



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2020년07월09일  
(11) 등록번호 10-2132144  
(24) 등록일자 2020년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/4703 (2013.01)  
A61K 38/16 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7003791(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년06월04일  
심사청구일자 2020년02월07일
- (85) 번역문제출일자 2020년02월07일
- (65) 공개번호 10-2020-0017548
- (43) 공개일자 2020년02월18일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7000297  
원출원일자(국제) 2015년06월04일  
심사청구일자 2017년12월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/034245
- (87) 국제공개번호 WO 2015/187977  
국제공개일자 2015년12월10일
- (30) 우선권주장  
62/007,908 2014년06월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
JP05507854 A  
JP2012070739 A\*  
KR1020150111347 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
악셀레론 파마 인코포레이티드  
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128
- (72) 발명자  
쿠마르, 라빈드라  
미국, 01720 매사추세츠주, 액턴, 알링턴 스트리트 421  
그린버그, 애시아  
미국, 02421 매사추세츠주, 렉싱턴, 메인 캠퍼스 드라이브 12468
- (74) 대리인  
강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 28 항

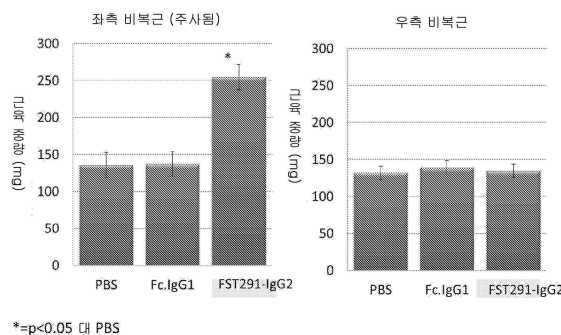
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **폴리스타틴 폴리펩티드를 이용한 장애의 치료방법 및 치료를 위한 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 전신 효과 보다는 투여 조직 (가령, 주사된 근육)에 효과를 보이는 폴리스타틴- Fc 융합 단백질에 관한 것이다. Fc 도메인은 폴리스타틴-Fc 융합 단백질을 이량체화시켜, 향상된 조직 보류를 제공한다. 명세서는 FST288, FST291 (비-자연 절단된 폴리스타틴) 또는 FST315로 이루어진 인간 폴리스타틴 폴리펩티드; 및 인간 IgG1 또는 IgG2 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

**대표도** - 도9



(52) CPC특허분류  
C07K 2319/30 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

샤르코-마리-치아 질병(Charcot-Marie-Tooth Disease)을 치료하는데 이용되는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 제1 아미노산과 제2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하고, 이때 제 1 아미노산 서열은 서열 번호: 15 또는 16의 아미노산 서열에 대하여 최소한 95% 동일한 아미노산 서열로 구성되며, 이때 제 2 아미노산 서열은 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하고, 이때 제 1 아미노산 서열은 서열 번호: 4의 아미노산 291-302중 임의의 하나에 대응하는 아미노산에서 종료되며, 이때 상기 폴리펩티드는 헤파린에 결합할 수 있고, 상기 폴리펩티드는 액티빈 A 및/또는 GDF11에 더 결합할 수 있는, 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 이때 제 1 아미노산 서열은 서열 번호: 15 또는 16의 아미노산 서열에 대하여 최소한 95% 동일한 아미노산 서열로 구성된, 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 이때 제 1 아미노산 서열은 서열 번호: 15 또는 16의 아미노산 서열로 구성된, 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 이때 링커 폴리펩티드는 제 1 아미노산 서열과 제 2 아미노산 서열 사이에 위치하며, 이때 상기 링커는 제 1 아미노산 서열의 C-말단 부분을 제 2 아미노산 서열의 N-말단 부분에 직접 연결시키고, 그리고 이때 상기 링커의 길이는 1-10개 아미노산인, 조성물.

#### 청구항 5

청구항 3에 있어서, 이때 링커 폴리펩티드는 제 3 아미노산 서열과 제 2 아미노산 서열 사이에 위치하며, 이때 상기 링커는 제 1 아미노산 서열의 C-말단 부분을 제 2 아미노산 서열의 N-말단 부분에 직접 연결시키고, 그리고 이때 상기 링커의 길이는 1-10개 아미노산인, 조성물.

#### 청구항 6

청구항 4에 있어서, 이때 상기 링커 폴리펩티드는 서열 TGGG을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 7

청구항 5에 있어서, 이때 상기 링커 폴리펩티드는 서열 TGGG을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 IgG 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 9

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 인간 IgG1와 비교하여 ADCC 및/또는 CDC 활성을 감소시키는 IgG 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 10

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 다음의 군에서 선택된 IgG 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하는, 조성물: IgG1, IgG2 및 IgG4.

#### 청구항 11

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 면역글로불린의 Fc 부분을 포함하는, 조성물.

**청구항 12**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 IgG1 불변 도메인을 포함하는, 조성물.

**청구항 13**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 서열 번호: 17의 아미노산 서열에 대하여 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

**청구항 14**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

**청구항 15**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 IgG2 불변 도메인을 포함하는, 조성물.

**청구항 16**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 서열 번호: 18의 아미노산 서열에 대하여 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

**청구항 17**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 제 2 아미노산 서열은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

**청구항 18**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 43의 아미노산 서열에 대하여 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 이때 서열 번호: 43의 말단(카르복시-말단) 리신(K)는 임의선택적으로 존재하지 않은, 조성물.

**청구항 19**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하고, 이때 서열 번호: 43의 말단(카르복시-말단) 리신(K)는 임의선택적으로 존재하지 않은, 조성물.

**청구항 20**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 42의 아미노산 서열에 대하여 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 이때 서열 번호: 42의 말단(카르복시-말단) 리신(K)에 대응하는 아미노산은 임의선택적으로 존재하지 않은, 조성물.

**청구항 21**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하고, 이때 서열 번호: 42의 말단(카르복시-말단) 리신(K)에 대응하는 아미노산은 임의선택적으로 존재하지 않은, 조성물.

**청구항 22**

청구항 21에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

**청구항 23**

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 조성물은 근육 내 투여 경로에 의해 이를 필요로 하는 환자의 표적화된 근육으로 투여되는, 조성물.

**청구항 24**

청구항 23에 있어서, 이때 목표 근육에서 근육 크기 또는 강도가 증가되는, 조성물.

**청구항 25**

청구항 23에 있어서, 이때 상기 조성물은 근육 크기 또는 강도에 실질적인 전신 효과(systemic effect)를 갖지 않는, 조성물.

**청구항 26**

청구항 23에 있어서, 이때 상기 조성물은 오직 하나의 표적화 된 근육에만 투여되는, 조성물.

**청구항 27**

청구항 23에 있어서, 이때 상기 조성물은 하나 이상의 표적화 된 근육에 투여되는, 조성물.

**청구항 28**

청구항 23에 있어서, 이때 목표 근육과 반대되는 근육은 크기 또는 강도가 실질적으로 증가하지 않는, 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원들에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2014년 6월 4일 출원된 미국 가특허출원 제 62/007,908에 대한 우선권의 이익을 주장한다. 전술한 출원의 명세서는 본 출원에 온전히 포함된다.

