



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0019768
(43) 공개일자 2018년02월26일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 38/16</i> (2006.01) <i>A61K 38/17</i> (2006.01)
 <i>A61K 38/38</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 38/16</i> (2013.01)
 <i>A61K 38/17</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7004410(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2007년12월18일
 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2016-7001731
 원출원일자(국제) 2007년12월18일
 심사청구일자 2016년01월20일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2018년02월13일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2007/025868</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2008/076437
 국제공개일자 2008년06월26일</p> <p>(30) 우선권주장
 60/875,682 2006년12월18일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 약셀레론 파마 인코포레이티드
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128</p> <p>(72) 발명자
 셰르만, 매튜 엘.
 미국, 매사추세츠 02459, 뉴턴, 자넷 로드 33</p> <p>(74) 대리인
 강명구</p> |
|--|---|

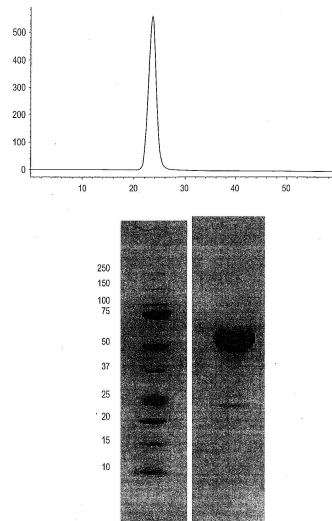
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 액티빈-ACTRII 길항물질과 적혈구 수준을 증가시키기 위한 이의 용도

(57) 요약

특정 측면에서, 본 발명에서는 설치류와 영장류를 비롯한 척추동물, 특히, 인간에서 적혈구 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시키기 위한 조성물과 방법을 제시한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/38 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 환자에서 적혈구 수준을 증가시키는 방법에 있어서,

- a) SEQ ID NO:2에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- b) SEQ ID NO:3에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- c) SEQ ID NO: 2에서 선택되는 최소한 50개의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드;
- d) SEQ ID NO:16에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- e) SEQ ID NO:17에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 또는
- f) SEQ ID NO: 16에서 선택되는 최소한 50개의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드에서 선택되는 ActRII 폴리펩티드의 효과량을 병든 인간 환자에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 폴리펩티드는 아래의 특징 중에서 한 가지 이상을 갖는 것을 특징으로 하는 방법:

- i) 최소한 10^{-7} M의 K_D 로 ActRII 리간드에 결합;
- ii) 세포 내에서 ActRII 신호전달 저해.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 폴리펩티드는 ActRII 폴리펩티드 도메인 이외에, 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡입/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 또는 정제 중에서 한 가지 이상을 향상시키는 하나 이상의 폴리펩티드 일부분을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인 또는 혈청 알부민에서 선택되는 폴리펩티드 일부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 폴리펩티드는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 moiety(lipid moiety)에 공동된 아미노산, 또는 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 공동된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 보유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 적혈구 수준에서 증가는 혈액 내에서 헤모글로빈 수준의 증가로서 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

빈혈을 치료하는 방법에 있어서, 효과량의 액티빈(activin)-ActRII 길항물질을 병든 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 액티빈-ActRII 길항물질은 액티빈 또는 ActRII 길항물질 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 액티빈-ActRII 길항물질 폴리펩티드는

- a) SEQ ID NO:2에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- b) SEQ ID NO:3에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- c) SEQ ID NO: 2에서 선택되는 최소한 50개의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드;
- d) SEQ ID NO:16에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- e) SEQ ID NO:17에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 또는
- f) SEQ ID NO: 16에서 선택되는 최소한 50개의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 액티빈-ActRII 길항물질 폴리펩티드는 아래의 특징 중에서 한 가지 이상을 갖는 것을 특징으로 하는 방법:

- i) 최소한 10^{-7} M의 K_D 로 ActRII 리간드에 결합;
- ii) 세포 내에서 ActRII 신호전달 저해.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 액티빈-ActRII 길항물질 폴리펩티드는 액티빈-ActRII 길항물질 폴리펩티드 도메인 이외에, 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡입/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 또는 정제 중에서도 한 가지 이상을 향상시키는 하나 이상의 폴리펩티드 일부분을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인 또는 혈청 알부민에서 선택되는 폴리펩티드 일부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

청구항 8에 있어서, 액티빈 또는 ActRII 길항물질 폴리펩티드는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모이어티(lipid moiety)에 공동된 아미노산, 또는 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 공동된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 보유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

적혈구 수준을 증가시키는 작용제를 확인하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) ActRII 리간드와 경쟁적으로, ActRII 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인에 결합하는 시험 작용제(test agent)를 확인하는 단계;
- b) 동물 내에서 적혈구 수준에 대한 상기 작용제의 효과를 평가하는 단계.

청구항 15

인간 환자에서 적혈구 수준을 증가시키기 위한 약제의 제조에서 액티빈 또는 ActRII 길항물질 폴리펩티드의 용도.

청구항 16

인간 환자에서 적혈구 수준을 증가시키는 방법에 있어서, 상기 방법은 효과량의 ActRII-Fc 융합 단백질을 환자
에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 ActRII-Fc 융합 단백질은

- a) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열;
- b) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열;
- c) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열,
- d) SEQ ID NO:2의 아미노산 서열,
- e) SEQ ID NO:7의 아미노산 서열,
- f) SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열;
- g) SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열;
- h) SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열;
- i) SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열;
- j) SEQ ID NO:20의 아미노산 서열; 또는
- k) SEQ ID NO:21의 아미노산 서열에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 환자의 골격근량(skeletal muscle mass)에서 15% 이하의 증가를 유도하는 것을 특징으로
하는 방법.

청구항 18

청구항 16에 있어서, ActRII-Fc 융합 단백질은 환자 내에서 20일 내지 30일의 기간 동안 최소한 100 ng/ml의 혈
청 농도에 도달하도록 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

청구항 16에 있어서, ActRII-Fc 융합 단백질은 환자 내에서 100 ng/ml 내지 1000 ng/ml의 범위에서 혈청 농도에
도달하도록 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

청구항 16에 있어서, ActRII-Fc 융합 단백질은 15일 내지 30일 사이의 혈청 반감기(serum half-life)를 갖는
것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, ActRII-Fc 융합 단백질은 주1회 빈도로 환자에 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

청구항 20에 있어서, ActRII-Fc 융합 단백질은 월1회 빈도로 환자에 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련된 출원

본 출원은 2006년 12월 18일 제출된 U.S. 가출원 No. 60/875,682에 우선권을 주장하는데, 상기 출원은 본 명세
서에 순전히 참조로서 편입된다.

[0003] 본 발명의 기술 분야

[0004] 본 발명은 설치류와 영장류를 비롯한 척추동물, 특히, 인간에서 적혈구 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시키기 위한 조성물과 방법에 관계한다.

배경 기술

[0005] 성숙 적혈구(red blood cell 또는 erythrocyte)는 척추동물의 순환계(circulatory system)에서 산소 전달(oxygen transport)을 담당한다. 적혈구는 폐 내에서 상대적으로 높은 산소 분압(partial pressure of oxygen)(pO_2)에서 산소에 결합하고 산소를 상대적으로 낮은 pO_2 를 갖는 신체 부위로 전달하는 단백질인 헤모글로빈(hemoglobin)을 고농도로 포함한다.

[0006] 성숙 적혈구는 적혈구생성(erythropoiesis)으로 명명된 과정 동안 다능성 조혈 줄기 세포(pluripotent hematopoietic stem cell)로부터 생산된다. 생후(post-natal) 개체에서, 적혈구생성은 일차적으로, 골수(bone marrow)와 비장(spleen)의 적비수(red pulp)에서 발생한다. 다양한 신호전달 경로(signaling pathway)의 공조된 작용은 세포 증식(proliferation), 분화(differentiation), 생존(survival)과 사멸(death)의 균형을 제어한다. 정상적인 조건 하에, 적혈구는 체내에서 일정한 적혈구량(red cell mass)을 유지하는 속도로 생산되고, 생산은 증가되거나 감소된 산소 분압(oxygen tension) 또는 조직 요구(tissue demand)를 비롯한 다양한 자극에 반응하여 증가하거나 감소할 수 있다. 적혈구생성 과정은 계통 수입된 전구 세포(lineage committed precursor cell)의 형성으로 시작되고, 일련의 독특한 전구 세포 유형을 통하여 진행된다. 적혈구생성의 최종 단계는 망상적혈구(reticulocyte)가 혈류(bloodstream) 내로 방출되고, 성숙 적혈구의 형태(morphology)를 취하면서 그들의 미토콘드리아(mitochondria)와 리보솜(ribosome)을 상실함에 따라 발생한다. 혈액 내에서 상승된 수준의 망상적혈구, 또는 상승된 망상적혈구:적혈구 비율은 증가된 적혈구 생산 속도를 지시한다.

[0007] 에리트로포이에틴(erythropoietin, Epo)은 생후 척추동물에서 적혈구생성의 가장 유의한 양성 조절인자로서 폭넓게 인정되고 있다. Epo는 감소된 조직 산소 분압(저산소증(hypoxia))과 낮은 적혈구 수준 또는 낮은 헤모글로빈 수준에 대한 보상적 적혈구생성 반응(compensatory erythropoietic response)을 조절한다. 인간에서, 상승된 Epo 수준은 골수와 비장 내에서 적혈구 전구체(erythroid progenitor)의 생산을 자극함으로써 적혈구 형성을 촉진한다. 생쥐에서, Epo는 일차적으로, 비장 내에서 적혈구생성을 강화시킨다.

[0008] 다양한 형태의 재조합 Epo는 다양한 임상적 환경(clinical setting)에서, 특히, 빈혈(anemia)의 치료를 위한 적혈구 수준을 증가시키기 위하여 의사에 의해 이용된다. 빈혈은 혈액 내에서 헤모글로빈 또는 적혈구의 정상보다 낮은 수준으로 특징되는 넓게-정의된 질환이다. 일부 사례에서, 빈혈은 적혈구의 생산 또는 생존에서 원발성 장애(primary disorder)에 의해 유발된다. 더욱 빈번하게는, 빈혈은 다른 체계의 질환에 속발성(secondary)이다(Weatherall & Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). 빈혈은 적혈구의 감소된 생산 속도 또는 증가된 파괴 속도, 또는 출혈(bleeding)에 기인한 적혈구의 상실에 기인할 수 있다. 빈혈은 예로써, 만성 신부전(chronic renal failure), 골수이형성증(myelodysplastic syndrome), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 골수 이식(bone marrow transplantation) 등을 비롯한 다양한 질환에 기인할 수도 있다.

[0009] Epo로 치료는 전형적으로, 수주 기간 동안 건강한 인간에서 대략 1-3 g/dL로 헤모글로빈에서 증가를 유도한다. 빈혈 개체에 투여될 때, 이러한 치료 섭생(treatment regimen)은 종종, 헤모글로빈과 적혈구 수준에서 실질적인 증가를 제공하고, 삶의 질에서 향상과 연장된 생존을 결과한다. Epo는 균일하게 효과적이지 않으며, 많은 개체가 높은 용량에도 반응하지 않는다(Horl et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). 암 환자 중에서 50% 이상이 Epo에 부적절한 반응을 나타내고, 말기 신장 질환(end-stage renal disease) 환자 중에서 대략 10%가 저반응(hypo-responsive)을 나타내고(Glaspy et al. (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri et al. (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425), 골수이형성증 환자 중에서 10% 미만이 긍정적으로 반응한다(Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). 염증, 철과 비타민 결핍, 부적절한 투석(dialysis), 알루미늄 독성, 부갑상선기능항진증(hyperparathyroidism) 등을 비롯한 여러 인자가 불량한 치료 반응(therapeutic response)을 예언하긴 하지만, Epo에 대한 내성(resistance)의 분자 기전은 아직 명확하지 않다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 환자에서 적혈구 수준을 증가시키기 위한 대안적 조성물과 방법을 제시하는 것이다.

[0011] 본 발명의 요약

[0012] 부분적으로, 본 발명에서는 액티빈 길항물질(activin antagonist), 그리고 ActRIIa와 ActRIIb 길항물질이 적혈구와 헤모글로빈 수준을 증가시키는데 이용될 수 있음을 증명한다. 특히, 본 발명에서는 ActRIIa의 가용성 형태

(soluble form)가 액티빈의 저해물질로서 기능하고, 생체내 투여될 때, 혈액 내에서 적혈구 수준을 증가시킨다는 것을 증명한다. 더욱 온화한 효과가 ActRIIb의 가용성 형태에서 관찰되었는데, 이는 가용성 ActRIIa보다 더욱 낮은 친화성(affinity)으로 액티빈에 결합한다. 가용성 ActRIIa와 ActRIIb가 액티빈 길항작용 이외의 기전을 통하여 적혈구 수준에 영향을 줄 수 있긴 하지만, 그럼에도 불구하고, 본 발명에서는 바람직한 치료제(therapeutic agent)가 액티빈 길항작용 또는 ActRII 길항작용 또는 둘 모두의 기초에서 선택될 수 있음을 증명한다. 이들 작용제는 총체적으로, 액티빈-ActRII 길항물질로 지칭된다. 이런 이유로, 특정 구체예에서, 본 발명에서는 예로써, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드, 액티빈-결합 ActRIIb 폴리펩티드, 항-액티빈 항체, 항-ActRIIa 항체, 항-ActRIIb 항체, 액티빈-, ActRIIb-, 또는 ActRIIa-표적된 소형 분자(small molecule)와 압타머(aptamer), 그리고 액티빈, ActRIIb, 또는 ActRIIa의 발현을 감소시키고, 환자에서 적혈구와 헤모글로빈 수준을 증가시키고, 수증 병든 환자에서 낮은 적혈구 또는 헤모글로빈과 연관된 질환을 치료하는 핵산을 비롯한 액티빈-ActRII 길항물질을 이용하는 방법을 제시한다. 본 명세서에 참조로서 편입된 U.S. Patent Application Serial No. 11/603,485에 기술된 바와 같이, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 골 성장(bone growth)을 촉진하고 골 밀도(bone density)를 증가시키는데 이용될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 적혈구 수준에 대한 이들 길항물질의 효과는 뼈에 대한 이들 길항물질의 효과보다 더욱 신속하고 더욱 낮은 용량에서 나타난다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명에서는 골 밀도에서 현저한 증가를 유발하지 않으면서 적혈구 또는 헤모글로빈 수준을 증가시키기 위하여 액티빈-ActRIIa 길항물질을 이용하는 방법을 제시한다. 가령, 이들 방법은 골 밀도에서 3% 이하, 5% 이하, 10% 이하 또는 15% 이하의 증가를 유발한다. 이런 선택적인 효과는 예로써, 더욱 낮은 용량의 액티빈-ActRIIa 길항물질, 더욱 낮은 투약 빈도를 이용함으로써, 또는 더욱 낮은 혈청 농도(serum concentration)를 제공하도록 계산된 용량과 빈도에서 더욱 짧은 혈청 반감기를 갖는 액티빈-ActRIIa 길항물질을 이용함으로써 달성될 수 있다.

[0013] 특정 측면에서, 본 발명에서는 액티빈에 결합하는 가용성, 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제시한다. 이러한 액티빈 결합 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드 또는 ActRIIb 폴리펩티드이다. ActRII 폴리펩티드는 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드와 제약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 제약학적 조합제(pharmaceutical preparation)로서 조제될 수 있다. 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드는 1 마이크로몰(micromolar) 이하, 또는 100 나노몰(nanomolar) 이하, 10 나노몰 이하 또는 1 나노몰 이하의 K_D 로 액티빈에 결합한다. 임의적으로, 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드는 GDF11 및/또는 GDF8에 대비하여 액티빈에 선택적으로 결합하는데, 임의적으로, GDF11 및/또는 GDF8에서보다 액티빈에 대하여 최소한 10-배, 20-배 또는 50-배 낮은 K_D 를 갖는다. 특정 작용 기전에 한정됨 없이, GDF11/GDF8 저해보다 액티빈 저해에 대한 이러한 선택성(selectivity) 정도는 근육에 대한 지속적으로 측정가능한 효과 없이 뼈 또는 적혈구생성에 대한 효과를 설명할 것으로 예상된다. 많은 구체예에서, ActRII 폴리펩티드는 적혈구 수준에 대한 바람직한 효과를 달성하는 용량에서, 근육 내에서 15% 이하, 10% 이하 또는 5% 이하의 증가를 유발하도록 선택될 것이다. 조성물은 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에 의한 평가에서, 다른 폴리펩티드 성분에 대하여 최소한 95% 순수하고, 임의적으로, 상기 조성물은 최소한 98% 순수하다. 이런 조합제에 이용되는 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 본 명세서에 개시된 임의의 폴리펩티드, 예를 들면, SEQ ID NO: 2, 3, 7 또는 12에서 선택되는 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드, 또는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 또는 13에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드이다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에는 자연 ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 단편(functional fragment), 예를 들면, SEQ ID NO: 1-3, 또는 C-말단 10개 내지 15개 아미노산("꼬리")이 부재하는 SEQ ID NO: 2의 서열에서 선택되는 서열의 최소한 10개, 20개 또는 30개 아미노산을 포함하는 기능적 단편이 포함된다. 이런 조합제에 이용되는 액티빈-결합 ActRIIb 폴리펩티드는 본 명세서에 개시된 임의의 폴리펩티드, 예를 들면, SEQ ID NO: 16, 17, 20 또는 21에서 선택되는 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드, 또는 SEQ ID NO: 16, 17, 20 또는 21에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드이다. 액티빈-결합 ActRIIb 폴리펩티드에는 자연 ActRIIb 폴리펩티드의 기능적 단편(functional fragment), 예를 들면, SEQ ID NO: 15-17, 또는 C-말단 10개 내지 15개 아미노산("꼬리")이 부재하는 SEQ ID NO: 17의 서열에서 선택되는 서열의 최소한 10개, 20개 또는 30개 아미노산을 포함하는 기능적 단편이 포함된다.

