



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월17일
(11) 등록번호 10-2253597
(24) 등록일자 2021년05월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)
- (21) 출원번호 10-2015-7016986
- (22) 출원일자(국제) 2014년01월24일
심사청구일자 2019년01월17일
- (85) 번역문제출일자 2015년06월25일
- (65) 공개번호 10-2015-0111347
- (43) 공개일자 2015년10월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/012996
- (87) 국제공개번호 WO 2014/116981
국제공개일자 2014년07월31일
- (30) 우선권주장
61/756,996 2013년01월25일 미국(US)
61/915,733 2013년12월13일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W02005033134 A2*
W02009158025 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
샤이어 휴먼 지네틱 테라피즈 인크.
미국 매사추세츠 (우편번호 02421) 렉싱턴 샤이어 웨이 300
- (72) 발명자
미네우, 로셀
미국 02421 매사추세츠 렉싱턴 샤이어 웨이 300
샤이서 휴먼 지네틱 테라피즈 인크. (내)
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 29 항

심사관 : 정혜진

(54) 발명의 명칭 **듀켄씨 근이영양증의 치료에서의 폴리스타틴**

(57) 요약

본 발명은 무엇보다도 근이영양증, 특히 듀켄씨 근이영양증(DMD)을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 따른 방법은 DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징이 강도, 중증도 또는 빈도 감소되거나, 발병 지연되도록 DMD를 앓거나 이에 걸리기 쉬운 개체에 유효량의 제조함 폴리스타틴 단백질을 투여하는 단계를 포함한다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/4703 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

듀켄씨 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy: DMD)을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서,
 DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징이 강도, 중증도 또는 빈도 감소되거나, 발병 지연되도록 10개 이상의 아미노산을 포함하는 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인과 융합된 서열 번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하는, 유효량의 재조합 폴리스타틴 단백질을 포함하며,
 상기 펩티드 링커는 서열 번호 5, 6, 또는 7의 아미노산 서열을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 1의 212번 내지 288번 아미노산 잔기의 결실을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Fc 도메인은
 EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호 3)와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 10
 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVPV
 CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGL
 AYEGKCI SISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMHEALHN
 YTQKLSLSLSPGK(서열 번호 10), 또는 서열 번호 11
 GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVPV
 CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGL
 AYEGKCI SISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHHTCPPCPAP
 PPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호 11)과 동일한 아미노산 서열을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 포유동물 세포로부터 제조된 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 인간 세포인 약제학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 HT1080 세포인 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 전신으로 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 전신 투여는 정맥내, 진피내, 흡입, 경피(국소), 안와내, 피하, 근육내, 경구 및 경점막 투여로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 전신 투여는 정맥내 투여인 약제학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 전신 투여는 피하 투여인 약제학적 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 전신 투여는 경구 투여인 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 2달 1회, 1달 1회, 3주 1회, 2주 1회, 1주 1회, 1일 1회 또는 다양한 간격으로 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 14

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 하기 표로부터 선택된 하나 이상의 골격근으로 전달되는 약제학적 조성물:

안륜근			
안와내: 모양체, 홍채 확대근, 홍채 산대근			
귀: 컷바퀴근, 측두두정근, 등자근, 고막 장근			
코: 눈살근, 코근, 콧구멍 확대근, 코끝 내림근, 상순비익거근			
입: 입꼬리 올림근, 입꼬리 내림근, 입둘레근			
협근	대협골근 소협골근	및 광경근	상순거근
아랫입술 내림근	소근	이근	눈썹 주름근
주근	원희내근	회외근	상완근
저작의 근육			
교근	측두근	내측 익돌근	외측 익돌근
혀 및 목의 근육			
턱설근	경돌설근	구개설근	부대설근
이복근	붓목빨근	하학설골근	이설골근
건갑설골근	홍골설골	홍골갑상근	갑상설골근
목빚근	전사각근	중사각근	후사각근
흉곽, 흉대 및 팔의 근육			
쇄골하근	대흉근	소흉근	복직근
외복사근	내복사근	복횡근	횡격막
외늑간근	내늑간근	전거근	승모근
건갑거근	대마름근	소마름근	광배근
삼각근	건갑하근	극상근	극하근
대원근	소원근	오혜완근	
팔 및 어깨			
상완 이두근-장두	상완 이두근-단두	상완 삼두근-장두	상완 삼두근-외측두
상완 삼두근-내측두	주근	원희내근	회외근
상완근			
상완 근육: 배쪽 및 등쪽			
상완 요골근	요측 수근 굴근	측측 수근 굴근	장장근
척측 수근 신근	장요측 수근 신근	단요측 수근 신근	상지신근
소지신근	척추 기립근: 경근막	척추 기립근: 극근	척추 기립근: 최장근
척추 기립근: 장늑근			
손의 내재성 근육: 무지구, 단무지 외전근, 단무지 굴근 및 무지 대립근			
손의 내재성 근육: 소지구, 소지 외전근, 단소지 굴근 및 소지 대립근			
손의 내재성 근육: 장측 골간근, 배측 골간근 및 벌레근			

하지대 및 다리의 근육			
장요근: 대요근	장요근: 장골근	대퇴방형근	장내전근
단내전근	대내전근	박근	봉공근
대퇴방형근: 대퇴직근	대퇴방형근: 외측광근	대퇴방형근: 내측광근	대퇴방형근: 중간광근
비복근	장비골근(종아리 근)	족저근	대전근
중둔근	소둔근	슬괵근: 대퇴이두근: 장두	슬괵근: 대퇴이두근: 단두
슬괵근: 반건양근	슬괵근: 반막근	대퇴근막 장근	치골근
전경골근			
앞다리 및 발의 근육			
장지신근	장모지 신근	단비골근	적척근
후경골근	장모지굴근	단지신근	단무지신근
무지의전근	단무지굴근	소지 외전근	소지굴근
소지 대립근	단지신근	발의 중앙근	족척방형근 또는 족저방형근
단지 굴근	배측 골간근	저측골간근	

청구항 15

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 횡격막(diaphragm), 삼두근(triceps), 족저근(soleus), 전경골근(tibialis anterior), 비복근(gastrocnemius), 장지신근(extensor digitorum longus), 복부 직근(rectus abdominus) 및 대퇴사두근(quadriceps)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 표적 조직으로 전달되는 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 심장으로 전달되는 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질은 횡격막, 삼두근, 족저근, 전경골근, 비복근, 장지신근, 복부 직근 및 대퇴사두근으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 심근 및 골격근으로부터 선택되는 하나 이상의 표적 조직으로 전달되는 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질의 투여는 근육 재생, 근육 강도 증가, 유연성 증가, 이동 범위 증가, 체력 증가, 피로 감소, 혈류 증가, 인지 개선, 폐 기능 개선, 염증 저해, 근육 섬유증 감소 및 근육 괴사 감소로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 발생시키는 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 단백질의 투여는 근육 섬유증 및 괴사의 감소로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 발생시키는 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항, 제2항 및 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징은 근육 소모, 근육 약화, 근육 노쇠, 근육 괴사, 근육 섬유증, 관절 구축, 골격 변각, 심근증, 연하 손상, 장관 및 방광 기능 손상, 근육 허혈, 인지 손상, 거동 이상, 사회화 손상, 척추측만증 및 호흡기 기능 손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 21

재조합 폴리스타틴 융합 단백질로서,

폴리스타틴 폴리펩타이드;

Fc 도메인; 및

상기 폴리스타틴 폴리펩타이드를 Fc 도메인과 회합시키는 링커를 포함하되,

상기 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질과 동일한 서열 번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하고; 상기 링커는 서열번호 5, 6, 또는 7의 아미노산 서열을 포함하고; 추가로 상기 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 액티빈, 마이오스타틴 및 GDF-11로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상에 결합할 수 있고, 0.5일 내지 10일의 범위의 생체내 반감기를 갖는 재조합 폴리스타틴 융합 단백질.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 폴리스타틴 폴리펩타이드는 서열 번호 1의 212번 내지 288번 아미노산 잔기의 결실을 포함하는 재조합 폴리스타틴 융합 단백질.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인인 재조합 폴리스타틴 융합 단백질.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 Fc 도메인은

EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호 3)와 동일한 아미노산 서열을 갖는 재조합 폴리스타틴 융합 단백질.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 서열 번호 8

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGVPV
CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGL
AYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDDEDQDYS
FPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP
EVTVCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호 8),
또는 서열 번호 9

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGVPV
CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGL
AYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDDEDQDYS
FPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번
호 9)와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 폴리스타틴 융합 단백질.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 서열 번호 10

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGVPV
CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGL
AYEGKCI SISEDTEEEEDDEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHTCPPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY
TQKLSLSLSPGK(서열 번호 10), 또는 서열 번호 11

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG
CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS
AYEGKCSISEDTEEEEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPEPKSCDKTHTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHE
ALHNHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호 11)와 동일한 아미노산 서열을 포함하는 재조합 폴리스타틴 용합 단백질.

청구항 27

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항의 재조합 폴리스타틴 용합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하
는 핵산.

청구항 28

제27항의 핵산을 포함하는 세포.

청구항 29

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항의 재조합 폴리스타틴 용합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하
는, 듀켄씨 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy: DMD)을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본원은 2013년 1월 25일자로 출원된 미국 특허출원 제61/756,996호 및 2013년 12월 13일자로 출원된 미국 특허출원 제61/915,733호(이의 개시내용은 그 전문이 명세서에 포함됨)로부터의 우선권을 주장한다.

배경 기술

[0003] 듀켄씨 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy: DMD)은 근육 퇴행 및 결과적으로 사망을 발생시키는 근이영양증의 열성 X 염색체 관련 형태이다. 상기 장애는 세포막의 디스트로글리칸 복합체(dystroglycan complex: DGC)에 구조적 안정성을 제공하는 근육 조직 내의 중요한 구조적 성분인 단백질 디스트로핀을 코딩하는 인간 X 염색체에 위치한 디스트로핀 유전자에서의 돌연변이에 의해 발생한다. 디스트로핀은 내부 세포질 액틴 필라멘트 네트워크 및 세포의 기질을 연결시켜, 근육 섬유에 물리적 강도를 제공한다. 따라서, 디스트로핀의 변경 또는 부재는 비정상적인 근형질 막 기능을 발생시킨다. 사람의 성별 둘 다가 돌연변이를 보유할 수 있지만, 남성이 통상적으로 조기 불능 및 사망률로 중증 표현형을 갖는 반면, 돌연변이를 보유한 여성은 통상적으로 훨씬 더 약한 표현형을 나타낸다.

[0004] 현재, DMD에 대해 공지된 치유는 없다. 유전자 치료 및 코르티코스테로이드의 다양한 투여 프로토콜을 포함하는 많은 치료학적 방안이 조사 중에 있다. 이들 치료 중 몇몇은 소정의 징후 및 증상을 지연시킬 수 있지만, DMD 환자에 대한 만족스러운 치료학적 옵션은 현재 없다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 무엇보다도 폴리스타틴 단백질 치료에 기초한 근이영양증, 특히 듀켄씨 근이영양증(DMD) 및/또는 베커 근이영양증(Becker muscular dystrophy)을 치료하기 위한 개선된 방법 및 조성물을 제공한다. 하기 실시예에 서를 비롯하여 본 명세서에 기재된 바대로, 본 발명의 발명자들은 DMD 동물 모델로의 재조합 폴리스타틴 단백질 (예를 들어, 폴리스타틴-Fc 재조합 융합 단백질)의 전신 투여가 DMD의 특징적인 증상인 근육 섬유증 및/또는 괴사의 감소 및 신체에 걸친 다양한 조직에서의 효과적인 근육 성장을 발생시킨다는 것을 처음으로 입증하였다. 또한, 본 발명의 발명자들은 본 발명에 따른 폴리스타틴-Fc 융합 단백질이 최대 약 5일의 연장된 혈청 반감기를 갖는다는 것을 또한 입증하였다. 어떠한 이론에 구속되고자 함이 없이, 예상치 못하게 긴 혈청 반감기가 더 우수한 생체내 효능에 기여할 수 있는 것으로 고려된다. 실제로, 본 발명 전에, 폴리스타틴은 마이오스타틴 및 액티빈의 조절자인 것으로 공지되었고, 이들 둘 다 근육 성장의 중요한 음성 조절자이다. 그러나, 본 발명 전에, 폴리스타틴이 특히 짧은 혈청 반감기를 가져, 단백질 치료제로서 폴리스타틴을 개발하기 위한 중요한 장애를 구성한다고 보고되었다. 예를 들어, 통상적인 상업적으로 구입 가능한 야생형 폴리스타틴(FS315) 단백질은 약 1시간의 혈청 반감기를 갖는다. Fc-융합 단백질은 폴리스타틴의 혈청 반감기를 연장시키도록 사용된다. 그러나, 큰 크기의 Fc 도메인 및 비교적 작은 크기의 폴리스타틴 단백질로 인해, 폴리스타틴 단백질에 대한 Fc 도메인의 직접 융합은 야생형 폴리스타틴 단백질의 정상 구조 및 기능을 방해할 수 있다고 생각된다. 폴리스타틴의 보고된 불량한 약동학/약역학(PK/PD) 특성 및 폴리스타틴-Fc 융합 단백질과 관련된 불확실성은 과학자 및 임상학자가 DMD 또는 다른 근이영양증에 대한 단백질 치료제로 폴리스타틴을 추가로 개발하지 못하게 한다. 실제로, 본 발명 전에, 유전자 치료는 DMD에 대한 폴리스타틴 기반 치료에 초점을 둔다. 본 발명의 발명자들이 발견한 예상치

못하게 더 우수한 생체내 효능 및 반감기는 처음으로 폴리스타틴이 DMD의 치료에 대한 효과적인 단백질 치료제 일 수 있다는 것을 확립한다.

[0006] 일 양상에서, 본 발명은 듀켄씨 근이영양증(DMD)을 치료하는 방법으로서, DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징이 강도, 중증도 또는 빈도 감소되거나, 발병 지연되도록 DMD를 앓거나 이에 걸리기 쉬운 개체에 유효량의 재조합 폴리스타틴 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징은 근육 소모, 근육 약화, 근육 노쇠, 관절 구축, 골격 변각, 근육의 지방 침윤, 비수축성 조직에 의한 근육의 대체(예를 들어, 근육 섬유증), 근육 괴사, 심근증, 연하 손상, 장관 및 방광 기능 손상, 근육 허혈, 인지 손상 기능(예를 들어 학습 장애, 더 높은 신경행동 장애의 위험, 인지 결함), 거동 이상, 사회화 손상, 척추측만증 및 호흡기 기능 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0007] 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질

[0008] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVP CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGL AYEKGKICAKSCEDIQCTGGKCLWDFKVGGRCSLCELDPCDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKHSGSCNSISEDTEEEEDQDYS FPISSILEW(서열 번호 1)과 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질 서열 번호 1과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질 서열 번호 1과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질 서열 번호 1과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질 서열 번호 1과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질 서열 번호 1과 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질과 비교하여 하나 이상의 결실, 돌연변이 또는 삽입을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 (도메인 3에 상응하는) 서열 번호 1의 212번 내지 288번 아미노산 잔기의 결실을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 헤파린 결합 부위를 포함한다.

[0011] 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 듀켄씨 근이영양증(DMD)을 치료하는 방법으로서, DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징이 강도, 중증도 또는 빈도 감소되거나, 발병 지연되도록 DMD를 앓거나 이에 걸리기 쉬운 개체에 유효량의 재조합 폴리스타틴 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하고, 재조합 폴리스타틴 단백질은

[0012] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVP CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGL AYEKGKICISEDTEEEEDQDYSFPISSILEW(서열 번호 2)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 2와 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 2와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 2와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 2와 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] 몇몇 실시형태에서, DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징은 근육 소모, 근육 약화, 근육 노쇠, 근육 비대증, 근육 가성비대, 관절 구축, 골격 변각, 심근증, 연하 손상, 장관 및 방광 기능 손상, 근육 허혈, 인지 손상, 거동 이상, 사회화 손상, 척추측만증 및 호흡기 기능 손상으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0015] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 Fc 도메인에 융합된다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 Fc 도메인은

[0016] EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 3); 또는

- [0017] KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK(서열 번호 4); 또는
- [0018] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK(서열 번호 14)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0019] 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인은 서열 번호 3, 서열 번호 4 또는 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인은 서열 번호 3, 서열 번호 4 또는 서열 번호 14와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인은 서열 번호 3, 서열 번호 4 또는 서열 번호 14와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0020] 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 연장된 혈청 반감기를 발생시키는 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 결합을 개선하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 인간 IgG1의 Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 및/또는 Asn 434에 상응하는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 돌연변이 H433K(His433Lys) 및/또는 N434F(Asn434Phe)를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 돌연변이 H433K(His433Lys) 및 N434F(Asn434Phe)의 돌연변이를 편입시키는 하기 기재된 서열을 포함한다:
- [0021] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEAL~~K~~FHYHTQKSLSLSPGK(서열 번호 15).
- [0022] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 링커를 통해 Fc 도메인에 융합된다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 3개 내지 100개의 아미노산을 포함하는 펩타이드이다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 ALEVL FQGP로 이루어진 링커가 아니다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 10개 내지 100개, 10개 내지 90개, 10개 내지 80개, 10개 내지 70개, 10개 내지 60개, 10개 내지 50개, 10개 내지 40개, 10개 내지 30개, 10개 내지 20개, 10개 내지 15개의 아미노산을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 적어도 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개 또는 95개의 아미노산을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG 링커, 서열 번호 5)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG2 링커, 서열 번호 6)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG3 링커, 서열 번호 7)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 서열 번호 5, 서열 번호 6 또는 서열 번호 7과 동일한 서열을 포함한다.
- [0023] 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 폴리스타틴 폴리펩타이드, Fc 도메인 및 폴리스타틴 폴리펩타이드와 Fc 도메인을 회합시키는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개 또는 95개)의 아미노산의 길이의 링커를 포함하는 재조합 폴리스타틴 융합 단백질을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 폴리스타틴 폴리펩타이드, Fc 도메인 및 폴리스타틴 폴리펩타이드를 Fc 도메인과 회합시키는 링커를 포함하는 재조합 폴리스타틴 융합 단백질을 제공하고, 링커는 ALEVL FQGP로 이루어진 링커가 아니다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 액티빈, 마이오스타틴 및/또는 GDF-11에 결합할 수 있고, 약 0.5일 내지 10일의 범위의 생체내 반감기를 갖는다.
- [0024] 특정한 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 8 또는 서열 번호 9
- [0025] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSEKCECSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKIKRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG PV CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVYQGRCKKTRDVFVCPGSSCTVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGL

AYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYS
 FPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 8)

[0026] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTL FKWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPV
 CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRS IGL
 AYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYS
 FPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번
 호 9)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또
 는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 특정한 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 10 또는 서열 번호 11

[0028] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTL FKWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPV
 CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRS IGL
 AYEGKCI SISEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK(서열 번호 10)

[0029] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTL FKWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPV
 CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRS IGL
 AYEGKCI SISEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPPEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 11)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,
 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 특정한 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은

[0031] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTL FKWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPV
 CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRS IGL
 AYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYS
 FPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호
 16) 또는

[0032] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTL FKWIMFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPV
 CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRS IGL
 AYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYS
 FPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEE
 M TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK(서열 번호
 17)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는
 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 포유동물 세포로부터 제조된다. 몇몇 실시형
 태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 몇몇 실시형태에서, 포유동물 세포는 중국 햄스터 난소(Chinese
 Hamster Ovary: CHO) 세포 또는 HT1080 세포이다.

[0034] 본 발명의 실시형태가 다양한 경로를 통해 전달될 수 있는 것으로 이해될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 재조합
 폴리스타틴 단백질은 전신으로 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 전신 투여는 정맥내, 진피내, 흡입, 경피(국소),

안와내, 근육내, 피하, 근육내, 경구 및/또는 경점막 투여로부터 선택된다.

- [0035] 실시형태는 다수의 투약 섭생을 통해 투여될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 2달 1회 (bimonthly), 1달 1회(monthly), 3주 1회(triweekly), 2주 1회(biweekly), 1주 1회(weekly), 1일 1회(daily) 또는 다양한 간격으로 투여된다.
- [0036] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 횡문근(예를 들어, 골격근, 심장 근육)으로부터 선택된 하나 이상의 표적 조직으로 전달된다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 심장으로 전달된다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 골격근으로 전달된다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 표 1로부터 선택된 하나 이상의 골격근으로 전달된다. 몇몇 실시형태에서, 횡문근(예를 들어, 골격근)은 삼두근, 전경골근, 족저근, 비복근, 이두박근, 승모근, 삼각근, 대퇴사두근 및 횡격막으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0037] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질의 투여는 근육 재생, 섬유증 감소, 근육 강도 증가, 유연성 증가, 이동 범위 증가, 체력 증가, 피로 감소, 혈류 증가, 인지 개선, 폐 기능 개선, 염증 저해, 근육 섬유증 및/또는 괴사의 감소를 발생시킨다.
- [0038] 다른 양상에서, 본 발명은 본 명세서에서 기재된 다양한 방법으로 사용되는 조성물을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 폴리스타틴 폴리펩타이드, Fc 도메인 및 폴리스타틴 폴리펩타이드를 Fc 도메인과 회합시키는 링커를 포함하는 재조합 폴리스타틴 융합 단백질을 제공하고, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 액티빈, 마이오스타틴 및/또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 약 2일 초과(예를 들어, 약 2.5일 초과, 약 3일, 약 3.5일, 약 4일, 약 4.5일, 약 5일, 약 5.5일, 약 6일)의 생체내 반감기를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 약 2일 내지 10일의 범위(예를 들어, 2.5일 내지 10일, 약 3일 내지 10일, 약 3.5일 내지 10일, 약 4일 내지 10일, 약 4.5일 내지 10일, 약 5일 내지 10일, 약 3일 내지 8일, 약 3.5일 내지 8일, 약 4일 내지 8일, 약 4.5일 내지 8일, 약 5일 내지 8일, 약 3일 내지 6일, 약 3.5일 내지 6일, 약 4일 내지 6일, 약 4.5일 내지 6일, 약 5일 내지 6일의 범위)의 생체내 반감기를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 생체내 반감기는 마우스, 래트, 비인간 영장류 및/또는 인간 중 하나 이상에서 측정된다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 (도메인 3에 상응하는) 서열 번호 1의 212번 내지 288번 아미노산 잔기의 결실을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 황산해파린 결합 부위를 포함한다.
- [0039] 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 폴리스타틴 폴리펩타이드, Fc 도메인 및 폴리스타틴 폴리펩타이드를 Fc 도메인과 회합시키는 링커를 포함하는 재조합 폴리스타틴 융합 단백질을 제공하고, 폴리스타틴 폴리펩타이드는
- [0040] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWIMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPV CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNTRICPEPASSEQYLCCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGL AYEGKCISISEDTEEEEDQDYSFPISILEW(서열 번호 2)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0041] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 액티빈, 마이오스타틴 및/또는 GDF-11에 결합할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 약 2일 초과(예를 들어, 약 2.5일 초과, 약 3일, 약 3.5일, 약 4일, 약 4.5일, 약 5일, 약 5.5일, 약 6일)의 생체내 반감기를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 약 2일 내지 10일의 범위(예를 들어, 약 2.5일 내지 10일, 약 3일 내지 10일, 약 3.5일 내지 10일, 약 4일 내지 10일, 약 4.5일 내지 10일, 약 5일 내지 10일, 약 3일 내지 8일, 약 3.5일 내지 8일, 약 4일 내지 8일, 약 4.5일 내지 8일, 약 5일 내지 8일, 약 3일 내지 6일, 약 3.5일 내지 6일, 약 4일 내지 6일, 약 4.5일 내지 6일, 약 5일 내지 6일의 범위)의 생체내 반감기를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 생체내 반감기는 마우스, 래트, 비인간 영장류 및/또는 인간 중 하나 이상에서 측정된다.

- [0042] 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인은
- [0043] EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 3); 또는
- [0044] KTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 4); 또는
- [0045] DKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 14)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0046] 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 연장된 혈청 반감기를 발생시키는 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 결 합을 개선하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인은 인간 IgG1의 Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 및/또는 Asn 434에 상응하는 하나 이상의 위치 에 서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 돌연변이 H433K(His433Lys) 및 /또는 N434F(Asn434Phe)를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 H433K(His433Lys) 및 N434F(Asn434Phe)의 돌연변이를 편입시키는 하기 기재된 서열을 포함한다:
- [0047] DKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 15).
- [0048] 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 따른 재조합 폴리스타틴 용합 단백질은 링커를 포함하여서, 링커를 통한 Fc 용합 이 해파린에 대한 결합의 부족을 유지시키는 것을 포함하여, 동족 리간드에 대한 폴리스타틴의 결합 특성을 실 질적으로 변경하지 않는다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 링커는 3개 내지 60개의 아미노산을 포함하는 펩타이드 이다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 링커는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개 또는 95개)의 아미노산을 포함하는 펩타이드이 다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 링커는 GAPGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG 링커, 서열 번호 5)와 적어도 50%(예를 들 어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 서열을 포 함한다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 링커는 GAPGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG2 링커, 서열 번호 6)와 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 링커는 GAPGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG3 링커, 서열 번호 7)와 적어도 50%(예를 들 어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 서열을 포 함한다.
- [0049] 특정한 실시형태에서, 본 발명에 의해 제공된 재조합 폴리스타틴 용합 단백질은 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서 열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 16 또는 서열 번호 17과 적어도 50%(예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0050] 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 용합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 용합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 용합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학 적 조성물을 제공한다.
- [0051] 본원에 사용된 대대로, 용어 "약" 및 "대략"은 등가물로서 사용된다. 약/대략 없이 또는 함께 본원에 사용된 임 의의 숫자는 관련 기술의 당업자가 이해하는 임의의 일반 변동을 포괄하도록 의도된다.
- [0052] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 하기하는 상세한 설명에서 명확하다. 그러나, 상세한 설명이, 본 발명의 실시형태를 나타내면서, 오직 예시의 방식으로 제공되고, 제한 없이, 본 발명의 범위 내의 다양한 변경 및 변형 이 상세한 설명으로부터 당해 분야의 당업자에게 명확한 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0053]

도면은 제한이 아니라 오직 예시 목적을 위한 것이다.

