



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0029111
(43) 공개일자 2018년03월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7006926(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년05월01일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2017-7002063
원출원일자(국제) 2009년05월01일
심사청구일자 2017년02월22일
- (85) 번역문제출일자 2018년03월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/002699
- (87) 국제공개번호 WO 2009/134428
국제공개일자 2009년11월05일
- (30) 우선권주장
61/050,168 2008년05월02일 미국(US)
61/144,131 2009년01월12일 미국(US)

- (71) 출원인
약셀레론 파마 인코포레이티드
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128
루드비히 인스티튜트 포우 캔서 리써치 엘티디.
미합중국 뉴욕주10158 뉴욕시 3 애브뉴 605
- (72) 발명자
그린버그, 아시아
미국 02114 매사추세츠주 보스턴 에머슨 플레이스 #22씨 10
크노프, 존
미국 01741 매사추세츠주 칼라일 로빈스 드라이브 147
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 1 항

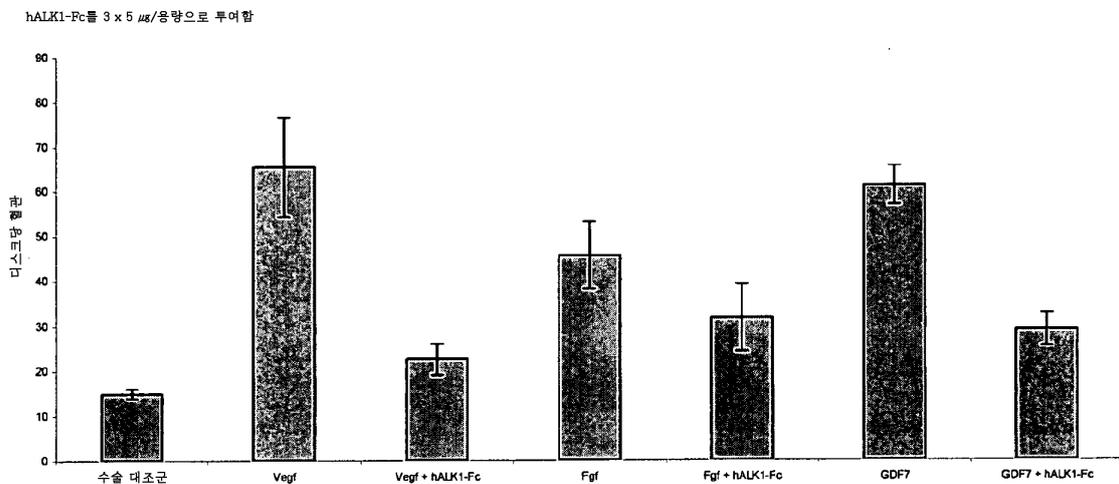
(54) 발명의 명칭 **혈관신생 및 혈관주위세포 적용범위의 조정을 위한 ALK1 길항제 기재의 방법 및 조성물**

(57) 요약

특정 측면에서, 본원은, 액티빈-유사 키나제 I (ALK1) 폴리펩티드의 세포의 도메인의 리간드-결합 부분을 포함하는 폴리펩티드가 생체 내에서, 특히 혈관신생-관련 장애에 걸린 포유동물에서 혈관신생을 억제하는데 사용될 수 있다는 통찰에 관한 것이다. 추가로, 본원은 ALK1의 억제제가 종양 및 망막을 비롯한 혈관분포 조직에서 혈관주위세포 적용범위를 증가시키는데 사용될 수 있다는 것을 입증한다. 본원에서는 또한 ALK1에 대한 리간드를 확인하고, 상기 리간드가 혈관신생유발 활성을 갖는다는 것을 입증하고, 수용체-리간드 상호작용을 억제하는 항체를 기재한다.

대표도 - 도7

hALK1-Fc를 사용한 CAM 분석



(52) CPC특허분류

C07K 14/71 (2013.01)

C07K 16/2896 (2013.01)

C07K 16/40 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2319/32 (2013.01)

(72) 발명자

쿠마르, 라빈드라

미국 01720 매사추세츠주 액톤 아틀링톤 스트리트
421

퍼살, 로버트, 스콧

미국 01801 매사추세츠주 우번 버드 스트리트 21

씨라, 자스비르

미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 링컨 테라스 3

피에트라스, 크리스티안

스웨덴 예스이-171 77 스톡홀름 박스 240 노벨스
백 3 루드빅 인스티튜트 포 캔서 리서치

명세서

청구범위

청구항 1

혈관신생 및 혈관주위세포 조성을 조정하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 35 USC § 119 하에 2008년 5월 2일에 출원한 미국 가출원 61/050,168호 및 2009년 1월 12일에 출원한 가출원 61/144,131호의 출원일의 이익을 주장하며, 상기 두 출원의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 새로운 혈관을 형성하는 과정인 혈관신생은 많은 정상 및 비정상 생리학적 상태에서 중요하다. 정상 생리학적 상태 하에, 인간 및 동물은 특수하고 제한된 상황에 혈관신생을 겪는다. 예를 들어, 혈관신생은 상처 치유, 태아 및 배아 발생, 및 황체, 내막 및 태반의 형성에서 정상적으로 관찰된다.

[0004] 바람직하지 않거나 부적절하게 조절된 혈관신생은 많은 장애에서 발생하고, 여기서 비정상 내피 성장이 병리학 적 과정을 유발하거나 관여할 수 있다. 예를 들어, 혈관신생은 많은 종양의 성장에 관여한다. 탈조절된 혈관신생은 류마티스 관절염, 망막병증, 혈관종 및 건선과 같은 병리학 적 과정에 관련되어 왔다. 조절되지 않은 혈관신생이 존재하는 다양한 병리학 적 질환 상태는 혈관신생-연관 질환으로 분류되었다.

[0005] 제어된 및 비제어된 혈관신생은 모두 유사한 방식으로 진행되는 것으로 생각된다. 모세 혈관은 주로 내피 세포 및 혈관주위세포 (기저막에 의해 둘러싸인)로 이루어진다. 혈관신생은 내피 세포와 백혈구에 의해 방출된 효소에 의한 기저막의 침식과 함께 시작된다. 이어서, 혈관 내강의 안을 덮는 내피 세포가 기저막을 통하여 돌출한다. 혈관신생 인자는 내피 세포가 침식된 기저막을 통해 이동하도록 유도한다. 이동하는 세포는 모 혈관으로부터 돌출하는 "발아 (sprout)"를 형성하고, 여기서 내피 세포는 유사분열 및 증식을 한다. 내피 발아는 서로 합해져서 모세관 루프를 형성하고, 이는 새로운 혈관을 생성한다.

[0006] 혈관신생을 억제하는 작용제는 다양한 장애를 치료하는데 효과적인 것으로 입증되었다. 아바스틴 (Avastin)TM (베바시주맵) (혈관 내피 성장 인자 (VEGF)와 결합하는 모노클로날 항체)은 다양한 암의 치료에 효과적인 것으로 입증되었다. 맥쿠젠(Macugen)TM (VEGF와 결합하는 앵타머)은 신생혈관 (습윤 (wet)) 노화-관련 황반 변성의 치료에 효과적인 것으로 입증되었다. SDF/CXCR4 신호전달 경로의 길항제는 종양 혈관신생을 억제하고, 마우스 모델에서 암에 대해 효과적이다 (Guleng et al. Cancer Res. 2005 Jul 1;65(13):5864-71). 이소쿠마린 2-(8-히드록시-6-메톡시-1-옥소-1H-2-벤조피란-3-일) 프로피온산 (NM-3)은 경구로 생체이용가능한 혈관신생 억제제로서 I상 임상 평가를 마쳤다. NM-3은 시험관 내에서 내피 및 종양 세포를 직접 치사시키고, 마우스에서 다양한 인간 종양 이종이식편의 치료에 효과적이다 (Agata et al. Cancer Chemother Pharmacol. 2005 Dec;56(6):610-4). 탈리도마이드 및 관련 화합물은 암의 치료에 유익한 효과를 나타냈고, 작용의 분자 메커니즘은 분명하지 않지만, 혈관신생의 억제가 항-종양 효과의 중요한 성분인 것으로 보인다 (예를 들어, 문헌 [Dredge et al. Microvasc Res. 2005 Jan;69(1-2):56-63] 참조). 류마티스 관절염의 치료에서 TNF-알파 길항제의 성공은 부분적으로 염증이 생긴 관절 조직에 대한 항-혈관신생 효과에 기인한다 (Feldmann et al. Annu Rev Immunol. 2001;19:163-96). 항-혈관신생 요법은 다른 염증성 질환, 특히 건선에 유익한 효과를 가질 것으로 널리 예상된다. 많은 항-혈관신생제는 영향을 받는 조직에 무관하게 혈관신생에 대해 효과를 갖지만, 다른 혈관신생제는 조직-선택적인 효과를 갖는 경향이 있을 수 있다.

[0007] 혈관주위세포는 내피 세포 및 평활근 세포와 함께 맥관구조의 성분 세포 유형 중 하나이다. 내피 세포에 대한 혈관주위세포의 비는 중추신경계에서 가장 크고, 혈관주위세포는 혈액-뇌 장벽에서 상당한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 당뇨 망막병증은 망막 미세혈관에서의 혈관주위세포의 손실을 특징으로 하며, 혈관주위세포의 손실

은 질환의 진행에 중요한 병리생리학적 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

[0008] 혈관분포 조직에서 혈관신생을 억제하고, 혈관주위세포 적용범위를 증가시키기 위한 추가의 조성물 및 방법을 갖는 것이 바람직하다. 이들은 일반적으로 또는 특정 조직 및/또는 질환 상태에서 원치 않는 혈관 성장을 억제할 수 있는 방법 및 조성물을 포함한다.

발명의 내용

[0009] <발명의 개요>

[0010] 부분적으로, 본원은 액티빈-유사 키나제 I (ALK1)-매개된 조절 시스템의 특성화, 및 생체 내 혈관분포 조직에서의 혈관신생 및 혈관주위세포 적용범위의 조절에서 상기 시스템의 역할을 제시한다. 특정 측면에서, 본원은 ALK-1 리간드의 길항제, 및 항-혈관신생체로서의 또는 혈관주위세포 적용범위를 증가시키기 위한 상기 길항제의 용도를 제공한다. 추가로, 본원은 ALK-1의 길항제 자체, 및 항-혈관신생체로서 상기 길항제의 용도를 제공한다. 본원에 설명된 바와 같이, ALK1은 GDF6 및 GDF7을 포함한 GDF5 군의 리간드, 및 또한 BMP10을 포함한 BMP9 군의 리간드에 대한 수용체이다. 본원은 ALK1 및 상기 설명된 리간드에 의해 매개된 신호전달이 생체 내에서 혈관신생에 관여하고, 상기 조절 시스템의 억제가 강력한 항-혈관신생 효과를 갖는다는 것을 입증한다. 추가로, 본원은 ALK1 조절 시스템의 억제가 혈관분포 조직에서 혈관주위세포 적용범위를 증가시킨다는 것을 입증한다. 따라서, 특정 측면에서, 본원은 혈관신생을 억제하는데 사용하기 위한 ALK1 조절 시스템의 길항제, 예를 들어 수용체 또는 하나 이상의 리간드의 길항제를 제공한다. 특정 측면에서, 본원은 암, 특히 다발성 골수종, 흑색종, 폐암, 췌장암 (특히, 췌장 내분비 조직의 종양), 유방암 (예를 들어, 원발성 유방암 또는 전이성 유방암; 에스트로겐 수용체 양성 (ER+) 또는 에스트로겐 수용체 음성 (ER-)), 류마티스 관절염, 눈에서 병리학 적 혈관신생과 연관된 장애, 및 혈관분포 조직에서의 혈관주위세포의 손실과 연관된 장애, 예컨대 당뇨 망막병증의 치료를 위한 ALK1 리간드의 길항제를 제공한다.

[0011] 특정 측면에서, 본원은 혈관신생을 억제하는데 사용하기 위한 ALK1의 세포외 도메인의 리간드 결합 부분을 포함하는 폴리펩티드 ("ALK1 ECD 폴리펩티드")를 제공한다. 임의의 특정 작용 메커니즘에 매이기를 바라지 않지만, 상기 폴리펩티드는 ALK1의 리간드와 결합하고, ALK1 및 다른 수용체와 상호작용하는 이들 리간드의 능력을 억제함으로써 작용하는 것으로 예상된다. 특정 실시태양에서, ALK1 ECD 폴리펩티드는 서열 1의 인간 ALK1 서열의 아미노산 22-118의 서열에 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. ALK1 ECD 폴리펩티드는 작은 단량체 단백질로서 또는 이량체 형태로 (예를 들어, 융합 단백질로서 발현된), 특히 눈과 같은 조직 내로 국소 투여하기 위해 사용될 수 있다. ALK1 ECD는 또한 개선된 특성, 예를 들어 증가된 반감기 또는 보다 큰 생산 또는 정제의 용이성을 제공하기 위해 제2 폴리펩티드 부분에 융합될 수 있다. 전신 투여 (예를 들어, 정맥내, 동맥내 및 복강내 투여)에서 ALK1 ECD 폴리펩티드의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 면역글로불린의 Fc 부분에 대한 융합 또는 폴리옥시에틸렌 모이어티 (moiety) (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜)에 대한 연결이 특히 유용할 수 있다. 본원에서 입증되는 바와 같이, 전신 투여된 ALK1-Fc 폴리펩티드는 눈에서 강력한 항-혈관신생 효과를 갖고, 또한 류마티스 관절염 및 다양한 종양의 무린 (murine) 모델에서 긍정적인 효과를 제공한다. 특정 실시태양에서, ALK1-Fc 융합 단백질은 서열 1의 아미노산 22-118의 서열에 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 개재 링커의 존재 또는 부재 하에 면역글로불린의 Fc 부분에 융합되고, 여기서 ALK1-Fc 융합 단백질은 GDF5, GDF7 및 BMP9와 1×10^{-7} M 미만의 K_D 로 결합하고, TGFβ-1과 1×10^{-6} 초과의 K_D 로 결합한다. Fc 부분은 유기체에 적절하도록 선택될 수 있다. 임의로, Fc 부분은 인간 IgG1의 Fc 부분이다. 바람직한 실시태양에서, ALK1-Fc 융합 단백질은 서열 1의 아미노산 22-118을 포함한다. 임의로, ALK1-Fc 융합 단백질은 서열 3의 아미노산 서열을 포함한다. 임의로, ALK1-Fc 융합 단백질은 포유동물 세포주, 특히 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주에서 서열 4의 핵산의 발현에 의해 생산된 단백질이다. ALK1-ECD 폴리펩티드는 실질적으로 발열원이 존재하지 않는 제약 제제로서 제제화될 수 있다. 제약 제제는 전신 전달 (예를 들어, 정맥내, 동맥내 또는 피하 전달) 또는 국소 전달 (예를 들어, 눈에 대한)을 위해 제조될 수 있다.

[0012] 특정 측면에서, 본원은 치료 환경에서 사용하기 위한 ALK1-Fc 융합 단백질의 비교적 균일한 제제를 개발하기 어렵다는 것을 인식한다. 본원에 설명된 바와 같이, ALK1-Fc 융합 단백질은 보다 고차 구조의 복합체로 응집되는 경향이 있다. 본원은 이러한 어려움에 대한 해법을 제공하고, 이에 따라 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%는 이량체 ALK1-Fc 융합 단백질로 이루어진, ALK1-Fc 융합 단백질을 포함하는 제약 제제를

제공한다. 따라서, 특정 측면에서, 본원은 서열 1의 아미노산 22-118의 서열에 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 ALK1-Fc 융합 단백질을 포함한 제약 체제를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합되고, ALK1-Fc 융합 단백질은 GDF5, GDF7 및 BMP9와 1×10^{-7} M 미만의 K_D 로 결합하며 TGF β -1과 1×10^{-6} 초과의 K_D 로 결합하고, ALK1-Fc 융합 단백질의 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%는 이량체 형태로 존재한다. ALK1-Fc 융합 단백질의 Fc 부분은 인간 IgG1의 Fc 부분일 수 있다. ALK1-Fc 융합 단백질은 서열 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. ALK1-Fc 융합 단백질은 포유동물 세포주, 특히 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주에서 서열 4의 핵산의 발현에 의해 생산될 수 있다. 이러한 제약 체제는, 특히 주사에 의해 눈에 투여하기에 적절하도록 제제화될 수 있다. 개시된 제약 체제는 혈관신생의 억제, 종양의 치료, 류마티스 관절염의 치료, 혈관신생과 연관된 안과적 장애의 치료, 및 혈관분포 조직에서의 혈관주위세포 적용범위의 감소와 연관된 장애, 예컨대 당뇨 망막병증의 치료를 비롯한 본원에 기재된 다양한 치료 목적에 대해 사용될 수 있다. ALK1-Fc 제약 체제는 혈관신생을 억제하는 제2 작용제, 예컨대 VEGF 길항제 (예를 들어, 아바스틴, 소라페닙 및 VEGF 수용체 트랩)와 함께 사용될 수 있다.

[0013]

본원은, ALK1 신호전달 경로의 길항제가 혈관분포 조직에서의 혈관주위세포 적용범위를 증가시킨다는 것을 입증한다. 따라서, 본원은 포유동물의 혈관분포 조직에서 혈관주위세포 적용범위의 증가를 촉진시키는 방법을 제공한다. 이러한 길항제는 ALK1 ECD 단백질 (예를 들어, ALK1-Fc), DAN 단백질, 및 ALK1 및 그의 임의의 리간드 (예컨대, BMP9, BMP10, GDF5, GDF6 및 GDF7)에 대한 항체를 비롯하여 본원에 기재된 길항제 중 임의의 것일 수 있다. 특정 측면에서, 본원은 유효량의 ALK1 ECD 단백질을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 포유동물의 혈관분포 조직에서 혈관주위세포 적용범위의 증가를 촉진시키는 방법을 제공한다. ALK1 ECD 단백질은 ALK1-Fc 융합 단백질일 수 있고, ALK1-Fc 융합 단백질은 서열 1의 아미노산 22-118의 서열에 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있으며, 여기서 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합되고, ALK1-Fc 융합 단백질은 TGF β -1과 1×10^{-6} 초과의 K_D 로 결합한다. ALK1 ECD 단백질은 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 ALK1 리간드와 결합할 수 있다. ALK1 ECD 폴리펩티드는 서열 1의 아미노산 34-95에 상응하는 아미노산 서열에 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. ALK1 ECD는 엄격한 혼성화 조건 하에 서열 2의 뉴클레오티드 100-285 또는 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 서열 2의 뉴클레오티드 100-285의 변이체와 혼성화하는 핵산에 의해 코딩된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. ALK1-Fc 융합 단백질은 서열 3의 서열을 가질 수 있다. ALK1 ECD 융합 단백질은 눈에 정맥내로 또는 국소 전달될 수 있다. 특정 측면에서, 본원은, 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 ALK1 폴리펩티드와 결합하고 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 유효량의 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 포유동물의 혈관분포 조직에서 혈관주위세포 적용범위의 증가를 촉진시키는 방법을 제공한다. 항체는 ALK1 폴리펩티드와 5×10^{-8} M 미만, 1×10^{-9} M 미만 또는 1×10^{-10} M 미만의 K_D 로 결합할 수 있다. 항체는 ALK1 리간드에 대한 ALK1의 결합을 억제할 수 있고, 여기서 ALK1 리간드는 BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 항체는 정맥내로 또는 안구내로 전달될 수 있다. WO 2007/040912에 기재된 항체가 상기 방법에 유용할 수 있다. ALK1 신호전달 길항제는 혈관신생을 억제하는 제2 작용제, 예컨대 VEGF 길항제와 함께 투여될 수 있다. 치료될 포유동물은 당뇨 망막병증, 또는 망막 맥관구조에서 혈관주위세포 적용범위의 감소를 특징으로 하는 다른 망막 장애, 또는 흑색종, 폐 종양, 다발성 골수종, 췌장 종양, 예컨대 췌장 내분비 조직의 종양, 및 유방암 (예를 들어, 원발성 유방암 또는 전이성 유방암; 에스트로젠 수용체 양성 (ER+) 또는 에스트로젠 수용체 음성 (ER-))으로 이루어진 군으로부터 선택되는 종양을 가질 수 있다.

[0014]

특정 측면에서, 본원은, 본원에서 일반적으로 또는 구체적으로 설명된 임의의 ALK1 ECD 폴리펩티드를 투여함으로써, 포유동물에서 혈관신생을 억제하기 위한 방법을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 방법은 포유동물에게 유효량의 ALK1-Fc 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 ALK1 Fc 융합 단백질은 서열 1의 아미노산 22-118의 서열에 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합되고, 여기서 ALK1-Fc 융합 단백질은 TGF β -1과 1×10^{-6} 초과의 K_D 로 결합한다. 임의로, ALK1-Fc 융합 단백질은 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 ALK1 리간드와 결합한다. 임의로, ALK1-Fc 융합 단백질은 서열 3의 서열을 갖는다. ALK1 ECD 폴리펩티드는 국소로 (예를 들어, 눈에) 또는 전신으로 (예를 들어, 정맥내, 동맥내 또는 피하로) 전달될 수 있다. 특정 실시태양에서, 본원은 ALK1-Fc 단백질을 예를 들어 전신 투여에 의해 눈에서 먼 위치에서 포유동물에게 투여함으로써

써, 포유동물의 눈에서 혈관신생을 억제하기 위한 방법을 제공한다.

[0015] 특정 측면에서, 본원은, ALK1, 특히 세포의 도메인에 위치하는 에피토프 (서열 1의 아미노산 22-118)와 결합하고, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드에 대한 ALK1의 결합을 억제하는 항체를 제공한다. ALK1에 대한 이들 리간드의 친화도에 기초하여, 항체는 5×10^{-8} M 미만, 임의로 5×10^{-8} 내지 1×10^{-10} 의 K_D 로 결합할 수 있다. 상기 범위 내의 친화도를 갖는 항체는 GDF5, 6 및 7 중 하나 이상에 의한 신호전달을 억제하는 한편, BMP9 및 10에 의한 신호전달에는 더 적은 영향을 미치는 것으로 예상될 것이다. 이러한 항체는 바람직하게는 GDF5, GDF6 및 GDF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드에 의해 자극된 혈관신생을 억제한다. 특정 메카니즘에 매이기를 바라지 않지만, 상기 항체는 ALK1 활성을 직접 억제함으로써 작용할 것으로 예상되고, 이는 ALK1 리간드의 활성을 억제하는 것으로 예상되는 ALK1-Fc 용합 단백질의 활성에 대조될 것이다. 항-ALK1 항체는 대체 수용체 시스템, 예를 들어 BMPRIa, BMPRIb 및 BMPRII 복합체를 통해 신호전달하는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 또는 BMP10의 능력을 저해하는 것으로 예상되지 않는다. 그러나, 항-ALK1 항체는 ALK1 ECD가 저친화도 리간드와 결합하지 않거나 억제하지 않을 수 있다라도 ALK1을 통해 신호전달하는 ALK1에 대한 저친화도 리간드 (예를 들어, 결합이 상대적으로 약하다라도 일반적으로 ALK-1을 통해 유의한 신호전달 사건을 촉발하는 것으로 인정되는 TGF- β)의 능력을 저해하는 것으로 예상된다. 항체는 ALK1 폴리펩티드와 1×10^{-10} M 미만의 K_D 로 결합할 수 있다. 상기 범위 내의 친화도를 갖는 항체는 BMP9 또는 10에 의한 신호전달을 억제하는 것으로 예상될 것이다. 상기 항체는 바람직하게는 ALK1에 대한 BMP9 및 BMP10의 결합을 억제한다. 특히, 본원에 개시된 데이터에 기초하여, ALK1에 상대적으로 불량하게 결합하는 항체는 GDF5 또는 BMP9와 같은 보다 강한 결합 리간드를 억제하지 않으면서 ALK1에 대한 TGF β 결합을 억제할 수 있다. 본원에 설명된 항체는 바람직하게는 재조합 항체이고, 이는 분자 생물학의 기술을 이용하여 구성된 핵산으로부터 발현된 항체, 예를 들어 단일쇄 항체로부터 개발된 인간화 항체 또는 완전 인간 항체를 의미한다. Fv, Fab 및 단일쇄 항체가 또한 용어 "재조합 항체" 내에 포함된다. 항체는 또한 폴리클로날 또는 비-재조합 모노클로날 항체 (인간 또는 무인 형태, 및 트랜스제닉 마우스로부터 얻은 인간 항체 포함) 일 수 있다. 항체 및 ALK1-ECD 폴리펩티드는 실질적으로 발열원이 존재하지 않는 제약 제제로서 제제화될 수 있다. 제약 제제는 전신 전달 (예를 들어, 정맥내, 동맥내 또는 피하 전달) 또는 국소 전달 (예를 들어, 눈에)을 위해 제조될 수 있다. WO 2007/040912에 기재된 항체가 본원에 기재된 다양한 방법에 유용할 수 있다.

