGG (서열 번호: 15), SGGGG (서열 번호: 16), TGGG (서열 번호: 17), 또는 GGGGS (서열 번호: 58) 단일항, 또는 반복부를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRIIB 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 A는 리더(신호) 서열이며, B는 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인으로 구성되며, 그리고 C는 생체내 안정성, 생체내 반감기, 취입/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체 형성, 및/또는 정제중 하나 또는 그 이상을 강화하는 폴리펩티드 부분이다. 특정 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRIIB 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 A는 TPA 리더 서열이며, B는 ALK4 또는 ActRIIB 수용체 폴리펩티드 도메인으로 구성되며, 그리고 C는 면역글로불린 Fc 도메인이다. 바람직한 융합 단백질은 다음의 서열 번호중 임의의 하나에서 제시된 아미노산 서열을 포함한다: 서열 번호: 39, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 70, 72, 74, 76, 78, 그리고 80.

[0246] 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 원하는 성질을 부여하기 위하여 하나 또는 그 이상의 이중성 부분 (도메인)을 더 포함한다. 예를 들면, 일부 융합 도메인은 친화력 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리에 특히 유용하다. 이러한 융합 도메인의 잘 알려진 예로는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타미온 S-전달 효소 (GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 (Fc), 말토즈 결합 단백질 (MBP), 또는 인간 혈청 알부민을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 친화력 정제를 목적으로, 친화력 크로마토그래피를 위한 관련 매트릭스, 이를 테면 글루타티온-, 아밀라제-, 및 니켈-또는 코발트-접합된 수지가 이용된다. 이러한 매트릭스중 많은 것들이 '키트' 형태로 이용가능한데, 이를 테면 Pharmacia GST 정제 시스템 및 (HIS₆) 융합 짝과 함께 유용한 QIAexpressTM 시스템(Qiagen)이 있다. 또다른 예로써, 리간드 트랩 폴리펩티드들의 탐지를 용이하게 하기 위하여 융합 도메인이 선택될 수 있다. 이러한 탐지 도메인의 예로는 다양한 형광 단백질 (가령, GFP) 뿐만 아니라 "에피토프 태그"를 포함하는데, 특이적 항체가 이용가능한 짧은 펩티드 서열이 일반적이다. 특정 단클론 항체에 용이하게 이용되는 잘 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA), 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우에서 융합 도메인은 프로테아제 절단 부위, 이를 테면 인자 (factor) Xa 또는 트롬빈에 대한 절단부위를 가지고, 이에 의해 관련 프로테아제가 이 융합 단백질을 부분적으로 절단하고, 이로 인하여 이로부터 재조합 단백질이 유리된다. 유리된 단백질은 후속 크로마토그래피 분리에 의해 융합 단백질로부터 분리될 수 있다.

[0247] 특정 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 이 폴리펩티드를 안정시킬 수 있는 하나 또는 그 이상의 변형을 내포한다. 예를 들면, 이러한 변형은 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 강화시키고, 폴리펩티드의 순환 반감기를 강화시키고 및/또는 폴리펩티드의 단백질분해를 감소시킨다. 이러한 안정화 변형에는 융합 단백질 (예를 들면, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인 및 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질), 당화 부위의 변형 (예를 들면, 본 명세서의 폴리펩티드에 당화 부위 추가 포함), 및 탄수화물 모이어티의 변형 (예를 들면, 본 명세서의 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티 제거 포함)이 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "안정화제 도메인"은 융합 단백질인 경우 융합 도메인 (가령, 면역글로불린 Fc 도메인)을 지칭하고, 뿐만 아니라 비단백질성(nonproteinaceous) 변형 이를 테면 탄수화물 모이어티, 또는 비단백질성 모이어티, 이를 테면 폴리에틸렌 글리콜을 또한 포함한다.

[0248] 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 방법에 따라 이용되는 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 단리된 복합체이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단리된 단백질 (또는 단백질 복합체) 또는 폴리펩티드 (또는 폴리펩티드 복합체)은 자연 환경의 성분으로부터 단리된 것이다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 이형다량체는 예를 들면, 전기영동 (가령, SDS-PAGE, 등전초점조절 (IEF), 모세관전기이동) 또는 크로마토그래피 (가령, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정되었을 때, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 순도로 정제된다. 항체 순도의 측정 방법은 당분야에 공지되어 있다[Flatman *et al.*, (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87]. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 제제는 실질적으로 ALK4 및/또는 ActRIIB 동종다량체가 없다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 ALK4 동종다량체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 ActRIIB 동종다량체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 제제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 ALK4 동종다량체와 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 ActRIIB 동종다량체를 포함한다.

[0249] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이를 포함하는 이형다량체는 당분야에 공지된 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드는 표준 단백질 화학 기

술, 예를 들면, Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) 및 Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)에서 설명된 것들을 이용하여 합성될 수 있다. 이에 더하여, 자동화된 펩티드 합성장치는 상업적으로 가용하다 (Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). 대안으로, 상기 폴리펩티드들과 이의 변이체들은 당분야에 공지된 다양한 발현 시스템 [가령, 대장균(*E. coli*)], 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, COS 세포, 벡로바이러스]을 이용하여 재조합적으로 만들어질 수 있다. 추가 구체예에서, 변형된 또는 변형되지 않은 폴리펩티드는 예로서, 프로테아제, 예를 들면, 트립신, 테르몰리신, 키모트립신, 펩신, 또는 대합된 염기성 아미노산 전환 효소 (PACE)를 이용함으로써 재조합적으로 생산된 전장 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 소화에 의해 생산될 수 있다. 단백질분해가능한 절단 부위는 컴퓨터 분석(시판되는 소프트웨어, 가령, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)을 이용하여 식별해낼 수 있다.

[0250] **3. ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산**

[0251] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 본 명세서에서 개시된 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 (이의 단편, 기능적 변이체 및 융합 단백질 포함)를 인코딩하는 단리된 및/또는 재조합 핵산을 제공한다. 예를 들면, 서열 번호: 11은 자연 발생적 humALK4 전구체 폴리펩티드를 인코딩하며, 서열 번호: 12는 ALK4의 프로세스된 세포외 도메인을 인코딩한다. 대상 핵산은 단일-가닥이거나 또는 이중 가닥일 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 이들 핵산은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 만드는 방법에 이용될 수 있다.

[0252] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단리된 핵산(들)은 자연 환경의 성분으로부터 단리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 보통 포함하는 세포 안에 있는 핵산 분자를 포함하지만, 상기 핵산 분자는 자연 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 존재하거나 또는 염색체외부에 존재한다.

[0253] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 서열 번호: 서열 번호: 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40, 43, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 82, 또는 83중 임의의 하나, 뿐만 아니라 이의 변이체들을 포함하는 것으로 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 다른 서열, 예를 들면, 대립형질 변이체를 포함하고; 그리고, 이런 이유로, 서열 번호: 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40, 43, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 82, 또는 83중 하나에서 지정된 코딩 서열의 뉴클레오티드 서열과 상이한 코딩 서열을 포함할 것이다.

[0254] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40, 43, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 82, 또는 83에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 이것으로 기본적으로 구성된, 또는 구성된다. 당업자는 서열 번호: 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40, 43, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 82, 또는 83에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열에 상보적인 서열을 포함하는, 이것으로 기본적으로 구성된, 또는 구성된 핵산 서열 또한 본 명세서 범위 안에 있음을 인지할 것이다. 추가 구체예들에서, 본 명세서의 핵산 서열은 단리되거나, 재조합되거나, 및/또는 이중성 뉴클레오티드 서열에 융합되거나 또는 DNA 라이브러리 안에 있을 수 있다.

[0255] 다른 구체예들에 있어서, 본 명세서 핵산은 또한, 고도로 엄격한 조건 하에, 서열 번호: 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40, 43, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 82, 또는 83에서 지정된 뉴클레오티드 서열, 서열 번호: 서열 번호: 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40, 43, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 82, 또는 83의 보체 서열, 또는 이들의 단편에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 당업자는 DNA 혼성화를 촉진시키는 적절한 엄격 조건은 가변적일 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 예를 들면, 6.0 x 염화나트륨/구연산나트륨 (SSC)에서 약 45 °C에서 혼성화, 이어서 50 °C에서 2.0 x SSC의 세척으로 실행할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서 염 농도는 50 °C에서 약 2.0 x SSC의 낮은 엄격성으로부터 50 °C에서 0.2 x SSC의 높은 엄격성에서 선택될 수 있다. 또한, 세척 단계의 온도는 약 22 °C의 낮은 엄격성 조건으로부터 약 65 °C의 높은 엄격성 조건으로 증가될 수 있다. 온도 및 염이 변화될 수 있거나, 또는 다른 변수가 변화되는 동안 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 명세서는 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄격성 조건하에 혼성화되고, 이어서 실온에서 2 x SSC에서 세척된 핵산을 제공한다.

[0256] 유전자 코드에서 축중성으로 인해 서열 번호: 7, 8, 11, 12, 21, 22, 40, 43, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 82, 또는 83에서 진술된 바와 같은 핵산과 상이한 단리된 핵산 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들면, 다수의

아미노산이 하나 이상의 삼중항으로 지정된다. 동일한 아미노산을 특징하는 코돈, 또는 동의코돈 (예를 들면, CAU와 CAC는 히스티딘의 경우 동의코돈임)으로 이 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않은 "침묵(silent)" 돌연변이가 된다. 그러나, 포유류 세포 중에 본 단백질의 아미노산 서열의 변화를 유도하는 DNA 서열 다형성이 존재할 것으로 기대된다. 당업자는 특정 단백질을 코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드 (뉴클레오티드의 최대 약 3 내지 5 %)에서의 이러한 변이가 자연 대립 유전자 변이로 인해 주어진 종의 개체들 사이에 존재할 수 있음을 인식할 것이다. 임의의 그리고 모든 이런 뉴클레오티드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 안에 있다.

[0257] 일정한 구체예에서, 본 발명의 재조합 핵산은 발현 구조체 내에서 하나 또는 그 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로, 발현에 이용된 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포에 있어서 다수 유형의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 당분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 전술한 하나 또는 그 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 종료 서열, 해독 개시 및 종료 서열, 및 인핸서 또는 활성자 서열을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 당분야에 공지된 구성 또는 유도성 프로모터는 본 명세서에서 고려된다. 상기 프로모터는 자연 발생적 프로모터이거나, 또는 하나 이상의 프로모터 요소들이 복합된 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 구조체는 세포 안 예외적 상에, 이를 테면 플라스미드로 존재하거나, 또는 발현 구조체는 염색체 안에 삽입될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 발현 벡터는 선택가능한 표지 유전자를 포함하여, 형질전환된 숙주 세포의 선별이 가능하다. 선택가능한 표지 유전자는 당분야에 공지되어 있으며, 이용되는 숙주 세포에 따라 가변적일 것이다.

[0258] 일정한 양상에서, 주체 핵산은 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 폴리펩티드를 인코딩하고 최소한 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터에서 제공된다. 조절 서열은 당분야에서 인식되고, 그리고 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 발현을 주도하도록 선별된다. 따라서, 용어 조절 서열은 프로모터, 인핸서, 및 기타 발현 조절 요소들을 포함한다. 예시적인 조절 서열은 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 설명되고 있다. 가령, 자신에게 작동가능하게 연결될 때 DNA 서열의 발현을 제어하는 임의의 매우 다양한 발현 제어 서열이 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현하기 위해 이들 벡터에서 이용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은, 예를 들면, SV40의 초기 및 후기 프로모터, *tet* 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로 바이러스 즉각 초기 프로모터, RSV 프로모터, lac 시스템, *trp* 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 RNA 중합효소에 의해 발현이 지시되는 T7 프로모터, 파아지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 피복 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소의 프로모터, 산 포스파타제의 프로모터, 가령, Pho5, 효모 α -메이팅 인자들의 프로모터, 베칼로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터, 또는 진핵 세포 또는 이의 바이러스의 발현을 제어하는 것으로 알려진 기타 서열, 및 다양한 이의 조합들을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 형질전환된 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되기를 원하는 단백질의 유형과 같은 인자에 좌우될 수 있음을 알아야 한다. 더욱이, 벡터의 복사체 수, 복사체 수를 조절하는 능력, 그리고 이 벡터에 의해 인코딩되는 임의의 다른 단백질, 가령, 항생제 표지 등의 발현이 또한 고려된다.

[0259] 본 명세서의 재조합 핵산은 원핵 또는 진핵 세포 (효모, 조류, 곤충 또는 포유류), 또는 이들 모두에서 발현하는데 적합한 벡터에 클론된 유전자 또는 이의 일부분을 결찰시킴으로써 만들어질 수 있다. 재조합 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 수송체는 플라스미드 및 다른 벡터를 포함한다. 예를 들면, 적합한 벡터는 다음의 유형의 플라스미드를 포함한다: 원핵 세포, 이를 테면 대장균에서 발현을 위한 pBR322-유도된 플라스미드, pEMBL-유도된 플라스미드, pEX-유도된 플라스미드, pBTac-유도된 플라스미드 및 pUC-유도된 플라스미드.

[0260] 일부 포유류 발현 벡터는 박테리아에서 벡터의 증식을 실행하는 원핵(prokaryotic) 서열과 진핵 세포에서 발현된 진핵(eukaryotic) 전사 단위를 모두 포함한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유도된 벡터는 진핵 세포의 형질감염에 적합한 포유류 발현 벡터의 예들이다. 이들 벡터중 일부는 박테리아 플라스미드, 이를 테면 pBR322의 서열로 변형되어, 진핵 세포와 원핵 세포 모두에서 복제 및 약물 저항성 선별이 가능하다. 대안으로, 바이러스, 이를 테면 소의 유두종 바이러스 (BPV-1), 또는 Epstein-Barr 바이러스 (pHEBo, pREP-유도된 그리고 p205)의 유도체들이 진핵 세포에서 단백질의 일시적 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스 (레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 예는 하기 유전자 요법 운반 시스템의 설명에서 찾아볼 수 있다. 플라스미드의 준비 및 숙주 유기체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 원핵 세포와 진핵 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템,

뿐만 아니라 전반적인 재조합 과정은 가령, [Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)]을 참고한다. 일부 경우들에 있어서, 벡로로바이러스 발현 시스템의 사용에 의해 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 벡로로바이러스 발현 시스템의 예로는 pVL-유도된 벡터 (이를 테면 pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도된 벡터 (이를 테면 pAcUW1), 및 pBlueBac-유도된 벡터 (이를 테면 β -gal 함유 pBlueBac III)을 포함한다.

[0261] 바람직한 구체예에서, 벡터, 예를 들면, Pcmv-스크립트 벡터 (Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터 (Promega, Madison, Wisc.)는 CHO 세포에서 대상 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드를 생산하도록 설계될 것이다. 명백한 바와 같이, 주체 유전자 구조체는 예로서, 정제를 위한 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생산하기 위해, 배양액에서 증식된 세포에서 주체 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 발현을 유발하는데 이용될 수 있다.

[0262] 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드들에 대한 코딩 서열이 포함된 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 또한 관계한다. 상기 숙주 세포는 임의의 원핵 세포 또는 진핵 세포일 것이다. 예를 들면, 본 명세서의 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 박테리아 세포, 이를 테면 *대장균*, 곤충 세포 (가령, 벡로로바이러스 발현 시스템을 이용), 효모, 또는 포유류 세포 [가령, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포계]에서 발현될 수 있다. 당업자들에게는 다른 적합한 숙주 세포들이 또한 알려져 있다.

[0263] 따라서, 본 명세서는 주체 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드를 생산하는 방법과 더욱 관련된다. 가령, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 발현이 발생하도록 허용하는 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 분리되고, 이 폴리펩티드를 함유하는 세포와 배지 혼합물로부터 분리될 수 있다. 대안으로, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 수득된 그리고 용해된 세포로부터 획득된 세포질 또는 막 분획으로부터 분리될 수 있다. 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에 공지되어 있다. 해당 폴리펩티드들은 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체를 이용한 면역침화력 정제, 그리고 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 물질을 이용한 친화력 정제 (가령, 단백질 A 겔럼을 이용하여 ALK4-Fc 및/또는 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 정제할 수 있다)를 포함하는 단백질을 정제하는데 공지된 기술을 이용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 이 둘 모두로부터 분리될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다.

[0264] 일부 구체예들에 있어서, 예를 들면, 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다. ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이의 융합 단백질은 크기 압출 크로마토그래피에 의해 측정하였을 때, >90%, >95%, >96%, >98%, 또는 >99%의 순도이고, SDS PAGE에 의해 측정하였을 때 >90%, >95%, >96%, >98%, 또는 >99%의 순도를 가질 수 있다. 목표 수준의 순도는 포유류 시스템, 특히 비-인간 영장류, 설치류(마우스), 및 인간에 바람직한 결과를 얻는데 충분한 정도이어야 한다.

[0265] 다른 구체예에서, 재조합 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 원하는 부분의 N 말단에서 정제 리더 서열, 예를 들면, 폴리-(His)/엔테로키나아제 개열 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni^{2+} 금속 수지를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 허용할 수 있다. 이후, 정제 리더 서열은 정제된 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 이형다량체를 제공하기 위해, 엔테로키나아제로 처리에 의해 차후 제거될 수 있다 [Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; 및 Janknecht et al. (1991) *PNAS USA* 88:8972].

[0266] 융합 유전자를 만드는 기술은 공지되어 있다. 기본적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합은 결합을 위한 블린트-단부 또는 스테거(stagger)-단부를 이용, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 절단, 바람직하지 못한 결합 및 효소적 결합을 피하기 위하여 적절한 알칼리 포스포타제 처리와 같은 코헤시브 단부(cohesive ends)의 메우기를 이용하는 통상의 기술에 따라 실행된다. 또다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화된 DNA 합성기가 포함된 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 유전자 단편들의 PCR 증폭은 2개의 연속 유전자 단편 간에 상보적 오버행(overhangs)을 만드는 앵커 프라이머를 이용하여 실행되고, 후속적으로 어닐링시켜 키메라 유전자 서열을 만들 수 있다. 가령, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992 참고.

[0267] 4. 예시적인 치료 용도

[0268] 특정 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 (가령, ALK4:ActRIIB 이형이량체)는 ALK4:ActRIIB-결합 리간드의 비정상적 활성화와 연관된 질환 또는 상태를 치료 또는 방지하는데 이용될 수 있다. 이들 질환, 장애들 또는 상태는 일반적으로 "ALK4:ActRIIB-연합된 상태" 또는 "ALK4:ActRIIB-연합된 장애들"로 본 명세서에서 지칭된다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 본 명세서에서 기술된 바와 같이 치료요법적으로 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형이량체를 이를 필요로 하는 개인에게 투여함으로써, ALK4:ActRIIB-연합된 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 용어 "피험자", "개인", 또는 "환자"는 명세서를 통하여 호환된다. 본 명세서의 임의의 ALK4:ActRIIB 이형이량체는 본 명세서에서 공개된 개별 치료 또는 조합된 치료에 잠재적으로 이용될 수 있다. 이들 방법은 특히 예를 들면, 설치류, 영장류 및 인간이 포함된 포유류의 치료 및 예방을 목적으로 한다.

[0269] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 장애 또는 상태를 "방지하는" 치료는 통계적 시료에서 처리안된 대조 시료와 비교하여 처리된 시료에서 장애 또는 상태의 발생이 감소되거나, 또는 처리안된 대조 시료와 비교하여 장애 또는 상태의 하나 또는 그 이상의 증상의 개시를 지연시키거나 또는 그 중증도를 감소시키는 화합물을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 특정 상태가 일단 확립되면 그 상태의 개선 또는 제거를 포함한다. 어느 경우이나, 예방 또는 치료는 의사 또는 다른 건강 관리 제공자에 의해 제공된 진단 및 치료제 투여의 의도된 결과로 식별 될 수 있다.

[0270] 일반적으로, 본 명세서에서 설명된 질환 또는 상태의 치료 또는 예방은 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체의 "유효량"을 투여하여 이루어진다. 물질의 유효량이란 필요한 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 본 발명의 약제의 "치료학적 유효량"은 질환 상태, 개체의 나이, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 약제의 능력에 따라 달라질 수 있다. 물질의 "예방 차원의 유효량"이란 원하는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0271] 자연 발생적 ALK4와 ActRIIB 수용체-리간드 복합체는 조직 성장 뿐만 아니라 이를 테면 다양한 구조의 정확한 형성과 같은 초기 발달과정, 또는 성 발달, 뇌하수체 호르몬 생성 그리고 뼈 및 연골 생성을 포함하는 발달 후 하나 이상의 능력에서 필수적인 역할을 한다. 따라서, ALK4:ActRIIB-연합된 상태는 비정상적 조직 성장 및 발달 결함을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 또한, ALK4:ActRIIB-연합된 상태는 세포 성장 및 분화 장애, 이를 테면 염증, 알레르기, 자가면역 질환 및 종양을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0272] 예를 들면, ALK4:ActRIIB-연합된 상태는 신경근 장애들 (가령, 근위축병 및 근육 위축), 울혈성 폐쇄성 폐 질환 (및 COPD와 연합된 근육 소모), 근육 소비 증후군, 근육감소증, 악액질, 지방 조직 장애들 (가령, 비만), 타입 2 당뇨병 (NIDDM, 성인-개시 당뇨병), 및 뼈 퇴행성 질환 (가령, 골다공증)을 포함한다. 다른 예시적인 ALK4:ActRIIB-연합된 상태는 근육퇴행성 및 신경근 장애들, 조직 복구 (가령, 상처 치유), 신경퇴행성 질환 (가령, 근위축성 측색 경화증), 및 면역학적 장애들 (가령, 림프구의 비정상적 증식 또는 기능과 관련된 장애들)을 포함한다.

[0273] 일부 구체예에서, 상기 ALK4:ActRIIB-연합된 상태는 간질성 폐 질환 (예 : 특발성 폐 섬유증)이다. 일부 구체예에서, 간질성 폐 질환은 폐 섬유증이다. 일부 구체예에서, 간질성 폐 질환은 다음 중 하나에 의해 유발된다: 규폐증, 석면폐증, 베릴륨증, 과민성 폐렴, 약물 사용(가령, 항생제, 화학 치료제, 항-부정맥제, 스타틴), 전신성 경화증, 다발성근염, 피부근염, 전신성 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염, 감염(가령, 비정형성 폐렴, 뉴모시스시스 폐렴, 결핵, 클라미디아 트라코마티스 및/또는 호흡기 세포 융합 바이러스), 림프계 암종증, 담배 흡연, 또는 발달 장애. 일부 구체예에서, 간질성 폐 질환은 특발성이다. (가령, 유육종증, 특발성 폐 섬유증, Hamman-Rich 증후군 및/또는 항합성효소 증후군). 특정 구체예에서, 간질성 폐 질환은 특발성 폐 섬유증이다. 일부 구체예에서, 특발성 폐 섬유증에 대한 치료는 추가적인 치료제와 함께 투여된다. 일부 구체예에서, 추가 치료제는 피르페니돈, N-아세틸시스테인, 프레드니손, 아자티오프린, 닌테다니브, 이들의 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0274] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 근위축병 치료의 일부분으로 이용될 수 있다. 용어 "근위축병"은 골격근 및 때때로 심장과 호흡기 근육이 점진적으로 약화되고, 악화되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 근육 질환을 말한다. 근위축병은 근육의 미세한 변화로 시작하는 점진적 근육 소모 및 약화를 특징으로 하는 유전적 질환이다. 근육이 시간이 지남에 따라 퇴화됨으로써, 사람의 근력은 감소된다. 대상 TGF-베타 슈퍼패밀리 이형다량체 복합체들이 포함된 치료에 의해 치료될 수 있는 예시적인 근위축병은 다음을 포함한다:

듀시엔 근위축병 (DMD), 베커 근위축병 (BMD), 에메리-드레이푸스 근위축병 (EDMD), 사지연결근육(limb-girdle) 근위축병 (LGMD), 안면견갑상완 근위축병 (FSH 또는 FSHD) (또한 랑도우지-데제르트로도 알려짐), 근긴장 이영양증 (MMD; 또한 스테인에르트(Steinert)의 질환으로도 알려짐), 눈인두 근위축병 (OPMD), 말단근위축병 (DD), 선천적 근위축병 (CMD)을 포함한다.

[0275] 듀시엔 근위축병 (DMD)은 1860년대 프랑스 신경학자 Guillaume Benjamin Amand Duchenne에 의해 처음으로 기술되었다. 베커 근위축병 (BMD)은 독일 의사 Peter Emil Becker의 이름을 따서 부른 것으로, 그는 1950 년대에 DMD 변종을 최초로 기술했다. DMD는 남성에서 가장 흔히 유행하는 유전 질환 중 하나로, 3,500명중 한 명 꼴로 영향을 준다. DMD는 X 염색체의 짧은 팔에 위치한 디스트로핀 유전자가 결함이 있을 때 발생한다. 남성은 X 염색체의 사본 하나만 가지고 있기 때문에, 이들은 디스트로핀 유전자의 사본 하나만 가지고 있다. 디스트로핀 단백질이 없으면, 수축과 이완주기 동안 근육이 쉽게 손상된다. 질병의 초기에 근육이 재생 작용에 의해 보상되지만, 나중에 근육 전구 세포는 진행되는 손상을 따라 잡을 수 없으며 건강한 근육은 기능이 없는 섬유-지방 조직으로 대체된다.

[0276] BMD는 디스트로핀 유전자에서 상이한 돌연변이로 인한 것이다. BMD 환자는 약간의 디스트로핀을 가지고 있지만, 불충분하거나 질이 낮다. 일부 디스트로핀의 존재는 BMD 환자에서 근육을 DMD 환자의 근육만큼 심각하거나 빠르게 퇴행하는 것으로부터 보호한다.

[0277] 동물 연구에서 DMD 및 BMD 환자의 경우 GDF8 신호 전달 경로 억제가 질병의 다양한 측면을 효과적으로 치료할 수 있음을 나타냈다 (Bogdanovich et al., 2002, Nature 420:418-421; Pistilli et al., 2011, Am J Pathol 178:1287-1297). 따라서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 길항제는 GDF8 억제제 (길항제)로 작용하여, DMD 및 BMD 환자의 생체에서 GDF8 및/또는 관련된 TGF β 슈퍼패밀리 리간드들에 의한 신호생성을 차단시키는 대체 수단을 구성한다.

[0278] 유사하게, ALK4:ActRIIB 본 명세서의 이형다량체는 근육 성장을 필요로 하는 다른 질환 상태에서 근육량을 증가시키는 효과적인 수단을 제공할 수 있다. 예를 들면, 근위축성 측색 경화증 (ALS), 또는 루게릭 질환 또는 운동 신경 질환은 골격근 수축에 필요한 중추 신경계의 구성 요소인 운동 신경을 공격하는 만성적, 진행성 및 난치성 CNS 장애다. ALS에서 운동 뉴런은 악화되고, 결국 죽게 되고, 비록 사람의 뇌는 정상적으로 기능을 발휘하고 기민하지만, 근육 수축의 시작은 척수 수준에서 차단된다. ALS가 발병되는 사람은 전형적으로 40 세에서 70 세 사이이며 퇴화되는 첫 번째 운동 뉴런은 팔이나 다리를 자극하는 뉴런이다. ALS 환자는 걷는데 어려움을 겪을 수도 있고, 물건을 떨어 뜨릴 수도 있고, 넘어질 수도 있고, 발음이 분명하지 않거나, 웃거나 우는 것이 통제가 되지 않을 수 있다. 이 질환이 진행됨에 따라, 팔다리의 근육은 사용하지 않음으로써 위축되기 시작한다. 근육 약화로 쇠약해지고, 결국 환자는 휠체어가 필요하거나 침대에 누워있어야 한다. 대부분의 ALS 환자는 호흡 부전, 또는 질병 발생 후 3 ~ 5 년내 폐렴 같은 인공 호흡기 합병증으로 사망한다.