도 1은 FS315-Fc가 상업적으로 구입 가능한 가용성 액티빈 수용체(sActRIIB)와 비교하여 Smad 1/5/8 경로를 통한 BMP-9 또는 BMP-10 신호전달을 저해하지 않는다는 것을 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 도 1a는 BMP-9 저해 검정의 예시적인 결과를 나타내고, 도 1b는 BMP-10 저해 검정의 예시적인 결과를 나타낸다.

도 2는 FS315-Fc가 마이오스타틴-및 액티빈 매개 Smad 2/3 신호전달을 저해한다는 것을 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 도 2a는 마이오스타틴 저해 검정의 예시적인 결과를 나타내고, 도 2b는 액티빈 A 저해 검정의 예시적인 결과를 나타낸다.

도 3은 조직에 걸친 PK 프로필을 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 예시적인 폴리스타틴-Fc 단백질은 마우스 혈청에서 약 5일의 혈청 반감기(도 3a), 및 2일 내지 5일의 조직 반감기(도 3b)를 갖는다.

도 4는 1mg/kg의 FS315-mFc에 대한 노출 4주 및 10주 후 및 8mg/kg에 대한 노출 6주 후 대퇴사두근(도 4a), 비복근(도 4b), 전경골근(도 4c) 및 삼두근(도 4d)의 근육 중량에 미치는 예시적인 폴리스타틴-Fc 단백질의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 근육 중량은 기준 신체 중량으로 보정된다.

도 5는 시간에 따른 혈청 폴리스타틴 수준에 대한 예시적인 폴리스타틴-Fc 단백질의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 도 5a는 10주 동안 1mg/kg의 FS315-mFc에 의한 치료 후 혈청에서의 수준을 나타내고, 도 5b는 6주 동안 8mg/kg의 FS315-mFc에 의한 치료 후 혈청에서의 수준을 나타낸다.

도 6은 FS315-mFc, sActRIIB-mFc 또는 PBS 대조군에 대한 노출 후 비복근의 근육 중량에 대한 예시적인 폴리스타틴-Fc 단백질의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 7은 신체 중량에 대한 폴리스타틴 야생형 및 변이체의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 패널 A는 시간에 따른 각각의 그룹에서의 동물의 예시적인 평균 신체 중량을 나타내고, 패널 B는 주사 6주 후 각각의 그룹에서의 동물의 예시적인 평균 신체 중량을 나타낸다.

도 8은 주사 2주 후 주사된 근육의 중량에 대한 폴리스타틴 변이체의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 패널 A는 주사된 근육 비복근의 질량을 나타내고, 패널 B는 주사된 근육 대퇴사두근의 질량을 나타낸다.

도 9는 주사 2주 후 주사된 근육 및 주사 부위로부터 먼 근육에 대한 도메인 3 결실의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 왼쪽 대퇴사두근은 주사 부위인 반면, 오른쪽 대퇴사두근은 대축성 동물내 대조 근육이다.

도 10은 주사 4주 후 주사 부위에서의 특정 근육 및 주사 부위로부터 먼 근육의 중량에 대한 폴리스타틴 변이체의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 패널 A(비복근) 및 패널 B(대퇴사두근)는 주사된 근육이다. 패널 C(전경골근), 패널 D(삼두근) 및 패널 E(횡격막)는 주사 부위로부터 먼 근육이다.

도 11은 주사 4주 후 주사된 근육 및 주사 부위로부터 먼 근육의 중량에 대한 도메인 3 결실의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 왼쪽 대퇴사두근은 주사 부위인 반면, 오른쪽 대퇴사두근은 대축성 동물내 대조 근육이다.

도 12는 (A) 대퇴사두근, (B) 비복근, (C) 전경골근, (D) 삼두근 및 (E) 횡격막에서 주사 2주 후 주사된 근육 및 먼 근육 둘 다에서의 섬유 크기에 대한 폴리스타틴 변이체의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 13은 (A) 대퇴사두근, (B) 비복근, (C) 전경골근, (D) 삼두근 및 (E) 횡격막에서 주사 4주 후 주사된 근육 및 먼 근육 둘 다에서의 섬유 크기에 대한 폴리스타틴 변이체의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 14는 (A) 대퇴사두근, (B) 비복근, (C) 전경골근, (D) 삼두근 및 (E) 횡격막에서 주사 6주 후 주사된 근육 및 먼 근육 둘 다에서의 섬유 크기에 대한 폴리스타틴 변이체의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 15는 노출 4주 후 A) C57 마우스 및 B) mdx 마우스의 비복근에서의 근섬유의 직경에 대한 예시적인 폴리스타틴-Fc 단백질의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 16은 비히클 대조군 동물과 비교하여 노출 2주, 4주, 6주 또는 8주 후 치료된 C57 마우스의 신체 중량에 대한 예시적인 폴리스타틴-Fc 단백질의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 17은 노출 4주 및 8주 후 비히클 대조군 동물에 대한 증가 백분율로서의 치료된 동물의 삼두근 및 대퇴사두

근의 중량에 대한 예시적인 폴리스타틴-Fc 단백질의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 18은 노출 4주 및 8주 후 비히클 대조군 동물에 대한 증가 백분율로서의 치료된 동물의 삼두근 및 대퇴사두근에서의 근섬유의 직경에 대한 예시적인 폴리스타틴-Fc 단백질의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 19는 노출 1주, 3주, 4주, 6주 또는 8주 후 1주 2회 피하 주사를 통해 융합 단백질이 투여된 동물의 혈청에서의 폴리스타틴-Fc 단백질의 예시적인 수준을 나타낸다. 패널 A)는 4주 후 안락사된 동물로부터의 결과를 나타내고, 패널 B)는 노출 8주 후 안락사된 동물로부터의 결과를 나타낸다.

도 20은 노출 6주 또는 12주 후 비히클 대조군 동물과 비교하여 치료된 동물의 대퇴사두근에서 섬유증의 3개의 마커: 알파-平滑근 액틴, 콜라겐 삼중 나선 반복부 함유 1 단백질(cthrc1) 및 콜라겐 I의 mRNA 발현에 대한 폴리스타틴-Fc 단백질의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 21은 6주 동안 비히클 또는 폴리스타틴-Fc 단백질로 치료된 mdx 마우스의 대퇴사두근 및 삼두근 조직의 예시적인 H&E 염색 절편을 나타낸다. C57 대조군 마우스의 대퇴사두근 및 삼두근으로부터의 예시적인 H&E 염색이 또한 도시된다.

도 22는 12주 동안 비히클 또는 폴리스타틴-Fc 단백질로 치료된 mdx 마우스의 대퇴사두근, 삼두근 및 횡격막 조직의 예시적인 콜라겐 I 염색 절편을 나타낸다. C57 대조군 마우스의 대퇴사두근, 삼두근 및 횡격막으로부터의 예시적인 콜라겐 I 염색이 또한 도시된다.

도 23은 대축성 비히클 대조 근육과 비교하여 4주 동안 치료된 C57BL/10 마우스의 근육 중량에 대한 2개의 폴리스타틴 변이체, FS315-mFc 융합 단백질 및 dFSD3-mFc 변이체 융합 단백질 중 하나의 1주 2회 근육내 주사의 효과를 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다.

도 24는 FS315-GAG3-mFc 및 FS315-GAG3-hFc 융합 단백질이 네이티브 FS315와 동일한 정도로 CAGA-루시페라제 검정에서 (A) 마이오스타틴 및 (B) 액티빈 신호전달을 저해한다는 것을 나타내는 예시적인 결과를 나타낸다. 비교하면, 9개의 아미노산 링커를 포함하는 시노 바이올로지컬 FS315-hFc(시노 바이올로지컬 인크(Sino Biological Inc.)사제. 카탈로그 10685-H02H호)는 상당히 덜 강력하다.

도 25는 10mg/kg의 단백질의 단일 SC 주사가 투약된 래트의 혈청에서의 FS315-GAG3-hFc 단백질의 수준을 나타낸다. 계산된 혈청 반감기는 3.5일이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0054] **정의**
- [0055] 본 발명이 더 쉽게 이해되도록, 소정의 용어가 하기 처음에 정의되어 있다. 하기 용어 및 다른 용어에 대한 추가의 정의는 본 명세서에 걸쳐 기재되어 있다.
- [0056] **동물:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "동물"은 동물 계의 임의의 구성원을 의미한다. 몇몇 실시형태에서, "동물"은 임의의 발생 단계의 인간을 의미한다. 몇몇 실시형태에서, "동물"은 임의의 발생 단계의 비인간 동물을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 비인간 동물은 포유동물(예를 들어, 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 및/또는 돼지)이다. 몇몇 실시형태에서, 동물은 포유동물, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충 및/또는 벌레를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 동물은 형질전환 동물, 유전 조작 동물 및/또는 클론일 수 있다.
- [0057] **대략 또는 약:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "대략" 또는 "약"은, 관심 대상의 하나 이상의 값에 적용되면서, 기재된 기준 값과 유사한 값을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 기재되지 않은 한 또는 문맥으로부터 달리 명확하지 않은 한(이러한 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외) 기재된 기준 값의 양 방향에서의(위로든 또는 아래로든) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하 내에 해당하는 값의 범위를 의미한다.
- [0058] **생체이용률:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "생체이용률"은 일반적으로 대상체의 혈류에 도달하는 투여된 용량의 백분율을 의미한다.
- [0059] **생물학적으로 활성인:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 구절 "생물학적으로 활성인"은 생물학적 시스템 및 특히 유기체에서 활성을 갖는 임의의 물질의 특성을 의미한다. 예를 들어, 유기체에 투여될 때, 물질은 유기체에 대한 생물학적 효과가 생물학적으로 활성인 것으로 생각되는 생물학적 효과를 갖는다. 특정한 실시형태에서, 펩타

이드가 생물학적으로 활성인 경우, 펩타이드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 공유하는 이 펩타이드의 부분은 통상적으로 "생물학적으로 활성인" 부분이라 칭한다.

- [0060] 심장 근육: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "심장 근육"은 심장의 벽 및 특히 심근에서 발견되는 유형의 불수의 횡문근을 의미한다.
- [0061] 담체 또는 회석제: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "담체" 및 "회석제"는 약제학적 제형의 제조에 유용한 약제학적으로 허용되는(예를 들어, 인간에 대한 투여에 안전하고 비독성인) 담체 또는 회석 물질을 의미한다. 예시적인 회석제는 무균수, 주사용 정균수(BWFI), pH 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 식염수), 무균 식염수 용액, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다.
- [0062] 폴리스타틴 또는 제조합 폴리스타틴: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "폴리스타틴(FS)" 또는 "제조합 폴리스타틴"은 달리 기재되지 않은 한 실질적인 폴리스타틴 생물학적 활성을 보유하는 임의의 야생형 및 변형 폴리스타틴 단백질(예를 들어, 아미노산 돌연변이, 결실, 삽입을 갖는 폴리스타틴 단백질 및/또는 융합 단백질)을 의미한다. 결실의 비제한적인 예는 도메인 3 결실($\Delta D3$ 또는 $dFSD3$)이다. 융합 단백질의 비제한적인 예는 Fc-융합 단백질이다.
- [0063] 기능적 균등물 또는 유도체: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "기능적 균등물" 또는 "기능적 유도체"는, 아미노산 서열의 기능적 유도체의 맥락에서, 원래 서열과 실질적으로 유사한 (기능적 또는 구조적) 생물학적 활성을 보유하는 분자를 의미한다. 기능적 유도체 또는 균등물은 천연 유도체일 수 있거나, 합성으로 제조된다. 예시적인 기능적 유도체는 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 단백질의 생물학적 활성은 보존된다. 치환 아미노산은 바람직하게는 치환된 아미노산과 유사한 화학물리적 특성을 갖는다. 바람직한 유사한 화학물리적 특성은 전하, 벌크화도(bulkiness), 소수화도, 친수화도 등의 유사성을 포함한다.
- [0064] 융합 단백질: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "융합 단백질" 또는 "키메라 단백질"은 2개 이상의 원래 별개의 단백질 또는 이의 일부를 연결하여 생성된 단백질을 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 링커 또는 스페이서는 각각의 단백질 사이에 존재할 것이다.
- [0065] 반감기: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "반감기"는 단백질 농도 또는 활성과 같은 분량이 시간 기간의 시작 시 측정된 이의 값의 반으로 되는 데 필요한 시간이다.
- [0066] 비대증: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "비대증"은 이의 구성 세포의 확대로 인한 장기 또는 조직의 용적의 증가를 의미한다.
- [0067] 개선한다, 증가시킨다 또는 감소시킨다: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "개선한다", "증가시킨다" 또는 "감소시킨다" 또는 문법적 균등물은 기준 측정, 예컨대 본 명세서에 기재된 치료의 개시 전의 동일한 개체에서의 측정 또는 본 명세서에 기재된 치료의 부재 하의 대조군 피험체(또는 복수의 대조군 피험체)에서의 측정에 상대적인 값을 의미한다. "대조군 피험체"는 치료되는 피험체와 거의 동일한 연령의 치료되는 피험체와 동일한 질환 형태로 이환된 피험체이다.
- [0068] 실험실내: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "실험실내"는 다세포 유기체 내보다는 예를 들어 시험관 또는 반응 용기, 세포 배양물 등에서 인공 환경에서 발생하는 사건을 의미한다.
- [0069] 생체내: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "생체내"는 다세포 유기체, 예컨대 인간 및 비인간 동물 내에 발생하는 사건을 의미한다. 세포 기반 시스템의 맥락에서, 상기 용어는 (예를 들어, 실험실내 시스템과 반대로) 살아 있는 세포 내에 발생하는 사건을 의미하도록 사용될 수 있다.
- [0070] 링커: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "링커"는 융합 단백질에서 천연 단백질에서의 특정한 위치에서 나타나는 것 이외의 아미노산 서열을 의미하고, 유연하거나 2개의 단백질 모이어티 사이의 α -나선과 같은 구조를 끼워넣도록 일반적으로 설계된다. 링커는 또한 스페이서라 칭해진다. 링커 또는 스페이서는 통상적으로 그 자체의 생물학적 기능을 갖지 않는다.
- [0071] 폴리펩타이드: 본 명세서에 사용되는 용어 "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합을 통해 함께 연결된 아미노산의 순차적 사슬을 의미한다. 상기 용어는 임의의 길이의 아미노산 사슬을 의미하도록 사용되지만, 당해 분야의 당업자는 상기 용어가 긴 사슬에 제한되지 않고, 펩타이드 결합을 통해 함께 연결된 2개의 아미노산을 포함하는 최소 사슬을 의미할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 당해 분야의 당업자에게 공지된 바대로, 폴리펩타이드는 공정 처리되고/되거나 변형될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "폴리펩타이드" 및 "펩타이드"는 상호

교환적으로 사용된다.

- [0072] **예방한다:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "예방한다" 또는 "예방"은, 질환, 장애 및/또는 병증의 발생과 관련하여 사용될 때, 질환, 장애 및/또는 병증의 발생의 위험을 감소시키는 것을 의미한다. "위험"의 정의를 참조한다.
- [0073] **단백질:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "단백질"은 별개의 단위로 작용하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 의미한다. 단일 폴리펩타이드가 별개의 작용 단위이고 별개의 작용 단위를 형성하기 위해 다른 폴리펩타이드와 영구적 또는 일시적 물리적 회합을 필요로 하지 않는 경우, 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 별개의 작용 단위가 서로 물리적으로 회합된 1종 초과 폴리펩타이드로 이루어진 경우, 용어 "단백질"은 물리적으로 커플링되고 별개의 단위로 함께 작용하는 다수의 폴리펩타이드를 의미한다.
- [0074] **위험:** 문맥으로부터 이해할 수 있는 것처럼, 질환, 장애 및/또는 병증의 "위험"은 특정한 개체가 질환, 장애 및/또는 병증(예를 들어, 근이영양증)을 진행시킬 가능성을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 위험은 백분율로서 표시된다. 몇몇 실시형태에서, 위험은 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 내지 100%이다. 몇몇 실시형태에서, 위험은 기준 샘플 또는 기준 샘플의 그룹과 관련된 위험에 대한 위험으로서 표시된다. 몇몇 실시형태에서, 기준 샘플 또는 기준 샘플의 그룹은 질환, 장애, 병증 및/또는 사건(예를 들어, 근이영양증)의 공지된 위험을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 기준 샘플 또는 기준 샘플의 그룹은 특정한 개체와 필적하는 개체 유래이다. 몇몇 실시형태에서, 상대 위험은 0.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상이다.
- [0075] **횡문근:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "횡문근"은 수의 제어 하의 현미경검사를 이용한 횡문의 발생을 만드는, 세포내 수축성 단위, 근질의 규칙적인 배열을 갖는 다핵성 근육 조직을 의미한다. 통상적으로, 횡문근은 심장 근육, 골격근 및 아가미분절 근육일 수 있다.
- [0076] **평활근:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "평활근"은 단일 및 다중 단위 근육을 포함하는 불수의로 제어되는 비횡문근을 의미한다.
- [0077] **피험체:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "피험체"는 인간 또는 임의의 비인간 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 또는 영장류)을 의미한다. 인간은 출생 전 형태 및 출생 후 형태를 포함한다. 많은 실시형태에서, 피험체는 인간이다. 피험체는 환자일 수 있고, 이는 질환의 진단 또는 치료를 위한 의학 제공자에 제시되는 인간을 의미한다. 용어 "피험체"는 본 명세서에서 "개체" 또는 "환자"와 상호 교환적으로 사용된다. 피험체는 질환 또는 장애로 이환되거나 이에 걸리기 쉬울 수 있지만, 질환 또는 장애의 증상을 나타내거나 나타내지 않을 수 있다.
- [0078] **실질적으로:** 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "실질적으로"는 관심 있는 특성 또는 특징의 전체 또는 거의 전체의 규모 또는 정도를 나타내는 정성적 상태를 의미한다. 생물학적 분야의 당업자는 생물학적 및 화학적 현상이 좀처럼, 설사 그렇다 하더라도, 완전함으로 가고/가거나, 완전함으로 진행하거나, 절대 결과를 성취하거나 피하지 않는다는 것을 이해할 것이다. 용어 "실질적으로"는 따라서 많은 생물학적 및 화학적 현상에서 고유한 완전함의 잠재적 결여를 포착하기 위해 본 명세서에서 사용된다.
- [0079] **실질적인 상동성:** 구절 "실질적인 상동성"은 아미노산 서열과 핵산 서열 사이의 비교를 의미하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 당해 분야의 당업자가 이해하는 바대로, 2개의 서열은 상응하는 위치에서 상동성 잔기를 함유하는 경우 "실질적으로 상동성"인 것으로 일반적으로 고려된다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 대안적으로, 상동성 잔기는 적절하게 유사한 구조적 및/또는 기능적 특징일 수 있는 비동일한 잔기일 수 있다. 예를 들어, 당해 분야의 당업자가 잘 이해하는 것처럼, 소정의 아미노산은 통상적으로 "소수성" 또는 "친수성" 아미노산으로서 및/또는 "극성" 또는 "비극성" 측쇄를 갖는 것으로서 분류된다. 동일한 유형의 다른 아미노산에 대한 하나의 아미노산의 치환은 대개 "상동성" 치환인 것으로 고려될 수 있다.
- [0080] 당해 분야에 널리 공지된 바대로, 아미노산 서열 또는 핵산 서열은 뉴클레오타이드 서열에 대해 BLASTN 및 아미노산 서열에 대해 BLASTP, 갭드 BLAST 및 PSI-BLAST와 같은 상업용 컴퓨터 프로그램에서 이용 가능한 것을 포함하는 임의의 다양한 알고리즘을 이용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 문헌[Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 및 Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics*

Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999]에 기재되어 있다. 상동성 서열을 확인하는 것 이외에, 상기 언급된 프로그램은 통상적으로 상동성의 정도의 표시를 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 2개의 서열은 이의 상응하는 잔기의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상이 잔기의 관련 신장부(stretch)에 대해 상동성인 경우 실질적으로 상동성인 것으로 고려된다. 몇몇 실시형태에서, 관련 신장부는 완전한 서열이다. 몇몇 실시형태에서, 관련 신장부는 적어도 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 125개, 150개, 175개, 200개, 225개, 250개, 275개, 300개, 325개, 350개, 375개, 400개, 425개, 450개, 475개, 500개 이상의 잔기이다.

[0081] 실질적인 동일성: 구절 "실질적인 동일성"은 아미노산 서열 또는 핵산 서열 사이의 비교를 의미하도록 본 명세서에서 사용된다. 당해 분야의 당업자가 이해하는 바대로, 2개의 서열은 일반적으로 상응하는 위치에서 동일한 잔기를 포함하는 경우 "실질적으로 동일함" 것으로 고려된다. 당해 분야에 널리 공지된 바대로, 아미노산 서열 또는 핵산 서열은 뉴클레오타이드 서열에 대해 BLASTN 및 아미노산 서열에 대해 BLASTP, 잭드 BLAST 및 PSI-BLAST와 같은 상업용 컴퓨터 프로그램에서 이용 가능한 것을 포함하는 임의의 다양한 알고리즘을 이용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 문헌[Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 및 Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999]에 기재되어 있다. 동일한 서열을 확인하는 것 이외에, 상기 언급된 프로그램은 통상적으로 동일성의 정도의 표시를 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 2개의 서열은 이의 상응하는 잔기의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상이 잔기의 관련 신장부에 대해 동일한 경우 실질적으로 동일한 것으로 고려된다. 몇몇 실시형태에서, 관련 신장부는 완전한 서열이다. 몇몇 실시형태에서, 관련 신장부는 적어도 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 125개, 150개, 175개, 200개, 225개, 250개, 275개, 300개, 325개, 350개, 375개, 400개, 425개, 450개, 475개, 500개 이상의 잔기이다.

[0082] 앓는: 질환, 장애 및/또는 병증을 "앓는" 개체는 질환, 장애 및/또는 병증의 하나 이상의 증상으로 진단되거나 나타낸다.

[0083] 걸리기 쉬운: 질환, 장애 및/또는 병증에 "걸리기 쉬운" 개체는 질환, 장애 및/또는 병증으로 진단되지 않는다. 몇몇 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 병증에 걸리기 쉬운 개체는 질환, 장애 및/또는 병증의 증상을 나타내지 않는다. 몇몇 실시형태에서, 질환, 장애, 병증 또는 사건(예를 들어, DMD)에 걸리기 쉬운 개체는 하기 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다: (1) 질환, 장애 및/또는 병증의 발생과 관련된 유전자 돌연변이; (2) 질환, 장애 및/또는 병증의 발생과 관련된 유전적 다형; (3) 질환, 장애 및/또는 병증과 관련된 단백질의 발현 및/또는 활성의 증가 및/또는 감소; (4) 질환, 장애, 병증 및/또는 사건의 발생과 관련된 습관 및/또는 라이프스타일; (5) 이식을 받았거나, 받을 예정이거나, 필요한 것. 몇몇 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 병증에 걸리기 쉬운 개체는 질환, 장애 및/또는 병증을 발생시킬 것이다. 몇몇 실시형태에서, 질환, 장애 및/또는 병증에 걸리기 쉬운 개체는 질환, 장애 및/또는 병증을 발생시키지 않을 것이다.

[0084] 표적 조직: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "표적 조직"은 듀켄씨 근이영양증(DMD)과 같은 치료하고자 하는 질환으로 이환된 임의의 조직을 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 표적 조직은 근육 소모, 골격 변각, 심근증 및 호흡기 기능 손상(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 질환 관련 병리학, 증상 또는 특징을 나타내는 조직을 포함한다.

[0085] 치료학적 유효량: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "치료학적 유효량"의 치료제는 질환, 장애 및/또는 병증의 증상(들)을 치료하고/하거나, 진단하고/하거나, 예방하고/하거나 이의 발병을 지연시키기 위해 질환, 장애 및/또는 병증을 앓거나 걸리기 쉬운 피험체에 투여될 때 충분한 양을 의미한다. 당해 분야의 당업자는 치료학적 유효량이 적어도 하나의 단위 용량을 포함하는 투약 섭생을 통해 통상적으로 투여된다는 것을 이해할 것이다.

[0086] 치료하는: 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "치료한다", "치료" 또는 "치료하는"은 특정한 질환, 장애 및/또는 병증을 완전히 또는 부분적으로 완화시키고/시키거나, 경감시키고/시키거나, 감소시키고/시키거나, 저해하고/하거나, 예방하고/예방하거나, 이의 발병을 지연시키고/시키거나, 이의 중증도를 줄이고/줄이거나, 이의 적어도 하나의 증상 또는 특징의 발생을 감소시키기 위해 사용되는 임의의 방법을 의미한다. 치료제는 질환과 관

련된 병리학을 발생시킬 위험을 감소시킬 목적을 위해 질환을 징후를 나타내지 않고/않거나 질환의 초기 징후만을 나타내는 피험체에 투여될 수 있다.