[0014] 가용성, 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드는 자연 발생 ActRII 폴리펩티드와 비교하여, 아미노산 서열(가령, 리간드-결합 도메인)에서 하나 이상의 변경(alteration)을 보유한다. 변경된 ActRIIa와 ActRIIb 폴리펩티드의 실례는 각각, WO 2006/012627, pp. 59-60과 pp. 55-58에 제공되는데, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 편입된다. 아미노산 서열에서 변경은 예로써, 포유동물, 곤충 또는 다른 진핵 세포(eukaryotic cell)에서 생산될 때, 폴리

펩티드의 글리코실화(glycosylation)를 변화시키거나, 또는 자연 발생 ActRII 폴리펩티드와 비교하여 폴리펩티드의 단백질 분해 절단(proteolytic cleavage)을 변화시킨다.

[0015] 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드는 하나의 도메인(domain)으로서 ActRII 폴리펩티드(가령, ActRIIa 또는 ActRIIb의 리간드-결합 일부분)와 바람직한 특성, 예를 들면, 향상된 약물 동태(improved pharmacokinetics), 더욱 용이한 정제, 특정 조직으로 표적화 등을 제공하는 하나 이상의 추가적인 도메인을 포함하는 융합 단백질(fusion protein)일 수 있다. 가령, 융합 단백질의 도메인은 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡입/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 융합 단백질의 다중화(multimerization) 및/또는 정제 중에서 1가지 이상을 향상시킬 수 있다. 액티빈-결합 ActRII 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인(야생형(wild-type) 또는 돌연변이형(mutant)), 혈청 알부민, 또는 바람직한 특성, 예를 들면, 향상된 약물 동태, 향상된 용해도(solubility) 또는 향상된 안정성(stability)을 제공하는 다른 폴리펩티드 일부분을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRII-Fc 융합체는 Fc 도메인과 세포외(extracellular) ActRII 도메인 사이에 배치된 상대적으로 체계화되지 않은 링커(linker)를 포함한다. 이러한 체계화되지 않은 링커는 ActRII의 세포외 도메인의 C-말단 단부("꼬리")에서 대략 15개의 아미노산 체계화되지 않은 영역에 상응하거나, 또는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 아미노산의 인공 서열(artificial sequence), 이차 구조가 상대적으로 없는 5개 내지 15개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의 아미노산의 길이, 또는 양쪽의 혼합을 보유할 수 있다. 링커는 글리신(glycine)과 프롤린(proline) 잔기가 풍부하고, 예로써, 트레오닌/세린과 글리신의 단일 서열(single sequence) 또는 트레오닌/세린과 글리신의 반복 서열(repeating sequence)(가령, TG₄(SEQ ID NO:22) 또는 SG₄(SEQ ID NO:23) 단일항(singlet) 또는 반복)을 보유할 수 있다. 융합 단백질은 정제 하위서열(purification subsequence), 예를 들면, 에피토프 태그(epitope tag), FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열(polyhistidine sequence), 그리고 GST 융합을 포함할 수 있다. 임의적으로, 가용성 ActRII 폴리펩티드에는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모이어티(lipid moiety)에 공동된 아미노산, 그리고 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 공동된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기가 포함된다. 제약학적 조합체는 또한, 하나 이상의 추가 화합물, 예를 들면, 골 질환(bone disorder)을 치료하는데 이용되는 화합물을 포함할 수 있다. 적절하게는, 제약학적 조합체는 실질적으로, 발열원(pyrogen)이 없다. 일반적으로, ActRII 단백질은 환자에서 부정적인 면역 반응(immune response)의 가능성을 낮추기 위하여 ActRII 단백질의 자연적인 글리코실화를 적절하게 매개하는 포유동물 세포주(mammalian cell line)에서 발현시키는 것이 바람직하다. 인간과 CHO 세포주(cell line)가 성공적으로 이용되고 있고, 다른 통상적인 포유동물 발현 시스템(expression system)이 유용할 것으로 기대된다.

[0016] 본 명세서에 기술된 바와 같이, ActRIIa-Fc(ActRIIa 일부분과 Fc 부분 사이에 최소 링커를 보유하는 형태)로 명명된 ActRIIa 단백질은 GDF8 및/또는 GDF11에 대비하여 액티빈에 대한 선택적인 결합, 높은 친화성 리간드 결합, 그리고 동물 모형에서 2주 이상의 혈청 반감기를 비롯한 바람직한 특성을 갖는다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRII-Fc 폴리펩티드, 그리고 이들 폴리펩티드와 제약학적으로 허용되는 부형제(pharmaceutically acceptable excipient)를 함유하는 제약학적 조합체를 제시한다.

[0017] 특정 측면에서, 본 발명에서는 가용성 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드, 예를 들면, ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제시한다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 앞서 기술된 바와 같이, 가용성, 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 가령, 분리된 핵산은 ActRII의 세포외 도메인(가령, 리간드-결합 도메인)을 코딩하는 서열과 ActRII의 막통과 도메인 및/또는 세포질 도메인의 일부 또는 전부를 코딩하지만 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 내에 배치된, 또는 세포외 도메인과 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 사이에 배치된 종결 코돈(stop codon)을 코딩하지 않는 서열을 보유할 수 있다. 가령, 분리된 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 4 또는 5와 같은 전장 ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열 또는 SEQ ID NO: 18과 같은 전장 ActRIIb 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 ActRIIa 또는 ActRIIb의 부분적으로 절두된 이형을 포함할 수 있고, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 번역이 전장 ActRII의 절두된 일부분에 임의적으로 융합된 세포외 도메인을 발생시키기 위하여, 3'-말단 앞에 또는 달리 배치된 최소한 600개 뉴클레오티드(nucleotide)의 전사 종결 코돈(transcription termination codon)을 더욱 포함할 수 있다. ActRIIa에 바람직한 핵산 서열은 SEQ ID NO: 14이다. 본 명세서에 개시된 핵산은 발현을 위한 프로모터(promoter)에 작동가능하게 연결될 수 있고, 본 발명에서는 이런 재조합 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포를 제시한다. 적절하게는, 상기 세포는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포이다.

[0018] 특정 측면에서, 본 발명에서는 가용성, 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드를 만드는 방법을 제시한다. 이런 방법에는 적절한 세포, 예를 들면, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포에서 본 명세서에 개시된 임의

의 핵산(가령, SEQ ID NO: 4, 5 14, 18, 또는 19)을 발현시키는 것이 포함될 수 있다. 이런 방법은 a) 가용성 ActRII 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에서 세포를 배양하고, 여기서 상기 세포는 가용성 ActRII 발현 구조체로 형질전환되고; b) 이렇게 발현된 가용성 ActRII 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다. 가용성 ActRII 폴리펩티드는 정제되지 않은, 부분적으로 정제된 또는 고도로 정제된 분취물(fraction)로서 회수될 수 있다. 정제는 예로써, 단백질 A 크로마토그래피(chromatography), 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)(가령, Q 세파로오스(sepharose)), 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography)(가령, 페닐세파로오스(phenylsepharose)), 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 그리고 양이온 교환 크로마토그래피(cation exchange chromatography) 중에서 임의의 순서로, 1가지, 2가지, 3가지 또는 그 이상을 비롯한 일련의 정제 단계에 의해 달성될 수 있다.

[0019] 특정 측면에서, 본 명세서에 개시된 액티빈-ActRII 길항물질, 예를 들면, 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드 또는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIb 폴리펩티드가 개체에서 적혈구 생산을 촉진하거나 적혈구 수준을 증가시키는 방법에 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 병든 환자에서 적은 적혈구 수 또는 낮은 헤모글로빈 수준과 연관된 질환(가령, 빈혈)을 치료하거나, 또는 적혈구 생산을 촉진하는 방법을 제시한다. 이러한 방법은 병든 개체에 효과량의 액티빈-ActRII 길항물질을 투여하는 단계를 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에 기술된 바와 같은 질환이나 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 액티빈-ActRII 길항물질의 용도를 제시한다.

[0020] 특정 측면에서, 본 발명에서는 적혈구의 생산을 촉진하는 작용제를 확인하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 a) 액티빈 또는 ActRII 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인에 결합하는 시험 작용제(test agent)를 확인하는 단계; b) 적혈구, 헤모글로빈 및/또는 적혈구 전구체 수준(가령, 망상적혈구 수준)에 대한 상기 작용제의 효과를 평가하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1에서는 CHO 세포에서 발현된 ActRIIa-hFc의 정제를 도시한다. 상기 단백질은 크기 칼럼(sizing column)(좌측 패널)과 Coomassie 염색된 SDS-PAGE(우측 패널)에 의해 가시화될 때, 완전하게 규정된 단일 피크로서 정화된다(좌측 레인: 분자량 기준; 우측 레인: ActRIIa-hFc).

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

도 3에서는 암컷 비-인간 영장류에서 적혈구 수에 대한 ActRIIa-hFc의 효과를 도시한다. 암컷 키노몰구스 원숭이(cynomolgus monkey)(각각, 5마리 원숭이로 구성되는 4개 군)는 0일, 7일, 14일과 21일에 위약(placebo), 또는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 ActRIIa-hFc로 치료하였다. 도 3A에서는 적혈구(RBC) 수를 도시한다. 도 3B에서는 헤모글로빈 수준을 도시한다. 통계학적 유의성(statistical significance)은 각 치료군(treatment group)에 대한 기준에 상대적이다. 57일에, 2마리 원숭이가 각 군에서 존속하였다.

도 4에서는 수컷 비-인간 영장류에서 적혈구 수에 대한 ActRIIa-hFc의 효과를 도시한다. 수컷 키노몰구스 원숭이(각각, 5마리 원숭이로 구성되는 4개 군)는 0일, 7일, 14일과 21일에 위약, 또는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 ActRIIa-hFc로 치료하였다. 도 4A에서는 적혈구(RBC) 수를 도시한다. 도 4B에서는 헤모글로빈 수준을 도시한다. 통계학적 유의성은 각 치료군에 대한 기준에 상대적이다. 57일에, 2마리 원숭이가 각 군에서 존속하였다.

도 5에서는 암컷 비-인간 영장류에서 망상적혈구 수에 대한 ActRIIa-hFc의 효과를 도시한다. 암컷 키노몰구스 원숭이(각각, 5마리 원숭이로 구성되는 4개 군)는 0일, 7일, 14일과 21일에 위약, 또는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 ActRIIa-hFc로 치료하였다. 도 5A에서는 절대 망상적혈구 수를 도시한다. 도 5B에서는 RBC에 상대적인 망상적혈구의 비율을 도시한다. 통계학적 유의성은 각 치료군에 대한 기준에 상대적이다. 57일에, 2마리 원숭이가 각 군에서 존속하였다.

도 6에서는 수컷 비-인간 영장류에서 망상적혈구 수에 대한 ActRIIa-hFc의 효과를 도시한다. 수컷 키노몰구스 원숭이(각각, 5마리 원숭이로 구성되는 4개 군)는 0일, 7일, 14일과 21일에 위약, 또는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 ActRIIa-hFc로 치료하였다. 도 6A에서는 절대 망상적혈구 수를 도시한다. 도 6B에서는 RBC에 상대적인 망상적혈구의 비율을 도시한다. 통계학적 유의성은 각 치료군에 대한 기준에 상대적이다. 57일에, 2마리 원숭이가 각 군에서 존속하였다.

도 7에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 결과를 도시하는데, 여기서 ActRIIa-hFc의 곡선 아래 영

역(area-under-curve, AUC)과 투여량은 ActRIIa-hFc가 정맥내(IV) 또는 피하(SC) 투여되는 지에 상관없이, 선형 상관관계(linear correlation)를 갖는다,

도 8에서는 IV 또는 SC 투여된 환자에서 ActRIIa-hFc의 혈청 수준의 비교 결과를 도시한다.

도 9에서는 상이한 용량 수준의 ActRIIa-hFc에 대응으로, 골 알칼리성 포스파타아제(bone alkaline phosphatase, BAP) 수준을 도시한다. BAP는 단백질화 골 성장(anabolic bone growth)에 대한 마커(marker)이다.

도 10에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 헤마토크릿(hematocrit) 수준의 기준으로부터 평균 변화(median change)를 도시한다. ActRIIa-hFc는 지정된 용량에서 정맥내(IV) 투여되었다.

도 11에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 헤모글로빈 수준의 기준으로부터 평균 변화(median change)를 도시한다. ActRIIa-hFc는 지정된 용량에서 정맥내(IV) 투여되었다.

도 12에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 RBC(적혈구) 수의 기준으로부터 평균 변화(median change)를 도시한다. ActRIIa-hFc는 지정된 용량에서 정맥내(IV) 투여되었다.

도 13에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 망상적혈구 수의 기준으로부터 평균 변화(median change)를 도시한다. ActRIIa-hFc는 지정된 용량에서 정맥내(IV) 투여되었다.

1. 개요

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

액티빈(activin)은 TGF-베타 대과에 속하는 이합체(dimeric) 폴리펩티드 성장 인자이다. 2개의 밀접하게 관련된 β 아단위(subunit)의 동종이합체(homodimer)/이종이합체(heterodimer)(각각, $P_A P_A$, $P_B P_B$, and $P_A P_B$)인 3가지 주요 액티빈 형태(A, B와 AB)가 존재한다. 인간 계통은 또한, 액티빈 C와 액티빈 E를 인코딩하는데, 이들은 간에서 주로 발현되고, β_c 또는 β_e 를 보유하는 이종이합체(heterodimeric) 형태 역시 공지되어 있다. TGF-베타 대과에서, 액티빈은 난소와 태반 세포에서 호르몬 생산을 촉진하고, 신경 세포 생존을 뒷받침하고, 세포 유형(cell type)에 따라 세포-주기 진행에 긍정적인 또는 부정적인 영향을 주고, 최소한 양서류 배(amphibian embryo)에서 중배엽 분화(mesodermal differentiation)를 유도할 수 있는 독특한 다중기능성 인자이다(DePaolo et al., 1991, Proc Soc Exp Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). 게다가, 자극된 인간 단핵구 백혈병(monocytic leukemic) 세포로부터 분리된 적혈구 분화 인자(erythroid differentiation factor, EDF)가 액티빈 A와 동일한 것으로 밝혀졌다(Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). 액티빈 A는 골수에서 적혈구생성을 촉진하는 것으로 제안되었다. 여러 조직에서, 액티빈 신호전달은 관련된 동종이합체, 인히빈(inhibin)에 의해 길항된다. 가령, 뇌하수체(pituitary)로부터 여포-자극 호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH)의 방출 동안, 액티빈은 FSH 분비와 합성을 촉진하는 반면, 인히빈은 FSH 분비와 합성을 예방한다. 액티빈 생물활성(bioactivity)을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질에는 폴리스타틴(follistatin, FS), 폴리스타틴-관련된 단백질(follistatin-related protein, FSRP)과 α_2 -마크로글로불린(macroglobulin)이 포함된다.

TGF- β 신호는 I형과 II형 세린/트레오닌 키나아제 수용체(kinase receptor)의 이가동의 복합체(heteromeric

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

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

본 발명에서 증명된 바와 같이, 다른 TGF-베타 집단 구성원, 예를 들면, GDF8 또는 GDF11에 대비하여, 액티빈 A에 실질적으로 우선적인 결합을 보이는 가용성 ActRIIa 폴리펩티드(sActRIIa)는 생체내에서 적혈구 수준을 증가시키는데 효과적이다. 특정 기전에 한정됨 없이, sActRIIa의 이러한 효과는 이들 연구에 이용된 특정 sActRIIa 구조체(construct)에 의해 나타나는 매우 강한 액티빈 결합(피코몰(picomolar) 해리 상수(dissociation constant))을 고려할 때, 액티빈 길항물질 효과에 의해 주로 유도될 것으로 기대된다. 기전에 상관없이, 본 발명의 개시로부터, ActRIIa-액티빈 길항물질이 설치류, 원숭이와 인간에서 적혈구 수준을 증가시킨다는 것이 명백하다. 혈액생성(hematopoiesis)은 에리트로포이에틴(erythropoietin), G-CSF와 철 항상성(iron homeostasis)을 비롯한 다양한 인자에 의해 조절되는 복잡한 과정이다. "적혈구 수준 증가"와 "적혈구 형성 촉진"은 임상적으로 관찰가능 측정기준(metric), 예를 들면, 헤마토크릿(hematocrit), 적혈구 수(red blood cell count)와 헤모글로빈(hemoglobin) 척도를 지칭하고, 이런 변화가 발생하는 기전에 중립적인 것으로 의도된다.

또한, 본 명세서에서 증명된 바와 같이, 가용성 ActRIIb 폴리펩티드(sActRIIb)는 생체내에서 망상적혈구 수준을 증가시키는데 효과적이는데, 이러한 효과는 더욱 긴 기간 동안, 증가된 헤마토크릿 수준을 유도할 것으로 기대된다.

