



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0105124
(43) 공개일자 2017년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
C12N 15/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 38/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7025044(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년11월24일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7007651
원출원일자(국제) 2009년11월24일
심사청구일자 2017년03월20일
(85) 번역문제출일자 2017년09월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/006252
(87) 국제공개번호 WO 2010/062383
국제공개일자 2010년06월03일
(30) 우선권주장
61/200,250 2008년11월26일 미국(US)
61/259,060 2009년11월06일 미국(US)

(71) 출원인
암젠 인크
미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원
암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
선, 정훈
미국 91320 캘리포니아주 사우전드 오크스 카미노
데 라 로사 4340
탐, 레이-팅 토니
미국 91362 캘리포니아주 사우전드 오크스 인디언
릿지 서클 3427
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

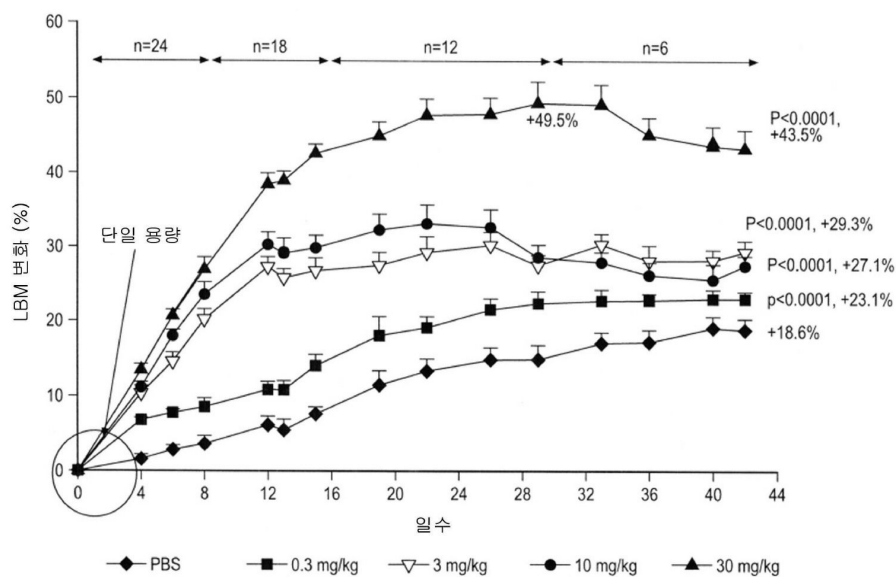
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 액티빈 I I B 수용체 폴리펩타이드의 변이체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 액티빈 A, 마이오스타틴, 또는 GDF-11에 결합하여 그 활성을 억제할 수 있는 안정된 액티빈 IIB 수용체 폴리펩타이드 및 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한, 안정된 폴리펩타이드 및 단백질을 생산할 수 있는 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 숙주세포를 제공한다. 근육쇠약 질환 및 대사성 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 또한 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 38/17 (2013.01)

A61K 38/177 (2013.01)

C07K 14/71 (2013.01)

C12N 15/00 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

마이클, 마크, 레오

미국 91316 캘리포니아주 엔시노 텍스호마 애비뉴
5007

분, 토마스, 씨.

미국 91320 캘리포니아주 뉴버리 파크 켈리 놀 레
인 2715

데쉬판드, 로히니

미국 93012 캘리포니아주 카마릴로 벨라폰테 코트
251

리, 위-셴

미국 91360 캘리포니아주 사우전드 오크스 웨도우
힐 서클 3025

한, 에이취큐

미국 91362 캘리포니아주 사우전드 오크스 크로스
랜드 스트리트 3353

명세서

청구범위

청구항 1

안정된 액티빈 IIB 수용체 폴리펩타이드를 포함하며, 상기 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단리된 단백질:

- (a) SEQ ID NO: 4, 6, 12 및 14로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드;
- (b) (a)에 대한 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음, 및
- (c) (a)에 대한 적어도 95 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 적어도 하나의 이중 단백질에 결합되는 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이중 폴리펩타이드는 IgG Fc 도메인인 단백질.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 이중 폴리펩타이드는 링커 서열에 의해 폴리펩타이드에 결합되는 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 링커는 SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 및 SEQ ID NO: 50으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단백질.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 단백질은 하기 폴리펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 폴리펩타이드를 포함하는 단백질:

- (a) SEQ ID NO: 8, 10, 16 및 18로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드;
- (b) (a)에 대한 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음, 및
- (c) (a)에 대한 적어도 95 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음.

청구항 7

제1항에 있어서, 위치 64에서의 아미노산 잔기는 알라닌인 단백질.

청구항 8

안정된 액티빈 IIB 수용체 폴리펩타이드 (svActRIIB)를 포함하며, 상기 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단리된 단백질:

(a) SEQ ID NO: 2에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고;

(b) SEQ ID NO: 2의 아미노산 19 내지 134에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고;

(c) SEQ ID NO: 2의 아미노산 23 내지 134에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고;

(d) SEQ ID NO: 2의 아미노산 25 내지 134에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고;

(e) (a) 내지 (d) 중 어느 하나에 대해 적어도 80 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음.

청구항 9

제8항의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 10

하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산 분자:

(a) SEQ ID NO: 4, 6, 12, 및 14로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

(b) (a)에 대한 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며; 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음; 및

(c) (a)에 대한 적어도 95 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 3, 5, 11 및 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열 또는 그의 보체를 갖는 핵산 분자.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 이중 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는 핵산 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자:

(a) SEQ ID NO: 8, 10, 16, 및 18로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

(b) (a)에 대한 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음; 및

(c) (a)에 대한 적어도 95 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있음.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 7, 9, 15 및 17로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열, 또는 그의 보체를 갖는 핵산 분자.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 전사 또는 해독 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 핵산 분자.

청구항 16

제10항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 17

제16항의 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 숙주세포는 포유동물 세포인 숙주세포.

청구항 19

단백질의 발현을 촉진하는 조건 하에서 제17항의 숙주세포를 배양하는 단계, 및 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 svActRIIB 단백질의 생산 방법.

청구항 20

유효량의 제1항의 단백질을 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 21

치료적 유효량의 제20항의 조성물을 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 마이오스타틴 활성 또는 액티빈 활성을 억제하는 방법.

청구항 22

치료적 유효량의 제20항의 조성물을 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 순수 근육량을 증가시키거나 순수근육량 대 지방량의 비를 증가시키는 방법.

청구항 23

치료적 유효량의 제20항의 조성물을 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 근육쇠약 질환 또는 대사성 장애를 치료하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 근육쇠약 질환은 근위축(muscular dystrophy), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 울혈성 폐쇄성 폐질환(congestive obstructive pulmonary disease), 만성 심부전, 암 악액질(cancer cachexia), AIDS, 신부전, 요독증(uremia), 류마티스 관절염, 노화관련 근육감소증(age-related sarcopenia), 기관 위축(organ atrophy), 수근관 증후군(carpal tunnel syndrome), 안드로겐 차단(androgen deprivation), 화상 상처, 당뇨병, 및 장기적인 입원, 척수 손상, 뇌졸중, 뼈 골절, 노화 또는 미세중력에의 노출에 기인한 근육쇠약으로부터 선택되는 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 대사성 장애는 당뇨병, 비만, 고혈당증, 및 뼈 손실로부터 선택되는 방법.

청구항 26

치료적 유효량의 제20항의 조성물을 치료가 필요한 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 액티빈이 과발현되는 질환의 치료 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 질환은 암인 방법.

청구항 28

제16항의 벡터를 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하고 상기 벡터는 상기 대상체에서 svActRIIB 폴리펩타이드의 발현을 이끌 수 있는, 상기 대상체에서 근육쇠약 또는 대사성 또는 액티빈 관련 장애의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 참조
- [0002] 본원은 2008년 11월 26일에 출원된 미국 가출원 제61/200,250호 및 2009년 11월 6일에 출원된 미국 가출원 제61/259,060호의 이익을 주장하며, 이들의 전체 내용은 본원에 참조로써 통합되어 있다.
- [0003] 본 발명의 기술분야는 개선된 특성을 갖는 전환성장인자- β (TGF- β) 패밀리 구성원 및 가용성 TGF- β 수용체뿐만 아니라 다양한 장애의 치료를 위한 TGF- β 패밀리 구성원의 활성을 조절하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 전환성장인자- β (TGF- β) 패밀리 단백질은 전환성장인자- β (TGF- β), 액티빈(activin), 골형성단백질(BMP), 신경 성장인자(NGF), 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF), 및 성장/분화 인자(GDF)를 포함한다. 이들 패밀리 구성원은 세포 증식, 분화, 및 기타 기능을 포함하는 다양한 생물학적 과정의 조절에 관여한다.
- [0005] 마이오스타틴(myostatin)으로도 불리는 성장/분화 인자 8(GDF-8)은 보통 성장하는 세포 및 성인 골격근 조직에서 발현되는 TGF- β 패밀리 구성원이다. 마이오스타틴은 골격근 성장을 음성적으로 조절하는 중요한 역할을 하는 것으로 보인다(McPherron et al., Nature (London) 387, 83-90 (1997), Zimmers et al., Science 296:1486-1488 (2002)). 마이오스타틴을 상쇄시키는 것이 동물의 순수근육량을 증가시키는 것으로 나타났다.
- [0006] TGF- β 패밀리 단백질의 또 다른 구성원은 관련된 성장/분화 인자인 성장/분화 인자 11(GDF-11)이다. GDF-11은 마이오스타틴 아미노산 서열에 대해 약 90% 서열 동질성을 갖는다. GDF-11은 성장하는 동물에서 축 패턴화(axial patterning)에 역할을 하며(Oh et al., Genes Dev 11:1812-26 (1997)), 또한 골격근 발달 및 성장에서 역할을 하는 것으로 보인다.
- [0007] 액티빈 A, B 및 AB는 두 가지 폴리펩타이드 사슬인 β A와 β B의 각각 동종이합체 및 이종이합체이다(Vale et al., Nature 321, 776-779 (1986), Ling et al., Nature 321, 779-782 (1986)). 액티빈은 본래 난포 자극 호르몬 합성의 조절에 관여하는 생식선 펩타이드로 발견되었고, 현재 많은 생물학적 활성의 조절에 관여하는 것으로 여겨진다. 액티빈 A는 주된 형태의 액티빈이다.
- [0008] 액티빈, 마이오스타틴, GDF-11 및 TGF- β 슈퍼패밀리의 다른 구성원은 액티빈 타입 II 및 액티빈 타입 IIB 수용체의 조합을 통해 결합하고 신호를 전달하며, 이들 모두는 막관통 세린/트레오닌 키나아제이다(Harrison et al., J. Biol. Chem. 279, 28036-28044 (2004)). 가교 연구는 마이오스타틴이 시험관내에서 액티빈 타입 II 수용체 ActRIIA 및 ActRIIB와 결합할 수 있음을 밝혀내었다(Lee et al., PNAS USA 98:9306-11 (2001)). 또한, GDF-11이 ActRIIA 및 ActRIIB 모두에 결합한다는 증거도 있다(Oh et al., Genes Dev 16:2749-54 (2002)).
- [0009] TGF- β 단백질 발현은 여러 가지 질환 및 장애와 연관된 것으로 알려져 있다. 그러므로, 몇 가지 TGF- β 단백질을 동시에 상쇄시킬 수 있는 치료 분자가 이러한 질환 및 장애를 치료하는데 특히 효과적인 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 상업적 규모로 치료 단백질을 생산하기 위해서는 단백질의 온전성(integrity)의 손상없이 효율적으로 발현되고 정제될 수 있는 단백질을 필요로 한다. 제조용이성(Manufacturability)은 비용상 효율적으로 단백질을 생산할 수 있게 하는 충분히 효율적인 방식으로 단백질을 발현 및 정제하는 능력으로 설명될 수 있다. 상업적인 환경에서, 각각의 잠재적인 치료 단백질에 대해 제조용이성이 결정되어야 한다. 단백질에 대해 단백질 발현 및 정제 과정은 최적화될 수 있지만, 제조용이성은 단백질의 고유의 특성의 기능인 것으로 보인다. 본 발명은 TGF- β 단백질을 효과적으로 상쇄시킬 수 있는, 개선된 제조용이성 특성을 갖는 생물학적 활성 치료 단백질을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 발명의 요약
- [0012] 본 발명은 액티빈, GDF-11 및 마이오스타틴에 결합할 수 있고, 그의 활성을 억제할 수 있고, 개선된 제조용이성 특성을 특징으로 하는 안정된 인간 액티빈 수용체 IIB (svActRIIB로 지칭됨) 폴리펩타이드를 포함하는 단리된 단백질을 제공한다. 안정된 ActRIIB 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2에 대해 위치 28 및 44 모두에서 아미노산 치환을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 하나의 구체예에서, 단리된 단백질은 SEQ ID NO: 2에 나타난 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 19 내지 134에 나타나 있는 서열을 가지며, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 23 내지 134에 나타나 있는 서열을 가지며, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 25 내지 134에 나타나 있는 서열을 가지며, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩타이드는 상기 임의의 폴리펩타이드에 대해 적어도 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % 또는 99 % 동일성으로 아미노산 서열을 가지며, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환을 가지며, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 위치 28에서의 상기 폴리펩타이드의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.
- [0014] 또 다른 구체예에서, 단리된 단백질은 안정된 액티빈 IIB 수용체 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4, 6, 12 및 14로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 4, 6, 12 또는 14에 대해 적어도 80 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 4, 6, 12 또는 14에 대해 적어도 90 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 4, 6, 12 또는 14에 대해 적어도 95 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.
- [0015] 추가 구체예에서, svActRIIB 단백질은 이중 단백질을 추가로 포함한다. 하나의 구체예에서, 이중 단백질은 Fc 도메인이다. 추가 구체예에서, Fc 도메인은 인간 IgG Fc 도메인이다. 추가 구체예에서, 이중 단백질은 링커 또는 힌지 링커 펩타이드에 의해 부착된다. 하나의 구체예에서, 링커 또는 힌지 링커는 SEQ ID NO: 25, 27, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 49 및 50으로 이루어진 그룹에 나타나 있는 아미노산 서열로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가 구체예에서, SEQ ID NO: 27, 38, 40, 42, 44, 45, 또는 46에 나타나 있는 힌지 링커는 인간 IgG2 Fc (SEQ ID NO: 22)를 svActRIIB 폴리펩타이드에 결합시킨다. 또 다른 구체예에서, SEQ ID NO: 48, 49,

또는 50에 나타나 있는 힌지 링커는 인간 IgG1 Fc (SEQ ID NO: 23) 또는 변형된 IgG1 Fc (SEQ ID NO: 47)를 svActRIIB 폴리펩타이드에 결합시킨다.

[0016] 추가 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 8, 10, 16 및 18로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 8, 10, 16 또는 18에 대해 적어도 80 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 8, 10, 16 또는 18에 대해 적어도 90 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 8, 10, 16 또는 18에 대해 적어도 95 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 위치 28에서의 상기 폴리펩타이드의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0017] 추가 구체예에서, 단백질은 상기 인용된 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 위치 64에서의 아미노산 잔기는 알라닌이다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 안정된 ActRIIB 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 하나의 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 2에 나타나 있는 폴리펩타이드 서열을 인코딩하고, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 19 내지 134에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 23 내지 134에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 25 내지 134에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩타이드의 어느 하나에 대해 적어도 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % 또는 99 % 동일성으로 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환을 가지며, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0019] 하나의 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 4, 6, 12 및 14로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 4, 6, 12 또는 14에 대해 적어도 80 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 4, 6, 12 또는 14에 대해 적어도 90 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 4, 6, 12 또는 14에 대해 적어도 95 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0020] 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 3, 5, 11 및 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖는

폴리뉴클레오티드, 또는 그의 보체를 포함한다.

- [0021] 또 다른 구체예에서, 단리된 핵산 분자는 상기에 나타나 있는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 하나의 이중 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 하나의 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 8, 10, 16 및 18로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 8, 10, 16 또는 18에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 8, 10, 16 또는 18에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 8, 10, 16 또는 18에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 S44에서의 치환은 T이고, 여기서, 상기 인코딩된 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 추가 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 7, 9, 15 및 17로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 또는 그의 보체를 포함한다.
- [0022] 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 25, 27, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 49 및 50으로 이루어진 그룹에 나타나 있는 힌지 링커 및 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0023] 추가 구체예에서, 핵산 분자는 전사 또는 해독 조절 서열을 추가로 포함한다. 또 다른 측면에서, 안정된 ActRIIB 단백질 또는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 또 다른 측면에서, 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하고, 안정된 ActRIIB 단백질 및 폴리펩타이드를 생산하는 방법을, 단백질 또는 폴리펩타이드의 발현을 촉진하는 조건 하에서 숙주세포를 배양하여 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또한 본 발명의 적어도 하나의 안정된 ActRIIB 폴리펩타이드 또는 단백질을 함유하는 조성물을 제공한다. 하나의 구체예에서, 상기 조성물은 안정된 ActRIIB 폴리펩타이드 또는 단백질을 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 함유하는 약제학적 조성물이다.
- [0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 svActRIIB 단백질 및 폴리펩타이드, 또는 이들을 함유하는 약제학적 조성물을 그와 같은 치료가 필요한 대상체에 투여하여, 마이오스타틴, 액티빈 A 또는 GDF-11 활성을 감소 또는 차단하는 방법을 제공한다.
- [0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 svActRIIB 단백질 또는 폴리펩타이드를 함유하는 유효량의 조성물 또는 약제학적 조성물을 대상체에 투여하여, 치료가 필요한 대상체에서 순수근육량을 증가시키거나 순수근육량 대 지방량의 비를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 svActRIIB 폴리펩타이드 또는 단백질을 함유하는 치료 조성물을 대상에게 투여함으로써, 장애를 겪고 있는 대상에서 근육 쇠약 질환(muscle wasting disease)을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 근육 쇠약 질환은 하기 상태: 암성 악액질(cancer cachexia), 근위축(muscular dystrophy), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 울혈성 폐쇄성 폐질환(congestive obstructive pulmonary disease), 만성 심부전, 화학적 악액질(chemical cachexia), HIV/AIDS로 인한 악액질, 신부전, 요독증(uremia), 류마티스 관절염, 노화관련 근육감소증(age-related sarcopenia), 노화관련 노쇠(age-related frailty), 기관 위축(organ atrophy), 수근관 증후군(carpal tunnel syndrome), 안드로겐 차단(androgen deprivation), 및 장기적인 입원, 척수 손상, 뇌졸중, 뼈 골절, 화상, 노화, 인슐린 저항성, 및 기타 장애로 인한 근육 쇠약을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 근육 쇠약은 또한 우주 비행으로 인한 무중력 상태에서부터 기인할 수 있다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 svActRIIB 단백질 또는 폴리펩타이드를 함유하는 유효량의 치료 조성물을 대상에게 투여함으로써, 이러한 치료를 필요로 하는 대상에서 액티빈이 과발현되는 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 구체예에서, 상기 질환은 암이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 svActRIIB 단백질 또는 폴리펩타이드를 함유하는 치료 조성물을 이러한 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 대사 장애의 치료 방법을 제공하며, 여기에서 상기 대사 장애는 골손실, 당뇨병, 비만, 내당능장애(impaired glucose tolerance), 과혈당

증, 및 대사 증후군으로부터 선택된다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 svActRIIB 폴리펩타이드 또는 단백질을 인코딩하는 벡터를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 근육 쇠약, 또는 대사 장애 또는 액티빈-관련 장애를 치료하기 위한 유전자 치료 방법을 제공하며, 여기에서 상기 벡터는 대상에서 svActRIIB 단백질 또는 폴리펩타이드를 발현할 수 있다.