[0087] **소정의 실시형태의 상세한 설명**

[0088] 본 발명은 무엇보다도 단백질 치료제로서의 폴리스타틴에 기초한 듀켄씨 근이영양증(DMD) 및/또는 베커 근이영양증을 포함하는 근이영양증을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 DMD의 적어도 하나의 증상 또는 특징이 강도, 중증도 또는 빈도 감소되거나, 발병 지연되도록 DMD를 앓거나 이에 걸리기 쉬운 개체에 유효량의 제조합 폴리스타틴 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 DMD를 치료하는 방법을 제공한다.

[0089] 본 발명의 다양한 양상은 하기 부문에 자세히 기재되어 있다. 부문의 사용은 본 발명을 제한하도록 의도되지 않는다. 각각의 부문은 본 발명의 임의의 양상에 적용될 수 있다. 본원에서, "또는"의 사용은 달리 기재되지 않은 한 "및/또는"을 의미한다.

[0090] **듀켄씨 근이영양증(DMD)**

[0091] DMD는 신체를 통한 근육의 진행성 악화 및 근육 관련 기능의 손실을 특징으로 하는 질환이다. 본 발명이 다양한 근육 조직에서 DMD 및 다른 근육성 이영양증과 관련된 섬유증, 염증 및 다른 증상 또는 특징을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공하는 것으로 고려된다. 몇몇 실시형태에서, 피험체에서의 제공된 방법 및 조성물의 사용은 이 피험체에서 섬유증 및/또는 괴사를 감소시킨다.

[0092] **근육 조직**

[0093] 동물에서 2가지 주요 유형의 근육 조직 - 횡문근 및 평활근이 존재한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "횡문근"은 반복 근절을 포함하는 근육 조직을 의미한다. 횡문근의 몇몇 특징을 갖지만 수의 조절 하에 있지 않은 심장 근육과 같은 몇몇 예외가 존재하기는 하지만, 횡문근은 수의 조절 하에 있고 골격에 부착되는 경향이 있다. 일반적으로, 횡문근은 신체의 수의 이동을 허용하고, 대퇴사두근, 비복근, 이두박근, 삼두근, 승모근, 삼각근 및 많은 다른 근육을 포함하는 주요 근육 그룹을 포함한다. 횡문근은 매우 긴 경향이 있고, 많은 횡문근은 독립적으로 작용할 수 있다. 그러나, 입, 항문, 심장 및 식도 상부에서를 포함하여 일부 횡문근은 골격에 부착되지 않는다.

[0094] 반면, 평활근은 매우 상이한 구조를 갖는다. 별개의 골격 부착을 갖는 일련의 긴 근육 보다는, 평활근은 평활근 세포 사이에 기계적 연결을 갖는 연속 시트로 조직화되는 경향이 있다. 평활근은 대개 중공 장기의 벽에 위치하고, 보통 수의 조절 하에 있지 않다. 특정한 장기를 둘러싸는 평활근은 동일한 부하를 보유하고 동시에 수축해야 한다. 평활근은, 적어도 부분적으로, 자세 또는 압력에서의 이동 및/또는 변화에 의해 발생한 중공 장기에서의 부하의 변화를 다루도록 작용한다. 이 이중 역할은 평활근이 횡문근과 같이 수축할 수 있을 뿐만 아니라, 지속 부하에 대항하여 장기 치수를 유지시키도록 등장성으로 수축해야 한다는 것을 의미한다. 평활근의 예는 혈관, 방광, 위장관, 예컨대 직장을 둘러싸는 것이다.

[0095] 근육의 강도는 근육의 세포의 수 및 크기, 및 이의 해부학적 배치에 따라 달라진다. 기존의 근원섬유의 크기의 증가(비대증) 및/또는 더 많은 근육 세포의 형성(과다형성)에 의한 근육 섬유의 직경의 증가는 근육의 힘 발생 용량을 증가시킬 것이다.

[0096] 근육은 또한 위치 또는 기능에 의해 그룹화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제조합 폴리스타틴 단백질은 얼굴의 하나 이상의 근육, 저작을 위한 하나 이상의 근육, 혀 및 목의 하나 이상의 근육, 흉곽의 하나 이상의 근육, 흉대 및 팔의 하나 이상의 근육, 팔 및 어깨의 하나 이상의 근육, 하나 이상의 배쪽 및 등쪽 전완 근육, 손의 하나 이상의 근육, 척추 기립근의 하나 이상의 근육, 하지대 및 다리의 하나 이상의 근육 및/또는 앞다리 및 발의 하나 이상의 근육에 표적화된다.

[0097] 몇몇 실시형태에서, 얼굴의 근육은 안와내 근육, 예컨대 모양체, 홍채 확대근, 홍채 산대근; 귀의 근육, 예컨대 귓바퀴근, 측두두정근, 등자근, 고막 장근; 코의 근육, 예컨대 눈살근, 코근, 콧구멍 확대근, 코끝 내림근, 상순비익거근; 입의 근육, 예컨대 입꼬리 올림근, 입꼬리 내림근, 입둘레근, 혀근, 대혀골근 및 소혀골근, 광경근, 상순거근, 아랫입술 내림근, 소근, 이근 및/또는 눈썹 주름근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0098] 몇몇 실시형태에서, 저작의 근육은 교근, 측두근, 내측 익돌근, 외측 익돌근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 혀 및 목의 근육은 턱설근, 경돌설근, 구개설근, 부대설근, 이복근, 붓목뿔근, 하

학설골근, 이설골근, 견갑설골근, 흉골설골, 흉골갑상근, 갑상설골근, 목빗근, 전사각근, 중사각근 및/또는 후사각근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0099] 몇몇 실시형태에서, 흉곽, 흉대 및 팔의 근육은 대흉근, 소흉근, 복직근, 외복사근, 내복사근, 복횡근, 횡격막, 외늑간근, 내늑간근, 전거근, 승모근, 견갑거근, 대마름근, 소마름근, 광배근, 삼각근, 견갑하근, 극상근, 극하근, 대원근, 소원근 및/또는 오혜완근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0100] 몇몇 실시형태에서, 팔 및 어깨의 근육은 상완 이두근-장두, 상완 이두근-단두, 상완 삼두근-장두, 상완 삼두근 외측두, 상완 삼두근-내측두, 주근, 원회내근, 회외근 및/또는 상완근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0101] 몇몇 실시형태에서, 배쪽 및 등쪽 전완 근육은 상완 요골근, 요측 수근 굴근, 측측 수근 굴근, 장장근, 척측 수근 신근, 장요측 수근 신근, 단요측 수근 신근, 상지신근, 소지신근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0102] 몇몇 실시형태에서, 손의 근육은 손의 내재성 근육, 예컨대 무지구, 단무지 외전근, 단무지 굴근, 무지 대립근, 소지구, 소지 외전근, 단소지 굴근, 소지 대립근, 장측 골간근, 배측 골간근 및/또는 벌레근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0103] 몇몇 실시형태에서, 척추 기립근의 근육은 경근막, 극근, 최장근 및/또는 장늑근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0104] 몇몇 실시형태에서, 하지대 및 다리의 근육은 대요근, 장골근, 대퇴방형근, 장내전근, 단내전근, 대내전근, 박근, 봉공근, 대퇴방형근, 예컨대, 대퇴직근, 외측광근, 내측광근, 중간광근, 비복근, 장비골근(종아리근), 족저근, 대전근, 중둔근, 소둔근, 슬괩근: 대퇴이두근: 장두, 슬괩근: 대퇴이두근: 단두, 슬괩근: 반건양근, 슬괩근: 반막근, 대퇴근막 장근, 치골근 및/또는 전경골근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0105] 몇몇 실시형태에서, 앞다리 및 발의 근육은 장지신근, 장모지 신근, 단비골근, 적척근, 후경골근, 장모지굴근, 단지신근, 단무지신근, 무지외전근, 단무지굴근, 소지 외전근, 소지굴근, 소지 대립근, 단지신근, 발의 충양근, 족척방형근 또는 족저방형근, 단지 굴근, 배측 골간근 및/또는 저측골간근을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0106] 예시적인 근육 표적은 표 1에 요약되어 있다.

표 1

안륜근			
안와내: 모양체, 홍채 확대근, 홍채 산대근			
귀: 귓바퀴근, 측두두정근, 등자근, 고막 장근			
코: 눈살근, 코근, 콧구멍 확대근, 코끝 내림근, 상순비익거근			
입: 입꼬리 올림근, 입꼬리 내림근, 입둘레근			
협근	대협골근 소협골근	및 광경근	상순거근
아랫입술 내림근	소근	이근	눈썹 주름근
주근	원회내근	회외근	상완근
저작의 근육			
교근	측두근	내측 익돌근	외측 익돌근
혀 및 목의 근육			
턱설근	경돌설근	구개설근	부대설근
이복근	붓목뿔근	하학설골근	이설골근
견갑설골근	홍골설골	홍골갑상근	갑상설골근
목빗근	전사각근	중사각근	후사각근
흉곽, 흉대 및 팔의 근육			
쇄골하근	대흉근	소흉근	복직근
외복사근	내복사근	복횡근	횡격막
외늑간근	내늑간근	전거근	승모근
견갑거근	대마름근	소마름근	광배근
삼각근	견갑하근	극상근	극하근
대원근	소원근	오혜완근	
팔 및 어깨			
상완 이두근-장두	상완 이두근-단두	상완 삼두근-장두	상완 삼두근-외측두
상완 삼두근-내측두	주근	원회내근	회외근
상완근			
상완 근육: 배쪽 및 등쪽			
상완 요골근	요측 수근 굴근	측측 수근 굴근	장장근
척측 수근 신근	장요측 수근 신근	단요측 수근 신근	상지신근
소지신근	척추 기립근: 경근막	척추 기립근: 극근	척추 기립근: 최장근
척추 기립근: 장늑근			
손의 내재성 근육: 무지구, 단무지 외전근, 단무지 굴근 및 무지 대립근			
손의 내재성 근육: 소지구, 소지 외전근, 단소지 굴근 및 소지 대립근			
손의 내재성 근육: 장측 골간근, 배측 골간근 및 벌레근			

[0107]

하지대 및 다리의 근육			
장요근: 대요근	장요근: 장골근	대퇴방형근	장내전근
단내전근	대내전근	박근	봉공근
대퇴방형근: 대퇴직근	대퇴방형근: 외측광근	대퇴방형근: 내측광근	대퇴방형근: 중간광근
비복근	장비골근(중아리 근)	족저근	대전근
중둔근	소둔근	슬괵근: 대퇴이두근: 장두	슬괵근: 대퇴이두근: 단두
슬괵근: 반건양근	슬괵근: 반막근	대퇴근막 장근	치골근
전경골근			
앞다리 및 발의 근육			
장지신근	장모지 신근	단비골근	적척근
후경골근	장모지굴근	단지신근	단무지신근
무지외전근	단무지굴근	소지 외전근	소지굴근
소지 대립근	단지신근	발의 중앙근	족척방형근 또는 족저방형근
단지 굴근	배측 골간근	저측골간근	

[0108]

[0109]

근이영양증

[0110]

근 이영양증은 약한 이동 및 손상된 이동을 발생시키는 근육 퇴행을 야기하는 유전 장애의 그룹이다. 모든 근 이영양증의 주요 특징은 이것이 성질상 진행성이라는 것이다. 근 이영양증은 듀켄씨 근이영양증(DMD), 베커 근 이영양증, 에머리-드레이푸스 근이영양증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 안면견갑상완형 근이영양증 (facioscapulohumeral muscular dystrophy), 지대형 근 이영양증(limb-girdle muscular dystrophy) 및 1형 및 2형 근육긴장퇴행위축(myotonic dystrophy)(1형 근육긴장퇴행위축의 선천적 형태를 포함)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 증상은 일부 또는 모든 근육이 이환되면서 근이영양증의 유형에 의해 변할 수 있다. 근 이영양증의 예시적인 증상은 근육 운동 기능의 발생 지연, 하나 이상의 근육 그룹을 사용하는 것의 어려움, 연하, 말하기 또는 먹기의 어려움, 침 흘리기, 눈꺼풀 늘어짐, 빈번한 낙상, 성인으로서 근육 또는 근육 그룹의 강도의 손실, 근육 크기 감소, 신체의 변경된 생체역학 또는 허약으로 인한 걷기의 문제, 근육 비대증, 근육 가성비대, 근육의 지방 침윤, 비수축성 조직에 의한 근육의 대체(예를 들어, 근육 섬유증), 근육 괴사 및/또는 인지 또는 거동 손상/지적 장애를 포함한다.

[0111]

근 이영양증에 대한 공지된 치유가 없지만, 전신 및 질환 변형 치료 둘 다를 포함하는 몇몇 지원적 치료가 사용된다. 코르티코스테로이드, 물리적 치료, 교정 장치, 휠체어 또는 ADL 및 폐 기능을 위한 다른 보조 의학 장치가 근 이영양증에 보통 사용된다. 근육긴장퇴행위축에서 심장 부정맥으로부터 갑작스러운 사망을 방지하기 위해 심장 박동기가 사용된다. 근긴장증(이완 불능)의 증상을 개선하는 근육긴장퇴행방지제는 맥실리틴 및 몇몇 경우에 페니토인, 프로카인아마이드 및 퀴닌을 포함한다.

[0112]

듀켄씨 근이영양증

[0113]

듀켄씨 근이영양증(DMD)은 근육 퇴행 및 결과적으로 사망을 발생시키는 근이영양증의 열성 X 염색체 관련 형태이다. DMD는 근위근의 약화, 비정상적 보행, 비복근(중아리) 근육에서의 가성비대 및 크레아틴 키나제(CK) 상승을 특징으로 한다. 많은 DMD 환자는 증상/징후가 통상적으로 더 명확해질 때 거의 5살에 진단받는다. 이환된 개체는 통상적으로 대략 10세 내지 13세에 걷지 못하고, 심폐 장애로 인해 20대 중반 내지 후반에 또는 그 이전에 사망한다.

[0114]

DMD 장애는 세포막의 디스트로글리칸 복합체(DGC)에 구조적 안정성을 제공하는 근육 조직 내의 중요한 구조적 성분인 단백질 디스트로핀을 코딩하는 인간 X 염색체에 위치한 디스트로핀 유전자에서의 돌연변이에 의해 발생한다. 디스트로핀은 내부 세포질 액틴 필라멘트 네트워크 및 세포외 기질을 연결시켜, 근육 섬유에 물리적 강도를 제공한다. 따라서, 디스트로핀의 변경 또는 부재는 비정상적인 근형질 막 찢어짐 및 근육 섬유의 괴사를 발생시킨다. 사람의 성별 둘 다가 돌연변이를 보유할 수 있지만, 여성은 질환의 중증 징후를 거의 나타내지 않는다.

[0115] DMD의 주요 증상은 특히 엉덩이, 골반 부위, 넓적다리, 어깨 및 종아리 근육의 근육에 영향을 미치는, 근육 소모와 관련된 근육 약화이다(통상적으로 수의 근육이 처음에 영향을 받음). 근육 약화는 또한 팔, 목 및 다른 부위에서 발생한다. 종아리는 대개 확대된다. 징후 및 증상은 보통 6살 전에 발생하고, 유아에서처럼 일찍 나타날 수 있다. 다른 신체적 증상은 독립적인 보행 능력의 지연, (보통 15살에) 보행, 걷기 또는 뛰기의 진행성 어려움 및 결과적인 보행 능력 손실; 빈번한 낙상; 피로; 운동 기능의 어려움(뛰기, 경충 뛰기, 점핑); 엉덩이 굴곡근의 짧아짐을 발생시키는 요추 전만 증가; 근육 섬유가 짧아지고 섬유증이 연결 조직에서 발생하므로 기능을 손상시키는 아킬레스 힘줄 및 슬픽근의 구축; 근육 섬유 기형; 지방 및 연결 조직에 의한 근육 조직의 대체에 의해 야기된 허 및 종아리 근육의 가성비대(확대); 더 높은 위험의 신경행동 장애(예를 들어, ADHD), 학습 장애(난독증) 및 특정 인지 기능의 비진행성 약화(특히 단기간 언어 기억); 골격 기형(몇몇 경우에 척추측만증 포함)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0116] **재조합 폴리스타틴 단백질**

[0117] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 실질적인 폴리스타틴 생물학적 활성을 보유하는 임의의 야생형 및 변형 폴리스타틴 단백질(예를 들어, 아미노산 돌연변이, 결실, 삽입을 갖는 폴리스타틴 단백질 및/또는 융합 단백질)을 포함한다. 통상적으로, 재조합 폴리스타틴 단백질은 재조합 기술을 사용하여 제조된다. 그러나, 천연 자원으로부터 정제되거나 화학적으로 합성된 폴리스타틴 단백질(야생형 또는 변형)은 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 통상적으로, 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 약 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 2일, 2.5일, 3일, 3.5일, 4일, 4.5일, 5일, 5.5일, 6일, 6.5일, 7일, 7.5일, 8일, 8.5일, 9일, 9.5일 또는 10일 이상의 생체내 반감기를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 0.5일 내지 10일, 1일 내지 10일, 1일 내지 9일, 1일 내지 8일, 1일 내지 7일, 1일 내지 6일, 1일 내지 5일, 1일 내지 4일, 1일 내지 3일, 2일 내지 10일, 2일 내지 9일, 2일 내지 8일, 2일 내지 7일, 2일 내지 6일, 2일 내지 5일, 2일 내지 4일, 2일 내지 3일, 2.5일 내지 10일, 2.5일 내지 9일, 2.5일 내지 8일, 2.5일 내지 7일, 2.5일 내지 6일, 2.5일 내지 5일, 2.5일 내지 4일, 3일 내지 10일, 3일 내지 9일, 3일 내지 8일, 3일 내지 7일, 3일 내지 6일, 3일 내지 5일, 3일 내지 4일, 3.5일 내지 10일, 3.5일 내지 9일, 3.5일 내지 8일, 3.5일 내지 7일, 3.5일 내지 6일, 3.5일 내지 5일, 3.5일 내지 4일, 4일 내지 10일, 4일 내지 9일, 4일 내지 8일, 4일 내지 7일, 4일 내지 6일, 4일 내지 5일, 4.5일 내지 10일, 4.5일 내지 9일, 4.5일 내지 8일, 4.5일 내지 7일, 4.5일 내지 6일, 4.5일 내지 5일, 5일 내지 10일, 5일 내지 9일, 5일 내지 8일, 5일 내지 7일, 5일 내지 6일, 5.5일 내지 10일, 5.5일 내지 9일, 5.5일 내지 8일, 5.5일 내지 7일, 5.5일 내지 6일, 6일 내지 10일, 7일 내지 10일, 8일 내지 10일, 9일 내지 10일의 생체내 반감기를 갖는다.

[0118] 폴리스타틴(FS)은 처음에 뇌하수체 세포 여포 자극 호르몬(FSH) 분비를 억제할 수 있는 단백질 인자로서 여포액으로부터 단리되었다. FS는 적어도 부분적으로 액티빈의 결합 및 중화를 통해 FSH에 대해 이의 영향을 발휘한다.

[0119] C 말단에서 대안적인 스플라이싱을 통해 생성된 FS의 적어도 2개의 동형: FS288 및 FS315가 존재한다. 288개의 아미노산 동형은 액티빈 결합에 중요한 소수성 잔기를 포함하는 63개 아미노산 N 말단 구역으로 이루어진 명확한 구조를 갖고, 이 단백질(64번 내지 288번 잔기)의 주요 부분은 각각 대략 73개 내지 75개의 아미노산의 3개의 10-시스테인 FS 도메인을 포함한다. N 말단으로부터 C 말단으로의 이 10-시스테인 도메인은 각각 도메인 1, 도메인 2 및 도메인 3이라 칭한다. FS315 동형은 엑스트라 엑손에 의해 코딩된 C 말단의 산성 잔기를 통해 생성된다. FS288은 헤파린 결합 도메인의 존재로 인해 조직 결합되는 경향이 있는 반면, 잠재적으로 헤파린 결합 도메인이 연장된 C 말단에 의해 마스킹되므로 FS315는 순환 형태인 경향이 있다.

[0120] FS가 실험실내 마이오스타틴 및 액티빈 둘 다를 저해하고, 이 저해가 마우스에서 생체내 비대증을 발생시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다(Lee et al., *Regulation of Muscle Mass by Follistatin and Activins*, (2010), *Mol. Endocrinol.*, 24(10): 1998-2008; Gilson et al., *Follistatin Induces Muscle Hypertrophy Through Satellite Cell Proliferation and Inhibition of Both Myostatin and Activin*, (2009), *J. Physiol. Endocrinol.*, 297(1):E157-E164). 특정한 이론에 구속되고자 함이 없이, 이 관찰된 효과는 적어도 부분적으로 마이오스타틴 및 액티빈에 의한 Smad2/3 경로의 활성화를 방지하는 FS로 인할 수 있다. Smad2/3 경로의 활성화는 근육 성장의 음성 조절을 발생시키는 것으로 밝혀졌다(Zhu et al., *Follistatin Improves Skeletal Muscle Healing After Injury and Disease Through an Interaction with Muscle Regeneration, Angiogenesis, and Fibrosis*, (2011), *Musculoskeletal Pathology*, 179(2):915-930).

[0121] 통상적인 야생형 또는 천연 인간 FS315 및 FS288 단백질의 아미노산 서열이 표 2에 기재되어 있다.

표 2

예시적인 인간 폴리스타틴 동형

FS315	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFFKWMIFNG GAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGK TYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVT CNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSC EDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSDPEVPCASDNATYASECAMKE AACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDDQDYSFPISSILEW(서열 번호 1)
FS288	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFFKWMIFNG GAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGK TYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVT CNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSC EDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSDPEVPCASDNATYASECAMKE AACSSGVLLLEVKHSGSCN(서열 번호 12)

[0122]

[0123]

따라서, 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 인간 FS315(서열 번호 1)이다. 본 명세서에 개시된 바대로, 서열 번호 1은 인간 폴리스타틴 단백질에 대한 정준(canonical) 아미노산 서열을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 단백질은 스플라이스 동형, 예컨대 FS 288(서열 번호 12)일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 또는 천연 단백질의 동족체 또는 유사체일 수 있다. 예를 들어, 인간 야생형 또는 천연 폴리스타틴 단백질의 동족체 또는 유사체는 실질적인 폴리스타틴 단백질 활성을 보유하면서 야생형 또는 천연 폴리스타틴 단백질(예를 들어, 서열 번호 1)과 비교하여 하나 이상의 아미노산 또는 도메인 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 인간 FS315 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 실질적으로 상동성이다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 1과 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성인 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 인간 FS315 폴리스타틴 단백질(서열 번호 1)과 실질적으로 동일하다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 1과 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0124]

인간 폴리스타틴 단백질의 동족체 또는 유사체는 이러한 방법을 수록한 참조문헌에서 발견되는 것처럼 당해 분야의 당업자에게 공지된 폴리펩타이드 서열을 변경하기 위한 방법에 따라 제조될 수 있다. 당해 분야의 당업자가 이해하는 바대로, 2개의 서열은 상응하는 위치에서 상동성 잔기를 포함하는 경우 "실질적으로 상동성"인 것으로 일반적으로 고려된다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 대안적으로, 상동성 잔기는 적절하게 유사한 구조적 및/또는 기능적 특징일 수 있는 비동일한 잔기일 수 있다. 예를 들어, 당해 분야의 당업자가 잘 이해하는 것처럼, 소정의 아미노산은 통상적으로 "소수성" 또는 "친수성" 아미노산으로서 및/또는 "극성" 또는 "비극성" 측쇄를 갖는 것으로서 분류된다. 동일한 유형의 다른 아미노산에 대한 하나의 아미노산의 치환은 대개 "상동성" 치환인 것으로 고려될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 아미노산의 보존적 치환은 하기 그룹 내의 아미노산 중에 이루어진 치환을 포함한다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D. 몇몇 실시형태에서, "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 치환이 이루어진 단백질의 상대 전하 또는 크기 특징을 변경시키지 않는 아미노산 치환을 의미한다.

[0125]

당해 분야에 널리 공지된 바대로, 아미노산 서열 또는 핵산 서열은 뉴클레오타이드 서열에 대해 BLASTN 및 아미노산 서열에 대해 BLASTP, 갭드 BLAST 및 PSI-BLAST와 같은 상업용 컴퓨터 프로그램에서 이용 가능한 것을 포함하는 임의의 다양한 알고리즘을 이용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 문헌[Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 및 Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999]에 기재되어 있다. 상동성 서열을 확인하는 것 이외에, 상기 언급된 프로그램은 통상적으로 상동성의 정도의 표시를 제공한다.