**배경 기술**

[0003] 전환 성장 인자-베타 (TGF-베타) 슈퍼패밀리는 공통의 서열 요소 및 구조적 모티프를 공유하는 다양한 성장 인자들을 함유한다. 이들 단백질들은 척추동물 및 무척추동물 모두에서 널리 다양한 세포 유형들에 대하여 생물학적 효과들을 발휘하는 것으로 공지되어 있다. 슈퍼패밀리의 구성원들은 패턴 형성 및 조직 구제화에 있어 배아 시기 발달 동안 중요한 기능들을 수행하며 지방생성, 근육발생, 연골형성, 심장발생, 혈액생성, 신경발생, 및 상피 세포 분화를 비롯한 다양한 분화 과정들에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 슈퍼패밀리는 두 가지 일반적인 갈래들로 나뉘어지며: BMP/GDF 및 TGF-베타/액티빈/BMP10 갈래들, 이들의 구성원들은 다양한, 종종 상보적인 효과들을 가진다. TGF-베타 패밀리의 일 구성원의 활성을 조작함으로써, 유기체에 상당한 생리학적 변화들을 유발하는 것이 종종 가능하다. 예를 들면, 피에몬테 및 벨기에 블루 소 (Piedmontese and Belgian Blue cattle breeds)는 GDF8 (미오스타틴으로도 불림) 유전자에서의 기능소실 돌연변이를 지니고 있는데, 이는 눈에 띄는 근육 질량의 증가를 유발한다. Grobet et al., Nat. Genet. 1997, 17(1):71-4. 더욱이, 인간에서, GDF8의 비활성 대립유전자는 증가된 근육 질량, 그리고, 이례적으로 우수한 힘과 연관되는 것으로 보고된다. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

[0004] 근육, 뼈, 연골 및 그 외 조직들에 있어서의 변화는 적절한 TGF-베타 패밀리 구성원에 의해 매개되는 작동적 또는 길항적 신호전달에 의해 이루어질 수 있다. 그러나 이 패밀리의 구성원들이 하나 이상의 조직에 영향을 줄 수 있기 때문에, 일부 환자의 진료 상황에 있어서는 이 패밀리 구성원들을 전신적인 방식 보다는 국소적인 방식으로 치료적으로 억제하는 것이 바람직하다. 그러므로 TGF-베타 신호전달의 잠재적 조절인자로서 기능하는 그리고 국소 투여에 적합한 제제가 필요하다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

- [0005] 발명의 요약
- [0006] 일부에서, 본 출원은 폴리스타틴 폴리펩티드가 투여되는 조직에 근접한 폴리스타틴 리간드 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8 및 GDF11)를 억제하면서도 환자에게 전신적 효과를 거의 또는 전혀 미치지 않도록 설계된 폴리스타틴 폴리펩티드를 제공한다.
- [0007] 본 출원에 기재된 폴리스타틴 폴리펩티드는 서열 번호: 1-4, 7-16 및 26-43중 임의의 서열 번호에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 선택적으로, 폴리스타틴 폴리펩티드는 이량체화되거나 보다 높은 차수의 다량체를 형성하도록 설계된다. 이는 이량체화 또는 다량체화를 가능하게 하는 도메인에 폴리스타틴 폴리펩티드의 폴리스타틴 서열을 융합시킴으로써 구현될 수 있다. 이러한 도메인의 한 예는, 예를 들면, 면역글로불린의 Fc 부위를 비롯한 면역글로불린의 불변 도메인이다. 선택적으로, 폴리스타틴 부위는 이종 부위에 직접 연결되거나, 삽입 서열, 가령, 링커가 사용될 수 있다. 링커의 한 예는 서열 TGGG이다. 선택적으로 폴리스타틴 폴리펩티드는, 인간 폴리스타틴-288이 헤파린 결합 활성을 가지는 것과 같이, 헤파린 결합 활성을 나타낼 수 있다. 대안적으로, 폴리스타틴은 인간 폴리스타틴-315와 같이, 마스킹된 헤파린 결합 도메인을 가질 수 있다. 일부에서 본 출원은 네이티브(native) 인간 IgG1에 비해 감소된 ADCC 또는 CDC 활성을 가지는 인간 IgG로부터의 면역글로불린 불변 도메인 부위를 포함하는 치료적으로 최적화된 폴리스타틴 폴리펩티드를 제공한다. 예에는 IgG2, IgG3, IgG4, 하이브리드 IgG2/4 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 변이체들이 포함된다. 일부에서 본 출원은 서열 번호:15 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열로 실질적으로 이루어진 또는 아미노산 서열로 이루어진 폴리스타틴의 최적 활성 형태를 제공하는데, 이 형태는 네이티브 FST(288) 및 FST(315) 형태들에 비해 우수한 단백질 특성들 및 활성, 특히 이량체 융합 단백질, 가령, 폴리스타틴-Fc 단백질과 관련하여 우수한 단백질 특성들 및 활성을 제공한다.
- [0008] 특정 양상들에서, 본 출원은 제 1 아미노산 서열 및 제 2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 제공하는데, 여기서 제 1 아미노산 서열은 서열 번호: 15 및 16으로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산 서열로 이루어지며, 제 2 아미노산 서열은 면역글로불린의 불변 도메인을 포함한다. 선택적으로, 제 1 아미노산 서열 및 제 2 아미노산 서열 사이에 배치되는 링커 폴리펩티드가 존재한다. 선택적으로 링커 폴리펩티드는 서열 TGGG를 포함하거나, 서열 TGGG로 본질적으로 이루어지거나 서열 TGGG로 이루어진다. 선택적으로, 제 2 아미노산 서열은 IgG 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하거나, 불변 도메인으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 불변 도메인으로 이루어진다. 선택적으로, 제 2 아미노산 서열은 인간 IgG1에 비해 감소된 ADCC 활성을 가진 IgG 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하거나, 불변 도메인으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 불변 도메인으로 이루어진다. 선택적으로, 제 2 아미노산 서열은 인간 IgG1에 비해 감소된 CDC 활성을 가진 IgG 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하거나, 불변 도메인으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 불변 도메인으로 이루어진다. 선택적으로, 제 2 아미노산 서열은 다음에서 선택된 IgG 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하거나, 불변 도메인으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 불변 도메인으로 이루어진다: IgG1, IgG2 및 IgG4. 선택적으로, 제 2 아미노산 서열은 면역글로불린, 가령, IgG 면역글로불린의 Fc 부위를 포함하거나 Fc 부위로 이루어지며, 이 면역글로불린은 인간 IgG1에 비해 감소된 ADCC, CDC 또는 이들 모두를 가지는 면역글로불린일 수 있고, 이의 예들에는 IgG2, IgG4 및 하이브리드 IgG2/4 또는 임의의 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 다양한 돌연변이들이 포함된다. 특정 양상들에서 본 출원은 서열 번호: 38-43의 그룹에서 선택된 서열에 최소한 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진, 또는 아미노산 서열로 이루어진 폴리스타틴 폴리펩티드를 제공한다. 특정 양상들에서 본 출원은 서열 번호: 26-28 및 32-34의 그룹에서 선택된 서열에 최소한 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진, 또는 아미노산 서열로 이루어진 폴리스타틴 폴리펩티드를 제공한다. 특정 양상들에서 본 출원은 서열 번호: 29-31 및 35-37의 그룹에서 선택된 서열에 최소한 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 아미노산 서열로 본질적으로 이루어진, 또는 아미노산 서열로 이루어진 폴리스타틴 폴리펩티드를 제공한다. 바람직한 폴리스타틴 폴리펩티드는 1nM, 100pM, 50pM 또는 10pM 미만의 KD로, 미오스타틴, GDF-11, 액티빈 A 및 액티빈 B로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 또는 그 이상의 리간드에 결합할 수 있다. 특정 양상들에서 상기 언급한 임의의 폴리펩티드들은 이형이량체 또는 동형이량체를 비롯한 이량체, 또는 보다 높은 차수의 다량체일 수 있다. 상기 언급된 임의의 폴리펩티드는 제약상의 제제로 혼입될 수 있다.
- [0009] 특정 양상들에서 본 출원은 본 출원에 개시된 임의의 폴리스타틴 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 및 이러한 핵산을 포함하는 세포들을 제공하며, 이 세포들은 폴리스타틴 폴리펩티드를 생성하기 위하여 사용될 수 있다.