[0029] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 svActRIIB 단백질 또는 폴리펩타이드 중 어느 하나를 여러 가지 검정에서 포획제(capture agent) 또는 결합제로 사용함으로써 마이오스타틴, 액티빈, 또는 GDF-11을 검출하고 정량화하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 SEC 컬럼 상에서 ActRIIB-Fc(E28W) 및 svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 간의 비교를 나타낸다. 3개의 피크를 나타내는 ActRIIB-Fc(E28W)에 비교하여, svActRIIB-Fc(E28W, S44T)는 1개의 피크를 나타낸다.

도 2는 10 mg/kg의 PBS를 투여한 10마리의 마우스에 비교하여, 단일 용량의 10 mg/kg svActRIIB-Fc(E28W, S44T)를 투여한 10마리의 C57Bl/6 마우스에서 14일 기간 동안의 체질량의 증가를 나타낸다.

도 3은 단일 용량의 0.3 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg, 및 30 mg/kg의 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)를 투여한 C57Bl/6에 대하여 시간에 따른 체지방량(lean body mass)의 용량-관련 변화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 발명의 상세한 설명

[0032] 본 발명은 안정화된 인간 액티빈 IIB 수용체(svActRIIB) 폴리펩타이드를 포함하는 단리된 단백질을 제공한다. 본 발명의 단백질 및 폴리펩타이드는 세 가지 TGF- β 단백질, 마이오스타틴(GDF-8), 액티빈 A, 또는 GDF-11 중 적어도 하나에 결합하고, 이들 단백질 중 적어도 하나의 활성을 억제하며, 다른 ActRIIB 가용성 수용체에 비해 개선된 제조용이성 특성을 갖는 이들의 능력을 특징으로 한다. 상기 안정화된 인간 액티빈 IIB 수용체 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2에 제시된 바와 같이, ActRIIB의 세포외 영역과 관련하여 두 위치 E28 및 S44에서의 아미노산 치환을 특징으로 한다. 하나의 구체예에서, 안정화된 인간 액티빈 IIB 수용체 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2와 관련하여 위치 64에 있는 알라닌이 추가로 치환될 수 있다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "TGF- β 패밀리를 구성원" 또는 "TGF- β 단백질"은 액티빈을 포함하는 전환성장인자 패밀리의 구조적으로 관련된 성장인자, 및 성장 및 분화 인자(GDF) 단백질을 지칭한다(Kingsley et al. Genes Dev. 8: 133-146 (1994), McPherron et al., Growth factors and cytokines in health and disease, Vol. 1B, D. LeRoith and C. Bondy. ed., JAI Press Inc., Greenwich, Conn, USA: pp 357-393).

[0034] 마이오스타틴으로도 불리는 GDF-8은 골격근 조직의 음성 조절제이다(McPherron et al. PNAS USA 94:12457-12461 (1997)). 마이오스타틴은 약 375개 아미노산 길이의 불활성 단백질로서 합성되며, 인간의 경우 GenBank 등록번호 AAB86694(SEQ ID NO: 35)를 갖는다. 상기 전구 단백질은 사염기 가공 부위(tetrabasic processing site)에서의 단백질가수분해 절단에 의해 활성화되어 N-말단 불활성 전구영역(prodomain) 및 약 109개 아미노산 C-말단 단백질을 생성하며, 이는 이합체화되어 약 25 kDa의 동종이합체를 형성한다. 이 동종이합체는 성숙한 생물학적 활성 단백질이다(Zimmers et al., Science 296, 1486 (2002)).

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "전구영역" 또는 "전구펩타이드"는 절단되어 활성 C-말단 단백질을 방출하는 불활성 N-말단 단백질을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "마이오스타틴" 또는 "성숙한 마이오스타틴"은 단량체, 이합체 또는 다른 형태의 성숙한 생물학적 활성 C-말단 폴리펩타이드 뿐만 아니라 대립유전자 변이체, 스플라이스 변이체 및 융합 펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 생물학적 활성 단편 또는 관련 폴리펩타이드이다. 성숙한 마이오스타틴은 인간, 마우스, 닭, 돼지, 칠면조, 및 랫트를 포함하는 많은 종 간에 100% 서열 동일성을 갖는 것으로 보고되어왔다(Lee et al., PNAS 98, 9306 (2001)).

[0036] 본원에 사용된 바와 같이, GDF-11은 스위스프로트(Swissprot) 등록번호 095390(SEQ ID NO: 36)을 갖는 BMP(골 형성 단백질) 뿐만 아니라 상기 단백질의 변이체 및 중 동족체(homolog)를 지칭한다. GDF-11은 축 골격의 전/후 패턴화의 조절에 관여하지만(McPherron et al, Nature Genet. 22 (93): 260-264 (1999); Gamer et al, Dev. Biol. 208 (1), 222-232 (1999)), 출생후 기능은 알려져 있지 않다.

[0037] 액티빈 A는 상기 폴리펩타이드 사슬 β A의 동종이합체이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "액티빈 A"는 GenBank 등록번호 NM_002192(SEQ ID NO: 34)를 갖는 액티빈 단백질을 지칭한다. 액티빈 A, B, 및 AB는 두 가지

폴리펩타이드 사슬인 βA 및 βB 의 각각 동중이합체 및 이중이합체이다. 본원에 사용된 바와 같이 "액티빈"은 액티빈 A, B, 및 AB 뿐만 아니라 상기 단백질의 변이체 및 중 동족체를 지칭한다.

[0038] 수용체 폴리펩타이드

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 액티빈 타입 II B 수용체(ActRIIB)는 등록번호 NP_001097을 갖는 인간 액티빈 수용체 또는 위치 64의 아르기닌이 알라닌으로 치환된 것과 같은 이의 변이체를 지칭한다. 용어 가용성 ActRIIB(야생형)는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1 내지 134(신호서열을 가짐), 또는 아미노산 19 내지 134(신호서열 없음)인 ActRIIB의 세포외 영역을 지칭한다.

[0040] 안정화된 수용체 폴리펩타이드

[0041] 본 발명은 안정화된 ActIIB 수용체 폴리펩타이드(본원에서 "svActRIIB 폴리펩타이드"로 지칭됨)를 포함하는 단리된 단백질을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "svActRIIB 단백질"은 안정화된 ActRIIB 폴리펩타이드를 포함하는 단백질을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된"은 내인성(endogenous) 물질로부터 어느 정도까지 정제된 단백질 또는 폴리펩타이드 분자를 지칭한다. 이들 폴리펩타이드 및 단백질은 액티빈 A, 마이오스타틴, 또는 GDF-11 중 어느 하나에 결합하여 이들의 활성을 억제할 뿐만 아니라 개선된 제조용이성 특징을 갖는 능력을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0042] 상기 안정화된 ActRIIB 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2와 관련하여 두 위치 28 및 44에 아미노산 치환을 갖는 것을 특징으로 한다. 일관성을 위해, 상기 안정화된 ActRIIB 폴리펩타이드 및 단백질 상의 상기 아미노산 위치는 상기 폴리펩타이드가 성숙되거나 절단되었는지 여부에 관계없이 언제나 SEQ ID NO: 2에서의 위치와 관련하여 언급된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "성숙한"은 신호 서열이 없는 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "절단된"은 N 말단 아미노산 또는 C 말단 아미노산이 제거된 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0043] 하나의 구체예에서, 단리된 안정된 액티빈 IIB 수용체 폴리펩타이드 (svActRIIB)는 SEQ ID NO: 2에 나타나 있는 폴리펩타이드 서열을 가지며, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 19 내지 134에 나타나 있는 서열을 가지며, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 23 내지 134에 나타나 있는 서열을 가지며, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 25 내지 134에 나타나 있는 서열을 가지며, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩타이드는 상기 폴리펩타이드의 어느 하나에 대해 적어도 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 동일성으로 아미노산 서열을 가지며, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환을 가지며, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 위치 28에서의 상기 폴리펩타이드의 치환은 W, 및 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0044] 하나의 구체예에서, svActRIIB 폴리펩타이드는 신호 서열, 예를 들어, SEQ ID NO: 4, 8, 12, 및 16을 포함한다. 그러나, 다양한 신호 펩타이드는 본 출원의 폴리펩타이드의 제조에 사용될 수 있다. 신호 펩타이드는 예를 들어, SEQ ID NO: 4의 아미노산 1 내지 19에 나타나 있는 서열, 또는 SEQ ID NO: 31 및 32에 나타나 있는 신호 서열을 가질 수 있다. svActRIIB 폴리펩타이드를 발현시키는데 유용한 임의의 다른 신호 펩타이드가 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 신호 서열이 제거되고, 성숙 펩타이드가 남는다. 신호 서열이 없는 svActRIIB 폴리펩타이드의 예는, 예를 들어, SEQ ID NO: 6, 10, 14 및 18를 포함한다.

[0045] 하나의 구체예에서, 단백질은 안정된 액티빈 IIB 수용체 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4, 6, 12 및 14로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 이들 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 25 내지 134을 나타내고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환을 가지며, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또

는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2에 나타나 있는 것과 상이한 신호 서열로 그리고 그 서열없이 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 4, 6, 12 또는 14에 대해 적어도 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 또는 99 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0046] 추가 구체예에서, svActRIIB 단백질은 이중 단백질을 추가로 포함한다. 하나의 구체예에서, 이중 단백질은 Fc 도메인이다. 추가 구체예에서, Fc 도메인은 인간 IgG Fc 도메인이다. 하나의 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 8, 10, 16 및 18로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO: 8, 10, 16 또는 18에 대해 적어도 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 또는 99 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0047] 추가 구체예에서, 단백질은 상기 기재된 폴리펩타이드의 어느 하나를 포함하고, 여기서, 위치 64에서의 아미노산 잔기는 알라닌이다.

[0048] 또 다른 구체예에서, 용어 svActRIIB 폴리펩타이드 및 단백질은 N 및 C 말단 절단을 포함하는, SEQ ID NO: 2, 4, 6, 12 및 14의 단편을 포함하는 단백질을 포함하고, 여기서, 위치 28은 W 또는 Y이고, 위치 44는 T이고, 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0049] 본 명세서에 사용된 바와 같이, svActRIIB 폴리펩타이드의 용어 "유도체"란 공유 또는 응집 콘주게이트, 예컨대 글리코실 그룹, 지질, 아세틸 그룹, 또는 C-말단 또는 N-말단 융합 폴리펩타이드, PEG 분자에 대한 콘주게이션, 및 하기에 더 충분히 기재되어 있는 다른 변형을 형성하기 위한 적어도 하나의 추가 화학 잔기, 또는 적어도 하나의 추가 폴리펩타이드의 부착을 지칭한다. 안정된 ActRIIB 수용체 폴리펩타이드는 다양한 세포 유형, 예컨대 포유동물 세포, 대장균, 효모 및 다른 재조합 숙주세포에서의 발현에 기인한 프로세싱에서 일어나는 C 및 N 말단에 대한 변형을 포함하는 추가 변형 및 유도체를 또한 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 svActRIIB 단백질은 융합 단백질을 형성하기 위해 직접적으로 또는 링커 서열을 통해 svActRIIB 폴리펩타이드에 부착된 이중 폴리펩타이드를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "융합 단백질"이란 재조합 DNA 기술을 통해 부착된 이중 폴리펩타이드를 갖는 단백질을 지칭한다. 이중 폴리펩타이드는 안정된 ActRIIB 폴리펩타이드의 올리고머화 및 추가 안정화를 촉진하기 위해 예를 들어, 참고로 본 명세서에 통합된 WO 00/29581에 기재된 바와 같이 Fc 폴리펩타이드, 히스 태그(his tag), 및 류신 지퍼 (leucine zipper) 도메인을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 하나의 구체예에서, 이중 폴리펩타이드는 Fc 폴리펩타이드 또는 도메인이다. 하나의 구체예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc (SEQ ID NO: 23), 변형된 IgG1 Fc (SEQ ID NO: 47), IgG2 Fc (SEQ ID NO: 22), 및 IgG4 Fc (SEQ ID NO: 24) 도메인로부터 선택된다. svActRIIB 단백질은 IgG1 (SEQ ID NO: 29), IgG2 (SEQ ID NO: 28), 또는 IgG4 (SEQ ID NO: 30)의 힌지 서열 모두 또는 일부를 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 svActRIIB 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 8, 10, 16 및 18에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드, 및 이들 서열에 대해 실질적으로 유사한 폴리펩타이드로부터 선택되고, 여기서, 위치 28 및 44에서의 치환이 유지된다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "실질적으로 유사한"이란, SEQ ID NO: 8, 10, 16, 및 18의 어느 것에 대해 적어도 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 동일한 서열을 지칭하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 유지하고, 여기서, 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0051] svActRIIB 폴리펩타이드는 "링커" 서열을 임의로 추가로 포함할 수 있다. 링커는 폴리펩타이드 및 제2 이중 폴리펩타이드 또는 다른 유형의 융합 사이 또는 2개 이상의 안정된 ActRIIB 폴리펩타이드 사이의 스페이스(spacer)로서 주로 쓰인다. 하나의 구체예에서, 링커는 펩타이드 결합에 의해 함께 결합된 아미노산, 바람직하게는 펩타이드 결합에 의해 결합된 1 내지 20개의 아미노산으로 만들어지고, 여기서, 상기 아미노산은 20개의 자연발생 아미노산으로부터 선택된다. 이들 아미노산 중 하나 이상은 당업자에 의해 이해된 바와 같이 글리코실화될 수 있다. 하나의 구체예에서, 1 내지 20개의 아미노산은 글리신, 알라닌, 프롤린, 아스파라긴, 글루타민,

및 리신으로부터 선택될 수 있다. 하나의 구체예에서, 링커는 입체장애된 대다수의 아미노산, 예컨대 글리신 및 알라닌으로 만들어 진다. 예시적인 링커는 폴리글리신 (특히 (Gly)₅, (Gly)₈, 폴리(Gly-Ala), 및 폴리알라닌이다. 하기 예에서 보여진 하나의 예시적인 적당한 링커는 (Gly)₄Ser (SEQ ID NO: 25)이다. 추가 구체예에서, svActRIIB는, SEQ ID NO: 27에서 예시된 바와 같이, "힌지 링커", 즉 IgG의 힌지 구역 또는 부분 힌지 구역에 인접하여 제공된 링커 서열을 포함할 수 있다. 힌지 서열은 IgG2Fc (SEQ ID NO: 28), IgG1Fc (SEQ ID NO: 29), 및 IgG4Fc (SEQ ID NO: 30)을 포함한다.

[0052] 힌지 링커 서열은 svActRIIB-Fc 단백질의 제조용이성 및 안정성을 개선하기 위해 또한 디자인될 수 있다. 하나의 구체예에서, SEQ ID NO: 27, 38, 40, 42, 44, 45, 및 46의 힌지 링커는, svActRIIB 폴리펩타이드에 부착될 때, IgG2 Fc (SEQ ID NO: 22)에 의한 제조용이성을 개선하기 위해 디자인된다. 하나의 구체예에서, 힌지 링커 서열은, svActRIIB 폴리펩타이드를 인간 IgG1 Fc (SEQ ID NO: 23) 또는 변형된 인간 IgG1 Fc (SEQ ID NO: 47), 예를 들어, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 및 SEQ ID NO: 50를 갖는 힌지 링커에 부착시킬 때, 제조용이성을 개선하기 위해 디자인된다. 이들 폴리펩타이드의 개선된 제조용이성은 하기의 실시예4에 기재되어 있다.

[0053] 링커는 또한 비(non)펩타이드 링커일 수 있다. 예를 들어, 알킬 링커, 예컨대 -NH-(CH₂)_s-C(O)-일 수 있고, 여기서, s = 2-20이 사용될 수 있다. 이들 알킬 링커는 임의의 비(non) 입체장애 그룹, 예컨대 저급 알킬 (예, C₁-C₆) 저급 아실, 할로젠 (예, Cl, Br), CN, NH₂, 페닐, 등에 의해 추가로 치환될 수 있다.