[0126]

몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질과 비교하여 하나 이상의 아미노산 결실, 삽입 또는 대체를 포함한다. 예를 들어, 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열

번호 1의 Y185 및/또는 L191에 상응하는 위치에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

- [0127] 도메인 결실 변이체
- [0128] 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 야생형 인간 폴리스타틴 단백질과 비교하여 하나 이상의 도메인 결실, 삽입 또는 대체(예를 들어, 도메인 교체)를 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 도메인 1, 2 및/또는 3과 상응하는 아미노산 서열의 결실, 삽입 및/또는 대체를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 하기 도시된 바대로 (도메인 3에 상응하는) 서열 번호 1의 212번 내지 288번 아미노산 잔기의 결실을 포함한다:
- [0129] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGPV
CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQNTNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGL
AYEGKCISISEDTEEEEEDEDQDYSFPPISSILEW(서열 번호 2).
- [0130] 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질이 실질적인 폴리스타틴 단백질 활성을 보유하면서 적합한 폴리스타틴 도메인 결실 변이체(예를 들어, 서열 번호 2)와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함하는 적합한 도메인 결실 변이체의 동족체 또는 유사체일 수 있다는 것이 고려된다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 서열 번호 2와 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 상동성인 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0131] 폴리스타틴 융합 단백질
- [0132] 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질이 융합 단백질 구성에 있을 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 예를 들어 폴리스타틴 단백질의 안정성, 독성 및/또는 전달을 증대시키거나 증가시키거나, 면역원성, 청소율 또는 독성을 감소시키거나 제거함으로써 폴리스타틴의 치료학적 효과를 통상적으로 촉진할 수 있는 폴리스타틴 도메인과 다른 도메인 또는 모이어티 사이의 융합 단백질일 수 있다. 폴리스타틴 융합 단백질을 위한 이러한 적합한 도메인 또는 모이어티는 Fc 도메인, XTEN 도메인을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0133] Fc 도메인
- [0134] 몇몇 실시형태에서, 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 FcRn 수용체에 결합하는 Fc 도메인 또는 이의 일부를 포함한다. 비제한적인 예로서, 적합한 Fc 도메인은 면역글로불린 하위유형, 예컨대 IgG로부터 유래할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터 유래한다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 IgM, IgA, IgD 또는 IgE로부터 유래한다. 특히 적합한 Fc 도메인은 인간 또는 인간화 항체로부터 유래한 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 변형 Fc 부분, 예컨대 변형 인간 Fc 부분이다.
- [0135] 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 하기 도시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0136] EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 3), 또는
- [0137] KTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 4); 또는
- [0138] DKHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 14).
- [0139] 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 서열 번호 3, 서열 번호 4 또는 서열 번호 14와 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 상동성인 또는 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0140] Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 개선된 결합은 연장된 혈청 반감기를 발생시키는 것으로 고려된다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 FcRn에 대한 개선된 결합을 발생시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. FcRn에 대한 개선된 결합을 가져오는 Fc 도메인 내의 다양한 돌연변이는 당해 분야에 공지되어 있고,

본 발명을 실행하는 데 적합할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 Fc 도메인은 인간 IgG1의 Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 및/또는 Asn 434에 상응하는 하나 이상의 위치에서의 하나 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0141] 예를 들어, 적합한 Fc 도메인은 H433K(His433Lys) 및/또는 N434F(Asn434Phe)의 돌연변이를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 적합한 Fc 도메인은 돌연변이 H433K(His433Lys) 및 N434F(Asn434Phe)를 포함할 수 있다. 돌연변이를 편입시킨 예시적인 Fc 도메인 서열은 하기 기재되어 있다:

[0142] DKHTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSMVHEALKFHYTQKLSLSLSPGK(서열 번호 15).

[0143] Fc 도메인에 포함될 수 있는 추가의 아미노산 치환은 예를 들어 미국 특허 제6,277,375호; 8,012,476호; 및 8,163,881호(이들은 본 명세서에서 참조문헌으로 포함됨)에 기재된 것을 포함한다.

[0144] 링커 또는 스페이서

[0145] 폴리스타틴 도메인은 Fc 도메인에 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 폴리스타틴 도메인 및 Fc 도메인을 연결시키는 링커 또는 스페이서를 포함한다. 아미노산 링커 또는 스페이서는 유연하거나 2개의 단백질 모이어티 사이의 알파-나선과 같은 구조를 끼워넣도록 일반적으로 설계된다. 링커 또는 스페이서는 비교적 짧거나 더 길 수 있다. 통상적으로, 링커 또는 스페이서는 예를 들어 길이 3개 내지 100개(예를 들어, 5개 내지 100개, 10개 내지 100개, 20개 내지 100개, 30개 내지 100개, 40개 내지 100개, 50개 내지 100개, 60개 내지 100개, 70개 내지 100개, 80개 내지 100개, 90개 내지 100개, 5개 내지 55개, 10개 내지 50개, 10개 내지 45개, 10개 내지 40개, 10개 내지 35개, 10개 내지 30개, 10개 내지 25개, 10개 내지 20개)의 아미노산을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 링커 또는 스페이서는 길이 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개 또는 100개 이상의 아미노산이다. 통상적으로, 더 긴 링커는 입체 장애를 감소시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 글라이세린 및 세린 잔기의 혼합물을 포함할 것이다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 트레오닌, 프롤린 및/또는 알라닌 잔기를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 링커는 10개 내지 100개, 10개 내지 90개, 10개 내지 80개, 10개 내지 70개, 10개 내지 60개, 10개 내지 50개, 10개 내지 40개, 10개 내지 30개, 10개 내지 20개, 10개 내지 15개의 아미노산을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 적어도 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개 또는 95개의 아미노산을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 ALEVLFGQP로 이루어진 링커가 아니다.

[0146] 비제한적인 예로서, 본 발명에 적합한 링커 또는 스페이서는 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG 링커, 서열 번호 5); GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG2 링커, 서열 번호 6); 및 GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG3 링커, 서열 번호 7)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0147] 적합한 링커 또는 스페이서는 또한 상기 예시적인 링커, 예를 들어 GAG 링커(서열 번호 5), GAG2 링커(서열 번호 6) 또는 GAG3 링커(서열 번호 7)와 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 상동성인 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태와 사용하기에 적합한 추가의 링커는 2012년 3월 2일자에 출원된 US20120232021(이의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)에서 확인될 수 있다.

[0148] 몇몇 실시형태에서, 임의의 동족 리간드(예를 들어, 액티빈, 마이오스타틴, 헤파린 등)에 결합하는 폴리스타틴 폴리펩타이드의 능력에 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 폴리스타틴 폴리펩타이드를 Fc 도메인과 회합시키는 링커가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 헤파린에 대한 폴리스타틴 펩타이드의 결합이 폴리스타틴 폴리펩타이드 단독과 비교하여 변경되지 않도록 링커가 제공된다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 이것이 액티빈과 회합되지 않는 한 보통 헤파린을 결합시키지 않는 FS315 폴리펩타이드이다. 이러한 몇몇 실시형태에서, FS315 폴리펩타이드 단독과 비교하여 FS315 폴리펩타이드의 증가된 헤파린 결합을 발생시키지 않는 링커가 제공된다.

[0149] 예시적인 폴리스타틴 융합 단백질

[0150] 특정한 실시형태에서, 적합한 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 폴리스타틴 폴리펩타이드, Fc 도메인 및 폴리스

타틴 폴리펩타이드를 Fc 도메인과 회합시키는 링커를 포함하고, 폴리스타틴 폴리펩타이드는 야생형 인간 FS315 단백질(서열 번호 1) 또는 도메인 3 결실 FS315 단백질(서열 번호 2)과 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 통상적으로, 적합한 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 액티빈 및 마이오스타틴에 결합할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 약 0.5일 내지 6일(예를 들어, 약 0.5일 내지 5.5일, 약 0.5일 내지 5일, 약 1일 내지 5일, 약 1.5일 내지 5일, 약 1.5일 내지 4.5일, 약 1.5일 내지 4.0일, 약 1.5일 내지 3.5일, 약 1.5일 내지 3일, 약 1.5일 내지 2.5일, 약 2일 내지 6일, 약 2일 내지 5.5일, 약 2일 내지 5일, 약 2일 내지 4.5일, 약 2일 내지 4일, 약 2일 내지 3.5일, 약 2일 내지 3일) 범위의 생체내 반감기를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 적합한 재조합 폴리스타틴 융합 단백질은 약 2일 내지 10일의 범위(예를 들어, 약 2.5일 내지 10일, 약 3일 내지 10일, 약 3.5일 내지 10일, 약 4일 내지 10일, 약 4.5일 내지 10일, 약 5일 내지 10일, 약 3일 내지 8일, 약 3.5일 내지 8일, 약 4일 내지 8일, 약 4.5일 내지 8일, 약 5일 내지 8일, 약 3일 내지 6일, 약 3.5일 내지 6일, 약 4일 내지 6일, 약 4.5일 내지 6일, 약 5일 내지 6일의 범위)의 생체내 반감기를 갖는다.

[0151] 비제한적인 예로서, 적합한 폴리스타틴 Fc 융합 단백질은 하기 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다:

[0152] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLCELDPCDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSI SEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 8), 또는

[0153] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLCELDPCDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSI SEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 9).

[0154] 다른 비제한적인 예로서, 적합한 폴리스타틴 Fc 융합 단백질은 하기 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다:

[0155] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCI SI SEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 10), 또는

[0156] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCI SI SEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 11).

[0157] 또 다른 비제한적인 예로서, 적합한 폴리스타틴 Fc 융합 단백질은 하기 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다:

[0158] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLCELDPCDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSI SEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 16), 또는

[0159] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMIIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRCVCAPDCSNITWKGPIVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDFVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCCLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDQDYSFPISSILEWGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHFKHYTQKSLSLSPGK(서열 번호 17)

[0160] 몇몇 실시형태에서, 적합한 재조합 폴리스타틴 Fc 융합 단백질은 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 16 또는 서열 번호 17과 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 상동성인 또는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0161] 폴리스타틴-Fc 융합 단백질은 동종이합체 또는 단량체 구성을 포함하는 다양한 구성으로 제공될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 적합한 동종이합체 구성은 폴리펩타이드 가닥 둘 다의 N 말단 끝에 부착된 융합 파트너(예를 들어, 폴리스타틴 폴리펩타이드와 링커)의 C 말단 끝을 갖도록 설계될 수 있다. 적합한 단량체 구성은 하나의 Fc 이합체에 융합된 융합 파트너(예를 들어, 폴리스타틴 폴리펩타이드와 링커)의 C 말단 끝을 갖도록 설계될 수 있다. 단량체 구성은 입체 장애를 감소시킬 수 있다.

[0162] 본 명세서에서 확인된 기준 단백질 서열(예를 들어, 기준 폴리스타틴 단백질 서열)과 관련하여 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "아미노산 서열 동일성 백분율(%)"은 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고, 필요한 경우, 최대 서열 동일성 백분율을 성취하기 위해 서열을 정렬시키고 갭을 도입한 후 기준 서열에서의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 목적을 위한 정렬은 예를 들어 공중에게 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 당해 분야의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 성취될 수 있다. 당해 분야의 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 성취하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 바람직하게는, WU-BLAST-2 소프트웨어는 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위해 사용된다(Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). WU-BLAST-2는 몇몇 조사 매개변수를 이용하고, 이들 중 대부분은 디폴트 값으로 설정된다. 조정 가능한 매개변수는 하기 값으로 설정된다: 오버랩 간격 = 1, 오버랩 분획 = 0.125, 워드 쓰레스홀드(T) = 11. HSP 스코어(S) 및 HSP S2 매개변수는 동적 값이고, 특정한 서열의 조성에 따라 프로그램 그 자체에 의해 확립되지만, 최소 값은 조정 가능할 수 있고 하기 기재된 바대로 설정된다.

[0163] **재조합 폴리스타틴 단백질의 제조**

[0164] 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 임의의 이용 가능한 수단에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 재조합 폴리스타틴 단백질은 재조합 폴리스타틴 단백질 코딩 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포 시스템을 이용함으로써 재조합으로 제조될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 재조합 폴리스타틴 단백질은 내인성 유전자를 활성화함으로써 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 재조합 폴리스타틴 단백질은 화학 합성에 의해 부분적으로 또는 완전히 제조될 수 있다.

[0165] 단백질이 재조합으로 제조되는 경우, 임의의 발현 시스템을 사용할 수 있다. 약간의 예를 제공하기 위해, 공지된 발현 시스템은 예를 들어 이. 콜라이, 난(egg), 바칼로바이러스, 식물, 효모 또는 포유동물 세포를 포함한다.

[0166] 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 적합한 재조합 폴리스타틴 단백질은 포유동물 세포에서 제조된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 포유동물 세포의 비제한적인 예는 BALB/c 마우스 골수종 세포주(NSO/1, ECACC 85110503호); 인간 망막모세포(PER.C6, 크루셀(CruCe11), 네덜란드 라이덴); SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 HEK293 또는 293 세포, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59,1977); 인간 섬유육종 세포주(예를 들어, HT1080); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK21, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포 +/-DHFR(CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216, 1980); 마우스 세르톨리 세포(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251, 1980); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1 587); 인간 자궁경부 암종

세포(HeLa, ATCC CCL 2); 개과 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주(Hep G2)를 포함한다.

[0167] 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 인간 세포로부터 제조된 재조합 폴리스타틴 단백질을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 CHO 세포 또는 HT1080 세포로부터 제조된 재조합 폴리스타틴 단백질을 제공한다.

[0168] 통상적으로, 재조합 폴리스타틴 단백질을 발현하도록 조작된 세포는 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질을 코딩하는 전이유전자를 포함할 수 있다. 재조합 폴리스타틴 단백질을 코딩하는 핵산이 조절 서열, 유전자 조절 서열, 프로모터, 비코딩 서열 및/또는 재조합 폴리스타틴 단백질을 발현하기 위한 다른 적절한 서열을 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 통상적으로, 코딩 구역은 하나 이상의 이들 핵산 성분과 작동적으로 연결된다.

[0169] 전이유전자의 코딩 구역은 특정한 세포 유형의 코돈 사용빈도를 최적화하도록 하나 이상의 침묵 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리스타틴 전이유전자의 코돈은 척추동물 세포에서 발현에 최적화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 전이유전자의 코돈은 포유동물 세포에서의 발현에 최적화될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 폴리스타틴 전이유전자의 코돈은 인간 세포에서의 발현에 최적화될 수 있다.

[0170] **약제학적 조성물 및 투여**

[0171] 본 발명은 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질 및 생리학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 추가로 제공한다.

[0172] 적합한 약제학적으로 허용되는 담체는 물, 염 용액(예를 들어, NaCl), 식염수, 완충 식염수, 알코올, 글라이세롤, 에탄올, 아라비아 검, 식물성 오일, 벤질 알코올, 폴리에틸렌 글라이콜, 젤라틴, 탄수화물, 예컨대 락토스, 아밀로스 또는 전분, 당, 예컨대 만니톨, 수크로스 또는 기타, 텍스트로스, 스테아르산마그네슘, 활석, 규산, 점성 파라핀, 향수 오일, 지방산 에스터, 하이드록시메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈 등, 및 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 약제학적 제제는, 원하는 경우, 활성 화합물과 해롭게 반응하지 않거나 이의 활성을 방해하지 않는 보조 물질(예를 들어, 활택제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충제, 착색제, 향료 및/또는 방향 물질 등)과 혼합될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 정맥내 투여에 적합한 수용성 담체를 사용한다.

[0173] 적합한 약제학적 조성물 또는 약제는, 원하는 경우, 또한 소량의 습윤 또는 유화 물질 또는 pH 완충제를 포함할 수 있다. 조성물은 액체 용액, 현탁액, 에멀션, 정제, 환제, 캡슐, 서방 방출 제형 또는 분말일 수 있다. 조성물은 또한 전통적인 결합제 및 담체, 예컨대 트라이글라이세라이드와 좌제로서 제형화될 수 있다. 경구 제형은 표준 담체, 예컨대 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등의 약제학적 등급을 포함할 수 있다.

[0174] 약제학적 조성물 또는 약제는 인간에 대한 투여에 적합화된 약제학적 조성물로서 일상적 절차에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 정맥내 투여를 위한 조성물은 통상적으로 무균 등장성 수성 완충제 중의 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 주사 부위에서 통증을 줄이기 위해 가용화제 및 국소 마취제를 또한 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 활성 물질의 분량을 나타내는 밀봉 실링 용기, 예컨대 앰플 또는 샷세(sachette)에서 예를 들어 건조 동결건조 분말 또는 물 비함유 농축물로서 별도로 제공되거나, 단위 투약 형태에서 함께 혼합된다. 조성물이 점적 주사에 의해 투여되는 경우, 이것은 무균 약제학적 등급 물, 식염수 또는 텍스트로스/물을 포함하는 점적 주사 병이 없을 수 있다. 조성물이 주사로 투여되는 경우, 투여 전에 성분이 혼합될 수 있도록 주사용 무균수 또는 식염수의 앰플이 제공될 수 있다.

[0175] 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질은 증성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 자유 아미노 기로 형성된 것, 예컨대 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래한 것 및 자유 카복시 기로 형성된 것, 예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화제이철, 아이소프로필아민, 트라이에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래한 것을 포함한다.

[0176] **투여 경로**

[0177] 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질(또는 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질을 포함하는 조성물 또는 약제)은 임의의 적절한 경로에 의해 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질 또는

이를 포함하는 약제학적 조성물은 전신으로 투여된다. 전신 투여는 정맥내, 진피내, 흡입, 경피(국소), 안와내, 근육내, 피하, 근육내, 경구 및/또는 경점막 투여일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물은 피하로 투여된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "피하 조직"은 피부 바로 밑의 혈거운 불규칙한 연결 조직의 층으로 정의된다. 예를 들어, 넓적다리 구역, 복근 구역, 둔근 구역 또는 견갑골 구역(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 구역에 조성물을 주사함으로써 피하 투여를 수행할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물은 정맥내로 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물은 경구로 투여된다. 하나 초과의 경로가 원하는 경우 동시에 사용될 수 있다.

[0178] 몇몇 실시형태에서, 투여는 개체에서 오직 국소 효과를 발생시키는 반면, 다른 실시형태에서, 투여는 개체의 다수의 부분에 걸쳐 효과, 예를 들어 전신 효과를 발생시킨다. 통상적으로, 투여는 하나 이상의 표적 조직에 대한 재조합 폴리스타틴 단백질의 전달을 발생시킨다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 심장, 뇌, 척수, 횡문근(예를 들어, 골격근), 평활근, 신장, 간, 폐 및/또는 비장(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 하나 이상의 표적 조직으로 전달된다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 심장으로 전달된다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 횡문근, 특히 골격근으로 전달된다. 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 삼두근, 전경골근, 족저근, 비복근, 이두박근, 승모근, 삼각근, 대퇴사두근 및/또는 횡격막으로 전달된다.

[0179] **투약 형태 및 투약 섭생**

[0180] 몇몇 실시형태에서, 조성물은 치료학적 유효량으로 및/또는 특정한 원하는 결과(예를 들어, 근이영양증, 예컨대 듀켄씨 근이영양증에 대한 위험을 치료하거나 감소키는 것)과 관련된 투약 섭생에 따라 투여된다.

[0181] 본 발명에 따라 투여하고자 하는 특정한 용량 또는 양은 예를 들어 원하는 경로의 성질 및/또는 정도, 경로 및/또는 투여 시기의 특정사항 및/또는 하나 이상의 특징(예를 들어, 체중, 연령, 개인 병력, 유전 특징, 라이프스타일 매개변수, 심장 결함의 중증도 및/또는 심장 결함의 위험의 수준 등 또는 이들의 조합)에 따라 변할 수 있다. 이러한 용량 또는 양은 당업자가 결정할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 적절한 용량 또는 양은 표준 임상 기술에 따라 결정된다. 대안적으로 또는 추가로, 몇몇 실시형태에서, 적절한 용량 또는 양은 투여하고자 하는 원하는 또는 최적 용량 범위 또는 양을 확인하는 것을 돕도록 하나 이상의 실험실내 또는 생체내 검정의 사용을 통해 결정된다.

[0182] 다양한 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 치료학적 유효량으로 투여된다. 일반적으로, 치료학적 유효량은 피험체에 의미있는 이익(예를 들어, 기초 질환 또는 병증을 치료하고/하거나, 조절하고/하거나, 치유하고/하거나, 예방하고/하거나, 완화시키는 것)을 성취하기에 충분하다. 특정한 몇몇 실시형태에서, 투여하고자 하는 적절한 용량 또는 양은 실험실내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래한 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0183] 몇몇 실시형태에서, 제공된 조성물은 약제학적 제형으로 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 약제학적 제형은 근이영양증, 예컨대 듀켄씨 근이영양증의 발병 또는 위험의 감소의 성취와 관련된 투약 섭생에 따라 투여를 위한 단위 용량 양이거나 이를 포함한다.

[0184] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질을 포함하는 제형은 단일 용량으로 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질을 포함하는 제형은 규칙적인 간격으로 투여된다. 본 명세서에 사용되는 "간격"에서의 투여는 치료학적 유효량이 정기적으로(일시 용량과 구별됨) 투여된다는 것을 나타낸다. 간격은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질을 포함하는 제형은 2달 1회, 1달 1회, 1달 2회, 3주 1회, 2주 1회, 1주 1회, 1주 2회, 1주 3회, 1일 1회, 1일 2회 또는 6시간마다 투여된다. 단일 개체에 대한 투여 간격은 고정된 간격일 필요는 없지만, 개체의 필요에 따라 시간에 따라 변할 수 있다.

[0185] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "2달 1회"는 2달마다 1회(즉, 매 2달마다 1회) 투여를 의미하고; 용어 "1달 1회"는 1달마다 1회 투여를 의미하며; 용어 "3주 1회"는 3주마다 1회(즉, 매 3주마다 1회) 투여를 의미하고; 용어 "2주 1회"는 2주마다 1회(즉, 매 2주마다 1회) 투여를 의미하며; 용어 "1주 1회"는 1주마다 1회 투여를 의미하고; 용어 "매일"은 1일마다 1회 투여를 의미한다.

[0186] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질을 포함하는 제형은 무기한으로 규칙적 간격으로 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합 폴리스타틴 단백질을 포함하는 제형은 한정 기

간 동안 규칙적 간격으로 투여된다.

[0187] **병용 치료**

[0188] 몇몇 실시형태에서, 재조합 폴리스타틴 단백질은 근이영양증의 치료에 현재 사용되는 하나 이상의 공지된 치료제(예를 들어, 코르티코스테로이드)와 함께 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 공지된 치료제(들)는 이의 표준 또는 승인 투약 섭생 및/또는 스케줄에 따라 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 공지된 치료제(들)는 이의 표준 또는 승인 투약 섭생 및/또는 스케줄과 비교하여 변경된 섭생에 따라 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 변경된 섭생은 하나 이상의 단위 용량이 양에서 변경(예를 들어, 감소 또는 증가)되고/되거나, 투약이 빈도에서 변경된다는 점에서(예를 들어, 단위 용량 사이의 하나 이상의 간격이 연장되거나(더 적은 빈도를 발생시킴) 감소된다(더 많은 빈도를 발생시킴)는 점에서) 표준 또는 승인 투약 섭생과 다르다.

[0189] **실시예**

[0190] **실시예 1. 폴리스타틴은 마이오스타틴 및 액티빈을 특이적으로 표적화한다**

[0191] 이 실시예는 DMD를 치료하기 위한 단백질 치료제로서의 폴리스타틴의 안정성을 평가하기 위한 표적 및 비표적 리간드에 대한 폴리스타틴 결합을 예시한다. 이론에 구속되고자 함이 없이, 마이오스타틴 및 액티빈에 의한 Smad2/3 경로의 활성화는 근원성 단백질 발현의 저해를 발생시키는 것으로 생각된다. 결과로서, 근원세포는 근육으로 분화될 수 없다. 따라서, 마이오스타틴 및 액티빈은 근육 재생을 위한 가변 표적으로 생각된다. 그러나, 많은 마이오스타틴 및 액티빈 길항제, 예컨대 가용성 액티빈 수용체 IIB형(sActRIIB)은 또한 소정의 구조적 유사성으로 인해 골 형성 단백질(BMP)에 결합한다. BMP, 특히 BMP-9 및 BMP-10은 신체에 걸쳐 조직 구성을 조정하는, 중심 형태발생 신호로 생각된다. 이러한 BMP의 저해는 바람직하지 않은 병리학적 병증을 발생시킬 수 있다. 하기 더 자세히 기재된 바대로, 이 실시예에 기재된 실험 데이터는 폴리스타틴이 고친화도로 마이오스타틴 및 액티빈을 특이적으로 표적화하고, 의미 있는 친화도로 비표적 BMP에 결합하지 않는다는 것을 확인시켜 준다. 따라서, 이 실시예는 폴리스타틴이 다른 마이오스타틴 조절제, 예컨대 sActRIIB와 비교하여 더 적은 바람직하지 않은 표적의 효과를 갖는 안전한 단백질 치료제일 수 있다는 것을 입증한다.

[0192] 구체적으로, 상업적으로 구입 가능한 폴리스타틴(FS315(R&D 시스템즈(R&D Systems)사제) 및 폴리스타틴-Fc 인간 키메라 FS315-hFc(시노 바이올로지컬(Sino Biological)사제)) 및 FS315-GAG3-mFc 융합 단백질은 바이아코어 검정을 이용하여 액티빈, 마이오스타틴 및 BMP에 대한 동역학 및 결합 친화도를 평가하기 위해 사용되었다. 간단히 말하면, FS315는 CM5 칩에 부동화되고, 폴리스타틴-Fc 융합 단백질은 인간 또는 마우스 항체 포획 키트(GE Healthcare)를 사용하여 포획되었다. 아민-커플링 후, 액티빈, 마이오스타틴 또는 BMP(예를 들어, BMP-2, -4, -6, -7, -9, -10 및 GDF-11)의 농도 시리즈를 25°C에서 가용성 분석물로서 첨가하였다. sActRIIB-hFc를 대조군으로서 사용하였다. 결합 친화도(Kd) 및 동역학은 표준 방법을 이용하여 결정되었다. 예시적인 결과는 표 3에 기재되어 있다.