[0279] 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 본 명세서의 이형다량체는 피부 근염, 봉입체 근염 또는 다발성근염과 같은 염증성 근육 질환/장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 염증성 근육 질환/장애는 피부근염이다. 일부 구체예에서, 상기 염증성 근육 질환/장애는 다발성근염이다. 일부 구체예에서, 상기 염증성 근육 질환/장애는 봉입체 근염이다. 일부 구체예에서, 봉입체 근염은 유전성 봉입체 근염이다. 일부 구체예에서, 봉입체 근염은 산발적 봉입체 근염이다.

[0280] 산발적 봉입체 근염은 자가 면역 및 퇴행성 과정과 관련있다. 이 질환은 일반적으로 50 세 이상의 환자에서 주로 나타나며, 남성에서는 우세하게 나타난다. 임상적으로, 산발적 봉입체 근염은 진행성 대퇴 사두근 및 심부 굴근의 약화 및 위축이 특징이다. 많은 환자가 휠체어에 의존하고, 증상이 발병한 지 10-15 년 후에 장애는 심화된다. 또한 식도 및 인두 근육 침범으로 인해 연하 장애가 자주 나타난다. 산발성 봉입체 근염에 대한 진단은 보통 여러 요인, 이를 테면, 혈액 내 크레아틴 키나아제 수치 상승, 비정상적인 근전도검사 결과; 또는 근육의 염증 세포 침범을 나타내는 근육 생검, 액포 변성 및/또는 비정상 단백질의 플라크 봉입물의 조합에 기초한다.

[0281] ALK4:ActRIIB 이형다량체에 의해 증가된 근육량의 촉진은 또한 근육 소모 질환을 앓고 있는 사람들에게 도움이 될 수 있다. Gonzalez-Cadavid et al. (supra)는 GDF8 발현은 사람의 무-지방량과 반비례하며, GDF8 유전자 발현의 증가는 AIDS 소모성 증후군 남성의 체중 감소와 관련이 있다고 보고하였다. AIDS 환자에서 GDF8의 기능을 억제함으로써, AIDS 환자의 삶의 질을 크게 향상시키면서, AIDS 증상을 적어도 완전히 제거되지는 못하더라도 완화시킬 수 있다.

- [0282] GDF8 기능의 상실은 영양 섭취 감소 없이, 지방 손실과 관련되기 때문에(Zimmers et al., supra; McPherron and Lee, supra), 대상 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 비만 및 타입 2 당뇨병의 발달을 지연 또는 방지하기 위한 치료물질로 추가 이용될 수 있다.
- [0283] 암성 식욕부진-악액질 증후군은 암의 가장 쇠약하고 생명을 위협하는 양상 중 하나다. 이 증후군은 많은 종류의 암의 공통적인 특징인데-사망한 암 환자의 약 80 %에 존재함-, 그리고 삶의 질이 낮아지고, 화학 요법에 대한 저조한 반응의 원인으로써, 비슷한 종양이 있지만 체중 감소가 없는 환자보다 생존 기간이 짧아지게 되는 원인이 된다. 질병이 발생하기 전 6개월 이내 몸무게의 5% 이상의 비자발적인 체중 감소가 6 개월 이내에 발생할 경우 암 환자에서 악액질이 의심된다. 식욕 부진, 지방과 근육 조직의 낭비, 심리적 고통과 관련하여 악액질은 암과 숙주 사이의 복합적인 상호 작용으로 발생한다. 암 악액질은 사이토킨 생산, 지질 동원 및 단백질 분해-유도 인자의 방출 및 중개 대사의 변화에 영향을 미친다. 비록 식욕 부진은 일반적이지만, 식이 섭취량 감소만으로는 암 환자에서 볼 수 있는 신체 조성 변화를 설명할 수 없으며, 영양 섭취를 늘리는 것으로 소비 증후군을 역전시킬 수 없다. 현재, 악액질 과정을 조절하거나 역전시킬 수 있는 치료법은 없다. 성체 마우스에서 GDF8의 전신 과발현이 인간 악액질 증후군에서 볼 수 있는 것과 유사한 심한 근육 및 지방 손실을 유도하는 것으로 밝혀졌기 때문에(Zimmers et al., supra), 대상 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 근육 성장이 요구되는 악액질 증후군의 증상을 예방, 치료 또는 경감 시키는데 유리하게 사용될 수 있다. 상기에서 설명한 바와 같이, 근육 손실을 예방, 치료 또는 경감 시키는데 유용한 이형 복합체의 예는 ALK4:ActRIIB 이형이량체다.
- [0284] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 뼈 및/또는 연골 형성을 유도하는 방법, 뼈 손실을 방지하는 방법, 뼈의 무기화를 증가시키는 방법, 뼈의 탈회를 방지하는 방법 및/또는 뼈의 밀도를 증가시키는 방법에 사용될 수 있다. ALK4:ActRIIB 이형다량체는 골다공증 발병에 대한 보호 수단으로서, 준임상적 저 골밀도로 진단된 환자에게 유용 할 수 있다.
- [0285] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 인간 및 다른 동물의 뼈 골절 및 연골 결합 치료에 의학적 유용성이 있을 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물은 폐쇄 및 개방 골절 감소 및 인공 관절의 개선된 고정에서 예방 용도로 사용될 수 있다. 골 형성체에 의해 유발된 신생 골 형성은 선천성, 외상성 또는 종양 절제술로 인한 두개 안면 결합의 치료에 유용하며, 미용 성형 수술에도 유용하다. 더욱이, 본 발명의 방법 및 조성물은 치주 질환의 치료 및 다른 치아 복구 과정에서 사용될 수 있다. 특정 경우에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 뼈 형성 세포를 끌어들이고, 뼈 형성 세포의 성장을 자극하거나, 뼈 형성 세포의 전구 세포 분화를 유도하는 환경을 제공 할 수 있다. 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 골다공증 치료에 또한 유용할 수 있다. 또한, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 연골 결합의 복구 및 골관절염의 예방/역전에 이용될 수 있다. 상기한 바와 같이, 뼈 형성을 유도하고, 뼈 손실을 방지하고, 뼈의 미네랄화를 증가시키고, 뼈의 탈미네랄화를 방지하고 및/또는 뼈 밀도를 증가시키는데 유용한이형화학적 복합체들의 예는 ALK4:ActRIIB 이형이량체다.
- [0286] Rosen et al. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7th ed. American Society for Bone and 미네랄 Research, Washington D.C. (참고자료에 편입됨)은 ALK4:ActRIIB 이형 다량체로 처리될 수 있는 골 질환에 대한 광범위한 논의를 제공한다. 여기에 부분 목록이 제공된다. 뼈 소실을 특징으로 하는 또는 원인이 되는 상태, 이를 테면 골다공증 (2차 골다공증 포함), 부갑상선항진증, 만성 신장 질환 미네랄 뼈 장애, 성 호르몬 박탈 또는 제거 (가령, 안드로겐 및/또는 에스트로겐), 글루코코르티코이드 치료, 류마티스 관절염, 중화상, 부갑상선항진증, 고칼슘혈증, 저칼슘혈증, 저인산혈증, 골연화증 (종양-유도된 골연화증 포함), 고인산혈증, 비타민 D 결핍, 부갑상선항진증 (가족성 부갑상선항진증 포함) 및 가부갑상선기능 저하증, 뼈로 종양 전이, 종양 또는 화학요법 결과로 뼈 소실, 뼈 및 골수 종양(가령, 다발성 골수종), 허혈성 뼈 장애들, 치주 질환 및 구강 뼈 소실, 쿠싱 질환, 파제트 질환, 갑상선항진증, 만성 설사 상태 또는 흡수불량, 신요세관산증, 또는 신경성 식욕부진에 본 발명의 방법 및 조성물이 적용될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물들은 비-연합 골절, 치유 속도가 느린 골절을 포함하는 뼈 형성 또는 치유 실패, 태아 및 신생아 뼈 이형성증 (가령, 저칼슘혈증, 고칼슘혈증, 칼슘 수용체 결함 및 비타민 D 결핍), 골괴사 (턱뼈 괴사 포함) 및 골 불완전 형성을 특징으로 하는 상태에 또한 적용될 수 있다. 추가적으로, 동화작용 효과는 그러한 길항제가 뼈 손상 또는 부식과 관련된 뼈 통증의 감소를 야기할 할 것이다. 항-재흡수 효과의 결과로써, 이러한 길항제는 비정상적 뼈 형성, 이를 테면 골모세포성 종양 전이 (예를 들어, 1 차 전립선 또는 유방암과 관련된), 골 형성 골육종, 골감화증, 진행성 골밀도 형성장애, 골내막 골형성과다증, 골반문증(osteopoikilosis) 및 선모양 뼈과다증(melorheostosis) 등이있다는 장애 치료에 유용할 수 있다. 치료될 수 있는 다른 질환으로는 섬유성 이형성증 (dysplasia)과 연골형성장애 (chondrodysplasias)가 있다.

- [0287] 또다른 특이적 구체예에서, 본 명세서는 골절 및 연골 및/또는 골 결손 또는 치주 질환과 관련된 다른 상태를 치료하기 위한 치료 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 상처 치유 및 조직 복구를 위한 치료 방법 및 조성물을 추가로 제공한다. 상처의 종류에는 화상, 절개 및 궤양이 포함되지만, 이에 국한되지는 않는다. 가령, PCT 공개 No. WO 84/01106 참고. 이러한 조성물들은 약학으로 수용가능한 비이클, 운반체, 또는 매트릭스에 혼합된 본 명세서의 최소한 하나의 ALK4:ActRIIB 이형다량체의 치료효과량을 포함한다.
- [0288] 일부 구체예에서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 뼈 소실을 야기하는 상태, 이를 테면 골다공증, 부갑상선항진증, 쿠싱 질환, 갑상선항진증, 만성 설사 상태 또는 흡수불량, 신요세관산증, 또는 신경성 식욕부진에 적용될 수 있다. 여성이거나, 체중이 적고, 좌식 생활 방식을 선호하는 것은 골다공증(골 미네랄 밀도 감소로 골절 위험으로 이어짐)의 위험 요소라는 것은 흔히 인지되는 사실이다. 그러나, 골다공증은 또한 특정 약물의 장기간 사용으로 발생할 수 있다. 약물 또는 다른 의학적 상태로 인한 골다공증은 2 차 골다공증으로 알려져 있다. 쿠싱 질환에서는 신체가 생성하는 과량의 코티솔이 골다공증과 골절을 유발한다. 이차성 골다공증과 관련된 가장 흔한 약물은 부신피질 호르몬에 의해 자연적으로 생성되는 호르몬인 코티솔처럼 작용하는 약물의 부류인 코르티코스테로이드이다. 적절한 수준의 갑상선 호르몬이 골격 형성에 필요하지만, 과도한 갑상선 호르몬은 시간이 지남에 따라 뼈 질량을 감소시킬 수 있다. 알루미늄을 함유한 제산제는 신장 문제가 있는 사람, 특히 투석중인 사람이 과다 복용했을 때 뼈가 소실될 수 있다. 2차 골다공증을 야기할 수 있는 다른 약물로는 발작을 예방하는데 이용되는 페니토인 (Dilantin) 및 바르비투레이트; 메토틱렉세이트 (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), 일부 관절염, 암 및 면역장애용 약물; 사이클로스포린 (Sandimmune, Neoral), 일부 자가면역 질환을 치료하고, 장기 이식 환자에서 면역계를 억제하는데 이용되는 약물; 전립선 암 및 자궁내막증 치료에 이용되는 황체형성 호르몬-방출 호르몬 항진제 (Lupron, Zoladex); 해파린(Calciparine, Liquaemin), 항응고 약물; 그리고 고콜레스테롤을 치료하는데 이용되는 콜레스티라민 (Questran) 및 콜레스티폴 (Colectid)을 포함한다.. 암 치료로 인한 뼈 손실은 널리 알려져 있으며, 암 치료로 인한 골 손실 (CTIBL)이라고 한다. 뼈 전이는 뼈에 구멍을 만드는데, 이는 ALK4:ActRIIB 이형다량체로 치료하여 교정할 수 있다. 뼈 소실은 또한 잇몸 질환, 즉 잇몸에 있는 박테리아가 독소와 유해한 효소를 생성하는 만성 감염에 의해 유발될 수 있다.
- [0289] 추가 구체예에서, 본 명세서는 비정상적이거나 원치않는 뼈 성장과 관련된 질병 또는 장애를 치료하기 위한 방법 및 치료제를 제공한다. 예를 들면, 선천적 장애 진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP) 환자는 자발적으로 또는 조직 외상에 대한 반응으로 연조직의 진행성 이소성 뼈의 성장에 시달리고 삶의 질에 큰 영향을 미친다. 추가적으로, 고관절 대체 수술 후 비정상적인 뼈의 성장이 일어나서 수술 결과를 망칠 수 있다. 이것은 본 방법 및 조성물이 치료 학적으로 유용할 수 있는 병리학적 뼈 성장 및 상황의 좀더 일반적인 예이다. 동일한 방법 및 조성물들은 다른 형태의 비정상적 뼈 성장 (가령, 외상, 화상 또는 척수 손상 후 뼈의 병리학적 성장)을 치료하고, 그리고 전이성 전립선 암 또는 골육종과의 연관하여 볼 수 있는 비정상적인 뼈 성장과 관련된 바람직하지 않은 상태를 치료 또는 예방하는데 유용 할 수 있다.
- [0290] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 암 환자의 뼈 형성을 촉진시키는데 이용될 수 있다. 특정 종양 (가령, 전립선, 유방, 다발성 골수종 또는 부갑상선항진증을 야기하는 임의의 종양)을 가진 환자는 종양-유도된 뼈 소실, 뼈 전이, 및 치료 물질들로 인하여 뼈 소실 위험이 높다. 이러한 환자는 뼈 소실 또는 뼈 전이의 증황이 없더라도 TGF-베타 슈퍼패밀리 이형다량체 복합체, 또는 복합체의 조합으로 치료될 수 있다. 환자는 뼈 소실 또는 뼈 전이 증황에 대해 모니터링받을 수 있고, 및 위험 증가를 암시하는 경우 ALK4:ActRIIB 이형다량체로 치료받을 수 있다. 일반적으로, 골밀도의 변화를 평가하기 위해 DEXA 스캔을 사용하고, 뼈 전이의 가능성을 평가하기 위해 뼈 리모델링의 지표를 사용할 수 있다. 혈청 표지가 모니터링될 수 있다. 뼈 특이적 알칼리 포스파타제 (BSAP)는 골모세포에 존재하는 효소다. BSAP의 혈중 농도는 뼈 전이 및 뼈 재형성을 증가시키는 다른 상태의 환자에서 증가한다. 오스테오칼신 및 프로콜라겐 펩티드 또한 뼈 형성 및 뼈 전이와 관련있다. 전립선 암에 의한 뼈 전이가 있는 환자에서 BASP의 증가가 탐지되었고, 그리고 정도는 덜 하지만, 유방암으로 인한 뼈 전이에서도 탐지되었다. 뼈로 전이된 전립선 암의 경우 BMP7 수치가 높았지만, 방광암, 피부암, 간암 또는 폐암으로 인하여 뼈 전이에서는 높지 않았다. 타입 I 카르복시-말단 텔로펩티드 (ICTP)는 뼈의 재흡수 동안 형성된 콜라겐에서 발견된 가교결합이다. 뼈가 끊임없이 부서지고, 재형성되기 때문에 ICTP는 신체 전체에서 발견 될 것이다. 그러나, 뼈 전이 부위에서 상기 수준은 정상 뼈의 영역에서보다 훨씬 높을 것이다. ICTP는 전립선 암, 폐암 및 유방암으로 인한 골 전이에서 높다. 또다른 콜라겐 가교결합, 타입 I N-말단 텔로펩티드 (NTx)은 뼈 전환 동안 ICTP와 함께 생성된다. NTx의 양은 폐암, 전립선암, 및 유방암이 포함된 임의의 상이한 유형의 암에 의해 야기되는 뼈 전이에서 증가된다. 또한, NTx의 수준은 골전이의 진행에 따라 증가한다. 따라서, 이 표지는 전이 뿐만 아니라, 질병의 정도를 측정하는 데 사용될 수 있다. 재

흡수의 다른 표지는 피리디놀린과 데옥시피리디놀린을 포함한다. 재흡수 표지 또는 뼈 전이의 재흡수 표지의 임의의 증가는 환자에서 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 이용한 치료의 필요를 나타낸다.

[0291] 또다른 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 만성 신장 질환 미네랄 골 장애 (CKD-MBD), 서로 연계된 골격의 광범위한 증후군, 심혈관, 및 신장 질환으로 발생된 미네랄 대사 장애를 가진 환자에 이용될 수 있다. CKD-MBD는 신장 골형성장애 (ROD)로 흔히 지칭되는 다양한 골격 병리를 포함하는데, ALK4:ActRIIB 이형다량체로 치료하는데 바람직한 구체예이다. 상이한 병원성 인자의 상대적 기여에 따라, ROD는 다양한 병원적 골 재구성 패턴으로 현시된다 (Hruska et al., 2008, Chronic kidney disease mineral bone disorder (CKD-MBD); in Rosen et al. (ed) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7th ed. American Society for Bone and Mineral Research, Washington D.C., pp 343-349). 상기 스펙트럼의 한 단부에서 요독 증성 골형성장애와 낮은 골 전환율을 가진 ROD이며, 활성 재구성 부위 수가 적고, 특히 뼈 형성이 억제되고, 뼈 재흡수가 낮은 것을 특징으로 한다. 다른 극단에서는 부갑상샘항진증, 높은 골 전환율, 그리고 섬유뼈염을 가진 ROD이다. ALK4:ActRIIB 이형다량체는 동화 효과 및 항재흡수 효과를 발휘한다면, 이들 물질은 ROD 병리 스펙트럼에 걸쳐 환자에 유용할 수 있다.

[0292] 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다른 뼈-활성 약학 물질과 공동으로 투여될 수 있다. 공동 투여 (Conjoint administration)는 단일 공동-제형의 투여, 동시 투여 또는 별도의 시간에 투여에 의해 이루어질 수 있다. ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다른 뼈-활성 물질들과 함께 투여될 때 특히 유익할 수 있다. 환자는 ALK4:ActRIIB 이형다량체와 칼슘 보충제, 비타민 D, 적절한 운동 및/또는 경우에 따라 다른 약물을 복용하는 경우 장점을 얻을 수 있다. 다른 약물의 예로 비스포스포네이트 (알렌드로네이트, 이반드로네이트 및 리세드로네이트), 칼시토닌, 에스트로겐, 부갑상선 호르몬 및 랄록시펜이 있다. 비스포스포네이트 (알렌드로네이트, 이반드로네이트 및 리세드로네이트), 칼시토닌, 에스트로겐 및 랄록시펜은 뼈 재구성(remodeling) 주기에 영향을 미치며, 항 흡수제로 분류된다. 뼈 재구성은 뼈 재흡수와 뼈 형성의 두 단계로 구분된다. 항-흡수 약물 치료는 골-재구성 주기의 뼈 흡수 부분을 느리게하거나 중단시키지만, 주기의 뼈-형성 부분을 늦추지는 않는다. 그 결과, 새로운 형성은 골 흡수보다 더 빠른 속도로 계속되고, 골밀도는 시간이 지남에 따라 증가할 수 있다. 부갑상선 호르몬의 한 형태인 테리파라티드(Teriparatide)는 뼈 재구성 주기에서 뼈 형성의 속도를 증가시킨다. 알렌드로네이트는 폐경기 골다공증 예방 (1 일 5mg 또는 주당 1회 35mg)과 치료 (1 일 10mg 또는 1 주일에 1 번 70mg)에 대한 승인을 받았다. 알렌드로네이트는 골 손실을 줄이고, 골 밀도를 높이며, 척추, 손목 및 고관절 골절의 위험을 줄여준다. 알렌드로네이트는 또한 이러한 약물 (즉, 프레드니손 및 코르티손)의 장기간 사용 및 남성 골다공증 치료의 결과로서 남성 및 여성에서 글루코코르티코이드에 의해 유도된 골다공증 치료를 위해 승인되었다. 알렌드로네이트와 비타민 D는 폐경기 여성 (1 주일에 한번 70mg과 비타민 D)의 골다공증 치료제 및 골다공증 남성의 골량 개선 치료제로 승인 받았다. 이반드로네이트는 폐경기 골다공증 예방 및 치료제로 승인되었다. 한 달에 한 번 알약을 복용할 경우(150mg), 이반드로네이트는 매일 같은 날에 복용해야 한다. 이반드로네이트는 골 손실을 줄이고, 골 밀도를 높이며, 척추 골절의 위험을 줄여준다. 리세드로네이트는 폐경기 골다공증 예방 및 치료제로 승인 받았다. 리세드로네이트는 매일 (5mg 용량) 또는 매주 (35mg 용량, 또는 칼슘과 함께 35mg 용량) 복용하면, 뼈 손실을 느리게 하고 골밀도를 증가시키며, 척추 및 비-척추 골절의 위험을 감소시킨다. 리세드로네이트는 또한 남성과 여성이 이들 약물 (가령, 프레드니손 또는 코르티손)의 장기간 사용으로 인한 글루코코르티코이드에 의한 골다공증을 예방 및/또는 치료하는 용도로 사용이 승인되었다. 칼시토닌은 칼슘 조절 및 골 대사에 관여하는 자연 발생 호르몬이다. 폐경된지 5 년 이상이 경과한 여성에서 칼시토닌은 뼈 손실을 줄이고, 척추 골밀도를 높이며, 골절과 관련된 통증을 완화시킬 수 있다. 칼시토닌은 척추 골절의 위험을 줄인다. 칼시토닌은 주사 (50-100IU 매일) 또는 비강 스프레이 (매일 200IU)로 제공된다.

[0293] 환자가 ALK4:ActRIIB 이형다량체 그리고 추가 뼈-활성 약물을 함께 제공받으면 유익할 수 있다. 에스트로겐 요법 (ET)/호르몬 요법 (HT)은 골다공증 예방에 승인되었다. ET는 폐경기 여성에서 뼈 손실을 줄이고, 척추와 고관절의 골밀도를 높이며, 엉덩이 및 척추 골절의 위험을 줄이는 것으로 나타났다. ET는 매일 약 0.3mg의 저용량 또는 약 0.625mg의 표준 용량을 제공하며, 70 세 이후에 시작한 경우에도 효과가 있는 알약 또는 피부 패치 형태로 가장 일반적으로 투여된다. 에스트로겐 단독으로 복용하면, 여성의 자궁 내막 암(자궁 내막 암) 발병 위험이 높아질 수 있다. 이러한 위험을 제거하기 위해, 건강 관리 제공자는 온전한 자궁을 갖고 있는 여성의 경우 에스트로겐 (호르몬 대체 요법 또는 HT)과 함께 프로세스테론 호르몬을 처방한다. ET/HT는 폐경 증상을 완화시키고, 뼈 건강에 유익한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 부작용으로는 질 출혈, 유방 압통, 기분 장애 및 담낭 질환이 있을 수 있다. 하루 60mg의 랄록시펜 (Raloxifene)은 폐경기 골다공증의 예방 및 치료를 위해 승인되었다. 그것은 잠재적인 단점이 없이, 에스트로겐의 유익한 효과를 제공하기 위해 개발된 선택적 에스트로겐 수용체 조절물질(Selective Estrogen Receptor Modulators) (SERMs)라고 불리는 약물의 한 종류이다. 랄

록시펜은 골량을 증가시키고, 척추 골절의 위험을 감소시킨다. 알록시펜이 고관절 및 비-척추 골절의 위험을 줄일 수 있음을 입증하는 데이터는 아직 없다. 부갑상선 호르몬의 한 형태인 테리파라티드는 폐경기 여성과 골절 위험이 높은 남성의 골다공증 치료제로 승인되었다. 이 약물은 새로운 뼈 형성을 자극하고, 뼈의 미네랄 밀도를 상당히 증가시킨다. 폐경기 여성에서 척추, 고관절, 발, 갈비뼈 및 손목에 골절 감소 기록이 있다. 남성의 경우 척추에서 골절 감소기록이 있지만, 다른 부위의 골절 감소를 평가할 수 있는 데이터가 충분하지 않다. 테리파라티드는 최대 24 개월 동안 매일 주사로 자가-투여된다.

[0294] 다른 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 동물의 체지방 함량을 조절하고, 이와 관련된 상태, 특히 이와 관련된 건강을 해치는 상태를 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 체중을 조절(관리)하는 것은 체중을 줄이거나 늘리거나, 체중 증가속도를 줄이거나 늘리거나, 체중 감소 속도를 줄이거나 늘리는 것을 의미 할 수 있으며, 체중을 적극적으로 유지하거나, 또는 (예 : 그렇지 않으면 체중을 증가시키거나 감소시킬 수 있는 외부 또는 내부 영향에 대해).크게 변화시키지 않을 수도 있다. 본 발명의 한 구체예는 변이체 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 필요로 하는 동물(가령, 인간)에게 투여함으로써 체중을 조절하는 것에 관계한다.

[0295] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 동물의 체중 감소 및/또는 체중 증가를 감소시키기 위해, 보다 구체적으로는 비만의 위험이 있거나 비만으로 고통받는 환자의 비만을 치료 또는 개선하기 위해 사용될 수 있다. 또다른 특이적 구체예에서, 본 발명은 체중의 증가 또는 유지할 수 없는 동물(예를 들어, 소모성 증후군을 가진 동물)을 치료하는 방법 및 화합물 에 관한 것이다. 그러한 방법은 체중 및/또는 체질량을 증가시키거나, 체중 및/또는 체질량 손실을 감소시키거나, 바람직하지 않게 낮거나 (예를 들어, 건강에 해로운) 체중 및/또는 체질량과 관련된 상태를 개선 시키는데 효과적이다. 또한, 높은 콜레스테롤 장애 (가령, 고콜레스테롤혈증 또는 이상지질혈증)은 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체로 치료될 수 있다.