[0016] 특정 측면에서, 본원은 포유동물에게 본원에서 일반적으로 또는 구체적으로 설명된 ALK1 폴리펩티드와 결합하는 유효량의 항체를 투여함으로써, 포유동물에서 혈관신생을 억제하기 위한 방법을 제공한다. 상기 목적에 유용한 항체는 ALK1의 세포의 도메인 (예를 들어, 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 폴리펩티드와 결합) 또는 ALK1의 다른 부분과 결합할 수 있다. 항체는 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 폴리펩티드와 결합할 수 있고, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드의 결합을 억제한다. 항체는 ALK1 폴리펩티드와 5×10^{-8} M 미만, 임의로 5×10^{-8} 내지 1×10^{-10} 의 K_D 로 결합할 수 있다. 항체는 GDF5, GDF6 및 GDF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드에 의해 자극된 혈관신생을 억제할 수 있다. BMP9 또는 10에 의한 신호전달에 비해 GDF5, 6 또는 7에 의해 매개된 신호전달을 선택적으로 억제하는 항체는 GDF5, 6 또는 7이 국제화되는 조직, 즉, 주로 뼈 또는 관절에서 일어나는 혈관신생의 선택적인 억제제로서 사용될 수 있다. 항체는 ALK1 폴리펩티드와 1×10^{-10} M 미만의 K_D 로 결합할 수 있다. 항체는 ALK1 리간드에 대한 ALK1의 결합을 억제할 수 있고, 여기서 ALK1 리간드는 BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 항-ALK1 항체는 국소로 (예를 들어, 눈에) 또는 전신으로 (예를 들어, 정맥내, 동맥내 또는 피하로) 전달될 수 있다. 특정 실시태양에서, 본원은 항-ALK1 항체를 투여함으로써 포유동물의 눈에서 혈관신생을 억제하기 위한 방법을 제공한다. 다른 특정 실시태양에서, 본원은 다발성 골수종의 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 본원은 다수의 혈관신생유발 (pro-angiogenic) 인자, 예를 들어 VEGF, PDGF 및/또는 FGF의 결과로서 병리학적 혈관신생과 연관되는 장애에서 혈관신생을 억제하기 위한 방법을 제공한다.

[0017] 특정 측면에서, 본원은 본원에 개시된 ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체를 제공한다. 임의의 특정 메카니즘에 매이기를 바라지 않지만, ALK1 리간드와 결합하는 항체는 성질상 ALK1 ECD 폴리펩티드에 유사한 효과를 가질 것으로 예상되고, 이는 두 종류의 작용제가 수용체 자체보다는 리간드와 결합하기 때문이다. 특정 실시태양에서, 항체는 GDF5, GDF6 및 GDF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드와 결합한다. 항체는 ALK1 리간드와 5×10^{-8} M 미만의 K_D 로 결합할 수 있다. 항체는 ALK1 리간드에 의해 자극된

혈관신생의 억제를 위해 선택될 수 있다. CAM 분석은 바람직한 항체의 선택을 위한 적절한 분석 시스템이다. 이러한 항체는 바람직하게는 재조합 항체이고, 실질적으로 발열원이 존재하지 않는 제약 제제로서 제제화될 수 있다. 제약 제제는 전신 전달 (예를 들어, 정맥내, 동맥내 또는 피하 전달) 또는 국소 전달 (예를 들어, 눈에)을 위해 제조될 수 있다.

[0018] 특정 측면에서, 본원은 ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체를 제공하고, 여기서 ALK1 리간드는 BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 항체는 ALK1 리간드와 1×10^{-10} M 미만의 K_D 로 결합할 수 있다. 이러한 항체는 바람직하게는 재조합 항체이고, 실질적으로 발열원이 존재하지 않는 제약 제제로서 제제화될 수 있다. 제약 제제는 전신 전달 (예를 들어, 정맥내, 동맥내 또는 피하 전달) 또는 국소 전달 (예를 들어, 눈에)을 위해 제조될 수 있다.

[0019] 특정 측면에서, 본원은 포유동물에게 ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 혈관신생을 억제하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 ALK1 리간드는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 항체는 GDF5, GDF6 및 GDF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드에 의해 자극된 혈관신생을 억제할 수 있다.

[0020] BMP/GDF 패밀리의 멤버 (BMP9, BMP10, GDF5, GDF6 및 GDF7 포함)는 기능적 신호전달 복합체를 형성하도록 타입 I 및 타입 II 수용체와 결합한다. 이들 수용체에 대한 결합 부위는 상이하다. 따라서, 특정 실시태양에서, ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 리간드의 결합을 억제하는 항체는 리간드의 타입 I 수용체 결합 부위에 또는 그 부근에 결합하는 항체이다.

[0021] 특정 측면에서, 본원은 본원에 개시된 ALK1 신호전달 시스템의 다른 억제제를 투여함으로써, 포유동물에서 혈관신생을 억제하기 위한 방법을 제공한다. 상기 억제제는 ALK1, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 또는 BMP10의 생산을 감소시키는 핵산 (예를 들어, 안티센스 또는 RNAi 구성체)을 포함할 수 있다. 다양한 친화도 결합 시약, 예를 들어 앵타머, 랜덤 펩티드, 선택된 표적에 대한 결합을 허용하도록 변형될 수 있는 단백질 스캐폴드 (scaffold) (상기 스캐폴드의 예는 안티칼린 및 FNIII 도메인을 포함함)가 또한 사용될 수 있고; 각각의 경우에, 친화도 결합 시약은 ALK1-리간드 상호작용을 파괴함으로써 또는 결합 후 일어나는 신호전달을 억제함으로써 본원에 개시된 ALK1 조절 시스템을 파괴하는 능력에 대해 선택될 것이다.

[0022] 추가의 실시태양에서, 본원은 ALK1 조절 시스템의 조절인자로서 DAN의 역할을 설명한다. 본원에서 제시된 바와 같이, DAN은 GDF5 그룹의 리간드와 결합하지만, BMP9 그룹의 리간드와는 결합하지 못한다. 따라서, DAN은 GDF5, GDF6 또는 GDF7에 의해 매개된 혈관신생을 억제하지만, BMP9 또는 BMP10에 의해 매개된 혈관신생을 억제하지 않는 것으로 예상된다. 그러므로, DAN은 GDF5 군의 단백질이 주로 발현되는 뼈 또는 관절에서 혈관신생을 억제하기 위한 선택제로서 사용될 수 있다. 따라서, 특정 실시태양에서, 본원은 류마티스 관절염 및 뼈 또는 관절을 포함하는 암 (예를 들어, 다발성 골수종 및 뼈 전이)을 비롯한 뼈 또는 관절 혈관신생의 맥락에서 항-혈관신생제로서 사용하기 위한 DAN 단백질을 제공한다. DAN 단백질은 일반적으로 GDF5, GDF6 및 GDF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 ALK1 리간드와 결합하는 반면에, BMP9 또는 BMP10에 대해서는 상대적으로 불량하게 결합할 것이다. DAN 단백질은 서열 10의 아미노산 17-180 (성숙 인간 DAN) 또는 서열 10의 아미노산 21-125 (DAN의 보존된 시스테인 노트 (knot) 도메인)에 상응하는 아미노산의 서열에 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. DAN 단백질은 또한 그의 상보체가 엄격한 혼성화 조건 하에 서열 11의 뉴클레오티드 153-467 또는 동일한 코딩 서열을 갖는 서열 11의 뉴클레오티드 153-467의 변이체 ("침묵 (silent)" 변이체, 예를 들어 삼중 코드의 워블 (wobble) 위치에서 하나 이상의 변경을 함유하는 변이체)에, 또는 서열 11의 뉴클레오티드 93-635 또는 그의 침묵 변이체와 혼성화하는 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 특정 측면에서, DAN 단백질은 융합 단백질, 예를 들어 Fc 융합 단백질이다. DAN은 뼈 및 관절 (다발성 골수종 및 뼈 전이와 같은 뼈 또는 관절에 위치하는 종양 포함)에서 혈관신생의 억제에 특히 유용할 것으로 예상되지만, 또한 다른 맥락에서, 예를 들어 다른 장소에 위치하는 종양에, 또는 눈에 유용할 수 있다.

[0023] 특정 측면에서, 본원은 류마티스 관절염에 걸린 포유동물에게 ALK1 ECD 단백질; ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체 (여기서, ALK1 리간드는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택됨); 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 ALK1 폴리펩티드와 결합하고, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체; 및 DAN 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 유효량의 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서

류마티스 관절염을 치료하는 방법을 제공한다.

- [0024] 특정 측면에서, 본원은 포유동물에서 종양을 치료는 방법을 제공한다. 상기 방법은 종양을 가진 포유동물에게 ALK1 ECD 단백질 (예를 들어, ALK1-Fc); ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체 (여기서, ALK1 리간드는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택됨); 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 ALK1 폴리펩티드와 결합하고, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체; 및 DAN 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 유효량의 작용제를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 방법은 혈관신생을 억제하는 제2 작용제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 종양은 뼈와 연관된 종양, 예를 들어 백혈병, 골수 종양, 다발성 골수종 또는 뼈 전이, 예를 들어 유방암 또는 전립선암과 일반적으로 연관되는 것일 수 있다. 종양은 흑색종, 폐암 종양, 췌장 종양 (예를 들어, 췌장 내분비 조직의 종양) 또는 유방암 (예를 들어, 원발성 유방암 또는 전이성 유방암)일 수 있다. 유방암은 에스트로겐 수용체 양성 (ER+) 또는 에스트로겐 수용체 음성 (ER-)일 수 있다. 종양은 또한 다수의 혈관신생유발 인자를 이용하는 종양, 예를 들어 항-VEGF 요법에 내성인 종양일 수 있다.
- [0025] 특정 측면에서 본원은 안과용 제제를 제공한다. 상기 제제는 ALK1 ECD 단백질; ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체 (여기서, ALK1 리간드는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택됨); 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 ALK1 폴리펩티드와 결합하고, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체; 및 DAN 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용제를 포함할 수 있다.
- [0026] 특정 측면에서, 본원은 눈의 혈관신생 관련 질환을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 전신으로 또는 상기 눈에, ALK1 ECD 단백질; ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체 (여기서, ALK1 리간드는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택됨); 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 ALK1 폴리펩티드와 결합하고, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체; 및 DAN 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 유효량의 작용제를 포함하는 제약 제제를 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0027] 각각의 경우에, 본원에 설명된 작용제는 혈관신생을 억제하는 제2 작용제와 함께 투여될 수 있다. 종양의 혈관신생을 억제하는 것이 바람직한 경우에, 본원의 작용제는 항암 효과를 갖는 제2 작용제, 예를 들어 화학치료제 또는 생물학적 항암제와 함께 투여될 수 있다.
- [0028] 본원은 또한, 서열 1의 아미노산 22-118의 서열에 적어도 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 ALK1-Fc 융합 단백질을 포함하고, 상기 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합되고, 여기서 ALK1-Fc 융합 단백질은 GDF5, GDF7 및 BMP9와 1×10^{-7} M 미만의 K_D 로 결합하고, TGF β -1과 1×10^{-6} 초과의 K_D 로 결합하는 것인 안과용 제약 제제를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 융합 단백질은 서열 3의 서열을 갖는다. 하나의 실시태양에서, Fc 부분은 인간 IgG1로부터의 것이다. 하나의 실시태양에서, 융합 단백질은 포유동물 세포주에서 서열 4의 핵산의 발현에 의해 생산된다. 하나의 실시태양에서, 세포주는 차이니즈 햄스터 난소 세포주이다. 제제는 페가프타닙, 라니비주맙 또는 당코르티코이드 중의 하나 이상의 의약을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 제제에는 실질적으로 발열원이 존재하지 않는다.
- [0029] 본원은 또한 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 ALK1 폴리펩티드와 결합하고, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 안과용 제약 제제를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 GDF5, GDF6 및 GDF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드에 의해 자극된 혈관신생을 억제한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 ALK1 폴리펩티드와 5×10^{-8} M 미만의 K_D 로 결합한다. 다른 실시태양에서, 항체는 ALK1 폴리펩티드와 1×10^{-10} M 미만의 K_D 로 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 또는 BMP10에 의해 자극된 혈관신생을 억제한다. 제제는 페가프타닙, 라니비주맙 또는 당코르티코이드 중의 하나 이상의 의약을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 제제에는 실질적으로 발열원이 존재하지 않는다.
- [0030] 특정 측면에서, 본원은 본원에 개시된 ALK1 리간드와 결합하고, ALK1에 대한 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 안과용 제약 제제를 제공한다. 특정 실시태양에서, 항체는 GDF5, GDF6 및 GDF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드와 결합한다. 항체는 ALK1 리간드와 5×10^{-8} M 미만의 K_D 로 결합할 수 있다. 항체는 ALK1 리간드에 의해 자극된 혈관신생의 억제를 위해 선택될 수 있다. CAM 분석은 바람직한 항체의 선택을 위한

적절한 분석 시스템이다. 상기 항체는 바람직하게는 재조합 항체이다. 제제는 페가프타닙, 라니비주맙 또는 당코르티코이드 중의 하나 이상의 의약을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 제제에는 실질적으로 발열원이 존재하지 않는다.

[0031] 본 출원은 또한, 서열 1의 아미노산 22-118의 서열에 적어도 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 ALK1-Fc 융합 단백질을 포함하고, 상기 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합되고, 여기서 ALK1-Fc 융합 단백질은 GDF5, GDF7 및 BMP9와 1×10^{-7} M 미만의 K_D 로 결합하고, TGF β -1과 1×10^{-6} 초과의 K_D 로 결합하는 것인 안과용 제약 제제를 눈에 투여하는 것을 포함하는, 눈의 혈관신생 관련 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 융합 단백질은 서열 3의 서열을 갖는다. 하나의 실시태양에서, Fc 부분은 인간 IgG1로부터의 것이다. 하나의 실시태양에서, 융합 단백질은 포유동물 세포주에서 서열 4의 핵산의 발현에 의해 생산된다. 하나의 실시태양에서, 세포주는 차이나이즈 햄스터 난소 세포주이다. 제제는 페가프타닙, 라니비주맙 또는 당코르티코이드 중의 하나 이상의 의약을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 제제에는 실질적으로 발열원이 존재하지 않는다.

[0032] 본 출원은 또한, 서열 1의 아미노산 22-118로 이루어진 ALK1 폴리펩티드와 결합하고, GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드의 결합을 억제하는 항체를 포함하는 안과용 제약 제제를 눈에 투여하는 것을 포함하는, 눈의 혈관신생 관련 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 GDF5, GDF6 및 GDF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 ALK1 리간드에 의해 자극된 혈관신생을 억제한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 ALK1 폴리펩티드와 5×10^{-8} M 미만의 K_D 로 결합한다. 다른 실시태양에서, 항체는 ALK1 폴리펩티드와 1×10^{-10} M 미만의 K_D 로 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 또는 BMP10에 의해 자극된 혈관신생을 억제한다. 제제는 페가프타닙, 라니비주맙 또는 당코르티코이드 중의 하나 이상의 의약을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 제제에는 실질적으로 발열원이 존재하지 않는다.

[0033] 개시된 방법의 하나의 실시태양에서, 혈관신생 관련 질환은 종양, 항-VEGF 요법에 내성인 종양, 다발성 골수종 종양, 뼈, 관절로 전이된 종양 또는 뼈 염증, 류마티스 관절염, 당뇨 망막병증, 미숙아 망막병증, 황반 변성, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 및 수정체 뒤 섬유증식으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 인간 액티빈 유사 키나제 1 (ALK1; 서열 1)에 대한 아미노산 서열을 보여준다. 단일 밀줄은 예측된 세포의 도메인을 보여준다. 이중 밀줄은 세포내 도메인을 보여준다. 신호 펩티드 및 막횡단 도메인은 밀줄을 치지 않았다.

도 2는 인간 ALK1 cDNA의 핵산 서열 (서열 2)을 보여준다. 코딩 서열을 밀줄로 표시하였다. 세포의 도메인을 코딩하는 부분은 이중 밀줄로 표시하였다.

도 3은 Fc 도메인에 대한 인간 ALK1의 세포의 도메인의 융합체 (서열 3)의 예를 보여준다. hALK1-Fc 단백질은 C-말단에서 링커 (밀줄친) 및 IgG1 Fc 구역에 융합된 인간 ALK1 단백질의 아미노산 22-120을 포함한다.

도 4는 서열 3의 hALK1-Fc 폴리펩티드의 발현을 위한 핵산 서열을 보여준다. 코딩된 아미노산 서열을 또한 보여준다. 리더 (leader) 서열은 Asp 22가 분비된 단백질의 N-말단 아미노산이 되도록 절단된다.

도 5는 내피 세포판 형성 분석에서 뮤린 ALK1-Fc ("RAP") 및 인간 ALK1-Fc ("ACE")의 항-혈관신생 효과를 보여준다. 모든 농도의 RAP 및 ACE는 내피 세포 성장 보충제 (ECGF)에 반응하는 관 (tube) 형성 수준을 양성 대조군인 엔도스타틴 (Endostatin)보다 더 큰 정도로 감소시켰다.

도 6은 병아리 (chick) 용모요막 (CAM) 분석에서 GDF7의 혈관신생 효과를 보여준다. GDF7 효과는 VEGF의 효과에 필적한다.

도 7은 CAM 분석에서 인간 ALK1-Fc 융합체의 항-혈관신생 효과를 보여준다. hALK1-Fc는 VEGF, FGF 및 GDF7에 의해 자극된 혈관신생을 억제한다.

도 8은 뮤린 ALK1-Fc (mALK1-Fc), hALK1-Fc, 상업적으로 이용가능한 항-ALK1 모노클로날 항체 (항-ALK1 mAb) 및 상업적으로 이용가능한 중화성 항-VEGF 모노클로날 항체의 상대적인 항-혈관신생 효과를 보여준다. ALK1-Fc

구성체의 항-혈관신생 효과는 항-VEGF 항체의 효과에 필적한다.

도 9는 생체 내에서 hALK1-Fc 및 항-VEGF 항체의 항-혈관신생 효과를 보여준다. hALK1-Fc 및 항-VEGF는 마우스 각막 미세낭 (micropocket) 분석으로 측정시 눈에서의 혈관신생에 대해 유사한 효과를 가졌다.

도 10은 류마티스 관절염의 무린 콜라겐-유도 관절염 (CIA) 모델에서 mALK1-Fc의 효과를 보여준다. 그래프는 콜라겐-유도된 수컷 DBA/1 관절염 마우스에서 42일 관찰 기간 동안 측정된 평균 그룹 관절염 스코어를 보여준다. RAP-041은 mALK1-Fc이다. 아바스틴™은 항-VEGF 항체 배바시주맙이다.

도 11은 수퍼로즈 (Superose) 12 10/300 GL 크기 배제 컬럼 (아머삼 바이오사이언시즈 (Amersham Biosciences, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재))에 의한 R&D 시스템즈 (R&D Systems, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)로부터의 hALK1-Fc (서열 3) 및 hALK1-Fc 융합 단백질의 분리를 보여준다. R&D 시스템즈 물질은 그래프의 좌측면 상의 피크에 의해 나타난 바와 같이 대략 13%의 응집 단백질 및 몇몇 더 낮은 분자량 종을 함유한다. 서열 3의 물질은 99% 초과가 적절한 분자 크기의 이량체로 이루어져 있다.

도 12는 PBS (원형) 및 mALK1-Fc (삼각형)로 처리된 마우스에서 루시페라제-발현 루이스 폐암 (LL/2-luc) 세포로부터의 형광 신호를 보여준다. 종양 세포를 꼬리 정맥에 주사하고, 세포 투여 당일(처리 (PBS 또는 10 mg/kg mALK1-Fc IP, 주 2회))을 개시하였다. PBS-처리된 마우스를 22일째에 빈사 상태로 희생시켰다. 처리군 및 대조군은 각각 7마리의 동물 (n=7)로 이루어져 있었다.

도 13은 체장 내분비 종양의 RIP1-Tag2 마우스 모델에서의 종양 발생의 다양한 단계에서 ALK1 및 BMP9 발현 수준을 보여준다. ALK1 발현은 최대 혈관신생 활성 기간 중에 최대치에 도달한 반면, BMP9 발현은 종양 발생 전에 걸쳐 증가한다.

도 14는 RIP1-Tag2 마우스에서의 종양 성장에 대한 mALK1-Fc 처리 효과를 나타낸다. 마우스를 10주령 또는 12주령에 시작하여 2주 동안 mALK1-Fc 또는 대조군 Fc (각 경우에 300 µg/마우스, 주 2회)로 처리하였다. mALK1-Fc 처리는 종양 성장을 철저히 억제한다.

도 15는 mALK1-Fc 또는 대조군 Fc로 처리된 RIP1-Tag2 마우스로부터의 종양의 혈관 밀도 (CD31⁺ 세포)를 보여준다. mALK1-Fc 처리는 종양의 혈관 밀도를 대략 50%만큼 감소시켰다.

도 16은 mALK1-Fc 또는 대조군 Fc로 처리된 RIP1-Tag2 마우스로부터의 종양의 혈관에서 혈관주위세포 적용범위 (CD31+ 세포에 대한 NG2+ 세포의 비)를 보여준다. mALK1-Fc 처리는 혈관주위세포 적용범위를 대략 100%만큼 증가시켰다.

도 17은 ER- 유방암 세포로부터 유래된 MDA-MB-231 세포주를 이용한 동소 이종이식편 모델에서의 mALK1-Fc의 효과를 보여준다. 30 mg/kg의 용량에서 mALK1-Fc는 이종이식편 종양에 대해 유의한 성장 지연 효과를 갖는다.

도 18은 ER+ 유방암 세포로부터 유래된 MCF7 세포주를 이용한 동소 이종이식편 모델에서의 hALK1-Fc의 효과를 보여준다. 10 또는 30 mg/kg의 용량에서, hALK1-Fc는 이종이식편 종양에 대해 유의한 성장 지연 효과를 갖는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035]

1. 개요

[0036]

ALK1은 TGF-β 수퍼패밀리의 리간드에 대한 타입 I 세포-표면 수용체이고, ACVRL1 및 ACVRL1로도 공지되어 있다. ALK1은 TGF-β1, TGF-β3 및 BMP-9에 대한 수용체로서 관련되었다 ([Marchuk et al., Hum Mol Genet. 2003]; [Brown et al., J Biol Chem. 2005 Jul 1;280(26):25111-8]).

[0037]

마우스에서, ALK1의 기능 상실 돌연변이는 발생 중인 혈관계에서 다양한 이상을 일으킨다 ([Oh et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 2000, 97, 2626-2631]; [Urness et al., Nat. Genet. 2000, 26, 328-331]).