[0010] 특정 양성들에서, 본 출원은 조직 또는 장기에 폴리스타틴 폴리펩티드를 직접 투여하는 조직 또는 장기의 치료 방법들을 제공한다. 예를 들면, 본 출원은 환자의 근육 크기 또는 강도의 증가방법을 제공하는데, 이 방법은 근육내 투여 경로로 유효량의 폴리스타틴 폴리펩티드를 필요로 하는 환자의 표적 근육에 투여하는 단계를 포함하며, 표적 근육에서 근육 크기 또는 강도 증가가 발생하고, 폴리스타틴 폴리펩티드는 근육 크기 또는 강도에 대한 실질적인 전신 효과를 가지지 않는다. 표적 근육은 근육 디스트로피 (가령, 듀첸 근육 디스트로피, 베커 근육 디스트로피 및 안면견갑상원형 근육 디스트로피), 염증성 근육 장애 (가령, 봉입체 근염), 근육 손상 또는 외상, 근육 불사용 (장기간 침상 안정(prolonged bed rest) 또는 사지 부동화 이후 발생할 수 있음) 및 근육 위축증을 비롯한 다양한 근육 장애 또는 노화, 암 또는 다양한 유형들의 만성 질환들의 결과로서의 약화 (weakening)에서 경우에 따라 손상을 입거나, 약화되거나 또는 결합이 있을 수 있다. 상기 방법은 또한 건강하지만 표적 근육의 근육 크기 또는 강도 증가를 원하는 근육에 적용될 수도 있다. 추가적으로, 근육에 대한 폴리스타틴 폴리펩티드의 투여는 일반적으로 체지방을 감소시킴으로써, 비만 또는 과도한 체지방과 연관된 그 외 장애의 치료에 유용할 수 있으며, 선택적으로, 폴리스타틴은 지방 조직에 직접 투여될 수 있다. 폴리스타틴 폴리펩티드는 단 하나의 표적 근육에 또는 하나 이상의 표적 근육에 투여될 수 있다.

**발명의 효과**

[0011] 상기 방법들 및 폴리스타틴 폴리펩티드는 그 외 조직들, 가령, 비표적 근육 또는 그 외 장기들에 대한 실질적인 효과 없이, 표적 조직, 예컨대, 근육에 대한 효과를 구현하기 위해 사용될 수 있다. 그 결과 폴리스타틴의 전신 효과는 관찰되지 않을 수 있다. 예를 들면, 표적 근육에 대해 반대쪽에 있는 근육은 크기 또는 강도가 실질적으로 증가하지 않을 수 있거나 다음으로 이루어진 그룹에서 선택된 측정치에 있어 환자에게 실질적인 효과를 전혀 주지 않을 수 있다: 혈청 FSH 수준들, 간 크기, 적혈구용적률, 헤모글로빈 및 망상적혈구 수준.

**도면의 간단한 설명**

[0012] **도 1**은 인간 폴리스타틴 315의 완전한, 비처리 아미노산 서열 (서열 번호:3)을 보여준다. 선도 서열은 이탤릭체로 강조되어 있고, 폴리스타틴 N-말단 부위 (FSN)는 하나의 밑줄로 표시되고, 세 개의 폴리스타틴 도메인 (FSDs)은 두개의 밑줄로 표시된다. 특히, 폴리스타틴 도메인 I (FSDI)은 적색으로 표시되어 있고, 폴리스타틴 도메인 II (FSDII)는 청색으로 표시되어 있고, 폴리스타틴 도메인 III (FSDIII)은 녹색으로 표시되어 있다.

**도 2**는 마우스에서 FST(288)-Fc, FST(315)-Fc, 또는 ActRIIB-Fc를 이용한 4주 피하 주사 처리의 체지방 조직 질량(lean tissue mass)에 대한 효과를 보여준다. 운반체(Vehicle)는 Tris-완충 식염수였다. 데이터는 평균± SEM이다. \*, 독립 t-검정으로 TBS에 대해. #, 독립 t-검정으로 FST 그룹에 대해. FST(288)-Fc, FST(315)-Fc, 및 ActRIIB-Fc 처리는 운반체 대조군 마우스에 비해 체지방 조직 질량을 현저히 증가시켰다. ActRIIB-Fc 처리된 마우스의 체지방 조직 질량의 증가는 FST(288)-Fc 또는 FST(315)-Fc 처리된 마우스에서 관찰된 체지방 조직 질량의 증가 보다 현저히 컸다.

**도 3**은 마우스에서 주 2회 4주간 FST(288)-Fc, FST(315)-Fc, 또는 ActRIIB-Fc 피하 주사 처리의 그림 강도에 대한 효과를 보여준다. 운반체(Vehicle)는 Tris-완충 식염수였다. 데이터는 평균± SEM이다. \*, 독립 t-검정으로 TBS에 대해. #, 독립 t-검정으로 FST 그룹에 대해. ActRIIB-Fc 처리는 마우스에서 그림 강도를 증가시켰다. FST(288)-Fc 또는 FST(315)-Fc 처리 마우스에서 그림 강도 증가는 관찰되지 않았다.

**도 4**는 마우스에서 FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1, 또는 ActRIIB-Fc의 주 2회 4주 피하 주사 처리의 흉근(Pecs), 전경 골근 (TA), 비복근 (Gastroc), 및 대퇴 근육 질량에 대한 효과를 보여준다. 운반체(Vehicle)는 Tris-완충 식염수였다. 데이터는 평균± SEM이다. \*, 독립 t-검정으로 TBS에 대해. #, 독립 t-검정으로 FST 그룹에 대해. ActRIIB-Fc 처리는 마우스에서 흉근, 전경 골근, 비복근, 및 대퇴 근육 질량을 현저히 증가시켰으나, FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1 처리 마우스에서 근육 질량의 증가는 거의 내지 전혀 관찰되지 않았다.