[0054] 본원에 개시된 svActRIIB 폴리펩타이드는 svActRIIB 폴리펩타이드의 분해를 감소시키고, 감소시키거나 반감기를 증가시키고, 독성을 감소시키고, 면역원성을 감소시키고, 감소시키거나 생물학적 활성을 증가시키는 것과 같은 목적하는 특성을 부여하기 위하여, 비-폴리펩타이드 분자에 부착될 수 있다. 예시적인 분자로는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리리신, 텍스트란과 같은 선형 중합체; 지질; 콜레스테롤 그룹(예컨대, 스테로이드); 탄수화물, 또는 올리고당 분자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0055] 상기 svActRIIB 단백질 및 폴리펩타이드는 다른 ActRIIB 가용성 폴리펩타이드와 비교할 때 개선된 제조용이성을 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "제조용이성"은 상기 단백질의 제조합 발현 및 정제 동안의 특정 단백질의 안정성을 지칭한다. 제조용이성은 발현 및 정제 조건하에서의 상기 분자의 고유 특성에 기인한다고 여겨진다. 개선된 제조용이성 특징의 예는 하기 실시예에 나타나 있으며, 단백질의 균일한 당화(실시예 2), 상기 단백질의 제조합 생산 동안의 증가된 세포 역가, 성장 및 단백질 발현(실시예 1), 개선된 정제 특성(실시예 2), 및 낮은 pH에서의 개선된 안정성(실시예 2)을 포함한다. 본 발명의 svActRIIB 단백질 및 폴리펩타이드는 다른 가용성 ActRIIB 폴리펩타이드에 비교하여, 시험관내 및 생체내 활성의 유지와 더불어, 개선된 제조용이성을 보여준다(실시예 2 및 3). 또한, 부가적인 힌지(hinge) 링커 서열은 하기 실시예 4에 나타난 바와 같이, 부가적인 제조용이성 잇점을 부여할 수 있다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "svActRIIB 폴리펩타이드 활성" 또는 "가용성 ActRIIB 폴리펩타이드의 생물학적 활성"은 하기 실시예에 입증된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는, svActRIIB 폴리펩타이드의 하나 이상의 시험관내 또는 생체내 활성을 지칭한다. 상기 svActRIIB 폴리펩타이드의 활성은 마이오스타틴 또는 액티빈 A 또는 GDF-11에 결합하는 능력, 및 마이오스타틴 또는 액티빈 A 또는 GDF-11의 활성을 억제하거나 중화시키는 능력을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 "결합할 수 있는"은 하기 실시예에 나타난 KinExaTM 방법과 같이, 당해 기술분야에 알려진 방법에 의해 측정된 결합을 지칭한다. 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11의 시험관내 억제는, 예를 들어, 하기 실시예에 기술된 pMARE C2C12 세포-기반 검정법을 이용하여 측정될 수 있다. 하기 실시예 3에서 입증된 생체내 활성은 마우스 모델에서 순수근육량 증가에 의해 증명된다. svActRIIB 폴리펩타이드 및 단백질의 생체내 활성은 증가된 체중, 증가된 순수근육량, 및 지방량에 대한 순수 근육의 증가된 비율을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 활성은 특정 유형의 종양에 의해 유발된 악액질을 감소시키거나 예방하는 것, 특정 유형의 종양의 성장을 예방하는 것, 및 특정 동물 모델의 생존을 증가시키는 것을 추가로 포함한다. 상기 svActRIIB 단백질 및 폴리펩타이드 활성의 부가적인 논의가 하기에 제공된다.

[0057] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 svActRIIB 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된"은 내인성 물질로부터 어느 정도까지 정제된 핵산 분자를 지칭한다.

[0058] 하나의 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 2에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하고,

단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 19 내지 134에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 23 내지 134에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 단, 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환은 제외되고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이다. 또 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리펩타이드의 어느 하나에 대해 적어도 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % 또는 99 % 동일성으로 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 단일 아미노산 치환, 및 위치 44에서 단일 아미노산 치환을 가지며, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W 또는 Y로부터 선택되고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 상기 구체예의 폴리뉴클레오티드는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이다.

[0059] 하나의 구체예에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 SEQ ID NO: 4, 6, 12, 및 14로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 핵산은 SEQ ID NO: 4, 6, 12 또는 14에 대해 적어도 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 액티빈 A, GDF-11, 또는 마이오스타틴에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 상기 구체예의 폴리뉴클레오티드는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 액티빈 A, GDF-11 또는 마이오스타틴에 결합할 수 있다.

[0060] 또 다른 구체예에서, 단리된 핵산 분자는 적어도 하나의 이중 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 하나의 구체예에서, 이중 단백질은 Fc 도메인, 추가 구체예에서, Fc 도메인은 인간 IgG Fc 도메인이다. 또 다른 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 25, 27, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 49 또는 50에 나타나 있는 링커 및 힌지 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 추가 구체예에서, 그와 같은 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 26, 37, 39, 41, 및 43으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는다.

[0061] 하나의 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 8, 10, 16 및 18로 이루어진 그룹에 나타나 있는 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 핵산은 SEQ ID NO: 8, 10, 16 및 18로 이루어진 그룹에 대해 적어도 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 가지며, 상기 폴리펩타이드는 액티빈 A, GDF-11, 또는 마이오스타틴에 결합할 수 있다. 하나의 구체예에서, 상기 구체예의 폴리뉴클레오티드는 폴리펩타이드를 인코딩하고, 여기서, 위치 28에서의 치환은 W이고, 위치 44에서의 치환은 T이고, 상기 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A 또는 GDF-11에 결합할 수 있다.

[0062] 하나의 구체예에서, 단리된 핵산 분자는 SEQ ID NO: 3, 5, 11 또는 13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 또는 그의 보체를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 단리된 핵산 분자는 서열 SEQ ID NO: 7, 9, 15 및 17로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 또는 그의 보체를 포함한다. 추가 구체예에서, 단리된 핵산 분자는 엄격한 또는 완만한 조건 하에서 SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 또는 17과 혼성화되고, 여기서, 상기 인코딩된 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 또는 18과 실질적으로 유사하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 위치 28에서 W 또는 Y, 및 위치 44에서 T를 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 인코딩된 폴리펩타이드는 액티빈 A, 마이오스타틴 또는 GDF-11에 결합하거나 또는 저해할 수 있다.

[0063] 본 발명의 핵산 분자는 단일가닥 및 이중가닥 형태, 및 그의 RNA 보체 모두에서 DNA를 포함한다. DNA는, 예를 들어, cDNA, 게놈 DNA, 합성 DNA, PCR에 의해 증폭된 DNA, 및 그의 조합을 포함한다. 게놈 DNA는 프로브(probe)로서 SEQ ID NO: 3, 5, 11 또는 13의 DNA, 또는 그의 적당한 단편을 사용하는 것과 같은 종래의 기술에 의해 단리될 수 있다. ActRIIB 폴리펩타이드를 인코딩하는 게놈 DNA는 수많은 종에 대해 이용가능한 게놈 라이브러리로부터 얻는다. 합성 DNA는 올리고뉴클레오티드 단편을 오버랩핑한 다음, 인코딩 구역의 재조합 일부 또는 모두에 대한 단편의 조립 및 서열을 플랭킹(flanking)하는 화학 합성으로부터 이용가능하다. RNA는 mRNA의

직접적인 고수준 합성을 인도하는 원핵세포 발현 벡터, 예컨대 T7 프로모터 및 RNA 중합효소를 사용하는 벡터로부터 얻을 수 있다. cDNA는 ActRIIB를 발현시키는 다양한 조직으로부터 단리된 mRNA로부터 제조된 라이브러리로부터 얻는다. 본 발명의 DNA 분자는 전체 길이 유전자, 및 폴리뉴클레오티드 및 그의 단편을 포함한다. 전체 길이 유전자는 N-말단 신호 서열을 인코딩하는 서열을 또한 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명은 상기에 기재된 핵산 분자를 또한 제공하고, 여기서, 상기 폴리뉴클레오티드는 전사 또는 해독 조절 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0066] 예시적인 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩타이드 서열.

[0067] svActRIIB (E28W, S44T), 신호 서열 있음

[0068] atggagt t tgggctgagctgggt t t t cctcgttgc t c t t t aagagg t g t c c a g t g t g a g a c a c g g t g g t g c a t c t a c t a c a a c g c c a a c t g g g a g c t g g a g c g c a c c a g a c c g g c c t g g a g c g t g c g a a g g c g a g c a g g a a g c g g c t g c a c t g c t a c g c c t c c t g g c g c a a c a g c t c t g g c a c c a t c g a g c t c g t g a a g a g g g c t g c t g g c t a g a t g a c t t c a a c t g c t a c g a t a g g c a g g a g t g t g t g g c c a c t g a g g a g a a c c c c c a g g t g t a c t t c t g c t g c t g t g a g g g c a a c t t c t g c a a c g a g c g c t t c a c t c a t t t g c c a g a g g c t g g g g g c c c g g a a g t c a c g t a c g a g c c a c c c c g a c a g c c c c a c c (SEQ ID NO: 3)

[0070] svActRIIB (E28W, S44T), 신호 서열 있음

[0071] m e f g l s w v f l v a l l r g v q c e t r w c i y n a n w e l e r t n q t g l e r c e g e q d k r l h c y a s w r n s s g t i e l v k k g c w l d d f n c y d r q e c v a t e e n p q v y f c c c e g n f c n e r f t h l p e a g g p e v t y e p p t a p t

[0072] (SEQ ID NO: 4)

[0074] svActRIIB (E28W, S44T), 신호 서열 없음

[0075] g a g a c a c g g t g g t g c a t c t a c t a c a a c g c c a a c t g g g a g c t g g a g c g c a c c a a c c a g a c c g g c c t g g a g c g c t g c g a a g g c g a g c a g g a c a a g c g g c t g c a c t g c t a c g c c t c c t g g c g c a a c a g c t c t g g c a c c a t c g a g c t c g t g a a g a a g g g c t g c t g g c t a g a t g a c t t c a a c t g c t a c g a t a g g c a g g a g t g t g t g g c c a c t g a g g a g a a c c c c c a g g t g t a c t t c t g c t g c t g t g a g g g c a a c t t c t g c a a c g a g c g c t t c a c t c a t t t g c c a g a g g c t g g g g g c c c g g a a g t c a c g t a c g a g c c a c c c c g a c a g c c c c a c c (SEQ ID NO: 5)

[0077] svActRIIB (E28W, S44T), 신호 서열 없음

[0078] e t r w c i y n a n w e l e r t n q t g l e r c e g e q d k r l h c y a s w r n s s g t i e l v k k g c w l d d f n c y d r q e c v a t e e n p q v y f c c c e g n f c n e r f t h l p e a g g p e v t y e p p t a p t (SEQ ID NO: 6)

[0080] svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 폴리뉴클레오타이드 서열, 신호 서열 있음

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtgagacacgggtggg
catctactacaacccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcaaggcgagcaggaca
agcggctgcaactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagat
gacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgagg
caacttctgcaacgagcgttcactcatttgccagaggctgggggcccgaagtacgtacgagccacccccgacag
ccccaccggagggggaggatctgtcgagtgccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagctcttctc
ttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtgggtggacgtgagcca
cgaagaccccgaggtccagtccaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggagg
agcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtac
aagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgaga
accacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaag
gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctccc
atgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt
cttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

(SEQ ID NO: 7)

[0081]

[0083] svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 폴리펩타이드 서열, 신호 서열 있음

[0084]

mefglswvflvalrrgvqcetrcwiynanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvateenpqvyfcccegn
fchnerfthlpeaggpevtieppptaptggggsvecppcpappvagsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpree
qfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvvtlppsreemtknqvslctclvkgyfypsdiavewesngqpennykttp
mldsdgsfflyskltvdkrswqqnfvfscsvmhealhnhytqkslsispkg (SEQ ID NO: 8)

[0086] svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 폴리뉴클레오타이드 서열, 신호 서열 없음

[0087]

gagacacgggtggtgcatctactacaacccaactgggagctggagcgcaccaaccagaccggcctggagcgtgcaaggcgagcaggacaagcggctgcac
tgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggcc
actgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgagggcaacttctgcaacgagcgttcactcatttgccagaggctgggggcccgaagtacgtac
gagccacccccgacagccccaccggagggggaggatctgtcgagtgccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagctcttctcttccccca
aaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggcagctgagccacgaagaccccgaggtccagtccaactggtacgtg
gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccagggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactgg
ctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacag
gtgtacacctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgg
gagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagc
aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ

ID NO: 9)

[0089] svActRIIB-Fc (E28W, S44T), 폴리펩타이드 서열, 신호 서열 없음

[0090] etrwciyynanwelertnqtglrcegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvateenpqvyfcccegnfchnerfthlpeaggpevty
 eppptaptggggsvecppcpappvagpsvlfppkpkdtlmi sr tpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqd
 lngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgyfypsdiavewesngqpennykttpmldsdgsfflyskltvdks
 rwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg (SEQ ID NO: 10)

[0092] svActRIIB (E28Y, S44T), 신호 서열 있음

[0093] atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgccttttaagagggtgccagtgtgagacacggctactgcatctactacaacgccaactgggagctggag
 cgcaccaaccagaccggcctggagcgctgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtg
 aagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccagggtgtacttctgctgctgtgagggaac
 ttctgcaacgagcgcttactcatittgccagaggctgggggcccgaagtacgtacgagccacccccgacagccccacc (SEQ ID NO: 11)

[0095] svActRIIB (E28Y, S44T), 신호 서열 있음

[0096] mefglswvflvalrlrgvqcetryciyynanwelertnqtglrcegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvateenpqvyfcccegn
 fchnerfthlpeaggpevtyeppptapt

[0097] (SEQ ID: 12)

[0099] svActRIIB (E28Y, S44T), 신호 서열 없음

[0100] gagacacggctactgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgctgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcac
 tgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggcc
 actgaggagaacccccagggtgtacttctgctgctgtgagggaacttctgcaacgagcgcttactcatittgccagaggctgggggcccgaagtacgtac
 gagccacccccgacagccccacc (SEQ ID NO: 13)

[0102] svActRIIB (E28Y, S44T), 신호 서열 없음

[0103] etryciyynanwelertnqtglrcegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvateenpqvyfcccegnfchnerfthlpeaggpevty
 eppptapt (SEQ ID NO: 14)

[0105] svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 폴리뉴클레오타이드 서열, 신호 서열 있음

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtgagacacggtagtg
catctactacaacgccaactgggagctggagcgaccaaccagaccggcctggagcgctgcgaaggcgagcaggaca
agcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagat
gacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaggg
caacttctgcaacgagcgcttcaactcatttgccagaggctggggggccggaagtacgtacgagccacccccgacag
ccccaccggagggggaggatctgtcgagtgccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttctctc
ttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggtagctgagcca
cgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcggtgaggtgcataatgccaagacaaagccacgggagg
agcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtac
aagtgcagggttccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaagggcagccccgaga
accacaggtgtacacctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaag
gcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacacctccc
atgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt
cttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

(SEQ ID NO: 15)

[0106]

[0108] svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 폴리펩타이드 서열, 신호 서열 있음

[0109] mefglswvflvalrlrgvqcetryciynanwelertnqtglrcegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvateenpqvyfcccegn
fchnerfthlpeaggpevtieppptaptgggsvceppcpappvagsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpree
qfnstfrvsvltvvhqdlngkeyckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttp
mldsdgsfflyskltvdksrwqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg (SEQ ID NO: 16)

[0111] svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 폴리뉴클레오타이드 서열, 신호 서열 없음

[0112] gagacacggtagtgcactactacaacgccaactgggagctggagcgaccaaccagaccggcctggagcgctgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcac
tgctacgcctcctggcgcaacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggcc
actgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgagggcaacttctgcaacgagcgcttcaactcatttgccagaggctggggggccggaagtacgtac
gagccacccccgacagccccaccggagggggaggatctgtcgagtgccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttctcttccccca
aaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggtagctgagccacgaagacccccaggtccagttcaactggtacgtg
gacggcggtgaggtgcataatgccaagacaaagccacggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactgg
ctgaacggcaaggagtacaagtcaaggcttccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaagggcagccccgagaaccacag
gtgtacacctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgg
gagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagc
aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ

ID NO: 17)

[0114] svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 폴리펩타이드 서열, 신호 서열 없음

[0115] etryciyynanwelertnqtglcercegeqdkrlhcyaswrnssgtielvkkgcwlddfncydrqecvateenpqvyfcccegnfncnerfthlpeaggpevty
 eppptaptggggsvecppcpappvagsvflfpkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdw
 lngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsiltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpmldsdgsfflyskltdvdk
 rwqqgnvfscsvmhcalhnhytqkslsispkg (SEQ ID NO: 18)

[0116] 본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명의 핵산 분자 및 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터가 또한 제공되며, 상기 벡터로 형질전환된 숙주 세포, 및 상기 svActRIIB 폴리펩타이드를 생산하는 방법이 또한 제공된다. 용어 "발현 벡터"는 폴리뉴클레오티드 서열로부터 폴리펩타이드를 발현하기 위한 플라스미드, 파아지, 바이러스 또는 벡터를 지칭한다. 상기 svActRIIB 폴리펩타이드의 발현을 위한 벡터는 벡터 연장 및 클로닝된 삽입물의 발현을 위해 요구되는 최소 서열을 함유한다. 발현 벡터는 (1) 유전적 요소 또는 유전자 발현을 조절하는 역할을 하는 요소, 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역될 svActRIIB 폴리펩타이드 및 단백질을 인코딩하는 서열, 및 (3) 적절한 전사 개시 및 종결 서열의 조립물을 포함하는 전사 단위를 포함한다. 이들 서열은 선별 마커를 추가로 포함할 수 있다. 숙주 세포 내 발현에 적합한 벡터들은 쉽게 이용 가능하며, 상기 핵산 분자는 표준 재조합 DNA 기술을 이용하여 상기 벡터 내로 삽입된다. 그러한 벡터는 특정 조직에서 기능하는 프로모터, 및 표적으로 하는 인간 또는 동물 세포에서 svActRIIB 폴리펩타이드의 발현을 위한 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. svActRIIB의 발현에 적합한 예시적인 발현 벡터는 svActRIIB 폴리뉴클레오티드를 함유하는 pDSRa(WO 90/14363에 기술되어 있으며, 본원에 참고로써 통합되어 있음) 및 그 유도체 뿐만 아니라 하기에 기술되거나 당해 기술분야에 알려진 임의의 부가적인 적합한 벡터이다.

[0117] 본 발명은 svActRIIB 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 추가로 제공한다. 여러 가지 다른 발현/숙주 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 시스템은 재조합 박테리오파아지, 플라스미드 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 세균과 같은 미생물; 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 바이러스 발현 벡터(예컨대, 배큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 바이러스 발현 벡터(예컨대, 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 형질감염되거나 또는 세균 발현 벡터(예컨대, Ti 또는 pBR322 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 동물 세포 시스템을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 재조합 단백질 생산에 유용한 포유동물 세포로는 VERO 세포, HeLa 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주, 또는 혈청이 없는 배지에서 성장하는 베기(Veggie) CHO 및 관련 세포주(Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31 참조) 또는 DHFR이 결핍된 CHO 세포주 DX-B11(Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20 참조)과 같은 이들의 파생세포, 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23:175 참조)와 같은 COS 세포, W138, BHK, HepG2, 3T3(ATCC CCL 163), RIN, MDCK, A549, PC12, K562, L 세포, C127 세포, BHK(ATCC CRL 10) 세포주, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 CV1(ATCC CCL 70)으로부터 유래된 CV1/EBNA 세포주(McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821 참조), 293, 293 EBNA 또는 MSR 293과 같은 인간 배아 신장 세포, 인간 표피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 다른 형질전환된 영양류 세포주, 정상 이배체(diploid) 세포, 일차 조직의 시험관내 배양으로부터 유래된 세포 균주 (strain), 일차 이식물(explant), HL-60, U937, HaK 또는 Jurkat 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 포유동물 발현은 성장 배지로부터 회수될 수 있는 분비된 또는 가용성 폴리펩타이드의 생산을 가능케 한다.

