



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0084211  
(43) 공개일자 2014년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 38/18* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)  
*A61P 7/06* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7013325

(22) 출원일자(국제) 2012년10월17일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2014년05월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/060650

(87) 국제공개번호 WO 2013/059347  
국제공개일자 2013년04월25일

(30) 우선권주장  
61/547,932 2011년10월17일 미국(US)

(71) 출원인  
악셀레론 파마 인코포레이티드  
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128

(72) 발명자  
시혜라, 자스비르  
미국, 매사추세츠 02421-6818, 렉싱턴, 링컨 테라스 3  
피어설, 로버트, 스콧  
미국, 매사추세츠 01801, 우번, 버드 스트리트 21  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
강명구

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **효과가 없는 적혈구생성 치료를 위한 방법 및 조성물**

### (57) 요 약

특정 측면들에서, 본 발명은 설치류 및 영장류, 구체적으로 인간을 포함하는 척추동물에서 붉은 혈액 세포 및/또는 혈모글로빈 수준을 증가시키는 조성물 및 방법을 제공한다.

(72) 발명자

쿠마르, 라빈드라

미국, 메사추세츠 01720, 액톤, 알링تون 스트리트  
421

수라가니, 나가, 벤카타 사이 라자세하르

미국, 메사추세츠 02062, 노우드, 에이피티#  
05-201, 버크민스터 드라이브 301

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

환자의 효과가 없는 적혈구생성을 치료하는 방법에 있어서, 이 방법은 서열 번호: 1의 아미노산 29-109 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 이러한 치료를 요하는 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 여기에서 이 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 위치 79에 대응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하는, 방법.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 환자는 비장거대증, 철 과부하, 적혈구모세포-유도된 골 병리 및 골수 세포과다증으로 구성된 집단으로부터 선택된 장애를 가진, 방법.

### 청구항 3

청구항 1-2 중 임의의 한 항에 있어서, 이 환자는 지중해빈혈, 철아구성 빈혈 그리고 이상적혈구생성 빈혈로 구성된 집단으로부터 선택된 장애를 가진, 방법.

### 청구항 4

청구항 1-3 중 임의의 한 항에 있어서, 환자는 조직 철 과부하를 가진, 방법.

### 청구항 5

청구항 1-4 중 임의의 한 항에 있어서, 환자는 골수의 적혈구생성 또는 비장거대증을 가진, 방법.

### 청구항 6

청구항 1-5 중 임의의 한 항에 있어서, 환자는 적혈구모세포-유도된 골 병리를 가진, 방법.

### 청구항 7

청구항 1-6 중 임의의 한 항에 있어서, 환자는 바람직하지 않은 높은 수준의 내생성 에리트로포에틴을 보유한, 방법.

### 청구항 8

청구항 1-7 중 임의의 한 항에 있어서, 환자는 지중해빈혈 증후군을 가진, 방법.

### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 환자는  $\beta$ -지중해빈혈 증후군을 가진, 방법.

### 청구항 10

청구항 9에 있어서, 환자는  $\beta$ -지중해빈혈 중간형을 가진, 방법.

### 청구항 11

청구항 1-10 중 임의의 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

### 청구항 12

청구항 1-10 중 임의의 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109 서열에 최소한 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

### 청구항 13

청구항 1-10 중 임의의 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

**청구항 14**

청구항 1-13 중 임의의 한 항에 있어서, 이 방법은 효과가 없는 적혈구생성을 위한 보조 치료를 더 투여하는 것을 포함하는, 방법.

**청구항 15**

청구항 14에 있어서, 보조 치료는 붉은 혈액 세포들 또는 전혈의 주입이 되는, 방법.

**청구항 16**

청구항 14에 있어서, 보조 치료는 철-킬레이트화 물질 또는 다중 철-킬레이트화 물질들의 투여를 더 포함하는 방법.

**청구항 17**

청구항 16에 있어서, 철-킬레이트화 물질들은 다음으로 구성된 집단으로부터 선택된 화합물인, 방법:

- a. 테페록사민(데스페리옥사민 B, 테스페록사민 B, DFO-B, DFOA, DFB, 또는 테스페랄로도 알려짐);
- b. 테페리프론(Ferriprox로도 또한 알려짐); 그리고
- c. 테페라시록스(비스-히드록시페닐-트리아졸, ICL670, 또는 Exjade<sup>TM</sup>로 또한 알려짐).

**청구항 18**

청구항 1-17 중 임의의 한 항에 있어서, 햅시딘 항진제의 투여를 더 포함하는, 방법.

**명세서****기술 분야****[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조**

본 출원은 2011년 10월 17일자 제출된 미국 가출원 번호 61/547,932를 우선권으로 주장한다. 상기 언급된 출원의 모든 교시는 명세서의 참고자료에 편입된다.

**배경기술**

[0003] 성숙한 붉은 혈액 세포, 또는 적혈구는 척추동물의 순환계에서 산소 운반을 담당한다. 붉은 혈액 세포들은 폐 안에서 상대적으로 높은 산소 ( $pO_2$ )의 분압(partial pressure)에서 산소에 결합하여, 상대적으로 낮은  $pO_2$ 를 가진 신체 영역들로 산소를 운반하는 단백질인 헤모글로빈을 고농도로 함유한다.

[0004] 성숙한 붉은 혈액 세포들은 적혈구생성이라고 명명된 과정에서 다능성(pluripotent) 조혈 줄기세포로부터 만들어진다. 출생후 적혈구생성은 골수와 비장의 적색 속질(red pulp)에서 주로 일어난다. 다양한 신호생성 경로들의 통합된 작용은 세포 증식, 분화, 생존 및 사멸의 균형을 관리한다. 정상적인 조건하에서, 붉은 혈액 세포들은 신체에서 일정한 붉은 세포 양을 유지하는 비율로 생성되고, 그리고 생산은 증가된 또는 감소된 산소 긴장 또는 조직 요구를 포함하는 다양한 자극에 반응하여 증가 또는 감소될 수 있다. 적혈구생성 과정은 선구(precursor) 세포로 정해진 계통의 형성으로 시작되고, 그리고 일련의 별개의 선구 세포 유형을 통하여 진행된다. 적혈구생성의 최종 단계는 망상적혈구가 혈류 안으로 방출되고, 이들의 미토콘드리아 및 리보솜을 상실하여, 성숙한 붉은 혈액 세포의 형태로 간주될 때 발생된다. 혈액 안에서 망상적혈구의 상승된 수준, 또는 상승된 망상적혈구:적혈구 비율은 붉은 혈액 세포 생산 속도의 증가를 나타낸다.

[0005] 에리트로포에틴 (EPO)은 척추동물에서 출생후 적혈구생성의 가장 중요한 양성 조절자로 널리 인지된다. EPO는 감소된 조직 산소 긴장 (저산소증) 및 낮은 붉은 혈액 세포 수준 또는 낮은 헤모글로빈 수준에 대한 보상적 적혈구생성 반응을 조절한다. 인간들에게서, 상승된 EPO 수준은 골수 및 비장에서 적혈구의 선조들의 생성을 자극시킴으로써 붉은 혈액 세포 형성을 촉진시킨다. 마우스에서, EPO는 주로 비장에서 적혈구생성을 강화시킨다.

[0006] EPO의 영향은 사이토kin 수용체 슈퍼페밀리에 속하는 세포-표면 수용체에 의해 중재된다. 인간 EPO 수용체 유

전자는 483개 아미노산 막통과 단백질을 인코드하고, 반면 활성 EPO 수용체는 리간드 없이도 다중결합 복합체로 존재하는 것으로 보인다 (미국 특허 제6,319,499호 참고). 포유류 세포에서 발현되는 클론된 전장 EPO 수용체는 적혈구의 선조 세포들에서 고유 수용체의 것과 유사한 친화력으로 EPO에 결합된다. EPO가 이의 수용체에 결합되면 형태학적 변화가 야기되어 미숙한 적혈구 모세포의 증식 증가, 미숙한 적혈구 모세포의 분화 증가, 그리고 적혈구의 선조 세포들에서 자가사멸(apoptosis)의 감소를 포함하는 수용체 활성화 및 생물학적 영향을 가져온다 (Liboi et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury et al., 1990, Science 248:378-381).

[0007] 다양한 임상적 환경과 특히 빈혈 치료를 위하여 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키기 위해 의사들은 다양한 형태의 재조합 EPO를 이용한다. 빈혈은 혈액 안에 정상 수준의 혜모글로빈 또는 붉은 혈액 세포들보다 더 낮은 수준을 특징으로 광범위하게-정의되는 상태다. 일부 경우에서, 빈혈은 붉은 혈액 세포들의 생산 또는 생존에서 1차 장애로 인하여 야기된다. 좀더 일반적으로, 빈혈은 다른 계통 질환에 대해 부차적이다 (Weatherall & Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). 빈혈은 붉은 혈액 세포들의 생산 감소율 또는 파괴 증가율로 인하여 또는 출혈로 인한 붉은 혈액 세포들의 상실에 의해 야기될 수 있다. 빈혈은 예를 들면, 만성 신부전, 화학요법 치료, 골이형성증 증후군, 류마티스 관절염, 및 골수 이식을 포함하는 다양한 장애로 인하여 발생될 수 있다.

[0008] EPO를 이용한 치료는 전형적으로 몇 주 간에 걸쳐 건강한 인간에게서 약 1-3 g/dL의 혜모글로빈의 상승을 야기한다. 빈혈이 있는 개체들에게 투여될 때, 이 치료 섭생은 흔히 혜모글로빈 및 붉은 혈액 세포 수준의 실질적 증가를 대개 제공하고, 그리고 삶의 질의 개선 및 생존의 연장으로 이어진다. EPO가 한결같이 효과적이지는 않은데, 많은 개체들은 심지어 높은 용량에도 저항적이다 (Horl et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). 암환자의 50% 이상은 EPO에 부적절한 반응을 나타내며, 말기 단계 신장 질환의 대략적으로 10%는 저반응적 (hyporesponsive)이고 (Glaspy et al. (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri et al. (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425), 그리고 골이형성증 증후군의 10% 미만이 호의적으로 반응한다 (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). 염증, 철 및 비타민 결핍, 부적절한 투석, 알부민 독성, 그리고 부갑상선기능항진을 포함하는 몇 가진 인자들은 부진한 치료 반응을 예고할 수 있다. EPO에 대한 저항의 문자 기전은 여전히 불명확하다. 최근 증거자료에 따르면 더 높은 용량의 EPO는 일부 환자 군에서 심혈관 유병율의 위험 증가, 종양 성장, 그리고 사망률과 연관될 수 있다고 제안한다 (Krapf et al., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). 따라서 EPO-기반 치료 화합물들 (에리트로포에틴-자극 물질들, ESAs)은 붉은 혈액 세포 주입의 필요성을 회피하는데 충분한 최저 용량으로 투여되어야 한다고 권고되고 있다 (Jelkmann et al., 2008, Crit Rev Oncol. Hematol 67:39-61).

[0009] 효과가 없는 적혈구생성은 적혈구생성의 초기 단계의 증가에도 불구하고 적혈구 생산이 감소되는 적혈구 장애 군을 설명하는데 이용된 용어다 (가령, Tanno, 2010, Adv Hematol 2010:358283 참고). 효과가 없는 적혈구생성은 빈혈, 상승된 에리트로포에틴 수준, 붉은 혈액 세포 선구들의 과도한 형성 및 철 과부하 (overload)를 대개 초래한다. 이들 현상은 다시 비장거대증, 간 및 심장 장애들과 골 손상 뿐만 아니라 기타 여병들로 이어질 수 있다. 내생성 에리트로포에틴 수준은 효과가 없는 적혈구생성을 가진 환자들에서 흔히 매우 높기 때문에, EPO-기반 치료는 대개 이들 환자에서 빈혈을 치료하지 못하거나 또는 비장거대증과 같은 질환의 다른 측면들의 악화 및 철 과부하의 원인이 될 수 있다.

[0010] 따라서, 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키고 및/또는 효과가 없는 적혈구생성에 관련되어 다른 장애들을 해결하기 위한 대안 방법들을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다.

#### 발명의 요약

[0012] 부분적으로, 본 발명은 GDF 트랩 (Traps)을 이용하여 빈혈, 비장거대증, 철 과부하, 세포과다 골수, 상승된 내생성 에리트로포에틴 수준 및 골 손상을 포함하나 이에 한정되지 않는, 효과가 없는 적혈구생성 및 효과가 없는 적혈구생성과 연관된 장애들과 증상들을 치료할 수 있다는 것을 설명한다. 구체적으로, 본 발명은 서열 번호: 1의 위치 79에 산성 잔기를 보유하는 가용성 형태의 ActRIIB 폴리펩티드인 GDF Trap이 생체로 투여되면, 정상적인 건강한 개체들 뿐만 아니라 빈혈 및 효과가 없는 적혈구생성의 동물 모델의 혈액에서 붉은 혈액 세포 수준을 증가시킨다는 것을 설명한다. 놀라운 것은, 붉은 혈액 세포 수준의 직접적인 증가에 추가하여, 공개된 분자들은 비장거대증, 철 과부하 및 골 손상을 포함하는 효과가 없는 적혈구생성과 연합된 기타 증상들을 개선시킨다. 일부 경우들에서, 이들 연합된 장애들은 빈혈이 있는 상태와 같이 환자의 건강 및 삶의 질에 대등하게 또는 그 이상으로 중요하다. 따라서, 특정 구체예들에서, 본 발명은 환자들에게서 붉은 혈액 세포 및 혜모글로빈 수준을 증가시키고, 이를 필요로 하는 환자들에게서 낮은 붉은 혈액 세포 수준과 연합된 장애들을 치료하기 위하여

GDF 트랩을 이용하는 방법들을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 빈혈, 조직 철 과부하, 골수외 (extramedullary) 적혈구생성, 적혈구모세포-유도된 골 병리, 그리고 부적절하게 상승된 에리트로포에틴 수준과 같은 주요 여병들을 포함하는, 효과가 없는 적혈구생성의 장애로 발생된 여병들을 치료하기 위하여 GDF Trap 폴리펩티드를 이용하는 방법들을 제공한다. 이러한 장애들에서, GDF 트랩을 이용하여 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키면서 붉은 혈액 세포 주입 및 철 칼레이트화 치료법의 필요성을 감소시킬 수 있고, 이로 인하여 공격을 받기 쉬운 조직들에서 철의 축적과 연합된 유병을 및 사망률을 감소시킬 수 있다. 일부에서, GDF 트랩은 붉은 혈액 세포들의 주입 및 철 칼레이트화 치료법을 포함하는 효과가 없는 적혈구생성을 위한 기존의 지지요법과 병용될 수 있다. GDF 트랩은 효과가 없는 적혈구생성을 치료하기 위하여 헵시딘(hepcidin) 항진제(agonist)와 또한 병용될 수 있다. 미국 특허 출원 번호 12/012,652(명세서의 참고자료에 편입된다)에서 설명된 것과 같이, GDF 트랩을 이용하여 또한 근육량을 증가시키고 그리고 지방량을 감소시킬 수 있다.

[0013] 특정 측면들에서, 본 발명은 아미노- 및 카르복시-말단절두 및 서열 변경을 보유한 ActRIIB 폴리펩티드들을 포함하는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드들인 GDF 트랩을 제공한다. 임의선택적으로, 본 발명의 GDF 트랩은 ActRIIB 수용체들의 하나 또는 그 이상의 리간드, 이를 테면, GDF8 (미오스타틴이라고도 불림), GDF11, Nodal, 및 BMP7 (OP-1라고 불림)을 선호적으로 길항하도록 기획될 수 있다. GDF 트랩의 예로는 액티빈에 대하여 상당히 감소된 친화력을 보유하는 ActRIIB로부터 유도된 일련의 변이체들이 포함된다. 이들 변이체는 붉은 혈액 세포들에게는 바람직한 영향을 나타내지만, 다른 조직에게는 감소된 영향을 나타낸다. 이러한 변이체들의 예로는 서열 번호:1의 위치 79에 대응하는 위치에서 산성 아미노산 (가령, 아스파르트산, D, 또는 글루타민산, E)을 보유하는 것들을 포함한다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 7, 26, 28, 29, 32, 37 또는 38의 아미노산 서열을 포함하는, 이로 구성된 또는 기본적으로 이 서열들로 구성된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 전술한 것중 임의의 것에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드들을 포함한다.

[0014] 특정 측면들에서, 본 발명은 ActRIIB 리간드 이를 테면, GDF8, GDF11, 액티빈 (가령, 액티빈 B), BMP7 또는 nodal에 결합하는 GDF 트랩과, 약제학적으로 수용가능한 운반체를 포함하는 약학 조제물을 제공한다. 임의선택적으로, GDF 트랩은 10 micromolar 미만, 1 micromolar 미만, 100 nanomolar 미만, 10 nanomolar 미만, 또는 1 nanomolar 미만의 Kd로 ActRIIB 리간드에 결합한다. 임의선택적으로, GDF 트랩은 ActRIIB 신호생성, 이를 테면, ActRIIB 리간드에 의해 촉발되는 세포내 신호 변환 사건을 저해한다. 이러한 조제물에 사용되는 GDF 트랩은 예를 들면, 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 또는 40로부터 선택된 아미노산 서열을 보유한 GDF 트랩, 또는 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 또는 40로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 보유한 GDF 트랩, 또는 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 또는 40로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 보유한 GDF 트랩 중 임의의 것일 수 있고, 여기에서 서열 번호: 1에서 L79에 대응하는 위치는 산성 아미노산이다. 이러한 제제물에 사용을 위하여 선호되는 GDF 트랩은 서열 번호: 26의 아미노산 서열로 구성되거나, 또는 서열 번호: 26의 아미노산 서열로 필수적으로 구성된다. GDF 트랩은 천연 ActRIIB 폴리펩티드의 기능적 단편, 이를 테면, 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 또는 40으로부터 선택된 서열의 최소한 10, 20 또는 30개의 아미노산을 포함하는 단편 또는 C-말단 1, 2, 3, 4, 5 또는 10 내지 15개 아미노산이 부족하고, 그리고 N-말단에서 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산이 부족한 서열 번호: 2의 서열을 포함할 수 있다. 선호되는 폴리펩티드는 서열 번호: 2 또는 40과 비교하여 N-말단에서 2 내지 5개의 아미노산과 C-말단에서 3개의 아미노산의 절두(절두)를 포함할 것이다. GDF 트랩은 자연적으로 발생되는 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하여 ActRIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열(가령, 리간드-결합 도메인에서)에서 하나 또는 그 이상의 변경을 포함할 수 있다. 아미노산 서열에서 변경은 예를 들면, 포유류, 곤충 또는 기타 진핵 세포에서 생산될 때, 이 폴리펩티드의 당화를 변경시키거나 또는 자연적으로 발생되는 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하여 이 폴리펩티드의 단백질분해성 절단을 변경시킬 수 있다.

[0015] GDF 트랩은 한 개 도메인으로써, ActRIIB 폴리펩티드 (가령, 하나 또는 그 이상의 서열 변이를 가진 ActRIIB의 리간드-결합 도메인), 그리고 바람직한 성질, 이를 테면, 개선된 약물동력학, 더 용이한 정제, 특정 조직들에 대한 표적화, 등을 제공하는 하나 또는 그 이상의 추가 도메인을 가지는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들면, 융합 단백질의 도메인은 생체내 안정성, 생체내 반감기, 취입/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체들의 형성, 융합 단백질의 다중결합화(multimerization), 및/또는 정제중 하나 또는 그 이상을 강화시킬 수 있다. GDF 트랩 융합 단백질들은 면역글로불린 Fc 도메인 (야생형 또는 돌연변이) 또는 혈청 알부민을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 융합은 Fc 도메인과 세포외 ActRIIB 도메인 사이에 위치한 상대적으로 조직화안된(unstructured) 링커를 포함한다. 이 조직화안된 링커는 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단 끝 ("꼬리")에 어림잡아 15개 아미노산의 조직화안된 영역에 대응할 수 있고, 또는 상대적으로 2차 구조가 없는 3

내지 5, 15, 20, 30, 50 또는 그 이상의 아미노산의 인공적인 서열일 수 있다. 링커는 글리신 및 프롤린 잔기가 많을 수 있으며, 예를 들면, 트레오닌/세린과 글리신의 반복 서열 (가령, TG<sub>4</sub> (서열 번호: 13) 또는 SG<sub>4</sub> (서열 번호: 14) 단일당 또는 반복) 또는 3개 글리신의 나열을 포함할 수 있다. 융합 단백질은 정제 하위서열, 이를 테면, 에피토프 테그, FLAG 테그, 폴리히스티딘 서열, 및 GST 융합을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 융합은 리더 서열을 포함한다. 이 리더 서열은 고유의 ActRIIB 리더 서열이거나 또는 이종기원의 리더 서열일 수 있다. 특정 구체예들에서, 이 리더 서열은 조직 플라스미노겐활성물질 (TPA) 리더 서열이다. 한 구체예에서, GDF 트랩 융합 단백질은 공식 A-B-C로 제시되는 것과 같은 아미노산 서열을 포함한다. B 부분은 서열 번호: 2 또는 40의 아미노산 25-131에 대응하는 아미노산 서열로 구성된 N- 및 C-말단 절두된 ActRIIB 폴리펩티드이다. A와 C 부분들은 독립적으로 0, 하나 또는 그 이상의 아미노산일 수 있고, 그리고 A와 C 부분들은 모두 B에 대해 이종기원이다. A 및/또는 C 부분들은 링커 서열을 통하여 B 부분에 부착될 수 있다.

[0016] 임의선택적으로, GDF 트랩은 당화된 아미노산, 폐길화된 (PEGylated) 아미노산, 파르네실화된 (farnesylated) 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 바이오티닐화된 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 그리고 유기 유도화 물질에 접합된 아미노산으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 변형된 아미노산 잔기를 보유한 변이체 ActRIIB 폴리펩티드들을 포함한다. 약학 조제물은 하나 또는 그 이상의 추가적인 화합물들 이를 테면, ActRIIB-연합된 장애를 치료하는데 이용된 화합물을 또한 포함할 수 있다. 바람직하게는, 약학 조제물은 실질적으로 발열물질이 없다. 일반적으로, 환자의 선호되지 않은 면역 반응 가능성을 감소시키기 위하여 GDF 트랩의 적절한 천연 당화를 중재하는 포유류 세포계통에서 GDF 트랩이 발현되는 것이 바람직하다. 인간 및 CHO 세포계통은 성공적으로 이용되었고, 다른 공통적인 포유류 발현 벡터들이 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0017] 특정 측면들에서, 본 발명은 인간에게서 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키는데 이용된다는 라벨이 붙은 포장된 약제를 제공한다

[0018] 특정 측면들에서, 본 발명은 변경된 리간드-결합 (가령, GDF8-결합) 도메인을 포함하는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드인 GDF 트랩을 제공한다. 변경된 리간드-결합 도메인들을 가진 GDF 트랩은 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기 이를 테면, 인간 ActRIIB의 이를 테면, E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 및 F101 (번호는 서열 번호: 1에 대한 번호임)에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 임의선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 ActRIIB 수용체의 야생형 리간드-결합 도메인과 비교하여 리간드 이를 테면, GDF8/GDF11에 대하여 증가된 선택성을 보유할 수 있다. 설명하자면, 이들 돌연변이는 액티빈보다는 GDF11 (그리고 따라서, 추정컨데, GDF8)에 대해 변경된 리간드-결합 도메인의 선택성을 증가시킨다고 명세서에서 설명된다: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E, 및 D80I. 다음의 돌연변이는 GDF11보다 액티빈 결합 비율을 증가시키는 역효과를 보유한다: D54A, K55A, L79A 및 F82A. 전체적인 (GDF11 및 액티빈) 결합 활성은 "꼬리" 영역의 포함, 또는 추정컨데, 조직화안된 링커 영역으로 증가될 수 있고, K74A 돌연변이 사용에 의해 또한 증가될 수 있다. 리간드 결합 친화력의 전반적인 증가를 초래하는 다른 돌연변이는 다음을 포함한다: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M 및 D80N. 원하는 효과를 얻기 위하여 돌연변이들이 복합될 수 있다. 예를 들면, GDF11:액티빈 결합 비율에 영향을 주는 돌연변이중 많은 것들은 리간드 결합에 전반적으로 부정적인 효과를 가지고, 따라서, 이들은 리간드 선택성을 가진 개선된 결합 단백질을 만들기 위하여 일반적으로 리간드 결합을 증가시키는 돌연변이와 복합될 수 있다. 예시적인 구체예에서, GDF 트랩은 임의선택적으로 추가적인 아미노산 치환, 추가 또는 결손과 복합된, L79D 또는 L79E 돌연변이를 포함하는 ActRIIB 폴리펩티드이다. 임의선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인을 포함하는 GDF 트랩은 GDF8 결합에 대한 Kd에 대한 액티빈 결합의 Kd 비율이 야생형 리간드-결합 도메인에 대한 비율과 비교하여 최소한 2, 5, 10, 또는 심지어 100배 이상 더 큰 비율을 가진다. 임의선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인을 포함하는 GDF 트랩은 GDF8/GDF11을 저해하는 IC50에 대해 액티빈을 억제하는 IC50의 비율이 야생형 리간드-결합 도메인에 대한 비율과 비교하여 최소한 2, 5, 10, 또는 심지어 100배 이상 더 큰 비율을 가진다. 임의선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인을 포함하는 GDF 트랩은 액티빈을 억제하는 IC50보다 최소한 2, 5, 10, 또는 심지어 100배 적은 IC50으로 GDF8/GDF11을 저해한다. 이들 GDF 트랩은 면역글로불린 Fc 도메인 (야생형 또는 돌연변이)을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 특정 경우들에서, 해당 가용성 GDF 트랩은 GDF8 및/또는 GDF11의 길항제(저해자)다.

[0019] 다른 GDF 트랩, 이를 테면, 다음의 트랩이 고려된다. 서열 번호: 1 또는 39의 ActRIIB 서열로부터 유도된 부분과 제 2 폴리펩티드 부분을 포함하는 GDF 트랩 융합 단백질, 여기에서 ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 21-29중 임의의 아미노산에서 시작하고 (임의선택적으로 서열 번호: 1 또는 39의 22-25에서 시작하고) 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 109-134중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응하고, 그리고 여기에서 GDF 트랩 융합 단백질은 세포-기반 분석에서 액티빈, 미오스타틴 및/또는 GDF11에 의한 신호생성을 저해

한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질, 여기에서 ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 20-29에서 시작하고 (임의선택적으로 서열 번호: 1 또는 39의 22-25에서 시작) 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 109-133중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질, 여기에서 ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 20-24에서 시작하고 (임의선택적으로 서열 번호: 1 또는 39의 22-25에서 시작) 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 109-133중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질, ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 21-24에서 시작하고, 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 109-134중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질, 여기에서 ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 20-24에서 시작하고, 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 118-133중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질, 여기에서 ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 21-24에서 시작하고, 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 118-134중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질, 여기에서 ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 20-24에서 시작하고, 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 128-133중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질, 여기에서 ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 21-29에서 시작하고, 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 118-134중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질, 여기에서 ActRIIB로부터 유도된 부분은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 20-29에서 시작하고, 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 128-133중 임의의 것에서 종료되는 서열에 대응한다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 위치 25에서 시작되고, 그리고 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 위치 131에서 종료되는 아미노산 서열을 포함하고, 필수적으로 이 서열로 구성된, 또는 이 서열로 구성된다. 또다른 바람직한 구체예에서, GDF 트랩 폴리펩티드은 서열 번호: 7, 26, 28, 29, 32, 37 또는 38의 아미노산 서열로 구성되거나, 또는 필수적으로 구성된다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질들중 임의의 것은 동종이합체 (homodimer)로 생성될 수 있다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질중 임의의 것은 IgG 중쇄의 불변 영역, 이를 테면, Fc 도메인을 포함하는 이종기원 부분을 보유할 수 있다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질중 임의의 것은 서열 번호: 1과 비교하여 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가적인 아미노산 치환, 결손 또는 삽입과 함께, 서열 번호: 1의 위치 70에 대응하는 위치에 산성 아미노산을 포함할 수 있다.

[0020] 다음과 같은 다른 GDF 트랩 단백질이 고려된다. 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 29-100의 서열에 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF 트랩 단백질, 여기에서 서열 번호: 1의 64에 대응하는 위치는 R 또는 K이고, 그리고 GDF 트랩 단백질은 세포-기반 분석에서 액티빈, 미오스타틴 및/또는 GDF11에 의한 신호생성을 저해한다. 상기 GDF 트랩 단백질, 여기에서 서열 번호: 1 또는 39의 서열에 대한 최소한 하나의 변형은 리간드 결합 포켓의 밖에 위치된다. 상기 GDF 트랩 단백질, 여기에서 서열 번호: 1 또는 39의 서열에 대해 최소한 하나의 변형은 리간드 결합 포켓 안에 위치된 보존적 변형이다. 상기 GDF 트랩 단백질, 여기에서 서열 번호: 1 또는 39의 서열에 대한 최소한 하나의 변형은 K74, R40, Q53, K55, F82 및 L79로 구성된 집단으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에 있는 변형이다. 상기 GDF 트랩 단백질, 여기에서 이 단백질은 ActRIIB의 내생성 N-X-S/T 서열이외의 위치와 리간드 결합 포켓 밖의 위치에서 최소한 하나의 N-X-S/T 서열을 포함한다.

[0021] 이를 테면, 다음과 같은 다른 GDF 트랩이 고려된다. 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 29-109의 서열에 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF 트랩 단백질, 그리고 여기에서 이 단백질은 ActRIIB의 내생성 N-X-S/T 서열이외의 위치와 리간드 결합 포켓 밖의 위치에서 최소한 하나의 N-X-S/T 서열을 포함한다. 상기 GDF 트랩, 여기에서 GDF 트랩 단백질은 서열 번호: 1 또는 39의 위치 24에 대응하는 위치에 N과 서열 번호: 1 또는 39의 위치 26에 대응하는 위치에서 S 또는 T를 포함하고, 그리고 GDF 트랩 단백질은 세포-기반 분석에서 액티빈, 미오스타틴 및/또는 GDF11에 의한 신호생성을 저해한다. 상기 GDF 트랩, 여기에서 GDF 트랩 단백질은 서열 번호: 1 또는 39의 위치 64에 대응하는 위치에 R 또는 K를 포함한다. 상기 GDF 트랩, 여기에서 ActRIIB 단백질은 서열 번호: 1 또는 39의 위치 79에 대응하는 위치에 D 또는 E를 포함하고, GDF 트랩 단백질은 세포-기반 분석에서 액티빈, 미오스타틴 및/또는 GDF11에 의한 신호생성을 저해한다. 상기 GDF 트랩, 여기에서 서열 번호: 1 또

는 39의 서열에 대하여 최소한 하나의 변형은 리간드 결합 포켓 안에 위치한 보존적 변형이다. 상기 GDF 트랩, 여기에서 서열 번호: 1 또는 39의 서열에 대하여 최소한 하나의 변형은 K74, R40, Q53, K55, F82 및 L79로 구성된 집단으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서의 변형이다. 상기 GDF 트랩, 여기에서 이 단백질은 이종기원의 부분을 더 포함하는 융합 단백질이다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질중 임의의 것은 동종이합체로 생성될 수 있다. 상기 GDF 트랩 융합 단백질중 임의의 것은 IgG 중쇄의 불변 영역, 이를 테면, Fc 도메인을 포함하는 이종기원의 부분을 보유할 수 있다.

[0022] 특정 측면들에서, 본 발명은 GDF 트랩 폴리펩티드를 인코드하는 핵산을 제공한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 이를 테면, 상기에서 설명된 가용성 GDF 트랩 폴리펩티드의 코딩 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 단리된 핵산은 하나 또는 그 이상의 서열 변이를 보유하는 ActRIIB 폴리펩티드들의 세포외 도메인(가령, 리간드-결합 도메인)을 포함하는 GDF 트랩을 코딩하는 서열과 ActRIIB 폴리펩티드의 막통과도메인 및/또는 세포질 도메인의 일부 또는 전부를 코드하는 서열, 뿐만 아니라 막통과도메인 또는 세포질 도메인 안에 위치된, 또는 세포외 도메인과 막통과도메인 또는 세포질 도메인 사이에 위치된 중단 코돈의 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, GDF 트랩을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 전장 ActRIIB 폴리뉴클레오티드 서열 이를 테면, 하나 또는 그 이상의 변이를 보유하는 서열 번호: 4, 또는 부분적으로 절두된 형태를 포함할 수 있고, 전술한 단리된 폴리뉴클레오티드는 3'말단 앞에 최소한 600개 뉴클레오티드에 전사 종료 코돈을 포함하거나 또는 이 폴리뉴클레오티드의 해독으로 전장 ActRIIB의 절두된 부분에 임의선택적으로 융합된 세포외 도메인이 생성되는 위치에 전사 종료 코돈을 더 포함한다. 본 명세서에서 공개된 핵산은 발현을 위하여 프로모터에 작동가능하도록 연결될 수 있고, 그리고 본 발명은 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드들에 의해 형질변환된 세포들을 제공한다. 바람직하게는 이 세포는 포유류 세포 이를 테면, CHO 세포다.

[0023] 특정 측면들에서, 본 발명은 GDF 트랩 폴리펩티드를 만드는 방법들을 제공한다. 이러한 방법은 적절한 세포, 이를 테면, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 안에 본 명세서에서 공개된 임의의 핵산 (가령, 서열 번호: 5, 25, 27, 30 또는 31)을 발현시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 다음을 포함할 수 있다: a) GDF 트랩 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 세포를 배양시키고, 여기에서 전술한 세포는 GDF 트랩 발현 구조체로 형질변환되고; 그리고 b) 발현된 GDF 트랩 폴리펩티드는 회수된다. GDF 트랩 폴리펩티드들은 세포 배양물로부터 단백질을 획득하기 위하여 당분야에 공지된 임의의 기술을 이용하여 미정제된 상태, 부분적으로 정제된 또는 매우 정제된 분획물로 회수될 수 있다.

[0024] 특정 측면들에서, 본 명세서에서 공개된 GDF 트랩 폴리펩티드는 대상에게서 붉은 혈액 세포 생산을 촉진시키거나 또는 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키는 방법에 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명은 낮은 붉은 혈액 세포 수 또는 낮은 혈모글로빈 수준과 연합된 장애 (가령, 빈혈, 골이형성증 증후군, 등등)를 치료하는 방법, 또는 이를 필요로 하는 환자들에게서 붉은 혈액 세포 생산을 촉진시키는 방법들을 제공한다. 이 방법은 이를 필요로 하는 대상에게 GDF 트랩 폴리펩티드의 유효량을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 특정 측면들에서, 본 발명은 본 명세서에서 설명된 장애 또는 상태의 치료를 위한 약물의 제조용으로 GDF 트랩 폴리펩티드들의 용도를 제공한다.

[0025] 부분적으로, 본 발명에서 GDF 트랩은 이를 필요로 하는 환자들에게서 붉은 혈액 세포 수준 (적혈구생성)을 증가시키고 또는 빈혈을 치료하기 위하여 EPO 수용체 활성물질과 복합되어(가령, 동시에 또는 다른 시간대에 투여되지만, 일반적으로 중첩되는 약리 효과를 획득하기 위한 방법으로) 이용될 수 있음이 설명된다. 부분적으로, 본 발명에서 GDF 트랩은 환자에게서 붉은 혈액 세포들의 형성을 공조적으로 증가시키기 위하여 EPO 수용체 활성물질과 복합되어 투여될 수 있음이 설명된다. 따라서, 이러한 복합 치료의 효과는 GDF 트랩과 EPO 수용체 활성물질이 개별적으로 이들의 각 용량으로 투여되었을 때, 각 효과의 합보다 훨씬 더 클 수 있다. 특정 구체예들에서, EPO 수용체 활성물질의 더 낮은 용량을 이용하여 붉은 혈액 세포들의 목표 수준에 이르도록 할 수 있고, 이로 인하여 더 높은 수준의 EPO 수용체 활성화와 연합된 있을 수 있는 부작용 또는 다른 문제점을 회피할 수 있기 때문에, 이러한 공조효과는 유익할 수 있다.

[0026] EPO 수용체 활성물질은 EPO 수용체에 직접적으로 접촉되고, 이 수용체를 활성화시킴으로써 적혈구생성을 자극할 수 있다. 특정 구체예들에서, EPO 수용체 활성물질은 고유의 EPO의 165개 아미노산 서열에 근거된 화합물 종류의 하나이며, 일반적으로 적혈구생성-자극 물질들 (ESAs)로 알려져 있으며, 이들의 예로는 에포에틴(epoetin) 알파, 에포에틴 베타, 에포에틴 멜타, 및 에포에틴 오메가다. 다른 구체예들에서, ESAs는 합성 EPO 단백질 (SEPs) 및 바람직한 약력학적 성질(연장된 순환 반감기)을 부여하는 비펩티드성 변형을 가진 EPO 유도물질들을 포함하는데, 이들의 예로는 다르브에포에틴 알파 및 메톡시-폴리에틸렌-글리콜 에포에틴 베타를이다. 특정 구체예들에서, EPO 수용체 활성물질은 EPO 폴리펩티드 기본골격에 혼입되지 않는 또는 ESA로 일반적으로 분류되지

않는 EPO 수용체 항진제일 수 있다. 이러한 EPO 수용체 항진제들은 EPO의 웨პ티드 및 비웨პ티드 모방체, EPO 수용체를 표적으로 하는 항진성 항체, EPO 모방체 도메인을 포함하는 융합 단백질, 그리고 에리트로포에틴 수용체 연장된-기간 제한된 항진제(EREDLA)를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0027] 특정 구체예들에서, EPO 수용체 활성물질은 EPO 수용체 자체에 접촉없이, 내생성 EPO의 생산을 강화시킴으로써, 적혈구생성을 간접적으로 촉진시킬 수 있다. 예를 들면, 저산소증-유도가능한 전사 인자들 (HIFs)은 세포 조절 기전에 의해 저산소 조건하에 억제된 (탈안정화된) EPO 유전자 발현의 내생성 자극물질이다. 일부분으로, 본 발명은 GDF 트랩과 HIF 안정화 성질을 가진 간접적인 EPO 수용체 활성물질, 이를 테면, 프롤일 히드록실라제 저해제의 복합 치료에 의해 환자에게서 적혈구생성을 증가시킨다.

[0028] 특정 측면들에서, 본 발명은 GDF 트랩 폴리웨პ티드를 환자에게 투여하는 방법들을 제공한다. 일부분으로, 본 발명에서 GDF 트랩 폴리웨პ티드들을 이용하여 붉은 혈액 세포 및 헤모글로빈 수준을 증가시킨다는 것이 설명된다. 일부분으로, 본 발명에서 GDF 트랩 폴리웨პ티드들은 효과가 없는 적혈구생성을 가진 환자들을 치료하고, 그리고 효과가 없는 적혈구생성과 연합된 하나 또는 그 이상의 상태, 이를 테면, 빈혈, 비장거대증, 철 과부화 또는 골질 장애들을 감소시키는데 이용될 수 있음이 설명된다. 특정 측면들에서, 본 발명은 붉은 혈액 세포들의 주입의 필요성을 감소시키고, 공격을 받기 쉬운 조직들에서 철 침착과 연합된 유병을 및 사망률을 감소시키면서, 지중해빈혈 환자에게서 효과가 없는 적혈구생성을 치료하기 위하여 GDF 트랩 폴리웨პ티드들을 이용하는 방법들을 제공한다. 구체적으로, GDF 트랩 폴리웨პ티드는  $\beta$ -지중해빈혈 중간형(intermedia)을 포함하는  $\beta$ -지중해빈혈 증후군을 치료하기 위하여 이러한 방식으로 이용될 수 있다. GDF 트랩 폴리웨პ티드들은 다른 치료 용도를 치료 또는 예방 이를 테면, 근육 성장을 촉진시키는데 또한 이용될 수 있다. 특정 경우들에서, 근육 성장을 촉진시키기 위하여 GDF 트랩 폴리웨პ티드를 투여할 때, 붉은 혈액 세포들에서 바람직하지 못한 효과를 감소시키기 위하여 GDF 트랩 폴리웨პ티드를 투여하는 동안 붉은 혈액 세포들에 대한 영향을 감시하는 것이 바람직할 수 있고, 또는 GDF 트랩 폴리웨პ티드의 용량을 결정 또는 조정하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 붉은 혈액 세포 수준, 헤모글로빈 수준, 또는 헤마토크리트 수준의 증가는 혈압의 증가를 야기시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 상자로 표시된 리간드 (리간드 결합 포켓)에 직접적으로 접촉시키기 위하여 다중 ActRIIB 및 ActRIIA 결정 구조의 조성 분석에 근거하여, 인간 ActRIIA (서열 번호: 15) 및 인간 ActRIIB (서열 번호: 2)의 세포외 도메인과 본 명세서에서 추론된 잔기를 배열한 것을 나타낸다.

도 2는 다양한 척추동물 ActRIIB 단백질 및 인간 ActRIIA (서열 번호: 16-23)의 다중 서열 배열을 나타낸다.

도 3은 TPA 리더 서열 (이중 밑줄), ActRIIB 세포외 도메인 (잔기 서열 번호: 1의 잔기 20-134; 밑줄), 및 hFc 도메인을 포함한, GDF 트랩 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (서열 번호: 11)의 전장 아미노산 서열을 나타낸다. 성숙한 융합 단백질에서 서열화에 의해 N-말단 잔기로 나타난 글리신은 이중 밑줄 및 강조된 것과 같이, 고유의 서열의 위치 79에 치환된 아스파르테이트는 이중 밑줄 및 강조되어 있다.