[0038]

인간에서, ALK1의 기능 상실 돌연변이는 유전성 출혈성 모세혈관 확장증 (HHT 또는 오슬러-렌두-웨버 (Osler-Rendu-Weber) 증후군)과 연관되고, 여기서 환자는 개재하는 모세혈관 상(bed) 없이 동맥으로부터 정맥으로 직접 유동 (소통)을 생성시키는 동정맥 기형을 발달시킨다 (동정맥 단락 (arteriovenous shunt)). HHT의 환자의 전형적인 증상은 재발 코출혈, 위장관 출혈, 피부 및 점막피부 모세혈관 확장증, 및 폐, 대뇌 또는 간 혈관계에서 동정맥 기형 (AVM)을 포함한다.

- [0039] 문헌 ([David et al., Blood. 2007 Mar 1;109(5):1953-61] 및 [Scharpfenecker et al., J Cell Sci. 2007 Mar 15;120(Pt 6):964-72])의 최근의 간행물에서는 BMP9 및 BMP10이 내피 세포에서 ALK1을 활성화시키고, 그의 활성화의 결과는 내피 세포 증식 및 이동을 억제하는 것으로 결론지었다. 상기 효과는 VEGF와 같은 혈관신생유발 인자의 효과와 직접적으로 반대된다. 따라서, 상기 간행물에서는 BMP9 및 BMP10 자체가 항-혈관신생 인자이고, 또한 ALK1 활성화는 항-혈관신생 효과를 갖는 것으로 결론지었다. 이와 대조적으로, 본원에서는 BMP9 및 BMP10의 길항제 (아고니스트가 아니라)가 항-혈관신생 효과를 갖는 것을 입증한다.
- [0040] 본원은 ALK1의 세포의 도메인의 일부를 포함하는 폴리펩티드 ("ALK1 ECD 폴리펩티드")가 생체 내에서 VEGF-독립적 혈관신생 및 VEGF, FGF 및 PDGF를 포함한 다수의 혈관신생 인자에 의해 매개된 혈관신생을 포함하는 혈관신생을 억제하기 위해 사용될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 부분적으로, 본원은 ALK1에 대한 생리학적 고친화도 리간드의 정체를 제공하고, ALK1 ECD 폴리펩티드가 혈관신생을 억제하는 것을 입증한다. 데이터는 ALK1 ECD 폴리펩티드가 TGF-β 1에 대해 의미있는 결합을 나타내지 않는 경우에도 ALK1 ECD 폴리펩티드가 항-혈관신생 효과를 발휘할 수 있음을 입증한다. 또한, ALK1 ECD 폴리펩티드는 VEGF, FGF 및 GDF7을 포함한 많은 상이한 혈관신생유발 인자에 의해 자극된 혈관신생을 억제한다. 따라서, 본원은 ALK1 조절 시스템의 설명을 제공하고, 여기서 ALK1은 GDF6 및 GDF7을 포함하는 GDF5 그룹의 리간드에 대한 수용체이고, 또한 BMP10을 포함하는 BMP9 그룹의 리간드에 대한 수용체이고, 두 그룹의 리간드에 대해 상이한 친화도를 갖는다. 또한, 본원은 ALK1 및 상기 설명된 리간드에 의해 매개된 신호전달이 생체 내에서 혈관신생유발성이고, 상기 조절 시스템의 억제가 생체 내에서 강력한 항-혈관신생 효과를 갖는다는 것을 입증한다. 따라서, 특정 측면에서, 본원은 VEGF-의존성 혈관신생 및 VEGF-독립적 혈관신생을 모두 포함하는 혈관신생을 억제하는데 사용하기 위한 수용체 또는 하나 이상의 리간드의 길항제를 포함한 ALK1 조절 시스템의 길항제를 제공한다. 그러나, ALK1 자체에 대한 항체는 ALK1 ECD 폴리펩티드와 상이한 효과를 갖는 것으로 예상됨을 알아야 한다. ALK1에 대한 범-중화성 항체 (강한 및 약한 리간드 모두의 결합을 억제하는 것)는 ALK1을 통한 상기 리간드의 신호전달을 억제하는 것으로 예상될 것이지만, 다른 수용체 (예를 들어, GDF5-7 및 BMP9-10의 경우에 BMPRIa, BMPRIb, BMPRII, 및 TGFβ의 경우에 TBRI 및 TBRII)를 통해 신호하는 상기 리간드의 능력을 억제하는 것으로 예상되지 않는다. 반면에, ALK1 ECD 폴리펩티드는 실시예에 나타난 것과 같은 구성체에 대해, GDF5-7 및 BMP9-10을 포함한 그가 강하게 결합하는 모든 리간드를 억제할 것으로 예상되지만, 그가 약하게 결합하는 리간드, 예를 들어 TGF-β에는 영향을 미치지 않을 것이다. 따라서, ALK1에 대한 범-중화성 항체는 ALK1을 통한 BMP9 및 TGF-β 신호전달을 차단하는 반면에, 다른 수용체를 통한 BMP9 및 TGF-β 신호전달을 차단하지는 않을 것이고, ALK1 ECD 폴리펩티드는 모든 수용체 (심지어 ALK1 이외의 수용체)를 통한 BMP9 신호전달을 억제할 수 있는 반면에, 임의의 수용체, 심지어 ALK1을 통한 TGF-β 신호전달을 억제하는 것으로는 예상되지 않을 것이다.
- [0041] 본원에 설명된 단백질은 달리 명시하지 않으면 인간 형태이다. 단백질에 대한 Genbank 참조번호는 다음과 같다: 인간 GDF5, CAA56874; 인간 GDF6, AAH43222; 인간 GDF7, NP_878248; 인간 BMP9, Q9UK05; 인간 BMP10, O95393; 인간 DAN, BAA92265. ALK1 서열을 도 1-5에 제시한다.
- [0042] 인간 DAN 아미노산 서열 (서열 10) (Genbank BAA92265):
- MLRVLVGA VL PAMLLAAPP P INKLALFPDK SAWCEAKNIT QIVGHSGCC EA KSIQNRACL G
QCFYSYV PNT FPQSTESLVH C DSCMPAQSM WEIVTLECPG HEEVPRVDKL VEKILHCSCQ
ACGKEPSHEG LSVYVQGEDG PGSQPGTHPH PPHPHPGGQ TPEPEDPPGA .PHTEEEGAED
- [0043]
- [0044] 성숙 DAN 단백질은 아미노산 17-180에 상응하는 것으로 예상된다. DAN의 보존된 시스테인 노트 도메인은 아미노산 21-125에 상응한다 (밑줄침).

[0045] 인간 DAN cDNA 서열 (서열 11) (Genbank BC012037):

```

gccgagcctc ctggggcgcc egggcccgcg acccccgcac ccagctccgc aggaccggcg
ggcgcgcgcg ggctctggag gccacgggca tgatgcttcg ggtcctgggt ggggctgtcc
tccttgccat gctactggct gccccaccac ccatcaacaa gctggcaactg tccccagata
agagtgcctg gtgcgaagcc aagaacatca ccagatcgt gggccacagc ggctgtgagg
ccaagtccat ccagaacagc gcgtgcctag gacagtgtct cagctacagc gtcccaaca
ccttcccaca gtcacacagag tccttggttc actgtgactc ctgcatgcca gcccagtcga
tgtgggagat tgtgacgctg gagtgcccg gccaagagga ggtgcccagg gtggacaagc
tggtggagaa gatcctgcac ttagctgcc aggcctgcgg caaggagcct agtcacgagg
ggctgagcgt ctatgtgcag ggcgaggagc ggccgggagc ccagcccggc acccacctc
acccccatcc cccccccat cctggcgggc agaccctga gcccgaggac ccccctgggg
ccccccacac agaggaagag ggggctgagg actgaggccc ccccaactct tcctccctc
tcacccccct gtggaatggt gggctcact ctctggggaa gtcaggggag aagctgaagc
cccccttggg cactggatgg acttggtctt agactcggac ttgaatgctg cccggttgc
atggagatct gaagggcgcg ggttagagcc aagctgcaca atttaataata ttcaagagtg
gggggaggaa gcagaggtct tcagggtctt tttttgggg ggggggtggt ctctcctg
ctggcttcta gagatgtgcc tgtgggagg ggaggaagtt ggtgagcca ttgagtgtg
ggggaggcca tccaagatgg catgaatcgg gctaaggtcc ctgggggtg agatggtact
gctgagggtcc cgggcttagt gtgagcatct tgccagcctc aggtctgagg gagggctggg
ctagaagacc cactggcaga aacaggaggc tccggcccca caggttccc caaggcctct
cacccactt cccatctcca gggaaagcgt gccccagtgg cactgaagtg gccctccctc
agcggagggg tttgggagtc aggcctgggc aggacctgc tgactcgtgg cgcgggagct
gggagccagg ctctccgggc ctctctctgg ctctcttggc ttgctcgtg ggggaaaggg
aggaggggaa gaaggaaggg gaagagtctt ccaaggccag aaggaggggg acaaccccc
aagaccatcc ctgaagacga gcacccccct cctctccctg ttagaaatgt tagtgccccg
cactgtgccc caagttctag gcccccaga aagctgtcag agccggccgc ctctccctc
ctcccaggga tgctcttgtt aaatatcgga tgggtgtggg agtgaggggt tacctccctc
gccccaaggt tccagaggcc ctgagcggga tgggctcgct gaacctcgag gaacctccagg
acgagaggga catgggactt cgtgggacag tcagggttca cttgggctct ctctagctcc
ccaattctgc ctgctcctc cctcccagct gcaacttaac cctagaaggt ggggacctgg
ggggagggac agggcaggcg ggcccagaa gaaagcccct cgttgcccag cactgtctgc
gtctgctctt ctgtgccag ggtggctgcc agcccactgc ctctgctctg ggggtggcctg
gcctcctgg ctgttgcgac gcgggcttct ggagctgttc accattggac agtctccctg
atggaccctc agtcttctca tgaataaatt ccttcaacgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
    
```

[0046]

[0047] DAN 전구체에 대한 코딩 서열은 핵산 93-635에 상응한다. 성숙 DAN 단백질에 대한 코딩 서열은 핵산 141-632에 상응한다. DAN의 보존된 시스테인 노트 부분에 대한 코딩 서열은 핵산 153-467에 상응한다.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 용어는 일반적으로 본원의 문맥 내에서 및 각각의 용어가 사용되는 구체적인 문맥 내에서 당업계에서 그들의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본원에 개시된 조성물 및 방법과 그의 제조 및 사용 방법을 설명하는데 있어서 당업자에게 추가의 지침을 제공하기 위해 명세서에서 논의된다. 임의의 용어 사용의 범위 또는 의미는 용어가 사용되는 구체적인 문맥으로부터 자명할 것이다.

[0049] 2. 가용형 ALK1 폴리펩티드

[0050] 자연 발생 ALK1 단백질은 막횡단 단백질이고, 세포 외부에 위치하는 단백질의 부분 (세포외 부분) 및 세포 내부에 위치하는 단백질의 부분 (세포내 부분)을 갖는다. 본원의 측면은 ALK1의 세포외 도메인의 일부를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0051] 특정 실시태양에서, 본원은 "ALK1 ECD 폴리펩티드"를 제공한다. 용어 "ALK1 ECD 폴리펩티드"는 임의의 신호 서열 및 신호 서열에 N-말단을 포함하거나 배제하는 자연 발생 ALK1 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열로 이루어지거나 포함하는 폴리펩티드, 또는 자연 발생 ALK1 폴리펩티드의 세포외 도메인에 적어도 33% 동일한, 및 자연 발생 ALK1 폴리펩티드의 세포외 도메인의 서열에 임의로 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 나타내도록 의도되고, 서열 1의 아미노산 34-95의 시스테인 노트 구역, 또는 시스테인 노트 + 세포외 도메인의 N- 및 C-말단에서 추가의 아미노산, 예를 들어 서열 1의 아미노산 22-118로 예시된다. 마찬가지로, ALK1 ECD 폴리펩티드는 서열 2의 뉴클레오티드 100-285 또는 그의 침묵 변이체, 또는 엄격한 혼성화 조건 (일반적으로, 상기 조건은 당업계에 공지되어 있지만, 예를 들어 50% v/v 포름아미드, 5x SSC, 2% w/v 차단제, 0.1% N-라우로일사르코신, 0.3% SDS 내에서 65°C에서 밤새 혼성화하고, 예를 들어 5x SSC 내에서 약 65°C에서 세척할 수 있음) 하에 그의 상보체에 혼성화하는 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 추가로, ALK1 ECD 폴리펩티드는 서열 2의 뉴클레오티드 64-384 또는 그의 침묵 변이체, 또는 엄격한 혼성화 조건 (일반적으로, 상기 조건은 당업계에 공지되어 있지만, 예를 들어 50% v/v 포름아미드, 5x SSC, 2% w/v 차단제, 0.1% N-라우로일사르코신, 0.3% SDS 내에서 65°C에서 밤새 혼성화하고, 예를 들어 5x SSC 내에서 약 65°C에서 세척할 수 있음) 하에 그의 상보체에 혼성화하는 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 따라서, 용어 "ALK1 ECD 폴리펩티드"는 ALK1 폴리펩티드의 단리된 세포외 부분, 그의 변이체 (예를 들어, 서열 1의 아미노산 22-118에 상응하는 서열에서 2, 3, 4, 5 또는 10개 이하의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 변이체를 포함하고, 서열 1의 아미노산 34-95에 상응하는 서열에서 2, 3, 4, 5 또는 10개 이하의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 변이체를 포함함), 그의 단편 및 임의의 상기한 것의 융합 단백질을 포

함하지만, 각각의 경우에 바람직하게는 임의의 상기 ALK1 ECD 폴리펩티드는 하나 이상의 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 또는 BMP10에 대한 실질적인 친화도를 보유할 것이다. 용어 "ALK1 ECD 폴리펩티드"는 명백하게 임의의 전장의 자연 발생 ALK1 폴리펩티드를 배제하는 것으로 의도된다. 일반적으로, ALK1 ECD 폴리펩티드는 생물학상 관련 온도, pH 수준 및 삼투압에서 수용액에 가용성이도록 설계될 것이다.

[0052] 상기한 바와 같이, 본원은 자연 발생 ALK1 폴리펩티드와 명시된 정도의 서열 동일성 또는 유사성을 공유하는 ALK1 ECD 폴리펩티드를 제공한다. 2개의 아미노산 서열의 % 동일성을 결정하기 위해, 서열을 최적 비교 목적을 위해 정렬시킨다 (예를 들어, 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 갭 (gap)을 도입할 수 있고, 비교 목적을 위해 비-상동성 서열은 무시될 수 있음). 이어서, 상응하는 아미노산 위치에서 아미노산 잔기를 비교한다. 제1 서열 내의 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기에 의해 점령되면, 분자들은 그 위치에서 동일하다 (본원에서 사용될 때, 아미노산 "동일성"은 아미노산 "상동성"과 동등함). 2개의 서열들 사이의 % 동일성은 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려한, 서열이 공유하는 동일한 위치의 수의 함수이다.

[0053] 서열의 비교 및 2개의 서열 사이의 % 동일성 및 유사성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다 ([Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988]; [Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994]; [Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987]; 및 [Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991]).

[0054] 하나의 실시태양에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 % 동일성은 GCG 소프트웨어 패키지 내의 GAP 프로그램 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능함) 내로 통합된 문헌 [Needleman and Wunsch, J Mol. Biol. (48):444-453 (1970)]의 알고리즘을 이용하여 결정한다. 특정 실시태양에서, GAP 프로그램에서 다음 파라미터가 사용된다: Blosum 62 행렬 (matrix) 또는 PAM250 행렬, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치. 또다른 실시태양에서, 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 % 동일성은 GCG 소프트웨어 패키지 내의 GAP 프로그램을 사용하여 결정한다 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Res. 12(1):387 (1984)) (<http://www.gcg.com>에서 이용가능함). 예시적인 파라미터는 NWSgapdna.CMP 행렬 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하는 것을 포함한다. 달리 명시하지 않으면, 2개의 아미노산 서열 사이의 % 동일성은 Blosum 62 행렬, 10의 갭 가중치 및 3의 길이 가중치를 사용하는 GAP 프로그램을 이용하여 결정되어야 하고, 상기 알고리즘이 목적하는 % 동일성을 계산할 수 없으면, 본원에 개시된 적합한 대안이 선택되어야 한다.

[0055] 다른 실시태양에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 % 동일성은 PAM 120 가중치 잔기 (weight residue) 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하는 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 통합된 문헌 [E. Myers and W. Miller, CABIOS, 4:11-17 (1989)]의 알고리즘을 이용하여 결정된다.

[0056] 2개의 아미노산 서열 사이에 최선의 전체 정렬을 결정하기 위한 다른 실시태양은 문헌 [Brutlag et al., Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)]의 알고리즘에 기반한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다. 서열 정렬에서, 질의 및 대상 서열은 모두 아미노산 서열이다. 상기 전체적인 서열 정렬의 결과는 % 동일성으로 제시한다. 하나의 실시태양에서, 아미노산 서열 동일성은 문헌 [Brutlag et al., Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)]의 알고리즘에 기반한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 수행한다. 특정 실시태양에서, 아미노산 정렬의 % 동일성 및 유사성을 계산하기 위해 사용된 파라미터는 행렬= PAM 150, k-터플 (tuple)= 2, 미스매치 패널티= 1, 연결 패널티= 20, 랜덤화 그룹 길이는 0, 컷오프 스코어= 1, 갭 패널티= 5 및 갭 크기 패널티 = 0.05를 포함한다.

[0057] 특정 실시태양에서, ALK1 ECD 폴리펩티드는 서열 1의 서열과 같은 자연 발생 ALK1 단백질의 세포외 부분, 및 바람직하게는 ALK1 세포외 도메인의 리간드 결합 부분을 포함한다. 특정 실시태양에서, 가용형 ALK1 폴리펩티드는 서열 1의 아미노산 22-118의 아미노산 서열에 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시태양에서, 말단절단된 (truncated) 세포외 ALK1 폴리펩티드는 서열 1의 세포외 부분의 아미노산 서열의 적어도 30, 40 또는 50개의 연속 아미노산을 포함한다.

[0058] 바람직한 실시태양에서, ALK1 ECD 폴리펩티드는 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및 BMP10의 하나 이상과 결합한다. 임의로, ALK1 폴리펩티드는 TGF-β1 또는 TGF-β3에 대해 실질적인 결합을 보이지 않는다. 결합은 용액 내에 또는 표면 플라즈몬 공명 시스템, 예를 들어 비아코어 (Biacore)TM 시스템에서 정제된 단백질을 사용하여 평가

할 수 있다. 바람직한 가용형 ALK1 폴리펩티드는 항-혈관신생 활성을 나타낼 것이다. 혈관신생 억제 활성에 대한 생물분석은 병아리 용모요막 (CAM) 분석, 마우스 각막 미세낭 분석, 이식된 종양에 단리된 또는 합성된 단백질 투여하는 효과를 측정하기 위한 분석을 포함한다. CAM 분석은 문헌 [O'Reilly, et al. in "Angiogenic Regulation of Metastatic Growth" Cell, vol. 79 2), Oct. 1, 1994, pp. 315-328]에 기재되어 있다. 간단히 설명하면, 무손상 난황을 갖는 3일령 닭 배아를 계란으로부터 분리하고, 페트리 접시에 넣는다. 3일 인큐베이션 후, 시험할 단백질을 함유하는 메틸셀룰로스 디스크를 개별 배아의 CAM에 적용한다. 48시간 인큐베이션 후, 내피 성장이 억제되었는지 결정하기 위해 배아 및 CAM을 관찰한다. 마우스 각막 미세낭 분석은 성장 인자-함유 펠렛을 의심되는 내피 성장 억제제를 함유하는 다른 펠렛과 함께 마우스의 각막에 이식하고, 각막 내에 정교해지는 모세관의 패턴을 관찰하는 것을 포함한다. 다른 분석은 실시예에서 설명한다.

[0059] ALK1 ECD 폴리펩티드는 ALK1 폴리펩티드의 세포질 테일 (tail) 및 막횡단 구역을 제거함으로써 제조할 수 있다. 별법으로, 막횡단 도메인은 결실에 의해 또는 막횡단 도메인을 포함하는 보통 소수성인 아미노산 잔기를 친수성 잔기로 치환함으로써 불활성화될 수 있다. 두 경우에, 지질 친화도를 감소시키고 수 용해도를 개선시킬 실질적 친수성 수치 (hydropathy) 프로필이 생성된다. 막횡단 도메인의 결실이 친수성 아미노산 잔기로의 치환보다 바람직하고, 이는 잠재적 면역원성 에피토프를 피하기 때문이다.

[0060] ALK1 ECD 폴리펩티드는 추가로 N-말단에서 임의의 다양한 리더 서열을 포함할 수 있다. 상기 서열은 펩티드가 발현되고 진핵세포 시스템에서 분비 경로에 대해 표적화되도록 한다 (예를 들어, 미국 특허 5,082,783 (Ernst et al., 1992) 참조). 별법으로, 천연 ALK1 신호 서열은 세포로부터의 돌출을 수행하도록 사용될 수 있다. 가능한 리더 서열은 천연, tPa 및 꿀벌 벨리틴 리더 (각각 서열 7-9)을 포함한다. 신호 펩티드의 처리는 다른 변수 중에서 선택된 리더 서열, 사용된 세포 종류 및 배양 조건에 따라 변할 수 있고, 따라서 서열 5의 것을 포함하는 성숙 ALK1 ECD 폴리펩티드에 대한 실제 N-말단 개시 부위는 N-말단 또는 C-말단 방향으로 1-5개 아미노산 만큼 이동할 수 있다.

[0061] 특정 실시태양에서, 본원에서는 폴리펩티드의 글리코실화를 변경시키도록 ALK1 폴리펩티드의 특정 돌연변이를 고려한다. 상기 돌연변이는 하나 이상의 글리코실화 부위, 예를 들어 O-연결된 또는 N-연결된 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하도록 선택될 수 있다. 아스파라긴-연결된 글리코실화 인식 부위는 일반적으로 적절한 세포성 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 (또는 아스파라긴-X-세린) (여기서, "X"는 임의의 아미노산임)을 포함한다. 변경은 또한 야생형 ALK1 폴리펩티드의 서열 (O-연결된 글리코실화 부위에 대해)에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 그에 의한 치환에 의해 이루어질 수 있다. 글리코실화 인식 부위의 첫번째 또는 세번째 아미노산 위치 중 하나 또는 둘 모두에서 다양한 아미노산 치환 또는 결실 (및/또는 제2 위치에서 아미노산 결실)은 변형된 트리펩티드 서열에서 비-글리코실화를 일으킨다. ALK1 폴리펩티드 상에 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 다른 수단은 ALK1 폴리펩티드에 대한 글리코시드의 화학적 또는 효소적 커플링에 의한 것이다. 사용된 커플링 방식에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 유리 카르복실기; (c) 유리 술폰히드릴기, 예를 들어 시스테인의 것; (d) 유리 히드록실기, 예를 들어 세린, 트레오닌 또는 히드록시프로린의 것; (e) 방향족 잔기, 예를 들어 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것; 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착될 수 있다. 이들 방법은 본원에 참고로 포함되는 WO 87/05330 (1987년 9월 11일 공개) 및 문헌 [Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306]에 기재되어 있다. ALK1 폴리펩티드 상에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 달성할 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 예를 들어 ALK1 폴리펩티드를 화합물 트리플루오로메탄술폰산 또는 동등한 화합물에 노출시키는 것을 포함할 수 있다. 상기 처리는 아미노산 서열을 무손상 상태로 유지하면서 연결 당 (N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분의 또는 모든 당의 절단을 일으킨다. 화학적 탈글리코실화는 문헌 ([Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52] 및 [Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131])에 더욱 설명되어 있다. ALK1 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 문헌 [Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350]에 설명된 바와 같이 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제를 사용하여 달성할 수 있다. ALK1 폴리펩티드의 서열은 적절한 경우에 사용된 발현 시스템의 종류에 따라 조정될 수 있고, 이것은 포유동물, 효모, 곤충 및 식물 세포 모두가 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴을 도입할 수 있기 때문이다. 일반적으로, 인간에 사용하기 위한 ALK1 단백질은 적절한 글리코실화를 제공하는 포유동물 세포주, 예를 들어 HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현될 것이지만, 다른 포유동물 발현 세포주, 공학처리된 글리코실화 효소를 갖는 효모 세포주 및 곤충 세포도 또한 유용한 것으로 예상된다.