비-인간 영장류에 대하여 본 명세서에 보고된 데이터는 생쥐, 쥐와 인간에서도 재현가능하고, 따라서 본 발명에서는 설치류에서부터 인간에 이르는 포유동물에서 적혈구 생산을 촉진하고 적혈구 수준을 증가시키기 위하여 ActRII 폴리펩티드와 다른 액티빈-ActRII 길항물질을 이용하는 방법을 제시한다. 액티빈-ActRII 길항물질에는 예로써, 액티빈-결합 가용성 ActRIIa 폴리펩티드; 액티빈-결합 가용성 ActRIIb 폴리펩티드; 액티빈(특히, β A 또는 β B로 지칭되는 액티빈 A 또는 B 아단위)에 결합하고 ActRIIa 및/또는 ActRIIb 결합을 교란시키는 항체; ActRIIa에 결합하고 액티빈 결합을 교란시키는 항체; ActRIIb에 결합하고 액티빈 결합을 교란시키는 항체; 액티빈, ActRIIb 또는 ActRIIa 결합을 위하여 선택된 비-항체 단백질(이들 단백질의 실체와 이들의 설계와 선택 방법은 WO/2002/088171, WO/2006/055689와 WO/2002/032925를 참조한다); 액티빈, ActRIIb 또는 ActRIIa 결합을 위하여 선택되고 Fc 도메인에 종종 부착되는 무작위화 펩티드(randomized peptide) 등이 포함된다. 액티빈, ActRIIb 또는 ActRIIa 결합 활성을 갖는 2개의 상이한 단백질(또는 다른 모이어티(moiety)), 특히, I형(가령, 가용성 I형 액티빈 수용체)과 II형(가령, 가용성 II형 액티빈 수용체) 결합 부위를 각각 차단하는 액티빈 접합제(binder)는 이중기능성(bifunctional) 결합 분자를 산출하기 위하여 서로 연결될 수 있다. 핵산 압타머, 소형 분자와 액티빈-ActRII 신호전달 축을 저해하는 다른 작용제가 액티빈-ActRII 길항물질로서 포함된다. 인히빈(즉, 인히빈 알파 아단위; 하지만, 인히빈이 모든 조직에서 액티빈을 보편적으로 길항하는 것은 아니다), 폴리스타틴(follistatin)(가령, 폴리스타틴-288과 폴리스타틴-315), FSRP, 액티빈 C, 알파(2)-마크로글로불린, 그리고 M 108 A(108번 위치에서 메티오닌(methionine)에서 알라닌(alanine)으로 변화) 돌연변이체 액티빈 A를 비롯한 다양한 단백질이 액티빈-ActRII 길항물질 활성을 갖는다. 일반적으로, 액티빈의 대안적 형태, 특히, I형 수용체 결합 도메인에서 변형을 보유하는 형태는 II형 수용체에 결합할 수 있지만 활성 3원 복합체(ternary complex)를 형성할 수 없기 때문에, 길항물질로서 기능한다. 부가적으로, 안티센스(antisense) 분자, siRNA 또는 액티빈 A, B, C 또는 E, 특히, ActRIIa 또는 ActRIIb 발현을 저해하는 리보자임(ribozyme)과 같은 핵산이 액티빈-ActRII 길항물질로서 이용될 수 있다. 이용되는 이러한 액티빈-ActRII 길항물질은 TGF-베타 과의 다른 구성원, 특히, GDF8과 GDF11에 대비하여, 액티빈-매개된 신호전달을 저해하는데 선택성을 나타낼 수 있다.

본 명세서에 이용되는 용어는 일반적으로, 본 발명의 배경 내에서 각 용어가 이용되는 특정 상황에서, 당분야의

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

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

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

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

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

"서열 유사성"은 모든 문법적 형태에서, 공통의 진화적 기원을 공유하거나 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 동일성 또는 일치성의 정도를 지칭한다.

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

2. ActRII 폴리펩티드

특정 측면에서, 본 발명은 ActRII 폴리펩티드에 관계한다. 본 명세서에서, "ActRII"는 II형 액티빈 수용체 집단을 지칭한다. 상기 집단에는 액티빈 수용체 타입 Ha와 액티빈 수용체 타입 Hb가 모두 포함된다.

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

"ActRIIa 폴리펩티드"에는 ActRIIa 집단 구성원의 자연 발생 폴리펩티드와 유용한 활성을 유지하는 이들의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체, 그리고 펩티도미메틱 형태(peptidomimetic form) 포함)를 포함하는 폴리펩티드가 포함된다(참조: WO/2006/012627). 가령, ActRIIa 폴리펩티드에는 ActRIIa 폴리펩티드의 서열에 최소한 대략 80% 동일한 서열을 보유하고 임의적으로, 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는, 임의의 공지된 ActRIIa의 서열로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 단백질 및/또는 액티빈에 결합하고 이의 기능을 저해한다. ActRIIa 폴리펩티드는 생체내에서 적혈구 형성을 촉진하는 활성에 대하여 선택될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 인간 ActRIIa 전구체 폴리펩티드(SEQ ID NO: 1)와 가용성 인간 ActRIIa 폴리펩티드(가령, SEQ ID NO: 2, 3, 7과 12)가 포함된다.

인간 ActRIIa 전구체 단백질 서열은 아래와 같다:

MGAAAKLAFVFLISCSGAI**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP**
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPL
 MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPSPLLGLKPLQLE
 VKARGREFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
 ILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
 TMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFL
 ALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL
 VLWELASRCTAADGFVDEYMLPFEEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVL
 RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
 TEDIVTVVTMVTNVDFFPKESL (SEQ ID NO: 1)

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

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

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP**EVYFCCCEGNCNEKFSYFP**
EMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

세포외 도메인의 C-말단 "꼬리"는 밑줄로 표시된다. 이러한 "꼬리"가 결실된 서열($\Delta 15$ 서열)은 아래와 같다:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP**EVYFCCCEGNCNEKFSYFP**
 EM (SEQ ID NO:3)

인간 ActRIIa 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다(Genbank entry NM_001616의 뉴클레오타이드 164-1705):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTCTTATCTCCTGTT
 CTTACAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGCTTTTCTT
 TAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCG
 TGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGA
 ATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTGTTGGCTGGATGA
 TATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCT
 GAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTT
 CTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTAC
 ACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCCTTGGTGCCACTT
 ATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATC
 ACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTCAACTCAAGACCCAGGACC
 ACCCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAA
 GTGAAAGCAAGGGGAAGATTGGTTGTGTCTGGAAGCCAGTTGCTTA
 ACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATG
 GCAAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCCTGGAATGAAGCATGAGAAC
 ATATTACAGTTTCAATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACCAGTGTGATGTGG
 ATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCATATCAGACTT
 TCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAAGTGTGTATATGCAGAA
 ACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAA
 AAGATGGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAA

TGTGCTGTTGAAAAACAACCTGACAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTG
GCCTTAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGG
TTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGCATATAA
CTTCCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTA
GTCCTATGGGAACCTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAG
ATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCT
TGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTA
AGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCA
TTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTATCAGCTGGATG
TGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACC
ACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTC
CTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

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

ATACTTGCTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATT
GGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCGTGTATGGTGA
CAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGT
TCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCT
ATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTT
TTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTCCA
GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCAC
CC (SEQ ID NO: 5)

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

"ActRIIb 폴리펩티드"에는 ActRIIb 집단 구성원의 자연 발생 폴리펩티드와 유용한 활성을 유지하는 이들의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체, 그리고 펩티도미메틱 형태(peptidomimetic form) 포함)를 포함하는 폴리펩티드가 포함된다(참조: WO/2006/012627). 가령, ActRIIb 폴리펩티드에는 ActRIIb 폴리펩티드의 서열에 최소한 대략 80% 동일한 서열을 보유하고 임의적으로, 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는, 임의의 공지된 ActRIIb의 서열로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다. 가령, 본 발명의 ActRIIb 폴리펩티드는 ActRIIb 단백질 및/또는 액티빈에 결합하고 이의 기능을 저해한다. ActRIIb 폴리펩티드는 생체내에서 적혈구 형성을 촉진하는 활성에 대하여 선택될 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드의 실례에는 인간 ActRIIb 전구체 폴리펩티드(SEQ ID NO: 1)와 가용성 인간 ActRIIb 폴리펩티드(가령, SEQ ID NO: 16, 17, 20과 21)가 포함된다.

인간 ActRIIb 전구체 단백질 서열은 아래와 같다:

MTAPWVALALLWGSLSWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERC
EGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGWLDDEFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSEELQEVVVHKKMRPTIK
DHWLKHPLGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 15)

신호 펩티드는 단일 밑줄로 표시된다; 세포외 도메인은 굵은 글씨체로 표시되고, 잠재적 N-연결된 글리코실화 부위(glycosylation site)는 박스로 표시된다.

인간 ActRIIb 가용성(세포외), 가공된 폴리펩티드 서열은 아래와 같다:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSS
GTIELVKKGCWLDDEFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL
PEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 16)

세포외 도메인의 C-말단 "꼬리"는 밑줄로 표시된다. 이러한 "꼬리"가 결실된 서열($\Delta 15$ 서열)은 아래와 같다:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSS
GTIELVKKGCWLDDEFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL
PEA (SEQ ID NO: 17)

인간 ActRIIb 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다(Genbank entry NM_001106의 뉴클레오티드 5-1543):

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGATCTACTACAA
CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCTGGAGCGCTGC
GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCAG
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCGCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGAC
AGCCCCACCTGCTCACGGTGTGGCCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
GGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
AGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCTGGGCCTCCACC
ACCATCCCCCTCTGGTGGGCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
GGGAACATCATCACATGGAACGAACCTGTGTATGTAGCAGAGACGATG
TCACGAGGCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAGTAAGAATGT
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
GTTTCGATTTGAGCCAGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
CCAGAGAGATGCCCTTCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG

AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCTTCGTTGGA
GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGACAAGAAGATGAGGCCCACCATTA
GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCTGGCCAGCTTTGTGTGACCATCG
AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGGGGCTGTGT
GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCCGAGGTGCGTCAACGGCACTACCTCG
GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCC
CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 18)

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

```
TCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCA
ACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGG
CGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCT
GGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACT
GCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCGAGGTGTA
CTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTG
CCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCC
CCACC (SEQ ID NO: 19)
```

특정 구체예에서, 본 발명은 가용성 ActRII 폴리펩티드에 관계한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, "가용성 ActRII 폴리펩티드"는 일반적으로, ActRIIa 또는 ActRIIb 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 본 명세서에서, "가용성 ActRII 폴리펩티드"에는 ActRIIa 또는 ActRIIb 단백질의 자연 발생 세포외 도메인과 이의 변이체(돌연변이체, 단편과 펩티드모방 형태 포함)가 포함된다. 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드는 예로써, 액티빈 AA, AB, BB, 또는 C 또는 E 아단위를 포함하는 형태를 비롯한 액티빈에 결합하는 능력을 유지한다. 임의적으로, 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드는 1 nM 또는 그 이하의 해리 상수로 액티빈 AA에 결합할 것이다. ActRII 단백질의 세포외 도메인은 액티빈에 결합하고, 일반적으로, 가용성이고, 따라서 가용성, 액티빈-결합 ActRII 폴리펩티드로 명명될 수 있다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12와 13에 예시된 가용성 폴리펩티드가 포함된다. SEQ ID NO: 7은 ActRIIa-hFc로 지칭되고, 실시예에서 더욱 상세하게 기술된다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드의 다른 실례는 ActRIIa 단백질의 세포외 도메인 이외에 신호 서열, 예를 들면, 꿀벌 멜리틴(honey bee mellitin) 리더 서열(SEQ ID NO: 8), 조직 플라스미노겐 활성화인자(tissue plasminogen activator, TPA) 리더(SEQ ID NO: 9) 또는 고유 ActRIIa 리더(SEQ ID NO: 10)를 포함한다. SEQ ID NO: 13에 예시된 ActRIIa-hFc 폴리펩티드는 TPA 리더를 이용한다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIb 폴리펩티드의 실례에는 SEQ ID NO: 16, 17, 20에 예시된 가용성 폴리펩티드가 포함된다. 액티빈-결합 ActRIIb 폴리펩티드는 또한, ActRIIb 단백질의 세포외 도메인 이외에 신호 서열, 예를 들면, 꿀벌 멜리틴(honey bee mellitin) 리더 서열(SEQ ID NO: 8) 또는 조직 플라스미노겐 활성화인자(tissue plasminogen activator, TPA) 리더(SEQ ID NO: 9)를 포함할 수 있다.

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

ActRII 폴리펩티드의 기능적 활성 변이체는 ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 상응하는 돌연변이된 핵산으로부터 재조합 방식으로 생산된 변형된 폴리펩티드의 라이브러리를 선별함으로써 취득될 수 있다. 이들 변이체는 생산되고, 액티빈에 의해 매개되는 ActRII 단백질 또는 신호전달의 길항물질(저해물질)로서 기능할 수 있는 변이체를 확인하기 위하여 검사될 수 있다. 특정 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 사례에서, 이러한 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 보유한다. 특정 구체예에서, ActRIIb 폴리펩티드의 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 16 또는 17에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 사례에서, 이러한 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 17 또는 18에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 보유한다.

기능적 변이체는 치료 효능(therapeutic efficacy), 또는 안정성(가령, 체외 반감기(ex vivo shelf life)와 생체내에서 단백질 분해(proteolytic degradation)에 대한 내성)를 강화시키는 것과 같은 목적을 위하여 ActRII 폴리펩티드의 구조를 변형함으로써 산출될 수도 있다. 이런 변형된 ActRII 폴리펩티드는 액티빈 결합을 유지하도록 선택될 때, 자연-발생 ActRII 폴리펩티드의 기능적 등가체(functional equivalent)로 간주된다. 변형된 ActRII 폴리펩티드는 예로써, 아미노산 치환, 결실, 또는 부가에 의해 생산될 수 있다. 가령, 이소루이신 또는 발린으로 루이신의 분리된 치환, 글루타민산염으로 아스파라긴산염의 분리된 치환, 세린으로 트레오닌의 분리된 치환,

또는 구조적으로 관련된 아미노산으로 아미노산의 유사한 치환(가령, 보존성 돌연변이)은 결과의 분자의 생물학적 활성에 주요한 효과를 나타내지 않을 것으로 예상하는 것은 합당하다. 보존성 치환은 측쇄에 관련된 아미노산 집단 내에서 발생하는 치환이다. ActRII 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화가 기능적 동족체(functional homolog)를 결과하는 지의 여부는 야생형 ActRII 폴리펩티드에서와 유사한 방식으로 세포 내에서 반응을 유도하는 변이 ActRII 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

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

본 발명에서는 돌연변이체, 특히, ActRII 폴리펩티드의 조합 돌연변이체(combinatorial mutant)의 세트와 절두 돌연변이체(truncation mutant)를 산출하는 방법을 계획한다; 조합 돌연변이체의 집합은 기능적 변이체 서열을 확인하는데 특히 유용하다. 이런 조합 라이브러리(combinatorial library)를 선별하는 목적은 예로써, 액티빈 또는 다른 리간드에 결합하는 ActRII 폴리펩티드 변이체를 산출하는 것이다. 다양한 선별 분석(screening assay)이 하기에 제시되는데, 이들 분석은 변이체를 평가하는데 이용될 수 있다. 가령, ActRII 폴리펩티드 변이체는 ActRII 리간드에 결합하거나, ActRII 폴리펩티드에 ActRII 리간드의 결합을 예방하거나, 또는 ActRII 리간드에 의해 유도된 신호전달을 간섭하는 능력에 대하여 선별된다.

ActRII 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 또한, 세포 내에서-기초된 또는 생체내 분석에 의해 검사될 수 있다. 가령, 혈액생성에 관여하는 유전자의 발현에 대한 ActRII 폴리펩티드 변이체의 효과가 평가된다. 이는 필요에 따라, 하나 이상의 재조합 ActRII 리간드 단백질(가령, 액티빈)의 존재에서 수행되고, 세포는 ActRII 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 그리고 임의적으로, ActRII 리간드를 생산하기 위하여 형질감염(transfection)될 수 있다. 유사하게, ActRII 폴리펩티드는 생쥐 또는 다른 동물에 투여되고, 하나 이상의 혈액 척도(blood measurement), 예를 들면, RBC 수, 헤모글로빈, 또는 망상적혈구 수가 평가될 수 있다.

자연 발생 ActRII 폴리펩티드에 비하여 선택적인 또는 전반적으로 증가된 효능을 갖는 조합-유래된 변이체가 산출될 수 있다. 유사하게, 돌연변이유발(mutagenesis)은 상응하는 야생형 ActRII 폴리펩티드와 극히 상이한 세포 내 반감기를 갖는 변이체를 산출할 수 있다. 가령, 변경된 단백질은 고유 ActRII 폴리펩티드의 파괴, 또는 불활성화를 유발하는 단백질 분해 변성 또는 다른 세포 과정에 더욱 안정화되거나 또는 덜 안정화될 수 있다. 이들 변이체와 이들을 인코딩하는 유전자는 ActRII 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 ActRII 폴리펩티드 수준을 변화시키는데 이용될 수 있다. 가령, 짧은 반감기는 더욱 일시적인 생물학적 효과를 발생시키고, 유도성 발현 시

시스템의 일부일 때, 세포 내에서 재조합 ActRII 폴리펩티드 수준의 더욱 엄격한 제어를 가능하게 할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 돌연변이는 상기 단백질의 반감기를 변화시키기 위하여 링커(존재하면) 및/또는 Fc 부분에서 발생될 수 있다.

