(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0033313
(43) 공개일자 2025년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) *A61P 21/04* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7005821(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년09월15일
심사청구일자 2025년02월21일
(62) 원출원 특허 10-2023-7037152
원출원일자(국제) 2016년09월15일
심사청구일자 2023년11월27일
(85) 번역문제출일자 2025년02월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/052014
(87) 국제공개번호 WO 2017/049011
국제공개일자 2017년03월23일
(30) 우선권주장
62/219,094 2015년09월15일 미국(US)

(71) 출원인
스칼러 락, 인크.
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 빈니 스트리트 301 써드 플로어
(72) 발명자
카번, 조지, 제이.
미국 01754 매사추세츠주 메이너드 브룩스 스트리트 89
스트롭, 미셸
미국 04096 메인주 야머스 힐사이드 스트리트 346
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

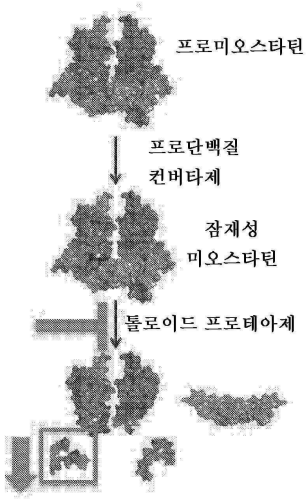
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용의 측면은 프로미오스타틴 및/또는 잠재성 미오스타틴에 특이적으로 결합하는 항체 및 그의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



3C

(52) CPC특허분류
A61P 21/04 (2018.01)
A61P 3/00 (2018.01)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
도노반, 아드리아나
미국 02132 매사추세츠주 웨스트 록스베리 맥스필드 스트리트 36

터너, 캐서린, 제인
미국 01720 매사추세츠주 액턴 헤이즐넛 스트리트 4

명 세 서

청구범위

청구항 1

프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며, 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 25의 아미노산 서열에 대해 적어도 98% 동일한 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 31의 아미노산 서열에 대해 적어도 98% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하고, 항체는 6개의 상보성 결정 영역 (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 포함하고, 여기서:

a) CDRH1은 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하고;

CDRH2는 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하고;

CDRH3은 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하고;

CDRL1은 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하고;

CDRL2는 서열식별번호: 18의 아미노산 서열을 포함하며;

CDRL3은 서열식별번호: 22의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 CDR 서열은 카바트(Kabat) 번호매김 시스템에 따라 번호매김되어 있거나; 또는

b) CDRH1은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하고;

CDRH2는 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함하고;

CDRH3은 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하고;

CDRL1은 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 포함하고;

CDRL2는 서열식별번호: 19의 아미노산 서열을 포함하며;

CDRL3은 서열식별번호: 22의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 CDR 서열은 IMGT 번호매김 시스템에 따라 번호매김되어 있는 것인,

항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 또는 인간화 항체 또는 항원-결합 단편인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, IgG_4 불변 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, IgG_4 불변 도메인이, IgG_1-유사 힌지를 생산하고 쇄간 디술피드 결합의 형성을 허용하는 Ser에서 Pro로의 백본 치환을 갖는 것인, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 경쇄 가변 영역이 그의 C-말단 끝부분에서 Cλ 경쇄 불변 도메인에 부착되어 있는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, N-말단 글루타민 (Q)이 피로글루탐산 잔기인 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 N-말단 글루타민 (Q)이 피로글루탐산 잔기인 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함

하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 더 큰 친화성으로 FcRn에 결합하도록 조작된 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, 생리학적 pH에 비교하여 산성 pH에서 감소된 친화성으로 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, 톨로이드 프로테아제에 의한 성숙 미오스타틴의 단백질분해적 형성을 억제하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 10

제1항에 있어서, 프로/잠재성-미오스타틴의 성숙 미오스타틴으로의 단백질분해적 활성화를 억제하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 11

제1항에 있어서, 인간 및 뮤린 프로/잠재성-미오스타틴과 교차-반응성인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 12

제1항에 있어서, GDF11 또는 액티빈에 결합하지 않는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 13

제1항 또는 제6항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 근병증 또는 대사 장애를 앓는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 근병증이 척수성 근육 위축 또는 근육 이영양증을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 근육 이영양증이 뒤시엔느 근육 이영양증(Duchenne's muscular dystrophy), 베커 근육 이영양증(Becker's muscular dystrophy), 또는 안면견갑상완 근육 이영양증을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서, 대사 장애가 비만, 제II형 당뇨병, 또는 프라더-윌리(Prader-Willi)를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 17

제13항에 있어서, 피하 또는 정맥내 투여용으로 제형화된 것인 제약 조성물.

청구항 18

제13항에 있어서, (i) 동결건조 조성물이거나, (ii) 액체 조성물이거나, 또는 (iii) 냉동된 조성물인, 제약 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, -65℃ 이하의 온도에서 냉동된 것인 제약 조성물.

청구항 20

제1항 또는 제6항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 골형성 부전증을 앓는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 피하 또는 정맥내 투여용으로 제형화된 것인 제약 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, (i) 동결건조 조성물이거나, (ii) 액체 조성물이거나, 또는 (iii) 냉동된 조성물인, 제약 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, -65℃ 이하의 온도에서 냉동된 것인 제약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 9월 15일에 출원되었고 발명의 영문 명칭이 "항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 및 그의 용도(ANTI-PRO/LATENT-MYOSTATIN ANTIBODIES AND USES THEREOF)"인 미국 특허 가출원 일련 번호 62/219,094를 35 U.S.C. § 119(e) 하에 우선권 주장하고, 이의 내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **개시내용의 분야**

[0004] 본 개시내용의 실시양태는 성장 인자 활성의 조정제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 조정제는 항체를 포함할 수 있고, TGF-β 패밀리 구성원 활성 및/또는 생물학을 조정할 수 있다.

배 경 기 술

[0005] 미오스타틴(Myostatin)은 근육 질량을 음성적으로 조절하는 분비형 성장 인자이다. 과다근육 표현형에 이르는, 미오스타틴 유전자에서의 기능 상실 돌연변이가 소, 양, 어류, 개 및 인간에서 기재된 바 있다. 미오스타틴 발현은 일반적으로 골격근에 제한되고, 낮은 수준의 발현이 지방 및 심장 조직에서 보고되었다. 미오스타틴 신호전달의 억제는 근육 크기의 증가에 이른다.

발명의 내용

[0006] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 측면은 여러 형태의 미오스타틴 (예를 들어, 프로미오스타틴(proMyostatin) 및/또는 잠재성 미오스타틴)에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 예를 들어, 본원에 제공된 항체는 프로(pro)-형태 및/또는 잠재성-형태의 미오스타틴, 예컨대 프로미오스타틴 및/또는 잠재성 미오스타틴 중 하나 이상에 특이적으로 결합한다. 특정 측면에서, 본 개시내용은 순수한 또는 실질적으로 순수한 프로GDF8 (프로미오스타틴으로도 지칭됨)에 특이적으로 결합하는 본원에 제공된 항체의 뜻밖의 발견을 기초로 한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 미오스타틴 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, 미오스타틴 신호전달의 억제는 근육 질량을 증가시키거나 또는 근육 위축을 방지하는데 유용하다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 미오스타틴에 결합하고, 프로단백질 컨버타제 및/또는 톨로이드 프로테아제에 의한 미오스타틴의 절단을 방지한다. 일부 실시양태에서, 프로미오스타틴 또는 잠재성 미오스타틴의 절단을 방지하는 것은 미오스타틴 활성화를 방지한다. 본 개시내용의 추가 측면은 pH에 민감한 항원에 대한 친화성이 있는 항체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 이러한 pH 민감성 항체는 혈청으로부터 항원을 소거시키는데 효과적이다. 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 혈청으로부터 항원 (예를 들어, 프로미오스타틴 및/또는 잠재성 미오스타틴)을 효율적으로 소거시킬 수 있는 스위핑 항체이다.

[0007] 본 개시내용의 측면은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 중쇄 가변 도메인이 서열식별번호(SEQ ID NO): 10-11 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 상보성 결정 영역 3 (CDRH3)을 포함하는 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 22-23 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 상보성 결정

영역 3 (CDRL3)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 6개의 상보성 결정 영역 (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 포함하고, CDRH1은 서열식별번호: 1-3 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH2는 서열식별번호: 4-9 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH3은 서열식별번호: 10-11 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL1은 서열식별번호: 12-17 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL2는 서열식별번호: 18-21 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하며, CDRL3은 서열식별번호: 22-23 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0008] 일부 실시양태에서, 상기 CDRH1은 서열식별번호: 1 또는 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH2는 서열식별번호: 4 또는 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH3은 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL1은 서열식별번호: 12 또는 13에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL2는 서열식별번호: 18 또는 19에 제시된 바와 같은 서열을 포함하며, CDRL3은 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0009] 또 다른 실시양태에서, 상기 CDRH1은 서열식별번호: 1 또는 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH2는 서열식별번호: 6 또는 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH3은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL1은 서열식별번호: 14 또는 15에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL2는 서열식별번호: 20 또는 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하며, CDRL3은 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0010] 다른 실시양태에서, CDRH1은 서열식별번호: 1 또는 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH2는 서열식별번호: 8 또는 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH3은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL1은 서열식별번호: 16 또는 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL2는 서열식별번호: 20 또는 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하며, CDRL3은 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0011] 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 25-29 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 중쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 30-35 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0012] 본 개시내용의 다른 측면은 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 경쇄 가변 도메인이 서열식별번호: 22-23 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 상보성 결정 영역 3 (CDRL3)을 포함하는 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 30의 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0013] 본 개시내용의 일부 측면은 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 28, 및 서열식별번호: 29로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 가변 중쇄 도메인이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 28, 또는 서열식별번호: 29에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 75% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%) 동일하다.

[0014] 본 개시내용의 일부 측면은 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 34, 및 서열식별번호: 35로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 가변 경쇄 도메인이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 34, 또는 서열식별번호: 35에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 75% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%) 동일하다.

[0015] 본 개시내용의 또 다른 측면은 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것에 대해 상기 기재된 항체와 경쟁하는 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 상기 기재된 항체와 동일한 에피토프에서 프로/잠재성-미오스타틴에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 10^{-6} M 미만의 항체와 프로/잠재성-미오스타틴 사이의 평형 해리 상수 Kd로 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것에 대해 경쟁한다. 다른 실시양태에서, 상기 항체의 Kd는 10^{-11} M 내지 10^{-6} M 범위이다.

[0016] 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체, 디아바디, 키메라 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 배선 서열을 갖는 프레임워크를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM, 및 IgE 불변 도메인으로 이루어진 군으로부터

선택된 중쇄 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG4의 불변 도메인을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항체는 IgG1-유사 힌지를 생산하고 쇄간 디술피드 결합의 형성을 허용하는 Ser에서 Pro로의 백본 치환을 갖는 IgG4 불변 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 형광 작용제, 발광 작용제, 효소 작용제 및 방사성 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 작용제에 접합된다.

[0017] 또 다른 실시양태에서, 항체는 성숙 미오스타틴에 비교하여 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 전환 성장 인자 베타 패밀리의 또 다른 구성원에 비교하여 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 구성원은 GDF11 또는 액티빈이다.

[0018] 본 개시내용의 추가 측면은 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합하고 톨로이드 프로테아제에 의한 성숙 미오스타틴의 단백질분해적 형성을 억제하는 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 톨로이드 프로테아제에 의한 성숙 미오스타틴의 단백질분해적 형성을 1 μM 미만의 IC50으로 억제한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 및 뮤린 프로/잠재성-미오스타틴과 교차-반응성이다. 다른 실시양태에서, 항체는 GDF11 또는 액티빈에 비교하여 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 성숙 미오스타틴에 비교하여 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합한다.

[0019] 본 개시내용의 또 다른 측면은 상기 기재된 항체를 프로/잠재성-미오스타틴의 단백질분해적 활성화를 억제하는데 효과적인 양으로 배지에 전달하는 것을 포함하는, 프로/잠재성-미오스타틴을 포함하는 배지 내에 존재하는 세포에서 미오스타틴 수용체 활성화를 감소시키는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 배지는 프로단백질 컨버타제를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 배지는 톨로이드 프로테아제를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 톨로이드 프로테아제에 의한 프로/잠재성-미오스타틴의 단백질분해적 활성화를 억제하는데 효과적인 양으로 배지에 전달된다. 일부 실시양태에서, 세포는 시험관내 세포이다. 다른 실시양태에서, 세포는 생체내 세포이다.

[0020] 본 개시내용의 또 다른 측면은 유효량의 상기 기재된 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 근병증에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근병증은 원발성 근병증이다. 또 다른 실시양태에서, 원발성 근병증은 불사용 위축을 포함한다. 다른 실시양태에서, 불사용 위축은 고관절 골절, 선택적 관절 치환술, 중환자 근병증, 척수 손상 또는 뇌졸중과 연관된다. 일부 실시양태에서, 근병증은 근육 상실이 질환 병리에 대해 속발성인 속발성 근병증이다. 다른 실시양태에서, 속발성 근병증은 탈신경, 유전적 근육 약화 또는 악액질을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 속발성 근병증은 근위축성 측삭 경화증 또는 척수성 근육 위축과 연관된 탈신경이다. 일부 실시양태에서, 속발성 근병증은 근육 이영양증과 연관된 유전적 근육 약화이다. 다른 실시양태에서, 속발성 근병증은 신부전, AIDS, 심장 병태, 암 또는 노화와 연관된 악액질이다.

[0021] 본 개시내용의 또 다른 측면은 노화에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 노화와 관련된 예시적인 질환 및 병태는, 비제한적으로, 근육감소증 (연령-관련 근육 상실), 허약, 및 안드로겐 결핍을 포함한다.

[0022] 본 개시내용의 또 다른 측면은 불사용 위축/외상에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 불사용 위축/외상에 관련된 예시적인 질환 및 병태는, 비제한적으로, 집중 치료실 (ICU)에서 보낸 시간에 관련된 근육 약화, 고관절/관절 치환술, 고관절 골절, 뇌졸중, 침상 안정, SCI, 회전근개 손상, 슬관절 치환술, 골절, 및 화상을 포함한다.

[0023] 본 개시내용의 또 다른 측면은 신경변성 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 예시적인 신경변성 질환 또는 병태는, 비제한적으로, 척수성 근육 위축 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 포함한다.

[0024] 본 개시내용의 또 다른 측면은 악액질에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 악액질에 관련된 예시적인 질환 및 병태는, 비제한적으로, 암, 만성 심부전, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 및 만성 신장 질환 (CKD)을 포함한다.

[0025] 본 개시내용의 또 다른 측면은 희귀 질환에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 예시적인 희귀 질환 및 병태는, 비제한적으로, 골형성 부전증, 산발성 봉입체 근염, 및 급성 림프모구 백혈병을 포함한다.

[0026] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대사 장애 및/또는 신체 조성에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 질환 또는 병태는 비만 (예를 들어, 중증 비만), 프라더-윌리, 제II형 당뇨병, 또는 식욕부진이다. 그러나, 대사 장애 및/또는 신체 조성에 관련된 추가적인 질

환 또는 병태가 본 개시내용의 범주 내에 속한다.

[0027] 본 개시내용의 또 다른 측면은 선천성 근병증에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 예시적인 선천성 근병증은, 비제한적으로, X-연관 근세관성 근병증, 상염색체 우성 중심핵성 근병증, 상염색체 열성 중심핵성 근병증, 네말린 근병증, 및 선천성 섬유-유형 불균등화 근병증을 포함한다.

[0028] 본 개시내용의 또 다른 측면은 근육 이영양증에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 예시적인 근육 이영양증은, 비제한적으로, 뒤시엔느, 베커, 안면견갑상완 (FSH), 및 지대 근육 이영양증을 포함한다.

[0029] 본 개시내용의 또 다른 측면은 비뇨부인과학 관련 질환 또는 병태, 성문 장애 (협착증), 외안 근병증, 손목 터널, 길랑-바레, 또는 골육종에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다.

[0030] 일부 실시양태에서, 치료는 대상체에서의 근육 강도 개선을 생성한다. 다른 실시양태에서, 치료는 대상체에서의 대사 상태 개선을 생성한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 항체는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 범위의 용량으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 0.3 mg/kg 내지 30 mg/kg 범위의 용량으로 투여된다.

[0032] 일부 실시양태에서, 항체는 대상체에게 정맥내 투여된다. 다른 실시양태에서, 항체는 대상체에게 피하 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 대상체에게 다중 경우로 투여된다. 일부 실시양태에서, 상기 다중 투여는 적어도 매달 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다중 투여는 적어도 매주 수행된다.

[0033] 본 개시내용의 추가 측면은 임의의 상기 기재된 항체 및 담체를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 담체는 제약상 허용되는 담체이다. 다른 실시양태에서, 항체 및 담체는 동결건조 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 항체 및 담체는 용액 내에 있다. 일부 실시양태에서, 항체 및 담체는 냉동된다. 다른 실시양태에서, 항체 및 담체는 -65℃ 이하의 온도에서 냉동된다.

[0034] 본 개시내용의 다른 측면은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)인 CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3을 포함하는 단백질을 코딩하며, 여기서 CDRH3은 서열식별번호: 10 또는 11에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 CDRH1은 서열식별번호: 1, 2 또는 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, CDRH2는 서열식별번호: 4-9 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0035] 본 개시내용의 또 다른 측면은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)인 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 포함함하는 단백질을 코딩하며, CDRL3은 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 CDRL1은 서열식별번호: 12-17 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, CDRL2는 서열식별번호: 18-21 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0036] 본 개시내용의 추가 측면은 서열식별번호: 38-49 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다.

[0037] 본 개시내용의 또 다른 측면은 상기 기재된 단리된 핵산을 포함하는 단리된 세포를 포함한다.

[0038] 일부 측면에서, 본 개시내용은 근병증에 걸린 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 평가하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플의 단백질, 및 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 면역학적 반응 혼합물을 제조하는 단계; 면역학적 반응 혼합물을 항체와 프로/잠재성-미오스타틴 사이에서 결합 복합체가 형성되도록 허용하는 조건 하에 유지시키는 단계; 및 결합 복합체 형성의 정도를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플의 단백질, 및 프로-미오스타틴에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 면역학적 반응 혼합물을 제조하는 단계; 면역학적 반응 혼합물을 항체와 프로-미오스타틴 사이에서 결합 복합체가 형성되도록 허용하는 조건 하에 유지시키는 단계; 및 결합 복합체 형성의 정도를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플의 단백질, 및 잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 면역학적 반응 혼합물을 제조하는 단계; 면역학적 반응 혼합물을 항체와 잠재성-미오스타틴 사이에서 결합 복합체가 형성되도록 허용하는 조건 하에 유지시키는 단계; 및 결합 복합체 형성의 정도를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플의 단백질, 및 성숙-미오스타틴에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 면역학적 반응 혼합물을 제조하는 단계; 면역학적 반응 혼합물을 항체와 성숙-미오스타틴 사이에서 결합 복합체가 형성되도록 허용하는 조건 하에 유지시키는 단계; 및 결합 복합

체 형성의 정도를 결정하는 단계를 포함한다.

[0039] 한 측면에서, 서열식별번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체가 본원에 개시된다. 한 실시양태에서, 이러한 항체는 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0040] 또 다른 측면에서, 서열식별번호: 1을 포함하는 CDRH1 서열, 서열식별번호: 6을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 14를 포함하는 CDRL1 서열, 서열식별번호: 20을 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열식별번호: 23을 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체가 본원에 개시된다.

[0041] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 26의 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 32의 서열을 포함한다.

[0042] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 27의 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 33의 서열을 포함한다.

[0043] 또 다른 측면에서, 서열식별번호: 1을 포함하는 CDRH1 서열, 서열식별번호: 8을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 16을 포함하는 CDRL1 서열, 서열식별번호: 20을 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열식별번호: 23을 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항체가 본원에 개시된다.

[0044] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 28의 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 34의 서열을 포함한다.

[0045] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 29의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 35의 서열을 포함한다.

[0046] 한 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 IgG4 불변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 IgG1-유사 힌지를 생산하고 쇄간 디술피드 결합의 형성을 허용하는 Ser에서 Pro로의 백본 치환을 갖는 IgG4 불변 도메인을 포함한다.

[0047] 한 실시양태에서, 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, 항체는 프로-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, 항체는 성숙 미오스타틴에 결합하지 않는다.

[0048] 한 실시양태에서, 항체는 톨로이드 프로테아제에 의한 성숙 미오스타틴의 단백질분해적 형성을 억제한다. 한 실시양태에서, 항체는 톨로이드 프로테아제에 의한 성숙 미오스타틴의 단백질분해적 형성을 1 μM 미만의 IC50으로 억제한다.

[0049] 한 실시양태에서, 항체는 인간 및 뮤린 프로/잠재성-미오스타틴과 교차-반응성이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하지만, 그러나 GDF11 또는 액티빈에는 결합하지 않는다.

[0050] 한 측면에서, 본원에 기재된 항체를 프로/잠재성-미오스타틴의 단백질분해적 활성화를 억제하는데 효과적인 양으로 배지에 전달하는 것을 포함하는, 프로/잠재성-미오스타틴을 포함하는 배지 내에 존재하는 세포에서 미오스타틴 수용체 활성화를 감소시키는 방법이 본원에 개시된다. 한 실시양태에서, 배지는 프로단백질 컨버타제를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 배지는 톨로이드 프로테아제를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 시험관 내 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 생체내 세포이다.

[0051] 또 다른 측면에서, 유효량의 본원에 개시된 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 근병증에 걸린 대상체를 치료하는 방법이 본원에 개시된다.

[0052] 한 실시양태에서, 근병증은 원발성 근병증이다. 또 다른 실시양태에서, 원발성 근병증은 불사용 위축이다. 한 실시양태에서, 불사용 위축은 고관절 골절, 선택적 관절 치환술, 중환자 근병증, 척수 손상, 및/또는 뇌졸중과 연관된다.

[0053] 또 다른 실시양태에서, 근병증은 근육 상실이 질환 병리에 대해 속발성인 속발성 근병증이다. 한 실시양태에서, 속발성 근병증은 탈신경, 유전적 근육 약화, 또는 악액질을 포함한다. 또 다른 실시양태에서,

속발성 근병증은 근위축성 측삭 경화증 또는 척수성 근육 위축과 연관된 탈신경이다. 또 다른 실시양태에서, 속발성 근병증은 근육 이영양증과 연관된 유전적 근육 약화이다. 한 실시양태에서, 속발성 근병증은 신부전, AIDS, 심장 병태, 암, 또는 노화와 연관된 악액질이다.

[0054] 한 실시양태에서, 투여는 대상체에서의 근육 강도 개선을 생성한다. 한 실시양태에서, 투여는 대상체에서의 대사 상태 개선을 생성한다.

[0055] 한 실시양태에서, 항체는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 범위의 용량으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 0.3 mg/kg 내지 30 mg/kg 범위의 용량으로 투여된다.

[0056] 한 실시양태에서, 항체는 대상체에게 정맥내 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 대상체에게 피하 투여된다.

[0057] 한 실시양태에서, 항체는 대상체에게 다중 경우로 투여된다. 한 실시양태에서, 다중 투여는 적어도 매달 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 다중 투여는 적어도 매주 수행된다.

[0058] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 본원에 개시된다. 한 실시양태에서, 조성물은 동결건조 조성물이다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 액체 조성물이다. 한 실시양태에서, 조성물은 냉동된다. 한 실시양태에서, 조성물은 -65℃ 이하의 온도에서 냉동된다.

[0059] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 제약 조성물을 포함하는 시린지가 본원에 개시된다.

[0060] 또 다른 측면에서, 서열식별번호: 39의 핵산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 45의 핵산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 본원에 개시된다.

[0061] 또 다른 측면에서, 서열식별번호: 1을 포함하는 CDRH1 서열, 서열식별번호: 6을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 14를 포함하는 CDRL1 서열, 서열식별번호: 20을 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열식별번호: 23을 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 본원에 개시된다.

[0062] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 40의 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 46의 서열을 포함한다.

[0063] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 41의 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 47의 서열을 포함한다.

[0064] 또 다른 측면에서, 서열식별번호: 1을 포함하는 CDRH1 서열, 서열식별번호: 8을 포함하는 CDRH2 서열, 및 서열식별번호: 11을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열식별번호: 16을 포함하는 CDRL1 서열, 서열식별번호: 20을 포함하는 CDRL2 서열, 및 서열식별번호: 23을 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 본원에 개시된다.

[0065] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 42의 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 48의 서열을 포함한다.

[0066] 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 43의 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 49의 서열을 포함한다.

[0067] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 단리된 핵산을 포함하는 단리된 세포가 본원에 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1A-1B는 미오스타틴 도메인 구조 및 프로미오스타틴 어셈블리를 나타낸다. 도 1A는 억제성 프로도메인에 C-말단 성장 인자 도메인이 이어진 프로단백질로서 분비된 미오스타틴을 나타내고, 이는 디술피드-연결 이량체로서 존재한다. 도 1B는 프로도메인 (진회색)이 "스트레이트재킷" 어셈블리로 성장 인자 (연회색)를 에워싸고 있는 불활성 형상으로 조립된 전구체 단백질을 나타낸다. 이러한 도면은 잠재성 TGFβ1의 구조로부터의 개조물이다 (Shi et al. Nature 2011).

도 2는 미오스타틴의 활성화가 2개의 독특한 프로테아제 이벤트를 수반하여, 3개의 주요 미오스타틴 종을 생성시킨다는 것을 나타낸다. 생합성 전구체 단백질인 프로미오스타틴이 2개의 별개의 프로테아제에 의해 프로세싱된다. 프로미오스타틴 (및 프로GDF11)의 절단이 프로단백질 컨버타제, 예컨대 푸린(Furin)/PACE3 (쌍을 이룬

염기성 아미노산 절단 효소(Paired Basic Amino acid Cleaving Enzyme) 3) 또는 PCSK5 (프로단백질 컨버타제 서브틸리신/켁신(Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin) 제5형)에 의해 수행되고, 이는 프로도메인과 성숙 성장 인자 사이의 보존된 RXXR 부위에서 절단한다. 이러한 절단으로 잠재성 복합체가 생산되고, 여기서 성숙 성장 인자는 그의 수용체에 결합하는 것이 프로도메인에 의해 차폐된다. BMP/톨로이드 패밀리로부터의 추가적인 프로테아제, 예컨대 TLL-2 (톨로이드-유사 단백질(Tolloid-like protein) 2) 또는 BMP1 (골 형태형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein) 1)에 의한 절단 후에 활성 성장 인자의 활성화 및 방출이 달성된다. 이러한 절단 이벤트로 성숙 형태의 미오스타틴이 산출되고, 이는 활성 미오스타틴 또는 성숙 미오스타틴으로 지칭될 수 있다.

도 3A-3C는 Ab1이 톨로이드 프로테아제 패밀리의 구성원에 의한 프로미오스타틴의 절단을 차단한다는 것을 나타낸다. 증가되는 양의 Ab1과 함께 예비인큐베이션된 잠재성 미오스타틴 샘플을 미오스타틴 활성화 검정법에서 분석하였다. 리포터 검정법에 의한 미오스타틴 방출의 분석 후 (도 3A), 샘플을 환원 조건 하에 러닝시키고, 미오스타틴의 프로도메인에 대해 생성된 항체로 웨스턴 블롯에 의해 프로빙하였다 (도 3B). 톨로이드 절단 후에 생성된 프로도메인의 ARM 부분에 상응하는 ~18 kDa 밴드 (박스)가 증가되는 용량의 Ab1에 비례하여 감소하였다. 잠재성 및 프로미오스타틴 표준물 (45 ng 로딩)은 프로미오스타틴은 ~50 kDa에서, 프로도메인은 ~ 37 kDa에서의 이동을 나타낸다. 도 3C는 미오스타틴의 활성화가 2개의 독특한 프로테아제 이벤트를 수반하여 3개의 주요 미오스타틴 종을 생성시킨다는 것을 나타낸다. 생합성 전구체 단백질인 프로미오스타틴이 2개의 별개의 프로테아제에 의해 프로세싱된다. 프로미오스타틴 (및 프로GDF11)의 절단이 프로단백질 컨버타제, 예컨대 푸린/PACE3 (쌍을 이룬 염기성 아미노산 절단 효소 3) 또는 PCSK5 (프로단백질 컨버타제 서브틸리신/켁신 제5형)에 의해 수행되고, 이는 프로도메인과 성숙 성장 인자 사이의 보존된 RXXR 부위에서 절단한다. 이러한 절단으로 잠재성 복합체가 생산되고, 여기서 성숙 성장 인자는 그의 수용체에 결합하는 것이 프로도메인에 의해 차폐된다. 톨로이드 프로테아제의 잠재적인 억제가 프로미오스타틴의 추가 절단을 차단하는 것을 도해하는 도 3B를 참조한다. BMP/톨로이드 패밀리로부터의 추가적인 프로테아제, 예컨대 TLL-2 (톨로이드-유사 단백질 2) 또는 BMP1 (골 형태형성 단백질 1)에 의한 절단 후에 활성 성장 인자의 활성화 및 방출이 달성된다.

도 4는 세포-기반 리포터 검정법에서의 모체 Ab1 항체 및 다른 후보물질의 성능을 나타낸다. 프로단백질-컨버타제 및 톨로이드 프로테아제 패밀리 둘 다로부터의 효소로의 밤새 단백질분해 반응 후에, 성숙 성장 인자의 방출을 293T 세포에서 CAGA-기반 리포터 검정법을 사용하여 측정하였다. 결과를 대조군 반응에 비교하여, 검정법에서 방출된 프로미오스타틴 또는 프로GDF11의 분율을 계산하였다. 3개의 사본의 평균에 대한 표준 편차가 제시되지만, 낮은 규모로 인해 대부분의 데이터 포인트에 대해 그래프 상에서 가시적이지 않다.

도 5는 Ab1, Ab2, Ab4, 및 Ab6 항체가 프로GDF11 활성화를 억제하지 않는다는 것을 그래프로 나타낸다.

도 6은 평균 퍼센트 체중 변화를 평가하는 검정법의 결과를 나타낸다. 동물을 매일 칭량하고, 제0일로부터의 퍼센트 중량 변화를 계산하였다. 데이터는 군 평균 ± SEM을 나타낸다. 연구 제42일의 각각의 군에 대한 평균 퍼센트 변화 데이터를 PBS 대조군에 비교하여 일원 ANOVA에 이어서 홀름-시닥(Holm-Sidak) 사후 검정, **$p<0.01$을 사용하여 분석하였다.

도 7A-7D는 조직 중량을 평가하는 검정법의 결과를 나타낸다. 도 7A는 평균 비복근 중량을 나타낸다. 도 7B는 평균 흉근 중량을 나타낸다. 도 7C는 평균 가자미근 중량을 나타낸다. 도 7D는 평균 삼두근 중량을 나타낸다. 비히클 대조군 (군 1)에 비교하여 일원 ANOVA에 이어서 홀름-시닥 사후 검정을 사용하여 통계 평가를 수행하였다. 데이터는 군 평균 ± SEM을 나타낸다. **$p<0.01$. 막대는 좌측에서 우측으로 군 1-5를 가리킨다.

도 8A-8C는 조직 중량을 평가하는 검정법의 결과를 나타낸다. 도 8A는 평균 전경골근 중량을 나타낸다. 도 8B는 평균 횡경막 중량을 나타낸다. 도 8C는 평균 사두근 중량을 나타낸다. 비히클 대조군 (군 1)에 비교하여 일원 ANOVA에 이어서 홀름-시닥 사후 검정을 사용하여 통계 평가를 수행하였다. 데이터는 군 평균 ± SEM을 나타낸다. *$p<0.05$. 막대는 좌측에서 우측으로 군 1-5를 가리킨다.

도 9A-9B는 평균 퍼센트 체중 및 제지방 질량 변화를 평가하는 검정법의 결과를 나타낸다. 도 9A는 연구 전반에 걸쳐 매주 2회 칭량된 동물에서의 제0일로부터의 계산된 퍼센트 중량 변화를 나타내는 그래프이다. 도 9B에서, 제-4일, 제7일, 제14일, 제21일, 및 제28일에 동물이 신체 조성을 측정하기 위해 에코MRI(EchoMRI) (QNMR)를 받았고, 제0일로부터의 퍼센트 제지방 질량 변화를 계산하였다. 데이터는 군 평균 ± SEM을 나타낸다. 체중 및 제지방 질량 둘 다에 대해, 연구의 제28일에 각각의 군에 대한 평균 퍼센트 변화 데이터를 IgG 대조군 (군 2)에 비교하여 일원 ANOVA에 이어서 홀름-시닥 사후 검정을 사용하여 분석하였다. ***$p<0.0005$, **$p<0.005$, *$p<0.05$, ns (유의하지 않음).

도 10A-10D는 근육 중량을 평가하는 검정법의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 10A는 평균 사두근 중량을 나타내고, 도 10B는 평균 비복근 중량을 나타내고, 도 10C는 평균 전경골근 중량을 나타내며, 도 10D는 평균 횡경막 중량을 나타낸다. IgG 대조군에 비교된 Ab1 치료군의 평균 근육 중량에서의 퍼센트 차이가 각각의 막대 위에 표기된다. IgG 대조군 (군 2)에 비교하여 일원 ANOVA에 이어서 홀름-시닥 사후 검정을 사용하여 통계 평가를 수행하였다. 데이터는 군 평균 ± SEM을 나타낸다. ****p<0.0001, ***p<0.0005, **p<0.005, *p<0.05, ns (유의하지 않음).

도 11A-11B는 평균 퍼센트 체중 및 제지방 질량 변화를 평가하는 검정법의 결과를 나타낸다. 도 11A는 연구 전반에 걸쳐 매주 2회 칭량된 동물로부터 계산된 제0일로부터의 퍼센트 중량 변화를 나타낸다. (도 11B) 동물이 제-1일, 제6일, 및 제13일에 신체 조성을 측정하기 위해 에코MRI (QNMR)를 받았고, 제-1일로부터의 퍼센트 제지방 질량 변화를 계산하였다. PBS = 포스페이트 완충 염수, Dex = 덱사메타손, IgG (20) = 20 mg/kg/wk로 투여된 IgG 대조군 항체, Ab1 (20) = 20 mg/kg/wk로 투여된 Ab1 항체, 및 Ab1 (2) = 2 mg/kg/wk로 투여된 Ab1 항체. 데이터는 군 평균 ± SEM을 나타낸다. 제14일 (체중) 및 제13일 (제지방 질량)의 각각의 군에 대한 평균 퍼센트 변화 데이터를 군 1 (****p<0.0001, ***p<0.0005, **p<0.005, *p<0.05)에 대비하여 및 군 5 (++++p<0.0001, +++p<0.0005, ++p<0.005, +p<0.05)에 대비하여 일원 ANOVA에 이어서 던넷 다중 비교 검정을 사용하여 분석하였다. ns (유의하지 않음).

도 12A-12D는 상이한 근육의 중량을 평가하는 검정법의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 12A는 평균 비복근 중량 (그램)을 나타내고, 도 12B는 평균 사두근 중량 (그램)을 나타내고, 도 12C는 PBS (IP) 및 일반 음용수로 치료된 대조군 동물 (군 1)에 대비된 평균 퍼센트 비복근 중량 변화를 나타내며, 도 12D는 PBS (IP) 및 일반 음용수로 치료된 대조군 동물 (군 1)에 대비된 평균 퍼센트 사두근 중량 변화를 나타낸다. PBS = 포스페이트 완충 염수, Dex = 덱사메타손, IgG (20) = 20 mg/kg/wk로 투여된 IgG 대조군 항체, Ab1 (20) = 20 mg/kg/wk로 투여된 Ab1 항체, 및 Ab1 (2) = 2 mg/kg/wk로 투여된 Ab1 항체. 도 12A-12B의 경우, 오차 막대는 표준 편차 (SD)를 나타낸다. 도 12C-12D의 경우, 오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타낸다. 군 1 (****p<0.0001, ***p<0.0005, **p<0.005, *p<0.05)에 대비하여 및 군 5 (++++p<0.0001, +++p<0.0005, ++p<0.005, +p<0.05)에 대비하여 일원 ANOVA에 이어서 던넷 다중 비교 검정을 사용하여 통계 평가를 수행하였다. ns (유의하지 않음). 막대는 좌측에서 우측으로 PBS, 물; PBS, dex; IgG 대조군; Ab1(20); 및 Ab1(2)를 가리킨다.

도 13A-13B는 평균 퍼센트 체중 및 제지방 질량 변화를 평가하는 검정법의 결과를 나타낸다. 도 13A는 연구 전반에 걸쳐 매주 2회 칭량된 동물에 대해 계산된 제0일로부터의 퍼센트 중량 변화를 나타낸다. 도 13B는 제-1일, 제7일, 및 제14일에 신체 조성을 측정하기 위해 에코MRI (QNMR)를 받은 동물로부터 계산된 제-1일로부터의 퍼센트 제지방 질량 변화를 나타낸다. PBS = 포스페이트 완충 염수, IgG (20) = 20 mg/kg/wk로 투여된 IgG 대조군 항체, Ab1 (20) = 20 mg/kg/wk로 투여된 Ab1 항체, 및 Ab1 (2) = 2 mg/kg/wk로 투여된 Ab1 항체. 데이터는 군 평균 ± SEM을 나타낸다.

도 14A-14D는 근육 중량을 평가하는 검정법으로부터의 결과를 나타낸다. 도 14A는 캐스팅된 다리로부터의 평균 비복근 중량 (그램)을 나타내고, 도 14B는 캐스팅된 다리로부터의 평균 사두근 중량 (그램)을 나타내고, 도 14C는 PBS (IP)로 치료되고 캐스팅되지 않은 대조군 동물 (군 1)에 대비된 평균 퍼센트 비복근 중량 변화를 나타내며, 도 14D는 PBS (IP)로 치료되고 캐스팅되지 않은 대조군 동물 (군 1)에 대비된 평균 퍼센트 사두근 중량 변화를 나타낸다. PBS = 포스페이트 완충 염수, IgG (20) = 20 mg/kg/wk로 투여된 IgG 대조군 항체, Ab1 (20) = 20 mg/kg/wk로 투여된 Ab1 항체, 및 Ab1 (2) = 2 mg/kg/wk로 투여된 Ab1 항체. 도 14A-14B의 경우, 오차 막대는 표준 편차 (SD)를 나타낸다. 도 14C-14D의 경우, 오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타낸다. 군 1 (****p<0.0001, ***p<0.0005, **p<0.005, *p<0.05)에 대비하여 및 군 5 (++++p<0.0001, +++p<0.0005, ++p<0.005, +p<0.05)에 대비하여 일원 ANOVA에 이어서 던넷 다중 비교 검정을 사용하여 통계 평가를 수행하였다. ns (유의하지 않음). 막대는 좌측에서 우측으로 PBS, 비-캐스팅; PBS, 캐스팅됨; IgG 대조군(2), 캐스팅됨; Ab1(20), 캐스팅됨; 및 Ab1(2), 캐스팅됨을 가리킨다.

도 15는 제21일 (상단 우측) 및 제28일 (상단 좌측)의 제지방 질량 변화를 평가하는 검정법의 결과를 나타낸다. 이는 3종의 상이한 용량인 20 mg/kg/wk (하단 좌측), 2 mg/kg/wk (하단 중앙), 및 0.5 mg/kg/wk (하단 우측)의 테스트된 항체, PBS 대조군, 및 IgG 대조군의 제지방 질량의 퍼센트 변화를 또한 도시한다. 군 1 (****p<0.0001, ***p<0.005, **p<0.01, *p<0.05)에 대비하여 및 IgG 대조군에 대비하여 일원 ANOVA에 이어서 던넷 다중 비교 검정을 사용하여 통계 평가를 수행하였다. 상단의 2개의 패널의 경우, 막대는 좌측에서 우측으로 하기와 같다: PBS; IgG 대조군 20 mg/kg/wk; Ab1 20 mg/kg/wk; Ab1 2 mg/kg/wk; Ab1 0.5 mg/kg/wk; Ab2 20 mg/kg/wk; Ab2 2 mg/kg/wk; Ab2 0.5 mg/kg/wk; Ab4 20 mg/kg/wk; Ab4 2 mg/kg/wk; Ab4 0.5 mg/kg/wk; Ab6 20

mg/kg/wk; Ab6 2 mg/kg/wk; 및 Ab6 0.5 mg/kg/wk. 하단 좌측의 패널 (20 mg/kg/wk)의 경우, 투여 후 제28일에 상응하는 데이터 포인트가 위에서 아래로 Ab1, Ab4, Ab2, Ab6, IgG 대조군, 및 PBS에 상응한다. 하단 중앙의 패널 (2 mg/kg/wk)의 경우, 투여 후 제28일에 상응하는 데이터 포인트가 위에서 아래로 Ab2, Ab1, Ab6, Ab4, IgG 대조군, 및 PBS에 상응한다. 하단 우측 패널 (0.5 mg/kg/wk)의 경우, 투여 후 제28일에 상응하는 데이터 포인트가 위에서 아래로 IgG 대조군 Ab1, Ab2, PBS, Ab4, 및 Ab6에 상응한다.

도 16A-16B는 도메인 구조, 및 미오스타틴 전구체 형태의 평가를 나타낸다. 도 16A는 프로미오스타틴 및 잠재성 미오스타틴의 도메인 구조를 나타내고, 프로테아제 절단 부위가 지시된다. 도 16B는 SDS PAGE 겔 상에 러닝된, 부분적으로 프로단백질 컨버타제로 절단된 프로미오스타틴을 나타낸다. 환원 조건 하에, 프로미오스타틴 단량체 (~50 kD), 프로도메인 (~37 kD) 및 성장 인자 (12.5 kD)로 단백질 밴드가 이루어졌다.

도 17A-17B는 Ab1이 미오스타틴에 대해 특이적이라는 것을 나타낸다. 도 17A는 Ab1이 프로미오스타틴 및 잠재성 미오스타틴에 특이적으로 결합한다는 것을 나타내고, TGFB 슈퍼패밀리의 다른 구성원, 특히 상응하는 형태의 GDF11에 대해서는 결합이 관찰되지 않았다. Ab1을 지시된 항원으로 코팅된 포르테-바이오(Forte-Bio) BLI 팁에 고농도 (50 ug/mL)로 투여하고, 온(on) 및 오프(off) 속도를 측정하여 대략적인 Kd 값을 수득하였다. 결합 이벤트를 지시하는 바이오센서 반응의 규모가 그래프로 흑색 막대에 의해 표시되고, 계산된 Kd가 주황색으로 지시된다. 도 17B는 Ab1이 프로미오스타틴의 활성화를 차단하지만, 프로GDF11는 그렇지 않다는 것을 나타낸다. 프로단백질-컨버타제 및 톨로이드 프로테아제 패밀리 둘 다로부터의 효소로의 밤새 단백질분해 반응 후, 293T 세포에서 CAGA-기반 리포터 검정법을 사용하여 성숙 성장 인자의 방출을 측정하였다. 결과를 대조군 반응에 비교하여 검정법에서 방출된 프로미오스타틴 또는 프로GDF11의 분율을 계산하였다.

도 18A-18C는 후보 항체로의 SCID 용량 반응을 나타낸다. 도 18A는 비복근의 근육 중량을 나타내고, 도 18B는 사두근의 근육 중량을 나타낸다. 도 18C는 PBS 대조군에 비교된 평균 근육 중량의 퍼센트 변화를 나타낸다. 도 18A-18B의 막대는 좌측에서 우측으로 하기와 같다: PBS; IgG 대조군 20 mg/kg/wk; Ab1 20 mg/kg/wk; Ab1 2 mg/kg/wk; Ab1 0.5 mg/kg/wk; Ab2 20 mg/kg/wk; Ab2 2 mg/kg/wk; Ab2 0.5 mg/kg/wk; Ab4 20 mg/kg/wk; Ab4 2 mg/kg/wk; Ab4 0.5 mg/kg/wk; Ab6 20 mg/kg/wk; Ab6 2 mg/kg/wk; 및 Ab6 0.5 mg/kg/wk.

도 19는 Ab1을 기존의 미오스타틴 항체 (AbMyo)에 비교하는 작용 기간 연구의 결과를 나타낸다. PBS를 음성 대조군으로서 사용하였고, IgG를 양성 대조군으로서 사용하였다. 21일 후에 여러 투여 프로토콜 하에 제지방 질량 변화를 검사하였다.

도 20은 시험관 내에서의 미오스타틴 활성화를 재구성하는 검정법을 도해하는 개략도이다.

도 21A-21B는 프롤린이 세린을 치환한 IgG4 아유형의 인간화 모노클로날 항체 (Ab2)의 중쇄 (도 21A; 서열식별번호: 50) 및 경쇄 (도 21B; 서열식별번호: 51)를 나타낸다. 이는 IgG1-유사 힌지 서열을 생성시키고, IgG4의 특징인 쇄간 디술피드 다리의 불완전한 형성을 최소화한다. 상보성 결정 영역 (CDR)에 밑줄이 그어진다. 볼드체 NST 서열: N-연결 글리코실화 컨센서스 서열 부위; 볼드체 DP 서열은 잠재적 절단 부위이고; 볼드체 NX 서열 (여기서 X는 S, T, 또는 G일 수 있음)은 잠재적인 탈아미드화 부위이고; 볼드체 DX 서열 (여기서 X는 G, S, T일 수 있음), 또는 SDG는 잠재적인 이성질체화 부위이고; 볼드체 메티오닌은 잠재적인 메티오닌 산화 부위이고; 볼드체 Q는 예상 N-말단 피로글루탐산이다.

도 22는 배선화에 의한 면역원성 위험 감소를 나타내는 개략도이다. 개략도에서 지시된 바와 같이, 24H4 (WT)는 프레임워크 영역 내에 5개의 비-배선 아미노산을 함유한다.

도 23A-23C는 Ab1의 최적화를 나타낸다. 프로미오스타틴에 특이적으로 결합하는 최적화된 후보물질을 선택하여, 친화성이 증가된 수십의 클론이 생성되었다. FACS를 수행하여, Ab1 (도 23A)에 비교된 효모 클론 (도 23B)의 결합 증가를 나타냈다. 도 23C는 친화성-성숙된 변이체가 오프-속도가 더 느리다는 것을 옥테트에 의해 또한 나타낸다.

도 24A-24B는 모체 Ab1과 친화성 최적화 변이체인 Ab3 및 Ab5의 가변 중쇄 영역 (도 24A) 및 가변 경쇄 영역 (도 24B)의 서열 정렬을 나타낸다. 서열 식별자는 위에서 아래로 서열식별번호: 24, 26, 28에 상응한다 (도 24A). 서열 식별자는 위에서 아래로 서열식별번호: 30, 32, 34에 상응한다 (도 24B). 카바트(Kabat) (밑줄) 및 IMGT 명명법 (볼드체)을 사용하여 상보성 결정 영역 (CDR)이 정의된다. 모체 Ab1로부터의 치환이 연회색으로 제시된다.

도 25는 정상 및 위축 마우스로부터의 근육 및 혈장에서의 프로- 및 잠재성-미오스타틴의 발현을 나타낸다.

도 26은 근육 및 혈장에서의 프로 및 잠재성 미오스타틴의 변화의 정량화를 나타낸다. 막대는 좌측에서 우측으로 프로미오스타틴, 잠재성 미오스타틴, 프로미오스타틴, 잠재성 미오스타틴, 및 잠재성 미오스타틴을 나타낸다.

도 27은 Ab2가 프로미오스타틴 및 잠재성 미오스타틴을 독특하게 인식하여, 혈청 및 근육 둘 다 내의 주요 미오스타틴 형태에 결합한다는 것을 나타낸다. 프로도메인 (더 진한 회색) 및 성숙 성장 인자 (더 연한 회색)에 대한 비-환원 웨스턴 블롯. 재조합 프로미오스타틴 (r프로미오스타틴)은 화살표로 강조된, 겔 상에서의 프로미오스타틴 및 미오스타틴 프로도메인 (잠재성 미오스타틴)의 이동을 나타낸다. 혈청에서는, Ab2 및 AbMyo 둘 다가 잠재성 미오스타틴 (프로도메인 밴드) 및 부분적으로 프로세싱된 다중 전구체에 결합하지만, Ab2만 프로미오스타틴 (최상부의 밴드)을 인식하였다. 근육에서는, Ab2가 프로미오스타틴을 침전시켰고, AbMyo와 프로미오스타틴의 상호작용이 근육 조직에서 없었다.