**도 5**는 난포-자극 호르몬 (FSH)의 혈청 수준에 대한 FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1의 4주 피하 주사 처리 효과를 보여준다. 운반체(Vehicle)는 Tris-완충 식염수였다. 데이터는 평균± SEM이다. \*, 독립 t-검정으로 TBS에 대해. FST(315)-IgG1 처리는 운반체 대조군 마우스에 비해 혈청 FSH 수준을 현저히 감소시켰다. 대조적으로, FST(288)-IgG1 처리는 혈청 FSH 수준에 전혀 효과가 없었다.

**도 6**은 마우스에서 FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1, 또는 ActRIIB-mFc를 이용한 주2회 4주 피하 주사 처리의 체지방 조직 질량에 대한 효과를 보여준다. 운반체(Vehicle)는 Tris-완충 식염수였다. 데이터는 평균±

SEM이다. \*, 독립 t-검정으로 TBS에 대해. ActRIIB-mFc 처리는 운반체 대조군 마우스에 비해 체지방 조직 질량을 현저히 증가시켰다. FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1 처리된 마우스에서는 체지방 조직 질량의 증가가 전혀 관찰되지 않았다.

도 7은 마우스에서 FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1, 또는 ActRIIB-mFc를 이용한 주 2회 4주 우측 비복근으로의 근육내 주사 처리의 비복근 근육 질량에 대한 효과를 보여준다. 운반체(Vehicle)는 Tris-완충 식염수였다. 데이터는 평균± SEM이다. \*, 독립 t-검정으로 TBS에 대해. #, 독립 t-검정으로 주사되지 않은 좌측 비복근에 대해 주사된 우측 비복근. FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1, 및 ActRIIB-mFc 처리는 주사된 우측 비복근에서 근육 질량을 현저히 증가시켰다. ActRIIB-mFc 처리는 또한 주사되지 않은 좌측 비복근에서 근육 질량을 현저히 증가시켰다. 대조적으로, FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1 처리된 마우스의 주사되지 않은 좌측 비복근에서는 증가가 관찰되지 않았다.

도 8은 마우스에서 FST(288)-IgG1의 우측 비복근내부로 주 2회 3주 용량을 달리한 근육내 주사처리의 비복근 근육 질량에 대한 효과를, 주사되지 않은 좌측 비복근에 대한 비율로서 표현하여 보여준다. 운반체는 인산-완충 식염수였다. 데이터는 평균± SEM이다. \*, 독립 t-검정으로 PBS에 대해. FST(288)-IgG1의 용량 증가는 주사되지 않은 근육에 비하여 주사된 비복근의 비대(hypertrophy)를 증가시켰다.

도 9는 FST(291)-IgG1를 이용한 주 2회 4주 좌측 비복근으로의 근육내 주사 처리의 효과를 보여준다. 운반체는 인산-완충 식염수였다. 데이터는 평균± SEM이다. \*, 독립 t-검정으로 PBS에 대해. FST(291)-IgG2의 근육내 투여는 주사되지 않은 근육 및 대조군들에 비해 주사된 비복근의 근육 질량을 눈에 띄게 증가시켰다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0013] 상세한 설명
- [0014] 1. 개요
- [0015] 특정 양상들에서, 본 발명은 폴리스타틴 폴리펩티드에 관련된다. 본 출원에서 사용되는 용어 "폴리스타틴"은 임의의 종으로부터 유도된 폴리스타틴 (FST) 단백질 및 폴리스타틴-관련 단백질의 패밀리를 의미한다. 폴리스타틴은 고등 동물의 거의 모든 조직들에서 발현되는 자가분비 당단백질이다. 이것은 처음에 난포액으로부터 분리되고 뇌하수체 전엽으로부터 난포-자극 호르몬 (FSH) 분비를 억제하는 단백질 분획으로 확인되었으므로, FSH-억제 단백질 (FSP)로 표기된다. 그 후, 이것의 1차적인 기능은, 뇌하수체 전엽에서 FSH의 분비를 향상시키는 이웃 분비 호르몬, 예를 들면 액티빈을 비롯한 TGF-β 수퍼패밀리의 구성원들의 결합 및 중성화인 것으로 결정되었다.
- [0016] 용어 "폴리스타틴 폴리펩티드"는, 예를 들면, 리간드 결합 (예컨대, 미오스타틴, GDF-11, 액티빈 A, 액티빈 B) 또는 헤파린 결합을 비롯한, 유용한 활성을 보유하는 폴리스타틴 패밀리의 임의의 자연 발생 폴리펩티드 뿐만 아니라 이의 임의의 변이체들 (돌연변이체, 절편, 융합체, 및 펩티도모방체 형태들을 포함)을 포함하는 폴리펩티드를 의미하기 위하여 사용된다. 예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드는 폴리스타틴 폴리펩티드의 서열에 최소한 약 80% 동일한 서열을 가지는, 그리고 바람직하게는 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성의 서열을 가지는 임의의 공지된 폴리스타틴 서열로부터 유래한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 용어 "폴리스타틴 폴리펩티드"는 이중 (비-폴리스타틴) 부위와 함께 상기 언급된 임의의 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산 서열이 서열 번호:3으로 나타내어지는 인간 폴리스타틴의 긴 (315개 아미노산) 형태에서 특유하게 발견되지 않을 경우 폴리스타틴에 대해 이중인 것으로 이해된다. 많은 이중 부위들의 예들이 본 출원에 제공되며, 이러한 이중 부위들은 아미노산 서열에 의해, 융합 단백질의 폴리스타틴 폴리펩티드 부위에 바로 인접하거나, 삽입 아미노산 서열, 가령, 링커 또는 그 외 서열에 의해 분리될 수 있다.
- [0017] 폴리스타틴은 교대 mRNA 스플라이싱 및 단백질의 가변 당화(variable glycosylation)에 기초한 31 내지 49 kDa의 분자량 범위의 단일-사슬 폴리펩티드이다. 교대로 스플라이싱된 mRNA는 315개 아미노산 (즉, FST315) 및 288개 아미노산 (즉, FST288)의 두 가지 단백질을 인코딩하며; 폴리스타틴 315는 폴리스타틴 303 (FST303)으로 추가로 단백질 효소분해 될 수 있다. 아미노산 서열의 분석은 네이티브 인간 폴리스타틴 폴리펩티드가 다음과 같은 5개의 도메인 (N-말단부로부터)을 포함함을 밝혀냈다: 신호 서열 펩티드 (서열 번호:1의 아미노산 1-29), N-말단 도메인 (FSN) (서열 번호:1의 아미노산 30-94), 폴리스타틴 도메인 I (FSDI) (서열 번호:1의 아미노산 95-164), 폴리스타틴 도메인 II (FSDII) (서열 번호:1의 아미노산 168-239), 및 폴리스타틴 도메인 III

(FSDIII) (서열 번호:1의 아미노산 245-316). PNAS, U.S.A., 1988, Vol. 85, No 12, pp. 4218-4222를 보라.

[0018] 인간 폴리스타틴-288 (FST288) 전구물질은 하기 아미노산 서열을 가지며, 신호 펩티드는 굵게 표시되어 있고, N-말단 도메인 (FSN)은 하나의 밑줄로 표시되고, 그리고 폴리스타틴 도메인 I-III (FSI, FSII, FSIII)은 두개의 밑줄로 표시되어 있다.