도 4는 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc를 인코드하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열 번호: 25는 센스 가닥에 상응하고, 서열 번호: 33은 안티센스 가닥에 상응된다. TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66)는 이중 밑줄로 표시되며, 그리고 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오티드 76-420)은 밑줄로 표시된다.

도 5는 TPA 리더 (이중 밑줄), 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131; 밑줄), 그리고 hFc 도메인을 포함한, 절두된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (서열 번호: 26)의 전장 아미노산 서열을 보여준다. 성숙한 융합 단백질에서 서열화에 의해 N-말단 잔기로 나타난 글루타메이트가 이중 밑줄 및 강조된 것과 같이, 고유의 서열의 위치 79에 치환된 아스파르테이트는 이중 밑줄 및 강조되어 있다.

도 6은 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc를 인코드하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열 번호: 27은 센스 가닥에 상응되며, 서열 번호: 34는 안티센스 가닥에 상응된다. TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66)는 이중 밑줄로 표시되며, 그리고 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오티드 76-396)은 밑줄로 표시된다. ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131)의 아미노산 서열 또한 나타낸다.

도 7은 리더없는 절두된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 25131)hFc의 아미노산 서열 (서열 번호: 28)을 나타낸다. 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131)은 밑줄로 나타낸다. 성숙한 융합 단백질에서 서열화에 의해 N-말단 잔기로 나타난 글루타메이트가 이중 밑줄 및 강조된 것과 같이, 고유의 서열의 위치 79에 치환된 아스파르테이트는 이중 밑줄 및 강조되어 있다.

도 8은 리더, hFc 도메인, 및 링커 없이 절두된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 25131)의 아미노산 서열(서열 번호: 29)을 나타낸다. 성숙한 용합 단백질에서 서열화에 의해 N-말단 잔기로 나타난 글루타메이트가 이중 밀줄 및 강조된 것과 같이, 고유의 서열의 위치 79에 치환된 아스파르테이트는 이중 밀줄 및 강조되어 있다.

도 9는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc를 인코드하는 또다른 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열 번호: 30은 센스 가닥에 상응되며, 서열 번호: 35는 앤티센스 가닥에 상응된다. TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66)는 이중 밀줄로 표시되며, 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오티드 76-396)은 밀줄로 표시되고, 그리고 세포외 도메인의 야생형 뉴클레오티드 서열에서 치환체들은 이중 밀줄 및 강조된다(서열 번호: 27과 비교, 도 6). ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131)의 아미노산 서열 또한 나타낸다.

도 10은 도 9에 나타낸 또다른 뉴클레오티드 서열(서열 번호: 30)의 뉴클레오티드 76-396 (서열 번호: 31)을 나타낸다. 도 9에 나타낸 동일한 뉴클레오티드 치환체들 또한 밀줄 및 강조로 표시된다. 서열 번호: 31은 L79D 치환을 가진, 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131에 상응)만을 인코드하는데, 가령, ActRIIB(L79D 25-131)이다.

도 11은 화학치료법-유도된 빈혈을 가진 마우스 모델에서 헤모글로빈 농도에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 효과를 보여준다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. \*\*, P < 0.01 vs. 동시간대 파클리탁셀(paclitaxel). GDF 트랩은 파클리탁셀 치료에 의해 유도된 빈혈을 상쇄시킨다.

도 12는 만성 신장 질환을 가진, 한쪽 신장절개된(NEPHX) 마우스 모델에서 붉은 혈액 세포(RBC) 수준에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 효과를 나타낸다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. \*\*\*, P < 0.001 vs. 기선. GDF 트랩은 대조군 마우스에서 관찰된 신장절제-유도된 빈혈을 되돌린다.

도 13은 만성 신장 질환을 가진, 한쪽 신장절개된(NEPHX) 마우스 모델에서 붉은 혈액 세포(RBC), 헤모글로빈 (HGB), 및 혜마토크릿 (HCT) 수준에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 효과를 나타낸다. 데이터는 4주간에 걸쳐 기선으로부터 평균 변화를 나타낸다( $\pm$  SEM). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001 vs. NEPHX 대조군. GDF 트랩은 이들 적혈구 매개변수의 신장절제-연합된 쇠퇴를 방지하고, 신장이 손상되지 않은(모조) 마우스의 것과 유사한 정도로 각각 증가된다.

도 14는 급성 혈액 손실에 의해 유도된 빈혈을 가진 랫 모델의 붉은 혈액 세포 (RBC) 수준에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 효과를 나타낸다. 혈액 제거는 D-1일에 일어났고, 0일 시점 및 3일 시점에 투약이 된다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001 vs. 동시간대 비이클. GDF 트랩은 혈액-상실에 의해 유도된 빈혈의 회복 속도 및 그 정도를 개선시켰다.

도 15는 게잡이 원숭이의 붉은 혈액 세포의 기선 농도에서 절대적 변화에 있어서 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (회색) 또는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (검정)의 처리 효과를 나타낸다. VEH = 비이클. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. n = 4-8/집단.

도 16은 게잡이 원숭이의 혜마토크릿의 절대적 변화에 있어서 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (회색) 또는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (검정)의 처리 효과를 나타낸다. VEH = 비이클. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. n = 4-8/집단.

도 17은 게잡이 원숭이의 혜모글로빈 기선 농도의 절대적 변화에 있어서 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (회색) 또는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (검정)의 처리 효과를 나타낸다. VEH = 비이클. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. n = 4-8/집단.

도 18은 게잡이 원숭이의 순환하는 망상적혈구 기선 농도의 절대적 변화에 있어서 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (회색) 또는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (검정)의 처리 효과를 나타낸다. VEH = 비이클. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. n = 4-8/집단.

도 19는 마우스의 혜마토크릿에 있어서 72시간 동안 에리트로포에틴 (EPO) 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 복합 치료 효과를 나타낸다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM (n = 4/집단)을 나타내고, 그리고 각 집단으로부터 유의적으로 상이한 것은 (p < 0.05, 독립표본 t-테스트) 상이한 문자로 표시된다. 복합 치료는 비이클과 비교하여 혜마토크릿을 23% 증가시켰는데, 이는 EPO 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 개별 효과의 합보다 훨씬 큰 공조적 증가다.

도 20은 마우스의 혜모글로빈 농도에 있어서 72시간 동안 에리트로포에틴 (EPO) 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 복합 치료 효과를 나타낸다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM (n = 4/집단)을 나타내고, 그리고 각 집단으로부터 유의적으로

로 상이한 것은 ( $p < 0.05$ ) 상이한 문자로 표시된다. 복합 치료는 비이클과 비교하여 헤모글로빈의 농도를 23% 증가시켰는데, 이 또한 공조적 효과다.

도 21은 마우스의 붉은 혈액 세포 농도에 있어서 72시간 동안 에리트로포에틴 (EPO) 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 복합 치료 효과를 나타낸다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM ( $n = 4$ /집단)을 나타내고, 그리고 각 집단으로부터 유의적으로 상이한 것은 ( $p < 0.05$ ) 상이한 문자로 표시된다. 복합 치료는 비이클과 비교하여 헤모글로빈의 농도를 20% 증가시켰는데, 이 또한 공조적 효과다.

도 22는 마우스의 적혈구생성 선구 세포의 수에 있어서 72시간 동안 에리트로포에틴 (EPO) 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 복합 치료 효과를 나타낸다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM ( $n = 4$ /집단)을 나타내고, 그리고 각 집단으로부터 유의적으로 상이한 것은 ( $p < 0.05$ ) 상이한 문자로 표시된다. EPO 단독으로 후기-단계 선구 성숙의 데가로 급격하게 호염기성 적혈구 모세포 (BasoE)의 수가 급격하게 증가되지만, 복합 치료는 BasoE 수를 더 적은 수준으로 증가시키지만, 여전히 그 정도는 유의적이며, 후기-단계 선구의 동일한 성숙을 지원한다.

도 23은 야생형 (WT) 마우스의 RBC 매개변수와  $\beta$ -지중해빈혈을 가진  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델에서의 RBC 매개변수를 비교한다. 2-6 월령의 처리를 받지 않은 마우스의 혈액 시료를 분석하여 붉은 혈액 세포 수 (RBC; A), 헤마토크리트 (HCT; B), 그리고 헤모글로빈 농도 (Hgb; C)를 결정하였다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM ( $n = 4$ /집단),  $***$ ,  $p < 0.001$ .  $Hbb^{-/-}$  마우스는 심각한 빈혈이 있는 것으로 확인되었다.

도 24는  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 RBC 수에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc의 효과를 나타낸다. 혈액 시료는 처리 4주후에 수집되었다. 데이터는 집단간 2개의 평균이며, 막대는 그 범위를 나타낸다. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc의 처리는  $Hbb^{-/-}$  마우스에 존재하는 RBC 결핍을 절반으로 감소시켰다.

도 25는  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 RBC 형태에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc의 효과를 나타낸다. 4주간 처리된 마우스의 Giemsa-착색된 혈액 도말 (smear)의 영상은 100x 확대상태에서 획득되었다. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스의 혈액에서 용혈, 세포 찌꺼기, 및 많은 작은 또는 불규칙적인 모양을 한 RBCs를 기록. 비교하면, ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는 용혈, 찌꺼기, 그리고 불규칙적인 모양을 한 RBCs의 발생을 상당히 감소시키면서, 반면 정상적인 모양을 한 RBCs의 수는 증가된다.

도 26은  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 RBC 수에 대하여 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타내는데, 비이클-투약된 야생형 마우스의 데이터는 비교를 위하여 포함된다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이며;  $n = 7$ /집단.  $**$ ,  $P < 0.01$  vs. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 평균 RBC 감소를 50% 이상 감소시켰다.

도 27은  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 혈청 빌리루빈 수준에 대하여 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타내는데, 비이클-투약된 야생형 마우스의 데이터는 비교를 위하여 포함된다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. # # #,  $P < 0.001$  vs. 비이클-처리된 야생형 마우스; \*,  $P < 0.05$  vs. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 총 빌리리분 수준을 상당히 감소시켰다.

도 28은  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 혈청 EPO 수준에 대하여 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타내는데, 비이클-투약된 야생형 마우스의 데이터는 비교를 위하여 포함된다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. # # #,  $P < 0.001$  vs. 비이클-처리된 야생형 마우스; \*,  $P < 0.05$  vs. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 평균 순환 EPO 수준을 60% 이상 감소시켰다.

도 29는  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 비장거대증에 대하여 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타내는데, 비이클-투약된 야생형 마우스의 데이터는 비교를 위하여 포함된다. A. 3월령의 마우스에서 시작하여 1 mg/kg으로 주당 2회씩, 2개월 동안 처리후 평균  $\pm$  SEM. # # #,  $P < 0.001$  vs. 비이클-처리된 야생형 마우스; \*,  $P < 0.05$  vs. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스. B. 6-8월령의 마우스에서 시작하여 1 mg/kg으로 주당 2회씩, 3개월 동안 처리한 별개 연구에서 관찰된 대표적인 비장 크기. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 비장의 중량을 상당히 감소시켰다.

도 30은  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 골 미네랄 밀도에 대하여 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타내는데, 비이클-투약된 야생형 마우스의 데이터는 비교를 위하여 포함된다. 대퇴골 분석에 근거하여 평균  $\pm$  SEM . #,  $P < 0.05$  vs. 비이클-처리된 야생형 마우스; \*,  $P < 0.05$  vs. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 골 미네랄 밀도를 정상화시켰다.

도 31은  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 철 항상성의 매개변수들에 대하여 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타낸다. 혈청 철 (A), 혈청 폐리틴 (B), 및 트란스페린 포화 (C)에 대한 평균  $\pm$  SEM . \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 철 과부하의 각 측정을 상당히 감소시켰다.

도 32은  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 조직 철 과부하에 대하여 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타낸다. 비장 (A-C), 간 (D-F), 및 신장 (G-I)의 조직 단편 ( $200 \mu\text{m}$ )에서 철 수준은 Per1의 프레시안 블루 (Prussian blue)로 착색시켜 측정되었다. 야생형 비장 (A)에서 철 착색은 적색 속질 (화살표)에서 풍부하였지만, 백색 속질 (\*)에서는 없었다.  $Hbb^{-/-}$  마우스 (B)의 비장에서 철 착색의 증가는 골수외 적혈구생성으로 인하여 적색 속질의 확장을 반영한다.  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc는 비장의 적혈구생성을 감소시켰고, 비장의 철 착색 (C)의 야생형 패턴을 복원시켰다. 추가적으로,  $Hbb^{-/-}$  마우스의 간의 Kupffer 세포 (H, 화살표) 및 신장 피층 (E, 화살표)에서 비정상적인 철 착색은 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (F 및 I)에 의해 정상화되었다. 확대, 200x.

도 33은  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 헵시딘 mRNA의 간 수준에 대하여 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타낸다. 평균  $\pm$  SEM; \*,  $P < 0.05$  vs. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리로  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 헵시딘 mRNA의 발현이 상당히 증가되었다.

도 34는  $\beta$ -지중해빈혈의  $Hbb^{-/-}$  마우스 모델의 반응성 산소 종 (ROS)의 순환 수준에 대하여 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리 효과를 나타내며, 비교용으로 비이클-투약된 야생형 마우스의 데이터가 포함된다. 데이터는 기하학적 평균  $\pm$  SEM. # # #,  $P < 0.001$  vs. 비이클-처리된 야생형 마우스; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 ROS를 상당히 감소시켰다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

### 1. 총람

[0031]

형질변환 성장 인자-베타 (TGF-베타) 슈퍼페밀리는 공통적인 서열 성분들과 구조적 모티프를 공유하는 다양한 성장 인자들을 함유한다. 이들 단백질은 척추동물 및 무척추동물에서 다양한 세포 유형에 생물학적 영향을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 슈퍼페밀리 구성요소들은 배 발생 동안 패턴 형성 및 조직 세포에서 중요한 기능을 수행하고, 그리고 지방형성, 근발생, 연골형성, 심근세포분화, 혈액생성, 신경발생, 그리고 상피 세포 분화를 포함하는 다양한 분화 과정에 영향을 줄 수 있다. TGF-베타 패밀리의 구성요소의 활성을 조정함으로써, 유기체 안에서 상당한 생리학적 변화를 야기시키는 것이 대개 가능하다. 예를 들면, Piedmontese 및 Belgian Blue 소 품종은 근육량의 상당한 증가를 야기시키는 GDF8 (또한 미오스타틴이라고도 함) 유전자에 기능상실 유전자를 가진다. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. 더욱이, 인간에서, GDF8의 비활성 대립유전자는 증가된 근육량과 연관되고, 보고에 의하면 아주 뛰어난 힘과 관련된다. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

[0032]

TGF- $\beta$  신호는 리간드 자극시 하류 Smad 단백질의 인산화 및 활성화시키는 유형 I 및 유형 II 세린/트레오닌 카나제 수용체들의 이종이합체 복합체들에 의해 매개된다 (Massagu, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). 이들 유형 I 및 유형 II 수용체들은 시스테인의 풍부한 영역을 가진 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 및 예측된 세린/트레오닌 특이성을 가진 세포질 도메인으로 구성된, 막통과 단백질이. 유형 I 수용체들은 신호생성에 필수적이다. 유형 II 수용체들은 리간드의 결합 및 유형 I 수용체들의 발현에 요구된다. 유형 I 및 II 액티빈 수용체들은 리간드 결합 이후 안정적인 복합체를 형성하여, 유형 II 수용체들에 의하여 유형 I 수용체들의 인산화가 이루어진다.

[0033]

2개의 관련된 유형 II 수용체들 (ActRII), ActRIIA 및 ActRIIB은 액티빈의 유형 II 수용체들로 확인되었다 (Mathews and Vale, 1991, *Cell* 65:973-982; Attisano et al., 1992, *Cell* 68: 97-108). 액티빈이외에도, ActRIIA 및 ActRIIB는 BMP7, Nodal, GDF8, 및 GDF11을 포함하는 몇 가지 다른 TGF- $\beta$  패밀리 단백질과 생물학적으로 상호작용할 수 있다(Yamashita et al., 1995, *J. Cell Biol.* 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, *Mol. Cell* 7: 949-957; Oh et al., 2002, *유전자 Dev.* 16:2749-54). ALK4는 액티빈, 특히 액티빈 A에 대한 1차 유형 I 수용체이고, 그리고 ALK-7은 액티빈, 특히 액티빈 B에 대한 수용체로 작용될 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIB 수용체들의 리간드 (ActRIIB 리간드로도 칭함)를 대상 GDF 트랩 폴리펩티드로 길항하는 것에 관계된다. ActRIIB 수용체들의 예시적인 리간드는 일부 TGF- $\beta$  패밀리 구성원, 이를 테면, 액티빈 A, 액티빈 B, Nodal, GDF8, GDF11, 및 BMP7을 포함한다.

[0034]

액티빈은 TGF-베타 슈퍼패밀리에 속하는 이합체성 폴리펩티드 성장 인자들이다. 2개의 밀접하게 관련된  $\beta$  아단위의 동종/이종이합체 (각각  $\beta_{\text{ABA}}$ ,  $\beta_{\text{B}BB}$ , 및  $\beta_{\text{AB}B}$ )인 3가지 주요 액티빈 형태(A, B 및 AB)가 있다. 인간 계놈은 또한 액티빈 C 및 액티빈 E를 인코드하고, 이들은 주로 간에서 발현되며,  $\beta_C$  또는  $\beta_E$ 를 함유하는 이종 이합체 또한 공지되어있다. TGF-베타 슈퍼패밀리에서, 액티빈은 난소 및 태반 세포들에서 호르몬 생산을 촉진시키고, 뉴런 세포 생존을 지원하고, 세포 유형에 따라 세포-주기 진행에 양성적으로 또는 부정적으로 영양을 주고, 그리고 양서류 배에서 최소한 중배엽 분화를 유도할 수 있는 독특하고 다양한 기능을 하는 인자다(DePaolo et al., 1991, *Proc Soc Ep Biol Med.* 198:500-512; Dyson et al., 1997, *Curr Biol.* 7:81-84; Woodruff, 1998, *Biochem Pharmacol.* 55:953-963). 더욱이, 자극된 인간 단핵구 백혈병 세포로부터 단리된 적혈구의 분화 인자 (EDF)는 액티빈 A와 동일한 것으로 나타났다 (Murata et al., 1988, *PNAS*, 85:2434). 액티빈 A는 골수에서 적혈구생성을 촉진한다고 제안되었다. 몇몇 조직에서, 액티빈 신호생성은 이의 관련된 이종이합체, 인히빈에 의해 길항된다. 예를 들면, 뇌하수체로부터 소포-자극 호르몬 (FSH)의 방출 동안, 액티빈은 FSH 분비 및 합성을 촉진시키는 반면, 인히빈은 FSH 분비 및 합성을 저지한다. 액티빈 생활성을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질들은 폴리스테틴 (PS), 폴리스테틴-관련된 단백질 (FSRP)과  $\alpha$ -마크로글루불린을 포함한다.

[0035]

Nodal 단백질은 중배엽 및 내배엽 유도 및 형성에 기능을 하고, 뿐만 아니라 축 구조 이를 테면, 초기 배형성에서 심장 및 위의 후속 조직화에 기능을 가진다. 발생중인 척추동물 배에서 배면 조직은 주로 척색 및 사전-삭 (pre-chordal) 플레이트에 주로 기여하며, 비-축 내 구조를 형성하기 위하여 주변 세포들을 모은다. Nodal은 유형 I 및 유형 II 수용체들 모두와 Smad 단백질로 알려진 세포내 효과물질을 통하여 신호를 발생하는 것으로 보인다. 최근 연구들은 ActRIIA 및 ActRIIB가 Nodal에 대하여 유형 II 수용체로 작용한다는 생각을 뒷받침한다 (Sakuma et al., 유전자 Cells. 2002, 7:401-12). Nodal 리간드들은 이들의 공-인자들 (가령, 크립토(cripto))과 상호작용하여 액티빈 유형 I 및 유형 II 수용체들을 활성화시키고, 이는 Smad2를 인산화시킨다고 제안된다. Nodal 단백질들은 중배엽 형성, 전면 패턴화(anterior patterning), 그리고 좌-우 축 상세(left-right axis specification)를 포함하는 초기 척추동물 배에 중요한 많은 사건들에 연루된다. 실험 증거에서 Nodal 신호생성은 액티빈 및 TGF-베타에 특이적으로 반응하는 것으로 나타난 루시퍼라제 리포터인, pAR3-Lux를 활성화시킨다. 그러나, Nodal은 골 형성 단백질에 특이적으로 반응하는 리포터인 pTlx2-Lux를 유도하지는 못한다. 최근 결과는 Nodal 신호생성이 액티빈-TGF-베타 경로 Smads, Smad2 및 Smad3에 의해 매개된다는 직접적인 생화학적 증거를 제공한다. 추가 증거에서 세포외 크립토(cripto) 단백질은 Nodal 신호생성에 요구되며, 액티빈 또는 TGF-베타 신호생성과는 구별된다는 것을 보여준다.

[0036]

성장 및 분화 인자-8 (GDF8)는 또한 미오스타틴으로 알려져있다. GDF8은 골근육량의 부정적 조절자다. GDF8은 발생 및 성인 골근육에서 매우 발현된다. 이식유전자 마우스에서 GDF8 null 돌연변이는 골근육의 현저한 비대 및 과형성을 특징으로 한다(McPherron et al., *Nature*, 1997, 387:83-90). 골근육량의 유사한 증가는 소에서 GDF8의 자연적으로 발생되는 돌연변이에서 분명히 나타난다(Ashmore et al., 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland and Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron and Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; 그리고 Kambadur et al., *Genome Res.*, 1997, 7:910-915) 그리고 놀랍게도 인간에서도 나타난다(Schuelke et al., *N Engl J Med* 2004;350:2682-8). 인간에서 HIV-감염과 연합된 근육 소모(wasting)는 GDF8 단백질 발현의 증가에 수반된다는 것이 연구에서 또한 나타났다 (Gonzalez-Cadavid et al., *PNAS*, 1998, 95:14938-43). 추가적으로, GDF8은 근육-특이적 효소 (가령, 크레아틴 키나제)의 생산을 조절하고, 그리고 근아세포 세포 증식 (WO 00/43781)을 조절할 수 있다. GDF8 프로펩티드는 성숙한 GDF8 도메인 이합체에 비공유적으로 결합하여, 이의 생물학적 활성을 비활성화시킨다 (Miyazono et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:

6407-6415; Wakefield et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263; 7646-7654; 그리고 Brown et al. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43). GDF8 또는 구조적으로 관련된 단백질에 결합하고, 이들의 생물학적 활성을 저해시키는 기타 단백질은 폴리스태틴, 그리고 잠재적으로, 폴리스태틴-관련된 단백질들을 포함한다 (Gamer et al. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232).

[0037] BMP11으로도 또한 알려진 성장 및 분화 인자-11 (GDF11)는 분비된 단백질이다 (McPherron et al., 1999, *Nat. Genet.* 22: 260-264). GDF11은 마우스 발생동안 꼬리 끝(tail bud), 수족 끝(limb bud), 상악(maxillary)과 하악(mandibular) 아치(arches), 그리고 배근(dorsal root) 강글리아에서 발현된다 (Nakashima et al., 1999, *Mech. Dev.* 80: 185-189). GDF11은 중배엽 및 신경 조직 모두의 패턴화에서 독특한 역할을 한다 (Gamer et al., 1999, *Dev Biol.*, 208:222-32). GDF11은 병아리 수족 발생 동안 연골형성 및 근발생의 음성 조절자로 드러났다 (Gamer et al., 2001, *Dev Biol.* 229:407-20). 근육에서 GDF11의 발현은 또한 GDF8과 유사한 방식으로 근육 성장을 조절하는데 이의 역할을 제시한다. 추가적으로, 뇌에서 GDF11의 발현은 GDF11이 또한 신경계 기능과 관련된 활성을 보유할 수 있음을 제시한다. 흥미로운 것은, GDF11은 후각 상피에서 신경발생을 저해시키는 것으로 나타났다 (Wu et al., 2003, *Neuron*. 37:197-207).

[0038] 골원성 단백질-1 (OP-1)로도 불리는 골 형성 단백질 (BMP7)은 연골 및 골 형성을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다. 추가적으로, BMP7은 광범위한 생리학적 공정을 조절한다. 예를 들면, BMP7은 상피 골형성 현상을 담당하는 골유도성 인자일 것이다. BMP7은 칼슘 조절 및 골 형상성에 역할을 한다는 것이 또한 발견되었다. 액티빈과 유사하게, BMP7은 유형 II 수용체들, ActRIIA 및 ActRIIB에 결합된다. 그러나, BMP7 및 액티빈은 별개의 유형 I 수용체들을 이종결합성 수용체 복합체들로 수집한다. 관찰된 주요 BMP7 유형 I 수용체는 ALK2이었고, 액티빈은 ALK4 (ActRIIB)에 배타적으로 결합된다. BMP7 및 액티빈은 별개의 생물학적 반응을 유도하고, 상이한 Smad 경로들을 활성화시켰다 (Macias-Silva et al., 1998, *J Biol Chem.* 273:25628-36).

[0039] 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 변이체 ActRIIB 폴리펩티드 (ActRIIB)의 변이체인 GDF 트랩 트랩 폴리펩티드는 야생형 가용성 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하였을 때, 생체내에서 붉은 혈액 세포 수준의 증가에 더 효과적이며, 그리고 빈혈 및 효과가 없는 적혈구생성에 대한 다양한 모델에서 유익한 효과를 가진다. 추가적으로, EPO 수용체 활성물질과 복합하여 GDF 트랩 폴리펩티드의 사용으로 붉은 혈액 세포 형성이 실질적으로 증가됨을 보여준다. 혈액생성은 에리트로포에틴, G-CSF 및 철 항상성을 포함하는 다양한 인자들에 의해 조정되는 복합 과정이다. 용어 "붉은 혈액 세포 수준을 증가시키고" 그리고 "붉은 혈액 세포 형성을 촉진시키고"는 임상적으로 관찰가능한 측정 기준, 이를 테면, 헤마토크립, 붉은 혈액 세포 수와 혈모글로빈 측정을 지칭하며, 그리고 이러한 변화를 일어키는 기전에 대해 중립을 의미한다.

[0040] 자극 붉은 혈액 세포 수준을 자극시키는데 추가적으로, GDF 트랩 폴리펩티드들은 예를 들면, 근육 성장을 촉진 (PCT 공개 WO 2006/012627 및 WO 2008/097541, 이는 전문이 명세서의 참고자료에 편입된다)을 포함하는 다양한 치료 용도에 유용하다. 일부 경우들에서, 근육을 증가시키는 목적으로 GDF 트랩 폴리펩티드를 투여할 때, 붉은 혈액 세포들에 대한 영향을 감소 또는 최소화시키는 것이 바람직할 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드로 치료된 또는 치료 후보인 환자들에게서 다양한 혈액 매개변수들을 관찰함으로써, 개인 환자의 필요, 기준 혈액 매개변수 및 치료 목적에 근거하여 적절한 투약량(투여량 및 빈도 포함)이 결정될 수 있다. 더욱이, 시간에 따른 치료 과정 및 하나 또는 그 이상의 혈액 매개변수에 있어서 영향은 환자 관리를 용이하게 하고, 적절한 유지 약량(양과 빈도 모두) 등을 결정함으로써 GDF 트랩 폴리펩티드가 투여된 환자 관리에 유용할 것이다.

[0041] EPO는 적혈구의 선조 세포의 성장 및 적혈구로의 성숙되는 것에 관련된 당단백질 호르몬이다. EPO는 태아 기간 동안 간에서 그리고 성인의 경우 신장에서 만들어진다. 주로 성인에게서 흔히 일어나는 EPO 생산의 감소는 신장 부전의 결과이며, 이는 빈혈로 이어진다. EPO는 EPO 유전자로 형질감염된 숙주 세포의 단백질 발현 및 분비에 기초하여 유전자 조작 기술에 의해 만들어졌다. 빈혈 치료에서 이러한 재조합 EPO의 투여는 효과적이었다. 예를 들면, Eschbach et al. (1987, *N Engl J Med* 316:73)는 만성 신부전에 의해 야기된 빈혈을 바로잡는데 EPO의 사용을 설명한다.

[0042] EPO의 효과는 사이토kin 수용체 슈퍼페밀리에 속하는 EPO 수용체로 명명되는 세포 표면 수용체에 EPO의 결합 및 이의 활성화를 통하여 중재되며, 인간 및 뮤린 EPO 수용체들이 클론되었고, 발현되었다 (D'Andrea et al., 1989, *Cell* 57:277; Jones et al., 1990, *Blood* 76:31; Winkelman et al., 1990, *Blood* 76:24; WO 90/08822/U.S. Pat. No. 5,278,065). 인간 EPO 수용체 유전자는 대략적으로 224개 아미노산의 세포외 도메인을 포함하는 483 개 아미노산의 막통과단백질을 인코드하고, 그리고 뮤린 EPO 수용체와 대략적으로 82% 아미노산 서열 동일성을 나타낸다 (미국 특허 제6,319,499호 참고). 포유류 세포에서 발현된 클론된, 전장 EPO 수용체 (66-72 kDa)는 적

혈구의 선조 세포에서 고유의 수용체와 유사한 친화력( $K_D = 100\text{--}300 \text{ nM}$ )으로 EPO에 결합된다. 따라서, 이 형태는 주요 EPO 결합 결정자(determinant)를 함유하는 것으로 보며, EPO 수용체로 지칭된다. 다른 밀접하게 관련된 사이토킨 수용체들과의 분석에 의해, EPO 수용체는 항진제 결합시에 이합체화되는 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고, 다중결합 복합체일 수도 있는 EPO의 상세한 구조 및 이의 활성 특이적 기전은 완전하게 밝혀지지 않았다(미국 특허 제. 6,319,499호).

[0043] EPO 수용체의 활성화는 몇 가지 생물학적 효과를 초래한다. 이들 효과에는 미숙한 적혈구 모세포의 증식 증가, 미숙한 적혈구 모세포의 분화 증가, 그리고 적혈구의 선조 세포의 자가사멸 감소가 포함된다(Liboi et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury et al., 1990, Science 248:378-381). 증식 및 분화를 조정하는 EPO 수용체 신호 변환 경로들은 별개의 것으로 보인다(Noguchi et al., 1988, Mol Cell Biol 8:2604; Patel et al., 1992, J Biol Chem 1992, 267:21300; Liboi et al., ibid). 일부 결과에서 분화 신호의 조정에는 보조 단백질이 요구될 수 있다고 제시된다(Chiba et al., 1993, Nature 362:646; Chiba et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11593); 그러나, 수용체의 구조적으로 활성화된 형태는 증식 및 분화를 모두 조절할 수 있기 때문에 (Pharr et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:938), 분화에서 보조 단백질의 역할에 대해서는 논란이 있다.

[0044] EPO 수용체 활성물질은 작은-분자 적혈구생성-자극 물질들 (ESAs) 뿐만 아니라 EPO-기반 화합물들을 포함한다. 전자의 예로는 폴리에틸렌 글리콜에 공유적으로 연계된 이합체 웨티드-기반 항진제 (상표명 Hematide)이며, 건강한 지원자 및 만성 신장 질환 및 내생성 항-EPO 항체를 가진 환자들에서 적혈구생성-자극 성질을 나타내었다 (Stead et al., 2006, Blood 108:1830-1834; Macdougall et al., 2009, N Engl J Med 361:1848-1855). 다른 예로는 비웨티드-기반 ESAs을 포함한다 (Qureshi et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:12156-12161).

[0045] EPO 수용체 활성물질은 EPO 수용체 자체 접촉없이, 내생성 EPO의 생산을 강화시킴으로써 적혈구 생성을 간접적으로 자극시키는 화합물들을 또한 포함한다. 예를 들면, 저산소증-유도가능한 전사 인자들 (HIFs)은 세포 조절 기전에 의해 저산소상태에서 억압되는(탈안정화된) EPO 유전자 발현의 내생성 자극물질이다. 따라서, HIF 프로일 히드록실라제 효소의 저해제는 생체내에서 EPO-유도 활성에 대해 조사된다. EPO 수용체의 다른 간접 활성물질은 원래부터 EPO 유전자 발현을 저해시키는 GATA-2 전사 인자의 저해제(Nakano et al., 2004, Blood 104:4300-4307), 그리고 EPO 수용체 신호 변환의 음성 조절자로 기능을 하는 조혈 세포 포스파타제(HCP 또는 SHP-1)의 저해제(Klingmuller et al., 1995, Cell 80:729-738)를 포함한다.

[0046] 본 명세서에서 이용된 용어들은 본 발명의 문맥 및 이를 용어가 사용된 특정 배경 안에서 당업계에서 통상적인 의미를 보유한다. 본 발명의 조성을 및 방법을 설명하고, 이를 어떻게 만들고 이용하는지에 대해 실무자들에게 추가 정보를 제공하지 위하여 특정 용어들은 본 명세서에서 추가 논의된다. 용어의 범위 또는 임의의 사용 의미는 이 용어가 이용된 특정 문맥에서 자명할 것이다.

[0047] "약" 및 "대략적으로"는 측정의 성질 및 정확성을 제공하기 위하여 측정된 양의 수용가능한 오차 범위를 일반적으로 의미한다. 전형적으로, 오차 범위의 예시는 주어진 값 또는 값의 범위의 20%, 바람직하게는 10%, 그리고 더 바람직하게는 5%이다.

[0048] 대안으로, 그리고 생물학적 시스템에서 특히, 용어 "약" 및 "대략적으로"는 주어진 값의 10배 범위, 바람직하게는 5-배 그리고 더 바람직하게는 2-배 안의 값을 의미한다. 본 명세서에서 제공된 수치적 양은 다른 언급이 없는 한 근사치이며, 용어 "약" 또는 "대략적으로"는 명시적으로 표현되지 않을 때 추측될 수 있음을 의미한다.

[0049] 본 발명의 방법은 야생형 서열 내지 하나 또는 그 이상의 돌연변이 (서열 변이체)를 포함하는 서로 서열을 비교하는 단계들을 포함할 수 있다. 이러한 비교는 전형적으로 가령, 당분야에 공지된 서열 배열 프로그램 및/또는 알고리즘(예를 들면, BLAST, FASTA 및 MEGALIGN, 그 외 다수)을 이용하여 중합체 서열을 배열시키는 것을 포함한다. 돌연변이가 잔기 삽입 또는 결손을 포함하는 이러한 배열에서 서열 배열은 삽입된 또는 결손된 잔기를 포함하지 않는 중합체 서열 안에 "캡(gap)" (전형적으로 -, 또는 "A"로 나타냄)을 도입시킨다는 것을 당업자는 바로 인지할 수 있다.

[0050] 모든 문법적 형태 및 철자 변형에서 "상동성(Homologous)"은 동일한 유기체 종에서 슈퍼페밀리의 단백질 뿐만 아니라, 상이한 종의 유기체로부터 상동성 단백질을 포함하는 "공통적인 진화 기원"을 포함하는 두 단백질 간에 상호관계를 지칭한다. 이러한 단백질 (그리고 이들을 인코드하는 핵산)은 동일성 비율 또는 특이적 잔기 또는 모티프의 존재에 의해 그리고 보존된 위치에 의해 나타내는 이들의 서열 유사성에 의해 반응된 서열 상동성을

보유한다.

[0051] 용어 "서열 유사성"은 공통적인 진화론적 기원을 공유하거나 또는 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 간에 동일 또는 대응 정도를 지칭한다.

[0052] 그러나, 공통적인 사용 및 본 출원에서 용어 "상동성"은 부사에 의해 가령, "매우"에 의해 수식될 때, 서열 유사성을 지칭할 수 있고, 공통적인 진화론적 기원을 공유하거나 또는 공유하지 않을 수 있다.

## 2. GDF 트랩 폴리펩티드들

[0054] 특정 측면들에서, 본 발명은 GDF 트랩 폴리펩티드들, 가령, 예를 들면, 단편들, 기능적 변이체들, 그리고 ActRIIB 폴리펩티드들의 변형된 형태들을 포함하는 가용성 변이체 ActRIIB 폴리펩티드들에 관계된다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드들은 대응하는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 동일한 또는 최소한 한 가지 유사한 생물학적 활성을 보유한다. 예를 들면, 본 발명의 GDF 트랩 폴리펩티드는 ActRIIB 리간드 (가령, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, Nodal, GDF8, GDF11 또는 BMP7)에 결합하여 이의 기능을 저해시킬 수 있다. 임의선택적으로, GDF 트랩 폴리펩티드는 붉은 혈액 세포 수준을 증가시킨다. GDF 트랩 폴리펩티드들의 예는 하나 또는 그 이상의 서열 변이를 가진 인간 ActRIIB 선구 폴리펩티드들 (서열 번호: 1 또는 39), 그리고 하나 또는 그 이상의 서열 변이를 가진 가용성 인간 ActRIIB 폴리펩티드들 (가령, 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 및 41)을 포함한다.

[0055] 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "ActRIIB"는 임의의 종의 액티빈 수용체 유형 IIb (ActRIIB) 단백질들과 돌연변이 또는 기타 변형에 의해 이러한 ActRIIB 단백질들로부터 유도된 변이체들을 지칭한다. 본 명세서에서 ActRIIB에 대한 언급은 현재 확인된 형태중 임의의 것을 참고하는 것으로 이해된다. ActRIIB 패밀리의 구성원들은 일반적으로 시스테인-풍부한 영역을 가진 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 키나제 활성을 가진 세포질 도메인을 포함하는, 일반적으로 막통과단백질들이다. 인간 ActRIIA 가용성 세포외 도메인 (비교용으로 제공됨)과 ActRIIB 가용성 세포외 도메인의 아미노산 서열은 도 1에서 설명된다.

[0056] 용어 "ActRIIB 폴리펩티드"는 ActRIIB 패밀리 구성원의 임의의 자연적으로 발생되는 폴리펩티드와 유용한 활성을 유지하는 임의의 변이체들(돌연변이, 단편들, 융합, 그리고 웨티도모방체 형태들을 포함)을 포함하는 폴리펩티드들을 포함한다. 예를 들면, WO 2006/012627 참고. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드들은 ActRIIB 폴리펩티드의 서열에 최소한 80% 동일한 서열을 가진 그리고 임의선택적으로 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 가진 임의의 공지된 ActRIIB의 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 단백질 및/또는 액티빈에 결합하고, 이의 기능을 저해시킬 수 있다. GDF 트랩인 ActRIIB 폴리펩티드는 생체내에서 붉은 혈액 세포 형성을 촉진시키 활성에 대해 선별될 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드들의 예로는 인간 ActRIIB 선구 폴리펩티드 (서열 번호: 1 및 39)와 가용성 인간 ActRIIB 폴리펩티드들 (가령, 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 및 41)을 포함한다. 본 명세서에서 설명된 모든 ActRIIB-관련된 폴리펩티드들의 아미노산 번호매김은 특별한 다른 사항이 없는 한, 서열 번호:1의 번호매김에 기초된다.

[0057]

인간 ActRIIB 선구 단백질 서열은 다음과 같다:

MTAPWVALALLWGS**GRGEAETRECIYYNANWELERT**NQ**SGLERC**  
**E**EQDKRLH**CYASWR**N**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**  
**VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT**LLTVLAYSLLPIG  
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHD**PG**PPPSPLVGLKPLQLLEIK  
 ARGRFGCVWKAQLMND**F**AVKIFPLQDKQS**E**RF**T**PGMKHENLL  
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHD**K**GSLTDYL**K**GNII**T**WNE**L**CHVAETM  
 SRGLSYLHED**V**PWCRGE**H**KPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLAD**FG**LA  
 VRFEP**G**KPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINF**Q**RD**A**FLRID**Y**AMGLV  
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLP**FE**EEIGQHPS**LE**ELQEVVVHKKMRPTIK  
 DHWLKH**P**GLA**Q**LC**V**TIEC**W**D**H**DAE**A**RL**S**AGC**V**EE**R**V**S**LI**R**SVNGTTS  
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (서열 번호: 1)

[0058]

[0059] 신호 캡티드 한줄로 표시되며; 세포외 도메인은 굵게 표시되며 그리고 잠재적인 N-연계된 당화 부위들은 상자로 표시된다.