[0062] 본원은 돌연변이체, 특히 ALK1 폴리펩티드의 조합 (combinatorial) 돌연변이체의 세트, 및 말단절단 돌연변이체

를 생성하는 방법을 추가로 고려하고; 조합 돌연변이체의 풀 (pool)은 기능적 변이체 서열을 확인하기 위해 특히 유용하다. 상기 조합 라이브러리를 스크리닝하는 목적은 예를 들어, 아고니스트 또는 길항제로서 기능할 수 있거나, 별법으로 신규한 활성을 모두 갖는 ALK1 폴리펩티드 변이체를 생성하기 위한 것일 수 있다. 다양한 스크리닝 분석을 아래에 제공하고, 이러한 분석은 변이체를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, ALK1 폴리펩티드 변이체를 ALK1 리간드와 결합하거나, ALK1 폴리펩티드에 대한 ALK1 리간드의 결합을 방지하거나, ALK1 리간드에 의해 유발된 신호전달을 저해하는 능력에 대해 스크리닝할 수 있다. ALK1 폴리펩티드 또는 그의 변이체의 활성은 또한 세포 기반 또는 생체내 분석, 특히 실시예에 개시된 임의의 분석에서 시험할 수 있다.

[0063] 자연 발생 ALK1 폴리펩티드의 세포의 도메인을 포함하는 ALK1 ECD 폴리펩티드에 비해 선택적인 또는 일반적으로 증가된 효능을 갖는, 조합 방식으로-유도된 변이체가 생성될 수 있다. 마찬가지로, 돌연변이 유발은 혈청 반감기가 상응하는 야생형 ALK1 ECD 폴리펩티드와 크게 상이한 변이체를 일으킬 수 있다. 예를 들어, 변경된 단백질은 단백질분해에 의한 (proteolytic) 분해, 또는 천연 ALK1 ECD 폴리펩티드의 파괴, 또는 제거 또는 불활성화를 일으키는 다른 과정에 대해 더 안정하거나 덜 안정하게 될 수 있다. 상기 변이체 및 그를 코딩하는 유전자는 ALK1 폴리펩티드의 반감기를 조정함으로써 ALK1 ECD 폴리펩티드 수준을 변경시키기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 짧은 반감기는 보다 일시적인 생물학적 효과를 일으킬 수 있고, 환자 내에서 재조합 ALK1 ECD 폴리펩티드 수준의 보다 엄격한 제어를 허용할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 단백질의 반감기를 변경하기 위해 링커 (존재하는 경우) 및/또는 Fc 부분에서 돌연변이가 이루어질 수 있다.

[0064] 조합 라이브러리는 각각 적어도 잠재적 ALK1 폴리펩티드 서열의 부분을 포함하는 폴리펩티드의 라이브러리를 코딩하는 유전자의 다의성 (degenerate) 라이브러리에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 잠재적 ALK1 폴리펩티드 뉴클레오티드 서열의 다의성 세트가 개별 폴리펩티드로서, 또는 별법으로 보다 큰 융합 단백질의 세트로서 (예를 들어, 파지 디스플레이에 대해) 발현가능하도록 합성 올리고뉴클레오티드의 혼합물을 효소 작용에 의해 유전자 서열 내로 라이케이팅될 수 있다.

[0065] 다의성 올리고뉴클레오티드 서열로부터 잠재적 ALK1 ECD 변이체의 라이브러리를 생성할 수 있는 많은 방법이 존재한다. 다의성 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기에서 수행될 수 있고, 이어서 합성 유전자를 발현을 위해 적절한 벡터 내로 라이케이팅할 수 있다. 다의성 올리고뉴클레오티드의 합성은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어 문헌 ([Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3]; [Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289]; [Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323]; [Itakura et al., (1984) Science 198:1056]; [Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477]) 참조). 상기 기술은 다른 단백질의 지시된 진화에 사용되었다 (예를 들어, 문헌 ([Scott et al., (1990) Science 249:386-390]; [Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433]; [Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406]; [Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382]); 및 미국 특허 5,223,409, 5,198,346 및 5,096,815 참조).

[0066] 별법으로, 조합 라이브러리를 생성하기 위해 다른 형태의 돌연변이 유발을 이용할 수 있다. 예를 들어, ALK1 폴리펩티드 변이체가 생성되고, 예를 들어 알려진 스캐닝 돌연변이 유발 등을 사용하는 스크리닝에 의해 ([Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572]; [Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099]; [Balint et al., (1993) Gene 137:109-118]; [Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601]; [Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892]; [Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838]; 및 [Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085]), 링커 스캐닝 돌연변이 유발에 의해 ([Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660]; [Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652]; [McKnight et al., (1982) Science 232:316]); 포화 돌연변이 유발에 의해 (Meyers et al., (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이 유발에 의해 (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 또는 화학적 돌연변이 유발을 포함한 랜덤 돌연변이 유발에 의해 ([Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY]; 및 [Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34]) 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 링커 스캐닝 돌연변이 유발은 특히 조합 세팅에서 말단절단된 (생활성) 형태의 ALK1 폴리펩티드를 확인하기 위한 매력적인 방법이다.

[0067] 점 돌연변이 및 말단절단에 의해 제조된 조합 라이브러리의 유전자 생성물을 스크리닝하기 위한 및 실제로 특정 특성을 갖는 유전자 생성물에 대한 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 매우 다양한 기술이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 기술은 일반적으로 ALK1 폴리펩티드의 조합 돌연변이 유발에 의해 생성된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝을 위해 채택가능할 것이다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위해 가장 널리 사용되는 기술은 대개 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터 내로 클로닝하고, 적절한 세포를 벡터의 생성되는

라이브리리로 형질전환시키고, 조합 유전자를 목적하는 활성의 검출이 그의 생성물이 검출된 유전자를 코딩하는 벡터의 비교적 용이한 단리를 가능하게 하는 조건 하에 발현시키는 것을 포함한다. 바람직한 분석은 ALK1 리간드 결합 분석 및 리간드-매개 세포 신호전달 분석을 포함한다.

[0068] 특정 실시태양에서, 본원의 ALK1 ECD 폴리펩티드는 ALK1 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 것 외에 번역후 변형을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 변형은 아세틸화, 카르복실화, 글리코실화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 그 결과, 변형된 ALK1 ECD 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 다당류 또는 단당류 및 포스페이트를 함유할 수 있다. ALK1 ECD 폴리펩티드의 기능성에 대한 상기 비-아미노산 요소의 효과를 다른 ALK1 ECD 폴리펩티드 변이체에 대해 본원에 설명된 바와 같이 시험할 수 있다. ALK1 ECD 폴리펩티드가 신생 형태의 ALK1 폴리펩티드를 절단함으로써 세포 내에서 생산될 때, 단백질의 정확한 접힘 및/또는 기능을 위해 번역후 처리가 또한 중요할 수 있다. 상이한 세포 (예를 들어 CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이러한 번역후 활성을 위한 특수한 세포 기구 및 특징적인 메카니즘을 갖고, ALK1 폴리펩티드의 정확한 변형 및 처리를 보장하도록 선택될 수 있다.

[0069] 특정 측면에서, ALK1 ECD 폴리펩티드의 기능적 변이체 또는 변형된 형태는 적어도 ALK1 ECD 폴리펩티드의 일부 및 하나 이상의 융합 도메인을 갖는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 융합 도메인의 잘 알려진 예는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S 트랜스퍼라제 (GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변구역 (Fc), 말토스 결합 단백질 (MBP), 또는 인간 혈청 알부민을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 융합 도메인은 요구되는 특성을 부여하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 일부 융합 도메인은 친화도 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리를 위해 특히 유용하다. 친화도 정제의 목적에서, 친화도 크로마토그래피를 위한 관련 매트릭스, 예를 들어 글루타티온-, 아밀라제- 및 니켈- 또는 코발트-컨쥬게이팅된 (conjugated) 수지가 사용된다. 많은 이러한 매트릭스는 "키트 (kit)" 형태, 예를 들어 (HIS₆) 융합 파트너에서 유용한 파마시아 (Pharmacia) GST 정제 시스템 및 퀴아익스프레스 (QIAexpress)TM 시스템 (퀴아젠 (Qiagen))로 이용가능하다. 다른 예로서, 융합 도메인은 ALK1 ECD 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 선택될 수 있다. 이러한 검출 도메인의 예는 다양한 형광 단백질 (예를 들어, GFP), 및 그에 대한 특이적인 항체가 이용가능한, 대체로 짧은 펩티드 서열인 "에피토프 태그 (tag)"를 포함한다. 그에 대한 특이적인 모노클로날 항체가 쉽게 이용가능한, 잘 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA) 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우에, 융합 도메인은 Factor Xa 또는 트롬빈에 대한 것과 같은 프로테아제 절단 부위를 갖고, 이는 관련 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 소화시켜 그로부터 재조합 단백질을 유리시키도록 한다. 이어서, 유리된 단백질은 후속적인 크로마토그래피 분리에 의해 융합 도메인으로부터 단리될 수 있다. 특정 바람직한 실시태양에서, ALK1 ECD 폴리펩티드는 생체 내에서 ALK1 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인 ("안정화제" 도메인)에 융합된다. "안정화시키는"은 파괴 감소, 신장에 의한 청소율 감소 또는 다른 약동학적 효과로 인한 것인지는와는 무관하게 혈청 반감기를 증가시키는 임의의 것을 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합이 또한 매우 다양한 단백질에 대해 바람직한 약동학적 특성을 부여하는 것으로 알려져 있다. 마찬가지로, 인간 혈청 알부민에 대한 융합은 바람직한 특성을 부여할 수 있다. 선택할 수 있는 다른 종류의 융합 도메인은 다량체화 (예를 들어, 이량체화, 사량체화) 도메인 및 기능성 도메인을 포함한다.

[0070] 특정 예로서, 본원은 Fc 도메인 (예를 들어, 서열 6)에 융합된 ALK1의 가용형 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKAL
 PVPTEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPEENNYKTTTPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMEALHN (A) HYT
 QKSLSLSPGK*

[0071]

[0072] 임의로, Fc 도메인은 Asp-265, 라이신 322 및 Asn-434와 같은 잔기에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 특정 경우에, 하나 이상의 이들 돌연변이 (예를 들어, Asp-265 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인에 비해 Fc γ 수용체와 결합하는 능력이 감소한다. 다른 경우에, 하나 이상의 이들 돌연변이 (예를 들어, Asn-434 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인에 비해 MHC 클래스 I-관련 Fc-수용체 (FcRN)와 결합하는 능력이 증가한다.

[0073] 융합 단백질의 상이한 요소들은 목적하는 기능성과 일치하는 임의의 방식으로 배열될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, ALK1 ECD 폴리펩티드는 이중성 도메인에 대해 C-말단에 위치할 수 있거나, 별법으로 이중성 도메인

이 ALK1 ECD 폴리펩티드에 대해 C-말단에 위치할 수 있다. ALK1 ECD 폴리펩티드 도메인 및 이종성 도메인은 융합 단백질 내에서 인접할 필요가 없고, 추가의 도메인 또는 아미노산 서열이 두 도메인에 대해 C- 또는 N-말단에, 또는 도메인들 사이에 포함될 수 있다.

- [0074] 본원에서 사용될 때, 용어 "면역글로불린 Fc 구역" 또는 간단히 "Fc"는 면역글로불린 사슬 불변 구역, 바람직하게는 면역글로불린 중쇄 불변 구역, 또는 그의 일부의 카르복실-말단 부분을 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 면역글로불린 Fc 구역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 또는 5) 2개 이상의 도메인 및 면역글로불린 힌지 구역의 조합물을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 면역글로불린 Fc 구역은 적어도 면역글로불린 힌지 구역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고, 바람직하게는 CH1 도메인이 결핍된다.
- [0075] 하나의 실시태양에서, 그로부터 중쇄 불변 구역이 유래되는 면역글로불린의 클래스는 IgG (Ig γ) (γ 서브클래스 1, 2, 3 또는 4)이다. 다른 클래스의 면역글로불린, IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) 및 IgM (Ig μ)이 사용될 수 있다. 적절한 면역글로불린 중쇄 불변 구역의 선택은 미국 특허 5,541,087과 5,726,044에 상세히 논의된 바 있다. 특정 결과를 달성하기 위해 특정 면역글로불린 클래스 및 서브클래스로부터 특정 면역글로불린 중쇄 불변 구역 서열을 선택하는 것은 당업계의 기술 수준 내에 있는 것으로 간주된다. 면역글로불린 Fc 구역을 코딩하는 DNA 구성체의 부분은 바람직하게는 적어도 힌지 도메인의 일부 및 바람직하게는 적어도 Fc γ 의 CH₃ 도메인의 일부 또는 임의의 IgA, IgD, IgE 또는 IgM 내의 상동성 도메인을 포함한다.
- [0076] 또한, 본원에 개시된 방법 및 조성물의 실시에서 면역글로불린 중쇄 불변 구역 내에서 아미노산의 치환 또는 결실이 유용할 수 있는 것으로 고려된다. 하나의 예는 상부 CH2 구역에 아미노산 치환을 도입하여 Fc 수용체에 대한 친화도가 감소한 Fc 변이체를 생성하는 것일 것이다 (Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:3613).
- [0077] 특정 실시태양에서, 본원은 다른 단백질 및/또는 다른 ALK1 ECD 폴리펩티드 종으로부터 단리되거나 이들이 실질적으로 없는 (예를 들어, 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 없는) ALK1 ECD 폴리펩티드의 이용가능한 단리된 및/또는 정제된 형태를 제조한다. ALK1 폴리펩티드는 일반적으로 재조합 핵산으로부터 발현에 의해 제조될 것이다.
- [0078] 특정 실시태양에서, 본원은 ALK1 단백질의 세포의 부분에 대한 코딩 서열을 포함하는 가용형 ALK1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본원은 또한 상기 핵산을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵세포일 수 있다. 예를 들어, 본원의 폴리펩티드는 세균 세포, 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*), 곤충 세포 (예를 들어, 바칼로바이러스 발현 시스템을 이용하여), 효모, 또는 포유동물 세포 내에서 발현될 수 있다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다. 따라서, 본원의 일부 실시태양은 또한 ALK1 ECD 폴리펩티드를 생산하는 방법에 관한 것이다. 서열 3에 제시되고 CHO 세포 내에서 발현된 ALK1-Fc 융합 단백질은 강력한 항-혈관신생 활성을 갖는 것이 확립되었다.
- [0079] DAN 폴리펩티드 (야생형 DAN의 변이체 포함), 및 DAN 단백질을 함유하는 융합 단백질이 ALK1 ECD 단백질에 관하여 상기한 바와 같이 생성되고 특성화될 수 있다.
- [0080] 3. ALK1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산
- [0081] 특정 측면에서, 본원은 본원에 개시된 단편, 기능적 변이체 및 융합 단백질을 포함한 임의의 ALK1 폴리펩티드 (예를 들어, ALK1 ECD 폴리펩티드)를 코딩하는 단리된 및/또는 재조합 핵산을 제공한다. 예를 들어, 서열 2는 자연 발생 인간 ALK1 전구체 폴리펩티드를 코딩하고, 서열 4는 IgG1 Fc 도메인에 융합된 ALK1 세포의 도메인의 전구체를 코딩한다. 핵산은 단일-가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 상기 핵산은 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 이들 핵산은 예를 들어, ALK1 폴리펩티드를 제조하는 방법에서 또는 직접적인 치료제로서 (예를 들어, 안티센스, RNAi 또는 유전자 요법 방안에서) 사용될 수 있다.
- [0082] 특정 측면에서, ALK1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열 2 또는 4의 변이체인 핵산을 포함하는 것으로 더욱 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 상이한 서열, 예를 들어 대립유전자 변이체를 포함한다.
- [0083] 특정 실시태양에서, 본원은 서열 2 또는 4에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 단리된 또는 재조합 핵산 서열을 제공한다. 당업자는 서열 2 또는 4에 상보적인 핵산 서열, 및 서열 2 또는 4의 변이체가 또한 본원의 범위 내에 있음을 이해할 것이다. 추가의 실시태양에서, 본원의 핵산 서열은 단리되고/되거나, 재조합되고/되거나, 이종성 뉴클레오티드 서열과 융합되거나, DNA 라이브러리 내에 존

제할 수 있다.

[0084] 다른 실시태양에서, 본원의 핵산은 또한 고도로 엄격한 조건 하에 서열 2 또는 4에 제시된 뉴클레오티드 서열, 서열 2 또는 4의 상보성 서열, 또는 그의 단편에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 논의한 바와 같이, 당업자는 DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄격도 조건이 변할 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 당업자는 DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄격도 조건이 변할 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 예를 들어, 6.0 x 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC)에서 약 45°C에서 혼성화를 수행한 후, 2.0 x SSC로 50°C에서 세척할 수 있다. 예를 들어, 세척 단계의 염 농도는 50°C에서 약 2.0 x SSC의 낮은 엄격도로부터 50°C에서 약 0.2 x SSC의 높은 엄격도까지 선택될 수 있다. 또한, 세척 단계의 온도는 실온, 약 22°C에서 낮은 엄격도 조건으로부터 약 65°C에서 높은 엄격도 조건까지 증가될 수 있다. 온도 및 염은 모두 변할 수 있거나, 다른 변수를 변화시키면서 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 본원은 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄격도 조건 하에 혼성화한 후, 실온에서 2 x SSC로 세척한 핵산을 제공한다.

[0085] 유전자 코드의 다의성으로 인해 서열 2 또는 4에 제시된 핵산과 상이한 단리된 핵산이 또한 본원의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, 많은 아미노산은 하나 초과와 삼중체로 지정될 수 있다. 동일한 아미노산을 지정하는 코돈, 또는 동의 코돈 (예를 들어, CAU 및 CAC는 히스티딘에 대한 동의 코돈임)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 "침묵" 돌연변이를 일으킬 수 있다. 그러나, 단백질의 아미노산 서열의 변화를 일으키지 않는 DNA 서열 다형성 (polymorphism)이 포유동물 세포 사이에 존재할 것으로 예상된다. 당업자는 특정 단백질을 코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드 (뉴클레오티드의 약 3-5%까지)에서 이들 변이가 자연적 대립유전자 변이로 인해 주어진 종의 개체들 사이에 존재할 수 있음을 이해할 것이다. 임의의 및 모든 이러한 뉴클레오티드 변이 및 생성되는 아미노산 다형성은 본원의 범위 내에 있다.

[0086] 특정 실시태양에서, 본원의 재조합 핵산은 발현 구성체 내에서 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로 발현을 위해 사용된 숙주 세포에 적절할 것이다. 다양한 숙주 세포에 대한 많은 종류의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 당업계에 공지되어 있다. 대개, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 종료 서열, 번역 개시 및 종료 서열, 및 인핸서 또는 활성인자 서열을 포함할 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 당업계에 공지되어 있는 구성적 또는 유도가능 프로모터가 본원에서 고려된다. 프로모터는 자연 발생 프로모터, 또는 하나 초과와 프로모터의 요소들을 조합한 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 구성체는 세포 내에 에피솜, 예를 들어 플라스미드 상에 존재할 수 있거나, 발현 구성체는 염색체 내에 삽입될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 허용하는 선별가능한 마커 유전자를 함유한다. 선별가능한 마커 유전자는 당업계에 잘 알려져 있고, 사용된 숙주 세포에 따라 변할 것이다.

[0087] 본원에 개시된 특정 측면에서, 핵산은 ALK1 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 적어도 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 발현 벡터 내에 제공된다. 조절 서열은 당업계에 인정되고, ALK1 폴리펩티드의 발현을 지시하도록 선택된다. 따라서, 용어 조절 서열은 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소를 포함한다. 예시적인 조절 서열은 문헌 [Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)]에 기재되어 있다. 예를 들어, 작동가능하게 연결될 때 DNA 서열의 발현을 제어하는 임의의 매우 다양한 발현 조절 서열이 이들 벡터 내에서 ALK1 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은 예를 들어, SV40의 초기 및 후기 프로모터, tet 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 최조기 프로모터, RSV 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 프로모터 (그의 발현은 T7 RNA 폴리머라제에 의해 지시됨), 파지 람다의 주요 작동유전자 (operator) 및 프로모터 구역, fd 코트 단백질에 대한 제어 구역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소에 대한 프로모터, 산 포스파타제의 프로모터, 예를 들어, Pho5, 효모 α-접합 인자의 프로모터, 바콜로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터 및 원핵 또는 진핵세포 또는 그들의 바이러스의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 공지된 다른 서열, 및 그의 다양한 조합을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 형질전환시킬 숙주 세포의 선택 및/또는 발현시키고자 하는 단백질의 종류와 같은 인자에 따를 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 벡터의 카피수, 벡터에 의해 코딩된 임의의 다른 단백질의 카피수 및 발현을 제어하는 능력, 예를 들어 항생제 마커가 또한 고려되어야 한다.

[0088] 본원에 포함되는 재조합 핵산은 클로닝된 유전자 또는 그의 일부를 원핵세포, 진핵세포 (효모, 조류, 곤충 또는 포유동물), 또는 둘 모두에서 발현에 적합한 벡터 내로 라이게이팅함으로써 생산될 수 있다. 재조합 ALK1 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 비히클은 플라스미드 및 다른 벡터를 포함한다. 예를 들어, 적합한 벡터는 이. 콜라이와 같은 원핵세포에서의 발현을 위한 pBR322-유도된 플라스미드, pEMBL-유도된 플라스미드, pEX-유도된 플

라스미드, pBTac-유도된 플라스미드 및 pUC-유도된 플라스미드 종류의 플라스미드를 포함한다.