도 28A-28B는 정상 및 위축 근육에서의 미오스타틴 유동의 모델을 제공한다. 정상 근육에서는 (도 28A), 프로미오스타틴이 근육에서 생산되고, 푸린 프로테아제에 의한 절단을 통해 잠재성 미오스타틴으로 전환되며, 이는 세포의 내부 또는 외부 어느 하나에서 발생할 수 있다. 그 후, 근육 내의 잠재성 미오스타틴의 일부 분획은 순환 내로 방출되어, 잠재성 미오스타틴의 순환 풀을 형성한다. 근육 위축에서는 (도 28B), 근육 내의 프로미오스타틴 수준의 상향 조절 및 잠재성 미오스타틴의 활성 성장 인자로의 전환 증가에 의해 활성 미오스타틴 성장 인자의 증가가 야기된다. 결과적으로, 잠재성 미오스타틴의 근육 풀이 mTLL2 절단에 의한 성숙 미오스타틴의 형성을 향해 전향됨에 따라 순환 잠재성 미오스타틴이 감소된다.

도 29는 투여된 래트로부터의 혈청 내의 Ab2 (상단 선) 및 IgG 대조군 (하단 선) 항체의 검출을 나타낸다. Ab2는 IgG 대조군에 비교하여 순환 내에서의 수준 상승을 나타내고, 연구 말기의 혈청 내의 Ab2는 평균 17.1 μg/ml이다. 기지량의 각각의 항체를 참조 표준으로서 사용하여 인간 IgG-특이적 ELISA에 의해 Ab2 수준을 결정하였다.

도 30A-30B는 치료된 래트에서의 Ab2의 약역학 효과를 나타낸다. 도 30A는 Ab2로 치료된 래트가 PBS- 또는 IgG 대조군-치료 동물에 비교하여 제지방 질량 증가를 나타낸다는 것을 나타낸다. Ab2 및 IgG를 10 mg/kg 용량으로 제0일에 정맥내 투여하였다. 제지방 질량을 투여 7, 14, 21 및 28일 후에 qNMR에 의해 측정하였다 (N = 8/군). 도 30B는 대퇴직근 및 전경골근을 연구 말기에 모든 군으로부터 수집하였고 (N = 8/군), 근육 질량을 결정하기 위해 칭량하였음을 나타낸다. Ab2로 치료된 래트는 대퇴직근 및 전경골근 근육 질량의 각각 14% 및 11%의 증가를 나타낸다.

도 31A-31B는 Ab2-치료 래트에서의 프로/잠재성-미오스타틴 프로/잠재성-미오스타틴 수준을 나타낸다. 도 31A는 Ab2 치료 (상단 선)가 래트 혈청 내의 잠재성 미오스타틴 수준을 ~20배만큼 증가시킨다는 것을 나타낸다. 도 31B는 래트 근육 (대퇴직근)에서, Ab2 치료가 잠재성 형태의 미오스타틴의 1.9x 증가에 이른다는 것을 나타낸다. 막대는 좌측에서 우측으로 프로미오스타틴, 잠재성 미오스타틴, 프로미오스타틴, 및 잠재성 미오스타틴에 상응한다. 래트 근육에서 프로미오스타틴의 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않는다. 이러한 데이터는 n=3개의 샘플/군으로의 정량적 웨스턴 분석으로부터의 것이다.

도 32는 Ab2 (Ab2) 또는 비교물 항체 (AbMyo)로의 치료가 빠르게는 항체 투여 7일 후에 제지방 질량 증가에 이른다는 것을 나타낸다. 제지방 질량 증가가 투여 21일 후까지는 Ab2 및 AbMyo에 대해 등가이다. 그러나, 투여 28일 후에는, AbMyo-치료군에서는 제지방 질량 증가가 상실되는 한편, Ab2-치료군에서의 증가는 연구 기간 전반에 걸쳐 유지된다. 상단 선은 Ab2에 상응하고, 중앙 선은 AbMyo에 상응하며, 하단 선은 IgG 대조군 (5 mg/kg)에 상응한다.

도 33은 단일의 5 mg/kg 용량의 Ab2 (상단 선) 또는 비교물 항체 (AbMyo; 하단 선) 후에, 약물의 혈청 수준을 항-인간 IgG ELISA를 사용하여 측정하였음을 나타낸다. 빠르게는 투여 1시간 후에 약물이 혈청에서 검출되고, > 1 μg/ml 수준의 양쪽 항체가 연구 전반에 걸쳐 검출될 수 있다. 그러나, Ab2가 AbMyo보다 유의하게 더 긴 반감기 및 추정 곡선하 면적 (AUCINF)을 나타내고, 이는 유사한 용량에서 Ab2가 AbMyo보다 유의하게 더 큰 노출을 나타낸다는 것을 시사한다.

도 34는 약물 치료 마우스 및 대조군에서 형광 웨스턴 블롯팅을 사용하여 혈청 미오스타틴을 측정하였음을 나타낸다. Ab2의 증가된 혈청 노출에도 불구하고, Ab2- 및 AbMyo-치료 마우스 둘 다에서의 혈청 잠재성 미오스타틴 수준이 유사하였다. 이러한 데이터는 유리 약물의 순환 수준이 표적 수준보다 충분히 더 과량이어서 Ab2의 증가된 혈청 노출이 AbMyo 군에서 관찰되는 것보다 순환 잠재성 미오스타틴의 더 큰 증가에 이르지 않는다는 것을

시사한다. 데이터 군은 좌측에서 우측으로 IgG, Ab2, AbMyo, IgG, Ab2, 및 AbMyo에 상응한다.

도 35A-35B는 형광 웨스턴 블롯에 의해 마우스 근육 용해물에서 잠재성 및 프로미오스타틴의 상대 수준을 측정하였음을 나타낸다. 도 35A는 잠재성 미오스타틴이 Ab2- 및 AbMyo-치료 근육 둘 다에서 상승된다는 것을 나타낸다. 그러나, AbMyo-치료 근육에서의 잠재성 미오스타틴의 상승은 제28일에 기준선으로 돌아가는 한편, Ab2 치료 근육에서의 상승은 적어도 이러한 시점까지 여전히 상승되어 있다 (AbMyo 치료에 대비하여 P<0.003). 도 35B는 프로미오스타틴으로 유사한 경향이 관찰된다는 것을 나타내지만, 제28일의 Ab2 치료군과 AbMyo 치료군 사이의 차이가 통계적으로 유의하지 않다 (P=0.068).

도 36A는 마우스에서의 근육 질량 및 기능에 대한 Ab2 치료의 효과를 나타낸다.

도 36B는 마우스에서의 최대 힘 생성에 대한 Ab2 치료의 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 미오스타틴은 TGFβ 슈퍼패밀리의 구성원이고, 미오스타틴 (일명 GDF8) 및 GDF11인 2개의 구성원을 포함하는 서브패밀리에 속한다. TGFβ 슈퍼패밀리의 다른 구성원과 같이, 미오스타틴 및 GDF11은 둘 다 처음에는 불활성 전구체 폴리펩티드 (각각 프로미오스타틴 및 프로GDF11로 명명됨)로서 발현된다. 도메인 구조 및 명명법이 도 1A에서 제시된다. 도 1B는 성숙 성장 인자가 "잠재성 래소"로 명명된 루프에 의해 연결된 2개의 알파 헬릭스로 구성된 케이지 내에 잠겨져 있는, 프로미오스타틴의 전반적인 구조의 그림 모델을 도해한다.

[0070] 성숙 성장 인자의 활성화 및 방출은 도 2에 개요된 여러 독특한 프로테아제 절단 이벤트에 의해 달성된다. 프로미오스타틴 및 프로GDF11의 제1 절단 단계는 프로단백질 컨버타제에 의해 수행되고, 이는 프로도메인과 성숙 성장 인자 사이의 보존된 RXXR 부위에서 절단한다. 이러한 절단으로 잠재성 복합체가 생산되고, 여기서 성숙 성장 인자는 그의 수용체에 결합하는 것이 프로도메인에 의해 차폐된다. BMP/톨로이드 패밀리로부터의 추가적인 프로테아제, 예컨대 mTLL-2에 의한 절단 후에 성숙 활성 미오스타틴 성장 인자의 활성화 및 방출이 달성된다 (도 2).

[0071] 인간, 래트, 마우스 및 시노몰구스에서의 예시적인 프로GDF8 서열이 하기에서 제공된다. 이러한 프로GDF8 서열에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위가 볼드체로 지시되고, 톨로이드 프로테아제 부위가 밑줄로 지시된다. 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위는 서열식별번호: 52-55의 아미노산 잔기 240 내지 243을 포함한다. 일부 실시양태에서, 톨로이드 프로테아제 부위는 서열식별번호: 52-55의 아미노산 잔기 74-75를 포함한다. 본원에 제공된 예시적인 프로GDF8 서열이 제한적인 것으로 의도되지 않고, 다른 종으로부터의 추가적인 프로GDF8 서열이 그의 임의의 이소형을 포함하여 본 개시내용의 범주 내에 속한다는 것을 이해하여야 한다.

[0072] 프로GDF8 (인간):

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLP
KAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFF
KFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNP
GTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEV
KVTDTPK**RSRR**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSG
ECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMV
VDRCGCS (SEQ ID NO: 52).

[0073]

[0074] 프로GDF8 (래트):

NEDSEREANVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLP
RAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQADGKPKCCFF
KFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRAVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMSP
GTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEV
KVTDTPK**RSRR**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSG
ECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMV
VDRCGCS (SEQ ID NO: 53).

[0075]

[0076] 프로GDF8 (마우스):

NEGSEREENVEKEGLCNACAWRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLP
RAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQADGKPKCCFF
KFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVKTPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMSP
GTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEV
KVTDTPK**RSRR**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSG
ECEFVFLQKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMV
VDRCGCS (SEQ ID NO: 54).

[0077]

[0078] 프로GDF8 (시노몰구스):

NENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDAIRQLLP
KAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFF
KFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNP
GTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEV
KVTDTPK**RSRR**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIA (SEQ ID NO: 55).

[0079]

[0080] 미오스타틴 및 GDF11은 이들의 성숙 성장 인자 도메인 사이에서는 90 퍼센트 동일성으로 비교적 높은 정도의 보존을 공유하지만, 이들의 프로도메인 영역에서는 둘 사이의 50 퍼센트 미만의 아미노산 동일성으로 훨씬 덜 보존된다. 미오스타틴 및 GDF11은 II형 수용체 (ACTRIIA/B)와 회합된 I형 수용체 (ALK4/5)로 이루어진 동일한 수용체에 결합하고 이를 통해 신호를 전달한다. 미오스타틴과 I형 및 II형 수용체의 맞물림으로 신호전달 케스케이드가 개시되어, SMAD 인산화 및 근육 위축 유전자의 전사 활성화에 이른다. 성숙 성장 인자에서의 상대적으로 높은 정도의 보존은 성숙 미오스타틴과 GDF11을 식별할 수 있는 시약, 예컨대 모노클로날 항체를 식별하는 것을 난제로 만들었다.

[0081] 일부 실시양태에서, GDF11의 성장 인자 도메인 및 N 말단 프로펩티드 부분 및 GDF8의 프로펩티드의 C 말단 부분을 함유하는 키메라 구축물에 특이적으로 결합하는 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 본원에 제공된다. 하기에 기재된 바와 같은 이러한 키메라 구축물은 GDF11Arm8로 지칭된다.

> GDF11Arm8 (SEQ ID NO: 65)

MDMRVPAQLLGLLLLWFSGVLGDYKDDDDKHHHHHHLEVLFQGPAEGPAAAAAA
AAAAAAAGVGGERSSRPAPSVAPEPDGCPVCVWRQHSRELRLESIKSQILSKLRLKE
APNISREVVKQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDF
LMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYNKVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGT
RYTGIRSLKLDMNPGTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTF
PGPGEDGLNPFLEVKVTDTPKRSRRNLGLDCDEHSSESRCCRYPLTVDFEAFGWDWI
IAPKRYKANYCSGQCEYMFMQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFN
DKQQIIYGKIPGMVVDRCGCS

[0082]

[0083] *근병증에서의 미오스타틴의 역할*

[0084] 골격 근육은 신체 질량의 약 40%를 차지하고, 하루에 1-2%의 비율로 바뀌는 동적인 기관이다. 근육 위축은 불사용 기간 동안 발생하고/하거나 (예를 들어 불사용 위축) 및/또는 고조된 전신 염증에 반응하여 발생하는 (악액질), 고도로 조절되는 이화 프로세스이다. 장기간의 부동 동안, 예컨대 침상 안정 동안 발생할 수 있는 불사용 위축에서, 근육 상실이 급속하게 발생한다. 예를 들어, 1주의 입원 동안, 평균 환자가 ~1.3 kg의 근육 질량을 상실한다.

[0085] 근육 위축은 광범위한 임상 병태에서 유의한 이환율을 야기한다. 탈신경 질환 예컨대 근위축성 측삭 경화증 (ALS) 또는 척수성 근육 위축 (SMA), 및 근육 이영양증을 포함하는 유전 질환에서, 근육 강도 및 기능의 상실은 적당한 치료가 없는, 고도로 불구로 만드는 임상 양상이다. 신부전, AIDS, 심장 병태, 또는 암으로 인한 악액질 증후군에서, 근육 소모는 종종 원발성 병태의 성공적인 치료를 훼손한다. 근육 상실은 자연적인 노화 프로세스를 또한 생성하고, 그의 가장 중증인 형태에서, 점점 더 개입이 정당화되는 병리로 인식되고 있는 노인에서의 전반적인 병태인 근육감소증으로 분류된다. 마지막으로, 근육 위축의 주요 구동인자는 불사용이다. 부동은 대형 병태 군 예컨대 고관절 골절, 선택적 관절 치환술, 척수 손상, 중환자 근병증 및 뇌졸중에서 급속하고 유의한 근육 상실을 야기한다. 원인이 다양하지만, 이러한 적응증은 특징적인 근육 약화를 공유하고, 이는 유의한 장애, 긴 신체 재활 및 회복 시간 및 삶의 질 손상에 이른다.

[0086] 근육 위축 병태에 충족되지 않은 의학적 요구가 있었다. 따라서, 일부 실시양태에서, 근육 위축을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 원발성 근병증의 치료에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 속발성 근병증, 예를 들어, 탈신경 질환, 유전적 근육 약화 및 악액질, 근육 상실이 질환 병리에 대해 속발성인 병태의 치료에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 원발성 근병증 근병증, 예컨대 불사용 위축 (예를 들어, 고관절 골절 또는 척수 손상 (SCI)과 연관됨)의 치료를 위한 본원에 제공된 방법은 대상체에서 근육 질량, 강도 및 기능의 증가를 생성한다.

[0087] *미오스타틴 경로 억제*

[0088] 근육-관련 병태의 치료를 향해 다양한 임상 개발 단계에 있는 여러 미오스타틴 경로 길항제가 있다. 이러한 경로의 길항제는 성숙 성장 인자 또는 그의 II형 수용체를 표적으로 하고, 대부분 다중 TGFβ 패밀리 구성원의 신호전달을 길항한다. 예를 들어, 다수의 현재의 임상 후보물질이 추가적인 성장 인자 예컨대 액티빈 A, GDF11, 및 BMP 9 및 10을 차단하고, 이들은 각각 생식 생물학, 상처 치유, 적혈구생성 및 혈관 형성의 조절인자이다. 본 개시내용의 측면은 미오스타틴에 더하여 이러한 인자를 차단하는 것이 허용불가능한 부작용으로 인해 안전하게 요법을 받을 수 있는 환자의 집단을 잠재적으로 제한할 것이라는 인식에 관련된다.

[0089] 따라서, 프로미오스타틴 및/또는 잠재성 미오스타틴에 결합하고, 이에 의해 미오스타틴 활성을 억제할 수 있는 항체, 및 근병증과 연관된 질환 및 장애를 치료하기 위한 그의 용도가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 순환 내의 잠재성 복합체의 우세를 고려하여, 성숙 성장 인자보다는 더욱 풍부하고 더 오래 생존하는 미오스타틴 전구체 예를 들어, 프로미오스타틴 및 잠재성 미오스타틴을 특이적으로 표적화하는 치료가 본원에 제공된다. 어떠한 특정 이론에도 구속되기를 원치 않으면서, 본원에 제공된 항체는, 예를 들어, I형 (ALK4/5) 및 II형 (ACTRIIA/B) 수용체에 결합하는 것에 의해 미오스타틴 경로를 활성화시킬 수 있는 "활성" 형태의 미오스타틴으로 간주되는 성숙 미오스타틴으로 프로미오스타틴 및/또는 잠재성 미오스타틴이 단백질분해에 의해 활성화되는 것을 방지할 수 있다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "프로/잠재성-미오스타틴"은 프로미오스타틴, 잠재성 미오스타틴, 또는 둘 다를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 프로미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 잠재성 미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 잠재성 미오스타틴 및 프로미오스타틴 둘 다에 특이적으로 결합한다. "잠재성 미오스타틴" 및 "프로미오스타틴"이 본원에 각각 "잠재성 GDF8" 및 "프로GDF8"로 지칭될 수도 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "성숙 미오스타틴"은 성숙, 생물학적 활성 형태의 미오스타틴을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 성숙 미오스타틴은 미오스타틴 수용체 결합 및/또는 활성화가 가능하다. 성숙 미오스타틴이 생체 내에서 그의 프로-미오스타틴 형태로부터 활성화 및 방출되는 것은 여러 독특한 프로테아제 절단 이벤트에 의해 달성된다. 먼저, "프로-미오스타틴"이 프로단백질 컨버타제에 의해 절단되어, "잠재성-미오스타틴"이 생성되고, 여기서 성숙 미오스타틴은 그의 수용체에 결합하는 것이 프로도메인의 일부분에 의해 차폐된다. BMP/톨로이드 패밀리로부터의 추가적인 프로테아제, 예컨대 mTLL-2에 의한 잠재성-미오스타틴의 절단 후에 성숙 미오스타틴의 활성화 및 방출이 달성된다. 예를 들어, 도 1A, 1B, 및 2를 참조한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "성숙 미오스타틴"은 전장 성숙 미오스타틴, 뿐만 아니라 생물학적 활성을 유지하는 전장 성숙 미오스타틴의 단편 둘 다를 지칭할 수 있다. 예시적인 성숙 미오스타틴 서열, 그의 변이체, 및 성숙 미오스타틴을 생성시키는 방법이 관련 분야에 널리 공지되어 있고, 본원에 더욱 상세하게 기재된다.

[0092] 용어 "프로-미오스타틴", 일명 "프로GDF8"은 동종이량체의 각각의 분자가 카르복실 말단의 성숙 미오스타틴 도메인에 공유결합으로 결합된 아미노 말단의 프로도메인을 포함하는 디술피드-연결 동종이량체를 포함하는 성숙 미오스타틴의 불활성 전구체를 지칭한다. 한 실시양태에서, "프로-미오스타틴"은 프로단백질 컨버타제, 또는 BMP/톨로이드 패밀리로부터의 프로테아제 중 어느 하나에 의해 절단되지 않았다. 예시적인 프로-미오스타틴 서열, 그의 변이체, 및 프로-미오스타틴을 생성시키는 방법이 관련 분야에 널리 공지되어 있고, 본원에 더욱 상세하게 기재된다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "잠재성-미오스타틴"은 동종이량체의 각각의 분자가 카르복실 말단의 성숙 미오스타틴 도메인에 비-공유결합으로 결합된 아미노 말단의 프로도메인을 포함하는 디술피드-연결 동종이량체를 포함하는 성숙 미오스타틴의 불활성 전구체를 지칭한다. 한 실시양태에서, "잠재성-미오스타틴"은 프로단백질 컨버타제에 의해 절단되었지만 BMP/톨로이드 패밀리로부터의 프로테아제에 의해 절단되지 않은 프로-미오스타틴으로부터 생성된다. 또 다른 실시양태에서, 프로도메인 및 카르복실 말단의 성숙 미오스타틴 도메인을 시험관 내에서 조합하고 이들을 정확하게 폴딩되게 함으로써 "잠재성-미오스타틴"이 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sengle et al., J. Biol. Chem., 286(7):5087-5099, 2011]을 참조한다. 예시적인 잠재성-미오스타틴 서열, 그의 변이체, 및 잠재성-미오스타틴을 생성시키는 방법이 관련 분야에 널리 공지되어 있고, 본원에 더욱 상세하게 기재된다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "프로/잠재성-미오스타틴"은 프로-미오스타틴, 잠재성-미오스타틴, 또는 프로-미오스타틴 및 잠재성-미오스타틴 둘 다를 지칭한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 프로-미오스타틴에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 잠재성-미오스타틴에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는프로-미오스타틴 및 잠재성-미오스타틴에 결합한다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "순수한 프로-미오스타틴" 또는 "순수한 프로-GDF8"은 다른 형태의 미오스타틴, 예컨대 잠재성-미오스타틴 및 성숙 미오스타틴이 없거나 또는 실질적으로 없는 프로-미오스타틴을 포함하는 조성물을 지칭한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 순수한 프로-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. 달리 말하면, 이러한 항체는 다른 형태의 미오스타틴, 잠재성-미오스타틴 및 성숙 미오스타틴이 결여된 조성물 내의 프로-미오스타틴에 결합한다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "프로단백질 컨버타제 절단 부위"는 프로-미오스타틴이 프로단백질 컨버타제에 의해 절단되는 부위를 지칭한다. 한 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위는 프로도메인과 생물학적으로 활성인 도메인 또는 성숙 미오스타틴 사이의 보존된 RXXR 부위이다. 예를 들어, 도 1A, 1B, 및 2를 참조한다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "BMP/톨로이드 프로테아제 패밀리 절단 부위"는 잠재성 미오스타틴이 BMP/톨로이드 프로테아제 패밀리 구성원에 의해 절단되는 부위를 지칭한다. 한 실시양태에서, BMP/톨로이드 프로테아제 패밀리 구성원은 mTLL-2이다. 예를 들어, 도 1A, 1B, 및 2를 참조한다.

[0098] *프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 항체*

[0099] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 특정 프로/잠재성-미오스타틴-특이적 항체 (예를 들어, 본원에 Ab1로 지칭되는 항체)가 프로/잠재성-미오스타틴의 성숙 미오스타틴으로의 단백질분해적 활성화를 방지하였다는 뜻밖의 발견을 기초로 한다. 또한, 이러한 항체를 사용하여 미오스타틴 활성화를 억제하는 것이 덱사메타손 및 캐스팅에 의해 유도된 근육 위축 마우스 모델 둘 다에서 근육 질량을 증가시키는데 효과적이었다. 본 개시내용의 측면은 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하고 프로/잠재성-미오스타틴의 성숙 미오스타틴으로의 단백질분해적 활성화를 억제하는 항체 (예를 들어, 항체 및 항원 결합 단편)을 제공한다.

[0100] 항체 (상호교환가능하게 복수 형태로 사용됨)는 이뮤노글로불린 분자의 가변 영역 내에 위치하는 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적으로 결합할 수 있는 이뮤노글로불린 분자이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 무손상 (예를 들어, 전장) 폴리클로날 또는 모노클로날 항체뿐만 아니라 그의 항원-결합 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')2, Fv), 단일쇄 (scFv), 그의 돌연변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 디아바디(diabody), 선형 항체, 단일쇄 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 필요한 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 형상의 이뮤노글로불린 분자 (항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체 및 공유결합으로 변형된 항체를 포함함)를 포괄한다. 항체는 임의 클래스의 항체 예컨대 IgD, IgE, IgG, IgA, 또는 IgM (또는 그의 서브클래스)를 포함하고, 항체는 임의의 특정 클래스일 필요가 없다. 그의 중쇄의 불변 도메인의 항체 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 클래스로 지정될 수 있다. IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM인, 이뮤노글로불린의 5종의 주요 클래스가 있고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 이뮤노글로불린 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 칭해진다. 상이한 이뮤노글로불린 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원 형상이 널리 공지되어 있다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같이, "단리된 항체"는 항원 특이성이 상이한 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭하도록 의도된다 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음). 그러나, 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원, 예컨대 다른 종으로부터의 프로/잠재성-미오스타틴 분자에 대한 교차반응성이 있을 수 있다. 또한, 단리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

[0102] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열 및 그의 단편으로부터 유래된 가변 및 불변 영역이 있는 항체를 포함하도록 의도된다. 본 개시내용의 인간 항체는, 예를 들어 CDR, 특히 CDR3 내에, 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해, 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프팅되어 있는 항체를 포함하도록 의도되지 않는다.

[0103] 용어 "에피토프"는 이뮤노글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 결정인자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 에피토프 결정인자는 화학적으로 활성인 일군의 표면 분자 예컨대 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 술포닐이고, 특정 실시양태에서, 특이적인 3차원 구조 특징 및/또는 특이적인 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체가 결합하는 항원 영역이다. 특정 실시양태에서, 항체가 단백질 및/또는 거대분자의 복합체 혼합물에서 그의 표적 항원을 우선적으로 인식할 때 이를 항원에 특이적으로 결합한다고 한다.

[0104] 본원에 기재된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 결합함으로써, 프로/잠재성-미오스타틴의 성숙 미오스타틴으로의 단백질분해적 활성화를 억제할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴의 단백질분해적 활성화를 적어도 20%, 예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 초과만큼 억제할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 항체는 프로단백질 컨버타제 (예를 들어, 푸린)에 의한 프로미오스타틴의 단백질분해적 절단을 적어도 20%, 예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 초과만큼 억제할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 항체는 톨로이드 프로테아제 (예를 들어, mTLL2)에 의한 프로미오스타틴 또는 잠재성 미오스타틴의 단백질분해적 절단을 적어도 20%, 예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 초과만큼 억제할 수 있다. 일상적인 방법에 의해, 예를 들어, 실시예 1 및 도 3에 기재된 바와 같은 웨스턴 블롯 분석에 의해 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 억제 활성을 측정할 수 있다. 그러나, 추가적인 방법이 프로/잠재성-미오스타틴의 단백질분해적 절단에 대한 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체

의 억제 활성을 측정하는데 사용될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 일부 실시양태에서, 프로/잠재성-미오스타틴 절단 (예를 들어, 프로단백질 컨버타제 및/또는 톨로이드 프로테아제에 의한 절단)이 억제 상수 (Ki)로서 반영될 수 있고, 이는 억제제 효능의 척도를 제공하고, 프로테아제 활성 (예를 들어, 프로단백질 컨버타제 또는 톨로이드 프로테아제의 활성)을 절반만큼 감소시키는데 필요한 억제제 (예를 들어, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체)의 농도이며, 효소 또는 기질 농도에 의존적이지 않다.

[0105] 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제는 (i) 프로단백질 컨버타제 절단 부위를 함유하는 단백질의 펩티드 결합을 가수분해하는 촉매 도메인, 및 (ii) 프로단백질 컨버타제 절단 부위가 있는 rTGF에 결합하는 결합 주머니를 포함한다. 본 개시내용에 따라 사용하기 위한 프로단백질 컨버타제의 예는, 비제한적으로, PCSK5/6, PACE4, PACE7 및 PACE3 (예를 들어, 푸린)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제는 인간, 원숭이 또는 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터)를 비제한적으로 포함하는 임의의 동물로부터 수득된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제는 PCSK5/6, PACE4, PACE7 및 PACE3 (예를 들어, 푸린)으로 이루어진 군으로부터 선택된 프로단백질 컨버타제에 대해 상동성이다. 예를 들어, 프로단백질 컨버타제는 PCSK5/6, PACE4, PACE7 또는 PACE3 (예를 들어, 푸린)에 대해 적어도 70% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 96% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 98% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 적어도 약 99.9% 동일할 수 있다.

[0107] 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위는 프로단백질 컨버타제 (예를 들어, PCSK5/6, PACE4, PACE7 및 PACE3)에 의해 절단될 수 있는 아미노 서열이다. 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위는 아미노산 서열 R-X-X-R (여기서 R은 아르기닌이고, X는 임의의 아미노산임)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위는 아미노산 서열 R-X-(K/R)-R (여기서 R은 아르기닌이고, K는 라이신이고, X는 임의의 아미노산임)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위는 아미노산 서열 R-V-R-R (서열식별번호: 57) (여기서 R은 아르기닌이고, V는 발린임)을 포함한다. 인간, 래트, 마우스, 및 시노몰구스 미오스타틴에 대한 예시적인 프로단백질 컨버타제 절단 부위가 서열식별번호: 52-55에서 볼드체로 제시된다. 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위는 아미노산 서열 RSRR (서열식별번호: 56)를 포함한다.

[0108] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 사용하기 위한 톨로이드 프로테아제는, 비제한적으로, BMP-1, mTLL-1 및 mTLL-2를 포함한다. 톨로이드 프로테아제는 인간, 원숭이, 또는 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터)를 포함하는 임의의 동물로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 톨로이드 프로테아제는 BMP-1, mTLL-1 및 mTLL-2로 이루어진 군으로부터 선택된 톨로이드 프로테아제에 대해 상동성이다. 예를 들어, 톨로이드 프로테아제는 BMP-1, mTLL-1 및 mTLL-2에 대해 적어도 70% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 96% 동일하거나, 적어도 97% 동일하거나, 적어도 98% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 적어도 99.5% 동일하거나, 또는 적어도 약 99.9% 동일할 수 있다.

[0109] 일부 실시양태에서, 톨로이드 프로테아제 절단 부위는 톨로이드 (예를 들어, BMP-1, mTLL-1 및 mTLL-2)에 의해 절단될 수 있는 아미노 서열이다. 인간, 래트, 마우스, 및 시노몰구스 미오스타틴에 대한 예시적인 톨로이드 프로테아제 절단 부위가 서열식별번호: 52-55에서 밑줄로 제시된다. 일부 실시양태에서, 톨로이드 절단 부위는 아미노산 서열 QR (여기서 Q는 글루타민이고, R은 아르기닌임)을 포함한다.

[0110] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 결합함으로써, 미오스타틴 활성을 억제할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 항체는 미오스타틴 신호전달을 적어도 20%, 예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 그 초과만큼 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 일상적인 방법에 의해, 예를 들어, 실시예 1에 기재된 바와 같은 미오스타틴 활성화 검정법을 사용하여 미오스타틴 신호전달의 억제를 측정할 수 있다. 그러나, 추가적인 방법이 미오스타틴 신호전달 활성을 측정하는데 사용될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0111] 예를 들어, 프로단백질 컨버타제 및/또는 톨로이드 프로테아제에 의한 미오스타틴의 단백질분해적 절단의 정도를 임의의 적절한 방법을 사용하여 측정 및/또는 정량화할 수 있음을 이해하여야 한다. 일부 실시양태에서, 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA)을 사용하여 미오스타틴의 단백질분해적 절단의 정도를 측정 및/또는 정량화한다. 예를 들어, ELISA를 사용하여 방출된 성장 인자 (예를 들어, 성숙 미오스타틴)의 수준을 측정할 수 있다. 또 다른 예로서, 프로미오스타틴, 잠재성 미오스타틴 및/또는 성숙 미오스타틴에 특이적으로 결합하는 항체를 특정 형태의 미오스타틴 (예를 들어, 프로/잠재성/성수형-미오스타틴)의 수준을 측정하는 ELISA에서 사용하여, 미오스타틴의 단백질분해적 절단의 정도를 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역침전에 이어서 트립신분해 펩티드의 SDS-PAGE 또는 질량 분광법, 형광 이방성-기반 기술, FRET 검정법, 수소-중수소 교환 질량 분광법, 및

/또는 NMR 분광학을 사용하여 미오스타틴의 단백질분해적 절단의 정도를 측정 및/또는 정량화한다.

[0112] 일부 실시양태에서, 항체 (일명 이뮤노글로불린)은 각각 약 25 kDa의 2개의 경쇄 (L) 및 각각 약 50 kDa의 2개의 중쇄 (H)로 구성된 사량체성 글리코실화 단백질이다. 람다 및 카파로 명명된 2종 유형의 경쇄가 항체에서 발견될 수 있다. 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 A, D, E, G, 및 M의 5종의 주요 클래스로 지정될 수 있고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소타입), 예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, 및 IgA_2로 추가로 분류될 수 있다. 각각의 경쇄는 전형적으로 N-말단 가변 (V) 도메인 (V_L) 및 불변 (C) 도메인 (C_L)을 포함한다. 각각의 중쇄는 전형적으로 N-말단 V 도메인 (V_H), 3개 또는 4개의 C 도메인 (C_H1-3), 및 힌지 영역을 포함한다. V_H에 가장 인접한 C_H 도메인이 C_H1로 지정된다. V_H 및 V_L 도메인은 3개의 초가변 서열 영역 (상보성 결정 영역, CDR)에 대한 스캐폴드를 형성하는, 프레임워크 영역 (FR1, FR2, FR3, 및 FR4)으로 칭해지는 4개의 비교적 보존된 서열로 이루어진다. CDR은 항체와 항원의 특이적인 상호작용을 담당하는 잔기의 대부분을 함유한다. CDR은 CDR1, CDR2, 및 CDR3으로 지칭된다. 따라서, 중쇄 상의 CDR 구성성분은 CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3으로 지칭되는 한편, 경쇄 상의 CDR 구성성분은 CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3으로 지칭된다. 전형적으로 CDR은 문헌 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.]에 기재된 바와 같이 카바트 CDR을 지칭한다. 항원 결합 부위를 특징화하는 또 다른 표준은 코티아(Chothia)가 기재한 바와 같은 초가변 루프를 지칭하는 것이다. 예를 들어, 문헌 [Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817]; 및 [Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14:4628-4638]을 참조한다. 또 다른 표준은 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어가 사용하는 AbM 정의이다. 일반적으로, 예를 들어, 문헌 [Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S, and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)]을 참조한다. 카바트 CDR과 관련하여 기재된 실시양태는 대안적으로 코티아 초가변 루프 또는 AbM-정의 루프와 관련된 유사한 기재된 관계, 또는 이러한 방법 중 임의의 것의 조합을 사용하여 실행될 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 및 이러한 항체를 코딩하는 본 개시내용의 핵산 분자는 표 1에 제시된 CDR 아미노산 서열을 포함한다.

[0114] 표 1.

항체	CDRH1 (SEQ ID NOs: 1-3)	CDRH2 (SEQ ID NOs: 4-9)	CDRH3 (SEQ ID NOs: 10-11)	CDRL1 (SEQ ID NOs: 12-17)	CDRL2 (SEQ ID NOs: 18-21)	CDRL3 (SEQ ID NOs: 22-23)
Ab1 카바트: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 2)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 4) ISYDGSN (SEQ ID NO: 5)	DLLVRFLEWSHYYGMDV (SEQ ID NO: 10)	SGSSSNIGSNTVH (SEQ ID NO: 12) SSNIGSNT (SEQ ID NO: 13)	SDNQRPS (SEQ ID NO: 18) SDN (SEQ ID NO: 19)	AAWDDSLNGV (SEQ ID NO: 22)
Ab3 카바트: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSYGMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGSIKYYADSVKG (SEQ ID NO: 6) ISYDGSI (SEQ ID NO: 7)	DLLVRFLEWSHKYGMDV (SEQ ID NO: 11)	SGSTSNIGSNTVH (SEQ ID NO: 14) TSNIGSNT (SEQ ID NO: 15)	SDDQRPS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDESLNGV (SEQ ID NO: 23)
Ab5 카바트: IMGT:	SSYGMH (SEQ ID NO: 1) GFAFSSYGMH (SEQ ID NO: 3)	VISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 8) ISYDGNN (SEQ ID NO: 9)	DLLVRFLEWSHKYGMDV (SEQ ID NO: 11)	SGSSSNIGGNTVH (SEQ ID NO: 16) SSNIGGNT (SEQ ID NO: 17)	SDDQRPS (SEQ ID NO: 20) SDD (SEQ ID NO: 21)	AAWDESLNGV (SEQ ID NO: 23)

[0115]

[0116] 표 1에서, CDRH3 및 CDRL3의 단일 서열은 카바트 및 IMGT를 반영한다.

[0117] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 결합제 (예를 들어, 항체)는 표 1에 제시된 항체 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같은 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 또는 CDRL3, 또는 이들의 조합을 포함하는 임의의 항체 (항원 결합 단편 포함)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-프로/잠재성-미오스타틴 결

합제는 표 1에 제시된 항체 중 어느 하나의 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 포함한다. 본 개시내용은 표 1에 제시된 항체 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같은 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 또는 CDRL3을 포함하는 분자를 코딩하는 임의의 핵산 서열을 또한 포함한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화성에서 특히 중요한 역할을 할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 결합제, 또는 그의 핵산 분자는 적어도 표 1에 제시된 바와 같은 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3을 포함할 수 있다.

[0118] 본 개시내용의 측면은 프로/잠재성-미오스타틴 단백질에 결합하고 6개의 상보성 결정 영역 (CDR): CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 및 CDRL3을 포함하는 모노클로날 항체 또는 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0119] 일부 실시양태에서, CDRH1은 서열식별번호: 1-3 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDRH2는 서열식별번호: 4-9 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDRH3은 서열식별번호: 10-11 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. CDRL1은 서열식별번호: 12-17 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDRL2는 서열식별번호: 18-21 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDRL3은 서열식별번호: 22-23 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0120] 일부 실시양태에서 (예를 들어, 표 1에 제시된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 Ab1에 대해서와 같이), CDRH1은 서열식별번호: 1 또는 2에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH2는 서열식별번호: 4 또는 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH3은 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL1은 서열식별번호: 12, 또는 13에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL2는 서열식별번호: 18 또는 19에 제시된 바와 같은 서열을 포함하며, CDRL3은 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 결합한다.

[0121] 일부 실시양태에서 (예를 들어, 표 1에 제시된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 Ab3에 대해서와 같이), CDRH1은 서열식별번호: 1 또는 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH2는 서열식별번호: 6 또는 7에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH3은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL1은 서열식별번호: 14, 또는 15에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL2는 서열식별번호: 20 또는 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하며, CDRL3은 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 결합한다.

[0122] 일부 실시양태에서 (예를 들어, 표 1에 제시된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 Ab5에 대해서와 같이), CDRH1은 서열식별번호: 1 또는 3에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH2는 서열식별번호: 8 또는 9에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRH3은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL1은 서열식별번호: 16, 또는 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, CDRL2는 서열식별번호: 20 또는 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하며, CDRL3은 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 결합한다. 일부 예에서, 임의의 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 결합제 (예를 들어, 항체)는 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, 및/또는 CDRL3과 실질적으로 유사한 하나 이상의 CDR (예를 들어, CDRH 또는 CDRL) 서열이 있는 임의의 항체 (항원 결합 단편 포함)를 포함한다. 예를 들어, 항체는 서열식별번호: 1-23 중 어느 하나 내의 상응하는 CDR 영역에 비교하여 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 변이를 함유하는 하나 이상의 표 1에 제시된 바와 같은 CDR 서열 (서열식별번호: 1-23)을 포함할 수 있다. 표 1에 열거된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 대한 완전한 아미노산 및 핵산 서열이 하기에서 제공된다.

[0123] 중쇄 가변 영역 - Ab1 모체

QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYY
GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATG
GAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGCA
CTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 38)

[0124]

[0125] 중쇄 가변 영역 - Ab2 배선

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYY
GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATG
GAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGCA
CTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 39)

[0126]

[0127] 중쇄 가변 영역 - Ab3 모체

QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
IKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKYG
MDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 26)
CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATG
GAAGTATCAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGCA
CAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 40)

[0128]

[0129] 중쇄 가변 영역 - Ab4 배선

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHKY
GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 27)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATG
GAAGTATCAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGCA
CAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 41)

[0130]

[0131] 중쇄 가변 영역 - Ab5 모체

QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
NNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHK
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 28)
CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATG
GAAATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGCA
CAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 42)

[0132]

[0133] 중쇄 가변 영역 - Ab6 배선

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
NNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHK
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 29)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATG
GAAATAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTGGTGCGATTTTTGGAGTGGTCGCA
CAAGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 43)

[0134]

[0135] 경쇄 가변 영역 - Ab1 모체

QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTC ACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGT ACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATAATCAGC GCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC CCTGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCA TGGGATGACAGCCTGAATGGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 44)

[0136]

[0137] 경쇄 가변 영역 - Ab2 배선

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTC ACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGT ACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATAATCAGC GCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC CCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCA TGGGATGACAGCCTGAATGGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 45)

[0138]

[0139] 경쇄 가변 영역 - Ab3 모체

QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 32)

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTC ACCATCTCTTGTTCTGGAAGCACCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGT ACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGC GCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC CCTGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCA TGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 46)

[0140]

[0141] 경쇄 가변 영역 - Ab4 배선

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTC ACCATCTCTTGTTCTGGAAGCACCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCCACTGGT ACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGC GCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC CCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCA TGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 47)

[0142]

[0143] 경쇄 가변 영역 - Ab5 모체

QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTC ACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCCACTGGT ACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGC GCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC CCTGGTCATCAGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCA TGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 48)

[0144]

[0145] 경쇄 가변 영역 - Ab6 배선

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDDQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 35)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTC ACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGAAATACTGTCCACTGGT ACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTGATGATCAGC GCCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC CCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCA TGGGATGAGAGCCTGAATGGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 49)

[0146]

[0147] Ab2-중쇄

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYY
GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
G (SEQ ID NO: 50)

[0148]

[0149] Ab2-경쇄

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVLGQPKA
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 51)

[0150]

[0151] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 서열식별번호: 24-29 중 어느 하나의 중쇄 가변 도메인 또는 서열식별번호: 30-35 중 어느 하나의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 임의의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 서열식별번호: 24 및 30; 25 및 31; 26 및 32; 27 및 33; 28 및 34; 또는 29 및 35의 중쇄 가변 및 경쇄 가변 쌍을 포함하는 임의의 항체를 포함한다.

[0152] 본 개시내용의 측면은 본원에 기재된 것들 중 임의의 것에 대해 상동성인 중쇄 가변 및/또는 경쇄 가변 아미노산 서열을 갖는 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 서열식별번호: 24-29 중 임의의 것의 중쇄 가변 서열 또는 서열식별번호: 30-35 중 어느 하나의 경쇄 가변 서열에 대해 적어도 75% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%) 동일한 중쇄 가변 서열 또는 경쇄 가변 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상동성 중쇄 가변 및/또는 경쇄 가변 아미노산 서열은 본원에 제공된 CDR 서열 중 임의의 것 내에서 다르지 않다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 서열 변이의 정도 (예를 들어, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%)는 임의의 본원에 제공된 CDR 서열을 배제한 중쇄 가변 및/또는 경쇄 가변 서열 내에서 발생할 수 있다.

[0153] 2개의 아미노산 서열의 "퍼센트 동일성"은 문헌 [Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993]에서와 같이 변형된 문헌 [Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990]의 알고리즘을 사용하여 결정된다. 이러한 알고리즘은 문헌 [Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입된다. XBLAST 프로그램, 스코어=50, 워드 길이=3으로 BLAST 단백질 검색을 수행하여, 관심 단백질 분자에 대해 상동성인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 2개의 서열 사이에 갭이 존재하는 경우, 갭(Gapped) BLAST를 문헌 [Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997]에 기재된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 갭 BLAST 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다.

[0154] 일부 실시양태에서, 프로/잠재성-미오스타틴과 상호작용하는데 잔기가 수반되지 않을 것 같은 위치에서 CDR 또는 프레임워크 서열 내로 보존적 돌연변이가 도입될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 치환이 이루어지는 단백질의 상대적 전하 또는 크기 특성을 변경시키지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 관련 분야의 통상의 기술자에게 공지된 폴리펩티드 서열을 변경시키는 방법, 예컨대 이러한 방법이 편찬되어 있는 참고문헌, 예를 들어 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989], 또는 [Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York]에서 발견되는 것들에 따라 변이체가 제조될 수 있다. 아미노산의 보존적 치환은 하기 군 내의 아미노산

사이에서 이루어진 치환을 포함한다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D.

[0155] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 바람직한 성질을 항체에 부여하는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 천연 IgG4 mAb로 발생하는 것으로 공지된, Fab-아암 교환으로 인한 잠재적인 합병증을 피하기 위해, 본원에 제공된 항체는 세린 228 (EU 번호매김; 카바트 번호매김에서의 잔기 241)이 프롤린으로 변환되어 IgG1-유사 (CPPCP (서열식별번호: 58)) 힌지 서열을 생성하는 안정화 'Adair' 돌연변이를 포함할 수 있다 (Angal S., *et al.*, "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," *Mol Immunol* 30, 105-108; 1993). 따라서, 임의의 항체가 안정화 'Adair' 돌연변이 또는 아미노산 서열 CPPCP (서열식별번호: 58)를 포함할 수 있다.

[0156] 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 결합제는 임의적으로 항체 불변 영역 또는 그의 일부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, V_L 도메인이 그의 C-말단 끝부분에서 경쇄 불변 도메인 예컨대 Cκ 또는 CΛ에 부착될 수 있다. 유사하게, V_H 도메인 또는 그의 일부분이 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 및 임의의 이소타입 서브클래스와 같은 중쇄의 전체 또는 일부분에 부착될 수 있다. 항체는 적절한 불변 영역을 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 따라서, 본 개시내용의 범주 내의 항체는 임의의 적절한 불변 영역과 조합된 V_H 및 V_L 도메인 또는 그의 항원 결합 부분을 포함한다.

[0157] 특정 실시양태에서, V_H 및/또는 V_L 도메인이 배선 서열로 복귀될 수 있고, 예를 들어, 이러한 도메인의 FR이 배선 세포에 의해 생산된 것에 필적하도록 통상적인 분자생물학 기술을 사용하여 돌연변이된다. 예를 들어, V_H 및/또는 V_L 도메인이 각각 IgHV3-30 (서열식별번호: 36) 및/또는 IgLV1-44 (서열식별번호: 37)의 배선 서열로 복귀될 수 있다. V_H 및/또는 V_L 도메인 중 임의의 것이 임의의 적절한 배선 서열로 복귀될 수 있음을 이해하여야 한다. 다른 실시양태에서, FR 서열은 컨센서스 배선 서열로부터 분기되어 유지된다.

IgHV3-30

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 36)

IgLV1-44

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNG (SEQ ID NO: 37)

[0158]

[0159] 일부 실시양태에서, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 또는 항원 결합 단편은 서열식별번호: 24-35에 제시된 항체의 프레임워크 영역을 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-프로-잠재성-미오스타틴 항체는 뮤린 항체이고, 뮤린 프레임워크 영역 서열을 포함한다.

[0160] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 비교적 높은 친화성으로, 예를 들어, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 이하 미만의 Kd로 프로/잠재성-미오스타틴에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 5 pM 내지 500 nM, 예를 들어, 50 pM 내지 100 nM, 예를 들어, 500 pM 내지 50 nM의 친화성으로 프로/잠재성-미오스타틴에 결합할 수 있다. 본 개시내용은 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것에 대해 임의의 본원에 기재된 항체와 경쟁하고 친화성이 50 nM 이하 (예를 들어, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 500 pM 이하, 50 pM 이하, 또는 5 pM 이하)인 항체 또는 항원 결합 단편을 또한 포함한다. 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 친화성 및 결합 동역학을 바이오센서 기술 (예를 들어, 옥테트(OCTET) 또는 비아코어(BIACORE))을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 적절한 방법을 사용하여 테스트할 수 있다.

[0161] 표적 항원에 "특이적으로 결합하는" 항체는 비-표적 항원에 결합하는 것보다 더 큰 친화성, 결합도로, 더욱 용이하게, 및/또는 더 긴 기간 동안 표적 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴의 톨로이드 절단 부위에서 또는 그 부근에서, 또는 톨로이드 도킹 부위에서 또는 그 부근에서 결합한다. 일부 실시양태에서, 톨로이드 절단 부위 또는 톨로이드 도킹 부위로부터 아미노산 잔기 15개 이하 이내에서 결

합하면 항체가 톨로이드 절단 부위 부근에서 또는 톨로이드 도킹 부위 부근에서 결합하는 것이다. 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 톨로이드 절단 부위 또는 톨로이드 도킹 부위로부터 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 이내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 GDF8의 톨로이드 절단 부위에서 또는 그 부근에서 결합한다. 예를 들어, 항체는 서열식별번호: 62 PKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHAT (서열식별번호: 62)에 기재된 바와 같은 아미노산 서열에 결합할 수 있다. 다른 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴의 프로단백질 컨버타제 절단 부위에서 또는 그 부근에서, 또는 프로단백질 컨버타제 도킹 부위에서 또는 그 부근에서 결합한다. 일부 실시양태에서, 프로단백질 컨버타제 절단 부위 또는 프로단백질 컨버타제 도킹 부위로부터 아미노산 잔기 15개 이하 이내에서 결합하면 항체가 프로단백질 컨버타제 절단 부위 부근에서 또는 프로단백질 컨버타제 도킹 부위 부근에서 결합하는 것이다. 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 프로단백질 컨버타제 절단 부위 또는 프로단백질 컨버타제 도킹 부위로부터 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 이내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 GDF8의 프로단백질 컨버타제 절단 부위에서 또는 그 부근에서 결합한다. 예를 들어, 항체는 서열식별번호: 63 GLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRC (서열식별번호: 63)에 기재된 바와 같은 아미노산 서열에 결합할 수 있다.