[0296] 다른 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 동물의 체지방 함량을 조절하고, 이와 관련된 상태, 특히 이와 관련된 건강을 해치는 상태를 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 체중을 조절(관리)하는 것은 체중을 줄이거나 늘리거나, 체중 증가속도를 줄이거나 늘리거나, 체중 감소 속도를 줄이거나 늘리는 것을 의미 할 수 있으며, 체중을 적극적으로 유지하거나, 또는 (예 : 그렇지 않으면 체중을 증가시키거나 감소시킬 수 있는 외부 또는 내부 영향에 대해).크게 변화시키지 않을 수도 있다. 본 발명의 한 구체예는 변이체 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 필요로 하는 동물(가령, 인간)에게 투여함으로써 체중을 조절하는 것에 관계한다. 예를 들면, 일부 구체예에서, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 비만 (가령, 복부 비만); 과체중; 인슐린 저항성; 대사성 증후군 및 다른 대사성 질환 또는 상태; 지질 장애 이를 테면, 낮은 HDL 수준, 높은 LDL 수준, 고지질혈증, 고중성지혈증 또는 이상지질혈증; 지단백질 일탈; 감소된 트리글리세리드; 염증 (가령, 간 염증 및/또는 지방 조직의 염증), 지방 간 질환; 비-알코올성 지방 간 질환; 고혈당; 손상된 포도당 내성 (IGT); 고인슐린혈증; 높은 콜레스테롤 (가령, 높은 LDL 수준 및 고콜레스테롤혈증); 심혈관 질환 이를 테면, 관상 심장 질환, 울혈성 심부전 포함된 심장 질환, 뇌졸중, 말초 맥관 질환, 죽상경화증; 동맥경화증, 및 고혈압; 증후군 X; 맥관 재협착; 신경병증; 망막증; 신경퇴행성 질환; 내피 기능이상, 호흡기 기능이상; 췌장염; 다낭포성 난소 증후군; 상승된 요산 수준; 혈색소증 (철 과부하); 흑색극세포증 (피부에 검은 반점); 또는 암 (가령, 난소암, 유방암, 내막암, 결장암); 또는 하나 또는 그 이상의 상기 질환 또는 상태와 연관된 또다른 장애 및/상태로부터 선택된 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체를 이용하여 치료되는 질환 또는 상태는 과체중 (가령, BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$), 또는 너무 많은 체지방과 연관된다.

[0297] 한 구체예에서, 본 명세서는 ALK4:ActRIIB 이형다량체의 효과량을 체중 감소를 원하는, 또는 이를 필요로 하는 피험자에게 투여하는 것을 포함하는, 체중을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 과체중 (가령, 비만-전단계)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 신체비만지수 (BMI)는 25 kg/m^2 또는 그 이상이다. 추가 구체예에서, 상기 피험자의 BMI는 25 kg/m^2 내지 29.9 kg/m^2 , 30 kg/m^2 내지 39.9 kg/m^2 , 25 kg/m^2 내지 39.9 kg/m^2 , 또는 25 kg/m^2 내지 50 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 비만이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 30 kg/m^2 또는 그 이상 (가령, 30 내지 39.9 kg/m^2 또는 30 kg/m^2 내지 50 kg/m^2)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 병적 비만이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 40 kg/m^2 또는 그 이상이다. 추가 구체예에서, 상기 피험자의 BMI는 40 kg/m^2 내지 45 kg/m^2 , 또는 40 kg/m^2 내지 50 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 내장비만 (가령, 배둘레 지방 및/또는 복강 지방이 포함된 복부 영역의 과도한 지방)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기

피험자의 허리-엉덩이 둘레율 (WHR)은 0.85 또는 그 이상이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 말단 비만 (가령, 엉덩이에 과도한 지방)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 유형 2 진성당뇨병을 갖는다. ALK4:ActRIIB 이형다량체는 단독으로, 또는 보조 요법의 다른 유형의 복합 요법으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, 상기 보조 요법은 식이요법 및/또는 운동요법이다.

[0298] 한 구체예에서, 본 명세서는 ALK4:ActRIIB 이형다량체의 효과량을 체중 증가를 줄이기를 원하는, 또는 이를 필요로 하는 피험자에게 투여하는 것을 포함하는, 체중을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 과체중 (가령, 비만-전단계)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 25 kg/m^2 또는 그 이상이다. 추가 구체예에서, 상기 피험자의 BMI는 25 kg/m^2 내지 29.9 kg/m^2 , 30 kg/m^2 내지 39.9 kg/m^2 , 25 kg/m^2 내지 39.9 kg/m^2 , 또는 25 kg/m^2 내지 50 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 비만이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 30 kg/m^2 또는 그 이상 (가령, 30 내지 39.9 kg/m^2 또는 30 kg/m^2 내지 50 kg/m^2)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 병적 비만이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 40 kg/m^2 또는 그 이상이다. 추가 구체예에서, 상기 피험자의 BMI는 40 kg/m^2 내지 45 kg/m^2 , 또는 40 kg/m^2 내지 50 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 유형 2 진성당뇨병을 갖는다.

[0299] ALK4:ActRIIB 이형다량체의 효과량을 과도한 체중과 연관된 질환 또는 상태를 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험자에게 투여하는 것을 포함하는, 과도한과 연관된 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 또한 제공한다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 비만이다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 인슐린 저항성이다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 이상지질혈증, 고지질혈증 (총 콜레스테롤 수준 $>240 \text{ mg/dL}$), 고콜레스테롤혈증 (가령, 총 콜레스테롤 수준 $>200 \text{ mg/dL}$, $>220 \text{ mg/dL}$, $>240 \text{ mg/dL}$, $>250 \text{ mg/dL}$, 또는 $>275 \text{ mg/dL}$), 낮은 HDL 혈청 수준 (가령, $<40 \text{ mg/dL}$, $<45 \text{ mg/dL}$, 또는 $<50 \text{ mg/dL}$), 높은 LDL 혈청 수준 (가령, $\geq 100 \text{ mg/dL}$, $\geq 130 \text{ mg/dL}$, $\geq 160 \text{ mg/dL}$, 또는 $\geq 190 \text{ mg/dL}$), 및 고중성지혈증 (가령, 공복기 TG 수준 $\geq 150 \text{ mg/dL}$, $\geq 175 \text{ mg/dL}$, $\geq 200 \text{ mg/dL}$, $\geq 300 \text{ mg/dL}$, $\geq 400 \text{ mg/dL}$, 또는 $\geq 499 \text{ mg/dL}$)으로 구성된 집단에서 선택된다. 특정 경우들에 있어서, ALK4:ActRIIB 길항제 치료는 식이요법 및/또는 운동에 부속된다.

[0300] 또다른 구체예에서 본 명세서는 과체중인 피험자의 체중을 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 과체중 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 신체비만지수 (BMI)는 25 kg/m^2 또는 그 이상이다. 추가 구체예에서, 상기 피험자의 BMI는 25 kg/m^2 내지 29.9 kg/m^2 , 30 kg/m^2 내지 39.9 kg/m^2 , 25 kg/m^2 내지 39.9 kg/m^2 , 또는 25 kg/m^2 내지 50 kg/m^2 , 또는 27 내지 40 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 비만이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 30 kg/m^2 또는 그 이상 (가령, 30 내지 39.9 kg/m^2 또는 30 kg/m^2 내지 50 kg/m^2)이다. ALK4:ActRIIB 이형다량체는 단독으로, 또는 복합 요법으로 투여된다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 식이요법 및/또는 운동에 부속된다.

[0301] 한 구체예에서 본 명세서는 비만 피험자의 체중을 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 30 kg/m^2 또는 그 이상 (가령, 30 내지 39.9 kg/m^2 또는 30 kg/m^2 내지 50 kg/m^2)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 40 kg/m^2 또는 그 이상이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 내장비만 (가령, 배 둘레 지방 및/또는 복강 지방이 포함된 복부 영역의 과도한 지방)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 허리-엉덩이 둘레율 (WHR)은 0.85 또는 그 이상이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 말단 비만 (가령, 엉덩이에 과도한 지방)이다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 식이요법 및/또는 운동에 부속된다.

[0302] 또다른 구체예에서, 본 명세서는 비만 또는 비만과 연관된 질환 또는 상태를 치료 및/또는 개선시키는 방법을 제공하는데, 이 방법은 비만 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 30 kg/m^2 또는 그 이상이다. 추가 구체예에서, 상기 피험자의 BMI는 30 내지 39.9 kg/m^2 또는 30 kg/m^2 내지 50 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 병적 비만이다.

일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 40 kg/m^2 또는 그 이상이다. 추가 구체예에서, 상기 피험자의 BMI는 40 kg/m^2 내지 45 kg/m^2 , 또는 40 kg/m^2 내지 50 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 유형 2 진성당뇨병을 갖는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 30 kg/m^2 또는 그 이상 (가령, 30 내지 39.9 kg/m^2)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 최소한 40 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 내장비만 (가령, 배둘레 지방 및/또는 복강 지방이 포함된 복부 영역의 과도한 지방)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 허리-엉덩이 둘레율 (WHR)은 0.85 또는 그 이상이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 말단 비만 (가령, 엉덩이에 과도한 지방)이다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 식이요법 및/또는 운동에 부속된다.

[0303] ALK4:ActRIIB 이형다량체의 효과량을 비만과 연관된 질환 또는 상태를 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험자에게 투여하는 것을 포함하는, 과도한과 연관된 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 또한 제공한다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 이상지질혈증, 고지질혈증 (총 콜레스테롤 수준 $>240 \text{ mg/dL}$), 고콜레스테롤혈증 (가령, 총 콜레스테롤 수준 $>200 \text{ mg/dL}$, $>220 \text{ mg/dL}$, $>240 \text{ mg/dL}$, $>250 \text{ mg/dL}$, 또는 $>275 \text{ mg/dL}$), 낮은 HDL 혈청 수준 (가령, $<40 \text{ mg/dL}$, $<45 \text{ mg/dL}$, 또는 $<50 \text{ mg/dL}$), 높은 LDL 혈청 수준 (가령, $\geq 100 \text{ mg/dL}$, $\geq 130 \text{ mg/dL}$, $\geq 160 \text{ mg/dL}$, 또는 $\geq 190 \text{ mg/dL}$), 및 고중성지혈증 (가령, 공복기 TG 수준 $\geq 150 \text{ mg/dL}$, $\geq 175 \text{ mg/dL}$, $\geq 200 \text{ mg/dL}$, $\geq 300 \text{ mg/dL}$, $\geq 400 \text{ mg/dL}$, 또는 $\geq 499 \text{ mg/dL}$)으로 구성된 집단에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 심혈관 질환이다. 추가 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 고혈압 (높은 혈압), 심근 경색, 말초 동맥 질환, 혈관조절(vasoregulation) 기능이상, 동맥경화증, 울혈성 심장 부전, 죽상경화증, 관상 심장 질환, 또는 미세혈관 질환이다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 간 질환이다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 간 질환 또는 상태는 NAFLD이다. 한 구체예에서, 상기 간 질환은 지방 간이다. 한 구체예에서, 상기 간 질환은 NASH이다. 또다른 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 지방간염, 지방증, 섬유증, 및/또는 경화증 집단에서 선택된다. 특정 경우들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 식이요법 및/또는 운동에 부속된다.

[0304] 또다른 구체예에서, 본 명세서는 유형 2 진성당뇨병 또는 당뇨와 연관된 질환 또는 상태를 치료, 개선 및/또는 방지하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 유형 2 진성당뇨병을 가진 피험자, 또는 유형 2 당뇨병 발생 위험에 처한 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다.. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 신체비만지수 BMI는 30 kg/m^2 또는 그 이상 (가령, 30 내지 39.9 kg/m^2)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 최소한 40 kg/m^2 이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 내장비만 (가령, 배둘레 지방 및/또는 복강 지방이 포함된 복부 영역의 과도한 지방)이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자의 WHR은 0.85 또는 그 이상이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 말단 비만 (가령, 엉덩이에 과도한 지방)이다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 식이요법 및/또는 운동에 부속된다.

[0305] 당뇨병과 연관된 질환 또는 상태를 치료, 개선 또는 방지하는 방법이 또한 제공되는데, 이 방법은 당뇨병을 가진 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 이상지질혈증, 고지질혈증 (총 콜레스테롤 수준 $>240 \text{ mg/dL}$), 고콜레스테롤혈증 (가령, 총 콜레스테롤 수준 $>200 \text{ mg/dL}$, $>220 \text{ mg/dL}$, $>240 \text{ mg/dL}$, $>250 \text{ mg/dL}$, 또는 $>275 \text{ mg/dL}$), 낮은 HDL 혈청 수준 (가령, $<40 \text{ mg/dL}$, $<45 \text{ mg/dL}$, 또는 $<50 \text{ mg/dL}$), 높은 LDL 혈청 수준 (가령, $\geq 100 \text{ mg/dL}$, $\geq 130 \text{ mg/dL}$, $\geq 160 \text{ mg/dL}$, 또는 $\geq 190 \text{ mg/dL}$), 및 고중성지혈증 (가령, 공복기 TG 수준 $\geq 150 \text{ mg/dL}$, $\geq 175 \text{ mg/dL}$, $\geq 200 \text{ mg/dL}$, $\geq 300 \text{ mg/dL}$, $\geq 400 \text{ mg/dL}$, 또는 $\geq 499 \text{ mg/dL}$)으로 구성된 집단에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 심혈관 질환이다. 추가 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 고혈압 (높은 혈압), 심근 경색, 말초 동맥 질환, 혈관조절 기능이상, 또는 동맥경화증이다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 간 질환이다. 또다른 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 지방 간 질환, 지방간염, 지방증, 및/또는 경화증 집단에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 또는 예방되는 질환 또는 상태는 백내장, 폐쇄성 수면 무호흡, 정맥염, 통풍, 골관절염, 쓸개 질환, 및 높은 콜레스테롤로 구성된 집단에서 선택된다. 특정 경우들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 식이요법 및/또는 운동에 부속된다.

[0306] 본 명세서는 피험자의 혈액-지질 프로파일을 개선시키는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 이러한 치료를 요하는 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명

세서는 LDL 콜레스테롤 수준을 감소 또는 HDL-콜레스테롤 수준을 증가시키는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 이상지질혈증을 갖는다. 또다른 구체예에서, 상기 피험자는 상승된 혈청 지질 (가령, 콜레스테롤 (고콜레스테롤혈증) 및/또는 트리글리세리드 (가령, 고중성지혈증)를 갖는다. 한 구체예에서 상기 피험자는 LDL-C ≥ 100 mg/dL, ≥ 130 mg/dL, 또는 ≥ 160 mg/dL)를 갖는다. 한 구체예에서 상기 피험자는 TG ≥ 150 mg/dL, ≥ 160 mg/dL, ≥ 170 mg/dL)를 갖는다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 상승된 혈장 인슐린 수준 (고인슐린혈증; 가령, >20 ug/ml의 공복 인슐린 수준이 100을 초과할 수 있다)을 갖는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 피험자는 유형 II 당뇨병을 갖는다.

[0307] 한 구체예에 따르면, 본 명세서는 대사성 질환 또는 장애 또는 대사성 질환 또는 장애와 연관된 질환 또는 상태를 치료 또는 예방 방법을 제공하는데, 이 방법은 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 이를 요하는 피험자에게 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 대사성 질환, 장애, 또는 상태는 고혈당 (가령, 경구 포도당 내성 테스트 동안 공복 상태 또는 포도당 투여 후 > 130 mg/dL)이다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 대사성 질환, 장애, 또는 상태는 지질 대사 질환, 장애, 또는 상태다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 대사성 질환, 장애, 또는 상태는 이상지질혈증이다. 추가 구체예에서, 지질 대사 질환, 장애, 또는 상태는 낮은 HDL 수준, 높은 LDL 수준, 높은 트리글리세리드 수준, 고지혈증, 및 지단백질 일탈에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 총 콜레스테롤 수준 >200 mg/dL, >220 mg/dL, >240 mg/dL, >250 mg/dL, 또는 >275 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 HDL 혈청 수준은 <40 mg/dL, <45 mg/dL, 또는 <50 mg/dL)이다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 LDL 혈청 수준은 ≥ 100 mg/dL, ≥ 130 mg/dL, ≥ 160 mg/dL, 또는 ≥ 190 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 공복 TG 수준은 ≥ 150 mg/dL, ≥ 175 mg/dL, ≥ 200 mg/dL, ≥ 300 mg/dL, ≥ 400 mg/dL, 또는 ≥ 499 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 대사성 질환, 장애, 또는 상태는 포도당 대사 질환, 장애, 또는 상태다. 추가 구체예에서, 상기 포도당 대사 질환, 장애, 또는 상태는 포도당 과민증, 인슐린 저항성, 손상된 포도당 내성 (IGT), 손상된 공복 포도당 (IFG)에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 대사성 질환, 장애, 또는 상태는 높은 요산 수준, NAFLD, 지방 간, NASH, 및 다낭포성 난소 증후군으로 구성된 집단에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 피험자는 고인슐린혈증을 갖는다. 한 구체예에서, 상기 치료되는 피험자는 비만 (가령, 상기 피험자는 복부 비만이 있다)이다. 또다른 구체예에서, 상기 치료되는 피험자는 유형 II 당뇨병을 갖는다.

[0308] 대사성 증후군은 심장 질환 위험을 증가시키는 일련의 장애와 관련된 상태다. 대사성 증후군의 주요 구성요소는 과도한 체중, 심혈관 매개변수매개변수 (높은 혈압, 이상지질혈증, 혈액에서 높은 수준의 트리글리세리드 및/또는 낮은 수준의 HDL), 죽상경화증, 당뇨병, 및/또는 인슐린 저항성이다. 이들 몇 가지를 가진 피험자, 가령 대사성 증후군을 가진 피험자는 각각이 위험인자이기는 하지만, 심장 질환에 걸리기 쉽다. 본 명세서는 대사성 증후군의 1, 2, 3 또는 그 이상의 구성요소를 치료 또는 예방하는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 이러한 치료를 요하는 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다.

[0309] 심혈관 질환 또는 상태를 치료, 예방 또는 개선하는 방법을 추가로 제공하는데, 이 방법은 이를 필요로 하는 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 치료되는, 예방되는, 또는 개선되는 심혈관 질환 또는 상태는 죽상경화증이다. 한 구체예에서, 상기 치료되는, 예방되는, 또는 개선되는 심혈관 질환 또는 상태는 고혈압 (가령, 휴식 상태에서 혈압 $>130/80$ mmHg 또는 $>140/90$ mmHg)이다. 한 구체예에서, 심혈관 질환은 죽상경화증 (관상 심장 질환 질환)이다.

[0310] 한 구체예에서, 본 명세서는 염증 간 질환 또는 상태를 치료 및/또는 개선하는 방법을 추가로 제공하는데, 이 방법은 이를 필요로 하는 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 질환 또는 상태는 NAFLD이다. 추가 구체예에서, 상기 질환 또는 상태는 지방 간이다. 추가 구체예에서, 상기 질환 또는 상태는 지방증 (가령, 비알코올성 지방간염 (NASH))이다. 추가 구체예에서, 상기 질환 또는 상태는 알코올성 지방 간 질환이다.

[0311] 본 명세서는 혈당 관리를 개선시키는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 이러한 치료를 요하는 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 공복 혈액 당 수준은 >130 , >135 , >140 , >145 , 또는 >150 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 식후 혈액 당 수준은 식후 2시간 >180 , >185 , >190 , >195 , 또는 >200 mg/dL이다. 특정 경우들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 식이요법 및/또는 운동에 부속된다. 상기 투여로 체중 감소시키거나 또는 비만을 또한 치료할 수 있다. 특정 경우들에 있어서, 상기 피험자는 유형 2 진성당뇨병을 갖는다. 특정 경우들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 27 내지 40 kg/m²이다. 특정 경우들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 30 내지 39.9 kg/m²이다. 특정 경우들에 있어서, 상기 피험자의 BMI는 최소한 40이다. 특정 경우들에 있어서, 상기 피험자는 과체중이다. 특정 경우들

에 있어서, 상기 피험자는 비만이다. 당분야에 공지된 기술, 이를 테면 혼합-식사 테스트를 이용하여 혈당 관리 개선이 평가될 수 있다.

[0312] 본 명세서에서 고혈당의 치료, 예방 또는 개선, 또는 고혈당과 연관된 상태를 치료, 예방 또는 개선시키기 위한 조성물 및 방법이 또한 제공되는데, 이는 이러한 치료를 요하는 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 공복 혈액 당 수준은 >130, >135, >140, >145, 또는 >150 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 식후 혈액 당 수준은 식후 2시간 >180, >185, >190, >195, 또는 >200 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 치료, 예방 또는 개선 결과는 치료 전 피험자의 것과 비교하여, 혈청 포도당의 감소, 혈청 트리글리세리드 수준 감소, 혈청 인슐린 수준 감소, 및/또는 혈청 비-에스테르화된 지방산 수준 감소로 구성된 집단에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 치료, 예방 또는 개선 결과는 치료 전 피험자의 체온과 비교하여, 체온이 약 0.4°C 내지 1°C 증가된다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 치료는 또한 피험자의 체중을 또한 감소시킨다.

[0313] 또다른 구체예에서, 본 명세서는 피험자의 혈장 인슐린 수준을 감소시키는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 이러한 치료를 요하는 피험자에게 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 공복 혈액 당 수준은 >130, >135, >140, >145, 또는 >150 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 식후 혈액 당 수준은 식후 2시간 >180, >185, >190, >195, 또는 >200 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 과체중이다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 비만이다. 또다른 구체예에서, 상기 피험자는 유형 2 당뇨병을 갖는다.

[0314] 본 명세서에서 고혈당의 치료, 예방 또는 개선, 또는 고혈당과 연관된 상태를 치료, 예방 또는 개선시키기 위한 조성물 및 방법이 또한 제공되는데, 이는 이러한 치료를 요하는 피험자에게 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 공복 혈액 당 수준은 >130, >135, >140, >145, 또는 >150 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 식후 혈액 당 수준은 식후 2시간 >180, >185, >190, >195, 또는 >200 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 치료, 예방 또는 개선 결과는 치료 전 피험자의 것과 비교하여, 혈청 포도당의 감소, 혈청 트리글리세리드 수준 감소, 혈청 인슐린 수준 감소, 및/또는 혈청 비-에스테르화된 지방산 수준 감소로 구성된 집단에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 치료, 예방 또는 개선 결과는 치료 전 피험자의 체온과 비교하여, 체온이 약 0.4°C 내지 1°C 증가된다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 또한 피험자의 체중을 또한 감소시킨다.

[0315] 또다른 구체예에서, 본 명세서는 피험자의 혈장 인슐린 수준을 감소시키는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 이러한 치료를 요하는 피험자에게 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 공복 혈액 당 수준은 >130, >135, >140, >145, 또는 >150 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자의 식후 혈액 당 수준은 식후 2시간 >180, >185, >190, >195, 또는 >200 mg/dL이다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 과체중이다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 비만이다. 또다른 구체예에서, 상기 피험자는 유형 2 당뇨병을 갖는다.

[0316] 또다른 구체예에서, 본 명세서는 피험자에서 간 질환을 치료, 예방 또는 개선하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 효과량의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 간 질환을 가진 피험자에게 투여하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 간 염증이 있다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 NAFLD이 있다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 지방 간염이 있다. 또다른 구체예에서, 상기 피험자는 NASH를 갖는다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 지방 간염이 있다. 또다른 구체예에서, 상기 피험자는 알코올성 지방 간 질환이 있다. 한 구체예에서, 상기 치료되는, 예방되는, 또는 개선되는 간 질환은 섬유증, 반흔형성(scarring), 경화증, 또는 간 부전이다. 또다른 구체예에서, 상기 치료되는, 예방되는, 또는 개선되는 간 질환은 간암이다. 한 구체예에서, 상기 피험자는 과체중이다. 또다른 구체예에서, 상기 피험자는 비만이다. 또다른 구체예에서, 상기 피험자는 유형 2 당뇨병을 갖는다.

[0317] 섬유증은 일반적으로 장기 또는 조직에서 세포 수의 상대적 감소와 함께 콜라겐 섬유 및 세포의 기질 모두의 과도한 침착을 지칭한다. 이 과정은 손상 후 자연 치유의 중요한 특징이지만, 섬유증은 예를 들어 폐, 신장, 간, 뼈, 근육 및 피부를 비롯한 다양한 조직 및 기관에서 병리학적 손상을 초래할 수 있다. 섬유증에서 TGF-베타의 역할은 광범위하게 연구되었다. 그러나, 다른 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드 예를 들면, 액티빈 (가령, 액티빈 A 및 액티빈 B) 및 GDF8을 포함하는 리간드는 섬유증에 또한 연루되어 있다 [Hedger et al (2013) Cytokine and Growth Factor Reviews 24:285-295; Hardy et al. (2015) 93: 567-574; 및 Cantini et al. (2008) J Sex Med 5:1607-1622]. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 섬유증, 특히 섬유증-연관된 장애 및 상태를 치료하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 하나 또는 그 이

상의 폐 섬유증, 과민성 폐렴, 특발성 섬유증, 결핵, 폐렴, 낭포성 섬유증, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 기종, 신장 (콩팥) 섬유증, 신장 (콩팥) 부전, 만성 신장 (콩팥) 질환, 뼈 섬유증, 골수섬유증, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 경피증, 사르코이드증, 다발성 맥관염이 있는 육아종증, 페이로니(Peyronie's) 질환, 간 섬유증, 윌슨(Wilson's) 질환, 글리코겐 저장 질환 (특히 유형 III, IV, IX, 및 X), 철-과부하, 고세(Gaucher) 질환, 켈웨거(Zellweger) 증후군, 비알코올성 및 알코올성 지방간염, 담즙 경화증, 경화담관염, 버드-키아리(Budd-Chiari) 증후군, 외과술-연합된 섬유증, 크론(Crohn's) 질환, 듀프렌 경축(Duputren's contracture), 종격 섬유증, 신장원발성 섬유증, 후복막 섬유증, 심방 섬유증, 심근내막 섬유증, 췌장 섬유증, 그리고 특발성 폐 섬유증을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다.

[0318] 신장은 체액, pH 균형, 전해질 농도, 혈압 뿐만 아니라 독소 및 폐기물 여과에 대한 책임을 포함하여 혈액의 많은 특징을 유지한다. 이러한 기능은 신장 네프론의 복잡한 구조, 신장의 다양한 모세 혈관을 통한 일정한 혈액 흐름 및 내분비 호르몬을 비롯한 신체의 나머지 부분으로부터의 신호에 의한 신장 조절에 달려 있다. 신장 기능의 문제는 직접적인 기전 (예: 유전적 결함, 감염 또는 독소 노출)과 비대 및 과다여과(이들 자체가 대개 신장 기능에 더 직접적인 곤란을 준다)와 같은 장기적인 스트레스 요인으로부터 점진적으로 진행되는 간접 메커니즘에 의해 나타난다. 혈액 보존 및 폐기물 분비에서 신장의 핵심적인 역할로 인하여, 신장 관련 질병 현시는 많고, 다양하며; 이는 Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th edition, McGraw Hill, N.Y., Part 13, Chp 277-289에서 검토될 수 있다.

[0319] 본원에서 기술된 바와 같이, ALK4:ActRIIB 이형다량체는 신장 질환 모델에서 다양한 유의한 효과를 가진다. 구체적으로, ALK4:ActRIIB 이형다량체를 이용한 치료는 한측면 수뇨관 폐색된 환자에서 신장 조직 손상, 염증, 및 섬유증을 감소시켰다. 이들 데이터로부터 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 신장 질환의 치료 또는 예방, 구체적으로 예를 들면, 신장 조직 손상, 염증, 및/또는 섬유증이 포함된 신장 질환의 다양한 합병증(현시)을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있음이 실증된다.