[0060]

위치 64의 알라닌을 가진 형태는 다음과 같고, 문현에서도 보도된다:

MTAPWVALALLWGS**GRGEAETRECIYYNANWELERT**NQ**SGLERC**  
**E**EQDKRLH**CYASWA**N**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**  
**VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT**LLTVLAYSLLPIG  
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHD**PG**PPPSPLVGLKPLQLLEIK  
 ARGRFGCVWKAQLMND**F**AVKIFPLQDKQS**E**RF**T**PGMKHENLL  
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHD**K**GSLTDYL**K**GNII**T**WNE**L**CHVAETM  
 SRGLSYLHED**V**PWCRGE**H**KPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLAD**FG**LA  
 VRFEP**G**KPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINF**Q**RD**A**FLRID**Y**AMGLV  
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLP**FE**EEIGQHPS**LE**ELQEVVVHKKMRPTIK  
 DHWLKH**P**GLA**Q**LC**V**TIEC**W**D**H**DAE**A**RL**S**AGC**V**EE**R**V**S**LI**R**SVNGTTS  
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (서열 번호: 39)

[0061]

[0062] 처리된 폴리캡티드 서열인, 인간 ActRIIB 가용성 (세포외)은 다음과 같다:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQ~~SGLERC~~**E**QDKRLH**CYASWR**N**SS**  
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP  
 EAGGPEVTYEPPPTAPT (서열 번호: 2)

[0063]

[0064] A64를 가진 또다른 형태는 다음과 같다:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG  
TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVY FCCCEGNFCNERFTHLP  
EAGGPEVTYEPPPTAPT (서열 번호: 40)

[0065]

일부 조건에서, 이 단백질은 N-말단에서 "SGR" 서열을 가지도록 만들어질 수 있다. 세포외 도메인의 C-말단 "꼬리"는 밑줄로 표시된다. 삭제된 "꼬리"를 가진 서열(Δ15 서열)은 다음과 같다:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG  
TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVY FCCCEGNFCNERFTHLP

[0067]

EA (서열 번호: 3)

[0068]

A64를 가진 또다른 형태는 다음과 같다:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG  
TIELVKKGCWLDDFN CYDRQECVATEENPQVY FCCCEGNFCNERFTHLP

[0069]

EA (서열 번호: 41)

[0070]

일부 조건에서, 이 단백질은 N-말단에서 "SGR" 서열을 가지도록 만들어질 수 있다. 인간 ActRIIB 선구 단백질을 인코드하는 핵산 서열은 다음과 같다: (Genbank entry NM\_001106의 뉴클레오티드 5-1543)(위치 64에 알라닌을 제공하는 서열, 그리고 대신 아르기닌이 제공되도록 변형될 수 있다)

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC  
 CCGCTCTGGCGTGGGAGGCTGAGACACGGAGTGCATCTACTACAA  
 CGCCAACCTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC  
 GAAGGCAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTGGCCAACA  
 GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT  
 CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG  
 GTGTACTCTGCTGTGAAGGCAACTCTGCAACGAGCGCTTCACTC  
 ATTGCCAGAGGCTGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC  
 AGCCCCCACCTGCTCACGGTGTGGCTACTCACTGCTGCCATCGG  
 GGCCTTCCTCATCGCCTGCTGGCTTTGGATGTACCGGCATCGCA  
 AGCCCCCTACGGTATGTGGACATCCATGAGGACCTGGCCTCCACC  
 ACCATCCCCCTGGTGGGCCTGAAGGCCACTGCAGCTGGAGATCAAG  
 GCTCGGGGGCGCTTGGCTGTCTGGAGGCCAGCTCATGAATGACT  
 TTGTAGCTGTCAGATCTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG  
 TGAACGGAGATCTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA  
 CAGTCATTGCTGCCAGAGCGAGGCTCAACCTCGAAGTAGAGCTGT  
 GGCTCATCACGGCCTTCATGACAAGGGCTCCACGGATTACCTCAA  
 GGGAACATCATCACATGGAACGAACGTGTGATGTAGCAGAGACGATG  
 TCACGAGGCCTCTCACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGGCG  
 AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTAAAGTAAGAATGT  
 ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTGGCTGGCT  
 GTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGACACCCACGGACAGGTAG  
 GCACGAGACGGTACATGGCTCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT  
 CCAGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGTTGGT  
 CTGGAGGCTTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG  
 AGTACATGCTGCCCTTGAGGAAGAGATTGCCAGCACCCCTCGTTGGA  
 GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTCACAAGAAGATGAGGCCACCATTA  
 GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCAGCTTGTGACCATCG  
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTGTCCGGCTGTGT  
 GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCG  
 GACTGTCTCGTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCC  
 CTAAAGAGTCAGCATCTAA (서열 번호: 4)

[0071]

[0072]

인간 ActRIIB 가용성 (세포외) 폴리펩티드을 인코드하는 핵산 서열은 다음과 같다(위치 64에 알라닌을 제공하는 서열, 그리고 대신 아르기닌이 제공되도록 변형될 수 있다):

GGCGTGCGGAGGCTGAGACACGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT  
 GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGC  
 GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTGGGCCAACAGCTCTGGC  
 ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT  
 ACGATAGGCAGGAGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT  
 CTGCTGCTGTGAAGGCAACTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCA  
 GAGGCTGGGGCCCGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCA

CC (서열 번호: 5)

[0073]

특정 구체예에서, 본 발명은 가용성 ActRIIB 폴리펩티드들의 변이체 형태인 GDF 트랩 폴리펩티드에 관계된다. 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 용어 "가용성 ActRIIB 폴리펩티드"는 일반적으로 ActRIIB 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 폴리펩티드들을 지칭한다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "가용성 ActRIIB 폴리펩티드"는 ActRIIB 단백질의 임의의 자연적으로 발생되는 폴리펩티드와 유용한 활성을 유지하는 임의의 변이체들(돌연변이, 단편들, 융합, 그리고 웨티도모방체 형태들을 포함)을 포함하는 폴리펩티드들을 포함한다. 예를 들면, ActRIIB 단백질의 세포외 도메인은 리간드에 결합하고, 일반적으로 가용성이다. 가용성 ActRIIB 폴리펩티드들의 예는 ActRIIB 가용성 폴리펩티드들 (가령, 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 및 41)을 포함한다. 가용성 ActRIIB 폴리펩티드들의 다른 예들은 ActRIIB 단백질의 세포외 도메인에 추가하여 신호 서열을 포함한다, 실시예 1 참고. 신호 서열은 ActRIIB 고유의 신호 서열, 또는 다른 단백질의 신호 서열, 이를 테면, 조직 플라스미노겐 활성물질 (TPA) 신호 서열 또는 벌꿀 멜리틴 (HBM) 신호 서열일 수 있다.

[0075]

본 발명은 ActRIIB의 기능적으로 활성 부분들 및 ActRIIB의 변이체들을 확인한다. 출원인은 Hilden et al. (Blood. 1994 Apr 15;83(8):2163-70)에 의해 공개된 서열 번호: 1의 아미노산 64에 대응하는 위치에 알라닌을 가지는 (A64) 서열을 보유하는 Fc 융합 단백질은 액티빈 및 GDF-11에 대해 상대적으로 낮은 친화력을 보유하는 것을 확인하였다. 대조적으로 위치 64에 아르기닌을 가진(R64)을 가진 동일 Fc 융합 단백질은 액티빈 및 GDF-11에 대하여 낮은 나노몰 내지 높은 피코몰 범위의 친화력을 보유한다. 따라서, R64을 가진 서열은 본 명세서에서 인간 ActRIIB에 대한 야생형 참고 서열로 이용된다.

[0076]

Attisano et al. (Cell. 1992 Jan 10;68(1):97-108)는 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단 프롤린 노트의 결손으로 액티빈에 대한 수용체 친화력이 감소되었음을 보여주었다. 서열 번호: 1의 아미노산 20-119를 함유하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질, "ActRIIB(20-119)-Fc"는 프롤린 노트 영역과 온전한 막근접(juxtamembrane) 도메인을 포함하는 ActRIIB(20-134)-Fc과 비교하여 GDF-11 및 액티빈에 대해 감소된 결합을 가진다. 그러나, ActRIIB(20-129)-Fc 단백질은 프롤린 노트 영역이 파괴되었지만, 야생형과 비교하여 유사한 그러나 어느정도 감소된 활성을 보유한다. 따라서, 아미노산 134, 133, 132, 131, 130 및 129에서 중단되는 ActRIIB 세포외 도메인들은 모두 활성이 있는 것으로 예상되지만, 134 또는 133에서 중단되는 구조체들은 대부분 활성이 있을 수 있다. 유사하게, 잔기 129-134 중 임의의 것에서 돌연변이는 많은 차이에 의해 리간드 결합 친화력을 변경시키지 않는 것으로 예상된다. 이를 뒷받침하는 것으로 P129 및 P130 돌연변이는 실질적으로 리간드 결합을 감소시키지 않는다. 따라서, ActRIIB-Fc 융합 단백질인 GDF 트랩 폴리펩티드는 아미노산 109 (최종 시스테인)와 같이 조기에 종료될 수 있지만, 그러나, 109 내지 119에서 또는 이 사이에서 끝나는 형태는 감소된 리간드 결합을 보유하는 것으로 예상된다. 아미노산 119는 보존이 부진하며, 용이하게 변경된 또는 절두된다. 128 또는 그 이후에 종료되는 형태들은 리간드 결합 활성을 유지한다. 119 내지 127에서 종료 또는 그 사이에서 종료되는 형태는 중단정도의 결합 능력을 보유할 것이다. 이들중 임의의 형태들은 임상 또는 실험 환경에 따라 사용되는 것이 바람직할 수 있다.

[0077]

ActRIIB의 N-말단에서, 아미노산 29 또는 이 앞에서 시작되는 단백질은 리간드 결합 활성을 유지할 것으로 예상된다. 아미노산 29는 시작 시스테인을 나타낸다. 위치 24에서 알라닌이 아스파라긴으로 돌연변이는 실질적으로 리간드 결합에 영향을 주지 않고, N-연계된 당화 서열을 도입시킨다. 이 사실은 아미노산 20-29에 상응하는, 신호 절단 웨티드와 시스테인 교차-연계된 영역 사이의 영역에서 돌연변이 또한 용인된다는 것을 확인한다. 구체적으로, 위치 20, 21, 22, 23 및 24에서 시작되는 구조체들은 활성을 유지할 것이고, 그리고 위치

25, 26, 27, 28 및 29에서 시작되는 구조체들 또한 활성을 유지하는 것으로 예상된다. 실시예들에서 나타난 데 어터들은 놀랍게도 22, 23, 24 또는 25에서 시작되는 구조체가 최고 활성을 가질 것이라는 것을 설명한다.

[0078] 이와 함께, ActRIIB의 활성 부분은 서열 번호: 1의 서열 번호: 1의 아미노산 29-109를 포함하고, 그리고 GDF 트랩 구조체들은 예를 들면, 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 20-29에 상응하는 잔기에서 시작되고, 그리고 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 109-134에 상응하는 위치에서 종료되는 ActRIIB 부분을 포함할 수 있다. 기타 예로는 서열 번호: 1 또는 39의 20-29 또는 21-29에서 시작되고, 그리고 서열 번호: 1 또는 39의 119-134, 119-133, 129-134, 또는 129-133의 위치에서 종료되는 구조체들을 포함한다. 다른 예들은 서열 번호: 1 또는 39의 20-24 (또는 21-24, 또는 22-25)에서 시작되고, 그리고 서열 번호: 1 또는 39의 위치 109-134 (또는 109-133), 119-134 (또는 119133) 또는 129-134 (또는 129-133)에서 종료되는 구조체들을 포함한다. 이 범위 안에 변이체들 또한 고려되는데, 서열 번호: 1 또는 39의 상응하는 부분에 대해 최소한 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 가진 것들이 고려된다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 잔기 25-131에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드를 포함하는, 이 폴리펩티드로 구성된, 또는 기본적으로 구성된다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 7, 26, 28, 29, 32, 37 또는 38에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드를 포함하는, 이 폴리펩티드로 구성된, 또는 기본적으로 구성된다. 바람직한 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 7, 26, 28, 29, 32, 37 또는 38의 아미노산 서열로 구성된 또는 기본적으로 구성된다.

[0079] 본 발명은 리간드 결합 포켓은 잔기 Y31, N33, N35, L38 내지 T41, E47, E50, Q53 내지 K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 내지 N83, Y85, R87, A92, 그리고 E94 내지 F101에 의해 한정된다는 것을 설명하는, 도 1에서 나타낸 것과 같이 조성 복합 ActRIIB 구조들의 분석 결과를 포함한다. 이들 위치에서, R40A, K55A, F82A와 위치 L79에서 돌연변이들과 같이, K74A 돌연변이가 잘 용인되기는 하지만, 보존성 돌연변이들도 용인될 것으로 예상된다. R40은 발톱개구리속 개구리(Xenopus)에서 K인데, 이 위치의 염기성 아미노산이 용인됨을 나타낸다. Q53는 소의 ActRIIB에서 R이며, 그리고 발톱개구리속 개구리 ActRIIB에서 K이고, 따라서 R, K, Q, N 및 H를 포함하는 아미노산은 이 위치에서 용인될 것이다. 따라서, GDF 트랩 단백질의 일반적인 공식은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 29-109를 포함하지만, 임의선택적으로 20-24 또는 22-25 범위의 위치에서 시작되고, 129-134 범위의 위치에서 종료되며, 그리고 리간드 결합 포켓 안에 1, 2, 5, 10 또는 15개의 연속 아미노산 변화를 포함하고, 그리고 리간드 결합 포켓 안에 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에서 0, 1 또는 그 이상의 비-보존적 변경을 포함하는 것이다. 이러한 단백질은 서열 번호: 1 또는 39의 아미노산 29-109 서열에 80%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 유지할 수 있다. 다양성이 특히 잘 용인될 수 있는 위치인 결합 포켓 바깥 부위는 세포외 도메인 (상기에서 표시된)의 아미노 및 카르복시 말단, 그리고 위치 42-46 및 65-73을 포함한다. 위치 65에서 아스파라긴이 알라닌으로의 변화(N65A)는 실질적으로 A64 배경에서 리간드 결합을 개선시키고, 따라서, R64 배경에서 리간드 결합에 결정적인 영향을 가지지 않는 것으로 예상된다. 이러한 변화는 아마도 A64 배경에서 N65에서 당화를 제거하고, 따라서 이 영역에서 상당한 변화는 용인될 가능성이 있음을 설명한다. R64A 변화는 용인이 부진한 반면, R64K는 잘 용인되고, 따라서 또다른 염기성 잔기, 이를 테면, H는 위치 64에서 용인될 것이다.

[0080] ActRIIB는 거의 모든 척추동물에서 잘 보존되는데, 완벽하게 보존된 큰 띠(stretches)의 세포외 도메인을 가진다. ActRIIB에 결합하는 많은 리간드 또한 잘 보존된다. 따라서, 다양한 척추동물 유기체의 ActRIIB 서열과의 비교는 변경될 수 있는 잔기에 대한 식견을 제공한다. 따라서, GDF 트랩으로 유용한 활성이 있는, 인간 ActRIIB 변이체 폴리펩티드는 또다른 척추동물 ActRIIB의 서열에서 상응하는 위치에 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있고, 또는 인간 또는 다른 척추동물 서열의 것과 유사한 잔기를 포함할 수 있다. 다음의 예들은 이 방법을 이 활성 ActRIIB 변이체를 특정짓는 것을 설명한다. L46는 발톱개구리속 개구리 ActRIIB에서 발린이고, 따라서 이 위치는 변경될 수 있고, 임의선택적으로 또다른 소수성 잔기, 이를 테면, V, I 또는 F, 또는 비-극성 잔기 이를 테면, A로 변경될 수 있다. E52는 발톱개구리속 개구리에서 K이며, 이는 이 부위가 극성 잔기, 이를 테면, E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y 그리고 아마도 A를 포함하는 매우 다양한 변화에 내성이 있음을 나타낸다. T93은 발톱개구리속 개구리에서 K이며, 유리한 극성 잔기, 이를 테면, S, K, R, E, D, H, G, P, G 및 Y와 함께 광범위한 구조적 변이가 이 위치에서 용인됨을 나타낸다. F108은 발톱개구리속 개구리에서 Y이며, 따라서 Y 또는 기타 소수성 기, 이를 테면, I, V 또는 L도 용인되어야 한다. E111은 발톱개구리속 개구리에서 K이며, 이 위치에서 D, R, K 및 H, 뿐만 아니라 Q 및 N을 포함하는 하전된 잔기는 이 위치에서 용인됨을 나타낸다. R112는 발톱개구리속 개구리에서 K이며, R 및 H을 포함하는 염기성 잔기는 이 위치에서 용인됨을 나타낸다. 위치 119에서 A는 상대적으로 보존이 부진하고, 이는 설치류에서는 P 그리고 발톱개구리속 개구리에서

는 V로 나타나고, 따라서 기존적으로 이 위치에서 임의의 아미노산이 용인되어야 한다.

[0081] 본 발명에서 N-연계된 당화 부위 (NXS/T)의 추가는 ActRIIB(R64)-Fc 형태와 비교하여 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 증가시킨다는 것이 설명된다. 위치 24에 아스파라гин을 도입함으로써 (A24N 구조체), 더 긴 반감기를 부여할 수 있는 NXT 서열이 만들어진다. 기타 NX(T/S) 서열들이 42-44 (NQS) 및 65-67 (NSS)에서 발견되지만, 후자는 위치 64에서 R로 효과적으로 당화될 것 같지는 않다. N-X-S/T 서열들은 도 1에서 특정된 리간드 결합 포켓 바깥 위치들로 일반적으로 도입될 수 있다. 비-내생성 N-X-S/T 서열들의 도입에 특별히 적합한 부위는 아미노산 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 또는 129-134를 포함한다. N-X-S/T 서열들은 ActRIIB 서열과 Fc 또는 다른 융합 성분 사이에 링커 안으로 도입될 수 도 있다. 이러한 부위는 기준 S 또는 T에 대해 정확한 위치에 N을 도입시킴으로써, 또는 기준 N에 상응하는 위치에 S 또는 T를 도입시킴으로써 최소한의 노력으로 도입될 수 있다. 따라서, N-연계된 당화 부위를 만들 수 있는 바람직한 변경은 다음과 같다: A24N, R64N, S67N (N65A 변경과 복합이 있을 수 있음), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S 및 R112T. 당화되는 것으로 예측되는 임의의 S는 당화에 의한 보호로 인하여 면역원성 부위를 만들지 않고 T로 변경될 수 있다. 유사하게, 당화되는 것으로 예측되는 임의의 T는 S로 변경될 수 있다. 따라서 변경 S67T 및 S44T가 고려된다. 유사하게, A24N 변이체에서, S26T 변경이 이용될 수 있다. 따라서, GDF 트랩은 하나 또는 그 이상의 추가적인, 비-내생성 N-연계된 당화 콘센스 서열들을 보유하는 ActRIIB 변이체일 수 있다.

[0082] ActRIIB의 위치 L79는 변경된 액티빈 - 미오스타틴 (GDF-11) 결합 성질을 부여하도록 변경될 수 있다. L79P는 액티빈 결합보다 더 큰 수준으로 GDF-11 결합을 감소시킨다. L79E 또는 L79D는 GDF-11 결합을 유지한다. 특히, L79E 및 L79D 변이체들은 감소된 액티빈 결합이 상당히 감소된다. 생체내 실험에서 이들 비-액티빈 수용체는 붉은 혈액 세포들을 증가시키는 중요한 능력은 유지하지만, 다른 조직에 대한 영향은 감소됨이 나타난다. 이들 데이터는 액티빈에 대한 영향이 감소된 폴리펩티드들의 획득에 대한 바람직함 및 가능성을 설명한다. 예시적인 구체예들에서, 본 명세서에서 설명된 방법들은 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가적인 아미노산 치환, 추가, 또는 결손과 복합되어 서열 번호: 1 또는 39의 위치 79에 상응하는 위치에 산성 아미노산(가령, D 또는 E)을 포함하는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드인 GDF 트랩 폴리펩티드를 이용한다.

[0083] 설명된 변이들은 다양한 방식으로 조합될 수 있다. 추가적으로, 본 명세서에서 설명된 돌연변이생성 프로그램 결과에서 ActRIIB 안에 보존이 유익한 아미노산 위치들의 존재가 나타난다. 이것들은 위치 64 (염기성 아미노산), 위치 80 (산성 또는 소수성 아미노산), 위치 78 (소수성, 그리고 구체적으로 트립토판), 위치 37 (산성, 그리고 구체적으로 아스파르트산 또는 글루타민산), 위치 56 (염기성아미노산), 위치 60 (소수성 아미노산, 구체적으로 페닐알라닌 또는 티로신)을 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 설명된 각 변이체에서, 본 발명은 보존될 수 있는 아미노산 골격(framework)을 제공한다. 보존되는 것이 바람직할 수 있는 기타 위치들은 다음과 같다: 위치 52 (산성 아미노산), 위치 55 (염기성아미노산), 위치 81 (산성), 98 (극성 또는 하전된, 구체적으로 E, D, R 또는 K).

[0084] 특정 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드들의 단리된 단편들은 ActRIIB 폴리펩티드를 인코드하는 핵산 (가령, 서열 번호: 4 및 5)의 상응하는 단편으로부터 재조합적으로 생산된 폴리펩티드들을 선별함으로써 획득될 수 있다. 추가적으로, 단편들은 이를 테면, 통상적인 Merrifield 고형 상 f-Moc 또는 t-Boc 화학을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 단편들은 (재조합으로 또는 화학 합성에 의해) 생산되고, 그리고 기능을 할 수 있는, 예를 들면, ActRIIB 단백질 또는 ActRIIB 리간드의 길항제 (저해제) 또는 항진제 (활성물질)로 기능을 할 수 있는 이들 웹티드 단편들을 식별하기 위하여 테스트될 수 있다.

[0085] 특정 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 또는 41로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 75% 동일한 아미노산 서열을 가진 변이체 ActRIIB 폴리펩티드이다. 특정 경우들에서, GDF 트랩은 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 또는 41로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩은 서열 번호: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 또는 41로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이 서열로 기본적으로 구성되거나, 또는 구성되며, 여기에서 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치는 산성 아미노산 (가령, D 또는 E 아미노산 잔기)이다.

[0086] 특정 구체예들에서, 본 발명은 치료 효과, 또는 안정성 (가령, 탈체 반감기 및 생체내 단백질분해성 분해에 대한 저항성)을 강화시키는 이러한 목적을 위하여 GDF 트랩 폴리펩티드의 구조를 변경시킴으로써 기능적 변이체들을 만드는 것을 고려한다. GDF 트랩 폴리펩티드들은 아미노산 치환, 결손, 또는 추가에 의해 또한 생성될 수

있다. 예를 들면, 류신을 이소류신 또는 발린으로 별도 대체, 아스파르테이트를 글루타메이트로, 트레오닌을 세린으로, 또는 한 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 유사 대체 (가령, 보존적 돌연변이)는 생성 분자의 생물학적 활성에 큰 영향을 가지지 않을 것이라고 예상되는 것이 합당하다. 보존적 대체는 이들의 측쇄와 연관된 아미노산 패밀리 안에서 일어난다. 변형안된 GDF 트랩 폴리펩티드 또는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하여 세포들에서 반응을 생산하는 GDF 트랩 폴리펩티드의 능력, 또는 변형안된 GDF 트랩 폴리펩티드 또는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하여, 하나 또는 그 이상의 리간드들, 이를 테면, 액티빈, GDF-11 또는 미오스타틴에 결합하는 GDF 트랩 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써, GDF 트랩 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화가 기능적 변이체를 야기하는지를 용이하게 결정할 수 있다.

[0087] 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIB 폴리펩티드가 변경된 리간드-결합 활성 (가령, 결합 친화력 또는 결합 특이성)을 보유하도록, ActRIIB 폴리펩티드의 세포외 도메인 (리간드-결합 도메인이라고도 함) 안에 돌연변이를 만드는 것을 고려한다. 특정 경우들에서, 이러한 GDF 트랩 폴리펩티드들은 특이적 리간드에 대하여 변경된 (상승된 또는 감소된) 결합 친화력을 보유한다. 다른 경우들에서, GDF 트랩 폴리펩티드들은 ActRIIB 리간드에 대하여 변경된 결합 특이성을 가진다.

[0088] 예를 들면, 본 발명은 액티빈과 비교하여 GDF8/GDF11에 선호적으로 결합하는 GDF 트랩 폴리펩티드들을 제공한다. 본 발명은 붉은 혈액 세포 수준의 매우 큰 증가가 치료 효과에 필요하고, 그리고 어느 정도의 탈-표적 효과 (off-target effect)가 수용가능한 심각한 질환의 치료에 다소 덜 바람직할 수 있지만, 이러한 폴리펩티드들의 탈표적 효과 영향을 감소시키는 바람직함을 추가 확립한다. 예를 들면, ActRIIB 단백질의 아미노산 잔기, 이를 테면, E39, K55, Y60, K74, W78, D80, 및 F101은 리간드-결합 포켓 안에 있고, 그리고 이들의 리간드 이를 테면, 액티빈 및 GDF8에 결합하는 것을 중재한다. 따라서, 본 발명은 ActRIIB 수용체의 변경된 리간드-결합 도메인을 포함하는 GDF 트랩 (가령, GDF8-결합 도메인)을 제공하는데, 이들은 이를 아미노산 잔기에 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함한다. 임의선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 ActRIIB 수용체의 야생형 리간드-결합 도메인과 비교하여 리간드 이를 테면, GDF8에 대하여 증가된 선택성을 가질 수 있다. 설명하자면, 이들 돌연변이는 액티빈보다 GDF8에 대해 변경된 리간드-결합 도메인의 선택성을 증가시킨다. 임의선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 GDF8 결합에 대한  $K_d$ 에 비교하여 액티빈 결합에 대한  $K_d$  비율이 야생형 리간드-결합 도메인에 대한 비율과 비교하여, 최소한 2, 5, 10, 또는 십지어 100배 이상 더 크다. 임의선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 GDF8를 억제하는  $IC_{50}$ 에 대하여 액티빈을 억제하는  $IC_{50}$ 의 비율이 야생형 리간드-결합 도메인과 비교하여 최소한 2, 5, 10, 또는 십지어 100배 이상 더 크다. 임의선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 액티빈을 억제하는  $IC_{50}$ 보다 최소한 2, 5, 10, 또는 십지어 100배 더 적은  $IC_{50}$ 으로 GDF8을 저해한다.

[0089] 특이적 실시예로써, ActRIIB의 리간드-결합 도메인의 양하전된 아미노산 잔기 Asp (D80)는 GDF8에 선호적으로 결합하지만, 액티빈에는 결합하지 않는 GDF 트랩 폴리펩티드를 생산하기 위하여 상이한 아미노산 잔기로 돌연변이될 수 있다. 바람직하게는, D80은 다음으로 구성된 집단으로부터 선택된 아미노산 잔기로 변화된다: 하전안된 아미노산 잔기, 음성 아미노산 잔기, 그리고 소수성 아미노산 잔기. 추가 특이적 실시예로써, 소수성 잔기, L79는 액티빈 결합을 상당히 감소시키지만, 반면 GDF11 결합은 유지될 수 있도록 산성 아미노산 아스파르트산 또는 글루타민산으로 변경될 수 있다. 당분야의 당업자가 인지할 수 있는 바와 같이, 설명된 돌연변이, 변이체 또는 변형의 대부분은 핵산 수준에서 만들어질 수 있고, 또는 일부 경우에서 해독후 변형에 의해 또는 화학 합성에 의해 만들어질 수 있다. . 이러한 기술은 당분야에 공지되어 있다.

[0090] 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIB 폴리펩티드의 당화를 변경시키기 위하여 ActRIIB에서 특정 돌연변이를 가지는 GDF 트랩 폴리펩티드를 고려한다. GDF 트랩 폴리펩티드들에서 예시적인 당화 부위는 도 1 (가령, 밀줄 NX(S/T) 부위)에서 설명된다. 이러한 돌연변이는 하나 또는 그 이상의 당화 부위, 이를 테면, O-연계된 또는 N-연계된 당화 부위를 도입 또는 제거하기 위하여 선택될 수 있다. 아스파라긴-연계된 당화 인지 부위는 적절한 세포 당화 효소에 의해 특이적으로 인지되는 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 (이때 "X"는 임의의 아미노산임)을 일반적으로 포함한다. 이 변경은 야생형 ActRIIB 폴리펩티드의 서열 (O-연계된 당화 부위를 위한)에 하나 또는 그 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 추가 또는 치환에 의해 또한 만들어질 수 있다. 당화 인지 부위의 첫 번째 또는 세 번째 아미노산 위치중 하나 또는 이 둘 모두에서 다양한 아미노산 치환 또는 결손 (및/또는 두 번째 위치에서 아미노산 결손)은 변형된 트리펩티드 서열에서 비-당화를 초래한다. GDF 트랩 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티 수를 증가시키는 또다른 수단은 GDF 트랩 폴리펩티드에 글리코시드를 화학 또는 효소적으로 커플링시키는 것이다. 이용된 커플링 방식에 따라, 당(들)이 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 유

리(free) 카르복실기들; (c) 유리 설프히드릴 기 이를 테면, 시스테인의 기들; (d) 유리 히드록실 기들 이를 테면, 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린의 기들; (e) 방향족 잔기 이를 테면, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 기들; 또는 (f) 글루타민의 아민 기에 부착될 수 있다. 이를 방법은 WO 87/05330 및 Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306에서 설명되며, 이는 전문이 명세서의 참고자료에 편입된다. GDF 트랩 폴리펩티드에 존재하는 하나 또는 그 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 화학적으로 이루어질 수 있다. 화학 탈당화는 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드를 화합물 트리플루오로메탄술폰산, 또는 등가의 화합물에 노출시키는 것과 관련된다. 이러한 처리는 연결당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 모든 또는 대부분의 당을 절단시키지만, 아미노산 서열은 그대로 남겨둔다. 화학적 탈당화는 Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 및 Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131에 의해 더 설명된다. GDF 트랩 폴리펩티드들상에서 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350에서 설명된 것과 같이 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 이루어질 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드의 서열은 이용되는 발현계의 유형에 따라 적절하게 조정될 수 있는데, 포유류, 효모, 곤충 및 식물 세포들은 모두 웨პ티드의 아미노산 서열에 영향을 받을 수 있는 상이한 당화 패턴을 도입시킬 수 있기 때문이다. 일반적으로, 인간에서 사용하기 위한 GDF 트랩 폴리펩티드들은 비록 다른 포유류 발현 세포 계통도 또한 이용될 수 있을 것으로 예상되지만, 적절한 당화를 제공하는 포유류 세포 계통, 이를 테면, HEK293 또는 CHO 세포 계통에서 발현될 것이다.

[0091]

본 명세서는 변이체, 구체적으로 임의선택적으로, 절두 변이체들을 포함하는 GDF 트랩 폴리펩티드의 복합 변이체들의 세트를 만드는 방법을 더 고려하는데; 복합 돌연변이들의 모둠은 GDF 트랩 서열들을 식별하는데 특히 유용하다. 이러한 복합 라이브러리를 스크리닝하는 목적은 예를 들면, 변경된 성질, 이를 테면, 변경된 약물동력학, 또는 변경된 리간드 결합을 가지는 GDF 트랩 폴리펩티드 변이체를 만들기 위함일 수 있다. 다양한 스크리닝 분석이 하기에 제공되는데, 이를 테면, 이러한 분석은 변이체들을 평가하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드 변이체는 ActRIIB 폴리펩티드에 결합하는 능력, ActRIIB 리간드가 ActRIIB 폴리펩티드에 결합을 방해하는 능력 또는 ActRIIB 리간드에 의해 유발되는 신호생성을 간섭하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0092]

GDF 트랩 폴리펩티드 또는 이의 변이체들의 활성은 세포-기반 또는 생체내 분석에서 또한 테스트될 수 있다. 예를 들면, 혈액생성과 관련된 유전자의 발현에서 GDF 트랩 폴리펩티드의 효과가 평가될 수 있다. 필요에 따라 이는 하나 또는 그 이상의 재조합 ActRIIB 리간드 단백질들 (가령, 액티빈) 존재하에 실행될 수 있고, 세포들은 GDF 트랩 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체들, 그리고 임의선택적으로, ActRIIB 리간드를 만들기 위하여 형질감염될 수 있다. 유사하게, GDF 트랩 폴리펩티드는 마우스 또는 다른 동물에게 투여될 수 있고, 그리고 당업계에서 인지되는 방법들이 이용되어 하나 또는 그 이상의 혈액 측정, 이를 테면, RBC 카운트, 혈모글로빈 수준, 혈마토크리트 수준, 철 저장, 또는 망상적혈구 카운트가 측정될 수 있다.

[0093]

조합적으로-유도된 변이체들은 참조 GDF 트랩 폴리펩티드에 비교하여 선택적 능력을 가지도록 만들어질 수 있다. 재조합 DNA 구조체들로부터 발현될 때, 이러한 변이체 단백질들이 유전자 치료법 프로토콜에 이용될 수 있다. 유사하게, 돌연변이생성은 대응하는 변형안된 GDF 트랩 폴리펩티드보다 상당히 상이한 세포내 반감기를 가지는 변이체를 야기시킬 수 있다. 예를 들면, 변경된 단백질은 단백질분해성 분해에 대해 더 안정적인 또는 덜 안정적일 수 있거나 또는 변형안된 GDF 트랩 폴리펩티드의 파괴, 또는 그렇지 않으면 비활성화를 야기하는 다른 과정에 대해 더 안정적이거나 또는 덜 안정적일 수 있다. 이러한 변이체들, 그리고 이들을 인코드하는 유전자는 GDF 트랩 폴리펩티드들의 반감기를 조정함으로써 GDF 트랩 폴리펩티드 수준을 변경시키는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 짧은 반감기는 더욱 일과적인 생물학적 영향을 일으킬 수 있고, 그리고 유도가능한 발현 시스템의 일부인 경우 이 세포 안에서 재조합 GDF 트랩 폴리펩티드 수준을 좀더 긴밀하게 조절할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 돌연변이들은 링커 (있다면) 및/또는 Fc 부분에서 만들어져, 이 단백질의 반감기를 변경시킬 수 있다.

[0094]

특정 구체예들에서, 본 발명의 GDF 트랩 폴리펩티드들은 ActRIIB 폴리펩티드들에 원래 존재하는 임의의 것에 추가하여 해독후 변형을 더 포함할 수 있다. 이러한 변화는 아세틸화, 카르복실화, 당화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그 결과, GDF 트랩 폴리펩티드들은 비-아미노산 성분들, 이를 테면, 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 폴리- 또는 모노-사카라이드, 및 인산염을 포함할 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드의 기능에서 이러한 비-아미노산 성분들의 효과는 다른 GDF 트랩 폴리펩티드 변이체들에 대하여 본 명세서에서 설명된 것과 같이 테스트될 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드가 GDF 트랩 폴리펩티드의 초기 형태를 절단함으로써 세포에서 생성될 때, 이 단백질의 정확한 폴딩 및/또는 기능을 위하여 해독후 프로세싱이 또한 중요할 수 있다.

상이한 세포들 (이를 테면, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이러한 해독후 활성에 대하여 특이적 세포 기전 및 특징적인 기준을 보유하고, 그리고 GDF 트랩 폴리펩티드들의 정확한 변형 및 프로세싱을 확보하기 위하여 선택될 수 있다.

[0095]

특정 측면들에서, GDF 트랩 폴리펩티드들은 ActRIIB 폴리펩티드의 최소한 한 부분을 포함하는 융합 단백질들 및 하나 또는 그 이상의 융합 도메인들을 포함한다. 이러한 융합 도메인들의 잘 알려진 예로는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S 트란스퍼라제(GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 (가령, Fc), 말토즈 결합 단백질 (MBP), 또는 인간 혈청 알부민을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 성질을 부여하기 위하여 선택될 수 있다. 예를 들면, 일부 융합 도메인들은 친화력 크로마토그래피에 의하여 융합 단백질들을 단리시키는데 특히 유용하다. 친화력 정제를 목적으로, 친화력 크로마토그래피를 위한 관련 매트릭스, 이를 테면, 글루타티온-, 아밀라제-, 그리고 니켈- 또는 코발트-접합된 수지가 이용된다. 이러한 매트릭스중 많은 것들이 "키트" 형태에서 이용되는데, 이를 테면, (HIS6) 융합 파트너와 이용가능한 *Pharmacia GST* 정제 시스템 및 *QIAexpress*™ 시스템 (Qiagen). 또 다른 실시예로써, GDF 트랩 폴리펩티드들의 탐지를 용이하게 하기 위하여 융합 도메인이 선택될 수 있다. 이러한 탐지 도메인들의 예로는 다양한 형광 단백질들 (가령, GFP) 뿐만 아니라 "특이적 항체가 이용가능한 통상적으로 짧은 웹티드 서열인 에피토프 테그"를 포함한다. 특이적 단클론 항체들이 바로 이용가능한 잘 알려진 에피토프 테그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루터닌(HA), 및 c-myc 테그들을 포함한다. 일부 경우들에서, 융합 도메인들은 이를 테면, 인자 Xa 또는 트롬빈(Thrombin)에 대한 프로테아제 절단 부위를 보유하여, 관련 프로테아제가 융합 단백질들을 부분적으로 절단하도록 허용하고, 이로 인하여, 이로부터 재조합 단백질들이 해방된다. 해방된 단백질들은 후속 크로마토그래피 분리에 의해 융합 도메인으로부터 단리될 수 있다. 특정 바람직한 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 생체 내에서 GDF 트랩 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인 "안정화" 도메인과 융합된다. "안정화시킨다"는 것은 그 이유가 파괴의 감소, 신장에 의한 제거의 감소, 또는 다른 약역학적 영향으로 인한 것이던 간에 관계없이 혈청 반감기를 증가시키는 임의의 것을 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 단백질에서 바람직한 약역학 성질을 부여하는 것으로 알려져있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 융합도 바람직한 성질을 부여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 유형의 융합 도메인들은 다중결합 (가령, 이합체화, 사합체화) 도메인 및 기능적 도메인 (추가적인 생물학적 기능을 부여하는, 이를 테면, 붉은 혈액 세포 수준을 더 증가시키는)을 포함한다.

[0096]

특이적 예로써, 본 발명은 Fc 도메인에 융합된 ActRIIB 폴리펩티드의 세포외(가령, 리간드-결합) 도메인을 포함하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질인 GDF 트랩을 제공한다. 예시적인 Fc 도메인의 서열은 다음에 나타낸다(서열 번호: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDEPKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTIISKAK  
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDG  
PFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK\*

[0097]

임의선택적으로, Fc 도메인은 잔기 이를 테면, Asp-265, 리신 322, 및 Asn-434에서 하나 또는 그 이상의 돌연변 이를 가진다. 특정 경우들에서, 하나 또는 그 이상의 이를 돌연변이 (가령, Asp-265 돌연변이)를 가진 돌연변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 대한 결합 능력이 감소된다. 다른 경우들에서, 하나 또는 그 이상의 이를 돌연변이 (가령, Asn-434 돌연변이)를 가진 돌연변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC 종류 I-관련된 Fc-수용체 (FcRN)에 대한 결합 능력이 증가된다.

[0099]

융합 단백질들의 상이한 성분들은 원하는 기능과 일치되도록 임의의 방식으로 배열될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드는 이종기원의 도메인의 C-말단에 위치될 수 있고, 또는 대안으로 이종기원의 도메인은 GDF 트랩 폴리펩티드의 C-말단에 위치될 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드 도메인 및 이종기원의 도메인은 융합 단백질 안에서 인접해있을 필요는 없고, 그리고 추가적인 도메인 또는 아미노산 서열은 도메인의 C- 또는 N-말단 또는 도메인들 사이에 포함될 수 있다.

[0100]

특정 구체예들에서, GDF 트랩 융합 단백질은 공식 A-B-C의 형태로된 아미노산 서열을 포함한다. B 부분은 서열 번호: 26의 아미노산 26-132에 상응하는 아미노산 서열로 구성된 N- 및 C-말단 절두된 ActRIIB 폴리펩티드이다. A 및 C 부분은 독립적으로 0이거나, 하나 또는 그 이상의 아미노산일 수 있고, 그리고 A 및 C 부분이 모두 존재할 때, B에 대해 이종기원이다. A 및/또는 C 부분은 링커 서열을 통하여 B 부분에 부착될 수 있다. 예시적

인 링커들은 짧은 폴리펩티드 링커 이를 테면, 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 글리신 잔기, 이를 테면, 예를 들면, Gly-Gly-Gly 링커를 포함한다. 다른 적합한 링커들이 본 명세서에서 설명된다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 융합 단백질은 공식 A-B-C 형태의 아미노산 서열을 포함하는데, 여기에서 A는 리더 서열이고, B는 서열 번호:26의 아미노산 26-132로 구성되며, 그리고 C는 생체내 안정성, 생체내 반감기, 취입/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체들의 형성, 및/또는 정제중 하나 또는 그 이상을 강화시키는 폴리펩티드 부분이다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 융합 단백질은 공식 A-B-C로 제시되는 아미노산 서열을 포함하는데, 여기에서 A는 TPA 리더 서열이고, B는 서열 번호:26의 아미노산 26-132로 구성되며, 그리고 C는 면역글로불린 Fc 도메인이다. 선호되는 GDF 트랩 융합 단백질은 서열 번호: 26로 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0101] 특정 구체예들에서, 본 발명의 GDF 트랩 폴리펩티드들은 GDF 트랩 폴리펩티드들을 안정화시킬 수 있는 하나 또는 그 이상의 변형을 포함한다. 예를 들면, 이러한 변형은 GDF 트랩 폴리펩티드들의 시험관 반감기를 강화시키고, GDF 트랩 폴리펩티드들의 순환 반감기를 강화시키거나 또는 GDF 트랩 폴리펩티드들의 단백질분해성 분해를 감소시킨다. 이러한 안정화 변형은 융합 단백질들 (예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드 및 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함), 당화 부위의 변형(예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드에 당화 부위 추가를 포함), 그리고 탄수화물 모이어티의 변형 (예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거를 포함)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 융합 단백질들의 경우에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 안정화제 도메인 이를 테면, IgG 분자 (가령, Fc 도메인)에 융합된다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "안정화제 도메인"은 융합 단백질들의 경우에 융합 도메인(가령, Fc)를 지칭하고, 뿐만 아니라, 이를 테면, 탄수화물 모이어티와 같은 비-단백질 변형, 또는 이를 테면, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비-단백질성 중합체를 포함한다.

[0102] 특정 구체예들에서, 본 발명은 다른 단백질로부터 단리되거나, 그렇지 않으면 다른 단백질들이 실질적으로 없는, GDF 트랩 폴리펩티드들의 이용가능한 단리된 및/또는 정제된 형태를 만든다.