[0162] 한 예에서, 본원에 기재된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 다른 형태의 미오스타틴 및/또는 TGFβ 성장 인자 패밀리의 다른 구성원에 비교하여 프로/잠재성-미오스타틴에 특이적으로 결합한다. TGFβ 성장 인자 패밀리의 구성원은, 비제한적으로, AMH, ARTN, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, GDF1, GDF10, GDF11, GDF15, GDF2, GDF3, GDF3A, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDNF, INHA, INHBA, INHBB, INHBC, INHBE, LEFTY1, LEFTY2, NODAL, NRTN, PSPN, TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 단백질을 포함한다. 이러한 항체는 TGFβ 성장 인자 패밀리의 다른 구성원에 비교하여 훨씬 더 높은 친화성으로 프로/잠재성-미오스타틴에 결합할 수 있다 (예를 들어, 적어도 2배, 5배, 10배, 50배, 100배, 200배, 500배, 또는 1,000배 더 높음). 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 TGFβ 성장 인자 패밀리의 다른 구성원에 비교하여 적어도 1,000배 더 큰 친화성으로 프로/잠재성-미오스타틴에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 GDF11 또는 성숙 미오스타틴 중 하나 이상의 형태에 비교하여 훨신 더 높은 친화성으로 프로/잠재성-미오스타틴에 결합할 수 있다 (예를 들어, 적어도 2배, 5배, 10배, 50배, 100배, 200배, 500배, 또는 1,000배 더 높음). 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 GDF11의 하나 이상의 형태 (예를 들어, 프로GDF11, 잠재성GDF11 또는 성숙 GDF11) 또는 성숙 미오스타틴에 비교하여 적어도 1,000배 더 큰 친화성으로 프로/잠재성-미오스타틴에 결합할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항체는 TGFβ 성장 인자 패밀리의 다른 구성원, 예컨대 프로/잠재성 GDF11에 비교하여 프로/잠재성-미오스타틴의 단백질분해적 절단 (예를 들어, 프로단백질 컨버타제 또는 톨로이드 프로테아제에 의한 절단)에 대해 훨씬 더 높은 억제 활성을 나타낼 수 있다 (예를 들어, 적어도 2배, 5배, 10배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1,000배 더 높음).

[0163] 일부 실시양태에서, 항체는 항원에 결합하지만, 이러한 항원을 혈장에서 효과적으로 제거하지는 않는다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항원 소거를 감소시킴으로써 혈장 내의 항원 농도가 증가될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 (예를 들어, 스위핑 항체)는 pH에 대해 민감성인 항원에 대한 친화성이 있다. 이러한 pH 민감성 항체는 중성 pH의 혈장 내의 항원에 결합할 수 있고, 산성 엔도솜에서는 항원으로부터 해리될 수 있으며, 따라서 항체-매개 항원 축적을 감소시키고/시키거나 혈장으로부터의 항원 소거를 촉진할 수 있다.

[0164] 본 개시내용의 측면은 스위핑 항체에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "스위핑 항체"는 중성 또는 생리학적 pH에서 pH-민감성 항원 결합 및 세포 표면 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 적어도 역치 수준의 결합 둘다가 있는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 중성 pH에서 신생아 Fc 수용체 FcRn에 결합한다. 예를 들어 스위핑 항체는 7.0 내지 7.6 범위의 pH에서 FcRn에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 항원 결합 부위에서 항원에 결합할 수 있고, 항체의 Fc 부분을 통해 세포 FcRn에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 그 후 내재화되어, 산성 엔도솜 내에서 항원을 방출할 수 있고, 이는 분해될 수 있다. 일부 실시양태에서, 더 이상 항원에 결합되지 않은 스위핑 항체는 그 후 세포에 의해 다시 혈청 내로 (예를 들어, 세포외배출에 의해) 방출될 수 있다.

[0165] 일부 실시양태에서, 혈관 내피 (예를 들어, 대상체의 것) 내의 FcRn은 스위핑 항체의 반감기를 연장시킨다. 일부 실시양태에서, 혈관 내피 세포는 스위핑 항체를 내재화시키고, 이는 일부 실시양태에서 항원 예컨대 미오스타틴 (예를 들어, 프로미오스타틴, 잠재성 미오스타틴 또는 프라이밍된 미오스타틴)에 결합되어 있다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 혈류 내로 다시 재순환된다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 그의 통상적인 대응물에 비교하여 반감기 (예를 들어, 대상체의 혈청 내에서의 반감기)가 증가된다. 일부 실시양태에서, 스위핑

항체의 통상적인 대응물은 스위핑 항체가 유래된 항체 (예를 들어, 통상적인 항체의 Fc 부분을 pH 7에서 더 큰 친화성으로 FcRn에 결합하도록 조작하기 전)를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 대상체의 혈청 내에서의 반감기가 그의 통상적인 대응물에 비교하여 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200% 또는 250% 더 길다.

[0166] 일부 실시양태에서, 스위핑 항체의 Fc 부분은 FcRn에 결합한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체의 Fc 부분은 pH 7.4에서 10^{-3} M 내지 10^{-8} M 범위의 Kd로 FcRn에 결합한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 pH 7.4에서 10^{-3} M 내지 10^{-7} M, 10^{-3} M 내지 10^{-6} M, 10^{-3} M 내지 10^{-5} M, 10^{-3} M 내지 10^{-4} M, 10^{-4} M 내지 10^{-8} M, 10^{-4} M 내지 10^{-7} M, 10^{-4} M 내지 10^{-6} M, 10^{-4} M 내지 10^{-5} M, 10^{-5} M 내지 10^{-8} M, 10^{-5} M 내지 10^{-7} M, 10^{-5} M 내지 10^{-6} M, 10^{-6} M 내지 10^{-8} M, 10^{-6} M 내지 10^{-7} M, 또는 10^{-7} M 내지 10^{-8} M 범위의 Kd로 FcRn에 결합한다. 일부 실시양태에서, FcRn은 스위핑 항체의 CH2-CH3 힌지 영역에 결합한다. 일부 실시양태에서, FcRn은 단백질 A 또는 단백질 G와 같은 영역에 결합한다. 일부 실시양태에서, FcRn은 FcγR과 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체 Fc 영역의 아미노산 잔기 AA가 FcRn에 결합하는데 요구된다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체 Fc 영역의 아미노산 잔기 AA가 FcRn에 결합하는 것에 영향을 미친다.

[0167] 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 더 큰 친화성으로 FcRn에 결합하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 pH 7.4에서 더 큰 친화성으로 FcRn에 결합하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, FcRn에 대한 스위핑 항체의 친화성이 증가되어 그의 약동학 (PK) 성질을 그의 통상적인 대응물에 비교하여 확장시킨다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 더 낮은 용량에서의 효능으로 인해 유해 반응을 덜 유발한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 덜 빈번하게 투여된다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체의 특정 조직 유형으로의 통과세포외배출이 증가된다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 태반-통과 전달의 효율을 강화한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 생산 비용이 덜 든다.

[0168] 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 더 낮은 친화성으로 FcRn에 결합하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 pH 7.4에서 더 낮은 친화성으로 FcRn에 결합하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, FcRn에 대한 스위핑 항체의 친화성이 감소되어 그의 약동학 (PK) 성질을 그의 통상적인 대응물에 비교하여 단축시킨다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 영상화 및/또는 방사성 면역요법을 위해 더욱 신속하게 소거된다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 자가면역 질환의 치료로서의 내인성 병원성 항체의 소거를 촉진한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 물질 태아-특이적 항체의 태반-통과 전달에 의해 야기될 수 있는 유해한 임신 결과의 위험을 감소시킨다.

[0169] 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 중성 또는 생리학적 pH (예를 들어, pH 7.4)에 비교하여 낮은 pH에서 항원에 대한 친화성이 감소된다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 생리학적 pH (예를 들어, pH 7.4)에 비교하여 산성 pH (예를 들어 5.5 내지 6.5 범위의 pH)에서 항원에 대한 친화성이 감소된다. 임의의 본원에 제공된 항체가 pH 변화에 따라 항원으로부터 해리되도록 조작될 수 있다는 것을 이해하여야 한다 (예를 들어, pH 민감성 항체). 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 스위핑 항체는 pH에 의존적으로 항원에 결합하도록 조작된다. 일부 실시양태에서,, 본원에 제공된 스위핑 항체는 pH에 의존적으로 FcRn에 결합하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 스위핑 항체는 세포내이입에 의해 내재화된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 스위핑 항체는 FcRn 결합에 의해 내재화된다. 일부 실시양태에서, 세포내이입된 스위핑 항체는 엔도솜에서 항원을 방출한다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 다시 세포 표면으로 재순환된다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 세포에 부착되어 남는다. 일부 실시양태에서, 세포내이입된 스위핑 항체는 다시 혈장으로 재순환된다. 임의의 본원에 제공된 항체의 Fc 부분이 상이한 FcRn 결합 활성을 갖도록 조작될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 일부 실시양태에서, FcRn 결합 활성이 스위핑 항체에 의한 항원의 소거 시간에 영향을 미친다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 장기-작용 또는 신속-작용 스위핑 항체일 수 있다.

[0170] 일부 실시양태에서, 통상적인 치료 항체를 스위핑 항체로 전환시키는 것은 유효 용량을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 통상적인 치료 항체를 스위핑 항체로 전환시키는 것은 유효 용량을 적어도 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99% 만큼 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 통상적인 치료 항체를 스위핑 항체로 전환시키는 것은 유효 용량을 적어도 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 8배, 10배, 15배, 20배, 50배 또는 100배만큼 감소시킨다.

[0171] 일부 실시양태에서, 치료법에 대한 스위핑 항체의 적합한 용량을 선택하는 것은 경험적으로 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 높은 용량의 스위핑 항체가 FcRn을 포화시켜, 내재화되지 않으면서 혈청에서 항원을 안정화

시키는 항체를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 낮은 용량의 스위핑 항체가 치료적으로 효과적이지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 스위핑 항체는 1일에 1회, 1주에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회, 4주에 1회, 6주에 1회, 8주에 1회, 10주에 1회, 12주에 1회, 16주에 1회, 20주에 1회, 또는 24주에 1회 투여된다.

[0172] 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 스위핑 항체이도록 변형 또는 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 임의의 적절한 방법을 사용하여 임의의 본원에 제공된 항체를 스위핑 항체로 전환시킬 수 있다. 예를 들어, 스위핑 항체를 제조하는 적절한 방법이 이전에 문헌 [Igawa *et al.*, (2013) "Engineered Monoclonal Antibody with Novel Antigen-Sweeping Activity In Vivo," *PLoS ONE* 8(5): e63236]; 및 [Igawa *et al.*, "pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality," *Biochimica et Biophysica Acta* 1844 (2014) 1943-1950]에 기재된 바 있고, 이들 각각의 내용은 이에 의해 참고로 포함된다. 그러나, 본원에 제공된 바와 같은 스위핑 항체를 제조하는 방법이 제한적인 것으로 의도되지 않다는 것을 이해하여야 한다. 따라서, 스위핑 항체를 제조하는 추가적인 방법이 본 개시내용의 범주 내에 속한다.

[0173] 본 개시내용의 일부 측면은 임의의 본원에 제공된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 친화성 (예를 들어, Kd로 표현되는 바와 같은 친화성)이 pH 변화에 대해 민감하다는 인식을 기초로 한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 비교적 높은 pH (예를 들어, 7.0-7.4 범위의 pH)에 비교하여 비교적 낮은 pH (예를 들어, 4.0-6.5 범위의 pH)에서 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것의 Kd가 증가된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 pH가 4.0 내지 6.5일 때 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것의 Kd가 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6}M, 10^{-7} M, 10^{-8} M부터의 범위이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 pH가 7.0 내지 7.4 범위일 때 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것의 Kd가 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M부터의 범위이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것의 Kd가 7.0 내지 7.4의 pH에 비교하여 4.0 내지 6.5의 pH에서 적어도 2배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 500배, 적어도 1000배, 적어도 5000배, 또는 적어도 10000배 더 크다.

[0174] 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 64에 기재된 바와 같은 아미노산 서열 내의 에피토프에 특이적으로 결합하지 않는 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 프로/잠재성-미오스타틴 항체는 국제 특허 출원 번호 PCT/JP2015/006323 (2015년 12월 18일에 출원됨)을 기초로 하는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/098357 (2016년 6월 23일에 공개됨)의 표 2a, 11a, 11b, 또는 13에 기재된 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 프로/잠재성-미오스타틴 항체는 국제 특허 출원 번호 PCT/JP2015/006323 (2015년 12월 18일에 출원됨)을 기초로 하는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/098357 (2016년 6월 23일에 공개됨)의 표 2a, 11a, 11b, 또는 13에 기재된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 것에 대해 경쟁하지 않거나 또는 교차-경쟁하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 프로/잠재성-미오스타틴 항체는 국제 특허 출원 번호 PCT/JP2015/006323 (2015년 12월 18일에 출원됨)을 기초로 하는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/098357 (2016년 6월 23일에 공개됨)의 표 2a, 11a, 11b, 또는 13에 기재된 VH 및 VL 쌍을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 프로/잠재성-미오스타틴 항체는 국제 특허 출원 번호 PCT/JP2015/006323 (2015년 12월 18일에 출원됨)을 기초로 하는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/098357 (2016년 6월 23일에 공개됨)의 표 2a, 11a, 11b, 또는 13에 기재된 VH 및 VL 쌍을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 것에 대해 경쟁하지 않거나 또는 교차-경쟁하지 않는다.

[0175] *폴리펩티드*

[0176] 본 개시내용의 일부 측면은 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 28, 및 서열식별번호: 29로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 가변 중쇄 도메인이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 28, 또는 서열식별번호: 29에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 적어도 75% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%) 동일하다.

[0177] 본 개시내용의 일부 측면은 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 34, 및 서열식별번호: 35로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 가변 경쇄 도메인이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 34, 또는 서열식별번호: 35에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 적어도 75% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%) 동일하다.

[0178] *항-프로/잠재성-미오스타틴 항체와 경쟁하는 항체*

[0179] 본 개시내용의 측면은 임의의 본원에 제공된 항체와 경쟁하거나 교차-경쟁하는 항체에 관한 것이다. 항체와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "경쟁하다"는 제1 항체와 그의 에피토프의 결합의 결과가 제2 항체의 부재 하의 제1 항체의 결합에 비교하여 제2 항체의 존재 하에 검출가능하게 감소되도록, 제1 항체가 단백질 (예를 들어, 잠재성 미오스타틴)의 에피토프에 제2 항체의 결합과 충분히 유사한 방식으로 결합하는 것을 의미한다. 제2 항체가 그의 에피토프에 결합하는 것이 제1 항체의 존재 하에 또한 검출가능하게 감소되는 대안이 가능하지만, 그러할 필요는 없다. 즉, 제1 항체가 그의 각자의 에피토프에 결합하는 것을 제2 항체가 억제하지 않으면서 제2 항체가 그의 에피토프에 결합하는 것을 제1 항체가 억제할 수 있다. 그러나, 각각의 항체가 다른 항체가 그의 에피토프 또는 리간드에 결합하는 것을 동일하거나, 더 크거나 또는 더 적은 정도로 검출가능하게 억제하는 경우, 이러한 항체를 이들의 각자의 에피토프(들)에 결합하는 것에 대해 서로 "교차-경쟁한다"고 한다. 경쟁 및 교차-경쟁 항체 둘 다가 본 개시내용의 범주 내에 속한다. 이러한 경쟁 또는 교차-경쟁이 발생하는 메카니즘 (예를 들어, 입체 장애, 형상 변화, 또는 공통 에피토프 또는 그의 일부분에 결합하는 것)과 관계 없이, 통상의 기술자는 이러한 경쟁 및/또는 교차-경쟁 항체가 본원에 제공된 방법 및/또는 조성물용으로 포함되고, 이에 유용할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0180] 본 개시내용의 측면은 임의의 본원에 제공된 항체와 경쟁 또는 교차-경쟁하는 항체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 임의의 본원에 제공된 항체와 동일한 에피토프에서 또는 그 부근에서 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체가 에피토프로부터 아미노산 잔기 15개 이하 이내에서 결합하면 항체가 에피토프 부근에서 결합하는 것이다. 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 임의의 본원에 제공된 항체가 결합하는 에피토프로부터 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 이내에서 결합한다.

[0181] 또 다른 실시양태에서, 항체는 본원에 제공된 항원 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴) 중 임의의 것에 결합하는 것에 대해 10^{-6} M 미만의 항체와 단백질 사이의 평형 해리 상수 Kd로 경쟁 또는 교차-경쟁한다. 다른 실시양태에서, 항체는 본원에 제공된 항원 중 임의의 것에 결합하는 것에 대해 10^{-11} M 내지 10^{-6} M 범위의 Kd로 경쟁 또는 교차-경쟁한다.

[0182] 본 개시내용의 측면은 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것에 대해 임의의 본원에 제공된 항체와 경쟁하는 항체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 임의의 본원에 제공된 항체와 동일한 에피토프에서 프로/잠재성-미오스타틴에 결합한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴의 톨로이드 절단 부위 또는 그 부근에서 또는 톨로이드 도킹 부위 또는 그 부근에서 결합한다. 다른 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체는 프로/잠재성-미오스타틴의 프로단백질 컨버타제 절단 부위 또는 그 부근에서 또는 프로단백질 컨버타제 도킹 부위 또는 그 부근에서 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것에 대해 10^{-6} M 미만의 항체와 프로/잠재성-미오스타틴 사이의 평형 해리 상수 Kd로 경쟁 또는 교차-경쟁한다. 다른 실시양태에서, 임의의 본원에 제공된 항체와 경쟁하는 항체는 프로/잠재성-미오스타틴에 10^{-11} M 내지 10^{-6} M 범위의 Kd로 결합한다.

[0183] 본원에 제공된 항체 중 임의의 것을 임의의 적절한 방법을 사용하여 특징화할 수 있다. 예를 들어, 한 방법은 항원이 결합하는 에피토프를 식별하는 것, 또는 "에피토프 맵핑"이다. 예를 들어, 문헌 [Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999]의 제11장에 기재된 바와 같이, 항체-항원 복합체의 결정 구조의 해상, 경쟁 검정법, 유전자 단편 발현 검정법, 및 합성 펩티드-기반 검정법을 포함하여, 단백질 상의 에피토프의 위치를 맵핑 및 특징화하기 위한 다수의 적절한 방법이 있다. 추가적인 예에서, 에피토프 맵핑을 사용하여 항체가 결합하는 서열을 결정할 수 있다. 에피토프는 선형 에피토프일 수 있고, 즉 아미노산의 단일 신장물 내에 함유될 수 있거나, 또는 반드시 단일 신장물 (1차 구조 선형 서열) 내에 함유될 필요는 없을 수 있는 아미노산의 3차원 상호작용에 의해 형성된 입체형상 에피토프일 수 있다. 다양한 길이의 펩티드 (예를 들어, 적어도 4-6개의 아미노산의 길이)를 단리하거나 또는 합성하여 (예를 들어, 재조합에 의해), 항체와의 결합 검정법에 사용할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체가 결합하는 에피토프를 표적 항원 서열로부터 유래된 중첩 펩티드를 사용하여 항체에 의한 결합을 결정함으로써 체계적인 스크린에서 결정할 수 있다. 유전자 단편 발현 검정법에 따르면, 표적 항원을 코딩하는 오픈 리딩 프레임을 무작위로 또는 특이적인 유전적 구축에 의해 단편화하고, 발현된 항원 단편과 테스트될 항체의 반응성을 결정한다. 유전자 단편을, 예를 들어, PCR에 의해 생산한 후, 방사성 아미노산의 존재 하에 시험관 내에서 단백질로 전사 및 번역시킬 수 있다. 그 후, 방사성으로 표지된 항원 단편에 대한 항체의 결합을 면역침전 및 겔

전기영동에 의해 결정한다. 파지 입자의 표면 상에 디스플레이된 무작위 펩티드 서열의 대형 라이브러리 (파지 라이브러리)를 사용함으로써 특정 에피토프를 또한 식별할 수 있다. 대안적으로, 중첩되는 펩티드 단편의 규정된 라이브러리를 단순 결합 검정법에서 테스트 항체에 결합하는 것에 대해 테스트할 수 있다. 또 다른 추가적인 예에서, 항원 결합 도메인의 돌연변이유발, 도메인 스와핑 실험 및 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 에피토프 결합에 요구되고/되거나, 충분하고/하거나, 필수적인 잔기를 식별할 수 있다. 예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴 폴리펩티드의 다양한 단편이 밀접하게 관련되지만 항원성 면에서 별개인 단백질, 예컨대 TGFβ 단백질 패밀리의 또 다른 구성원 (예를 들어, GDF11)로부터의 서열로 교체된 (스와핑된) 표적 항원의 돌연변이체를 사용하여 도메인 스와핑 실험을 수행할 수 있다. 돌연변이체 프로/잠재성-미오스타틴에 대한 항체의 결합을 평가함으로써, 항체 결합에 대한 특정 항원 단편의 중요성을 평가할 수 있다.

[0184] 대안적으로, 동일한 항원에 결합하는 것으로 공지된 다른 항체를 사용하여 항체가 이러한 다른 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하여, 경쟁 검정법을 수행할 수 있다. 경쟁 검정법은 관련 분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 에피토프 맵핑 방법을 적용하여, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체가 본원에 기재된 바와 같은 프로/잠재성-미오스타틴 내의 특정 잔기/분절 중 하나 이상에 결합하는지 여부를 결정할 수 있다. 추가로, 항체와 프로/잠재성-미오스타틴 내의 이러한 정의된 잔기 중 하나 이상의 상호작용을 일상적인 기술에 의해 결정할 수 있다. 예를 들어, 결정 구조를 결정할 수 있고, 프로/잠재성-미오스타틴 내의 잔기와 항체 내의 하나 이상의 잔기 사이의 거리를 이에 따라 결정할 수 있다. 이러한 거리를 기초로, 프로/잠재성-미오스타틴 내의 특정 잔기가 항체 내의 하나 이상의 잔기와 상호작용할지 여부를 결정할 수 있다. 추가로, 적절한 방법, 예컨대 경쟁 검정법 및 표적 돌연변이유발 검정법을 후보 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체가 또 다른 표적 예컨대 돌연변이체 프로/잠재성-미오스타틴에 비교하여 프로/잠재성-미오스타틴에 우선적으로 결합하는 것을 결정하는데 적용할 수 있다.

[0185] *프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 항체의 생산*

[0186] 수많은 방법을 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 수득하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 방법을 사용하여 항체를 생산할 수 있다. 공지된 방법에 따라 하이브리도마의 생성에 의해 모노클로날 항체를 또한 생산할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-499] 참조). 그 후, 이러한 방식으로 생성된 하이브리도마를 표준 방법, 예컨대 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA) 및 표면 플라즈몬 공명 (예를 들어, 옥테트 또는 비아코어) 분석을 사용하여 스크리닝하여, 특정 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 하나 이상의 하이브리도마를 식별할 수 있다. 임의 형태의 특정 항원, 예를 들어, 재조합 항원, 천연 발생 형태, 그의 임의의 변이체 또는 단편, 뿐만 아니라 그의 항원성 펩티드 (예를 들어, 본원에 선형 에피토프로서 기재되거나 또는 입체형상 에피토프로서 스캐폴드 내에 있는 에피토프 중 임의의 것)을 면역원으로서 사용할 수 있다. 항체를 제조하는 한 예시적인 방법은 항체 또는 그의 단편 (예를 들어, scFv)을 발현하는 단백질 발현 라이브러리, 예를 들어, 파지 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다. 예를 들어, 라드너(Ladner) 등의 미국 특허 번호 5,223,409; 문헌 [Smith (1985) Science 228:1315-1317]; [Clackson et al. (1991) Nature, 352: 624-628]; [Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597WO92/18619]; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; 및 WO 90/02809에 파지 디스플레이 라이브러리가 기재되어 있다.

[0187] 디스플레이 라이브러리를 사용하는 것에 더하여, 특정 항원 (예를 들어, 프로미오스타틴)을 비-인간 동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 마우스, 햄스터 또는 래트를 면역화하는데 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 마우스이다.

[0188] 또 다른 실시양태에서, 모노클로날 항체가 비-인간 동물로부터 수득된 후, 적절한 재조합 DNA 기술을 사용하여 변형되고, 예를 들어, 키메라 항체이다. 키메라 항체를 제조하기 위한 다양한 접근법이 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985]; [Takeda et al., Nature 314:452, 1985], 캐빌리(Cabilly) 등의 미국 특허 번호 4,816,567; 보스(Boss) 등의 미국 특허 번호 4,816,397; 타나구치(Tanaguchi) 등의 유럽 특허 공개 EP171496; 유럽 특허 공개 0173494, 영국 특허 GB 2177096B를 참조한다.

[0189] 추가적인 항체 생산 기술에 대해, 문헌 [Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]을 참조한다. 본 개시내용은 항체의 임의의 특정 출처, 생산 방법, 또는 다른 특수 성질에 필수적으로 제한되지 않는다.

[0190] 본 개시내용의 일부 측면은 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는

진핵생물 또는 원핵생물 세포일 수 있다. 숙주 세포 내에 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있거나, 또는 염색체 외부에서 유지될 수 있다. 숙주 세포는 임의의 진핵생물 또는 원핵생물 세포, 예컨대 박테리아, 곤충, 진균류, 식물, 동물 또는 인간 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 진균류 세포는, 예를 들어, 사카로마이세스(Saccharomyces) 속의 것, 특히 에스. 세레비시아에(*S. cerevisiae*) 종의 것이다. 용어 "원핵생물"은 항체 또는 상응하는 이뮤노글로불린 쇄의 발현을 위한 DNA 또는 RNA 분자로 형질전환 또는 형질감염될 수 있는 모든 박테리아를 포함한다. 원핵생물 숙주는 그람 음성, 뿐만 아니라 그람 양성 박테리아, 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*), 에스. 티피무리움(*S. typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 포함할 수 있다. 용어 "진핵생물"은 효모, 고급 식물, 곤충 및 척추동물 세포, 예를 들어, 포유동물 세포, 예컨대 NSO 및 CHO 세포를 포함한다. 재조합 생산 절차에서 사용된 숙주에 따라, 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 항체 또는 이뮤노글로불린 쇄는 글리코실화될 수 있거나 또는 글리코실화되지 않을 수 있다. 항체 또는 상응하는 이뮤노글로불린 쇄는 최초의 메티오닌 아미노산 잔기를 또한 포함할 수 있다.

[0191] 일부 실시양태에서, 일단 벡터가 적합한 숙주 내로 혼입되었으면, 숙주가 뉴클레오티드 서열의 고수준 발현에 적절한 조건 하에 유지될 수 있고, 원하는 바와 같이, 이뮤노글로불린 경쇄, 중쇄, 경쇄/중쇄 이량체 또는 무손상 항체, 항원 결합 단편 또는 다른 이뮤노글로불린 형태의 수집 및 정제가 이어질 수 있다; 문헌 [Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979)]을 참조한다. 따라서, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터가 세포 내로 혼입되고, 차례로 이러한 세포가 항체 또는 항원 결합 단편을 생산한다. 추가로, 상기 언급된 숙주 세포를 포함하는 트랜스제닉 동물, 바람직하게는 포유동물이 항체 또는 항체 단편의 대규모 생산에 사용될 수 있다.

[0192] 형질전환된 숙주 세포를 최적의 세포 성장을 달성하기 위한 임의의 적절한 기술을 사용하여 발효기에서 성장시키고 배양할 수 있다. 발현되었으면, 전체 항체, 그의 이량체, 개별적인 경쇄 및 중쇄, 다른 이뮤노글로불린 형태, 또는 항원 결합 단편을 황산암모늄 침전, 친화성 칼럼, 칼럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 관련 분야의 표준 절차에 따라 정제할 수 있다; 문헌 [Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982)]을 참조한다. 그 후, 항체 또는 항원 결합 단편을 성장 배지, 세포 용해물, 또는 세포막 분획으로부터 단리할 수 있다. 예를 들어, 미생물에 의해 발현된 항체 또는 항원 결합 단편을 임의의 통상적인 수단, 예를 들어, 분취용 크로마토그래피 분리 및 면역학적 분리 예컨대 항체의 불변 영역에 대해 예를 들어 지시된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체의 사용을 수반하는 것에 의해 단리 및 정제할 수 있다.

[0193] 본 개시내용의 측면은 모노클로날 항체의 무한 연장 공급원을 제공하는 하이브리도마에 관한 것이다. 하이브리도마의 배양물로부터 직접적으로 이뮤노글로불린을 수득하는 것에 대한 대안으로서, 불멸화 하이브리도마 세포를 후속 발현 및/또는 유전 조작을 위한 재배열된 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 공급원으로서 사용할 수 있다. 재배열된 항체 유전자가 적합한 mRNA로부터 역전사되어 cDNA가 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역이 상이한 이소타입의 것으로 교환될 수 있거나 또는 전적으로 제거될 수 있다. 단일쇄 Fv 영역을 코딩하도록 가변 영역이 연결될 수 있다. 다중 Fv 영역이 연결되어 하나를 초과하는 표적에 대한 결합 능력을 부여할 수 있거나, 또는 키메라 중쇄 및 경쇄 조합물이 사용될 수 있다. 임의의 적합한 방법이 항체 가변 영역의 클로닝 및 재조합 항체 생성에 사용될 수 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 적합한 핵산을 수득하고, 발현 벡터 내로 삽입하고, 이러한 벡터를 표준 재조합 숙주 세포 내로 형질감염시킬 수 있다. 다양한 이러한 숙주 세포를 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물 숙주 세포가 효율적인 프로세싱 및 생산에 유리할 수 있다. 이러한 목적에 유용한 전형적인 포유동물 세포주는 CHO 세포, 293 세포, 또는 NSO 세포를 포함한다. 변형된 재조합 숙주를 숙주 세포의 성장 및 코딩 서열의 발현에 적합한 배양 조건 하에 배양함으로써 항체 또는 항원 결합 단편의 생산에 착수할 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편을 이를 배양물로부터 단리함으로써 회수할 수 있다. 생성된 항체가 배지 내로 분비되도록 발현 시스템을 신호 펩티드를 포함하도록 디자인할 수 있다; 그러나, 세포내 생산이 또한 가능하다.

[0195] 본 개시내용은 본원에 기재된 항체의 이뮤노글로불린 쇄의 가변 영역을 적어도 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 또한 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 가변 영역은 상기 기재된 하이브리도마 중 임의의 하나에 의해 생산된 항체의 가변 영역의 VH 및/또는 VL의 적어도 하나의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.

[0196] 항체 또는 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, DNA, cDNA, RNA, 또는 합성에 의해 생산

된 DNA 또는 RNA, 또는 이러한 폴리뉴클레오티드 중 임의의 것을 단독으로 또는 조합하여 포함하는 재조합에 의해 생산된 키메라 핵산 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 벡터의 일부분이다. 이러한 벡터는 추가 유전자 예컨대 적절한 숙주 세포 및 적절한 조건 하에서 벡터 선택을 허용하는 마커 유전자를 포함할 수 있다.

[0197] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 원핵생물 또는 진핵생물에서의 발현을 허용하는 발현 제어 서열에 작동적으로 연결된다. 폴리뉴클레오티드의 발현은 번역가능한 mRNA 내로의 폴리뉴클레오티드의 전사를 포함한다. 진핵생물 세포, 바람직하게는 포유동물 세포 내에서의 발현을 보장하는 조절 요소가 관련 분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 이는 전사 개시를 용이하게 하는 조절 서열을 포함할 수 있고, 임의적으로, 전사 종결 및 전사체의 안정화를 용이하게 하는 폴리-A 신호를 포함할 수 있다. 추가적인 조절 요소는 전사, 뿐만 아니라 번역 인핸서, 및/또는 천연적으로 회합되거나 이종성인 프로모터 영역을 포함할 수 있다. 원핵생물 숙주 세포에서의 발현을 허가하는 가능한 조절 요소는, 예를 들어, 이. 콜라이에서의 PL, Lac, Trp 또는 Tac 프로모터를 포함하고, 진핵생물 숙주 세포에서의 발현을 허가하는 조절 요소의 예는 효모에서의 AOX1 또는 GAL1 프로모터, 또는 포유동물 및 다른 동물 세포에서의 CMV-프로모터, SV40-프로모터, RSV-프로모터 (라우스 육종 바이러스), CMV-인핸서, SV40-인핸서 또는 글로빈 인트론이다.

[0198] 전사 개시를 담당하는 요소 이외에, 이러한 조절 요소는 폴리뉴클레오티드의 하류에 전사 종결 신호, 예컨대 SV40-폴리-A 부위 또는 tk-폴리-A 부위를 또한 포함할 수 있다. 추가로, 사용된 발현 시스템에 따라, 폴리펩티드를 세포 구획으로 지시하거나 또는 이를 배지 내로 분비할 수 있는 리더 서열이 폴리뉴클레오티드의 코딩 서열에 부가될 수 있고, 이전에 기재된 바 있다. 리더 서열(들)은 적합한 단계에서 번역, 개시 및 종결 서열과 어셈블리되고, 바람직하게는 리더 서열은 번역된 단백질 또는 그의 일부분이 예를 들어 세포외 배지 내로 분비되는 것을 지시할 수 있다. 임의적으로, 원하는 특성, 예를 들어, 발현된 재조합 생성물의 안정화 또는 단순화된 정제를 부여하는 C- 또는 N-말단 식별 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 이종성 폴리뉴클레오티드 서열을 사용할 수 있다.

[0199] 일부 실시양태에서, 경쇄 및/또는 중쇄의 가변 도메인을 적어도 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 양쪽 이뮤노글로불린 쇄 또는 오직 하나의 가변 도메인을 코딩할 수 있다. 유사하게, 폴리뉴클레오티드는 동일한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있거나, 또는 발현에 대해 별도로 제어될 수 있다. 또한, 일부 측면은 항체 또는 항원 결합 단편의 한 이뮤노글로불린 쇄의 가변 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 임의적으로는, 항체의 다른 이뮤노글로불린 쇄의 가변 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 함께 포함하는, 유전 조작에서 통상적으로 사용되는 벡터, 특히 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지에 관련된다.

[0200] 일부 실시양태에서, 진핵생물 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 내의 진핵생물 프로모터 시스템으로서 발현 제어 서열이 제공되지만, 원핵생물 숙주용 제어 서열을 또한 사용할 수 있다. 바이러스 예컨대 레트로바이러스, 우두 바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스, 또는 소 유두종 바이러스로부터 유래된 발현 벡터를 (예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편을 발현하도록 세포를 조작하기 위해) 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 표적화된 세포 집단 내로 전달하는데 사용할 수 있다. 다양한 적합한 방법을 재조합 바이러스 벡터를 구축하는데 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 및 벡터를 표적 세포로 전달하기 위해 리포솜 내로 재구성시킬 수 있다. 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 이뮤노글로불린 쇄의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인(들)을 코딩하는 서열 및 발현 제어 서열)을 함유하는 벡터를 세포 숙주의 유형에 따라 달라지는 적절한 방법에 의해 숙주 세포 내로 전달할 수 있다.

[0201] *변형*

[0202] 본 개시내용의 항체 또는 항원 결합 단편은 프로/잠재성-미오스타틴의 검출 및 단리를 위한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 양전자 방출 금속, 비-방사성 상자성 금속 이온, 및 친화성 표지를 포함하지만 이에 제한되지 않는 검출가능한 표지로 변형될 수 있다. 검출가능한 물질은 적절한 기술을 사용하여 본 개시내용의 폴리펩티드에 직접적으로 또는 간접적으로 중간체 (예를 들어, 링커)를 통해 커플링 또는 접합될 수 있다. 적절한 효소의 비-제한적인 예는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제, 글루코스 옥시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적절한 보결분자단 복합체의 비-제한적인 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적절한 형광 물질의 비-제한적인 예는 비오틴, 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드, 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 비-제한적인 예는 루시페라제, 루시페린, 및 에쿼린을 포함하며; 적절한 방사성 물질의 예는 방사성 금속 이온, 예를

들어, 알파-방출체 또는 다른 방사성 동위원소, 예를 들어, 아이오딘 (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 트리튬 (^{3}H), 인듐 (^{115}mIn, ^{113}mIn, ^{112}In, ^{111}In), 및 테크네튬 (^{99}Tc, ^{99}mTc), 탈륨 (^{201}Ti), 갈륨 (^{68}Ga, ^{67}Ga), 팔라듐 (^{103}Pd), 몰리브데넘 (^{99}Mo), 크세논 (^{133}Xe), 플루오린 (^{18}F), ^{153}Sm, Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{86}R, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn, ^{85}Sr, ^{32}P, ^{153}Gd, ^{169}Yb, ^{51}Cr, ^{54}Mn, ^{75}Se, 및 주석 (^{113}Sn, ^{117}Sn)을 포함한다. 검출가능한 물질은 적절한 기술을 사용하여 본 개시내용의 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 중간체 (예를 들어, 링커)를 통해 커플링 또는 접합될 수 있다. 검출가능한 물질에 접합된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 본원에 기재된 바와 같이 진단 검정법에 사용될 수 있다.

[0203] *제약 조성물*

[0204] 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 중 하나 이상을 완충제를 포함하는 제약상 허용되는 담체 (부형제)와 혼합하여, 근병증과 연관된 질환 또는 장애를 완화시키는데 사용하기 위한 제약 조성물을 형성시킬 수 있다. "허용되는"은 담체가 조성물의 활성 성분과 혼화성이어야 (바람직하게는, 활성 성분을 안정화시킬 수 있어야) 하고 치료될 대상체에게 해롭지 않아야 한다는 것을 의미한다. 완충제를 포함하여 제약상 허용되는 부형제 (담체)의 예가 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이전에 기재된 바 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover]을 참조한다. 한 예에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 표적 항원의 상이한 에피토프/잔기를 인식하는 하나를 초과하는 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체를 함유한다.

[0205] 본 발명의 방법에서 사용될 제약 조성물은 동결건조 제형 또는 수성 용액의 형태로 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함할 수 있다. (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 덱스트란을 포함하는 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; 킬레이팅제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 트윈(TWEEN)™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 제약상 허용되는 부형제가 본원에 추가로 기재된다.

[0206] 일부 예에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체를 함유하는 리포솜을 포함하고, 이는 문헌 [Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)]; [Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)]; 및 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545에 기재된 바와 같은 임의의 적절한 방법에 의해 제조될 수 있다. 순환 시간이 강화된 리포솜이 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다. 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물로의 역상 증발 방법에 의해 특히 유용한 리포솜이 생성될 수 있다. 규정된 세공 크기의 필터를 통해 리포솜이 압출되어, 원하는 직경의 리포솜이 산출된다.

[0207] 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 각각 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀션, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀션 내의 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수도 있다. 예시적인 기술이 이전에 기재된 바 있고, 예를 들어, 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)]을 참조한다.

[0208] 다른 예에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 서방성 양식으로 제형될 수 있다. 서방성 제제의 적절한 예는 매트릭스가 성형품, 예를 들어 필름의 형태인, 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스, 또는 마이크로캡슐을 포함한다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이드), 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 7 에틸-L-글루

타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 루프론 디포(LUPRON DEPOT)™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로스피어), 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.

[0209] 생체내 투여에 사용될 제약 조성물은 무균성이어야 한다. 이는, 예를 들어, 무균성 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다. 일반적으로 치료용 항체 조성물은 무균성 접근 포트가 있는 용기, 예를 들어, 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알 내에 놓인다.

[0210] 본원에 기재된 제약 조성물은 경구, 비경구 또는 직장 투여, 또는 흡입 또는 취입에 의한 투여를 위한 단위 투여 형태 예컨대 정제, 환제, 캡슐, 분말, 과립, 용액 또는 현탁액, 또는 좌약 내에 있을 수 있다.

[0211] 고체 조성물 예컨대 정제를 제조하기 위해, 주요 활성 성분을 제약 담체, 예를 들어, 통상적인 정제화 성분 예컨대 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 소르비톨, 활석, 스테아르산, 스테아르산마그네슘, 인산이칼슘 또는 검, 및 다른 제약 희석제, 예를 들어, 물과 혼합하여, 본 개시내용의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 비-독성 염의 균질 혼합물을 함유하는 고체 예비제형 조성물을 형성시킨다. 이러한 예비제형 조성물을 균질한 것으로 지칭하는 경우, 이는 조성물이 균등하게 효과적인 단위 투여 형태 예컨대 정제, 환제 및 캡슐로 쉽게 세분될 수 있도록 활성 성분이 조성물 전반에 걸쳐 균일하게 분산되어 있는 것을 의미한다. 그 후, 이러한 고체 예비제형 조성물을 0.1 mg 내지 약 500 mg의 본 개시내용의 활성 성분을 함유하는 상기 기재된 유형의 단위 투여 형태로 세분한다. 신규 조성물의 정제 또는 환제를 코팅하거나 또는 다른 방식으로 배합하여 장기 작용의 장점을 제공하는 투여 형태를 제공할 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 환제가 내부 투여 및 외부 투여 성분을 포함할 수 있고, 이때 후자는 전자의 덮개 형태이다. 이러한 2개의 성분은 위에서의 붕해를 저지하는 역할을 하고 내부 성분이 손상되지 않은 상태로 십이지장 내로 통과하도록 또는 그의 방출이 지연되도록 허용하는 장용 층에 의해 분리될 수 있다. 다양한 물질이 이러한 장용 층 또는 코팅에 사용될 수 있고, 이러한 물질은 다수의 중합체성 산, 및 중합체성 산과 쉘락, 세틸 알콜 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질의 혼합물을 포함한다. 적절한 계면활성제는, 특히, 비-이온성 작용제, 예컨대 폴리옥시에틸렌소르비탄 (예를 들어 트윈™ 20, 40, 60, 80 또는 85) 및 다른 소르비탄 (예를 들어 스팬(Span)™ 20, 40, 60, 80 또는 85)을 포함한다. 계면활성제가 있는 조성물은 편리하게는 0.05 내지 5%의 계면활성제를 포함할 것이고, 0.1 내지 2.5%일 수 있다. 필요하다면, 다른 성분, 예를 들어 만니톨 또는 다른 제약상 허용되는 비히클이 첨가될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0212] 시판되는 지방 에멀션, 예컨대 인트라리피드(Intralipid)™, 리포신(Liposyn)™, 인포누트롤(Infonutrol)™, 리포푼딘(Lipofundin)™ 및 리피피산(Lipiphysan)™을 사용하여 적절한 에멀션을 제조할 수 있다. 활성 성분은 예비-혼합 에멀션 조성물 내에 용해될 수 있거나, 또는 대안적으로 오일 (예를 들어 대두유, 홍화유, 면실유, 호마유, 옥수수유 또는 아몬드유) 내에 용해될 수 있고, 인지질 (예를 들어 난 인지질, 대두 인지질 또는 대두 레시틴) 및 물과 혼합 시 에멀션이 형성될 수 있다. 에멀션의 장성을 조정하기 위해 다른 성분, 예를 들어 글리세롤 또는 글루코스가 첨가될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 적절한 에멀션은 전형적으로 최대 20%의 오일, 예를 들어, 5 내지 20%를 함유할 것이다.

[0213] 에멀션 조성물은 항-프로미오스타틴 항체를 인트라리피드™ 또는 그의 성분 (대두유, 난 인지질, 글리세롤 및 물)과 혼합함으로써 제조된 것일 수 있다.

[0214] 흡입 또는 취입용 제약 조성물은 제약상 허용되는 수성 또는 유기 용매, 또는 그의 혼합물 내의 용액 및 현탁액, 및 분말을 포함한다. 액체 또는 고체 조성물은 상기 기재된 바와 같은 적절한 제약상 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 국소 또는 전신 효과를 위해 경구 또는 비강 호흡 경로에 의해 투여된다. 바람직하게는 무균성의 제약상 허용되는 용매 내의 조성물은 기체 사용에 의해 연무될 수 있다. 연무된 용액은 연무 장치로부터 직접적으로 호흡될 수 있거나, 또는 연무 장치가 안면 마스크, 텐트 또는 간헐성 양압 호흡기에 부착될 수 있다. 제형을 적합한 방식으로 전달하는 장치로부터, 바람직하게는 경구적으로 또는 비강 내로, 용액, 현탁액 또는 분말 조성물이 투여될 수 있다.

[0215] *질환/장애를 치료하기 위한 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 용도*

[0216] 본원에 기재된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 근병증과 연관된 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "근병증"은 근육 섬유가 제대로 기능하지 않는 근육 질환을 지칭하고, 전형적으로는 근육 약화를 생성한다. 근병증은 성질 면에서 신경근육성 또는 근육골격성인 근육 질환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근병증은 유전적 근병증이다. 유전적 근병증은, 비제한적으로, 이영양증, 근긴장증, 선천성 근병증 (예를 들어, 네말린 근병증, 멀티/미니코어 근병증, 및 중심핵성 근병증), 미토콘드리아 근병증, 가족형

주기적 근병증, 염증성 근병증 및 대사성 근병증 (예를 들어, 글리코겐 축적 질환 및 지질 축적 장애)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근병증은 후천적 근병증이다. 후천적 근병증은, 비제한적으로, 외부 물질 유도 근병증 (예를 들어, 약물-유도 근병증 및 글루코코르티코이드 근병증, 알콜성 근병증, 및 다른 독성 작용제로 인한 근병증), 근염 (예를 들어, 피부근염, 다발성 근염 및 봉입체 근염), 골화 근염, 횡문근용해, 및 미오글로빈뇨, 및 불사용 위축을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근병증은 골절 (예를 들어 고관절 골절)에 의해 또는 신경 손상 (예를 들어, 척수 손상 (SCI))에 의해 야기될 수 있는 불사용 위축이다. 일부 실시양태에서, 근병증은 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 척수성 근육 위축 (SMA), 신부전, AIDS, 심장 병태 및/또는 암으로 인한 악액질 증후군과 같은 질환 또는 장애에 관련된다. 일부 실시양태에서, 근병증은 노화에 관련된다.

[0217] 본 개시내용의 측면은 대상체에게 유효량의 상기 기재된 항체를 투여하는 것을 포함하는, 근병증에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근병증은 원발성 근병증이다. 또 다른 실시양태에서, 원발성 근병증은 불사용 위축을 포함한다. 다른 실시양태에서, 불사용 위축은 고관절 골절, 선택적 관절 치환술, 중환자 근병증, 척수 손상 또는 뇌졸중과 연관된다. 일부 실시양태에서, 근병증은 근육 상실이 질환 병리에 대해 속발성인 속발성 근병증이다. 다른 실시양태에서, 속발성 근병증은 탈신경, 유전적 근육 약화 또는 악액질을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 속발성 근병증은 근위축성 측삭 경화증 또는 척수성 근육 위축과 연관된 탈신경이다. 일부 실시양태에서, 속발성 근병증은 근육 이영양증과 연관된 유전적 근육 약화이다. 다른 실시양태에서, 속발성 근병증은 신부전, AIDS, 심장 병태, 암 또는 노화와 연관된 악액질이다.

[0218] 본 개시내용의 또 다른 측면은 노화에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 노화와 관련된 예시적인 질환 및 병태는, 비제한적으로, 근육감소증 (연령-관련 근육 상실), 허약, 및 안드로겐 결핍을 포함한다.

[0219] 본 개시내용의 또 다른 측면은 불사용 위축/외상에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 불사용 위축/외상에 관련된 예시적인 질환 및 병태는, 비제한적으로, 집중 치료실 (ICU)에서 보낸 시간에 관련된 근육 약화, 고관절/관절 치환술, 고관절 골절, 뇌졸중, 침상 안정, SCI, 회전근개 손상, 슬관절 치환술, 골절, 및 화상을 포함한다.