- [0089] 일부 포유동물 발현 벡터는 세균에서 벡터의 전파를 용이하게 하는 원핵세포 서열, 및 진핵세포 내에서 발현되는 하나 이상의 진핵세포 전사 단위를 모두 함유한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유도된 벡터는 진핵세포의 형질감염에 적합한 포유동물 발현 벡터의 예이다. 이들 벡터 중 일부는 원핵 및 진핵세포 모두에서 복제 및 약물 내성 선택을 용이하게 하도록 세균 플라스미드, 예를 들어 pBR322로부터의 서열로 변형된다. 별법으로, 진핵세포 내에서 단백질의 일시적인 발현을 위해 바이러스의 유도체, 예를 들어 소 유두종 바이러스 (BPV-1), 또는 엡스타인-바 바이러스 (pHEBo, pREP-유도된 및 p205)가 사용될 수 있다. 다른 바이러스 (레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 예는 유전자 요법 전달 시스템의 설명 아래에서 찾을 수 있다. 플라스미드 제조 및 숙주 유기체의 형질전환에 사용되는 다양한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 원핵 및 진핵세포 모두에 대한 다른 적합한 발현 시스템 및 일반적인 재조합 절차에 대해서는 문헌 [Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)]을 참조한다. 몇몇 경우에, 바콜로바이러스 발현 시스템을 사용함으로써 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 바콜로바이러스 발현 시스템의 예는 pVL-유도된 벡터 (예를 들어 pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도된 벡터 (예를 들어 pAcUW1), 및 pBlueBac-유도된 벡터 (예를 들어 β-gal 함유 pBlueBac III)를 포함한다.
- [0090] 바람직한 실시태양에서, 벡터는 CHO 세포 내에서 ALK1 폴리펩티드의 생산을 위해 설계될 것이고, 예를 들어 Pcmv-Script 벡터 (스트라타젠 (Stratagene, 미국 캘리포니아주 라 조라)), pcDNA4 벡터 (인비트로젠 (Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드)) 및 pCI-neo 벡터 (프로메가 (Promega, 미국 위스콘신주 매디슨))를 포함한다. 자명할 바와 같이, 유전자 구성체는 정제를 위해, 예를 들어 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 포함한 단백질을 생산하도록 배양액 내에 전파되는 세포 내에서 ALK1 폴리펩티드의 발현을 일으키기 위해 사용될 수 있다.
- [0091] 본원은 또한 하나 이상의 ALK1 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 (예를 들어, 서열 2 또는 4)을 포함하는 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵세포일 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 ALK1 폴리펩티드는 세균 세포, 예를 들어 이. 콜라이, 곤충 세포 (예를 들어, 바콜로바이러스 발현 시스템을 사용하여), 효모, 또는 포유동물 세포 내에서 발현될 수 있다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다.
- [0092] 따라서, 본원은 또한 ALK1 ECD 폴리펩티드를 포함한 본 발명의 ALK1 폴리펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, ALK1 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ALK1 폴리펩티드의 발현이 일어나도록 하기에 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. ALK1 폴리펩티드는 ALK1 폴리펩티드를 함유하는 세포 및 배지의 혼합물로부터 분리되고 단리될 수 있다. 별법으로, ALK1 폴리펩티드는 세포질 내에 또는 막 분획 내에 보유될 수 있고, 세포를 수거하고, 용해시키고 단백질을 단리할 수 있다. 세포 배양액은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양을 위한 적합한 배지는 당업계에 잘 알려져 있다. ALK1 폴리펩티드는 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동, ALK1 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체를 사용한 면역침화도 정제 및 ALK1 폴리펩티드에 융합된 도메인과 결합하는 작용제를 사용한 친화도 정제 (예를 들어, ALK1-Fc 융합체를 정제하기 위해 단백질 A 컬럼이 사용될 수 있음)를 포함한 단백질을 정제하기 위한 당업계에 공지된 기술을 이용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포 또는 둘 모두로부터 단리될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, ALK1 폴리펩티드는 그의 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다. 바람직한 실시태양에서, 정제는 예를 들어 다음 중 3개 이상을 임의의 순서로 포함하는 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계에 의해 달성된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로스 크로마토그래피, 페닐세파로스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과 및 버퍼 교환으로 완료될 수 있다.
- [0093] 다른 실시태양에서, 재조합 ALK1 폴리펩티드의 목적하는 부분의 N-말단에서 폴리-(His)/엔테로키나제 절단 부위 서열과 같은 정제 리더 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni²⁺ 금속 수지를 사용하는 친화도 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 허용할 수 있다. 이어서, 정제 리더 서열은 엔테로키나제로 처리하여 후속적으로 제거되어, 정제된 ALK1 폴리펩티드를 제공할 수 있다 (예를 들어, [Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177]; 및 [Janknecht et al., PNAS USA 88:8972] 참조).
- [0094] 융합 유전자를 제조하기 위한 기술은 잘 공지되어 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 연결은 라이게이션을 위한 블런트-단부 (blunt-ended) 또는 스테거-단부 (stagger-ended) 말단,

적절한 말단을 제공하기 위해 제한 효소 소화, 적절한 경우에 점착 (cohesive) 단부의 충전 (filling-in), 바람직하지 않은 연결을 피하기 위해 알칼린 포스포타제 처리, 및 효소적 라이게이션을 이용하는 통상적인 기술에 따라 수행한다. 다른 실시태양에서, 융합 유전자는 자동 DNA 합성기를 포함하는 통상적인 기술에 의해 합성할 수 있다. 별법으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 2개의 연속 유전자 단편 사이에 상보성 오버행 (overhang)을 일으키는 앵커 (anchor) 프라이머를 사용하여 수행할 수 있고, 이는 후속적으로 어닐링되어 키메라 (chimeric) 유전자 서열을 생성할 수 있다 (예를 들어, [Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992] 참조).

[0095] ALK1, BMP9, BMP10, GDF5, GDF6 또는 GDF7의 길항제인 핵산 화합물의 카테고리의 예는 안티센스 핵산, RNAi 구성체 및 촉매적 핵산 구성체를 포함한다. 핵산 화합물은 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥 화합물은 또한 오버행 또는 비-상보성의 구역을 포함할 수 있고, 여기서 하나의 또는 가닥 중 다른 것은 단일 가닥이다. 단일 가닥 화합물은 자가-상보성의 구역을 포함할 수 있고, 이는 화합물이 이중 나선 구조의 구역과 소위 "헤어핀 (hairpin)" 또는 "스텝-루프 (stem-loop)" 구조를 형성하는 것을 의미한다. 핵산 화합물은 전장 ALK1 핵산 서열 또는 리간드 핵산 서열의 1000개 이하, 500개 이하, 250개 이하, 100개 이하 또는 50, 35, 30, 25, 22, 20 또는 18개 이하의 뉴클레오티드로 이루어진 구역에 상보성인 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상보성의 구역은 바람직하게는 적어도 8개 뉴클레오티드, 임의로 적어도 10개 또는 적어도 15개 뉴클레오티드, 임의로 15 내지 25개 뉴클레오티드일 것이다. 상보성의 구역은 표적 전사체의 인트론, 코딩 서열 또는 비코딩 서열, 예를 들어 코딩 서열 부분 내에 위치할 것이다. 일반적으로, 핵산 화합물은 길이가 약 8 내지 약 500개 뉴클레오티드 또는 염기쌍 길이일 것이고, 임의로 길이는 약 14 내지 약 50개 뉴클레오티드일 것이다. 핵산은 DNA (특히 안티센스로서 사용하기 위한), RNA 또는 RNA:DNA 하이브리드일 수 있다. 임의의 하나의 가닥은 DNA 및 RNA의 혼합물, 및 DNA 또는 RNA로서 쉽게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 이중 가닥 화합물은 DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA일 수 있고, 임의의 하나의 가닥은 또한 DNA 및 RNA의 혼합물, 및 DNA 또는 RNA로서 쉽게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함할 수 있다. 핵산 화합물은 백본 (뉴클레오티드간 연결을 포함한 천연 핵산에서 당-포스페이트 부분) 또는 염기 부분 (천연 핵산의 퓨린 또는 피리미딘 부분)에 대한 하나 이상의 변형을 포함한 임의의 다양한 변형을 포함할 수 있다. 안티센스 핵산 화합물은 바람직하게는 길이가 약 15 내지 약 30 뉴클레오티드일 것이고, 종종 혈청 내에서, 세포 내에서, 또는 화합물이 전달될 것 같은 장소에서, 예를 들어 경구 전달된 화합물의 경우 위 및 흡입된 화합물에 대해 폐에서 안정성과 같은 특징을 개선하기 위해 하나 이상의 변형을 포함할 것이다. RNAi 구성체의 경우에, 표적 전사체에 상보성인 가닥은 일반적으로 RNA 또는 그의 변형일 것이다. 다른 가닥은 RNA, DNA 또는 임의의 다른 변이일 수 있다. 이중 가닥 또는 단일 가닥의 "헤어핀" RNAi 구성체의 이중체 부분은 다이서 (Dicer) 기질로서 역할을 하는 한, 바람직하게는 길이가 18 내지 40 뉴클레오티드 길이 및 임의로 약 21 내지 23 뉴클레오티드 길이일 것이다. 촉매적 또는 효소적 핵산은 리보자임 또는 DNA 효소일 수 있고 또한 변형된 형태를 함유할 수 있다. 핵산 화합물은 생리학적 조건 하에 및 넌센스 또는 센스 제어가 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않는 농도에서 세포와 접촉될 때 표적의 발현을 약 50%, 75%, 90% 이상 억제할 수 있다. 핵산 화합물의 효과를 시험하기 위한 바람직한 농도는 1, 5 및 10 마이크로몰농도이다. 핵산 화합물은 또한 예를 들어, 혈관신생에 대한 효과에 대해 시험될 수 있다.

[0096] 야생형 DAN의 변이체를 포함한 DAN 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 및 DAN 단백질을 함유하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산을, ALK1 ECD 단백질을 코딩하는 핵산에 관하여 상기한 바와 같이 생성하고 특성화할 수 있다.

[0097] 4. 항체

[0098] 본원의 다른 측면은 ALK1 폴리펩티드의 세포외 부분과 반응성인 항체, 바람직하게는 ALK1 폴리펩티드와 특이적으로 반응성인 항체에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 항체는 GDF5, GDF6, GDF7 BMP-9 또는 BMP-10과 같은 리간드에 대한 ALK1 결합을 저해할 수 있고, ALK1의 리간드에 대한 항체는 관련 단백질의 성숙한 처리된 형태와 결합할 것임이 이해될 것이다. 본원은 또한 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9 및/또는 BMP10과 결합하고 상기 리간드에 대한 ALK1 결합을 억제하는 항체를 제공한다. 바람직한 항체는 생물분석, 예를 들어 CAM 분석 또는 각막 미세낭 분석 (상기 참조)에서 항-혈관신생 활성을 나타낼 것이다.

[0099] 본원에서 사용될 때, 용어 "항체"는 예를 들어, 임의의 이소형 (IgG, IgA, IgM, IgE 등)의 전체 항체를 포함하는 것으로 의도되고, 선택된 항원과 반응성인 면역글로불린의 단편 또는 도메인을 포함한다. 항체는 통상적인 기술을 이용하여 단편화될 수 있고, 단편은 효용성 및/또는 관심있는 특이적 에피토프와의 상호작용에 대해 스크리닝될 수 있다. 따라서, 상기 용어는 특정 단백질과 선택적으로 반응할 수 있는 항체 분자의 단백질 분해에 의해 절단된 또는 재조합 방식으로 제조된 부분의 절편을 포함한다. 이러한 단백질 분해성 및/또는 재조합 단편의

비-제한적인 예는 Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, 및 펩티드 링커에 의해 연결된 V_L 및/또는 V_H 도메인을 함유하는 단일쇄 항체 (scFv)를 포함한다. scFv는 공유 또는 비-공유 연결되어 2개 이상의 결합 부위를 갖는 항체를 형성할 수 있다. 용어 항체는 또한 폴리클로날, 모노클로날, 또는 항체 및 재조합 항체의 다른 정제된 체계를 포함한다. 용어 "재조합 항체"는 분자 생물학의 기술을 이용하여 구성된 핵산으로부터 발현된 항체 또는 면역글로불린의 항원 결합 도메인, 예를 들어 단일쇄 항체로부터 개발된 인간화 항체 또는 완전 인간 항체를 의미한다. 단일 도메인 및 단일쇄 항체도 또한 용어 "재조합 항체" 내에 포함된다.

[0100] 항체는 동물에 대한 항원의 투여, 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 동물에 대한 항원의 투여, 또는 항체 (중중 단일쇄 항체 또는 항체 도메인)의 라이브러리에 대한 항체를 사용한 스크리닝을 포함한 당업계에 공지된 임의의 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 항원 결합 활성이 검출되면, 단백질의 관련 부분을 전장 IgG 프레임워크를 포함한 다른 항체 프레임워크에 그래프팅할 수 있다. 예를 들어, ALK1 폴리펩티드 또는 ALK1 리간드로부터 유래된 면역원을 사용함으로써, 항-단백질/항-펩티드 항혈청 또는 모노클로날 항체를 표준 프로토콜에 의해 제조할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)] 참조). 마우스, 햄스터 또는 토끼와 같은 포유동물을 면역원성 형태의 펩티드 (예를 들어, 항체 반응을 유발시킬 수 있는 ALK1 폴리펩티드 또는 항원 단편, 또는 융합 단백질)로 면역화시킬 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성을 부여하는 기술은 담체에 대한 컨쥬게이션 또는 당업계에 잘 알려진 다른 기술을 포함한다. ALK1 폴리펩티드의 면역원성 부분 (바람직하게는 세포의 부분)은 어쥬번트 (adjuvant)의 존재 하에 투여될 수 있다. 면역화의 진행은 혈장 또는 혈청 내에서 항체 역가의 검출에 의해 모니터링할 수 있다. 항체의 수준을 평가하기 위해 항원으로서 면역원에 대해 표준 ELISA 또는 다른 면역분석이 사용될 수 있다.

[0101] ALK1 폴리펩티드의 항원 체계를 사용한 동물의 면역화 후, 항-ALK1 항혈청을 얻을 수 있고, 원하는 경우에, 혈청으로부터 폴리클로날 항-ALK1 항체를 단리할 수 있다. 모노클로날 항체를 생산하기 위해, 항체-생산 세포 (립프구)를 면역화된 동물로부터 수거하고, 표준 체세포 융합 절차에 의해 불멸화 세포, 예를 들어 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 얻을 수 있다. 이러한 기술은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 하이브리도마 기술 (문헌 [Kohler and Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497]에서 처음 개발된), 인간 B 세포 하이브리도마 기술 (Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72), 및 인간 모노클로날 항체를 생산하기 위한 EBV-하이브리도마 기술 (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)을 포함한다. 하이브리도마 세포는 본원의 포유동물 ALK1 폴리펩티드와 특이적으로 반응성인 항체의 생산에 대해 면역화학적으로 스크리닝될 수 있고, 모노클로날 항체를 상기 하이브리도마 세포를 포함하는 배양액으로부터 단리할 수 있다.

[0102] 본원에서 사용될 때, 용어 항체는 ALK1 폴리펩티드 중 하나와 특이적으로 반응성인 그의 단편을 포함하는 것으로 의도된다. 항체는 통상적인 기술을 이용하여 단편화될 수 있고, 단편은 전체 항체에 대해 상기한 바와 동일한 방식으로 효용성에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, F(ab)₂ 단편은 항체를 펩신으로 처리하여 생성될 수 있다. 생성되는 F(ab)₂ 단편은 Fab 단편을 생산하기 위해 디설피드 다리를 환원시키도록 처리될 수 있다. 본원의 항체는 항체의 적어도 하나의 CDR 구역에 의해 부여된 ALK1 폴리펩티드에 대한 친화도를 갖는 이중특이적, 단일쇄, 및 키메라 및 인간화 분자를 포함하는 것으로 추가로 의도된다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 그에 부착된 표지를 추가로 포함하고 검출될 수 있다 (예를 들어, 표지는 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자 (co-factor)일 수 있음).

[0103] 특정 바람직한 실시태양에서, 본원의 항체는 재조합 항체, 특히 인간화 모노클로날 항체 또는 완전 인간 재조합 항체이다.

[0104] 항체를 참조하여 사용될 때 형용사 "~와 특이적으로 반응성인"은 당업계에서 일반적으로 이해되는 바와 같이, 항체가 최소한 특정 종류의 생물학적 샘플 내에서 관심있는 항원의 존재를 검출하기 위해 유용하도록 항체가 관심있는 항원 (예를 들어 ALK1 폴리펩티드 또는 ALK1 리간드) 및 관심없는 다른 항원 사이에서 충분히 선택적임을 의미하는 것으로 의도된다. 항체를 사용하는 특정 방법에서, 보다 높은 정도의 결합 선택성이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 관심없는 하나 이상의 매우 높은 풍부도 단백질의 존재 하에 관심있는 낮은 풍부도 단백질을 검출하는데 사용하기 위한 항체는 관심있는 항원과 다른 교차-반응물 사이에서 보다 높은 정도의 선택성을 갖는다면 더 잘 작용할 수 있다. 모노클로날 항체는 일반적으로 목적하는 항원과 교차-반응성 폴리펩티드 사이를 효과적으로 식별하는 경향이 더 크다 (폴리클로날 항체에 비해). 또한, 하나의 종류의 생물학적 샘플 (예를 들어 대변 샘플) 내에서 관심있는 항원을 선택적으로 확인하는데 효과적인 항체는 상이한 종류의 생물학적 샘플

(예를 들어 혈액 샘플) 내에서 동일한 항원을 선택적으로 확인하는 것만큼 효과적이지 않을 수 있다. 마찬가지로, 다른 생물학적 오염물이 없는 정제된 단백질 제제 내에서 관심있는 항원을 확인하는데 효과적인 항체는 조야한 생물학적 샘플, 예를 들어 혈액 또는 소변 샘플 내에서 관심있는 항원을 확인하는 것만큼 효과적이지 않을 수 있다. 따라서, 바람직한 실시태양에서, 본원은 아마도 항체의 사용을 위해 선택된 샘플 종류인 샘플 종류 내에서 관심있는 항원에 대한 특이성이 입증된 항체를 제공한다.

[0105] 항체: 항원 상호작용의 특이성에 영향을 미치는 하나의 특징은 항원에 대한 항체의 친화도이다. 목적하는 특이성은 다양한 상이한 친화도에서 도달될 수 있지만, 일반적으로 바람직한 항체는 친화도 (해리 상수)가 약 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 이하일 것이다. ALK1에 대한 TGF β 의 명백하게 낮은 결합 친화도가 주어지면, 많은 항-ALK1 항체가 TGF β 결합을 억제할 것으로 예상된다. 그러나, GDF5, 6, 7 그룹의 리간드는 약 5×10^{-8} M의 K_D 로 결합하고, BMP9, 10 리간드는 약 1×10^{-10} M의 K_D 로 결합한다. 따라서, 이들 리간드의 신호전달 활성을 저해하도록 적절한 친화도의 항체가 선택될 수 있다.

[0106] 또한, 바람직한 항체를 확인하도록 항체를 스크리닝하기 위해 사용되는 기술은 얻어진 항체의 특성에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 특정 치료 목적에 사용될 항체는 바람직하게는 특정 세포 종류를 표적화할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 종류의 항체를 얻기 위해, 관심있는 항원을 발현하는 세포와 결합하는 항체에 대해 스크리닝하는 것이 바람직할 수 있다 (예를 들어 형광 활성화된 세포 분류에 의해). 마찬가지로, 항체가 용액에서 항원과 결합하도록 사용되어야 한다면, 용액 결합을 시험하는 것이 바람직할 수 있다. 특히 바람직한 항체를 확인하기 위해 항체:항원 상호작용을 시험하기 위한 다양한 상이한 기술이 이용가능하다. 이러한 기술은 ELISA, 표면 플라즈몬 공명 결합 분석 (예를 들어 비아코어 결합 분석 (비아-코어 에이비 (Bia-core AB, 스웨덴 옴살라)), 샌드위치 분석 (예를 들어 아이젠 인터내셔널, 인크. (IGEN International, Inc., 미국 메릴랜드주 게이터스버그)의 상자성 비드 시스템), 웨스턴 블롯 (western blot), 면역침전 분석 및 면역조직화학을 포함한다.

[0107] 5. 항체 및 Fc-융합 단백질에서의 변경

[0108] 본원은 공학처리된 또는 변이체 Fc 구역을 갖는 항체, ALK1-Fc 융합 단백질 및 DAN-Fc 융합 단백질을 추가로 제공한다. 상기 항체 및 Fc 융합 단백질은 예를 들어 효과기 기능, 예를 들어 항원-의존 세포독성 (ADCC) 및 보체-의존 세포독성 (CDC)을 조정하는데 유용할 수 있다. 추가로, 변형은 항체 및 Fc 융합 단백질의 안정성을 개선할 수 있다. 항체 및 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 DNA 내로 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 상기 변이체는 예를 들어 본원에 개시된 항체 및 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구성체가 목적하는 특징을 갖는다면, 최종 구성체에 도달하도록 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어진다. 아미노산 변화는 또한 항체 및 Fc 융합 단백질의 번역후 과정, 예를 들어 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것을 변경시킬 수 있다.

[0109] 감소된 효과기 기능을 갖는 항체 및 Fc 융합 단백질은 WO 94/28027 및 WO 98/47531 (Bluestone et al.); 또한 문헌 [Xu et al. 2000 Cell Immunol 200; 16-26]에 기재된 Ala-Ala 돌연변이를 포함하고 이로 제한되지 않는 아미노산 서열에 변화를 도입함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 특정 실시태양에서, Ala-Ala 돌연변이를 포함하는 불변 구역 내에 돌연변이를 갖는 본원의 항체 및 Fc 융합 단백질은 효과기 기능을 감소 또는 폐지하기 위해 사용될 수 있다. 이들 실시태양에 따라, 항체 및 Fc 융합 단백질은 위치 234에서 알라닌에 대한 돌연변이 또는 위치 235에서 알라닌에 대한 돌연변이, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 항체 또는 Fc 융합 단백질은 IgG4 프레임워크를 포함하고, 여기서 Ala-Ala 돌연변이는 위치 234에서 페닐알라닌으로부터 알라닌으로의 돌연변이(들) 및/또는 위치 235에서 류신으로부터 알라닌으로의 돌연변이를 설명할 것이다. 다른 실시태양에서, 항체 또는 Fc 융합 단백질은 IgG1 프레임워크를 포함하고, 여기서 Ala-Ala 돌연변이는 위치 234에서 류신으로부터 알라닌으로의 돌연변이(들) 및/또는 위치 235에서 류신으로부터 알라닌으로의 돌연변이를 설명할 것이다. 항체 또는 Fc 융합 단백질은 별법으로 또는 추가로 CH2 도메인에서 점 돌연변이 K322A를 포함하는 다른 돌연변이를 함유할 수 있다 (Hezareh et al. 2001 J Viro1. 75: 12161-8).

[0110] 특정 실시태양에서, 항체 또는 Fc 융합 단백질은 보체 의존 세포독성 (CDC)을 향상시키거나 억제하기 위해 변형될 수 있다. 조정된 CDC 활성은 Fc 구역 내에 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 도입함으로써 달성될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 6,194,551 참조). 별법으로 또는 추가로, 시스템 잔기(들)이 Fc 구역

내에 도입될 수 있어서, 상기 구역 내에 사슬간 디설피드 결합 형성을 허용한다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 개선되거나 감소된 내재화 능력 및/또는 증가되거나 감소된 보체-매개된 세포 치사성을 가질 것이다 (문헌 [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B.J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)], WO99/51642, [Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988)]; 미국 특허 5,648,260; 미국 특허 5,624,821; 및 WO94/29351 참조).

[0111] 6. 혈관신생, 혈관주위세포 적용범위 및 특정 장애를 조정하기 위한 방법 및 조성물

[0112] 본원은 대상에게 유효량의 ALK1 ECD 폴리펩티드, 예를 들어 ALK1-Fc 융합 단백질, DAN 단백질, 예를 들어 DAN-Fc 융합 단백질, 또는 본원에 개시된 항체, 예를 들어 GDF5, GDF6, GDF7, BMP9, BMP10, 또는 ALK1의 ECD에 대한 항체, 또는 임의의 상기한 것의 핵산 길항제 (예를 들어, 안티센스 또는 siRNA) (이하에서 종합적으로 "치료제"로서 칭함)를 투여함으로써, 포유동물에서 혈관신생을 억제하고/거나 혈관주위세포 적용범위를 증가시키는 방법을 제공한다. 제시된 데이터는 본원에 개시된 항-혈관신생 치료제가 포유동물의 눈에서 혈관신생을 억제하기 위해 사용될 수 있음을 구체적으로 나타낸다. 이들 치료제는 또한 뼈 및 관절에서 및 종양, 특히 뼈 및 관절과 연관된 종양에서 혈관신생을 억제하는데 유용할 것으로 예상된다.