[0103] 특정 구체예들에서, 본 발명의 GDF 트랩 폴리펩티드들 (변형안된 또는 변형된)은 다양한 당분야에 공지된 기술에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들면, 이러한 GDF 트랩 폴리펩티드들은 표준 단백질 화학 기술 이를 테면, Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) and Grant G. A. (ed.), *Peptide Synthesis: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992)에서 설명된 것을 이용하여 합성될 수 있다. 추가적으로, 자동화된 펩티드 합성기가 상업적으로 이용가능하다(가령, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). 대안으로, GDF 트랩 폴리펩티드들, 이의 단편들 또는 변이체들은 당분야에 공지된 다양한 발현 시스템 (가령, 대장균, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, COS 세포, 베콜로바이러스)을 이용하여 재조합적으로 생산될 수 있다. 추가 구체예에서, 변형된 또는 변형안된 GDF 트랩 폴리펩티드들은 예를 들면, 프로테아제, 가령, 트립신, 터모리신, 크립토트립신, 펩신, 또는 쌍을 이룬 염기성아미노산 변형 효소 (PACE)를 이용하여 재조합적으로 만들어진 전장 GDF 트랩 폴리펩티드를 절단함으로써 만들어질 수 있다. 컴퓨터 분석 (시판되는 이용가능한 소프트웨어, 가령, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)이 단백질분해성 절단 부위를 식별하는데 이용될 수 있다. 대안으로, 이러한 GDF 트랩 폴리펩티드들은 당분야에 공지된 표준 기술, 이를 테면, 화학 절단 (가령, 시아노겐 브롬화불, 히드록실아민)을 이용하여 재조합적으로 생산된 전장 GDF 트랩 폴리펩티드들로부터 만들어질 수 있다.

### 3. GDF 트랩 폴리펩티드를 인코드하는 핵산들

[0105] 특정 측면들에서, 본 발명은 본 명세서에서 공개된 임의의 GDF 트랩 폴리펩티드들을 인코드하는 단리된 및/또는 재조합 핵산을 제공한다. 서열 번호: 4는 자연적으로 발생되는 ActRIIB 선구 폴리펩티드를 인코드하고, 서열 번호: 5는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드를 인코드하고, 그리고 서열 번호: 25, 27, 30 및 31은 가용성 GDF 트랩을 인코드한다. 대상 핵산은 단일-가닥으로 된 또는 이중 가닥으로될 수 있다. 이러한 핵산들은 DNA 또는 RNA 분자들일 수 있다. 이들 핵산은 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드들을 만드는 방법에 이용되거나 또는 직접적인 치료 물질들 (가령, 유전자 치료법)로 이용될 수 있다.

[0106] 특정 측면들에서, 대상 GDF 트랩 폴리펩티드를 인코드하는 핵산들은 서열 번호: 5, 25, 27, 30 및 31의 변이체인 핵산을 포함하는 것으로 더 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열들은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 치환, 추가 또는 결손에 의해 상이한 서열, 이를 테면, 대립유전자 변이체를 포함한다; 그리고 따라서, 서열 번호: 5, 25, 27, 30 및 31로 지정된 코딩 서열의 뉴클레오티드 서열과는 상이한 코딩 서열들을 포함할 것이다.

[0107] 특정 구체예들에서, 본 발명은 서열 번호: 5, 25, 27, 30 또는 31에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 단리된 또는 재조합 핵산 서열들을 제공한다. 당업자는 서열 번호: 5, 25, 27, 30 또는 31에 상보적인 핵산 서열, 그리고 서열 번호: 5, 25, 27, 30 또는 31의 변이체 또한 본 발명의 범위 안에 있음

을 인지할 것이다. 추가 구체예들에서, 본 발명의 핵산 서열들은 단리된, 재조합, 및/또는 이종기원의 뉴클레오티드 서열과 융합된, 또는 DNA 라이브러리 안에 있을 수 있다.

[0108] 다른 구체예들에서, 본 발명의 핵산들은 서열 번호: 5, 25, 27, 30 또는 31로 지정된 뉴클레오티드 서열, 서열 번호: 5, 25, 27, 30 또는 31의 보체 서열, 또는 이의 단편들에 매우 엄격한 조건하에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함한다. 상기에서 눈의된 바와 같이, 당업자는 DNA 혼성화를 촉진시키는 적절한 엄격한 조건들은 가변적일 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들면, 45°C에서 6.0 x 염화나트륨/구연산나트륨 (SSC)에서 혼성화, 이어서 50°C에서 2.0 x SSC에서 세척을 실행할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서 염 농도는 50°C에서 약 2.0 x SSC의 낮은 염격성에서, 50°C에서 약 0.2 x SSC의 높은 염격성으로부터 선택될 수 있다. 추가적으로, 세척 단계의 온도는 실온, 약 22 °C에서 낮은 염격성 조건으로부터 약 65°C의 높은 염격성 조건으로 증가될 수 있다. 온도 및 염은 모두 변화될 수 있거나, 또는 온도 또는 염 농도는 다른 변수가 변화되는 동안 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명은 실온에서 6 x SSC의 낮은 염격성 조건하에서 혼성화되고, 실온에서 2 x SSC에서 세척되는 핵산을 제공한다.

[0109] 유전자 코드의 축퇴로 인하여 서열 번호: 5, 25, 27, 30 또는 31에서 제시된 핵산과 상이한 단리된 핵산들 또한 본 발명의 범위 안에 있다. 예를 들면, 아미노산의 번호는 하나이상의 삼별 코드에 의해 지정된다. 동일한 아미노산, 또는 유의적 아미노산 (예를 들면, CAU와 CAC는 히스티딘에 대해 유의적임)을 명시하는 코돈으로 이 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 "침묵" 돌연변이가 초래된다. 특정 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 대체 뉴클레오티드 서열에 의해 인코드될 수 있다. 대체 뉴클레오티드 서열들은 고유의 GDF 트랩 핵산 서열에 대체 축퇴(degenerate)이지만, 동일한 융합 단백질을 여전히 인코드한다. 특정 구체예들에서, 서열 번호: 26을 보유하는 GDF 트랩은 서열 번호: 30을 포함하는 대체 핵산 서열에 의해 인코드된다. 그러나, 해당 단백질들의 아미노산 서열에서 변화로 이어지는 DNA 서열 다형성이 포유류 세포들 간에 존재하는 것으로 예측된다. 특정 단백질을 인코드하는 핵산에서 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 (뉴클레오티드의 최대 약 3-5%)는 천연 대립유전자 변이로 인하여 주어진 종의 개체들 사이에서 존재할 수 있음을 당업자는 인지할 것이다. 이러한 뉴클레오티드 변이중 임의의 그리고 모든 변이 및 결과로 생성되는 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 안에 있다.

[0110] 특정 구체예들에서, 본 발명의 재조합 핵산들은 발현 구조체 안에서 하나 또는 그 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하도록 연계될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열들은 발현에 이용되는 숙주 세포에 일반적으로 적합하다. 다양한 숙주 세포에 대하여 적합한 발현 벡터들과 적합한 조절 서열들의 다양한 유형들이 당분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 전술한 하나 또는 그 이상의 조절 뉴클레오티드 서열들은 프로모터 서열들, 리더 또는 신호 서열들, 리보좀 결합 부위, 전사 개시 및 종료 서열들, 해독 개시 및 종료 서열들, 그리고 인핸서 또는 활성물질 서열들을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 당분야에 공지된 구성 또는 유도가능한 프로모터들 또한 본 발명에서 고려된다. 프로모터들은 자연적으로 발생되는 프로모터, 또는 하나 이상의 프로모터 성분에 복합되는 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 구조체는 세포 안에 에피좀, 이를 테면, 플라스미드에 존재하거나, 또는 발현 구조체가 염색체 안에 삽입될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 발현 벡터는 형질변환된 숙주 세포의 선별을 가능하게 하는 선택성 지표 유전자를 함유한다. 선택성 지표 유전자들은 당분야에 공지되어 있고, 이용되는 숙주세포와 함께 변화될 것이다.

[0111] 본 발명의 특정 측면들에서, GDF 트랩 폴리펩티드를 인코드하고, 그리고 최소한 하나 조절 서열에 작동가능하도록 연계된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터에 대상 핵산이 제공된다. 조절 서열들은 당분야에 공지되어 있고, 그리고 GDF 트랩 폴리펩티드의 발현을 지시하기 위하여 선택된다. 따라서, 용어 조절 서열은 프로모터, 인핸서, 및 기타 발현 제어 성분들을 포함한다. 예시적인 조절 서열들은 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 설명된다. 예를 들면, DNA 서열의 발현을 조절하는 발현 조절 서열들이 DNA 서열에 작동가능하도록 연계되어 있을 때, 다양한 임의의 발현 조절 서열들은 이들 벡터에서 GDF 트랩 폴리펩티드를 인코드하는 DNA 서열을 발현시키기 위하여 이용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열들은 예를 들면, SV40의 초기 및 후기 프로모터들, tet 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터, RSV 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 RNA 중합체효소에 의해 발현이 지시되는 T7 프로모터, 람파 파아지의 주요 작동 및 프로모터 영역, fd 피복 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 기타 글리콜분해 효소의 프로모터, 산성 포스파타아제의 프로모터, 가령, Pho5, 효모  $\alpha$ -교배 인자들의 프로모터, 베클로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터 그리고 원핵 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 기타 서열등, 이의 다양한 조합들을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 형질변환되는 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되기 를 희망하는 단백질의 유형과 같은 인자들에 따라 달라질 수 있음을 인지해야 한다. 더욱이, 벡터의 복사체 수,

복사체 수를 조절하는 능력, 벡터에 의해 인코드되는 임의의 다른 단백질, 이를 테면, 항생제 지표들 또한 고려되어야 한다.

[0112] 본 발명의 재조합 핵산은 원핵 세포, 진핵 세포 (효모, 조류, 곤충 또는 포유류), 또는 이들 모두에서 발현에 적합한 벡터 안에 결찰시킴으로써 만들어 질 수 있다. 재조합 GDF 트랩 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 베이를은 플라스미드 및 기타 벡터들을 포함한다. 예를 들면, 적합한 벡터들은 플라스미드 유형을 포함한다: 원핵 세포, 이를 테면, 대장균(*E. coli*)에서 발현을 위한 pBR322-유도된 플라스미드, pEMBL-유도된 플라스미드, pEX-유도된 플라스미드, pBTac-유도된 플라스미드 그리고 pUC-유도된 플라스미드.

[0113] 일부 포유류 발현 벡터들은 박테리아 안에서 벡터를 증식시키기 위한 원핵생물 서열들과 진핵 세포 안에서 발현되는 하나 또는 그 이상의 진핵생물 전사 단위를 모두 포함한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유도된 벡터들은 진핵 세포의 형질감염에 적합한 포유류 발현 벡터들의 예들이다. 이들 벡터들의 일부는 세균성 플라스미드의 서열들, 이를 테면, pBR322로 변형되어, 원핵 및 진핵 세포들 모두에서 복제 및 약물 저항성 선별이 실행된다. 대안으로, 바이러스 이를 테면, 소의 유도종 바이러스(BPV-1), 또는 Epstein-Barr 바이러스 (pHEBo, pREP-유도된 그리고 p205)의 유도물질들은 진핵 세포 안에서 단백질의 일시적 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스 포함)의 발현 시스템들의 예는 유전자 치료제 운반 시스템의 설명에서 찾아볼 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 유기체의 형질변환에 이용되는 다양한 방법들은 당분야에 공지되어 있다. 진핵 및 원핵 세포에 대한 기타 적합한 발현 시스템들, 뿐만 아니라 일반적인 재조합 과정은 *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16 및 17을 참고로 한다. 일부 경우들에서, 베클로바이러스 발현 시스템의 이용에 의한 재조합 폴리펩티드들의 발현이 바람직할 수 있다. 베클로바이러스 발현 시스템의 예로는 pVL-유도된 벡터들 (이를 테면, pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도된 벡터들 (이를 테면, pAcUW1), 그리고 pBlueBac-유도된 벡터들 (이를 테면, -gal을 포함하는 pBlueBac III)을 포함한다.

[0114] 바람직한 구체예에서, CHO 세포에서 대상 GDF 트랩 폴리펩티드들을 생산하도록 벡터들이 기획될 수 있는데, 이를 테면, Pcmv-Script 벡터 (Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터들 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터들 (Promega, Madison, Wisc.)가 있다. 자명한 것과 같이, 대상 유전자 구조체들은 가령, 정제용 용합 단백질들 또는 변이체 단백질들을 포함하는 단백질들을 생산하기 위하여, 배양물에서 증식된 세포들 안에서 대상 GDF 트랩 폴리펩티드를 발현시키기 위하여 이용될 수 있다.

[0115] 본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 대상 GDF 트랩 폴리펩티드들에 대한 코딩 서열 (가령, 서열 번호: 4, 5, 25, 27, 30 또는 31)를 포함하는 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 관계된다. 이 숙주 세포는 임의의 원핵성생물 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 GDF 트랩 폴리펩티드는 박테리아 세포 이를 테면, 대장균(*E. coli*), 곤충 세포 (가령, 베클로바이러스 발현 시스템을 이용), 효모, 또는 포유류 세포에서 발현될 수 있다. 기타 적합한 숙주 세포들은 당업자들에게 공지되어 있다.

[0116] 따라서, 본 발명은 대상 GDF 트랩 폴리펩티드들을 생산하는 방법들에 더 관계된다. 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드를 인코드하는 발현벡터로 형질감염된 숙주 세포들은 GDF 트랩 폴리펩티드의 발현이 허용되는 적합한 조건하에 배양될 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드는 분비되고, GDF 트랩 폴리펩티드를 함유하는 세포 및 배지 혼합물로부터 단리될 수 있다. 대안으로, GDF 트랩 폴리펩티드는 세포질 또는 막 분획에 유지되어, 세포들을 수거하고, 용해시키고, 그리고 이 단백질이 단리될 수 있다. 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 기타 부산물들을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에 공지되어 있다. 대상 GDF 트랩 폴리펩티드들은 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동 및 GDF 트랩 폴리펩티드들의 특정 에피토프에 특이적인 항체들을 이용한 면역친화력 정제를 포함하는 단백질들을 정제하기 위하여 당분야에 공지된 기술을 이용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 이를 둘 모두로부터 단리될 수 있다. 바람직한 구체예에서, GDF 트랩 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하는 도메인을 포함하는 용합 단백질이다.

[0117] 또다른 구체예에서, 정제 리더 서열을 코딩하는 용합 유전자, 이를 테면, 재조합 GDF 트랩 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에 poly-(His)/엔테로키나제 절단 부위 서열은 Ni<sup>2+</sup> 금속 수지를 이용한 친화력 크로마토그래피에 의해 발현된 용합 단백질의 정제를 허용할 수 있다. 정제 리더 서열은 엔테로키나제를 이용하여 처리됨으로써 후속적으로 제거되어 정제된 GDF 트랩 폴리펩티드가 제공된다 (가령, Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; 그리고 Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

[0118] 용합 유전자를 만드는 기술들은 당분야에 공지되어 있다. 기본적으로, 상이한 폴리펩티드 서열들을 코딩하는 다

양한 DNA 단편들의 결합은 결찰을 위한 블런트-엔드 또는 스태거(stagger)-엔드-말단, 적합한 말단을 제공하기 위한 제한효소 절단, 바람직하지 못한 결합을 회피하기 위하여 적합한 알칼리 포스파타제로 코헤시드 엔드의 채움 및 효소 결찰을 이용한 통상적인 기술에 따라 실행된다. 또다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화된 DNA 합성지를 포함하는 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 키메라 유전자 서열을 만들기 위하여 후속적으로 어닐될 수 있는 2개의 연속 유전자 단편들 사이에 상보적 오버행이 일어나게 하는 앵커 프라이머를 이용하여 실행될 수 있다(예를 들면, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992 참고).

[0119] 4. 스크리닝 분석(Screening Assays)

[0120] 특정 측면들에서, 본 발명은 ActRIIB 폴리펩티드들의 항진체 또는 길항체인 화합물(물질)을 식별하기 위하여 대상 GDF 트랩 폴리펩티드(가령, 가용성 변이체 ActRIIB 폴리펩티드들)를 이용하는 것에 관계된다. 이 분석을 통하여 확인된 화합물들은 생체내 또는 시험관 안에서 붉은 혈액 세포, 혼모글로빈 및/또는 망상적혈구 수준을 조절하는 능력을 평가하기 위하여 테스트될 수 있다. 이들 화합물은 예를 들면, 동물 모델에서 테스트될 수 있다.

[0121] ActRIIB 신호생성을 표적화함으로써, 붉은 혈액 세포 또는 혼모글로빈 수준을 증가시키는 치료 물질들에 대한 스크리닝을 위한 다수의 방법이 있다. 특정 구체예들에서, 화합물들의 고-처리량 스크리닝은 선택된 세포 계통에서 ActRIIB-중재된 영향을 뒤흔드는 물질을 확인하기 위하여 실행될 수 있다. 특정 구체예들에서, 이 분석은 ActRIIB 폴리펩티드가 이의 결합 짹, 이를 테면, ActRIIB 리간드(가령, 액티빈, Nodal, GDF8, GDF11 또는 BMP7)에 결합되는 것을 특이적으로 저해 또는 감소시키는 화합물들을 선별 및 식별하기 위하여 실행된다. 대안으로, 이 분석을 이용하여 ActRIIB 폴리펩티드가 이의 결합 짹 이를 테면, ActRIIB 리간드에 결합하는 것을 강화시키는 화합물들을 식별하는데 이용될 수 있다. 추가 구체예에서, ActRIIB 폴리펩티드와의 상호작용 능력에 의해 이 화합물들이 식별될 수 있다.

[0122] 다양한 분석 포맷이 충족될 수 있는데, 본 발명의 내영에 의해, 본 명세서에서 명시적으로 설명이 안된 것 역시 본 발명의 당업자에 의해 이해될 수 있을 것이다. 본 명세서에서 설명된 것과 같이, 본 발명의 테스트 화합물들(물질들)은 임의의 조합적 화학 방법에 의해 만들어질 수 있다. 대안으로, 대상 화합물들은 생체내 또는 시험관에서 합성되는 자연적으로 발생되는 생물분자들일 수 있다. 조직 성장의 조절물질로 작용하는 물질들의 능력에 대하여 테스트되는 화합물(물질)은 예를 들면, 박테리아, 효모, 식물 또는 기타 유기체(가령, 천연 생성물)에 의해 만들어지거나, 화학적으로(가령, 웨이드 모방체를 포함하는 작은 분자들), 또는 재조합적으로 만들어질 수 있다. 본 발명에 의해 고려되는 테스트 화합물들은 비-펩티드성 유기 분자들, 웨이드들, 폴리펩티드들, 웨이드모방체, 당, 호르몬, 및 핵산 분자들을 포함한다. 특정 구체예에서, 테스트 물질은 약 2,000 Daltons 미만의 분자량을 보유한 작은 유기 분자다.

[0123] 본 발명의 테스트 화합물들은 단일, 별도 엔터티로 제공될 수 있거나, 또는 더 큰 복합체 라이브러리, 이를 테면, 복합 화학에 의해 만들어진 복합체 라이브러리로 제공될 수 있다. 이들 라이브러리는 예를 들면, 알코올, 알킬 할로겐화물, 아민, 아미드, 에스테르, 알레히드, 에테르 및 기타 유기 화합물 분류를 포함할 수 있다. 테스트 시스템에 테스트 화합물은 초기 스크리닝 단계에서 특히 단리된 형태 또는 화합물들의 혼합물로 제시될 수 있다. 임의선택적으로, 이 화합물들은 임의선택적으로 다른 화합물로부터 유도될 수 있고 그리고 화합물의 단리를 용이하게 하는 유도화 집단을 보유할 수 있다. 유도화 집단의 비-제한적 예들은 바이오틴, 플로우레신, 디옥시게닌, 그런 형광 단백질, 동위원소, 폴리히스티딘, 자석 비드, 글루타티온 S 전이효소(GST), 광활성가능한 교차링커 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0124] 화합물들 및 천연 추출물들의 라이브러리를 테스트하는 많은 약물 선별 프로그램에서, 주어진 시간내에 조사해야 할 화합물 수를 최대화시키기 위하여 고처리량 분석이 바람직하다. 이를 테면, 무-세포 시스템에서 실행되는 분석은 정제된 또는 반-정제된 단백질들로 유도될 수 있고, 테스트 화합물에 의해 중재되는 분자 표적에서 변경의 상대적으로 용이한 발생 및 탐지가 허용되도록 "1차" 스크린으로 흔히 선호된다. 더욱이, 테스트 화합물의 세포 독성 또는 생체이용성의 효과는 시험관 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있고, 대신 분석은 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 짹(가령, ActRIIB 리간드) 사이의 결합 친화력의 변형으로 명백한 분자 표적에서 약물의 효과에 주로 집중된다.

[0125] 오직 설명을 위하여, 본 발명의 예시적인 스크리닝 분석에서, 관심 화합물은 ActRIIB 리간드에 통상적으로 결합

할 수 있는 단리된 그리고 정제된 ActRIIB 폴리펩티드와 접촉되는데, 이는 분석 의도에 적합하다. 그 다음, 이 화합물과 ActRIIB 폴리펩티드의 혼합물에 ActRIIB 리간드를 함유하는 조성물이 추가된다. ActRIIB/ActRIIB 리간드 복합체들의 탐지 및 정량화는 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에서 복합체 형성을 저해(또는 강화)시킬 때 화합물의 효과를 결정하는 수단을 제공한다. 화합물의 효과는 다양한 농도의 테스트 화합물을 이용하여 획득된 데이터의 용량 반응 곡선을 만들어서 평가될 수 있다. 더욱이, 조절 분석은 비교용 기준을 제공하기 위하여 또한 실행될 수 있다. 예를 들면, 조절 분석에서, 단리된 그리고 정제된 ActRIIB 리간드는 ActRIIB 폴리펩티드를 함유하는 조성물에 추가되고, ActRIIB/ActRIIB 리간드 복합체의 형성을 테스트 화합물 없이 정량화된다. 일반적으로 반응물이 혼합되는 순서는 변화될 수 있고, 동시에 혼합될 수 있음을 이해할 것이다. 더욱이, 정제된 단백질들 대신, 세포 추출물 및 용해물을 이용하여 적합한 무-세포 분석 시스템을 제공할 수 있다.

[0126] ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 결합 단백질 사이에 복합체 형성을 다양한 기술에 의해 탐지될 수 있다. 예를 들면, 복합체들의 형성 제어는 예를 들면, 탐지 가능하도록 라벨된 단백질들 이를 테면, 방사능라벨된 (가령, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C 또는 <sup>3</sup>H), 형광으로 라벨된 (가령, FITC), 또는 효소적으로 라벨된 ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 결합 단백질을 이용하여 면역분석, 또는 크로마토그래피 탐지에 의해 정량화될 수 있다.

[0127] 특정 구체예들에서, 본 발명은 형광 극성화 분석 및 형광 공명 에너지 전달(FRET) 분석을 이용하여 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 상호작용 정도를 직접 또는 간접적으로 측정하는 것을 고려한다. 더욱이, 다른 방식의 탐지, 이를 테면, 광학 파로(PCT Publication WO 96/26432 및 미국 특허 제5,677,196호), 표면 플라스몬 공명(SPR), 표면 하전 센서, 그리고 표면력 센서에 기반을 둔 것들이 본 발명의 많은 구체예들과 양립된다.

[0128] 더욱이, 본 발명은 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 꽉 사이에 상호작용을 파괴 또는 강화시키는 물질들을 식별하기 위하여, "두개 하이브리드 분석"으로 또한 공지된 상호작용 트랩 분석의 이용을 고려한다. 예를 들면, 미국 특허 제5,283,317호; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; 그리고 Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696) 참고. 특정 구체예에서, 본 발명은 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 상호작용을 끊는 화합물들(가령, 작은 분자들 또는 펩티드)을 식별하기 위하여 역위 두 개 하이브리드 시스템의 이용을 고려한다. 예를 들면, Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; 그리고 미국 특허 제5,525,490호; 제5,955,280호; 그리고 제5,965,368호.

[0129] 특정 구체예들에서, 대상 화합물들은 ActRIIB 폴리펩티드와의 상호작용하는 이들의 능력으로 식별된다. 화합물과 ActRIIB 폴리펩티드 간에 상호작용은 공유적 또는 비-공유적일 수 있다. 예를 들면, 이러한 상호작용은 광-교차연계, 방사능라벨된 리간드 결합, 그리고 친화력 크로마토그래피를 포함하는 시험관내 생물화학방법을 이용하여 이 단백질 수준에서 식별될 수 있다(Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). 특정 경우들에서, 이 화합물들은 기전 기반 분석 이를 테면, ActRIIB 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 탐지하는 분석에서 선별될 수 있다. 이는 고형 상 또는 유동상 결합 사건을 포함할 수 있다. 대안으로, ActRIIB 폴리펩티드를 인코드하는 유전자는 리포터 시스템 (가령,  $\beta$ -갈락토시다제, 루시퍼라제, 또는 그린 형광 단백질)과 함께 세포 안으로 형질감염되고, 고처리량 스크리닝 또는 라이브러리의 개별 구성원에 의해 라이브러리에 대항하여 스크리닝된다. 다른 기전 기반 결합 분석, 예를 들면, 자유 에너지의 변화를 탐지하는 결합 분석이 이용될 수 있다. 결합 분석은 웰, 비드 또는 침에 고정된 표적과 함께 실행되거나, 또는 고정된 항체에 의해 포획된 표적과 함께 실행되거나, 또는 모세관 전기영동에 의해 해리된 표적과 함께 실행될 수 있다. 결합된 화합물들은 발색 또는 형광 또는 표면 플라스몬 공명을 이용하여 통상적으로 탐지될 수 있다.

## 5. 예시적인 치료 용도

[0130] 특정 구체예들에서, 본 발명의 GDF 트랩 폴리펩티드들은 포유동물 이를 테면, 설치류 및 영장류, 그리고 구체적으로 인간 환자들에서 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키는데 이용될 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드들, 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합된 GDF 트랩 폴리펩티드들은 효과가 없는 적혈구생성을 치료하는데 유용할 수 있다. 철동태(ferrokinetic) 연구에 근거하여 형성불능 빈혈, 출혈, 또는 말초 용혈과는 기본적으로 구별되며(Ricketts et al., 1978, Clin Nucl Med 3:159-164), 효과가 없는 적혈구생성을 다양한 빈혈 집단을 설명하는데, 이때 성숙한 RBCs의 생산은 골수에 존재하는 주어진 적혈구의 선구 (적혈구 모세포)의 예상된 주어진 수

보다 적다(Tanno et al., 2010, *Adv Hematol* 2010:358283). 이러한 빈혈에서, 성숙한 RBCs의 효과가 없는 생산으로 인하여 상승된 에리트로포에틴 수준의 상승에도 불구하고 조직 저산소증은 지속된다. 상승된 에리트로포에틴 수준은 적혈구 모세포의 대량 팽창을 유도하고, 잠재적으로 골수의 적혈구생성으로 인하여 비장거대증(비장 확대)(Aizawa et al., 2003, *Am J Hematol* 74:68-72), 적혈구모세포-유도된 골 병리 (Di Matteo et al., 2008, *J Biol Regul Homeost* 물질들 22:211-216), 그리고 치료 RBC 주입 없을 때조차도 조직 철과부하(Pippard et al., 1979, *Lancet* 2:819-821)로 이어지는 악의적인 순환이 궁극적으로 발생된다. 따라서, 적혈구 생성 효과를 상승시킴으로써, GDF 트랩 폴리펩티드는 전술한 순환을 파괴시킬 수 있고, 잠재적인 빈혈 뿐만 아니라, 상승된 에리트로포에틴 수준, 비장거대증, 골 병리, 및 조직 철 과부하의 연합 여병들을 경감시킬 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드들은 빈혈 및 상승된 EPO 수준을 포함하는 효과가 없는 적혈구생성, 뿐만 아니라 여병들 이를 테면, 비장거대증, 적혈구모세포-유도된 골 병리, 및 철 과부하, 그리고 이들의 수행 병리를 치료할 수 있다. 비장거대증과 함께, 이러한 병리는 흉곽 또는 복부 통증 및 세망내피계 과형성을 포함한다. 골수의 혈액 생성은 비장뿐만 아니라 골수의 조혈 허위종양 형태의 다른 조직에서도 잠재적으로 일어날 수 있다(Musallam et al., 2012, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a013482). 적혈구모세포-유도된 골 병리와 함께, 수행 병리는 낮은 골 미네랄 밀도, 골다공증, 및 골 통증 (Haidar et al., 2011, *Bone* 48:425-432)을 포함한다. 철 과부하와 함께, 수행 병리는 헵시딘 억압과 규정식 철의 과다흡수(Musallam et al., 2012, *Blood Rev* 26(Suppl 1):S16-S19), 다발성 내분비병 그리고 간 섬유증/간경변 (Galanello et al., 2010, *Orphanet J Rare Dis* 5:11), 그리고 철-과부하 심근증 (Lekawanvijit et al., 2009, *Can J Cardiol* 25:213-218)을 포함한다.

[0132]

효과가 없는 적혈구생성의 가장 흔한 원인은 지중해빈혈 증후군, 유전적 혜모글로빈병증인데, 이때 고유의 알파- 및 베타-혜모글로빈의 생산에서 불균형은 적혈구모세포 성숙 동안 자가사멸의 증가로 이어진다(Schriner, 2002, *Curr Opin Hematol* 9:123-126). 지중해빈혈은 세계적으로 가장 빈번한 유전적 장애들인데, 역학적 패턴의 변화는 미국 및 전세계적으로 공중보건의 커지는 문제로 연계된다 (Vichinsky, 2005, *Ann NY Acad Sci* 1054:18-24). 지중해빈혈 증후군은 이들의 심각성에 따라 명명된다. 따라서,  $\alpha$ -지중해빈혈은 소수의  $\alpha$ -지중해빈혈 ( $\alpha$ -지중해빈혈 특징으로도 알려짐; 두 가지 영향을 받은  $\alpha$ -글로빈 유전자), 혜모글로빈 H 질환 (세 가지 영향을 받은  $\alpha$ -글로빈 유전자), 그리고 주요  $\alpha$ -지중해빈혈(태아 수종으로도 알려짐; 네 가지 영향을 받은  $\alpha$ -글로빈 유전자)을 포함한다.  $\beta$ -지중해빈혈은 소수의  $\beta$ -지중해빈혈 ( $\beta$ -지중해빈혈 특징으로도 알려짐; 한 가지 영향을 받은  $\beta$ -글로빈 유전자),  $\beta$ -지중해빈혈 중간형 (두 가지 영향을 받은  $\beta$ -글로빈 유전자), 혜모글로빈 E 지중해빈혈 (두 가지 영향을 받은  $\beta$ -글로빈 유전자), 그리고 주요  $\beta$ -지중해빈혈(Cooley의 빈혈로 또한 알려짐; 두 가지 영향을 받은  $\beta$ -글로빈 유전자는  $\beta$ -글로빈 단백질의 완전한 부재를 초래함).  $\beta$ -지중해빈혈은 여러 장기에 영향을 주며, 심각한 유병률 및 사망률과 연관되며, 그리고 현재 일생동안 관리가 요구된다.  $\beta$ -지중해빈혈 환자의 수명은 철 칼레이트화와 함께 정규적인 혈액 주입으로 인하여 최근에 증가되었지만, 주입 및 과도한 위장의 철 흡수로 인한 철 과부하는 심각한 여병들 이를 테면, 심장 질환, 혈전정, 생식샘기능저하, 갑상선기능저하, 당뇨병, 골다공증, 그리고 골감소증을 야기할 수 있다 (Rund et al., 2005, *N Engl J Med* 353:1135-1146).  $\beta$ -지중해빈혈의 마우스 모델을 이용하여 본 명세서에서 설명된 것과 같이, GDF 트랩 폴리펩티드는 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합하여, 지중해빈혈 증후군을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0133]

GDF 트랩 폴리펩티드들은 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합되어, 지중해빈혈 증후군이외에도 효과가 없는 적혈구생성의 장애를 치료하는데 이용될 수 있다. 이러한 장애들은 철아구성 빈혈 (유전된 또는 후천적); 적혈구생성이상 빈혈 (유형 I 및 II); 낫모양 세포 빈혈; 유전적 구상적혈구증; 피루베이트 키나제 결핍; 이를 테면, 엽산 결핍 (선천적 질환, 섭취량 감소, 또는 증가된 요구조건등으로 인하여), 코발아민 결핍 (선천적 질환, 치명적 빈혈, 손상된 흡수, 훼장 부전, 또는 감소된 섭취로 인하여), 특정 약물, 또는 상세불명 원인(선천적 이상적혈구생성 빈혈, 난치성 거대적아구 빈혈, 또는 적백혈병)의 잠재적 원인으로 인한 거대적아구 빈혈; 골섬유증 (골수 변질형성) 및 골수로를 포함하는 골수로성 빈혈; 선천적 적혈구생성 피린증; 그리고 납 중독을 포함한다.

[0134]

본 명세서에서 이용된 바와 같이, 장애 또는 상태를 "예방하는" 치료는 통계학적 시료에서 처리안된 대조군 시료와 비교하여 처리된 시료에서 장애 또는 상태의 발생을 감소시키거나, 또는 처리안된 대조군 시료와 비교하여 장애 또는 상태의 하나 또는 그 이상의 증상의 개시를 지연 또는 증상을 감소시키는 화합물을 지칭한다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "치료하는"은 일단 확립된 상태의 경감 또는 제거가 포함된다. 어느 경우이건 간에, 예방 또는 처리는 의사 또는 다른 건강 관리자 그리고 치료제의 투여의 의도된 결과에 의해 제시되는 진단과 구별될 수 있다.

[0135]

본 명세서에서 나타난 것과 같이, GDF 트랩 폴리펩티드들은 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합되어,

건강한 개체들에서 붉은 혈액 세포, 헤모글로빈 또는 망상적혈구 수준을 증가시키는데 이용될 수 있고, 그리고 이러한 GDF 트랩 폴리펩티드들은 선택된 환자 집단에서 이용될 수 있다. 적합한 환자 집단의 예는 붉은 혈액 세포 또는 헤모글로빈 수준이 바람직하지 못하게 낮은 환자들, 이를 테면, 빈혈이 있는 환자들, 그리고 붉은 혈액 세포 또는 헤모글로빈 수준이 바람직하지 못하게 낮은 위험에 처한 또는 발생될 위험에 처한 환자들, 이를 테면, 실질적인 혈액 손실을 초래할 수 있는 큰 외과술 또는 다른 과정을 겪게될 환자들을 포함한다. 한 구체예에서, 적절한 붉은 혈액 세포 수준을 가진 환자들은 GDF 트랩 폴리펩티드로 치료되어 붉은 혈액 세포 수준이 증가되고, 그리고 혈액을 빼내어, 나중에 주입용으로 사용하기 위하여 보관된다.

[0136]

GDF 트랩 폴리펩티드들은 본 명세서에서 공개된 것과 같이 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합되어 빈혈 환자들에게서 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키는데 이용될 수 있다. 인간의 헤모글로빈 수준을 관찰할 때, 적합한 나이 및 성별 기준에 정상인 수준 미만의 수준은 비록 개인 간의 차이가 있지만 빈혈을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 12 g/dl의 헤모글로빈 수준은 일반적인 성인 집단에서 정상 수준보다 더 낮은 것으로 일반적으로 간주된다. 잠재적인 원인은 혈액-상실, 영양 결핍, 의약 반응 및 골수 및 많은 질환과의 다양한 문제점을 포함한다. 좀더 구체적으로, 빈혈은 예를 들면, 만성 신부전, 골이형성증 증후군, 류마티스 관절염, 골수 이식을 포함하는 다양한 장애들과 연합된다. 빈혈은 또한 다음 상태와 또한 연관될 수 있다: 고령 종양 (가령 유방암, 폐암, 결장암); 임파계 종양(가령 만성 림프성 백혈병, 비-Hodgkins 및 Hodgkins 임파종); 조혈 시스템의 종양 (가령 백혈병, 골이형성증 증후군, 다발성 골수종); 방사능 치료법; 화학치료법 (가령 백금 포함 섭생); 류마티스 관절염, 기타 염증성 제종 관절증, 전신 홍반성 낭창(SLE), 급성 또는 만성 피부 질환 (가령 건선), 염증성 장 질환(가령 Crohn 질환 및 궤양성 결장염)을 포함하나 이에 한정되지 않는 염증 및 자가면역 질환; 특발성 또는 선천적 상태를 포함하는 급성 또는 만성 신장 질환 또는 부전; 급성 또는 만성 간질환; 급성 또는 만성 출혈; 환자의 알로(allo)- 또는 자가(auto)-항체로 인하여 및/또는 종교적 원인(가령 일부 여호와의 증인)으로 인하여 붉은 혈액 세포들의 주입이 불가능한 상황; 감염 (가령 말라리아, 골수염); 예를 들면, 낫모양 세포 질환, 지중해빈혈을 포함하는 헤모글로빈병증; 약물 사용 또는 남용, 가령 알코올 오용; 수혈을 회피하기 위하여 임의의 원인으로 인한 소아 환자; 그리고 노인 환자 또는 순환 과부하의 걱정으로 인하여 주입을 할 수 없는 심폐 질환과 빈혈을 가진 환자.

[0137]

골이형성증 증후군 (MDS)은 골수 혈액 세포의 효과가 없는 생산 및 급성 골수성 백혈병으로 전환될 위험을 특징으로 하는 조혈 상태의 다양한 집합이다. MDS 환자들에서, 혈액 줄기세포는 건강한 붉은 혈액 세포들, 백색 혈액 세포, 또는 혈소판으로 성숙되지 않는다. MDS 장애들은 예를 들면, 난치성 빈혈, 고리를 형성한 철아구를 가진 난치성 빈혈, 과도한 아구를 가진 난치성 빈혈, 형질변환에서 과도한 아구를 가진 난치성 빈혈, 다중계통 형성 장애를 가진 난치성 혈구감소, 그리고 단리된 5q 염색체 이상과 연합된 골이형성증 증후군을 포함한다. 이들 장애들은 조혈 세포의 양과 질 모두에서 비가역적 결함이 있기 때문에, 대부분 MDS 환자들은 만성 빈혈을 앓는다. 따라서, MDS 환자들은 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키기 위하여 결국 혈액 주입 및/또는 성장 인자들 (가령, 에리트로포에틴 또는 G-CSF)의 치료를 필요로 한다. 그러나, 많은 MDS 환자들은 이러한 요법의 빈도로 인하여 부작용을 겪는다. 예를 들면, 빈번한 붉은 혈액 세포 주입을 받은 환자들은 과도한 철의 축적으로 인한 조직 및 장기 손상을 가질 수 있다. 하기 실시예들에서 설명된 것과 같이, GDF 트랩 폴리펩티드들은 MDS의 마우스 모델에서 빈혈 치료에 이용되었다. 따라서, 본 명세서에서 공개된 GDF 트랩 폴리펩티드들은 MDS 환자를 치료하는데 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, MDS를 앓고 있는 환자들은 EPO 수용체 활성물질과 복합된 GDF 트랩 폴리펩티드 조합을 이용하여 치료될 수 있다. 다른 구체예들에서, MDS를 앓고 있는 환자들은 GDF 트랩 폴리펩티드와 MDS를 치료하는 하나 또는 그 이상의 추가 치료 물질들, 예를 들면, 탈리도미드, 레날리도미드, 아자시타진, 테시타빈, 에리트로포에틴, 테페록사민, 안티히모사이트 글루불린, 필그라스트림(G-CSF) 및 에리트로포에틴 신호생성 경로 항진체와의 조합을 이용하여 치료될 수 있다.

[0138]

임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합된 GDF 트랩 폴리펩티드들은 붉은 혈액 세포 (RBC) 형태에 거의 변화가 없는 것과 전형적으로 연합된 과다증식성 골수 빈혈을 치료하는데 적합할 수 있다. 과다증식성 빈혈은 다음과을 포함한다: 1) 만성 질환의 빈혈, 2) 신장 질환의 빈혈, 그리고 3) 낮은 대사상태와 연합된 빈혈. 이들 각 유형에서, 내생성 에리트로포에틴 수준 관찰된 빈혈 수준에 대해 부적절하게 낮다. 다른 과소증식성 빈혈은 다음과을 포함한다: 4) 초기-단계 철-결핍 빈혈, 그리고 5) 골수에 순상으로 인한 빈혈. 이들 유형에서, 내생성 에리트로포에틴 수준은 관찰된 빈혈 수준에 대해 적합하게 상승된다.

[0139]

가장 흔한 유형은 만성 질환의 빈혈인데, 여기에는 염증, 감염, 조직 손상, 및 상태 이를 테면, 암이 포함되며, 낮은 에리트로포에틴 수준과 골수에서 에리트로포에틴에 대해 부적절한 반응으로 구별된다(Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634). 많은 인자들

이 암-관련된 빈혈에 기여할 수 있다. 일부는 질병 과정 자체 및 염증성 사이토킨 이를 테면, 인터루킨-1, 인터페론-감마, 및 종양 피사 인자의 생성과 연관된다(Bron et al., 2001, Semin Oncol 28(Suppl 8):1-6). 이의 영향중에, 염증은 주요 철-조절 펩티드 헵시딘을 유도하고, 이로 인하여 대식세포로부터 철 수출이 저해되고, 일반적으로 적혈구생성에 이용되는 철이 제한된다(Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18:394-400). 다양한 경로를 통한 혈액 상실은 암-관련된 빈혈에 또한 기여할 수 있다. 암 진행으로 인한 빈혈 유행은 암 유형에 따라 변화되는데, 전립선 암의 경우 5%에서부터 다발성 골수종에서는 최대 90%까지 다양한다. 암-관련된 빈혈은 피로 및 삶의 질의 저하, 감소된 치료 효과, 그리고 증가된 사망률을 포함하는 환자들에게 심각한 결과를 가진다.