[0118] 적절한 숙주-벡터 시스템을 이용하여, svActRIIB 폴리펩타이드는 생산을 가능케 하는 조건 하에서 본 발명의 핵산 분자를 함유하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양함으로써 재조합으로 생산된다. 형질전환된 세포는 장기간, 고수율 폴리펩타이드 생산에 사용될 수 있다. 상기 세포가 선별 마커 뿐만 아니라 목적하는 발현 카세트를 함유하는 벡터로 형질전환되면, 상기 세포는 예를 들어 이들이 선택 배지로 전환되기 이전에 강화 배지에서 성장하도록 허용될 수 있다. 상기 선별 마커는 상기 도입된 서열을 성공적으로 발현하는 세포를 성장시키고 회수하도록 설계된다. 안정적으로 형질전환된 세포의 저항성 덩어리 (clump)는 사용된 세포주에 적절한 조직 배양 기술을 이용하여 증식될 수 있다. 재조합 단백질의 발현의 개요는 문헌[Methods of Enzymology, v. 185, Goeddel, D.V., ed., Academic Press (1990)]에서 발견된다.

[0119] 일부 경우, 예컨대 원핵 시스템을 이용한 발현에서, 상기 발현된 본 발명의 폴리펩타이드는 생물학적으로 활성이기 위해 적합한 삼차 구조 및 이황화 결합으로 "리폴딩(refolding)" 및 산화될 수 있다. 리폴딩은 당해 기술분야에 널리 알려진 많은 과정을 이용하여 수행될 수 있다. 그러한 방법은, 예를 들어 상기 가용화된 폴리펩타

이드를 무질서유발제(chaotropic agent)의 존재하에 일반적으로 7 이상의 pH에 노출시키는 것을 포함한다. 무질서유발제의 선택은 봉입체(inclusion body) 가용화를 위해 사용된 선택과 유사하지만, 무질서유발제는 일반적으로 더 낮은 농도에서 사용된다. 예시적인 무질서유발제는 구아니딘 및 우레아이다. 대부분의 경우, 리폴딩/산화 용액은 특정 비율의 환원제 및 그 산화된 형태를 함유하여 시스테인 가교의 형성을 위해 발생하는 이황화 서플링을 가능케하는 특정 산화환원 전위를 생성할 것이다. 일부 통상적으로 사용되는 산화환원쌍은 시스테인/시스테인, 글루타치온/디티오비스GSH, 염화제이구리, 디티오프레이톨 DTT/디티안 DTT, 및 2-머캅토에탄올(bME)/디티오-bME를 포함한다. 많은 경우, 리폴딩의 효율을 증가시키기 위해 공용매가 사용될 수 있다. 통상적으로 사용되는 공용매는 글리세롤, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, 및 아르기닌을 포함한다.

[0120] 또한, 상기 폴리펩타이드는 통상적인 기술에 따라 용액 중에 또는 고체 지지체 상에서 합성될 수 있다. 다양한 자동 합성기가 상업적으로 이용가능하며 공지된 프로토콜에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d.Ed., Pierce Chemical Co. (1984); Tam et al., J Am Chem Soc, 105:6442, (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany and Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany et al., Int J Pep Protein Res, 30:705-739 (1987)]을 참조한다.

[0121] 본 발명의 폴리펩타이드 및 단백질은 당해 기술분야의 숙련자에게 널리 알려진 단백질 정제 기술에 따라 정제될 수 있다. 이들 기술은, 하나의 수준에서, 단백질 및 비-단백질 분획의 조 분류(crude fractionation)를 포함한다. 다른 단백질로부터 상기 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 분리한 다음, 목적하는 상기 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 부분적인 또는 완전한 정제(또는 균질할 때까지의 정제)를 달성하기 위해 크로마토그래피 및 전기영동 기술을 이용하여 추가로 정제될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 폴리펩타이드" 또는 "정제된 폴리펩타이드"는 다른 성분으로부터 단리될 수 있는 조성물을 지칭하는 것으로 의도되며, 여기에서 상기 폴리펩타이드는 그 자연상에서 수득가능한 상태에 비하여 임의의 정도까지 정제된다. 그러므로, 정제된 폴리펩타이드는 또한 자연적으로 발생할 수 있는 환경으로부터 벗어난 폴리펩타이드를 지칭한다. 일반적으로, "정제된"은 다양한 다른 성분을 제거하기 위해 분류된 폴리펩타이드 조성물을 지칭할 것이며, 상기 조성물은 실질적으로 그 발현된 생물학적 활성을 유지한다. 용어 "실질적으로 정제된"이 사용되는 경우, 이 명칭은 폴리펩타이드 또는 펩타이드가 조성물에서 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 또는 약 90% 이상의 단백질을 이루는 것과 같이, 상기 조성물의 주성분을 형성하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드 조성물을 지칭할 것이다.

[0122] 정제에 사용되기에 적합한 다양한 기술은 당해 기술분야의 숙련자에게 널리 알려져 있을 것이다. 이들은, 예를 들어, 황산암모늄, PEG, 항체(면역침전) 등을 이용하거나 또는 열 변성에 의한 침전 후 원심분리; 친화성 크로마토그래피(단백질-A 컬럼), 이온 교환, 겔 여과, 역상, 하이드록실아파타이트(hydroxylapatite), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 등전위 포커싱(isoelectric focusing), 겔 전기영동, 및 이들 기술의 조합과 같은 크로마토그래피를 포함한다. 당해 기술분야에 일반적으로 알려져 있는 바와 같이, 다양한 정제 단계의 수행 순서는 달라질 수 있으며, 또는 특정 단계들이 생략될 수 있는 것으로 여겨지며, 이는 여전히 실질적으로 정제된 폴리펩타이드의 제조를 위한 적합한 방법을 창출한다. 예시적인 정제 단계가 하기 실시예에 제공되어 있다.

[0123] 폴리펩타이드 정제 정도를 정량화하기 위한 여러 가지 방법들은 본 내용에 비추어 볼 때 당해 기술분야의 숙련자에게 알려져 있을 것이다. 이들은, 예를 들어, 활성 분획의 특정 결합 활성을 측정하는 것, 또는 SDS/PAGE 검정에 의해 분획 내 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 양을 평가하는 것을 포함한다. 폴리펩타이드 분획의 순도를 평가하는 바람직한 방법은 상기 분획의 결합 활성을 계산하는 것, 이를 최초 추출물의 결합 활성과 비교하는 것, 그리고 이로써 "-배 정제 수(-fold purification number)"에 의해 본원에 평가된 정제 정도를 계산하는 것이다. 결합 활성량을 나타내는데 사용되는 실제적인 단위는, 물론, 정제를 수행하기 위해 선택된 특정 검정 기술 및 상기 폴리펩타이드 또는 펩타이드가 검출가능한 결합 활성을 나타내는지 여부에 좌우될 것이다.

[0124] 안정화된 액티빈 타입 IIB 폴리펩타이드는 근육-저하 캐스케이드(cascade)를 활성화시키는 리간드에 결합한다. svActRIIB 폴리펩타이드는 리간드 액티빈 A, 마이오스타틴, 및/또는 GDF-11에 결합하여 활성을 억제할 수 있으며, 근위축을 포함하는 질환 뿐만 아니라 특정 암, 및 다른 질환을 치료할 수 있는 능력을 가지고 있다.

[0125] 하기 실시예는 시험관내 검정에서 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합하여 중화시키는 능력을 유지할 뿐만 아니라 생체내 활성을 유지하면서, 본원에 기술된 아미노산 치환을 갖는 svActRIIB 폴리펩타이드 및 단백질에 대한 개선된 특성을 보여준다. 이러한 특성은 다른 가용성 수용체와 비교하여 개선된 제조용이성을 갖는 단백질 및 폴리펩타이드를 생성한다.

[0127]

항체

[0128]

본 발명은 또한 본 발명의 svActRIIB 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 안정화된 ActRIIB 폴리펩타이드에 결합하는 항체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합하는"은 10^6 M^{-1} 이상의 svActRIIB 폴리펩타이드에 대한 결합 친화도(K_a)를 갖는 항체를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 다클론 항체(예를 들어, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds), Cold Spring Harbor Press, (1988) 참조), 및 단일클론 항체(예를 들어, 미국 특허 제RE 32,011호, 제4,902,614호, 제4,543,439호, 및 제4,411,993호, 및 Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analysis, Plenum Press, Kennett, McKearn and Bechtol (eds.) (1980) 참조)를 포함하는 온전한 항체를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 또한 재조합 DNA 기술에 의해 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성되는 F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv, Fc, 및 단일 사슬 항체와 같은 항체의 단편을 지칭한다. 용어 "항체"는 또한 이중특이성(bispecific) 또는 이중작용성(bifunctional) 항체를 지칭하며, 이는 두 개의 상이한 중쇄/경쇄 및 두 개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 이중특이성 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab 단편의 결합을 포함하는 여러 가지 방법에 의해 생성될 수 있다(Songsivilai et al, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990), Kostelny et al., J. Immunol.148:1547-1553 (1992) 참조).

[0129]

본원에 사용된 바와 같이 용어 "항체"는 또한 키메라 항체, 즉 하나 이상의 비인간 가변 항체 면역글로불린 영역에 결합된 인간 불변 항체 면역글로불린 영역을 갖는 항체, 또는 이의 단편을 지칭한다(예를 들어, 미국 특허 제5,595,898호 및 미국 특허 제5,693,493호 참조). 항체는 또한 "인간화된" 항체(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 및 WO 94/10332호 참조), 미니바디(minibody)(WO 94/09817호), 맥시바디(maxibody), 및 형질전환 동물에 의해 생성된 항체를 포함하며, 여기에서 인간 항체 생성 유전자 중 일부를 함유하나 내인성 항체의 생산이 부족한 형질전환 동물은 인간 항체를 생성할 수 있다(예를 들어, Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), 및 미국 특허 제6,300,129호 참조). 용어 "항체"는 또한 다합체성 항체, 또는 이중이합체성 항체와 같은 더 높은 수준의 단백질의 복합체, 및 항이디오타입(anti-idiotypic) 항체를 포함한다. "항체"는 또한 항이디오타입(anti-idiotypic) 항체를 포함한다. sv ActRIIB 폴리펩타이드에 대한 항체는, 예를 들어, 시험관내 및 생체내에서 svActRIIB를 확인하고 정량화하는데 사용될 수 있다.

[0130]

또한 본원에 기술된 svActRIIB 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는, 임의의 동물, 예를 들어, 마우스 및 랫트 항체, 및 토끼 항체로부터 얻어지는 다클론 항체가 포함한다.

[0131]

그러한 항체는 본원에 개시된 폴리펩타이드를 검출하고 검정하기 위한 연구 도구로서 그리고 정량화 검정법에서 용도를 갖는다. 그러한 항체는 상기 기술된 방법 및 당해 기술분야에 알려진 방법을 이용하여 제조된다.

[0133]

약제학적 조성물

[0134]

본 발명의 svActRIIB 단백질 및 폴리펩타이드를 함유하는 약제학적 조성물이 또한 제공된다. 그러한 조성물은 약제학적으로 허용가능한 물질, 및 생리적으로 허용가능한 제형 물질과 혼합된 치료적 또는 예방적 유효량의 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함한다. 상기 약제학적 조성물은, 예를 들어, 조성물의 pH, 오스몰농도(osmolality), 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 무균성, 안정성, 용출 또는 방출 속도, 조성물의 흡수성 또는 투과성을 변형, 유지 또는 보존하기 위한 제형 물질을 함유할 수 있다. 적합한 제형 물질로는 아미노산(예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신); 항균제; 항산화제(예컨대, 아스코브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨); 완충제(예컨대, 붕산염, 중탄산염, Tris-HCl, 구연산염, 인산염, 다른 유기산); 증량제(예컨대, 만니톨 또는 글리신), 킬레이트화제(예컨대, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)); 착화제(예컨대, 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-사이클로덱스트린 또는 하이드록시프로필-베타-사이클로덱스트린); 충전제; 단당류; 이당류 및 기타 탄수화물(예컨대, 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린); 단백질(예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 착색제; 풍미제 및 희석제; 유화제; 친수성 중합체(예컨대, 폴리비닐피롤리돈); 저분자량 폴리펩타이드; 염형성 반대이온(예컨대, 나트륨); 보존제(예컨대, 염화벤즈알코올, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페네틸 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소); 용매(예컨대, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜); 당알코올(예컨대, 만니톨 또는 솔비톨); 현탁제; 계면활성제 또는 습윤제(예컨대, 플루로닉(pluronic), PEG, 소르비탄 에스테르, 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80과 같은 폴리솔베이트, 트리트론, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 킬록사팜); 안정성 증진제(수크로스 또는 솔비톨); 탄력성 증진제(예컨대, 알칼리 금속 할로젠화물(바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨, 만니톨, 솔비톨); 전달 매

질; 희석제; 부형제 및/또는 약제학적 보조제(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990))를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0135] 최적의 약제학적 조성물은, 예를 들어, 의도된 투여 경로, 전달 방식, 및 목적하는 투여량에 좌우되어 당해 기술분야의 숙련자에 의해 결정될 것이다. 예를 들어, 위의 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences]을 참조한다. 상기 조성물은 폴리펩타이드의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출속도, 및 생체내 클리어런스(clearance) 속도에 영향을 미칠 것이다. 예를 들어, 적합한 조성물은 주사용수, 비경구 투여용 생리식염용액일 수 있다.

[0136] 약제학적 조성물에서 일차 매질(vehicle) 또는 담체는 자연상에서 수성 또는 비수성일 수 있다. 예를 들어, 적합한 매질 또는 담체는 가능한 경우 비경구 투여용 조성물에 통상적인 다른 물질이 보충된, 주사용수, 생리식염용액 또는 인공 뇌척수액일 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수는 또 다른 예시적인 매질이다. 다른 예시적인 약제학적 조성물은 트리스(Tris) 완충액, 또는 아세테이트 완충액을 포함하며, 이들은 추가로 솔비톨 또는 이의 적합한 대용품을 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 조성물은 목적하는 정도의 순도를 갖는 선택된 조성물을 동결전조된 케익 또는 수용액 형태의 임의의 제형 물질(상기 Remington's Pharmaceutical Sciences)과 혼합함으로써 보관을 위해 제조될 수 있다. 또한, 상기 치료 조성물은 수크로스 및 같은 적절한 부형제를 사용하여 동결건조물로 제형화될 수 있다.

[0137] 상기 제형은 여러 가지 방법, 예를 들어, 흡입 치료요법에 의해, 경구로, 또는 주사에 의해 투여될 수 있다. 비경구 투여가 고려되는 경우, 본 발명에 사용하기 위한 상기 치료 조성물은 약제학적으로 허용가능한 매질 중에 목적하는 폴리펩타이드를 포함하는, 발열원이 없는(pyrogen-free), 비경구적으로 허용가능한 수용액의 형태일 것이다. 비경구 주사를 위해 특히 적합한 매질은 폴리펩타이드가 멸균된 등장성 용액으로서 제형화된, 잘 보존된, 멸균 증류수이다. 또 다른 조제물은 이후 데포(depot) 주사를 통해 전달될 수 있는 제품의 제어형 또는 서방형 방출을 제공하는, 주사가능한 미소구체(microsphere), 생분해성 입자, 중합체성 화합물(폴리락트산, 폴리글리콜산), 비드, 또는 리포솜과 같은 제제를 이용한 목적하는 분자의 제형을 포함할 수 있다. 히아루론산이 또한 사용될 수 있으며, 이는 혈액순환에서의 지속을 촉진하는 효과를 가질 수 있다. 목적하는 분자를 도입하기 위한 다른 적합한 수단은 이식가능한 약물 전달 장치이다.

[0138] 또 다른 측면에서, 주사 투여에 적합한 약제학적 제형은 수용액 중에, 바람직하게는 행크스 용액, 링거 용액, 또는 생리식염 완충 식염수와 같은 생리적으로 양립될 수 있는 완충액 중에서 제형화될 수 있다. 수성 주사 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로오스, 솔비톨, 또는 텍스트란과 같이, 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 또한, 활성 화합물의 현탁액은 적절한 유질의 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성(lipophilic) 용매 또는 매질은 참기름과 같은 지방유, 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드, 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 비지질 다량양이온성 아미노 중합체가 또한 전달을 위해 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 또한 성분들의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액의 제조를 가능케 하는 적합한 안정화제를 함유할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 약제학적 조성물은 흡입용으로 제형화될 수 있다. 흡입 용액은 또한 에어로졸 전달을 위한 추진체를 이용하여 제형화될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 용액은 분무화될 수 있다. 폐 투여가 PCT 출원 제 PCT/US94/001875호에 추가로 설명되어 있으며, 이는 화학적 변형된 단백질의 폐 전달을 기술하고 있다.

[0139] 특정 제형이 경구로 투여될 수 있다는 것 역시 고려된다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 이 방식으로 투여되는 분자는 정제 및 캡슐과 같은 고체 제형의 혼합에 관습상 사용되는 담체를 이용하거나 이용하지 않고 제형화될 수 있다. 예를 들어, 캡슐은 생체이용률이 최대화되고 전-전신성(pre-systemic) 분해가 최소화될 때 위장관내 지점에서 상기 제형의 활성 부분을 방출하도록 설계될 수 있다. 치료 분자의 흡수를 용이하게 하기 위해 부가적인 제제가 포함될 수 있다. 또한 희석제, 풍미제, 저용융점 왁스, 식물성 오일, 윤활제, 현탁제, 정제 붕해제, 및 결합제가 사용될 수 있다. 경구 투여용 약제학적 조성물은 경구 투여에 적합한 복용량으로 당해 기술분야에 널리 알려진 약제학적으로 허용가능한 담체를 이용하여 제형화될 수 있다. 그러한 담체는 상기 약제학적 조성물이 환자의 섭취를 위해 정제, 환제, 당의정(dragee), 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제형화될 수 있게 한다.