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

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

대안으로, 조합 라이브러리를 산출하기 위하여 다른 형태의 돌연변이유발이 이용될 수 있다. 가령, ActRII 폴리펩티드 변이체는 예로써, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발(alanine scanning mutagenesis) 등을 이용한 선별에 의해(Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085), 링커 스캐닝 돌연변이유발(linker scanning mutagenesis)에 의해(Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); 포화 돌연변이(saturation mutagenesis)에 의해(Meyers et al., (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이에 의해(Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 또는 화학적 돌연변이유발(chemical mutagenesis) 등을 비롯한 무작위 돌연변이유발(random mutagenesis)에 의해(Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34), 라이브러리로부터 산출되고 분리될 수 있다. 링커 스캐닝 돌연변이유발, 특히, 조합 설정(combinatorial setting)에서 링커 스캐닝 돌연변이유발은 절두된(생물활성) 형태의 ActRII 폴리펩티드를 확인하기 위한 매력적인 방법이다.

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

특정 구체예에서, 본 발명의 ActRII 폴리펩티드는 ActRII 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 변형 이외에, 추가의 번역후 변형(post-translational modification)을 포함할 수 있다. 이들 변형에는 예로써, 아세틸화(acetylation), 카르복실화(carboxylation), 글리코실화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 지질화(lipidation)와 아실화(acylation)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 결과로써, 이러한 변형된 ActRII 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 지질(lipid), 폴리사카라이드(polysaccharide) 또는 모노사카라이드(monosaccharide), 그리고 인산염(phosphate)을 포함할 수 있다. ActRII 폴리펩티드의 기능성(functionality)에 대한 이런 비-아미노산 요소의 효과는 다른 ActRII 폴리펩티드 변이체에 대하여, 본 명세서에 기술된 바와 같이 검사될 수 있다. ActRII 폴리펩티드가 ActRII 폴리펩티드의 초기 형태(nascent form)를 절단함으로써 세포 내에서 생산될 때, 번역후 처리(post-translational processing)

역시 단백질의 정확한 접힘(folding) 및/또는 기능에 중요하다. ActRII 폴리펩티드의 정확한 변형과 처리를 담보하기 위하여, 이런 번역후 활성을 위한 특이적인 세포 기구와 특징적인 기전을 보유하는 상이한 세포(가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)가 선택될 수 있다.

특정 측면에서, ActRII 폴리펩티드의 기능적 변이체 또는 변형된 형태에는 ActRII 폴리펩티드의 최소한 일부분과 하나 이상의 융합 도메인을 보유하는 융합 단백질이 포함된다. 이런 융합 도메인의 널리 공지된 실례에는 폴리히스티딘(polyhistidine), Glu-Glu, 글루타티온 S 전이효소(glutathione S transferase, GST), 티오레독신(thioredoxin), 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토오스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 특성을 공여하도록 선택된다. 가령, 일부 융합 도메인은 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의한 융합 단백질의 분리에 특히 유용하다. 친화성 정제를 위하여, 친화성 크로마토그래피에 적합한 기반(matrix), 예를 들면, 글루타티온-, 아밀라아제-, 그리고 니켈- 또는 코발트-공동된 수지가 이용된다. 이들 기반 중에서 대부분은 "키트" 형태, 예를 들면, Pharmacia GST 정제 시스템과 (HIS₆) 융합 상대와 함께 이용되는 QIAexpress™ 시스템(Qiagen)으로 가용하다. 다른 실례로서, 융합 도메인은 ActRII 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 선택된다. 이런 검출 도메인의 실례에는 다양한 형광 단백질(가령, GFP)과 "에피토프 태그(epitope tag)"가 포함되는데, 이들 태그는 통상적으로, 특이적인 항체가 가용한 짧은 펩티드 서열이다. 특이적인 단클론 항체가 용이하게 가용한 널리 공지된 에피토프 태그에는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(influenza virus haemagglutinin, HA)과 c-myc 태그가 포함된다. 일부 사례에서, 융합 도메인은 프로테아제 절단 부위(protease cleavage site), 예를 들면, 인자 Xa 또는 트롬빈(thrombin)에 대한 프로테아제 절단 부위를 보유하는데, 상기 부위는 관련된 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 절단하여, 이로부터 재조합 단백질이 유리될 수 있도록 한다. 유리된 단백질은 이후, 차후의 크로마토그래피 분리(chromatographic separation)에 의해 융합 도메인으로부터 분리될 수 있다. 특정의 바람직한 구체예에서, ActRII 폴리펩티드는 생체내에서 ActRII 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인("안정화" 도메인)과 융합된다. "안정화"는 이러한 안정화가 감소된 파괴, 신장에 의한 감소된 소거, 또는 다른 약동학적 효과에 기인하는 지에 상관없이, 혈청 반감기를 증가시키는 무언가를 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 범위의 단백질에 바람직한 약동학적 특성을 공여하는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 융합은 바람직한 특성을 공여할 수 있다. 선택되는 다른 유형의 융합 도메인에는 다중화(multimerizing)(가령, 이합화(dimerizing), 사합화(tetramerizing)) 도메인과 기능성 도메인(추가적인 생물학적 기능, 예를 들면, 근육 성장의 추가적인 자극 공여)이 포함된다.

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

```

THTCPPEPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV(A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN(A) HYTQKSLSLSPGK*