[0113] 혈관신생 연관 질환은 혈관신생-의존 암, 예를 들어, 고형 종양, 혈액 종양, 예를 들어 백혈병, 및 종양 전이; 양성 종양, 예를 들어 혈관종, 청신경종, 신경섬유종, 트라코마 및 화농성 육아종; 류마티스 관절염; 건선; 피부홍조; 오슬러-웨버 (Osler-Webber) 증후군; 심근 혈관신생; 플라크 (plaque) 혈관신생; 모세혈관 확장증; 혈우병 관절; 및 혈관섬유종을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0114] 특히, 본원의 폴리펩티드 치료제는 암 (종양) 및 특히 성장을 지지하기 위해 혈관신생 과정에 의존하는 것으로 알려진 암을 치료 또는 예방하기 위해 유용하다. 대부분의 항-혈관신생제와는 달리, ALK1 ECD 폴리펩티드는 다수 인자에 의해 자극된 혈관신생에 영향을 미친다. 이는 암에서 고도로 관련되고, 여기서 암은 종종 종양 혈관신생을 지지하기 위해 다수 인자를 획득할 것이다. 따라서, 본원에 개시된 치료제는 단일 혈관신생 인자를 표적으로 하는 약물을 사용하는 치료 (예를 들어, VEGF를 표적으로 하는 베마시주맵)에 내성인 종양을 치료하는데 특히 효과적일 것이다. 본원에서 입증되는 바와 같이, ALK1-Fc 융합 단백질은 흑색종, 폐암, 췌장암 (특히, 췌장 내분비 조직의 종양), 다발성 골수종 및 유방암 (예를 들어, 원발성 유방암 또는 전이성 유방암; 에스트로겐 수용체 양성 (ER+) 또는 에스트로겐 수용체 음성 (ER-))의 병리학적 효과를 감소시키는데 효과적이다.

[0115] 다발성 골수종은 상당한 혈관신생 성분을 포함하는 암으로서 널리 인정된다. 따라서, ALK1-Fc 융합 단백질 및 본원에 개시된 다른 치료제는 다발성 골수종 및 뼈와 연관된 다른 종양을 치료하는데 유용할 것으로 예상된다. 본원에서 입증되는 바와 같이, 본원에 개시된 치료제는 다발성 골수종과 연관된 뼈 손상을 개선하기 위해 사용될 수 있고, 따라서 다른 종양, 예를 들어 유방 또는 전립선 종양의 뼈 전이와 연관된 뼈 손상을 개선하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 나타난 바와 같이, GDF5-7 리간드는 뼈에서 고도로 발현되고, 임의의 특정 메카니즘에 제한되기를 바라지 않지만, 이들 리간드를 저해하면 뼈에서 종양 발생에 요구되는 과정을 파괴할 수 있다.

[0116] 상기 방법의 특정 실시태양에서, 하나 이상의 폴리펩티드 치료제가 함께 (동시에) 또는 상이한 시간에 (순차적으로) 투여될 수 있다. 또한, 폴리펩티드 치료제는 암을 치료하기 위한 또는 혈관신생을 억제하기 위한 다른 종류의 화합물과 함께 투여될 수 있다.

[0117] 특정 실시태양에서, 본원의 방법은 단독으로 사용될 수 있다. 별법으로, 방법은 증식성 장애 (예를 들어, 종양)의 치료 또는 예방에 지시된 다른 통상적인 항암 치료 방법과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 예방적 암 방지, 수술 후 암 재발 및 전이의 방지에서 및 다른 통상적인 암 요법의 보조로서 사용될 수 있다. 본원은 통상적인 암 요법 (예를 들어, 화학요법, 방사선 요법, 광 요법, 면역요법 및 수술)의 유효성이 본 발명의 폴리펩티드 치료제의 사용을 통해 향상될 수 있음을 인정한다.

[0118] 넓은 범위의 통상적인 화합물이 항신생물 활성을 갖는 것으로 나타난다. 이들 화합물은 고형 종양을 축소시키거나, 전이 및 추가의 성장을 방지하거나, 백혈병 또는 골수 악성종양에서 악성 세포의 수를 감소시키기 위해 화학요법에서 억제제로 사용되었다. 화학요법이 다양한 종류의 악성종양을 치료하는데 효과적이었지만, 많은 항-신생물 화합물은 바람직하지 않은 부작용을 유발한다. 2가지 이상의 상이한 치료가 조합될 때, 치료는 상승적으로 작용하고 각각의 치료 용량을 감소시켜, 보다 고용량에서 각각의 화합물에 의해 나타나는 유해한 부작용을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 다른 경우에, 치료에 불응성인 악성종양은 2 이상의 상이한 치료의 조합 요법에 반응할 수 있다.

[0119] 본원에 개시된 폴리펩티드 치료제가 다른 통상적인 항-신생물제와 조합으로 동시에 또는 순차적으로 투여될 때,

상기 치료제는 항-신생물제의 치료 효과를 향상시키거나, 이러한 항-신생물제에 대한 세포 내성을 극복할 수 있다. 이는 항-신생물제의 용량을 감소시켜, 바람직하지 않은 부작용을 감소시키거나 내성 세포에서 항-신생물제의 유효성을 회복시킨다.

- [0120] 본원에 따라, 본원에 설명된 항-혈관신생제는 질환의 치료를 위한 다른 조성물 및 절차와 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 종양은 통상적으로 ALK1 또는 ALK1 리간드 길항제와 조합한 수술, 방사선 또는 화학요법으로 치료될 수 있고, 이후 길항제는 미세전이의 휴면을 확장시키고 임의의 잔류 일차 종양을 안정화하기 위해 환자에게 후속적으로 투여된다.
- [0121] 혈관신생-억제제는 또한 암이 새로이 발생하거나 재발 암이 발생할 위험이 큰 것으로 알려진 개인에게 예방적으로 제공될 수 있다. 따라서, 본원의 측면은 대상에게 유효량의 ALK1 또는 ALK1 리간드 길항제 및/또는 그의 유도체, 또는 본원의 다른 혈관신생-억제제를 투여하는 것을 포함하는, 대상에서 암의 예방적 방지를 위한 방법을 포함한다.
- [0122] 본원에서 입증되는 바와 같이, ALK1-Fc는 류마티스 관절염의 무린 모델의 표현형을 감소시키기 위해 효과적이다. 따라서, 본원에 개시된 치료제는 류마티스 관절염 및 다른 종류의 뼈 또는 관절 염증의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0123] 특정 정상 생리학적 과정, 예를 들어, 배란, 월경 및 태반형성이 또한 혈관신생과 연관된다. 본원의 혈관신생 억제 단백질은 내피 세포의 과도하거나 비정상 자극의 질환의 치료에서 유용하다. 이들 질환은 장 유착, 즉상 경화증, 공피증 및 비후성 반흔, 즉, 켈로이드를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 이들은 또한 병리학적 결과로서 혈관신생이 있는 질환, 예를 들어 고양이 급흡병 (로셀 미날리아 퀸토사 (Rochele minalia quintosa)) 및 궤양 (헬리코박터 파이로리 (Helicobacter pylori))의 치료에서 유용하다.
- [0124] 일반적 혈관신생 억제 단백질은 배아 착상에 요구되는 자궁 혈관생성을 감소 또는 방지함으로써 피임제로서 사용될 수 있다. 따라서, 본원은 배아 착상을 방지하기에 충분한 양의 억제 단백질을 여성에게 투여할 때 효과적인 피임 방법을 제공한다. 피임 방법의 한 측면에서, 성교 및 수정이 일어나기 전 또는 후에 배아 착상을 차단하기에 충분한 양의 억제 단백질이 투여되어, 효과적인 피임 방법, 가능하게는 "사후 (morning after)" 방법을 제공한다. 본 진술에 의해 매이기를 원하지 않지만, 자궁 내막의 혈관생성의 억제는 포배 (blastocyst)의 착상을 저해하는 것으로 생각된다. 자궁관의 점막의 혈관생성의 유사한 억제는 포배의 착상을 저해하여, 자궁관 임신의 발생을 방지한다. 투여 방법은 알약 (pill), 주사 (정맥내, 피하, 근육내), 좌약, 질 스폰지, 질 탐폰 및 자궁내 장치를 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 본원의 혈관신생 억제제의 투여는 태반의 정상적인 향상된 혈관생성, 및 또한 성공적으로 착상된 포배 및 발생 중인 배아 및 태아 내에서 혈관의 발생을 저해할 것으로 또한 생각된다.
- [0125] 눈에서, 혈관신생은 예를 들어 당뇨 망막병증, 미숙아망막병증, 황반 변성, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장 및 수정체위 섬유증과 연관된다. 본원에 개시된 치료제는 눈내로 또는 눈으로의 다른 국소 투여에 의해 투여될 수 있다. 또한, 실시예에 나타난 바와 같이, ALK1-Fc는 전신으로 투여될 수 있고, 눈 혈관신생에 대해 여전히 목적하는 효과를 갖는다.
- [0126] 눈에서 혈관신생과 연관된 다른 질환은 유행 각막결막염, 비타민 A 결핍증, 콘택트렌즈 과다착용, 아토피 각막염, 상운 각막염, 익상편 (pterygium) 건조각막염, 쇼그렌 (sjogren), 장미 여드름, 폴리텐각결막염 (phlyctenulosis), 매독, 미코박테리아 (Mycobacteria) 감염, 지질 변성, 화학 화상, 세균성 궤양, 진균성 궤양, 단순 포진 감염, 대상포진 감염, 원충 감염, 카포시 (Kaposi) 육종, 무렌 (Mooren) 궤양, 테리엔 (Terrien) 변연 각막 변성, 변연 각질용해증, 류마티스 관절염, 전신 루푸스, 다발동맥염, 외상 (trauma), 베게너 (Wegeners) 사르코이드증 (sarcoidosis), 공막염, 스티븐 존슨 (Steven's Johnson) 병, 유천포창 방사상 각막절개술, 및 각막 이식 거부, 겸상 적혈구 빈혈, 사르코이드 (sarcoid), 탄성섬유 가성황색종, 파제트 (Pagets)병, 정맥 폐색, 동맥 폐색, 목동맥 폐쇄 질환, 만성 포도막염/유리체염, 미코박테리아 감염, 라임 (Lyme)병, 전신 홍반 루푸스, 미숙아 망막병증, 일스 (Eales)병, 베체트 (Bechets)병, 망막염 또는 맥락막염을 일으키는 감염, 추정 눈 히스토플라스마증, 베스트 (Bests) 병, 근시, 시신경유두소와 (optic pits), 스타가르트 (Stargarts) 병, 주변 포도막염, 만성 망막 탈착, 과다점성 증후군, 톡소플라스마증 (toxoplasmosis), 외상 및 레이저조사후 (post-laser) 합병증을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 다른 질환은 루베오시스 (rubeosis) (전방각 혈관신생)와 연관된 질환 및 모든 형태의 증식성 유리체망막병증을 포함한 혈관섬유 또는 섬유 조직의 비정상 증식에 의해 유발된 질환을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

- [0127] 눈의 병태는 예를 들어 치료제의 전신, 국소, 눈내 주사에 의해, 또는 치료제를 방출하는 지속 방출 장치의 삽입에 의해 치료 또는 예방될 수 있다. 치료제는 화합물이 각막 및 예를 들어 전방, 후방, 유리체, 방수 (aqueous humor), 유리체액, 각막, 홍채/섬모체, 수정체, 맥락막/망막 및 공막과 같은 눈의 내부 구역을 관통하도록 충분한 시간 동안 화합물이 눈 표면과 접촉하여 유지되도록 제약상 허용되는 안과용 비히클 내에 전달될 수 있다. 제약상 허용되는 안과용 비히클은 예를 들어, 연고, 식물유 또는 캡슐화 물질일 수 있다. 별법으로, 본원의 치료제는 유리체 및 방수 내로 직접 주사될 수 있다. 추가의 별법으로, 화합물은 눈의 치료를 위해 전신으로, 예를 들어 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0128] 하나 이상의 치료제가 투여될 수 있다. 본원의 방법은 또한 눈의 병태를 치료하기 위해 사용되는 다른 의약의 동시-투여를 포함한다. 하나 초과와 다른 작용제 또는 작용제와 의약의 조합물을 투여할 때, 투여는 시간상 동시에 또는 순차적으로 일어날 수 있다. 치료제 및/또는 의약은 상이한 투여 경로로 또는 동일한 투여 경로로 투여될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 치료제 및 의약은 안과용 제약 제제 내에 함께 투여된다.
- [0129] 하나의 실시태양에서, 치료제는 약물학적 메카니즘에 의해 혈관신생을 차단하는 작용을 하는 다른 의약과 동시 투여에 의해 눈에서 혈관신생과 연관된 질환을 치료하기 위해 사용된다. 본원의 치료제와 동시에 투여될 수 있는 의약은 페가프타닙 (맥쿠젠™), 라니비주맙 (루센티스(Lucentis)™), 스쿠알라민 락테이트 (에비존(Evizon)™), 헤파리나제 및 당코르티코이드 (예를 들어 트리암시놀론)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 하나의 실시태양에서, 본원에 개시된 적어도 하나의 치료제 및 페가프타닙 (맥쿠젠™), 라니비주맙 (루센티스™), 스쿠알라민 락테이트 (에비존™), 헤파리나제 및 당코르티코이드 (예를 들어 트리암시놀론) 중의 하나 이상의 의약을 함유하는 안과용 제약 제제를 투여함으로써 혈관신생과 연관된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0130] 7. 제제화 및 유효 투여량
- [0131] 본원에 설명된 치료제는 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 본원에 따라 사용하기 위한 제약 조성물은 하나 이상의 생리학상 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여 통상적인 방식으로 제제화될 수 있다. 이러한 제제에는 대부분의 규제 요건에 따라 일반적으로 실질적으로 발열원이 존재하지 않을 것이다.
- [0132] 특정 실시태양에서, 본원의 치료 방법은 조성물을 전신으로, 또는 임플란트 또는 장치로서 국소로 투여하는 것을 포함한다. 투여될 때, 본원에서 사용하기 위한 치료 조성물은 발열원이 존재하지 않는 생리학상 허용되는 형태로 존재한다. 상기한 바와 같이 조성물 내에 또한 임의로 포함될 수 있는 ALK1 신호전달 길항제 이외의 치료상 유용한 작용제는 본원에 개시된 방법에서 대상 화합물 (예를 들어, ALK1 ECD 폴리펩티드 또는 임의의 본원에 개시된 항체)과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0133] 대개, 본원에 개시된 단백질 치료제는 비경구로, 특히 정맥내 또는 피하로 투여될 것이다. 비경구 투여에 적합한 제약 조성물은 하나 이상의 ALK1 ECD 폴리펩티드 또는 다른 항체를 하나 이상의 제약상 허용되는 멸균 등장성 수용액 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 사용 직전에 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합으로 포함할 수 있고, 이는 항산화제, 버퍼, 정균제, 제제를 의도된 수여체의 혈액과 등장성으로 만드는 용질, 또는 현탁제 또는 비후제를 함유할 수 있다. 본원의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물, 식물유, 예를 들어 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레이트를 포함한다. 적합한 유효성은 예를 들어, 코팅 물질, 예를 들어 레시틴의 사용, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0134] 하나의 실시태양에서, 본원에 개시된 항체 및 ALK1 ECD 단백질은 안과용 제약 제제 내에서 투여된다. 일부 실시태양에서, 안과용 제약 제제는 멸균 수용액 (바람직하게는 주사에 적합한 농도의), 또는 고약 (salve) 또는 연고이다. 이러한 고약 또는 연고는 대개 멸균의 제약상 허용되는 고약 또는 연고 베이스, 예를 들어 광물유-백색 바셀린 (white petrolatum) 베이스 내에 용해 또는 현탁된 본원에 개시된 하나 이상의 항체 또는 ALK1 ECD 단백질을 포함한다. 고약 또는 연고 조성물에서, 무수 라놀린이 또한 제제 내에 포함될 수 있다. 치메로살 또는 클로로부탄올이 또한 바람직하게는 상기 연고 조성물에 항균제로서 첨가된다. 하나의 실시태양에서, 멸균 수용액은 미국 특허 6,071,958에 설명된 바와 같다.
- [0135] 본원은 pH를 조정하기 위해 산 및 염기; 및 pH를 좁은 범위 내에 유지하기 위해 완충제를 포함하도록 변화될 수 있는 제제를 제공한다. 추가의 의약이 제제에 첨가될 수 있다. 이들은 페가프타닙, 헤파리나제, 라니비주맙 또는 당코르티코이드를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본원에 따른 안과용 제약 제제는 무균 처리에 의해 제조되거나, 적합한 제제 단계에서 멸균을 수행한다.

- [0136] 조성물 및 제제는 원하는 경우에 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여형을 포함할 수 있는 팩 (pack) 또는 디스펜서 (dispenser) 장치 내에 제공될 수 있다. 팩은 예를 들어 금속 또는 플라스틱 호일, 예를 들어 블리스터 (blister) 팩을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치에는 투여를 위한 지시서가 동봉될 수 있다.
- [0137] <실시예>
- [0138] 실시예 1: ALK1-Fc 융합 단백질의 발현
- [0139] 본 발명자들은 그들 사이에 최소 링커를 갖는 인간 Fc에 융합된 인간 ALK1 또는 무린 Fc 도메인에 융합된 마우스 ALK1의 세포외 도메인을 갖는 가용형 ALK1 융합 단백질을 제조하였다. 구성체를 각각 hALK1-Fc 및 mALK1-Fc로 칭한다.
- [0140] hALK1-Fc는 도 3에 CHO 세포주로부터 정제된 것으로서 제시된다 (서열 3). 특히, 인간 ALK1 단백질의 세포외 도메인의 통상적인 C-말단은 서열 1의 아미노산 118이지만, 본 발명자들은 도메인이 글루타민 잔기로 끝나는 것을 방지하는 것이 바람직하다고 결정하였다. 따라서, 인간 ALK1로부터 유래한 서열 3의 부분은 Q118에 대해 C-말단인 2개의 잔기, 즉 류신 및 알라닌을 포함한다. 따라서, 본원은 ALK1 유래 서열의 C-말단이 Q118의 1 내지 5개 아미노산 상류 (서열 1에 대해 113-117) 또는 하류 (119-123)의 임의의 부위인 ALK1 ECD 폴리펩티드 (Fc 융합 단백질 포함)를 제공한다.
- [0141] hALK1-Fc 및 mALK1-Fc 단백질을 CHO 세포주에서 발현시켰다. 3개의 상이한 리더 서열을 고려하였다:
- [0142] (i) 꿀벌 펠리틴 (HBML): MKFLVNVLFVMVYISYIYA (서열 7)
- [0143] (ii) 조직 플라스미노겐 활성화인자 (TPA): MDAMKRGKLVLLCGAVFVSP (서열 8)
- [0144] (iii) 천연: MTLGSPRKGLMLLMALVTQG (서열 9).
- [0145] 선택된 형태는 TPA 리더를 사용하고, 도 4에 제시된 비처리된 아미노산 서열을 갖는다 (서열 5).
- [0146] 상기 폴리펩티드는 도 4에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된다 (서열 4).
- [0147] 정제는, 예를 들어 다음 중 3개 이상을 임의의 순서로 포함하는 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계에 의해 달성할 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로스 크로마토그래피, 페닐세파로스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완료될 수 있다. hALK1-Fc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피로 측정시에 >98%, SDS PAGE로 측정시에 >95%의 순도로 정제되었다.
- [0148] 단백질 생성 및 정제의 과정에서, 본 발명자들은 hALK1-Fc가, 변성 및 환원 조건 (예를 들어, 환원 SDS-PAGE) 하에서는 순수한 것으로 보이지만 환자에게 투여시에는 문제가 되는 이량체 및 보다 고차 구조의 응집체의 혼합물로 발현되는 경향이 있다는 것을 발견하였다. 응집체는 면역원성이거나 또는 생체이용률이 불량할 수 있고, 이들 응집체는 그의 이종성으로 인해 약물 개발에 바람직한 수준으로 제약 체제를 특성화하는 것을 어렵게 한다. 따라서, 최종 제제 중에 응집체의 양을 감소시키는 다양한 접근법을 시험하였다.
- [0149] 한 접근법은, 다수의 다양한 세포 배양 배지를 시험하였다. IS CHO-CD (카탈로그 번호 91119, 어바인 사이언티픽 (Irvine Scientific, 미국 캘리포니아주 산타 아나 소재))는 응집 생성물의 생산에서 주목할 만한 감소를 보인 반면, hALK1-Fc의 높은 생산 수준은 유지하였다. 추가로, pH 8.0에서의 소수성 상호작용 컬럼 (예를 들어, 페닐세파로스)으로부터의 물질의 용리는 응집 생성물을 추가로 분리하였다. 생성된 물질은 99% 초과 이량체로 이루어져 있다. R&D 시스템즈사로부터 판매된 ALK1-Fc 융합 단백질 (카탈로그 번호 370-AL, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)과 비교하면, NSO 세포에서 생성된 상기 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의해 고분자량 종으로 나타난 나머지 단백질과 함께 84% 이량체인 것으로 나타난다. 제제에 대한 사이징 (sizing) 컬럼 프로파일의 비교를 도 11에 나타낸다. 응집체 형성은 ALK1-Fc 생산에서 상당한 문제인 것으로 입증되었는 바, 추가 정제 단계를 수반하는 접근법 (그러나, 이러한 접근법은 정제된 단백질의 수율을 낮출 수 있음)을 비롯한 다른 접근법이 개발될 수 있을 것으로 예상된다.
- [0150] 실시예 2: ALK1-Fc 리간드의 확인
- [0151] ALK1은 TGF β 패밀리의 멤버에 대한 타입 1 수용체이다. TGF β 패밀리의 다양한 멤버를 비아코어™ 시스템을 사용하여 인간 ALK1-Fc 융합 단백질에 대한 결합에 대해 시험하였다. TGF β 자체, GDF8, GDF11, BMP2 및 BMP4는 모두 hALK1-Fc 단백질에 대한 실질적인 결합을 보이지 않았다. BMP2 및 BMP4는 제한된 결합을 보여주었다.

GDF5, GDF7 및 BMP9는 각각 K_D 값이 약 5×10^{-8} M, 5×10^{-8} M 및 1×10^{-10} M인 결합을 보여주었다. GDF6에 대한 GDF5와 GDF7의 유사성에 기초하여, GDF6은 유사한 친화도로 결합할 것으로 예상된다. BMP10은 BMP9와 밀접하게 관련되고, 또한 유사한 친화도로 결합할 것으로 예상된다.

[0152] 실시예 3: 내피 세포에 대한 ALK1-Fc 및 항-ALK1 항체 효과의 특성화

[0153] Smad1/5/8-매개 신호전달에 반응성인 4개의 순차적 컨센서스 SBE 부위의 제어 하의 루시퍼라제 리포터 구성체 (SBE4-luc)를 사용하여, 본 발명자들은 HMVEC 세포에서 hALK1-Fc 약물 또는 중화성 ALK1 특이적 모노클로날 항체의 존재 및 부재 하에 BMP-9 매개 활성을 측정하였다. HMVEC 세포를 rhBMP-9 (50 ng/ml)로 자극하였고, 이는 본원에서 SBE4-luc 조정된 전사 상향조절의 증가에 의해 입증된, Smad1/5/8-매개 전사 활성화를 유도하였다. 첨가될 때, hALK1-Fc 화합물 (10 μ g/ml) 또는 항체 (10 μ g/ml)는 상기 전사 반응을 각각 거의 60% 감소시켰고, 이는 ALK1-Fc의 존재가 BMP9 신호전달을 유의하게 감소시키고, 또한 BMP9 신호전달이 ALK1 활성화에 관련되는 것을 나타낸다.

[0154] SMAD 인산화의 활성화는 상류 액티빈 수용체의 활성화를 분석하기 위해 일반적으로 사용된다. ALK1은 그의 리간드에 의한 활성화 시에 SMAD 단백질 1, 5 및 8의 인산화를 조정하는 것으로 알려져 있다. 여기서, 본 발명자들은 HUVEC 세포 (선천적으로 ALK1 수용체를 발현하는 인간 내피 세포주)에서 SMAD 인산화를 개선하기 위해 rhBMP-9 (50 ng/ml)를 30분에 걸쳐 첨가하였다. SMAD 1/5/8의 인산화는 세포를 리간드로 처리한 5분 후에 보였고, 인산화는 30분 기간 전체 동안 유지되었다. 비교적 낮은 농도의 hALK1-Fc (250 ng/ml)의 존재 하에, SMAD 1/5/8 인산화는 감소하였고, 이는 상기 작용제가 내피 세포에서 Smad 1/5/8 활성화를 억제함을 보여주는 것이다.