[0140] 경구 사용을 위한 약제학적 조제물은 활성 화합물을 고체 부형제와 조합하고 얻어진 과립 혼합물을 가공하여(임의로, 분쇄 이후) 정제 또는 당의정 코어를 수득함으로써 얻어질 수 있다. 요구되는 경우, 적합한 보조제가 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는, 락토스, 수크로스, 만니톨, 및 솔비톨을 포함하는 당류; 옥수수, 밀, 쌀, 감자 또는 다른 식물로부터 얻은 전분; 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스, 또는 소듐 카복시메틸셀룰로오스와 같은 셀룰로오스; 아라빅 및 트라가칸트를 포함하는 검류; 및 젤라틴 및 콜라겐과 같은 단백질

과 같은, 탄수화물 또는 단백질 충전제를 포함한다. 요구되는 경우, 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 및 알긴산 또는 이의 염, 예를 들어 알긴산나트륨과 같은, 붕해제 또는 가용화제가 첨가될 수 있다.

[0141] 당의정 코어는 농축된 당액과 같은 적합한 코팅제와 함께 사용될 수 있으며, 이는 또한 검 아라빅, 탈크, 폴리비닐피롤리돈, 카르보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜, 및/또는 이산화티타늄, 락카 용액(lacquer solution), 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있다. 착색제 또는 색소는 제품 식별을 위해 또는 활성 화합물의 양, 즉, 복용량을 규명하기 위해 상기 정제나 당의정 코팅에 첨가될 수 있다.

[0142] 경구로 사용될 수 있는 약제학적 조제물은 또한 젤라틴으로 만들어진 푸쉬-피트(push-fit) 캡슐 뿐만 아니라 젤라틴 및 글리세롤이나 솔비톨과 같은 코팅으로 만들어진 연질, 밀봉된 캡슐을 포함한다. 푸쉬-피트 캡슐은, 락토스 또는 전분과 같은 충전제 또는 결합제, 탈크 또는 스테아린산 마그네슘과 같은 윤활제, 및 임의로 안정화제와 혼합된 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 성분은 안정화제를 갖거나 갖지 않는 지방유, 액체, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 액체 중에 용해되거나 현탁될 수 있다.

[0143] 서방형- 또는 제어형-전달 제형 내에 폴리펩타이드를 포함하는 제형을 포함하는, 부가적인 약제학적 조성물은 당해 기술분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 리포솜 담체, 생체분해형 마이크로입자 또는 다공성 비드 및 데포주사와 같은, 여러 가지 서방형- 또는 제어형-전달 수단을 제형화하기 위한 기술은 당해 기술분야의 숙련자에게 또한 알려져 있다. 예를 들어, 약제학적 조성물의 전달을 위한 다공성 중합체성 마이크로입자의 제어방출을 기술하는 PCT/US93/00829호를 참조한다. 서방 조제물의 부가적인 예로는 모양을 갖는 물품 형태의 반투과성 중합체 매트릭스, 예컨대 필름, 또는 마이크로캡슐을 포함한다. 서방형 매트릭스는 폴리에스테르, 하이드로겔, 폴리락타이드(U.S. 3,773,919, EP 58,481), L-글루탐산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983)), 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트)(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981); Langer et al., Chem. Tech., 12:98-105(1982)), 에틸렌 비닐 아세테이트(상기 Langer et al) 또는 폴리-D(-)-3-하이드록시부티르산(EP 133,988)을 포함할 수 있다. 서방형 조성물은 또한 리포솜을 포함하며, 이는 당해 기술분야에 알려진 몇 가지 방법 중 어느 하나에 의해 제조될 수 있다. 예컨대, 문헌[Eppstein et al., PNAS (USA), 82:3688 (1985); EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949]을 참조한다.

[0144] 생체내 투여를 위해 사용될 수 있는 약제학적 조성물은 일반적으로 멸균이어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 상기 조성물이 동결건조되는 경우, 이 방법을 이용한 멸균이 동결건조 및 재구성 이전 또는 이후에 수행될 수 있다. 비경구 투여용 조성물은 동결건조된 형태로 또는 용액으로 보관될 수 있다. 또한 비경구 조성물은 일반적으로 멸균 액세스 포트(access port)를 갖는 용기, 예를 들어, 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 정맥 용액 백 또는 바이알 내에 들어간다.

[0145] 상기 약제학적 조성물이 제형화되면, 이는 용액, 현탁액, 겔, 유화액, 고체 또는 건조되거나 동결건조된 분말로서 멸균 바이알 내에 보관될 수 있다. 그러한 제형은 즉석사용 형태 또는 투여에 앞서 재구성을 필요로 하는(예컨대, 동결건조된) 형태 중 하나로 보관될 수 있다.

[0146] 특정 구체예에서, 본 발명은 단일-용량 투여 단위를 생산하는 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 건조된 단백질을 갖는 제1 용기 및 수성 제형을 갖는 제2 용기 모두를 각각 함유할 수 있다. 또한 단일 및 다수-챔버의 미리 채워진 주사기(예컨대, 액체 주사기 및 리오주사기(lyosyringe))를 함유하는 키트 역시 본 발명의 범주에 속한다.

[0147] 치료적으로 사용될 약제학적 조성물의 유효량은, 예를 들어, 치료 정황 및 목적에 좌우될 것이다. 따라서, 당해 기술분야의 숙련자라면 치료를 위한 적절한 투여 수준이 전달되는 분자, 상기 폴리펩타이드가 사용되는 징후, 투여 경로, 및 환자의 크기(체중, 체표면 또는 장기 크기) 및 상태(연령 및 일반적인 건강)에 따라 부분적으로 달라질 것임을 인식할 것이다. 따라서, 임상에서는 투여량을 조절하고 최적 치료 효과를 얻기 위해 투여 경로를 바꿀 수 있다. 전형적인 투여량은, 전술한 인자에 좌우되어 약 0.1mg/kg 내지 약 100 mg/kg 이상까지의 범위일 수 있다. 폴리펩타이드 조성물은 바람직하게는 정맥내로 주입되거나 투여될 수 있다. 장기간 작용하는 약제학적 조성물은 특정 제형의 반감기 및 클리어런스 속도에 좌우되어 3 내지 4일마다, 매주, 또는 2주마다 투여될 수 있다. 투여 빈도는 사용되는 폴리펩타이드의 약동학적 매개변수에 좌우될 것이다. 일반적으로, 조성물은 목적하는 효과를 달성하는 투여량에 도달될 때까지 투여된다. 그러므로, 상기 조성물은 단일 용량으로서, 또는 시간이 지남에 따라 다중 용량으로(동일하거나 상이한 농도/투여량으로), 또는 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가의 개선은 통상적으로 이루어진다. 적절한 투여량은 적절한 용량-반응 데이터의 이용을 통해 알아낼 수 있다.

- [0148] 상기 약제학적 조성물의 투여 경로는 알려진 방법, 예컨대 경구로, 정맥내, 복강내, 대뇌내(실질조직내), 뇌실내, 근육내, 안내, 동맥내, 문맥내, 병변내 경로, 골수강내, 척추강내, 심실내, 경피, 피하, 또는 복강내 주사를 통해; 뿐만 아니라 서방형 시스템에 의해 또는 이식 장치에 의해, 비강내, 경장(enteral), 국소, 설하, 요도, 경질(vaginal), 또는 직장 방법이다. 원하는 경우, 상기 조성물은 볼루스(bolus)주사에 의해 또는 연속적으로 주입에 의해, 또는 이식 장치에 의해 투여될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 상기 조성물은 목적하는 분자가 흡착되어 있거나 캡슐화되어 있는 막, 스펀지, 또는 또 다른 적절한 물질의 이식을 통해 국소로 투여될 수 있다. 이식 장치가 사용되는 경우, 상기 장치는 어느 적절한 조직이나 기관 내로 이식될 수 있고, 목적하는 분자의 전달은 확산, 지효성의 볼루스, 또는 연속 투여를 통한 것일 수 있다.
- [0149] 일부 경우, 본 발명의 svActRIIB 폴리펩타이드는 본원에 기술된 것과 같은 방법을 이용하여, 상기 폴리펩타이드를 발현하고 분비하도록 유전적으로 조작된 특정 세포를 이식함으로써 전달될 수 있다. 그러한 세포는 동물 또는 인간 세포일 수 있으며, 자가조직이나 이중조직으로부터 유래할 수 있다. 임의로, 상기 세포는 불멸화될 수 있다. 면역 반응의 기회를 줄이기 위해, 상기 세포는 캡슐화되어 주변 조직의 침투를 피할 수 있다. 캡슐화 물질은 일반적으로 상기 폴리펩타이드 제품을 방출시키지만, 환자의 면역계에 의한 또는 주변 조직으로부터의 다른 유해 인자에 의한 세포의 파괴를 예방하는, 생체에 적합한 반투과성 중합체성 동봉물(enclosure) 또는 막이다.
- [0150] svActRIIB 또는 svActRIIB의 유도체를 인코딩하는 핵산 분자가 대상 내로 직접 도입되는, 생체내 svActRIIB 유전자 치료요법이 또한 계획된다. 예를 들어, svActRIIB를 인코딩하는 핵산 서열은 아테노-관련 바이러스 벡터와 같은 적절한 전달 벡터를 이용하거나 이용하지 않고 핵산 컨스트럭트의 국소 주입을 통해 표적 세포 내로 도입된다. 대안적인 바이러스 벡터로는 레트로바이러스, 아테노바이러스, 단순포진바이러스, 유두종바이러스 벡터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 바이러스 벡터의 물리적 전달은 목적하는 핵산 컨스트럭트 또는 상기 목적하는 핵산 서열을 함유하는 다른 적절한 전달 벡터의 국소 주입, 리포좀-매개 전달, 직접 주입(DNA 자체), 또는 마이크로입자 충격(microparticle bombardment, 유전자총)에 의해 생체내에서 달성될 수 있다.
- [0151] 본 내용의 조성물은 단독으로 또는 이들의 치료 효과를 증진시키거나 잠재적인 부작용을 감소시키기 위해 다른 치료제와 병용하여 사용될 수 있다.
- [0153] svActRIIB 조성물의 용도
- [0154] 본 발명은 생체내 및 시험관내 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11의 양 또는 활성을 감소시키거나 중화시키기 위한 방법 및 약제학적 조성물을 제공한다. svActRIIB 폴리펩타이드는 마이오스타틴, 액티빈 A, 및 GDF-11에 대해 높은 결합 친화도를 가지며, 마이오스타틴, 액티빈 A 및 GDF-11 중 적어도 하나의 생물학적 활성을 감소시키고 억제할 수 있다.
- [0155] 하나의 측면에서, 본 발명은 유효량의 svActRIIB 조성물을 대상에게 투여함으로써 치료를 필요로 하는 대상에서 마이오스타틴-관련 및/또는 액티빈 A 관련 장애를 치료하기 위한 방법 및 시약을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상"은 인간을 포함한 포유동물과 같이, 임의의 동물을 지칭한다.
- [0156] 본 발명의 조성물은 대상에서 순수근육량을 증가시키는데 유용하다. 상기 조성물은 또한 지방량에 비례하여 순수근육량을 증가시키는데 유용하며, 따라서 대상에서 체중의 퍼센트로서 지방량을 감소시키는데 유용하다. 실시예 3은 본 발명의 svActRIIB 폴리펩타이드 및 단백질이 동물에서 순수근육량을 증가시킬 수 있음을 입증한다.
- [0157] svActRIIB 조성물에 의해 치료될 수 있는 장애로는 다양한 형태의 근육 쇠약 뿐만 아니라, 당뇨병 및 관련 장애와 같은 대사 장애, 및 골다공증과 같은 골 퇴행성 질환을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0158] 근육 쇠약 장애는 뒤센(Duchenne) 근위축, 진행성 근위축, 베커형(Becker's type) 근위축, 데제린-란도우지(Dejerine-Landouzy) 근위축, 에르브(Erb) 근위축, 및 영아 신경축삭 근위축과 같은 근위축을 포함한다. 부가적인 근육 쇠약 장애는 근위축성 축삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 울혈성 폐쇄성 폐질환(congestive obstructive pulmonary disease), 암, AIDS, 신부전, 기관 위축, 안드로겐 차단(androgen deprivation), 및 류마티스 관절염과 같은 만성 질환 또는 장애로부터 발생된다.
- [0159] 마이오스타틴 및/또는 액티빈의 과발현은 중증 근육 쇠약 증후군인 악액질의 원인이 될 수 있다. 악액질은 암으로부터 초래되며, 또한 류마티스 관절염, 당뇨병성 신장증, 신부전, 화학치료요법, 화상으로 인한 상해, 뿐만 아니라 다른 원인으로부터 발생한다. 또 다른 실시예에서, 마이오스타틴-면역반응성 단백질의 혈청 및 근육내

농도가 AIDS-관련 근육 쇠약을 나타내는 남성에서 증가하는 것으로 밝혀졌고, 제지방량(fat-free mass)에 반비례하였다(Gonzalez-Cadavid et al., PNAS USA 95: 14938-14943 (1998)). 마이오스타틴 수준은 또한 화상에 대응하여 증가하는 것으로 나타났으며, 이는 이화 근육 효과를 유발한다(Lang et al, FASEB J 15, 1807-1809 (2001)). 근육 쇠약을 유발하는 부가적인 상태는 휠체어내 구금과 같은 장애로 인한 비활동, 뇌졸중, 병, 척수 손상, 뼈 골절 또는 정신적 외상으로 인한 장기간 입원, 및 극미중력 환경(우주 비행)에서의 근위축으로부터 발생할 수 있다. 예를 들어, 혈장 마이오스타틴 면역반응성 단백질은 장기간 입원 이후 증가하는 것으로 밝혀졌다(Zachwieja et al. J Gravit Physiol. 6(2):11(1999). 또한, 우주선 비행 중 극미중력 환경에 노출된 랫트의 근육이 노출되지 않은 랫트의 근육에 비교하여 증가된 양의 마이오스타틴을 발현한 것으로 밝혀졌다(Lalani et al., J.Endocrin 167 (3):417-28 (2000)).

[0160] 또한, 근육 대비 지방 비율의 노화 관련 증가, 및 노화 관련 근위축은 마이오스타틴에 관련된 것으로 보인다. 예를 들어, 평균 혈청 마이오스타틴-면역반응성 단백질은 청년(19-35세), 중년(36-75세), 및 노년(76-92세) 남녀 그룹에서 나이가 증가함에 따라 증가한 반면, 평균 근육량 및 제지방량은 이들 그룹에서 나이가 증가함에 따라 감소하였다(Yarasheski et al. J Nutr Aging 6(5):343-8 (2002)). 또한, 마이오스타틴은 심장 근육에서 낮은 수준으로 발현되는 것으로 밝혀져 왔으며, 발현은 경색 후 심근세포에서 상향조절된다(Sharma et al., J Cell Physiol. 180 (1):1-9 (1999)). 그러므로, 심장 근육에서 마이오스타틴 수준을 감소시키는 것이 경색 후 심장 근육의 회복을 개선시킬 수 있다.

[0161] 마이오스타틴은 또한 제2형 당뇨병, 비인슐린 의존성 당뇨병, 과혈당증, 및 비만을 포함하는 대상 장애에 영향을 미치는 것으로 보인다. 예를 들어, 마이오스타틴 결핍은 두 가지 마우스 모델의 비만 및 당뇨병 표현형을 개선하는 것으로 나타났다(Yen et al. FASEB J. 8:479 (1994)). 본 내용의 svActRIIB 폴리펩타이드는 상기 대사를 장애를 치료하는데 적합하다. 그러므로, 본 발명의 조성물을 투여하는 것은 적합한 대상에서 당뇨병, 비만, 및 고혈당 상태를 개선할 것이다. 또한, 상기 svActRIIB 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 비만인 개체의 음식 섭취를 감소시킬 수 있다.

[0162] 본 발명의 안정화된 ActRIIB 폴리펩타이드를 투여하는 것은 골 강도를 개선하고 골다공증 및 다른 퇴행성 골질환을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 마이오스타틴-결핍 마우스는 마우스 상완골(humerus)의 미네랄 함량 및 밀도의 증가 및 근육이 붙은 부위에서 지주골(trabecular bone) 및 피질골(cortical bone) 모두의 미네랄 함량의 증가 뿐만 아니라 근육량 증가를 나타낸 것으로 밝혀졌다(Hamrick et al. Calcif Tissue Int 71(1):63-8 (2002)). 또한, 본 발명의 svActRIIB 조성물은, 예를 들어, 전립선암 치료에 사용된 안드로겐 차단 치료요법과 같은 경우에 안드로겐 차단의 효과를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0163] 본 발명은 또한 유효량의 svActRIIB 단백질을 동물에게 투여함으로써 동물의 근육량을 증가시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 성숙한 C-말단 마이오스타틴 폴리펩타이드는 시험된 모든 종에서 유사하거나 동일하므로, svActRIIB 폴리펩타이드는 소, 닭, 칠면조, 및 돼지를 포함하는 농업상 중요한 임의의 종에서 순수근육량을 증가시키고 지방을 감소시키는데 효과적인 것으로 예상될 수 있다.

[0164] 본 발명의 svActRIIB 폴리펩타이드 및 조성물은 또한 하기 시험관내 검정에서 나타난 바와 같이, 액티빈 A의 활성을 상쇄시킨다. 액티빈 A는 특정 유형의 암, 특히 난소 암종과 같은 생식선 종양에서 발현되며, 중증 악액질을 유발하는 것으로 알려져 있다(Ciprano et al. Endocrinol 141 (7):2319-27 (2000), Shou et al., Endocrinol 138 (11):5000-5 (1997); Coerver et al, Mol Endocrinol 10(5):534-43 (1996); Ito et al. British J Cancer 82(8):1415-20 (2000), Lambert-Messerlian, et al, Gynecologic Oncology 74:93-7 (1999)). 그러므로, 본 내용의 조성물은 특정 암 및 특정 생식선 유형 종양의 치료로 인한 악액질과 같은, 액티빈 A 과발현 뿐만 아니라 마이오스타틴 발현과 관련된 상태를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0165] 또한, 본 발명의 svActRIIB 폴리펩타이드는 많은 검정에서 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11을 검출하고 정량화하는데 유용하다. 일반적으로, 본 발명의 안정화된 ActRIIB 폴리펩타이드는, 예를 들어 문헌[Asai, ed., Methods in Cell Biology, 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., New York (1993)]에 언급된 것과 유사한, 여러 가지 검정에서 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11에 결합하여 고정화시키는 포획제로 유용하다. 상기 폴리펩타이드는 몇 가지 방식으로 표지될 수 있으며, 마이오스타틴을 검출하고 정량화하기 위해 표지된 항체와 같은 제3분자와 반응할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드 또는 제3분자는 바이오틴과 같은 검출 가능한 부분을 이용하여 변형될 수 있으며, 이는 이후 효소-표지된 스트렙타비딘, 또는 다른 단백질과 같은 제4분자에 의해 결합될 수 있다(Akerstrom, J Immunol 135:2589 (1985); Chaubert, Mod Pathol 10:585 (1997)).