[0220] 본 개시내용의 또 다른 측면은 신경변성 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 예시적인 신경변성 질환 또는 병태는, 비제한적으로, 척수성 근육 위축 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 포함한다.

[0221] 본 개시내용의 또 다른 측면은 악액질에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 악액질에 관련된 예시적인 질환 및 병태는, 비제한적으로, 암, 만성 심부전, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 및 만성 신장 질환 (CKD)을 포함한다.

[0222] 본 개시내용의 또 다른 측면은 희귀 질환에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 예시적인 희귀 질환 및 병태는, 비제한적으로, 골형성 부전증, 산발성 봉입체 근염, 및 급성 림프모구 백혈병을 포함한다.

[0223] 본 개시내용의 또 다른 측면은 대사 장애 및/또는 신체 조성에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 질환 또는 병태는 비만 (예를 들어, 중증 비만), 프라더-윌리, 제II형 당뇨병, 또는 식욕부진이다. 그러나, 대사 장애 및/또는 신체 조성에 관련된 추가적인 질환 또는 병태가 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 본 개시내용의 범주 내에 속한다.

[0224] 본 개시내용의 또 다른 측면은 선천성 근병증에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 예시적인 선천성 근병증은, 비제한적으로, X-연관 근세관성 근병증, 상염색체 우성 중심핵성 근병증, 상염색체 열성 중심핵성 근병증, 네말린 근병증, 및 선천성 섬유-유형 불균등화 근병증을 포함한다.

[0225] 본 개시내용의 또 다른 측면은 근육 이영양증에 관련된 질환 또는 병태에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 예시적인 근육 이영양증은, 비제한적으로, 뒤시엔느, 베커, 안면견갑상완 (FSH), 및 지대 근육 이영양증을 포함한다.

[0226] 본 개시내용의 또 다른 측면은 비뇨부인과학 관련 질환 또는 병태, 성문 장애 (협착증), 외안 근병증, 손목 터널, 길랑-바레, 또는 골육종에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 포함한다.

[0227] 본원에 개시된 방법을 실행하기 위해, 유효량의 상기 기재된 제약 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 인간)에게 적절한 경로, 예컨대 정맥내 투여를 통해, 예를 들어, 볼루스로서 또는 장기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수액내, 피하, 관절내, 활액내, 수막강내, 경구, 흡입 또는 국소 경로에 의해

투여할 수 있다. 제트 연무기 및 초음파 연무기를 포함하는 시판되는 액체 제형용 연무제가 투여에 유용하다. 액체 제형은 직접적으로 연무될 수 있고, 동결건조 분말은 재구성 후에 연무될 수 있다. 대안적으로, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체를 플루오로카본 제형 및 계량 용량 흡입기를 사용하여 에어로졸화할 수 있거나, 또는 동결건조 및 제분 분말로서 흡입할 수 있다.

[0228] 본원에 기재된 방법에 의해 치료될 대상체는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다. 포유동물은 농장 동물, 스포츠 동물, 애완동물, 영장류, 말, 개, 고양이, 마우스 및 래트를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 치료를 필요로 하는 인간 대상체는 근병증과 연관된 질환/장애, 예컨대 상기 언급된 것들에 걸렸거나, 걸릴 위험이 있거나, 또는 걸린 것으로 추정되는 인간 환자일 수 있다. 프로/잠재성-미오스타틴-연관 질환 또는 장애에 걸린 대상체는 일상적인 의학 검사, 예를 들어, 실험실 테스트, 장기 기능 테스트, CT 스캔 또는 초음파에 의해 식별될 수 있다. 이러한 질환/장애 중 임의의 것에 걸린 것으로 추정되는 대상체는 질환/장애의 하나 이상의 증상을 나타낼 수 있다. 질환/장애에 대한 위험이 있는 대상체는 질환/장애에 대한 위험 인자 중 하나 이상이 있는 대상체일 수 있다.

[0229] 본원에 사용된 바와 같은 "유효량"은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 활성 작용제와 조합되어 대상체에 대한 치료 효과를 부여하는데 요구되는 각각의 활성 작용제의 양을 지칭한다. 관련 분야의 통상의 기술자가 인식할 바와 같이, 유효량은 치료되는 특정 병태, 병태의 중증도, 연령, 신체 상태, 체격, 성별 및 체중을 포함하는 개별적인 환자 파라미터, 치료 기간, 동반 요법 (존재하는 경우)의 성질, 특정 투여 경로, 및 보건 진료원의 지식 및 전문기술 내에 속하는 유사 인자에 따라 바뀐다. 이러한 인자는 관련 분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 일상적일 뿐인 실험으로 다루어질 수 있다. 개별적인 성분 또는 이들의 조합물의 최대 용량, 즉 견실한 의학적 판단에 따른 가장 높은 안전한 용량이 사용되는 것이 일반적으로 바람직하다. 그러나, 관련 분야의 통상의 기술자는 환자가 의학적 이유, 심리적 이유 또는 실질적으로 임의의 다른 이유로 더 낮은 용량 또는 허용가능한 용량을 요구할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 실시양태에서, 유효량은장애 또는 그의 하나 이상의 증상의 중증도 및/또는 기간을 감소시키거나 완화시키는데, 장애 발생을 방지하는데, 장애 퇴행을 야기하는데, 장애와 연관된 하나 이상의 증상의 재발, 발생, 발병 또는 진행을 방지하는데, 장애를 검출하는데, 또는 또 다른 요법 (예를 들어, 예방 또는 치료 작용제)의 예방 또는 치료 효과(들)를 강화하거나 개선하는데 충분한 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 양을 지칭한다.

[0230] 일부 실시양태에서, 프로/잠재성-미오스타틴 항체를 대상체에게 투여하는 상황에서, 유효량은 대조군 근육 질량과 비교하여 대상체에서 표적 근육의 질량을 증가시키는데 효과적인 양이다. 일부 실시양태에서, 근육 질량 증가는 대조군 근육 질량에 비교하여 적어도 1.1배, 적어도 1.2배, 적어도 1.3배, 적어도 1.4배, 적어도 1.5배, 적어도 1.6배, 적어도 1.7배, 적어도 1.8배, 적어도 1.9배, 적어도 2배, 적어도 4배, 적어도 5배 또는 그 초과의 배수의 증가이다. 일부 실시양태에서, 근육 질량 증가는 대조군 근육 질량에 비교하여 1배 내지 5배, 2배 내지 10배, 1배 내지 1.5배, 1배 내지 2배 등의 범위의 증가이다.

[0231] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대조군 근육 질량"은 대상체 내의 표적 근육의 질량에 대한 조건 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴 항체로의 치료)의 효과를 평가하는데 유용한 참조 표준을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대조군 근육 질량은 미리 정해진 값이다. 일부 실시양태에서, 대조군 근육 질량은 실험적으로 결정된다. 일부 실시양태에서, 대조군 근육 질량은 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 투여되지 않은 대상체에서의 표적 근육의 질량이다. 일부 실시양태에서, 대조군 근육 질량은 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 투여되지 않은 대상체의 집단에서의 표적 근육의 질량 (예를 들어, 평균 질량)이다. 일부 실시양태에서, 대조군 근육 질량은 프로/잠재성-미오스타틴 항체를 투여하기 전 (예를 들어, 직전)의 대상체에서의 표적 근육의 질량이다. 일부 실시양태에서, 대조군 근육 질량은 프로/잠재성-미오스타틴 항체 대신, 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 이에 대해 지시되는 항원에 노출된 동물로부터 수득된 일반 항체 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴 항체와 동일한 이소타입의 것)가 투여된 대상체에서의 표적 근육의 질량이다. 일부 실시양태에서, 대조군 근육 질량은 프로/잠재성-미오스타틴 항체 대신, 비히클, 예를 들어, 염수가 투여된 대상체에서의 표적 근육의 질량이다.

[0232] 일부 실시양태에서, 프로/잠재성-미오스타틴 항체를 대상체에게 투여하는 상황에서, 유효량은 대조군 힘 생성 능력에 비교하여 대상체에서 표적 근육의 힘 생성 능력 (예를 들어, 수평 관류 배스로 개조된 근육 지레 시스템으로 시험관 내에서 결정된 바와 같은 최대 힘 생성)을 증가시키는데 효과적인 양이다. 일부 실시양태에서, 힘 생성 능력 증가는 대조군 힘 생성 능력에 비교하여 적어도 1.1배, 적어도 1.2배, 적어도 1.3배, 적어도 1.4배, 적어도 1.5배, 적어도 1.6배, 적어도 1.7배, 적어도 1.8배, 적어도 1.9배, 적어도 2배, 적어도 4배, 적어도 5배 또는 그 초과의 배수의 증가이다. 일부 실시양태에서, 힘 생성 능력 증가는 대조군 힘 생성 능력에 비교하여 1

배 내지 5배, 2배 내지 10배, 1배 내지 1.5배, 1배 내지 2배 등의 범위의 증가이다.

[0233] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대조군 힘 생성 능력"은 대상체 내의 근육의 힘 생성 능력에 대한 조건 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴 항체로의 치료)의 효과를 평가하는데 유용한 참조 표준을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대조군 힘 생성 능력은 미리 정해진 값이다. 일부 실시양태에서, 대조군 힘 생성 능력은 실험적으로 결정된다. 일부 실시양태에서, 대조군 힘 생성 능력은 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 투여되지 않은 대상체에서의 표적 근육의 힘 생성 능력이다. 일부 실시양태에서, 대조군 힘 생성 능력은 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 투여되지 않은 대상체의 집단에서의 표적 근육의 힘 생성 능력 (예를 들어, 평균 힘 생성 능력)이다. 일부 실시양태에서, 대조군 힘 생성 능력은 프로/잠재성-미오스타틴 항체를 투여하기 전 (예를 들어, 직전)의 대상체에서의 표적 근육의 힘 생성 능력이다. 일부 실시양태에서, 대조군 힘 생성 능력은 프로/잠재성-미오스타틴 항체 대신, 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 이에 대해 지시되는 항원에 노출된 동물로부터 수득된 일반 항체 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴 항체와 동일한 이소타입의 것)가 투여된 대상체에서의 표적 근육의 힘 생성 능력이다. 일부 실시양태에서, 대조군 힘 생성 능력은 프로/잠재성-미오스타틴 항체 대신, 비히클, 예를 들어, 염수가 투여된 대상체에서의 표적 근육의 힘 생성 능력이다.

[0234] 경험적 고려사항, 예컨대 반감기가 일반적으로 투여량의 결정에 기여할 것이다. 예를 들어, 인간 면역계와 혼화성인 항체, 예컨대 인간화 항체 또는 완전 인간 항체가 항체의 반감기를 연장시키는데, 그리고 숙주의 면역계가 항체를 공격하는 것을 방지하는데 사용될 수 있다. 투여 빈도는 요법의 과정에 걸쳐 결 및 조정될 수 있고, 필수적이지는 않지만 일반적으로, 근병증과 연관된 질환/장애의 치료 및/또는 억제 및/또는 호전 및/또는 지연을 기초로 한다. 대안적으로, 항-프로/잠재성-미오스타틴의 지속적인 연속 방출 제형이 적합할 수 있다. 지속 방출을 달성하기 위한 다양한 제형 및 장치가 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 본 개시내용의 범주 내에 속한다.

[0235] 한 예에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체에 대한 투여량은 1회 이상의 항체 투여가 제공된 개체에서 경험적으로 결정될 수 있다. 증분식 투여량의 길항제가 개체에게 제공된다. 길항제의 효능을 평가하기 위해, 질환/장애의 지표물이 이어질 수 있다.

[0236] 일반적으로, 임의의 본원에 기재된 항체의 투여를 위해, 초기 후보 투여량은 약 2 mg/kg일 수 있다. 본 개시내용의 목적을 위해, 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 요인에 따라, 약 0.1 μg/kg 내지 3 μg/kg 내지 30 μg/kg 내지 300 μg/kg 내지 3 mg/kg에서 30 mg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 초과의 값까지의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 병태에 따라, 원하는 증상 억제가 발생할 때까지 또는 충분한 치료 수준이 달성되어 프로/잠재성-미오스타틴과 연관된 질환 또는 장애 또는 그의 증상이 완화될 때까지 치료가 지속된다. 예시적인 투여 레지멘은 약 2 mg/kg의 초기 용량에 이어서 매주 약 1 mg/kg의 항체의 유지 용량 또는 격주로 약 1 mg/kg의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 실행자가 달성하기를 원하는 약동학적 붕괴의 패턴에 따라, 다른 투여량 레지멘이 유용할 수 있다. 예를 들어, 1주에 1-4회 투여하는 것이 구상된다. 일부 실시양태에서, 약 3 μg/mg 내지 약 2 mg/kg 범위의 투여 (예컨대 약 3 μg/mg, 약 10 μg/mg, 약 30 μg/mg, 약 100 μg/mg, 약 300 μg/mg, 약 1 mg/kg, 및 약 2 mg/kg)이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 빈도는 매주, 2주마다, 4주마다, 5주마다, 6주마다, 7주마다, 8주마다, 9주마다 또는 10주마다 1회; 또는 매달, 2개월마다, 또는 3개월마다, 4개월마다, 5개월마다, 6개월마다, 8개월마다, 10개월마다, 매년, 또는 그 초과마다 1회이다. 통상적인 기술 및 검정법에 의해 이러한 요법의 진행이 쉽게 모니터링된다. 시간에 따라 투여 레지멘 (사용된 항체 포함)이 변할 수 있다.

[0237] 일부 실시양태에서, 정상 체중의 성인 환자의 경우, 약 0.3 내지 5.00 mg/kg 범위의 용량이 투여될 수 있다. 특정 투여량 레지멘, 예를 들어, 용량, 시기 및 반복은 특정 개체 및 이러한 개체의 병력, 뿐만 아니라 개별적인 작용제의 성질 (예컨대 작용제의 반감기, 및 다른 관련 고려사항)에 좌우될 것이다.

[0238] 본 개시내용의 목적을 위해, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 적합한 투여량은 사용된 특정 항체 (또는 그의 조성물), 질환/장애의 유형 및 중증도, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 기존 요법, 환자의 임상 이력 및 길항제에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 좌우될 것이다. 일부 실시양태에서, 임상의는 원하는 결과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체를 투여할 것이다. 예를 들어, 수용자의 생리학적 상태, 투여 목적이 치료용인지 또는 예방용인지 여부, 및 숙련의에게 공지된 다른 요인에 따라, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 투여는 연속적 또는 간헐적일 수 있다. 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 투여는 미리 선택된 기간에 걸쳐 본질적으로 연속적일 수 있거나, 또는 예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴과 연관된 질환 또는 장애가 발생되기 전, 발생되는 동안 또는 발생된 후에, 일련의 간격이 있는 용량일 수 있다.

[0239] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는"은 하나 이상의 활성 작용제를 포함하는 조성물을 근병증과 연관된 질환/장애, 이러한 질환/장애의 증상, 또는 이러한 질환/장애에 대한 소인이 있는 대상체에게 이러한 장애, 이러한 질환의 증상, 또는 질환/장애에 대한 소인을 치유하거나, 고치거나, 완화시키거나, 해소시거나, 변경시키거나, 구제하거나, 호전시키거나, 개선하거나, 이에 영향을 미칠 목적으로 적용 또는 투여하는 것을 지칭한다.

[0240] 프로/잠재성-미오스타틴과 연관된 질환/장애를 완화시키는 것은 질환의 발생 또는 진행을 지연시키는 것, 또는 질환 중증도를 감소시키는 것을 포함한다. 질환을 완화시키는 것은 치유적인 결과를 필수적으로 요구하지 않는다. 본원에 사용된 바와 같이, 프로/잠재성-미오스타틴과 연관된 질환/장애의 발생을 "지연시키는 것"은 질환 진행의 유예, 저해, 저속화, 지체, 안정화, 및/또는 연기를 의미한다. 이러한 지연은 치료되는 질환 및/또는 개체의 이력에 따라 길이가 다양할 수 있다. 질환 발생을 "지연" 또는 완화시키거나, 또는 질환 발병을 지연시는 방법은 이러한 방법을 사용하지 않는 것과 비교하여 소정의 시간 프레임에서 하나 이상의 증상이 발생될 가능성을 감소시키고/시키거나 소정의 시간 프레임에서 증상의 중증도를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는, 통계적으로 유의한 결과를 제공하는데 충분한 다수의 대상체를 사용하여, 전형적으로 임상 연구를 기초로 한다.

[0241] 질환의 "발생" 또는 "진행"은 질환의 최초 징후 및/또는 후속 진행을 의미한다. 표준 임상 기술을 사용하여 질환 발생이 검출가능하고 평가될 수 있다. 그러나, 발생은 검출가능하지 않을 수 있는 진행을 또한 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 발생 또는 진행은 증상의 생물학적 과정을 지칭한다. "발생"은 발현, 재발 및 발병을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 근병증과 연관된 질환/장애의 "발병" 또는 "발현"은 최초의 발병 및/또는 재발을 포함한다.

[0242] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 프로/잠재성-미오스타틴의 활성 미오스타틴으로의 단백질분해적 활성화를 생체 내에서 적어도 20% (예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과)만큼 억제하는데 충분한 양으로 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 다른 실시양태에서, 항체는 프로/잠재성-미오스타틴 또는 잠재성 미오스타틴 수준을 적어도 20% (예를 들어, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 또는 그 초과)만큼 감소시키는데 효과적인 양으로 투여된다.

[0243] 치료될 질환의 유형 또는 질환 부위에 따라, 의학 분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 제약 조성물을 대상체에게 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 다른 통상적인 경로를 통해 또한 투여될 수 있고, 예를 들어, 경구로, 비경구로, 흡입 스프레이에 의해, 국소적으로, 직장으로, 비강으로, 협측으로, 질로, 또는 이식 저장소를 통해 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 동맥내, 활액내, 흉골내, 수막강내, 병변내, 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 추가적으로, 주사성 디포 투여 경로를 통해, 예컨대 1-, 3-, 또는 6-개월 디포 주사성 또는 생분해성 물질 및 방법을 사용하여 이를 대상체에게 투여할 수 있다.

[0244] 주사성 조성물은 다양한 담체 예컨대 식물성 오일, 디메틸아세트아미드, 디메틸포름아미드, 에틸 락테이트, 에틸 카르보네이트, 이소프로필 미리스테이트, 에탄올 및 폴리올 (글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유할 수 있다. 정맥내 주사의 경우, 수용성 항체가 점적 방법에 의해 투여될 수 있고, 이에 의해 항체 및 생리학상 허용되는 부형제를 함유하는 제약 제형이 주입된다. 생리학상 허용되는 부형제는, 예를 들어, 5% 덱스트로스, 0.9% 염수, 링커 용액 또는 다른 적절한 부형제를 포함할 수 있다. 근육내 제제, 예를 들어, 적절한 가용성 염 형태의 항체의 무균성 제형이 제약 부형제 예컨대 주사용수, 0.9% 염수, 또는 5% 글루코스 용액에 용해되어 투여될 수 있다.

[0245] 한 실시양태에서, 부위-특이적 또는 표적화 국소 전달 기술을 사용하여 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체가 투여된다. 부위-특이적 또는 표적화 국소 전달 기술의 예는 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 다양한 이식성 디포 공급원 또는 국소 전달 카테터, 예컨대 주입 카테터, 유치 카테터, 니들 카테터, 합성 이식물, 외막 랩, 션트 및 스텐트 또는 다른 이식성 장치, 부위 특이적 담체, 직접 주사, 또는 직접 도포를 포함한다. 예를 들어, PCT 공개 번호 WO 00/53211 및 미국 특허 번호 5,981,568을 참조한다.

[0246] 폴리뉴클레오티드, 또는 발현 벡터를 함유하는 치료 조성물의 표적화 전달을 또한 사용할 수 있다. 수용체-매개 DNA 전달 기술이, 예를 들어, 문헌 [Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202]; [Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994)]; [Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621]; [Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542]; [Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655]; [Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338]에 기재되어 있다.

[0247] 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 본원에 기재된 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체를 코딩하는 것)를 함유하는 치료

조성물은 유전자 요법 프로토콜에서 국소 투여를 위해 약 100 ng 내지 약 200 mg의 DNA의 범위로 투여된다. 일부 실시양태에서, 약 500 ng 내지 약 50 mg, 약 1 μg 내지 약 2 mg, 약 5 μg 내지 약 500 μg, 및 약 20 μg 내지 약 100 μg의 DNA 또는 그 초과의 값의 농도 범위가 유전자 요법 프로토콜 동안 또한 사용될 수 있다.

[0248] 유전자 전달 비히클을 사용하여 본원에 기재된 치료용 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 전달할 수 있다. 유전자 전달 비히클은 바이러스 또는 비-바이러스 기원의 것일 수 있다 (일반적으로, 문헌 [Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51]; [Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845]; [Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185]; 및 [Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148] 참조). 내인성 포유동물 프로모터 및/또는 인핸서 또는 이종성 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하여 이러한 코딩 서열의 발현을 유도할 수 있다. 코딩 서열의 발현은 구성적이거나 또는 조절될 수 있다.

[0249] 원하는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 본원에 개시된 항체를 코딩함)의 전달 및 원하는 세포에서의 발현을 위한 적절한 바이러스-기반 벡터가 본 개시내용의 범주 내에 속한다. 예시적인 바이러스-기반 비히클은 재조합 레트로바이러스 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; 미국 특허 번호 5,219,740 및 4,777,127; GB 특허 번호 2,200,651; 및 EP 특허 번호 0 345 242 참조), 알파바이러스-기반 벡터 (예를 들어, 신드비스(Sindbis) 바이러스 벡터, 셈리키(Semliki) 삼림 바이러스 (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), 로스 리버(Ross River) 바이러스 (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) 및 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), 및 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655 참조)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 문헌 [Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147]에 기재된 바와 같은 죽은 아데노바이러스에 연결된 DNA의 투여를 또한 사용할 수 있다.

[0250] 단독의 죽은 아데노바이러스에 연결된 또는 연결되지 않은 다가양이온성 응축 DNA (예를 들어, 문헌 [Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147] 참조); 리간드-연결 DNA (예를 들어, 문헌 [Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985] 참조); 진핵생물 세포 전달 비히클 세포 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,814,482; PCT 공개 번호 WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; 및 WO 97/42338 참조) 및 핵 전하 중화 또는 세포막과의 융합을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 비-바이러스 전달 비히클 및 방법을 또한 사용할 수 있다. 네이키드 DNA를 또한 사용할 수 있다. 예시적인 네이키드 DNA 도입 방법이 PCT 공개 번호 WO 90/11092 및 미국 특허 번호 5,580,859에 기재되어 있다. 유전자 전달 비히클로서 작용할 수 있는 리포솜이 미국 특허 번호 5,422,120; PCT 공개 번호 WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; 및 EP 특허 번호 0524968에 기재되어 있다. 추가적인 접근법이 문헌 [Philip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14:2411], 및 [Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581]에 기재되어 있다.

[0251] 본원에 기재된 방법에서 사용된 특정한 투여량 레지멘, 예를 들어, 용량, 시기 및 반복은 특정 대상체 및 이러한 대상체의 병력에 좌우될 것이다.

[0252] 일부 실시양태에서, 1종 초과의 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체, 또는 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체 및 또 다른 적절한 치료제의 조합물을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여할 수 있다. 길항제는 동일한 유형이거나 또는 서로 상이할 수 있다. 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체는 작용제의 유효성을 강화하고/하거나 보완하는 작용을 하는 다른 작용제와 함께 사용될 수도 있다.

[0253] 근병증과 연관된 질환/장애에 대한 치료 효능을 임의의 적절한 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 근병증과 연관된 질환/장애에 대한 치료 효능을 근육 약화를 평가하는 것 (예를 들어, 약화의 패턴 및 중증도를 평가하는 것), 근전도검사, 혈액 화학을 평가하는 것 (예를 들어, 전해질을 평가하는 것, 내분비 원인을 평가하는 것, 크레아티닌 키나제 수준을 측정하는 것, 적혈구 침강 속도를 결정하는 것 및 항핵 항체 검정법을 수행하는 것), 및 생체검사를 평가하는 것 (예를 들어, 조직학적, 조직화학적, 전자현미경, 생화학적 및 유전학적 분석에 의함)에 의해 평가할 수 있다.

[0254] *근병증과 연관된 질환/장애를 완화시키는 것에서 사용하기 위한 키트*

[0255] 본 개시내용은 근병증과 연관된 질환/장애를 완화시키는 것에서 사용하기 위한 키트를 또한 제공한다. 이러한 키트는 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체, 예를 들어, 본원에 기재된 것들 중 임의의 것을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다.

[0256] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 따라 사용하는 것에 대한 지침서를 포함할 수 있다. 포함된 지침서는 본원에 기재된 것들과 같은 표적 질환을 치료하거나, 그의 발병을 지연시키거나 또는

이를 완화시키기 위한 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 투여의 설명을 포함할 수 있다. 키트는 개체가 표적 질환에 걸렸는지 여부를 식별하는 것을 기초로 치료에 적절한 개체를 선택하는 것의 설명을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 지침서는 표적 질환의 위험이 있는 개체에게 항체를 투여하는 것의 설명을 포함한다.

[0257] 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 사용에 관련된 지침서는 의도되는 치료에 대한 투여량, 투여 일정, 및 투여 경로에 관한 정보를 일반적으로 포함한다. 용기는 단위 용량, 벌크 포장 (예를 들어, 다중-용량 포장), 또는 서브-유닛 용량일 수 있다. 본 개시내용의 키트에서 공급되는 지침서는 전형적으로 라벨 또는 포장 삽입물 (예를 들어, 키트에 포함된 종이 시트) 상의 서면 지침서이지만, 기계에서 판독할 수 있는 지침서 (예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크 상에 보유된 지침서)가 또한 허용가능하다.

[0258] 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 근병증과 연관된 질환 또는 장애를 치료하고/하거나, 그의 발병을 지연시키고/시키거나, 이를 완화시키는데 사용된다는 것을 가리킨다. 지침서는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 실행하기 위해 제공될 수 있다.

[0259] 본 개시내용의 키트는 적절한 포장재 내에 있다. 적절한 포장재는 바이알, 병, 단지, 가요성 포장재 (예를 들어, 밀봉 마일라(Mylar) 또는 플라스틱 백) 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특수 장치, 예컨대 흡입기, 비강 투여 장치 (예를 들어, 아토마이저) 또는 주입 장치 예컨대 미니펌프와 함께 사용하기 위한 포장재가 또한 구상된다. 키트는 무균성 접근 포트가 있을 수 있다 (예를 들어, 용기가 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 용기 또한 무균성 접근 포트가 있을 수 있다 (예를 들어, 용기가 피하 주사 바늘이 관통할 수 있는 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 하나의 활성 작용제는 본원에 기재된 것들과 같은 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체이다.

[0260] 키트는 추가적인 성분 예컨대 완충제 및 해석 정보를 임의적으로 제공할 수 있다. 일반적으로, 키트는 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 회합된 라벨 또는 포장 삽입물(들)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 키트의 내용물을 포함하는 제조품을 제공한다.

[0261] *프로/잠재성-미오스타틴을 검출하기 위한 검정법*

[0262] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 대상체로부터 수득된 샘플 내의 프로/잠재성-미오스타틴을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "대상체"는 개별적인 생물, 예를 들어, 개별적인 포유동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 영장류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 설치류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 양, 염소, 소, 고양이, 또는 개이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 척추동물, 양서류, 파충류, 어류, 곤충, 파리, 또는 선충류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 연구 동물이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 유전자 조작되고, 예를 들어, 유전자 조작된 비-인간 대상체이다. 대상체는 임의의 성별일 수 있고, 임의의 발생 단계에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 환자 또는 건강한 자원자이다.

[0263] 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 샘플 내의 프로/잠재성-미오스타틴을 검출하는 방법은 (a) 항원이 샘플 내에 존재한다면, 항체가 항원에 결합하고, 이에 의해 결합 복합체를 형성하는데 적절한 조건 하에 샘플과 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체를 접촉시키는 단계; 및 (b) 항원에 결합된 항체 또는 항원 결합 단편의 수준을 결정하는 단계 (예를 들어, 결합 복합체의 수준을 결정하는 단계)를 수반한다.

[0264] 본원에 사용된 바와 같이, 결합 복합체는 항원 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴 단백질)에 결합된 항체 (항원 결합 단편 포함)의 생체분자 복합체를 지칭한다. 결합 복합체는 단일 특이성의 항체, 또는 상이한 특이성의 2개 이상의 항체 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 결합 복합체는 동일한 항원 상의 상이한 항원 부위를 인식하는 2개 이상의 항체를 포함한다. 일부 경우에, 항체는 다른 생체분자 예컨대 RNA, DNA, 다당류 또는 단백질이 결합되어 있는 항원에 결합될 수 있다. 한 실시양태에서, 결합 복합체는 상이한 항원을 인식하는 2개 이상의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체 내의 항체 (예를 들어, 항원에 결합된 고정된 항체) 자체가 항원으로서 항체 (예를 들어, 검출가능하게 표지된 항체)에 결합될 수 있다. 따라서, 일부 경우에, 결합 복합체는 다중 항원 및 다중 항체 또는 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

[0265] 결합 복합체 내에 존재하는 항원은 그의 천연적인 계내 형상일 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체와 정제된 단백질 항원, 또는 항원을 포함하는 단리된 단백질 사이에서 결합 복합체가 형성되고, 여기서 항원은 그의 천연적인 계내 형상이 아니다. 일부 실시양태에서, 항체와 정제된 단백질 항원 사이에서 결합 복합체가 형성되고, 여기서 항원은 그의 천연적인 계내 형상이 아니고, 고체 지지체 (예를 들어, PVDF

막) 상에 고정된다. 일부 실시양태에서, 항체 및, 예를 들어, 천연 형상으로 계 내에 (예를 들어, 세포의 표면 상에) 존재하는 세포 표면 단백질으로 결합 복합체가 형성된다.

[0266] 결합 복합체 내의 항체는 검출가능하게 표지될 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 검출가능하게 표지된 항체 및 표지되지 않은 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 검출가능하게 표지된 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체 내의 항체는 하나 이상의 고체 지지체에 고정된다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체 내의 항원은 하나 이상의 고체 지지체에 고정된다. 예시적인 고체 지지체가 본원에 개시되고, 관련 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 결합 복합체의 상기 예는 제한적인 것으로 의도되지 않는다. 결합 복합체의 다른 예가 관련 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0267] 임의의 검출, 진단 및 모니터링 방법에서, 항체 (항원 결합 단편 포함) 또는 항원이 고체 지지체 표면에 직접적으로 또는 간접적으로 접합될 수 있다. 고체 지지체에 접합시키는 방법은 표준이고, 공유결합 및 비-공유결합 상호작용을 통해 달성될 수 있다. 접합 방법의 비-제한적인 예는 흡착, 가교, 단백질 A/G - 항체 상호작용, 및 스트렙타비딘-비오틴 상호작용을 포함한다. 접합의 다른 방법이 관련 분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0268] 일부 측면에서, 검출, 진단 및 모니터링 방법은 항원 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴)에 결합된 항체 (항원 결합 단편 포함)의 수준을 하나 이상의 참조 표준에 비교하는 것을 포함한다. 참조 표준은, 예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴이 있거나 또는 없는 대상체에서의 상응하는 프로/잠재성-미오스타틴의 수준일 수 있다. 한 실시양태에서, 참조 표준은 프로/잠재성-미오스타틴을 함유하지 않는 샘플에서 검출된 프로/잠재성-미오스타틴의 수준 (예를 들어, 배경 수준)이다. 대안적으로, 샘플과 비-특이적 항체 (예를 들어, 비-면역 혈청으로부터 수득된 항체)를 접촉시킴으로써, 특정 프로/잠재성-미오스타틴을 함유하는 샘플로부터 배경 수준을 결정할 수 있다. 한편, 참조 수준은 프로/잠재성-미오스타틴을 함유하는 샘플 (예를 들어, 양성 대조군)에서 검출된 프로/잠재성-미오스타틴의 수준일 수 있다. 일부 경우에, 참조 표준은 샘플 내의 다양한 농도의 프로/잠재성-미오스타틴과 연관된 일련의 수준일 수 있고, 테스트 샘플 내의 프로/잠재성-미오스타틴의 농도를 정량화하는데 유용할 수 있다. 참조 표준에 대한 상기의 예는 제한적이지 않고, 다른 적절한 참조 표준이 관련 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 일부 실시양태에서, 프로/잠재성-미오스타틴에 결합된 항체의 수준을 성숙 미오스타틴의 수준에 비교한다. 일부 경우에, 프로/잠재성-미오스타틴의 수준을 성숙 미오스타틴에 비교하여, 샘플 내의 불활성 대 활성 미오스타틴의 비를 결정한다.

[0269] 생물학적 샘플로부터, 본원에 제공된 바와 같이, 프로/잠재성-미오스타틴의 수준을 측정할 수 있다. 생물학적 샘플은 대상체 또는 세포로부터 수득될 수 있는 임의의 생물학적 물질을 지칭한다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 뇌척수액, 소변, 세포 (또는 세포 용해물) 또는 조직 (예를 들어, 정상 조직 또는 종양 조직)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 유체 샘플이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 고형 조직 샘플이다. 예를 들어, 조직 샘플은, 비제한적으로, 골격 근육, 심장 근육, 지방 조직, 뿐만 아니라 다른 기관으로부터의 조직을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 생검 샘플이다. 일부 실시양태에서, 관련 분야의 일상적인 방법을 사용하여 고형 조직 샘플이 유체 샘플로 제조될 수 있다.

[0270] 생물학적 샘플은 세포주의 하나 이상의 세포를 또한 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포주는 인간 세포, 영장류 세포 (예를 들어, 베로(vero) 세포), 래트 세포 (예를 들어, GH3 세포, OC23 세포) 또는 마우스 세포 (예를 들어, MC3T3 세포)를 포함한다. 인간 배아 신장 (HEK) 세포, HeLa 세포, 국립 암 연구소(National Cancer Institute) 60 암 세포주 (NCI60)로부터의 암 세포, DU145 (전립선암) 세포, Lncap (전립선암) 세포, MCF-7 (유방암) 세포, MDA-MB-438 (유방암) 세포, PC3 (전립선암) 세포, T47D (유방암) 세포, THP-1 (급성 골수성 백혈병) 세포, U87 (교모세포종) 세포, SHSY5Y 인간 신경모세포종 세포 (골수종으로부터 클로닝됨) 및 Saos-2 (골암) 세포를 비제한적으로 포함하는 다양한 인간 세포주가 있다.

[0271] 추가 실시양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계, (b) 프로/잠재성-미오스타틴을 검출하는 항체를 사용하여 생물학적 샘플 내의 프로/잠재성-미오스타틴의 수준을 결정하는 단계, 및 (c) 단계 (a) 및 (b)를 1회 이상 반복하는 단계를 포함하는, 질환 또는 병태에 걸렸거나 또는 걸릴 위험이 있는 대상체에서 질환, 병태, 또는 그의 임의의 치료 (예를 들어, 근병증 또는 근병증 치료)를 모니터링하는 방법에 관한 것이다. 미오스타틴이 근육 위축에 대한 바이오마커로서 사용되었지만, 그러나 현재 이용가능한 상업적인 방법 및 시약 (예를 들어, ELISA 및 웨스턴 블롯에서 사용되는 항체)은 미오스타틴에 대해 특이적이지 않거나, 성숙 미오스타틴만 검출하거나, 또는 미오스타틴을 전혀 검출하지 않는다. 따라서, 진단 목적을 위해 질환 및/또는 병태 (예를 들어, 근육 위축)의 상황에서 프로/잠재성-미오스타틴을 검출하기 위한 방법 및 시약 (예를 들어, 항체)이

본원에 제공된다. 한 예로서, 질환 또는 병태의 진행을 검출하거나 또는 모니터링하기 위해 프로/잠재성-미오스타틴의 수준을 대상체 또는 이로부터의 생물학적 샘플에서 측정할 수 있다. 또 다른 예로서, 질환 또는 병태에 대한 치료에 대한 응답을 모니터링하기 위해 프로/잠재성-미오스타틴의 수준을 대상체 또는 이로부터의 생물학적 샘플에서 측정할 수 있다. 대상체가 걸린 질환 또는 병태 또는 대상체에 적용될 수 있는 임의의 치료 레지멘에 따라 상이할 수 있는 임의의 적절한 기간에 걸쳐 프로/잠재성-미오스타틴의 수준을 모니터링할 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0272] 또 다른 실시양태는 상기 기재된 항체, 항원 결합 단편, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포 중 어느 하나를 포함하고, 적절한 검출 수단을 임의적으로 포함하는 진단 조성물에 관한 것이다. 항체는, 예를 들어, 면역검정법에서 이용하기에 적절하고, 여기서 항체는 액체상에서 사용될 수 있거나 또는 고체상 담체에 결합될 수 있다. 항체를 이용할 수 있는 면역검정법의 예는 직접적 또는 간접적 양식의 경쟁적 및 비-경쟁적 면역검정법이다. 이러한 면역검정법의 예는 효소 결합 면역검정법 (ELISA), 방사성 면역검정법 (RIA), 샌드위치 (면역측정 검정법), 유동 세포측정법, 웨스턴 블롯 검정법, 면역침전 검정법, 면역조직화학, 면역-현미경검사, 측면 유동 면역-크로마토그래프 검정법, 및 프로테오믹스 어레이이다. 다수의 상이한 고체 지지체 (예를 들어, 담체, 막, 칼럼, 프로테오믹스 어레이 등)에 항원 및 항체가 결합될 수 있다. 고체 지지체 물질의 예는 유리, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐리덴 디플루오라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트, 덱스트란, 나일론, 아밀로스, 천연 및 변형 셀룰로스, 예컨대 니트로셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 아가로스, 및 자철광을 포함한다. 지지체의 성질은 고정될 수 있거나 또는 용액 내에 현탁될 수 있다 (예를 들어, 비드).

[0273] 추가 실시양태에 의해, 본원에 제공된 항체 (항원 결합 단편 포함)는 조직 샘플, 혈액 샘플 또는 임의의 다른 적합한 체액 샘플일 수 있는 대상체로부터의 생물학적 샘플을 수득함으로써 대상체에서의 프로/잠재성-미오스타틴 발현을 평가하는 방법에서 또한 사용될 수 있다. 이러한 절차는 혈액 샘플 (전혈, 혈청, 혈장), 조직 샘플, 또는 이로부터 단리된 단백질 샘플을 항체와 항원 사이의 결합 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에 항체와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 그 후, 이러한 결합 복합체의 수준을 임의의 적절한 방법에 의해 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원이 샘플 내에 존재한다면 항체가 프로/잠재성-미오스타틴 단백질에 결합하고 항원에 결합된 항체로 이루어진 결합 복합체가 형성되는데 적절한 조건 하에 생물학적 샘플이 항체와 접촉된다. 이러한 접촉 단계는 전형적으로 반응 챔버, 예컨대 튜브, 플레이트 웰, 막 배스, 세포 배양 디쉬, 현미경 슬라이드 등에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 항체가 고체 지지체 상에 고정된다. 일부 실시양태에서, 항원이 고체 지지체 상에 고정된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 반응 챔버의 표면이다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 중합체성 막 (예를 들어, 니트로셀룰로스 스트립, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (PVDF) 막 등)의 것이다. 다른 적합한 고체 지지체를 사용할 수 있다.

[0274] 일부 실시양태에서, 항원과의 접촉 전에 항체가 고체 지지체 상에 고정된다. 다른 실시양태에서, 결합 복합체의 형성 후에 항체 고정이 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 결합 복합체의 형성 전에 항원이 고체 지지체 상에 고정된다. 고정된 결합 복합체를 검출하기 위해 검출 시약이 반응 챔버에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 검출 시약은 항원에 대해 지시된 검출가능하게 표지된 2차 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 항체 자체가 검출가능하게 표지되며, 이에 의해 검출 시약이다.

[0275] 한 측면에서, 검출 방법은 항체를 고체 지지체에 고정하는 단계; 샘플 내에 존재한다면 항원이 항체에 결합하는 것을 허용하는 조건 하에 샘플 (예를 들어, 생물학적 샘플 또는 단리된 단백질 샘플)을 고체 지지체에 적용하는 단계; 과량의 샘플을 고체 지지체로부터 제거하는 단계; 검출가능하게 표지된 항체가 항원에 결합된 고정된 항체에 결합하는 것을 허용하는 조건 하에 검출가능하게 표지된 항체를 적용하는 단계; 고체 지지체를 세정하는 단계 및 고체 지지체 상의 표지의 존재를 검정하는 단계를 포함한다.

[0276] 일부 실시양태에서, 반응 챔버 (예를 들어, 막 배스)에서 항체와 접촉되기 전에 항원이 고체 지지체, 예컨대 PVDF 막 상에 고정된다. 고정된 결합 복합체를 검출하기 위해 검출 시약이 반응 챔버에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 검출 시약은 항원에 대해 지시된 검출가능하게 표지된 2차 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출 시약은 1차 항체에 대해 지시된 검출가능하게 표지된 2차 항체를 포함한다. 본원에 개시된 바와 같이, 검출가능한 표지는, 예를 들어, 방사성 동위원소, 형광단, 발광 분자, 효소, 비오틴-모이어티, 에피토프 태그, 또는 염료 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 1차 항체 자체가 검출가능하게 표지되며, 이에 의해 검출 시약이다. 적절한 검출가능한 표지가 본원에 기재되고, 관련 분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0277] 따라서, (a) 항원 결합 시약 (예를 들어, 프로/잠재성-미오스타틴 결합 시약)으로서의 검출가능하게 표지된 항체 및/또는 표지되지 않은 항체; (b) 검출 시약; 및 임의적인 (c) 샘플 내의 항원을 검출하기 위해 이러한 시약

을 사용하는 것에 대한 완전한 지침서를 포함하는, 가정용 또는 임상 용도 (현장 서비스)에 적절한 진단 키트가 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 진단 키트는 고체 지지체 상에 고정된 프로/잠재성-미오스타틴 및/또는 항체를 포함한다. 본원에 기재된 고체 지지체 중 임의의 것이 진단 키트 내에 혼입시키기에 적절하다. 바람직한 실시양태에서, 고체 지지체는 플레이트 웰의 반응 챔버의 표면이다. 전형적으로, 플레이트 웰은 6, 12, 24, 96, 384, 및 1536개로부터 선택된 다수의 웰이 있는 멀티-웰 플레이트이지만, 이렇게 제한되지 않는다. 다른 실시양태에서, 이러한 진단 키트는 검출가능하게 표지된 항체를 제공한다. 진단 키트는 이러한 실시양태에 제한되지 않고, 키트 조성에서의 다른 변형이 관련 분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0278] 따라서, 하기의 구체적인 실시양태는 단순히 설명적인 것으로 해석되어야 하고, 어떠한 방식으로도 본 개시내용의 나머지 부분을 제한하지 않는다. 본원에 인용된 모든 간행물은 본원에 언급된 목적 또는 주제를 위해 참조로 포함된다.

[0279] 실시예

[0280] *실시예 1: 항체 생성 및 선택*

[0281] *항체 요약*

[0282] Ab2는 인간 프로- 및 잠재성- 미오스타틴에 높은 친화성 (포르테바이오 BLI에 의한 Kd = 3420 pM)으로 결합하는 IgG4/람다 이소타입의 완전 인간 항-프로/잠재성-미오스타틴 모노클로날 항체이다. 이러한 항체는 0.5 마이크로몰 범위 (이는 검정법의 한계이거나 또는 그 부근임)의 IC50 값으로 프로/잠재성-미오스타틴의 단백질분해적 활성화를 억제할 수 있다. 이러한 폴리펩티드의 이론적 분자량은 144,736 Da이고, 그의 이론적 pI는 6.7이다. 항체 디스플레이를 사용한 친화성 최적화를 수행하여, 친화성이 더 높은 변이체인 Ab4 및 Ab6을 식별하였다. 친화성 최적화 변이체를 인간 IgG4/람다 이소타입 프레임워크 상에서 유사하게 구축하였다.

[0283] 표 2: 후보 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 생화학적 성질

항체	친화성 (옥테트) pM	이론적 MW (Da) *비-글리코실화	pI 계산치
Ab1	4760	144809.8	6.9
Ab2	3420	144735.6	6.7
Ab4	472	144661.7	6.7
Ab6	331	144629.5	6.7

[0284]

[0285] *모체 항체의 플랫폼 및 식별*

[0286] 프로- 및 잠재성- 미오스타틴을 선택용 1차 항원으로서 사용하여 나이브 파지 디스플레이라이브러리의 선택을 통해 모체 Ab1 항체를 식별하였다. 맥카퍼티(McCafferty) 등 (McCafferty et al., 1990)이 기재한 것과 유사한 양식으로 통상적인 scFv를 디스플레이하는 라이브러리를 사용하여 파지 선택 및 초기 스크리닝을 수행하였다. 각각의 선택 라운드는 예비-정화 (비-특이적 파지 항체 제거용), 항원과의 인큐베이션, 세정, 용출, 및 증폭으로 이루어졌다. 고체 상 (면역튜브 상에 코팅된 비오틴화 항원) 및 용액 상 (스트렙타비딘이 코팅된 비드를 사용하여 포착된 비오틴화 항원) 패닝 전략 둘 다를 사용하여 다중 라운드를 통해 선택을 수행하였다.

[0287] 전체적으로, 10,000개의 개별적인 scFv 클론을 2개의 별개의 캠페인을 통해 프로- 또는 잠재성- 미오스타틴에 결합하는 것에 대해 스크리닝하였다. 제1 프로그램은 프로/잠재성-미오스타틴을 항원으로서 이용한 한편, 제2 캠페인은 잠재성 미오스타틴을 항원으로서 사용하였다. 관심 대상인 scFv 클론에 대한 DNA를 시퀀싱하였고, 216개의 독특한 클론이 식별되었다. 양성 결합 scFv 클론을 프로GDF11, 뿐만 아니라 관련되지 않은 단백질의 패널에 결합하는 것에 대해 대비-스크리닝하여, 프로/잠재성-미오스타틴에 대한 특이성을 확증하였다. 독특한 scFv 클론의 패널로부터, (134개의 GDF8 특이적 클론 중) 101개를 추가적인 특징화를 위해 전장 IgG (IgG1 이소타입)로 전환시켰다.

[0288] 전장 IgG 항체를 인간 및 뮤린 프로- 및 잠재성- 형태의 미오스타틴 및 GDF11에 결합하는 것에 대해 ELISA에 의

해 추가로 특징화하였다. 항체를 미오스타틴 프로도메인, 프로TGFβ (인간 및 뮤린), 미오스타틴의 성숙 성장 인자, GDF11 성숙 성장 인자, 액티빈 A 성장 인자, 및 프로액티빈 A에 결합하는 것에 대해 또한 스크리닝하였다. 선도 항체를 GDF11, 액티빈, 또는 TGFβ 단백질과의 상호작용의 부재 하의 프로- 및 잠재성 인간 및 뮤린 미오스타틴과의 교차-반응성을 기초로 선택하였다.

[0289] 2종 형태의 에피토프 비닝을 이용하였다. 먼저, 미오스타틴 및 GDF11의 프로도메인의 일부분이 스와핑된 키메라 구축물을 디자인하여 생산하였다. 이러한 키메라 단백질을 ELISA에 의해 스크리닝 항체와의 상호작용에 대해 검정하였다. 포르테바이오 BLI 기구를 사용하여 에피토프 비닝을 수행하였고, 여기서 비오틴화 프로/잠재성-미오스타틴 항체가 스트렙타비딘-코팅 바이오센서 칩 상에 고정되었고, 항체의 교차-차단을 센서 반응에 의해 평가하였다. 이러한 에피토프 비닝 실험은, ELISA 결합 실험으로부터의 데이터와 함께, 본 발명자들의 기능적으로 활성인 선도 항체 (하기 참조)를 3개의 별개의 에피토프 군으로 분리하는 것을 허용하였다 (표 3 참조).