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVL  
YKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNCIP  
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLD  
GKTYRNECALLKARCKEOPELEVOYOGRCKKTCRDVFC PGSSTCV  
VDOTNNAYCVTCNRICPEPASSEYOYLCGNDGVTYSSACHLRKATC  
LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK VGRGRCSLC  
DELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS  
CN (SEQ ID NO:1)

[0019]  
 [0020] (서열 번호:1)

[0021] 처리된 (성숙) 인간 폴리스타틴 변이체 FST(288)는 하기 아미노산 서열을 가지는데 N-말단 도메인은 하나의 밑줄로 표시되며, 폴리스타틴 도메인 I-III은 두개의 밑줄로 표시된다. 더욱이, 첫번째 시스테인에 앞서는 임의의 초기 아미노산 G 또는 N은 어떠한 결과없이 처리에 의해 제거되거나 의도적으로 제거될 수 있으며, 이러한 약간 더 작은 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 추가로 포함됨이 이해될 것이다.

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNT  
LFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVC  
APDCSNITWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKEOPELEVOYOGR  
C  
KKTCRDVFCPGSSTCVVDOTNNAYCVTCN RICPEPASSEYOYLCGN  
DGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGK  
KCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKE  
AACSSGVLLEVKHSGSCN (SEQ ID NO:2)

[0022]  
 [0023] (서열 번호:2)

[0024] 인간 폴리스타틴-315 (FST315) 전구물질은 하기 아미노산 서열을 가지며, 신호 펩티드는 굵게 표시되어 있고, N-말단 도메인 (FSN)은 하나의 밑줄로 표시되고, 폴리스타틴 도메인 I-III (FSI, FSII, FSIII)은 두개의 밑줄로 표시된다 (NCBI 등록 번호 AAH04107.1; 344 아미노산).

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVL  
YKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNCIP  
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLD  
GKTYRNECALLKARCKEOPELEVOYOGRCKKTCRDVFC PGSSTCV  
VDOTNNAYCVTCNRICPEPASSEYOYLCGNDGVTYSSACHLRKATC  
LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK VGRGRCSLC  
DELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS  
CNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW (SEQ ID NO:3)

[0025]  
 [0026] (서열 번호:3)

[0028] \*처리된 (성숙) 인간 FST(315)는 하기 아미노산 서열을 가지는데 N-말단 도메인은 하나의 밑줄로 표시되며, 폴리스타틴 도메인 I-III은 두개의 밑줄로 표시된다. 더욱이, 첫번째 시스테인에 앞서는 임의의 초기 아미노산 G 또는 N은 어떠한 결과없이 처리에 의해 제거되거나 의도적으로 제거될 수 있으며, 이러한 약간 더 작은 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 추가로 포함됨이 이해될 것이다.

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNT  
LFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCVA  
PDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVOYQGR  
KKTCRDVFCPGSSTCVVDOTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGN  
DGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGK  
KCLWDFKVGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKE  
AACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISILEW

[0029]

[0030]

(서열 번호:4)

[0031]

본 출원의 폴리스타틴 폴리펩티드는 유용한 활성을 보유하는 폴리스타틴 단백질의 임의의 자연 발생 도메인 뿐만 아니라 이의 변이체들 (예컨대, 돌연변이, 절편, 및 펩티도모방체 형태들)을 포함할 수 있다. 예를 들면, FST(315) 및 FST(288)은 액티빈 (액티빈 A 및 액티빈 B) 그리고 미오스타틴 (그리고 밀접하게 관련된 GDF11) 모두에 대해 높은 친화도를 가지며 폴리스타틴 도메인들 (예컨대, FSN 및 FSD I-III)은 이러한 TGF-β 리간드의 결합에 관여되는 것으로 생각됨이 알려져있다. 그러나 이들 세 가지 도메인들 각각은 이들 TGF-β 리간드에 대하여 서로 상이한 친화도를 가질 수 있는 것으로 생각된다. 예를 들면, 최근의 연구는 오직 N-말단 도메인 (FSN) 및 두 개의 FSDI 도메인들만을 동시에 포함하는 폴리펩티드 구조체들이 미오스타틴에 대해 높은 친화도를 보유하였으며, 액티빈에 대한 친화도를 거의 또는 전혀 나타내지 않았고 유전자 발현에 의해 마우스 내부에 도입될 경우 전신적인 근육 성장을 증진시켰음을 밝혀내었다 (Nakatani *et al.*, The FASEB Journal, Vol. 22477-487 (2008)).

[0032]

추가적으로, FSDI 도메인은 인간 폴리스타틴의 헤파린 결합 도메인을 함유하며, 이 도메인은 KKCRMNKKNKPR의 아미노산 서열 (서열 번호: 5)을 가진다. 이러한 헤파린 결합 도메인은 BBXBXXBBXBXB (서열 번호:6)으로 나타낼 수 있는데 여기서 "B"는 염기성 아미노산, 특히 리신 (K) 또는 아르기닌 (R)을 의미한다. 따라서 본 출원은, 일부에서, (예컨대, 미오스타틴에 대한 높은-친화도를 유지하면서 액티빈에 대해 현저히 감소된 친화도를 보유하는) 자연 발생 FST 단백질에 비해 주어진 TGF-β 리간드의 선택적 결합 및/또는 억제력을 나타내는 변이체 폴리스타틴 단백질을 포함한다.

[0033]

특정 양상들에서, 본 출원은 하기 제시된 FSN 도메인을 포함하는 폴리펩티드, 그리고, 예를 들면, 하나 이상의 이중 폴리펩티드를 포함하며, 또한, 첫번째 시스템에 앞서는 임의의 초기 아미노산 G 또는 N은 하기 나타난 예(서열 번호:8)에서와 같이 삭제될 수 있음이 이해될 것이다.

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF  
 NGGAPNCIPCKET (SEQ ID NO:7)

[0034]

[0035]

(서열 번호:7)

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNG  
 GAPNCIPCKET (SEQ ID NO:8)

[0036]

(서열 번호:8)

[0037]

특정 양상들에서, 본 출원은 하기 제시된 바와 같이 헤파린 결합과 함께 미오스타틴 (및/또는 GDF11) 결합의 최소 코어 활성도를 함유하는 FSDI 도메인을 포함하는 폴리펩티드, 그리고, 예를 들면, 하나 이상의 이중 폴리펩티드를 포함한다.

CENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALL  
 KARCKEQPELEVQYQGR (SEQ ID NO:9)

[0038]

(서열 번호:9)

[0039]

FSDI 서열은 FSN 도메인을 추가로 포함하는 폴리펩티드로서 발현함으로써 구조적인 면에서 유리하게 유지될 수 있다. 따라서, 본 출원은 하기 제시된 (서열 번호:10) FSN-FSDI 서열을 포함하는 폴리펩티드, 및, 예를 들면, 하나 이상의 이중 폴리펩티드를 포함하며, 더욱이, 첫번째 시스템에 앞서는 임의의 초기 아미노산 G 또는 N은 어떠한 결과없이 처리에 의해 제거되거나 의도적으로 제거될 수 있으며, 이러한 약간 더 작은 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 추가로 포함됨이 이해될 것이다.