[0166] 본 발명은 하기 실시예를 통해 상세하게 설명되나, 이는 단지 예시를 위한 것이며 본 발명의 범주를 제한하고자

하는 것은 아니다.

- [0168] 실시예 1
- [0169] svActRIIB 폴리펩타이드의 발현 및 정제
- [0170] 안정화된 ActRIIB 폴리펩타이드를 발현하고 정제하기 위해 하기 방법이 사용되었다.
- [0171] 인간 액티빈 타입 IIB 수용체의 cDNA를 인간 고환 유래의 cDNA 라이브러리(Clontech, Inc.)로부터 단리하고, 본원에 참고로써 통합되어 있는 미국 특허출원 제11/590,962호, 미국 출원공개 제2007/0117130호에 기재된 것과 같이 클로닝하였다.
- [0172] 하기 방법을 사용하여 svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 10), 및 ActRIIB-Fc(E28W)(SEQ ID NO: 21)를 생성하였다. svActRIIB를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 5), 또는 ActRIIB를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(E28W)(SEQ ID NO: 19)를, 28 위치에서 E의 W로의 아미노산 치환, 및 44 위치에서 S의 T로의 아미노산 치환을 유발하는 변이를 함유하는 프라이머를 이용하여, PCR 오버랩 연장(PCR overlap extension)을 이용하여 힌지 링커 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(SEQ ID NO: 26)를 통해, 인간 IgG2 Fc를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(SEQ ID NO: 22)에 융합시켰다. 전체 폴리뉴클레오티드 서열은 svActRIIB-IgG Fc(E28W, S44T)의 경우 SEQ ID NO: 9이고, ActRIIB-ActRIIB-IgG Fc(E28W)의 경우 SEQ ID NO: 20이다. 이중 가닥 DNA 단편을 벡터 pTT5(Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada (NRCC), 6100 Avenue Royalmount, Montreal (Quebec) Canada H4P 2R2), pDSR α(WO/9014363호에 기술됨) 및/또는 pDSR α의 유도체 내로 서브클로닝하였다.
- [0173] 안정화된 ActRIIB-Fc 폴리펩타이드의 일시적 발현을 하기와 같이 수행하였다.
- [0174] svActRIIB-IgG Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 10), 및 ActRIIB-IgG Fc(E28W)(SEQ ID NO: 21) 폴리펩타이드를, 250 µg/ml 제네티신(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 및 0.1% 플루로닉 F68(Invitrogen)이 첨가된 프리스타일™(FreeStyle™) 배지(Invitrogen)에서 유지된 무혈청 현탁액 적응된 293-6E 세포(National Research Council of Canada, Ottawa, Canada)에서 일시적으로 발현시켰다. 형질감염을 1L 배양액으로서 수행하였다. 간략하게, 상기 세포 접종원을 4L 페른바크(fernbach) 셰이크 플라스크(Corning, Inc.)에서 1.1×10^6 세포/ml로 성장시켰다. 상기 셰이크 플라스크 배양액을 65 RPM에서 이노바(Innova) 2150 셰이커 플랫폼(News Brunswick Scientific, Edison, NJ) 상에 유지시켰고, 이를 37℃ 및 5% CO₂에 유지된 습식 배양기에 두었다. 형질감염시, 293-6E 세포를 1.0×10^6 세포/ml로 희석하였다.
- [0175] 상기 형질 복합체를 100 ml 프리스타일™ 293 배지(Invitrogen)에서 형성시켰다. 1 mg 플라스미드 DNA를 우선 배지에 첨가한 다음, 3 ml의 FuGene HD 형질감염 시약(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)을 첨가하였다. 상기 형질감염 복합체를 상온에서 약 15분간 배양한 다음, 셰이크 플라스크에 있는 세포에 첨가하였다. 형질감염 20시간 후, 20%(w/v)의 펩톤 TN1(OrganoTechnie S.A., TeknieScience, QC, Canada)을 최종 농도 0.5% (w/v)에 도달하도록 첨가하였다. 형질감염/발현을 4-7일간 수행하였고, 이후, 상기 조건 배지를 4℃에서 60분간 4,000 RPM에서 원심분리하여 회수하였다.
- [0176] 안정적인 형질감염 및 발현을 하기와 같이 수행하였다. 표준 전기천공 과정을 사용하여 안정한 CHO 숙주 세포를 svActRIIB-IgG Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 9) 또는 ActRIIB-IgG Fc(E28W)(SEQ ID NO: 20)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 플라스미드로 형질감염시켜 상기 svActRIIB-IgG-Fc 세포주를 제조하였다. 상기 발현 플라스미드로 숙주 세포를 형질감염시킨 후, 상기 세포를 GHT 없이 무혈청 선별 배지에서 2~3주간 성장시켜 플라스미드를 선별하고 세포를 회수하였다. 세포는 85% 이상의 생존율을 달성할 때까지 선별된다. 그리고 나서, 형질감염된 세포의 풀(pool)을 150 nM 메토타렉세이트를 함유하는 배지에서 배양하였다.
- [0177] 6일 발현 검정에서, svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 발현 세포의 풀은 ActRIIB-Fc(E28W) 발현 세포의 풀에 비교하여 더 높은 세포 역가, 성장능, 및 생산된 단백질의 개선된 특이적 생산성(picogram/세포/일)을 나타내었다. 선별 풀은, ActRIIB-Fc(E28W)의 경우 0.9 g/리터를 생산한데 반해, svActRIIB-Fc(E28W, S44T)의 경우 약 1.2 g/리터를 생산하였다.
- [0178] svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 및 ActRIIB-Fc(E28W) 발현 세포주 각각을 전형적인 유가배양 공정을 이용하여 확대

시켰다. 세포를 웨이브 생물반응기(Wave bioreactor, Wave Biotech LLC) 내로 접종하였다. 볼루스 공급으로 3 회 유가배양하였다. 10일째에 10 L를 회수하고, 나머지는 11일째에 회수하였고, 두 가지 회수물을 내부여과(depth filtration)시킨 다음, 멸균 여과시켰다. 상기 조건 배지를 10인치 0.45/0.2 마이크론 예비필터를 통해 여과시킨 다음, 6인치 0.2 마이크론 필터를 통해 여과시켰다.

[0180] 단백질 정제

[0181] 약 5 L의 조건 배지를 직접 220mL MabSelect™ 컬럼 단백질 A 컬럼(GE Healthcare) 상으로 로딩하였다. 상기 컬럼을 PBS(인산완충식염수: 2.67 mM 염화칼륨, 138 mM 염화나트륨, 1.47 mM 제1인산칼륨, 8.1 mM 제2인산나트륨, pH 7.4) 중에서 전-평형화시켰다. 상기 컬럼을 OD280에서 측정값이 대략 0일 때까지 평형화 완충액으로 세척한 다음, 상기 단백질을 0.1M 아세트산으로 용출시켰다.

[0182] 맵셀렉트(Mabselect™) 풀을 300mL SP-HP 컬럼(GE Healthcare)(5 x 15 cm)에 적용시켰다. 상기 컬럼을 10mM NaOAc, pH 5로 전-평형화시켰다. 그리고 나서, 상기 컬럼을 OD280에서 측정값이 대략 0일 때까지 평형화 완충액으로 세척하였다. 상기 컬럼을 10 mM NaOAc, pH 5 중에 0-150 mM NaCl로부터 20 컬럼 부피의 농도구배 완충액으로 용출시켰다. 상기 SP-HP 풀을 농축하고 0.2μm 셀룰로오스 아세테이트(Corning) 필터로 여과하였다.

[0183] 사용된 단백질의 서열이 하기 표에 제시되어 있다.

ActRIIB-Fc	ActRIIB 서열	링커- хин지	IgG2 Fc
svActRIIB-IgG ₂ Fc (E28W, S44T) (SEQ ID NO: 10)	ETRWCIYYNANWELERT NQTLGERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKG CWLDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNE RFTHLPEAGGPEVTYEP PTAPT (SEQ ID NO: 6)	GGGGSV ECPPCP (SEQ ID NO: 27)	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO:22)
ActRIIB-IgG ₂ Fc (E28W) (SEQ ID NO: 21)	ETRWCIYYNANWELERT NQSLGERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKG CWLDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNE RFTHLPEAGGPEVTYEP PTAPT (SEQ ID NO: 19)	GGGGSV ECPPCP (SEQ ID NO: 27)	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22)

[0184]

[0185] 실시예 2

[0186] 폴리펩타이드의 특성규명

[0187] 전술한 바와 같이, 맵셀렉트™ 단계를 통해 정제된 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 10), 및 SP-HP 컬럼 단계를 통해 정제된 ActRIIB-Fc(E28W)(SEQ ID NO: 21) 폴리펩타이드의 시료들을 PBS, pH 7.4를 이용하여 0.2 mg/ml로 희석하였다. 그리고 나서, 상기 폴리펩타이드의 당화 프로파일 하기 기술된 바와 같은 SEC를 이용하여 결정하였다.

[0189] 크기 배제 크로마토그래피(SEC). 일련의 두 컬럼(TOSHAAS G3000swx1, 7.8 x 300 mm)을 갖는 아질런트(Agilent) 1100 HPLC 시스템 상에서 실험을 수행하였다. 2x PBS를 0.5 ml/분에서 이동상으로 사용하였다.

[0191] 도 1은 전술한 프로토콜을 이용하여 SEC 컬럼 상에서 ActRIIB-Fc(E28W) 및 svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 간의 비교를 나타낸다. 세 개의 피크를 나타내는 ActRIIB-Fc(E28W)에 비교하여, svActRIIB-Fc(E28W, S44T)는 단일 피크를 나타낸다. 이들은 양 단백질의 Fc 이합체의 N42 위치에서 N-결합된 당화의 정도에 해당한다. svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 폴리펩타이드의 단일 피크는 이합체의 N42 위치에서 완전히 당화된 N-결합된 아스파라긴에 해당한다. ActRIIB-Fc(E28W)의 세 개의 피크(왼쪽부터 오른쪽)는 N42에서 완전히 당화된 아스파라긴, N42에서 부분적으로 당화된 아스파라긴, 및 N42에서 당화되지 않은 아스파라긴에 해당한다. 그러므로, 이는 svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 분자가 ActRIIB-Fc(E28W)에 비해 완전히 당화되며, 이는 이러한 당화 부위와 관련하여 불균일하므로, 정제하기 더 어렵다는 것을 입증한다. 또한, 예비 연구는 svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 분자가 하기 제시된 바와 같이 개선된 제조용이성 특성을 갖는다는 것을 보여준다. 부가적인 연구 역시 ActRIIB-Fc(E28W)의 가장 적게 당화된 피크가 부분적으로 그리고 완전히 당화된 분자보다 낮은 물리적 및 열 안정성을 갖는다는 것을 입증한다.

[0192] 액티빈 A, 마이오스타틴, 및 GDF-11에 대한 상기 수용체 폴리펩타이드의 K_D 및 IC_{50} 값을 하기에 기술한 바와 같이 얻었다.

[0194] KinEx ATM 평형 검정

[0195] KinExATM 기술(Sapidyne Instruments, Inc.)을 이용한 용액-기반 평형-결합 검정을 사용하여, ActRIIB-Fc 폴리펩타이드에 결합하는 리간드의 해리 평형 상수(K_D)를 결정하였다. 울트라링크 바이오서포트 비드(UltraLink Biosupport beads, Pierce)를 하룻밤동안 각각 약 100 μ g/ml의 마이오스타틴, GDF-11, 및 액티빈 A로 예비코팅한 다음, BSA로 블로킹하였다. 1 pM 및 3 pM의 ActRIIB-Fc(E28W)(SEQ ID NO: 21) 및 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 10) 시료를 상기 리간드-코팅된 비드를 통과시키기 전 8 시간 동안 상온에서 시료 완충액 중에서 각각 다양한 농도(0.7 fM 내지 160 pM)의 마이오스타틴, 액티빈 A, 및 GDF-11과 함께 배양하였다. 상기 비드-결합된 가용성 수용체의 양을 슈퍼블록(superblock) 중에서 1 mg/ml의 형광(Cy5) 표지된 염소 항-인간-Fc 항체에 의해 정량화하였다. 상기 결합 신호는 주어진 마이오스타틴, 액티빈 A, 또는 GDF-11 농도와 평형인 자유 가용성 수용체의 농도에 비례한다. KinEx ATM 소프트웨어(Sapidyne Instruments, Inc.)에 제공된 이중-곡선 일-부위 균일 결합 모델(dual-curve one-site homogeneous binding model)을 이용하여 경쟁 커브의 비선형 회귀로부터 K_D 를 얻었다. 각각에 대해 얻은 상기 K_D 값이 하기 표에 제시되어 있다.

	마이오스타틴	GDF-11	액티빈 A
ActRIIB-Fc (E28W)	0.1 pM	0.1 pM	0.2 pM
svActRIIB-Fc (E28W, S44T)	0.1pM	0.1 pM	0.1 pM

[0196]

[0197] C2C12 세포 기반 활성 검정

[0198] 액티빈 A, GDF-11, 또는 마이오스타틴이 야생형 액티빈 IIB 수용체-Fc에 결합하는 것을 억제하는, ActRIIB-Fc(E28W)(SEQ ID NO: 21) 및 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 10)의 능력을 하기에 기술된 바와 같이 세포 기반 활성 검정을 이용하여 시험하였다.

[0199] C2C12 근아세포(ATCC No: CRL-1772)를 pMARE-luc 컨스트럭트로 형질감염시켜 마이오스타틴/액티빈/GDF-11-반응성 리포터 세포주를 생성하였다. 상기 pMARE-luc 컨스트럭트는 마이오스타틴/액티빈 반응 요소(Dennler et al. EMBO 17: 3091-3100 (1998))를 나타내는, CAGA 서열의 12개 반복(repeat)을 TATA 박스의 상부의 pLuc-MCS 리포터 벡터(Stratagene cat # 219087) 내로 클로닝함으로써 제조된다. C2C12 세포는 그들의 세포 표면 상에 액티빈 수용체 IIB를 자연적으로 발현한다. 마이오스타틴/액티빈 A/GDF-11이 상기 세포 수용체에 결합하는 경우, Smad 경로가 활성화되며, 인산화된 Smad는 상기 반응 요소에 결합하여(Macias-Silva et al. Cell 87:1215 (1996)), 루시페라아제 유전자를 발현시킨다. 이후, 제조사 프로토콜에 따라 시판중인 루시페라아제 리포터 검정 키트(cat # E4550, Promega, Madison, WI)를 이용하여 루시페라아제 활성을 측정하였다. pMARE-luc(C2C12/pMARE)로

형질감염된 안정한 C2C12 세포주를 사용하여 하기 과정에 따라 활성을 측정하였다. 리포터 세포를 96 웰 배양액 내로 접종하였다. 전술한 바와 같이 구축된 ActRIIB-IgG2 Fc 융합의 희석물을 이용한 스크리닝을 4 nM 액티빈 A, 마이오스타틴, 및 GDF-11에 고정된 농도를 이용하여 수행하였다. 이들 리간드 각각을 몇 가지 농도의 수용체와 함께 예비 배양하였다. 처리된 배양액 중의 루시페라아제 활성을 결정함으로써 활성을 측정하였다. 각 폴리펩타이드에 대하여 IC₅₀ 값을 결정하였다. 이들은 하기 표에 나타나 있다. 이들 값은 하기 표에 제시되어 있다.

	마이오스타틴	GDF-11	액티빈 A
ActRIIB-Fc (E28W)	0.95 nM	2.4 nM	3.2 nM
svActRIIB-Fc (E28W, S44T)	1.07 nM	2.4 nM	3.6 nM

[0200]

[0201]

따라서, 상기 세포 기반 활성은 ActRIIB-Fc(E28W) 및 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)의 경우 대략적으로 동일하다.

[0203]

낮은 pH에서의 안정성

[0204]

낮은 pH에서의 단백질의 안정성은 단백질의 제조용이성을 고려할때 유용한 매개변수인데, 상업적인 생산 공정 중 바이러스 불활성화 단계가 일반적으로 낮은 pH, 예컨대 약 pH 3.0 내지 4.0 사이에서 수행되기 때문이다.

[0205]

상업적인 단백질 정제 중 바이러스 불활성화 단계 동안에 겪게된 낮은 pH에서의 단기간 단백질 안정성 효과를 평가하기 위해, 하기 시험을 수행하였다. 각 단백질을 100 mM 아세트산나트륨(pH 3.5) 중에서 10 mg/ml로 희석하였다. 이를 25℃에서 보관하였고, SEC 검정을 이용하여 시간 0, 2시간 및 24시간에 검정하였다. SEC 검정은 전술한 바와 같이 수행되었고, 고분자량 응집물의 퍼센트를 결정하였다.

[0206]

HMW 응집 (%)

	T = 0	T = 2 시간 (hr)	T = 4 시간 (hr)
ActRIIB-Fc (E28W)	1.53	1.36	13.74
svActRIIB-Fc (E28W, S44T)	1.66	2.17	8.93

[0207]

[0208]

따라서, pH 3.5에서 생성된 고분자량 응집물의 퍼센트는 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)의 경우 4시간에 ActRIIB-Fc(E28W)에 비해 실질적으로 적다.

[0209]

추가 연구는 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)가 pH 3.0, 3.5 및 5.0의 노출로부터 ActRIIB-Fc(E28W)보다 더 좋은 가역성을 나타내었다는 것과, svActRIIB-Fc(E28W, S44T)가 모든 pH에서 ActRIIB-Fc(E28W)보다 더 균일하였다는 것을 보여주었다.

[0210]

따라서, svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 폴리펩타이드는, 액티빈 A, 마이오스타틴, 및 GDF-11 활성을 억제하는 능력은 유지하면서, ActRIIB-Fc(E28W)에 비해 개선된 제조 용이성, 특히 낮은 pH에서의 개선된 안정성 및 모든 pH에서 보다 큰 균일성을 갖는 것으로 입증된다.