[0320] 따라서, 본 발명의 방법은 다양한 신장-연합된 질환 또는 상태에 적용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "신장-연합된 질환 또는 상태"는 신장 또는 신장계에 영향을 주는 임의의 질환, 장애, 또는 상태를 말할 수 있다. 신장-연합된 질환 또는 상태의 예로는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 만성 신장 질환 (또는 부전), 급성 신장 질환 (또는 부전), 일차(primary) 신장 질환, 비-당뇨성 신장 질환, 사구체신염, 간질 신장염, 당뇨병 신장 질환, 당뇨병 신증, 사구체경화증, 급속 진행성 사구체신염, 신장 섬유증, 알포트 증후군, IDDM 신장염, 메산증 증식성 사구체신염, 막증식성 사구체신염, 초승달 사구체신염, 신장 간질 섬유증, 국소 분절 사구체경화증, 막성 신증, 미세변화 질환, 파우치-면역 급속 진행성 사구체신염, IgA 신증, 다낭포성 신장 질환, 텐트 질환, 네프로사이트노시스, 헤이만 신장염, 상염색체 우성 (성인) 다낭포성 신장 질환, 상염색체 열성 (소아) 다낭포성 신장 질환, 급성 신장 손상, 신증 증후군, 신장 허혈, 족세포 질환 또는 장애, 단백뇨, 사구체 질환, 막성 사구체신염, 국소 분절 사구체신염, 전-자간증, 자간증, 신장 병변, 콜라겐 맥관 질환, 양성 기립성 (체위성) 단백뇨, IgM 신증, 막성 신증, 사르코이드증, 진성 당뇨병, 약물로 인한 신장 손상, 파브리 질환, 아미노산뇨, 판코니 증후군, 고혈압 신장경화증, 간질 신장염, 겸상 세포 질환, 혈색소뇨, 미오글로빈뇨, 웨그너 육아종증, 글리코겐 저장 질환 유형 1, 만성 신장 질환, 만성 신부전, 낮은 사구체 여과율 (GFR), 신혈관경화증, 낭창 신장염, ANCA-양성 파우치-면역 초승달 사구체신염, 만성 동종이식편 신증, 신독성, 신장 독성, 신장 괴사, 신장 손상, 사구체 및 관상 손상, 신장 기능이상, 신장의 증후군, 급성 신부전, 만성 신부전, 근위관 기능이상, 급성 신장 이식 거부, 만성 신장 이식 거부, 비-IgA 메산증증식성 사구체신염, 감염후 사구체신염, 임의 중요한 신장 관련 맥관염, 임의의 유전적 신장 질환, 임의의 간질 신장염, 신장 이식 부전, 신장 암, 다른 상태와 연합된 신장 질환 (가령, 고혈압, 당뇨병, 및 자가면역 질환), 텐트 질환, 네프로사이트노시스, 헤이만 신장염, 원발성 신장 질환, 허탈성 사구체병증, 밀도 침착 질환, 저온글로불린혈증-연합된 사구체신염, 헤노흐-췌라인 질환, 감염후 사구체신염, 세균성 심장 내막염, 현미경적 다발성혈관염, 척-스트라우스 증후군, 항-GBM-항체 매개된 사구체신염, 아밀로이드증, 단클론 면역글로불린 침착 질환, 원성류 사구체신염, 면역이질결정집합체 사구체병증, 허혈성 관상 손상, 약물-유도된 관상-간질 신장염, 독성 관상-간질 신장염, 전염성 관상-간질 신장염, 세균성 신우신염, 폴리오마바이러스 감염 또는 HIV 감염으로 인한 바이러스성 전염성 관상-간질 신장염, 대사성-유도된 관상-간질 질환, 혼합 결함조직 질환, 캐스트 신증, 요산염 또는 옥살염 또는 약물-유도된 결정 침착으로 발생할 수 있는 결정 신증, 급성 세포성 관상-간질 동종이식편 거부, 림프종 또는 이식-후 림프증식성 질환으로 인한 종양성 침윤성 질환, 심장의 폐쇄성 질환, 맥관 질환, 혈전미세 혈관병, 신혈관경화증, 죽종색전증 질환, 혼합 결함조직 조직 질환, 결절성다발성동맥염, 칼씨네우린-억제제 유도된-맥관 질환, 급성 세포성 맥관 동종이식편 거부, 급성 체액성 동종이식편 거부, 초기 신장 기능 쇠퇴 (ERFD), 최종 단

계 신장 질환 (ESRD), 신장 정맥 혈전증, 급성 관상 피사, 급성 간질 신장염, 확립된 만성 신장 질환, 신장 동맥 협착, 허혈성 신증, 요독증, 약물 및 독신-유도된 만성 관상간질 신장염, 역류 신증, 신장 결석, 궤양성 신증, 정상색소빈혈, 신장 빈혈, 당뇨병 만성 신장 질환, IgG4-관련된 질환, 폰 히펠-린다우 증후군, 결절성 경화증, 콩팥황폐증, 수질 낭포성 신장 질환, 신장 세포 암종, 선암, 신아세포종, 림프종, 백혈병, 저시알화 장애, 만성 사이클로스포린 신증, 신장 재관류 손상, 신장 형성장애, 질소혈, 양측 동맥 폐색, 급성 요산 신증, 저혈량증, 급성 양측 폐쇄성 요로병, 고칼슘혈증 신증, 용혈성 요독증성 증후군, 급성 뇨폐, 악성 신장경화증, 산후 사구체경화증, 경피증, 비-궤양성 신증-GBM 질환, 미세 결절성다발성동맥염, 알레르기성 육아종증, 급성 방사선 신장염, 연쇄상구균-감염후사구체신염, 발덴스트롬고분자글로불린혈증, 진통성 신증, 동정맥루, 동정맥 이식편, 투석, 이소성 신장, 수질 스폰지 신장, 신장 골형성장애, 홀기능 신장, 수신증, 미세알부민뇨, 요독증, 혈뇨, 고지질혈증, 저알부민혈증, 지질뇨, 산독증, 고칼륨증, 및 부종.

[0321] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 임의선택적으로 만성 신장 질환 치료용 하나 또는 그 이상의 보조 치료제와 복합되어, 만성 신장 질환을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 임의선택적으로 만성 신장 질환 치료용 하나 또는 그 이상의 보조 치료제와 복합되어, 만성 신장 질환의 하나 또는 그 이상의 여병(증후군 또는 현시)을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 임의선택적으로 말기 신부전 치료용 하나 또는 그 이상의 보조 치료제와 복합되어, 말기 신부전을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 만성 콩팥 질환 (CKD)은 만성 신장 질환으로도 알려져 있으며, 몇 달 또는 몇 년에 걸쳐 신장 기능이 점진적으로 상실된다. 신장 기능이 악화되는 증상에는 일반적으로 기분이 좋지 않고 식욕이 감소하는 증상이 있을 수 있다. 종종, 만성 신장 질환은 고혈압이나 당뇨병과 같은 신장 문제의 위험이 있다고 알려진 사람들과 CKD와 관련이 있는 사람들의 스크리닝 결과로 진단된다. 이 질환은 심혈관 질환, 빈혈 또는 심낭염과 같이 인지된 합병증 중 하나로 이어질 때도 확인될 수 있다. 최근의 전문 지침은 5 단계로 CKD의 중증도를 분류하는데, 1 단계가 가장 완만하고 대개 증상이 거의 없으며, 5 단계는 치료하지 않으면 평균 수명이 짧은 심각한 병이다. 5 단계 CKD는 종종 말기 콩팥병, 말기 신장병 또는 말기 신부전으로 불리며, 만성 신부전 또는 만성 콩팥부전과 같은 오래된 용어와 대부분 동의어이며; 그리고 일반적으로 환자가 신장 대체 요법, 가령, 투석의 형태를 포함할 수 있지만, 이상적으로 신장 이식을 필요로 한다는 것을 의미한다. CKD는 초기에 특별한 증상이 없으며, 일반적으로 소변에서 단지 혈청 크레아티닌이나 단백질이 증가로만 탐지된다. 신장 기능이 감소하면, 아래에 설명된 것처럼 다양한 증상이 나타날 수 있다. 유체-과부하 및 레닌-앙지오텐신계를 통하여 신장에 의해 생성된 혈관 호르몬의 생성으로 혈압이 상승할 수 있고, 고혈압 발생 및/또는 울혈성 심부전으로 고생하는 위험이 증가한다. 요소가 축적되어, 질소혈증과 궁극적으로는 요독증 (기면증에서 심낭염 및 뇌증에 이르는 증상)을 일으킬 수 있다. 높은 전신 순환으로 인해, 요소는 고농도에서 외분비 땀으로 배설되고, 땀이 증발하면서 피부에 결정화된다 ("요독증 프로스트(uremic frost)"). 칼륨이 혈액에 축적될 수 있다 (불안감과 치명적인 심장 부정맥을 포함한 다양한 증상을 가진 고칼륨혈증). 고칼륨증은 일반적으로 사구체 여과율이 20-25 ml/min/1.73 m² 미만으로 떨어지기 전에 발생되지 않는데, 이 시점에서 신장이 칼륨을 배출하는 능력은 감소된다. CKD의 고칼슘혈증은 산혈증 (칼륨의 세포외 이동으로 이어짐)과 인슐린 부족으로 악화될 수 있다. 에리스로포이에틴 합성이 감소되어 빈혈을 유발할 수 있다. 경미한 부종에서부터 생명을 위협하는 폐부종에 이르는 유체 체적 과다 현상이 발생할 수 있다. 인산염 배출 감소로 인한 과인산혈증은 일반적으로 사구체 여과의 감소에 따라 발생할 수 있다. 과인산혈증은 혈관 석회화의 직접적인 자극이 되는 심혈관 위험의 증가와 관련이 있다. 일반적으로 섬유아세포 성장 인자-23의 자극으로 유발되는 저 칼슘혈증이 나타날 수 있다. 골세포는 효소 1-알파-수산화효소 (25-하이드록시콜레칼시페롤이 1,25 디하이드록시비타민 D3으로의 전환을 담당)의 강력한 억제제인, FGF23의 생산 증가를 담당한다. 후에, 이것은 보조적 부갑상선기능항진증, 신장 골형성장애, 및 혈관 석회화로 진행되어 심장 기능을 더욱 악화시킨다. 대사성 산독증 (황산염, 인산염, 요산 등의 축적으로 인해)은 효소에 작용하는 과량의 산에 의해 발생되고, 효소 활성의 변경 원인이 되며; 그리고 또한 과도한 산성 (산성 혈증)으로 인한 고칼륨혈증의 촉진에 의해 심장 및 신경근의 흥분성을 증가시켰다. 산독증은 또한 근위 세뇨관의 세포에서 충분한 암모니아를 생산하는 능력이 감소했기 때문에 발생한다. 신장 기능이 감소함에 따라, 유병률이 증가하는 철 결핍 성 빈혈은 특히 혈액 투석이 필요한 사람들에게 만연하다. 원인은 다원적이지만, 염증 증가, 적혈구 생성 인자 감소 및 골수 억제로 이어지는 고요산혈증이 포함된다. CKD를 가진 사람들은 가속된 죽상경화증으로 고통 받고, 일반 집단보다 심혈관 질환을 일으킬 가능성이 더 크다. CKD 및 심혈관 질환으로 고통받는 환자는 심혈관 질환만으로 고통받는 환자보다 유의적으로 나쁜 예후를 보이는 경향이 있다.

[0322] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "복합하여", "의 조합" 또는 "공동 투여"는 추가 요법(가령, 제2, 제3, 제 4 등)이 여전히 신체에서 효과적일도록 투여하는 임의의 형태를 의미한다 (예를 들어, 다수 화합물이 환자에서 동

시에 효과적이며, 이들 화합물의 공조상승효과를 포함할 수 있음). 유효성은 혈액, 혈청 또는 혈장에서 측정가능한 약물 농도와 관련이 없을 수도 있다. 예를 들면, 상이한 치료 화합물은 동일한 제형 또는 별도 제형으로, 동시, 순차적 또는 상이한 일정에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 그러한 치료를 받는 개인은 다른 치료법의 결합된 효과로부터 이익을 얻을 수 있다. 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형이량체는 하나 또는 그 이상의 다른 추가적인 물질들 또는 보조 요법과 동시에, 이보다 앞서, 또는 후속적으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 각각의 치료제는 특정 약제에 대해 결정된 투여량 및/또는 일정으로 투여될 것이다. 요법에서 사용하는 특정 조합은 본 명세서의 길항제와 치료 및/또는 바람직한 치료 효과의 양립 가능성을 고려할 것이다.

[0323] 일부 구체예에서, 환자가 Duchenne 근이영양증 또는 Becker 근이영양증이 있는 경우, 본 명세서에서 개시된 임의의 상기 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있다: 에테플리르센, 코르티코스테로이드 (가령, 데플라사코르트), 스테로이드 (가령, 프레드니손), 혈압 및/또는 심장 약물(가령, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 베타 차단제, 이뇨제), 항-천식 (가령, 알부테롤), 비타민/영양제/항산화제(가령, 아미노산, 카르니틴, 코엔자임 Q10, 크레아틴, 어유, 녹차 추출물, 비타민 E), 수술, 물리 치료, 줄기 세포 치료, 유전자 요법, 인공 호흡,식이 요법 및/또는 운동.

[0324] 일부 구체예에서, 환자가 얼굴어깨위팔근육 근이영양증이 있는 경우, 본 명세서에서 개시된 임의의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 알부테롤, 언어 치료, 수술, 보행 보조기구, 등 받침대, T 세포 억제제(가령, 절두된 히스티달-tRNA 합성효소), 줄기 세포 치료, 유전자 요법 및/또는 발지장치중 하나 또는 그 이상의 조합과 함께 투여될 수 있다.

[0325] 일부 구체예에서, 환자가 근 위축성 측삭 경화증을 앓고 있는 경우, 본 명세서에서 개시된 임의의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있다: 릴루졸, 에다라본, 마시티닙, 항산화제, 물리 치료법, 언어 치료법, 영양 보조, 호흡 보조 (가령, 비-침습적 인공 호흡기), 줄기 세포 치료, 및/또는 유전자 치료.

[0326] 일부 구체예에서, 환자에게 산발적 봉입체 근염이 있는 경우, 본 명세서에서 개시된 임의의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있다: 코르티코스테로이드, 프레드니손, 옥산드로론, 메토틱렉세이트, 마이코페놀레이트 모페틸, 정맥내 면역글로블린, 베타 인터페론-1a, 에타네르셉트, 알레무투수맙, 폴리스타틴, 리툼, 비마그루맙, 아리모클로몰, 라파마이신, 항산화제, 카르니틴, 코엔자임 Q10, 물리치료, 작업 요법, 줄기 세포 치료, 및/또는 유전자 치료.

[0327] 일부 구체예에서, 환자가 알 포트 증후군을 가지고 있다면, 본 명세서에서 개시된 임의의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있다: 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 억제제 (가령, 베나제프릴, 씨라자프릴, 에날라프릴, 포시노프릴, 리시노프릴, 페리노프릴, 라마프릴 및 퀴나프릴), 안지오텐신 수용체 차단제 (가령, 칸데사르탄, 에프레사르탄, 이르베사르탄, 로사르탄, 텔미사르탄 및 발사르탄), 스테틴 (가령, 플루바스태틴), 비-디히드로피리딘 칼슘 통로 차단제 (가령, 딜티아젠프), 사이클로스포린, 및/또는 알도스테론 억제제.

[0328] 일부 구체예에서, 사르코니아 감소증이 있는 환자의 경우, 본 명세서에서 개시된 임의의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 다음중 하나 또는 그 이상과 조합되어 투여될 수 있다: 우로코르틴 II, 호르몬 대체 요법 (가령, 테스토스테론 또는 인간 성장 호르몬), 크레아틴, 비타민 D, 운동, 식이요법, 및/또는 체력 단련.

[0329] 5. 약학 조성물

[0330] 특정 측면들에서, 본 명세서의 ALK4:ActRIIB 이형다량체는 단독으로 또는 약학 제형 (또한 치료 조성물 또는 약학 조성물로도 지칭됨)의 성분으로 투여될 수 있다. 약학 제형은 이 안에 포함된 활성 성분 (가령, 본 명세서의 물질)의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하고, 그리고 이 제형이 투여될 예정인 대상에 대하여 수용불가능한 독성이 있는 추가 성분을 포함하지 않는 형태의 제제를 말한다. 대상 화합물은 인간 또는 동물 용 의약에 사용하기 위한 임의의 편리한 방법으로 투여 용으로 제형화 될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질들은 약학으로 수용가능한 운반체와 함께 제형화될 수 있다. 약학으로 수용가능한 운반체는 활성 성분 이외에 약학 제형 안에 있는 성분을 말하며, 일반적으로 대상에게 비독성이다. 약학으로 수용가능한 운반체는 완충액, 부형제, 안정화제, 및/또는 보존제다. 일반적으로, 본 명세서에 이용되는 약학 제형은 대상에게 투여될 때, 발열원이 없고, 생리학적으로-수용가능한 형태이다. 본 명세서에서 설명된 것들 이외의 치료에 유용한 물질은 상기에서 설명된 바와 같이, 본 명세서의 방법에서 해당 물질과 복합 투여될 수 있다.

[0331] 특정 구체예들에 있어서, 조성물들은 비경구 [가령, 정맥 (I.V.) 주사, 동맥내 주사, 골내 주입, 근육 주사, 척

수강 내 주사, 피하 주사 또는 피내 주사]로 투여될 것이다. 비경구 투여에 적합한 약학 조성물들은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질들과 하나 이상의 약학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액, 또는 사용 직전에 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성 될 수 있는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 주사가 가능한 용액 또는 분산액은 항산화제, 완충액, 세균발육억제제, 현탁제, 증점제 또는 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 제형에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 오일 (예: 올리브 오일), 주사가 가능한 유기 에스테르 (예, 에틸 올레이트) 및 이들의 적합한 혼합물을 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅 물질 (예: 레시틴)의 사용, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지 그리고 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0332] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 치료 방법은 상기 약학 조성물을 전신 투여하거나, 또는 임플란트 또는 장치로부터 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. 또한, 상기 약학 조성물은 표적 조직 부위 (가령, 골수 또는 근육)에 운반하기 위한 형태에 포집되거나 또는 주입될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 조성물은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질을 표적 조직 부위 (가령, 골수 또는 근육)로 운반할 수 있는 매트릭스를 포함할 수 있는데, 이 매트릭스는 발생 조직에 대한 구조를 제공하고, 체내로 최적으로 흡수될 수 있다. 예를 들면, 상기 매트릭스는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질의 지연 방출을 제공할 수 있다. 이러한 매트릭스는 다른 이식된 의학 용도에 현재 사용되는 재질로 형성될 수 있다.

[0333] 매트릭스 재질은 생체적합성, 생분해성, 기계적 성질, 미용적 외관 및 경계면 성질중 하나 또는 그 이상에 의해 선택될 수 있다. 해당 조성물의 특정 용도가 적절한 제형을 규정할 것이다. 상기 조성물에 대한 잠재적 매트릭스는 생분해가능하며, 화학적으로 황산칼슘, 인산삼칼슘, 히드록시아파타이트, 폴리락트산 및 폴리안하이드리드로 규정될 수 있다. 다른 잠재적 물질은 예를 들면, 뼈 또는 피부 콜라겐을 포함하는 생분해가능하며, 생물학적으로 잘 규정된 물질이다. 또한 매트릭스는 순수 단백질 또는 세포외 매트릭스 성분들로 구성된다. 다른 잠재적 매트릭스는 비-생분해성이며, 화학적으로 예를 들면, 소결(sintered) 히드록시아파타이트, 바이오글라스, 알루미늄이트 또는 기타 세라믹을 포함한 비-생분해성이며, 화학적으로 규정된다. 매트릭스는 예를 들면, 폴리락트산 및 히드록시아파타이트 또는 콜라겐 및 인산삼칼슘을 포함하는 전술한 유형의 물질의 조합을 포함할 수도 있다. 바이오 세라믹은 공극 크기, 입자 크기, 입자 형태 및 생분해성중 하나 또는 그 이상을 변경시키기 위하여 조성물(예, 칼슘-알루미늄이트-포스페이트) 및 공정이 변경될 수 있다.

[0334] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 약학 조성물은 국소적으로 투여될 수 있다. 상기 약학 조성물의 "국소 적용" 또는 "국소적"이라는 것은 피부, 상처 부위 및 점막이 포함된 신체 표면에 상기 약학 조성물을 접촉시키는 것을 의미한다. 국소 약학 조성물들은 다양한 적용 형태를 가질 수 있고, 전형적으로 조성물이 투여될 때 조직 부근 또는 조직에 직접 접촉되는 약물-함유층을 포함한다. 국소 투여에 적합한 약학 조성물은 액체, 겔, 크림, 로션, 연고, 포말, 페이스트, 퍼티(putty), 반-고체 또는 고체 형태로 제형화된 조성물 안에 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 하나 또는 그 이상의 ALK4:ActRIIB 이형다량체를 포함할 수 있다. 액체, 겔, 크림, 로션, 연고, 포말, 페이스트, 퍼티 안에 조성물들은 표적 조직에 이 조성물을 펴바르거나, 분무하거나, 문지르거나, 토닥이거나 또는 롤링시켜 적용시킬 수 있다. 또한 이 조성물은 멸균 드레싱, 경피 패치, 고약 또는 붕대에 스며들어 있을 수 있다. 퍼티, 반고형 또는 고형의 조성물은 변형가능한 형태일 수 있다. 이들은 탄성 또는 비-탄성일 수 있다 (가령, 유연성 또는 경직). 특정 측면들에 있어서, 상기 조성물은 조성물의 일부를 형성하고, 동일하거나 또는 상이한 조성물들의 섬유, 미립자 또는 다중층을 포함할 수 있다.

[0335] 액체 안에 국소 조성물은 약학으로 수용가능한 용액, 에멀션, 마이크로에멀션, 및 현탁액을 포함할 수 있다. 활성 성분(들)에 추가하여, 액체 투약형은 당분야에서 통상적으로 이용하는 비활성 희석액, 예를 들면, 물 또는 기타 용매, 가용화 물질 및/또는 유화제 [가령, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 또는 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (가령, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 검, 올리브, 피마자, 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이의 혼합물]을 포함할 수 있다.

[0336] 전형적인 겔, 크림, 로션, 연고, 반고형 또는 고형 조성물은 하나 또는 그 이상의 농후 물질들, 이를 테면 폴리사카라이드, 합성 폴리머 또는 단백질-기반의 폴리머를 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 겔형성 물질은 적절하게 비독성이며, 원하는 점도를 제공하는 것이다. 농후 물질들은 다음의 폴리머, 코폴리머, 및 단량체를 포함한다: 비닐피롤리돈, 메타아크릴아미드, 아크릴아미드 N-비닐이미다졸, 카르복시 비닐, 비닐 에스테르, 비닐 에테르, 실리콘, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜, 비닐알코올, 아크릴레이트 나트륨, 아크릴레이트, 말레산, NN-디메틸아크릴아미드, 디아세톤 아크릴아미드, 아크릴아미드, 아크릴로일 몰포린, 플루로

닉, 콜라겐, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐렌, 폴리비닐 실리케이트, 당(가령, 슈크로스, 포도당, 갈락토사민, 갈락토스, 트레할로스, 만노스, 또는 락토즈)로 치환된 폴리아크릴레이트, 아크릴아미도프로판 술포산, 테트라메톡시오르소실리케이트, 메틸트리메톡시오르소실리케이트, 테트라알콕시오르소실리케이트, 트리알콕시오르소실리케이트, 글리콜, 프로필렌 글리콜, 글리세린, 폴리사카라이드, 알기네이트, 텍스트란, 시클로텍스트란, 셀룰로오스, 변형된 셀룰로오스, 산화된 셀룰로오스, 치토산, 치틴, 구아르, 카라기난, 히알루론산, 이눌린, 전분, 변형된 전분, 아가로스, 메틸셀룰로오스, 식물 검, 히알루로난, 젤라틴, 글리코사미노글리칸, 카르복시메틸 셀룰로오스, 히드록시에틸 셀룰로오스, 히드록시 프로필 메틸 셀룰로오스, 펙틴, 저-메톡시 펙틴, 교차-연계된 텍스트란, 전분-아크릴로니트릴 접합 코폴리머, 전분 폴리아크릴레이트 나트륨, 히드록시에틸 메타아크릴레이트, 히드록실 에틸 아크릴레이트, 폴리비닐렌, 폴리에틸비닐에테르, 폴리메틸 메타크릴레이트, 폴리스티렌, 폴리우레탄, 폴리알카노에이트, 폴리락트산, 폴리락테이트, 폴리(3-히드록시부티레이트), 술포화된 하이드로겔, AMPS (2-아크릴아미도-2-메틸-1-프로판술포산), SEM (술포에틸메타크릴레이트), SPM (술포프로필 메타크릴레이트), SPA (술포프로필 아크릴레이트), N,N-디메틸-N-메타아크릴옥시에틸-N-(3-술포프로필)암모니움 베타인, 메타아크릴산 아미노프로필-디메틸 암모니움 술포베타인, SPI (이타코닌산-비스(1-프로필 술포니자시드-3) 에스테르 디-칼륨 염), 이타코닌산, AMBC (3-아크릴아미도-3-메틸부타논산), 베타-카르복시에틸 아크릴레이트 (아크릴산 이량체), 및 말레 무수물-메틸비닐 에테르 폴리머, 이의 유도체들, 이의 염들, 이의 산, 및 이의 조합들. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 약학 조성물들은 예를 들면, 캡슐, 카시에(cachets), 알약, 테블릿, 로젠지(풍미제 베이스, 이를 테면 슈크로스 및 아카시아 또는 트라가탄 이용), 분말, 과립, 또는 수성 또는 비-수성 액체에 용액 또는 현탁액, 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 에 멸선, 또는 엘릭시르(elixir) 또는 시럽, 또는 캔디 (비활성 베이스, 이를 테면 젤라틴 및 글리세린, 또는 슈크로스 및 아카시아 이용), 및/또는 구강 세척제로 경구 투여될 수 있는데, 이들 각각은 본 명세서의 사전 결정된 양의 화합물 및 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 활성 성분을 함유한다. 본 명세서의 화합물 및 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 다른 활성 성분은 또한 볼루스(bolus), 연질약(electuary), 또는 페이스트로 또한 투여될 수 있다.

[0337] 경구 투여를 위한 고체 투약형 (가령, 캡슐, 테블릿, 알약, 당의정, 분말 및 과립)에서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 화합물은 예를 들면, 구연산나트륨, 인산이칼슘, 충전제 또는 전색제(extender) (가령, 전분, 락토스, 슈크로스, 포도당, 만니톨, 및 실리카산), 결합제 (가령, 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로스, 및 아카시아), 습윤제 (가령, 글리세롤), 봉해 물질 (가령, 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 실리케이트, 및 탄산 나트륨), 용액 지체 물질 (가령, 파라핀), 흡수 가속화제 (가령, 4차 암모니움 화합물), 습윤 물질 (가령, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트), 흡수제 (가령, 카울린 및 벤토나이트 진흙), 윤활제 (가령, 활석, 스테아레이트 칼슘, 스테아레이트 마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 술페이트 나트륨), 발색 물질, 및 이의 혼합물을 포함하는 하나 또는 그 이상의 약학으로 수용가능한 운반체와 혼합될 수 있다. 캡슐, 테블릿 및 알약의 경우, 상기 약학 제형 (조성물)은 완충 물질을 또한 포함할 수 있다. 유사한 형태의 고체 조성물은 가령, 락토스 또는 유당을 포함하는 하나 또는 그 이상의 부형제 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 연질 및 경질 충전된 젤라틴 캡슐 안에 충전물로 이용될 수 있다.