[0140]

만성 신장 질환은 신장 손상 정도의 심각성이 다양한 과소증식성 빈혈과 연합된다. 이러한 빈혈은 에리트로포에틴의 부적절한 생산 및 붉은 혈액 세포들의 감소된 생존으로 인한 것이다. 만성 신장 질환은 보통 수년간 또는 수십년간에 걸쳐 환자의 생존을 위해서 투석 또는 신장 이식이 요구되는 시점인 최종 단계(단계-5) 질환으로 점진적으로 진행된다. 빈혈은 대개 이 과정의 초기에 발생되어, 질병이 진행됨에 따라 악화된다. 신장 질환의 빈혈의 임상적 결과는 잘 정리되어 있고, 우측 심실의 비대 발생, 손상된 인지 기능, 감소된 삶의 질의 저하, 그리고 변경된 면역 기능의 발달이 포함된다(Levin et al., 1999, Am J Kidney Dis 27:347-354; Nissenson, 1992, Am J Kidney Dis 20(Suppl 1):21-24; Revicki et al., 1995, Am J Kidney Dis 25:548-554; Gafter et al., 1994, Kidney Int 45:224-231). 만성 신장 질환의 마우스 모델에서 출원인에 의해 설명된 것과 같이(하기 실시예 참고), 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합된 GDF 트랩 폴리펩티드는 신장 질환의 빈혈 치료에 이용될 수 있다.

[0141]

낮은대사 속도를 야기하는 많은 상태는 약한 내지 중간 수준의 저증식성 빈혈을 만들 수 있다. 이를 상태중 내분비 결핍 상태가 있다. 예를 들면, 빈혈은 Addison의 질환, 갑상선기능저하, 부갑상선기능항진, 또는 거세된 남성 또는 에스트로겐으로 치료된 남성에서 일어날 수 있다. 약한 내지 중간 수준의 빈혈은 단백질 섭취의 감소, 구체적으로 노인에게서 빈번한 상태와 함께 발생될 수 있다. 끝으로, 빈혈은 거의 임의의 원인으로 발생되는 만성 간 질환을 가진 환자에게서 발생될 수 있다(Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634).

[0142]

상당한 양의 급성 혈액 손실, 이를 테면, 외상, 또는 출산후 출혈로 인한 빈혈은 급성 출혈후 빈혈로 알려져 있다. 급성 혈액 손실은 처음에는 빈혈없이 혈액양의 감소(hypovolemia)를 야기하는데, 다른 혈액 구성요소들과 함께 RBC의 비례적인 고갈 때문이다. 그러나, 혈액양의 감소는 혈관밖으로부터 혈관 격실로 유체를 이동시키는 생리적 기전을 신속하게 촉발시켜, 혈액회석 및 빈혈을 초래한다. 만성적인 경우 혈액 상실은 점진적으로 체내 철 보관을 고갈시켜, 궁극적으로 철 결핍으로 이어진다. 마우스 모델에서 출원인에 의해 설명된 것과 같이(하기 실시예에서 설명됨), 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합된 GDF 트랩 폴리펩티드는 급성 혈액 손실의 빈혈로부터 회복을 가속화시키는데 이용될 수 있다.

[0143]

철-결핍 빈혈은 중간 단계인 부정적 철 균형과 철-결핍 적혈구생성을 포함하는 철 결핍의 증가의 단계화된 진행에서 최종 단계이다. 철 결핍은 철 요구의 증가, 철 섭취의 감소, 또는 철 손실의 증가로 야기될 수 있는데, 이를 테면, 임신, 부적절한 다이어트, 장의 흡수불량, 급성 또는 만성 염증, 그리고 급성 또는 만성 혈액 손실과 같은 상태에서 구체화된다. 이러한 유형의 약한 내지 중간 수준의 빈혈과 함께, 골수는 과소증식성으로 유지되고, RBC 형태는 대개 정상이다; 그러나, 약한 빈혈도 일부 소구성 저색소성 RBC를 야기할 수 있고, 그리고 일시적 내지 심각한 철-결핍 빈혈이 골수의 과다증식과 수반되고, 소수성 그리고 저색소성 RBC의 우세가 증가된다(Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634). 철-결핍 빈혈의 적합한 치료법은 이의 원인 및 심각성에 따라 달라지는데, 경구 철 제제, 장관외 철 제제, 그리고 RBC 주입이 주요 통상적인 선택이다. 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합된 GDF 트랩 폴리펩티드는 만성 철-결핍 빈혈을 치료하는데 단독으로 이용되거나, 또는 다중인자 기원의 빈혈을 특히 치료하기 위하여 통상적인 치료 방법과 복합되어 이용될 수 있다.

[0144]

과소증식성 빈혈은 염증, 감염, 또는 암 진행에 부차적인 기능이상을 대신하여 주요 기능이상 또는 골수의 기능 부전으로 인한 것일 수 있다. 중요한 예들은 암 화학치료 약물 또는 암 방사능치료에 의한 골수억제일 것이다. 광범위한 임상 실험을 검토하여, 화학요법이후 환자의 100%에서 약한 빈혈이 발생될 수 있고, 그리고 이러한 환자의 최대 80%까지 좀더 심각한 빈혈이 일어날 수 있음이 밝혀졌다(Groopman et al., 1999, J Natl Cancer Inst 91:1616-1634). 골수억제성 약물은 다음이 포함된다: 1) 알킬화 물질들 이를 테면, 질소 머스터드(가령, 멜팔란) 및 니트로조우레아(가령, 스트렙토조이신); 2) 대사길항물질 이를 테면, 엽산 길항제(가령, 메토트렉세이트), 퓨린 유사체(가령, 티오구아닌), 그리고 피리미딘 유사체(가령, 겜시타빈); 3) 세포독성 항생제 이를 테면, 안트라사이클린(가령, 독소루비신); 4) 키나제 저해제(가령, 게피티니브); 5) 유사분열 저해제 이를 테

면, 탁산 (가령, 파클리탁셀) 및 빈카 알칼로이드 (가령, 비노렐빈); 6) 단클론 항체들 (가령, 리투시마브); 그리고 7) 토포이소머라제 저해제 (가령, 토포테칸 및 에토록시드). 화학치료법-유도된 빈혈의 마우스 모델에서 설명된 것과 같이 (하기 실시예에서 설명됨), 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합된 GDF 트랩 폴리펩티드는 화학치료 물질들 및/또는 방사능 치료법에 의해 야기된 빈혈을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0145] 임의선택적으로 EPO 수용체 활성물질과 복합된 GDF 트랩 폴리펩티드는 보통보다 작은 크기(소구성), 보통보다 큰 크기(대구성), 잘못형성된 또는 비정상적인 색을 띤(저색소성) RBC을 부분적으로 특징으로 하는, RBC 성숙의 장애를 가진 빈혈을 치료하는데 적합할 수 있다.

[0146] 특정 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드들은 효과가 없는 적혈구생성에 대한 보충 요법과 복합적으로 이용될 수 있다(가령, 동시에 또는 상이한 시간대에 투여될 수 있는데, 그러나 일반적으로 중첩되는 약리학적 효과를 획득하기 위한 방식으로). 이러한 요법은 빈혈을 치료하기 위하여 붉은 혈액 세포들 또는 전체 혈액과 함께 주입을 포함한다. 만성 또는 유전적 빈혈에서, 철 항상성을 위한 정상적인 기전은 반복된 주입에 의해 압도되어, 결국 독성 및 잠재적으로 생명에 주요한 조직 이를 태면, 심장, 간, 그리고 내분비 선에서 철의 치명적인 축적으로 이어진다. 따라서, 효과가 없는 적혈구생성을 만성적으로 앓고 있는 환자들의 보충 요법에는 소변 및/또는 대변에 철 배출을 촉진시켜, 이로 인하여 조직 철 과부하를 예방 또는 역전시키기 위하여 하나 또는 그 이상의 철-킬레이트 분자들로 치료가 포함된다 (Hershko, 2006, *Haematologica* 91:1307-1312; Cao et al, 2011, *Pediatr Rep* 3(2):e17). 효과적 철-킬레이트화 물질들은 히드록실 라디칼 및 산화 산물의 촉매 생산을 통하여 대부분의 철 독성의 원인이 되는, 비-트란스페린 결합된 철의 산화된 형태인 제2 철에 선택적으로 결합하여 이를 중화시킬 수 있어야 한다(Esposito et al, 2003, *Blood* 102:2670-2677). 이를 물질들은 구조적으로 다양하지만, 모두다 1:1 (헥사덴테이트 물질들), 2:1 (트리덴테이트), 또는 3:1 (바이덴테이트)의 화학량론으로 개별 철 원자들과 8면 좌표 복합체들을 중화시킬 수 있는 산소 또는 질소 제공 원자들을 보유한다 (Kalinowski et al, 2005, *Pharmacol Rev* 57:547-583). 효과적 철-킬레이트화 물질들은 또한 상대적으로 낮은 분자량을 가지고(700 daltons 미만), 병든 조직에 접근할 수 있도록 물과 지질에 용해성을 가진다. 철-킬레이트화 분자들의 특정 예로는 매일 장관외 투여를 요구하는 박테리아 기원의 헥사덴테이트 물질인, 데페록사민, 그리고 경구 활성 합성 물질들 데포리프론(바이덴테이트) 그리고 테페라시록스(트리덴테이트)이다. 2개의 철-킬레이트화 물질들의 같은 날 투여로 구성된 복합 치료법은 킬레이트화 단일치료법에 무반응인 환자에게 전망을 보여주었고, 또한 데페록사민 단독의 경우 열악한 환자 순응성의 문제를 또한 해결하였다(Cao et al, 2011, *Pediatr Rep* 3(2):e17; Galanello et al, 2010, *Ann NY Acad Sci* 1202:79-86).

[0147] 특정 구체예들에서, GDF 트랩 폴리펩티드들은 효과가 없는 적혈구생성에 대한 헵시딘 항진제와 복합되어 이용될 수 있다. 간에서 주로 생산되는 순환 폴리펩티드, 헵시딘은 흡수성 소장세포, 간세포 및 대식세포에 국소화된 철-수출 단백질인 폐로포르틴의 분해를 유도하는 이의 능력에 의해 철 대사의 주요 조절자로 간주된다. 광범위하게 말하자면, 헵시딘은 세포외 철의 이용성을 감소시켜, 헵시딘 항진제들은 효과가 없는 적혈구생성의 치료에 유익할 수 있다(Nemeth, 2010, *Adv Hematol* 2010:750643). 이러한 관점은  $\beta$ -지중해빈혈의 마우스 모델에서 증가된 헵시딘 발현의 유익한 영향에 의해 뒷받침된다(Gardenghi et al, 2010, *J Clin Invest* 120:4466-4477).

[0148] 추가적으로, 본 명세서에서 나타낸 것과 같이, GDF 트랩 폴리펩티드들은 더 낮은 용량 범위에서 붉은 혈액 세포들의 증가를 위하여 EPO 수용체 활성물질과 복합적으로 이용될 수 있다. 이는 EPO 수용체 활성물질의 높은 용량과 연합된 위험 및 공지의 오프-타겟 효과를 줄이는데 유익할 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명은 빈혈 치료를 필요로 하는 개체에게 GDF 트랩 폴리펩티드의 치료요법적으로 효과적인 양을 투여하거나 또는 GDF 트랩 폴리펩티드와 EPO 수용체 활성물질의 복합물(또는 동시 치료법)의 효과량을 투여함으로써 빈혈 치료를 필요로 하는 개체에게서 빈혈을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 이 방법은 포유동물, 그리고 구체적으로 인간의 치료 및 예방적 처리에 유용할 수 있다.

[0149] GDF 트랩 폴리펩티드들은 EPO의 부정적 영향에 민감한 환자들에게서 이를 활성물질의 필요 용량을 줄이기 위하여 EPO 수용체 활성물질과 복합적으로 이용될 수 있다. EPO의 주요 부정적 영향은 혜마토크릿 또는 혜모글로빈 수준의 과도한 증가 및 적혈구증가다. 상승된 혜마토크릿 수준은 고혈압 (좀더 구체적으로 고혈압의 악화) 및 혈관 혈전증으로 이어질 수 있다. 보고된, 일부는 고혈압과 관련된, 또 다른 EPO의 부정적 영향은 두통, 인플루엔자와 유사한 증상, 분로의 차단(obstruction of shunts), 혈전증으로 인한 뇌 경련, 고혈압성 뇌장애, 그리고 붉은 세포 혈액 세포 경산배달(aplasia)이다 (Singibarti, (1994) *J. Clin Investig* 72(suppl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15(suppl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) *Neurology* 49, 686-689; Bunn (2002) *N Engl J Med* 346(7), 522-523).

[0150]

본 명세서에서 설명된 GDF 트랩 폴리펩티드들의 붉은 혈액 세포 수준에서의 신속한 효과는 이들 물질들이 EPO와는 상이한 기전에 의해 작용함을 나타낸다. 따라서, 이들 길항제는 EPO에 잘 반응하지 못하는 환자들에게서 붉은 혈액 세포 및 혈모글로빈 수준을 증가시키는데 유용할 수 있다. 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드는 EPO의 정상 내지 증가된 용량(>300 IU/kg/week)의 투여가 표적 수준까지 혈모글로빈 수준을 증가시키지 못하는 환자들에게 유익할 수 있다. 부적절한 EPO 반응을 가진 환자들은 모든 유형의 빈혈에서 찾아볼 수 있지만, 암 환자 및 말기 신장 신환자에서 특히 빈번하게 비-반응자들의 수가 많이 관찰된다. EPO에 대한 부적절한 반응은 구성적(가령, EPO를 이용한 첫 치료시에 관찰됨) 또는 후천적(가령 EPO로 반복 치료시에 관찰됨)일 수 있다.

[0151]

환자들은 더 낮은 표적 수준이 더 적은 심혈관 부작용을 야기할 수 있지만, 표적 혈모글로빈 수준, 보통 약 10 g/dl 내지 약 12.5 g/dl으로, 그리고 전형적으로 약 11.0 g/dl (see also Jacobs et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19)으로 환자들을 복귀시키는 의도의 용량 섭생으로 치료될 수 있다. 대안으로, 혈마토크릿 수준(세포에 의해 점령되는 혈액 시료의 용적 비)은 붉은 혈액 세포들의 상태에 대한 척도로 이용될 수 있다. 건강한 개체들의 혈마토크릿 수준은 남성 성인의 경우 41 내지 51%이며, 여성 성인의 경우 35 내지 45%이다. 표적 혈마토크릿 수준은 대개 30-33%이다. 더욱이, 혈모글로빈/혈마토크릿 수준은 사람마다 다양하다. 따라서, 최적으로, 각 환자에게 맞도록 표적 혈모글로빈/혈마토크릿 수준을 개별화시킬 수 있다.

[0152]

특정 구체예들에서, 본 발명은 환자의 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수를 측정함으로써 GDF 트랩 폴리펩티드로 처리된 환자 또는 처리될 후보를 관리하는 방법을 제공한다. 조혈 매개변수들을 이용하여 GDF 트랩 폴리펩티드로 처리되는 환자들에 적합한 용량을 평가하고, GDF 트랩 폴리펩티드로 처리되는 동안 조혈 매개변수들을 감시하고, GDF 트랩 폴리펩티드로 처리되는 동안 용량을 조절해야하는지를 평가하고, 및/또는 GDF 트랩 폴리펩티드의 적합한 유지 용량을 평가할 수 있다. 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수가 정상 수준을 벗어난다면, GDF 트랩 폴리펩티드의 투약은 감소, 지연 또는 종료될 수 있다.

[0153]

본 명세서에서 설명된 방법들에 따라 측정될 수 있는 조혈 매개변수들은 당분야에 공지된 방법을 이용하여 예를 들면, 붉은 혈액 세포 수준, 혈압, 철 저장 및 증가된 붉은 혈액 세포 수준과 상관관계가 있는 체액에서 발견되는 기타 물질들을 포함한다. 이러한 매개변수들은 환자의 혈액 시료를 이용하여 측정될 수 있다. 붉은 혈액 세포 수준, 혈모글로빈 수준, 및/또는 혈마토크릿 수준의 증가는 혈압 증가를 야기시킬 수 있다.

[0154]

한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수가 정상 범위 밖에 있거나, 또는 정상보다 높다면, GDF 트랩 폴리펩티드로 치료될 후보 환자들에게 GDF 트랩 폴리펩티드의 투여 개시는 조혈 매개변수들이 자연적으로 또는 치료 중재를 통하여 정상 또는 수용가능한 수준으로 복귀될 때까지 지연시킬 수 있다. 예를 들면, 후보 환자가 고혈압 또는 사전고혈압인 경우, 이 환자는 환자의 혈압을 낮추기 위하여 혈압을 낮추는 물질로 치료될 수 있다. 예를 들면, 이뇨제, 아드레날린성 저해제s (알파 차단제 및 베타 차단제 포함), 혈관확장제, 칼슘 채널 차단제, 양지오텐신-전환 효소(ACE) 저해제, 또는 양지오텐신 II 수용체 차단제를 포함하는, 개별 환자 상태에 적합한 임의의 혈압을 낮추는 물질이 이용될 수 있다. 혈압은 식이요법 및 운동 섭생을 이용하여 대안적으로 치료될 수 있다. 유사하게, 후보 환자가 정상보다 낮은 철 저장을 고유하거나, 정상보다 낮은 경우, 이 환자는 이 환자의 철 저장이 정상 또는 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 식사 및/또는 철 보충제 처방을 받을 수 있다. 정상적인 붉은 혈액 세포 수준 및/또는 혈모글로빈 수준보다 더 높은 환자의 경우, 정상 또는 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 GDF 트랩 폴리펩티드의 투여는 지연될 수 있다.

[0155]

특정 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수가 정상 범위를 벗어나거나, 또는 정상보다 높은 측면에 있다면, GDF 트랩 폴리펩티드로 치료될 후보 환자에게서 투여 개시는 지연되지 않을 수도 있다. 그러나, GDF 트랩 폴리펩티드의 투약량 또는 투여 빈도는 GDF 트랩 폴리펩티드의 투여시에 발생되는 조혈 매개변수들의 수용 불가능한 증가 위험을 줄일 수 있는 양으로 설정될 수 있다. 대안으로, 환자를 위하여 조혈 매개변수의 바람직하지 못한 수준을 해결하는 치료제와 GDF 트랩 폴리펩티드를 복합시킨 치료 섭생이 개발될 수 있다. 예를 들면, 환자의 혈압이 상승된 경우, GDF 트랩 폴리펩티드와 혈압을 낮추는 물질의 투여가 관련된 치료 섭생이 기획될 수 있다. 바람직한 철 저장보다 낮은 수준의 환자들의 경우, GDF 트랩 폴리펩티드와 철 보충 치료 섭생이 개발될 수 있다.

[0156]

한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수에 대한 기준 매개변수는 GDF 트랩 폴리펩티드로 처리될 후보 환자를 위하여 확립될 수 있고, 그리고 기준 값에 근거하여 이 환자를 위한 적합한 투약 섭생이 확립된다. 대안으로, 환자의 의료 기록에 근거하여 확립된 기준 매개변수들은 환자를 위한 적합한 GDF 트랩 폴리펩티드 투약 섭생을 알리는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 건강한 환자가 정해진 정상 범위 이상으로 확립된 기준 혈압을 가진다면, 이 환자의 혈압을 GDF 트랩 폴리펩티드로 치료하기에 앞서 일반 집단에서는 정상으로 간주되는 범

위로 이 환자의 혈압을 가져다놓을 필요는 없을 수도 있다. GDF 트랩 폴리펩티드로 치료 전 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수에 대한 환자의 기준 값은 GDF 트랩 폴리펩티드로 처리하는 동안 조혈 매개변수에 있어서 임의의 변화를 관찰하는 관련 비교 값으로 또한 이용될 수 있다.

[0157] 특정 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수는 GDF 트랩 폴리펩티드로 치료될 환자들에서 측정된다. 조혈 매개변수들은 처리 하는 동안 환자를 모니터하는데 이용될 수 있고, GDF 트랩 폴리펩티드의 투약을 조절 또는 종료 또는 다른 치료제의 추가적인 투약을 허용한다. 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드의 투여가 혈압, 붉은 혈액 세포 수준, 또는 혜모글로빈 수준의 증가, 또는 철 저장의 감소시킨다면, GDF 트랩 폴리펩티드의 용량은 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수들에 대한 GDF 트랩 폴리펩티드의 영향을 줄이기 위하여 그 양 또는 빈도가 감소될 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드의 투여가 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수들이 환자에게 불리한 쪽으로 변화시킨다면, GDF 트랩 폴리펩티드의 투약은 조혈 매개변수들이 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 일시적으로 중단될 수 있고, 또는 영구적으로 중단될 수 있다. 유사하게, 하나 또는 그 이상의 조혈 매개변수들이 GDF 트랩 폴리펩티드의 투여량 또는 빈도의 감소후에도 수용가능한 범위 안에 오지 못한다면, 투약은 종료될 수 있다. GDF 트랩 폴리펩티드의 투약의 감소 또는 종료의 대안으로, 또는 추가적으로, 이 환자에게 바람직하지 못한 수준의 조혈 매개변수를 해결하는 추가 치료제, 이를 테면, 혈압을 낮추는 물질 또는 철 보충제가 투여될 수 있다. 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드로 치료되는 환자의 혈압이 상승된 경우, GDF 트랩 폴리펩티드의 투약은 동일 수준으로 지속될 수 있고, 혈압을 낮추는 물질은 처리 섭생에 추가되어, GDF 트랩 폴리펩티드의 투여량은 감소될 수 있고(가령, 양 및/또는 빈도) 그리고 혈압을 낮추는 물질이 처리 섭생에 추가되거나, 또는 GDF 트랩 폴리펩티드의 투약은 종료되고, 이 환자는 혈압을 낮추는 물질로 치료될 수 있다.

## 6. 약학 조성물

[0159] 특정 구체예들에서, 본 발명의 화합물들 (가령, GDF 트랩 폴리펩티드들)은 약제학적으로 수용가능한 운반체와 함께 제형화된다. 예를 들면, GDF 트랩 폴리펩티드는 단독으로 투여되거나 또는 약학 제제 (치료 조성물)의 성분으로 투여될 수 있다. 대상 화합물들은 인간 또는 수의학적 약물에 이용하기 위하여 임의의 통상적인 방식으로 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0160] 특정 구체예들에서, 본 발명의 치료 방법은 이 조성물을 전신으로 투여하거나, 또는 임플란트 또는 장치로 국소 투여하는 것을 포함한다. 투여될 때, 본 발명에서 이용되는 치료 조성물은 물론 발열물질-없는, 생리학적으로 수용가능한 형태이어야 한다. 상기에서 설명된 것과 같이 이 조성물안에 임의선택적으로 포함될 수 있는 GDF 트랩 폴리펩티드들을 제외한 치료에 유용한 물질들은 본 발명의 방법에서 대상 화합물들 (가령, GDF 트랩 폴리펩티드들)과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0161] 전형적으로, 화합물들은 장관외로 투여될 것이다. 장관외 투여용 약학 조성물은 하나 또는 그 이상의 약학적으로 수용가능한 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 혼탁액, 유액, 또는 사용 직전 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말들과 복합된 하나 또는 그 이상의 GDF 트랩 폴리펩티드를 포함할 수 있는데, 이것들은 제제에게 의도된 수용자의 혈액과 등장성을 제공하는 항산화제, 완충액, 정균제, 용질, 또는 혼탁 또는 농후 물질들을 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 이용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 운반체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(이를 테면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 이와 유사한 것들), 그리고 이의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 이를 테면, 올리브유, 그리고 주사용 유기 에스테르, 이를 테면, 에틸 올레이트를 포함한다. 예를 들면, 코딩 물질, 이를 테면, 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지시킴으로써, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유동성이 유지될 수 있다.

[0162] 더욱이, 이 조성물은 표적 조직 부위 (가령, 골수)로 운반하기 위한 형태로 포집 또는 주사될 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 표적 조직 부위 (가령, 골수)로 하나 또는 그 이상의 치료 화합물들(가령, GDF 트랩 폴리펩티드들)을 운반할 수 있는 매트릭스를 포함할 수 있는데, 이는 발달 조직을 위한 구조를 제공하고, 바람직하게는 신체 안으로 재흡수될 수 있다. 예를 들면, 매트릭스는 GDF 트랩 폴리펩티드들의 느린 방출을 제공할 수 있다. 이러한 매트릭스는 다른 이식된 의료 장치의 사용에 존재하는 물질로 형성될 수 있다.

[0163] 매트릭스 재료의 선택은 생체적합성, 생체분해성, 기계적인 성질, 미용적 외관 및 인터페이스 성질에 근거된다. 대상 조성물의 특정 용도는 적합한 제제를 한정지을 것이다. 조성물의 잠재적 매트릭스는 생분해가능하며, 황산 칼슘염, 인산삼칼슘염, 히드록시아파타이트, 폴리락트산 및 폴리안하이드리드로 화학적으로 특정될 수 있다. 다른 잠재적인 물질들은 생분해가능하고, 화학적으로 잘 특정화되는데, 이를 테면, 골 또는 피부 콜라겐이다.

추가 매트릭스는 순수 단백질들 또는 세포외 매트릭스 성분들을 포함한다. 다른 잠재적인 매트릭스는 비-생분해가능하며, 한, 그리고 이를 테면, 소결된 히드록시아파타이트, 바이오클라스, 알루미네이트, 또는 다른 세라믹으로 화학적으로 특정된다. 매트릭스는 상기 언급된 유형의 물질의 임의의 조합을 포함할 수 있는데, 이를 테면, 폴리락트산과 히드록시아파타이트 또는 콜라겐 및 인산삼칼슘염이 될 수 있다. 바이오세라믹은 조성물에서 변경될 수 있는데, 칼슘-알루미네이트-인산염에서 변경되는데, 포어 크기, 입자 크기, 입자 모양 및 생분해성을 변경시키기 위하여 처리될 수 있다.

[0164] 특정 구체예들에서, 본 발명의 방법들은 캡슐, 카세, 알약, 정제, 로젠지(풍미된 베이스, 통상적으로 슈크로즈, 아카시아 또는 트라가칸을 이용), 분말, 과립, 또는 용액 또는 수성 또는 비-수성 액체에 혼탁액, 또는 수중유 또는 유중수 액체 유액, 또는 엘록시르 또는 시럽 또는 향정(비활성 베이스, 이를 테면, 젤라틴 및 글리세린, 또는 슈크로즈 및 아카시아 이용)으로 경구 투여될 수 있고 및/또는 구강 세척제 및 이와 유사한 것으로 투여될 수 있으며, 각각은 활성 성분으로 예정된 양의 물질을 포함한다. 이 물질은 볼루스, 지약(electuary) 또는 페이스트로 투여될 수 있다.

[0165] 경구 투여용 고형 투약형(캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립 및 이와 유사한 것들)에서, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 치료 화합물들은 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 수용가능한 운반체, 이를 테면, 구연산나트륨 또는 인산이칼슘염, 및/또는 다음중 임의의 것과 함께 혼합될 수 있다: (1) 충전제 또는 증량제, 이를 테면, 전분, 락토즈, 슈크로즈, 포도당, 만니톨, 및/또는 규산; (2) 결합제, 이를 테면, 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로즈, 및/또는 아카시아; (3) 습윤제, 이를 테면, 글리세롤; (4) 봉해 물질들, 이를 테면, 한천-한천, 탄산 칼슘염, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 그리고 탄산나트륨염; (5) 용액 자체 물질들, 이를 테면, 파라핀; (6) 흡수 가속화제, 이를 테면, 4차 암모늄화합물들; (7) 습윤 물질들, 이를 테면, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 이를 테면, 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 활석, 스테아레이트 칼슘, 스테아레이트 마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴황산나트륨, 그리고 이의 혼합물; 그리고 (10) 발색 물질들. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약학 조성물은 또한 완충 물질들을 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고형 조성물은 락토즈 및 유당과 같은 부형제 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 및 이와 유사한 것들을 이용하여 연질 및 경질 젤라틴 캡슐에 충전물로 이용될 수 있다.

[0166] 경구 투여용 액체 투약형은 약학적으로 수용가능한 유액, 미소유액, 용액, 혼탁액, 시럽 및 엘록시르를 포함한다. 활성 성분에 추가적으로, 액체 투약형은 당분야에 흔히 이용되는 비활성 희석제, 이를 테면, 물 또는 기타 용매들, 가용화 물질들과 유화제, 이를 테면, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부티렌 글리콜, 오일(구체적으로, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 곡물, 올리브, 카스터, 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라하이드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 비활성 희석제 이외에도, 경구 조성물은 어쥬번트, 이를 테면, 가습 물질들, 유화 및 혼탁 물질들, 감미제, 풍미제, 발색, 향료 및 보존제 물질들을 또한 포함할 수 있다.

[0167] 활성 화합물들에 추가하여 혼탁액은 혼탁 물질들 이를 테면, 에통실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 그리고 소르비탄 에스테르, 미소결정 셀룰로오즈, 알부민 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천-한천, 및 트라가탄 그리고 이의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0168] 본 발명의 조성물은 어쥬번트, 이를 테면, 보존제, 가습 물질들, 유화 물질들 그리고 분산 물질들을 또한 함유 할 수 있다. 미생물 작용을 예방하기 위하여 다양한 항박테리아 및 항곰팡이 물질들, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 및 이와 유사한 것들을 포함시킬 수 있다. 등장성 물질들, 이를 테면, 슈가, 염화나트륨, 이와 유사한 것들을 조성물에 포함시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 추가적으로, 흡수를 지연시키는 물질, 이를 테면, 알부민 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 물질들을 포함시켜 얻을 수 있다.

[0169] 투약 섭생은 본 발명의 대상 화합물들(가령, GDF 트랩 폴리펩티드들)의 작용을 변경시키는 다양한 인자들을 고려하여 주치의가 결정할 수 있음을 인지할 것이다. 다양한 인자들은 환자의 붉은 혈액 세포 수, 헤모글로빈 수준 또는 다른 진단적 평가, 바람직한 표적 붉은 혈액 세포 수, 환자의 나이, 성별, 식사, 그리고 억압된 붉은 혈액 세포 수준에 기여하는 임의 질환의 심각성, 투여 시간 및 기타 임상 인자들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 최종 조성물에 기타 공지의 성장인자들의 추가 또한 투약에 영향을 줄 수 있다. 붉은 혈액 세포와 헤모글로빈 수준의 주기적 평가, 뿐만 아니라 망상적혈구 수준 및 조혈 과정의 다른 지표의 평가에 의해 진행과정이 감시될 수 있다.

- [0170] 특정 구체예들에서, 본 발명은 GDF 트랩 폴리펩티드들의 생체내 생산을 위한 유전자 치료법을 또한 제공한다. 이러한 치료법은 상기 열거된 장애들을 가진 세포 또는 조직으로 GDF 트랩 폴리펩티드를 도입시켜 치료 효과를 획득할 수 있다. GDF 트랩 폴리뉴클레오티드 서열들의 운반은 재조합 발현 벡터 이를 테면, 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산 시스템을 이용하여 획득될 수 있다. GDF 트랩 폴리뉴클레오티드 서열들의 바람직한 치료 운반은 표적화된 리포좀의 이용이다.
- [0171] 본 명세서에서 교시되는 유전자 치료법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스성 벡터들은 아데노바이러스, 포진 바이러스, 우두, 또는 RNA 바이러스 이를 테면, 레트로바이러스를 포함한다. 레트로바이러스성 벡터는 뮤린 또는 조류 레트로바이러스의 유도체일 수 있다. 단일 외부 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스성 벡터들의 예로는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: Moloney 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), Harvey 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 그리고 Rous 육종 바이러스 (RSV). 다수의 추가적인 레트로바이러스성 벡터들은 다중 유전자를 혼입시킬 수 있다. 이들 모든 벡터들은 선택성 지표용 유전자를 전달 또는 혼입시킬 수 있고, 형질유도된 세포들이 생성되거나 식별될 수 있다. 레트로바이러스성 벡터들은 예를 들면, 당, 당지질, 또는 단백질을 부착시킴으로써 표적-특이적으로 만들어질 수 있다. 항체를 이용한 바람직한 표적화가 실행된다. 당업자는 특이적 폴리뉴클레오티드 서열들이 레트로바이러스성 계놈 안으로 삽입되거나 또는 바이러스성 외피에 부착되어, GDF 트랩 폴리뉴클레오티드를 포함하는 레트로바이러스성 벡터의 표적 특이적 운반이 가능해진다는 것을 인지할 것이다.
- [0172] 대안으로, 조직 배양물 세포들은 통상적인 인산칼슘 형질감염에 의해 레트로바이러스성 구조 유전자 gag, pol 및 env를 인코드하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포들은 관심 유전자를 포함하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성된 세포들은 레트로바이러스성 벡터를 배양 배지로 방출시킨다.
- [0173] GDF 트랩 폴리뉴클레오티드의 또다른 표적화된 운반 시스템이 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템들은 거대분자 복합체들, 나노입자들, 미소구, 비드 및 수중유 유액을 포함하는 지질-기반 시스템, 미셀, 혼합된 미셀 및 리포좀을 포함한다. 본 발명의 선호되는 콜로이드성 시스템은 리포좀이다. 리포좀은 시험관 및 생체에서 운반 비이클로 유용한 인공 막 소포다. RNA, DNA 및 고유 비리온은 수성 내부 안에 포획될 수 있고, 그리고 생물학적으로 활성 형태로 세포에 전달될 수 있다 (가령, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981 참고). 리포좀 비이클로 이용한 효과적인 유전자 전달 방법들은 당분야에 공지되어 있다, 가령, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. 리포좀 조성물은 스테로이드, 특히 콜레스테롤과 보통 복합된 복합 인지질이다. 다른 인지질 또는 다른 지질이 또한 이용될 수 있다. 리포좀의 물리적 성질은 pH, 이온 강도 및 이가 양이온의 존재에 따라 달라진다.
- [0174] 리포좀 생산에 유용한 지질의 예로는 포스파티딜 화합물들, 이를 테면, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 스핀고리피드, 세레브로시드 및 강글리오시드를 포함한다. 설명을 위한 인지질은 난황 포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린, 그리고 디스테아로일포스파티딜콜린을 포함한다. 리포좀의 표적화는 예를 들면, 장관-특이성, 세포-특이성, 그리고 세포 기관-특이성에 근거할 수 있으며, 당분야에 공지되어 있다.
- [0175] **구체예**
- [0176] 현재 본 발명은 일반적으로 설명되지만, 다음의 실시예를 참고로 하면 더 잘 이해될 것이며, 다음의 실시예는 오로지 본 발명의 특정 구체예들의 설명을 위하여 포함된것이며, 본 발명을 제한시키려는 의도는 없다.
- [0177] **실시예 1. GDF 트랩의 생성.**
- [0178] 출원인은 다음과 같이 GDF 트랩을 만들었다. GDF11 및/또는 미오스타틴과 비교하여 상당히 감소된 액티빈 A 결합을 가진 변형된 ActRIIB의 세포외 도메인을 가지는 폴리펩티드 (서열 번호: 1의 위치 79에서 류신에서 아스파르테이트로의 치환 결과)는 인간 또는 마우스 Fc 도메인에 융합되는데 이들 사이에 최소 링커(3개 글리신 아미노산)가 있었다. 이 구조체들은 차례로 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 및 ActRIIB(L79D 20-134)-mFc로 지칭된다. 위치 79에서 아스파르테이트를 대신하여 글루타메이트로의 대체 형태(L79E)도 유사하게 진행되었다. 서열 번호: 7의 위치 226에서 발린 대신 알라닌으로의 대체 형태 또한 생성되었고, 테스트된 모든 측면에서 대등하게 진행되었다. 위치 79에서 아스파르테이트(서열 번호: 1에 대해, 또는 서열 번호: 7에 대해 위치 60)는 하기 회색으로 강조되었다. 서열 번호: 7에 대해 위치 226에서 발린 또한 하기 회색으로 강조된다.

[0179] GDF 트랩 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc는 CHO 세포 계통으로부터 정제된 것을 다음과 같이 나타낸다(서열 번호: 7).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK  
 GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT  
APGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL

LSPGK

[0180] GDF 트랩의 ActRIIB-유도된 부분은 다음의 아미노산 서열(서열 번호: 32)을 보유하고, 이 부분은 단량체로 이용되거나, 또는 단량체, 이합체 또는 그 이상의 차수의 복합체로써 비-Fc 융합 단백질로 이용될 수 있다.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE  
 LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE

PPPTAPT (서열 번호: 32)

[0183] GDF 트랩 단백질은 CHO 세포 계통에서 발현되었다. 3가지 상이한 리더 서열들이 고려되었다:

(i) 꿀벌 멜리틴 (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (서열 번호: 8)

(ii) 조직 플라스미노겐활성물질 (TPA): MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (서열 번호: 9)

(iii) 고유: MTAPWVALALLWGSLCAGS (서열 번호: 10).

[0187] 선택된 형태는 TPA 리더를 이용하고, 다음의 처리안된 아미노산 서열을 보유한다:

MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE  
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE  
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 11)

[0188]

[0189] 이 폴리펩티드는 다음의 핵산 서열 (서열 번호: 12)에 의해 인코드된다:

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT  
 CGCCCGGCGC CTCTGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA  
 ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA  
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA  
 AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGC GGAGTGTGTG GCCACTGAGG  
 AGAACCCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC  
 ATTGCCCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCCCACCG  
 GTGGTGGAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG  
 TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA  
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG  
 ACGCGCTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT  
 ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA  
 AGTGCAGGTCCTTCTCAACAAA GCCCCTCCAG TCCCATGCA GAAAACCATC TCCAAAGGCCA  
 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA  
 AGAACCCAGGT CAGCCTGACCC TGCCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG  
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACCA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT  
 CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG  
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCAACTAC ACGCAGAAGA  
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0190]

[0191] 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계, 예를 들면, 다음중 3개 또는 그 이상의 것을 임의의 순서로 이용하여 정제될

수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다. 정제 과정의 예로써, 세포 배양 배지는 단백질 A 컬럼을 통과시키고, 150 mM Tris/NaCl (pH 8.0)에서 세척되며, 그 다음 50 mM Tris/NaCl (pH 8.0)에서 세척되며, 그리고 0.1 M 글리신, pH 3.0으로 용리되었다. 낮은 pH 용리물은 바이러스 제거 단계로 실온에서 30분간 유지된다. 그 다음 용리물이 중화되고, Q 세파로즈 이온 교환 컬럼을 통과하고, 그리고 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl에서 세척되고, 150 mM 내지 300 mM의 NaCl 농도와 함께, 50 mM Tris pH 8.0에서 용리되었다. 그 다음 용리물은 50 mM Tris pH 8.0, 1.1 M 황산암모늄으로 변화되고, 페닐 세파로즈 컬럼을 통과하고, 세척되고, 그리고 150 내지 300 mM의 황산암모늄과 함께, 50 mM Tris pH 8.0에서 용리되었다. 용리물은 투석되고, 사용을 위하여 여과된다.

[0192] 추가적인 GDF 트랩 (미오스타틴 또는 GDF11에 대해 액티빈 A 결합 비율을 감소시키기 위하여 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질)은 PCT/US2008/001506 및 WO 2006/012627에서 설명되며, 이는 전문이 명세서의 참고자료에 편입된다.

### [0193] 실시예 2. GDF-11 및 액티빈-중재된 신호생성에 대한 생물분석.

[0194] A-204 리포터 유전자 분석을 이용하여 GDF-11 및 액티빈 A에 의한 신호생성에서 ActRIIB-Fc 단백질들 및 GDF 트랩의 영향을 평가하였다. 세포 계통: 인간 횡문근육종 (근육으로부터 유도된). 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12 (Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100에서 설명됨). CAGA12 모티프는 TGF-베타 반응성 유전자 (PAI-1 유전자)에 존재하고, 따라서 이 벡터는 인자들 신호생성 내지 Smad2 및 3에 일반적으로 이용된다.

[0195] 1일차: Split A-204 세포를 48-웰 플레이트로 나눈다.

[0196] 2일차: 10 ug pGL3(CAGA)12 또는 pGL3(CAGA)12(10 ug)+ pRLCMV (1 ug) 및 Fugene로 형질감염된 A-204 세포.

[0197] 3일차: 인자들을 추가한다 (배지+ 0.1 % BSA로 희석됨). 저해제는 세포에 추가하기 전에 1시간 동안 인자들과 사전배양되어야 한다. 6 시간 후, 세포들은 PBS로 헹구고, 세포를 용해시킨다.

[0198] 루시퍼라제 분석이 이어진다. 임의의 저해제 없이, 액티빈 A는 리포터 유전자 발현의 10배 자극을 보여주었고, 그리고 ED50 ~ 2 ng/ml. GDF-11: 16 배 자극, ED50: ~ 1.5 ng/ml.

[0199] ActRIIB(20-134)는 이 분석에서 액티빈, GDF-8 및 GDF-11 활성의 강력한 저해제다. 이 분석에서 변이체들도 테스트되었다.