[0290] 표 3: 5개의 항-프로/잠재성-미오스타틴 IgG1 항체의 순위

[0291]

클론 ID	프로GDF8 Kd (μM) (옥테트)	인간 프로GDF8 IC50[2] (μM) 리포터 검정법	뮤린 프로GDF8 IC50[2] (μM) 리포터 검정법	6주 내의 % 체중 증가 25 mg/kg/주	4주 내의 % 제지방 질량 증가 20 mg/kg/주	에피토프 빈
Ab1	11.5	0.996	1.46	14.58*	14.1*	1
Ab7	28	0.983	1.68	12.42*	ND	1
Ab8	0.5	6.037	139[1]	10.33*	7.4	2
Ab9	22	12.16	19.86	7.44	ND	3
Ab10	0.3	0.772	ND	ND	14.3*	1

[0292] *일원 ANOVA와 던넷에 의한 통계적 유의성

[0293] Ab8은 잠재성 미오스타틴에 결합하지 않고, 프로미오스타틴에만 결합한다. 뮤린 프로/잠재성-미오스타틴 제제에는 ~40% 잠재성 물질이 있고, 이는 기능 검정법에서 겉보기 효능을 감소시킨다.

[0294] ND: 결정되지 않음.

[0295] 항체가 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하여 그의 활성화를 억제하는 능력을 평가하기 위해, 다수의 생화학적 및 세포 검정법이 확립되었다. 프로- 및 잠재성- 미오스타틴에 대한 결합 동역학을 비오틴화 기질 단백질이 스트렙타비딘-코팅 센서 칩 상에 고정된 포르테바이오 옥테트에 의해 측정하였다. 스크리닝으로부터의 후보물의 평형 해리 상수가 표 3에서 제시된다.

[0296] IgG가 미오스타틴 신호전달을 억제하는 능력을 측정하기 위해, 미오스타틴 활성화 검정법이 개발되었다. mT112 (미오스타틴 활성화에 요구되는 톨로이드 프로테아제) 또는 푸린 (프로도메인으로부터 성숙 성장 인자를 절단하는 프로단백질 컨버타제)을 과발현하는 세포로부터의 컨디셔닝 배지를 생산하였다. 테스트 항체와의 예비-인큐베이션 후, 프로/잠재성-미오스타틴 또는 잠재성 미오스타틴을 mT112 및 푸린 혼합물 컨디셔닝 배지 (프로미오스타틴) 또는 mT112 컨디셔닝 배지 (잠재성 미오스타틴)와 함께 인큐베이션하였다. 밤새 단백질분해 반응 후, 성숙 성장 인자의 방출을 293T 세포에서 CAGA-기반 리포터 검정법을 사용하여 측정하였다. 동일한 검정법에서 항체를 용량 반응에 의해 추가로 검증하였고, 그의 결과가 표 3에서 제시된다.

[0297] 5개의 모체 항체 (표 3)가 상기 검정법 모두에서 일관적으로 강력한 선택성 및 활성을 입증하였고, 이들을 생체 내에서의 추가 특징화 (실시예 2에서 논의됨)를 위해 추가로 선택하였다. 일관성을 위해, Ab8이 잠재성 미오스타틴을 인식하지 않음에 따라, 프로/잠재성-미오스타틴에 대한 이러한 항체의 결합 및 활성이 요약된다.

[0298] 항체 후보물의 작용 메카니즘을 결정하기 위해, 도 3에 제시된 바와 같이, 미오스타틴의 프로도메인에 대해 생성된 폴리클로날 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅에 의해 샘플을 분석하였다. 이는 mT112 절단 후에 생성되는 미오스타틴 프로도메인의 단편 (상자)의 추적을 허용하였다. Ab1의 농도가 증가됨에 따라 이러한 단편의 생성

에서 용량-의존적 감소가 나타났다. 이러한 실험은 에피토프 빈 1의 항체가 톨로이드 패밀리의 프로테아제에 의한 프로- 및 잠재성- 미오스타틴의 절단을 차단함으로써 작용한다는 것을 가리킨다.

[0299] 활성 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 시험관 내 및 생체 내 활성을 기초로, Ab1을 친화성 성숙, 배선화 및 제작가능성 분석을 포함하는 추가 최적화를 위한 선도물로서 선택하였다.

[0300] *Ab1의 최적화*

[0301] Ab1 항체를 추가 최적화를 위해 선택하였다. 프로/잠재성-미오스타틴에 대한 친화성을 효모 디스플레이를 사용하여 최적화하였다. 추가적으로, Ab1의 서열을 배선화하여 인간 가변 영역 프레임워크 내의 비-배선 아미노산 위치의 잠재적인 면역원성 경향을 감소시켰다.

[0302] *효모 디스플레이에 의한 Ab1의 친화성 최적화*

[0303] 효모를 기초로 하는 scFv 디스플레이 접근법을 사용하여 Ab1 모체 항체를 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것에 대해 최적화하였다. 간략하게, Ab1이 이용하는 인간 프레임워크에 상응하는 항체 심층 시퀀싱을 사용하여 천연 인간 항체 레퍼토리에서 관찰되는 아미노산 빈도를 기초로 선택된 CDR 위치에 점 돌연변이를 도입하기 위해 3개의 상이한 scFv 라이브러리를 생성시켰다. 생성된 중쇄 또는 경쇄의 각각의 변이체에 각각의 CDR 내에 1개씩 총 3개의 치환을 갖도록 각각의 라이브러리는 단일 점 돌연변이가 각각의 CDR에 도입된 Ab1 서열을 기초로 하는 scFv를 함유하였다. 3개의 라이브러리를 FACS-기반 분류 및 선택에 사용하여 프로/잠재성-미오스타틴에 대한 결합 친화성이 더 높은 클론의 풀을 식별하였다 (도 23). 효모에서 발현된 scFv 클론의 직접적인 결합을 사용하여, 포유동물 세포 배양물에서 발현되는 전장 IgG로 전환시키기 위한 항체를 선택하였다.

[0304] 효모 캠페인에서 식별된 친화성이 더 높은 다수의 scFv 클론은 중쇄의 28번 위치에 치환을 함유하였다. 일부 클론의 경우, 트레오닌이 아스파라긴으로 치환되는 것이 CDRH1 내의 비-정규 N-글리코실화 모티프의 혼입을 생성하였다. 항체의 가변 영역 내의 N-글리코실화는 바람직하지 않을 수 있으므로, 글리코실화 모티프를 함유한 모든 클론을 이러한 위치에서 알라닌을 함유하도록 추가로 치환시켰다.

[0305] 그 후, 프로- 및 잠재성- 미오스타틴에 대한 결합 동역학을 각각의 친화성 최적화 구축물에 대해 옥테트에 의해 평가하고, 모체 Ab1의 것에 비교하였다 (실시예 2에서 논의됨). 모든 클론이 미오스타틴에 대한 유의하게 증가된 결합 친화성을 나타냈고, GDF11을 넘어서는 선택적 결합 프로파일을 기초로 2개 (Ab3 및 Ab5)를 선택하였다.

[0306] *항-프로/잠재성-미오스타틴 항체의 1차 서열 및 백본*

[0307] 모체 Ab1과 그의 친화성 최적화 변이체의 가변 영역의 서열 정렬이 하기에서 제시된다. 카바트(Kabat) (밑줄) 및 IMGT 명명법 (볼드체)을 사용하여 상보성 결정 영역 (CDR)이 규정된다. 모체 Ab1로부터의 치환이 소문자로 제시된다 (하기 및 도 24A-24B).

[0308] A. 중쇄 가변 영역

```
                          프레임워크 1          CDR1          프레임워크 2
Ab1 모체          QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab3               QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFaFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab5               QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFaFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA

                    CDR2                  프레임워크 3
Ab1 모체          VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab3               VISYDGSiKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab5               VISYDGnNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

                     CDR3                 프레임워크 4
Ab1 모체          DLLVRFLEWSHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
Ab3               DLLVRFLEWSHkYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 26)
Ab5               DLLVRFLEWSHkYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 28)
```

[0309]

[0310] B. 경쇄 가변 영역

```
                          프레임워크 1          CDR1        FRW2
Ab1 모체            QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab3                 QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSbSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab5                 QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGgNTVHWYQQLPGTAPKLLIY

                     CDR2              프레임워크 3
Ab1 모체            SDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC
Ab3                 SDdQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC
Ab5                 SDdQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC

                    CDR3          프레임워크 4
Ab1 모체            AAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
Ab3                 AAWDeSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 32)
Ab5                 AAWDeSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
```

[0311]

[0312] *이소타입 선택을 위한 항체 조작 및 논리적 근거*

[0313] 일부 실시양태에서, 미오스타틴 차단에 유용한 항체는 이펙터 기능이 결여될 것이다. 따라서, 인간화 구축물을 위해, IgG4-Fc 영역을 선택하였다. IgG4 이소타입의 항체는 보체 C1q에 불량하게 결합하고, 따라서 보체를 유의하게 활성화시키지 않는다. 이러한 항체는 또한 Fcγ 수용체에 약하게 결합하여, 불충분하거나 부재의 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC)에 이른다.

[0314] 천연 IgG4 mAb로 발생하는 것으로 공지된, Fab-아암 교환으로 인한 잠재적인 합병증을 피하기 위해, Ab1 및 그의 변이체를 세린 228 (EU 번호매김; 카바트 번호매김의 잔기 241)이 프롤린으로 전환되어 IgG1-유사 (CPPCP (서열식별번호: 58)) 힌지 서열을 생성하는 안정화 'Adair' 돌연변이 (Angal, 1993)로 조작하였다. 승인된 항체인 키트루다(Keytruda), 마일로타그(Mylotarg) 및 티사브리(Tysabri)의 생산, 뿐만 아니라 다수의 현재의 후기 임상 후보 mAb에서 이러한 조작된 Fc-서열이 사용된다.

[0315] *배선화 및 면역원성 위험 평가*

[0316] Ab1 모체 항체 및 그의 변이체는 파지 디스플레이로부터 유래된 완히 인간 IgG4 (S228P), 람다 항체이다. 이러한 항체의 Fc 부분은 Fab 아암 교환을 방지하기 위해 단일 안정화 돌연변이를 함유한다 (상기 기재됨). IgG4 Fc는 Fc 감마 수용체에 대한 측정가능한 결합이 있을 것으로 예상되지 않는다 (실시예 2 참조).

[0317] 완전 인간 나이브 파지 라이브러리로부터 단리된 바와 같은 Ab1의 가변 프레임워크 영역은 5개의 비-배선 아미노산을 함유한다 (하기 및 도 22 참조). 카바트 명명법을 사용하여 상보성 결정 영역 (CDR)이 규정되고, 밑줄로 표시된다. 비-배선 잔기가 소문자로 제시된다.

[0318] A. 중쇄 가변 영역

```
          <-------------FR1------------><CDR><-----FR2----><-----CDR2------>
Ab1     QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
IgHV3-30.v...e.............................................................

            <--------------FR3-------------><------CDR3-----><---FR4--->
Ab1         RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYYGMDVWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO: 24)
IgHV3-30    ................................ (SEQ ID NO: 36)
JH6                                                 ..................
(SEQ ID NO: 59)
```

[0319]

[0320] B. 경쇄 가변 영역

```
            <---------FR1--------><----CDR1---><-----FR2-----><CDR2->
Ab1         QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPS
IgLV1-44    .s.............................n................n.....

            <--------------FR3-------------><--CDR3--><---FR4-->
Ab1         GVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO:30)
IgLV1-44    ................a......e....... (SEQ ID NO: 60)
JL1/2/3                                          ........... (SEQ ID NO:
61)
```

[0321]

[0322] 면역원성 잠재력을 경감시키기 위해, 비-배선 프레임워크 잔기를 그의 상응하는 배선 아미노산으로 치환시킨 Ab1 분자의 추가적인 변이체를 생성시켰다. 일부 실시양태에서, Ab1에 관련된 이러한 치환이 Ab3 및 Ab4, 또는 배선화가 적합한 임의의 본원에 개시된 항체에 유사하게 적용될 수 있다.

[0323] Ab1과 그의 친화성 최적화 변이체의 가변 영역의 서열 정렬이 하기에서 제시된다. A.) 중쇄, B.) 경쇄. 카바트 (밑줄) 및 IMGT 명명법 (볼드체)을 사용하여 상보성 결정 영역 (CDR)이 규정된다. 모체 Ab1에 존재하는 프레임워크 영역 치환이 소문자로 제시된다.

[0324] A. 중쇄 가변 영역

```
                          프레임워크 1          CDR1          프레임워크 2
IgHV3-30          QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab1               QiQLVqSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab2               QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab4               QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab6               QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA

                    CDR2                 프레임워크 3
IgHV3-30          VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab1               VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab2               VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab4               VISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab6               VISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

                     CDR3              프레임워크 4
IgHV3-30          ----------------------------- (SEQ ID NO: 36)
Ab1               DLLVRFLEWSHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
Ab2               DLLVRFLEWSHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
Ab4               DLLVRFLEWSHKYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 27)
Ab6               DLLVRFLEWSHKYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 29)
```

[0325]

[0326] B. 경쇄 가변 영역

```
                          프레임워크 1          CDR1        FRW2
IgLV1-44        QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY
Ab1             QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab2             QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab4             QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab6             QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIY

                 CDR2              프레임워크 3
IgLV1-44        SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC
Ab1             SDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC
Ab2             SDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC
Ab4             SDDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC
Ab6             SDDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC

                CDR3          프레임워크 4
IgLV1-44        --------------------- (SEQ ID NO: 60)
Ab1             AAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
Ab2             AAWDDSLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
Ab4             AAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
Ab6             AAWDESLNGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 35)
```

[0327]

[0328] 5개의 치환 중 3개가 CDR 영역에서 떨어져 있고, 따라서 결합에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다. 경쇄의 2번 위치의 프롤린이 CDRL3에 대해 패킹되고, 배선 세린으로의 치환이 CDR 형상을 안정화시킴으로써 프로/잠재성-미오스타틴에 결합하는 것을 실제로 개선시킨다.

[0329] 전체 항체는 99% 초과로 인간이다 (100% 빼기 % 비-배선 AA (CDRH3 제외)로서 계산됨). 화학적 접합이 없다. 중쇄 CDRH2 서열은 배선 IgHV3-30 서열에도 존재하는 잠재적인 이성질체화 경향 (Asp-Gly)을 함유한다.

[0330] *실시예 2: 약리학적 특징화*

[0331] *시험관내 약리학적 검정법*

[0332] 총 24개의 최적화 Ab1 변이체를 IgG4로서 발현시켜 정제하고, 개선된 결합 및 기능 활성에 대해 검정하였다. 이러한 분자에 대한 변화는, 친화성 성숙 스크린에서 프로/잠재성-미오스타틴에 대한 결합 증가를 부여한 CDR에서의 돌연변이와 함께, 모체 가변 영역에 대한 배선화 돌연변이를 포함하였다 (실시예 1 참조).

[0333] Ab1 변이체를 여러 상이한 ELISA-기반 검정법에서 스크리닝하였고, 여기서, 친화성 성숙의 결과로서 비-특이적 결합이 도입되지 않았음을 증명하기 위한 음성 대조군 단백질의 대형 스크린과 함께, 프로미오스타틴 및 잠재성 미오스타틴 단백질 (인간, 뮤린, 및 시노몰구스)에 대한 결합을 재평가하였다. 음성 대조군은 GDF11 단백질 (프로GDF11, 잠재성 GDF11 및 성숙 GDF11), TGFβ 단백질, 및 액티빈 단백질 (프로액티빈)을 포함하였다. 추가적으로, 항체를 이전에 공개된 것 (Hotzel et al., 2012)과 유사한 스크린에서 다중특이성 (급속한 소거에 이를 수 있음에 대해 평가하였다. 다중특이성 스크린에서 음성 대조군 단백질에 대한 또는 배큘로바이러스 입자와의 유의한 상호작용이 있는 임의의 항체는 개발 프로그램을 위한 후보물로서 추가로 고려하지 않았다.

[0334] Ab1의 24개의 최적화된 변이체를 또한 프로미오스타틴 활성화 검정법에서 평가하여 그의 기능적 효능을 결정하였고, 용량 반응 곡선으로부터의 EC50 값을 모체 Ab1 항체에 비교하였다. 대부분의 항체가 EC50 값이 등가이거나 또는 개선되었고, 몇몇은 이러한 검정법에서 효능 감소를 나타냈다. 활성 검정법에서 효능이 감소된 것들은 추가 분석에서 제외하였다.

[0335] 프로- 및 잠재성 미오스타틴에 대한 특이성을 유지하면서 프로- 및 잠재성 미오스타틴에 대한 결합이 개선된 3개의 Ab1 변이체가 식별되었다. 이러한 3개의 변이체 및 모체 Ab1 분자에 대한 결합 및 활성 데이터가 표 4-7에 요약되고, 서열이 실시예 1에서 제시된다.

[0336] 표 4: 모체 Ab1 IgG4에 대한 인간/시노몰구스/마우스 프로미오스타틴에 대한 항체의 결합 특성

	Ab1			
	활성 검정법 - 293T 세포	*동역학 분석–포르테바이오 옥테트*		
	EC50 (μM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Kd (M)
인간	0.274	4.18E+05	1.99E-03	4.76E-09
시노몰구스	0.5842	3.05E+05	1.75E-03	5.75E-09
마우스	0.8386	2.37E+05	2.62E-03	1.10E-08

[0337] 82-1

[0338] 표 5: 비-배선화 잔기가 올바른 배선 잔기로 교체된 Ab1 IgG4 (Ab2)에 대한 인간/시노몰구스/마우스 프로미오스타틴에 대한 항체의 결합 특성

	Ab2			
	활성 검정법 - 293T 세포	*동역학 분석 - 포르테바이오 옥테트*		
	EC50 (μM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Kd (M)
인간	0.248	4.57E+05	1.56E-03	3.42E-09
시노몰구스	0.6168	2.78E+05	1.41E-03	5.08E-09
마우스	0.7138	2.35E+05	1.97E-03	8.39E-09

[0339]

[0340] 표 6: 수정된 배선 잔기를 함유하는 Ab3 IgG4 (Ab4)에 대한 인간/시노몰구스/마우스 프로미오스타틴에 대한 항체의 결합 특성

	Ab4			
	활성 검정법 - 293T 세포	*동역학 분석 - 포르테바이오 옥테트*		
	EC50 (μM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Kd (M)
인간	0.179	4.98E+05	2.35E-04	4.72E-10
시노몰구스	0.4451	3.01E+05	2.34E-04	7.76E-10
마우스	0.4466	2.53E+05	2.72E-04	1.08E-09

[0341]

[0342] 표 7: 수정된 배선 잔기를 함유하는 Ab5 IgG4 (Ab6)에 대한 인간/시노몰구스/마우스 프로미오스타틴에 대한 항체의 결합 특성

	Ab6			
	활성 검정법 - 293T 세포	*동역학 분석 - 포르테바이오 옥테트*		
	EC50 (nM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Kd (M)
인간	0.151	5.27E+05	2.51E-04	4.77E-10
시노몰구스	0.4037	3.50E+05	2.57E-04	7.35E-10
마우스	0.3068	2.94E+05	2.81E-04	9.54E-10

[0343]

[0344] *세포-기반 생체외 및 생체내 생물학적 활성 검정법*

[0345] Ab1 최적화 변이체를 용량 반응 연구에서 GDF8 활성화 검정법에서 평가하였다. 이러한 실험에서, 0.5 μM 프로

미오스타틴을 증가되는 양의 테스트 물품과 함께 예비-인큐베이션하였다. 이러한 예비-인큐베이션 단계 후, mT112 및 푸린 프로테아제를 과발현하는 HEK293 세포로부터의 컨디셔닝 배지를 첨가하여, 프로미오스타틴으로부터 성숙 성장 인자를 방출시켰다. 30℃에서의 밤새 인큐베이션 후, 물질을 SMAD-기반 루시페라제 리포터 플라스미드를 보유하는 293T 세포에 첨가하고, 방출된 물질의 활성을 기록하였다. 스크린으로부터의 데이터가 도 4에서 제시된다.

[0346] *다른 TGFβ 패밀리 구성원을 넘어서는 미오스타틴에 대한 선택성*

[0347] 결합 및 기능성 검정법 둘 다에 의해 후보 항체의 선택성을 또한 평가하여, TGFβ 패밀리의 다른 구성원에 대한 교차 반응성의 결여를 증명하였다. 인간 미오스타틴 및 GDF11은 성숙 성장 인자 도메인에서 90% 동일성을 공유하고, 프로도메인 영역에서 47% 동일성을 공유한다. 에피토프 맵핑 연구로부터, 모체 Ab1 분자가 프로미오스타틴 및 잠재성 미오스타틴의 프로도메인 상의 에피토프를 인식하는 것으로 결정되었는데, ELISA 검정법이 이러한 항체가 미오스타틴의 프로도메인으로 이루어진 구축물에 결합하는 것을 나타냈기 때문이다. 미오스타틴 및 GDF11의 프로도메인이 50% 미만의 동일성을 공유하고, 본 발명자들은 유의한 교차 반응성을 예상하지 않지만, 선도 항체의 특이성을 주의깊게 평가하였다.

[0348] 관심 항체와 음성 대조군 시약 사이의 상호작용을 검출하기 위한 민감한 검정법이 개발되었다. 이러한 검정법에서, 비오틴화 프로GDF11 또는 비오틴화 프로미오스타틴을 포르테바이오 BLI 스트렙타비딘-코팅 센서 팁 상에 고정시키고, 이를 30 μg/mL의 항체를 함유하는 웰에 적용하였다. 피분석물과 칩 상에 고정된 단백질 사이의 상호작용을 바이오센서 칩의 반응의 규모에 의해 측정하였다. 5분 회합 후의 바이오센서 반응 (프로GDF8에 대한 포화 신호)을 2개의 항원 사이에서 비교하였고, 이는 GDF8 결합에 대한 퍼센트 반응으로서 표현되었다. 모든 항체가 프로미오스타틴에 대해 측정된 견고한 결합 이벤트에 비교하여, 프로GDF11과의 상호작용이 최소였다.

[0349] 표 8: 고농도의 후보 분자에서의 프로GDF11과의 상호작용

	GDF11 반응, GDF8 반응의 백분율로서 표현됨
Ab1	1.33%
Ab2	0.81%
Ab4	2.51%
Ab6	2.07%

[0350]

[0351] 항체 후보물을 GDF11 활성화 검정법에서 또한 평가하였다. 이러한 검정법에서, 50 nM 프로GDF11을 증가되는 농도의 항체와 함께 예비인큐베이션한다. 예비인큐베이션 후, BMP-1 (톨로이드 패밀리 프로테아제) 및 PCSK5 (GDF11에 대해 특이적인 푸린 패밀리 구성원)를 과발현하는 HEK293 세포로부터의 컨디셔닝 배지를 첨가하여 단백질분해에 의해 프로GDF11을 활성화시켰다. 30℃에서의 밤새 인큐베이션 후, 반응 혼합물을 SMAD-기반 리포터 세포주에서 GDF11 활성에 대해 평가하였다. 표 8에 제시된 바와 같이, 항-미오스타틴 항체는 프로GDF11 활성화를 억제하지 않는 한편, 양성 대조군 항체는 GDF11 활성화의 용량-의존적 억제를 제공한다.

[0352] 항체 후보물의 결합 친화성을 포르테바이오 옥테트 QKe 딥 앤드 리드(dip and read) 무표지 검정법을 사용하여 바이오-레이어 간섭측정법을 이용하여 결정하였다. 항원을 각각의 실험에서 바이오센서 (프로GDF8, 프로GDF11 및 프로액티빈에 대한 스트렙타비딘-코팅 바이오센서; 모두에 대해 직접적인 아민 커플링)에 고정하였고, 항체/구축물을 고농도 (50 μg/mL)의 용액으로 제공하여 결합 상호작용을 측정하였다.

[0353] 항체의 결합 친화성을 포르테바이오 옥테트 QKe 딥 앤드 리드 무표지 검정법 시스템을 사용하여 바이오-레이어 간섭측정법을 이용하여 결정하였다. 인간 프로GDF8, 잠재성 GDF8, 프로GDF11 및 프로액티빈을 비오틴화하고, 스트렙타비딘-코팅 바이오센서 (포르테바이오)에 고정하였다. 성숙 성장 인자를 제조사의 지침서 (포르테바이오)에 따라 직접적인 아민 커플링을 통해 아민 반응성 팁에 고정시켰다. 각각의 실험에서, 항체/구축물을 단일의 고농도 (50 μg/mL)의 용액으로 제공하여 결합 상호작용을 측정하였다. 성장 인자는 R&D 시스템즈(R&D systems)에서 구입하였고, 비오틴화 단백질은 기재된 바와 같이 생산되었다.

[0354] 표 9a: 상이한 형태의 여러 TGFβ 패밀리 구성원에 결합하는 것에 대한 항체의 비교

	Ab2	*Ab4*	*Ab6*	*Ab1*
프로 GDF8	7.35E-09	9.24E-10	8.89E-10	6.23E-09
잠재성 GDF8	7.84E-09	1.10E-09	1.12E-09	9.06E-09
성숙 GDF8	-	-	-	-
프로 GDF11	-	*1.25E-07	*6.07E-08	-
성숙 GDF11		-	-	-
프로 액티빈 A	-	-	-	-
성숙 액티빈 A	-	-	-	-
BMP 9	-	-	-	-
BMP10	-	-	-	-
성숙 TGFB1	-	-	-	-

[0355]

[0356] *비-특이적 결합

[0357] 항원 결합 연구로부터의 결과가 표 9a에 요약된다. 검출가능한 결합이 없는 실험은 빼기 기호 (-)로 표기된다. 불량한 결합 반응으로 데이터에 핏팅된 일부 Kd 계산치가 있는데, 이는 표에서 약한 비-특이적 결합 (*)으로서 지시된다.

[0358] 표 9a에서 사용된 프로GDF8 샘플이 약 10-15%의 잠재성 GDF8을 함유하였기 때문에, 별개의 실험을 사용하여 프로GDF8이 인간 및 뮤린 GDF8 항원에 특이적으로 결합하는 것을 확증하였다. 추가적으로, 프로GDF8이 프로단백질 컨버타제 및 톨로이드 프로테아제 둘 다에 의해 단백질분해적으로 절단된 것인 프라이밍된 GDF8을 Ab2 및 AbMyo에 대한 결합 친화성에 대해 또한 평가하였다. 이러한 실험을 위해, 30 μM 데카노일-RVKR-CMV의 존재 하에 배양된 안정적으로 통합된 293 세포로부터 인간 프로GDF8의 균질한 제제를 정제하였다. mT112-과발현 세포로부터의 컨디셔닝 배지 및 정제된 푸린 프로테아제를 사용하여 프로GDF8의 시험관내 절단에 의해 프라이밍된 인간 GDF8를 생산하였다. 이러한 단백질로의 결합 실험에서, 150 nM의 Ab2 또는 AbMyo를 사용하여 인간 Fc 포착 팁 (포르테바이오) 상의 고정 부위를 포화시키고, 150 nM 피분석물의 회합 및 해리를 평가하였다.

[0359] 뮤린 단백질에 대한 결합 친화성의 분석을 또한 평가하였고, 이는 표 9b에서 제공된다. 잠재성 및 성숙 GDF8을 철저하게 인식하는 항체 (AbMyo2)로의 음성 선택을 통해 모든 성숙 및 잠재성 뮤린 GDF8을 샘플로부터 제거함으로써 뮤린 프로GDF8 단백질을 생산하였다. 50 nM의 항체를 사용하여 항-인간 Fc 포착 팁 (포르테바이오)을 포화시켰다. 먼저, 모든 항체를 단일의 200 nM 농도의 뮤린 프로GDF8, 뮤린 잠재성 GDF8, 및 성숙 GDF8에 대해 테스트하였다. 결합이 관찰되었으면, 항체를 앞서 기재된 바와 같이 고정하고, 3배 희석에 의해 200 내지 0.82 nM의 적정에서 피분석물을 사용함으로써, Kd 값을 결정하였다. 포르테바이오 데이터 분석 소프트웨어 8.2로 글로벌 피트(global fit)를 사용하여 Kd를 결정하였다. 성숙 미오스타틴에 결합하는 것에 대해, 5 ug/mL의 성장인자 (R&D 시스템즈)를 pH 5의 아세테이트 완충제 내의 아민 반응성 센서 팁 (포르테바이오)에 커플링시켰다. 모든 항체를 먼저 333 nM에서 이러한 미오스타틴-커플링 센서에 결합하는 것에 대해 테스트하였다. 그 후, 결합을 나타낸 항체를 3배 희석에 의해 333 내지 1.37 nM 범위의 농도에서 테스트하였다. 글로벌 피트를 사용하여, 상호작용의 Kd를 포르테바이오 데이터 분석 8.2를 사용하여 결정하였다.

[0360] 표 9b: 상이한 형태의 인간 및 뮤린 GDF8에 결합하는 것에 대한 항체의 비교

	Ab2	*AbMyo*
인간 프로 GDF8	2.9 E-09	-
인간 잠재성 GDF8	2.4 E-9	3.87E-10
인간 프라이밍된 GDF8	8.66E-09	8.83E-10
성숙 GDF8	-	4.7 E -11
뮤린 프로GDF8	2.3 E-09	-
뮤린 잠재성 GDF8	2.0 E-09	< 1 E-12

[0361]

[0362] 항원 결합 연구로부터의 결과가 표 9b에 요약된다. 검출가능한 결합이 없는 실험은 빼기 기호 (-)로 표기된다. < 1 E-12로 표지된 일부 값은 해리 속도가 매우 느려, 높은 친화성을 정량화할 수 없게 하였다. 놀랍게도, AbMyo가 재조합 프로GDF8을 인식할 수 없었고, 이는 문헌 [Latres et al. 2015]에서 보고된 결과와 상이하며, 상기 문헌에서 저자는 인공물을 생산할 수 있는 항체가 투여된 마우스의 혈청으로부터의 면역침전 실험에서 AbMyo와 프로GDF8의 회합을 보고하였다. 또 다른 놀라운 결과는 GDF8과 톨로이드-절단 프로도메인의 복합체인 Ab2 및 프라이밍된 GDF8 사이의 상호작용이다. Ab2는 프로도메인의 톨로이드 절단을 차단하기 때문에 이러한 결과는 예상밖이고, Ab2와 프로GDF8 및 잠재성 GDF8의 상호작용이 무손상 톨로이드 절단 부위를 필요로 하지 않는다는 것을 시사한다.

[0363] *Fc-영역 기능성의 평가*

[0364] 일부 실시양태에서, 항-프로/잠재성-미오스타틴 요법은 가용성 표적 (프로/잠재성-미오스타틴)에 결합하는 것 및 단백질분해적 활성화를 방지하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 이러한 프로세스에서 항체 의존적 세포-매개 세포독성 및 보체 고정이 수반되지 않는다. Ab1 및 그의 관련 변이체를 IgG4-Fc 영역을 함유하도록 조작하였다. 보체 성분 C1q 및 Fcɣ 수용체에 대한 약한 결합으로 인해 IgG4 항체는 일반적으로 이펙터 기능이 결여되는 것으로 이해된다.

[0365] 이펙터 기능에 대한 능력 감소를 입증하기 위해, Ab1 및 관련 항체를 CD64 (FcgRI) 및 C1q에 결합하는 것에 대해 ELISA에 의해 테스트하였다. 비교를 위해, Ab1의 IgG1 변이체를 또한 제조하였다. 이러한 검정법에서, IgG1에 비교하여 모든 IgG4 항체가 CD64 및 C1q에 대해 유의하게 더 약한 결합 (10 내지 20-배)을 나타냈다. EC50에서의 상대적 결합 값이 표 10에 열거된다.

[0366] 표 10: CD64에 대한 Ab2 및 관련 항체의 상대적 결합 친화성

항체	이소타입	상대적 CD64 결합 @ EC50(%)	상대적 C1q 결합 @ EC50(%)
Ab1-G1	IgG1	100	100
Ab1	IgG4 (S228P)	10	ND
Ab2	IgG4 (S228P)	5	8
Ab3	IgG4 (S228P)	5	5
Ab5	IgG4 (S228P)	8	9

[0367]

[0368] ND: 결정되지 않음

[0369] Ab1 및 그의 관련 변이체의 CD64 및 C1q에 대한 겉보기 결합 친화성이 다른 IgG4 임상 후보 항체와 유사하고, IgG1 이소타입의 항체에 비교하여 상당히 감소된다. 따라서, IgG4 항체의 생물학을 기초로, 항-프로/잠재성-미오스타틴 항체가 생체 내에서 감지가능한 이펙터 기능을 유도하지 않을 것으로 결론지어진다.

[0370] *동물 모델에서의 효능*

[0371] 시험관내 특징화를 기초로, 4개의 항체를 선택하여 생체내 연구에서 테스트하였다 (Ab7, Ab1, Ab8 및 Ab9). 이러한 연구의 목적은 이러한 4개의 후보 항체가 마우스에서 근육 질량을 조정하는 능력을 평가하는 것이었다. 암컷 SCID 마우스 열마리 (10마리)의 군 다섯개 (5개)에 주당 1회로 제0일, 제7일, 제14일, 제21일, 제28일, 및 제35일에 복강내 (IP) 주사에 의해 테스트 물품을 투여하였다. 테스트 물품 투여 전에 (제0일), 모든 동물이 악력 강도 평가를 받았다. 연구 마지막 날 (제42일)에 악력 강도 평가를 또한 수행하였다. 제0일에, 전체 혈구 계산 (CBC)의 평가를 위해 안와후방 출혈을 통해 혈액을 수집하였다. 투여 후, 동물을 체중 및 일반적인 건강 관찰에 대해 매일 평가하였다. 제42일에, 악력 강도 평가 후, 동물을 CO_2 과량투여로 희생시키고, CBC 평가를 위해 심장 천자를 통해 혈액을 수집하였다. 혈장 제조를 위해 추가적인 혈액을 수집하였다. 다양한 조직을 단리하고 칭량하였다. 수집된 근육은 하기와 같았다: 비복근, 흉근, 가자미근, 삼두근, 전경골근, 사두근 (대퇴직근) 및 횡경막. 수집된 기관은 하기와 같았다: 심장, 신장, 비장, 간 및 서혜부 백색 지방 조직. 조직학적 분석을 위해 포르말린 (다리 1) 및 OCT (다리 2)에 고정시킨 비복근 근육을 제외하고는 모든 조직을 칭량하고 급속 냉동시켰다.

[0372] *요약*

[0373] 연구 SCH-02의 동물에 대한 평균 일일 퍼센트 중량 변화 데이터가 도 6에서 제시된다. 5개의 군 모두의 동물이 매주 기준으로 체중이 증가하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, 항체 Ab1로 치료된 동물이 체중 증가가 가장 컸다 (14.6%). 비히클 (PBS) 대조군의 동물에 비교하여 Ab1로 치료된 동물만 평균 퍼센트 체중 변화에서 통계적으로 유의한 증가가 있었다 (도 6).

[0374] 절개된 근육에 대한 중량이 도 7 및 8에서 플롯팅된다. 비히클 (PBS) 대조군으로 치료된 동물에 비교하여 Ab1로 치료된 동물은 각각 27.6% 및 49.8%의 비복근 (도 7A) 및 횡경막 (도 8B) 중량의 통계적으로 유의한 증가가 있었다. Ab1로 치료된 동물로부터의 추가적인 근육이 PBS 대조군에 비교하여 중량 증가를 나타냈지만, 이러한 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 심장, 비장, 신장, 간 및 지방 조직의 평균 조직 중량에 대해서는 치료군 사이의 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

[0375] *SCID 용량 반응 연구*

[0376] 생체 내 연구 (상기)에서, 25 mg/kg의 Ab1이 매주 1회로 6주 동안 투여된 동물이 비히클 (PBS)이 투여된 동물에 비교하여 체중 및 근육 중량 (비복근 및 횡경막)의 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다. 다음으로, Ab1의 이러한 근육 강화 활성을 SCID 마우스에서의 용량 반응 연구에서 더욱 상세하게 조사하였다. 이러한 연구에서, Ab1의 용량을 높게는 60 mg/kg/wk로 증가시킴으로써 근육 질량에 대한 효과의 규모가 증가될 수 있는지 여부, 및 Ab1의 용량을 낮게는 2 mg/kg/wk로 감소시킴으로써 근육 질량에 대한 효과의 규모가 감소될 수 있는지 여부를 시험하였다. 이러한 연구에서, Ab1의 활성을 추가의 2개의 항체 (상기 기재된 연구에서 본래 테스트된 Ab8, Ab10)에 비교하였다.

[0377] 암컷 SCID 마우스 열마리 (10마리)의 군 열개 (10개)에 주당 2회로 제0일, 제3일, 제7일, 제10일, 제14일, 제17일, 제21일, 및 제24일에 복강내 (IP) 주사 (10 ml/kg)에 의해 테스트 물품을 투여하였다. 테스트 물품의 용량은 하기와 같았다: Ab1 (30 mg/kg, 10 mg/kg, 3 mg/kg 및 1 mg/kg), Ab10 (10 mg/kg 및 3 mg/kg), 및 Ab8 (10 mg/kg 및 3 mg/kg). 대조군에는 PBS 및 IgG-대조군 (30 mg/kg)을 투여하였다. 치료군이 표 11에 기재된다. 동물은 연구 시작 시에 10주령이었다. 제-4일에, 그리고 연구 전반에 걸쳐 투여일에 상응하는 주당 2회로 체중을 측정하였다. 신체 질량 조성 파라미터 (지방 질량, 제지방 질량 및 수 함량)을 에코 MRI (QNMR)로 제-4일, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일에 측정하였다. 1차 항체 용량 삼십일 (30일) 후에, 동물을 CO_2 과량투여로 희생시키고, CBC 평가 및 혈장 제조를 위해 심장 천자를 통해 혈액을 수집하였다. 추가적으로, 연구 종결 시, 다양한 조직을 단리하고 칭량하였다. 수집된 근육은 하기와 같았다: 비복근, 가자미근, 전경골근, 사두근 (대퇴직근) 및 횡경막. 연구 마우스의 우측 및 좌측 다리 둘 다로부터 근육을 절개하였다. 분석을 위해, 양쪽 다리로부터의 개별적인 근육의 중량을 합치고, 그램 단위의 평균 근육 중량을 계산하였다. 수집된 다른 조직은 하기와 같았다: 심장, 신장, 비장, 간 및 지방 조직. 조직학적 분석을 위해 포르말린 (좌측 다리) 및 OCT (우측 다리)에 고정시킨 비복근 근육을 제외하고는 모든 조직을 칭량한 후 급속 냉동시켰다.

[0378] 표 11: 연구 디자인

치료군	테스트 물품 용량	주당 용량 #	주당 총 용량	동물 ID
1	PBS 대조군	2	0	1-10
2	IgG 대조군 (30 mg/kg)	2	60 mg/kg/wk	11-20
3	Ab1 (30 mg/kg)	2	60 mg/kg/wk	21-30
4	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	31-40
5	Ab1 (3 mg/kg)	2	6 mg/kg/wk	41-50
6	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	51-60
7	Ab10 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	61-70
8	Ab10 (3 mg/kg)	2	6 mg/kg/wk	71-80
9	Ab8 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	81-90
10	Ab8 (3 mg/kg)	2	6 mg/kg/wk	91-100

[0379]

[0380] 비히클 (PBS), IgG 대조군 및 여러 용량의 Ab1로 치료된 동물에 대한 평균 퍼센트 중량 변화 및 평균 퍼센트 제지방 질량 변화 데이터가 도 9에서 제시된다. 20 및 60 mg/kg/wk 용량의 Ab1로 치료된 동물은 IgG 대조군으로 치료된 동물에 비교하여 연구 제28일에 각각 15.3% 및 14.4%의 유의한 체중 증가가 있었다 (도 9A). Ab1 (60, 20, 6 및 2 mg/kg/wk 용량)로 치료된 동물의 군 4개 모두가 IgG 대조군으로 치료된 동물에 비교하여 연구 제28일에 각각 14.1%, 12.4%, 17.1%, 및 15.5%의 제지방 질량의 통계적으로 유의한 증가가 있었다 (도 9B).

[0381] 4개의 근육 (사두근, 비복근, 전경골근 및 횡경막)에 대한 중량이 도 10에서 플롯팅된다. 가자미근을 또한 절개하였지만, 작은 크기의 이러한 근육은 극단적으로 가변적인 데이터 세트를 생성하였다. 모든 용량의 Ab1로 치료된 동물이 IgG 대조군 동물에 비교하여 근육 중량의 통계적으로 유의한 증가가 있었다 (도 10). IgG 대조군에 비교된 근육 질량의 평균 퍼센트 변화가 각각의 근육 그래프 상에서 상응하는 막대 위에서 제시된다. 사두근 근육에 대한 평균 퍼센트 중량 변화는 최고 용량에 대한 20.5% 내지 최저 용량에 대한 10.7% 범위였다 (도 10A). 비복근 근육에 대한 평균 퍼센트 중량 변화는 최고 용량에 대한 17.7% 내지 최저 용량에 대한 15.9% 범위였다 (도 10B). 전경골근 근육에 대한 평균 퍼센트 중량 변화는 최고 용량에 대한 24.0% 내지 최저 용량에 대한 18.0% 범위였다 (도 10C). 횡경막 근육에 대한 평균 퍼센트 중량 변화는 모든 용량 군에 대해 30%를 초과하였다 (도 10D). 심장, 비장, 신장, 간 및 지방 조직의 평균 조직 중량에 대해서는 치료군 사이의 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

[0382] *덱사메타손-유도 근육 위축 모델에서의 Ab1 치료*

[0383] 항-미오스타틴 항체 Ab1가 건강한 SCID 마우스에서 근육 질량을 증강시키는 능력을 고려하여, Ab1 치료가 근육 위축을 유도하는 치료로부터 동물을 또한 보호할 수 있는지 여부를 결정하였다. 동물을 2주 동안 그의 음용수 내의 덱사메타손으로 치료함으로써 코르티코스테로이드-유도 근육 위축의 모델이 확립되었다. 선택된 용량 (2.5 mg/kg/일)은 제지방 신체 질량 및 개별적인 뒷다리 근육의 질량의 유의한 감소를 유도할 수 있었다. 이어지는 실험에서, 동물을 여러 용량의 Ab1로 치료하여 이러한 덱사메타손-유도 근육 위축으로부터 동물을 보호할 수 있는지 여부를 결정하였다.

[0384] 이러한 연구에서, 수컷 마우스 (C57BL/6) 열마리 (10마리)의 군 여덟개 (8개)가 13.5주령에 연구에 등록되었다. 연구 제0일에 시작하여, 마우스에게 일반 음용수 (군 1-4) 또는 덱사메타손을 함유하는 물 (군 5-8)을 제공하였다. 테스트 물품을 주당 2회로 제0일, 제3일, 제7일 및 제10일에 복강내 (IP) 주사 (10 ml/kg)에 의해 투여하였다. 테스트 물품 및 용량은 하기와 같았다: PBS (군 1 및 5), 10 mg/kg IgG 대조군 (군 2 및 6), 10 mg/kg Ab1 (군 3 및 7), 및 1 mg/kg Ab1 (군 4 및 8). 치료군이 표 12에 기재된다. 연구 전반에 걸쳐 주당 적어도 2회로 체중을 측정하였다. 신체 질량 조성 파라미터 (지방 질량, 제지방 질량 및 수 함량)을 에코 MRI (QNMR)로 제-1일, 제6일, 및 제13일에 측정하였다. 1차 항체 용량 십사일 (14일) 후에, 동물을 CO_2 과량투여로 희생

시키고, 혈장 제조를 위해 심장 천자를 통해 혈액을 수집하였다. 추가적으로, 연구 종결 시, 다양한 조직을 단리하고 칭량하였다. 수집된 근육은 하기와 같았다: 비복근, 가자미근, 전경골근, 사두근 (대퇴직근) 및 횡경막. 연구 마우스의 우측 및 좌측 다리 둘 다로부터 근육을 절개하였다. 분석을 위해, 양쪽 다리로부터의 개별적인 근육의 중량을 합치고, 그램 단위의 평균 근육 중량을 계산하였다. 수집된 다른 조직은 하기와 같았다: 심장, 신장, 비장, 간 및 지방 조직. 조직학적 분석을 위해 포르말린 (좌측 다리) 및 OCT (우측 다리)에 고정시킨 비복근 근육을 제외하고는 모든 조직을 칭량한 후 급속 냉동시켰다.

[0385] 표 12: 덱사메탄손-유도 위축 모델 연구에 대한 치료군

치료군	음용수 내의 덱사메타손	테스트 물품 용량	주당 용량 #	주당 총 용량	동물 ID
1	없음	PBS 대조군	2	0	1-10
2	없음	IgG 대조군 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	11-20
3	없음	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	21-30
4	없음	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	31-40
5	2.5 mg/kg/일	PBS 대조군	2	0	51-60
6	2.5 mg/kg/일	IgG 대조군 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	61-70
7	2.5 mg/kg/일	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	71-80
8	2.5 mg/kg/일	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	81-90

[0386]

[0387] 이러한 실험에서, 마우스를 항-미오스타틴 항체 Ab1로 치료하는 것이 코르티코스테로이드-유도 근육 위축으로부터 동물을 보호할 수 있는지 여부가 결정되었다. 연구 동안, 체중을 매주 2회 측정하였고, 제지방 질량을 QNMR에 의해 제-1일, 제6일, 및 제13일에 측정하였다. 비-질환 대조군 (군 1) 및 덱사메타손 치료군 (군 5-8)의 동물에 대한 평균 퍼센트 중량 변화 및 평균 퍼센트 제지방 질량 변화 데이터가 도 11에서 제시된다. 제14일에 임의의 이러한 치료군 사이에 평균 퍼센트 체중 변화의 유의한 차이가 없었다 (도 11A). 마우스를 덱사메타손으로 2주 동안 치료하는 것으로 일반 음용수가 제공된 대조군 (군 1)에 비교하여 제지방 신체 질량이 유의하게 감소되었다 (군 5 및 6) (도 11B). 그러나, 덱사메타손 및 20 mg/kg/wk의 항체 Ab1 둘 다로 치료된 마우스 (군 7)는 대조군 (군 1)에 비교하여 연구의 제14일에 제지방 신체 질량의 퍼센트 변화에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 20 mg/kg/wk의 Ab1로 치료된 동물은 덱사메타손으로 치료된 대조군 (군 5 및 6) 중 어느 하나에 비교했을 때 제14일에 제지방 신체 질량의 퍼센트 변화에서 유의한 차이를 나타냈지만, 2 mg/kg/wk는 그렇지 않았다.

[0388] 덱사메타손 및 테스트 물품으로의 2주 치료가 끝났을 때, 개별적인 근육을 절개하고 칭량하였다. 2개의 근육 (비복근 및 사두근)에 대한 중량 데이터가 도 12A-12B에서 플롯팅된다. 음용수를 통해 덱사메타손이 제공되었고 또한 PBS 또는 IgG 대조군 항체가 제공된 동물은 비-질환 대조군 (군 1)에 비교하여 비복근 및 사두근 근육의 유의한 위축을 나타냈다 (군 5 및 6). 덱사메타손 및 20 mg/kg/wk의 Ab1 둘 다로 치료된 동물 (군 7)은 덱사메타손으로 치료된 대조군 (군 5 및 6) 중 어느 하나에 비교했을 때 근육 중량에서 유의한 차이를 나타냈지만, 2 mg/kg/wk는 그렇지 않았다. 추가적으로, 덱사메타손 및 20 mg/kg/wk의 항체 Ab1 둘 다로 치료된 마우스 (군 7)는 비-질환 대조군 (군 1)에 비교했을 때 비복근 및 사두근 중량에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 대조군 (군 1, PBS 및 물)의 평균 근육 중량에 비교된 각각의 군의 근육 중량의 평균 퍼센트 차이가 도 12C-12D에서 제시된다. PBS 및 IgG 대조군에서 덱사메타손 치료에 의해 유도된 비복근 질량의 퍼센트 감소는 각각 16.5% 및 18.9%였다. 대조적으로, 덱사메타손 및 20 mg/kg/wk의 Ab1 둘 다로 치료된 동물은 비복근 근육 질량 감소가 단지 4.0%였고, 이는 비-질환 대조군 (군 1)과 통계적으로 상이하지 않았다. 덱사메타손 및 2 mg/kg/wk Ab1 둘 다로 치료된 동물 (군 8)은 비복근 근육 질량 감소가 단지 10%인 한편, 이러한 군에 대한 근육 질량 감소는 PBS 및 IgG 대조군 (군 5 및 6)에 대한 감소와 통계적으로 상이하지 않았다. 유사한 결과가 사두

근 근육에 대해 나타났다 (도 12D).