[0211]

실시예 3

[0212]

생체내 효능의 결정

[0213]

11주령 암컷 C57B1/6 마우스를 찰스 리버 실험실(Charles River Laboratories)로부터 구입하였다. 마우스(그룹당 10마리)에 단일 용량(10 mg/kg)의 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 10) 또는 매질(vehicle, PBS)을 투여하였다. 각 그룹의 10마리의 동물에 대해 용량 투여 후 3, 7, 10 및 14일에 NMR(PixImus, GE LUNAR Corporation)에 의해 체지방량(lean body mass)을 결정하였다. 각 세트의 마우스에 대한 결과도 도 2에 나타나 있다. 단일 용량의 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)가 동물에서 체지방량을 현저히 증가시킨 것으로 볼 수 있다(P<0.001, 반복된 측정 ANOVA에 기초함. 그룹당 n=10마리).

[0214]

용량-반응 효능을 결정하기 위한 연구를 하기와 같이 수행하였다. PBS 중에 증가하는 단일 용량의 0, 0.3, 3,

10, 및 30 mg/kg의 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 10)를 암컷 10-12주령 C57Bl/6 마우스(Charles River Laboratories)에 피하로 투여하였다. 6마리 동물들은 초기에 PBS 대조 그룹을 포함하는 각 투여 그룹에 있었다. 상기 42일간의 연구 동안 2 내지 4일마다 NMR(PIXImus, GE LUNAR Corporation)에 의해 체지방량을 결정하였다. 각 주의 끝에, 각 그룹에서 한 마리의 동물을 희생시켜 추가 데이터(6 그룹 모두로부터 총 각각 6주에 6마리)를 얻고, 이후 남아있는 동물에 대해 체지방량을 결정하였다. 상기 결과들은 도 3에 제시되어 있다. 모든 용량에서, svActRIIB-Fc(E28W, S44T) 폴리펩타이드는 용량-의존적인 방식으로 근육량을 현저히 증가시켰다.

[0215] 추가 연구에서, ActRIIB-Fc(E28W)(SEQ ID NO: 21) 및 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 10) 간의 머리 대 머리 비교를 암컷 C57Bl/6 마우스(Charles River Laboratories, 그룹당 10마리) 상에서 수행하여 대조그룹(PBS 투여)과 비교하여 단일 용량의 10 mg/kg의 각 가용성 수용체의 투여 후 순수근육량 증가 및 체중 변화를 측정하였다. 체지방량을 NMR(PIXImus, GE LUNAR Corporation)에 의해 결정하였고, 체중 변화를 37일간 정기적으로 동물의 체중을 제어 결정하였다. 상기 비교 연구 후기의 결과는 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 10)의 경우 25%의 순수근육량 증가 및 20%의 체중 증가에 비해, 대조 그룹의 경우 5%의 순수근육량 증가 및 9%의 체중 증가에 비해, ActRIIB-Fc(E28W)(SEQ ID NO: 21)가 24%의 순수근육량 증가 및 25%의 체중 증가를 나타내었다는 것이었다.

[0216] 그러므로, svActRIIB-Fc(E28W, S44T)는 개선된 제조용이성 특징을 가지면서, ActRIIB-Fc(E28W)에 비교하여 비슷한 생체내 효능을 갖는 것으로 볼 수 있다.

[0217] 실시예 4

[0218] 변형된 힌지 링커를 이용한 개선된 제조용이성

[0219] 부가적인 링커 및 변형된 힌지 영역을 구축하여, 안정화된 ActRIIB(E28W, S44T) 폴리펩타이드의 단백질 발현 및 제조용이성의 추가적인 개선에 대해 시험하였다. 힌지 링커 #1의 변형에 기초한 변형된 링커/힌지 서열을 문헌 [Mikaelian et al., Methods in Molecular Biology, 57, 193-202 (1996)], 및 널리 알려진 방법에 따라, 오버랩 연장 PCR 변이형성법을 이용하여 생성하였다.

[0220] IgG2 Fc 융합과 잘 작동하도록 설계된 상기 변형된 힌지 링커들은 (힌지 링커 #1 서열과 비교하여) 하기에 제시된 힌지 링커 #2-7이다.

[0221] 힌지 링커 #1 폴리뉴클레오티드

[0222] ggagggggaggatctgtcgagtgcccaccgtgcca (SEQ ID NO: 26).

[0224] 힌지 링커 #1 폴리펩타이드

[0225] GGGGSVECPPCP (SEQ ID NO: 27)

[0227] 힌지 링커 #2 폴리뉴클레오티드

[0228] ggagggggaggatctgagcgcaaatgttgtgtcgagtgcccaccgtgc (SEQ ID NO: 37)

[0230] 힌지 링커 #2 펩타이드

[0231] GGGGSERKCCVECPPC (SEQ ID NO: 38)

[0233] 힌지 링커 #3 폴리뉴클레오티드

[0234] ggagggggaggatctggtggagtggttcaggtccaccgtgc (SEQ ID NO: 39)

[0236] 힌지 링커 #3 펩타이드

- [0237] GGGGSGGGSGPPC (SEQ ID NO: 40)
- [0239] 힌지 링커 #4 폴리뉴클레오티드
- [0240] ggagggggaggatctggtggagtggttcaggtccaccggga (SEQ ID NO: 41)
- [0242] 힌지 링커 #4 펩타이드
- [0243] GGGGSGGGSGPPG (SEQ ID NO: 42)
- [0245] 힌지 링커 #5 폴리뉴클레오티드
- [0246] ggagggggaggatctgagcgcaaatgtccacctgtgtcgagtccccaccgtgc (SEQ ID NO: 43)
- [0248] 힌지 링커 #5 펩타이드
- [0249] GGGGSERKCPPCVCPPC (SEQ ID NO: 44)
- [0251] 힌지 링커 #6 펩타이드
- [0252] GPASGGPASGPPCP (SEQ ID NO: 45)
- [0254] 힌지 링커 #7 펩타이드
- [0255] GPASGGPASGCPPCVCPPCP (SEQ ID NO: 46)
- [0257] 하기 힌지 링커 #8 내지 #10은 설계되어 IgG1Fc (SEQ ID NO: 23) 또는 이하에 주어진 변형된 IgG1Fc (이하의 SEQ ID NO: 47)와 함께 잘 수행된다.
- [0258] 변형된 IgG1 Fc
- [0259] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENN
- [0260] YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47)
- [0262] 힌지 링커 #8 펩타이드
- [0263] GGGGSVDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 48)
- [0265] 힌지 링커 #9 펩타이드
- [0266] GGGGSVDKTHTGPPCP (SEQ ID NO: 49)
- [0268] 힌지 링커 #10 펩타이드

[0269] GGGSGGGGSVDKTHTGPPCP (SEQ ID NO: 50)

[0271] svActRIIB-Fc(28W, S44T)를 이용한 변형된 힌지 링커 서열의 시험을 하기와 같이 수행하였다. svActRIIB를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(E28W, S44T)(SEQ ID NO: 5), 상기 나타낸 변형된 힌지 링커를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 IgG2 Fc를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(SEQ ID NO: 22) 또는 IgG1 Fc(SEQ ID NO: 23) 또는 변형된 IgG1 Fc(SEQ ID NO: 47)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를, 하기 변화: 문헌[Durocher et al., Nucleic Acids Research 30, No. 3, e9 (2002)]에 기술된 바와 같이 프리스타일 293 배지 대신에 1.1 mg/ml 플루로닉, 6 mM L-글루타민 및 25 µg/ml 제네티신(Invitrogen)이 첨가된 F17 배지(Invitrogen)를 사용한 것을 제외하고, 실시예 1에 기술된 바와 같은 배지 내로 서브클로닝시키고, 실시예 1에 기술된 바와 같은 일시적 293-6E 발현 시스템을 이용하여 발현시켰다. 상기 배양액을 형질감염 후 37°C에서 7일간 성장시켰다. 분취량을 원심분리하여 세포를 제거하고, 상등액을 가열하기 이전에 로딩 완충액과 혼합하여 웨스턴 블롯 검정을 위해 4-20% 트리스-글리신 겔로 로딩하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 이전시킨 후, 시료를 1:1000의 희석으로 과산화수소 결합된 항-인간 Fc 항체(Pierce #31423)로 탐색하였다.

[0272] 하기 과정을 이용하여 단백질을 정제하였다. svActRIIB-Fc 변이체를 함유하는 약 0.25 L의 조건 배지를 5 ft² 10K 막 접선 유동 필터(tangential flow filter)를 이용하여 농축하였다. 상기 농축물을 PBS(염화마그네슘 또는 염화칼슘이 없는 둘베코(Dulbecco))로 평형화된 5 mL 단백질 고성능 컬럼™(GE Healthcare)에 적용하였다. 280 nm에서의 흡광도(OD₂₈₀)가 0.1 미만일 때까지 평형화 완충액으로 컬럼을 세척한 후, 결합된 단백질을 0.1 M 글리신-HCl, pH 2.7로 용출시키고, 즉시 1 M Tris-HCl, pH 8.5로 중화시켰다..

[0273] 하기 방법에 의해 응집물 부분의 퍼센트 및 반 분자(half molecule) 부분의 퍼센트를 결정하였다. 일련로 두 개의 크기 배제 컬럼(TOSHAAS G3000swx1)을 갖는 HPLC 시스템 상에 각 시료의 50 µL 분취물을 주입하여 변성화 크기 배제 크로마토그래피 실험을 수행하였다. 이동상은 인산완충식염수(PBS) 중에 5 M GuHCl을 함유한다. 모든 시료를 7 M GuHCl을 갖는 PBS 중에서 1 mg/mL로 희석하였다. 응집물 부분의 퍼센트는 주된 피크 이전에 용출된 피크들의 총 피크 면적으로부터 결정되는 반면, 반-분자 부분의 퍼센트는 주된 피크 이후에 용출된 피크들의 총 피크 면적으로부터 결정된다. 상기 반-분자는 불활성 반-분자를 나타내는 것으로 여겨진다.

[0274] 다양한 힌지 링커를 갖는 svActRIIB-Fc(E28W, S44T)의 응집물 및 반-분자 분포가 하기 표에 제시되어 있다.

힌지 링커 서열	% 응집물	% 반(half) 분자
GGGGSVECPPC (SEQ ID NO: 27)	0.63	15.12
GGGGSERKCCVECPPC (SEQ ID NO: 38)	15.01	7.19
GGGSGGGSGGPPC (SEQ ID NO: 40)	0.56	3.83
GGGSGGGSGGPPG (SEQ ID NO: 42)	0.00	99.03
GGGGSERKCPPCVCPPC (SEQ ID NO: 44)	1.09	3.81

[0275]

[0276] 이와 같이, 특정 링커들은 생성된 불활성 반-분자의 퍼센트를 감소시킴으로써 이들 예비 시험에 따라 안정화된 ActRIIB-Fc(E28W, S44T)의 제조용이성을 개선시킬 수 있다.

[0277] 하기 표는 서열 목록에 열거된 바와 같은 서열을 확인한다.

SEQ ID NO	기술
1	ActRIIB 세포외 도메인, 폴리뉴클레오티드
2	ActRIIB 세포외 도메인, 폴리펩타이드
3	svActRIIB (E28W, S44T) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 있음
4	svActRIIB (E28W, S44T) 폴리펩타이드, 신호 서열 있음
5	svActRIIB (E28W, S44T) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 없음
6	svActRIIB (E28W, S44T) 폴리펩타이드, 신호 서열 없음
7	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 있음
8	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 폴리펩타이드, 신호 서열 있음
9	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 없음
10	svActRIIB-Fc (E28W, S44T) 폴리펩타이드, 신호 서열 없음
11	svActRIIB (E28Y, S44T) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 있음
12	svActRIIB (E28Y, S44T) 폴리펩타이드, 신호 서열 있음
13	svActRIIB (E28Y, S44T) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 없음
14	svActRIIB (E28Y, S44T) 폴리펩타이드, 신호 서열 없음
15	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 있음
16	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 폴리펩타이드, 신호 서열 있음
17	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 없음
18	svActRIIB-Fc (E28Y, S44T) 폴리펩타이드, 신호 서열 없음
19	ActRIIB (E28W) 폴리펩타이드, 신호 서열 없음
20	ActRIIB-Fc (E28W) 폴리뉴클레오티드, 신호 서열 없음
21	ActRIIB-Fc (E28W) 폴리펩타이드, 신호 서열 없음
22	IgG2Fc 폴리펩타이드 서열
23	IgG1Fc 폴리펩타이드 서열
24	IgG4 Fc 폴리펩타이드 서열
25	링커 아미노산 서열

[0278]

26	한지 링커 #1 폴리뉴클레오티드 서열
27	한지 링커 #1 펩타이드 서열
28	한지 구역 IgG2
29	한지 구역 IgG1
30	한지 구역 IgG4
31	대체 신호 서열, 폴리펩타이드
32	신호 서열, 폴리펩타이드
33	야생형 ActRIIB 등록 NP_001097
34	엑티빈 폴리펩타이드 서열
35	마이오스타틴 폴리펩타이드 서열
36	GDF-11 폴리펩타이드 서열
37	한지 링커 서열 #2 폴리뉴클레오티드
38	한지 링커 서열 #2 펩타이드
39	한지 링커 서열 #3 폴리뉴클레오티드
40	한지 링커 서열 #3 펩타이드
41	한지 링커 서열 #4 폴리뉴클레오티드
42	한지 링커 서열 #4 펩타이드
43	한지 링커 서열 #5 폴리뉴클레오티드
44	한지 링커 서열 #5 펩타이드
45	한지 링커 서열 #6 펩타이드
46	한지 링커 서열 #7 펩타이드
47	변형된 IgG1 Fc 폴리펩타이드 서열
48	한지 링커 서열 #8 펩타이드
49	한지 링커 서열 #9 펩타이드
50	한지 링커 서열 #10 펩타이드

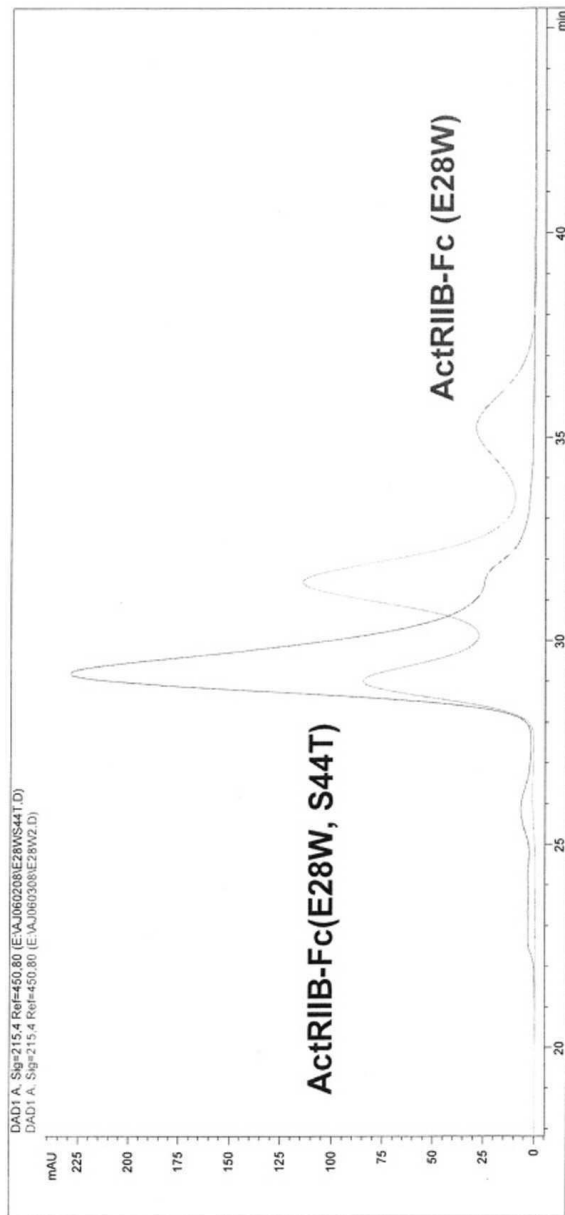
[0279]

[0280]

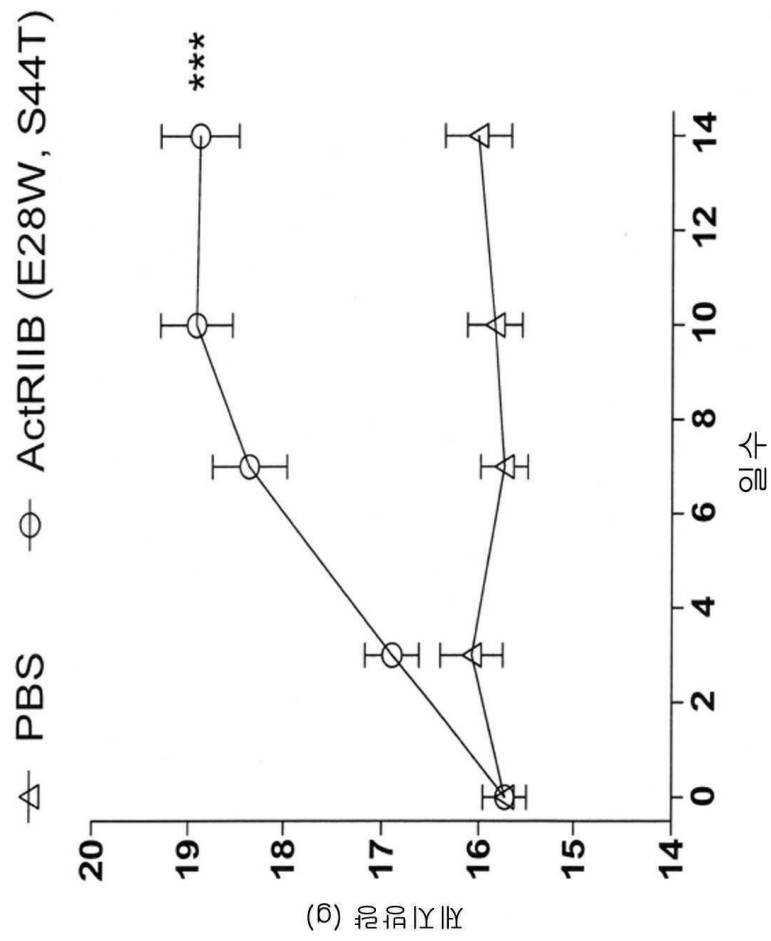
본 발명의 범주는 본원에 기술된 특정 구체예에 의해 한정되어서는 안되며, 이는 본 발명의 각각의 측면 중 한 가지 예에 불과하며, 기능적으로 동등한 방법 및 성분들이 본 발명의 범주에 속한다. 실제로, 본원에 제시되고 기술된 것 이외에, 다양한 변형은 전술한 설명 및 첨부된 도면으로부터 당해 기술분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 그러한 변형은 첨부된 청구항의 범주에 속하는 것으로 의도된다.