표 3

예시적인 결합 친화도 및 동역학 데이터

리간드	KD 값 (M)			
	FS315	FS315-hFc	FS315-mFc	sActRIIB-hFc
BMP-2	4.4E-07	비결합	비결합	비결합
BMP-4	1.4E-08	NM	8.1E-08	1.3E-07
BMP-6	3.6E-10	9.0E-10	NM	5.7E-11
BMP-7	3.8E-08	NM	NM	1.1E-09
BMP-9	비결합	비결합	비결합	5.4E-11
BMP-10	1.0E-07	1.5E-07	비결합	1.0E-11
GDF-11	해당 없음	8.2E-10	1.8E-14	3.4E-10
마이오스타틴	1.0E-13	8.4E-14	7.3E-14	1.3E-12
액티빈	7.3E-10	1.9E-10	3.8E-14	7.0E-11

NM = 불량한 곡선 맞춤 또는 기준 칩에 대한 고결합으로 인해 측정 불가

[0193]

[0194] 표 3에 기재된 바대로, 폴리스타틴(예를 들어, FS315 또는 FS315-Fc)은 고친화도로 표적 마이오스타틴 및 액티

빈에 결합하지만, BMP-9 및 -10에 결합하지 않는 반면(측정 가능하지 않거나 10^{-7} M 초과)의 Kd), sActRIIB-Fc는 유사한 친화도로 마이오스타틴, 액티빈 및 BMP에 결합한다. 놀랍게도 및 중요하게는, Fc 융합은 1차 표적 마이오스타틴에 대한 폴리스타틴의 친화도를 적어도 10배 증가시킨다.

[0195] 또한, 폴리스타틴이 마이오스타틴 및 액티빈 신호전달(Smad 2/3 경로)을 특이적으로 저해하지만 BMP 신호전달(Smad 1/5/8 경로)을 저해하지 않는지를 추가로 결정하기 위해 루시퍼라제 리포터 검정을 이용하였다. 구체적으로, 폴리스타틴이 루시퍼라제 신호의 감소를 측정함으로써 Smad 1/5/8 경로를 저해할 수 있는지를 결정하기 위해 BMP 반응 구성성분(BMP Response Element: BRE)-루시퍼라제 검정을 이용하였다(Korchynskiy et al., *Identification and Functional Characterization of Distinct Critically Important Bone Morphogenetic Protein-specific Response Elements in the Id1 Promoter*, (2002), J BIOL CHEM., 277(7):4883-4891). 폴리스타틴이 루시퍼라제 신호의 감소를 측정함으로써 Smad 2/3 경로를 저해할 수 있는지를 결정하기 위해 CAGA-루시퍼라제 검정을 이용하였다(Dennler et al., *Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene*, (1998), EMBO J, 17(11):3091-3100). 간단히 말하면, HEK293 세포는 BRE(BRE-Id1-luc) 또는 CAGA-루시퍼라제(p(CAGA)₁₂-MLP-luc 벡터) 작제물 및 레닐라-루시퍼라제 작제물(프로메가(Promega) pGL4.74 [hRluc/TK])과 밤새 동시 형질감염시켰다. 다음날, 세포를 폴리스타틴의 농도 시리즈와 함께 또는 이것 없이 마이오스타틴 및 액티빈(Smad 2/3 경로 유도)의 경우, CAGA-루시퍼라제 리포터) 또는 BMP-9 및 BMP-10(Smad 1/5/8 경로 유도)의 경우, BRE-루시퍼라제 리포터)로 처리하였다. 밤새 항온처리 후, 루시퍼라제 신호를 프로메가 듀얼-글로(Dual-Glo) 검정 키트를 사용하여 결정하고, 값을 레닐라 대조군으로 정규화하였다. 이 실험에서, 네이티브 폴리스타틴(R&D 시스템즈) 및 폴리스타틴 Fc 융합 단백질(시노 바이올로지컬 FS315-hFc, FS315-GAG3-mFc)을 시험하였다. FS315-GAG3-mFc는 하기 기재되어 있다.

[0196] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKMFIFNGGAPNCIPCKETCENVDGPGKCKRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPV
CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSCTVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGL
AYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKCLWDFKVGGRCSLCELDPCDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKHSGSCNSISEDTEEEEDQDYS
FPISSILEWGA PGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT
VVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTSKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKV
SLTCMITDFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLVNQSWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKLSLHSPGK(서열 번호 13)

[0197] BRE-루시퍼라제 검정의 예시적인 결과가 도 1에 도시되어 있다. FS315-Fc는 Smad 1/5/8 경로를 통해 BMP-9 또는 -10 신호전달을 저해하지 않는다.

[0198] CAGA-루시퍼라제 검정의 예시적인 결과는 도 2에 도시되어 있다. FS315 및 FS315-GAG3-mFc 둘 다 Smad 2/3의 공지된 활성자인 마이오스타틴(1.2nM) 및 액티빈(0.4nM)의 생리학적 관련 수준의 투여 후 관찰된 Smad 2/3 유도의 양과 비교하여 0.1nM 이상의 용량에서 Smad2/3 신호전달의 강력한 저해를 나타냈다. 이 결과는 폴리스타틴이 마이오스타틴 및 액티빈 활성의 강력하고 특이적인 저해제라는 것을 나타낸다. Fc 융합의 존재는 네이티브 FS315 분자와 FS315-GAG3-mFc 융합 단백질 사이의 유사한 저해 곡선에 의해 표시된 바대로 폴리스타틴의 독성에 해롭게 영향을 미치지 않았다. 예상치 못하게 중요하게는, 본 발명에 따른 Fc 융합 단백질은 1차 표적 마이오스타틴에 대한 폴리스타틴의 결합 친화도를 상당히 증가시킨다(예를 들어, 표 3에 기재된 바대로 적어도 10배).

[0199] **실시예 2. 폴리스타틴 융합 단백질 FS315-GAG3-mFc는 혈청 반감기를 연장시켰다**

[0200] 본 발명 전에, 폴리스타틴이 짧은 혈청 반감기를 갖는다는 것이 보고되었고, 이는 단백질 치료제로서 폴리스타틴을 개발하기 위한 우려되는 점이다. 예를 들어, 통상적인 상업용 FS315 단백질은 약 1시간의 혈청 반감기를 갖는다. 이 실시예에서, FS315-GAG3-mFc 융합 단백질의 생체내 반감기가 결정되었고, 이는 상당히 연장된 혈청 반감기를 갖는다.

[0201] 구체적으로, 각인 대조 구역(imprinting control region: ICR) 마우스가 모델로서 선택되었고, I¹²⁵ 표지된 FS315-GAG3-mFc를 1.0mg/kg(약 2 μ Ci/동물)로 피하로 투여하였다. 투여 후, 혈청 및 조직의 샘플을 주사 후 10일까지 취했다. 샘플 채취된 조직은 갑상선, 간, 신장, 폐, 비장, 횡격막, 심장, 대퇴사두근 및 삼두근이었다. 혈청 샘플의 예시적인 결과는 도 3a에 도시되어 있다. 볼 수 있는 것처럼, FS315-GAG3-mFc의 혈청 반감기는 대략 5일이고, 이는 당해 분야에 공지된 짧은 폴리스타틴 혈청 반감기(약 1시간)와 비교하여 놀랍게도 길다. 다양한 조직에 걸친 PK 프로파일의 예시적인 결과는 도 3b 및 표 4에 기재되어 있다. 폴리스타틴-Fc의 반감기는, 갑상선을 제외하고, 조직에 걸쳐 2일 내지 5일이다. 또한, 연장된 조직 반감기 프로파일은 예상 밖이었다.

[0202] 연장된 생체내 반감기 데이터는 폴리스타틴이 DMD의 치료를 위해 효과적인 단백질 치료제일 수 있다는 것을 추가로 확인시켜준다.

표 4

예시적인 FS315-GAG3-mFc 생체내 PK 데이터

조직	t _{1/2} (시간)	Cmax (ng/g 조직 또는 ng/ml 혈청)	AUC _{0- 마지막} (시간/ng/g 조직 또는 ng/ml 혈청)	AUC _{0-∞} (시간/ng/g 조직 또는 ng/ml 혈청)
혈청	134	14.0	557	782
갑상선	118	467.4	57019	71769
신장	77	9.8	221	249
간	48	4.4	118	127
폐	116	3.9	106	136
비장	95	5.8	72	83
심장	105	1.6	46	55
횡격막	99	1.0	28	33
삼두근	78	1.7	44	50
대퇴사두근	99	0.8	25	31

[0203]

[0204] **실시예 3. FS315-GAG3-mFc의 생체내 효능**

[0205] 이 실시예는 듀켄씨 근이영양증의 mdx 마우스 모델에 대한 폴리스타틴(예를 들어, FS315-GAG3-mFc)의 투여가 1 mg/kg의 낮은 용량에서도 증가된 근육 질량의 경향을 발생시킨다는 것을 입증한다. 이 실시예에서, 용어 "FS315-GAG3-mFc", "FS315-Fc" 및 "FS315-mFc"는 상호 교환되어 사용된다.

[0206] 구체적으로, 이 연구에서, 45마리의 mdx 마우스를 빈 비히클, 0mg/kg, 1.0mg/kg 또는 8mg/kg의 FS315-GAG3-mFc로 치료하였다. 비히클 또는 치료 그룹에서의 동물은 연구 기간 동안 매주 2의 피하(견갑골내) 주사를 받았고, 폴리스타틴 용합 단백질 수준은 안와내 샘플채취를 통해 평가되었다.

[0207] 비히클 치료된 대조군 동물의 절반을 1mg/kg의 FS315-Fc 그룹으로 희생시키고, 비치료 대조군 동물과 함께 남은 비히클 치료된 동물을 8mg/kg의 치료 그룹으로 희생시켰다. 예시적인 치료 스케줄은 표 5A 및 표 5B에 기재되어 있다:

표 5

mdx 마우스에서의 예시적인 주사 및 샘플채취 스케줄
 5A: 1mg/kg의 FS315-GAG3-mFc 치료 과정

사건	일
채혈 전, 주사 1	0
주사 2	3
채취된 혈액 샘플, 주사 3	7
주사 4	10
채취된 혈액 샘플, 주사 5	14
주사 6	17
채취된 혈액 샘플, 주사 7	21
주사 8	24
채취된 혈액 샘플, 주사 9	29
희생, 4주 시점	30
주사 10	32
채취된 혈액 샘플, 주사 11	35
주사 12	38
채취된 혈액 샘플	44
주사 13	45
주사 14	49
채취된 혈액 샘플, 주사 15	52
주사 16	56
채취된 혈액 샘플, 주사 17	59
주사 18	63
주사 19	66
채취된 혈액 샘플	70
최종 희생, 10주	71

[0208]

5B. 8mg/kg의 FS315-GAG3-mFc 치료 과정

사건	일
채혈전	0
주사 1	1
주사 2	5
채취된 혈액 샘플, 주사 3	8
주사 4	12
채취된 혈액 샘플, 주사 5	15
주사 6	19
주사 7	22
주사 8	26
채취된 혈액 샘플, 주사 9	30
주사 10	33
주사 11	37
주사 12	41
채취된 혈액 샘플	43
최종 희생, 6주	44

[0209]

- [0210] 1mg/kg의 FS315-Fc 그룹에 대한 치료된 비히클에서의 근육 중량에 관한 예시적인 데이터가 도 4에 도시되어 있다. 구체적으로, 도 4는 1mg/kg에 의한 4주 및 10주 치료 및 8mg/kg에 의한 6주 치료 후 그램 단위의 대퇴사두근(도 4a), 비복근(도 4b), 전경골근(도 4c) 및 삼두근(도 4d)에 대한 근육 중량을 나타낸다. 근육 중량 데이터는 기준 신체 중량에 대해 조정된다.
- [0211] 투여 후 폴리스타틴의 순환 수준에 대한 예시적인 데이터는 도 5에 도시되어 있다. 구체적으로, 도 5a는 1mg/kg의 1주 2회 주사로 치료된 동물의 혈청에서의 FS315-mFc의 수준을 나타내고, 도 5b는 8mg/kg의 1주 2회 주사로 치료된 동물의 혈청에서의 FS315-mFc의 수준을 나타낸다.
- [0212] 도 4 내지 도 5에 도시된 바대로, FS315-Fc가 DMD의 동물 모델에서 근육 질량을 증가시킨다는 명확한 표시가 있다.
- [0213] **실시예 4. 재조합 폴리스타틴-Fc 융합 단백질의 생체내 효능**
- [0214] 이 실시예는 폴리스타틴-Fc 융합 단백질의 투여가 생체내 근육 비대증(예를 들어, 근육 질량 및 근섬유 직경 증가)을 발생시킨다는 것을 나타낸다.
- [0215] 이 연구에서, C57BL/10 및 mdx 마우스 둘 다에 비복근 근육(근육내, IM)으로 직접 FS315-GAG3-mFc가 주사되었다. 구체적으로, 각각의 마우스는, 각각 한 측에 1주 2회로, 2회 주사를 받았다. 왼쪽 비복근은 주사마다 전체 20 μ g의 단백질에 대해 FS315-GAG3-mFc의 20 μ l의 1mg/ml 용액을 받았다. 오른쪽 비복근은 20 μ l의 PBS(비히클 대조군)를 받았다. 주사는 전체 4주 동안 1주 2회 발생하였다. 최종 주사 24시간 후, 마우스를 희생시키고, 비복근 근육을 조심스럽게 절제하고 무게를 잰다. 동일한 용량에서 가용성 액티빈 IIB형 수용체-Fc 마우스 키메라(sActRIIB-mFc, R&D 시스템즈)를 받는 그룹은 양성 대조군으로서 포함되었다. 또한, 비치료 마우스는 음성 대조군으로서 포함되었다.
- [0216] 도 6은 20 μ g의 FS315-mFc 또는 sActRIIB-mFc에 의한 1주 2회 치료 후 C57 대조군 마우스 및 mdx 마우스 둘 다에서의 상당히 증가한 근육 질량을 나타낸다. 도 6에 기재된 연구 설계 및 숫자 데이터는 하기 표 6에 기재되어 있다:

표 6

근육 중량

군주	그룹	N	시험 비복근 중량(g)	PBS 비복근 중량(g)	시험-PBS 비복근 중량(g)	P-값**
C57	FS315-mFc*	8	0.17 ± 0.016 (0.18)	0.15 ± 0.013 (0.16)	0.02 ± 0.013 (0.024)	0.02
	sActRIIB-mFc	8	0.18 ± 0.016 (0.17)	0.16 ± 0.02 (0.16)	0.019 ± 0.017 (0.016)	0.09
	비치료	5	0.16 ± 0.013 (0.15)	0.16 ± 0.0074 (0.16)	0.0032 ± 0.012 (0.003)	>0.99
mdx	FS315-mFc	10	0.19 ± 0.017 (0.18)	0.17 ± 0.019 (0.16)	0.021 ± 0.013 (0.018)	0.005
	sActRIIB-mFc	8	0.21 ± 0.024 (0.2)	0.19 ± 0.026 (0.19)	0.024 ± 0.017 (0.018)	0.04
	비치료	5	0.16 ± 0.019 (0.16)	0.17 ± 0.023 (0.17)	-0.0084 ± 0.0055 (-0.06)	0.16

* 이 실시예에서 사용된 모든 폴리스타틴 작제물은 GAG3 링커를 포함한다.

** P 값은 쌍 지은 t 시험으로부터 얻고 본페로니(Bonferroni) 보정되었다 (6회 통계 시험에 대해 보정)

- [0217]
- [0218] 근섬유 직경은 주사된 비복근 근육의 디지털 전체 슬라이드 스캐닝을 통해 결정되었다. 샘플을 10% 중성 완충 식염수 중에 고정하고 처리하고 파라핀 중에 포매하고 5 μ m 절편으로 절단하고 알렉사 플루오르(Alexa fluor)

488 접합 소맥 배아 응집소(Wheat Germ Agglutinin: WGA)(근육 세포막을 염색시키는 방법임)로 염색하였다. 스캐닝된 이미지를 이미지 분석 소프트웨어(ImageScope and ImagePro Plus)를 이용하여 분석하였다. 각각의 근섬유의 경우, 근섬유의 도심(centroid)을 통과하는 2도 간격에서의 근섬유 횡단면 길이를 측정함으로써 평균 직경이 결정되었다.

[0219] 도 6에 따라, 도 15는 FS315-mFc로 치료된 비복근 근육의 근섬유 직경의 증가를 나타낸다. 이러한 증가는 C57(WT, 도 15a) 및 mdx 마우스(도 15b) 둘 다에서 발생하였다. 더 큰 직경으로의 이동의 설명은 근육 중량 증가가 근육 비대증의 결과라는 것을 나타낸다. 표 7은 예시적인 평균 직경 변화 및 상응하는 통계 분석의 분석이다.

표 7

평균 직경			
대조(비교)	평균 편차	표준 오차	p
WT FS315-mFc 대 비히클	12.5	0.8	<0.0001
mdx FS315-mFc 대 비히클	5.3	1.2	<0.0001
비주사 WT 대 mdx	14.6	5.8	0.04

[0220]

[0221] 사용된 통계 모델은 각각의 동물 내에 이루어진 다수의 측정을 설명할 수 있는 위계적 선형 모델(hierarchical linear model: HLM)이다. 각각의 군주 및 치료 그룹 내의 비치료 다리와 치료 다리 사이의 차이는 매우 상당하다($p < 0.0001$, 이는 근육 중량 데이터를 확증한다).

[0222] 이 데이터는 폴리스타틴, 특히 폴리스타틴-Fc 융합 단백질이 근육 성장을 효과적으로 유도하고 DMD와 관련된 근육 위축증을 치료할 수 있다는 것을 입증한다.

[0223] **실시예 5. 예시적인 폴리스타틴 변이체의 생체내 효능**

[0224] 실시예 2-4에 기재된 야생형 폴리스타틴 FS315 단백질에 기초한 생체내 반감기 및 효능 데이터는 폴리스타틴이 DMD를 위한 효과적인 단백질 치료로서 사용될 수 있다는 것을 입증한다. 이 실시예는 단백질 치료제가 폴리스타틴 변이체에 기초하여 개발될 수 있다는 것을 또한 입증한다.

[0225] 구체적으로, 예시적인 폴리스타틴 도메인 결실 또는 점 돌연변이는 하기 표 8에 기재된 바대로 생성되고, 변이체와 야생형 폴리스타틴 사이의 비교를 수월하게 하도록 널리 확립된 IM/AAV 전달 시스템을 이용하여 이의 근육 재생 효능에 대해 시험되었다.

[0226] 이 연구에서, 7개의 그룹에 걸쳐 3-4주령의 전체 35마리의 C57 마우스가 사용되었다. 7개의 그룹은 각각 5마리의 마우스를 포함하고, 5마리의 폴리스타틴 변이체가 시험되고(표 8)), 야생형 FS315 및 빈 벡터가 대조군으로서 사용되었다. FS315를 코딩하는 유전자는 추가의 29개의 아미노산을 가져 세포로부터 분비 시 분해되는 신호 펩타이드를 나타낸다. 따라서, FS315 및 FS344는 동일한 야생형 작제물을 의미하고, 하기 실시예에서 상호 교환되어 사용된다.

표 8

예시적인 폴리스타틴 변이체의 효능 스크리닝

변이체	돌연변이
dFSD2	도메인 2 결실
dFSD3	도메인 3 결실
FSD1/1/3	도메인 2 결실, 도메인 1에 의한 대체
Y185A	점 돌연변이체/도메인 2
L191D	점 돌연변이체/도메인 2

[0227]

[0228]

[0229]

[0230]

[0231]

[0232]

[0233]

[0234]

[0235]

[0236]

폴리스타틴 변이체는 동물마다 대략 1×10^{11} 의 바이러스 입자의 용량으로 AAV9 벡터를 사용하여 왼쪽 대퇴사두근 및 왼쪽 비복근으로 단일 일측 주사를 통해 투여되었다. 하기 종점이 주사 후 2주, 4주 및 6주에 시험되었다: 혈청 및 뇌에서의 폴리스타틴 수준, 마우스 중량, 개별적인 근육 중량(주사된 근육 및 원위 근육 둘 다) 및 조직학(예를 들어, 섬유 수, 크기 및 형태 등). 대축성 근육은 이 연구에 동물내 비교자로서 작용한다.

도 7에 도시된 바대로, 야생형 FS315 및 도메인 3 결실 돌연변이체 둘 다 빈 벡터 대조군과 비교하여 신체 중량이 상당히 증가하였다. 특히, 시험된 도메인 3 결실 폴리스타틴 변이체는 주사 3주 후에 빨리 신체 중량이 증가하였다.

도 8은 주사 2주 후 동축성 및 대축성 측 둘 다에서의 A) 비복근 및 B) 대퇴사두근의 예시적인 평균 근육 중량을 나타낸다. 야생형 FS315 및 도메인 3 결실 폴리스타틴 변이체 둘 다 주사 2주 후 동축성 측에 대해 상당히 증가한 근육 질량을 나타낸다(도 8). 특히, FS315 및 dFSD3으로 주사된 근육은 빈 벡터와 비교하여 중량이 60% 내지 70% 초과이었다(도 8). dFSD3이 주사된 절제된 대퇴사두근은 2주에 대축성 비치료 근육보다 특히 더 많았다(도 9).

4주에, 도메인 3 결실 및 야생형 폴리스타틴은 주사된 근육 및 원위 근육 둘 다에서 근육 질량이 증가하였다. 도 10을 참조한다. 2주에 관찰된 것처럼, dFSD3은 비치료 측과 비교하여 주사된 근육에서 특히 더 많은 근육 질량으로 4주에 상당한 비대성 효과를 발생시켰다(도 11). ELISA에 의해 결정된 혈청에서의 폴리스타틴 수준은 야생형 및 dFSD3 치료 마우스에 유사하고, 2주, 4주 및 6주에 30ng/ml로 평균되었다(데이터 비도시).

근섬유 크기는 표준 조직학적 및 면역조직화학적 방법을 이용하여 주사 2주, 4주 및 6주 후 주사된 근육 및 원위 근육 조직 둘 다에서 또한 결정되었다. 예시적인 2주, 4주 및 6주 결과는 각각 도 12, 도 13 및 도 14에 도시되어 있다. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)에서 듀넷(Dunnett) 다중 비교 시험과 함께 1방향 아노바(ANOVA)를 사용하여 모든 통계를 수행하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 12에 도시된 바대로, 2주에, 주사된 근육에서, 근섬유 비대증은 FS344(23%), dFSD3(30%), Y185A 및 L191D 그룹에서의 대퇴사두근 및 FS344(17%) 및 dFSD3(25%) 그룹에서의 비장근에서 관찰되었다. 원위 근육 그룹에서, 근섬유 비대증은 dFSD2(12%) 그룹에서의 TA에서 관찰되었다. 비대증은 삼두근 또는 횡격막에서 관찰되지 않았다.

도 13에 도시된 바대로, 4주에, 주사된 근육에서, 근섬유 비대증은 FS344(41%), dFSD3(50%), dFSD113 및 L191D 그룹에서의 대퇴사두근 및 FS344(42%), dFSD2, dFSD3(73%), dFSD113, Y185A 및 L191D 그룹에서의 비장근에서 관찰되었다. 원위 근육 그룹에서, 비대증은 dFSD3(10%) 그룹에서의 TA 및 FS344(23%) 및 dFSD2(29%) 그룹에서의 횡격막에서 관찰되었다. 비대증은 삼두근에서 관찰되지 않았다.

도 14에 도시된 바대로, 6주에, 주사된 근육에서, 근섬유 비대증은 FS344(41%), dFSD3(30%), Y185A 그룹에서의 대퇴사두근 및 FS344(90%), dFSD3(49%), Y185A, L191D 그룹에서의 비장근에서 관찰되었다. 원위 근육에서, 근섬유 비대증은 FS344(26%), dFSD3(41%), dFSD113, Y185A 및 L191D 그룹에서의 TA에서 및 dFSD3(35%) 그룹에서의 횡격막에서 관찰되었다. 최소 비대증이 삼두근에서 관찰되었다.

종합하면, 이 결과는 단백질 치료제가 폴리스타틴 변이체에 기초하여 개발될 수 있다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 폴리스타틴 도메인 결실 또는 점 돌연변이는 근육 재생 효능을 보유하거나 개선할 수 있다. 상기 기재된 바대로, 도메인 3 결실은 DMD를 치료하기 위한 특히 유용한 폴리스타틴 변이체일 수 있다.

[0237] **실시예 6. FS315-GAG3-mFc의 전신 효능**

[0238] 실시예 4에 기재된 바대로, 비복근으로의 FS315-mFc의 주사는 대조군 근육에 비해 증가한 근육 질량을 발생시킨다. 이 실시예는 FS315-mFc의 전신 주사가 주사 부위와 먼 다양한 부위에서 근육 성장을 또한 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 이 실시예에서 사용된 모든 폴리스타틴 작제물은 GAG3 링커를 포함한다.

[0239] 전체 20마리의 C57BL/6 마우스가 8주 동안 1주 2회 피하(견갑골내) 주사를 받은 동물의 절반으로(대조군) 및 8주 동안 1주 2회 10mg/kg의 FS315-mFc의 피하(견갑골내) 주사를 받은 다른 절반으로 이 연구에서 사용되었다. 동물은 마지막 주사 24시간 후 희생되었고, 왼쪽 및 오른쪽 대퇴사두근, 비복근, 전경골근 및 삼두근의 중량은 동물의 전체 신체 중량으로서 측정되었다. 하기 표 9는 이 실시예에 대한 실험 설계를 나타낸다.