[0155] 시험관 내 시스템에서 ALK1-Fc의 혈관신생 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 매트리지겔 (Matrigel) 기질 상에서 내피 세포의 관 형성을 감소시키는데 있어서 화합물의 유효성을 분석하였다. 상기 기술은 혈관신생을 평가하기 위해 일반적으로 사용되고, 신속하고 고도로 재현가능한 결과를 제공한다. 내피 세포 성장 보충제 (ECGS)를 사용하여 매트리지겔 상에서 내피 세포로부터 미세혈관 형성을 유도하고, 이어서 항-혈관신생 화합물의 효능을 18시간에 걸쳐 약물 및 ECGS 모두의 존재 하에 코드 (cord) 형성의 감소로서 측정하였다. 예상되는 바와 같이, ECGS (200 ng/ml)의 첨가는 매트리지겔 기질 상에 생성된 기초 수준의 내피 세포 코드 형성을 나타내는 음성 대조군 (처리제를 첨가하지 않음)에 비해 유의한 코드 형성을 유도하였다 (도 5). hALK1-Fc (100 ng/ml) 또는 mALK1-Fc (100 ng/ml)의 첨가시에, 코드 형성은 뚜렷하게 감소하였다. 모든 샘플에서 혈관 길이의 최종 정량화로 모든 농도의 hALK1-fc 또는 mALK1-Fc가 혈관신생을 기초 수준으로 감소시켰음이 밝혀졌다. 추가로, hALK1-Fc 및 mALK1-Fc는 강한 혈관신생유발 인자 ECGS의 존재 하에 혈관신생의 강한 억제를 유지하였고, 이는 음성 대조군 엔도스타틴 (100 ng/ml)보다 훨씬 더 강력한 항-혈관신생 활성을 입증한다.

[0156] 실시예 4: CAM 분석

[0157] VEGF 및 FGF는 혈관신생을 자극하는 것으로 잘 알려져 있다. GDF7의 혈관신생 효과를 평가하기 위해 CAM (병아리 용모요막) 분석 시스템을 사용하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, GDF7은 VEGF와 유사한 효력으로 혈관신생을 자극한다. GDF5 및 GDF6에서도 유사한 결과가 관찰되었다.

[0158] ALK1-Fc 용합체를 CAM 분석으로 항-혈관신생 활성화에 대해 시험하였다. 이들 용합 단백질은 VEGF, FGF 및 GDF7에 의해 자극된 혈관신생에 대한 강력한 항-혈관신생 효과를 보였다 (도 7 참조). BMP9 및 PDGF는 상기 분석에서 상대적으로 불량한 혈관신생 유도 능력을 보였지만, 그럼에도 불구하고 이들 인자에 의한 상기 혈관신생 효과는 ALK1에 의해 억제되었다.

[0159] ALK1-Fc 단백질 및 상업적으로 이용가능한 항-혈관신생 항-VEGF 모노클로날 항체를 CAM 분석에서 비교하였다. ALK1-Fc 단백질은 항-VEGF에 비해 유사한 효력을 가졌다. 항-VEGF 항체인 베바시주맙은 현재 인간에서 암 및 황반 변성의 치료에 사용되고 있다 (도 8 참조).

[0160] 흥미롭게도, 항-ALK1 항체 (R&D 시스템즈)는 상기 분석 시스템에서 혈관신생을 유의하게 억제하지 못하였다. 본 발명자들은 이것이 상이한 종에서 ALK1 서열의 차이를 반영할 수 있는 것으로 예상된다.

[0161] 실시예 5: 마우스 각막 미세낭 분석

[0162] 마우스 눈에서 혈관신생에 대한 ALK1-Fc의 효과를 평가하기 위해 마우스 각막 미세낭 분석을 사용하였다. 복강내 투여된 hALK1-Fc는 눈 혈관신생을 유의하게 억제하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, hALK1-Fc는 눈 혈관신생을 항-VEGF와 동일한 정도로 억제하였다. hALK1-Fc 및 항-VEGF를 동일한 중량/중량 용량으로 사용하였다.

VEGF를 포화시킨 매트릭셀 플러그를 눈 이외의 위치에 이식했을 때 유사한 데이터를 얻었다.

- [0163] 이들 데이터는 ALK1에 대한 고친화도 리간드가 혈관신생을 촉진하고, ALK1-Fc 융합 단백질이 강력한 항-혈관신생 활성을 가짐을 입증한다. ALK1에 대한 리간드는 2개의 카테고리에 속하고, 여기서 GDF5, 6, 7 그룹은 ALK1에 대한 중간 친화도를 갖고, BMP9, 10 그룹은 ALK1에 대해 고 친화도를 갖는다.
- [0164] GDF5, 6 및 7은 주로 뼈 및 관절에 국재하는 한편, BMP9는 혈액 내에서 순환한다. 따라서, ALK1, GDF5, 6 및 7을 포함하는 뼈 및 관절의 혈관신생유발 시스템, 및 ALK1 및 BMP9 (및 가능하게는 BMP10)을 포함하는 전신 혈관신생 시스템이 있는 것으로 보인다.
- [0165] 실시예 6: 류마티스 관절염의 뮤린 모델
- [0166] 뮤린 콜라겐-유도 관절염 모델은 류마티스 관절염의 널리 허용된 모델이다. 본 연구에서, 10마리의 마우스의 군들을 비히클, 항-VEGF (베바시주맵 - 베바시주맵은 뮤린 VEGF를 억제하지 않으므로 음성 대조군으로서 사용됨), 또는 mALK1-Fc ("RAP-041")를 사용하여 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 25 mg/kg의 용량으로 처리하였다. 제21일에 콜라겐 부스트 (boost) 후, 관절염 스코어 (도 10 참조) 및 발 부기는 모든 군에서 꾸준히 증가하였고, 약 38일에 최고치에 도달하였다. mALK1-Fc ("RAP-041")로 처리된 마우스는 특히 최고 용량 (25 mg/kg)에서 2가지 특징 모두에 대해 감소된 스코어를 보였지만, 이러한 감소는 통계학적으로 유의하지 않았다. 그럼에도 불구하고, 용량-관련 경향은 명백하다.
- [0167] 제42일에 연구 종료시에, 관절염의 발생은 비히클 대조군 처리된 마우스에서 10/10, 베바시주맵 처리된 마우스에서 9/10, mALK1-Fc 1 mg/kg 처리군에서 8/10 및 mALK1-Fc 10 mg/kg 처리군에서 9/10에 달하였다. mALK1-Fc 25 mg/kg 처리군에서, 질환 발생은 6/10으로 더 낮았다.
- [0168] 실시예 7: DAN의 리간드 결합 특징
- [0169] DAN은 BMP 활성을 억제하는 분비형 시스테인 노트 단백질의 패밀리의 멤버이다. DAN은 GDF5와 결합하고 길항하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 또한 DAN이 GDF7과는 단단히 결합하지만, BMP9와는 그렇지 않은 것으로 결정하였다. 따라서, 본 발명자들은 DAN이 ALK1에 대한 일련의 뼈 및 관절 국재 리간드들을 억제하고, DAN이 뼈 및 관절 관련 혈관신생의 강력한 길항제인 것으로 예상되는 것으로 결론지었다. 따라서, DAN은 뼈의 암, 예를 들어, 다발성 골수종 및 뼈 전이, 및 또한 류마티스 관절염 및 골관절염을 치료하는데 유용할 수 있다.
- [0170] 함께 살펴보면, 이들 실시예에 개시된 발견은 생체 내에서 혈관신생, 및 특히 눈 혈관신생을 억제하기 위한, 본원에 설명된 수많은 시약을 제공한다. 이들 발견은 또한 GDF5, 6 및 7을 표적으로 한 작용제가 뼈 및 관절 혈관신생을 선택적으로 억제하기 위해 사용될 수 있음을 나타낸다. 이들 발견은 또한 상기 작용제가 암 및 류마티스 관절염을 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [0171] 실시예 8: CAM 분석에서 ALK1-Fc는 종양 혈관신생을 감소시킨다
- [0172] 임의의 조직과 마찬가지로 종양은 기초 영양소 및 산소 요구량을 갖는다. 작은 종양은 주변 혈관으로부터의 확산을 통해 충분한 양을 얻을 수 있지만, 종양이 커짐에 따라 이들은 존재하는 모세혈관을 동원하고 유지시켜 영양소를 확보해야 한다. ALK1-Fc 단백질의 혈관 억제를 통한 종양 성장 제한 능력을 시험하기 위해서, 본 발명자들은 흑색종 체외이식편 CAM 분석에서 다양한 농도의 mALK1-Fc를 시험하였다. 상기 기재된 CAM 분석에서와 같이, 각 계란의 표면에 작은 윈도우를 만들고, 이를 통해 5×10^5 B16 흑색종 세포를 이식하였다. 이어서, 계란을 1주일 동안 매일 0.02 mg/ml mALK1-Fc, 0.2 mg/ml mALK1-Fc로 처리하거나 또는 처리하지 않은 채로 방치하였다. 실험의 마지막에 종양을 조심스럽게 꺼내어, 칭량하고, 디지털 영상을 획득하였다. mALK1-Fc로 처리된 CAM으로부터 유래한 종양은 비처리된 CAM 종양에 비해 현저한 크기 감소를 나타내었다. 종양 무게의 정량화로, 매일 0.02 mg/ml 또는 0.2 mg/ml의 mALK1-Fc로 처리된 종양의 무게는 비처리된 CAM에 비해 65% 및 85%의 감소를 나타낸다는 것이 입증되었다 (도 6E). 결론으로서, 혈관신생 및 종양 성장은 ALK1-Fc의 첨가 후 용량-반응성 방식으로 유의하게 저해되었고, 이는 ALK1-Fc가 강력한 항-혈관신생제임을 나타낸다.
- [0173] 실시예 9: 폐암 실험 모델
- [0174] 종양 증식에 대한 ALK1-Fc의 효과를 추가로 확인하기 위해서, 폐암의 마우스 모델을 시험하였다. 형광 표지된 뮤린 루이스 폐암 세포 (LL/2-luc)를 알비노 흑색 마우스 6마리에 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 같은 날, 복강내 투여된 PBS 대조군 (n=7) 또는 10 mg/kg mALK1-Fc (n=7)로 마우스 처리를 시작하였다. 생전 형광 영상은 대조군 마우스에서 종양의 실질적인 발생이 폐에 편재화되어 있음을 나타내었고, 이식 22일 후에 마우스는 빈사

상태가 되어 희생시켜야 하였다. 대조적으로, ALK1-Fc 처리된 마우스는 폐 종양의 실질적으로 지연된 성장을 나타내었고, 22일 현재 100% 생존을 나타내었다. 도 12를 참조한다.

- [0175] 이들 데이터는, ALK1-Fc가 폐암의 마우스 모델에서의 종양 성장에 대해 유의한 영향을 미치고 생존 이점을 제공한다는 것을 입증한다.
- [0176] 실시예 10. 췌장 종양 모델에 대한 ALK1-Fc 단백질의 효과
- [0177] SV40 대형 T 항원은 마우스의 다양한 여러 조직에서 발견되어, 마우스 내 자발적인 동소 종양의 형성을 자극할 수 있는 종양 유전자이다. 이러한 종양은 통상 사용되는 이중이식편 모델보다 천연 발생 종양에 대해 보다 더욱 유사할 수 있다. RIP1-Tag2 마우스에서, 상기 마우스를 인슐린 프로모터의 제어 하에 T 항원을 발현하도록 유전자 변형시켜, 특히 췌장의 내분비 조직에서 종양을 발생시킨다. 본 발명자들은 RIP1-Tag2 종양에 대한 ALK1-Fc의 효과를 시험하였다.
- [0178] 본 발명자들은, RIP1-Tag2 마우스의 췌장 조직이 정상 조직에서 시작하여 과형성 양상으로 발전하고, 혈관신생을 거쳐 실질적인 신생(de novo) 혈관계를 발생시키고, 최종적으로 완전히 형성된 종양이 되는 일련의 단계를 거친다는 것을 발견하였다. ALK-1 및 BMP9 발현을 이러한 다양한 단계의 조직에서 모니터링하였다. 결과를 도 13에 나타낸다. ALK1의 발현은 종양 발생 중 혈관신생 단계 중에 최고치에 도달한 반면, BMP9 발현은 종양 발생 전반에 걸쳐 증가하였다.
- [0179] RIP1-Tag2 마우스를 10주령 (초기 종양 발생) 또는 12주령 (성숙 종양 발생)에서 시작하여 mALK1-Fc 또는 대조군 Fc (300 µg/마우스, 또는 대략 12 mg/kg, 2주 동안 주 2회)로 처리하였다. 어느 한 경우에서, mALK1-Fc로 처리는 종양 성장을 본질적으로 중지시켰다. 도 14를 참조한다. 10주령에서 처리된 마우스의 종양 부피는 10주에서 12주까지 증가하지 못한 반면, 대조군 Fc 단백질로 처리된 마우스는 동일한 기간 동안 종양 부피의 3 배 증가를 나타내었다. 유사하게, 12주령에서 처리된 마우스의 종양 부피는 12주에서 14주까지 증가하지 못한 반면, 대조군은 종양 부피의 추가 30% 증가를 나타내었다.
- [0180] 처리군 및 대조군 종양의 형광 염색은 내피 세포의 마커인 CD31에 대한 염색으로 측정시, mALK1-Fc 처리로 인한 혈관화의 감소를 나타내었다 (도 15). 현저하게, mALK1-Fc 처리는 CD31 양성 세포에 대한 NG2 양성 세포 (혈관 주위세포)의 비로 측정시 종양 맥관구조의 혈관주위세포 적용범위를 증가시켰다 (도 16). 혈관주위세포는, 혈관의 일부를 형성하고 혈관 안정성 및 삼투성을 조정하는 역할을 하는 세포이다. 혈관주위세포 적용범위의 유사한 증가는 CaLu6 비-소세포 폐암 세포주를 갖는 이중이식편 종양 모델의 ALK1-Fc 처리에 반응하여 관찰되었다.
- [0181] 일괄하여, 이들 데이터는, ALK1-Fc가 RIP1-Tag2 마우스에서 형성된 자발적인 동소 췌장 종양에서의 종양 성장의 강력한 억제제이며, 종양 억제는 종양 혈관화의 현저한 억제 및 종양 맥관구조의 혈관주위세포 적용범위의 현저한 증가와 서로 관련이 있다는 것을 나타낸다. 종양 생물학과 관련한 후자의 중요성은 측정해야 한다. 그러나, 당뇨 망막병증의 병리는 대부분 혈관주위세포의 손실 및 당뇨병성 망막의 혈관으로부터의 유체 누출에 대부분 기인한다는 것을 알아야 한다. 따라서, 이들 데이터는 ALK1-Fc가 항-종양제/항-혈관신생제로서 사용될 수 있고, 또한 이러한 작용제를 사용하여 혈관분포 조직에서 혈관주위세포의 형성을 촉진할 수 있다는 것을 입증한다.
- [0182] 실시예 11. 유방암 종양 모델에 대한 ALK1-Fc 융합 단백질의 효과
- [0183] mALK1-Fc는 에스트로젠 수용체 양성 (ER+) 및 에스트로젠 수용체 음성 종양 세포 (ER-) 모두로부터 유래된 유방암 종양 세포주의 성장을 지연시키는데 효과적이었다.
- [0184] MDA-MB-231 유방암 세포주 (ER- 세포로부터 유래됨)를 루시퍼라제 유전자로 안정하게 형질감염시켜 종양 성장 및 가능한 전이의 생체내 검출을 가능하게 하였다. 이 연구에서, 1×10^6 MDA-MB-231-Luc 세포를 흉선이 없는 누드 마우스 (할란 (Harlan))의 유방 지방 패드에 동소 이식하였다. 종양 진행 후, IVIS 스펙트럼 영상 시스템 (칼리퍼 라이프 사이언시즈 (Caliper Life Sciences))을 사용하여 생물 발광을 검출하였다. 발광 (검출된 광자 수)의 증가는 종양 부하의 증가에 상응한다.
- [0185] 30마리의 암컷 누드 마우스의 유방 지방 패드에 1×10^6 종양 세포를 주사하였다. 종양 이식 3일 후에 마우스를 주 2회 피하 (SC) 주사에 의해 비히클 대조군 또는 mALK1-Fc (30 mg/kg)로 처리하였다. 처리를 계속하였고, 종양 진행을 10주 동안 생물발광 영상으로 모니터링하였다. 30 mg/kg의 mALK1-Fc 처리는 생물발광 검출에 의해

측정시 비히클 처리된 대조군과 비교하여 종양 진행을 늦추었다 (도 17). mALK1-Fc를 사용한 처리는 종양 성장을 지연시켰지만, 이 모델에서 종양 성장을 역전시키지는 않았다. 이는, 종양을 연속 성장을 지지하는 신규한 혈관 형성을 요구하기 전의 일정 크기로 생존시킬 수 있는 항-혈관신생 화합물인 것으로 예상될 수 있다. 유사한 실험에서, hALK1-Fc는 3 mg/kg 적은 용량 수준에서 유사한 (약간 적은) 효과를 나타내었다.

[0186] 에스트로겐-수용체-양성 (ER+)의 루시퍼라제 발현 세포주인 MCF-7을 또한 동소 이식 모델에서 시험하였다. 상기 모델에서, 암컷 누드 마우스에 17β-에스트라디올의 60일 지연 방출 펠렛을 피하 이식하였다. 펠렛 이식 2일 후, 5 x 10⁶ MCF-7 종양 세포를 유방 지방 패드에 이식하였다. 마우스를 주 2회 IP 경로에 의해 3, 10 및 30 mg/kg의 hALK1-Fc, 또는 비히클 대조군으로 처리하였다. 종양 진행 후, IVIS-스펙트럼 영상기 (칼리퍼 라이프 사이언스즈)를 사용하여 주 단위로 생물 발광 영상을 얻었다. 비히클 처리된 마우스에서, 종양은 연구일 26일까지 빠르게 진행되었다 (도 18). 26일 후, 60일 (에스트라디올 펠렛이 고갈되는 시점)에 연구를 종결할 때까지 종양 발광의 변동이 있었다. 이러한 변동은, 빠른 종양 성장이 숙주 동물의 혈관신생 반응을 초과하여 종양 괴사를 유발하고 발광 신호의 감소를 수반할 수 있는 상기 모델의 공통 특징 때문이다. 나머지 세포는 성장을 지속하여 신호를 증가시킨다. 10 또는 30 mg/kg의 hALK1-Fc로 처리된 마우스는 비히클-처리된 대조군과 비교하여 연구 중에 일정한 수준으로 종양 크기를 유지시킬 수 있었고, 이는 종양 성장에 대한 상기 분자의 강력한 효과를 나타낸다.

[0187] 참조 포함

[0188] 본원에 인용된 모든 공개 및 특허는 각각의 개별 공개 또는 특허가 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 지시되는 것처럼 그 전문을 본원에 참조로 포함시킨다. 상충되는 경우, 본원에 제시된 임의의 정의를 포함한 본원이 우선할 것이다.

[0189] 동등물

[0190] 본 발명의 특정 실시태양을 본원에서 명백하게 개시하지만, 상기 명세서의 내용은 예시적인 것으로서, 제한적인 것이 아니다. 본 발명의 많은 변형은 본 명세서 및 아래의 청구의 범위를 살펴보면 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 완전한 범위는 그들의 동등물의 완전한 범위와 함께 청구의 범위 및 상기 변형과 함께 명세서를 참조로 결정되어야 한다.

도면

도면1

인간 액티빈 수용체-유사 키나제 1 (ALK-1)에 대한 아미노산 서열
(gi:3915750; 서열 1)

1 MTLGSPRKGL LMLLMALVTQ GDPVKPSRGP LVTCTCESPH CKGPTCRGAW CTVVLVREEG
61 RHPQEHRCG NLHRELCRGR PTEFVNHYCC DSHLCNHNVY LVLEATOPPS EOPGTDGOLA
121 LILGPVLALL ALVALGLGL WHVRRRQEKO RGLHSELGES SLILKASEQG DSMIGDLLDS
181 DCTTGSGSGL PELVQRTVAR QVALVECVGK GRYGEVWRGL WHGESVAVKLFSSRDEQSWF
241 RETEYNTVL LRHDNIGFLASDMTSRNS TQLWLITHYH EHGSLYDFLQ ROTLEPHLAL
301 RLAVSAACGL AHLHVEIEGT QGKPAIAHRD EKSARNVLVKS NLOCCADLG LAVMHSQGS
361 YLDIGNNPRV GTKRYMAPEV LDEQIRTDCE ESKWTDIWA FGLVLEIAR RTIVNGIVED
421 YRPPFYDVVP NDPSFEDMKK VVCVDQQTPT IPNRLAADPV LSGLAOMMRE CWYYPNSARL
481 TALRIKKTLO KISNSPEKPK VIQ

도면2

인간 액티빈 수용체-유사 키나제 1 (ALK-1)에 대한 핵산 서열
(서열 2)

```

1 atgaccttgg gctcccccaq gaaaggcctt ctgatgtgctg tgatggcctt ggtgacccaq
61 gaggaccctg tgaaccgctc tggggcccq ctggtgaect gacatgtga gaccacacat
121 tgcacggggc ctacctgcca gggggcctgg tgcacagtatg tctggtgca gaggagggqg
181 agccaccccc aggaacatca ggcctgcggg aacttgcaca gggagctctg caaggggcgc
241 cccaccgagt tgcacaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caactgtcc
301 ctggtgctgg aggccacca acctcctctg gacagcccg gaacagatgg ccagctggcc
361 ctgatcctgg gccctgtgct ggcttgtctg gccctgggg cctgggtgt cctgggctg
421 tggcatctcc gacggaggca ggaagaagca cgtggctgc acagcgagct gggagagctc
481 agtctcatcc tgaagaatc tgaagcaggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt
541 gactgcacca caggggagtg ctacgggctc ccttctctgg tgcagaggac agtggcacgg
601 cagggtgctt tggggagtg tgggggaaa gcccctatg gcaagtgtg gggggcctt
661 tggcagggg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggatgaaca gtccctgttc
721 cgggagactg agatctataa cacagtgtt ctgagacacg acaacatcct aggtctcatc
781 gctcagaca tgacctccc caactcgagc acgcagctgt ggtctatcac gcaactacc
841 gagcagggc cctctacga cttctgcag agacagacgc tggagcccca tctggctctg
901 agctagctg tgtcccgcc atgcccctg gcccactgc acgtggagat cttcggtaac
961 caggggcaac cagccattgc ccaccggac ttcaagagcc gcaatgtgct ggtcaagagc
1021 aactcgagc gttcctcgc gacacctggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgt
1081 tacctggaca tggcaacaa ccgagagtg ggcaccaagc ggtacatgac acccgaggtg
1141 ctggagcagc agatccgac gactgcttt gactcctaca agtggactga catctggccc
1201 tttggcctgg tctgtggga gattgcccgc cggaccatcg tgaatggcat cgtggaggac
1261 tatagaccac cctctatga tgtgtgccc aatgacccca gctttggaga catgaagaag
1321 tgggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggtggtgctg agaccggctc
1381 ctctcagccc tagctcagat gatcgggag tctgtgtacc caaacccctc tggccgactc
1441 accgctgctg ggatcaagaa gacactacaa aaaattagca acagtccaga gaagcctaaa
1501 gtgattcaat ag
    
```