```

부가적인 특정 실례로서, 본 발명에서는 Fc 도메인에 융합된 ActRIIb의 가용성 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질(가령, SEQ ID NO: 21)을 제시한다.

```

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGWLD
DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCP
PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

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

융합 단백질의 상이한 요소는 원하는 기능성과 일치하는 임의의 방식으로 정렬될 수 있다. 가령, ActRII 폴리펩티드가 이질성 도메인의 C-말단에 배치되거나, 또는 대안으로, 이질성 도메인이 ActRII 폴리펩티드의 C-말단에

배치될 수 있다. ActRII 폴리펩티드 도메인과 이질성 도메인은 융합 단백질 내에서 인접할 필요가 없고, 추가적인 도메인 또는 아미노산 서열이 한쪽 도메인의 C- 또는 N-말단에 또는 이들 도메인 사이에 포함될 수 있다.

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

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

3. ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산

특정 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에 개시된 단편, 기능적 변이체와 융합 단백질을 비롯한 임의의 ActRII 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드와 가용성 ActRIIb 폴리펩티드)를 인코딩하는 분리된 및/또는 재조합 핵산을 제시한다. 가령, SEQ ID NO: 4는 자연 발생 인간 ActRIIa 전구체 폴리펩티드를 인코딩하는 반면, SEQ ID NO: 5는 ActRIIa의 가공된 세포외 도메인을 인코딩한다. 가령, SEQ ID NO: 18은 자연 발생 인간 ActRIIb 전구체 폴리펩티드를 인코딩하는 반면, SEQ ID NO: 19는 ActRIIb의 가공된 세포외 도메인을 인코딩한다. 본 발명의 핵산은 단일 가닥(single-strand) 또는 이중 가닥(double strand)이다. 이들 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 이들 핵산은 예로써, ActRII 폴리펩티드를 제조하는 방법에, 또는 직접적인 치료제(가령, 유전자 치료법에서)로서 이용될 수 있다.

특정 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 핵산은 SEQ ID NO: 4 또는 5의 변이체 핵산을 포괄하는 것으로 간주된다. 특정 측면에서, ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 핵산은 SEQ ID NO: 18 또는 19의 변이체 핵산을 포괄하는 것으로 간주된다. 변이체 뉴클레오티드 서열에는 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 구별되는 서열, 예를 들면, 대립형질 변이체(allelic variant)가 포함된다.

특정 구체예에서, 본 발명에서는 SEQ ID NO: 4, 5, 18, 또는 19에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 분리된 또는 재조합 핵산 서열을 제시한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, SEQ ID NO: 4, 5, 18, 또는 19에 상보적인 핵산 서열, 그리고 SEQ ID NO: 4, 5, 18, 또는 19의 변이체 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 서열은 분리되고, 재조합되고 및/또는 이질성 뉴클레오티드 서열과 융합되거나 DNA 라이브러리 내에 융합될 수 있다.

다른 구체예에서, 본 발명의 핵산에는 SEQ ID NO: 4, 5, 18, 또는 19에 열거된 뉴클레오티드 서열에 고도로 엄밀한 조건 하에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열, SEQ ID NO: 4, 5, 18, 또는 19의 보체 서열, 또는 이들의 단편 역시 포함된다. 앞서 언급된 바와 같이, 당업자는 DNA 혼성화(hybridization)를 촉진하는 적절한 엄밀도(stringency) 조건이 변화될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 당업자는 DNA 혼성화(hybridization)를 촉진하는 적절한 엄밀도(stringency) 조건이 변화될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 가령, 대략 45°C에서 6.0 x 염화나트륨(sodium chloride)/시트르산나트륨(sodium citrate)(SSC)에서 혼성화, 이후 50°C에서 2.0 x SSC의 세척을 수행할 수 있다. 가령, 세척 단계에서 염 농도는 50°C에서 대략 2.0 x SSC의 낮은 엄밀도 내지 50°C에서 대략 0.2 x SSC의 높은 엄밀도에서 선택될 수 있다. 이에 더하여, 세척 단계에서 온도는 실온(대략 22°C)에서 낮은 엄밀도 조건에서 대략 65°C에서 높은 엄밀도 조건으로 증가될 수 있다. 온도와 염 모두 변화되거나, 또는 다른 변수가 변하는 반면에 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명은 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄밀도 조건하에 혼성화되고, 이후 실온에서 2 x SSC에서 세척되는 핵산을 제시한다.

유전자 코드(genetic code)에서 축퇴(degeneracy)로 인하여 SEQ ID NO: 4, 5, 18 또는 19에 열거된 핵산과 차별되는 분리된 핵산 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 가령, 다수의 아미노산이 하나 이상의 삼중항(triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 명기하는 코돈, 또는 동종이명(synonym)(가령, CAU와 CAC는 히스티딘에 대한 동종이명(synonym)이다)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 "침묵" 돌연변이를 유도한다. 하지만,

본 발명의 단백질의 아미노산 서열에서 변화를 유발하는 DNA 서열 다형성(polymorphism)이 포유동물 세포 사이에 존재할 것으로 예상된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특정 단백질을 인코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드에서 이들 변이(뉴클레오티드의 최대 3-5%)가 자연적인 대립형질 변이(allelic variation)로 인하여 특정한 종의 개체 사이에 존재할 수 있다. 이와 같은 모든 뉴클레오티드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 내에 있다.

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

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

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

일부 포유동물 발현 벡터는 세균 내에서 벡터의 증식을 용이하게 하는 원핵 서열, 그리고 진핵 세포에서 발현되는 하나 이상의 진핵 전사 단위(transcription unit)를 모두 포함한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo와 pHyg 유래된 벡터는 진핵 세포의 형질감염(transfection)에 적합한 포유동물 발현 벡터의 실례이다. 이들 벡터 중에서 일부는 원핵과 진핵 세포 모두에서 복제와 내약성(drug resistance) 선택을 용이하게 하는 세균 플라스미드, 예를 들면, pBR322로부터 서열로 변형된다. 대안으로, 소 파필로마 바이러스(bovine papilloma virus)(BPV-I), 또는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus)(pHEBo, pREP-유래된, p205)와 같은 바이러스의 유도체가 진핵 세포에서 단백질의 일시적인 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 실례는 하기, 유전자 치료 전달 시스템의 설명에서 확인할 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 생물체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법이 당분야에 널리 공지되어 있다. 원핵과 진핵 세포 둘 모두에 적합한 다른 발현 시스템 및 전반적인 재조합 절차는 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001을 참조한다. 일부 사례에서, 배큘로바이러스 발현 시스템의 이용으로 재조합 폴

리펩티드를 발현하는 것이 바람직하다. 이런 배콜로바이러스 발현 시스템의 실례에는 pVL-유래된 벡터(가령, pVL1392, pVL1393과 pVL941), pAcUW-유래된 벡터(가령, pAcUW1), 그리고 pBlueBac-유래된 벡터(가령, β -gal 보유 pBlueBac III)가 포함된다.

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

본 발명은 또한, 하나 이상의 본 발명의 ActRII 폴리펩티드에 대한 코딩 서열(가령, SEQ ID NO: 4, 5, 18 또는 19)을 비롯한 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 관계한다. 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포이다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 세균 세포(가령, 대장균(*E. coli*)), 곤충 세포(가령, 배콜로 바이러스 발현 시스템 이용), 효모, 또는 포유동물 세포에서 발현된다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다.

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

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

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

4. 대안적 액티빈과 ActRII 길항물질

본 명세서에 제공된 데이터는 액티빈-ActRII 신호전달의 길항물질이 적혈구 또는 헤모글로빈 수준을 증가시키는 데 이용될 수 있음을 증명한다. 가용성 ActRIIa와 ActRIIb 폴리펩티드, 특히, ActRIIa-Fc와 ActRIIb-Fc가 선호

되는 길항물질이고, 이런 길항물질이 액티빈 길항작용(antagonism) 이외의 기전(가령, 액티빈 저해는 아마도, TGF-beta 대과의 다른 구성원을 비롯한 광범위한 분자의 활성을 저해하는 작용제의 추세의 지표이고, 이런 집단적인 저해는 혈액생성에 바람직한 효과를 유도한다)을 통하여 적혈구 수준에 영향을 줄 수 있긴 하지만, 항-액티빈(가령, 액티빈 β_A , β_B , β_C 와 β_E) 항체, 항-ActRIIa 항체, 항-ActRIIb 항체, 안티센스, ActRIIa 및/또는 ActRIIb의 생산을 저해하는 RNAi 또는 리보자임 핵산, 그리고 액티빈, ActRIIa 또는 ActRIIb의 다른 저해물질, 특히, 액티빈-ActRIIa 및/또는 액티빈-ActRIIb 결합을 파괴하는 저해물질을 비롯한, 다른 유형의 액티빈-ActRII 길항물질 역시 유용할 것으로 기대된다.

ActRII 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드)와 특이적으로 반응하고, ActRII 폴리펩티드를 포함하는 리간드에 경쟁적으로 결합하거나 ActRII-매개된 신호전달을 저해하는 항체가 ActRII 폴리펩티드 활성의 길항물질로서 이용될 수 있다. 유사하게, 액티빈 β_A , β_B , β_C 와 β_E 폴리펩티드, 또는 이들의 이종이합체와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 및/또는 ActRIIb 결합을 파괴하는 항체가 길항물질로서 이용될 수 있다.

ActRIIa 폴리펩티드, ActRIIb 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드로부터 유래된 면역원(immunogen)을 이용함으로써, 항-단백질/항-펩티드 항혈청(antisera) 또는 단클론 항체가 표준 프로토콜(standard protocol)에 의해 제조될 수 있다(참조: Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). 포유동물, 예를 들면, 생쥐, 햄스터 또는 토끼는 액티빈, ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드의 면역원성 형태(immunogenic form), 항체 반응(antibody response)을 유도할 수 있는 항원 단편, 또는 융합 단백질로 면역될 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성(immunogenicity)을 공여하는 기술에는 담체(carrier)에 배합(conjugation) 또는 당분야에 널리 공지된 다른 기술이 포함된다. ActRII 또는 액티빈 폴리펩티드의 면역원성 부분이 어쥬번트(adjuvant)의 존재 하에 투여될 수 있다. 면역화의 진행은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가(antibody titer)의 검출에 의해 모니터링될 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역분석은 상기 면역원을 항원으로 하여 항체 수준을 평가하는데 이용될 수 있다.

액티빈, ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드의 항원성 조합제로 동물의 면역 이후, 항혈청이 수득될 수 있고, 원하는 경우에, 다클론 항체가 혈청으로부터 분리될 수 있다. 단클론 항체를 생산하기 위하여, 항체-생산 세포(립프구)를 면역된 동물로부터 수거하고 표준 체세포 융합 절차에 의해 영속 세포(immortalizing cell), 예를 들면, 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마(hybridoma) 세포를 산출할 수 있다. 이런 기술은 당분야에 널리 공지되어 있는데, 여기에는 예로써, 하이브리도마 기술(Kohler와 Milstein에 의해 최초로 개발됨((1975) Nature, 256: 495-497)), 인간 B 세포 하이브리도마 기술(Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72), 인간 단클론 항체를 생산하는 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96) 등이 포함된다. 하이브리도마 세포는 액티빈, ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체 및 이런 하이브리도마 세포를 포함하는 배양액으로부터 분리된 단클론 항체의 생산을 위하여 면역화학적으로 선별될 수 있다.

본 명세서에서, "항체"는 예로써, 임의의 아이소타입(IgG, IgA, IgM, IgE 등)의 완전 항체(whole antibody)를 의미하고, 선택된 항원과 반응하는 면역글로불린의 단편 또는 도메인을 포괄한다. 항체는 통상적인 기술을 이용하여 단편화될 수 있고, 이들 단편은 유용성 및/또는 목적하는 특정 에피토프와의 상호작용에 대하여 선별될 수 있다. 따라서 상기 용어는 특정 단백질과 선택적으로 반응할 수 있는 항체 분자의 단백질 분해-절단된 또는 재조합-제조된 일부분의 단편을 포괄한다. 이런 단백질 분해 및/또는 재조합 단편의 무-제한적 실례에는 Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, 그리고 펩티드 링커에 의해 연결된 V[L] 및/또는 V[H] 도메인을 보유하는 단일 사슬 항체(scFv)가 포함된다. scFv는 공유 또는 비-공유 연결되어 2개 또는 그 이상의 결합 부위를 보유하는 항체를 형성할 수 있다. 항체는 또한, 항체와 재조합 항체의 다클론, 단클론, 또는 다른 정제된 조합제를 포괄한다. "재조합 항체"는 분자 생물학의 기술을 이용하여 작제된 핵산으로부터 발현된 항체, 또는 면역글로불린의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 인간화 항체(humanized antibody), 또는 단일 사슬 항체로부터 발생된 완전 인간 항체(human antibody)를 의미한다. 단일 도메인과 단일 사슬 항체 역시 "재조합 항체"에 포함된다.

특정 구체예에서, 본 발명의 항체는 단클론 항체이고, 특정 구체예에서, 본 발명은 신규한 항체를 산출하는 방법을 제시한다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드, ActRIIb 폴리펩티드, 또는 액티빈 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 산출하는 방법은 검출가능한 면역 반응을 자극하는데 효과적인 항원 폴리펩티드를 함유하는 면역 조성물(immunogenic composition)의 일정량을 생쥐에 투여하는 단계, 생쥐로부터 항체-생산 세포(가령, 비장으로부터 유래된 세포)를 수득하는 단계, 항체-생산 세포를 골수종 세포와 융합하여 항체-생산 하이브리도마를 수득하는 단계, 그리고 항체-생산 하이브리도마를 검사하여 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산

하는 하이브리도마를 확인하는 단계를 포함한다. 일단 수득된 하이브리도마는 임의적으로, 하이브리도마-유래된 세포가 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 배양 조건 하에 세포 배양액에서 증식될 수 있다. 단클론 항체는 세포 배양액으로부터 정제될 수 있다.

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

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

액티빈 또는 ActRII 길항물질인 핵산 화합물 종류의 실례에는 안티센스 핵산, RNAi 구조체와 촉매 핵산 구조체가 포함된다. 핵산 화합물은 단일 또는 이중 가닥이다. 이중 가닥 화합물은 오버행 또는 비-상보성 영역 역시 포함할 수 있는데, 여기서 이들 가닥의 한쪽 또는 다른 쪽은 단일 가닥이다. 단일 가닥 화합물은 자기-상보성(self-complementarity) 영역을 포함할 수 있는데, 이는 상기 화합물이 이중 나선 구조의 영역을 포함하는 소위, "헤어핀(hairpin)" 또는 "스텝-루프(stem-loop)" 구조를 형성한다는 것을 의미한다. 핵산 화합물은 전장 ActRII 핵산 서열 또는 액티빈 β_A , β_B , β_C 또는 β_E 핵산 서열의 1000개 이하, 500개 이하, 250개 이하, 100개 이하, 또는 50개, 35개, 25개, 22개, 20개, 18개 또는 15개 이하의 뉴클레오티드로 구성되는 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상보성 영역은 적절하게는, 최소한 8개 뉴클레오티드, 임의적으로, 대략 18개 내지 35개 뉴클레오티드이다. 상보성 영역은 표적 전사체(target transcript)의 인트론(intron), 코딩 서열 또는 비-코딩 서열, 예를 들면, 코딩 서열 부분 내에 존재한다. 일반적으로, 핵산 화합물은 대략 8개 내지 대략 500개 뉴클레오티드 또는 염기쌍 길이를 보유하는데, 임의적으로, 상기 길이는 대략 14개 내지 대략 50개 뉴클레오티드이다. 핵산은 DNA(특히, 안티센스로서 이용됨), RNA 또는 RNA:DNA 하이브리드이다. 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함한다. 유사하게, 이중 가닥 화합물은 DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA이고, 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함한다. 핵산 화합물은 골격(뉴클레오티드내 연쇄(interanucleotide linkage)를 비롯한, 자연 핵산에서 당-인산염 부분) 또는 염기 부분(자연 핵산의 퓨린 또는 피리미딘 부분)에 하나 이상의 변형을 비롯한 임의의 다양한 변형을 포함한다. 안티센스 핵산 화합물은 바람직하게는, 대략 15개 내지 대략 30개의 뉴클레오티드 길이를 갖고, 혈청에서, 세포에서, 또는 화합물이 전달될 가능성이 높은 위치, 예를 들면, 경구 전달된 화합물의 경우에 위와 흡입된 화합물의 경우에 폐에서 안정성과 같은 특성을 향상시키는 하나 이상의 변형을 종종 포함한다. RNAi 구조체의 경우에, 표적 전사체에 상보적인 가닥은 일반적으로, RNA 또는 이의 변형이다. 다른 가닥은 RNA, DNA 또는 임의의 다른 변형일 수 있다. 이중 가닥 또는 단일 가닥 "헤어핀" RNAi 구조체의 이중나선 부분은 일반적으로, 18개 내지 40개 뉴클레오티드 길이, 임의적으로, 대략 21개 내지 23개 뉴클레오티드 길이를 갖는데, 여기서 이는 Dicer 기질(substrate)로서 기능한다. 촉매 또는 효소 핵산은 리보자임 또는 DNA 효소이고, 변형된 형태 역시 포함된다. 핵산 화합물은 생리 조건하에 난센스(nonsense) 또는 센스(sense) 제어가 거의 또는 전혀 영향을 주지 않는 농도에서 세포와 접촉할 때, 대략 50%, 75%, 90% 또는 그 이상으로 표적의 발현을 저해한다. 핵산 화합물의 효과를 검사하는데 선호되는 농도는 1, 5와 10 마이크로몰(micromolar)이다. 또한, 핵산 화합물은 예로써, 적혈구 수준에 대한 효과에 대하여 검사될 수 있다.

5. 선별 검사

특정 측면에서, 본 발명은 액티빈-ActRIIa 및/또는 액티빈-ActRIIb 신호전달 경로의 항진물질 또는 길항물질인

화합물(작용제)을 확인하기 위한 ActRII 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드)와 액티빈 폴리펩티드의 용도에 관계한다. 이러한 선별을 통하여 확인된 화합물은 생체내에서 또는 시험관내에서 적혈구, 헤모글로빈 및/또는 망상적혈구를 조절하는 능력을 평가할 수 있다. 이들 화합물은 예로써, 동물 모형에서 검사될 수 있다.

액티빈과 ActRII 신호전달을 표적함으로써 적혈구 또는 헤모글로빈 수준을 증가시키는 치료제의 선별을 위한 다수의 접근법이 존재한다. 특정 구체예에서, 화합물의 고속 선별(high-throughput screening)은 선택된 세포주에 대한 액티빈 또는 ActRII-매개된 효과를 교란시키는 작용제를 확인하기 위하여 수행될 수 있다. 특정 구체예에서, 이러한 검사는 액티빈에 대한 ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드의 결합을 특이적으로 저해하거나 감소시키는 화합물을 선별하고 확인하기 위하여 수행된다. 대안으로, 상기 검사는 액티빈에 대한 ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드의 결합을 강화시키는 화합물을 확인하는데 이용될 수 있다. 다른 구체예에서, 화합물은 액티빈, ActRIIa 폴리펩티드, 또는 ActRIIb 폴리펩티드와 상호작용하는 능력으로 확인될 수 있다.