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLTKWMI FNG  
 GAPNCIPCKETCENVD CGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLD  
 GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRC (SEQ ID NO:10)

[0040]

(서열 번호:10)

[0041]

Nakani 외.에 의해 입증된 바와 같이, FSN-FSDI-FSDI 구조는 마우스에서 유전적으로 발현될 때 전신 근육 성장을 부여하기에 충분하며, 따라서 본 출원은 하기 아미노산 서열들을 포함하는 폴리펩티드 및, 예를 들면, 하나 이상의 이중 폴리펩티드를 포함한다.

[0042]

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLTKWMI FNG  
 GAPNCIPCKETCENVD CGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLD  
 GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCENVD CGPGKKCRMNKKNK  
 RCVCAPDCSNITWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRC

[0043]

(서열 번호:11)

[0044]

FSDI 서열이 미오스타틴 및 GDF11 결합을 부여하지만, 액티빈들, 특히 액티빈 A 뿐만 아니라 액티빈 B도, 또한 근육의 음성 조절인자이므로, 미오스타틴/GDF11 그룹 및 액티빈 A/액티빈 B 그룹 모두를 억제하는 폴리스타틴 폴리펩티드는 보다 강력한 근육 효과를 제공할 수 있음이 입증되었다. 더욱이, 본 출원에서 특정 폴리스타틴 폴리펩티드, 특히 헤페린 결합 도메인을 포함하는, 그리고 더욱 특히 상동이량체 형태의, 가령, Fc 융합체의 폴리스타틴 폴리펩티드가 낮은 전신적 가용성을 나타냄을 알아낸 것을 고려할 때, 생식축 및 그 외 조직들에 있어 공지된 액티빈 억제 효과와 연관된 안전성 문제들이 경감된다. FSDII이 액티빈 A 및 B 결합을 부여함을 고려하여, 본 출원은 FSDI 및 FSDII (서열 번호:12), 뿐만 아니라 FSN-FSDI-FSDII 구조체 (서열 번호: 13)를 포함하는 폴리펩티드 및, 예를 들면, 하나 이상의 이중 폴리펩티드를 제공한다.

[0045]

CENVD CGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLDGKTYRNECALL  
 KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPE  
 PASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKC (SEQ ID  
 NO:12)

[0046]

(서열 번호:12)

[0047]

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLTKWMI FNG  
 GAPNCIPCKETCENVD CGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLD  
 GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAY  
 CVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKC

[0048]

(서열 번호:13)

[0049]

실시예에서 설명하는 바와 같이, 291 아미노산들의 폴리스타틴 폴리펩티드 (자연 발생 FST-315의 절단 (truncation)을 나타냄)을 나타냄)는 유리한 성질들을 가진다. 따라서, 비처리 (서열 번호: 14) 및 성숙 FST(291) (서열 번호: 15) 폴리펩티드가 본 출원에 포함되며 이중 단백질과 조합될 수 있다. 더욱이, 첫번째 시스테인에 앞서는 임의의 초기 아미노산 G 또는 N은 어떠한 결과없이 처리에 의해 제거되거나 의도적으로 제거될 수 있으며, 이러한 약간 더 작은 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드, 가령, 하기에 (서열 번호 : 16)와 같은 폴리펩티드가 추가로 포함됨이 이해될 것이다.

[0050]

MVRARHQPGGLCLLLLLL CQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLY  
 KTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLTKWMI FNGGAPNCIP  
 CKETCENVD CGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLD  
 GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCV  
 VDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC  
 LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLC  
 DELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS  
 CNSIS (SEQ ID NO:14)

[0051]

[0052] (서열 번호:14)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF  
 NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG  
 LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN  
 NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG  
 KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNA  
 TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSIS (SEQ ID NO:15)

[0053]

[0054] (서열 번호:15)

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNG  
 GAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLD  
 GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA  
 YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC  
 IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATY  
 ASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSIS (SEQ ID NO:16)

[0055]

[0056] (서열 번호:16)

[0057] 특정 구체예들에서, 본 발명은 대상 폴리스타틴 폴리펩티드 (예컨대, FST-IgG 융합 폴리펩티드)를 이용하여 폴리스타틴의 리간드 (폴리스타틴 리간드로도 언급됨)를 길항시키는 것에 관한 것이다. 그러므로 본 발명의 조성물 및 방법들은 폴리스타틴의 하나 이상의 리간드의 이상 활성화와 연관된 장애를 치료하는데 유용하다. 폴리스타틴의 예시적인 리간드는 일부 TGF-β 패밀리의 구성원들, 가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 미오스타틴 (GDF8) 및 GDF11을 포함한다.

[0058] 본 출원에서 폴리스타틴 단백질은 FST로 언급될 수 있다. 숫자를 수반하는 경우, 가령, FST(288)의 경우, 이는 단백질이 폴리스타틴의 288 형태임을 표시한다. FST(288)-Fc로 나타내어진 경우, 이는 FST(288)에 대한 C-말단 Fc 융합을 표시하며, 이는 삽입 링커를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 이 경우 Fc는 본 출원에 정의된 바와 같은 임의의 면역글로불린 Fc 부위일 수 있다. FST(288)-IgG2로 나타내어진 경우, 이는 FST(288)에 대한 인간 IgG2의 Fc 부위의 C-말단 Fc 융합을 표시한다.

[0059] 액티빈들은 이량체 폴리펩티드 성장 인자이며 TGF-β 수퍼패밀리에 속한다. 두 개의 밀접하게 관련된 β 서브유닛들의 동형/이형이량체 (β<sub>A</sub>β<sub>A</sub>, β<sub>B</sub>β<sub>B</sub>, 및 β<sub>A</sub>β<sub>B</sub>)인 세 가지 액티빈들 (A, B, 및 AB)이 존재한다. 추가적인 액티빈 C 및 E가 확인되었으나, 이들 단백질의 기능은 잘 알려져있지 않다. TGF-β 수퍼패밀리에서, 액티빈들은 난소 및 태반 세포들에서 호르몬 생성을 자극하고, 신경 세포 생존을 보조하고, 세포-유형에 따라 세포-주기 진행에 양성적으로 또는 음성적으로 영향을 미치며, 양서류 배발생에서 최소한 중배엽 분화를 유도할 수 있는 독특한 다기능성 인자들이다 (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 세포들로부터 분리된 적혈구 분화 인자 (EDF)는 액티빈 A와 동일한 것으로 밝혀졌다 (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). 액티빈 A는 골수에서 적혈구생성의 자연적 조절인자로서 기능함이 제시되었다. 몇가지 조직들에서, 액티빈 신호전달은 이의 관련 이형이량체인, 인히빈에 의해 길항된다. 예를 들면, 뇌하수체로부터 난포-자극 호르몬 (FSH)을 방출하는 동안, 액티빈은 FSH 분비 및 합성을 촉진시키는 반면, 인히빈은 FSH 분비 및 합성을 저해한다. 액티빈은 또한 근육 질량 및 기능의 음성 조절인자로서 연관되어왔으며, 액티빈 길항제들은 근육 성장을 촉진시키거나 생체내 근육 손실에 대항할 수 있다. Link and Nishi, Exp Cell Res. 1997 Jun 15;233(2):350-62; He et al., Anat Embryol (Berl). 2005 Jun;209(5):401-7; Souza et al. Mol Endocrinol. 2008 Dec;22(12):2689-702; Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jul;297(1):E157-64; Gilson et al. Zhou et al. Cell. 2010 Aug 20;142(4):531-43.