[0389] *캐스팅-유도 근육 위축 모델에서의 Ab1 치료*

[0390] 항-미오스타틴 항체 Ab1가 건강한 SCID 마우스에서 근육 질량을 증강시키는 능력을 고려하여, Ab1 치료가 근육 위축을 유도하는 치료로부터 동물을 또한 보호할 수 있는지 여부를 연구하였다. 마우스의 우측 다리를 2주 동안 캐스팅함으로써 불사용 위축 모델이 확립되었다. 이러한 기간 동안 족저 굽힘 자세로 우측 다리와 발을 캐스팅하는 것은 개별적인 뒷다리 근육의 질량의 유의한 감소를 유도할 수 있었다. 이어지는 실험에서, 동물을 여러 용량의 Ab1로 치료하여 이러한 캐스팅-유도 근육 위축으로부터 동물을 보호할 수 있는지 여부를 결정하였다.

[0391] 표 13: 캐스팅-유도 위축 모델 연구에 대한 치료군

치료군	캐스팅	테스트 물품 용량	주당 용량 #	주당 총 용량	동물 ID
1	비-캐스팅	PBS 대조군	2	0	1-10
2	비-캐스팅	IgG 대조군 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	11-20
3	비-캐스팅	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	21-30
4	비-캐스팅	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	31-40
5	캐스팅됨	PBS 대조군	2	0	51-60
6	캐스팅됨	IgG 대조군 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	61-70
7	캐스팅됨	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	71-80
8	캐스팅됨	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	81-90

[0392]

[0393] 이러한 연구에서, 수컷 마우스 (C57BL/6) 열마리 (10마리)의 군 여덟개 (8개)가 14.5주령에 연구에 등록되었다. 연구 제0일에 시작하여, 마우스를 마취시키고, 족저 자세로 우측 뒷다리와 발을 캐스팅하였다 (군 5-8). 대조군 (군 1-4)을 또한 마취시켰지만, 뒷다리를 캐스팅하지 않았다. 테스트 물품을 주당 2회로 제0일, 제3일, 제7일 및 제10일에 복강내 (IP) 주사 (10 ml/kg)에 의해 투여하였다. 테스트 물품 및 용량은 하기와 같았다: PBS (군 1 및 5), 10 mg/kg IgG Ctl (군 2 및 6), 10 mg/kg Ab1 (군 3 및 7), 및 1 mg/kg Ab1 (군 4 및 8). 치료군이 표 13에 기재된다. 연구 전반에 걸쳐 주당 적어도 2회로 체중을 측정하였다. 신체 질량 조성 파라미터 (지방 질량, 제지방 질량 및 수 함량)을 에코 MRI (QNMR)로 제-1일, 제7일, 및 제14일에 측정하였다. 1차 항체 용량 십사일 (14일) 후에, 동물을 CO_2 과량투여로 희생시키고, 혈장 제조를 위해 심장 천자를 통해 혈액을 수집하였다.

[0394] 추가적으로, 다양한 조직을 단리하고 칭량하였다. 수집된 근육은 하기와 같았다: 비복근, 가자미근, 족저근, 전경골근, 및 사두근 (대퇴직근). 분석을 위해, 동물의 우측 뒷다리로부터의 개별적인 근육의 중량을 수집하였다. 수집된 다른 조직은 하기와 같았다: 심장, 지방 조직 및 비장. 조직학적 분석을 위해 포르말린에 고정시킨 비복근 근육을 제외하고는 모든 조직을 칭량한 후 급속 냉동시켰다.

[0395] *요약*

[0396] 이러한 실험에서, 마우스를 항-미오스타틴 항체 Ab1로 치료하는 것이 우측 뒷다리를 캐스팅하는 것에 의해 유도된 불사용 근육 위축으로부터 마우스를 보호할 수 있는지 여부를 테스트하였다. 연구 동안, 체중을 매주 2회 측정하였고, 제지방 질량을 QNMR에 의해 제-1일, 제7일, 및 제14일에 측정하였다. 비-질환 대조군 (군 1) 및 2주 동안 캐스팅된 군 (군 5-8)의 동물에 대한 평균 퍼센트 중량 변화 및 평균 퍼센트 제지방 질량 변화 데이터가 도 13에서 제시된다. 우측 뒷다리를 캐스팅하는 것은 체중 증가에 대한 어떠한 음성 효과도 없었고 (도 13A), 군의 제지방 질량에서의 어떠한 차이도 유의하지 않았다 (도 13B).

[0397] 2주 연구가 끝났을 때, 개별적인 근육을 절개하고 칭량하였다. 2개의 근육 (비복근 및 사두근)에 대한 중량 데이터가 도 14A-14B에 플롯팅된다. 다리가 캐스팅되었고 또한 PBS 또는 IgG 대조군 항체가 제공된 동물은 캐스팅되지 않은 대조군 (군 1)에 비교하여 비복근 및 사두근 근육의 유의한 위축을 나타냈다 (군 5 및 6). 캐스팅되었고 또한 20 mg/kg/wk의 Ab1이 투여된 동물 (군 7)은 캐스팅된 대조군 (군 5 및 6) 중 어느 하나에 비교했을 때 근육 중량에서 유의한 차이를 나타냈지만, 2 mg/kg/wk는 그렇지 않았다. 추가적으로, 20 mg/kg/wk의 항체 Ab1로 치료된 캐스팅된 마우스 (군 7)는 캐스팅되지 않은 대조군 (군 1)에 비교했을 때 비복근 및 사두근 중량에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 캐스팅되지 않은 대조군 (군 1)의 평균 근육 중량에 비교된 각각의 군의 근육 중량의 평균 퍼센트 차이가 도 14C-14D에서 제시된다. PBS 및 IgG 대조군에서 캐스팅에 의해 유도된 비복근 질량의 퍼센트 감소는 각각 22.8% 및 23.5%였다. 대조적으로, 20 mg/kg/wk의 Ab1로 치료된 캐스팅 마우스는 비복근 근육 질량 감소가 단지 10.0%였다. 이러한 차이는 PBS 및 IgG 대조군 항체가 제공된 캐스팅된 대조군 (군 5 및 6)과 통계적으로 상이한 것으로 밝혀졌다. 2 mg/kg/wk Ab1로 치료된 캐스팅된 마우스에 대한 근육 질량 감소는 PBS 및 IgG 대조군 (군 5 및 6)에 대한 감소와 통계적으로 상이하지 않았다. 유사한 결과가 사두근 근육에 대해 나타났다 (도 14D).

[0398] 프로테아제 절단 부위가 지시된, 프로미오스타틴 및 잠재성 미오스타틴의 도메인 구조가 도 16A에서 제시된다. SDS PAGE 겔 상에 러닝된, 부분적으로 프로단백질 컨버타제로 절단된 프로미오스타틴의 예가 도 16B에서 제시된다. 환원 조건 하에, 프로미오스타틴 단량체 (~50 kD), 프로도메인 (~37 kD) 및 성장 인자 (12.5 kD)로 단백질 밴드가 이루어졌다.

[0399] Ab1은 프로미오스타틴 및 잠재성 미오스타틴에 특이적으로 결합하고, TGFβ 슈퍼패밀리의 다른 구성원, 특히 상응하는 형태의 GDF11에 대해서는 결합이 관찰되지 않는다 (도 17A). Ab1을 지시된 항원으로 코팅된 포르테-바이오 BLI 팁에 고농도 (50 ug/mL)로 투여하고, 온 및 오프 속도를 측정하여 대략적인 Kd 값을 수득하였다. 결합 이벤트를 지시하는 바이오센서 반응의 크기가 그래프로 흑색 막대에 의해 표시되고, 계산된 Kd가 주황색으로 지시된다. 추가로, Ab1이 프로미오스타틴의 활성화를 차단하지만, 프로GDF11는 그렇지 않다 (도 17B).

[0400] *Ab1, Ab2, Ab4 및 Ab6으로의 SCID 용량 반응 연구*

[0401] 이전의 Ab1로의 생체 내 연구는 Ab1이 건강한 동물에서 근육 질량을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 근육 위축 (덱사메타손 및 캐스팅 유도 위축)의 마우스 모델에서 근육 상실을 방지할 수 있음을 입증하였다. 항체 조작 시도로 시험관 내 특성이 Ab1보다 양호한 3개의 항체가 식별되었다. 이러한 연구에서, SCID 마우스에서, 3종의 상이한 용량으로 이러한 항체의 생체 내 활성을 이미 확립된 Ab1 활성에 비교하였다.

[0402] 암컷 SCID 마우스 여덟마리 (8마리)의 군 열네개 (14개)에 테스트 물품을 주당 2회로 제0일, 제3일, 제7일, 제10일, 제14일, 제17일, 제21일 및 제24일에 복강내 (IP) 주사 (10 ml/kg)에 의해 투여하였다. 테스트 물품의 용량은 하기와 같았다: Ab1, Ab2, Ab4 및 Ab6을 3종의 상이한 용량 (10 mg/kg, 1 mg/kg, 및 0.25 mg/kg)으로 제공하였고, IgG-대조군 항체를 10 mg/kg으로 제공하였다. 치료군이 표 14에 기재된다. 동물은 연구 시작 시에 10주령이었다. 연구 전반에 걸쳐 투여일에 상응하는 주당 2회로 체중을 측정하였다. 신체 질량 조성 파라미터 (지방 질량, 제지방 질량 및 수 함량)을 에코 MRI (QNMR)로 제0일, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일에 측정하였다. 1차 항체 용량 이십팔일 (28일) 후에, 동물을 CO_2 과량투여로 희생시키고, 혈장 제조를 위해 심장 천자를 통해 혈액을 수집하였다.

[0403] 추가적으로, 다양한 조직을 단리하고 칭량하였다. 수집된 근육은 하기와 같았다: 비복근, 가자미근, 전경골근, 사두근 (대퇴직근), 지신근, 및 횡경막. 연구 마우스의 우측 및 좌측 다리 둘 다로부터 근육을 절개하였다. 분석을 위해, 양쪽 다리로부터의 개별적인 근육의 중량을 합치고, 그램 단위의 평균 근육 중량을 계산하였다. 수집된 다른 조직은 하기와 같았다: 심장, 신장, 비장, 간 및 지방 조직. 조직학적 분석을 위해 포르말린에 고정시킨 좌측 비복근 근육을 제외하고는 모든 조직을 칭량한 후 급속 냉동시켰다.

[0404] 표 14: 용량 반응 모델 연구에 대한 치료군

치료군	테스트 물품 용량	주당 용량 #	주당 총 용량	동물 ID
1	PBS 대조군	2	0	1-8
2	IgG 대조군 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	9-16
3	Ab1 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	17-24
4	Ab1 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	25-32
5	Ab1 (0.25 mg/kg)	2	0.5 mg/kg/wk	33-40
6	Ab2 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	41-48
7	Ab2 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	49-56
8	Ab2 (0.25 mg/kg)	2	0.5 mg/kg/wk	57-64
9	Ab4 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	65-72
10	Ab4 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	73-80
11	Ab4 (0.25 mg/kg)	2	0.5 mg/kg/wk	81-88
12	Ab6 (10 mg/kg)	2	20 mg/kg/wk	89-96
13	Ab6 (1 mg/kg)	2	2 mg/kg/wk	97-104
14	Ab6 (0.25 mg/kg)	2	0.5 mg/kg/wk	105-112

[0405]

[0406] 비히클 (PBS), IgG 대조군, 및 상이한 용량의 Ab1, Ab2, Ab4 및 Ab6로 치료된 동물에 대한 평균 퍼센트 제지방 질량 변화 (제0일로부터의 변화) 데이터가 도 15에서 제시된다. 20 mg/kg/wk 용량 수준의 Ab1, Ab2, Ab4, 및 Ab6으로 치료된 동물은 연구 제21일 및 제28일에 IgG 대조군 및 비히클 (PBS) 치료 동물에 비교하여 제지방 질량의 유의한 증가가 있었다. 2 mg/kg/wk 용량 수준의 Ab1 및 Ab2로 치료된 동물 또한 연구 제21일 및 제28일에 제지방 질량의 유의한 변화가 있었다. 0.5 mg/kg/wk 용량 수준의 Ab1, Ab2, Ab4 및 Ab6으로 치료된 동물에 대해서는 대조군으로부터의 제지방 질량의 유의한 변화가 없었다.

[0407] 연구 종결 시 (제28일), 근육을 수집하고 칭량하였다. 사두근 (대퇴직근) 및 비복근 근육에 대한 중량이 도 18A 및 18B에서 플롯팅된다. 20 mg/kg/wk 용량 수준의 Ab1, Ab2, Ab4, 및 Ab6로 치료된 동물은 비히클 (PBS)로 치료된 동물에 비교하여 비복근 및 사두근 (대퇴직근) 근육 중량이 유의하게 증가되었다. 2 mg/kg/wk 용량 수준의 Ab2 및 Ab4로 치료된 동물 또한 비복근 근육 중량이 유의하게 변화되었다. 2 mg/kg/wk 용량 수준의 Ab2로 치료된 동물은 사두근 (대퇴직근) 근육 중량 또한 유의하게 변화되었다. 0.5 mg/kg/wk 용량 수준의 Ab1, Ab2, Ab4 및 Ab6으로 치료된 동물에 대해서는 대조군으로부터의 근육 질량에서 유의한 변화가 없었다. 여러 용량의 Ab1, Ab2, Ab4 및 Ab6으로 치료된 동물의 비복근 및 사두근 (대퇴직근) 근육 중량의 퍼센트 차이 (비히클군에 비교했을 때)가 도 18C에 열거된다.

[0408] *SCID 마우스에서의 Ab1로의 작용 기간 연구*

[0409] Ab1이 SCID 마우스에서 단일 용량 및 3회의 매주 용량 후에 제지방 질량을 증가시키는 능력을 테스트하였다. 제0일에 1회 (군 1-4), 또는 제0일, 제7일 및 제14일에 주당 1회로 (군 5-7), 암컷 SCID 마우스 여덟마리 (8마리)의 군 일곱개 (7개)에 테스트 물품을 복강내 (IP) 주사 (10 ml/kg)에 의해 투여하였다. 표 15를 참조한다. 항체 (IgG 대조군, Ab1 및 AbMyo)를 10 mg/kg으로 투여하였다. 동물은 연구 시작 시에 10 내지 11주령이었다. 연구 전반에 걸쳐 투여일에 상응하는 주당 2회로 체중을 측정하였다. 신체 질량 조성 파라미터 (지방 질량, 제지방 질량 및 수 함량)을 에코 MRI (QNMR)로 제0일, 제7일, 제14일, 및 제21일에 측정하였다.

[0410] 표 15: 치료군 및 투여 빈도

치료군	테스트 물품	용량 (mg/kg)	투여 빈도
1	PBS 대조군	0	1회
2	IgG 대조군	10	1회
3	Ab1	10	1회
4	AbMyo	10	1회
5	IgG 대조군	10	1회 매주
6	Ab1	10	1회 매주
7	AbMyo	10	1회 매주

[0411]

[0412] 비히클 (PBS), IgG 대조군, Ab1, AbMyo로 치료된 동물에 대한 평균 퍼센트 제지방 질량 변화 데이터가 도 19에서 제시된다. 데이터는 연구 제0일로부터의 제지방 질량의 변화로서 표현된다. 단일 용량의 테스트 물품 21일 후에, Ab1 (군 3)로 치료된 동물은 (IgG 대조군 동물 - 군 1에 비교하여) 제지방 질량이 유의하게 증가하였고, 이는 3회 용량의 Ab1 (군 6) 후의 제지방 질량 변화와 구별할 수 없었다. 제지방 질량의 이러한 변화는 단일 용량 (군 4) 또는 3회의 매주 용량 (군 7)의 AbMyo로 치료된 동물에서 나타난 변화에 또한 필적하였다.

[0413] *실시예 3: 화학/제약 과학*

[0414] Ab2는 228번 위치에서 프롤린이 세린을 치환한 IgG4 아유형의 인간화 모노클로날 항체이다. 이는 IgG1-유사 힌지 서열을 생성시키고, IgG4의 특징인 쇄간 디술피드 다리의 불완전한 형성을 최소화한다. Ab2의 중쇄 및 경쇄의 완전한 아미노산 서열이 하기에서 제시된다. 상보성 결정 영역 (CDR)에 밑줄에 그어진다. 볼드체 NST 서열: N-연결 글리코실화 컨센서스 서열 부위; 볼드체 DP 서열은 잠재적인 절단 부위이고; 볼드체 NX 서열 (여기서 X는 S, T, 또는 G일 수 있음)은 잠재적인 탈아미드화 부위이고; 볼드체 DX 서열 (여기서 X는 G, S, T, 또는 SDG일 수 있음) 잠재적인 이성질체화 부위이고; 볼드체 메티오닌은 잠재적인 메티오닌 산화 부위이며; 볼드체 Q는 예상되는 N-말단 피로글루탐산이다 (도 21A-21B).

[0415] Ab1의 분자 모델링에서 여러 개의 잠재적인 번역-후 변형 부위가 식별되었다. 경쇄 내의 2개의 아스파라긴 및 중쇄 내의 7개의 아스파라긴이 탈아미드화에 대해 감수성이다. 이러한 잔기 중 2개는 중쇄의 CDR 영역 내에 위치한다.

[0416] 천연 IgG4 mAb는 중쇄-간 디술피드 다리의 불완전한 형성이 있을 수 있고, 이때 2개의 절반 분자 (각각 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄를 함유함)가 무손상 항체 구조 내에서 비공유결합 상호작용에 의해 유지된다. IgG4 분자는 시험관 내 및 생체 내에서 절반-분자가 교환되는 경향이 있을 수 있고, 제작 뱃치에 걸쳐 절반 분자의 수준이 일관적이어야 한다. IgG4 구조의 백본에서 Ser이 Pro으로 치환되는 것은 IgG1-유사 힌지 서열을 생성하고, 이에 의해 쇄간 디술피드 결합의 형성을 가능하게 하고 항체 구조를 현저하게 안정화시킨다. 비-환원 모세관 전기영동 및 유리 술프히드릴의 정량화와 같은 검정법을 사용하여, 확장 특징화로 개발하는 동안 힌지 영역의 무결성 및 안정성을 모니터링한다. 쇄 스와핑에 대한 잠재력을 생체 내에서 모니터링한다.

[0417] *요약*

[0418] 프로미오스타틴 및/또는 잠재성 미오스타틴의 활성화를 차단하는 프로/잠재성-미오스타틴-특이적 항체가 본원에 제공된다. 이러한 활성화-차단 항체를 건강한 마우스에 투여하는 것은 제지방 신체 질량 및 근육 크기를 증가시키고, 이때 1개월 기간에 걸쳐 근육-강화 효과를 유지하는데 단일 용량만이 필요할 뿐이다. 추가적으로, 항체 투여는 건강한 마우스를 근육 소모의 2개의 별개의 모델에서 근육 위축으로부터 보호한다. 이러한 데이터는 미오스타틴 활성화를 차단하는 것이 생체 내에서 강건한 근육 성장을 촉진하고 근육 위축을 방지하고, 근육 소모의 치료적 개입에 대한 대안적인 메카니즘을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0419] *실시예 4: 근육 위축에서의 프로- 및 잠재성-미오스타틴의 분석*

[0420] 근육 위축 동안, 뿐만 아니라 정상 상태 동안 근육 조직 및 순환 내의 프로 및 잠재성 미오스타틴의 존재를 결정하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 근육 위축의 표준 모델은 마우스를 2.5 mg/kg/주 덱사메타손 (음용수 내에 투여됨)으로 치료하는 것을 수반하고, 2주의 치료 후 근육 및 혈장을 수집하였다. 이러한 모델은 치료 과정에 걸쳐 정기적으로 근육 질량의 15-25% 감소에 이른다. 덱사메타손으로 치료되지 않은 마우스로부터 동시에 대조군 근육 및 혈장을 수집하였다. 대퇴직근, 전경골근, 및 가자미근을 절개해 내고, 액체 질소에서 급속 냉동시키고, 사용할 준비가 될 때까지 -80℃에서 보관하였다. 분쇄에 이어서 프로테아제 및 포스페이트 억제제가 보충된 T-PER 완충제에서 용해시킴으로써 근육 용해물이 생성되었다. 표준 방법으로 혈장을 수집하고, -80℃에서 보관하였다.

[0421] 동일한 농도의 단백질을 함유하는 다중 샘플을 PAGE 겔로 분리하고, PVDF 막 상으로 웨스턴 블롯팅하였다. 근육 용해물에 대해, 10-50 ng의 총 단백질을 겔 상에 로딩하였다. 혈장을 PBS에서 1:10 희석하고, 10 μl의 각각의 샘플을 겔 상에 로딩하였다. 크기 표준물로서, 0.1-1 ng 재조합 프로 및/또는 잠재성 미오스타틴도 겔 상에 로딩하였다. 미오스타틴 단백질의 식별을 미오스타틴의 프로도메인을 인식하는 항체 (AF1539, R&D 시스템즈)를 사용하여 수행하였다. 이러한 분석은 프로미오스타틴이 근육 내의 우세한 형태인 한편, 잠재성 미오스타틴이 혈장 내의 주요 형태임을 나타낸다 (도 25). 추가로, 덱사메타손으로 근육 위축이 유도된 마우스에서, 근육 조직에서 프로미오스타틴이 증가되는 한편, 혈장에서 잠재성 미오스타틴이 감소된다는 것이 입증되었다.

[0422] 이러한 결과를 확증하기 위해, 형광 표지화 및 검출 (아주레 바이오시스템즈(Azure Biosystems))을 사용하여 웨스턴 블롯을 반복하였다. 정상 마우스 및 덱사메타손-치료 마우스로부터의 혈장 및 대퇴직근 및 전경골근 근육 내의 각각의 미오스타틴 형태의 상대적 수준을 정량화하였다. 이러한 데이터는 양쪽 근육에서의 프로미오스타틴의 2 내지 2.5배 증가, 및 혈장에서의 잠재성 미오스타틴의 2.3배 감소를 나타내어, 상기 기재된 결과를 확증한다 (도 26).

[0423] 이러한 데이터를 기초로, 정상 및 질환 근육에서의 미오스타틴 "흐름"에 대한 모델이 제공된다. 입증된 바와 같이, 정상 근육에서는 (도 28A), 프로미오스타틴이 근육에서 생산되고, 푸린 프로테아제에 의한 절단을 통해 잠재성 미오스타틴으로 전환되며, 이는 세포의 내부 또는 외부에서 발생할 수 있다 (Anderson et al., 2008). 그 후, 근육 내의 잠재성 미오스타틴의 일부 분획이 순환 내로 방출되어, 잠재성 미오스타틴의 순환 풀을 형성한다. 근육 위축에서는, 활성 미오스타틴 성장 인자의 증가가 일어나서, 근육 위축을 구동시킨다. 이러한 증가는 근육 내의 프로미오스타틴 수준의 상향조절 및 잠재성 미오스타틴이 활성 성장 인자로 전환되는 것의 증가에 의해 야기되는 것으로 생각된다 (도 28B). 근육 내의 프로미오스타틴 증가를 나타내어, 여기서 개요된 데이터는 이러한 모델의 제1 단계를 직접적으로 지지한다. 근육 내의 잠재성 미오스타틴의 부수적인 증가 없이 성숙 미오스타틴의 생산 증가를 가리켜서, 데이터는 덱사메타손-치료 마우스에서의 근육 질량 감소가 관찰됨에 따라 제2 단계를 또한 지지한다. 따라서, 혈장 내의 미오스타틴의 수준이 감소되고, 이는 성숙 미오스타틴으로의 전환 증가를 시사한다.

[0424] *실시예 5: 뮤린 혈청 및 근육 조직으로부터의 면역침전*

[0425] 순환 내의 프로미오스타틴의 존재를 결정하고, Ab2 및 AbMyo가 혈청 및 근육 내의 내인성 미오스타틴 전구체에 결합하는 것을 연구하기 위해, 면역침전을 수행하였다. Ab2는 근육 내의 주요 형태의 미오스타틴을 인식한다. 도 27에 제시된 결과는 혈청 프로미오스타틴의 풀이 Ab2로 침전된다는 것을 입증하여, 생체 내에 세포외 프로미오스타틴이 존재한다는 것을 시사한다. 혈청 내의 프로미오스타틴, 잠재성 미오스타틴, 및 다른 부분적으로 프로세싱된 형태의 미오스타틴에 결합하는 것에 더하여, Ab2는 근육 추출물로부터 프로미오스타틴을 면역침전시킨다. 대조적으로, AbMyo는 근육 내의 프로미오스타틴과의 검출가능한 상호작용이 없으면서 혈청 내의 잠재성 미오스타틴 및 부분적으로 프로세싱된 전구체에 효율적으로 결합하였다. 근육은 미오스타틴 신호전달이 발생하는 부위라는 것을 고려하여, 이는 Ab2 작용 메카니즘에 중요한 장점을 제공할 수 있다.

[0426] 균질화된 근육 용해물을 하기와 같이 제조하였다: 냉동된 마우스 사두근을 크라이오프렙(CryoPrep) 분쇄기 (코바리스(Covaris), 매사추세츠주 워번)로 분쇄하였다. 그 후, 분쇄된 근육을 M-Per 완충제 (써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific))와 EDTA 무함유 1x 홀트(Halt)™ 프로테아제 및 포스파타제 억제제 칵테일 (써모피셔 사이언티픽)에 50 mg/mL의 농도로 재현탁시켰다. 그 후, 플라스틱 막자 (바이오-플라스(Bio-Plas) 카탈로그 #4030-PB)를 사용하여 조직을 분쇄하고, 컷-오프 피펫 팁으로 반복적으로 피펫팅하여 추가로 균질화시켰다. 그 후, 근육 샘플을 30분 동안 4℃에서 엔드-오버-엔드 회전시키면서 인큐베이션하였다. 마지막으로, 샘플을

16,100 g에서 10분 동안 원심분리시켜, 불용성 분획을 펠릿화시켰다. 가용성 분획을 흡인해 내어, 하류 실험에서 사용하였다.

[0427] 면역침전을 위해, 써모 사이언티픽의 피어스(Pierce)™ 공동-면역침전 키트를 제조사의 지침서에 따라 사용하여 Ab2, IgG 대조군, 또는 AbMyo 항체를 아가로스 비드에 공유결합으로 접합시켰다. 75 ug의 각각의 항체를 50 uL의 비드 슬러리에 접합시키고, 30 ug의 항체를 각각의 면역침전에서 이용하였다. 3 mL의 풀링된 정상 마우스 혈청 (바이오레클레메이션(Bioreclamation)) 또는 1.05 mL의 상기 기재된 바와 같이 제조된 균질화된 가용성 마우스 사두근에 대해 면역침전을 수행하였다. 항체가 접합된 비드 및 샘플을 엔드-오버-엔드로 흔들면서 4℃에서 밤새로 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, QIAvac 24 플러스(QIAvac 24 Plus) 진공 매니폴드 (퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 전체 샘플 부피를 공동-면역침전 키트 내에 포함된 스핀 필터에 통과시킴으로써 비드를 회수하였다. 그 후, 키트의 지침서에 따라 비드를 200 uL의 IP 용해/세정 완충제로 3x 세정하고, 100 μL의 1x 컨디셔닝 완충제로 1회 세정하였다. 50 μL의 용출 완충제로 5분 동안 용출을 수행한 후, 수집 튜브에서 5 μL의 1 M 트리스(Tris), pH 9.5와 혼합하였다.

[0428] 테스트 항체가 끌어 내린 미오스타틴 종을 AF1539 (R&D 시스템즈), ab124721, (앱캠(Abcam)), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 680 어피니퓨어(AffiniPure) 당나귀 항-양 IgG (H+L) (잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)), 및 IRDye® 800CW 당나귀 항-토끼 IgG (H + L) (LI-COR 바이오사이언시즈(LI-COR Biosciences))를 이용하여 웨스턴 블롯팅에 의해 가시화하였다. 써모 사이언티픽(Thermo Scientific)의 시 블록(SEA BLOCK) 차단 완충제를 차단 및 1차 항체 인큐베이션에 이용하였다.

[0429] *실시예 6: Ab2로 치료된 래트에서의 근육 질량 증가 및 미오스타틴 단백질 발현 변경*

[0430] **연구 디자인**

[0431] 7 내지 8주령 암컷 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트에게 단일 정맥내 용량의 Ab2 (10 mg/kg), 비-기능성 인간 IgG 대조군 항체 (10 mg/kg), 또는 등가 부피의 포스페이트 완충 염수 (PBS)를 투여하였다. 연구 과정 동안, 투여하고 나서 4시간, 48시간, 7일, 14일, 21일, 및 28일 후에 군당 3마리의 래트로부터 혈청을 수집하였다. 표준 방법에 의해 수집하였고, 샘플을 -80℃에서 보관하였다. 제지방 질량을 정량적 핵 자기 공명 (qNMR)에 의해 기준선 (제0일 투여 전) 및 제7일, 제14일, 제21일, 및 제28일 (8마리의 래트/군)에 측정하고, 연구 종료 시에 (제28일) 골격 근육 (대퇴직근, 전경골근, 및 가자미근)을 수집하고, -80℃에서 보관하기 위해 액체 질소에서 급속 냉동시켰다.

[0432] **결과**

[0433] 기지량의 각각의 약물을 참조 표준으로서 사용하여 인간 IgG에 대해 특이적인 ELISA를 사용하여 혈청 샘플에서 약물 노출을 측정하였다. 도 29에 나타난 바와 같이, 주사 4시간 후, Ab2 및 IgG 대조군 항체 둘 다가 래트 혈청에서 검출된다. 연구가 진행됨에 따라, Ab2가 IgG 대조군에 비교하여 상승된 순환 약물 수준을 나타내고, 연구 종결 시에는 혈청 내의 약물이 평균 17.1 μg/ml이다.

[0434] Ab2 치료의 약역학 효과를 연구 과정 동안의 제지방 질량 측정 (qNMR에 의해) 및 연구 종결 시의 절개 근육의 중량의 결정 둘 다에 의해 평가하였다. 도 30A는 연구 과정 동안의 제지방 질량 측정을 나타내고, 여기서 Ab2로 치료된 래트는 PBS 또는 인간 IgG 대조군 항체로 치료된 래트에 비교하여 제지방 질량의 명확한 증가를 입증한다. 연구 종결 (제28일) 시에 전체 골격 근육을 수집하고 칭량함으로써 근육 질량을 측정하였다. 도 30B에 나타난 바와 같이, Ab2로 치료된 래트는 대퇴직근 및 전경골근 근육 질량에서 각각 14% 및 11%의 증가를 나타낸다. 총괄적으로, 이러한 데이터는 래트를 단일 용량의 Ab2로 치료하는 것이 오래 지속되는 근육 질량 증가에 이른다는 것을 가리킨다.

[0435] 프로 및 잠재성 미오스타틴의 상대적 수준을 근육 용해물 또는 혈청 샘플의 정량적 웨스턴 블롯팅에 의해 결정하였다. 급속 냉동된 근육 샘플로부터 분쇄에 이어서 프로테아제 및 포스파타제 억제제가 보충된 T-PER 완충제에서 용해시킴으로써 근육 용해물을 생성시켰다. 용해 후, 동일한 농도의 단백질을 함유하는 샘플을 PAGE 겔로 분리하고, 저형광 PVDF 막 상으로 웨스턴 블롯팅하였다. 근육 용해물에 대해, 10-50 ng의 총 단백질을 겔 상에 로딩하였다. 혈장을 PBS에서 1:10 희석하고, 10 μl의 각각의 샘플을 겔 상에 로딩하였다. 크기 표준물로서, 0.1-1 ng 재조합 프로 및/또는 잠재성 미오스타틴도 겔 상에 로딩하였다. 잠재성 미오스타틴의 프로도메인을 인식하는 항체 (AF1539, R&D 시스템즈)를 사용한 후, 형광 표지된 2차 항체로 검출하여, 미오스타틴 단백질의 식별을 수행하였다. 모든 웨스턴 블롯 분석에 대해, 군당 최소 3개의 샘플을 검정하였다.

[0436] Ab2 치료는 래트 혈청 내의 잠재성 미오스타틴 수준을 IgG 대조군-치료 래트에 비교하여 ~20배만큼 증가시킨다

(도 31A). 이러한 데이터는 다른 항체 약물로 나타난 효과와 일관되어, 순환 내의 약물 표적의 결합을 반영한다. 래트 근육 (대퇴직근)에서, Ab2 치료는 잠재성 형태의 미오스타틴의 1.9x 증가 (IgG 대조군-치료 래트에 대비하여)에 이른다. 프로미오스타틴의 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않는다. 이러한 데이터는 Ab2가 그의 표적인 프로/잠재성 미오스타틴에 결합하고, 근육, 뿐만 아니라 순환 내의 미오스타틴 프로세싱을 변경시킨다는 것을 가리킨다. Ab2 치료가 래트 근육에서 잠재성 미오스타틴을 증가시키지만 프로미오스타틴은 그렇지 않다는 것이 또한 관찰되었다 (도 31B).

[0437] *실시예 7: Ab2로 치료된 마우스에서의 근육 질량 증가 및 미오스타틴 단백질 발현의 변경, 및 비교물 항-미오스타틴 항체에 대한 비교*

[0438] **연구 디자인**

[0439] 10주령 수컷 SCID 마우스에게 단일 복강내 용량 (5 mg/kg)의 Ab2, 비-기능성 인간 IgG 대조군 항체, 또는 미오스타틴/수용체 상호작용을 차단함으로써 작용하는 비교물 항체 (AbMyo)를 투여하였다. 연구 과정 동안, 투여하고 나서 1시간, 4시간, 48시간, 7일, 14일, 21일, 28일, 및 56일 후에 혈청 및 골격 근육을 수집하였다. 표준 방법으로 혈청을 수집하였고, 샘플을 -80℃에서 보관하였다. 골격 근육 (대퇴직근, 전경골근, 및 가자미근)을 수집하고, 칭량하고, -80℃에서의 보관을 위해 액체 질소에서 급속 냉동시켰다. 정량적 핵 자기 공명 (qNMR)에 의해 기준선 (제0일 투여 전)에, 그리고 연구 과정에 걸쳐 매주 제지방 질량을 측정하였다.

[0440] **결과**

[0441] 연구 과정 동안 제지방 질량을 (qNMR에 의해) 측정함으로써 Ab2 치료의 효과를 평가하였다. 도 32는 연구 과정 동안의 제지방 질량 측정치를 나타내고, 여기서 Ab2로 치료된 마우스는 인간 IgG 대조군 항체로 치료된 마우스에 비교하여 제지방 질량의 명확한 증가를 입증한다. 연구의 첫 3주에 대해, 비교물 항체 (AbMyo)로 치료된 마우스가 Ab2 군에서의 것과 등가인 제지방 질량 증가를 나타낸다. 그러나, 투여 28일 후에, AbMyo-치료 마우스는 증가된 제지방 질량을 유지하지 않는다. 대조적으로, Ab2-치료군의 마우스는 이들의 증가된 제지방 질량을 연구 기간 (56일) 전반에 걸쳐 유지한다. 이러한 데이터는 Ab2가 AbMyo보다 작용 기간이 더 길다는 것을 시사한다.

[0442] 인간 IgG에 대해 특이적인 ELISA와 참조 표준으로서 사용된 기지량의 각각의 약물을 사용하여 혈청 샘플에서 약물 노출을 측정하였다. 도 33에 나타난 바와 같이, 빠르게는 주사 1시간 후에, Ab2 및 비교물 항체 (AbMyo) 둘 다가 혈청에서 검출되고, 연구 전반에 걸쳐 > 1 μg/ml 수준의 양쪽 항체를 검출할 수 있다. 그러나, Ab2가 AbMyo보다 유의하게 더 긴 반감기 및 추정 곡선하 면적 (AUCINF)을 나타내고, 이는 유사한 용량에서 Ab2가 AbMyo보다 유의하게 더 큰 노출을 나타낸다는 것을 시사한다.

[0443] 프로 및 잠재성 미오스타틴의 상대 수준을 근육 용해물 또는 혈청 샘플의 정량적 웨스턴 블롯팅에 의해 결정하였다. 급속 냉동된 근육 샘플로부터 분쇄에 이어서 프로테아제 및 포스파타제 억제제가 보충된 T-PER 완충제에서 용해시킴으로써 근육 용해물을 생성시켰다. 용해 후, 동일한 농도의 단백질을 함유하는 샘플을 PAGE 겔로 분리하고, 저형광 PVDF 막 상으로 웨스턴 블롯팅하였다. 근육 용해물에 대해, 10-50 ng의 총 단백질을 겔 상에 로딩하였다. 혈장을 PBS에서 1:10 희석하고, 10 μl의 각각의 샘플을 겔 상에 로딩하였다. 크기 표준물로서, 0.1-1 ng 재조합 프로 및/또는 잠재성 미오스타틴도 겔 상에 로딩하였다. 잠재성 미오스타틴의 프로도메인을 인식하는 항체 (AF1539, R&D 시스템즈)를 사용한 후, 형광 표지된 2차 항체로 검출하여, 미오스타틴 단백질의 식별을 수행하였다. 모든 웨스턴 블롯 분석에 대해, 군당 최소 3개의 샘플을 검정하였다.

[0444] 혈청 미오스타틴을 약물 치료 마우스 및 대조군에서 형광 웨스턴 블롯팅을 사용하여 측정하였다. Ab2의 증가된 혈청 노출에도 불구하고, Ab2- 및 AbMyo-치료 마우스 둘 다에서의 혈청 잠재성 미오스타틴 수준이 유사하였다 (도 34). 이러한 데이터는 유리 약물 (표적에 결합되지 않음)의 순환 수준이 표적 수준보다 충분히 더 커서 Ab2의 증가된 혈청 노출이 AbMyo로 관찰되는 것보다 더 큰 순환 잠재성 미오스타틴 증가에 이르지 않는다는 것을 시사한다.

[0445] 형광 웨스턴 블롯팅에 의해 근육 (대퇴직근) 내의 미오스타틴 수준을 또한 평가하였다. 잠재성 및 프로미오스타틴의 상대적 수준을 형광 웨스턴 블롯에 의해 마우스 근육 용해물에서 측정하였다. 잠재성 미오스타틴이 Ab2 및 AbMyo 치료 근육 둘 다에서 상승된다 (도 35A). 그러나, AbMyo-치료 근육에서의 잠재성 미오스타틴의 상승은 제28일에 기준선으로 돌아가는 한편, Ab2 치료 근육에서의 상승은 적어도 이러한 시점까지 여전히 상승되어 있다 (AbMyo 치료에 대비하여 $P<0.003$). 프로미오스타틴으로 유사한 경향이 관찰되지만 (도 35B), 차이가 통계적으로 유의하지 않다 ($P = 0.068$). 이러한 데이터는 약물 작용 부위인 골격 근육에서의 Ab2의 더 긴 작용 기

간을 시사한다.

[0446] *실시예 8: Ab2가 근력 생성을 증가시킨다.*

[0447] 이러한 실시예에서, 근력 생성에 대한 Ab2의 효과를 평가하였다. 간략하게, 수컷 C57BL/6J 마우스에게 IgG (20 mg/kg), 마우스 IgG1 이소타입의 불변 영역이 있는 Ab2 (20 mg/kg), 또는 PBS를 4주 동안 주당 1회로 복강내 투여하였다 (n=군당 10마리).

[0448] 연구 종결 시에, 근육을 절개하여 칭량하고, 지신근 (EDL) 근육의 시험관내 근육 성능을 수평 관류 배스로 개조된 305C 근육 지레 시스템 (오로라 사이언티픽 인크.(Aurora Scientific Inc.), 캐나다 오로라)으로 시험관 내에서 측정하였다. 근육을 생리학적으로 완충된 빙냉 용액 내에 놓고, 실크 봉합사를 근위 힘줄에 묶었다. 근육을 305C 근육 레버 시스템의 수평 배스 내에 놓고, 95% O_2/5% CO_2로 산소치료되고 37℃에서 유지된 생리학적 완충제를 관류시켰다.

[0449] 봉합사를 한쪽 측면의 고정된 기둥, 및 다른쪽 상의 지레 팔에 묶었다. 0.01 Hz 주파수의 일련의 1 Hz 및 100 Hz 필드 자극 (0.2 ms 펄스, 100 ms 기간)을 근육 측면의 백금 전극을 통해 전달하여, 봉합사가 단단히 조여지고 최대로 발달된 힘이 안정적인 것을 확실하게 하였다. 일단 안정적이면, 직접적인 근육 자극 - 힘 vs. 주파수를 측정하였다. 백금 와이어 전극을 근육 복부에 대해 근위 및 원위로 놓았다.

[0450] 연축 장력을 1 ms 펄스로 모니터링하였고, 최대 힘에 도달할 때까지 전압을 증가시켰다. 그 후, 증가되는 자극 주파수로 일련의 자극을 수행하였다 (1 ms 펄스, 250 ms 훈련 기간): 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 Hz, 이어서 1 Hz에서의 최종 자극.

[0451] 도 36A에 도시된 바와 같이, 4주 Ab2 치료 후, 근육 질량 및 기능이 증가되었다. 평균 EDL 중량이 33%만큼 증가하였고, 평균 비복근 및 사두근 중량이 19%만큼 증가하였다.

[0452] 도 36B에 도시된 바와 같이, 최대 힘 생성이 4회의 매주 Ab2 투여 후에 30%만큼 증가하였다.

[0453] 본 개시내용의 여러 실시양태가 본원에 기재되고 설명되었지만, 관련 분야의 통상의 기술자는 기능을 수행하고/하거나 본원에 기재된 결과 및/또는 하나 이상의 장점을 수득하기 위해 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 쉽게 구상할 것이고, 각각의 이러한 변경 및/또는 변형은 본 개시내용의 범주 내인 것으로 간주된다. 더욱 일반적으로, 관련 분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 물질 및 구성이 예시적인 것으로 의도된다는 것과 실제 파라미터, 치수, 물질 및/또는 구성은 구체적인 본 개시내용이 사용되는 용도 또는 용도들에 좌우될 것임을 쉽게 이해할 것이다. 관련 분야의 통상의 기술자는 일상적일 뿐인 실험을 사용하여, 본원에 기재된 개시내용의 구체적인 실시양태에 대한 다수의 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 실시양태가 예시로서만 제시된다는 것과, 첨부된 특허청구범위 및 그의 등가물의 범주 내에서, 본 개시내용이 구체적으로 기재되고 청구된 것과 다르게 실행될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 본 개시내용은 각각의 개별적인 본원에 기재된 특색, 시스템, 물품, 물질 및/또는 방법에 관한 것이다. 추가적으로, 2개 이상의 이러한 특색, 시스템, 물품, 물질 및/또는 방법의 임의의 조합이, 이러한 특색, 시스템, 물품, 물질 및/또는 방법이 서로 모순되지 않는다면, 본 개시내용의 범주 내에 포함된다.

[0454] 본원의 명세서 및 청구항에서 사용된 바와 같은 단수형은, 명확하게 달리 지시되지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0455] 본원의 명세서 및 청구항에서 사용된 바와 같은 "및/또는"이라는 구절은 이렇게 접속된 요소 중 "어느 하나 또는 둘 다", 즉, 일부 경우에는 결합적으로 존재하고, 다른 경우에는 분리적으로 존재하는 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는" 절에 의해 구체적으로 식별되는 요소 이외의 다른 요소가, 구체적으로 식별되는 이러한 요소에 관련되는지 여부와 관계 없이, 명확하게 반대로 지시되지 않는 한 임의적으로 존재할 수 있다. 따라서, 비제한적인 예로서, 개방형 언어 예컨대 "포함하는"과 함께 사용된 경우의 "A 및/또는 B"에 대한 언급은 한 실시양태에서는 B 부재 하의 A (B 이외의 요소를 임의적으로 포함함)를, 또 다른 실시양태에서는 A 부재 하의 B (A 이외의 요소를 임의적으로 포함함)를, 또 다른 실시양태에서는 A 및 B 둘 다 (다른 요소를 임의적으로 포함함)를 지칭할 수 있다.

[0456] 본원의 명세서 및 청구항에서 사용된 바와 같이, "또는"은 상기 정의된 바와 같은 "및/또는"과 의미가 동일한 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록 내의 품목을 분리할 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로, 즉 다수의 요소 또는 요소 목록 중 적어도 하나를 포함할 뿐만 아니라 이 중 하나 초과를 포함하고, 추가적인 열거되지 않은 품목을 임의적으로 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 명확하게 대조적으로 지시된 용어, 예컨

대 "중 오직 하나" 또는 "중 정확히 하나", 또는 특허청구범위에서 사용된 경우의 "로 이루어진"만 다수의 요소 또는 요소 목록 중 정확히 하나의 요소를 포함하는 것을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "또는"은 배타적인 용어, 예컨대 "어느 하나", "중 하나", "중 오직 하나" 또는 "중 정확히 하나"가 선행할 때만 배타적인 대안 (즉, "둘 다가 아니라 하나 또는 다른 하나")을 지시하는 것으로 해석되어야 할 것이다. 특허청구범위에서 사용된 경우의 "로 본질적으로 이루어진"은 특허법 분야에서 사용되는 바와 같은 그의 통상적인 의미를 지닐 것이다.

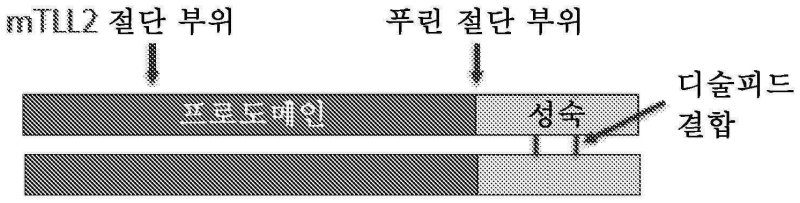
[0457] 본원의 명세서 및 청구항에서 사용된 바와 같이, 하나 이상의 요소의 목록에 대한 언급에서의 "적어도 하나"라는 구절은 요소 목록 내의 요소 중 임의의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 하지만, 요소 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 모든 요소를 반드시 적어도 하나 포함할 필요는 없고, 요소 목록 내의 요소의 임의의 조합을 배제하지 않는다. 이러한 정의는 "적어도 하나"라는 구절이 지칭하는 요소 목록 내에서 구체적으로 식별되는 요소 이외의 요소가, 구체적으로 식별되는 요소에 관련되는지 여부와 관계 없이, 임의적으로 존재할 수 있는 것을 또한 허용한다. 따라서, 비제한적인 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나" (또는 등가적으로 "A 또는 B 중 적어도 하나" 또는 등가적으로 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는 한 실시양태에서는 B의 부재 하의 적어도 하나이고, 임의적으로는 1개를 초과하는 것을 포함하는 A (임의적으로, B 이외의 요소를 포함함)를, 또 다른 실시양태에서는 A의 부재 하의 적어도 하나이고, 임의적으로는 1개를 초과하는 것을 포함하는 B (임의적으로, A 이외의 요소를 포함함)를, 또 다른 실시양태에서는 적어도 하나이고, 임의적으로는 1개를 초과하는 것을 포함하는 A, 및 적어도 하나이고, 임의적으로는 1개를 초과하는 것을 포함하는 B (임의적으로, 다른 요소를 포함함)를 지칭할 수 있는 식이다.

[0458] 특허청구범위, 뿐만 아니라 상기 명세서에서, "포함하는", "포함한", "보유하는", "갖는", "함유하는", "수반하는", "수용하는" 등과 같은 모든 이행구는 개방형인 것으로, 즉 포함하지만 제한되지 않는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 미국 특허청의 특허 심사 지침서(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)의 2111.03 섹션에 기재된 바와 같이, "로 이루어진" 및 "로 본질적으로 이루어진"이라는 이행구만 각각 폐쇄형 또는 반-폐쇄형 이행구일 것이다.