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

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

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

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

ActRII 폴리펩티드와 액티빈 사이에 복합체 형성은 다양한 기술로 검출될 수 있다. 가령, 복합체 형성의 조절은 예로써, 검출가능하게 표지된 단백질, 예를 들면, 방사성표지된(가령, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C 또는 ^3H), 형광 표지된(가령, FITC), 또는 효소 표지된 ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드 또는 액티빈을 이용하여, 면역분석(immunoassay)에 의해, 또는 크로마토그래피 검출(chromatographic detection)에 의해 정량될 수 있다.

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

게다가, 본 발명에서는 ActRII 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 상호작용을 파괴하거나 강화시키는 작용제를 확인하기 위한, "이중 하이브리드 분석(two hybrid assay)"으로 알려져 있는 상호작용 트랩 분석(interaction trap assay)의 이용을 고려한다(참조: U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRII 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 상호작용을 분리시키는 화합물(가령, 소형 분자 또는 펩티드)을 확인하는 역 이중 하이브리드 시스템(reverse two hybrid system)의 이용을 고려한다(참조: Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; U.S. Pat. No. 5,525,490; 5,955,280; 5,965,368).

특정 구체예에서, 본 발명의 화합물은 본 발명의 ActRII 또는 액티빈 폴리펩티드와 상호작용하는 능력으로 확인된다. 상기 화합물과 ActRIIa, ActRIIb, 또는 액티빈 폴리펩티드 사이에 상호작용은 공유 또는 비-공유이다. 가령, 이런 상호작용은 광-가교연결(photo-crosslinking), 방사성표지된 리간드 결합, 그리고 친화성 크로마토그래피를 비롯한 시험관내 생화학적 방법을 이용하여 단백질 수준에서 확인될 수 있다(Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). 특정 사례에서, 이들 화합물은 기전 기초된 분석(mechanism based assay), 예를 들면, 액티빈 또는 ActRII 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 검출하는 분석에서 선별된다. 이는 고체상(solid phase) 또는 액체상(fluid phase) 결합 현상을 포함할 수 있다. 대안으로, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자는 리포터 시스템(가령, β -갈락토시다아제, 루시페라제, 또는 녹색 형광 단백질)으로 세포 내로 형질감염되고, 임의적으로 고속 선별에 의해 라이브러리에 대하여 또는 상기 라이브러리의 개별 구성원으로 선별된다. 다른 기전 기초된 결합 분석, 예를 들면, 자유 에너지(free energy)에서 변화를 검출하는 결합 분석이 이용될 수도 있다. 결합 분석은 웰, 비드 또는 칩에 고정되거나, 고정된 항체에 의해 포획되거나, 또는 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)에 의해 분해된 표적으로 수행될 수 있다. 결합된 화합물은 통상적으로, 비색(colorimetric) 또는 형광 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 검출된다.

6. 전형적인 치료 용도

특정 구체예에서, 본 발명의 액티빈-ActRII 길항물질(가령, ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드)은 포유동물, 예를 들면, 설치류와 영장류, 특히, 인간 환자에서 적혈구 수준을 증가시키는데 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 액티빈-ActRIIa 길항물질, 예를 들면, ActRIIa 폴리펩티드의 치료 효과량, 또는 액티빈-ActRIIb 길항물질, 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드의 치료 효과량을 필요 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 빈혈을 치료하거나 예방하는 방법을 제시한다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 액티빈-ActRII 길항물질, 특히, ActRII 폴리펩티드의 치료 효과량을 필요 개체에 투여함으로써 상기 개체에서 적혈구 형성을 촉진하는 방법을 제시한다. 이들 방법은 포유동물, 특히, 인간의 치료적 처치와 예방적 처치에 이용될 수 있다.

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

본 명세서에서 확인되는 바와 같이, 액티빈-ActRIIa 길항물질과 액티빈-ActRIIb 길항물질은 건강한 개체에서 적

혈구, 헤모글로빈 또는 망상적혈구 수준을 증가시키는데 이용되고, 이들 길항물질은 선택된 환자 개체군에서 이용될 수 있다. 적절한 환자 개체군의 실례는 바람직하지 않게 낮은 적혈구 또는 헤모글로빈 수준을 갖는 환자, 예를 들면, 빈혈 환자, 그리고 바람직하지 않게 낮은 적혈구 또는 헤모글로빈 수준이 발생할 위험이 있는 환자, 예를 들면, 큰 수술 또는 상당한 혈액 손실(blood loss)을 유발하는 다른 절차를 받을 예정인 환자이다. 한 구체예에서, 적절한 적혈구 수준을 갖는 환자는 적혈구 수준을 증가시키기 위하여 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되고, 이후 혈액이 채워지고 수혈(transfusion)에 추후 이용을 위하여 보관된다. 한 구체예에서, 적절한 적혈구 수준을 갖는 환자는 적혈구 수준을 증가시키기 위하여 액티빈-ActRIIb 길항물질로 치료되고, 이후 혈액이 채워지고 수혈(transfusion)에 추후 이용을 위하여 보관된다.

본 명세서에 개시된 액티빈-ActRII 길항물질, 특히, ActRIIa-Fc와 ActRIIb 단백질은 빈혈 환자에서 적혈구 수준을 증가시키는데 이용될 수 있다. 인간에서 헤모글로빈 수준을 관찰할 때, 적절한 연령과 성별 항목에서 정상적인 것보다 낮은 수준은 개별 편차(individual variation)를 고려한다 하더라도, 빈혈을 지시할 수 있다. 가령, 12 g/dL의 헤모글로빈 수준은 일반적으로, 보편적인 성인 개체군에서 정상 범위보다 낮은 것으로 간주된다. 잠재적 원인에는 혈액 손실(blood-loss), 영양 결핍(nutritional deficit), 약물 반응(medication reaction), 골수와 관련된 여러 문제점, 그리고 여러 질환이 포함된다. 더욱 구체적으로, 빈혈은 예로써, 만성 신부전(chronic renal failure), 골수이형성증(myelodysplastic syndrome), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 골수 이식(bone marrow transplantation)을 비롯한 다양한 질환과 연관된다. 빈혈은 또한, 아래의 질환과 연관될 수 있다: 고형 종양(solid tumor)(가령, 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer)); 림프계(lymphatic system)의 종양(가령, 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocyte leukemia), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma)과 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma); 조혈기관(hematopoietic system)의 종양(가령, 백혈병(leukemia), 골수이형성증(myelodysplastic syndrome), 다발성 골수종(multiple myeloma)); 방사선요법(radiation therapy); 화학요법(chemotherapy)(가령, 백금 포함 섭생(platinum containing regimen)); 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 다른 염증성 관절염, 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus, SLE), 급성이나 만성 피부 질환(가령, 건선(psoriasis)), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease)(가령, 크론병(Crohn's disease)과 궤양성 대장염(ulcerative colitis))이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 염증 질환(inflammatory disease)과 자가면역 질환(autoimmune disease); 특발성 또는 선천성 장애를 비롯한 급성이나 만성 신장 질환 또는 신부전; 급성이나 만성 간 질환; 급성이나 만성 출혈; 환자의 동종-이나 자기-항체로 인하여 및/또는 종교적 이유(가령, 일부 여호와의 증인(Jehovah's Witnesses))로 적혈구의 수혈이 불가능한 상황; 감염(가령, 말라리아(malaria), 골수염(osteomyelitis)); 겸상적혈구 질환(sickle cell disease), 지중해 빈혈(thalassemia)을 비롯한 헤모글로빈병증(hemoglobinopathy); 약물이나 남용, 예를 들면, 알코올 중독(alcobol misuse); 수혈이 피해야만 하는 임의의 원인으로 인한 빈혈을 앓는 소아 환자; 그리고 순환 과부하(circulatory overload)에 대한 우려로 수혈을 받을 수 없는 노인 환자 또는 빈혈과 함께 근본적 심폐 질환(cardiopulmonary disease)을 앓는 환자.

더욱 낮은 표적 수준이 더욱 적은 심혈관 부작용(cardiovascular side effect)을 유발하긴 하지만, 환자는 헤모글로빈 수준을 표적 수준, 통상적으로, 대략 10 g/dL 내지 대략 12.5 g/dL, 전형적으로, 대략 11.0 g/dL로 복원하도록 의도된 투약 섭생(dosing regimen)으로 치료될 수 있다(참조: Jacobs et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19). 대안으로, 헤마토크릿 수준(세포에 의해 점유된 혈액 시료의 체적 비율)이 적혈구의 상태에 대한 척도로서 이용될 수 있다. 건강한 개체에 대한 헤마토크릿 수준은 성체 수컷의 경우에 41 내지 51% 범위이고, 성체 암컷의 경우에 35 내지 45% 범위이다. 표적 헤마토크릿 수준은 통상적으로, 대략 30-33%이다. 게다가, 헤모글로빈/헤마토크릿 수준은 개체마다 상이하다. 따라서 최적으로, 표적 헤모글로빈/헤마토크릿 수준은 각 환자에 대하여 개별화될 수 있다.

본 명세서에 개시된 액티빈-ActRIIa 길항물질의 적혈구 수준에 대한 신속한 효과는 이들 작용제가 Epo와 상이한 기전으로 작용한다는 것을 암시한다. 따라서 이들 길항물질은 Epo에 만족스럽게 반응하지 않는 환자에서 적혈구와 헤모글로빈 수준을 증가시키는데 유용할 수 있다. 가령, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 정상 내지 증가된 양(>300 IU/kg/week)의 Epo의 투여가 헤모글로빈 수준을 표적 수준까지 증가시키지 못하는 환자에서 유익하다. 부적절한 Epo 반응을 나타내는 환자가 모든 유형의 빈혈에서 관찰되긴 하지만, 암 환자와 말기 신장 질환 환자에서 특히 빈번하게 더욱 많은 수의 비-반응자(non-responder)가 관찰되었다. Epo에 대한 부적절한 반응은 선천성(constitutive)(즉, Epo로 첫 번째 치료 이후에 관찰됨) 또는 후천성(즉, Epo로 반복된 치료 이후에 관찰됨)일 수 있다.

이들 액티빈-ActRII 길항물질은 또한, Epo의 부작용에 민감한 환자를 치료하는데 이용될 수 있다. Epo의 일차적

인 부작용은 헤마토크릿 또는 헤모글로빈 수준에서 과도한 증가와 적혈구 증가증(polycythemia)이다. 상승된 헤마토크릿 수준은 고혈압(더욱 구체적으로, 고혈압의 악화)과 혈관 혈전증(vascular thrombosis)을 유발할 수 있다. 보고된 Epo의 다른 부작용에는 두통(headache), 인플루엔자-유사 증상(influenza-like syndrome), 셉트 폐색(obstruction of shunt), 혈전증에 기인한 심근 경색(myocardial infarction)과 뇌 경련(cerebral convulsion), 고혈압성 뇌병증(hypertensive encephalopathy), 적혈구 무형성(red blood cell aplasia) 등이 포함되고, 일부는 고혈압에 관련된다(Singibarti, (1994) J. Clin Invest 72(suppl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15(suppl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) Neurology 49, 686-689; Bunn (2002) N Engl J Med 346(7), 522-523).

7. 제약학적 조성물

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

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

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

더 나아가, 본 발명의 조성물은 표적 조직 부위(가령, 골수)로의 전달을 위한 형태로 내포되거나 주입될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 치료 화합물(가령, ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리펩티드)을 표적 조직 부위(가령, 골수)로 전달할 수 있는 기반(matrix)을 포함하는데, 이는 발달 중인 조직에 대한 구조물을 제공하고 최적으로, 체내 재흡수될 수 있다. 가령, 기반은 ActRII 폴리펩티드의 느린 방출(slow release)을 제공한다. 이런 기반은 다른 이식된 의학 적용에 현재 이용되고 있는 물질로 형성될 수 있다.

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

특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 예로써, 캡슐, 교갑(cachet), 알약(pill), 정제(tablet), 마름모꼴 정제(lozenge)(방향성 기부(flavored basis), 통상적으로, 슈크로오스(sucrose)와 아카시아(acacia) 또는 트랜저캔

스(tragacanth) 이용), 분말, 과립, 또는 수용성이나 비-수용성 액체에 녹인 용액이나 현탁액, 또는 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 액체 에멀전, 또는 엘릭시르 또는 시럽, 또는 향정(pastille)(불활성 기부(inert base), 예를 들면, 젤라틴(gelatin)과 글리세린(glycerin), 또는 수크로오스와 아카시아 이용) 및/또는 구강세정제(mouth wash) 등의 형태로 경구 투여될 수 있는데, 이들 각각은 미리 결정된 양의 작용제를 활성 성분으로 함유한다. 작용제는 거환약(bolus), 연질약(electuary) 또는 페이스트(paste)로 투여될 수도 있다.

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

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

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

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

투약 섭생(dosage regimen)은 본 발명의 화합물(가령, ActRIIa와 ActRIIb 폴리펩티드)의 작용을 변화시키는 다양한 인자를 고려하여 담당 의사에 의해 결정될 것이다. 다양한 인자에는 환자의 적혈구 수, 헤모글로빈 수준 또는 다른 진단 척도, 원하는 표적 적혈구 수, 환자의 연령, 성별과 식이, 감소된 적혈구 수준의 원인이 되는 질환의 심각도, 투여 기간, 그리고 다른 임상 인자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 최종 조성물에 다른 공지된 성장 인자의 첨가 역시 용량에 영향을 줄 수 있다. 진행은 적혈구와 헤모글로빈 수준의 주기적 평가, 그리고 망상적혈구 수준과 혈액생성 과정의 다른 지표의 평가에 의해 모니터링될 수 있다.

영장류와 인간으로 실험은 ActRIIa-Fc가 최소한 대략 20일 내지 30일의 기간 동안, 대략 100 ng/ml 이상의 혈청 농도를 달성할 만큼 충분한 간격과 양으로 투약될 때, 적혈구 수준에 대한 상기 화합물의 효과가 검출될 수 있음을 증명한다. 최소한 20일 내지 30일의 기간 동안 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml 또는 그 이상의 혈청 수준을 달성하는 투약 역시 이용될 수 있다. 골 효과(bone effect)는 최소한 대략 20일 내지 30일의 기간 동안, 대략 200 ng/ml의 혈청 수준에서 관찰될 수 있는데, 실질적인 효과는 대략 1000 ng/ml 이상에서 나타난다. 따라

서 뼈에 거의 영향을 주지 않으면서 적혈구에 대한 효과를 달성하는 것이 바람직하면, 대략 20일 내지 30일의 기간 동안 대략 100 내지 1000 ng/ml 사이의 혈청 농도를 전달하는 투약 계획(dosing scheme)이 설계될 수 있다. 인간에서, 200 ng/ml의 혈청 수준은 0.1 mg/kg 이상의 1회 복용량(single dose)으로 달성될 수 있고, 1000 ng/ml의 혈청 수준은 0.3 mg/kg 이상의 1회 복용량으로 달성될 수 있다. 상기 분자의 관찰된 혈청 반감기는 대부분의 Fc 융합 단백질보다 훨씬 긴 대략 20 내지 30일이고, 따라서 예로써, 매주 또는 격주 기준으로 대략 0.05 내지 0.5 mg/kg로 투약함으로써 지속적으로 효과적인 혈청 수준이 달성되거나, 또는 더욱 높은 용량이 투약 간에 더욱 긴 간격과 병용될 수 있다. 가령, 0.1 내지 1 mg/kg의 복용량이 매일 또는 격월 기준으로 이용될 수도 있다.

특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRII 폴리펩티드의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 제시한다. 이런 요법은 앞서 열거된 바와 같은 질환을 나타내는 세포 또는 조직 내로 ActRIIa 또는 ActRIIb 폴리뉴클레오티드 서열의 도입에 의해 치료 효과를 달성하게 된다. ActRII 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산 시스템과 같은 재조합 발현 벡터를 이용하여 달성될 수 있다. ActRII 폴리뉴클레오티드 서열의 치료적 전달(therapeutic delivery)에는 표적된 리포솜(liposome)의 이용이 바람직하다.

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

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

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

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

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] [실시예]
- [0023] 본 발명은 앞서 전반적으로 기술되었고, 아래의 실시예를 참조하면 더욱 용이하게 이해될 수 있는데, 이들 실시예는 본 발명의 특정 구체예를 예시하는 목적으로 포함되고 본 발명을 한정하지 않는다.
- [0024] 실시예 1: ActRIIa-Fc 융합 단백질
- [0025] 본 발명자들은 사이에 위치하는 최소 링커로 인간 또는 생쥐 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIa의 세포외 도메인을 포함하는 가용성 ActRIIa 융합 단백질을 작제하였다. 이들 구조체는 각각, ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc로 지칭된다.
- [0026] CHO 세포주로부터 정제된 ActRIIa-hFc는 하기에 도시된다(SEQ ID NO: 7):
- ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT
PKPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFGLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK
- [0027]
- [0028] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3가지 상이한 리더(leader) 서열이 고려되었다:
- [0029] (i) 꿀벌 멜리틴(mellitin)(HBML): MKFLVNVLFVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)
- [0030] (ii) 조직 플라스미노겐 활성화인자(TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)
- [0031] (iii) 고유: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).
- [0033] *선택된 형태는 TPA 리더를 이용하고, 아래의 가공되지 않은 아미노산 서열을 보유한다:
- MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
GDGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG
NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT
PKPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLT
VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFGLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)
- [0034]

[0035] 상기 폴리펩티드는 아래의 핵산 서열에 의해 인코딩된다:

```
ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
TCGTTTCGCCCCGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT
TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGT
ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTCTGG
TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
GGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
CCCACCTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACAT
GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCT
```

[0036] ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

[0037]

[0038] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 둘 모두 재조합 발현이 상당히 용이하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 상기 단백질은 완전하게 규정된 단일 피크로서 정화되었다. N-말단 염기서열분석에서, -ILGRSETQE의 단일 서열(SEQ ID NO: 11)이 밝혀졌다. 정제는 예로써, 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피 중에서 임의의 순서로, 3가지 또는 그 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계에 의해 달성될 수 있다. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. ActRIIa-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 측정에서 >98%, 그리고 SDS PAGE에 의한 측정에서 >95%의 순도로 정제하였다.

[0039] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc는 리간드, 특히, 액티빈 A에 대한 높은 친화성을 보였다. GDF-11 또는 액티빈 A("ActA")는 표준 아민 결합 절차(standard amine coupling procedure)를 이용하여 Biacore CM5 칩에 고정시켰다. ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 상기 시스템으로 적하하고, 결합을 측정하였다. ActRIIa-hFc는 5×10^{12} 의 해리 상수(dissociation constant, K_D)로 액티빈에 결합하고, 상기 단백질은 9.96×10^{-9} 의 K_D 로 GDF11에 결합하였다(도 2 참조). ActRIIa-mFc는 유사하게 행동하였다.

[0040] ActRIIa-hFc는 약동학 연구에서 매우 안정하였다. 쥐는 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg의 ActRIIa-hFc 단백질을 투여하고, 24시간, 48시간, 72시간, 144시간과 168시간 시점에 상기 단백질의 혈장 수준을 측정하였다. 별도의 연구에서, 쥐는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg을 투여하였다. 쥐에서, ActRIIa-hFc는 11-14일 혈청 반감기를 나타내고, 상기 약물의 순환 수준(circulating level)은 2주후 매우 높았다(1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 최초 투여의 경우에 각각, 11 $\mu\text{g/ml}$, 110 $\mu\text{g/ml}$ 또는 304 $\mu\text{g/ml}$). 키노몰구스 원숭이에서, 혈장 반감기는 14일보다 훨씬 크고, 상기 약물의 순환 수준은 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 최초 투여의 경우에 각각, 25 $\mu\text{g/ml}$, 304 $\mu\text{g/ml}$ 또는 1440 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

[0041] 실시예 2: ActRIIa-hFc는 비-인간 영장류에서 적혈구 수준을 증가시킨다.

[0042] 본 연구에서는 각각 5마리 수컷과 5마리 암컷 키노몰구스 원숭이로 구성되는 4개 군을 이용하였는데, 각 군에서 성별당 3마리는 29일에 종결이 예정되고, 각 군에서 성별당 2마리는 57일에 종결이 예정되었다. 각 동물은 1일, 8일, 15일과 22일 시점에 정맥내(intravenous, IV) 주입을 통하여, 운반제(vehicle)(군 1), 또는 1, 10, 또는 30 mg/kg의 용량에서 ActRIIa-Fc(각각, 군 2, 3과 4)를 투여하였다. 용량 체적(dose volume)은 3 ml/kg에 유지시켰다. 적혈구 수준의 다양한 척도는 첫 번째 투여전 2일 시점과 첫 번째 투여후 15일, 29일과 57일(남아있는 2마리 동물에 대하여) 시점에 평가하였다.

- [0043] ActRIIa-hFc는 전체 연구 기간 동안 모든 용량 수준과 시점에서, 수컷과 암컷에 대한 평균 적혈구 과라미터(적혈구 수[RBC], 헤모글로빈[HGB], 그리고 헤마토크릿[HCT])의 통계학적으로 유의한 증가를 유도하고, 절대적 망상적혈구 수(ARTC)와 상대적 망상적혈구 수(RTC)에서 증가를 동반하였다. 도 3 - 6을 참조한다.
- [0044] 통계학적 유의성은 기준에서 치료군에 대한 평균과 비교하여, 각 치료군에서 산정하였다.
- [0045] 흥미롭게도, 적혈구 수와 헤모글로빈 수준에서 증가는 에리트로포이에틴(erythropoietin)에서 보고된 효과에 크기 면에서 거의 동등하다. 이들 효과의 발생은 에리트로포이에틴보다 ActRIIa-Fc에서 더욱 신속하다.
- [0046] 쥐와 생쥐에서 유사한 결과가 관찰되었다.
- [0047] 실시예 3: ActRIIa-hFc는 인간 환자에서 적혈구 수준을 증가시킨다.
- [0048] 실시예 1에 기술된 ActRIIa-hFc 융합 단백질은 일차적으로, 건강한 폐경기(postmenopausal) 여성에서 상기 단백질의 안정성을 평가하기 위하여 수행된 무작위(randomized), 이중-맹검(double-blind), 위약-대조(placebo-controlled) 연구에서 인간 환자에 투여하였다. 48명의 개체는 ActRIIa-hFc 또는 위약의 단일 복용량(single dose)을 섭취하는 6명(5명 활성물질: 1명 위약)으로 구성된 집단(cohort)으로 무작위화시켰다. 용량 수준은 정맥내(IV)의 경우에, 0.01 내지 3.0 mg/kg, 그리고 피하(SC)의 경우에 0.03 내지 0.1 mg/kg이었다. 모든 개체는 120일 동안 추적하였다. 약동학(PK) 분석 이외에, 골 형성과 재흡수의 생화학적 마커, 그리고 FSH 수준의 측정으로 ActRIIa-hFc의 생물학적 활성을 평가하였다.
- [0049] 잠재적 변화를 찾기 위하여, 연구 기간 동안 모든 개체에서 헤모글로빈과 RBC 수를 상세하게 조사하고 기준 수준과 비교하였다. 혈소판 수(platelet count)는 동일 시점에서, 대조(control)와 비교하였다. 시간의 추이에서, 혈소판 수에 대한 기준 수치로부터 임상적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- [0050] ActRIIa-hFc의 PK 분석에서, 용량과의 선형 프로파일(linear profile), 그리고 대략 25-32일의 평균 반감기가 확인되었다. ActRIIa-hFc에 대한 곡선 아래 영역(area-under-curve, AUC)은 용량에 선형으로 관련되고, SC 투약(dosing)후 흡수는 본질적으로 완전하였다(도 7과 8 참조). 이들 데이터는 SC가 바람직한 투약 방법임을 지시하는데, 그 이유는 상기 방법이 첫 며칠간의 IV 투약과 연관된 약물의 혈청 농도(serum concentration)에서 스파이크(spike)를 피하면서 상기 약물에 대한 동등한 생체이용효율(bioavailability)과 혈청 반감기를 제공하기 때문이다(도 8 참조). ActRIIa-hFc는 단백질동화 골 성장(anabolic bone growth)에 대한 마커인 골-특이적 알칼리성 포스파타아제(bone-specific alkaline phosphatase, BAP)의 혈청 수준에서 신속하고 지속적인 용량-의존성 증가, 그리고 골 재흡수(bone resorption)에 대한 마커인 C-말단 I형 콜라겐 텔로펩티드(telopeptide)와 타르타르산염(tartrate)-내성 산성 포스파타아제(acid phosphatase) 5b 수준에서 용량-의존성 감소를 유도하였다. 다른 마커, 예를 들면, PINP는 결론에 이르지 못하는 결과를 보였다. BAP 수준은 최대 용량의 약물에서 거의 포화 효과(saturating effect)를 보였는데, 이는 상기 단백질동화 골 생물마커에 대한 반-극대 효과(half-maximal effect)가 0.3 mg/kg의 용량에서 달성되고, 3 mg/kg 범위까지 계속 증가한다는 것을 지시하였다. 약물에 대한 AUC에 약역학 효과(pharmacodynamic effect)의 상관관계로서 산정되면, EC50은 51,465 (day*ng/ml)이다. 도 9를 참조한다. 이들 골 생물마커 변화는 조사된 최대 용량 수준에서 대략 120일 동안 지속되었다. 액티빈의 저해와 일치하는, 혈청 FSH 수준에서 용량-의존성 감소 역시 관찰되었다.
- [0051] 전반적으로, IV 또는 SC 제공되는 지에 상관없이 0.01과 0.03 mg/kg 군에서 아마도 방혈(phlebotomy)에 관련된, 연구의 첫 주 동안 헤모글로빈에서 매우 적은 약물 무관한 감소(non-drug related reduction)가 관찰되었다. 0.1 mg/kg SC와 IV 헤모글로빈 결과는 안정하거나, 또는 8-15일까지 완만한 증가를 보였다. 0.3 mg/kg IV 용량 수준에서, 이르면 2일 시점에 HGB 수준에서 분명한 증가가 나타나고 종종 15-29일에 최고점에 달하는데, 이는 위약 개체에서 관찰되지 않았다. 본 연구의 이 시점에서, 이러한 변화는 통계학적 유의성(statistical significance)에 도달하지 못하였다.
- [0052] 전반적으로, ActRIIa-hFc는 적혈구 수와 망상적혈구 수에 대한 용량-의존성 효과를 보였다. 혈액학적 변화(hematological change)의 요약을 위하여, 도 10-13을 참조한다.
- [0053] 실시예 4: 대안적 ActRIIa-Fc 단백질
- [0054] 본 명세서에 기술된 방법에 따라 이용될 수 있는 다양한 ActRIIa 변이체(variant)는 International Patent Application W02006/012627(가령, pp. 55-58)에서 기술되는데, 상기 문헌은 본 명세서에 순전히 참조로서 편입된다. 대안적 구체에는 ActRIIa의 세포외 도메인의 C-말단 꼬리(최종 15개 아미노산)의 결실을 포함한다. 이런 구조체에 대한 서열은 아래에 제시된다(Fc 부분은 밑줄로 표시됨)(SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPVPPIETISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0055]

[0056] 실시예 5: ActRIIb-Fc 융합 단백질

[0057]

본 발명자들은 인간 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIb의 세포외 도메인을 포함하는 가용성 ActRIIb 융합 단백질을 작제하였다. 액티빈과 세포외 ActRIIb의 공동-결정(co-crystal) 구조는 리간드 결합에서 세포외 도메인의 최종(C-말단) 15개 아미노산(본 명세서에서 "꼬리"로 지칭됨)에 대한 어떤 역할도 제시하지 못하였다. 상기 서열은 결정 구조 상에서 분해되지 않았는데, 이는 이들 잔기가 결정 내에서 균일하게 채워지지 않은 유연성 루프(flexible loop) 내에 존재한다는 것을 암시하였다(Thompson et al. EMBO J. 2003 Apr 1 ;22(7):1555-66). 상기 서열은 또한, ActRIIb와 ActRIIa 사이에 불량하게 보존된다. 따라서 이들 잔기는 기본, 또는 배경 ActRIIb-Fc 융합 구조체에서 제외되었다. 부가적으로, 이러한 배경 형태(background form)에서 64번 위치는 알라닌(alanine)에 의해 점유되는데, 이는 A64R 대립형질(allele)이 자연적으로 발생시킨 하지만, 일반적으로 "야생형" 형태로 간주된다. 따라서 배경 ActRIIb-Fc 융합체는 아래의 서열(Fc 부분은 밑줄로 표시됨)(SEQ ID NO:20)을 보유한다:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPVPPIETISKAKGQ
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0058]

[0059] 놀랍게도, C-말단 꼬리는 액티빈과 GDF-11 결합을 강화시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서 ActRIIb-Fc의 바람직한 유형은 아래의 서열(Fc 부분은 밑줄로 표시됨)(SEQ ID NO:21)을 보유한다:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP
TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKA
LPVPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

[0060]

[0061] 본 명세서에 기술된 방법에 따라 이용될 수 있는 다양한 ActRIIb 변이체(variant)는 International Patent Application W02006/012627(가령, pp. 59-60)에서 기술되는데, 상기 문헌은 본 명세서에 순전히 참조로서 편입된다.

[0062]

실시예 6: ActRIIb-hFc는 비-인간 영장류에서 적혈구생성을 촉진한다

[0063]

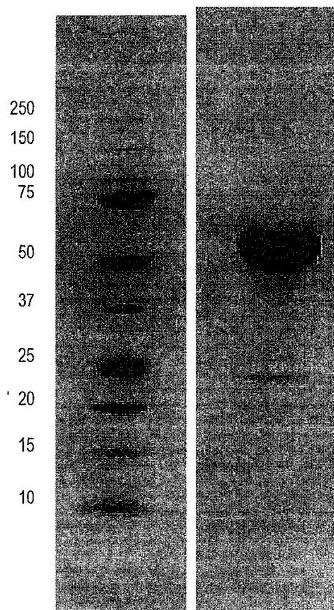
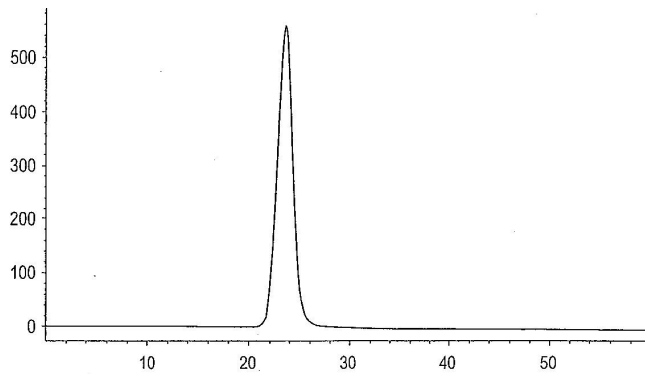
ActRIIb-hFc(IgG1)은 1개월 동안 주1회, 피하 주입(subcutaneous injection)으로 수컷과 암컷 키노몰구스 원숭이에 투여하였다. 48마리 키노몰구스 원숭이(성별로 24마리)는 4개 치료군(각 군에서 성별로 6마리) 중에서 하나에 지정하고, 4주 동안 주1회, 운반제 또는 3, 10, 또는 30 mg/kg에서 ActRIIb-hFc를 피하 주입하였다(총 5회 투약). 평가된 파라미터(parameter)에는 전반적인 임상 병리(general clinical pathology)(혈액학(hematology), 임상 화학(clinical chemistry), 응고(coagulation), 그리고 검뇨(urinalysis))가 포함되었다. ActRIIb-hFc는 15일 시점에, 치료된 군에서 통계학적으로 유의한 상승된 평균 절대 망상적혈구 수치를 유도하였다. 36일 시점에, ActRIIb-hFc는 상승된 평균 절대 망상적혈구와 적혈구 분포 계수(distribution width) 수치, 그리고 더욱 낮은 평균 혈구 헤모글로빈 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration)를 비롯한 여러 혈액학적 변화를 유도하였다. 모든 치료된 군과 양성 모두 영향을 받았다. 이들 효과는 골수로부터 미성숙 망상적혈구의 방출에 대한 ActRIIb-hFc의 양성 효과(positive effect)와 일치한다. 상기 효과는 치료된 동물에서 약물이 씻겨나간 이후에(연구 56일 시점) 역전되었다. 따라서 ActRIIb-hFc는 적혈구생성을 촉진하는 것으로 결론된다.

[0064] 참조로서 편입

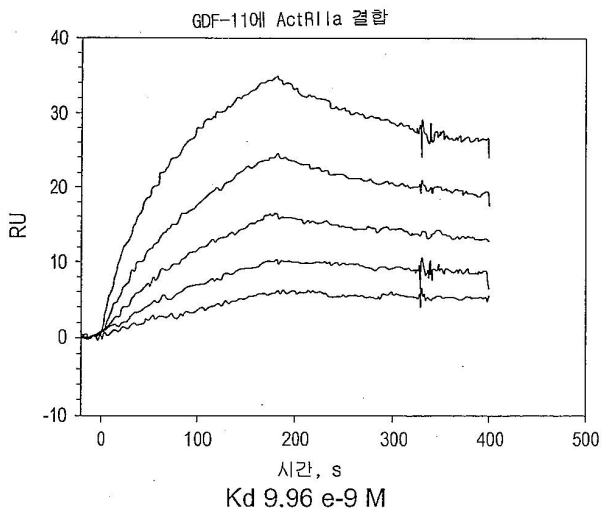
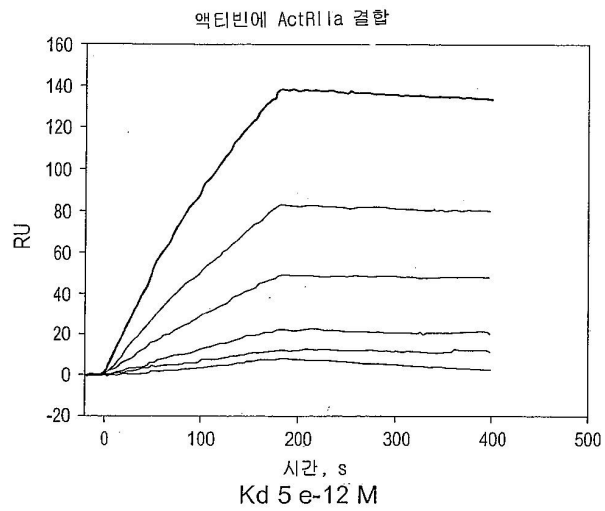
[0065] 본 명세서에 언급된 모든 간행물과 특허는 순전히 참조로서 편입된다. 요부(subject matter)의 특정 구체예가 논의되긴 했지만, 상기 명세서는 설명을 목적으로 하고, 본 발명을 한정하지 않는다. 상기 명세서와 하기 특허 청구범위를 검토한 이후에, 다수의 변이는 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 특허청구범위와 이의 균등한 범위, 그리고 명세서와 이의 변이에 기준하여 결정되어야 한다.

도면

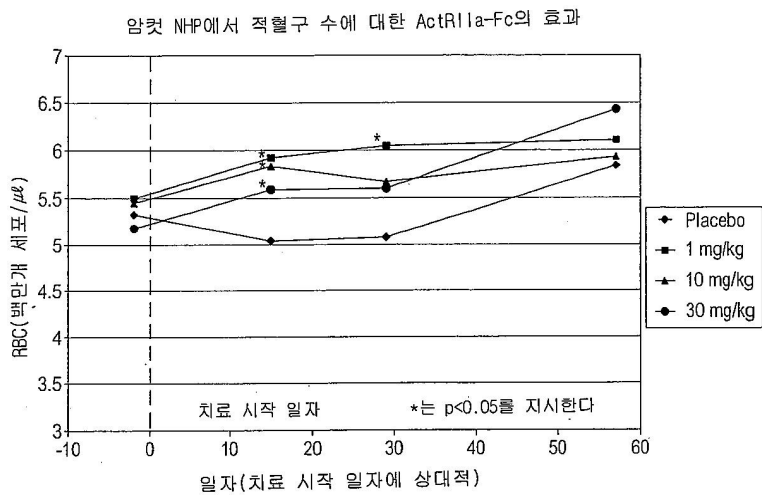
도면1



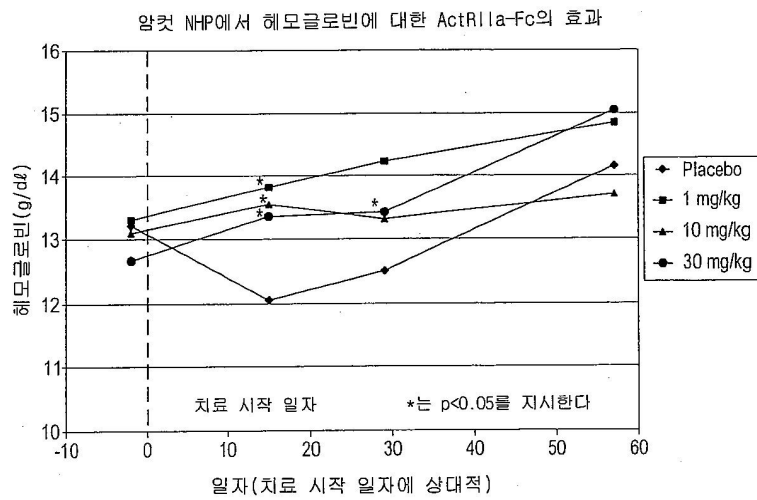
도면2



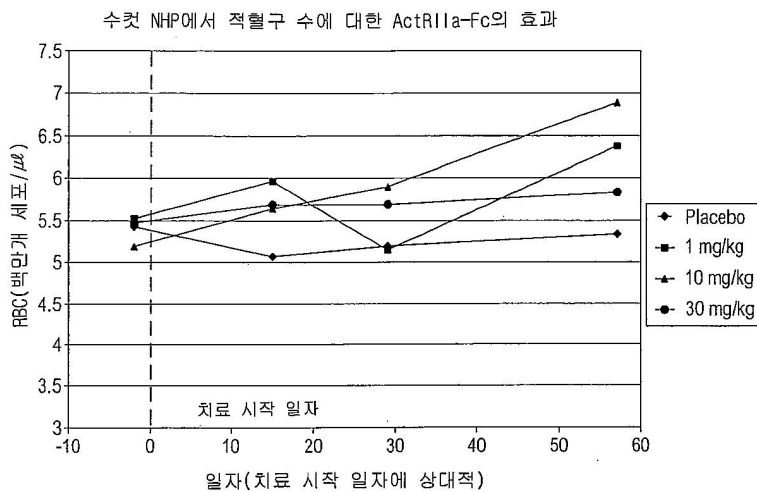
도면3a



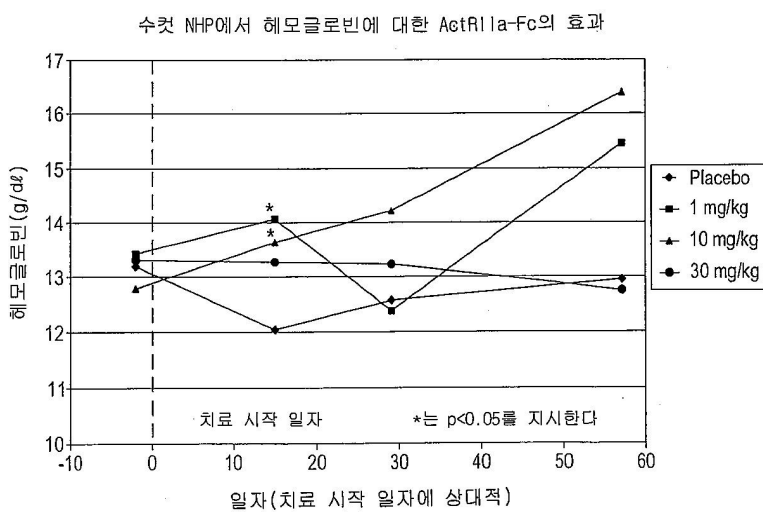
도면3b



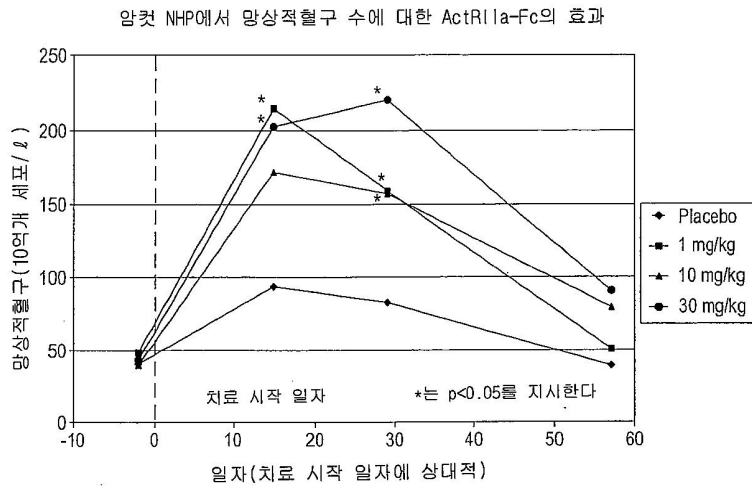
도면4a



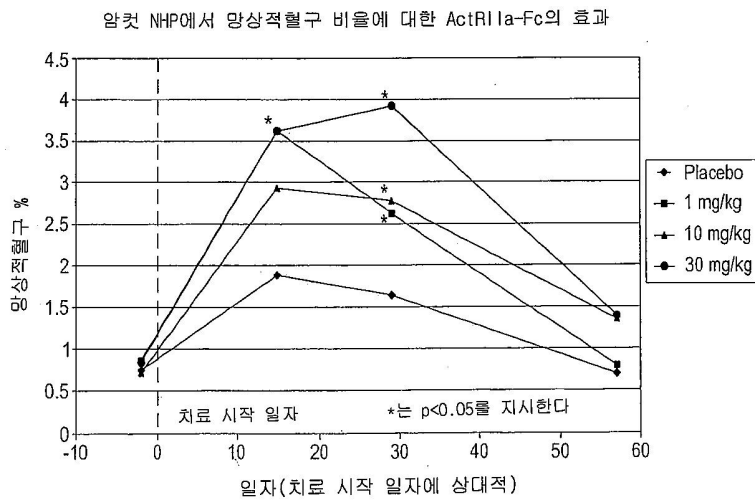
도면4b



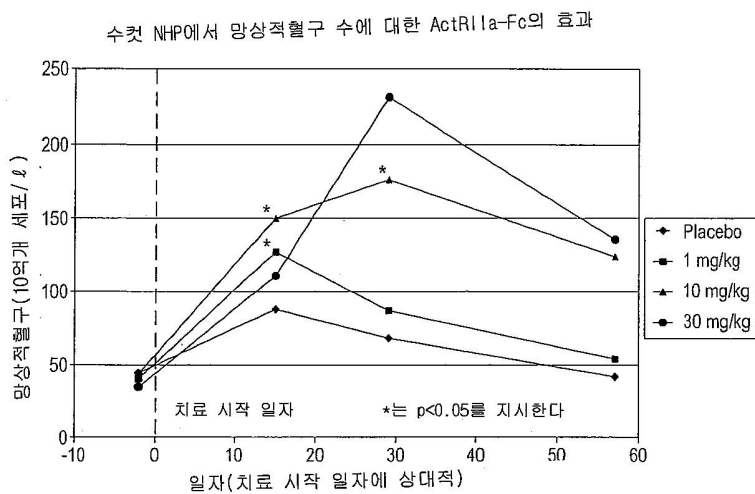
도면5a



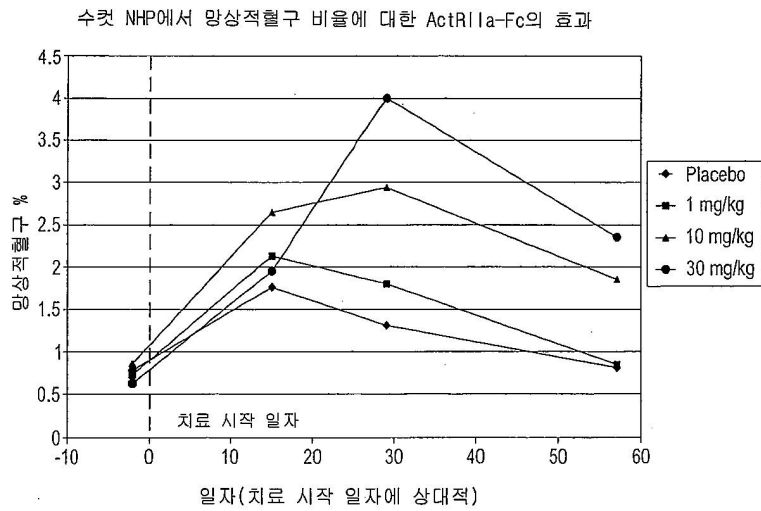
도면5b



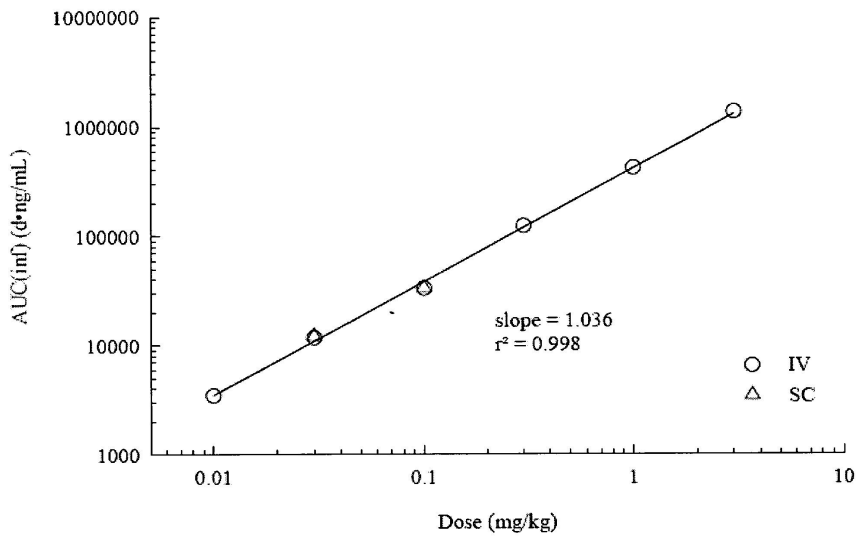
도면6a



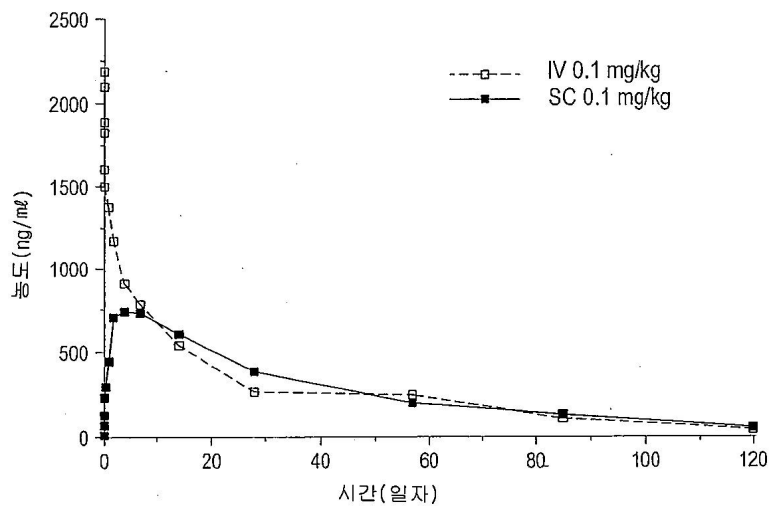
도면6b



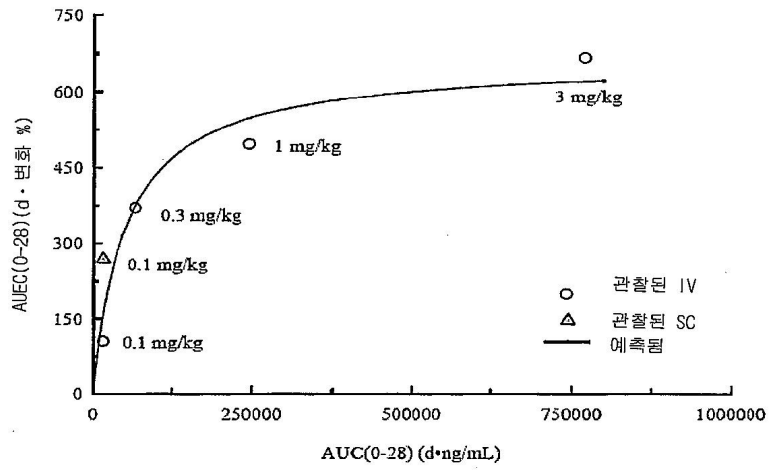
도면7



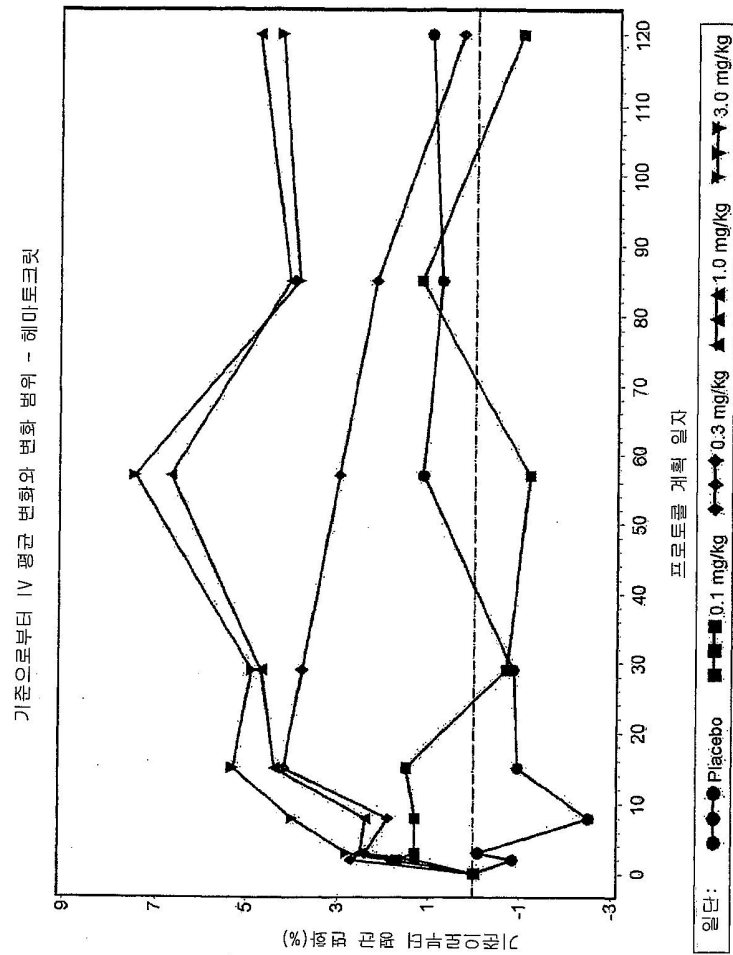
도면8



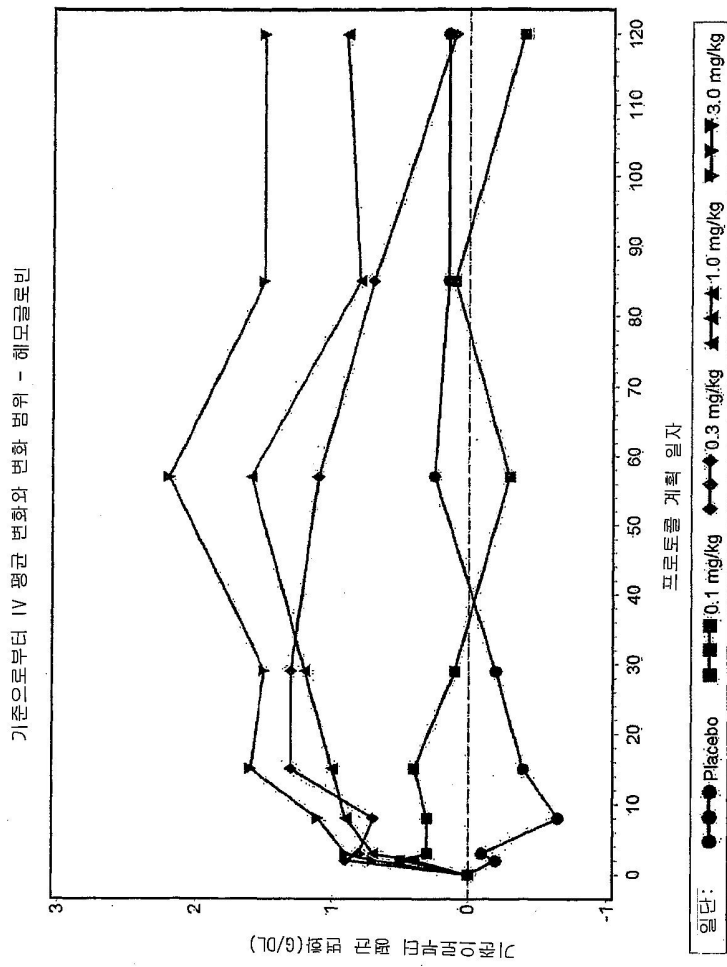
도면9



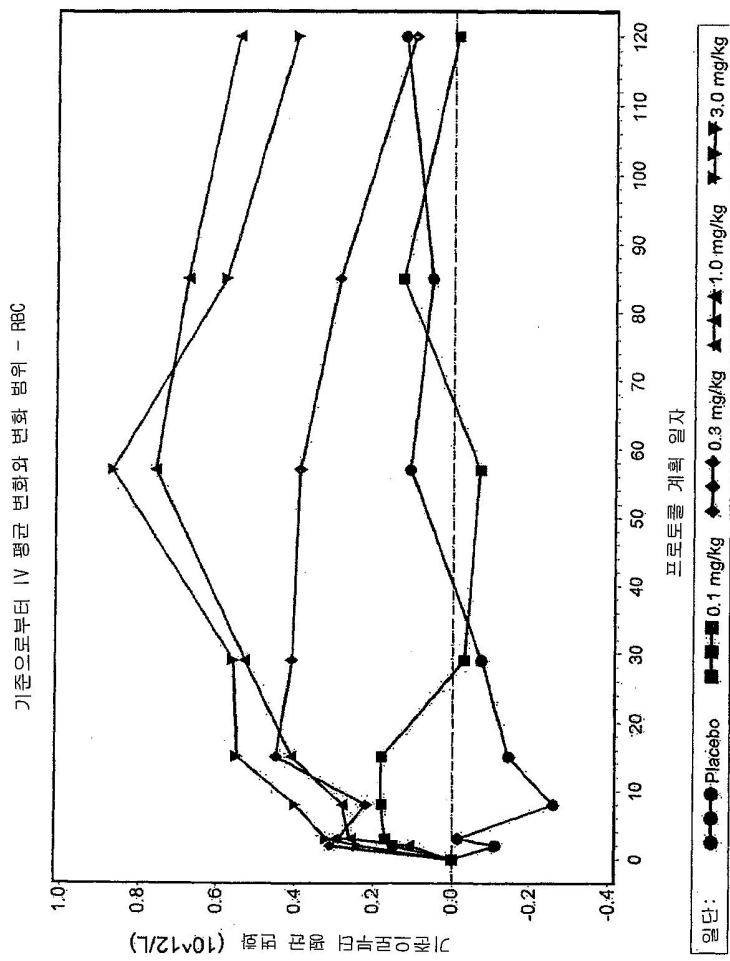
도면10



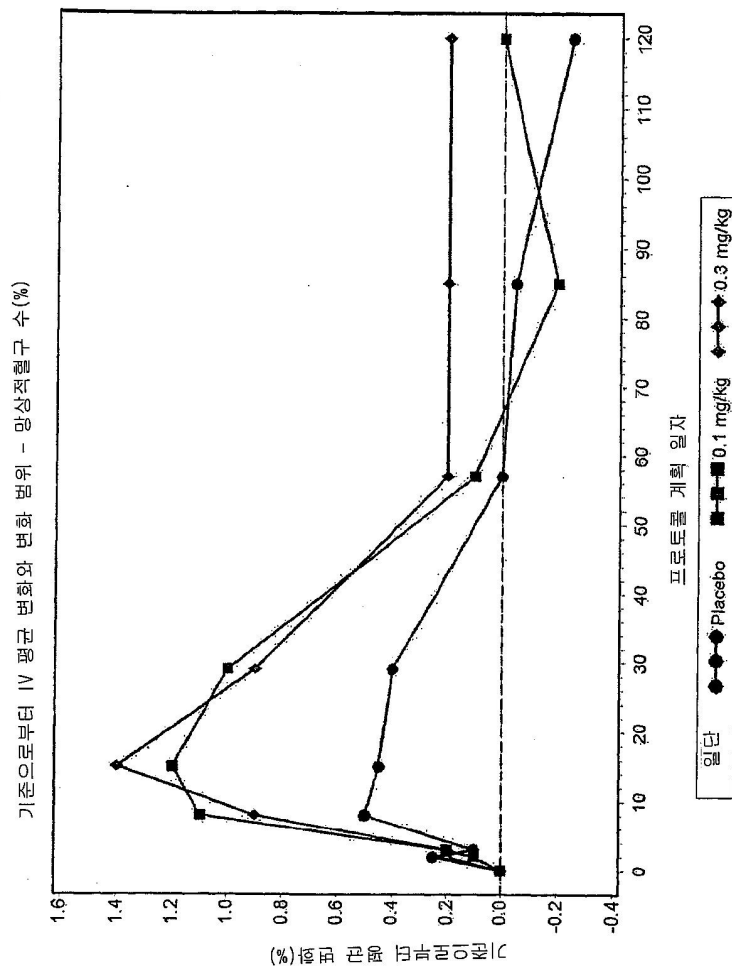
도면11



도면12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> ACCELERON PHARMA INC.
- <120> ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING RED
BLOOD CELL LEVELS
- <130> PHPH-022-W01
- <140> PCT/US07/025868
- <141> 2007-12-18
- <150> 60/875,682
- <151> 2006-12-18
- <160> 23
- <170> Patent In Ver. 3.3
- <210> 1
- <211> 513
- <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu

130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu

180 185 190

Gln Leu Leu Glu Val Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys

195 200 205

Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln

210 215 220

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

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

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

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

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

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

Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
 485 490 495
 Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
 500 505 510
 Leu

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 2

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

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110
 Lys Pro Pro
 115

<210> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Pro Glu Met

100

<210> 4

<211> 1542

<212>

> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60

atacttggtg gatcagaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120

agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180

tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 240

gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300

tatTTTTgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360

gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg 420