[0338] 상기 약학 조성물의 경구 투여를 위한 액체 투약형은 약학으로 수용가능한 에멸션, 마이크로에멸션, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함할 수 있다. 활성 성분(들)에 추가하여, 액체 투약형은 당분야에서 통상적으로 이용하는 비활성 희석액, 예를 들면, 물 또는 기타 용매, 가용화 물질 및/또는 유화제 [가령, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 또는 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (가령, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 검, 올리브, 피마자, 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이의 혼합물]을 포함할 수 있다. 비활성 희석제 이외에, 경구 제형은 예를 들면, 가습 물질, 유화 및 현탁 물질, 감미 물질, 풍미 물질, 발색 물질, 향료 물질, 보존 물질, 및 이의 조합들을 포함하는 어쥬번트를 또한 포함할 수 있다.

[0339] 현탁액은 활성 화합물 이외에, 예를 들어 에톡시화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천-한천, 트라가탄 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0340] 미생물의 작용 및/또는 성장의 예방은 파라벤, 클로로부탄올 및 페놀 소르브산을 비롯한 다양한 항박테리아 및 항진균제를 포함시킴으로써 확보될 수 있다.

[0341] 특정 구체예들에 있어서, 조성물에 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 등장화제를 포함시키는 것이 바

람직할 수 있다. 또한, 예를 들어, 모노스테아르산 알루미늄 및 젤라틴을 포함하는 흡수를 지연시키는 물질을 포함시킴으로써 주사가 가능한 약형의 연장된 흡수가 이루어질 수 있다.

[0342] 투여 섭생은 본 발명의 하나 이상의 물질의 작용을 변형시키는 다양한 인자를 고려하는 주치의에 의해 결정될 것이다. 적혈구 세포 형성을 촉진시키는 ALK4:ActRIIB 이형다량체의 경우, 환자의 적혈구 수, 헤모글로빈 수치, 원하는 목표 적혈구 수, 환자의 나이, 환자의 식단, 억제된 적혈구 세포 수준에 원인이 될 수 있는 질병의 중증도, 기여할 수 있는 질병의 중증도, 투여 시간 및 다른 임상 인자들을 포함하지만 이에 국한되지는 다양한 인자들을 포함할 수 있다. 최종 조성물에 기타 공지의 활성 물질을 추가하면 이 약형에 또한 영향을 줄 수 있다. 다음의 하나 또는 그 이상의 적혈구 세포 수준, 헤모글로빈 수준, 망상세포 수준, 및 조혈 과정의 다른 지표의 주기적 측정에 의해 진행을 모니터링할 수 있다.

[0343] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 본 명세서에 따른 하나 또는 그 이상의 물질의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 또한 제공한다. 그러한 치료는 상기 나열된 바와 같은 하나 이상의 장애를 갖는 세포 또는 조직 내로 약물 서열을 도입함으로써 그의 치료 효과를 얻을 수 있다. 상기 물질 서열의 전달은 예를 들어, 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산 시스템과 같은 재조합 발현 벡터를 사용하여 달성 될 수 있다. 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질 서열의 바람직한 치료 전달은 표적화된 리포솜을 사용하는 것이다.

[0344] 본 명세서에서 교시된 바와 같이, 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 유두종, 또는 RNA 바이러스 (가령, 레트로바이러스)를 포함한다. 레트로바이러스 벡터는 뮤린 또는 조류 레트로바이러스의 유도체일 수 있다. 단일 외부 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 예로는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 모로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), 하베이 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 및 라우스 육종 바이러스 (RSV). 다수의 추가 레트로바이러스 벡터가 다중 유전자를 혼입할 수 있다. 이들 모든 벡터는 선택가능한 표지의 유전자를 전달 또는 혼입하여, 형질유도된 세포를 동정 및 생성할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예를 들면, 당, 당지질, 또는 단백질을 부착시킴으로써, 표적-특이적으로 만들어질 수 있다. 항체를 이용한 바람직한 표적화가 이루어진다. 당업자는 특이적 폴리뉴클레오타이드 서열을 레트로바이러스 게놈 안에 삽입시키거나 또는 바이러스 외피에 부착시켜, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질을 함유하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적 운반이 가능하다는 것을 인지할 것이다.

[0345] 대안으로, 조직 배양 세포는 통상적인 인산칼슘 형질감염에 의해 레트로바이러스 구조 유전자 (gag, pol, 및 env)를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포는 관심 대상의 유전자를 함유하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성 세포는 레트로바이러스 벡터를 배양 배지로 방출한다.

[0346] 본 발명의 하나 또는 그 이상의 물질에 대한 또다른 표적화된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템은 예를 들면, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 그리고 수중유 에멀션, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 인공 막 소포로, 시험관 및 생체내 운반 비이클로 유용하다. RNA, DNA, 및 고유 비리온은 수성 내부에 포집되고, 생물학적 활성 형태로 세포로 운반된다. [Fraley, et al. (1981) Trends Biochem. Sci., 6:77 참고. 리포솜 비이클을 이용한 효과적인 유전자 전달 방법은 당분야에 공지되어 있다.[Mannino, et al. (1988) Biotechniques, 6:682, 1988].

[0347] 리포솜의 조성물은 통상 인지질의 조합으로, 스테로이드 (가령, 콜레스테롤)를 포함할 수 있다. 리포솜의 물리적 성질은 pH, 이온 강도 그리고 이가양이온 존재에 따라 달라진다. 다른 인지질 또는 다른 지질이 또한 이용될 수 있는데, 예를 들면 포스파티딜 화합물 (가령, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 스펜고리피드, 세레브로시드, 및 강글리오시드), 난 포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린, 및 디스테아로일포스파티딜콜린이 포함된다. 리포솜의 표적화는 예를 들면, 장기(organ)-특이성, 세포-특이성, 및 소기관-특이성에 기반을 두고, 당분야에 공지되어 있다.

[0348] 참고자료에 통합

[0349] 여기에 언급된 모든 간행물 및 특허는 각각의 개별 간행물 또는 특허가 구체적으로 개별적으로 참조로 포함되도록 지시된 것처럼 본원에 참고로 인용된다.

[0350] 주제의 특정 실시 예들이 논의되었지만, 상기 명세서는 예시적이고, 이에 한정되지 않는다. 본 명세서 및 청구 범위를 검토하면 많은 변형이 당업자에게 명백해질 것이다. 본 발명의 전체 범위는 그 균등물의 전체 범위 및 명세서와 함께 청구항을 참조하여 그러한 변형과 함께 결정되어야 한다.

- [0351] 구체예
- [0352] 지금부터 본 발명이 일반적으로 기술되며, 단지 본 발명의 특정 구체예 및 실시 양태는 예시하기 위한 목적으로 포함되는 것으로, 이에 본 발명을 제한하려는 의도는 아니며, 하기 실시 예를 참조함으로써 보다 용이하게 이해될 것이다.
- [0353] **실시예 1. ALK4:ActRIIB 이형이량체의 생성**
- [0354] 인간 ActRIIB 및 인간 ALK4의 세포의 도메인을 포함하는 가용성 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형화학적 복합체를 작제하였으며, 상기 세포의 도메인 각각은 이 세포의 도메인과 Fc 도메인 사이에 위치한 링커와 함께, 각각 별도로 Fc 도메인에 융합되어 있다. 개별 구조체는 차례로 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드로 지칭되며, 이들 각 서열은 하기에 제시된다.
- [0355] ActRIIB-Fc 또는 ALK4-Fc 동형이량체 복합체와 반대로, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형화학적 복합체의 형성을 촉진하는 방법은 비대칭 이형화학적 복합체 형성을 유도하기 위하여 Fc 도메인의 아미노산 서열에 변경을 도입시키는 것이다. Fc 도메인을 이용하여 비대칭 상호작용 짝을 만드는 많은 상이한 방법들이 본 명세서에서 설명된다.
- [0356] 한 가지 방법에서, 차례로 서열 번호: 39-41 및 42-44의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 폴리펩티드 서열에서 설명된 바와 같이, 하나의 Fc 도메인이 상호작용 면에 있는 양이온 아미노산을 도입시키도록 변경되고, 한편 또다른 Fc 도메인은 이 상호작용 면에 음이온 아미노산을 도입시키도록 변경된다. ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 및 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 각각 조직 플라스미노겐 활성화자 (TPA) 리더를 이용한다: MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSP (서열 번호: 38).
- [0357] ActRIIB-Fc 폴리펩티드 서열 (서열 번호: 39)은 하기에 나타낸다:
- ```

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열 번호: 39)

```
- [0358]
- [0359] 리더 (신호) 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 가능한 동형이량체 복합체보다는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 형성을 촉진시키기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (산성 아미노산이 리신으로 대체됨)이 ActRIIB 융합 단백질의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신 (K)이 제거된, 서열 번호: 39의 아미노산 서열이 제공된다.
- [0360] 이 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 다음의 핵산 서열 (서열 번호: 40)에 의해 인코딩된다:
- [0361] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
- [0362] 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGCGC CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
- [0363] 101 AGTGCATCTA CTACAAGGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
- [0364] 151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
- [0365] 201 CTCCTGGGCG AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
- [0366] 251 GGCTAGATGA CTCAACTGCT TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
- [0367] 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
- [0368] 351 GCGCTTCACT CATTGCGCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
- [0369] 401 CACCCCGGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC

[0370] 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA  
 [0371] 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG  
 [0372] 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  
 [0373] 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA  
 [0374] 651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT  
 [0375] 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA  
 [0376] 751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC  
 [0377] 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC AAGAACCAGG  
 [0378] 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG  
 [0379] 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC  
 [0380] 951 CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG  
 [0381] 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  
 [0382] 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG  
 [0383] 1101 TAAA (서열 번호: 40)

[0384] 성숙 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 41)는 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신(K)이 제거된다.

[0385] 1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT  
 [0386] 51 IELVKKGWL DDFNCYDRQE CVATEENPVQ YFCCCEGNFC NERFTHLPEA  
 [0387] 101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS  
 [0388] 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS  
 [0389] 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS  
 [0390] 251 RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLKSDGSF  
 [0391] 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKLSLS PGK

[0392] (서열 번호: 41)

[0393] 상보적 형태의 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 42)은 다음과 같다:

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD  
 51 GACMVSIENL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD  
 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF  
 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP  
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG  
 251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY  
 301 DTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL  
 351 SLSPG (서열 번호: 42)

[0394] 리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 상기 서열 번호: 39 및 41의 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 함께 이형 이량체 형성을 유도하기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (리신이 아스파르트산으로 대체됨)이 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인으로 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단에 리신(K)이 추가된, 서열 번호: 42의 아미노산 서열이 제공될 수 있다.

[0396] ALK4-Fc 융합 단백질은 다음 핵산 (서열 번호: 43)에 의해 인코딩된다:

[0397] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC

[0398] 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC

[0399] 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT

[0400] 151 GGGGCGCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT

[0401] 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT

[0402] 251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTAACTGAC

[0403] 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC

[0404] 351 TGAGACCCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAATCACA

[0405] 401 CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC

[0406] 451 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA

[0407] 501 GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT

[0408] 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG

[0409] 601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT

[0410] 651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA

[0411] 701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG

[0412] 751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT

[0413] 801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA

[0414] 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACACTAC

[0415] 901 GACACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG

[0416] 951 CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT

[0417] 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC

[0418] 1051 TCCCTGTCTC CGGGT (서열 번호: 43)

[0419] 성숙 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 44)는 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단에 리신(K)이 추가된다.

[0420] 1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV

[0421] 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG

[0422] 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD

[0423] 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN

[0424] 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL

[0425] 251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP PVLDSGDSFF LYSDLTVDKS

[0426] 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (서열 번호: 44)

[0427] 차례로 서열 번호: 41 및 서열 번호:44의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 단백질은 CHO 세포계에서 공동-발현되고, 정제되어, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc을 포함하는 이형화합성 복합체가 생성될 수 있다.

[0428] 비대칭 Fc 융합 단백질을 이용한 이형다량체 복합체들의 형성을 촉진시키는 또다른 방법에서, 차례로 서열 번호: 45-46 및 47-48의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 폴리펩티드 서열에서 설명된 바와 같이, 상보적 소수성 상호작용과 추가적인 분자간 이황화결합을 도입하도록 Fc 도메인이 변경된다. ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 및 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 각각 조직 플라스미노겐 활성화자 (TPA) 리더를 이용한다: MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (서열 번호: 38).

[0429] ActRIIB-Fc 폴리펩티드 서열 (서열 번호: 45)은 하기에 나타낸다:

```

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

```

[0430] 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열 번호: 45)

[0431] 리더 (신호)서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 가능한 동형이량체 복합체보다는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 형성을 촉진시키기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (세린이 시스테인으로 그리고 트레오닌이 트립토판으로 대체됨)이 상기 융합 단백질의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신 (K)이 제거된, 서열 번호: 45의 아미노산 서열이 제공된다.

[0432] 성숙 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 다음과 같다:

```

[0433] 1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
[0434] 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
[0435] 101 GGPEVITYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
[0436] 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
[0437] 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
[0438] 251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
[0439] 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

```

[0440] (서열 번호: 46)

[0441] 상보적 형태의 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 47) 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신 (K)이 제거될 수 있다.

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD  
51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD  
101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF  
151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP  
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAPI EKTISKAKG  
251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY  
301 KTTTPVLDSD GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL

351 SLSPGK (서열 번호: 47)

리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 상기 서열 번호: 45 및 46의 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 함께 이형 이량체 형성을 유도하기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 4개의 아미노산 치환이 ALK4 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인으로 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신 (K)이 제거된, 서열 번호: 47의 아미노산 서열이 제공된다.

성숙 ALK4-Fc 융합 단백질 서열은 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신(K)이 제거될 수 있다.

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV  
51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG  
101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN  
201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL  
251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGSGFF LVSKLTVDKS  
301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (서열 번호: 48)

차례로 서열 번호: 46 및 서열 번호: 48의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 단백질은 CHO 세포계에서 공동-발현되고, 정제되어, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc를 포함하는 이형화학적 복합체가 생성될 수 있다.

다양한 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 복합체들의 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 에피토프-기반 친화성 크로마토 그래피 (예를 들어, 항체 또는 ALK4 또는 ActRIIB상의 에피토프에 대해 지시된 항체 또는 기능적으로 동등한 리간드) 및 다중형태 크로마토 그래피 (예를 들어, 정전기 및 소수성 리간드를 모두 함유하는 수지와 함께). 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.

비대칭 Fc 융합 단백질을 이용한 이형다량체 복합체들의 형성을 촉진시키는 또다른 방법에서, 차례로 서열 번호: 70-73 및 74-77의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 폴리펩티드 서열에서 설명된 바와 같이, 상보적 소수성 상호작용과 추가적인 분자간 이황화결합을 도입, 그리고 순수한 분자 전하에 기초한 정제를 촉진하기 위한 2 개의 Fc 도메인 사이의 정전 차이를 유도하도록 Fc 도메인이 변경된다. ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 및 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 각각 조직 플라스미노겐 활성화자 (TPA) 리더를 이용한다: MDAMKRG LCCVLLLCGAVFVSP (서열 번호: 38).

[0455] ActRIIB-Fc 폴리펩티드 서열 (서열 번호: 70)은 하기에 나타낸다:

```

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREMT ENQVSLWCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQD SLSLSPG (서열 번호: 70)

```

[0456]

[0457] 리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 가능한 동형이량체 복합체보다는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 형성을 촉진시키기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (세린이 시스테인으로 그리고 트레오닌이 트립토판으로 대체됨)이 상기 융합 단백질의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. 상기 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 정제를 용이하게 하기 위하여, 2개의 아미노산 치환 (리신을 산성 아미노산로 치환)이 융합 단백질의 Fc 도메인으로 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단에 리신이 추가된, 서열 번호: 70의 아미노산 서열이 제공될 수 있다.

[0458] ActRIIB-Fc 융합 단백질은 다음 핵산 (서열 번호: 71)에 의해 인코딩된다:

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
201 CTCCTGGGCG AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
401 CACCCCGGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTG CACCAGGACT
701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGCAGC CCCGAGAACC
801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATGCCGGA GGAGTGACC GAGAACCAGG
851 TCAGCCTGTG GTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGGAC AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG

```

[0481] 1101 T (서열 번호: 71)

[0482] 상숙 ActRIIB-Fc 융합 단백질 서열 (서열 번호: 72)은 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 추가될 수 있다.

[0483] 1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

[0484] 51 IELVKKG CWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

[0485] 101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS

[0486] 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS

[0487] 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC

[0488] 251 REEMTENQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF

[0489] 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQDSL SLS PG

[0490] (서열 번호: 72)

[0491] ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 핵산 (서열 번호: 73)에 의해 인코딩된다:

[0492] 1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAAC TG

[0493] 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC

[0494] 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCAACAG CTCTGGCACC

[0495] 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA

[0496] 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG TACTTCTGCT

[0497] 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT

[0498] 301 GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACCGGTGG

[0499] 351 TGGAATCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC

[0500] 401 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC

[0501] 451 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC

[0502] 501 TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA

[0503] 551 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC

[0504] 601 GTCCTACCG TCCTGCACCA GGA CTGGCTG AATGGCAAG AGTACAAGTG

[0505] 651 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA

[0506] 701 AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACACAGG TGTACACCCT GCCCCATGC

[0507] 751 CGGGAGGAGA TGACCGAGAA CCAGGTCAGC CTGTGGTGCC TGGTCAAAGG

[0508] 801 CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG

[0509] 851 AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGA CTCCGA CGGCTCCTTC

[0510] 901 TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA

[0511] 951 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC

[0512] 1001 AGGACAGCCT CTCCTGTCT CCGGGT (서열 번호: 73)

[0513] 상보적 형태의 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 74) 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거될 수 있다.

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD  
 51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD  
 101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF  
 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDF EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP  
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKLPAP IEKTISKAKG  
 251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESRGQPENNY  
 301 KTTTPVLDSE GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL  
 351 SLSPGK (서열 번호: 74)

[0514]

[0515]

리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 상기 서열 번호: 70 및 72를 갖는 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 함께 이형이량체 형성을 유도하기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 4개의 아미노산 치환(티로신을 시스테인으로, 트레오닌을 세린으로, 류신을 알라닌으로, 티로신을 발린으로 치환함으로써)이 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인으로 도입될 수 있다. 상기 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 정제를 용이하게 하기 위하여, 2개의 아미노산 치환 (아스파라긴을 아르기닌으로, 그리고 아스파르트산을 아르기닌으로 치환)이 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인으로 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거된, 서열 번호: 74의 아미노산 서열이 제공된다.

[0516]

ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 핵산 (서열 번호: 75)에 의해 인코딩된다:

[0517]

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC

[0518]

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC

[0519]

101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT

[0520]

151 GGGGCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT

[0521]

201 GCGCACCTGC ATCCCCAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT

[0522]

251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC

[0523]

301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC

[0524]

351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAACCTACA

[0525]

401 CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC

[0526]

451 CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA

[0527]

501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCTT GAGGTCAAGT

[0528]

551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG

[0529]

601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT

[0530]

651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA

[0531]

701 ACAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCAA AGCCAAAGGG

[0532]

751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTGCACCTG CCCCCATCC GGGAGGAGAT

[0533]

801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGTCTGCGC CGTCAAAGGC TTCTATCCCA

[0534]

851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCCGCG GGCAGCCGGA GAACAACTAC

[0535]

901 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCGCG GGCTCCTTCT TCCTCGTGAG

[0536]

951 CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT

[0537]

1001 GTCCTGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC

[0538]

1051 TCCCTGTCTC CGGGTAAA (서열 번호: 75)

[0539]

성숙 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 서열은 다음 (서열 번호: 76)과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제

거될 수 있다.

[0540] 1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV  
 [0541] 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG  
 [0542] 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 [0543] 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN  
 [0544] 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL  
 [0545] 251 SCAVKGFPYS DIAVEWESRG QPENNYKTTP PVLDSRGSFF LVSKLTVDKS  
 [0546] 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK (서열 번호: 76)

ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 핵산 (서열 번호: 77)에 의해 인코딩된다:

[0548] 1 TCCGGGCCCC GGGGGGTCCA GGCTCTGCTG TGTGCGTGCA CCAGCTGCCT  
 [0549] 51 CCAGGCCAAC TACACGTGTG AGACAGATGG GGCCTGCATG GTTCCATTT  
 [0550] 101 TCAATCTGGA TGGGATGGAG CACCATGTGC GCACCTGCAT CCCCAGGTG  
 [0551] 151 GAGCTGGTCC CTGCCGGGAA GCCCTTCTAC TGCCTGAGCT CGGAGGACCT  
 [0552] 201 GCGCAACACC CACTGTGCTG AACTGACTA CTGCAACAGG ATCGACTTGA  
 [0553] 251 GGGTGCCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC CATGTGGGGC  
 [0554] 301 CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCACCGT GCCCAGCACC  
 [0555] 351 TGAACCTCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCTT CTTCCTCCCA AAACCAAGG  
 [0556] 401 ACACCTCATG GATCTCCCGG ACCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 [0557] 451 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT  
 [0558] 501 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA  
 [0559] 551 CGTACCGTGT GGTACGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT  
 [0560] 601 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT  
 [0561] 651 CGAGAAAACC ATCTCAAAG CCAAAGGGCA GCCCGAGAA CCACAGGTGT  
 [0562] 701 GCACCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTACGCTG  
 [0563] 751 TCCTGCGCGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA  
 [0564] 801 GAGCCGCGGG CAGCCGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG  
 [0565] 851 ACTCCGCGGG CTCCTTCTTC CTCGTGAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC  
 [0566] 901 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT  
 [0567] 951 GCACAACCAC TACACGAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GTAAAA

(서열 번호: 77)

차레로 서열 번호: 72 및 서열 번호:76의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 단백질은 CHO 세포계에서 공동-발현되고, 정제되어, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc을 포함하는 이형화학적 복합체가 생성될 수 있다.

다양한 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 복합체들의 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 그리고 에피토프-기반 친화성 크로마토 그래피 (예를 들어, 항체 또는 ALK4 또는 ActRIIB상의 에피토프에 대해 지시된 항체 또는 기능적으로 동등한 리간드) 및 다중형태 크로마토 그래피 (예를 들어, 정전기 및 소수성 리간드를 모두 함유하는 수지와 함께).

상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.

[0571] 비대칭 Fc 융합 단백질을 이용한 이형다량체 복합체들의 형성을 촉진시키는 또다른 방법에서, 차례로 서열 번호: 78-81 및 47, 48, 82, 및 83의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 폴리펩티드 서열에서 설명된 바와 같이, Fc 도메인은 상보적 소수성 상호작용과 추가적인 분자간 이황화결합을 도입하기 위하여, 그리고 단백질 A 친화력에 근거한 정제의 용이성을 위하여 ActRIIB-Fc 폴리펩티드에서 특이적으로 히스티딘에서-아르기닌-으로의 치환을 위하여 변경된다. ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 및 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 각각 TPA 리더를 이용한다: MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSP (서열 번호: 38).

[0572] ActRIIB-Fc 폴리펩티드 서열 (서열 번호: 78)은 하기에 나타낸다:

```

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQ
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNRYTQK SLSLSPGK (서열 번호: 78)

```

[0573]

[0574] 리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 가능한 동형이량체 복합체보다는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 형성을 촉진시키기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (세린이 시스테인으로 그리고 트레오닌이 트립토판으로 대체됨)이 상기 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. 상기 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 정제를 실행하기 위하여 상기 두줄도 표시된 융합 단백질의 Fc 도메인 안으로 또다른 아미노산 치환 (히스티딘을 아르기닌으로 대체)이 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거된, 서열 번호: 78의 아미노산 서열이 제공된다.

[0575] ActRIIB-Fc 융합 단백질은 다음 핵산 (서열 번호: 79)에 의해 인코딩된다:

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGAGGCT GAGACACGGG
101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
151 GGCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
251 GGCTAGATGA CTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
401 CACCCCGGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGA CTCACACATG CCCACCGTGC
451 CCAGCACCTG AACTCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAAA
501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGG AGGAGCAGTA
651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGCAGC CCCGAGAACC
801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATGCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG

```

[0593] 851 TCAGCCTGTG GTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG  
 [0594] 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC  
 [0595] 951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG  
 [0596] 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  
 [0597] 1051 GAGGCTCTGC ACAACCGCTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG  
 [0598] 1101 TAAA (서열 번호: 79)

[0599] 성숙 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 (서열 번호: 80)과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거될 수 있다.

[0600] 1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT  
 [0601] 51 IELVKKG CWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA  
 [0602] 101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS  
 [0603] 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS  
 [0604] 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC  
 [0605] 251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF  
 [0606] 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN RYTQKSLSLS PGK  
 [0607] (서열 번호: 80)

[0608] ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 핵산 (서열 번호: 81)에 의해 인코딩된다:

[0609] 1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAAC TG  
 [0610] 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC  
 [0611] 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCAACAG CTCTGGCACC  
 [0612] 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA  
 [0613] 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT  
 [0614] 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT  
 [0615] 301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACCGGTGG  
 [0616] 351 TGGAAC TAC ACATGCCCAC CGTGCCAGC ACCTGAATC CTGGGGGGAC  
 [0617] 401 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC  
 [0618] 451 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC  
 [0619] 501 TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA  
 [0620] 551 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC  
 [0621] 601 GTCCTACCG TCCTGCACCA GGA CTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG  
 [0622] 651 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA  
 [0623] 701 AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACACAGG TGTACACCCT GCCCCATGC  
 [0624] 751 CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGTGGTGCC TGGTCAAAGG  
 [0625] 801 CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG  
 [0626] 851 AGAACA ACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC  
 [0627] 901 TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA

- [0628] 951 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CGCTACACGC
- [0629] 1001 AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGTAAA (서열 번호: 81)
- [0630] ALK4-Fc 융합 폴리펩티드의 보체 형태는 서열 번호: 47 (상기에 나타냄)이며, 이것은 서열 번호: 78 및 80의 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 이형이량체 형성을 유도하기 위하여 4개의 아미노산 치환을 포함하며, 그리고 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거될 수 있다.
- [0631] ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 핵산 (서열 번호: 82)에 의해 인코딩된다:
- [0632] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
- [0633] 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGTC CAGGCTCTGC
- [0634] 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
- [0635] 151 GGGGCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
- [0636] 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
- [0637] 251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
- [0638] 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
- [0639] 351 TGAGACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAAGTCACA
- [0640] 401 CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
- [0641] 451 CTCTTCCCC CAAAACCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
- [0642] 501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
- [0643] 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
- [0644] 601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTACCGT
- [0645] 651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
- [0646] 701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCAA AGCCAAAGGG
- [0647] 751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTGCACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT
- [0648] 801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGTCTGCGC CGTCAAAGGC TTCTATCCCA
- [0649] 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
- [0650] 901 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCGTGAG
- [0651] 951 CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
- [0652] 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
- [0653] 1051 TCCCTGTCTC CCGGTAAA (서열 번호: 82)
- [0654] 성숙 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 서열은 서열 번호: 48(상기에 나타냄)과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거될 수 있다.
- [0655] ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 핵산 (서열 번호: 83)에 의해 인코딩된다:
- [0656] 1 TCCGGGCCCC GGGGGGTCCA GGCTCTGCTG TGTGCGTGCA CCAGCTGCCT
- [0657] 51 CCAGGCAAC TACACGTGTG AGACAGATGG GGCCTGCATG GTTCCATTT
- [0658] 101 TCAATCTGGA TGGGATGGAG CACCATGTGC GCACCTGCAT CCCCAGGTG
- [0659] 151 GAGCTGGTCC CTGCCGGGAA GCCCTTCTAC TGCCTGAGCT CGGAGGACCT
- [0660] 201 GCGCAACACC CACTGCTGCT AACTGACTA CTGCAACAGG ATCGACTTGA

[0661] 251 GGGTGCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC CATGTGGGGC  
 [0662] 301 CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCACCGT GCCCAGCACC  
 [0663] 351 TGAACCTCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCAAGG  
 [0664] 401 ACACCTCAT GATCTCCCGG ACCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC  
 [0665] 451 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT  
 [0666] 501 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA  
 [0667] 551 CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT  
 [0668] 601 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT  
 [0669] 651 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT  
 [0670] 701 GCACCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG  
 [0671] 751 TCCTGCGCCG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA  
 [0672] 801 GAGCAATGGG CAGCCGAGGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG  
 [0673] 851 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCGTGAGCA AGCTACCGT GGACAAGAGC  
 [0674] 901 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT  
 [0675] 951 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAA

[0676] (서열 번호: 83)

[0677] 차례로 서열 번호: 80 및 서열 번호:48의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 단백질은 CHO 세포계에서 공동-발현되고, 정제되어, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc을 포함하는 이형화합성 복합체가 생성될 수 있다.