표 9

실험 설계

그룹	N	마우스 균주	시험 물품	주사 경로	용량	투약 스케줄	희생(마지 막 주사 24시간 후)
A	10	WT C57BL/6	FS315-mFc	SC (견갑골내)	10mg/kg	1주 2회	4주
B	10	WT C57BL/6	FS315-mFc	SC (견갑골내)	10mg/kg	1주 2회	8주
C	10	WT C57BL/6	비히클 (PBS)	SC (견갑골내)	NA	1주 2회	4주
D	10	WT C57BL/6	비히클 (PBS)	SC (견갑골내)	NA	1주 2회	8주

[0240]

[0241] 도 16은 연구의 8주 과정에 걸친 예시적인 신체 중량 데이터를 나타낸다. 볼 수 있는 것처럼, FS315-mFc 치료 동물에 대한 신체 중량은 2주에 시작하고 8주 연구에 걸쳐 계속하여 이 비히클 치료 대조군 동물보다 상당히 컸다. 도 17은 예시적인 근육 중량 데이터를 나타낸다. FS315-mFc로 치료된 마우스로부터의 삼두근 근육은 4주에 빨리 비히클 대조군과 비교하여 중량이 상당히 더 높았다. 8주의 치료 후, 삼두근 및 대퇴사두근 근육 그룹 둘 다 비히클과 비교하여 상당한 중량 증가를 나타냈다(도 17). 근섬유 크기는 실시예 4에 기재된 방법에 의해 결정되었다. 도 18은 4주 및 8주에 삼두근 및 대퇴사두근 근육 그룹에 대해 근섬유 직경의 증가 백분율을 나타낸다. 근육 그룹 둘 다 4주 및 8주 둘 다에 FS315-mFc에 의한 치료 후 더 큰 근섬유 크기에 대한 이동을 입증한다.

[0242] 또한, 혈청 폴리스타틴 수준은 피하 주사 후 증가되었다. 예를 들어, (1주 2회 피하 주사로) 치료 마우스의 혈청에서의 FS315-mFc 수준은 도 19에 도시되어 있다. FS315-mFc 수준은 FS315-mFc 주사와 혈청 수집 사이의 시간의 양(24시간)과 일치하게, 4주 및 8주 희생 시점에서 수집된 혈청에서 가장 높았다. 이 시점에, FS315-mFc의 혈청 수준은 평균 약 200ng/ml이었다. 2주마다의 안와내 출혈을 FS315-mFc 주사 3일 후 수집하였고, FS315-mFc의 혈청 수준은 평균 약 30 내지 50ng/ml이었다.

[0243] 이 데이터는 FS315-mFc의 전신 주사(예를 들어, 피하 주사)가 신체에 걸쳐 다양한 근육 조직에서 근육 성장을 효과적으로 유도할 수 있다는 것을 입증한다.

[0244] **실시예 7. DMD 마우스 모델에서의 폴리스타틴-Fc 융합 단백질의 전신 효능**

[0245] 이 실시예는 DMD 질환 모델에서의 전신 효능을 추가로 나타낸다. 특히, 하기 기재된 바대로, FS315-mFc의 전신 주사는 근육 괴사 및/또는 섬유증과 같은 다양한 특징적인 DMD 증상의 진행을 성공적으로 감소시켰다. 이 실시예에서 사용된 모든 폴리스타틴 작제물은 GAG3 링커를 포함한다.

[0246] mdx 마우스 모델은 DMD에 대한 후보 치료의 개념의 증거를 입증하기 위한 전임상 모델로서 광범위하게 사용된다. mdx 마우스의 사지 근육 그룹 및 횡격막 둘 다 연령이 증가하는 경향이 있는 광범위한 병리학을 나타낸다. 이러한 병리학은 근육에서의 염증성 침입, 괴사 및 섬유증의 부위를 특징으로 한다. FS315-mFc는 근육에서의 섬유증의 증가에 대한 이의 효과를 평가하기 위해 이 모델에서 시험되었다. 전체 50마리의 mdx 마우스가 이 실시예에서 사용되었고, 12주 동안 1주 2회로 20마리의 동물은 PBS의 피하 주사를 받았고, 30마리의 동물은

10mg/kg의 FS315-mFc의 피하 주사를 받았다(표 10 참조). 동물은 마지막 주사 24시간 후 희생되었고, 조직은 피사 및 섬유증의 분석을 위해 수집되었다(표 11 참조).

표 10

실험 설계

그룹	N	시험품	주사 경로	용량	투약 스케줄	희생 (주사 24시간 후)
A	15	FS315-mFc	SC	10mg/kg	1주 2회	6주
B	10	PBS	SC	해당 없음	1주 2회	6주
C	15	FS315-mFc	SC	10mg/kg	1주 2회	12주
D	10	PBS	SC	해당 없음	1주 2회	12주

[0247]

표 11

조직 수집 및 처리

횡격막	대퇴사두근	비복근	삼두근
단백질 분석을 위해 ½ 급속 냉동됨	단백질 분석을 위해 1 급속 냉동됨	단백질 분석을 위해 1 급속 냉동됨	단백질 분석을 위해 1 급속 냉동됨
조직학적 분석을 위해 포르말린 중에 ½ 고정됨	조직학적 분석을 위해 포르말린 중에 1 고정됨	조직학적 분석을 위해 포르말린 중에 1 고정됨	조직학적 분석을 위해 포르말린 중에 1 고정됨

[0248]

[0249] 도 20은 RNA 수준에서의 섬유성 단백질 발현에 대한 FS315-mFc의 예시적인 효과를 나타낸다. 구체적으로, 콜라겐 I형, 알파-평활근 액틴 및 콜라겐 삼중 나선 반복부 함유 1 단백질의 RT-PCR은 1주 2회 SC 치료 후 6주에 빨리 이 섬유증 관련 단백질의 발현에서 상당한 감소를 나타냈다.

[0250] 표 12 및 표 13은 근육 조직 절편에서 (H&E 염색 절편의 평가에 의해 결정된 바대로) 피사 및 (FS315-mFc 치료 mdx 마우스 근육에서의 콜라겐 I 염색 근육 절편의 평가에 의해 결정된 바대로) 섬유증의 조직병리학적 평가를 요약한 것이다. FS315-mFc 및 비히클 치료 그룹의 경우, 각각 그룹마다 전체 15마리 및 10마리의 동물이 존재하였다. 표 12에 나타낸 바대로, FS315-mFc 치료는 1주 2회 주사의 개시로부터 6주에 사지 근육의 피사 발병을 상당히 감소시켰다. 이러한 피사 감소는 대퇴사두근 및 삼두근 근육을 통한 H&E 절편의 이미지에 예시되어 있다(도 21). 근육 조직 절편의 콜라겐 I 염색에 의해 입증된 섬유증의 발생은 FS315-mFc 치료의 12주 후 상당히 감소하였다(또한 표 13 참조). 이 콜라겐 분해 감소는 콜라겐 I 염색 근육 절편의 이미지에 예시되어 있다(도 22).

[0251] 이 연구의 결과는 FS315-mFc가 근육 피사 및/또는 섬유증(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 DMD 마우스 모델에서 이환 근육 병리학의 진행을 효과적으로 감소시킴으로써 DMD를 성공적으로 치료할 수 있다는 것을 나타낸다.

표 12

FS315-mFc 치료 mdx 마우스 근육에서의 피사의 발생(p 값은 피셔(Fisher) 정확 시험을 이용하여 비히클과 FS315-mFc 사이의 유의도를 나타낸다)

	6주 대퇴사두근 p=0.001		12주 대퇴사두근 p=0.049	
점수	비히클	FS315-mFc	비히클	FS315-mFc
최소	10%	67%	30%	73%
중간	40%	33%	70%	27%
현저	50%	0%	0%	0%

	6주 삼두근 p<0.001		12주 삼두근 p=0.02	
점수	비히클	FS315-mFc	비히클	FS315-mFc
최소	0%	53%	20%	73%
중간	10%	33%	70%	20%
현저	90%	14%	10%	7%

	6주 비복근 p<0.001		12주 비복근 p=0.007	
점수	비히클	FS315-mFc	비히클	FS315-mFc
최소	0%	73%	20%	80%
중간	40%	27%	60%	20%
현저	60%	0%	20%	0%

전체 확인된 근육 부위에서 최소 <5%; 중간 <30%; 현저 >30%

[0252]

표 13

섬유증의 발생, (p 값은 피셔 정확 시험을 이용한 비히클과 FS315-mFc 사이의 유의도를 나타낸다)

	12주 대퇴사두근 p=0.0001	
점수	비히클	FS315-mFc
최소	0%	80%
중간	70%	20%
현저	30%	0%

	12주 삼두근 p=0.001	
점수	비히클	FS315-mFc
최소	0%	67%
중간	80%	20%
현저	20%	13%

	12주 비복근 p<0.0001	
점수	비히클	FS315-mFc
최소	0%	73%
중간	20%	27%
현저	80%	0%

전체 확인된 근육 부위에서 최소 ~1%; 중간 <5%; 현저 >5%

[0253]

[0254] 실시예 8. 재조합 폴리스타틴 도메인 3 결실 Fc 융합 단백질의 생체내 효능

[0255] 이 실시예는 폴리스타틴 도메인 3 결실(dFSD3) Fc 융합 단백질이 야생형 폴리스타틴-Fc 융합 단백질과 유사하게

생체내 근육 성장을 효과적으로 유도한다는 것을 나타낸다. 이 실시예에서 사용된 모든 폴리스타틴 작제물은 GAG3 링커를 포함한다.

[0256] 구체적으로, 실시예 5에 기재된 도메인 3 결실 작제물은 FS315-mFc에 사용된 것과 동일한 mFc에 융합되었다. 또한, 동일한 GAG3 링커 서열은 dFSD3을 mFc에 융합시키도록 사용되었다. C57BL/10 마우스에 실시예 4에 기재된 바대로 비복근 근육으로 직접적으로 융합 단백질 둘 다를 주사하였다. 마우스를 20 μ g의 융합 단백질의 1주 2회 주사의 4주 후 희생시켰고, 반대의 비복근 근육은 동일한 용적의 PBS를 받았다. 마지막 주사 24시간 후, 치료 마우스를 희생하고, 주사된 비복근 근육을 조심스럽게 주사하고 무게를 잰다. 도 23에 표시된 바대로, dFSD3-GAG3-mFc 융합 단백질은 비히클 대조군에 비해 상당한 근육 질량 증가를 발생시켰고, 증가는 FS315-mFc에 의해 관찰된 것과 유사하였다. 이 실시예는 폴리스타틴 도메인 3 결실 Fc 융합 단백질(예를 들어, dFSD3-GAG3-mFc)이 생체내 활성이고 DMD 치료에 대한 다른 유망한 치료학적 후보물질이라는 것을 나타낸다.

[0257] **실시예 9. 폴리스타틴 기능에 대한 더 긴 링커의 이익**

[0258] 이 실시예는 더 긴 링커, 특히 적어도 10개의 아미노산을 포함하는 링커가 폴리스타틴 기능에 예상치 못한 이점을 제공한다는 것을 나타낸다. 구체적으로, 이 실시예는 57개의 아미노산 링커를 포함하는 FS315-GAG3-Fc 융합 단백질(젯과 밋/또는 인간 Fc)이 9개의 아미노산 링커 ALEVLFGQP를 포함하는 시노 바이올로지컬로부터의 상업적으로 구입 가능한 FS315-hFc 융합 단백질(시노 바이올로지컬 인크. 카탈로그 10685-H02H호)과 비교하여 마이오스타틴 및 액티빈을 저해하는 이의 능력이 더 강력하다는 것을 나타낸다. 신호전달 검정에 사용된 마이오스타틴 및 액티빈의 농도는 1.2nM이었다. 도 24 및 표 14에 표시된 바대로, FS315-GAG3-mFc 및 FS315-GAG3-hFc 융합 단백질은 네이티브 FS315와 동일한 정도로 CAGA-루시퍼라제 검정에서 마이오스타틴 및 액티빈 신호전달을 저해한다. 비교하면, 상업적으로 구입 가능한 FS315-hFc 융합 단백질(시노 바이올로지컬)은 상당히 덜 강력하다. 계산된 IC50은 하기와 같다:

표 14

Smad2/3 신호전달을 위한 CAGA-루시퍼라제 리포터 검정에서의 마이오스타틴 및 액티빈의 폴리스타틴 저해에 대한 예시적인 IC50 값

물질	리간드	IC50 (nM)
FS315 (R&D 시스템즈)	마이오스타틴	0.45
FS315-GAG3-mFc	마이오스타틴	0.46
FS315-GAG3-hFc	마이오스타틴	0.68
FS315-hFc (시노 바이올로지컬)	마이오스타틴	2.99
FS315 (R&D 시스템즈)	액티빈	0.40
FS315-GAG3-mFc	액티빈	0.36
FS315-GAG3-hFc	액티빈	0.70
FS315-hFc (시노 바이올로지컬)	액티빈	2.90

[0259]

[0260] 특정한 이론에 구속되고자 함이 없이, FS315 단백질과 Fc 구역 사이의 더 긴 링커(예를 들어, 이 특정한 작제물 FS315-GAG3-Fc에서의 57개의 아미노산 링커)가 훨씬 더 짧은 링커(예를 들어, 9개의 아미노산)를 갖는 융합 단백질과 비교하여 FS315의 더욱 네이티브한 구성을 허용하여, 네이티브 FS315로 관찰된 것과 유사한 정도로 신호전달의 저해 및 표적 리간드에 대한 결합을 허용한다. 비교하면, 상업적으로 구입 가능한 FS315-hFc 단백질은, 가능하게는 FS315 구성 및 생리학적 활성에 해로운 효과를 야기하면서, Fc와 FS315 단백질 사이의 상당히 더 적은 분리로 9개의 아미노산의 훨씬 더 짧은 링커를 갖는다.

[0261] 실시예 10. 폴리스타틴 용합 단백질 FS315-GAG3-hFc는 혈청 반감기를 갖는다

[0262] 이 실시예에서, 본 발명자들은 제공된 폴리스타틴 용합 단백질, 특히 더 긴 링커(예를 들어, 적어도 10개의 아미노산을 갖는 링커)를 갖는 것이 연장된 혈청 반감기를 갖는다는 것을 나타낸다. 구체적으로, 처음으로, 본 발명자들은 여기서 GAG3 링커(FS315-GAG3-hFc)와 함께 인간 Fc에 용합된 FS315가 10mg/kg의 단일 용량에서 스프라그-다우리 래트로 피하로(SC) 투여될 때 연장된 혈청 반감기를 갖는다는 것을 입증하였다. 투여 후, 혈청은 15분 내지 5일의 범위의 시점에 수집되었다. FS315-GAG3-hFc는 인간 FS315를 포획하고 혈청 샘플에서 온전한 용합 단백질의 인간 Fc 도메인을 검출하는 메소스케일 디스커버리(Mesoscale Discovery: MSD) 검정을 이용하여 래트 혈청에서 측정되었다. 래트 혈청에서의 FS315-GAG3-hFc의 수준은 도 25에 도시되어 있다. PK 매개변수는 표 15에 요약되어 있다.

표 15

FS315-GAG3-hFc 생체내 PK 데이터

t _{1/2} (시간)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (시간)	AUC _{0-마지막} (hr*ng/mL)	AUC _{0-∞} (hr*ng/mL)
84	1372	48	114585	205803

[0263]

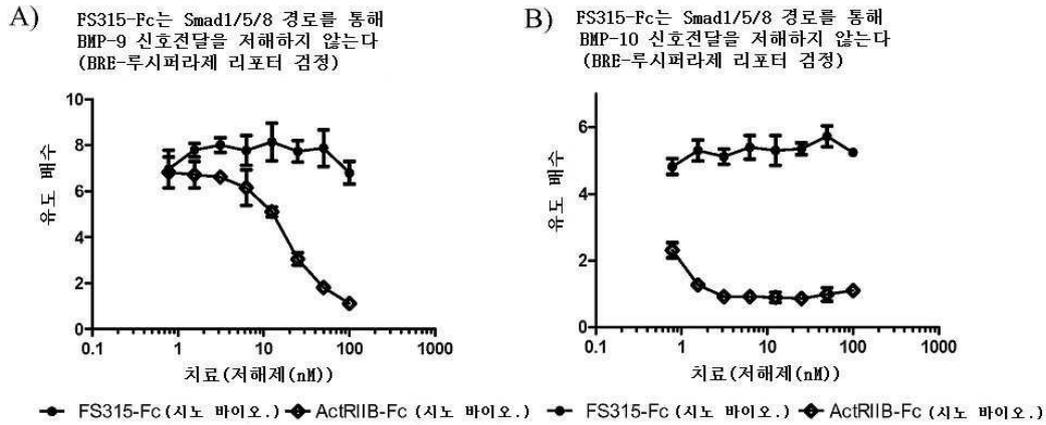
[0264] 종합하면, 상기 실시예는 제공된 변이체를 포함하는 폴리스타틴이 DMD 질환 모델에서 예를 들어 전신 투여에 의해 근육 비대증을 유도하고 근육 괴사 및 섬유증을 악화시키는 데 있어서 매우 효과적이라는 것을 입증한다. 따라서, 폴리스타틴 및 제공된 변이체는 DMD의 치료를 위한 효과적인 단백질 치료제일 수 있다.

[0265] 등가물 및 범위

[0266] 당해 분야의 당업자는 단지 일상적인 실험을 이용하여 본 명세서에 기재된 본 발명의 특정한 실시형태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확신할 수 있다. 본 발명의 범위는 상기 설명에 제한되도록 의도되지 않고, 오히려 하기 특허청구범위에 기재된 바와 같다.

도면

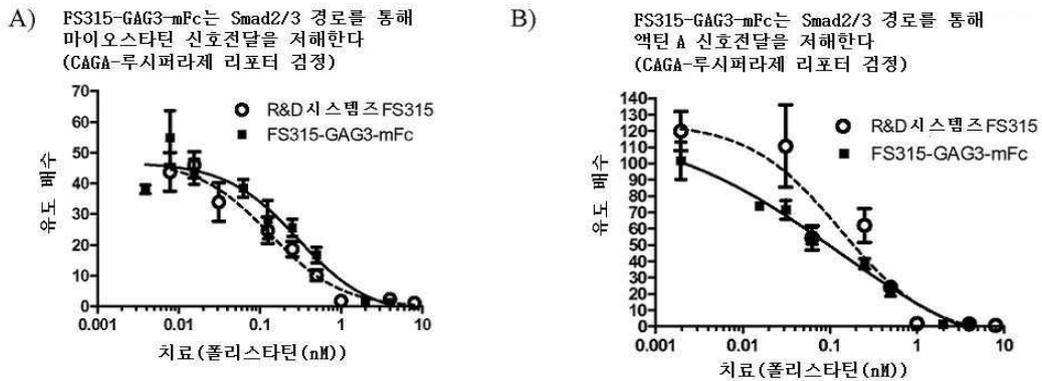
도면1



도 1

FS315-Fc는 Smad1/5/8 경로를 통해 BMP-9 또는 -10 신호전달을 저해하지 않는다 (BRE-루시퍼라제 리포터 검정)

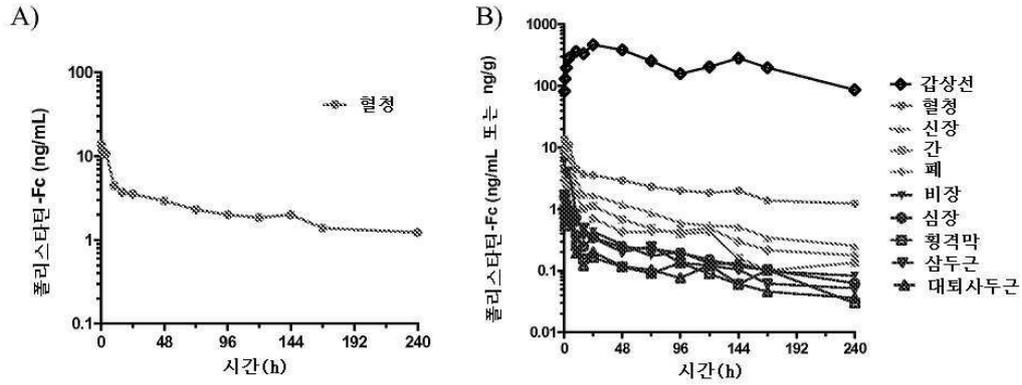
도면2



도 2

FS315-GAG3-mFc는 Smad2/3 경로를 통해 마이오스타틴 및 액틴 A 신호전달을 저해한다 (CAGA-루시퍼라제 리포터 검정)

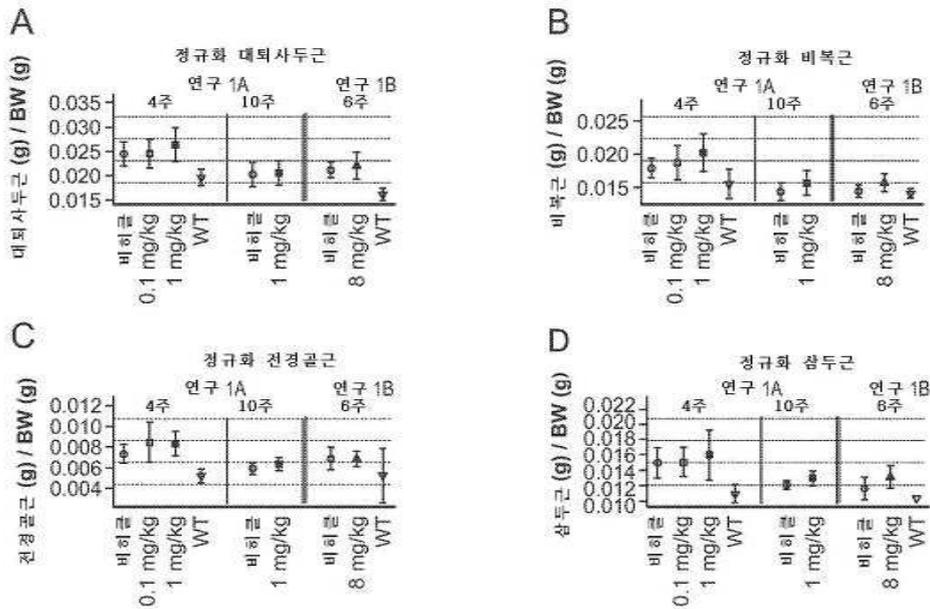
도면3



도 3

1mg/kg의 SC 주사 후 마우스 혈청 및 조직에서의 FS315-mFc PK 프로파일. 예상된 조직 반감기는 2일 내지 5일이고, 혈청 반감기는 약 5일이다.