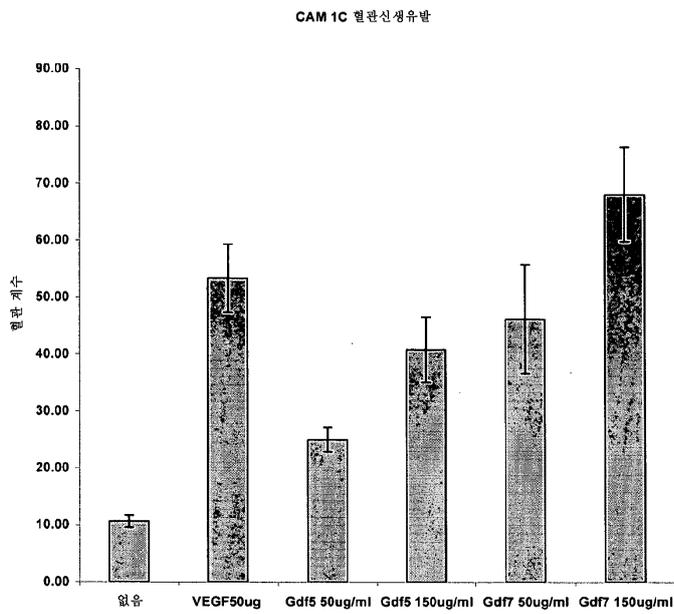
도면3

ALK1-Fc 융합 단백질 (서열 3)

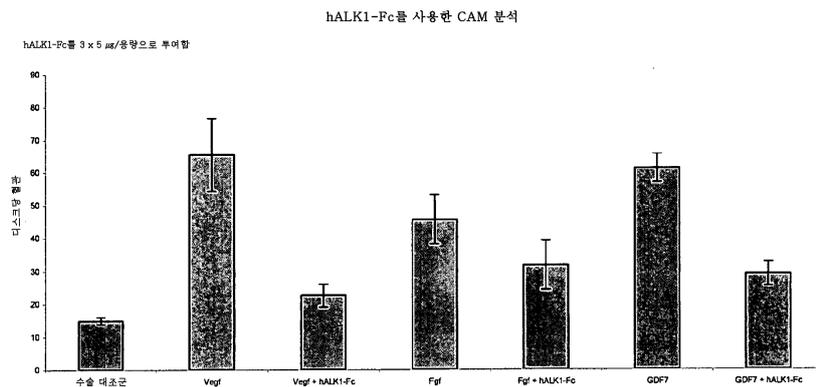
```

DPVKPSRGLVLTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHKRGCGNLH
RELRCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVSLEATQPPSEQPGTDGQLATGGGT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPVPPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK
    
```

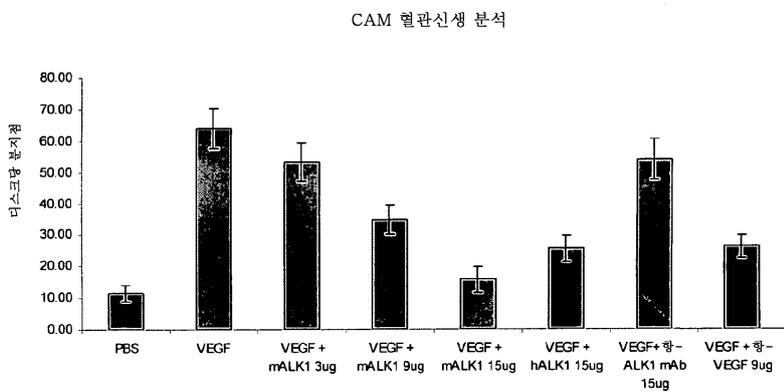

도면6



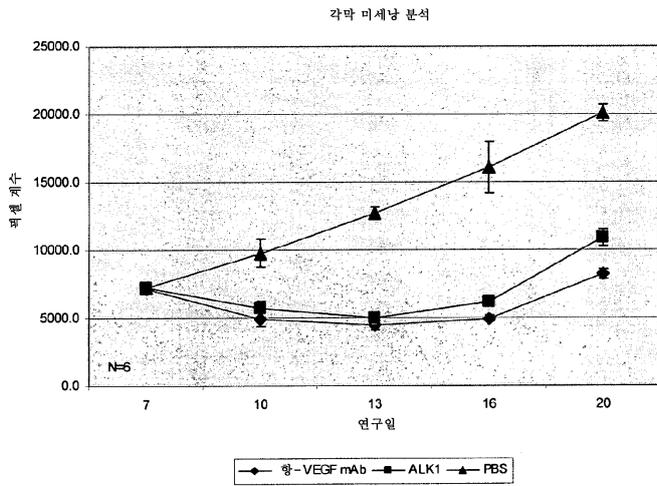
도면7



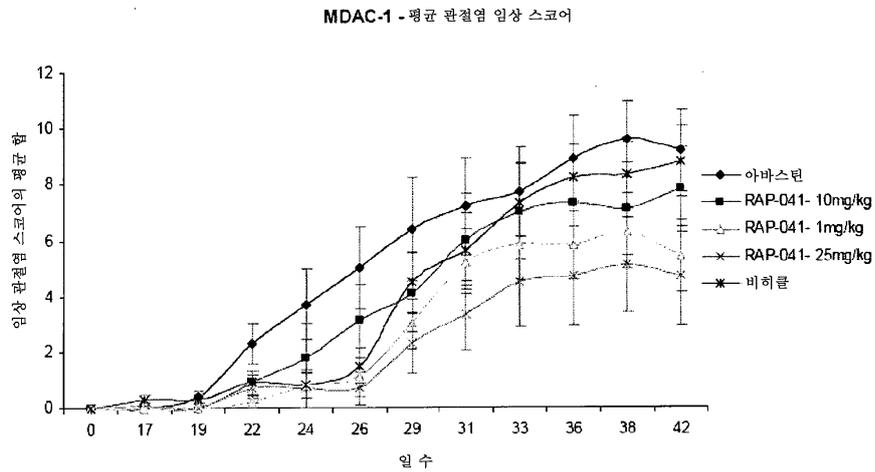
도면8



도면9

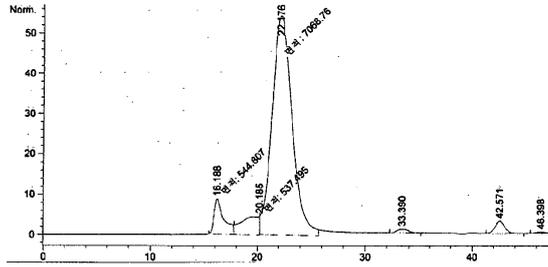


도면10

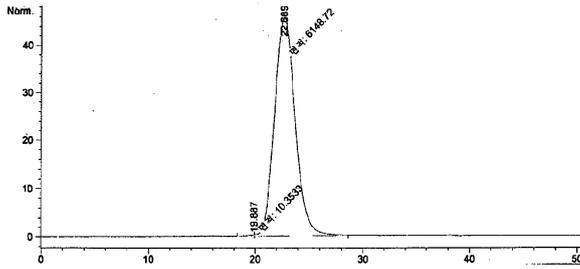


도면11

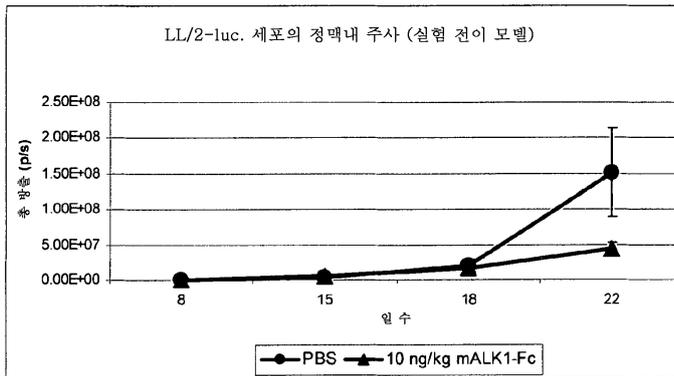
R&D 시스템으로부터의 ALK1-Fc 융합 단백질



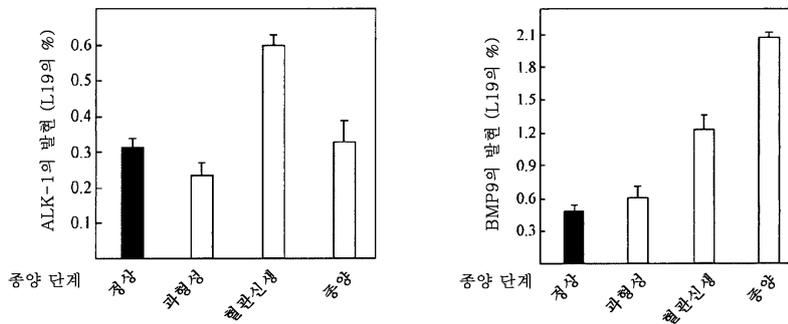
본 출원인에 의해 제조된 ALK1-Fc 융합 단백질



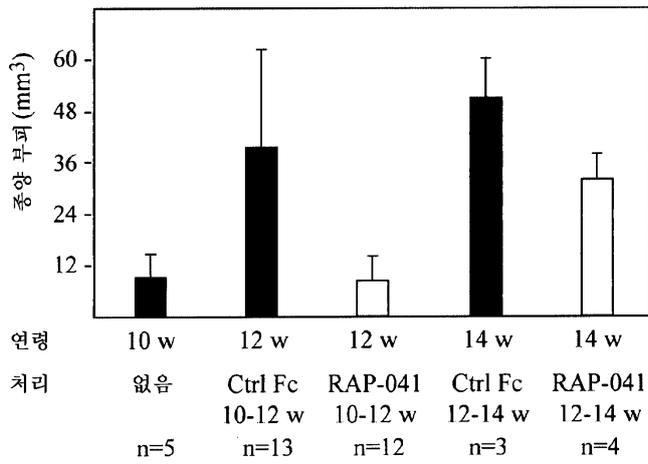
도면12



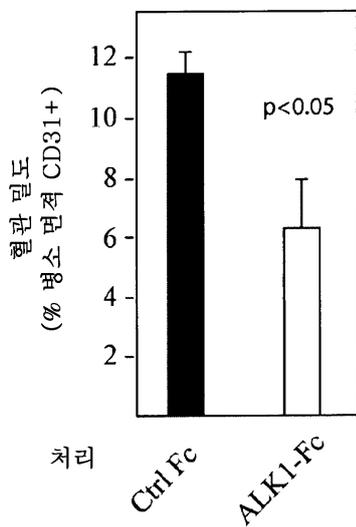
도면13



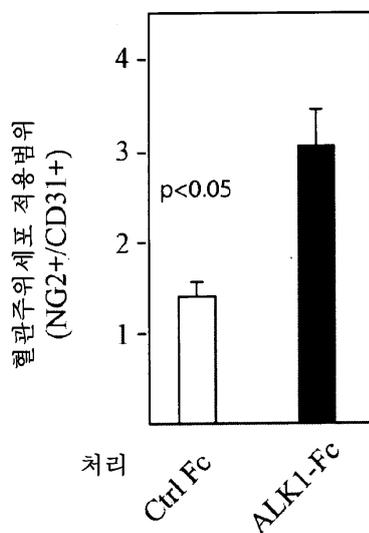
도면14



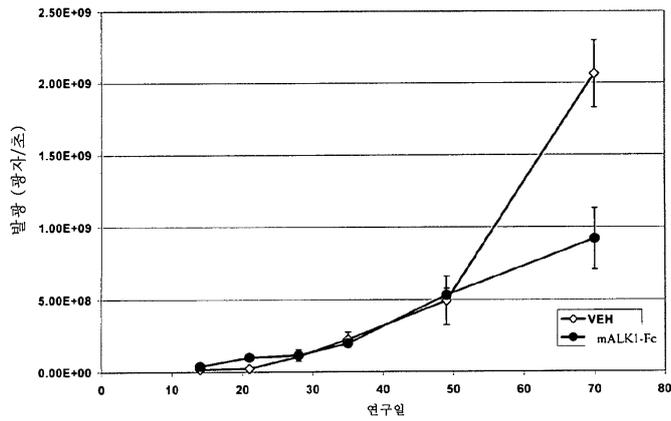
도면15



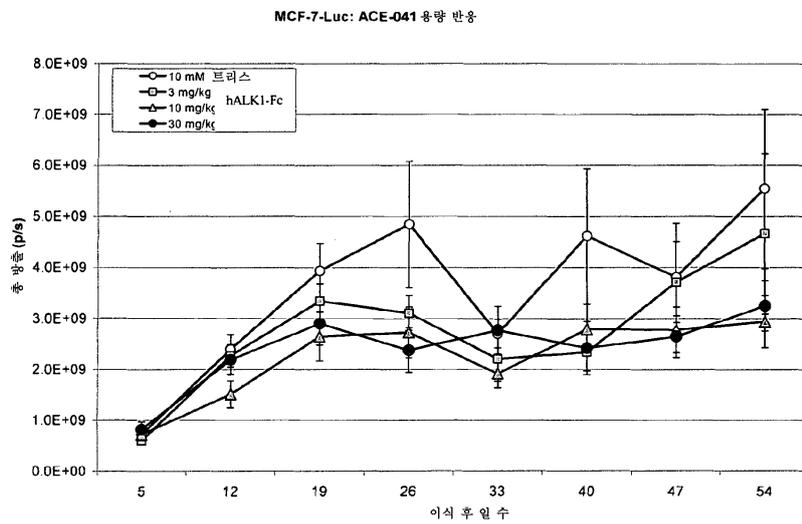
도면16



도면17



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA, INC.

LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD.

Grinberg, Asya

Knopf, John

Kumar, Ravindra

Pearsall, Robert S

Seehra, Jasbir

Pietras, Kristian

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR MODULATING ANGIOGENESIS AND PERICYTE

COMPOSITION

<130> A0904.70003
 <140> PCT/US2009/002699
 <141> 2009-05-01
 <150> US 61/050,168
 <151> 2008-05-02
 <150> US 61/144,131
 <151>
 > 2009-01-12
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 1

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

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

 Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala
 115 120 125
 Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Leu Gly Leu Trp His Val Arg
 130 135 140

Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser
 145 150 155 160

Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Ser Met Leu Gly Asp
 165 170 175

Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe
 180 185 190

Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val
 195 200 205

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu
 210 215 220

Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe
 225 230 235 240

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile
 245 250 255

Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln
 260 265 270

Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 275 280 285

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val
 290 295 300

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr
 305 310 315 320

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val
 325 330 335

Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 340 345 350

Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro
 355 360 365

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln
 370 375 380

Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala

385 390 395 400
Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly

 405 410 415
Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp
 420 425 430

Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr
 435 440 445

Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu
 450 455 460

Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu
465 470 475 480

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro
 485 490 495

Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln
 500

<210> 2

<211> 1512

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt ggtgaccag 60
ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct gcacgtgtga gagccacat 120
tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg tgcacagtag tgctggtcgc ggaggagggg 180
aggcaccccc aggaacatcg gggctcgggg aacttcaca gggagctctg cagggggcgc 240
cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300

ctggtgctgg aggccacca acctccttcg gacgagccgg gaacagatgg ccagctggcc 360
ctgatcctgg gccccgtgt ggccttctctg gccctggtgg ccctgggtgt cctgggcctg 420
tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag ctgggcctgc acagcgagct gggagagtcc 480
agtctcatcc taaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt 540
gactgcacca caggagatgg ctcagggtc cccttcctgg tgcagaggac agtggcacgg 600
caggttgctt tggtagagtg tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggccttg 660

tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggatgaaca gtcctggttc 720

cgggagactg agatctataa cacagtgttg ctcagacacg acaacatcct aggcttcate 780

gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagetgt ggctcatcac gcactaccac 840

gagcacggct ccctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagcccca tctggctctg 900

aggctagctg tgtccgcggc atgcggcctg ggcacactgc acgtggagat cttcggtaaa 960

cagggcaaac cagccattgc ccaccgagc ttcaagagcc gcaatgtgct ggtcaagagc 1020

aacctgcagt gttgcatcgc cgacctgggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat 1080

tacctggaca tcggcaacaa cccgagagtg ggcaccaagc ggtacatggc acccgaggtg 1140

ctggacgagc agatccgcac ggactgcttt gaggctcaca agtggactga catctgggcc 1200

tttggcctgg tgcctgtgga gattgccgc cggaccatcg tgaatggcat cgtggaggac 1260

tatagaccac ctttctatga tgtggtgccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag 1320

gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agaccggctc 1380

ctctcaggcc tagctcagat gatgcgggag tgcctgtacc caaacccctc tgcccgactc 1440

accgcgctgc ggatcaagaa gacctacaa aaaattagca acagtccaga gaagcctaaa 1500

gtgattcaat ag 1512

<210> 3

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant Protein

<400> 3

Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu
 1 5 10 15

Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val
 20 25 30

Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys
 35 40 45

Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val
 50 55 60

Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu
 65 70 75 80

Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly
 85 90 95

Gln Leu Ala Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 100 105 110

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 115 120 125

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 130 135 140

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 145 150 155 160

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 165 170 175

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 180 185 190

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 195 200 205

Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 210 215 220

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 225 230 235 240

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 245 250 255

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 260 265 270

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 275 280 285

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 290 295 300

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 4

<211> 1075

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant DNA

<400> 4

```

gctagcacca tggatgcaat gaagagaggg ctctgctgtg tgctgctgct gtgtggagca      60
gtcttcgttt cgcccggcgc cgacctgtg aagccgtctc ggggcccgct ggtgacctgc      120
acgtgtgaga gcccacattg caaggggcct acctgccggg gggcctggtg cacagtagtg      180
ctggtgcggg aggaggggag gcacccccag gaacatcggg gctgcgggaa ctgacacagg      240

gagctctgca ggggccgccc caccgagttc gtcaaccact actgctgca cagccacctc      300
tgcaaccaca acgtgtccct ggtgctggag gccaccaac ctcttcgga gcagccggga      360
acagatggcc agctggccac cggtggtgga actcacacat gcccacctg cccagcacct      420
gaagccctgg gggcaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg      480
atctcccga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agacctgag      540
gtcaagttea actggtactg ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg      600
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac      660

tggtgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc      720
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc      780
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc      840
tatcccagcg acatgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag      900
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc cccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg      960
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg     1020
cacaaccact acacgcagaa gagectctcc ctgtctccgg gtaaatgagg aattc      1075
    
```

<210> 5

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant Protein

<400> 5

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

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

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

 115 120 125
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 145 150 155 160
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 165 170 175
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

 180 185 190
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 195 200 205
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 210 215 220
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr
 225 230 235 240
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

 245 250 255

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

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

<210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> residue may optionally be mutated to alanine
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(100)
 <223> residue may optionally be mutated to alanine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (212)..(212)
 <223> residue may optionally be mutated to alanine
 <400> 6

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

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
 100 105 110
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175
 Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220
 Lys
 225
 <210> 7
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Recombinant Leader Peptide
 <400> 7
 Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala

20

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant Leader Peptide

<400> 8

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

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro

20

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant Leader Peptide

<400> 9

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala

1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly

20

<210> 10

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 10

Met Leu Arg Val Leu Val Gly Ala Val Leu Pro Ala Met Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Pro Pro Pro Ile Asn Lys Leu Ala Leu Phe Pro Asp Lys Ser Ala

20 25 30

Trp Cys Glu Ala Lys Asn Ile Thr Gln Ile Val Gly His Ser Gly Cys

35 40 45

Glu Ala Lys Ser Ile Gln Asn Arg Ala Cys Leu Gly Gln Cys Phe Ser
 50 55 60

Tyr Ser Val Pro Asn Thr Phe Pro Gln Ser Thr Glu Ser Leu Val His
 65 70 75 80

Cys Asp Ser Cys Met Pro Ala Gln Ser Met Trp Glu Ile Val Thr Leu
 85 90 95

Glu Cys Pro Gly His Glu Glu Val Pro Arg Val Asp Lys Leu Val Glu
 100 105 110

Lys Ile Leu His Cys Ser Cys Gln Ala Cys Gly Lys Glu Pro Ser His
 115 120 125

Glu Gly Leu Ser Val Tyr Val Gln Gly Glu Asp Gly Pro Gly Ser Gln
 130 135 140

Pro Gly Thr His Pro His Pro His Pro His Pro His Pro Gly Gly Gln
 145 150 155 160

Thr Pro Glu Pro Glu Asp Pro Pro Gly Ala Pro His Thr Glu Glu Glu
 165 170 175

Gly Ala Glu Asp
 180

<210> 11

<211> 2003

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 11

gccgagcctc ctggggcgcc cgggcccgcg acccccgcac ccagctccgc aggaccggcg 60

ggcgcgcgcg ggcctctggag gccacgggca tgatgcttcg ggtcctggtg ggggctgtcc 120

tccttgccat gctactggct gccccaccac ccatcaacaa gctggcactg ttcccagata 180

agagtgcctg gtgcgaagcc aagaacatca cccagatcgt gggccacagc ggctgtgagg 240

ccaagtccat ccagaacagg gcgtgcctag gacagtgctt cagctacagc gtccccaaca 300

ccttcccaca gtccacagag tccttggttc actgtgactc ctgcatgcca gcccagtcca 360

tgtgggatgat tgtgacgctg gagtgcccg gccacgagga ggtgcccagg gtggacaagc 420

tggtggagaa gatcctgcac tgtagctgcc aggccctgcgg caaggagcct agtcacgagg 480

ggctgagcgt ctatgtgcag ggcgaggacg ggccgggatc ccagcccggc acccacctc 540

 acccccatcc ccaccccat cctggcgggc agaccctga gcccgaggac cccctgggg 600
 cccccacac agaggaagag ggggctgagg actgaggccc cccaactct tectecctc 660
 tcatcccct gtggaatgtt gggctcact cctggggaa gtcaggggag aagctgaagc 720
 cccctttgg cactggatgg acttgcttc agactcggac ttgaatgctg cccggttgc 780
 atggagatct gaagggcgg ggttagagcc aagctgcaca atttaataa ttcaagagtg 840
 gggggaggaa gcagaggtct tcagggtct tttttgggg ggggggtgt ctcttctgt 900
 ctggcttcta gagatgtgcc tgtgggaggg ggaggaagt ggctgagcca ttgagtctg 960

 ggggaggcca tccaagatgg catgaatcgg gctaaggtcc ctgggggtgc agatgtact 1020
 gctgaggtc cgggcttagt gtgagcatct tgccagctc agccttgagg gagggctggg 1080
 ctagaaagac cactggcaga aacaggaggc tccggccca caggtttccc caaggctct 1140
 caccacctt ccatctcca gggaagcgt gccccagtgg cactgaagt gcctcctc 1200
 agcggagggg tttgggagtc aggcctgggc aggacctgc tgactcgtgg cgcgggagct 1260
 gggagccagg ctctccggc ctttctctgg ctctcttggc ttgcctggtg ggggaagggg 1320
 aggaggggaa gaaggaaagg gaagagtctt ccaaggccag aaggaggggg acaaccccc 1380

 aagaccatcc ctgaagacga gcatccccct cctctcctg ttagaatgt tagtgccccg 1440
 cactgtgcc caagttctag gcccccaaga aagctgtcag agccggccgc cttctccct 1500
 ctcccagga tgctctttg aaatatcgga tgggtgtggg agtgaggggt tacctcctc 1560
 gcccaaggt tcagaggcc ctagcggga tgggctcgt gaacctcag gaactccagg 1620
 acgaggagga catgggactt gcgtggacag tcagggttca cttgggctct ctctagctcc 1680
 ccaattctgc ctgctcctc cctcccagct gcactttaa cctagaaggt ggggacctg 1740
 ggggagggac agggcaggcg ggccatgaa gaaagccct cgttgcccag cactgtctgc 1800

 gtctgtctt ctgtgccag ggtgctgcc agcccactgc ctctgcctg ggtgacctg 1860
 gccctctgg ctgttcgac gcgggcttct ggagcttgc accattggac agtctcctg 1920
 atggacctc agicttctca tgaataaatt cttcaacgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa 2003