### [0200] 실시예 3. N-말단 및 C-말단 절두에 의한 GDF-11 저해

[0201] N-말단 및/또는 C-말단에서 절두를 가진 ActRIIB(20-134)-hFc 변이체를 만들고, GDF-11 및 액티빈의 저해제로써 활성에 대해 테스트되었다. 활성은 다음과 같이 나타났다(조건화 배지에서 특정됨):

[0202] C-말단 ActRIIB-hFc 절두:

	IC50 (ng/mL)	
	GDF-11	액티빈
ActRIIB(20-134)-hFc	45	22
ActRIIB(20-132)-hFc	87	32
ActRIIB(20-131)-hFc	120	44
ActRIIB(20-128)-hFc	130	158

[0203]

[0204] 나타낸 것과 같이, 3개 절두(PPT로 끝남), 6개 절두(YEP로 끝남) 또는 C-말단에서 더 많은 아미노산의 절두는 이 분자의 활성이 3배 또는 그 이상의 감소를 야기한다. ActRIIB 부분의 최종 15개 아미노산 절두는 더 큰 활성 손실을 야기한다(WO2006/012627 참고).

[0205] ActRIIB(20-131)-hFc 단백질의 배경에서 아미노 말단 절두가 있었다. 활성은 다음과 같이 나타낸다(조건화배

지에서 측정됨):

[0206] N-말단 ActRIIB-hFc 절두:

	IC50 (ng/mL)	
	GDF-11	액티빈
ActRIIB(20-131)-hFc (GRG...)	183	201
ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...)	121	325
ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...)	71	100
ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...)	60	43
ActRIIB(24-131)-hFc (AET...)	69	105

[0207]

따라서, N-말단으로부터 2개, 3개, 또는 4개 아미노산의 절두는 전장 세포와 도메인을 가진 형태보다 더 활성이 큰 단백질의 생산으로 이어진다. 추가적인 실험에서 5개 아미노산의 절두, ActRIIB(25-131)-hFc는 절두안된 형태와 대등한 활성을 보유하며, N-말단에서 추가적인 결손은 이 단백질의 활성 손상이 지속됨을 보여준다. 따라서, 최적 구조체들은 서열 번호: 1의 아미노산 133-134 사이에 C-말단을 가지고, 그리고 서열 번호: 1의 아미노산 22-24에서 N-말단이 시작될 것이다. 아미노산 21 또는 25에 상응하는 N-말단은 ActRIIB(20-134)-hFc 구조체의 것과 유사한 활성을 제공할 것이다. 이를 절두는 GDF 트랩, 이를 테면, L79D 또는 L79E 변이체에서 또한 이용될 수 있다.

[0209] 실시예 4. ActRIIB-Fc 변이체, 세포-기반 활성.

[0210] ActRIIB-Fc 단백질들 및 GDF 트랩의 활성은 상기에서 설명된 것과 같이 세포 기반 분석에서 테스트되었다. 결과는 아래 표에 요약된다. 일부 변이체들은 상이한 C-말단 절두 구조체들에서 테스트되었다. 위에서 논의된 바와 같이, 5 또는 15개 아미노산의 절두는 활성의 감소를 유발시켰다. GDF 트랩 (L79D 및 L79E 변이체)들은 액티빈 결합의 실질적인 손실을 보유주는 반면 GDF-11의 야생형 저해를 거의 유지하고 있었다.

[0211]

GDF11 및 액티빈 A에 가용성 ActRIIB-Fc 결합:

ActRIIB-Fc 변이	ActRIIB의 부분(서열 번호: 1의 아미노산에 상응)	GDF11 저해 활성	액티빈 저해 활성
R64	20-134	+++ (대략. $10^{-8}$ M K <sub>I</sub> )	+++ (대략. $10^{-8}$ M K <sub>I</sub> )
A64	20-134	+( 대략. $10^{-6}$ M K <sub>I</sub> )	+( 대략. $10^{-6}$ M K <sub>I</sub> )
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

+ 부진한 활성 (어림잡아  $1 \times 10^{-6}$  KI)++ 중간 활성 (어림잡아  $1 \times 10^{-7}$  KI)+++ 양호한 (야생형) 활성 (어림잡아  $1 \times 10^{-8}$  KI)

++++ 야생형 활성보다 더 큰

[0212]

랫트에서 혈청 반감기에 대해 몇가지 변이체들이 평가되었다. ActRIIB(20-134)-Fc는 대략적으로 70 시간의 혈청 반감기를 보유한다. ActRIIB(A24N 20-134)-Fc는 대략적으로 100-150 시간의 혈청 반감기를 보유한다. A24N 변이체는 세포-기반 분석 (상기) 및 생체내 분석 (하기)에서 야생형 분자와 대등한 활성을 보유한다. 더 긴 반감기와 함께, 시간이 경과함에 따라 A24N 변이체는 야생형 분자보다 단위 단백질당 더 큰 효과를 제공할 것이다. A24N 변이체, 그리고 상기에서 테스트된 임의의 다른 변이체들은 GDF 트랩 분자들과 복합될 수 있는데, 이를 테면, L79D 또는 L79E 변이체가 된다.

[0214]

실시예 5. GDF-11 및 액티빈 A 결합.

특정 ActRIIB-Fc 단백질들 및 GDF 트랩이 리간드들에 결합하는 것을 BiaCoreTM 분석에서 테스트하였다.

ActRIIB-Fc 변이체 또는 야생형 단백질은 항-hFc 항체를 이용하여 시스템 상에서 포획되었다. 리간드가 주입되었고, 포획된 수용체 단백질들 위로 유동되었다. 결과는 다음 표에 요약된다.

[0217]

리간드 결합 특이성 IIB 변이체.

GDF11			
단백질	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1.21e-6	6.35e-5	5.19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.77e-5	2.41e-5	3.56e-11
GDF8			
단백질	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2.25e-5	4.71e-5	2.1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11
액티빈A			
단백질	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			낮은 결합
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			낮은 결합
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7.46e6	6.28e-4	8.41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11

[0218]

[0219] 이들 데이터는 A24N 변이체가 ActRIIB(20-134)-hFc 분자의 활성과 유사한 리간드-결합 활성을 유지하고, 그리고 L79D 또는 L79E 분자는 미오스타틴과 GDF11 결합을 유지하지만, 액티빈 A에 대한 결합은 눈에 띄게 감소된 것(정량화할 수 없음)을 보여준다는 세포 기반 분석 데이터를 확인시켜준다.

[0220]

다른 변이체들도 생성되었고, 그리고 WO2006/012627 (이는 전문이 명세서의 참고자료에 편입된다) 가령, pp. 59-60에서 보고된 바와 같이, 장치에 결합된 리간드를 이용하고, 결합된 리간드위로 수용체를 흘려보냄으로써, 다른 변이체들을 테스트하였다. 특히, K74Y, K74F, K74I (그리고 K74에서 추정컨대 다른 소수성 치환, 이를 테면, K74L), 및 D80I는 야생형 K74 분자와 비교하여 GDF11 결합에 대한 액티빈 A 결합의 비율 감소를 유발한다. 이들 변이체들에 대한 데이터 표는 아래 만들었다:

[0221]

GDF11 및 액티빈 A에 대한 가용성 ActRIIB-Fc 변이체 결합 (BiaCore 분석)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8.6e-8M (+++)
+15tail	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M +++++	KD=5.3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

\* 관찰된 결합이 없음

-- &lt; 1/5 WT 결합

- ~ 1/2 WT 결합

+ WT

++ &lt; 2x 증가된 결합

+++ ~5x 증가된 결합

++++ ~10x 증가된 결합

+++++ ~ 40x 증가된 결합

[0222]

실시예 6. ActRIIB-hFc는 인간이 아닌 영장류에서 적혈구생성을 촉진한다.

[0223]

ActRIIB(20-134)-hFc (IgG1)는 피하 주사를 통하여 암수 계집이 원숭이들에게 1개월 동안 1주일에 1회 투여되었다. 48마리의 계집이 원숭이 (성별당 24마리)를 4개 처리군 중 하나에 할당하였고(집단 및 성별당 6마리), 4주간 주당 1회씩 3, 10, 또는 30 mg/kg(총 5회 용량)으로 비이를 또는 ActRIIB-hFc를 피하 주사로 투여받았다. 평가된 매개변수들은 일반적인 임상 병리(혈액학, 임상 화학, 응결, 그리고 소변 분석)이 포함되었다. ActRIIB-hFc는 처리된 동물들에서 15일 시점까지 통계학적으로 유의적으로 상승된 평균 절대 망상적혈구 값을 유발시켰다. 36일 시점에 ActRIIB-hFc는 상승된 평균 절대 망상적혈구 및 붉은 혈액 세포 폭 값을 더 낮은 평균 혈구 헤모글로빈 농도를 포함하는, 몇 가지 혈액학적 변화를 유발시켰다. 모든 처리된 집단 및 양쪽 성별 모두 영향을 받았다. 이러한 영향은 골수로부터 미숙한 망상적혈구의 방출시 ActRIIB-hFc의 양성 효과와 일치한다. 이 효과는 약물이 처리된 동물로부터 셧겨나온 후(연구 56일차) 역전되었다. 따라서, 우리는 ActRIIB-hFc가 적혈구생성을 촉진시킨다는 결론을 내린다.

[0225] 실시예 7. ActRIIB-mFc는 비장의 적혈구생성 활성의 자극에 의해 마우스에서 적혈구 생성 양태를 촉진시킨다.

[0226] 본 연구에서, 골수 및 비장에서 조혈 선조들의 빈도에서 ActRIIB(20-134)-mFc 의 생체내 투여 영향이 분석되었다. C57BL/6 마우스의 한 집단에 대조군으로 PBS가 주사되었고, 마우스의 두 번째 집단에는 ActRIIB-mFc가 10 mg/kg에서 2회 용량으로 투여되었고, 이 두 집단 모두 8일 후에 희생되었다. 말초 혈액은 완전한 혈액 계산에 이용되었고, 대퇴골과 비장은 각 장기에서 임파, 적혈구 그리고 골수 선조 세포 내용을 분석하는 시험관 세포집락(clonogenic) 분석을 실시하는데 이용되었다. 본 연구의 간략한 시간 틀에서, 처리된 마우스의 붉은 혈액 세포, 혜모글로빈 또는 백색 혈액 세포 수준에 있어서 유의적인 변화는 없었다. 대퇴부에서, 대조군과 처리군 사이에 핵화된 세포 수와 선조 함량간에 차이는 없었다. 비장에서, 이 화합물 처리된 집단은 접시당 성숙한 적혈구의 선조 (CFU-E) 콜로니 수, 비장당 총 선조 수 및 빈도에서 통계학적으로 유의적인 증가가 있었다. 추가적으로, 비장당 골수 (CFU-GM), 미숙한 적혈구 (BFU-E)의 수 및 총 선조 수에서 증가가 있었다.

[0227] 동물:

[0228] 6-8주령의 16마리의 C57BL/6 암컷 마우스가 본 연구에 이용되었다. 8마리 마우스에게 1일차와 3일차에 10 mg/kg의 용량으로 테스트 화합물 ActRIIB-mFc을 피하 주사하였고, 그리고 8마리 마우스에게 마우스 당 100  $\mu$ L 용적으로 비이를 대조군, 인산염 완충된 염(PBS)으로 피하 주사하였다. 모든 마우스는 관련 동물 보호 지침에 따라 첫 주사후 8일 시점에 희생되었다. 개별 동물의 말초 혈액 (PB) 시료들은 심장에 구멍을 통하여 수집되었고, 이는 온전한 혈액 수 및 차등 (CBC/Diff)에 이용되었다. 각 마우스로부터 대퇴부 및 비장도 수거되었다.

[0229] 실행된 테스트:

[0230] CBC/Diff 카운트

[0231] 각 마우스의 PB는 심장 구멍을 통하여 수집되었고, 적합한 미세 튜브 안에 두었다. 시료는 CellDyn 3500 카운터 상에서 분석을 위하여 CLV로 보내졌다.

[0232] 세포집락 분석

[0233] 골수, 적혈구 및 임파 계통의 세포집락 선조들은 하기에서 설명된 것과 같이 시험관내 메틸셀룰로오스-기반 배지 시스템을 이용하여 평가되었다.

[0234] 성숙한 적혈구의 선조들:

[0235] 성숙한 적혈구의 (CFU-E) 계통의 세포집락 선조들은 재조합 인간 (rh) 에리트로포에틴 (3 U/mL)을 함유하는 메틸셀룰로오스-기반 배지에서 배양되었다.

[0236] 임파 선조들:

[0237] 임파 (CFU-pre-B) 계통의 세포집락 선조들은 rh 인터루킨 7 (10 ng/mL)을 함유하는 메틸셀룰로오스-기반 배지, MethoCult® 3630에서 배양되었다.

[0238] 골수 및 미숙한 적혈구의 선조들:

[0239] 과립구-단세포(CFU-GM), 적혈구의 (BFU-E) 그리고 다형잠재적 (CFU-GEMM) 계통의 세포집락 선조들은 재조합 뮤린 (rm) 출기 세포 인자 (50 ng/mL), rh 인터루킨 6 (10 ng/mL), rm 인터루킨 3 (10 ng/mL) 그리고 rh 에리트로포에틴 (3 U/mL)을 포함하는 메틸셀룰로오스-기반 배지, MethoCult™ 3434에서 배양되었다.

[0240] 방법:

[0241] 마우스 대퇴 및 비장은 표준 프로토콜에 따라 처리되었다. 간략하게 설명하자면, 골수는 대퇴 강으로 2% 태아소 혈청 (IMDM 2% FBS)을 포함하는 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지를 21 가우지 바늘 및 1cc 주사기를 이용하여 세정함으로써 획득되었다. 비장 세포들은 70  $\mu$ M 필터를 통하여 비장을 분쇄시키고, 필터는 IMDM 2% FBS로 헹궈냄으로써 획득되었다. 3% 빙초산에서 핵화된 세포 카운트는 Neubauer 카운팅 챔버를 이용하여 단일 세포 혼탁액에서 실행되어, 장기당 총 세포가 산출될 수 있다. 오염된 붉은 혈액 세포들을 제거하기 위하여, 전체 비장 세포들은 염화암모늄 용해 완충액 3배 용적으로 희석되었고, 열음위에서 10분간 항온처리되었다. 그 다음 세포는 IMDM 2% FBS에서 세척되었고, 재현탁되었으며, 용해 이후 세포의 세포 농도를 결정하기 위하여 두 번째 세포 카운트가 실행되었다.

[0242] 세포 저장분을 만들고, 각 배지 제제에서 각 조직에 최적의 도말 농도를 얻기 위하여 각 메틸셀룰로오스-기반

배지 제제에 추가하였다. 골수 세포는 성숙한 적혈구의 선조들을 평가하기 위하여 MethoCult™ 3334에서 접시당  $1 \times 10^5$  세포로 도말되었고, 임파 선조들을 평가하기 위하여 MethoCult™ 3630에서 접시당  $2 \times 10^5$  세포로 도말되었고, 그리고 미숙한 적혈구 및 골수 선조들을 평가하기 위하여 MethoCult™ 3434에서 접시당  $2 \times 10^5$  세포로 도말되었다. 비장 세포들은 성숙한 적혈구의 선조들을 평가하기 위하여 MethoCult™ 3334에서 접시당  $4 \times 10^5$  세포로 도말되었다. 임파 선조들을 평가하기 위하여 MethoCult™ 3360에서 접시당  $4 \times 10^5$  세포로 도말되었고, 그리고 미숙한 적혈구 및 골수 선조들을 평가하기 위하여 MethoCult™ 3434에서 접시당  $2 \times 10^5$  세포로 도말되었다. 삼중 접시에 도말된 배양물은 숙련자들에 의해 콜로니 계수(colony enumeration) 및 평가가 실행될 때까지 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양되었다. 성숙한 적혈구의 선조들은 2일간 배양되었고, 임파 선조들은 7일간 배양되었고, 그리고 골수 선조들은 12일간 배양되었다.

[0243] 분석:

[0244] 모든 데이터 세트에 있어서 평균 +/- 1 표준 편차는 세포집락의 삼중 배양물, 대조군 및 처리군에 대하여 산출되었다.

[0245] 각 조직에서 콜로니 형성 세포(CFC) 빈도는 다음과 같이 산출되었다:

[0246] 배양접시당 도말된 세포

[0247] 배양접시당 획득된 평균 CFC

[0248] 대퇴 또는 비장당 총 CFC는 다음과 같이 산출되었다:

[0249] 획득된 총 CFC x 대퇴 또는 비장당 핵회된 세포 (RBC 용해 이후)

[0250] 배양된 핵화된 세포의 수

[0251] 표준 t-테스트는 PBS 조절 마우스와 화합물 처리된 마우스 사이에서 세포 또는 조혈 선조들의 평균 수에 차이가 있는지를 평가하기 위하여 실행되었다. 콜로니 계수의 잠재적 주관성으로 인하여 0.01 미만의 p 값을 유의미적으로 간주된다. 각 집단의 평균 값(+/ - SD)은 다음 표에 나타낸다.

[0252] 표: 조혈 매개변수들

처리군	백색 혈액 세포 ( $\times 10^9/L$ )	붉은 혈액 세포들 ( $\times 10^9/L$ )	헤모글로빈 (g/L)	헤마토크리트 (L/L)
PBS (n=8)	9.53 +/- 1.44	10.5 +/- 1.1	160.9 +/- 13.3	0.552 +/- 0.057
ActRIIB-mFc (n=8)	9.77 +/- 1.19	10.8 +/- 0.3	162.1 +/- 4.1	0.567 +/- 0.019

[0253] 표: 대퇴 및 비장으로부터 CFC

처리군	대퇴당 총 CFC	비장당 총 CFC	대퇴당 총 CFU-E	비장당 총 CFU-E
PBS (n=8)	88 +/- 10	54 +/- 14	156 +/- 27	131 +/- 71
ActRIIB-mFc (n=8)	85 +/- 9	79 +/- 6*	164 +/- 23	436 +/- 86*

[0254] \* 예비 분석은 p<0.05을 나타낸다.

[0255] 본 연구의 짧은 기간들에서 ActRIIB(20-134)-mFc로 마우스를 처리하여도 붉은 혈액 세포 또는 헤모글로빈 내용에서 유의미적인 증가를 초래하지는 않았다. 그러나, 선조 세포 함량에서 효과는 주목할 만하였다. 대퇴에서

대조군과 처리군사이에 핵화된 세포수 또는 선조 함량에 차이는 없었다. 비장에서, 화합물 처리된 집단은 붉은 혈액 세포 용해 이전에 핵화된 세포 수와 배양접시당 성숙한 적혈구의 선조 (CFU-E) 콜로니 수, 비장당 총 선조의 수 및 빈도에서 통계학적으로 유의적인 증가를 경험하였다. 추가적으로, 비장당 골수 (CFU-GM)의 수, 미숙한 적혈구 (BFU-E)의 수 그리고 총 선조 수에서 증가를 볼 수 있었다. 따라서, 오랜 시간 과정에 걸쳐 ActRIIB(20-134)-mFc 처리는 상승된 붉은 혈액 세포 및 혈모글로빈 함량을 상승시킬 수 있을 것으로 예상된다.

[0257] 실시예 8: GDF 트랩은 생체내 붉은 혈액 세포 수준을 증가시킨다

[0258] 12주령의 수컷 C57BL/6NTac 마우스를 두 처리군중 하나에 할당하였다(N=10). 마우스에게 4주간 주당 2회씩 10 mg/kg에서 비이클 또는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드 ("GDF 트랩") [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc]를 피하주사로 투여하였다. 연구 종료시, 전혈을 심장 구멍에 의해 EDTA를 포함하는 투브로 수거하였고, HM2 혈액학 분석기 (Abaxis, Inc)를 이용하여 세포 분포에 대하여 분석하였다.

[0259] 집단 지정

집단	N	마우스	주사	투여량 (mg/kg)	경로	빈도
1	10	C57BL/6	PBS	0	SC	주당 2회
2	10	C57BL/6	GDF 트랩 [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc]	10	SC	주당 2회

[0260] [0261] GDF 트랩으로의 처리는 비이클 대조군과 비교하였을 때, 백색 혈액 세포(WBC)의 수에 통계학적으로 유의적인 영향이 없었다. 붉은 혈액 세포 (RBC) 수는 대조군과 비교하여 처리군에서 증가되었다(하기 표 참고). 혈모글로빈 함량 (HGB) 및 혈마토크립 (HCT)은 모두 추가적인 붉은 혈액 세포들로 인하여 또한 증가되었다. 붉은 혈액 세포들 (RDWc)의 평균 폭은 처리된 동물에서 더 높았고, 이는 미숙한 붉은 혈액 세포들의 모둠에서 증가를 나타낸다. 따라서, GDF 트랩으로의 처리는 붉은 혈액 세포들의 증가로 이어지지만, 백색 혈액 세포 집단에서는 눈에 띄는 효과는 없었다.

[0262] 혈액학 결과

	RBC $10^12/L$	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	10.7 ± 0.1	14.8 ± 0.6	44.8 ± 0.4	17.0 ± 0.1
GDF 트랩	12.4 ± 0.4**	17.0 ± 0.7*	48.8 ± 1.8*	18.4 ± 0.2**

\*=p<0.05, \*\*= p<0.01

[0264] 실시예 9: GDF 트랩은 생체내 붉은 혈액 세포 수준의 증가에 있어서 ActRIIB-Fc보다 우위에 있다.

[0265] 19주령의 수컷 C57BL/6NTac 마우스는 세집단중 하나에 무작위로 할당되었다. 마우스에게 3주간 주당 2회씩 피하 주사를 통하여 비이클 (10 mM Tris Buffered Saline, TBS), 야생형 ActRIIB(20-134)-mFc, 또는 GDF trap ActRIIB(L79D 20-134)-hFc가 투여되었다. 혈액은 기침에서 그리고 투약 3주후에 뺨 출혈을 통하여 수집되었고, 혈액학 분석기(HM2, Abaxis, Inc.)를 이용하여 세포 분석되었다.

[0266] ActRIIB-Fc 또는 GDF로의 처리는 비이클 대조군과 비교하여 백색 혈액 세포 (WBC) 수에 있어서 유의미적인 효과는 없었다. 붉은 혈액 세포 카운트(RBC), 혈마토크립 (HCT), 및 혈모글로빈 수준은 모두 대조군 또는 야생형 구조체와 비교하였을 때 GDF 트랩 처리된 마우스에서 상승되었다(하기 표 참조). 따라서, 직접적인 비교에서, GDF 트랩은 야생형 ActRIIB-Fc 단백질보다 유의적으로 더 큰 수준으로 붉은 혈액 세포들의 증가를 촉진시킨다.

사실, 이 실험에서, 야생형 ActRIIB-Fc 단백질은 붉은 혈액 세포들에서 통계학적 유의적인 증가를 유발하지 않고, 이는 이 효과를 밝히기 위해서는 더 긴 또는 더 높은 투약이 필요하다는 것을 암시한다.

[0267] 투약 3주 후 혈액학 결과

	<b>RBC (10<sup>12</sup>/ml)</b>	<b>HCT %</b>	<b>HGB g/dL</b>
<b>TBS</b>	11.06 ± 0.46	46.78 ± 1.9	15.7 ± 0.7
<b>ActRIIB-mFc</b>	11.64 ± 0.09	49.03 ± 0.3	16.5 ± 1.5
<b>GDF 트랩</b>	13.19 ± 0.2**	53.04 ± 0.8**	18.4 ± 0.3**

\*\*=p<0.01

[0269] 실시예 10. 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩 생성

[0270] 실시예 1에서 설명된 것과 같이, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc라고 불리는 GDF 트랩은 류신을 아스파르테이트로의 치환 (서열 번호: 1의 잔기 79에서)과 인간 Fc 도메인의 C-말단에 최소 링커 (3개 글리신 잔기)를 포함하는 ActRIIB 세포의 도메인 (서열 번호: 1의 잔기 20-134)에 TPA 리더의 N-말단 융합에 의해 생성되었다 (도 3). 이 융합 단백질에 대응하는 뉴클레오티드 서열은 도 4에 나타낸다.

[0271] ActRIIB(L79D 25-131)-hFc라고 불리는 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩은 류신을 아스파르테이트로의 치환 (서열 번호: 1의 잔기 79에서)과 인간 Fc 도메인의 C-말단에 최소 링커 (3개 글리신 잔기)를 포함하는 ActRIIB 세포의 도메인 (서열 번호: 1의 잔기 25-131)에 TPA 리더의 N-말단 융합에 의해 생성되었다 (도 5). 이 융합 단백질에 대응하는 뉴클레오티드 서열은 도 6에 나타낸다.

[0272] 실시예 11. 이중-절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩에 의한 선택적 리간드 결합

[0273] 몇 가지 리간드에 대한 GDF 트랩 및 기타 ActRIIB-hFc 단백질들의 친화력은 Biacore™ 기구로 시험관에서 평가되었다. 결과는 하기 표에 요약된다. Kd 값은 복합체의 매우 신속한 결합 및 해리로 인하여  $k_{on}$  및  $k_{off}$ 의 정확한 측정이 방해되어 안정-상태(steady-state) 친화력 피트에 의해 획득되었다.

[0274] ActRIIB-hFc 변이체들의 리간드 선택성:

융합 구조체	액티빈 A (Kd e-11)	액티빈 B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350.0	78.8	12.3
ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1
ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290.0	62.1	7.4

[0275] 절두된 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc은 액티빈 A 및 액티빈 B 결합의 심각한 손실을 가진 더 긴 변이체, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc에 의해 나타나는 리간드 선택성과 대등하거나 또는 초월하였는데, 이는 L79D 치환이 없는 ActRIIB-hFc 대응부와 비교하여 GDF11 결합이 거의 온전하게 유지된다. 절두 만으로(L79D 치환 없이)는 본 명세서에서 나타난 리간드 간의 선택성을 변경시키지 않는다[ActRIIB(L79 25-131)-hFc와 ActRIIB(L79 20-134)-hFc의 비교].

[0277] 실시예 12. 대안 뉴클레오티드 서열들을 가진 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 생성

[0278] ActRIIB(L79D 25-131)-hFc를 만들기 위하여, 고유의 위치 79 (서열 번호: 1)에서 아스파르테이트 치환과 N-말단 및 C-말단 절두를 가진 인간 ActRIIB 세포의 도메인(서열 번호: 1에서 잔기 25-131)은 고유의 ActRIIB 리더를

대신하여 TPA 리더 서열로 N-말단 융합되고, 그리고 최소 링커(3개 글리신 잔기)를 통하여 인간 Fc 도메인으로 C-말단 융합되었다(도 5). 이 융합 단백질을 인코드하는 하나의 뉴클레오티드 서열은 도 6 (서열 번호: 27)에 나타내고, 동일한 융합 단백질을 정확하게 인코드하는 대안 뉴클레오티드 서열은 도 9 (서열 번호: 30)에 나타낸다. 이 단백질은 실시예 1에서 설명된 방법을 이용하여 발현되었고, 정제되었다.

[0279] 실시예 13. 마우스에서 절두된 ActRIIB 세포외도메인을 가진 GDF 트랩은 마우스에서 적혈구의 선조들의 증식을 증가시킨다

[0280] ActRIIB(L79D 25-131)-hFc는 적혈구의 선조들의 증가에 대하여 이의 효과를 결정하기 위하여 평가되었다. 수컷 C57BL/6 마우스 (8 주령)는 1일차와 4일차에 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 6) 또는 비이클 (TBS; n = 6)로 처리되었고, 그 다음 비장, 경골, 대퇴 및 혈액의 수집을 위하여 8일차에 안락사되었다. 비장 및 골수 세포가 단리되었고, 5% 태아 소 혈청이 함유된 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지로 희석되었고, 특화된 메틸셀룰로오즈-기반 배지에 혼탁되었고, 콜로니-형성 단위-적혈구(CFU-E) 및 버스터 형성 단위-적혈구(BFU-E) 단계에서 각각 세포집락 선조들의 수준을 평가하기 위하여 2일 또는 12일간 배양되었다. BFU-E 측정을 위한 메틸셀룰로오즈-기반 배지 (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies)는 CFU-E 측정용 메틸셀룰로오즈-기반 배지 (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies)에는 존재하지 않는 재조합 뮤린 줄기 세포 인자, 인터루킨-3, 및 인터루킨-6을 포함하였고, 이 두 배지는 다른 성분들 중에 에리트로포에틴은 모두 포함하였다. BFU-E 및 CFU-E 모두의 경우, 콜로니 수는 각 조직 시료로부터 유도된 이중 배양물 플레이트에서 측정되었고, 결과의 통계학적 분석은 처리군당 마우스의 수에 근거하였다.

[0281] ActRIIB(L79D 25-131)-hFc로 처리된 마우스의 비장-유도된 배양물은 대조군 마우스의 대응하는 배양물의 CFU-E 콜로니 수의 2배를 가지고 ( $P < 0.05$ ), 반면 BFU-E 콜로니의 수는 생체내에서 처리군과 유의적으로 차이가 나지 않았다. 골수 배양물에서 CFU-E 또는 BFU-E 콜로니 수는 처리군과 유의적으로 차이가 나지 않았다. 예상과 같이, 비장-유도된 배양물에서 CFU-E 콜로니의 증가된 수는 대조군과 비교하여 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc로 처리된 마우스의 안락사시 붉은 혈액 세포 수준 (11.6% 증가), 혜모글로빈 농도 (12% 증가), 및 혈마토크립 수준 (11.6% 증가)에서 매우 유의적인 변화와 동반되었다 ( $P < 0.001$ ). 이 결과는 절두된 ActRIIB 세포외 도메인을 가진 GDF 트랩의 생체내 투여는 붉은 혈액 세포 수준을 증가시키는 전반적인 효과의 일부로써 적혈구 선조들의 증식을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

[0282] 실시예 14. 절두된 ActRIIB 세포외 도메인을 가진 GDF 트랩은 마우스에서 화학치료법-유도된 빈혈을 상쇄시킨다.

[0283] 출원인은 미소관 중합을 차단시킴으로써 세포 분할을 저해하는 파클리탁셀에 근거한 화학치료법-유도된 빈혈의 마우스 모델에서 적혈구 생성 매개변수들에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 효과를 조사하였다. 수컷 C57BL/6 마우스 (8주령)는 4개 처리군중 하나에 할당되었다:

[0284] 1) 파클리탁셀 (25 mg/kg, i.p.)

[0285] 2) ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, i.p.)

[0286] 3) 파클리탁셀 + ActRIIB(L79D 25-131)-hFc

[0287] 4) 비이클 (TBS).

[0288] 파클리탁셀은 0일 시점에 투여되었고, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 또는 비이클은 0일과 3일 시점에 투여되었다. 1, 3 및 5일 시점에서 별도 코호트로부터 CBC 분석용으로 혈액 시료가 수집되었고, 처리군 1-3 (상기)에 대한 결과는 주어진 시점에서 비이클과의 차이 백분율로 나타내었다. 파클리탁셀 독성으로 인한 감소는 3일차에 오직 -파클리탁셀 코호트( $n = 1$ )에서 문제가 되었고; 다른 방법에서 시점당 처리군당  $n = 3-5$ . 비이클과 비교하여, 파클리탁셀 단독은 5일차에 거의 13% 감소된 혜모글로빈 농도를 감소시켰고, 반면 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 추가는 이 파클리탁셀-유도된 감소를 예방하였다(도 11). 혈마토크립 및 RBC 수준에서 유사한 효과가 관찰되었다. 파클리탁셀 없이, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc는 3일차와 5일차에 비이클과 비교하여 혜모글로빈 농도를 10% 증가시켰다 (도 11). 따라서, 절두된 ActRIIB 세포외 도메인을 가진 GDF 트랩은 화학치료법-유도된 빈혈을 상쇄시키는데 충분하도록 붉은 혈액 세포들의 수준을 증가시킬 수 있다.

[0289] 실시예 15. 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩은 마우스에서 신장절제-유도된 빈혈을 역전시킨다.

[0290] 출원인은 신장절제된 만성 신장 질환의 마우스 모델의 빈혈에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 효과를 조사하였다. 수컷 C57BL/6 마우스 (11주령)는 허위 수술 또는 한 측면 신장절제를 하여 에리트로포에틴 생산 능력을 감소시켰다. 마우스는 수술화 1주일간 회복되도록 두었고, 그 다음 총 4주 동안 주당 2회씩 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, i.p.; 상태당 n = 15) 또는 비이클 (TBS; 상태당 n = 15)로 처리되었다. 투약 하기 전 그리고 처리후 4주 뒤 혈액 시료가 수집되었다. 비이클-처리된 신절제된 마우스는 4주 처기 기간에 걸쳐 붉은 혈액 세포 수에서 심각한 감소를 나타내었고, 에리트로포에틴 생산에 대한 신장의 능력이 감소되었음에도 불구하고 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc로 처리된 경우 감소를 방지하였을 뿐만 아니라 기준 이상으로 붉은 혈액 세포 수준이 17% ( $P < 0.001$ ) 증가되었다(도 12). 신절제된 마우스에서, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc는 혜모글로빈 농도 및 혈마토크릿 수준에서 기준으로부터 상당한 증가를 만들었고, 특히 허위-수술된 상태와 같이 신절제 상태하에 대략적으로 동일한 수준으로 이들 적혈구생성 매개변수를 각각 자극하였다(도 13). 따라서, 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩은 만성 신장 질환 모델에서 빈혈을 역전시키는데 충분하도록 붉은 혈액 세포 수준을 증가시킬 수 있다.

[0291] 실시예 16. 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩은 랫에서 혈액 손실에 의해 유도된 빈혈로부터의 회복을 개선시킨다.

[0292] 출원인은 급성 혈액 손실에 의해 유도된 빈혈 (급성 출혈 후 빈혈)의 랫 모델에서 적혈구생성 매개변수에 있어서 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 효과를 조사하였다. 수컷 Sprague-Dawley 랫 (대략적으로 300 g)은 제조자 (Harlan)에서 만성 경정맥 카테테르를 제공받았다. 시작 1일 전, 이소플로란 마취하에 각 랫으로부터 카테테르를 통하여 5분에 걸쳐 총 혈액 용적의 20%를 빼내었다. 제거된 혈액의 용적은 120g 이상의 체중을 가진 랫에 대하여 Lee 및 공동작업자 (J Nucl Med 25:72-76, 1985)에 의해 유도된 다음의 상관관계에 따라 산출된 총 혈액 용적의 값에 근거하였다:

$$\text{총 혈액 용적 (ml)} = 0.062 \times \text{체중 (g)} + 0.0012$$

[0294] 혈액의 제거 당시 카테테르를 통하여 동일한 용적의 인산염-완충된 염수가 대체되었다. 랫은 0일 시점과 3일 시점에 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 5) 또는 비이클 (TBS; n = 5)로 처리되었다. CBC 분석을 위한 혈액 시료는 기점 -1일(기준), 0, 2, 4, 및 6일 시점에 카테테르를 통하여 빼내었다.

[0295] 대조군 랫은 0일 시점에 붉은 혈액 세포 주준에서 거의 15% 급락으로 조절 20% 혈액 손실에 대응되었다. 이들 수준은 2일과 4일 시점에서 상당히 더 낮게 유지되었고, 그리고 6일 시점까지 완전하게 회복되지 않았다(도 14). ActRIIB(L79D 25-131)-hFc로 처리된 랫은 20% 혈액 손실 이후 붉은 혈액 세포 수준에서 거의 동일한 급학을 나타내었지만, 이들 랫은 2일까지 이러한 수준에서 완전한 회복을 나타내었고, 이어서 4일과 6일 시점에는 더 상승되어, 이는 대응하는 시점에서 대조군 수준보다 매우 상당한 개선을 나타낸다(도 14). 혜모글로빈 농도에 대하여도 유사한 결과를 얻었다. 이러한 발견은 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩은 급성 출혈에 의해 유발되는 빈혈로부터 붉은 혈액 세포 수준의 더 신속한 회복을 시킬 수 있음을 설명한다.

[0296] 실시예 17. 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩은 비-인간 영장류에서 붉은 세포들의 수준을 증가시킨다.

[0297] 2개의 GDF 트랩, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc는 계집이 원숭이에서 붉은 혈액 세포 생산을 자극시키는 이들의 능력에 대해 평가되었다. 원숭이에게 1일과 8일 시점에 GDF 트랩 (10 mg/kg; n = 4마리 수컷/4마리 암컷), 또는 비이클 (n = 2마리 수컷/2마리 암컷)을 피하 주사하였다. 혈액 시료는 1일 시점 (전처리 기준), 3, 8, 15, 29, 및 44에 수거되었고, 그리고 붉은 혈액 세포 수준 (도 15), 혈마토크릿 (도 16), 혜모글로빈 수준 (도 17), 및 망상적혈구 수준 (도 18)에 대하여 분석되었다. 비이클-처리된 원숭이들은 반복된 혈액 샘플링의 예상 효과로 모든 처리후 시점에서 붉은 혈액 세포들, 혈마토크릿, 및 혜모글로빈의 감소된 수준을 나타내었다. 대조적으로, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 또는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc로 처리는 처리후 첫 시점 (3일차) 이들 매개변수를 증가시켰고, 그리고 연구 동안 이들 매개변수를 실질적으로 상승된 수준으로

유지시켰다(도 15-17). 중요한 것은, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 또는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc로 처리된 원숭이의 망상적혈구 수준은 비이클과 비교하여 8, 15 및 29일 시점에서 실질적으로 증가되었다 (도 18). 이 결과는 GDF 트랩 처리가 붉은 혈액 세포 선구의 생산을 증가시켜, 상승된 붉은 혈액 세포 수준을 초래한다는 것을 설명한다.

[0298] 이와 함께, 이들 데이터는 절두된 GDF 트랩, 뿐만 아니라 전장 변이체를 GDF11의 선택적 길항제 및 잠재적으로 관련된 관련된 리간드로 이용하여 생체내에서 붉은 혈액 세포 형성을 증가시킬 수 있음을 설명한다.

#### [0299] 실시예 18. ActRIIB5로부터 유도된 GDF 트랩

[0300] ActRIIB 막통과도메인을 포함하는 엑손 4는 상이한 C-말단 서열에 의해 대체된(WO2007/053775) 또다른 ActRIIB의 가용성 형태(ActRIIB5로 지칭)을 보고하였다.

[0301] 리더없는 고유의 인간 ActRIIB5의 고유 서열은 다음과 같다:

GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
KGCW~~DD~~DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAGDQGSGALWLLEGPAHE

[0302] (서열 번호: 36)

[0303] 변이체 ActRIIB5(L79D)를 삭제하기 위하여 설명된 것과 같이 고유의 위치 79에서 류신이 아스파르테이트로의 치환, 또는 다른 산성 치환이 실행될 수 있다(밑줄 및 강조), 이의 서열은 다음과 같다:

GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
KGCW~~DD~~DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAGDQGSGALWLLEGPAHE

[0304] (서열 번호: 37)

[0305] 다음의 서열을 가진 인간 ActRIIB5(L79D)-hFc 융합 단백질을 만들기 위하여 이 변이체는 TGGG 링커를 가진 인간 Fc에 연결될 수 있다:

GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
KGCW~~DD~~DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST  
TIPSGGPEATAAGDQGSGALWLLEGPAHETGGGTHTCPCPAELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY

[0306] SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 38)

[0307] 이 구조체는 CHO 세포에서 발현될 수 있다.

#### [0308] 실시예 19. 절두된 ActRIIB 세포외도메인을 가진 GDF 트랩과 EP0의 복합 치료가 마우스에서의 효과

[0309] EP0는 적혈구의 선구의 증식을 증가시킴으로써 붉은 혈액 세포들의 형성을 유도하였고, 반면 GDF 트랩은 EP0의 영향을 보충 또는 강화시키는 방식으로 붉은 혈액 세포들의 형성에 잠재적으로 영향을 줄 수 있다. 따라서, 출원인은 적혈구생성 매개변수에 있어서 EP0 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 복합 처리 효과를 조사하였다. 수컷 C57BL/6 마우스 (9 주령)에게 재조합 인간 EP0 단독(에포에틴 알파, 1800 unit/kg), ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 단독(10 mg/kg), EP0 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 모두, 또는 비이클 (Tris-완충된 염수)의 1회 i.p. 주사하였다. 혈액, 비장, 및 대퇴의 수집 이후 72시간에 마우스를 안락사시켰다.

[0310]

비장 및 대퇴는 다음의 세포계산 분석을 위하여 적혈구의 선구 세포를 획득하도록 처리되었다. 제거 이후, 비장은 5% 태아 소 혈청을 포함하는 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지에서 잘게 썰고 멸균 1-mL 주사기로부터 풀려져가 있는 70- $\mu$ m 세포 여과기를 통하여 밀어내어 물리적으로 해리시켰다. 대퇴는 임의의 잔류 근육 또는 연결조직을 없애고, 끝은 다듬어 5% 태아 소 혈청을 포함하는 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지로 남아있는 축을 세정함으로써 골수를 3-mL 주사기가 연결된 21-가우지 바늘을 통하여 수집하였다. 세포 혼탁액은 원심분리하였고 (10분간 2000rpm) 그리고 세포 펠렛은 5% 태아 소 혈청을 포함하는 PBS에 재현탁되었다. 각 조직으로부터 세포 ( $10^6$ )는 비-특이적 결합을 차단시키기 위하여 항-마우스 IgG와 함께 배양되었고, 그 다음 마우스 세포-표면 지표 CD71 (트란스페린 수용체) 및 Ter119 (세포-표면 글리코포린 A와 연합된 항원)에 대항하여 형광으로 라벨된 항체와 함께 배양하고, 세척되었고, 그리고 유동 세포분석에 의해 분석되었다. 시료안에 죽은 세포들은 프로피디움 요오드화물과의 반대착색에 의한 분석으로부터 배제되었다. 비장 또는 골수에서 적혈구의 분화는 CD71 라벨링 및 Ter119 라벨링의 정도로 평가되었고, CD71 라벨링은 분화 과정에서 감소되었으며, 사전적혈구모세포 단계로 시작되는 말단 적혈구 분화 동안 Ter119 라벨링은 증가된다(Socolovsky et al., 2001, Blood 98:3261-3273; Ying et al., 2006, 혈액 108:123-133). 따라서, 유동 세포측정을 이용하여 설명된 것과 같이, 사전적혈구 모세포 (CD71<sup>높음</sup> Ter119<sup>낮음</sup>), 호염기성 적혈구 모세포 (CD71<sup>높음</sup> Ter119<sup>높음</sup>), 다염적혈구 + 정염색 적혈구 모세포 (CD71<sup>중간</sup> Ter119<sup>높음</sup>), 그리고 후기 정염색 적혈구 모세포 + 망상적혈구 (CD71<sup>낮음</sup> Ter119<sup>높음</sup>)의 수를 측정하였다.