[0060] 성장 및 분화 인자-8 (GDF8)은 또한 미오스타틴으로 공지되어 있다. GDF8은 골격 근육 질량의 음성 조절인자이다. GDF8은 성장중인 그리고 성인 골격 근육에서 많이 발현된다. 유전자삽입 마우스에서의 GDF8 무효화 돌연변이는 눈에 띄는 골격 근육 비대 및 과형성으로 특징지어진다 (McPherron et al., Nature, 1997, 387:83-90). 유사한 골격 근육 질량 증가가 소에서의 GDF8의 자연 발생 돌연변이들에서 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; and Kambadur et al., Genome Res., 1997, 7:910-915) and, strikingly, in humans (Schuelke et al., N Engl J Med 2004;350:2682-8). 연구결과들 또한 인간에서 HIV-감염 관련 근육 소모가 GDF8 단백질 발현의 증가를 수반함을 보여주었다 (Gonzalez-Cadavid et al., PNAS, 1998, 95:14938-43). 또한, GDF8은 근육-특이적 효소들 (예컨대, 크레아틴 키나아제)의 생성을 조절하며 근육모세포 증식을 조절할 수 있다 (WO 00/43781). GDF8 프로펩티드는 성숙 GDF8 도메인 이량체에 비공유적으로 결합하여, 그 생물학적 활성을 비활성화시킬 수 있다 (Miyazono et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) J. Biol. Chem., 263; 7646-7654; and Brown et al. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). GDF8 또는 구조적 관련 단백질들에 결합하여 이들의 생물학적 활성을 억제하는 그 외 단백질들은 폴리스타틴, 그리고 잠재적으로, 폴리스타틴-관련 단백질을 포함한다 (Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

- [0061] 본 명세서에서 사용되는 용어들은 일반적으로 각 용어가 사용되는 본 발명의 내용 및 구체적인 내용에 있어서 해당 기술 분야에서의 통상의 의미를 가진다. 특정 용어들은, 하기에서 또는 본 명세서의 다른 부분에서 본 발명의 조성물들 및 방법들 그리고 이들을 제조 및 사용하는 방법을 설명함에 있어서 실시하는 사람들에게 추가적인 안내를 제공하기 위하여 논의된다. 한 용어의 임의의 사용 범위 또는 사용 의미는 그 용어가 사용되는 구체적인 내용으로부터 명확해질 것이다.
- [0062] "약" 및 "대략"은 일반적으로 측정들의 성질 또는 정밀도가 주어졌을 때 측정된 양에 대하여 허용가능한 오차 범위를 의미하게 된다. 전형적으로, 예시적인 오차 범위는 주어진 수치 또는 수치 범위의 20 퍼센트 (%) 이내, 바람직하게는 10% 이내, 더욱 바람직하게는 5% 이내이다.
- [0063] 대안적으로, 그리고 특히 생물학계에서, 용어 "약" 및 "대략"은 임의의 배수에 속하는, 바람직하게는 5-배 이내 그리고 더욱 바람직하게는 2-배 이내에 속하는 평균 수치일 수 있다. 본 출원에 제공되는 수치량들은 달리 언급이 없는 한 근사치이며, 용어 "약" 또는 "대략"은 명기되지 않는 경우 암시될 수 있음을 의미한다.
- [0064] 본 발명의 방법들은 야생형 서열 내지 하나 이상의 돌연변이 (서열 변이체들)를 비롯한 서열들을 서로 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 비교는 전형적으로 예컨대, 해당 분야에 널리 공지된 서열 정렬 프로그램 및/또는 알고리즘 (예를 들면, 두서너 가지 예로, BLAST, FASTA 및 MEGALIGN)을 사용한 폴리머 서열들의 정렬을 포함한다. 해당 기술분야의 숙련자들은 돌연변이가 잔기 삽입 또는 결실을 함유하는 정렬들에서, 서열 정렬은 삽입되거나 결실된 잔기를 함유하지 않는 폴리머 서열에 "공백(gap)" (전형적으로 대시, 또는 "A"로 나타냄)을 도입시킴을 용이하게 이해할 수 있다.
- [0065] 모든 문법적인 형태들 및 철자 변형들에 있어 "상동(homologous)"은 동일한 종의 유기체들에서의 수퍼패밀리로부터 얻은 단백질, 뿐만 아니라 상이한 종의 유기체로부터의 상동 단백질을 포함하는, "공통의 진화 기원"을 가지는 두 단백질들 사이의 관계를 의미한다. 이러한 단백질들 (및 이의 인코딩 핵산들)은 특이적 잔기 또는 모티프의 존재 및 보존된 위치에 의해 또는 백분율 동일성 면에서 이들의 서열 유사성에 의해 반영되는 서열 상동성을 가진다. 그러나 통상의 용법에서 그리고 본 출원에서, 부사, 가령, "매우"로 변형된 경우 용어 "상동"은 서열 유사성을 의미할 수 있으며 공통의 진화 기원과 관련되거나 관련되지 않을 수 있다.
- [0066] 모든 문법적인 형태들에서 용어 "서열 유사성"은 공통의 진화 기원을 공유할 수 있거나 공유하지 않을 수 있는 핵산 또는 아미노산 서열들 사이의 동일성 또는 상응성 정도를 의미한다.
- [0067] 2. 폴리스타틴 폴리펩티드
- [0068] 특정 양상들에서, 본 출원은 폴리스타틴 폴리펩티드 (예컨대, FST-Fc 폴리펩티드), 그리고 특히 서열 번호:2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16을 포함하는 폴리펩티드에 의해 예시되는 절단 형태들, 및 이의 변이체들에 관한 것이다. 선택적으로, 절편, 기능적 변이체, 및 변형된 형태들은 이들의 상응하는 야생형 폴리스타틴 폴리펩티드와 유사한, 동일한 또는 개선된 생물학적 활성들을 가진다. 예를 들면, 본 출원의 폴리스타틴 변이체는 폴리스타틴 리간드 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, 및 GDF8)에 결합하여 이들의 기능을 억제할 수 있다. 선택적으로, 폴리스타틴 폴리펩티드는 조직들, 특히 근육의 성장을 조절한다. 폴리스타틴 폴리펩티드의 예들에는 서열 번호. 1-16 및 26-43 중 임의의 아미노산 서열들을 포함하는, 이러한 아미노산 서열들로 본질적으로 이루어진 또는 이루어진 폴리펩티드, 뿐만 아니라 서열 번호. 1-16 및 26-43 중 임의의 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열들을 포함하는, 이러한 아미노산 서열들로 본질적으로 이루어진, 또는 이루어진 폴리펩티드가 포함된다. 이러한 폴리펩티드에 대한 변이체들은 하기 안내에 따라 제조될 수 있다. 폴리스타틴 폴리펩티드에서 아미노산들의 변

호는 네이티브 선도 서열이 사용되는지 여부에 관계없이, 서열 번호:1의 서열에 기초한다.