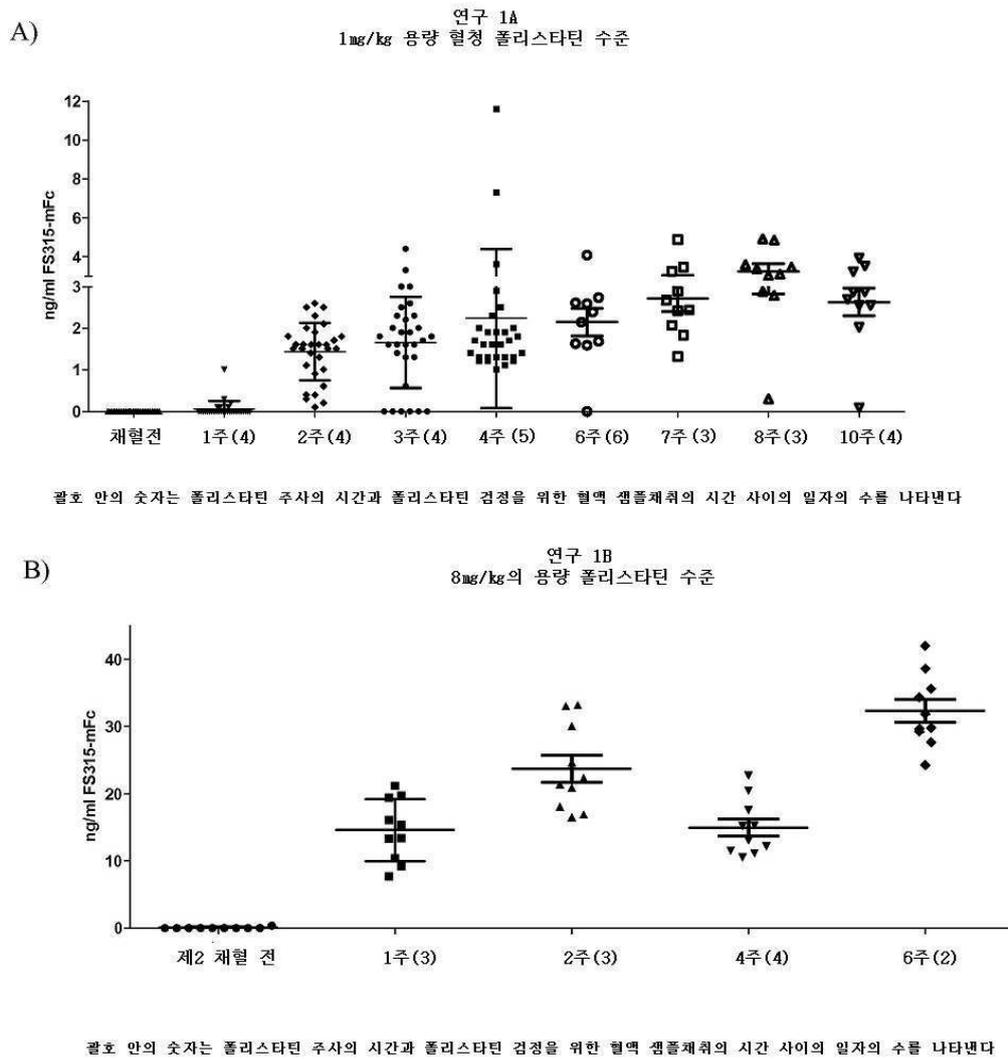
도면4



도 4

mdx 마우스로의 FS315-mFc의 1주 2회 SC 투여 후 근육 질량의 변화. 근육 중량은 기준 체중으로 정규화된다. 10주 동안 1mg/kg 또는 6주 동안 8mg/kg로 치료된 mdx 마우스에서의 근육 중량 증가의 경향이 있다

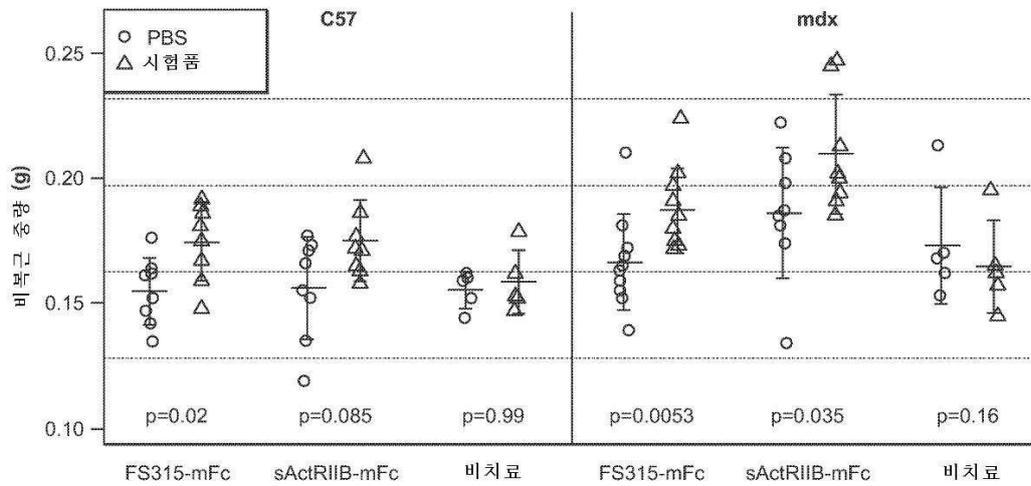
도면5



도 5

1mg/kg(A) 및 8mg/kg(B)로 치료된 mdx 마우스의 혈청에서의 FS315-mFc의 수준

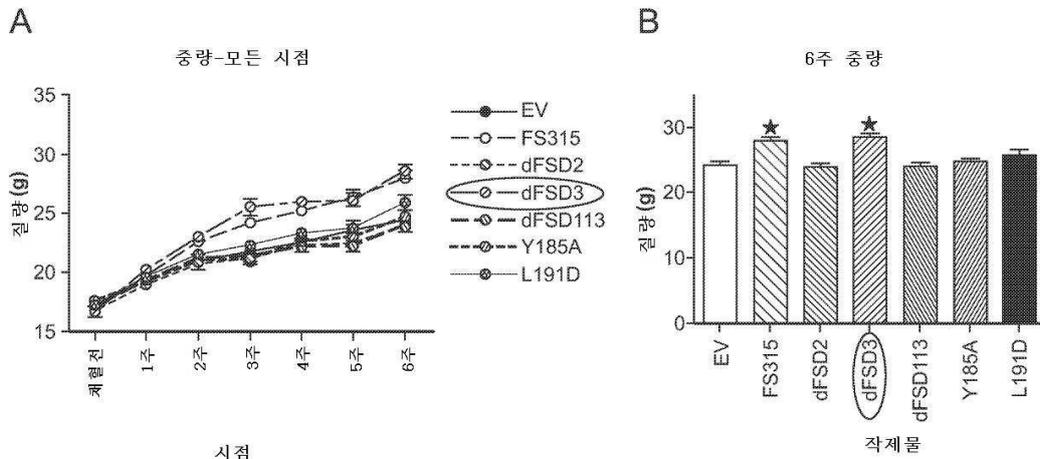
도면6



도 6

비복근으로 직접적으로 20 μ g의 1주 2회 주사의 4주 후 근육 중량에 대한 FS315-mFc의 근육내 주사의 영향. 대축성 비복근은 동일 용적의 PBS를 받았고 각각의 치료 그룹에 대한 대조군으로서 작용한다. 비치료 그룹은 주사를 받지 않았고, 이 그룹에 대한 각각의 데이터 세트는 오른쪽 및 왼쪽 비복근을 나타낸다. P 값은 본페로니 보정에 의한 쌍 지은 t 시험으로부터 얻었다

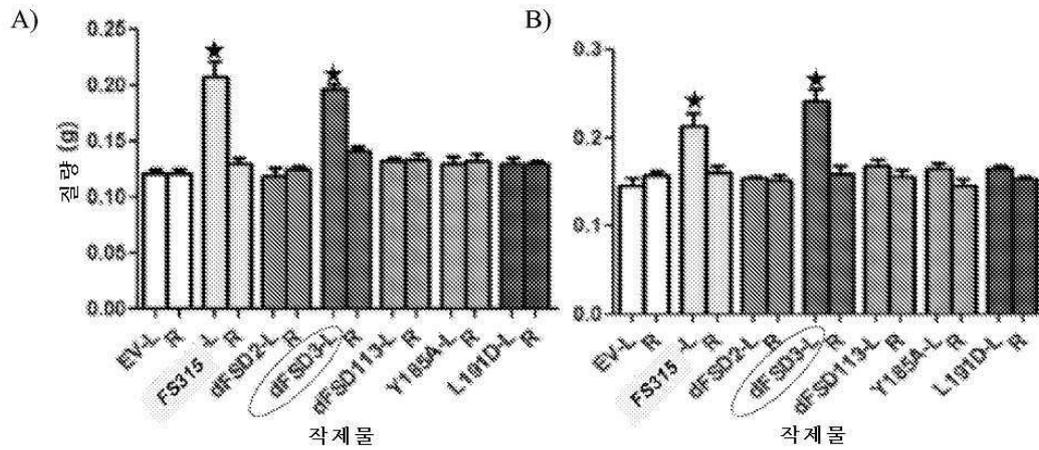
도면7



도 7

C57 마우스의 비복근 및 대퇴사두근에 대한 폴리스타틴 변이체의 근육내 유전자 전달 후 주마다의 체중

도면8



도 8

C57 마우스의 비복근(A) 및 대퇴사두근(B)에 대한 폴리스타틴 변이체의 근육내 유전자 전달 후 2주 근육 중량

도면9

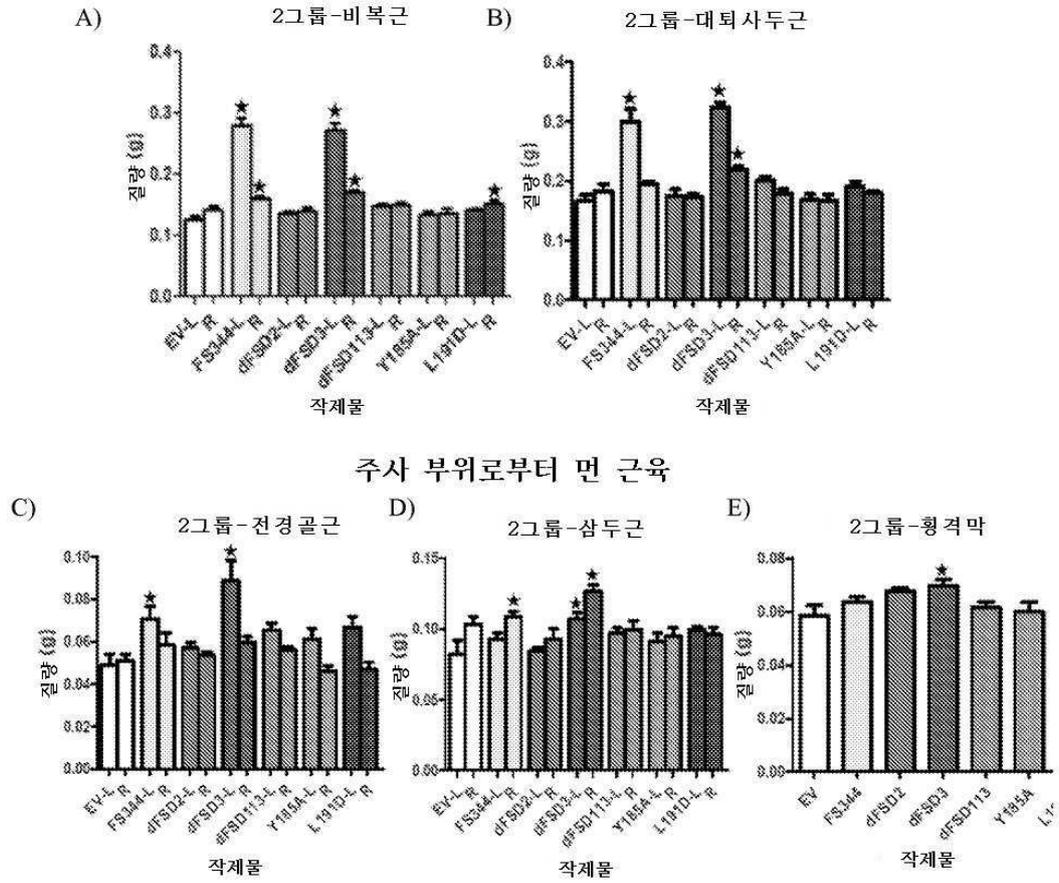


도 9

직접적인 유전자 전달을 통해 dFSD3을 받은 절제된 대퇴사두근의 2주 전체 형태. 오른쪽 대퇴사두근은 dFSD3의 주사를 받지 않았다.

도면10

주사된 근육



도 10

C57 마우스의 비복근(A) 및 대퇴사두근(B)에 대한 폴리스타틴 변이체의 근육내 유전자 전달 후 4주 근육 중량. 하기 근육은 주사 부위로부터 멀었다: C)전경골근, D) 삼두근, E) 횡격막

도면11

왼쪽
주사 부위

오른쪽



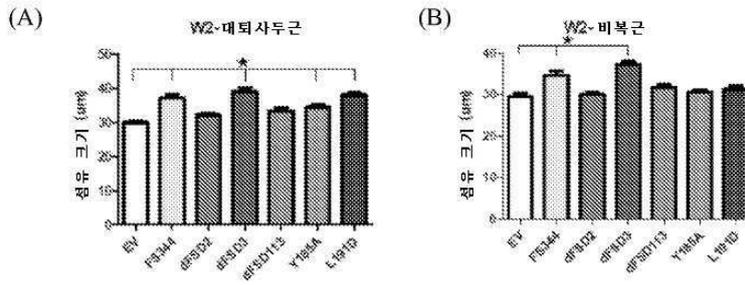
dFSD3 4주

도 11

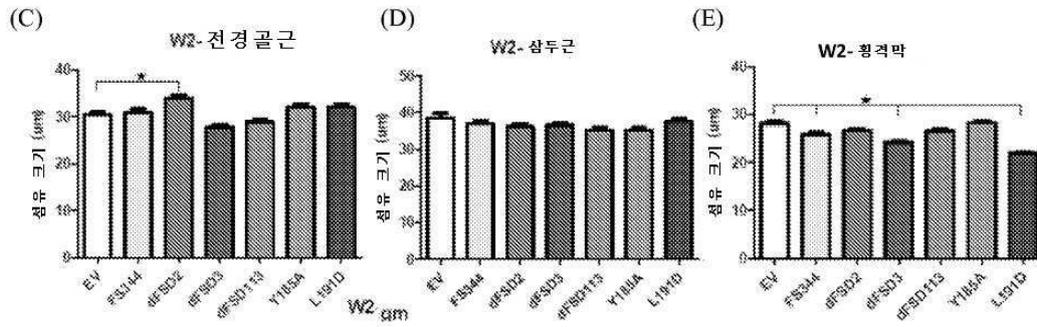
직접적인 유전자 전달을 통해 dFSD3을 받은 대퇴사두근의 4주 전체 형태.
오른쪽 대퇴사두근은 dFSD3의 주사를 받지 않았다

도면12

주사된 근육



원위 근육

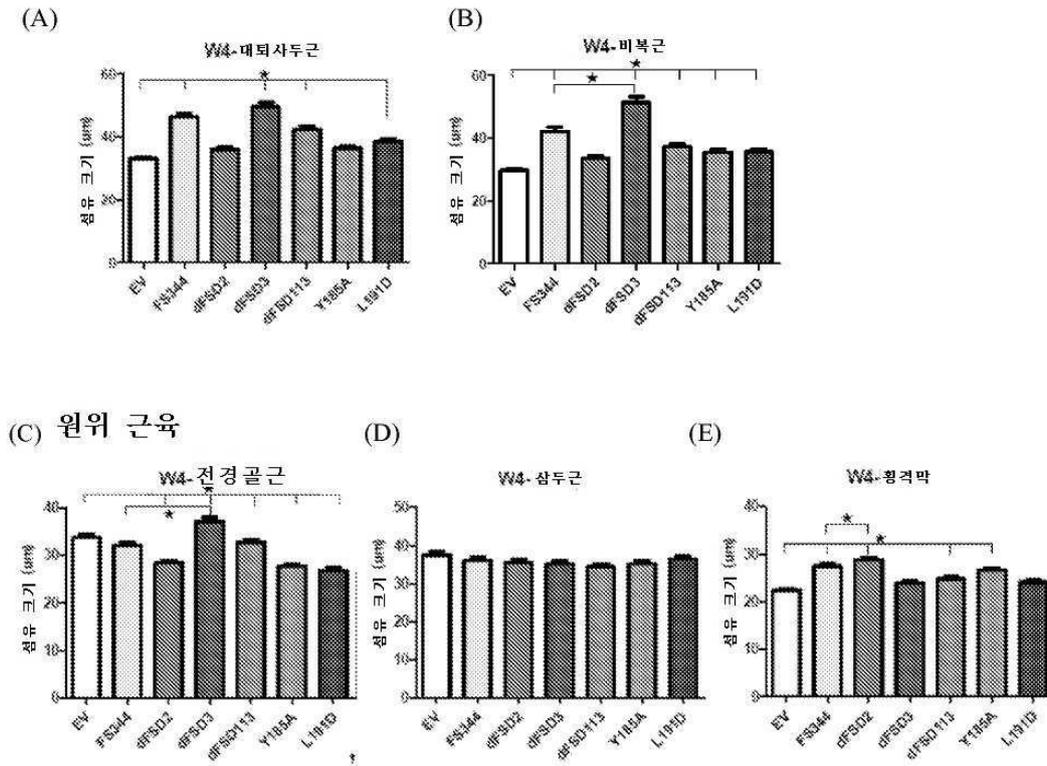


도 12

C57 마우스의 대퇴사두근(A) 및 비복근(B)에 대한 폴리스타틴 변이체의 근육내 유전자 전달 후 2주 근육 근원섬유 직경. 하기 근육은 주사 부위로부터 멀었다: (C) 전경골근, (D) 삼두근, (E) 횡격막.

도면13

주사된 근육

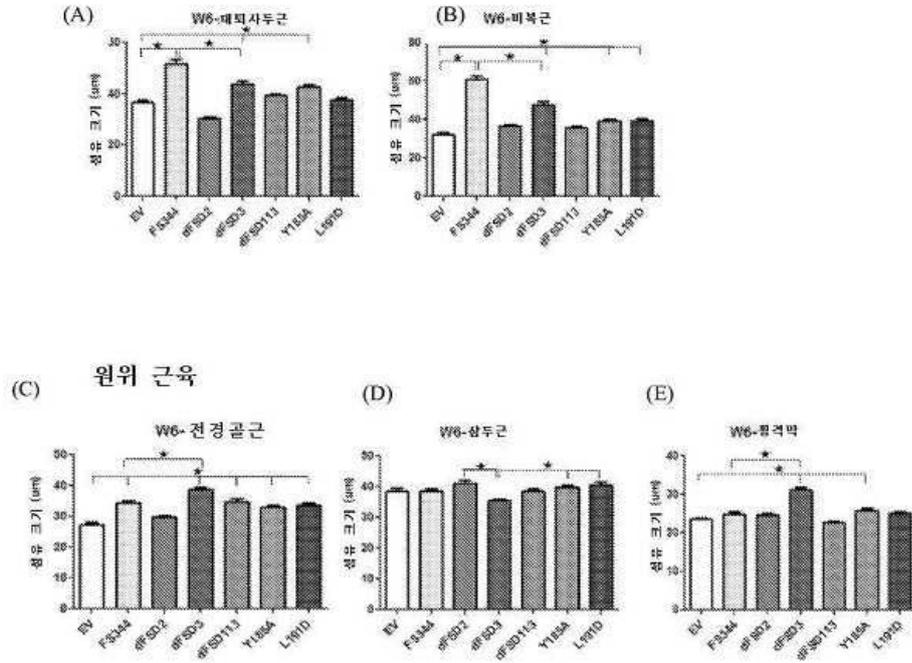


도 13

C57 마우스의 대퇴사두근(A) 및 비복근(B)에 대한 폴리스타틴 변이체의 근육내 유전자 전달 후 4주 근육 근원섬유 직경. 하기 근육은 주사 부위로부터 멀었다: (C) 전경골근, (D) 삼두근, (E) 횡격막.

도면14

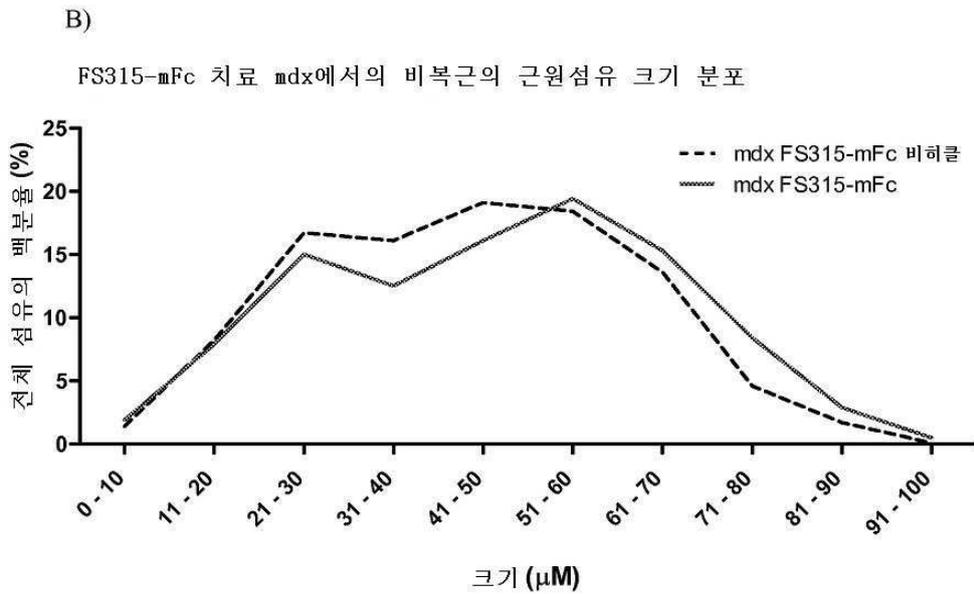
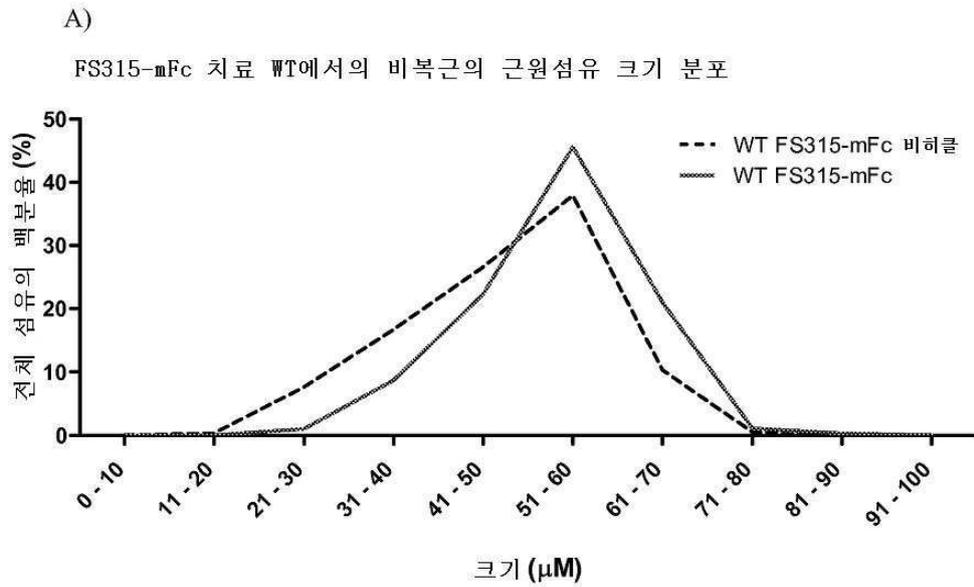
주사된 근육



도 14

C57 마우스의 대퇴사두근(A) 및 비복근(B)에 대한 폴리(에스터)틴 변이체의 근육내 유전자 전달 후 6주 근육 근원섬유 직경. 하기 근육은 주사 부위로부터 밀었다: (C) 전경골근, (D) 삼두근, (E) 횡격막.

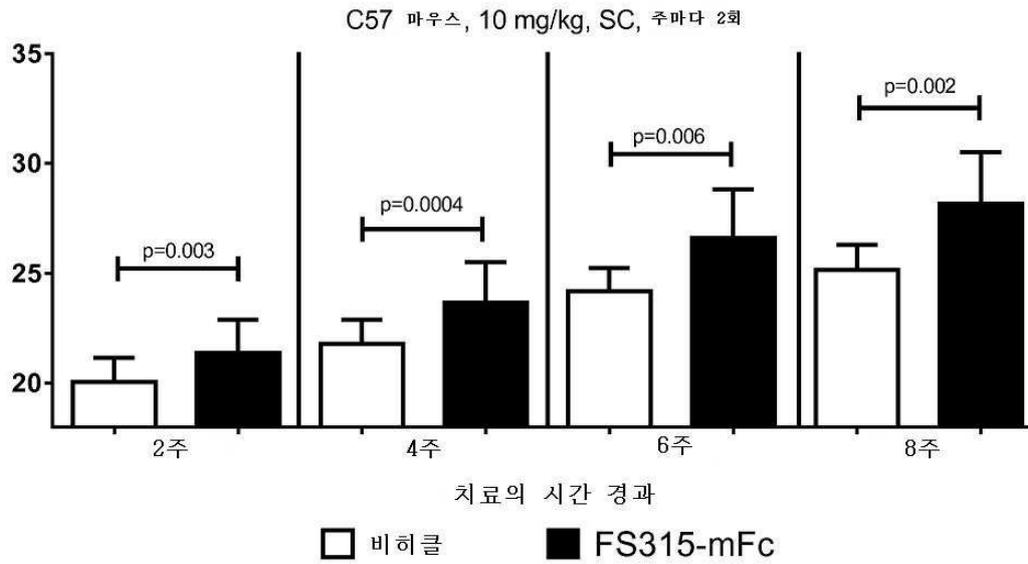
도면15



도 15

C57 (WT) (A) 또는 mdx (B) 마우스의 비복근으로의 근육내 FS315-mFc 주사 후 근원섬유의 크기 분포

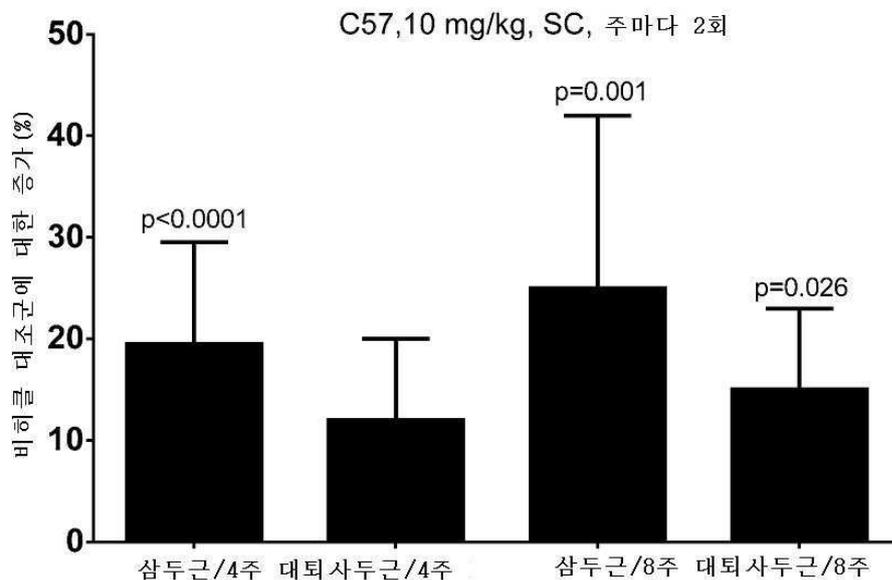
도면16



도 16

피하 주사를 통한 10mg/kg의 FS315-mFc로 8주 동안 1주 2회 치료된 C57 마우스의 체중. P 값은 쌍을 짓지 않은 t 시험을 이용하여 얻었다.