[0311]

EPO 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 복합된 처리는 붉은 혈액 세포들에서 놀라울 정도로 왕성하게 증가되었다. 이 실험의 72시간 시간 틀에서, EPO 또는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 단독으로는 비이클과 비교하여 유의미적으로 헤마토크리트를 증가시키지 못하였지만, 이 두 물질의 복합 처리는 이들의 개별 효과의 합 이상으로 예상치못한 공조적인 효과로 헤마토크리트를 거의 25% 증가시켰다(도 19). 이 유형의 공조는 개별 물질들은 상이한 세포 기전을 통하여 작용한다는 증거로 간주된다. 유사한 결과는 헤모글로빈 농도 (도 20) 및 붉은 혈액 세포 농도 (도 21)에 있어서 또한 관찰되는데, 이들 각각은 복합된 처리에 의해 공조적으로 또한 증가되었다.

[0312]

적혈구의 선구 수준의 분석은 좀더 복합적인 패턴을 나타낸다. 마우스에서, 비장은 유도가능한 ("스트레스 (stress)") 적혈구생성을 담당하는 1차 장기로 간주된다. 72시간에 비장 조직의 유동 세포 분석에서 EPO는 비이클과 비교하여 적혈구생성 선구 프로파일을 분명하게 변경시켰고, 1/3이상 감소된 후기 선구 (후기 정염색 적혈구 모세포 + 망상적혈구)의 댓가로 170% 이상 호염기성 적혈구 모세포의 수를 증가시켰다(도 22). 중요한 것은, 복합된 처리는 비이클과 비교하여 EPO 단독보다는 덜한 수준으로, 유의적으로 호염기성 적혈구 모세포를 증가시켰고, 후기-단계 선구의 감소안된 성숙을 지원한다(도 22). 따라서, EPO 및 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc와의 복합된 처리는 균형잡힌 선구 증식 및 성숙을 통하여 적혈구생성을 증가시켰다. 비장과 대조적으로, 복합된 처리 이후, 골수에서 선구 세포 프로파일은 EPO 단독보다는 뚜렷하게 다르지 않다. 출원인은 비장의 선구 프로파일로 예측되는데, 복합된 처리는 망상적혈구 수준의 증가로 이어지고, 이 실험을 72시간 이상으로 연장한다면, 지속적인 증가된 망상적혈구 수준의 증가로 이어질 것이다.

[0313]

이와 함께, 이들 발견은 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩은 생체내에서 붉은 혈액 세포 형성을 공조적으로 증가시키기 위하여 EPO와 복합 투여될 수 있음을 설명한다. 상보적인 그러나 특정되지 않은 기전을 통하여, GDF 트랩은 EPO 수용체 활성물질 단독의 강력한 증식 효과를 중개할 수 있고, 그리고 붉은 혈액 세포들의 표적 수준은 EPO 수용체 활성물질의 더 낮은 용량으로 유지되도록 허용되고, 이로 인하여 잠재적인 부작용을 회피하거나 또는 EPO 수용체 활성화의 더 높은 수준과 연합된 다른 문제점을 회피한다.

[0314]

실시예 20. 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 가진 GDF 트랩은 골이형성증 증후군의 마우스 모델에서 RBC 수준을 증가시킨다.

[0315]

골이형성증 증후군(MDS)은 말초 혈구감소, 난치성 빈혈, 그리고 급성 골수 백혈병에 대한 진행 위험을 임상적 특징으로 하는 골수 부전의 다양한 장애들이다. RBC의 주입은 피로 경감, 삶의 질 개선 및 생존을 연장시키기 위하여 MDS에서 주요 유지 치료법이다; 그러나, 정규적인 주입은 이들 환자에게서 전형적으로 유병율 및 사망률에 부정적인 영향을 주는 철 과부하를 초래하고, 치료법 이를 테면, 철 퀄레이트화 치료법의 사용으로 이어질 수 있다(Dreyfus, 2008, Blood Rev 22 Suppl 2:S29-34; Jabbour et al., 2009, Oncologist 14:489-496). 재조합 에리트로포에틴 (EPO) 및 이의 유도물질들은 작은 비율의 MDS 환자에서 대체 요법이기는 하지만(Estey, 2003, Curr Opin Hematol 10:60-67), 최근 연구에서 이들 부류의 물질은 혈전색전 사건 및 종양 성장으로 인하

여 일부 용량에서 유병율 및 사망률의 증가된 위험과 연합된다는 것이 암시되었다 (Krapf et al., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). 따라서, 만성 주입과 수반되는 철 과부 하없이 또는 외생성 EPO 및 이의 유도물질들에 고유한 위험없이 RBC 수준을 증가시킬 수 있는 대체 MDS 치료법이 필요하다.

[0316] 따라서, 출원인은 급성 백혈병에 주입을 포함하는 MDS의 주요 특징을 요약하는 이식유전자 마우스 모델의 RBC 수준에서 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 효과를 조사하였다(Lin et al., 2005, Blood 106:287-295; Beachy et al., 2010, Hematol Oncol Clin North Am 24:361-375). 3월령에서 시작하여, 수컷 및 암컷 NUP98-HOXD13 마우스는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.) 또는 비이클 (TBS)로 주당 2회 처리하였다. 야생형 한배새끼들에게 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 또는 비이클을 투여하고, 대조군으로 삼았다. 투약 개시에 앞서, 그리고 CBC 측정을 실행하기 위하여 매월 혈액 시료가 수집되었다.

[0317] NUP98-HOXD13 마우스와 야생형 대조군 사이의 기준에서 몇 가지 차이가 주지되었다. 특히, 수컷 NUP98-HOXD13 마우스는 야생형 마우스와 비교하여 상당히 감소된 RBC 농도 (-8.8%, p < 0.05) 및 혜마토크립 (-8.4%, p < 0.05)을 나타내었고, 암컷 NUP98-HOXD13 마우스는 유사한 경향을 보였다. 다음의 표에는 투약 3개월 후 (평균 ± SD) 결과를 나타낸다.

NUP98-HOXD13 마우스		RBC 농도 ( $10^{12}$ 세포/L)	헤모글로빈 농도 (g/dL)	혜마토크립 (%)
수컷	비이클 (n = 6)	6.56 ± 0.51	10.68 ± 0.68	31.83 ± 2.13
	ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (n = 8)	8.65 ± 0.54 ***	13.54 ± 0.91 ***	39.20 ± 2.82 ***
암컷	비이클 (n = 5)	6.38 ± 1.61	10.30 ± 2.58	31.96 ± 8.73
	ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (n = 6)	8.52 ± 0.70 *	13.52 ± 0.56 *	42.23 ± 2.53 †

\*\*\* p < 0.001 vs. 수컷 + 비이클

\* p < 0.05 vs. 암컷 + 비이클

† p = 0.056 vs. 암컷 + 비이클

[0318]

비이클과 비교하여, 3개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 처리는 수컷 및 암컷 NUP98-HOXD13 마우스 모두에서 RBC 농도 및 혜모글로빈 농도를 상당히 증가시켰다(대략적으로 30%). 이들 수컷 마우스에서 혜마토크립 또한 상당히 증가되었고, 암컷 마우스에서도 유의적 경향으로 증가되었다. 따라서, 절두된 ActRIIB 세포외 도메인을 가진 GDF 트랩은 MDS의 뮤린 모델에서 RBC 수준을 유의적으로 증가시킬 수 있다. 주입은 외생성 철의 본질적 원천인 반면, GDF 트랩은 적혈구생성을 통하여 내생성 철 저장을 이용하여 촉진됨으로써 RBC 수준을 상승시키고, 이로 인하여 철 과부하 및 이의 부정적 결과를 회피한다. 추가적으로, 실시예 19에서 명시된 것과 같이, GDF 트랩은 EPO 수용체 활성화와 연합된 잠재적 부작용을 우회하기 위하여 EPO 수용체 활성물질의 사용에 의한 것과는 다른 상이한(비록 상보적) 세포 기준을 통하여 작용한다.

[0320]

실시예 21.  $\beta$ -지중해빈혈의 마우스 모델에서 RBC 수준 및 형태에서 절두된 ActRIIB 세포외도메인을 가진 GDF 트랩의 효과

[0321]

$\alpha$ - 및  $\beta$ -글로빈의 발현에서 불균형인 효과가 없는 적혈구생성의 가장 흔한 원인을 나타내는 지중해빈혈 증후군은 적혈구모세포 성숙 동안 증가된 자가사멸로 인하여 빈혈을 초래한다. RBC 주입은 현재 지중해빈혈에서 주요 유지 치료법이지만, 그러나 시간의 경과에 따라 특정 조직에서 잠재적인 치명적인 철 축적을 유발한다(Tanno et al., 2010, Adv Hematol 2010:358283). 예를 들면, 철 과부하와 연합된 심장 질환은 주요 지중해빈혈 환자에게서 50%의 사망률을 차지할 수 있다(Borgna-Pignatti et al., 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47). 중요한 것은, 내생성 EPO 수준은 전형적으로 상승되고, 그리고 지중해빈혈 증후군 뿐만 아니라 효과가 없는 적혈구생성의 다른 장애에서 질병 병인에 기여하고; 따라서, 재조합 EPO의 치료적 사용은 적합하지 않을 수 있다.

따라서, 만성 주입과 수반되는 철 과부하없이 RBC 수준을 증가시킬 수 있는 지중해빈혈 및 효과가 없는 적혈구 생성의 기타 장애에 대한 대체 치료가 필요하다.

[0322]

출원인은  $\beta$ -주유 글로빈 코딩 유전자의 전체 코딩 영역이 결손된  $\beta$ -지중해빈혈 중간형의 마우스 모델에서 RBC 형성에 대해 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc의 효과를 조사하였다.  $Hbb^{th-1}$  대립유전자의 마우스 동종접합체는 순환하는 RBC들의 높은 비율에서 봉입체를 가진 저색소, 소구성 빈혈을 나타낸다 (Skow et al, 1983, Cell 1043:1043-1052). 예비 실험에서, 2-5월령의  $Hbb^{-/-}$   $\beta$ -지중해빈혈 마우스 (C57BL/6J- $Hbb^{d3th}$ /J)에게 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (10 mg/kg) 또는 비이클 (Tris-완충된 염수)을 주당 2회씩 피하 주사를 통하여 제공하였다. 야생형 한배 새끼들에게는 비이클을 투여하여 추가적인 대조군으로 삼았다. 투약 개시전 그리고 CBC 분석을 위하여 투약 이후 정규적으로 뺨 출혈을 통하여 혈액 시료 (100  $\mu$ l)를 수집하였다. 기선에서 조혈 매개변수들의 특징화로  $Hbb^{-/-}$   $\beta$ -지중해빈혈 마우스가 심각한 빈혈이 있음을 확인하였고(도 23), 그리고 4주간 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc로  $Hbb^{-/-}$  마우스를 처리하면, 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스와 비교하여 RBC 수가 상당히 증가되었고, 이로 인하여 이 모델에서 관찰된 빈혈이 절반으로 감소되었다(도 24). 혜마토크릿 및 혈모글로빈 농도에서도 처리와 연합된 증가가 또한 관찰되었다. 중요한 것은,  $Hbb^{-/-}$  마우스를 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc로 처리하면 비이클-처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스와 비교하여 또한 RBC 형태의 개선과 용혈 및 적혈구 찌꺼기가 감소되고(도 25), 따라서 적혈구생성에 근원적인 개선을 나타낸다. 그러므로, 절두된 ActRIIB 세포외 도메인을 가진 GDF 트랩 폴리펩티드는  $\beta$ -지중해빈혈의 뮤린 모델에서 RBC 수와 형태 모두를 증가시킴으로써 빈혈에 대하여 치료 효과를 제공할 수 있다. 빈혈이 감소되는 동안 적혈구모세포 성숙을 촉진시킴으로써, GDF 트랩 폴리펩티드들은 효과가 없는 적혈구생성을 치료할 수 있다. 외생 철의 본래 원천인 주입과 달리, GDF 트랩 폴리펩티드는 적혈구생성을 통하여 내생성 철 저장의 사용을 촉진하고, 이로 인하여 철 과부하 및 이의 부정적 결과를 회피함으로써 RBC 수준을 상승시킬 수 있다.

[0323]

[0324]

실시예 22.  $\beta$ -지중해빈혈의 마우스 모델에서 EPO 수준, 비장거대증, 골 밀도, 및 철 과부하에 있어서 절두된 ActRIIB 세포외도메인을 가진 GDF 트랩의 효과

[0325]

효과가 없는 적혈구생성과 연합된 저산소증은 EPO 수준을 상승시키고, 골수 안과 밖에 적혈구 모세포의 상당한 팽창으로 몰아가고, 이는 비장거대증 (비장 확대), 적혈구모세포-유도된 골 병리, 그리고 치료용 RBC 주입없이도 조직 철 과부하로 이어질 수 있다. 치료안된 철 과부하는 조직 철 침착, 다중 장기 기능이상, 조숙한 사망율 (Borgna-Pignatti et al., 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47; Borgna-Pignatti et al., 2011, Expert Rev Hematol 4:353-366)으로 이어지고, 대부분은 지중해빈혈의 심각한 형태에서 심근증으로 인한 것이다 (Lekawanvijit et al., 2009, Can J Cardiol 25:213-218). 적혈구생성 효과를 증가시킴으로써, GDF 트랩 폴리펩티드는 잠재적 빈혈 및 상승된 EPO 수준을 경감시키고, 뿐만 아니라 비장거대증, 골 병리, 및 철 과부하와 연합된 여병을 완화시킬 수 있다.

[0326]

출원인은 실시예 21에서 연구된  $\beta$ -지중해빈혈 중간형의 동일한 마우스 모델에서 이들 매개변수들에 있어서 GDF 트랩 폴리펩티드의 영향을 조사하였다.  $Hbb^{-/-}$  3월령의  $\beta$ -지중해빈혈 마우스 (C57BL/6J- $Hbb^{d3th}$ /J)에게 2개월간 주당 2회씩 무작위로 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (1 mg/kg, n = 7) 또는 비이클 (Tris-완충된 염수, n = 7)을 피하 주사를 통하여 제공하였다. 야생형 한배 새끼에게 비이클 (n = 13)을 투여하고, 추가 대조군으로 삼았다. CBC 분석을 위하여 연구 종료시 혈액 시료 (100  $\mu$ l)를 수집하였다. 연구 종료시, 골 미네랄 밀도는 이중 에너지 x-선 흡광광도(DEXA)에 의해 측정되었고, 혈청 EPO 수준은 ELISA에 의해 결정되었고, 반응성 산소 종(ROS)은 2',7'-디클로로히드로플루오레신 디아세테이트와 유동 세포분석으로 정량화되었고 (Suragani et al., 2012, Blood 119:5276-5284), 그리고 헬시딘 mRNA 수준은 정량적인 중합체효소 쇄 반응으로 측정되었다.

[0327]

GDF 트랩 폴리펩티드는 효과가 없는 적혈구생성의 경감과 일관되게 다중 혈액학 영향을 발휘하였다. 2개월 동안  $Hbb^{-/-}$  마우스를 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc로 처리하면, 비이클-투약된  $Hbb^{-/-}$  마우스와 비교하여 RBC 카운트가 25% 증가되었다(도 26).  $Hbb^{-/-}$  마우스에서, ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리는 또한 비이클 대조군과 비교하여 2개월 시점에서 혈모글로빈 농도 및 혜마토크릿을 유의미적으로 증가시켰다. 변화들은 순환 망상적혈구의 수준 감소와 수반되었고 (ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 또는 비이클로 처리된  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 각각 31.3 ±

2.3% vs. 44.8 ± 5.0%), 이는 빈혈 완화와 일치된다. 실시예 21에서와 같이, 처리 of  $Hbb^{-/-}$  마우스를 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc로 처리하면 비이클-투약된  $Hbb^{-/-}$  마우스와 비교하여 RBC 형태가 개선되었고, 적혈구 찌꺼기가 감소되었다. 건강한 개체와 비교하여, 지중해빈혈을 가진 환자들은 RBC 파괴 속도가 증가되었고, 혈색소(heme) 이화작용의 산물이며 용혈의 지표인 빌리루빈의 혈청 수준이 상승된 것으로 나타난다(Orten, 1971, Ann Clin Lab Sci 1:113-124).  $Hbb^{-/-}$  마우스에서, ActRIIB(L79D 25-131)-mFc로 처리하면 비이클과 비교하여 2개월 시점에서 혈청 빌리루빈 수준이 거의 절반으로 감소되고 (도 27), 이로 인하여 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc는 RBC 형성을 촉진하기 때문에 성숙한 RBC의 구조적/기능적 일체성을 개선시킬 수 있다는 증거가 된다. 중요한 것은,  $Hbb^{-/-}$  마우스를 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc로 처리하면 2개월 시점에서 동일 모델의 비이클과 비교하여 60% 이상으로 혈청 EPO 수준을 감소시킨다(도 28). 상승된 EPO 수준은  $\beta$ -지중해빈혈에서 효과가 없는 적혈구생성의 특질이기 때문에, 이러한 수준의 감소는 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc가 뮤린 모델 of 지중해빈혈의 뮤린 모델에서 이것이 유발하는 빈혈 뿐만 아니라 효과가 없는 적혈구 생성을 경감시킨다는 강력한 증거다.

[0328]

GDF 트랩 폴리펩티드는 효과가 없는 적혈구생성의 주요 여병이 나타나는 종점에서 유익한 변화를 또한 만들었다. 지중해빈혈 환자들에서, 비장거대증 및 골 퇴화는 EPO-자극된 적혈구의 과형성과 골수의 적혈구생성에 의해 유발된다.  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc를 처리하면 비이클과 비교하여 비장 중량이 상당히 감소되었고(도 29) 그리고 골 미네랄 밀도는 야생형 값으로 완전히 복귀되었다(도 30). 철 항상성은 GDF 트랩 폴리펩티드로 처리함으로써 또한 상당히 개선되었다. 혈청 철은 결합안된(유리) 철과 순환계에서 요소 철을 운반하는 특화된 단백질인 아포트란스페린에 결합된 형태(트란스페린을 형성)로 구성된다. 혈청 철은 전체 신체 철의 상대적으로 작은 그리고 불안정한 성분으로 구성되는 반면, 주로 세포에서 발견되는 철 저장의 또 다른 형태인 페리틴의 혈청 수준은 더 큰 그리고 덜 불안정한 성분을 나타낸다. 철 부하의 세 번째 측도는 트란스페린 포화인데, 트란스페린이 점유하는 철 결합 능력에 대한 수준이다.  $Hbb^{-/-}$  마우스에서, 2개월 동안 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc 처리로 비이클과 비교하여 철 과부하의 이들 각 지표들이 상당히 감소되었다(도 31). 철 항상성의 다양한 매개변수에 대한 이의 영향에 추가적으로, ActRIIB(L79D 25-131)-mFc는 비장, 간 그리고 신장에서 조직분석으로 측정되었을 때  $Hbb^{-/-}$  마우스에서 조직 절 과부화를 정상화시켰다(도 32). 더욱이, GDF 트랩 폴리펩티드는 철 항상성의 주요 조절자로 간주되는 간의 단백질인 헵시딘의 발현에 유익한 영향을 발휘하였는데(Gantz, 2011, Blood 117:4425-4433), 헵시딘의 수준은 음식의 철 취입과 역으로 변화된다. 처리 with ActRIIB(L79D 25-131)-mFc로 처리하면  $Hbb^{-/-}$  마우스의 간에서 헵시딘의 비정상적인 낮은 발현을 역전시켰다 (도 33). 끝으로, 유사한 기획을 가진 또 다른 연구를 실행하여 철 과부하에 독성 영향중 많은 부분을 매개하는 것으로 간주되는 반응성 산소 종 (ROS)에서 GDF 트랩의 효과를 측정하였다(Rund et al., 2005, N Engl J Med 353:1135-1146). 3월령의  $Hbb^{-/-}$  마우스에서, 2개월 동안 주당 2회씩 ActRIIB(L79D 25-131)-mFc, 1 mg/kg로 처리하면 ROS 수준이 거의 정상화되었고(도 34), 지중해빈혈 및 효과가 없는 적혈구생성을 특징으로 하는 다른 질환에서 ROS에 의해 중재되는 조직 손상을 상당히 감소시킬 수 있을 것으로 예측할 수 있다.

[0329]

이와 함께, 상기 발견들은 GDF 트랩 폴리펩티드들이 빈혈 및 상승된 EPO 수준을 포함하는 효과가 없는 적혈구생성, 뿐만 아니라 여병들 이를 테면, 비장거대증, 적혈구모세포-유도된 골 병리, 그리고 철 과부하, 및 이들의 부속 병리를 치료할 수 있다는 것을 설명한다. 비장거대증에서, 이러한 병리는 흉부 또는 복부 통증과 망상내피 과형성을 포함한다. 골수의 혈액생성은 비장에서 뿐만 아니라 골수의 조혈 허위종양 형태의 다른 조직에서도 잠재적으로 발생될 수 있다(Musallam et al., 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). 적혈구모세포-유도된 골 병리에서, 참여 병리는 낮은 골 미네랄 밀도, 골다공증, 그리고 골 통증을 포함한다(Haidar et al., 2011, Bone 48:425-432). 철 과부하에서, 참여 병리는 헵시딘 억압 및 식이 철의 과다흡수(Musallam et al., 2012, Blood Rev 26(Suppl 1):S16-S19), 다발성 내분비병과 간 섬유증/간경변 (Galanello et al., 2010, Orphanet J Rare Dis 5:11), 그리고 철-과부하 심근증 (Lekawannijit et al., 2009, Can J Cardiol 25:213-218)을 포함한다. 효과가 없는 적혈구생성에 대한 기준 치료와 대조적으로, GDF 트랩 폴리펩티드들 이를 테면, ActRIIB(L79D 25-131)-mFc는 뮤린 모델에서 철 과부하를 감소시킬 수 있고, 동시에 RBC 수준을 증가시킬 수 있다. 이러한 새로운 능력은 빈혈 치료 과정에서 외생 철이 신체에 본질적으로 부담을 주고, 효과가 없는 적혈구생성의 잠재적 상태의 경감없는 혈액 주입으로부터 GDF 트랩 폴리펩티드들을 차별시킨다.

[0330]

참고자료에 편입

[0331]

본 명세서에서 언급된 모든 공고 및 특허들은 이를 각 공개 또는 특허가 명시적으로 그리고 개별적으로 참고자

료에 통합된 것과 같이, 이들 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다.

[0332] 주제의 특이적 구체예들이 논의되었지만, 상기 명세서는 설명을 위함이며, 제한적이지 않다. 본 명세서 및 하기 청구범위를 참고하면 당업자들에게는 많은 변이들이 자명해질 것이다. 본 발명의 온전한 범위는 청구범위, 이의 등가의 범위, 이러한 변이를 가진 명세서에 의해 결정되어야 한다.

## 도면

### 도면1

ActRIIa	ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FAIWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC IYYNANWELE RTNOSGLERC EGEODKRLHC YASWRNSSGT
IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM IELVKKGCWL DDFNCYDROE CVATEENPOV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA	
EVTQPTSNPV TPKPPT GGPEVTVYEPP PTAPT	

## 도면2

랫 IIb	MTAPWAA-LA LLWGSLCAGSGRGEAETRECIVYNNANWELLERTNOQSGLER-CEGEODKR
돼지 IIb	MTAPWAA-LA LLWGSLCAGSGRGEAETRECIVYNNANWELLERTNOQSGLER-CEGEODKR
마우스 IIb	MTAPWAA-LA LLWGSLCAGSGRGEAETRECIVYNNANWELLERTNOQSGLER-CEGEODKR
인간 IIb	MTAPWAA-LA LLWGSLCAGSGRGEAETRECIVYNNANWELLERTNOQSGLER-CEGEODKR
소 IIb	MTAPWAA-LA LLWGSLCAGSGRGEAETRECIVYNNANWELLERTNOQSGLER-CEGEODKR
발톱개구리 IIb	MGASVALLTFLILLATFRAGSGHDEVETRECIVYNNANWELLEKTNOQSGLER-CEGEODKR
인간 IIA	MGAAAALKLAFAYVFLISCSGGAILGRSETTQECLFFNANWEKDRNTQGVEP-CYGDKDKR
콘센서스	MtAPwaaXialIwgslcagsgrqeaeTrECIVYNNANWEELerTNOQSGLERLcEGeQDKR
랫 IIb	LHCYASWPNSSGTIELVKKGCMLDDFNCDYDRQECVATEENPQVYFCCCCEGNFCNERFT
돼지 IIb	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCMLDDFNCDYDRQECVATEENPQVYFCCCCEGNFCNERFT
마우스 IIb	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCMLDDFNCDYDRQECVATEENPQVYFCCCCEGNFCNERFT
인간 IIb	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCMLDDFNCDYDRQECVATEENPQVYFCCCCEGNFCNERFT
소 IIb	LHCYASWRNSSGTIELVKKGCMLDDFNCDYDRQECVATEENPQVYFCCCCEGNFCNERFT
발톱개구리 IIb	LHCYASWRNSSGFIELVKKGCMLDDFNCDYDRQECVATEENPQVYFCCCCEGNFCNERFT
인간 IIA	RHCFATWKNISSIEIVVKQGCMWLDIDNCYDRTDCVKEKDSPENVYFCCCCEGNMCNEKFS
콘센서스	IHCYASWRNSSGTIEIVVKKGCMWLDIDNCYDRTDCVKEKDSPENVYFCCCCEGNFCNERFT
랫 IIb	HLPEPGGPDEVTYEP-PPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLS-
돼지 IIb	HLPEAGGPDEVTYEP-PPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLS-
마우스 IIb	HLPEPGGPDEVTYEP-PPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLS-
인간 IIb	HLPEAGGPDEVTYEP-PPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLS-
소 IIb	HLPEAGGPDEVTYEP-PPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLS-
발톱개구리 IIb	HLPEEV--ETFDPKPQPSASVLLNLLYSLLPIVGLSM
인간 IIA	YFPEMEEVTQPTSNP-VTPKPPYYNLLYSLVPLMLI--
콘센서스	hiPEXggapevTyePKppataptliltvlayslliPIggISM

도면3

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGAS~~G~~REA ETRECIYYNA NWELERTNQS  
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCW~~D~~DDFNC YDRQECVATE  
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPPTAPT GGGTHTCPPC  
151 PAPELLGGPS VFLFPPPKPD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV  
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP  
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV  
301 EWESNGOPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH  
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK

## 도면4

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG  
TCAGAACCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCC

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC  
TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC  
CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT  
GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG  
CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA  
CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT

351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC  
CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC  
GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCACG

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCC  
GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG  
TGGGTTCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  
ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA  
CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGGCGCCC TCCTCGTCAT

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT  
GTTGTCGTGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCTGA

## 도면4a

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA  
CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT

751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACCC  
CGGGGGTAGC TCTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCAGGA GGAGATGACC AAGAACCAAGG  
TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATGCCGTG  
AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC  
CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG  
GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  
TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACCA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG  
CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCC

1101 TAAATGA (서열번호: 25)  
ATTTACT (서열번호: 33)

## 도면5

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC

51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV

101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG

151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA

201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTI

251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP

301 ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT

351 QKSLSLSPGK (서열번호: 26)

## 도면6

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 E T R E C I Y Y  
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA  
TCAGAACCAA AGCGGGCCGC GGCAGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
101 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC  
TGCAGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGAACAG  
CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

201 S G T I E L V K K G C W D D D F  
201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA  
GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCCTG CTACTGAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V  
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG  
TGACGATGCT ATCCGTCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L  
301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT  
ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T  
351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG  
CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAAC TCTGGGGGGA  
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC  
GGCCTGGGGA CTCCAGTGTGTA CGCACCAACCA CCTGCACCTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

## 도면6a

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAAGTC  
 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA  
 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG  
 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGTAG  
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGTTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
 901 GAGAACAACT ACAAGACAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
 951 CTT CCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTGTCCTCCT  
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (서열번호: 27)  
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (서열번호: 34)

## 도면7

1 ETRECIYYNA NWELELRTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
 51 KGCW DDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
 101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV  
 151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD  
 201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLG PSREEMTKNQ  
 251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTV  
 301 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (서열번호: 28)

## 도면8

1 ETRECIYYNA NWELELRTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
 51 KGCW DDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
 101 TYEPPPT (서열번호: 29)

## 도면9

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 E T R E C I Y Y  
 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTATATACA  
 TCAGAACGAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
 ATGCTAAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACCGGTGT  
 TAGGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACCTC  
 CTCCCCCTG TCCTATTGTC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

201 S G T I E L V K K G C W D D D F  
 CTCGGGACG ATGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA  
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTC CACGACCCCTG CTGCTAAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V  
 ATTGTTATGA CCGCCAGGA TGTGTGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC  
 TAACAATACT GGCGGTCCCT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L  
 TAATTCTGTT GTTGCAGGG GAAATTCTGT AATGAAACGGT TTACCCACCT  
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T  
 CCCGAAGCC GGCAGGCGCG AGGTGACCTA TGAACCCCGG CGCACCGGTG  
 GGGGCTTCGG CGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGC GGGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAC CCTGGGGGA  
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGAGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC  
 GGCCTGGGA CTCCAGTGTA CGCACCAACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

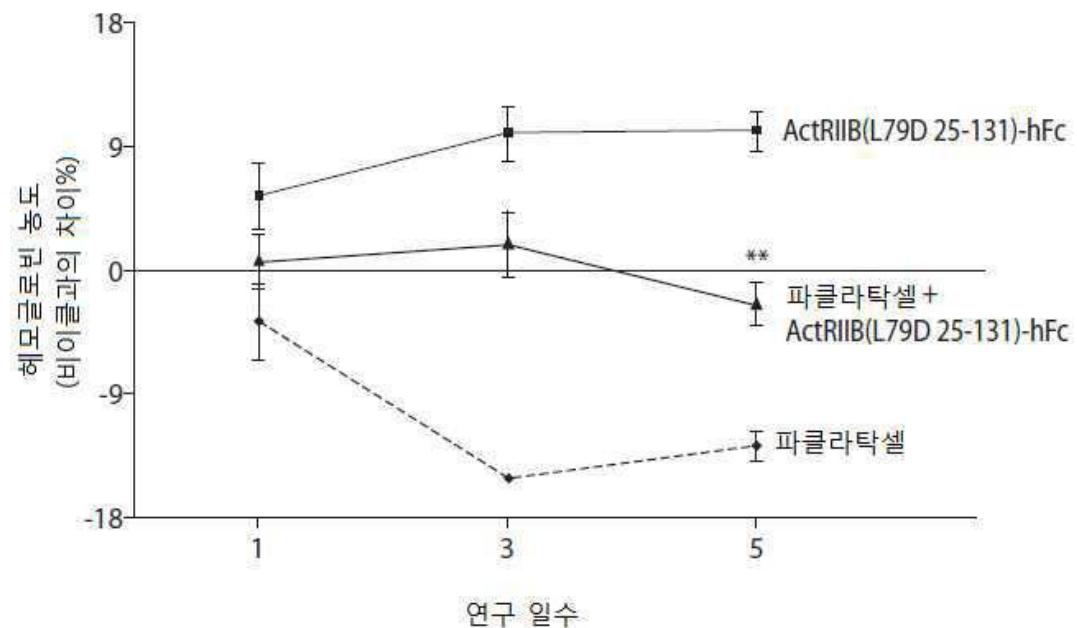
## 도면9a

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC  
  
 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA  
  
 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG  
  
 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGTAG  
  
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
  
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
  
 901 GAGAACAACT ACAAGACAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
  
 951 CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT  
  
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
  
 1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (서열번호: 30)  
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (서열번호: 35)

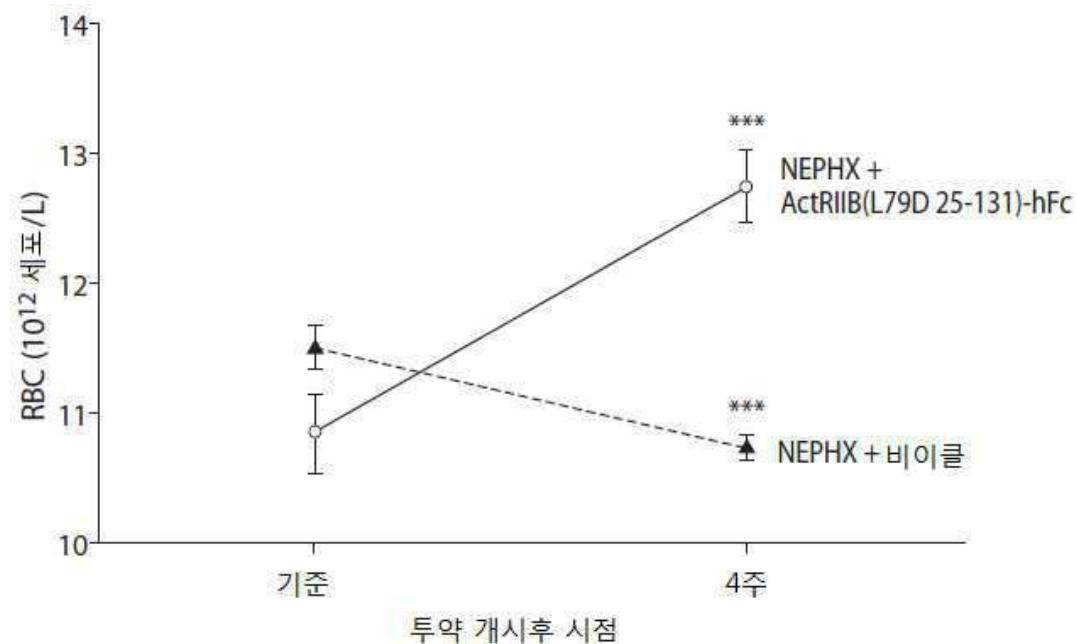
## 도면10

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATACCA ATGCTAATTG GGAACCTGAA  
 CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG  
 CCTCCATTCG TATGCGTCGT GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACCTGG  
 TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA ATTGTATGA CCGCCAGGAA  
 TGTGTGCGGA CCGAAGAGAA TCCGCGAGGTG TATTTCCTGTT GTTGCAGGG  
 GAATTCTGT AAATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG  
 AGTGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACCC (서열번호: 31)