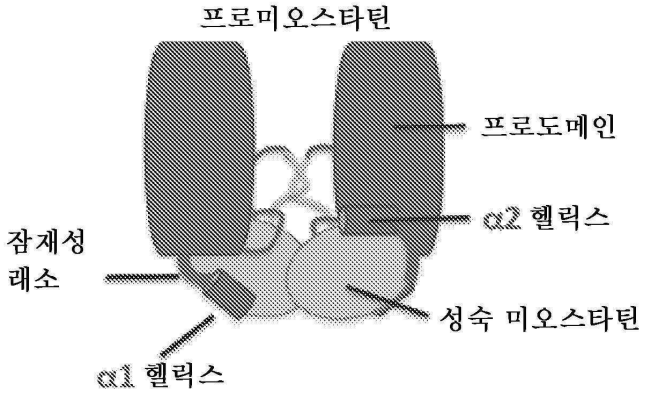
[0459] 청구범위에서 청구 요소를 수식하는 "제1," "제2," "제3" 등의 서수 용어의 사용은, 그 자체로 하나의 청구 요소의 또 다른 청구 요소에 대한 임의의 우선성, 선행성, 또는 순서, 또는 방법의 행위가 수행되는 일시적 순서를 함축하지 않으며, 이들은 청구 요소를 구별하기 위해, 특정 명칭을 갖는 하나의 청구 요소를 (서수 용어의 사용을 제외하고는) 동일한 명칭을 갖는 또 다른 요소와 구별하기 위한 라벨로서 단지 사용되는 것이다.

도면

도면1

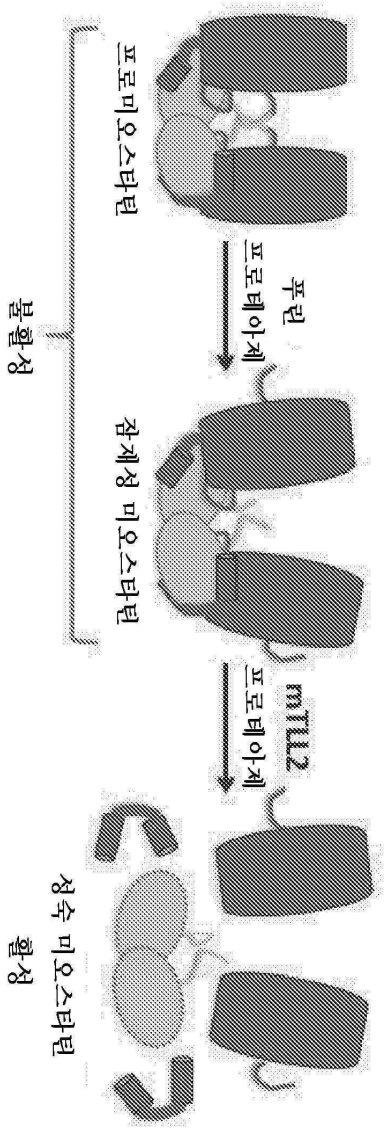

mTLL2 절단 부위
푸린 절단 부위
프로도메인
성숙
디술피드
결합

1A

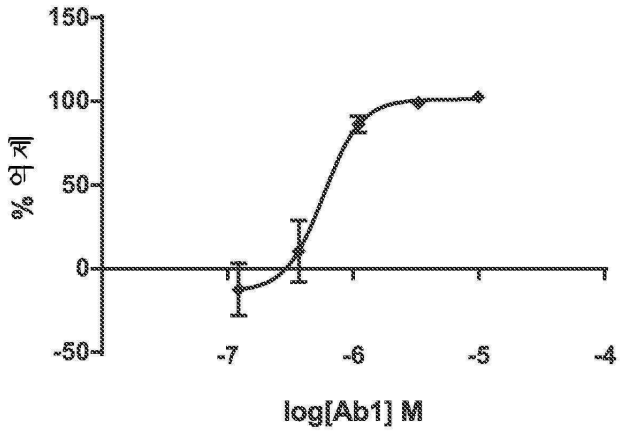

프로미오스타틴
프로도메인
α2 헬릭스
잠재성
래소
성숙 미오스타틴
α1 헬릭스

1B

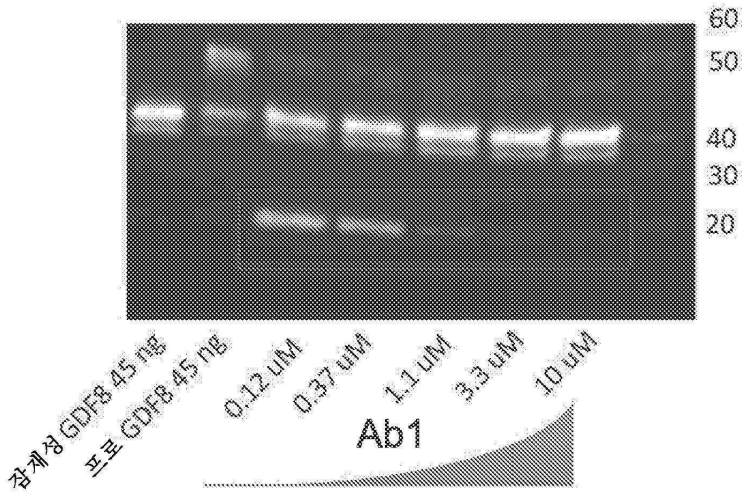
도면2



도면3i

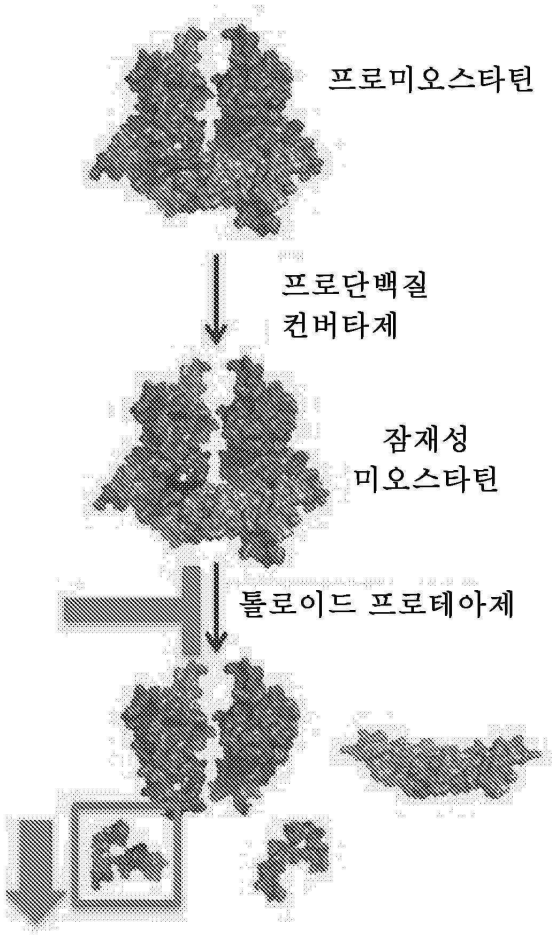

150
100
50
0
-50
% 억제
-7
-6
-5
-4
log[Ab1] M

3A


60
50
40
30
20
잠재성 GDF8 45 ng
프로 GDF8 45 ng
0.12 uM
0.37 uM
1.1 uM
3.3 uM
10 uM
Ab1

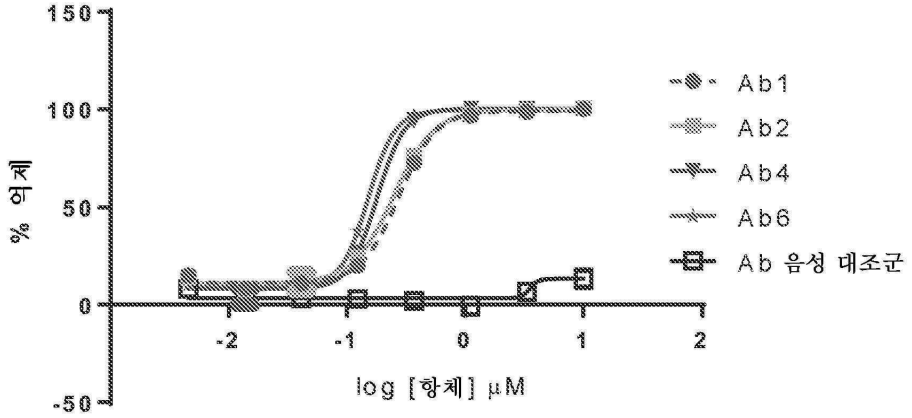
3B

도면3ii

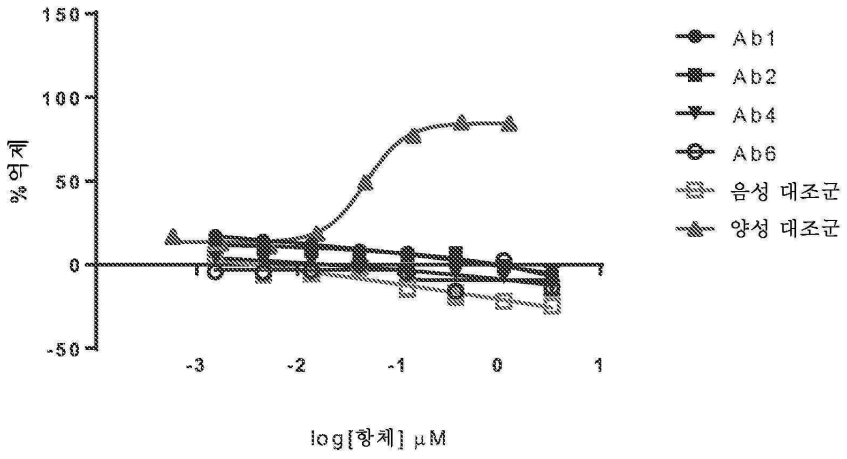

프로미오스타틴
프로단백질
컨버타제
잠재성
미오스타틴
톨로이드 프로테아제

3C

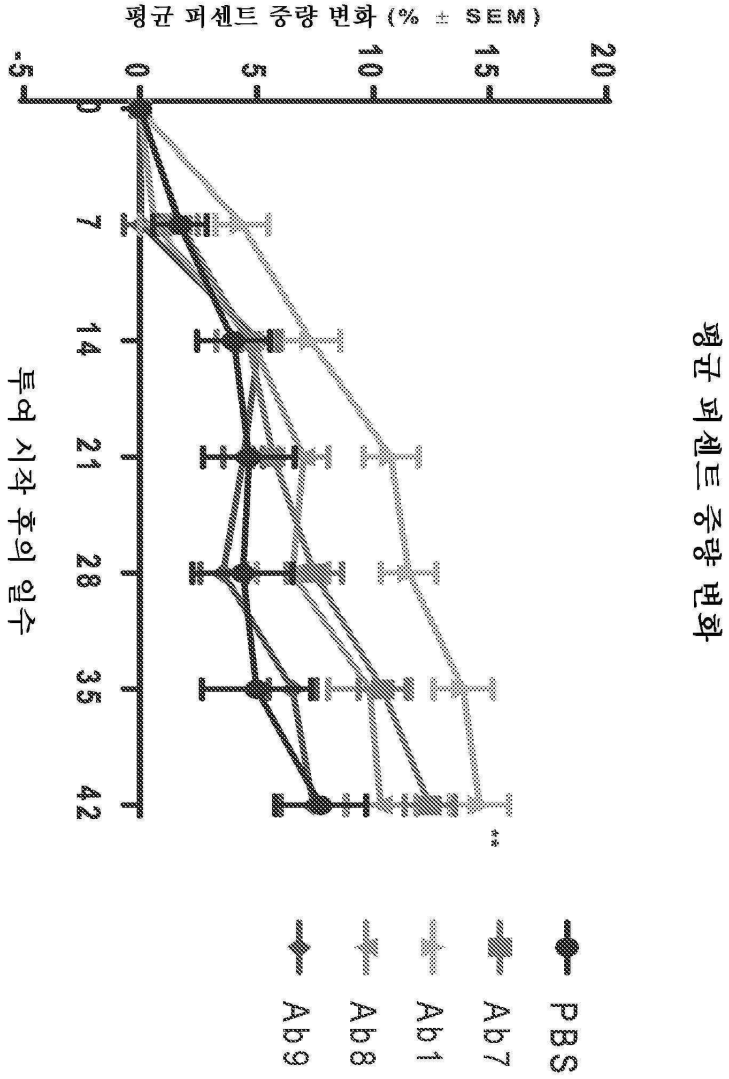
도면4


150
100
50
0
-50
% 억제
-2
-1
0
1
2
log [항체] μM
Ab1
Ab2
Ab4
Ab6
Ab 음성 대조군

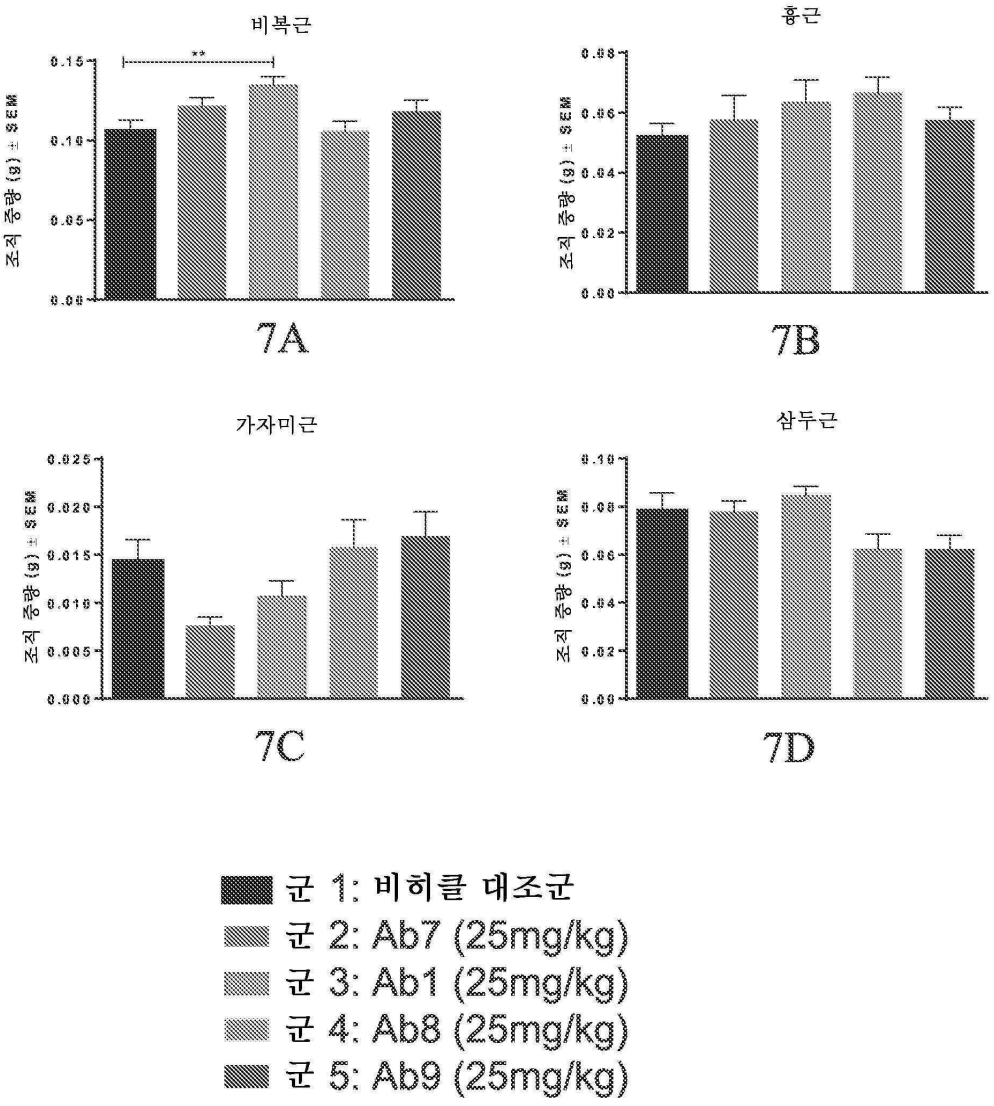
도면5


150
100
50
0
-50
%억제
-3
-2
-1
0
1
log[항체] μM
Ab1
Ab2
Ab4
Ab6
음성 대조군
양성 대조군

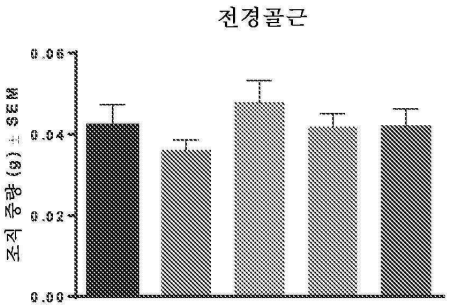
도면6


평균 퍼센트 중량 변화 (% ± SEM)
20
15
10
5
0
-5
평균 퍼센트 중량 변화
0
7
14
21
28
35
42
투여 시작 후의 일수
**
PBS
Ab7
Ab1
Ab8
Ab9

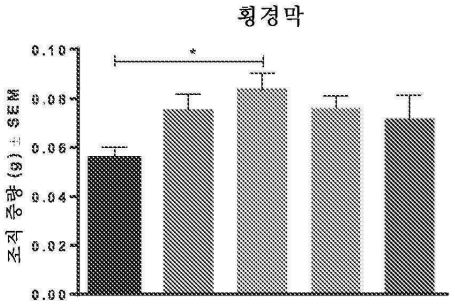
도면7


비복근
흉근
가자미근
삼두근
조직 중량 (g) ± SEM
**
7A
7B
7C
7D
군 1: 비히클 대조군
군 2: Ab7 (25mg/kg)
군 3: Ab1 (25mg/kg)
군 4: Ab8 (25mg/kg)
군 5: Ab9 (25mg/kg)

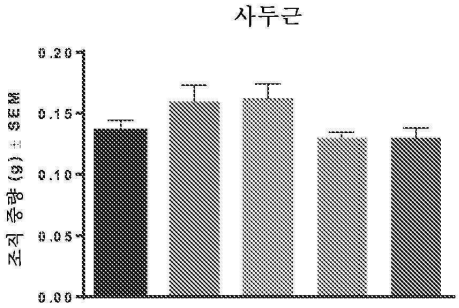
도면8



8A



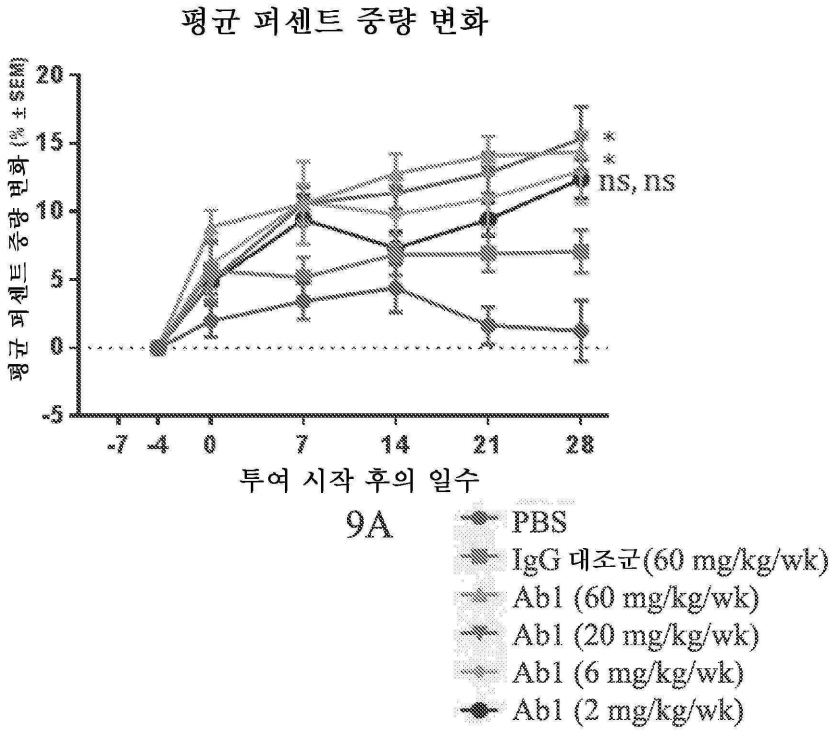
8B



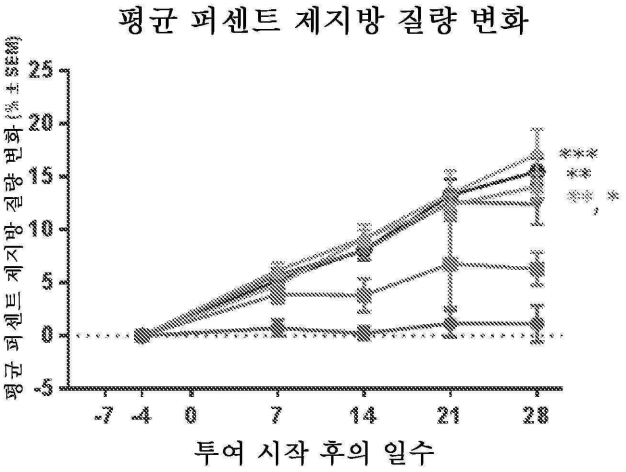
8C

- 균 1: 비히클 대조군
- 균 2: Ab7 (25mg/kg)
- 균 3: Ab1 (25mg/kg)
- 균 4: Ab8 (25mg/kg)
- 균 5: Ab9 (25mg/kg)

도면9

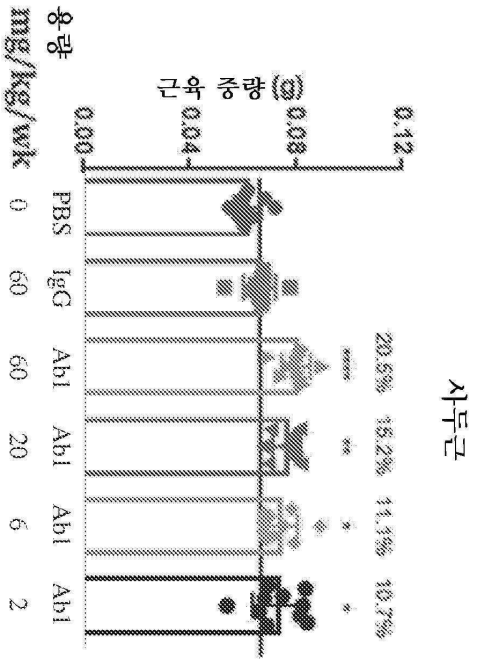

평균 퍼센트 중량 변화
평균 퍼센트 중량 변화 (% ± SEM)
20
15
10
5
0
-5
-7
-4
0
7
14
21
28
투여 시작 후의 일수
**
*
ns, ns
PBS
IgG 대조군(60 mg/kg/wk)
Ab1 (60 mg/kg/wk)
Ab1 (20 mg/kg/wk)
Ab1 (6 mg/kg/wk)
Ab1 (2 mg/kg/wk)

9A

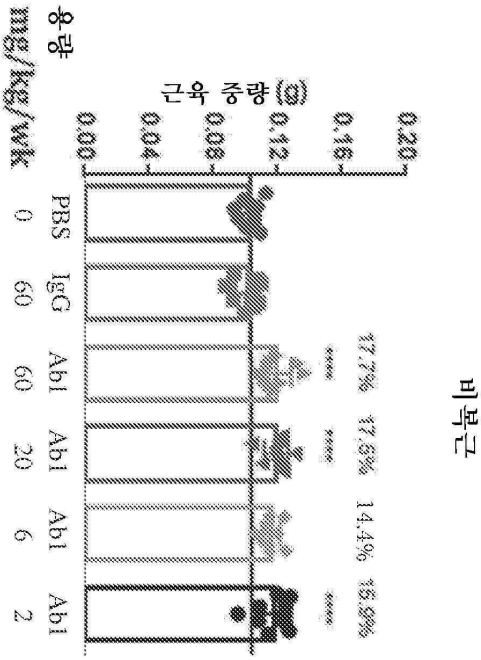

평균 퍼센트 제지방 질량 변화
평균 퍼센트 제지방 질량 변화 (% ± SEM)
25
20
15
10
5
0
-5
-7
-4
0
7
14
21
28
투여 시작 후의 일수
***
**
*, *

9B

도면10i

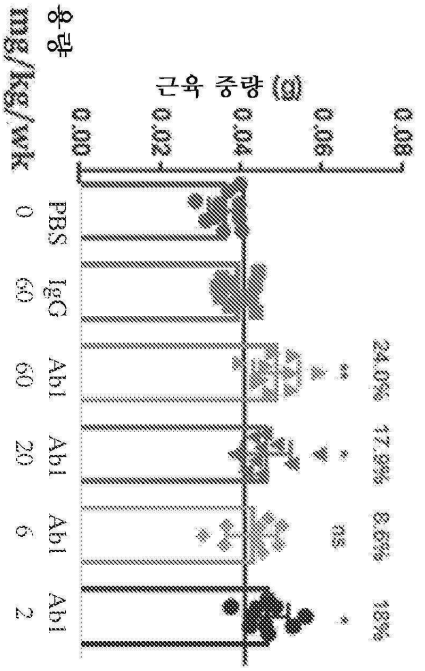


10A

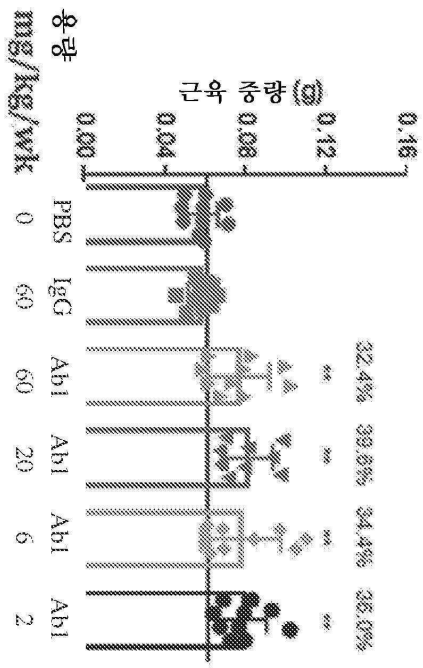


10B

도면10ii

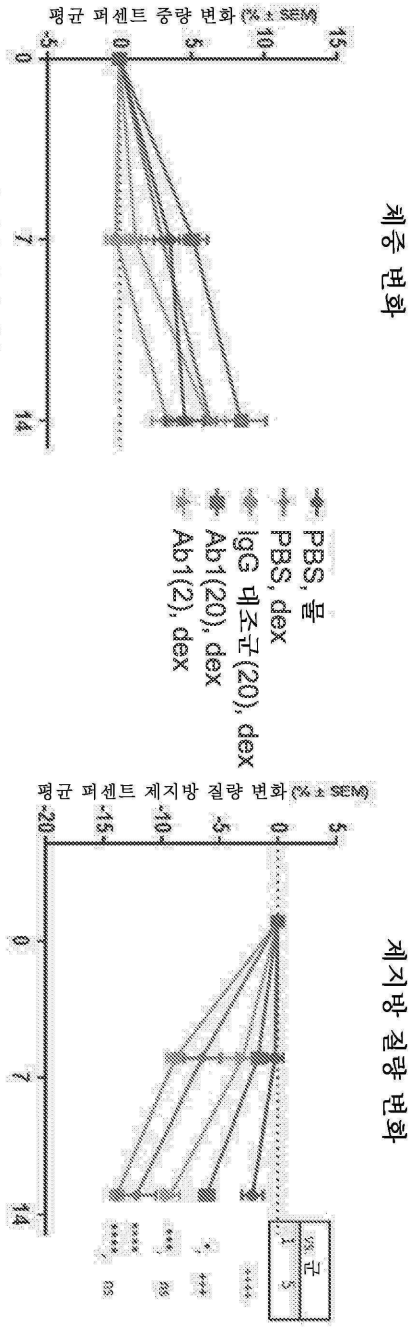


10C



10D

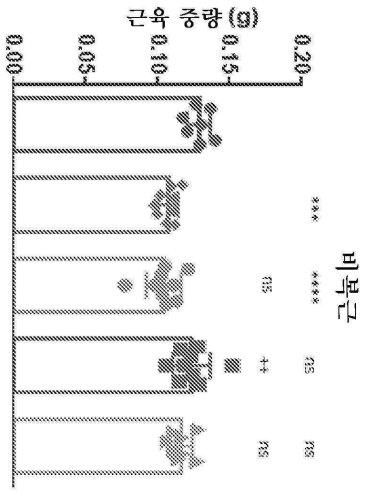
도면11


체중 변화
평균 퍼센트 중량 변화 (% ± SEM)
15
10
5
0
-5
0
7
14
투여 시작 후의 일수
PBS, 물
PBS, dex
IgG 대조군(20), dex
Ab1(20), dex
Ab1(2), dex
제지방 질량 변화
평균 퍼센트 제지방 질량 변화 (% ± SEM)
5
0
-5
-10
-15
-20
0
7
14
투여 시작 후의 일수
vs. 군
1
5
****
*
***
**
**
***
****

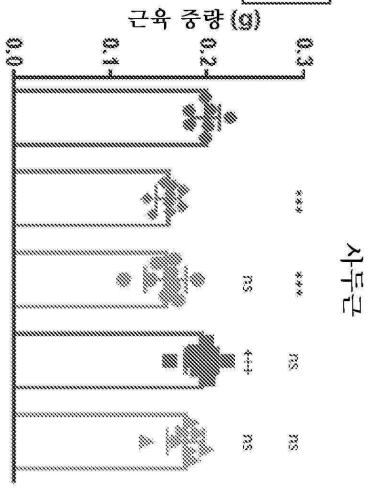
11A

11B

도면12i

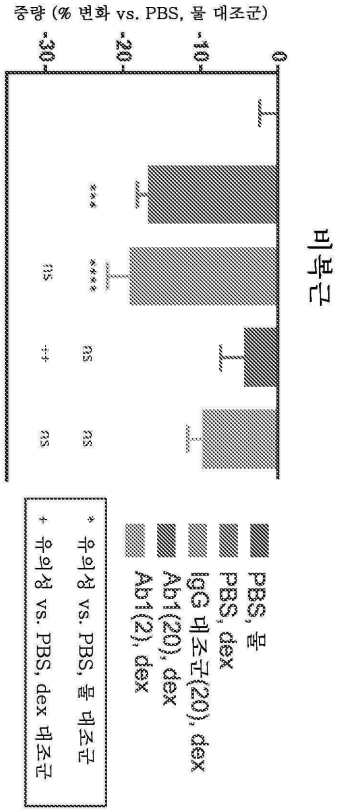


12A

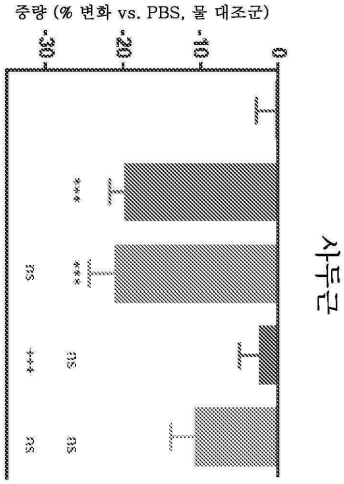


12B

도면12ii

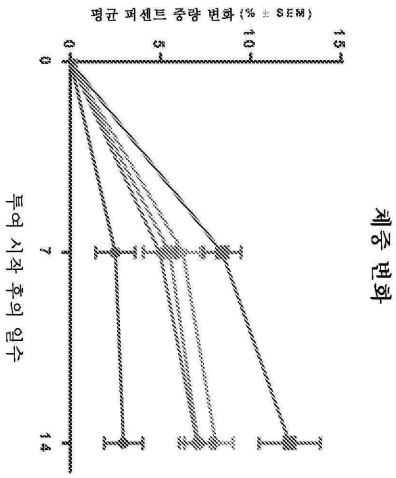


12C

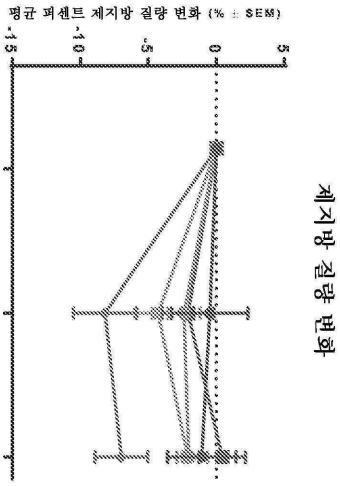


12D

도면13

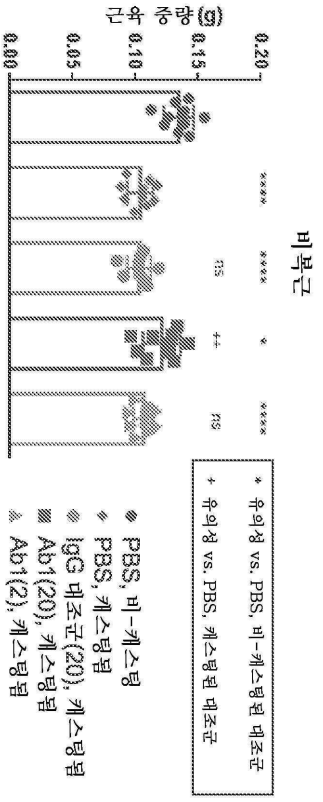

체중 변화
평균 퍼센트 중량 변화 (% ± SEM)
15
10
5
0
0
7
14
투여 시작 후의 일수
PBS, 비-케스텅
PBS, 케스텅뮙
IgG 대조군 (20), 케스텅뮙
Ab1(20), 케스텅뮙
Ab1(2), 케스텅뮙

13A

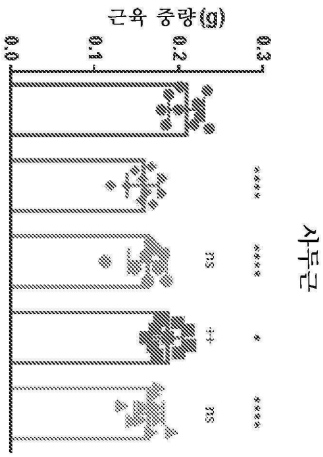

제지방 질량 변화
평균 퍼센트 제지방 질량 변화 (% ± SEM)
5
0
-5
-10
-15
0
7
14
투여 시작 후의 일수

13B

도면14i

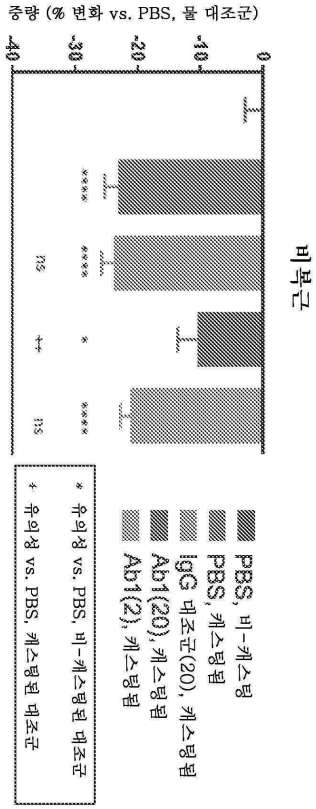


14A

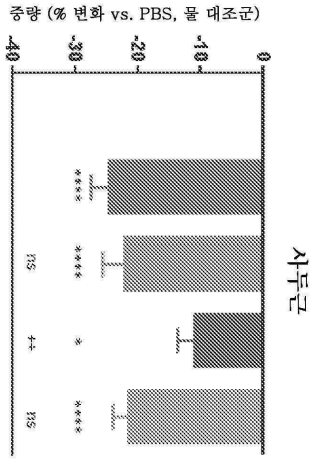


14B

도면14ii

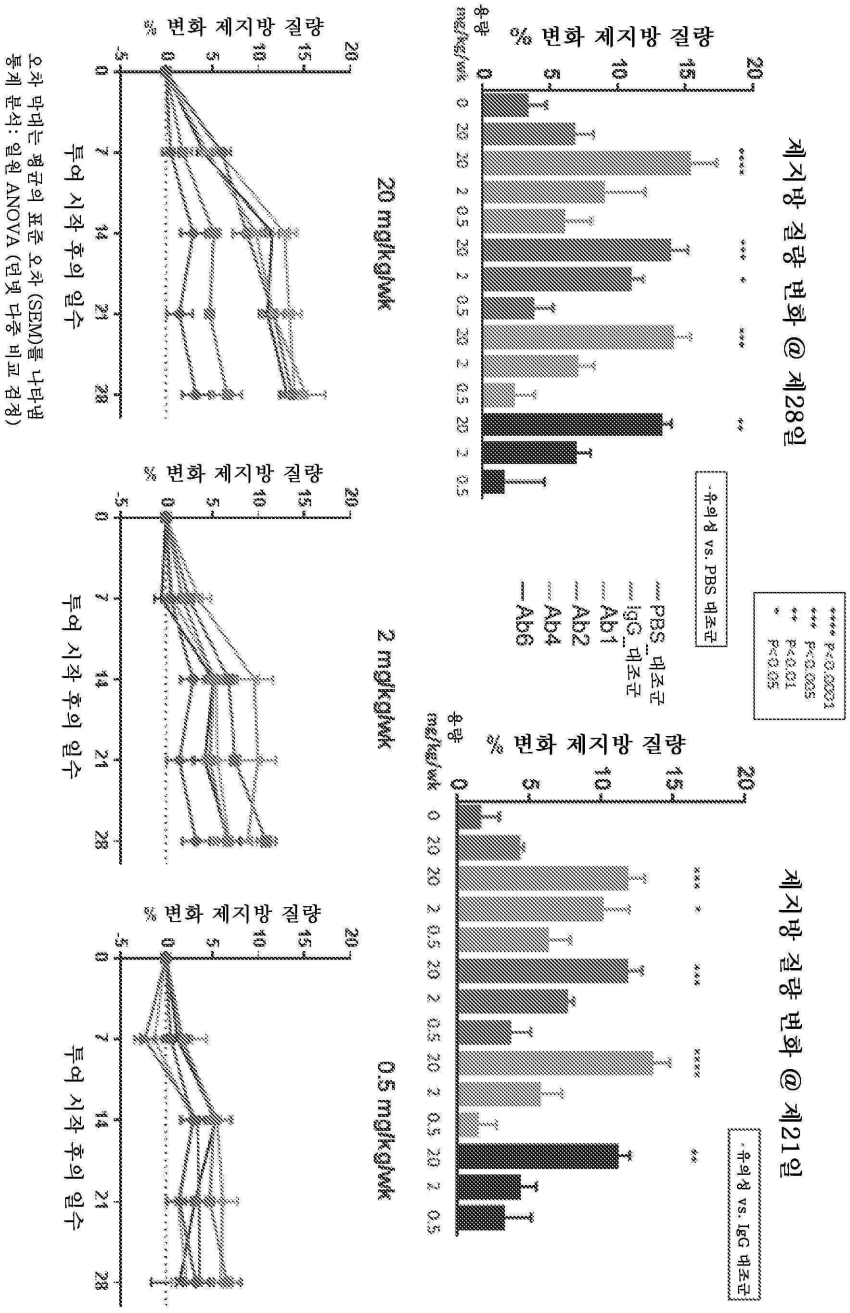


14C

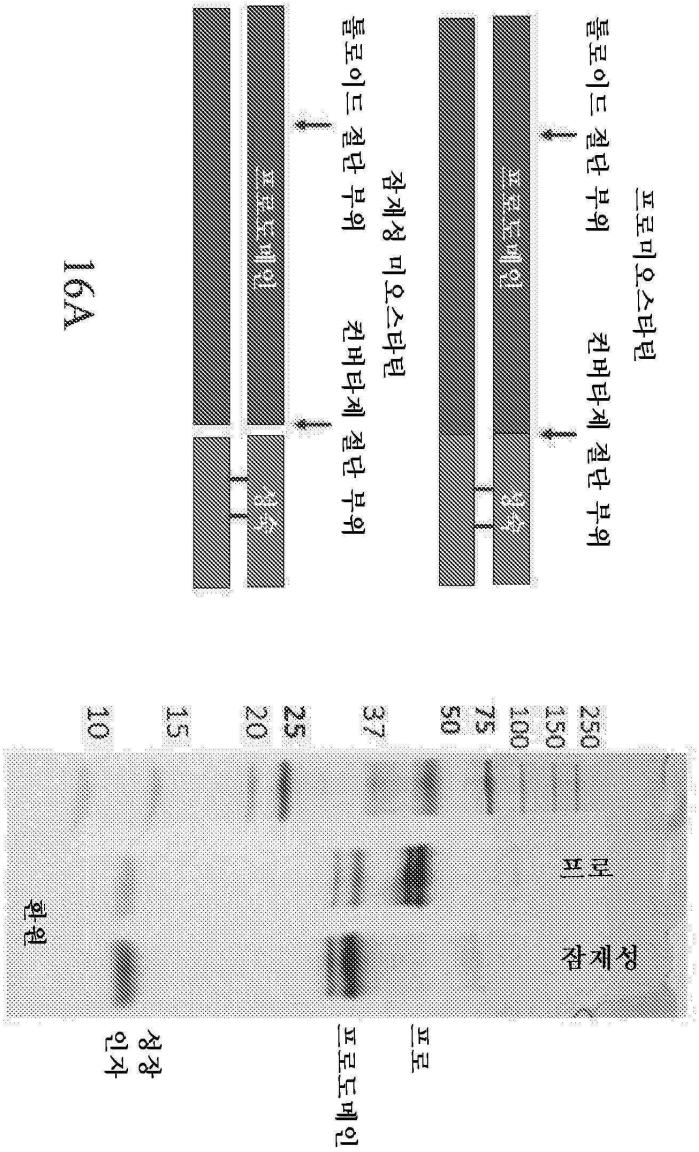


14D

도면15


제지방 질량 변화 @ 제28일
**** P<0.0001
*** P<0.0025
** P<0.01
* P<0.05
유의성 vs. PBS 대조군
PBS_대조군
IgG_대조군
Ab1
Ab2
Ab4
Ab6
% 변화 제지방 질량
용량
mg/kg/wk
0 20 20 2 0.5 20 2 0.5 20 2 0.5
제지방 질량 변화 @ 제21일
유의성 vs. IgG 대조군
20 mg/kg/wk
2 mg/kg/wk
0.5 mg/kg/wk
투여 시작 후의 일수
오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타냄
통계 분석: 일원 ANOVA (던넷 다중 비교 검정)

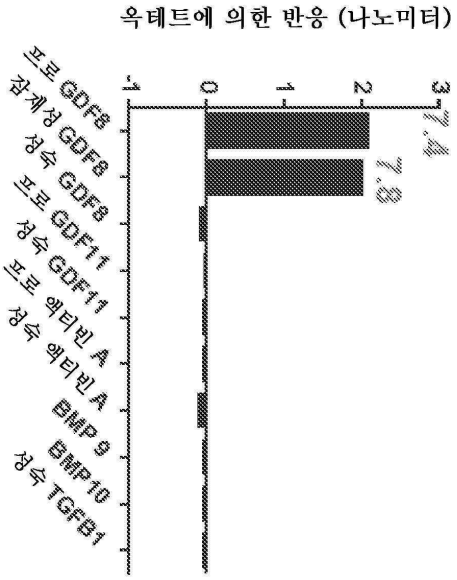
도면16


프로미오스타틴
톨로이드 절단 부위
퀸버타제 절단 부위
프로도메인
성숙
잠재성 미오스타틴
톨로이드 절단 부위
퀸버타제 절단 부위
프로도메인
성숙
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
면역
잠재성
프로
프로도메인
성장인자
환원

16A

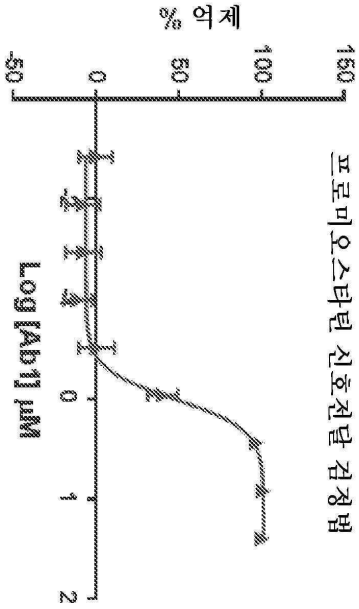
16B

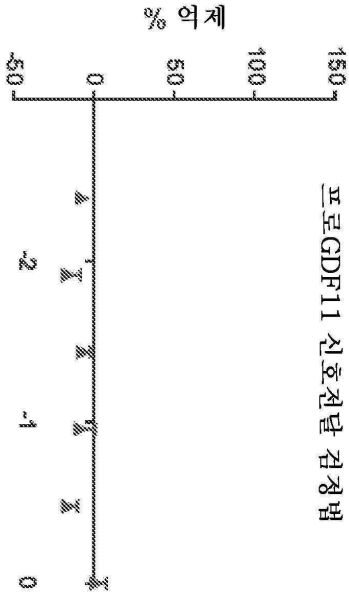
도면17



항원에 대한 Kd (나노몰)