ctctattcct tggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480

tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttggtc caactcaaga cccaggacca 540

ccccacctt ctccattact aggggtgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600

ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660
 tttccaatac aggacaaaca gtcatggcaa aatgaatacg aagtctacag ttgccttga 720
 atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780
 gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840

gctaattgtg tctcttgga tgaactgtgt catattgcag aaaccatggc tagaggattg 900
 gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960
 aggacatca aaagtaaaaa tgtgtgtgtg aaaaacaacc tgacagcttg cattgtctgac 1020
 ttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgatacca tggacaggtt 1080
 ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140
 gcatttttga ggatagatat gtatgccatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200
 tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260

cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320
 ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380
 tgttgggac acgacgcaga agccagggtta tcagctggat gtgtaggatga aagaattacc 1440
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500
 gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga 1542

<210> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60

agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
 ttgtctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 180
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
 tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaage cacc 345

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43)

<223> Asp or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (100)

<223> Lys or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (212)

<223> His or Ala

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

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

Lys

225

<210> 7

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 7

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

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60
Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
65 70 75 80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr

	85	90	95
Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro			
	100	105	110
Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
	115	120	125
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
	130	135	140
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
145	150	155	160
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
	165	170	175
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
	180	185	190
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
	195	200	205
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
	210	215	220
Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
225	230	235	240
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr			
	245	250	255
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	260	265	270
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
	275	280	285
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
	290	295	300
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
305	310	315	320
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
	325	330	335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

340

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> *Apis mellifera*

<400> 8

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile

1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala

20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Tissue

Plasminogen Activator leader sequence

<400> 9

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

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro

20

<210> 10

<211> 20

<212>

> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Native leader

sequence

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala

20

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu

1

5

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 12

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Phe Pro Glu Met Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 13

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 13

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

1 5 10 15
Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr

20 25 30
Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn

35 40 45
Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His

50 55 60
Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys

65 70 75 80
Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys

85 90 95
Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly

100 105 110
Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr

115 120 125
Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly

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

145 150 155 160
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

165 170 175
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

180 185 190

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

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

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

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

Lys

<210> 14

<211> 1114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 14

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
tcgcccgcg ccgtatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata 180
aacggcggca ttgttttgct acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240
aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300
cagccctgaa gtatatcttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360
ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaataca gttacaccta agccaccac 420

cggtgttgga actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
agtcttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt 540
cacatgcgtg gtggtggagc tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 600
ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720
caagtcaag gtctccaaca aagccctccc agtcccctc gagaaaacca tctccaaagc 780
caaaggcgag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840

caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggttc tatcccagcg acatgccgt 900
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
ctccgacggc tcctttctcc tctatagca gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgaga attc 1114

<210> 15

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

 Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160
 Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190
 Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205

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

 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

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

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

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 16

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 101

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 17

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

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

<210> 18

<211> 1539

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60
 cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
 accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180
 gcctcctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggtg ctggctagat 240
 gacttcaact gctacatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccagggttac 300
 ttctgtgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatgtgcc agaggctggg 360
 ggcccgggaag tcacgtacga gccacccccg acagccccca ccctgctcac ggtgctggcc 420

 tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480
 cggcatcgca agcccccta cggatcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540
 ccatccctc tgggtggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc 600
 ttgggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
 ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
 cagagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
 ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caagggaac 840

 atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900
 ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgccacagg 960
 gactttaaaa gtaagaatgt attgtgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
 ggcttggctg ttcgatttga gccagggaac cctccagggg acaccacgg acaggtaggc 1080
 acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
 ttctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtgc 1200

aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag 1260

cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt 1320

aaagatcact ggttgaaaca cccgggcttg gcccagcttt gtgtgacat cgaggagtgc 1380

tgggaccatg atgcagagcg tcgcttgctc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440

attcgaggt cggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500

accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

<210> 19

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

tctgggcgtg gggaggctga gacacgggag tgcattctact acaacgcaa ctgggagctg 60

gagcgacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcggctgcac 120

tgctaagcct cctgggcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180

ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gactgtgtgg cactgagga gaacccccag 240

gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttcactca ttgcccagag 300

gtggggggcc cggaagtcac gtacgagcca ccccgacag cccccacc 348

<210> 20

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
 Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
 65 70 75 80
 Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
 85 90 95
 His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125

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

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

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 21

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 21

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

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

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
100 105 110
Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
115 120 125
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
130 135 140
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

 210 215 220

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

225 230 235 240

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

 245 250 255

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

 260 265 270

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

 275 280 285

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

 290 295 300

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

305 310 315 320

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

 325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

340

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 22

Thr Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 23

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5