도면

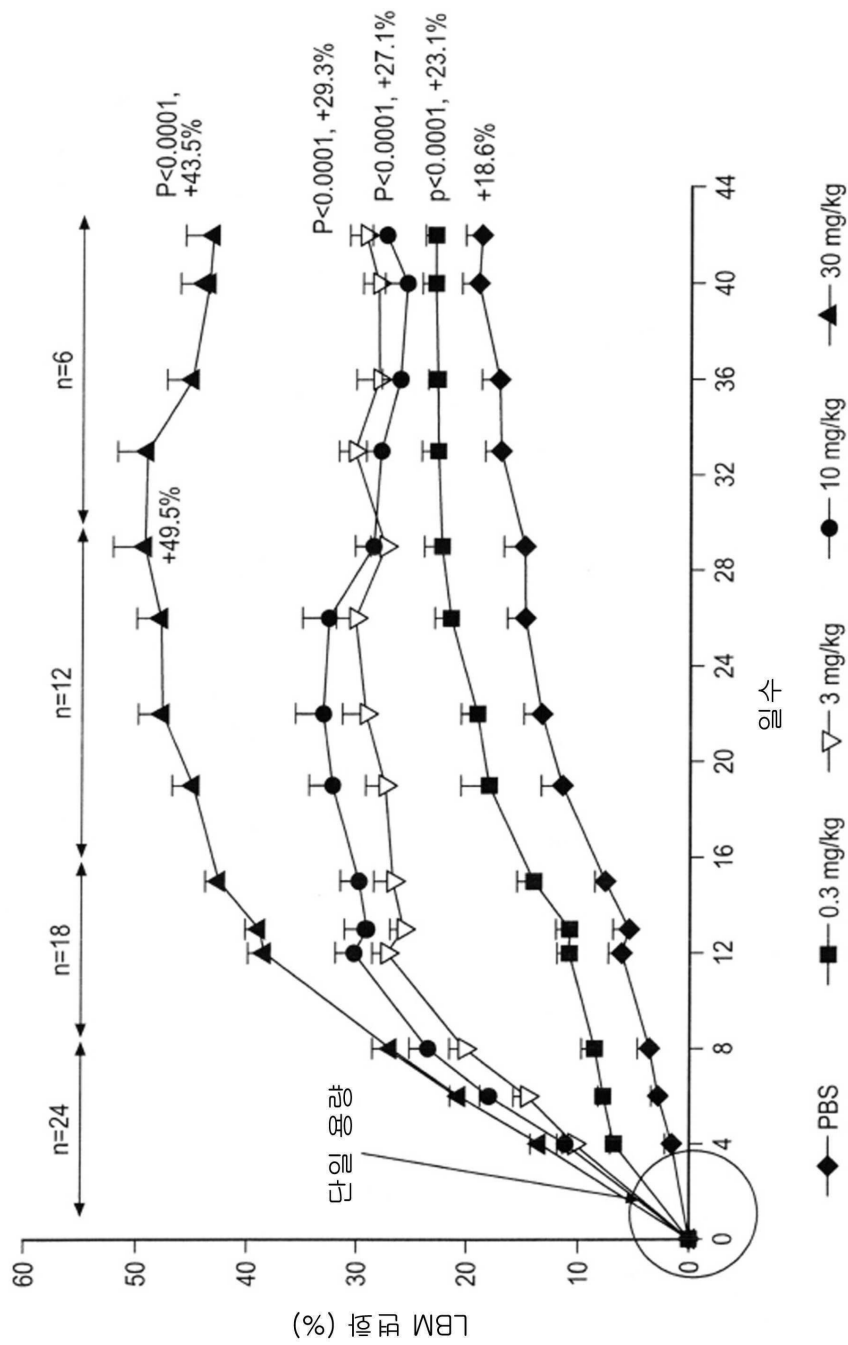
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN INC.

SUN, Jeonghoon

TAM, Lei-Ting Tony

MICHAELS, Mark Leo

BOONE, Thomas C.

DESHPANDE, Rohini

LI, Yue-Sheng

HAN, HQ

<120> STABILIZED RECEPTOR POLYPEPTIDES AND USES THEREOF

<130> A-1450-WO-PCT

<140> to be assigned

<141> 2009-11-24

<150> 61/200,250

<151> 2008-11-26

<150> 61/259,060

<151> 2009-11-06

<160> 50

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 402

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(402)

<400> 1

atg acg gcg ccc tgg gtg gcc ctc gcc ctc ctc tgg gga tgc ctg tgc 48

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

1 5 10 15

gcc ggc tct ggg cgt ggg gag gct gag aca cgg gag tgc atc tac tac 96

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

20 25 30

aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc 144

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

35 40 45

tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc 192

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

50 55 60

aac agc tct ggc acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat 240

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

65 70 75 80

gac ttc aac tgc tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac 288

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn

85 90 95

ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc 336

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg

100 105 110

ttc act cat ttg cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca 384

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro

115 120 125

ccc ccg aca gcc ccc acc 402

Pro Pro Thr Ala Pro Thr

130

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn

85	90	95	
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg			
100	105	110	
Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro			
115	120	125	
Pro Pro Thr Ala Pro Thr			
130			
<210> 3			
<211> 387			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220><221> CDS			
<222> (1)..(387)			
<400> 3			
atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt	48		
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly			
1 5 10 15			
gtc cag tgt gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag	96		
Val Gln Cys Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu			
20 25 30			
ctg gag cgc acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag	144		
Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln			
35 40 45			
gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc	192		
Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr			
50 55 60			
atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac	240		
Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr			
65 70 75 80			
gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc	288		
Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe			

85	90	95	
tgc tgc tgt gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca			336
Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro			
100	105	110	
gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc			384
Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro			
115	120	125	
acc			387

Thr

<210> 4

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

100	105	110	
Glu	Ala	Gly	Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
115	120	125	

Thr

<210> 5

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 5

gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc 48
Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15

acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg 96
Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30

ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc 144
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
35 40 45

gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag 192

Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60

gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt 240
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
65 70 75 80

gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg 288
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly

85 90 95
ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc acc 330
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr
100 105 110

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg

1 5 10 15

Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg

20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu

35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln

50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys

65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly

85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr

100 105 110

<210> 7

<211> 1071

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1071)

<400> 7

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

gtc cag tgt gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag 96

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

20 25 30

ctg gag cgc acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag 144

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

35	40	45	
gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc			192
Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr			
50	55	60	
atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac			240
Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr			
65	70	75	80
gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc			288
Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe			
85	90	95	
tgc tgc tgt gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca			336
Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro			
100	105	110	
gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc			384
Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro			
115	120	125	
acc gga ggg gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct			432
Thr Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro			
130	135	140	
gtg gca gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc			480
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
145	150	155	160
ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg			528
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
165	170	175	
agc cac gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg			576
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
180	185	190	
gag gtg cat aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc			624

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

195 200 205

acg ttc cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg 672

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu

210 215 220

aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc 720

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

225 230 235 240

ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca 768

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

245 250 255

cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag 816

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

260 265 270

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc 864

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

275 280 285

gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca 912

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

290 295 300

cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc 960

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

305 310 315 320

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 1008

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

325 330 335

gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc 1056

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

340 345 350

ctg tct ccg ggt aaa

1071

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 8

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr

65 70 75 80

Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe

85 90 95

Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro

100 105 110

Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro

115 120 125

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
195 200 205

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
225 230 235 240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
260 265 270

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

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys
355

<210> 9

<211> 1014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1014)

<400> 9

gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc 48

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15

acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg	96
Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg	
20 25 30	
ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc	144
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu	
35 40 45	
gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag	192
Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln	
50 55 60	
gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt	240
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys	
65 70 75 80	
gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg	288
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly	
85 90 95	
ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc acc gga ggg	336
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly	
100 105 110	
gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga	384
Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly	
115 120 125	
ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc	432
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	
130 135 140	
tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa	480
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	
145 150 155 160	
gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat	528
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	

165	170	175	
aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt			576
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg			
180	185	190	
gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag			624
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
195	200	205	
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag			672
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
210	215	220	
aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac			720
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
225	230	235	240
acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg			768
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
245	250	255	
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg			816
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
260	265	270	
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg			864
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met			
275	280	285	
ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac			912
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
290	295	300	
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat			960
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
305	310	315	320
gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg			1008

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325 330 335

ggt aaa 1014

Gly Lys

<210> 10

<211> 338

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg

1 5 10 15
 Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
 35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys

65 70 75 80
 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 115 120 125

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

130 135 140
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 145 150 155 160

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 165 170 175

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
180 185 190

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

195 200 205
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
210 215 220

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
225 230 235 240

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
245 250 255

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

260 265 270
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
275 280 285

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
290 295 300

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
305 310 315 320

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

325 330 335
Gly Lys

<210> 11

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(387)

<400> 11

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

gtc cag tgt gag aca cgg tac tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag 96
Val Gln Cys Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu

20 25 30
ctg gag cgc acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag 144
Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln

35 40 45
gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc 192
Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr

50 55 60

atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac 240
Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr

65 70 75 80
gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc 288
Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe

85 90 95
tgc tgc tgt gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca 336

Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro

100 105 110
gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc 384
Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro

115 120 125
acc 387
Thr

<210> 12
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu
20 25 30

Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln
35 40 45

Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr
50 55 60

Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
65 70 75 80

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

Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro
100 105 110

Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
115 120 125

Thr

<210> 13

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 13

gag aca cgg tac tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc 48

Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15

acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg 96

Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30

ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc 144

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
35 40 45

gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag 192
Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln

50 55 60
gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt 240
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys

65 70 75 80
gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg 288
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly

85 90 95

ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc acc 330
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr

100 105 110

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

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

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

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr
100 105 110

<210> 15
 <211> 1071
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(1071)
 <400> 15
 atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 gtc cag tgt gag aca cgg tac tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag 96
 Val Gln Cys Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu
 20 25 30
 ctg gag cgc acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag 144
 Leu Glu Arg Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln
 35 40 45
 gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc 192
 Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr
 50 55 60
 atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac 240
 Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
 65 70 75 80
 gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc 288
 Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe
 85 90 95
 tgc tgc tgt gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca 336
 Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro
 100 105 110
 gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc 384
 Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
 115 120 125

acc gga ggg gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct 432

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
130 135 140

gtg gca gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc 480

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145 150 155 160

ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg 528

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

165 170 175

agc cac gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg 576

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180 185 190

gag gtg cat aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc 624

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
195 200 205

acg ttc cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg 672

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
210 215 220

aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc 720

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
225 230 235 240

ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca 768

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245 250 255

cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag 816

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
260 265 270

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc 864

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

275 280 285
gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca 912
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290 295 300
cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc 960
Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305 310 315 320

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 1008
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
325 330 335
gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc 1056
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350
ctg tct ccg ggt aaa 1071

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 16

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr

65 70 75 80

Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe

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

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
340 345 350
Leu Ser Pro Gly Lys
355
<210
> 17
<211> 1014
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(1014)
<400> 17
gag aca cgg tac tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc 48
Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15
acc aac cag acc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg 96
Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30
ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc 144
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
35 40 45
gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag 192
Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60
gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt 240
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
65 70 75 80
gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg 288
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
85 90 95
ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc acc gga ggg 336
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly

100	105	110	
gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga			384
Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly			
115	120	125	
ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc			432
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
130	135	140	
tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa			480
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
145	150	155	160
gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat			528
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
165	170	175	
aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt			576
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg			
180	185	190	
gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag			624
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
195	200	205	
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag			672
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
210	215	220	
aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac			720
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
225	230	235	240
acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg			768
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
245	250	255	
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg			816
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
260	265	270	

gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg 864
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
275 280 285
ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac 912
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
290 295 300
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat 960
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
305 310 315 320
gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg 1008
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325 330 335
ggt aaa 1014
Gly Lys
<210> 18
<211> 338
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Glu Thr Arg Tyr Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
1 5 10 15
Thr Asn Gln Thr Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
20 25 30
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu
35 40 45
Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys
65 70 75 80
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly

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

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

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

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

<210> 19

<211> 110

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg

1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg

20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu

35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln

50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys

65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly

85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr

100 105 110

<210> 20

<211> 1014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1014)

<400> 20

gag aca cgg tgg tgc atc tac tac aac gcc aac tgg gag ctg gag cgc 48

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg

1 5 10 15

acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag cag gac aag cgg 96

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg

20	25	30	
ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc acc atc gag ctc			144
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu			
35	40	45	
gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc tac gat agg cag			192
Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln			
50	55	60	
gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac ttc tgc tgc tgt			240
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys			
65	70	75	80
gag ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg cca gag gct ggg			288
Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly			
85	90	95	
ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca gcc ccc acc gga gga			336
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly			
100	105	110	
gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga			384
Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly			
115	120	125	
ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc			432
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
130	135	140	
tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa			480
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
145	150	155	160
gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat			528
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
165	170	175	
aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt			576
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg			

180	185	190	
gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag			624
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
195	200	205	
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag			672
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
210	215	220	
aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac			720
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
225	230	235	240
acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg			768
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
245	250	255	
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg			816
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
260	265	270	
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg			864
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met			
275	280	285	
ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac			912
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
290	295	300	
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat			960
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
305	310	315	320
gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg			1008
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
325	330	335	
ggt aaa			1014

Gly Lys

<210> 21

<211> 338

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu Thr Arg Trp Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg

1 5 10 15

Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg

20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu

35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln

50 55 60

Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys

65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly

85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly

100 105 110

Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg

180 185 190

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

195 200 205
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 210 215 220
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

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

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

<210> 22

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

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

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 23

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Ile Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Gly Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215
<210> 24
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

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

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

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

 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215
 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Linker
 <400> 25
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<220><221> CDS

<222> (1)..(36)

<400> 26

gga ggg gga gga tct gtc gag tgc cca ccg tgc cca

36

Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Ser Lys Thr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

Pro Gly

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10 15

Ala Gly

<210> 33

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

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

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

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

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
450 455 460

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

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
500 505 510

<210> 34

<211> 426

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Pro Leu Leu Trp Leu Arg Gly Phe Leu Leu Ala Ser Cys Trp Ile

1 5 10 15

Ile Val Arg Ser Ser Pro Thr Pro Gly Ser Glu Gly His Ser Ala Ala

20 25 30

Pro Asp Cys Pro Ser Cys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Lys Asp Val Pro

35 40 45

Asn Ser Gln Pro Glu Met Val Glu Ala Val Lys Lys His Ile Leu Asn

50 55 60

Met Leu His Leu Lys Lys Arg Pro Asp Val Thr Gln Pro Val Pro Lys

65 70 75 80

Ala Ala Leu Leu Asn Ala Ile Arg Lys Leu His Val Gly Lys Val Gly

85 90 95

Glu Asn Gly Tyr Val Glu Ile Glu Asp Asp Ile Gly Arg Arg Ala Glu

100 105 110

Met Asn Glu Leu Met Glu Gln Thr Ser Glu Ile Ile Thr Phe Ala Glu

115 120 125

Ser Gly Thr Ala Arg Lys Thr Leu His Phe Glu Ile Ser Lys Glu Gly

130 135 140

Ser Asp Leu Ser Val Val Glu Arg Ala Glu Val Trp Leu Phe Leu Lys

145 150 155 160

Val Pro Lys Ala Asn Arg Thr Arg Thr Lys Val Thr Ile Arg Leu Phe

165 170 175

Gln Gln Gln Lys His Pro Gln Gly Ser Leu Asp Thr Gly Glu Glu Ala

180 185 190

Glu Glu Val Gly Leu Lys Gly Glu Arg Ser Glu Leu Leu Leu Ser Glu

195 200 205

Lys Val Val Asp Ala Arg Lys Ser Thr Trp His Val Phe Pro Val Ser

210 215 220

Ser Ser Ile Gln Arg Leu Leu Asp Gln Gly Lys Ser Ser Leu Asp Val

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

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

 355 360 365
 His Ser Thr Val Ile Asn His Tyr Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe
 370 375 380
 Ala Asn Leu Lys Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser
 385 390 395 400
 Met Leu Tyr Tyr Asp Asp Gly Gln Asn Ile Ile Lys Lys Asp Ile Gln
 405 410 415
 Asn Met Ile Val Glu Glu Cys Gly Cys Ser
 420 425

 <210> 35
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15

Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
20 25 30
Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
35 40 45
Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
50 55 60
Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu
65 70 75 80
Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val
85 90 95
Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
100 105 110
Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu
115 120 125
Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
130 135 140
Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
145 150 155 160
Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
165 170 175
Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
180 185 190
Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
195 200 205
Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
210 215 220
Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
225 230 235 240
Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
245 250 255
Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys

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

 305 310 315 320
 Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
 325 330 335
 Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 340 345 350
 Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
 355 360 365
 Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 370 375

<210> 36

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 37

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<220><221> CDS

<222> (1)..(48)

<400> 37

gga ggg gga gga tct gag cgc aaa tgt tgt gtc gag tgc cca ccg tgc 48

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<220><221> CDS

<222> (1)..(42)

<400> 39

gga ggg gga gga tct ggt gga ggt ggt tca ggt cca ccg tgc 42

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Cys

1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Cys

1 5 10

<210> 41

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<220><221> CDS

<222> (1)..(42)

<400> 41

gga ggg gga gga tct ggt gga ggt ggt tca ggt cca ccg gga 42

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Gly

1 5 10

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<400> 42

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Pro Gly

1 5 10

<210> 43

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<220><221> CDS

<222> (1)..(54)

<400> 43

gga ggg gga gga tct gag cgc aaa tgt cca cct tgt gtc gag tgc cca 48

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Pro Pro Cys Val Glu Cys Pro

1 5 10 15

ccg tgc 54

Pro Cys

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<400> 44

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Pro Pro Cys Val Glu Cys Pro

1 5 10 15

Pro Cys

<210> 45

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Hinge linker
 <400> 45
 Gly Pro Ala Ser Gly Gly Pro Ala Ser Gly Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Hinge linker
 <400> 46
 Gly Pro Ala Ser Gly Gly Pro Ala Ser Gly Cys Pro Pro Cys Val Glu
 1 5 10 15
 Cys Pro Pro Cys Pro
 20
 <210>
 47
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

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

180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hinge linker

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Gly Pro Pro Cys Pro

1	5	10	15
<210> 50			
<211> 21			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> Hinge linker			
<400> 50			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr			
1	5	10	15
Gly Pro Pro Cys Pro			
20			