[0678] 다양한 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 복합체들의 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 에피토프-기반 친화성 크로마토 그래피 (예를 들어, 항체 또는 ALK4 또는 ActRIIB상의 에피토프에 대해 지시된 항체 또는 기능적으로 동등한 리간드) 및 다중형태 크로마토 그래피 (예를 들어, 정전기 및 소수성 리간드를 모두 함유하는 수지와 함께). 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.

[0679] **실시예 2. ActRIIB-Fc 동형이량체 및 ALK4-Fc 동형이량체와 비교하여 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 리간드 결합 프로파일**

[0680] 상기에서 설명된 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체성 복합체의 리간드 결합 선택성을 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 동형이량체 복합체의 것과 비교하기 위하여 Biacore<sup>TM</sup>-기반의 결합 분석이 이용되었다.복합체, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체, ActRIIB-Fc 동형이량체, 및 ALK4-Fc 동형이량체는 항-Fc 항체를 이용하여 상기 시스템에 독립적으로 포집되어 있다. 리간드들을 주입하고, 포집된 수용체 단백질을 위로 흐르도록 하였다. 결과는 아래 표에 요약되어 있고, 효과적인 리간드 트랩의 리간드 해리속도( $k_d$ )는 회색 음영으로 나타낸다.

| ActRIIB-Fc 동형이량체와 ALK4-Fc 동형이량체와 비교하여 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 리간드 결합 프로파일 |                   |                      |               |                   |                      |               |                          |                      |               |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|---------------|-------------------|----------------------|---------------|--------------------------|----------------------|---------------|
| 리간드                                                                         | ActRIIB-Fc 동형이량체  |                      |               | ALK4-Fc 동형이량체     |                      |               | ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체 |                      |               |
|                                                                             | $k_a$<br>(1/Ms)   | $k_d$<br>(1/s)       | $K_D$<br>(pM) | $k_a$<br>(1/Ms)   | $k_d$<br>(1/s)       | $K_D$<br>(pM) | $k_a$<br>(1/Ms)          | $k_d$<br>(1/s)       | $K_D$<br>(pM) |
| 액티빈 A                                                                       | $1.2 \times 10^7$ | $2.3 \times 10^{-4}$ | 19            | $5.8 \times 10^5$ | $1.2 \times 10^{-2}$ | 20000         | $1.3 \times 10^7$        | $1.5 \times 10^{-4}$ | 12            |
| 액티빈 B                                                                       | $5.1 \times 10^6$ | $1.0 \times 10^{-4}$ | 20            | 결합없음              |                      |               | $7.1 \times 10^6$        | $4.0 \times 10^{-5}$ | 6             |
| BMP6                                                                        | $3.2 \times 10^7$ | $6.8 \times 10^{-3}$ | 190           | ---               |                      |               | $2.0 \times 10^6$        | $5.5 \times 10^{-3}$ | 2700          |
| BMP9                                                                        | $1.4 \times 10^7$ | $1.1 \times 10^{-3}$ | 77            | ---               |                      |               | 일과성*                     |                      | 3400          |
| BMP10                                                                       | $2.3 \times 10^7$ | $2.6 \times 10^{-4}$ | 11            | ---               |                      |               | $5.6 \times 10^7$        | $4.1 \times 10^{-3}$ | 74            |
| GDF3                                                                        | $1.4 \times 10^6$ | $2.2 \times 10^{-3}$ | 1500          | ---               |                      |               | $3.4 \times 10^6$        | $1.7 \times 10^{-2}$ | 4900          |
| GDF8                                                                        | $8.3 \times 10^5$ | $2.3 \times 10^{-4}$ | 280           | $1.3 \times 10^5$ | $1.9 \times 10^{-3}$ | 15000†        | $3.9 \times 10^5$        | $2.1 \times 10^{-4}$ | 550           |
| GDF11                                                                       | $5.0 \times 10^7$ | $1.1 \times 10^{-4}$ | 2             | $5.0 \times 10^6$ | $4.8 \times 10^{-3}$ | 270†          | $3.8 \times 10^7$        | $1.1 \times 10^{-4}$ | 3             |
| * 상호작용의 일시적 성질로 인한 중간생성물<br>† 매우 낮은 신호<br>--- 테스트안됨                         |                   |                      |               |                   |                      |               |                          |                      |               |

[0681]

[0682]

이들 비교 결합 데이터는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc 또는 ALK4-Fc 동형이량체에 대하여 변경된 결합 프로파일/선택성을 갖는다는 것이 실증한다. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 동형이량체와 비교하여 액티빈 B에 대하여 강화된 결합을 보이며, ActRIIB-Fc 동형이량체에서 관찰된 바와 같이, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11에 대하여 강력한 결합을 유지하고, 그리고 BMP9, BMP10, 및 GDF3에 대하여 실질적으로 감소된 결합을 나타낸다. 구체적으로, BMP9는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체에 대하여 낮은 친화력 또는 탐지불가능한 친화력을 나타내고, 한편 이 리간드는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체에 강력하게 결합한다. ActRIIB-Fc 동형이량체와 마찬가지로, 상기 이형이량체는 BMP6에 대하여 중간-수준의 결합을 유지한다. 도 4 참고

[0683]

또한, A-204 리포터(Reporter) 유전자분석을 이용하여 액티빈 A, 액티빈 B, GDF11, GDF8, BMP10, 및 BMP9에 의한 신호전달에 있어서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체와 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체의 효과를 평가하였다. 세포 계통: 인간 횡문근육종 (근육에서 유도). 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12 (Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100에서 설명됨). CAGA12 모티프는 TGFβ-반응성 유전자 (예를 들면, PAI-1 유전자)에 존재하며, 이 벡터는 SMAD2 및 SMAD3을 통한 신호생성 인자에 일반적으로 사용된다. 예시적인 A-204 리포터 유전자분석은 하기에 개요가 설명된다.

[0684]

1일차: 48-웰 플레이트에 A-204 세포를 분열시킨다.

[0685]

2일차: A-204 세포는 10 ug pGL3(CAGA)12 또는 pGL3(CAGA)12(10 ug)+pRLCMV (1 ug) 및 Eugene로 형질감염시킨다.

[0686]

3일차: 인자들을 추가한다 (배지+0.1% BSA로 희석됨). 억제제는 세포에 추가하기 전, 약 1 시간 동안 인자들로 사전 배양될 필요가 있다. 약 6시간 후, 세포는 PBS로 행구고, 그 다음 용해된다.

[0687]

상기 단계 후, 출원인은 루시페라제 분석을 시행하였다.

[0688]

ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체와 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체는 모두 이 분석에서 액티빈 A, 액티빈 B, GDF11, 및 GDF8의 강력한 억제제로 결정되었다. 구체적으로, 도 7에서 설명된 비교 동형이량체/이형이량체 IC<sub>50</sub> 데이터에서 볼 수 있는 바와 같이, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체와 유사하게 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11 신호전달 경로를 억제한다. 그러나, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 BMP9 및 BMP10 신호전달 경로 억제는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하여 상당히 감소된 것이다. 이 데이터는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체와 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체 모두가 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11에 강력한 결합을 나타내지만, BMP10 및 BMP9는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하여, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체에 대하여 상당히 감소된 친화력을 갖는 것으로 관찰된 상기-논의된 결합 데이터와 일치한다.

[0689] 이와 함께, 이들 데이터에서 따라서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하였을 때, 액티빈 B, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11의 더 강한 선택적 길항제임을 실증한다. 따라서, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 특정 용도에서 ActRIIB-Fc 동형이량체보다 더 유용할 것이며, 이때 이러한 선택적 길항작용이 유지되지만, 하나 또는 그 이상의 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, GDF8, 및 GDF11의 길항작용을 유지하지만, 하나 또는 그 이상의 BMP9, BMP10, GDF3, 및 BMP6의 길항작용은 최소화시키는 것이 바람직한 치료 용도를 포함한다.

[0690] 실시예 3. 마우스에서 ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하였을 때, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 활성 프로파일

[0691] 동형이량체와 이형이량체성 복합체들은 생체내 활성 프로파일의 차이를 조사하기 위하여 마우스에서 테스트되었다. 야생형 C57BL/6 마우스에게 대략 10 주령에서 시작하여 4주간 주당 2회 ActRIIB-Fc 동형이량체 (10 mg/kg), ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체 (3 또는 10 mg/kg), 또는 비이클 (인산염-완충된 염수, PBS)을 피하로 투여하였다 (한 집단에서 n = 9마리). ALK4-Fc 동형이량체는 표면 플라즈몬 공명에서 측정하였을 때 무-세포 조건하에서 높은 친화력으로 리간드에 결합하는 능력이 없기 때문에 생체내에서 테스트되지 않았다. 연구 중점은 다음을 포함한다: 체중; 시작 및 연구 종료(4주)에 핵자기공명(NMR)에 의해 측정된 체지방량 및 지방총량; 시작 및 연구 종료(4주)에 이중 에너지 X-선 흡광분석(DEXA)에 의해 측정된 총 골 미네랄 밀도; 그리고 4주차에 측정된 비복근(gastrocnemius), 대퇴직근, 및 흉근의 중량.

| 야생형 마우스에서 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 복합체들의 활성                                                  |       |                                 |                             |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------------------------|-----------------------------|-----------|
| 중점<br>(4 주)                                                                              | 비이클   | ActRIIB-Fc<br>동형이량체<br>10 mg/kg | ALK4-Fc:ActRIIB-Fc<br>이형이량체 |           |
|                                                                                          |       |                                 | 10 mg/kg                    | 3 mg/kg   |
| 기준으로부터 체중 변화                                                                             | ↑ 15% | ↑ 38% **                        | ↑ 41% **                    | ↑ 33% **  |
| 기준으로부터 체지방량<br>변화                                                                        | ↓ 1%  | ↑ 5% **                         | ↑ 5% **                     | ↑ 5% **   |
| 기준으로부터 지방총량<br>변화                                                                        | ↑ 5%  | ↓ 3.6% **                       | ↓ 3.5% **                   | ↓ 3.5% ** |
| Change in total bone mineral<br>density from baseline                                    | ↑ 8%  | ↑ 14% *                         | ↑ 12% *                     | ↑ 11%     |
| 비복근 중량 †                                                                                 | 23    | 36 **                           | 35 **                       | 30 **     |
| 대퇴직근 중량 †                                                                                | 11.5  | 17 **                           | 16 **                       | 14 **     |
| 흉근 중량 †                                                                                  | 15    | 23 **                           | 28 **                       | 23 **     |
| *P < 0.05 vs. 비이클<br>**P < 0.01 vs. 비이클<br>† 체격 관리를 위하여 좌우 근육량의 복합을 넓다리뼈 길이 (mm)로 표준화시켰다 |       |                                 |                             |           |

[0692]

[0693] 연구 결과는 상기 표에 요약된다. 예상한 바와 같이, ActRIIB-Fc 동형이량체는 신체 조성물에서 상당한 변화를 여기하였고, 이는 GDF8 및 액티빈 억제에 공지 효과와 연관된다. 비이클-처리된 대조군과 비교하여, 연구 전과정에 걸쳐 ActRIIB-Fc 동형이량체로 야생형 마우스를 처리하면 체중 증가가 2배 이상되었다. 이 순 체중 증가와 함께 체지방량과 총 골 미네랄 밀도의 유의적인 증가뿐만 아니라, 비이클과 비교하여 지방총량의 현저한 감소가 있었다. 체지방 (전형적으로 마우스의 체중의 약 70%)이 지방량 (전형적으로 체중의 약 10%)보다 훨씬 더 많기 때문에, 체지방 및 지방 조직에서 표준화된(백분율-기반) 변화는 이들 대응에서 절대 변화와는 상이하다는 점을 인지해야 한다. 비복근, 대퇴근, 및 흉근이 포함된 개별 골근육은 ActRIIB-Fc 동형이량체를 이용한 치료 과정에서 비이클 대조와 비교하여 중량에서 모두 유의적으로 증가되었다.

[0694] ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 이들 두 복합체의 차등적인 리간드 선택성에도 불구하고, ActRIIB-Fc 동형이량체와 놀라울 정도로 유사한 효과를 만든다. 상기 표에 나타난 바와 같이, 10 mg/kg의 용량 수준에서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체로 마우스를 치료하면, 열거된 모든 중점에 대하여 동일한 용량 수준에서 ActRIIB-Fc 동형이량체의 효과와 정합되거나, 거의 정합되거나, 또는 이 효과를 초과한다. 3 mg/kg에서 ALK4-Fc:ActRIIB-

Fc 이형이량체의 효과는 10 mg/kg과 비교하여 몇 가지 종점에서 약하게 감소되었으며, 따라서 투여분량-효과 상관관계에 대한 증거를 제시한다.

[0695] 따라서, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 골격근 및 뼈에는 유익한 동화성(anabolic) 효과를, 그리고 지방 조직에는 이화성(catabolic) 효과를 발휘하는데, 이들은 ActRIIB-Fc 동형이량체의 효과와 매우 유사하다. 그러나, ActRIIB 동형이량체와는 달리, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc는 일시적 결합만을 나타내고, 따라서 이들 리간드에 의해 매개되는 공정, 이를 테면 혈관신생의 동시에 억제하는 거의 없거나 없어야 할 것이다. 이 신규한 선택성은 예를 들면, 근육과 뼈에는 자극 효과를, 그리고 변경된 혈관신생은 필요하지 않지만, 지방에는 저해 효과를 필요로 하는 환자의 치료에 유용할 것이다.

[0696] **실시예 4. ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 신장 섬유증 및 염증을 억제하고, 신장 손상을 감소시킨다.**

[0697] 실시예 2에서 설명된 신장 질환에서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 효과는 마우스 한측면 수뇨관 폐색 모델에서 평가되었다. 가령, Klahr and Morrissey (2002) Am J Physiol Renal Physiol 283: F861-F875.

[0698] 24마리의 12주령의 C57BL/6 수컷 마우스는 신장의 하부 폴 수준에서 일측면 요관 결찰을 2회 받았다. 3 일 후, 8 마리의 마우스를 안락사시키고, 개별 동물의 신장을 수확하여 신장 손상을 평가하였다. 나머지 마우스는 무작위로 2집단으로 나누었다: i) 8마리 마우스에게 외과술 후 3일, 7일, 10일 및 14일차에 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체를 10mg/kg의 투여분량으로 피하 주사하였고, 그리고 ii) 8마리 마우스에게 외과술 후 3일, 7일, 10 일 및 14일차에 비이클 대조, 인산염 완충된 염수(PBS)로 피하 투여하였다. 두 집단은 관련 동물 관리 지침에 따라 17 일째에 희생되었다. UUO 신장과 반대쪽 신장 모두에서 조직학적 분석 (H & E, Masson 's 3색 (Trichrome) 염색)을 위해 개별 동물의 절반 신장을 수집하고, RNA 추출(RNeasy Midi Kit, Qiagen, IL)을 위해 1/4 신장을 사용했다.

[0699] 다양한 유전자의 수준을 평가하기 위해 UUO 신장 시료에 대한 유전자 발현 분석을 수행했다. 다양한 섬유증 유전자 (Col1a1, 피브로넥틴, PAI-1, CTGF, 및  $\alpha$ -SMA), 염증 유전자 (TNF $\alpha$ , 및 MCP1), 사이토킨 (TGF  $\beta$  1, TGF  $\beta$  2, TGF  $\beta$  3, 및 액티빈 A), 및 신장 손상 유전자 (NGAL)의 발현을 평가하기 위하여 CFX Connect™ Real-time PCR 탐지계 (Bio-Rad, CA)를 이용하여 QRT-PCR을 실행하였다. 도 8 참고. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체로 치료를 받은 마우스는 섬유증 및 염증 유전자의 발현이 상당히 억제되었고, TGF  $\beta$  1/2/3의 상향조절이 억제되었고, 그리고 신장 손상이 감소되었다. 조직학적 데이터에서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체 치료는 UUO 모델에서 신장 섬유증을 상당히 억제하였고, 신장 손상을 감소시켰다는 것이 확인되었다.

[0700] 이와 함께, 이들 데이터에서 ALK4:ActRIIB 이형다량체 치료는 신장 섬유증 및 염증을 억제하고, 신장 손상을 감소시킨다는 것이 실증되었다. 더욱이, 이들 데이터에서 예를 들면, ALK4 및/또는 ActRIIB-결합 리간드의 길항제, ALK4 및/또는 ActRIIB 수용체의 길항제, ALK4 및/또는 ActRIIB 하류 신호전달 중개물질 (가령, Smads)의 길항제, 그리고 ALK4 및/또는 ActRIIB와 연합된 TGF  $\beta$  슈퍼패밀리 공동-수용체의 길항체를 포함하는, 다른 ALK4:ActRIIB 길항제는 신장 질환의 치료 또는 예방에 유용할 수 있음을 나타낸다.

## 도면

### 도면1



도면2

도면3

```

IgG1 ----THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVKF 53
IgG4 ---ESKYGPPCPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQF 57
IgG2 -----VECPGPCAPPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVQF 51
IgG3 EPKSCDTPPPCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVQF 60
 * * * * * . * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

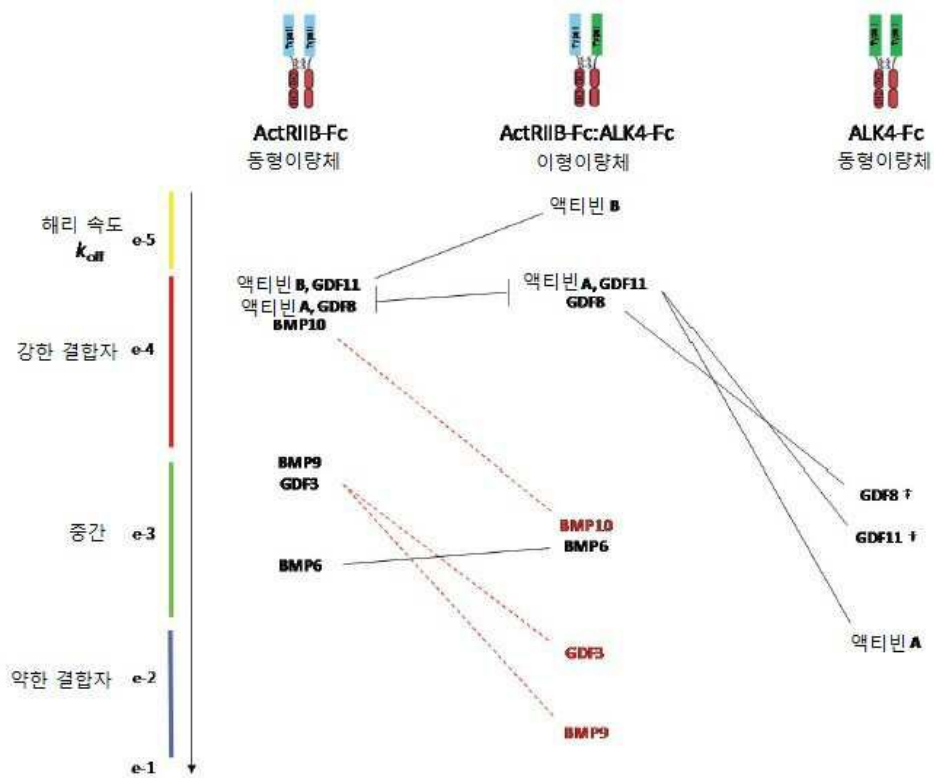
IgG1 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
IgG4 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117
IgG2 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111
IgG3 KMYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120
 : * * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *

IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 173
IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 177
IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 171
IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP 180
 * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *

IgG1 PVLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225
IgG4 PVLDSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK 229
IgG2 PMLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 223
IgG3 PMLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK 232
 * : * * * * * : * * * * * : * : * * * * * : : * * * * * * *