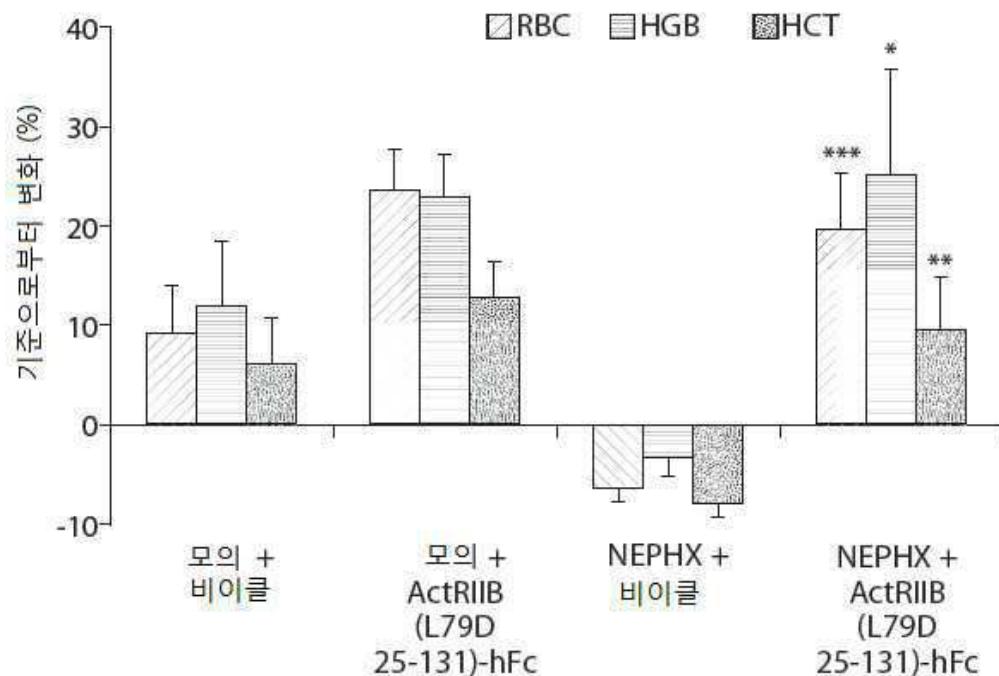
도면11



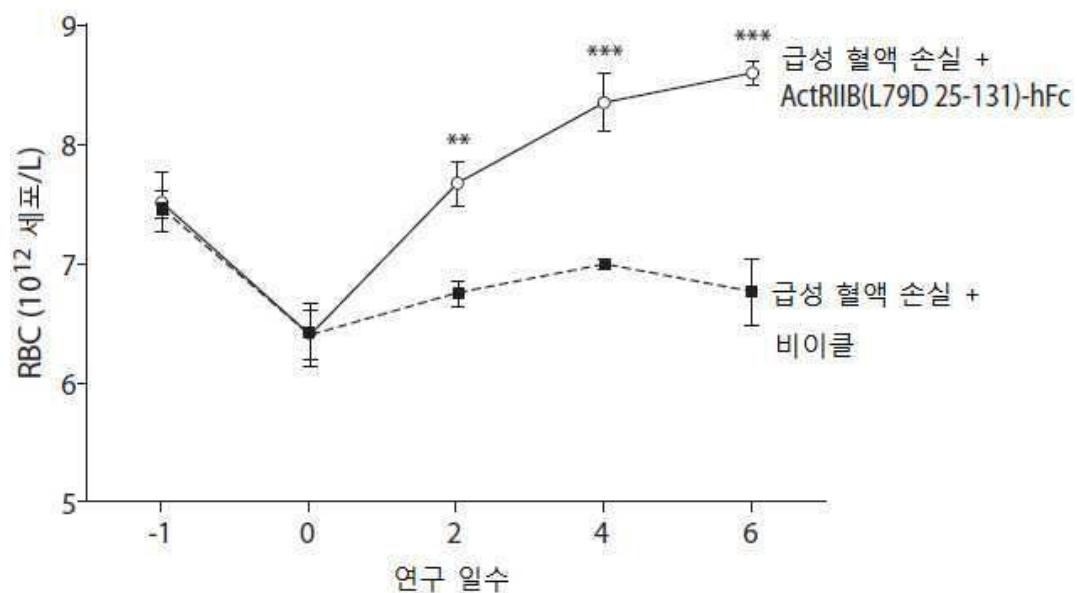
도면12



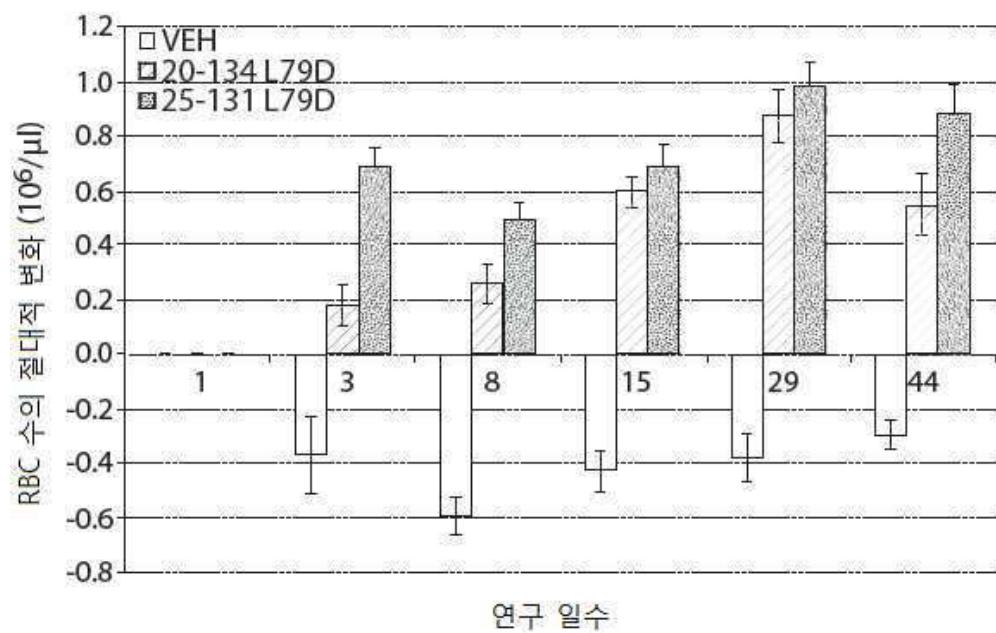
도면13



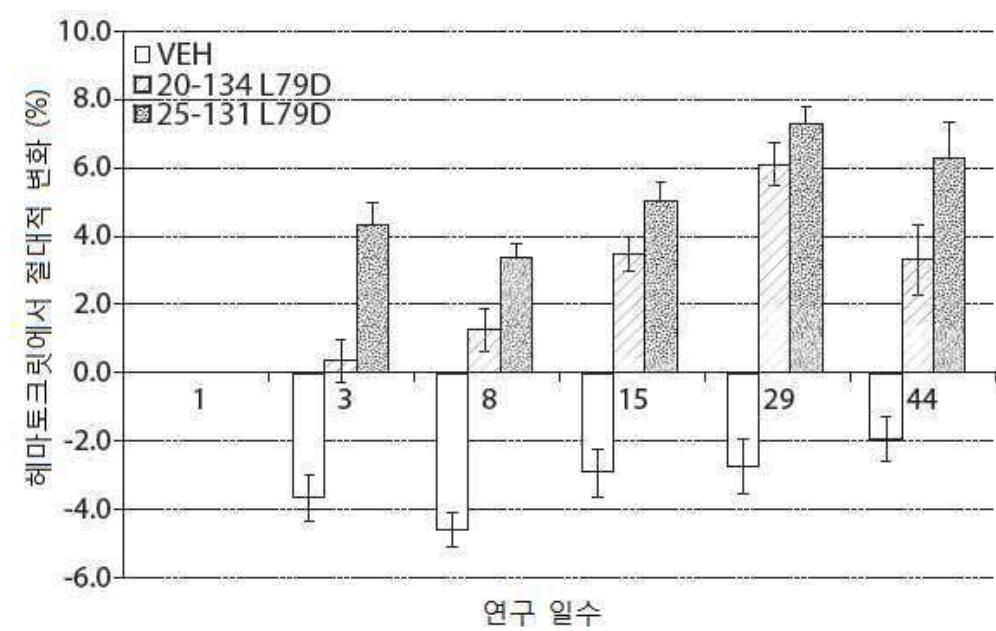
도면14



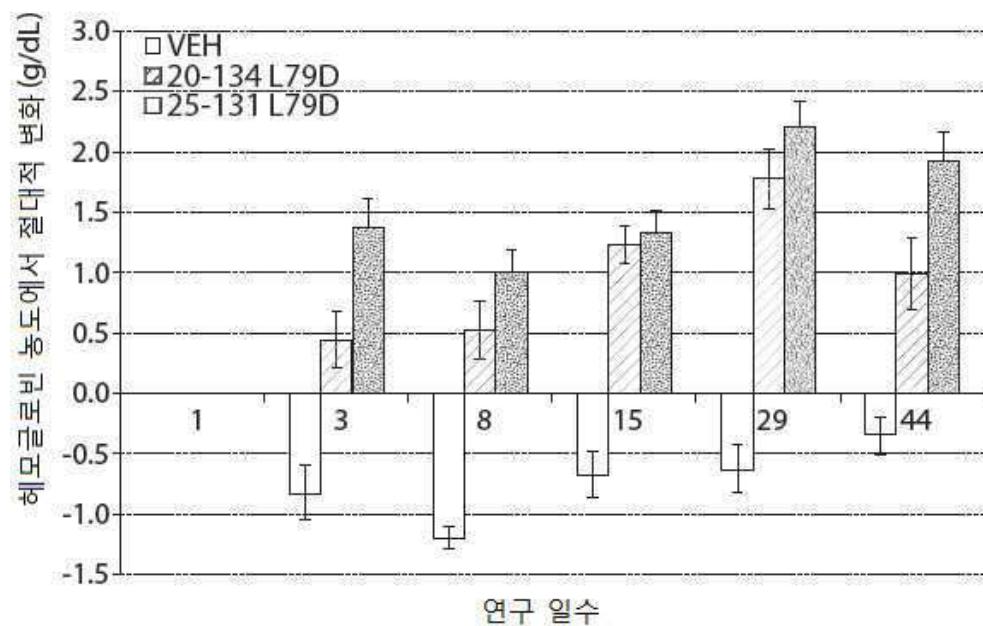
도면15



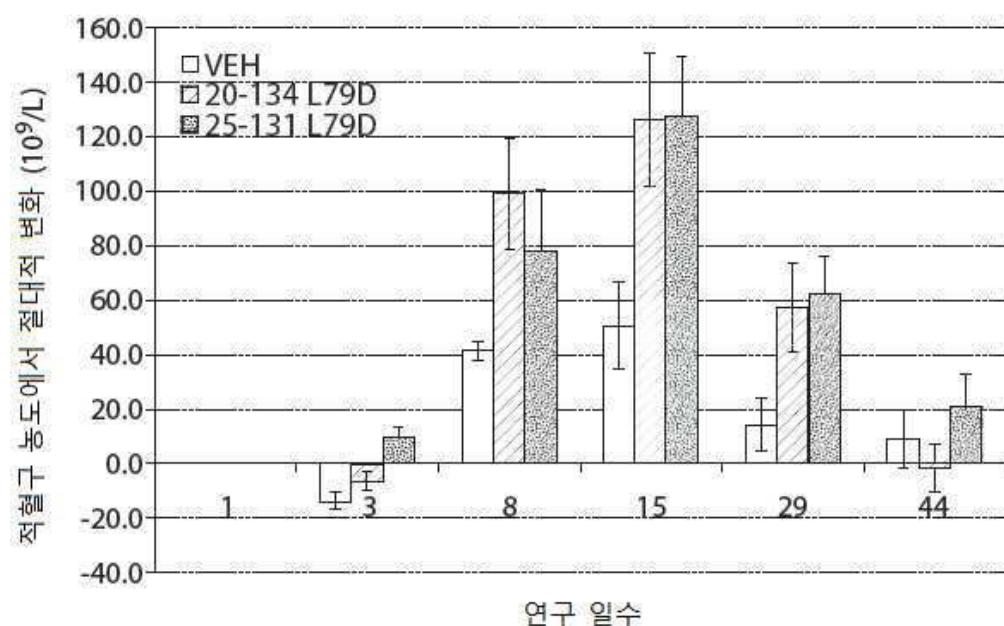
도면16



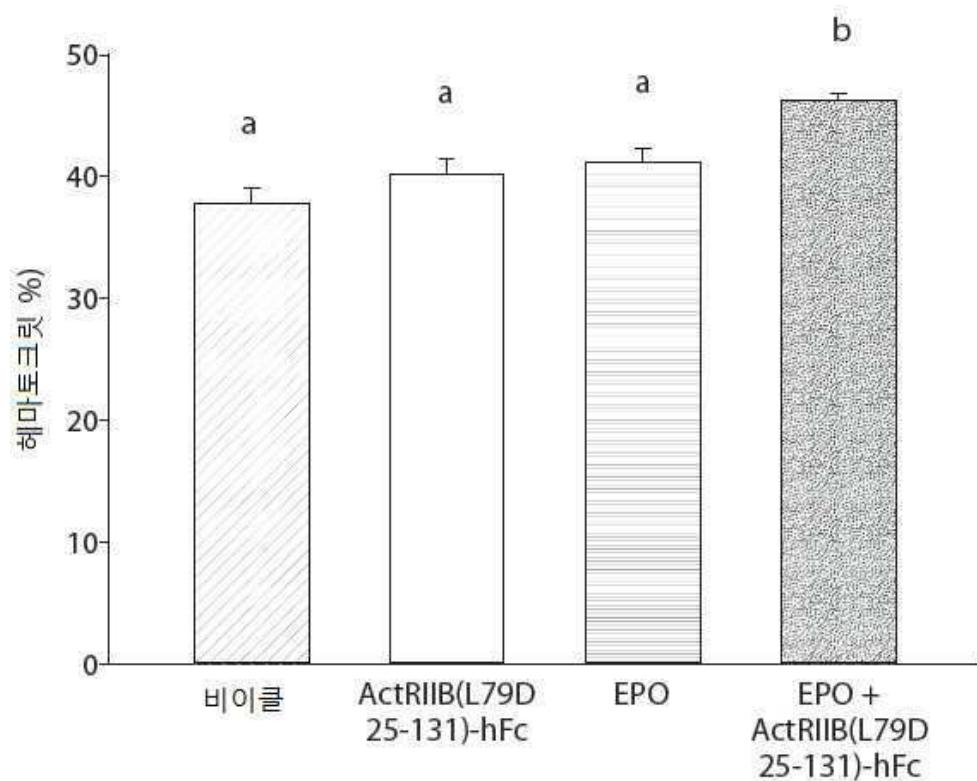
도면17



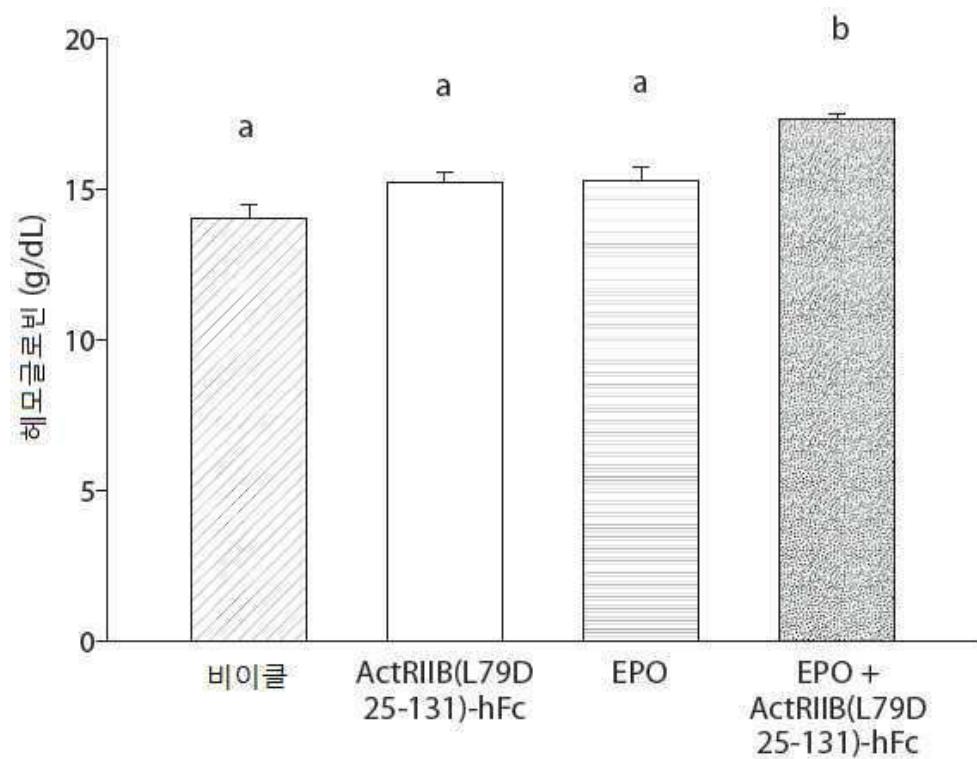
도면18



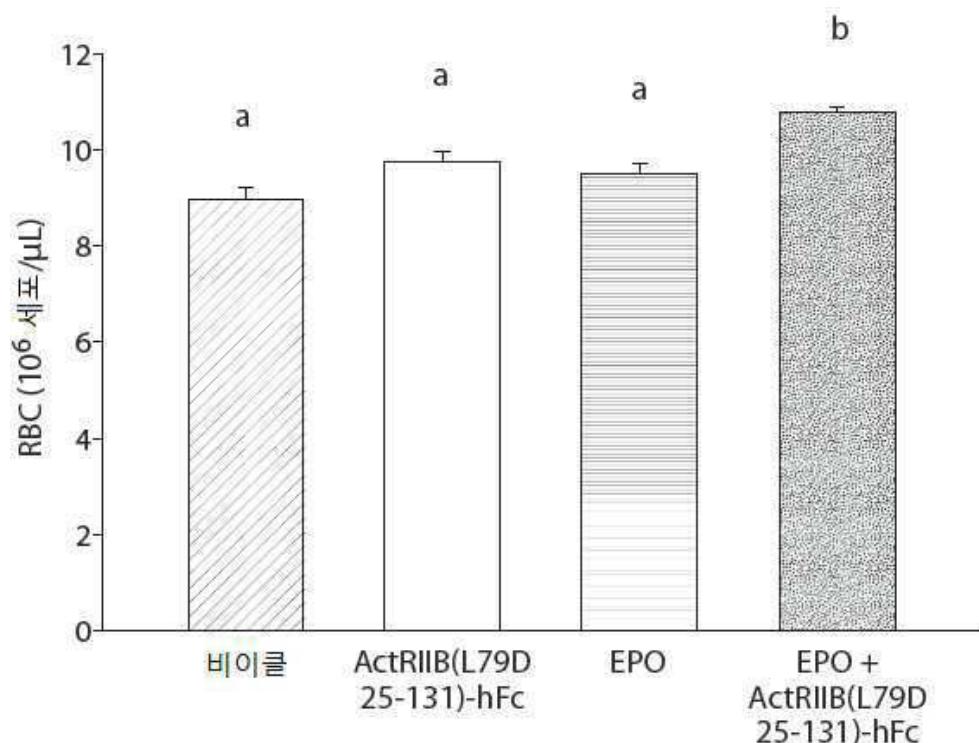
도면19



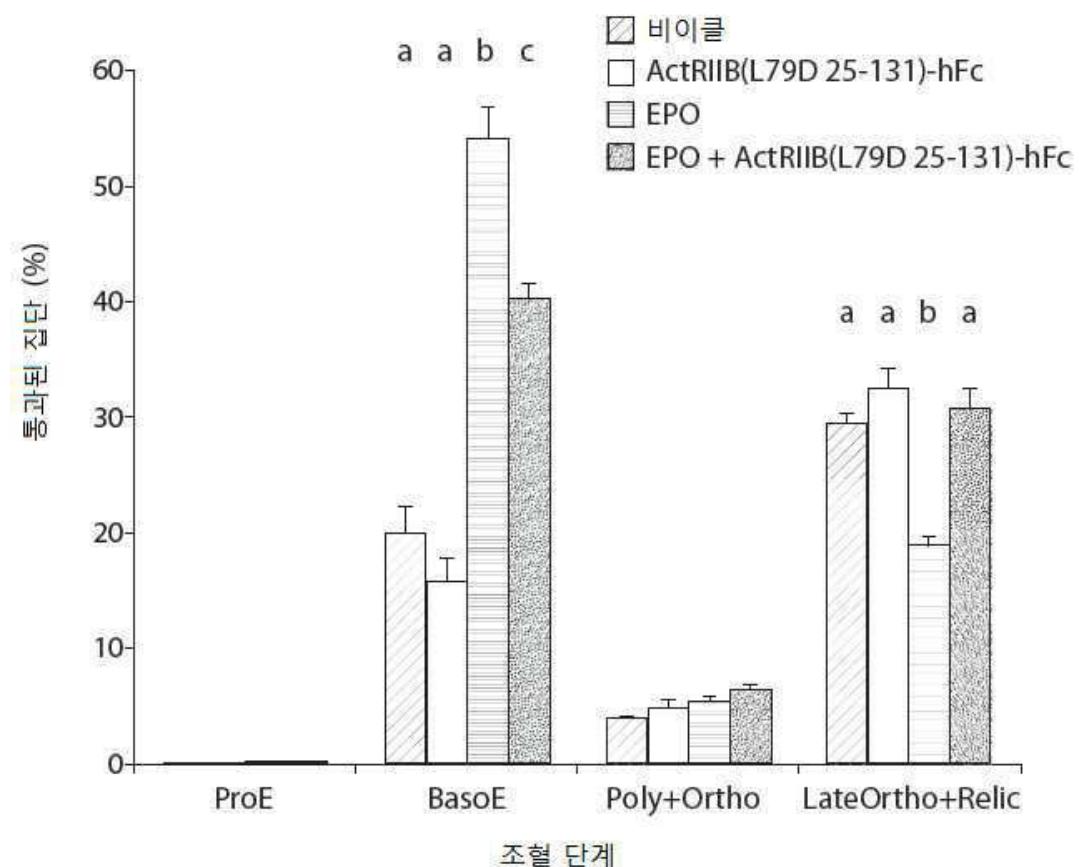
도면20



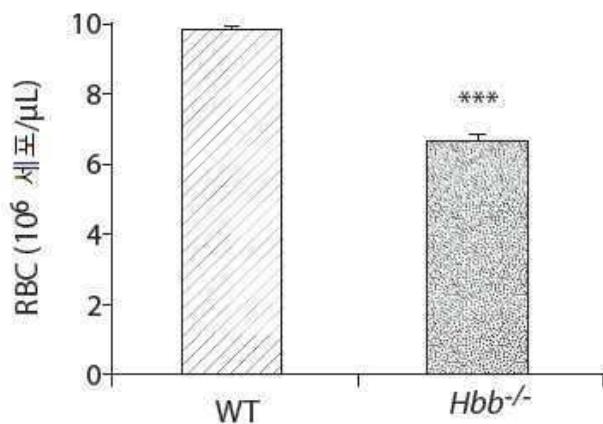
도면21



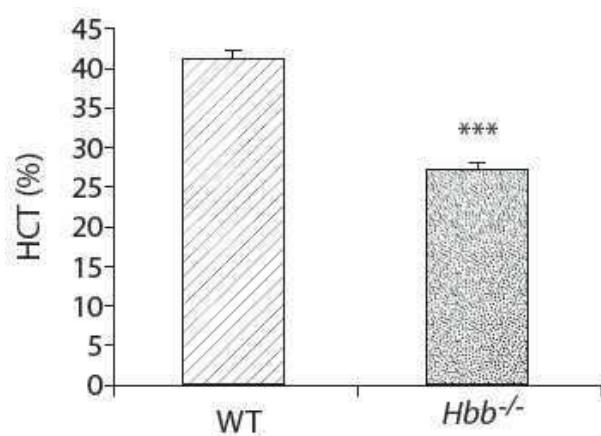
도면22



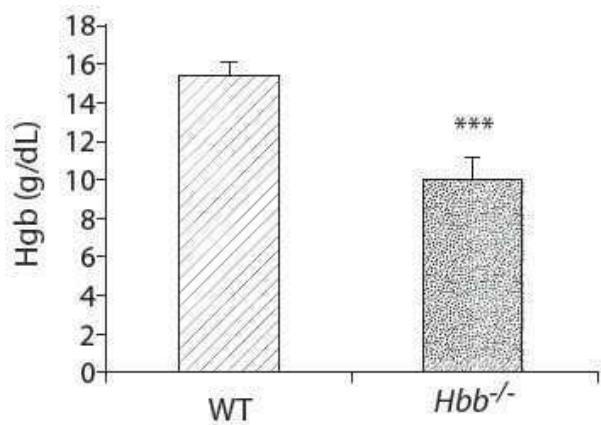
도면23a



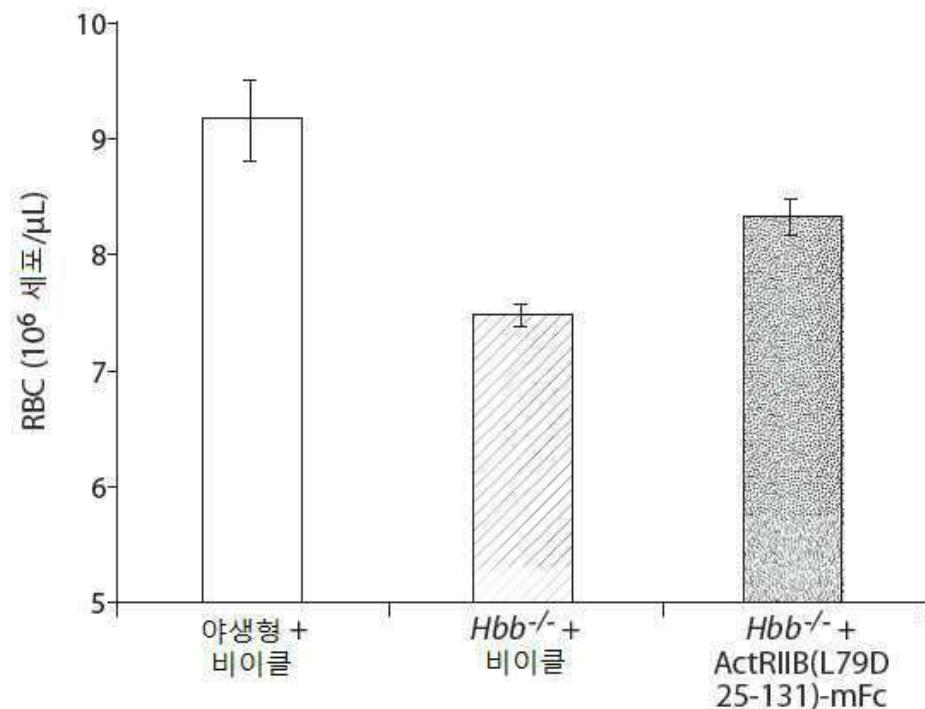
도면23b



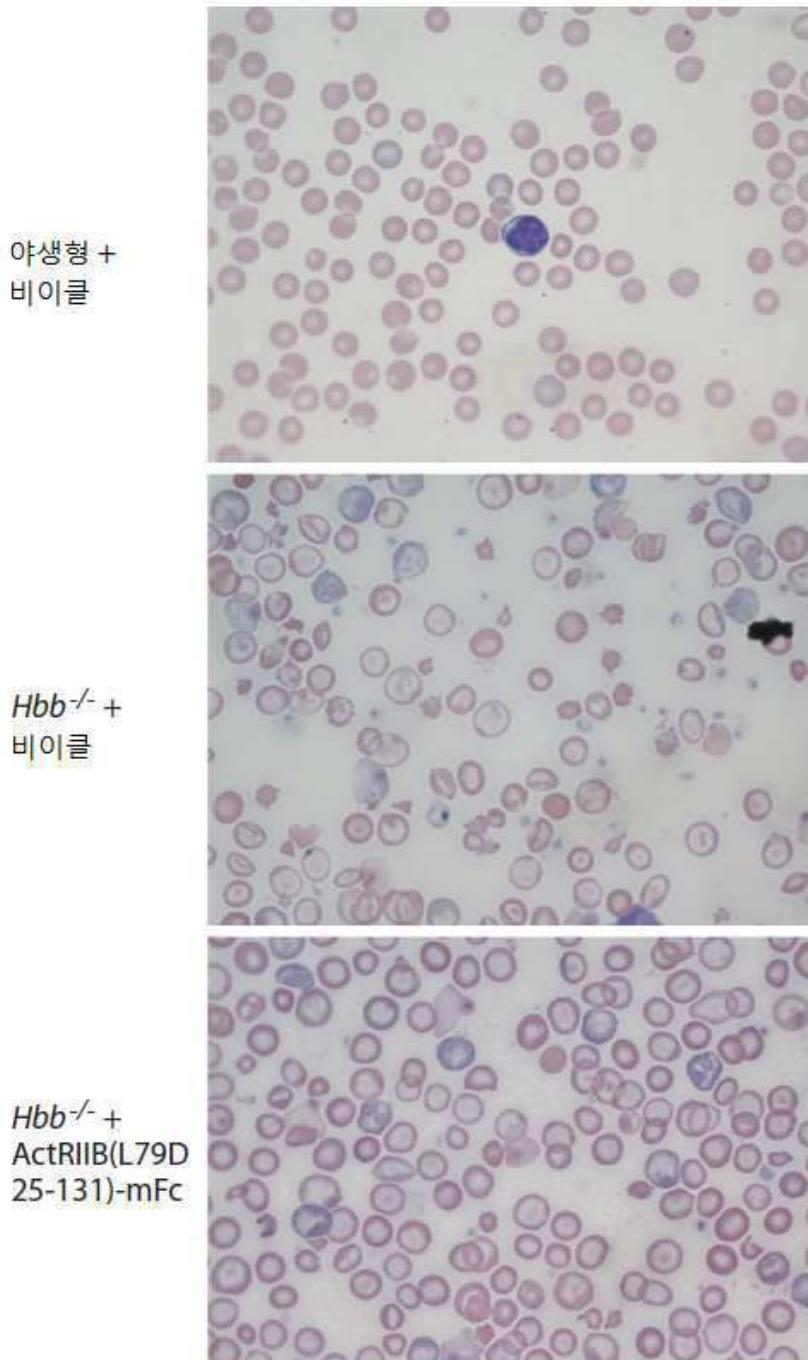
도면23c



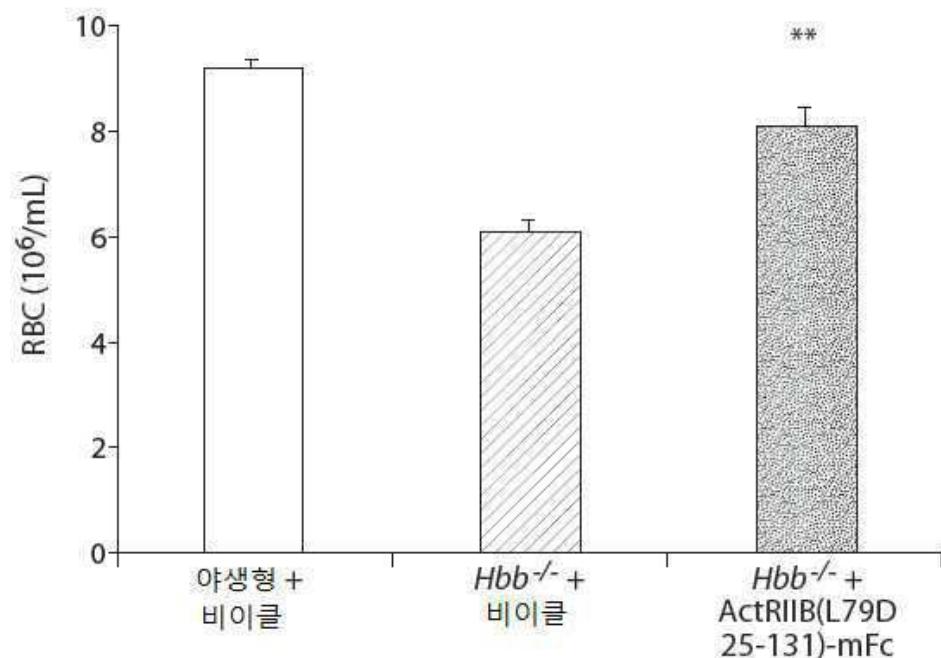
도면24



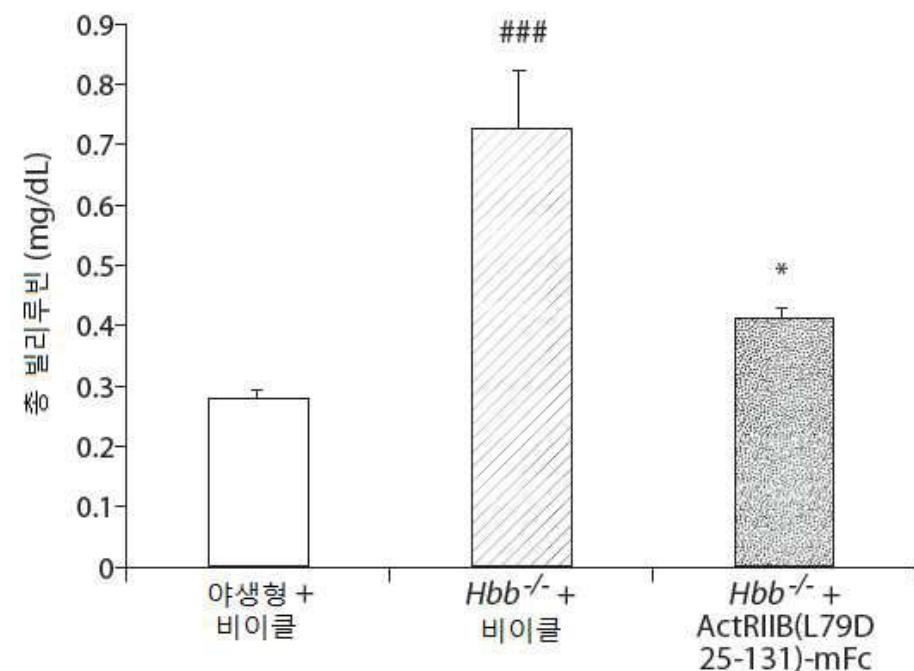
도면25



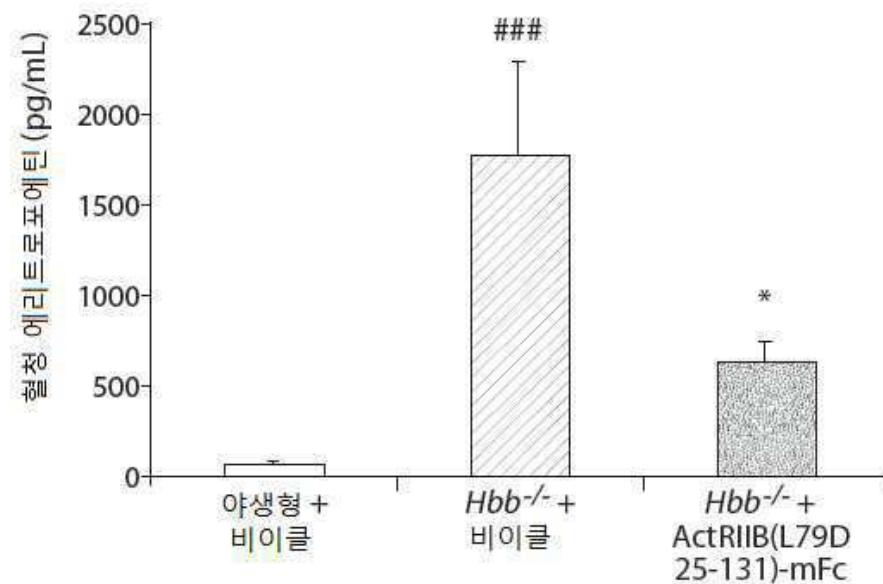
도면26



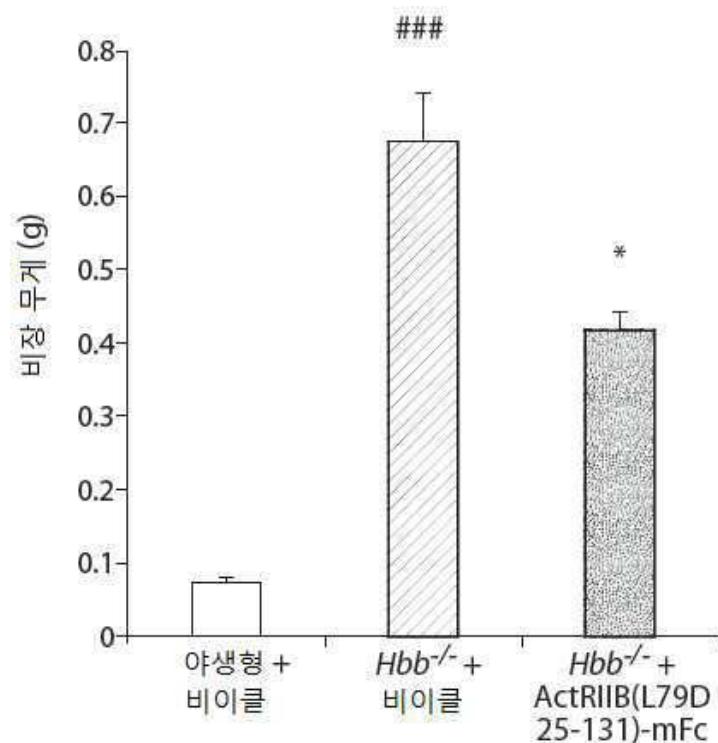
도면27



도면28



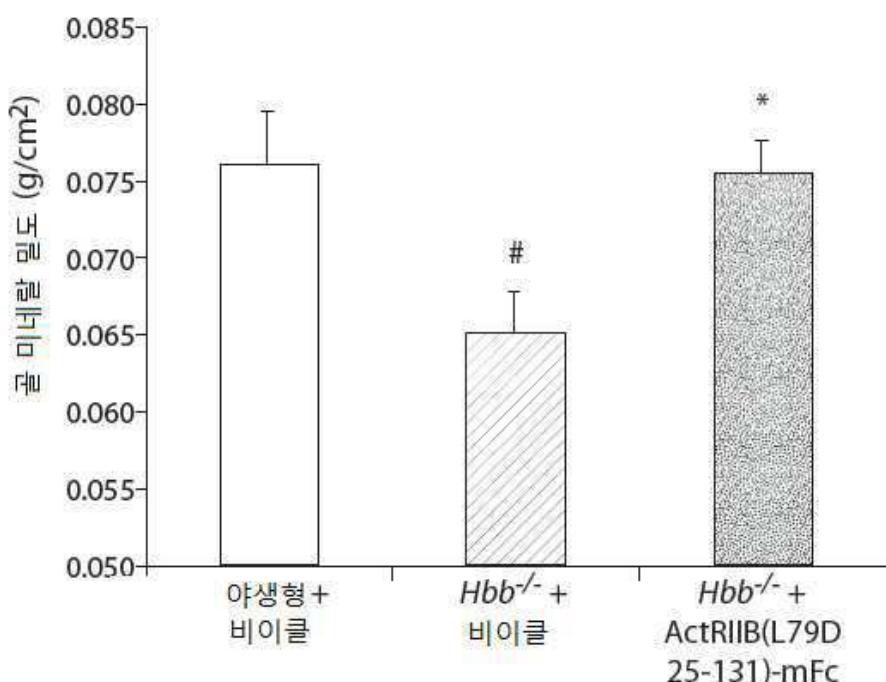
도면29a



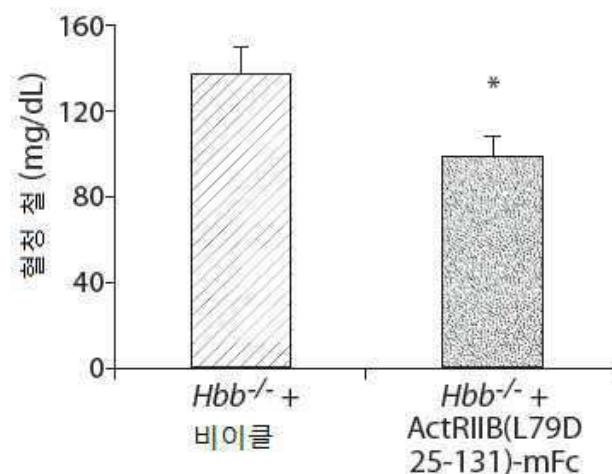
도면29b



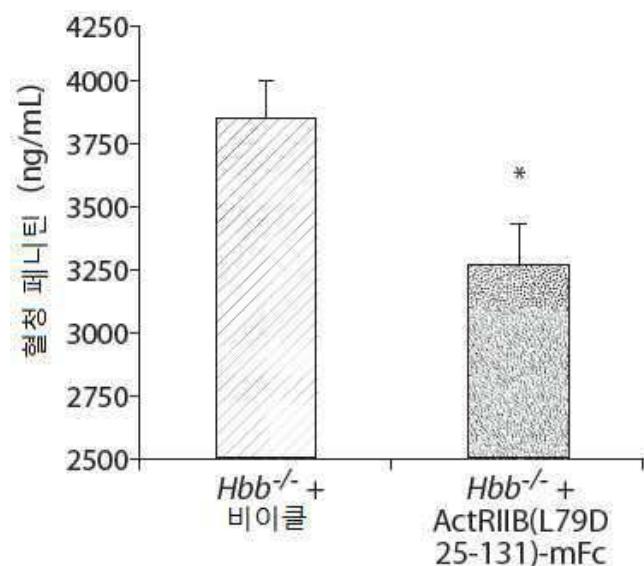
도면30



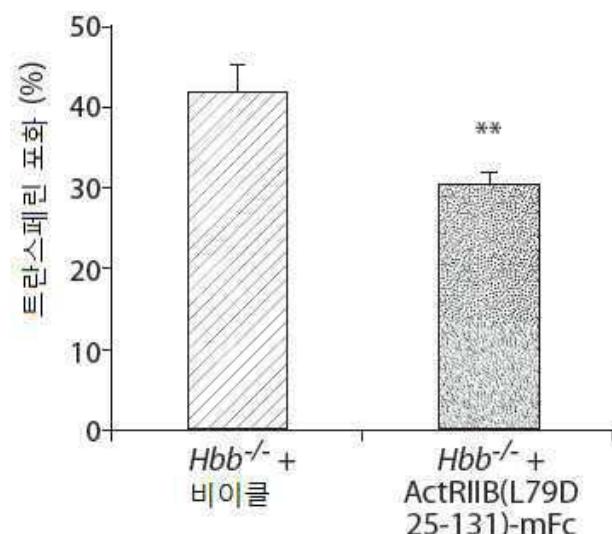
도면31a



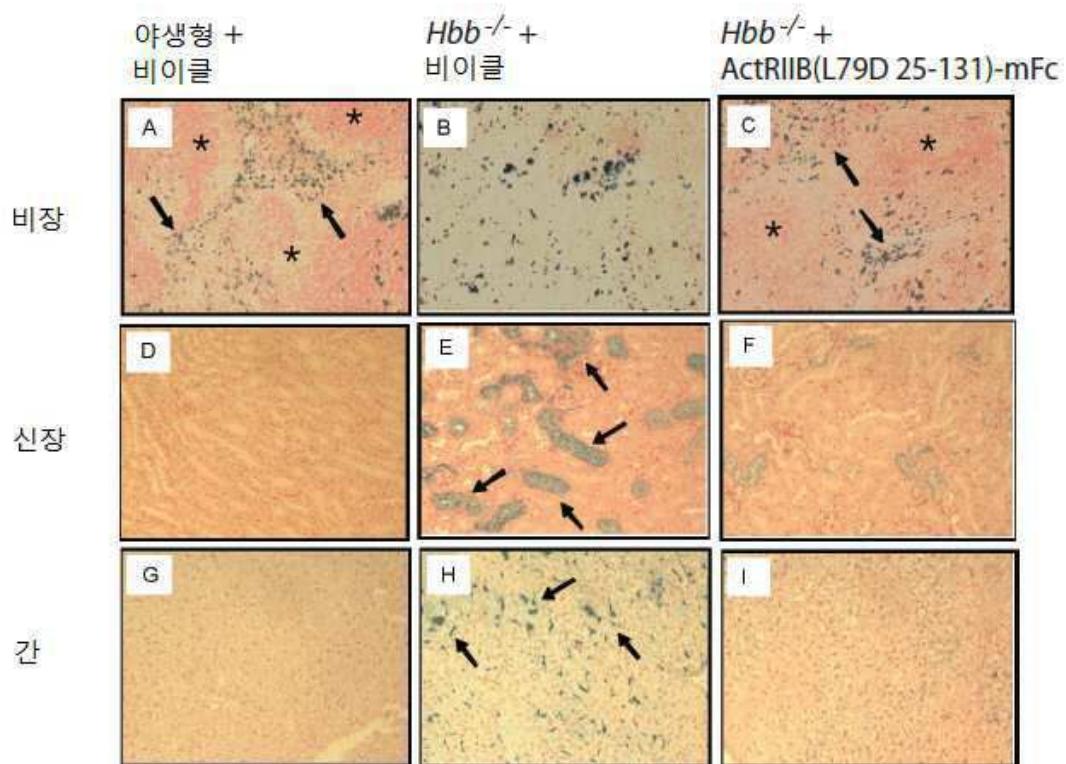
도면31b



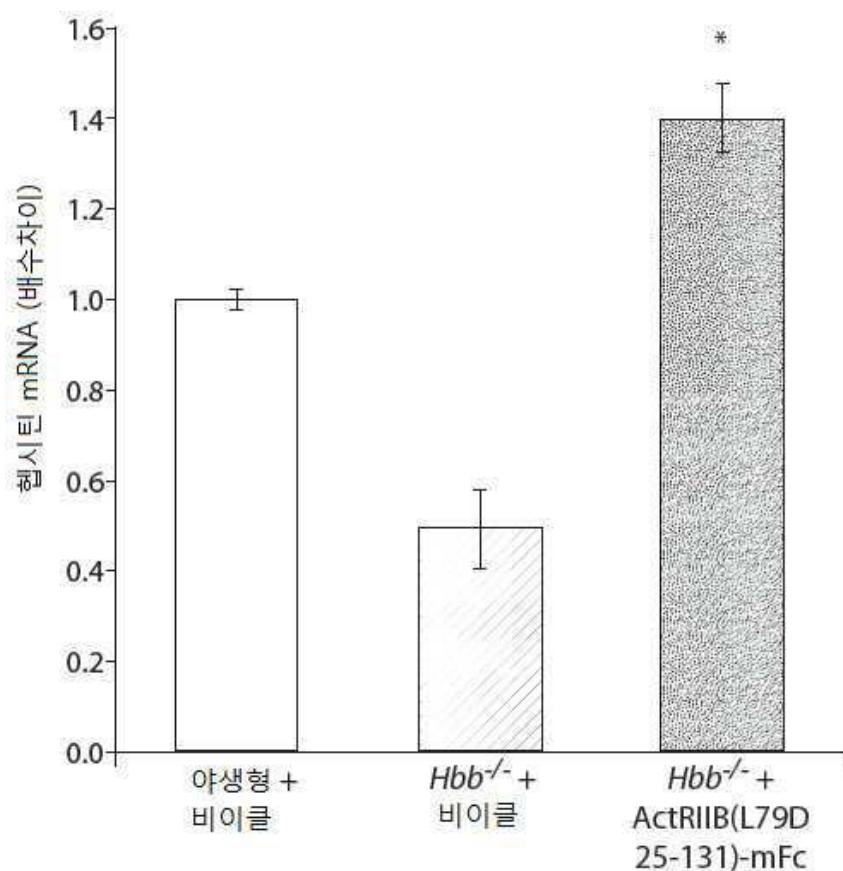
도면31c



도면32



도면33



도면34