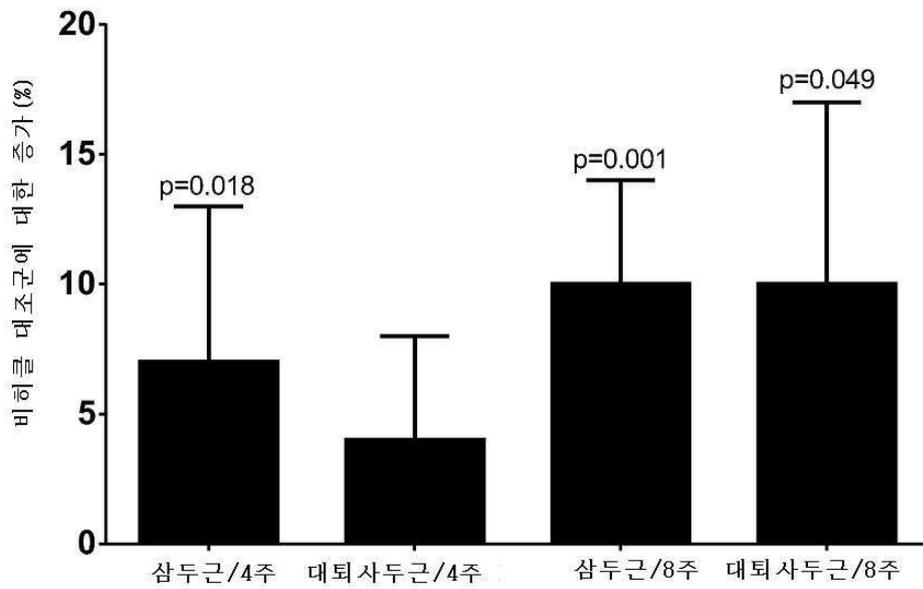
도면17



도 17

4주 및 8주에 FS315-mFc 치료 C57 마우스에서의 삼두근 및 대퇴사두근에 대한 체중 변화 백분율. P 값은 쌍 짓지 않은 t 시험으로부터 얻었다.

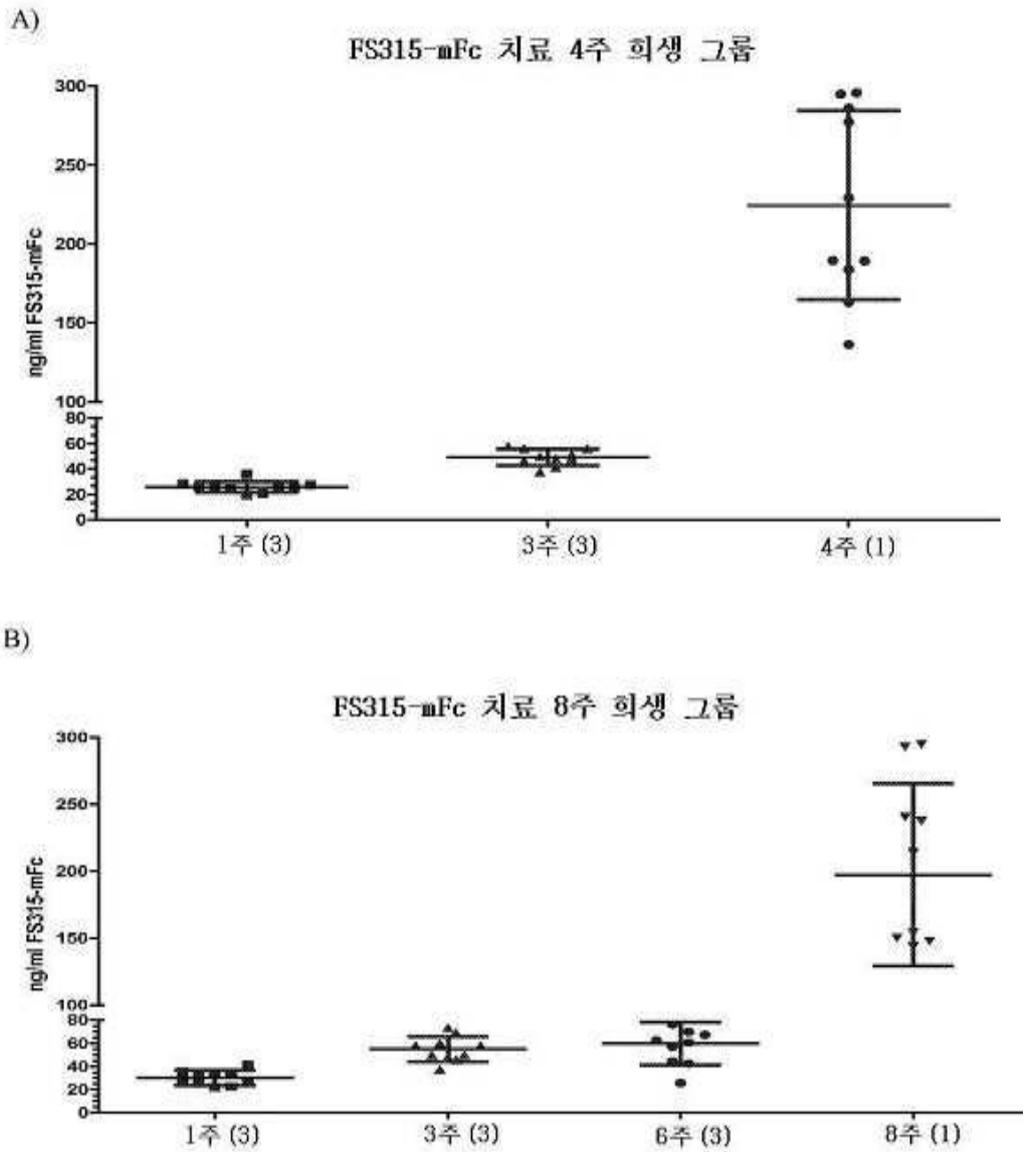
도면18



도 18

4주 및 8주에 FS315-mFc 치료 C57 마우스에서의 삼두군 및 대퇴사두군 근원섬유의 비히클 대조군에 대한 증가 백분율. P 값은 쌍 짓지 않은 t 시험으로부터 얻었다.

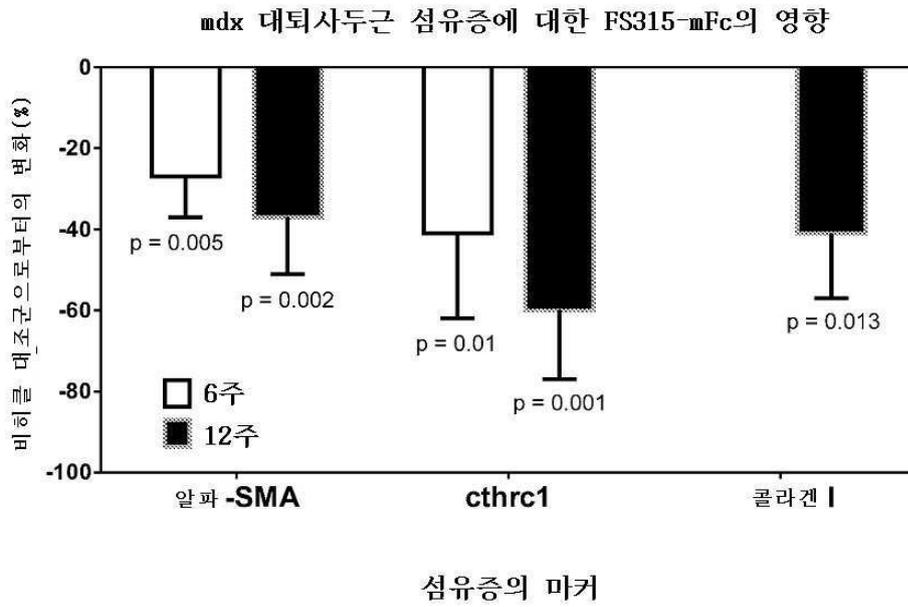
도면19



도 19

C57 마우스로의 10mg/kg의 1주 2회 피하 주사 후 혈청에서의 FS315-mFc의 수준. X축에서, "주"는 치료 과정의 주를 의미한다. 혈청이 수집될 때 상응하는 FS315-mFc의 주사 후 일의 숫자는 괄호 내에 포함된다. 비히클 치료 마우스는 혈청에서 검출 가능한 폴리스타틴을 갖지 않았다.

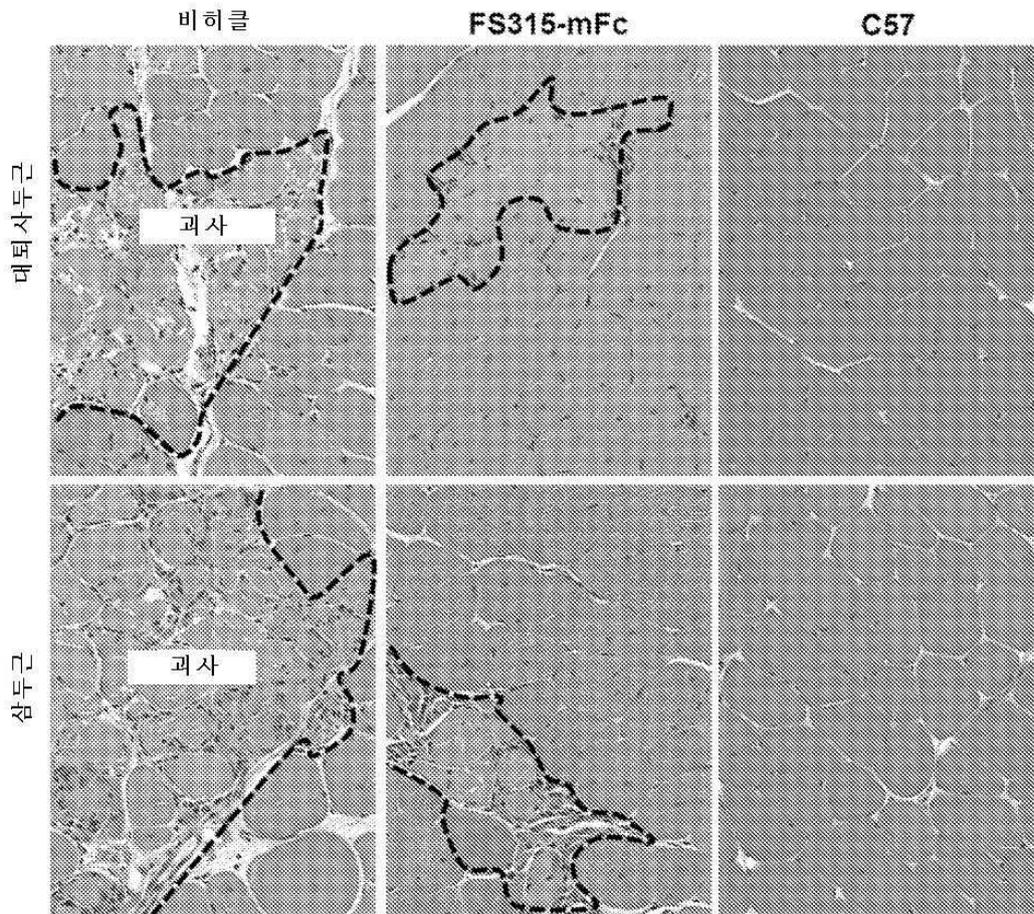
도면20



도 20

mdx 마우스의 FS315-mFc 치료의 6주 및 12주 후 섬유증의 중요한 마커의 mRNA 수준. RT-PCR은 치료 마우스의 대퇴사두근에서의 각각의 단백질의 mRNA 수준을 정량화하기 위해 이용되었다(n=시점마다 15마리의 동물). P 값은 일방향 아노바, 이후 터키 사후 썬지음 비교 시험 또는 이의 비모수적 아날로그로부터 얻었다.

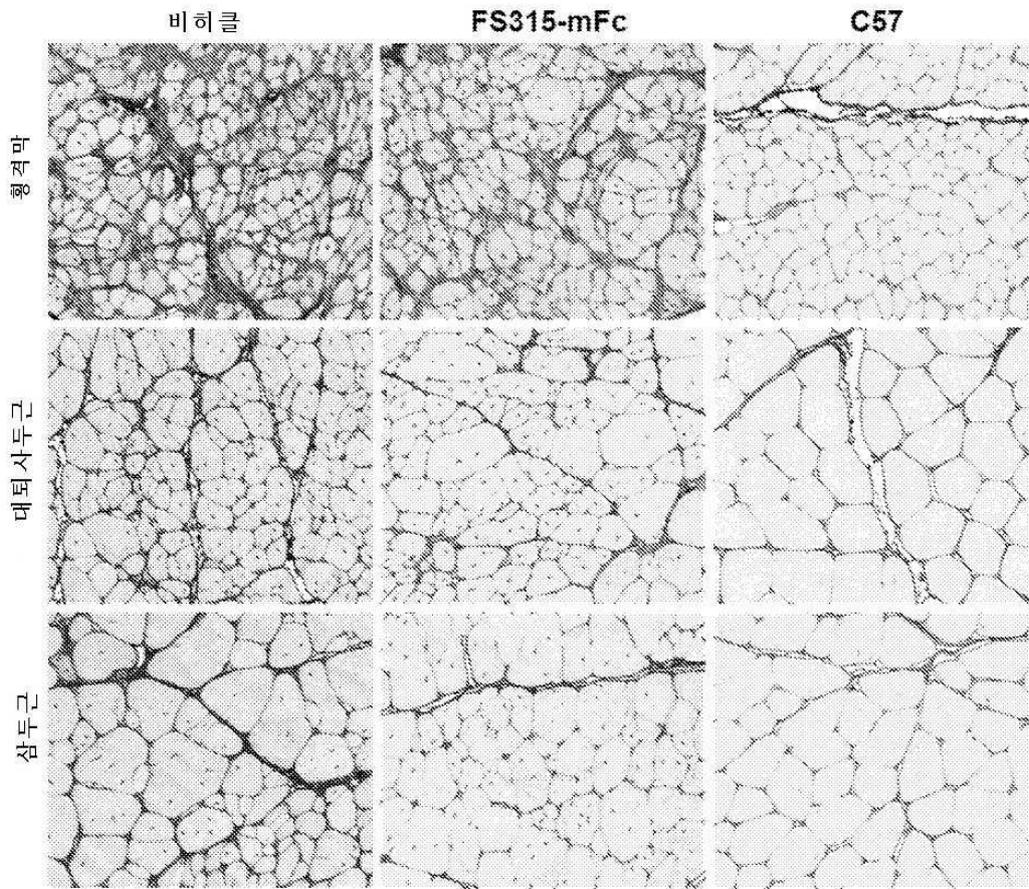
도면21



도 21

10mg/kg의 FS315-mFc에 의한 1주 2회 치료의 6주 후 대퇴사두근 및 삼두근의 H&E 염색된 절편, 선으로 그은 부위는 괴사 조직을 나타낸다. C57 패널은 건강한 이환되지 않은 근육을 나타낸다.

도면22

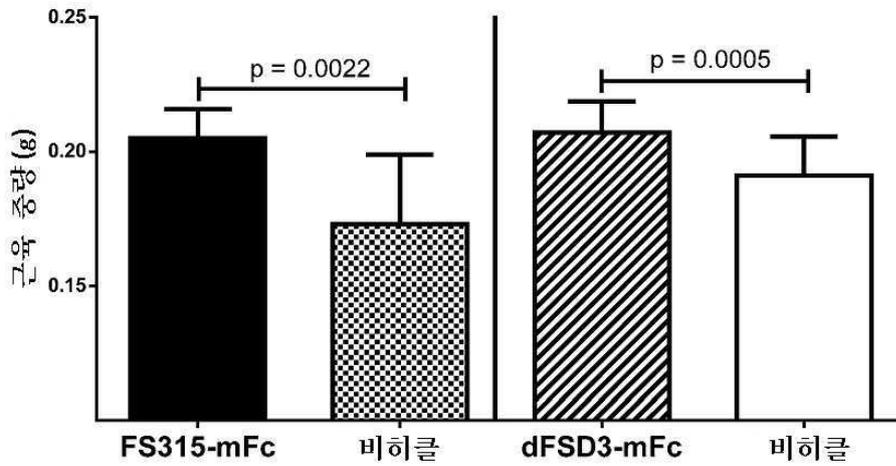


도 22

10mg/kg의 FS315-mFc에 의한 1주 2회 치료의 12주 후 횡격막, 대퇴사두근 및 삼두근의 콜라겐 I 염색된 절편. 갈색의 염색된 부위는 콜라겐 I 침착 및 섬유증을 나타낸다. C57 패널은 건강한 이환되지 않은 근육을 나타낸다.

도면23

비복근 중량에 대한 FS315-mFc 및 dFSD3-mFc의 영향

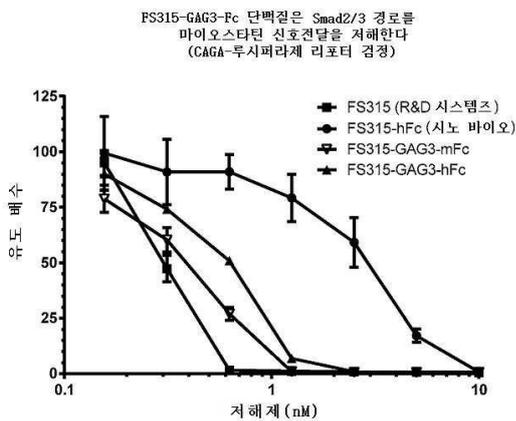


도 23

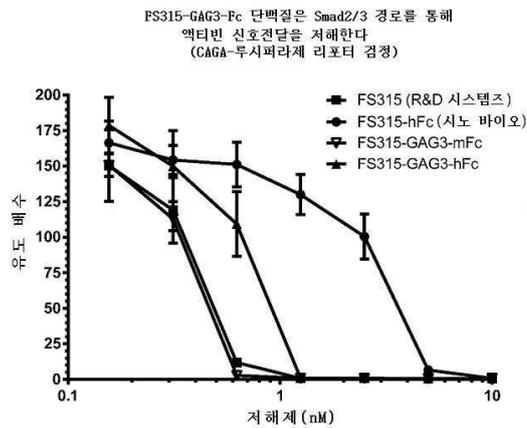
4주 동안 비복근으로 직접적으로 20 μ g의 1주 2회 주사 후 주사된 근육 중량에 대한 FS315-mFc 및 dFSD3-mFc의 약동학적 영향. P 값은 쌍 지은 t 시험으로부터 얻었다(비히클 대조군 과 비교하여 폴리스타틴 치료된 것)

도면24

A)



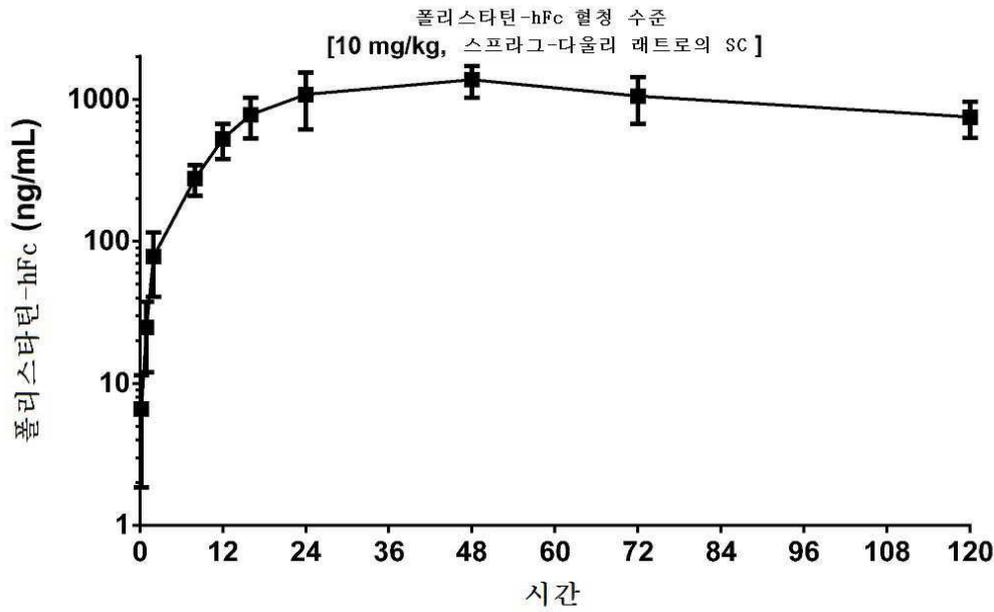
B)



도 24

FS315-GAG3-mFc 및 -hFc는 상업적으로 구입 가능한 FS315-(9 링커)-hFc 단백질(시노 바이올로지컬)과 비교하여 더 높은 정도로 Smad2/3 경로 (GAGA-루시퍼라제 리포터 검정)를 통해 A) 마이오스타틴 및 B) 액티빈 A 신호전달을 저해한다.

도면25



도 25

10mg/kg의 SC 주사 후 래트 혈청에서의 FS315-hFc PK 프로파일. 약 3.5일의 예상된 혈청 반감기.

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.
- <120> FOLLISTATIN IN TREATING DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY
- <130> WO2014/116981
- <140> PCT/US2014/012996
- <141> 2014-01-24
- <150> US 61/756,996
- <151> 2013-01-25
- <150> US 61/915,733
- <151> 2013-12-13
- <160> 17
- <170> PatentIn version 2.0
- <210> 1
- <211> 315
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15

 Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30
 Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
 35 40 45
 Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
 50 55 60
 Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
 65 70 75 80

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

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

 Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly
 210 215 220
 Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu
 225 230 235 240
 Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala

245 250 255
 Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
 260 265 270

Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
 275 280 285

Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp
 290 295 300

Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp
 305 310 315

<210> 2

<211> 238

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
 35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
 50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
 65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
 85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
 100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
 115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized peptide linker

<400> 6

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly

 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro

 35

<210> 7

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chemically synthesized peptide linker

<400> 7

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly

 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala

 35 40 45

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro

 50 55

<210> 8

<211> 598

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu

1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

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

 275 280 285
 Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp
 290 295 300
 Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Gly Ala Pro Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro
 325 330 335
 Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly

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

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

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

Gly Gly Ala Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 370 375 380
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 385 390 395 400
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 405 410 415
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 420 425 430
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 435 440 445
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 450 455 460
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 465 470 475 480
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 485 490 495
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 500 505 510
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 515 520 525
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 530 535 540
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 545 550 555 560
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 565 570 575
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 580 585 590
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 595 600

<210> 10

<211> 521

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu

1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu

50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn

65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile

85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn

100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu

115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys

130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys

145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr

165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg

180 185 190

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

195 200 205

Lys Cys Ile Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 465 470 475 480
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 485 490 495
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 500 505 510
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 515 520
 <210> 11
 <211> 527
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu

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

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

 130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys
 145 150 155 160
 Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr
 165 170 175
 Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg
 180 185 190
 Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly
 195 200 205
 Lys Cys Ile Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu
 210 215 220
 Asp Gln Asp Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Gly Ala
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 290 295 300
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 305 310 315 320
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 325 330 335
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 340 345 350
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 355 360 365
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 370 375 380
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

385 390 395 400
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 405 410 415
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 420 425 430
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 435 440 445
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

 450 455 460
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 465 470 475 480
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 485 490 495
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 500 505 510
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

 515 520 525
 <210> 12
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15
 Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30
 Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
 35 40 45

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

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
 85 90 95
 Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
 100 105 110

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

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

 Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala
 245 250 255
 Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala
 260 265 270
 Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn
 275 280 285

 <210> 13
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu

1 5 10 15

Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

 20 25 30

Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

 35 40 45

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu

 50 55 60

Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn

65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile

 85 90 95

Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn

 100 105 110

Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu

 115 120 125

Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys

130 135 140

Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys

145 150 155 160

Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr

 165 170 175

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg

 180 185 190

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

195 200 205

Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly

210 215 220

Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu

225 230 235 240

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

245 250 255
 Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala

260 265 270
 Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn

275 280 285
 Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp

290 295 300
 Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Gly Ala Pro Gly Gly

305 310 315 320
 Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro

325 330 335
 Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly

340 345 350
 Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly

355 360 365
 Gly Gly Ala Pro Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val

370 375 380
 Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile

385 390 395 400
 Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp

405 410 415
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His

420 425 430
 Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg

435 440 445
 Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

450 455 460
 Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu

465 470 475 480
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr

485 490 495

Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu
 500 505 510
 Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp
 515 520 525
 Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile
 530 535 540
 Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln
 545 550 555 560
 Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
 565 570 575
 Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 580 585 590
 Gly Lys
 <210> 14
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
 50 55 60
 Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
 65 70 75 80
 Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
 85 90 95

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

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

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

 Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 545 550 555 560
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 565 570 575
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 580 585 590
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 595
 <210> 17
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 17
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu
 1 5 10 15
 Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu
 20 25 30
 Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys
 35 40 45
 Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu
 50 55 60

 Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn
 65 70 75 80
 Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile
 85 90 95
 Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn
 100 105 110
 Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu
 115 120 125

 Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys
 130 135 140
 Pro Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys

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

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

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

 Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro
 325 330 335
 Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 340 345 350
 Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly
 355 360 365
 Gly Gly Ala Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 370 375 380

 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 385 390 395 400

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

 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 450 455 460
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 465 470 475 480
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 485 490 495
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 500 505 510

 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 515 520 525
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 530 535 540
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 545 550 555 560
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 565 570 575

 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu Lys Phe His Tyr Thr Gln Lys Ser
 580 585 590
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 595