```

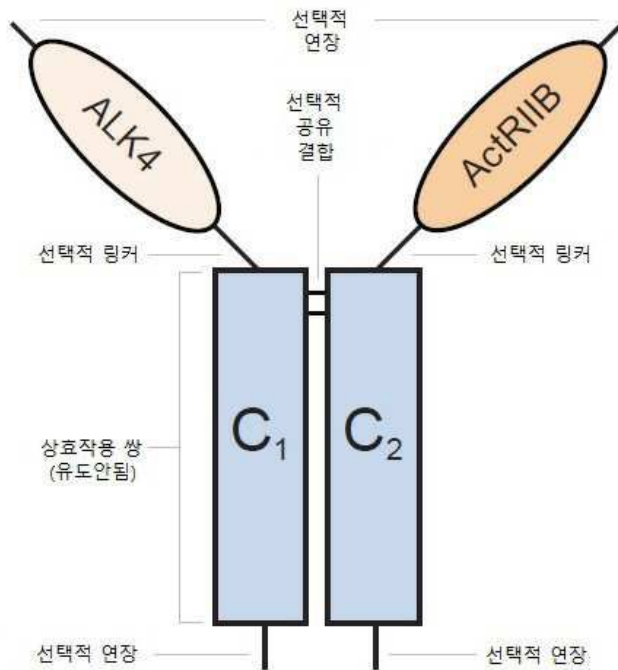
도면4



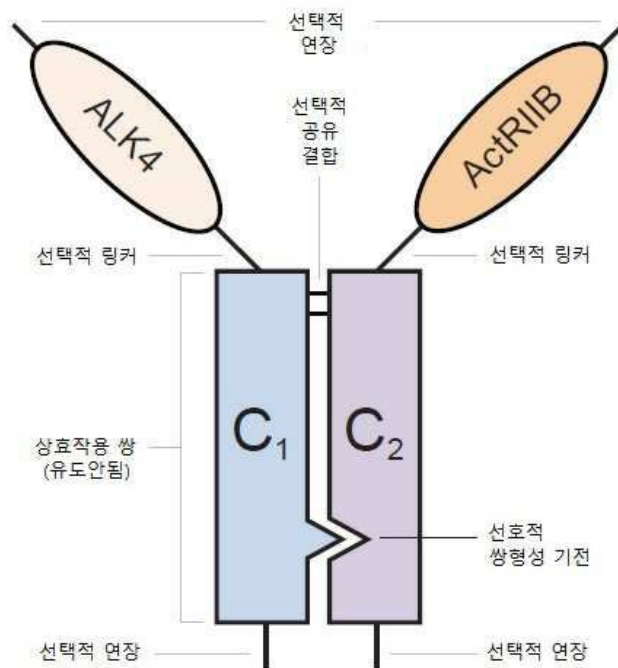
도면5

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

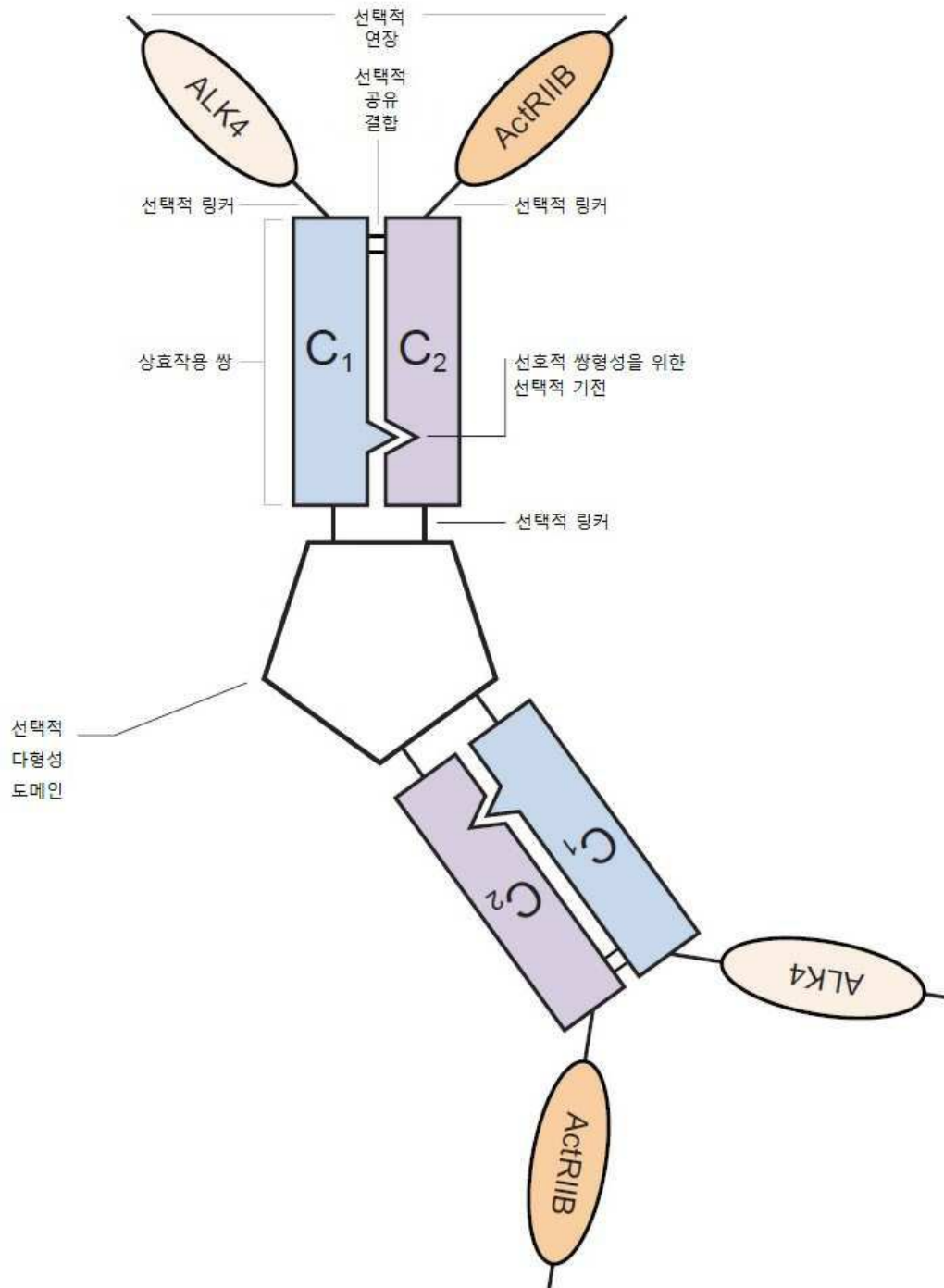
도면6a



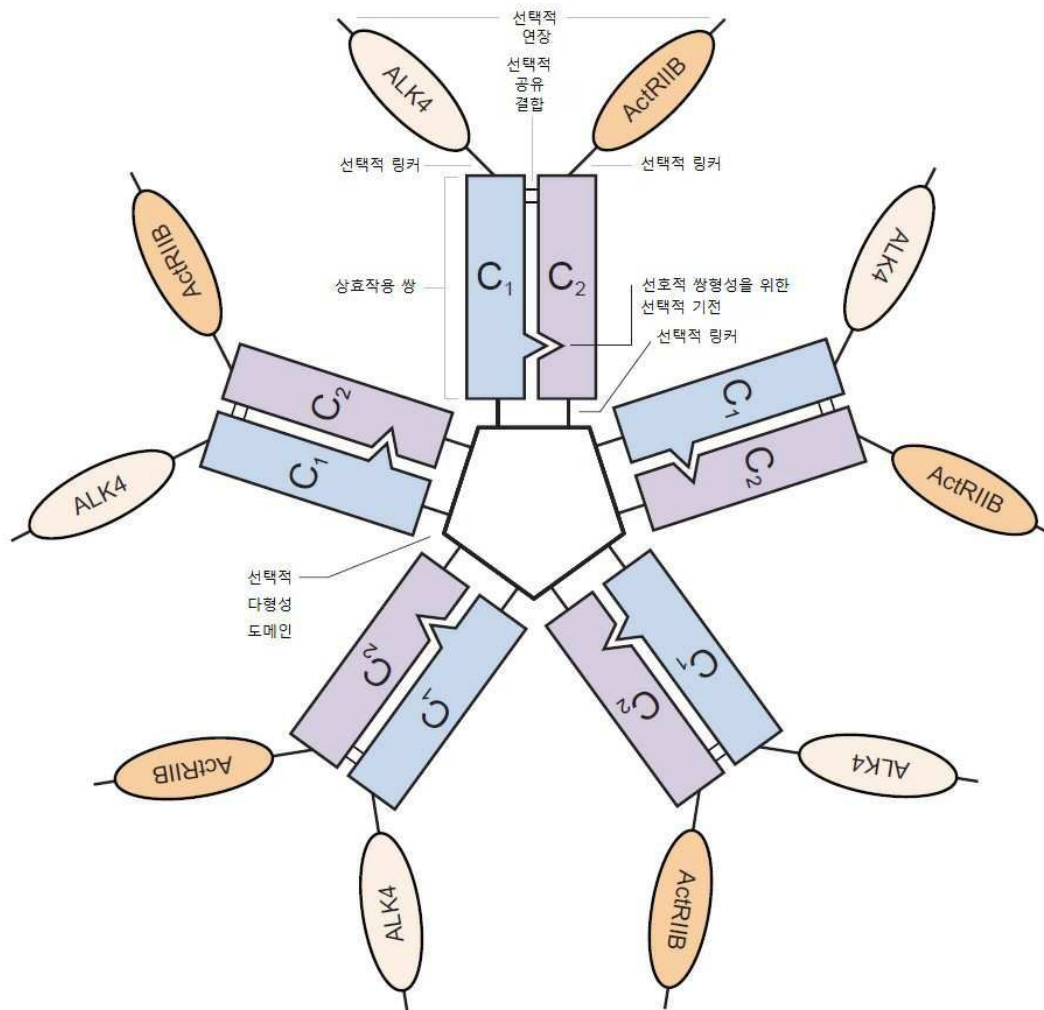
도면6b



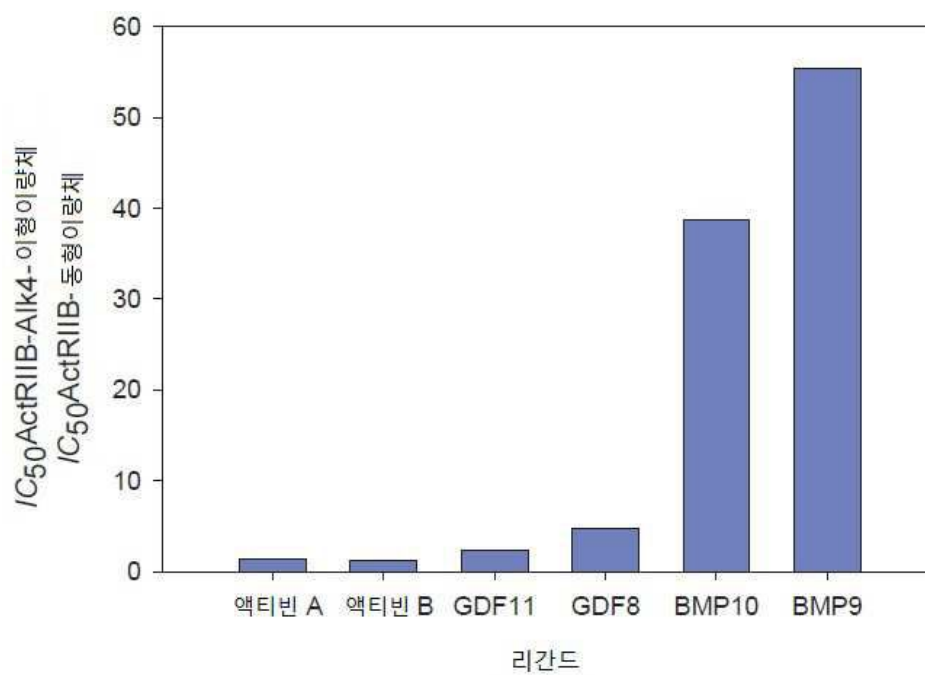
도면6c



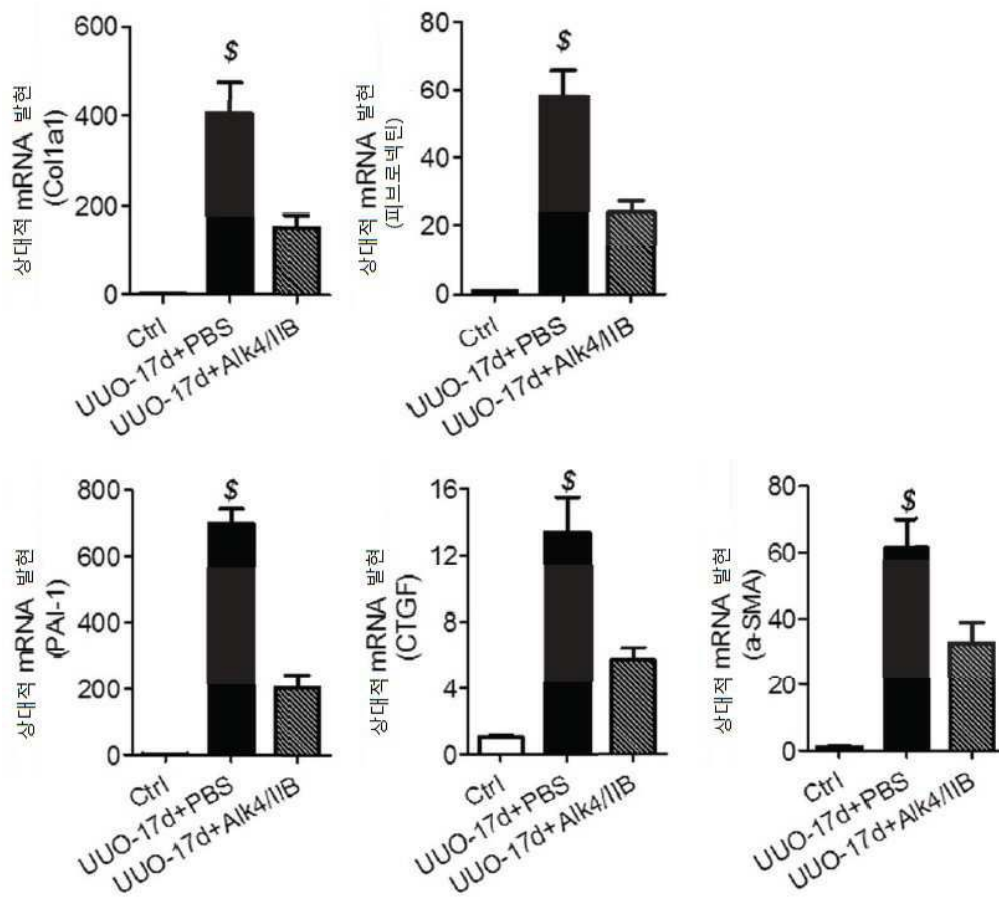
도면6d



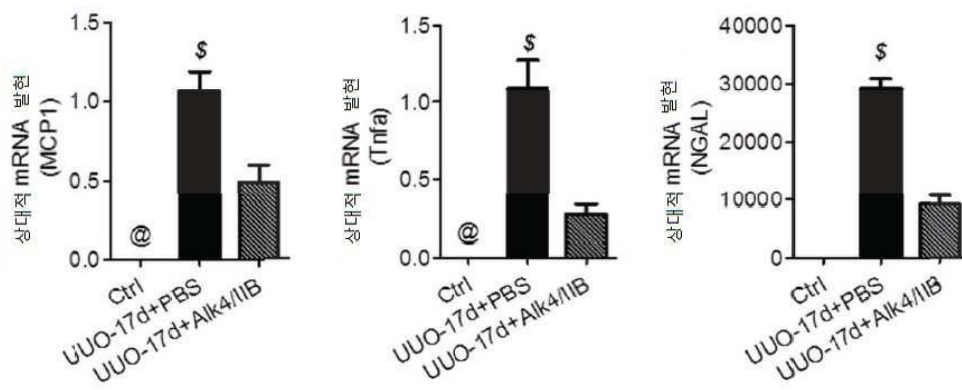
도면7



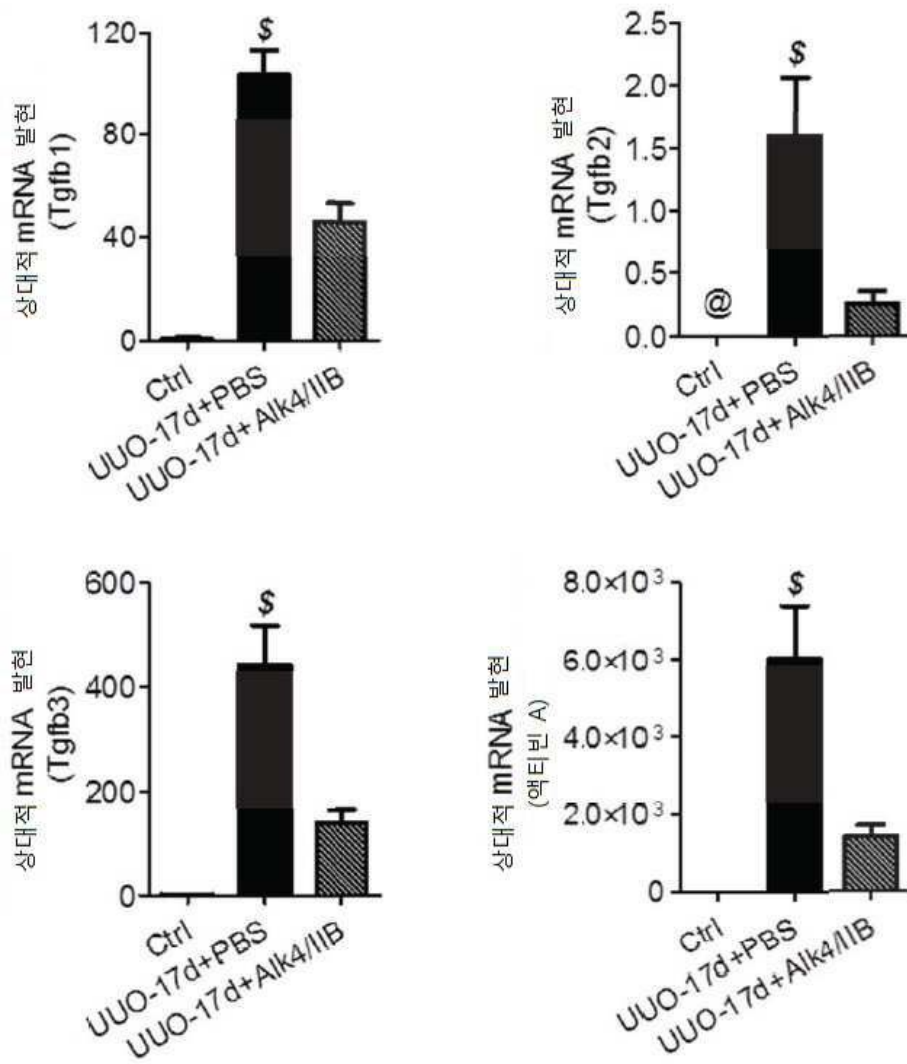
도면8a



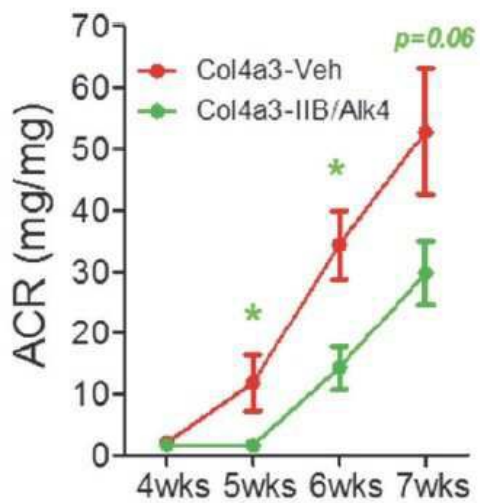
도면8b



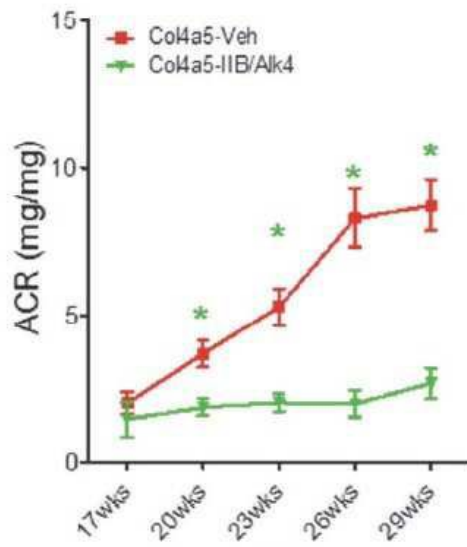
도면8c



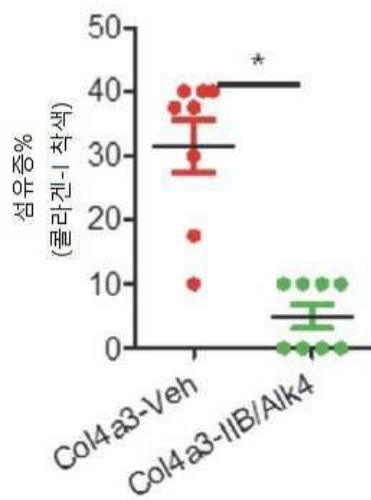
도면9a



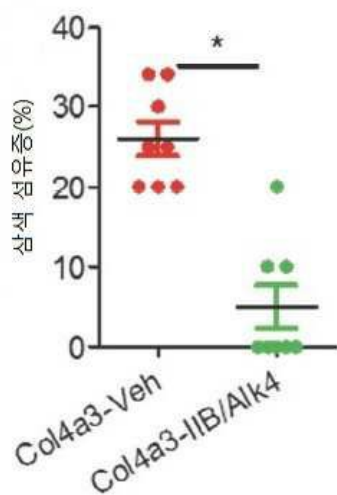
도면9b



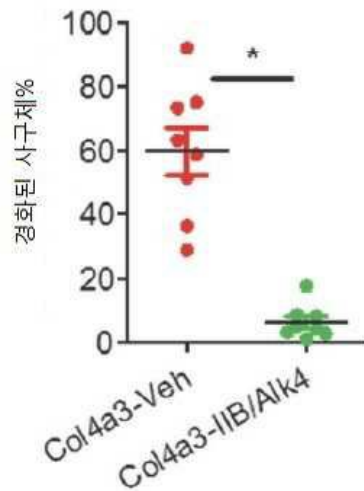
도면10a



도면10b



도면10c



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> ALK4:ACTRIIB HETEROMULTIMERS AND USES THEREOF

<130> 1848179-0002-117-W01

<140> PCT/US2017/055426

<141> 2017-10-05

<150> 62/510,417

<151> 2017-05-24

<150> 62/404,727

<151> 2016-10-05

<160> 84

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Trp Gly Ser Leu Cys

1 5 10 15

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
|                                                                 |     | 80  |
|                                                                 |     |     |
| Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
|                                                                 |     |     |
| Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
|                                                                 |     |     |
| Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys  
 275 280 285  
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp  
 290 295 300  
 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg  
 305 310 315 320  
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val  
 325 330 335  
  
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro  
 340 345 350  
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu  
 355 360 365  
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile  
 370 375 380  
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys  
 385 390 395 400  
  
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu  
 405 410 415  
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val  
 420 425 430  
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro  
 435 440 445  
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp  
 450 455 460  
  
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu  
 465 470 475 480  
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu  
 485 490 495  
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile  
 500 505 510

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

<210> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

Leu Pro Glu Ala  
100

<210> 4

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro

165 170 175

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu

180 185 190

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

195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys

210 215 220

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys

225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn

245 250 255

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser

260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys

275 280 285

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp

290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg

305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val

325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro

340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu

355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile

370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys

385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu

405 410 415  
Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val

420 425 430  
His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro

435 440 445  
Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp

450 455 460  
Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu

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

485 490 495  
Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile

500 505 510

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Pro Thr

115

<210> 6

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Pro Glu Ala

100

<210> 7

<

211> 1536

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtgcgc cggctctggg 60

cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120

accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180

gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggtg ctggctagat 240

gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccaggtgtac 300

ttctgctgct gtgaaggcaa ctctgcaac gaacgcttca ctcatTTGCC agaggctggg 360

ggcccggaag tcacgtacga gccacccccg acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420

tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgcTGGCctt ttggatgtac 480

cggcatcgca agcccccta cggTcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540

ccatccccctc ttgtgggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcggggggcg 600

tttgctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660

ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720

cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780

ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caagggaac 840

atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacagg cctctcatac 900

ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg 960

gactttaaaa gtaagaatgt attgtgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020

ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc 1080

acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140

ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtgc 1200

aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag 1260

caccttcgt tggaggagct gcaggagggt gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320

aaagatcact ggttgaacaa cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc 1380

tgggacctg atgcagaggc tcgttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440

attcggagggt cggTcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500

accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatc 1536

<210> 8

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gggcgtgggg aggtgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag 60

cgcaccaacc agagcggcct ggagcgctgc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc 120

tacgcctcct ggcgcaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaagg ctgctggcta 180

gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa ccccagggtg 240

tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgaacgt tcaTcattt gccagaggct 300

ggggggccgg aagtcacgta cgagccaccc ccgacagccc ccacc

345

<210> 9

<211> 505

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ala Glu Ser Ala Gly Ala Ser Ser Phe Phe Pro Leu Val Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu

20 25 30

Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr

35 40 45

Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His

50 55 60

His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys

65 70 75 80

Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys

85 90 95

Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His

100 105 110

Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Leu Val

115 120 125

Gly Ile Ile Ala Gly Pro Val Phe Leu Leu Phe Leu Ile Ile Ile Ile

130 135 140

Val Phe Leu Val Ile Asn Tyr His Gln Arg Val Tyr His Asn Arg Gln

145 150 155 160

Arg Leu Asp Met Glu Asp Pro Ser Cys Glu Met Cys Leu Ser Lys Asp

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Leu Pro Leu Phe Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Thr Ile Val

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Leu Gln Glu Ile Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Arg Trp Arg Gly Gly Asp Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Glu Arg Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp Asn |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| Gly Thr Trp Thr Gln Leu Trp Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Ser Leu Phe Asp Tyr Leu Asn Arg Tyr Thr Val Thr Ile Glu Gly Met |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Ile Lys Leu Ala Leu Ser Ala Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Met |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
|                                                                 |     |     |     |
| Glu Ile Val Gly Thr Gln Gly Lys Pro Gly Ile Ala His Arg Asp Leu |     |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |     |
| Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Met Cys Ala Ile Ala |     |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |     |
| Asp Leu Gly Leu Ala Val Arg His Asp Ala Val Thr Asp Thr Ile Asp |     |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |     |
| Ile Ala Pro Asn Gln Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu |     |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Val Leu Asp Glu Thr Ile Asn Met Lys His Phe Asp Ser Phe Lys Cys |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Ala Asp Ile Tyr Ala Leu Gly Leu Val Tyr Trp Glu Ile Ala Arg Arg |     |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |     |
| Cys Asn Ser Gly Gly Val His Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp |     |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |     |
| Leu Val Pro Ser Asp Pro Ser Ile Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys |     |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |     |

Asp Gln Lys Leu Arg Pro Asn Ile Pro Asn Trp Trp Gln Ser Tyr Glu  
 450 455 460  
 Ala Leu Arg Val Met Gly Lys Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn  
 465 470 475 480  
 Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln  
 485 490 495  
 Leu Ser Val Gln Glu Asp Val Lys Ile  
 500 505

<210> 10

<211> 103

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 10

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

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro  
 85 90 95  
 Ser Met Trp Gly Pro Val Glu  
 100

<210> 11

<211> 1515

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggcggagt cgccggagc ctctccttc ttcccccttg ttgtcctcct gctcgccggc 60

agcggcgggt ccgggccccg ggggggtccag gctctgctgt gtgcgtgcac cagctgcctc 120

caggccaact acacgtgtga gacagatggg gcctgcatgg tttccatttt caatctggat 180

gggatggagc accatgtgcg cacctgcac cccaaagtgg agctgggtccc tgccgggaag 240

cccttctact gcctgagctc ggaggacctg cgcaacaccc actgctgcta cactgactac 300

tgcaacagga tcgacttgag ggtgcccagt ggtcacctca aggagcctga gcaccggtcc 360

atgtggggcc cggtaggagct ggtaggcac atcgccggcc cgggtttcct cctgttcctc 420

atcatcatca ttgttttct tgtcattaac tatcatcagc gtgtctatca caaccgccag 480

agactggaca tggaagatcc ctcatgtgag atgtgtctct ccaaagacaa gacgtccag 540

gatcttgtct acgatctctc cacctcaggg tctggctcag ggtiaccct cttgtccag 600

cgcacagtgg cccgaacat cgttttacia gagattattg gcaagggtcg gtttggggaa 660

gtatggcggg gccgctggag gggtaggtgat gtggctgtga aaatattctc ttctcgtgaa 720

gaacggtctt gggtcaggga agcagagata taccagacgg tcatgctgcg ccatgaaaac 780

atccttggat ttattgctgc tgacaataaa gataatggca cctggacaca gctgtggctt 840

gtttctgact atcatgagca cgggtccctg tttgattatc tgaaccggta cacagtgaca 900

attgagggga tgattaagct ggccttgtct gctgctagtg ggctggcaca cctgcacatg 960

gagatcgtgg gcacccaagg gaagcctgga attgctcatc gagacttaaa gtcaaagaac 1020

attctggtga agaaaaatgg catgtgtgcc atagcagacc tgggcctggc tgtccgtcat 1080

gatgcagtca ctgacacat tgacattgcc ccgaatcaga gggtagggac caaacgatac 1140

atggccctg aagtacttga tgaaaccatt aatatgaaac actttgactc ctttaaagt 1200

gctgatattt atgcccctcg gcttgtatat tgggagattg ctgaagatg caattctgga 1260

ggagtccatg aagaatatca gctgccatat tacgacttag tgccctctga cccttcatt 1320

gaggaaatgc gaaaggttgt atgtgatcag aagctgcgtc ccaacatccc caactggtgg 1380

cagagtatg aggcactgcg ggtgatgggg aagatgatgc gagagtgtg gtatgccaac 1440

ggcgagccc gcctgacggc cctgcgcac aagaagacce tctcccagct cagcgtgcag 1500

gaagacgtga agatc 1515

<210> 12

<211> 309

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

tccgggcccc ggggggtcca ggctctgctg tgtgcgtgca ccagctgcct ccaggccaac 60

tacacgtgtg agacagatgg ggcctgcatg gtttccattt tcaatctgga tgggatggag 120  
caccatgtgc gcacctgcat ccccaaagtg gagctgggtcc ctgccgggaa gcccttctac 180

tgccctgagct cggaggacct gcgcaacacc cactgctgct aactgacta ctgcaacagg 240  
atcgacttga ggggtgccag tggtcacctc aaggagcctg agcacccgtc catgtggggc 300  
ccggtggag 309

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

Gly Gly Gly

1

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 14

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 15

Thr Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 17

Thr Gly Gly Gly

1

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 18

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 19

<211> 546

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Ala Glu Ser Ala Gly Ala Ser Ser Phe Phe Pro Leu Val Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu  
 20 25 30  
 Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr  
 35 40 45  
 Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His  
 50 55 60  
 His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys  
 65 70 75 80  
 Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys  
 85 90 95  
 Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His  
 100 105 110  
 Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Leu Val  
 115 120 125  
 Gly Ile Ile Ala Gly Pro Val Phe Leu Leu Phe Leu Ile Ile Ile Ile  
 130 135 140  
 Val Phe Leu Val Ile Asn Tyr His Gln Arg Val Tyr His Asn Arg Gln  
 145 150 155 160  
 Arg Leu Asp Met Glu Asp Pro Ser Cys Glu Met Cys Leu Ser Lys Asp  
 165 170 175  
 Lys Thr Leu Gln Asp Leu Val Tyr Asp Leu Ser Thr Ser Gly Ser Gly  
 180 185 190  
 Ser Gly Leu Pro Leu Phe Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Thr Ile Val  
 195 200 205  
 Leu Gln Glu Ile Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly  
 210 215 220  
 Arg Trp Arg Gly Gly Asp Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Arg Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu  
 245 250 255  
 Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Ala Asp