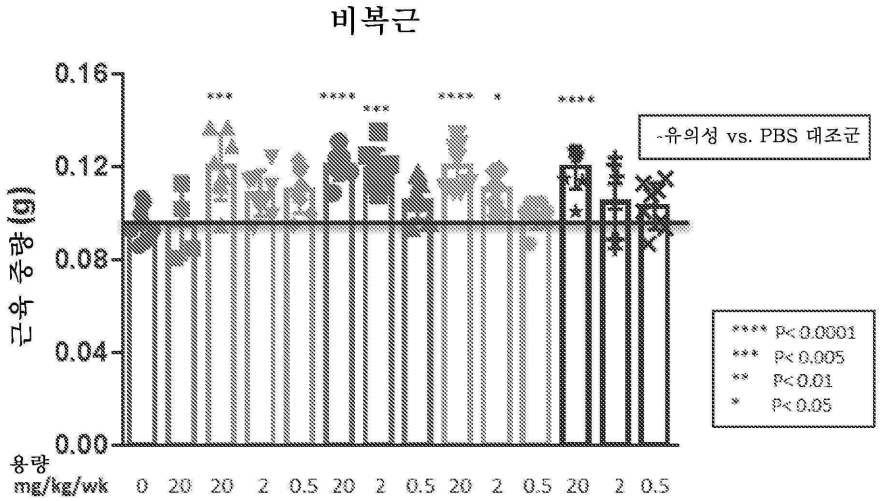
17A



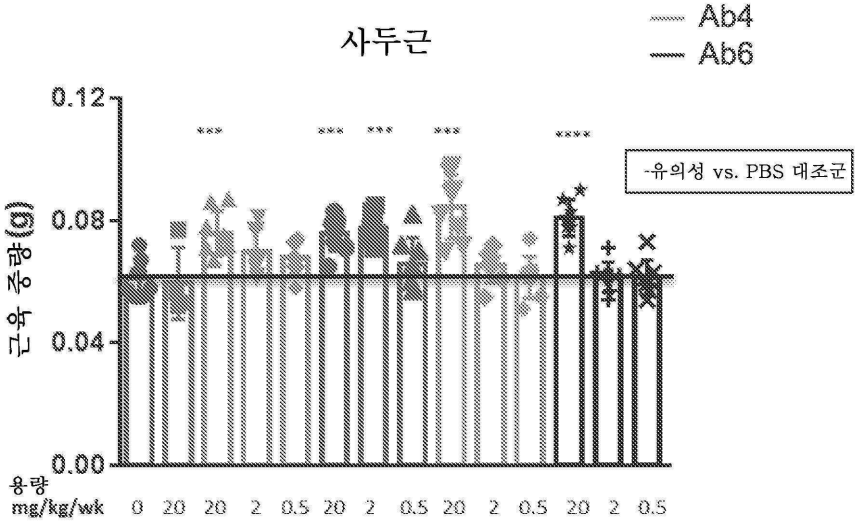


17B

도면18i



18A



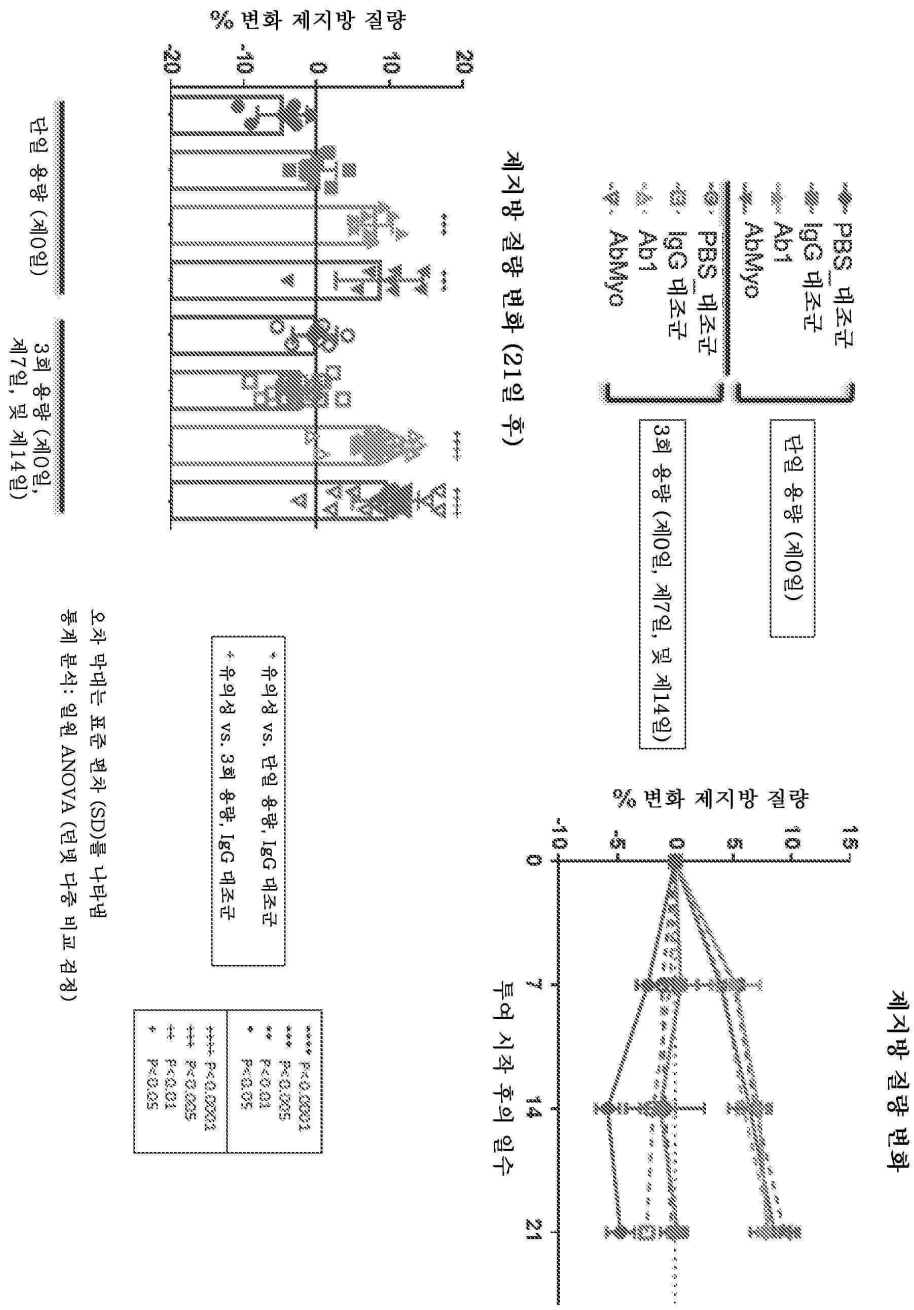
18B

도면18ii

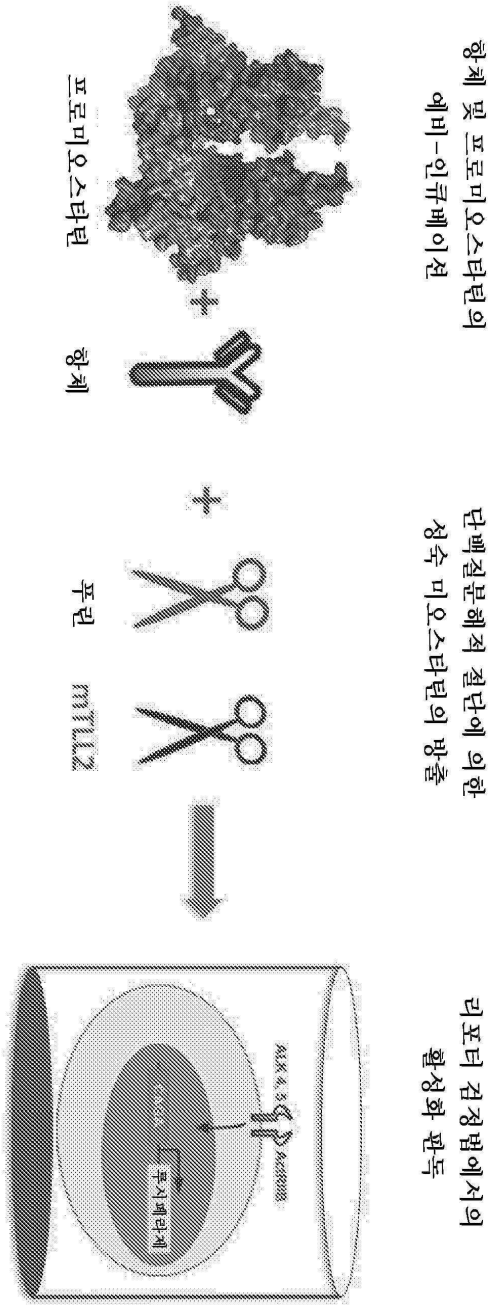
근육	Ab	PBS_대조군	20 mg/kg/wk	2 mg/kg/wk	0.5 mg/kg/wk
비복근	Ab1	0	25.1	13.0	14.9
비복근	Ab2	0	25.6	24.0	9.8
비복근	Ab4	0	25.0	15.0	3.1
비복근	Ab6	0	24.8	9.3	7.4
사두근	Ab1	0	23.9	13.9	10.8
사두근	Ab2	0	23.9	26.1	7.6
사두근	Ab4	0	37.8	6.4	0.2
사두근	Ab6	0	32.0	0.4	0.2

18C

도면19


제지방 질량 변화
PBS_대조군
IgG 대조군
Ab1
AbMyo
PBS_대조군
IgG 대조군
Ab1
AbMyo
단일 용량 (제0일)
3회 용량 (제0일, 제7일, 및 제14일)
% 변화 제지방 질량
15
10
5
0
-5
-10
0
7
14
21
투여 시작 후의 일수
제지방 질량 변화 (21일 후)
% 변화 제지방 질량
20
10
0
-10
-20
단일 용량 (제0일)
3회 용량 (제0일, 제7일, 및 제14일)
* 유의성 vs. 단일 용량, IgG 대조군
+ 유의성 vs. 3회 용량, IgG 대조군
**** P<0.00001
*** P<0.0005
** P<0.01
* P<0.05
++++ P<0.00001
+++ P<0.0005
++ P<0.01
+ P<0.05
오차 막대는 표준 편차 (SD)를 나타냄
통계 분석: 일원 ANOVA (던넷 다중 비교 검정)

도면20


항체 및 프로미오스타틴의
예비-인큐베이션
프로미오스타틴
항체
단백질분해적 절단에 의한
성숙 미오스타틴의 방출
푸린
mTL2
리포터 검정법에서의
활성화 판독
루시페라제

도면21

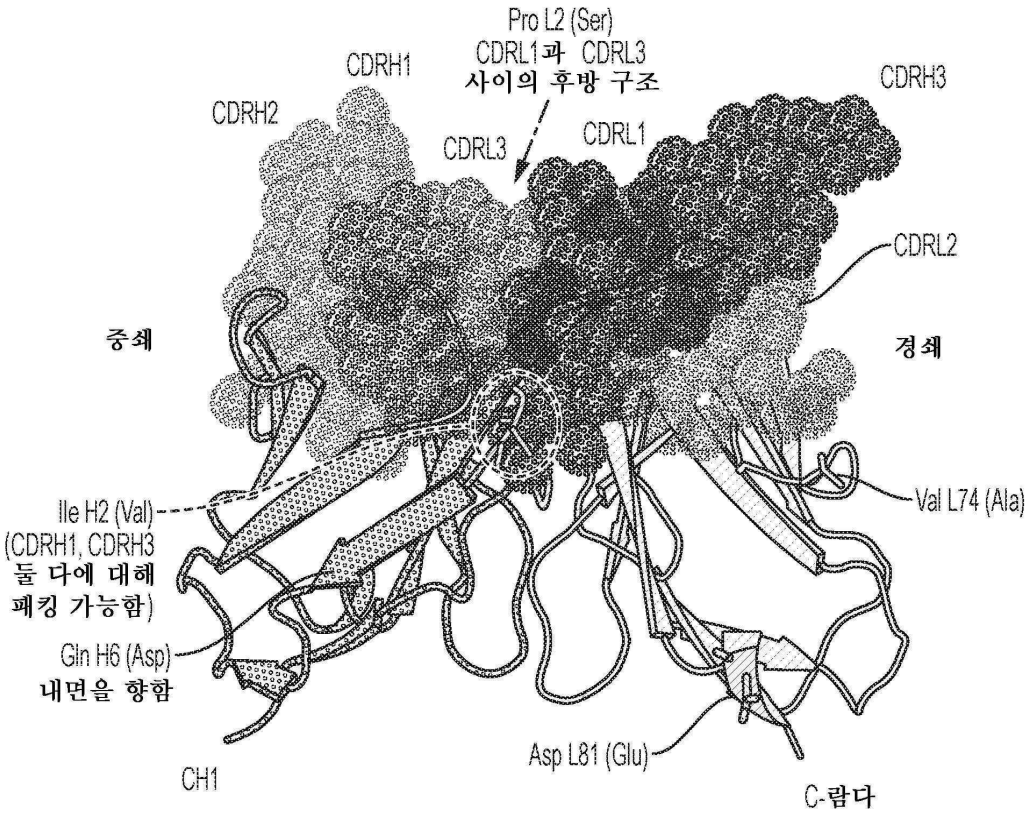
```
  1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY   60
 61 ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVRFLEWSHYYGMDVWGQGT  120
121 TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  180
181 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF  240
241 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  300
301 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  360
361 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK  420
421 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG                              452
```

21A

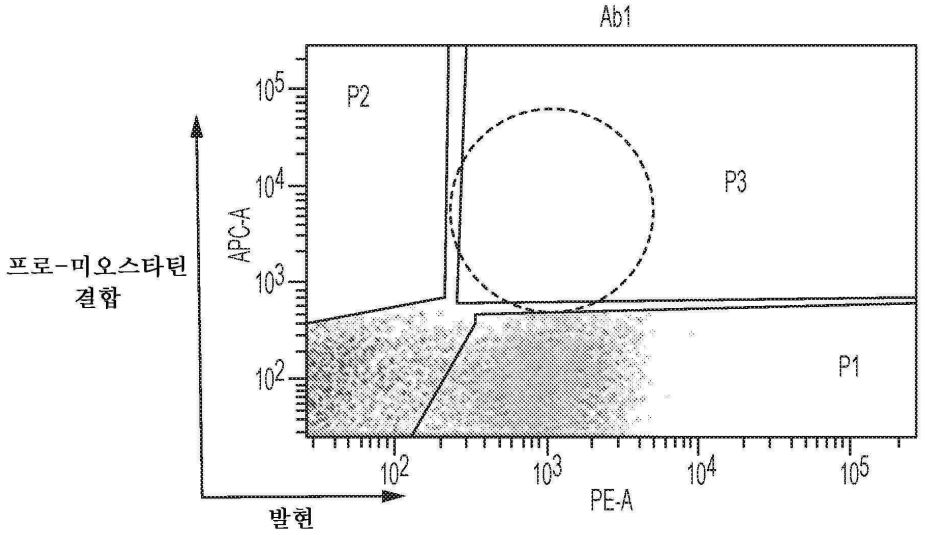
```
  1 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVP   60
 61 DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL  120
121 FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY  180
181 LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS                           215
```

21B

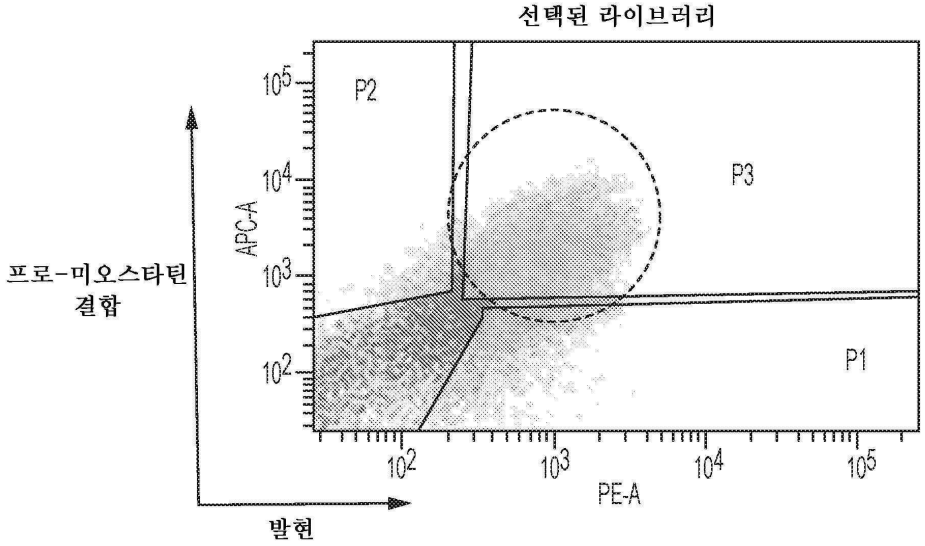
도면22



도면23i

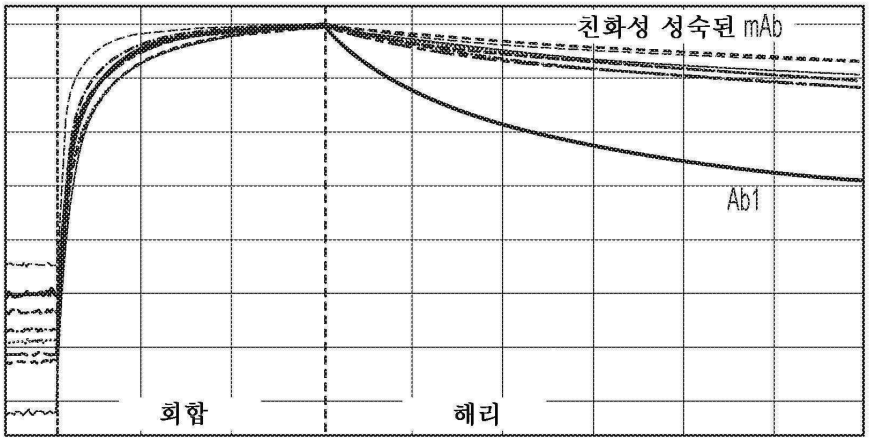


23A



23B

도면23ii



추가 특징화용으로 선택된 상위 12개의 클론

Ab1:	4.8 nM		
Ab4:		0.47 nM	10배 개선
Ab6:		0.48 nM	10배 개선
최상의 친화성 성숙 mAb:		<10 pM	>480배 개선

23C

도면24

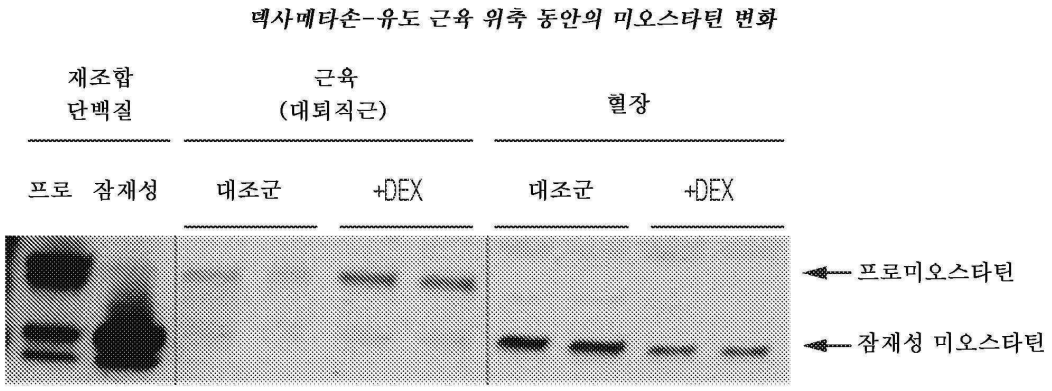
```
                 프레임워크 1          CDR1      프레임워크 2
Ab1     QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab3     QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
Ab5     QIQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA

          CDR2              프레임워크 3
Ab1     VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab3     VISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
Ab5     VISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

           CDR3          프레임워크 4
Ab1     DLLVRFLEWSHYYGMDVWGQGTTVTVSS
Ab3     DLLVRFLEWSHKYGMDVWGQGTTVTVSS
Ab5     DLLVRFLEWSHKYGMDVWGQGTTVTVSS
```

24A

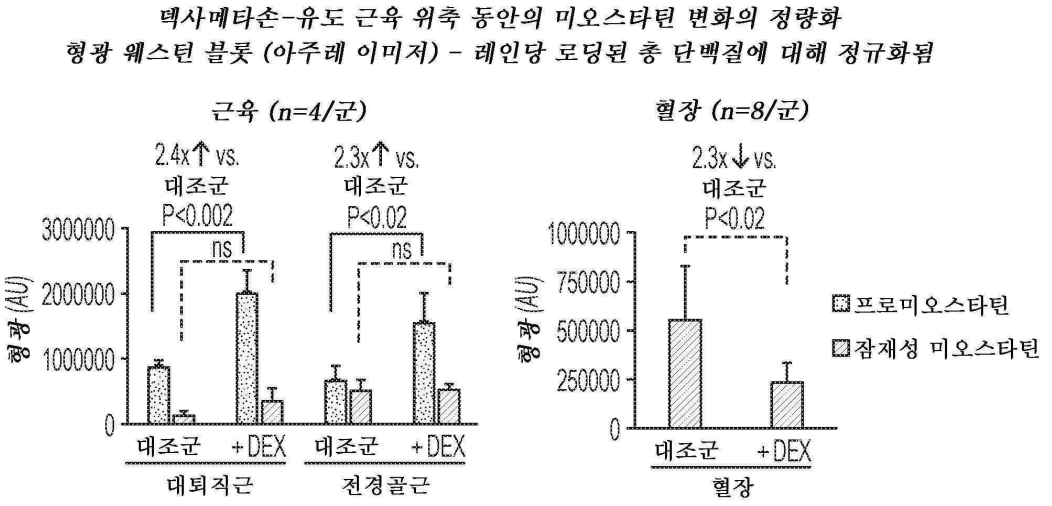
```
                 프레임워크 1          CDR1      FRW2
Ab1     QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab3     QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGSNTVHWYQQLPGTAPKLLIY
Ab5     QPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGNTVHWYQQLPGTAPKLLIY

          CDR2          프레임워크 3
Ab1     SDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC
Ab3     SDDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC
Ab5     SDDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLVISGLQSDDEADYYC

        CDR3      프레임워크 4
Ab1     AAWDDSLNGVFGGGTKLTVL
Ab3     AAWDESLNGVFGGGTKLTVL
Ab5     AAWDESLNGVFGGGTKLTVL
```

24B

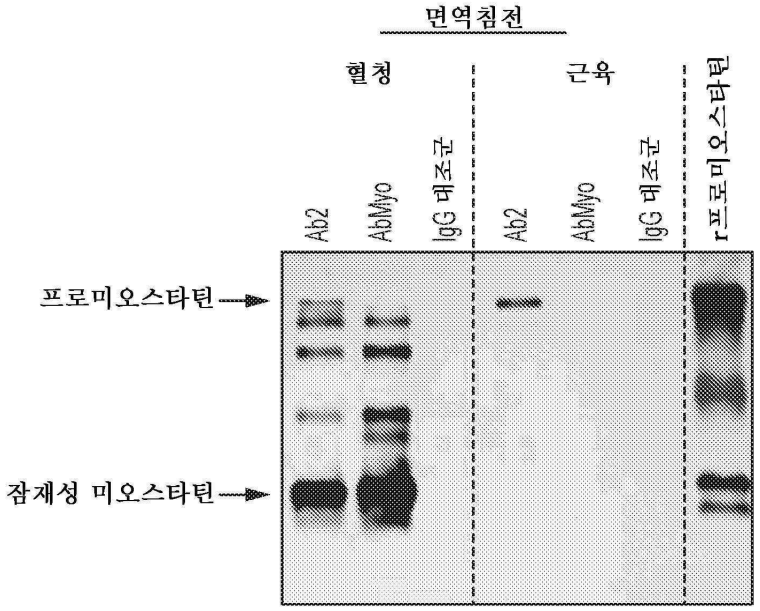
도면25



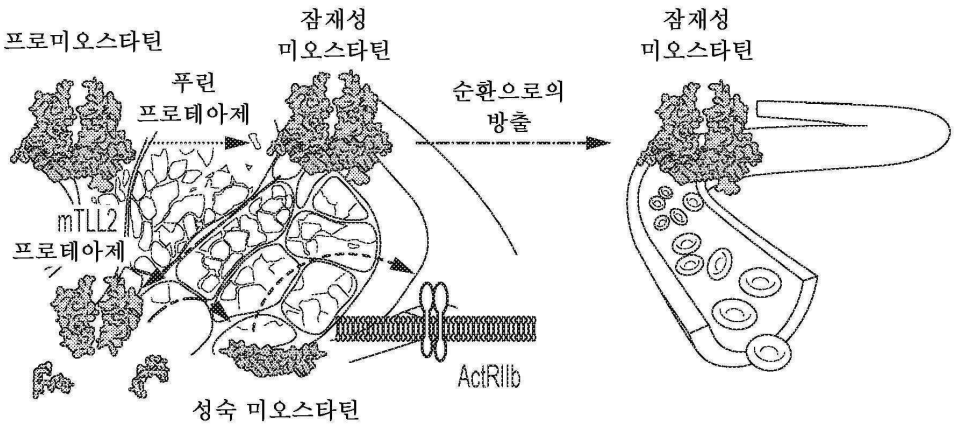
도면26



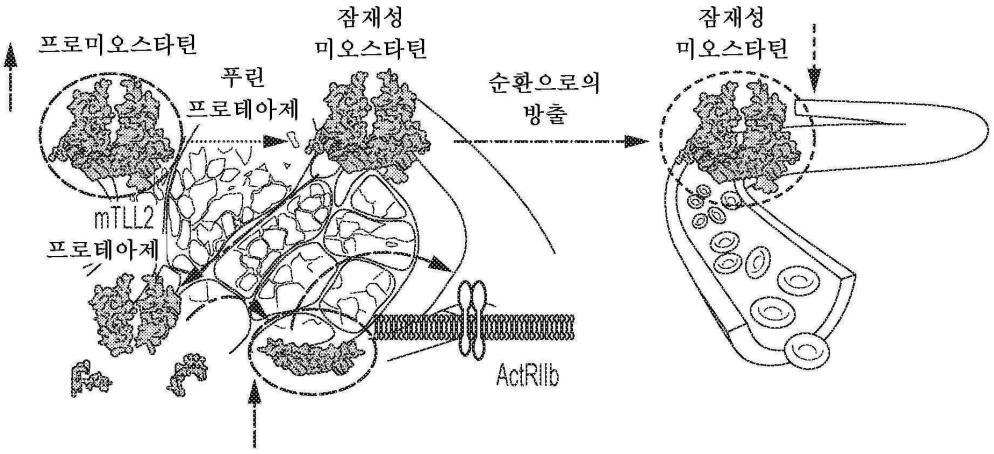
도면27



도면28

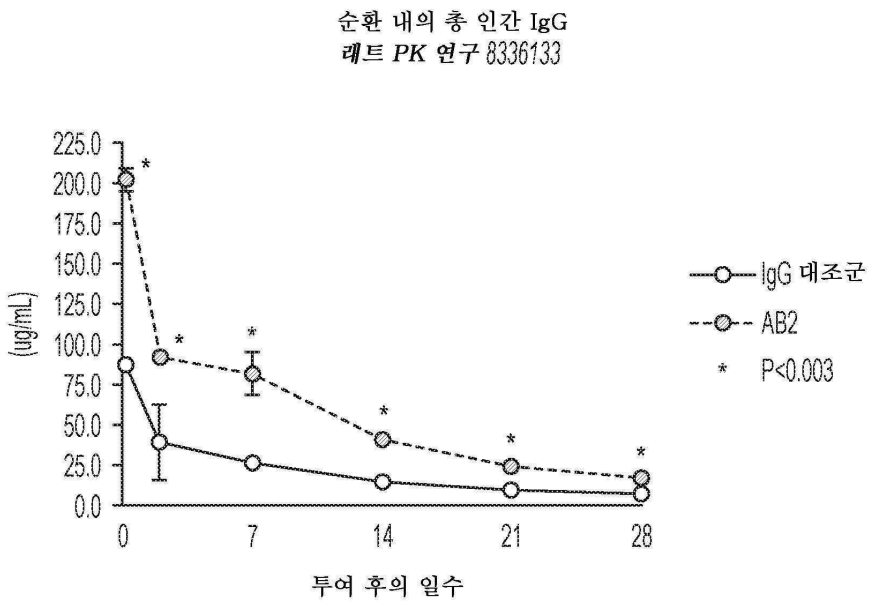

프로미오스타틴
잠재성
미오스타틴
푸린
프로테아제
순환으로의
방출
잠재성
미오스타틴
mTLL2
프로테아제
ActRIIb
성숙 미오스타틴

28A

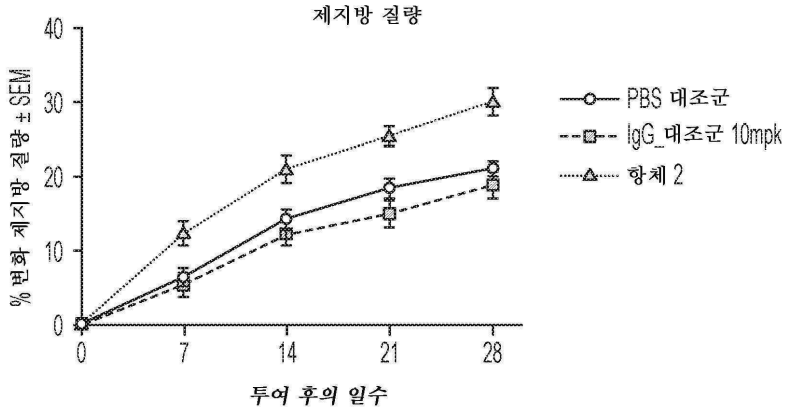

프로미오스타틴
잠재성
미오스타틴
푸린
프로테아제
순환으로의
방출
잠재성
미오스타틴
mTLL2
프로테아제
ActRIIb

28B

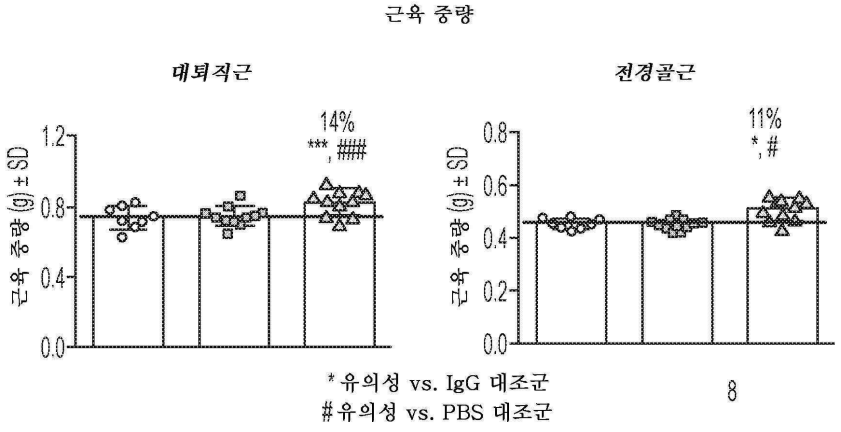
도면29


순환 내의 총 인간 IgG
래트 PK 연구 8336133
225.0
200.0
175.0
150.0
125.0
100.0
75.0
50.0
25.0
0.0
(ug/mL)
0
7
14
21
28
투여 후의 일수
IgG 대조군
AB2
* P<0.003

도면30



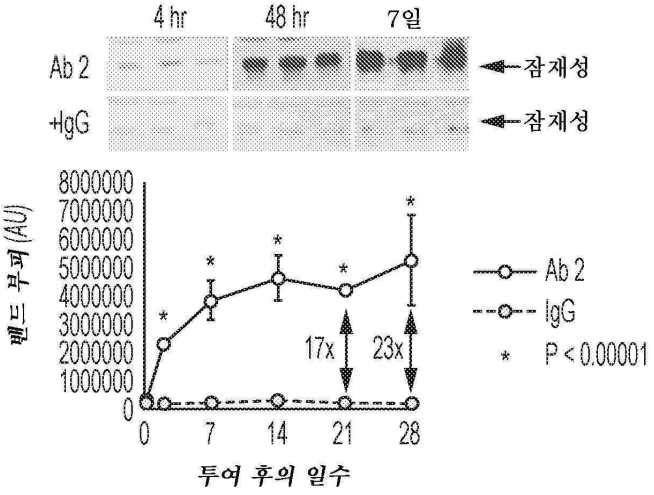
30A



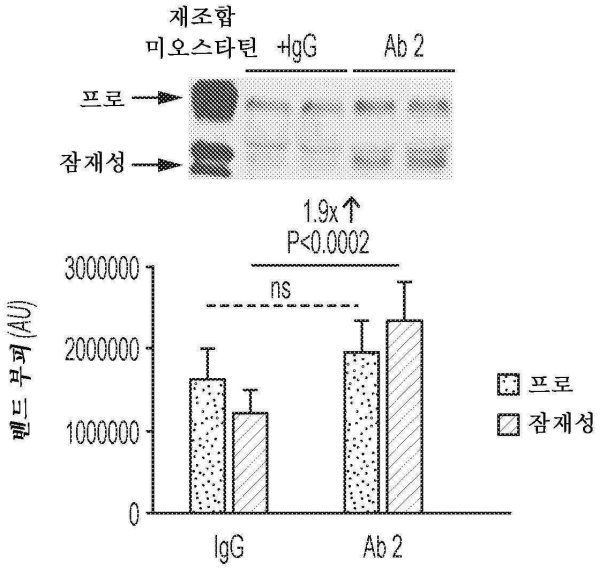
8

30B

도면31

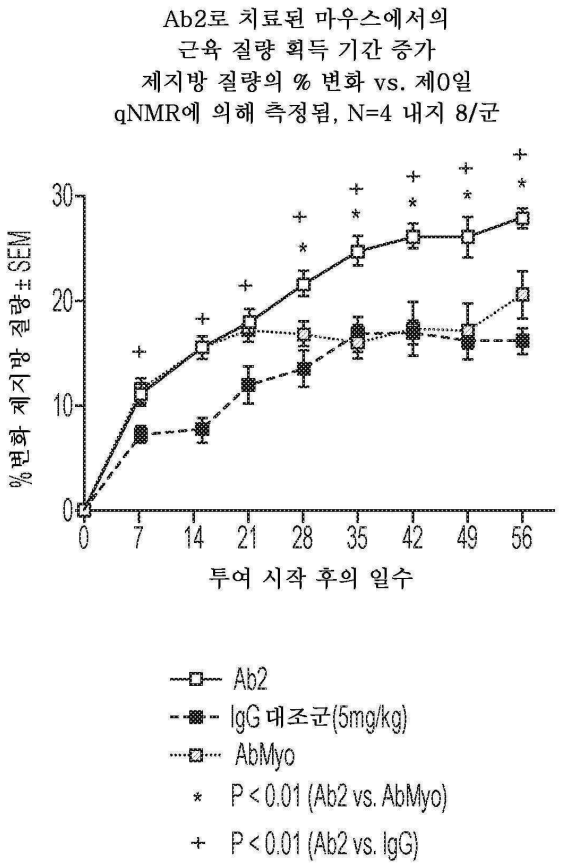

4 hr
48 hr
7일
Ab 2
+IgG
잠재성
잠재성
밴드 부피 (AU)
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
17x
23x
Ab 2
IgG
* P < 0.00001
0
7
14
21
28
투여 후의 일수

31A


재조합
미오스타틴
+IgG
Ab 2
프로
잠재성
1.9x↑
P<0.0002
ns
밴드 부피 (AU)
3000000
2000000
1000000
0
프로
잠재성
IgG
Ab 2

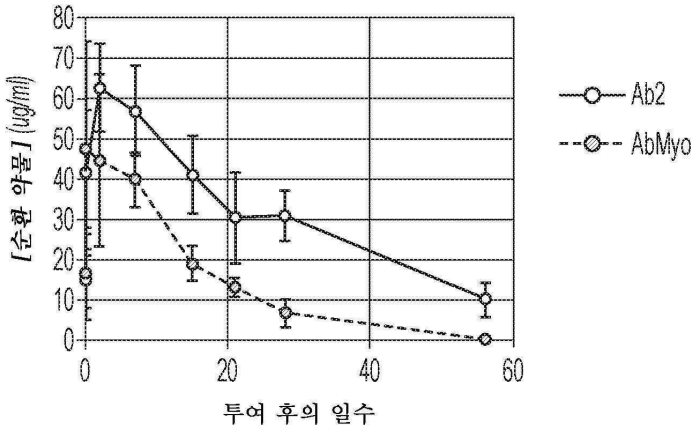
31B

도면32


Ab2로 치료된 마우스에서의
근육 질량 획득 기간 증가
제지방 질량의 % 변화 vs. 제0일
qNMR에 의해 측정됨, N=4 내지 8/군
% 변화 제지방 질량 ± SEM
30
20
10
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
투여 시작 후의 일수
Ab2
IgG 대조군(5mg/kg)
AbMyo
* P < 0.01 (Ab2 vs. AbMyo)
+ P < 0.01 (Ab2 vs. IgG)

도면33

Ab2는 SCID 마우스에서 AbMyo에 대비하여 우수한 노출을 나타냄
α-인간 IgG ELISA, N=4/군

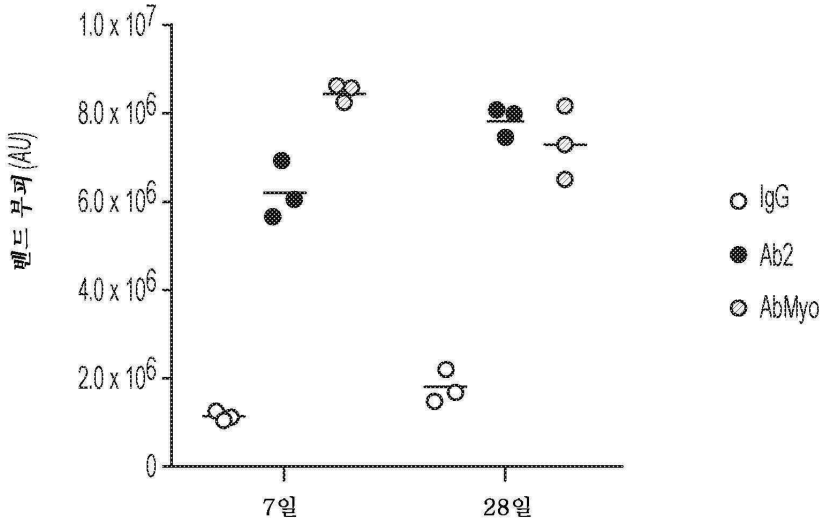


	$t_{1/2}$ (일)	AUC_{INF} (일*ug/mL)
AbMyo	8.2	773
Ab2	20.3	2072

도면34

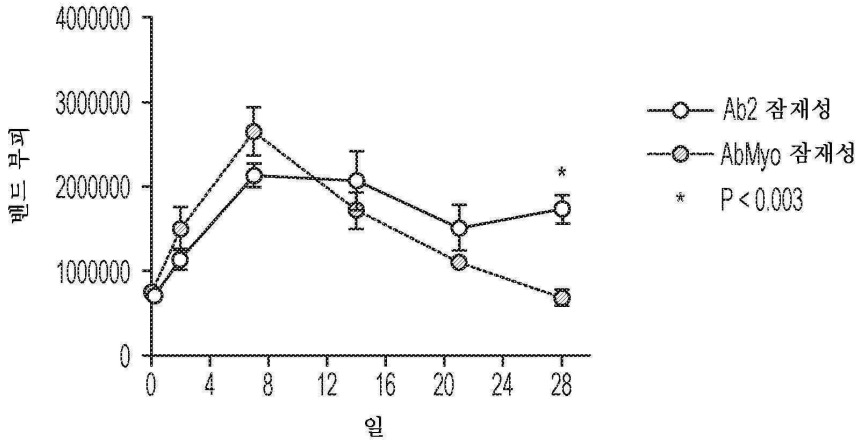
Ab2 및 AbMyo는 순환 잠재성
미오스타틴에 대해 유사한 효과를 가짐

혈청 내의 잠재성 미오스타틴
정량적 웨스턴, N=3/군



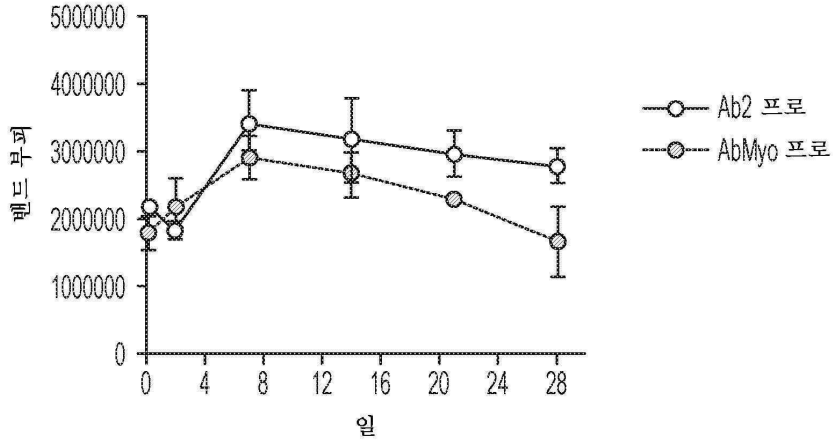
도면35

Ab2- 및 AbMyo-치료 마우스에서의 근육 잠재성 미오스타틴



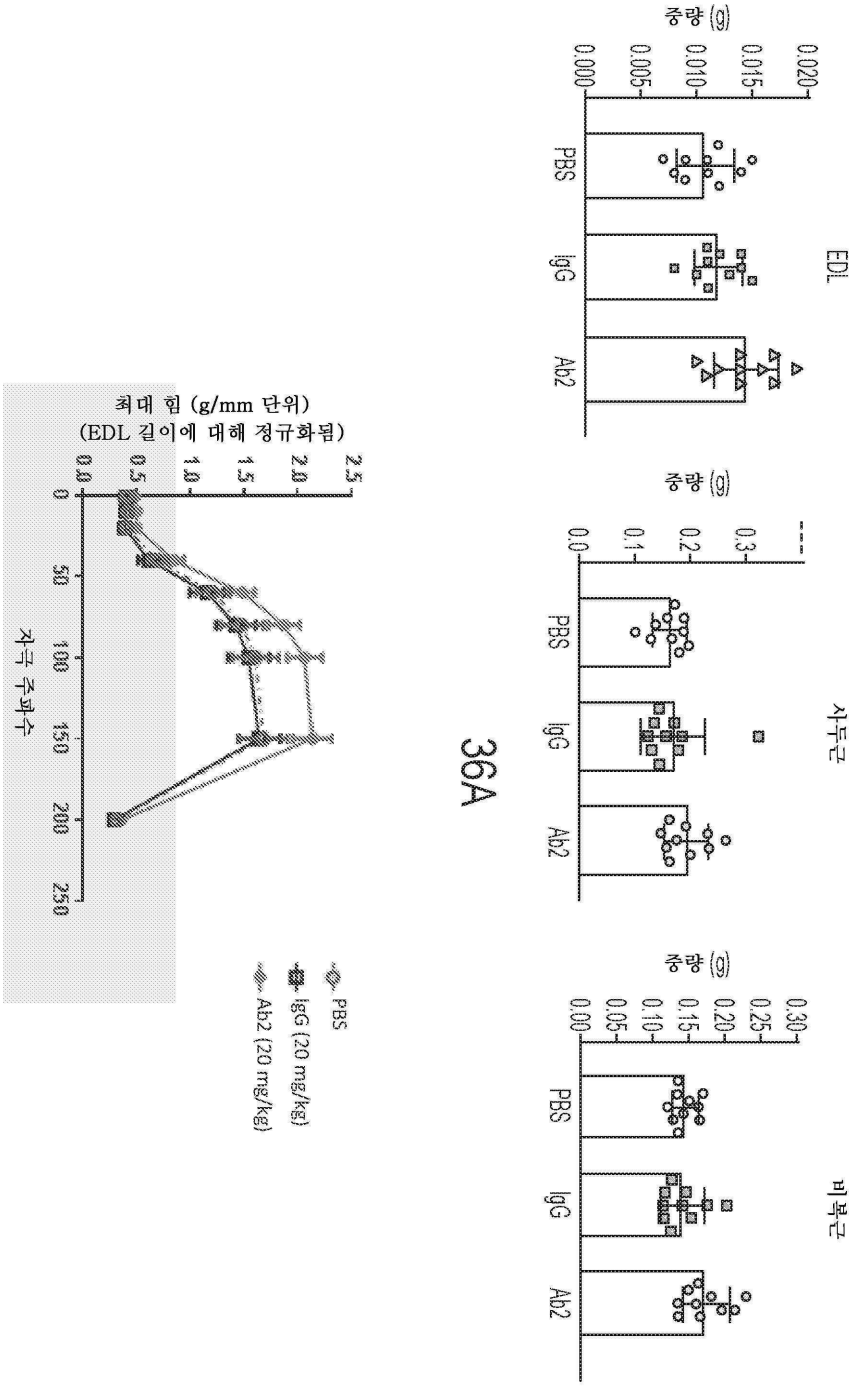
35A

Ab2- 및 AbMyo-치료 마우스에서의 근육 프로미오스타틴



35B

도면36



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Scholar Rock, Inc.

<120> ANTI-PRO/LATENT-MYOSTATIN ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> S1918.70001WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/219,094

<151> 2015-09-15

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 1

Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 3

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 4

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 5

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 6

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic Polypeptide

<400> 7

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 8

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 9

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 10

Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 11

Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 12

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val His

1 5 10

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 13

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr

1 5

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 14

Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val His

1 5 10

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 15

Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr

1 5

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 16

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr Val His

1 5 10

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 17

Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 18

Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 19

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 19

Ser Asp Asn

1

<210> 20

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 20

Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 21

Ser Asp Asp

1

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 22

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val

1 5 10

<210> 23

<211

> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 23

Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu Asn Gly Val

1 5 10

<210> 24

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 24

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 25

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 26

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 26

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 27

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 28

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 28

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 29

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Lys Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 30

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 30

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 31

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 31

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210>

32

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 32

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 33

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Polypeptide

<400> 33

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 34

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 34

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn

20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 35

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 35

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn

20 25 30

Thr Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Glu Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 36

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

<210> 37

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 37

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly

<210> 38

<211> 378

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 38

cagatccagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300

ctggtgcgat ttttggagtg gtcgcactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctca 378

<210> 39

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 39

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300

ctggtgcgat ttttggagtg gtcgcactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctca 378

<210> 40

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 40

cagatccagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtat caaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300

ctggtgcgat ttttggagtg gtcgcacaag tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctca 378

<210> 41

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 41

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtat caaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300

ctggtgcgat ttttggagtg gtcgcacaag tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctca 378

<210> 42

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 42

cagatccagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaataa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300

ctggtgcgat ttttggagtg gtcgcacaag tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctca 378

<210> 43

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 43

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaataa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctc 300

ctggtgcgat ttttggagtg gtcgcacaag tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcaccg tctcctca 378

<210> 44

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 44

cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgataatc agcgcccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggtcatcag tgggctccag 240

tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggggtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 45

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 45

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgataatc agcgcccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggggtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 46

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 46

cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcacctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgatc agcgcccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggtcatcag tgggctccag 240

tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 47

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 47

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcacctc caacatcgga agtaatactg tccactggta ccagcaactc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgatc agcgcccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 48

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 48

cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggaaatactg tccactggta ccagcaactc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgatc agcgcccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggtcatcag tgggctccag 240

tctgacgatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 49

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 49

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga ggaaatactg tccactggta ccagcaactc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgatgatc agcgcccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg agagcctgaa tggggtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 50

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Val Arg Phe Leu Glu Trp Ser His Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

180 185 190

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

195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val

210 215 220

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

225 230 235 240

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

245 250 255

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
325 330 335
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Leu Gly
450
<210> 51
<211> 215
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 51

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Asn Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110
Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
115 120 125
Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140
Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175
Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190
Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205
Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215
<210> 52
<211> 352
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys
1 5 10 15

Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala
20 25 30

Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn
35 40 45

Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu
50 55 60

Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp
65 70 75 80

Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile
85 90 95

Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Val Asp Gly Lys Pro
100 105 110

Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val
115 120 125

Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr
130 135 140

Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly
165 170 175

Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp
180 185 190

Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp
195 200 205

Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp
210 215 220

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg

225 230 235 240

Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser

245 250 255

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

260 265 270

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly

275 280 285

Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val

290 295 300

His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr

305 310 315 320

Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile

325 330 335

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

340 345 350

<210> 53

<211> 352

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 53

Asn Glu Asp Ser Glu Arg Glu Ala Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys

1 5 10 15

Asn Ala Cys Ala Trp Arg Gln Asn Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Glu Ala

20 25 30

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

35 40 45

Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Pro Pro Leu

50 55 60

Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp

65 70 75 80

Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile

85 90 95

Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Ala Asp Gly Lys Pro

100 105 110

Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val

115 120 125

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

130 135 140

Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly

145 150 155 160

Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Ser Pro Gly

165 170 175

Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp

180 185 190

Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp

195 200 205

Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp

210 215 220

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg

225 230 235 240

Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser

245 250 255

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

260 265 270

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly

275 280 285

Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val

290 295 300

His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr

305 310 315 320

Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile

325 330 335

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

340 345 350

<210> 54

<211> 352

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Asn Glu Gly Ser Glu Arg Glu Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys

1 5 10 15

Asn Ala Cys Ala Trp Arg Gln Asn Thr Arg Tyr Ser Arg Ile Glu Ala

20 25 30

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

35 40 45

Ile Ser Lys Asp Ala Ile Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Pro Pro Leu

50 55 60

Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp

65 70 75 80

Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile

85 90 95

Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Ala Asp Gly Lys Pro

100 105 110

Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val

115 120 125

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

130 135 140

Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly

145 150 155 160

Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Ser Pro Gly

165 170 175

Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp

180 185 190

Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp
195 200 205
Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp
210 215 220
Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg
225 230 235 240

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

His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr
305 310 315 320
Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile
325 330 335
Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
340 345 350
<210> 55
<211> 277
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 55
Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys

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

50 55 60

Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp

65 70 75 80

Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile

85 90 95

Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Val Asp Gly Lys Pro

100 105 110

Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val

115 120 125

Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr

130 135 140

Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly

145 150 155 160

Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly

165 170 175

Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp

180 185 190

Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp

195 200 205

Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp

210 215 220

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg

225 230 235 240

Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser

245 250 255

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

260 265 270

Asp Trp Ile Ile Ala

275

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 56

Arg Ser Arg Arg

1

<210> 57

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 57

Arg Val Arg Arg

1

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 58

Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 59

His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

1 5 10 15

Ser

<210> 60

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 60

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

85

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 61

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

1 5 10

<210> 62

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 62

Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln

1 5 10 15

Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala

20 25 30

Thr

<210> 63

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 63

Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg

1 5 10 15

Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser

20 25 30

Arg Cys

<210> 64

<211> 80

<212> PRT

<213> Synthetic Polynucleotide

<400> 64

Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn Val Glu Lys Glu

1 5 10 15

Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr Lys Ser Ser Arg

20 25 30

Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Glu Thr

35 40 45

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

50 55 60

Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp

65 70 75 80

<210> 65

<211> 418

<212> PRT

<213> Synthetic Polynucleotide

<400> 65

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Ser Gly Val Leu Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His
20 25 30

His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ala Glu Gly Pro
35 40 45

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Gly
50 55 60

Gly Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp
65 70 75 80

Gly Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu
85 90 95

Glu Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala
100 105 110

Pro Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro
115 120 125

Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val Gln Arg Asp Asp Ser
130 135 140

Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr
145 150 155 160

Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu Met Gln Val Asp Gly
165 170 175

Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser Lys Ile Gln Tyr Asn
180 185 190

Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu Arg Pro Val Glu Thr
195 200 205

Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys
210 215 220

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

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

Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His
355 360 365
Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr
370 375 380
Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln
385 390 395 400
Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly
405 410 415

Cys Ser