260 265 270  
 Cys Ser Phe Leu Thr Leu Pro Trp Glu Val Val Met Val Ser Ala Ala  
  
 275 280 285  
 Pro Lys Leu Arg Ser Leu Arg Leu Gln Tyr Lys Gly Gly Arg Gly Arg  
 290 295 300  
 Ala Arg Phe Leu Phe Pro Leu Asn Asn Gly Thr Trp Thr Gln Leu Trp  
 305 310 315 320  
 Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly Ser Leu Phe Asp Tyr Leu Asn  
 325 330 335  
 Arg Tyr Thr Val Thr Ile Glu Gly Met Ile Lys Leu Ala Leu Ser Ala  
  
 340 345 350  
 Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Met Glu Ile Val Gly Thr Gln Gly  
 355 360 365  
 Lys Pro Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val  
 370 375 380  
 Lys Lys Asn Gly Met Cys Ala Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Arg  
 385 390 395 400  
 His Asp Ala Val Thr Asp Thr Ile Asp Ile Ala Pro Asn Gln Arg Val  
  
 405 410 415  
 Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Thr Ile Asn  
 420 425 430  
 Met Lys His Phe Asp Ser Phe Lys Cys Ala Asp Ile Tyr Ala Leu Gly  
 435 440 445  
 Leu Val Tyr Trp Glu Ile Ala Arg Arg Cys Asn Ser Gly Gly Val His  
 450 455 460  
 Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Val Pro Ser Asp Pro Ser  
  
 465 470 475 480  
 Ile Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys Asp Gln Lys Leu Arg Pro Asn  
 485 490 495  
 Ile Pro Asn Trp Trp Gln Ser Tyr Glu Ala Leu Arg Val Met Gly Lys  
 500 505 510

Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala  
515 520 525

Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser Val Gln Glu Asp Val

530 535 540

Lys Ile

545

<210> 20

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro

85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 21

<211> 1638

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

atggcggagt cggccggagc ctctctcttc ttcccccttg ttgtcctcct gctcgcgggc 60

agcggcgggt ccgggccccg ggggtccag gctctgctgt gtgcgtgcac cagctgcctc 120

caggccaact acacgtgtga gacagatggg gcctgcatgg tttccatttt caatctggat 180  
gggatggagc accatgtgcg cacctgcatc cccaaagtgg agctgggtccc tgccgggaag 240  
cccttctact gcctgagctc ggaggacctg cgcaacaccc actgctgcta cactgactac 300  
tgcaacagga tcgacttgag ggtgcccagt ggtcacctca aggagcctga gcacccgtcc 360  
atgtggggcc cggtaggagct ggtaggcatc atcgccggcc cgggtttcct cctgttcctc 420

atcatcatca ttgttttctt tgtcattaac tatcatcagc gtgtctatca caaccgccag 480  
agactggaca tggaagatcc ctcatgtgag atgtgtctct ccaaagacaa gacgtccag 540  
gatcttgtct acgatctctc cacctcaggg tctggctcag ggttaccctt ctttgtccag 600  
cgcacagtgg cccgaacat cggtttacaa gagattattg gcaagggtcg gtttggggaa 660  
glatggcggg gccgctggag ggggtgtgat gtggctgtga aaatattctc ttctcgtgaa 720  
gaacggtctt gggtcagga agcagagata taccagacgg tcctgctgcg ccatgaaaac 780  
atccttggat ttattgtgctg tgacaataaa gcagactgct cattcctcac attgccatgg 840

gaagtgtgaa tggctctctc tgccccaag ctgaggagcc ttagactcca atacaaggga 900  
ggaaggggaa gagcaagatt ttatttccca ctgaataatg gcacctggac acagctgtgg 960  
cttgtttctg actatcatga gcacgggtcc ctgtttgatt atctgaaccg gtacacagtg 1020  
acaattgagg ggatgattaa gctggccttg tctgctgcta gtgggctggc acacctgcac 1080  
atggagatcg tgggcaccca aggggaagcct ggaattgctc atcgagactt aaagtcaaag 1140  
aacattctgg tgaagaaaaa tggcatgtgt gccatagcag acctgggcct ggctgtccgt 1200  
catgatgcag tcaactgacac cattgacatt gccccgaatc agagggtggg gaccaaacga 1260

tacatggccc ctgaagtact tgatgaaacc attaatatga aacactttga ctcttttaa 1320  
tgtgctgata tttatgccct cgggcttgta tattgggaga ttgctcgaag atgcaattct 1380  
ggaggagtcc atgaagaata tcagctgcca tattacgact tagtgccctc tgaccttcc 1440  
attgaggaaa tgcgaaaggt tgtatgtgat cagaagctgc gtccaacat cccaactgg 1500  
tggcagagtt atgaggcact gcgggtgatg gggaagatga tgcgagagtg ttggtatgcc 1560  
aacggcgcag cccgcctgac ggccctgcgc atcaagaaga ccctctccca gctcagcgtg 1620  
caggaagacg tgaagatc 1638

<210> 22

<211> 309

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tccgggcccc ggggggtcca ggctctgctg tgtgcgtgca ccagctgcct ccaggccaac 60  
 tacacgtgtg agacagatgg ggccctcatg gtttccattt tcaatctgga tgggatggag 120  
 caccatgtgc gcacctgcat ccccaaagtg gagctggtec ctgccgggaa gcccttctac 180  
 tgcctgagct cggaggacct gcgcaacacc cactgctgct aactgacta ctgcaacagg 240  
 atcgacttga gggtgcccag tggtcacctc aaggagcctg agcacccgtc catgtggggc 300  
 ccggtggag 309

<210> 23

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 23

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 Ala 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 Lys 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

Lys Ser Asp Gly Ser 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> 24

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 24

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 Ala 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 Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu  
165 170 175

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp 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> 25

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

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 | Ala | 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 | Tyr |  |  |  |  |
| 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 | Ser | 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> 26                                                             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <211> 225                                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <212> PRT                                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <213> Artificial Sequence                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <400> 26                                                             |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| 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 Ala 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 Ser Phe Phe Leu Thr 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> 27

<211> 225

&lt;212&gt; PRT

### <213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 27

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 Ala 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 Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp

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 Ser 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> 28

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 28

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 Ala Pro Ile Glu Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Cys Ala 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 Ser Phe Phe Leu Val 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> 29  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                   polypeptide  
 <400> 29  
 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 Ala Pro Ile Glu Lys  
                   100                                      105                                      110  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Phe Arg Pro Glu Val His Leu  
                   115                                      120                                      125  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Thr Ile Ser Leu

210 215 220

Ser Pro Gly Lys

225

<210> 30

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 30

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 Ala 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 Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu  
 130 135 140  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Asn Gly Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala  
 165 170 175  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Ile Leu Arg  
 180 185 190  
 Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Ser Val  
 195 200 205  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Asp Arg  
  
 210 215 220  
 Ser Pro Gly Lys  
 225  
 <210> 31  
 <211> 225  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 31  
 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 Ala 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 Ser 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> 32  
<211> 223  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 32  
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val  
  
1 5 10 15  
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
20 25 30  
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

35                      40                      45  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 50                      55                      60  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
  
 65                      70                      75                      80  
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 85                      90                      95  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 100                      105                      110  
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 115                      120                      125  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
  
 130                      135                      140  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 145                      150                      155                      160  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
 165                      170                      175  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 180                      185                      190  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
  
 195                      200                      205  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210                      215                      220  
 <210> 33  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 33  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala  
 1                      5                      10                      15  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

|       |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|-------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
|       | 20           |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |  |
| Lys   | Asp          | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val |  |  |  |
| 35    |              |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |  |
| Val   | Asp          | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Lys | Trp | Tyr | Val |  |  |  |
| 50    |              |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |     |     |  |  |  |
| Asp   | Gly          | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln |  |  |  |
| 65    |              |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     | 80  |     |     |     |  |  |  |
| Tyr   | Asn          | Ser | Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln |  |  |  |
|       |              |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     | 95  |     |     |     |  |  |  |
| <br>  |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| Asp   | Trp          | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala |  |  |  |
| 100   |              |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |  |  |  |
| Leu   | Pro          | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Gln | Pro |  |  |  |
| 115   |              |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |
| Arg   | Glu          | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr |  |  |  |
| 130   |              |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |  |  |  |
| Lys   | Asn          | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser |  |  |  |
| 145   |              |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     | 160 |     |     |     |  |  |  |
| <br>  |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| Asp   | Ile          | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Ser | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr |  |  |  |
|       |              |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     | 175 |     |     |     |  |  |  |
| Asn   | Thr          | Thr | Pro | Pro | Met | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr |  |  |  |
| 180   |              |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |     |  |  |  |
| Ser   | Lys          | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Ile | Phe |  |  |  |
| 195   |              |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |
| Ser   | Cys          | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | Arg | Phe | Thr | Gln | Lys |  |  |  |
| 210   |              |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |  |  |  |
| <br>  |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| Ser   | Leu          | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| 225   |              |     | 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| <210> | 34           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| <211> | 279          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| <212> | PRT          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| <213> | Homo sapiens |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |

<400> 34

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys  
1 5 10 15  
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro  
20 25 30  
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu  
35 40 45  
Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro  
50 55 60  
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
65 70 75 80  
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
85 90 95  
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp  
100 105 110  
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
115 120 125  
Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
130 135 140  
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
145 150 155 160  
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg  
165 170 175  
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
180 185 190  
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
195 200 205  
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn  
210 215 220  
Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser  
 245 250 255  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser  
 260 265 270  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 275  
 <210> 35  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 35  
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15  
  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45  
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80  
  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140  
  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205  
  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Ser Leu Gly Lys  
 225  
 <210> 36  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide  
 <400> 36  
 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 Ala 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 Ser 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 Gly Gly Ser Ala Gln Leu Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Asn Ala Gln Leu Glu Trp Glu Leu Gln Ala Leu Glu Lys Glu Leu  
 245 250 255  
 Ala Gln Gly Ala Thr  
 260  
 <210> 37  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide  
  
 <400> 37  
 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 Ala 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 Ser 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 Gly Gly Ser Ala Gln Leu Lys Lys Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Lys Asn Ala Gln Leu Lys Trp Lys Leu Gln Ala Leu Lys Lys Lys Leu  
                                     245                                      250                                      255  
  
 Ala Gln Gly Ala Thr  
                                     260  
 <210> 38  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Tissue plasminogen activator (TPA) sequence

<400> 38

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> 39

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 39

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

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
145 150 155 160  
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
165 170 175  
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
180 185 190  
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
195 200 205  
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
210 215 220  
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
225 230 235 240  
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
245 250 255  
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
260 265 270  
Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
275 280 285  
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
290 295 300  
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys  
305 310 315 320  
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
325 330 335  
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
340 345 350  
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
355 360 365

<210> 40

<211> 1104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 40

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt  | 60   |
| tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcattcta ctacaacgcc | 120  |
| aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac  | 180  |
| aagcggctgc actgctacgc ctctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag    | 240  |
| aagggtgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag   | 300  |
| gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact  | 360  |
| catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc    | 420  |
|                                                                    |      |
| ggtgggtgaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca   | 480  |
| gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgagggtc     | 540  |
| acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg   | 600  |
| gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgaggg aggagcagta caacagcacg  | 660  |
| taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac  | 720  |
| aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc     | 780  |
| aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgaa ggagatgacc   | 840  |
|                                                                    |      |
| aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct atcccagcga catcgccgtg   | 900  |
| gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctgaag  | 960  |
| tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    | 1020 |
| gggaactct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag     | 1080 |
| agcctctccc tgtctccggg taaa                                         | 1104 |

<210> 41

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 41

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

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
 20 25 30  
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn  
 50 55 60  
  
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His  
 85 90 95  
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
 100 105 110  
 Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 115 120 125  
  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 130 135 140  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 145 150 155 160  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 165 170 175  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 180 185 190  
  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 195 200 205  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 210 215 220  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys  
 245 250 255  
  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

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

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

<210> 42

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 42

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala

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

85 90 95  
 Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly  
 100 105 110

His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr  
115 120 125  
Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
130 135 140  
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
145 150 155 160  
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
165 170 175  
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
180 185 190  
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
195 200 205  
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
210 215 220  
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
225 230 235 240  
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
245 250 255  
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
260 265 270  
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
275 280 285  
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro  
290 295 300  
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr  
305 310 315 320  
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
325 330 335  
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
340 345 350  
Ser Pro Gly

355

<210> 43

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 43

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt | 60   |
| tcgcccggcg cctccgggcc ccgggggggc caggctctgc tgtgtgcgtg caccagctgc | 120  |
| ctccaggcca actacacgtg tgagacagat ggggcctgca tggtttccat tttcaatctg | 180  |
| gatgggatgg agcaccatgt gcgcacctgc atccccaag tggagctggt ccctgccggg  | 240  |
|                                                                   |      |
| aagcccttct actgcctgag ctccgaggac ctgcgcaaca ccactgctg ctacactgac  | 300  |
| tactgcaaca ggatcgactt gagggtgccc agtggtcacc tcaaggagcc tgagcacccg | 360  |
| tccatgtggg gcccggtgga gaccggtggt ggaactcaca catgcccacc gtgcccagca | 420  |
| cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc  | 480  |
| atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct | 540  |
| gagggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg | 600  |
| cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag | 660  |
|                                                                   |      |
| gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct ccagccccc  | 720  |
| atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg | 780  |
| cccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc | 840  |
| ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac | 900  |
| gacaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctatag cgacctacc  | 960  |
| gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct | 1020 |
| ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggt                  | 1065 |

<210> 44

<211> 331

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 44

```

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

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

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

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

```

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

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 305 310 315 320  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 325 330

<210> 45

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr

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

85 90 95  
 Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly

100 105 110  
 Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro  
 115 120 125  
 Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr  
 130 135 140  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
  
 145 150 155 160  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 165 170 175  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 180 185 190  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 195 200 205  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
  
 210 215 220  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 225 230 235 240  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 245 250 255  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 260 265 270  
 Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys  
  
 275 280 285  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 290 295 300  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 325 330 335  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
  
 340 345 350

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

355

360

365

<210> 46

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 46

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

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

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

275 280 285  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 290 295 300  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 305 310 315 320  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 325 330 335  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 340

<210> 47

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 47

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala  
 20 25 30

Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu  
 35 40 45  
  
 Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu  
 50 55 60  
 His His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly  
 65 70 75 80  
 Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys  
 85 90 95  
 Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly  
 100 105 110  
  
 His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 130 135 140  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 165 170 175  
  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 180 185 190  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 195 200 205  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 210 215 220  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 225 230 235 240  
  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 245 250 255  
 Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 260 265 270  
 Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

275 280 285  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr  
 305 310 315 320  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 325 330 335  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 340 345 350  
 Ser Pro Gly Lys  
 355

<210> 48

<211> 332

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 48

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

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro  
 85 90 95  
 Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro  
 100 105 110

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg

225 230 235 240

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330

<210> 49

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

115

<210> 50

<211> 150

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 50

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

|                         |                                         |     |
|-------------------------|-----------------------------------------|-----|
| 115                     | 120                                     | 125 |
| Pro Pro Thr Ala Pro Thr | Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu |     |
| 130                     | 135                                     | 140 |
| Pro Ile Gly Gly Leu Ser |                                         |     |
| 145                     | 150                                     |     |

<210> 51

<211> 150

<212> PRT

<213> Sus scrofa

&lt;400&gt; 51

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Ala | Pro | Trp | Ala | Ala | Leu | Ala | Leu | Leu | Trp | Gly | Ser | Leu | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Val | Gly | Ser | Gly | Arg | Gly | Glu | Ala | Glu | Thr | Arg | Glu | Cys | Ile | Tyr | Tyr |

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

[illegible]

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
 145 150

<210> 52

<211> 150

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

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

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

115 120 125  
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser  
 145 150

<210> 53

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu

130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser

145 150

<210> 54

<211> 150

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 54

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

115 120 125  
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
130 135 140

Pro Val Gly Gly Leu Ser

145 150

<210> 55

<211> 150

<212> PRT

<213> Xenopus sp.

<400> 55

Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe

1 5 10 15

Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr

20 25 30  
Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu

35 40 45  
Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser

50 55 60  
Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp

65 70 75 80

Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu

85 90 95  
 Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Tyr Cys Asn  
 100 105 110  
 Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro  
 115 120 125  
 Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro  
 130 135 140  
 Ile Val Gly Leu Ser Met  
 145 150

<210> 56

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

145 150

<210> 57

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Thr, Ala or not present

<220><221> MOD\_RES

<222> (121)..(121)

<223> Pro, Ala, Val or Met

<400> 57

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr

130 135 140  
 Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met  
 145 150  
 <210> 58  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide  
 <400> 58  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5  
 <210> 59  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 59  
 Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys  
  
 1 5 10 15  
 Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser  
 20 25 30  
 Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro  
 35 40 45  
 Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser  
 50 55 60  
 Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg  
  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro  
 85 90 95  
 Ser Met Trp Gly Pro Val Glu  
 100  
 <210> 60  
 <211> 103

<212> PRT

<213> *Condylura cristata*

<400> 60

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Leu Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Leu Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Phe Cys Asn Lys

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Val Lys Glu Pro Glu Arg Pro

85 90 95

Ser Val Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 61

<211> 103

<212> PRT

<213> *Erinaceus europaeus*

<400> 61

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Thr Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Phe Cys Asn Arg

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Pro Lys Glu Ser Glu Gln Ala  
85 90 95  
Ser Met Trp Gly Pro Val Glu  
100

<210> 62

<211> 102

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 62

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

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

<210> 63

<211> 103

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys  
1 5 10 15  
Leu Gln Thr Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser  
20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Val Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro  
35 40 45

Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser  
50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Ile Asp Phe Cys Asn Lys

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Ala His Pro  
85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 64

<211> 103

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 64

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro  
35 40 45

Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser  
50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Phe Cys Asn Lys

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro

85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 65

<211> 103

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 65

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Thr Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Ile Asp Phe Cys Asn Lys

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro

85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 66

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 66

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 | Ala | 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 | Cys | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Glu | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Trp |  |  |
| 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 | Ser | 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 | Asp | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly |
|     |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |

Lys

225

<210> 67

<211> 225

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 67

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 Ala Pro Ile Glu Lys  
 100 105 110  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
 115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
 130 135 140  
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Arg Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 165 170 175  
 Asp Ser Arg Gly Ser Phe Phe Leu Val 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> 68

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 68

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 Ala 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 Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp  
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 Ser 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 Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
210 215 220

Lys

225

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 70

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

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
180 185 190  
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
195 200 205  
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
210 215 220  
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
225 230 235 240  
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
245 250 255  
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
260 265 270  
Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Glu Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys  
275 280 285  
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
290 295 300  
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
305 310 315 320  
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
325 330 335  
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
340 345 350  
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Asp Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
355 360 365  
<210> 71  
<211> 1101  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide  
<400> 71  
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt

tcgcccgcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcattcta ctacaacgcc 120  
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180

aagcggctgc actgctacgc ctcttggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240  
aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300  
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360  
catttgccag aggttggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc 420  
ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480  
gttttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc 540  
acatgcgtgg tgggtggactg gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660  
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720  
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaagcc 780  
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga ggagatgacc 840  
gagaaccagg tcagcctgtg gtgctgtgtc aaaggcttct atccagcga catgccgtg 900  
gagtgggaga gcaatggga gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960  
tccgacggct ctttttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020

gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcaggac 1080  
agcctctccc tgtctccggg t 1101

<210> 72  
<211> 342  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide  
<400> 72  
Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn  
1 5 10 15  
Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly  
20 25 30  
Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser  
35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His  
 85 90 95  
  
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr  
 100 105 110  
 Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 115 120 125  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 130 135 140  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 145 150 155 160  
  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 165 170 175  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 180 185 190  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 195 200 205  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 210 215 220  
  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Glu  
 245 250 255  
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 260 265 270  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 275 280 285  
  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

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

<210> 73

<211> 1026

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 73

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gggcgtgggg aggctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag  | 60   |
| cgcaccaacc agagcggcct ggagcgctgc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc  | 120  |
| tacgcctcct ggcgcaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctggcta  | 180  |
| gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccaggtg  | 240  |
| tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgagcgct tcactcattt gccagaggct  | 300  |
| ggggggcccg aagtcacgta cgagccaccc ccgacagccc ccaccggtgg tggaaactcac | 360  |
| acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc  | 420  |
| ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg  | 480  |
| gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg  | 540  |
| cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc  | 600  |
| gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc    | 660  |
| aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga   | 720  |
| gaaccacagg tgtacaccct gcccccatgc cgggaggaga tgaccgagaa ccaggtcagc  | 780  |
| ctgtggtgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat   | 840  |
| gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggtccttc   | 900  |
| ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca  | 960  |
| tgctccgtga tgcatgagc tctgcacaac cactacacgc aggacagcct ctccctgtct   | 1020 |
| ccgggt                                                             | 1026 |

<210> 74

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 74

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

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala

20 25 30

Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu

35 40 45

Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu

50 55 60

His His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly

65 70 75 80

Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys

85 90 95

Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly

100 105 110

His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

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

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

<210> 75

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 75

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccggcg cctccgggcc ccgggggggc caggctctgc tgtgtgcgtg caccagctgc 120

ctccaggcca actacacgtg tgagacagat ggggcctgca tggtttccat tttcaatctg 180

gatgggatgg agcaccatgt gcgcacctgc atccccaag tggagctggt ccctgccggg 240  
aagcccttct actgcctgag ctccgaggac ctgcgcaaca cccactgctg ctacactgac 300  
tactgcaaca ggatcgactt gaggtgccc agtggtcacc tcaaggagcc tgagcacccg 360  
tccatgtggg gcccggtgga gaccggtggt ggaactcaca catgccacc gtgccagca 420  
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 480

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct 540  
gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 600  
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag 660  
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 720  
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg 780  
ccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgtctgcgc cgtcaaagc 840  
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagccgcg ggcagccgga gaacaactac 900

aagaccagc ctcccgtgct ggactccgc ggctccttct tctcgtgag caagctcacc 960  
gtggacaaga gcaggtgga gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt 1020  
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 1068

<210> 76

<211> 332

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 76

Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Ile | Asp | Leu | Arg | Val | Pro | Ser | Gly | His | Leu | Lys | Glu | Pro | Glu | His | Pro |
| 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Met | Trp | Gly | Pro | Val | Glu | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr | His | Thr | Cys | Pro |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |
| Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro |
| 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Cys | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Ser | Cys | Ala | Val | Lys | Gly |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Arg | Gly | Gln | Pro |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Arg | Gly | Ser |
| 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Phe | Leu | Val | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln |
| 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |

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

325

330

<210> 77

<211

> 996

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 77

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| tccgggcccc ggggggtcca ggctctgctg tgtgcgtgca ccagctgcct ccaggccaac | 60  |
| tacacgtgtg agacagatgg ggcctgcatg gtttccattt tcaatctgga tgggatggag | 120 |
| caccatgtgc gcacctgcat ccccaaagtg gagctggtcc ctgccgggaa gcccttctac | 180 |
| tgcttgagct cggaggacct gcgcaacacc cactgctgct acactgacta ctgcaacagg | 240 |
| atcgacttga gggtgcccag tggtcacctc aaggagcctg agcacccgtc catgtggggc | 300 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| ccggtggaga ccggtgggtg aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg | 360 |
| gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg   | 420 |
| acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc  | 480 |
| aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag | 540 |
| tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat | 600 |
| ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc | 660 |
| atctccaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg  | 720 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg tctgcgccg tcaaaggett ctatccagc   | 780 |
| gacatcgccg tggagtggga gagccgcggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct  | 840 |
| cccgtgctgg actccgcgg ctccttcttc ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc  | 900 |
| aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac | 960 |
| tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa                           | 996 |

<210> 78

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 78

```

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

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

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

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

```

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

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

<210> 79

<211> 1104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 79

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt  | 60  |
| tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcattcta ctacaacgcc | 120 |
| aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac   | 180 |
| aagcggctgc actgctacgc ctcttgccgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag  | 240 |
| aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag  | 300 |
| gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact  | 360 |
| catttgccag aggtctggggg cccggaagtc acgtacgagc caccctcgac agccccacc  | 420 |

gggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480  
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 540  
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600  
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660  
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720  
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 780  
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga ggagatgacc 840

aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgccctg 900  
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960  
tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020  
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccgcta cacgcagaag 1080  
agcctctccc tgctccggg taaa 1104

<210> 80

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
|                                                                 |     |     |
| Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
|                                                                 |     |     |
| Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
|                                                                 |     |     |
| Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
|                                                                 |     |     |
| Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                                     |     |     |
| 340                                                             |     |     |

<210> 81

<211> 1029

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 81

gggcgtgggg aggctgagac acgggagtg atctactaca acgccaactg ggagctggag 60

cgcaccaacc agagcggcct ggagcgctgc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc 120

tacgcctcct ggcgcaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctggcta 180

gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccaggtg 240

tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgagcgct tcactcattt gccagaggct 300

ggggggcccg aagtcacgta cgagccaccc ccgacagccc ccaccggtgg tggaactcac 360

acatgccac cgtgccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 420

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg 480

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 540

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 600

gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 660

aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 720

gaaccacagg tgtacacct gcccccatgc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 780

ctgtggtgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 840

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggtccttc 900

ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 960

tgctccgtga tgcatgagcg tctgcacaac cgctacacgc agaagagcct ctccctgtct 1020

ccgggtaaa 1029

<210> 82

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 82

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60  
 tcgcccggcg cctccgggcc ccgggggggtc caggctctgc tgtgtgcgtg caccagctgc 120  
 ctccaggcca actacacgtg tgagacagat ggggcctgca tggtttccat tttcaatctg 180  
 gatgggatgg agcaccatgt gcgcacctgc atccccaag tggagctggt ccctgccggg 240

aagcccttct actgctgag ctccgaggac ctgcgcaaca cccactgctg ctacactgac 300  
 tactgcaaca ggatcgactt gaggtgccc agtggtcacc tcaaggagcc tgagcacccg 360  
 tccatgtggg gcccggtgga gaccggtggt ggaactcaca catgccacc gtgccagca 420  
 cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 480  
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct 540  
 gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 600  
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tectcaccgt cctgcaccag 660

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 720  
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg 780  
 ccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgtcctgcgc cgtcaaaggc 840  
 ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggagccgga gaacaactac 900  
 aagaccagc ctccgtgct ggactccgac ggctccttct tectcgtgag caagctcacc 960  
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1020  
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 1068

<210> 83

<211> 996

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 83

tccgggcccc ggggggtcca ggctctgctg tgtgcgtgca ccagctgcct ccaggccaac 60  
 tacacgtgtg agacagatgg ggctgcatg gtttcattt tcaatctgga tgggatggag 120  
 caccatgtgc gcacctgcat ccccaaagtg gagctggtcc ctgccgggaa gcccttctac 180  
 tgcctgagct cggaggacct gcgcaacacc cactgctgct aactgacta ctgcaacagg 240  
 atcgacttga ggggtgccag tggtcacctc aaggagcctg agcacccgtc catgtggggc 300

ccggtggaga ccggtggtgg aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 360

gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 420  
 acccctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 480  
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 540  
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 600  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 660  
 atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg 720

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg tctgcgccg tcaaaggctt ctatcccagc 780  
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct 840  
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc 900  
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 960  
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 996

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

6xHis tag

<400> 84

His His His His His His

1 5