- [0069] 상기 설명한 바와 같이, 폴리스타틴은 폴리스타틴-리간드 결합을 매개하는 것으로 생각되는 세 가지 시스템-농후 부위들 (즉, FS 도메인들 I-III)로 특징지어진다. 더욱이, 연구자들은 상기 세 가지 FS-결합 도메인들 중 단 하나 (예컨대, FSDI)만을 포함하는 폴리펩티드 구조체들은 특정 폴리스타틴-리간드 (예컨대, 미오스타틴)에 대한 강한 친화도를 보유하며 *생체내*에서 생물학적으로 활성임을 입증하였다. Nakatani *et al.*, The FASEB Journal, Vol. 22477-487 (2008)를 보라. 그러므로 본 출원의 변이체 폴리스타틴 폴리펩티드는 폴리스타틴 단백질의 하나 이상의 활성 부위들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 출원의 구조체들은 서열 번호:1의 아미노산 30-95에 상응하는 잔기에서 시작하여 서열 번호:1의 아미노산 316-344에 상응하는 위치에서 끝날 수 있다. 그 외 예들에는 서열 번호:1의 아미노산 30-95로부터의 위치에서 시작하여 아미노산 164-167 또는 238-244에 상응하는 위치에서 끝나는 구조체들이 포함된다. 다른 예들은 서열 번호 7-16 중 임의의 것을 포함할 수 있다.
- [0070] 본 출원에 기재된 폴리스타틴 변이체들은 서로 또는 이종 아미노산 서열들과 다양한 방식으로 조합될 수 있다. 예를 들면, 본 출원의 변이체 폴리스타틴 단백질은 FSDI (서열 번호:1의 아미노산 95-164 (즉, 서열 번호:2), FSDII (서열 번호:1의 아미노산 168-239), 또는 FSDIII (서열 번호:1의 아미노산 245-316)에서 선택된 하나 이상의 FS 도메인들을 포함하는 폴리펩티드, 뿐만 아니라 FSDI (서열 번호:1의 아미노산 95-164 (즉, 서열 번호:2), FSDII (서열 번호:1의 아미노산 168-239), 또는 FSDIII (서열 번호:1의 아미노산 245-316)에 최소한 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열로부터 선택된 하나 이상의 FS 도메인들을 포함하는 단백질을 포함한다. 재조합 단백질이, 예를 들면, 폴리스타틴 리간드-결합 활성 (예컨대, 미오스타틴) 및 생물학적 활성 (예컨대, 근육 질량 및/또는 강도 포함)을 비롯한 원하는 활성을 유지한다면, 세 가지 FS 도메인들은 본 출원의 변이체 폴리스타틴 폴리펩티드 내에서 임의의 순서로 결합될 수 있다. 이러한 폴리스타틴 변이체 폴리펩티드의 예들에는, 예를 들면, 도메인 구조들, 가령, FSDI-FSDII-FSDIII, FSDI-FSDIII, FSDI-FSDII-FSDIII, FSDI-FSDII, FSDI-FSDI, FSN-FSDI-FSDII-FSDIII, FSN-FSDI-FSDII, FSN-FSDI-FSDI, FSN-FSDI-FSDIII, FSN-FSDI-FSDI-FSDIII을 보유하는 폴리펩티드, 및 이러한 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 그 외 이종 폴리펩티드를 융합시켜 얻은 폴리펩티드가 포함된다. 이러한 도메인들은 직접 연결되거나 링커 폴리펩티드를 통해 연결될 수 있다. 선택적으로, 폴리펩티드 링커들은 임의의 서열일 수 있고 1-50, 바람직하게는 1-10, 그리고 더욱 바람직하게는 1-5 아미노산들을 포함할 수 있다. 특정 양상들에서, 바람직한 링커들은 시스템 아미노산들을 전혀 함유하지 않는다.
- [0071] 일부 구체예들에서, 본 출원의 폴리스타틴 변이체들은 하나 이상의 폴리스타틴 리간드에 대하여 감소된 또는 제거된 결합 친화도를 가진다. 특정 양상들에서, 본 출원은 액티빈에 대하여 감소된 또는 제거된 결합 친화도를 가지는 폴리스타틴 변이체들을 제공한다. 특정 양상들에서, 본 출원은 액티빈에 대하여 감소된 또는 제거된 결합 친화도를 가지지만 미오스타틴에 대하여는 높은 친화도를 보유하는 폴리스타틴 변이체들을 제공한다.
- [0072] 특정 양상들에서, 본 출원은 FSDII 도메인 또는 기능적 활성 FSDII 도메인에 상응하는 서열을 포함하지 않는 폴리스타틴 변이체들을 제공한다. 예를 들면, 본 출원의 폴리스타틴 폴리펩티드는 FSDII 도메인의 부분적 또는 완전한 결실을 통해 얻어지는 변이체를 포함할 수 있다. 특정 양상들에서, 이러한 폴리스타틴 변이체들은 FSDII 부위 내 하나 이상의 시스템 잔기들의 결실 또는 비-시스템 아미노산들로의 치환을 포함한다.
- [0073] 본 출원의 폴리스타틴 단백질은 신호 서열을 포함할 수 있다. 신호 서열은 폴리스타틴 단백질의 네이티브 신호 서열 (예컨대, 서열 번호:1의 아미노산 1-29) 또는 또다른 단백질로부터의 신호 서열, 가령, 조직 플라즈미노겐 활성인자 (TPA) 신호 서열 또는 꿀벌 멜라틴 (HBM) 신호 서열일 수 있다.
- [0074] 추가의 N-연결된 당화 부위들 (N-X-S/T)이 폴리스타틴 폴리펩티드에 부가될 수 있으며, FST-Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. N-X-S/T 서열들은 리간드-결합 포켓 외부의 위치들에 일반적으로 도입될 수 있다. N-X-S/T 서열들은 폴리스타틴 서열과 Fc 또는 그 외 융합 성분 간의 링커로 도입될 수 있다. 이러한 부위는 기존의 S 또는 T에 대하여 올바른 위치에 N을 도입함으로써, 또는 기존의 N에 상응하는 위치에 S 또는 T를 도입함으로써 최소한의 노력으로 도입될 수 있다. 당화될 예정인 임의의 S는 당화에 의해 제공되는 보호로 인해 면역원 부위를 생성하지 않고 T로 변형될 수 있다. 유사하게, 당화될 예정인 임의의 T는 S로 변형될 수 있다. 따라서, 폴리스타틴 변이체는 하나 이상의 추가적인, 비-내인성 N-연결된 당화 공통 서열들을 포함할 수 있다.
- [0075] 특정 구체예들에서, 본 출원은 치료적 효능, 또는 안정성 (예컨대, *생체외* 반감기 및 *생체내* 단백질 가수분해에 대한 내성)을 향상시키는 것과 같은 목적을 위하여 폴리스타틴 폴리펩티드의 구조를 변형시킴으로써 기능적 변이체들을 제조하는 것을 고려한다. 변형된 폴리스타틴 폴리펩티드는 또한 예를 들어, 아미노산 치환, 결실, 또는 부가에 의해 생성될 수도 있다. 예를 들어, 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파테이트를 글루타메이트

로, 트레오닌을 세린으로 단리 대체, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 유사 대체 (예컨대, 보존성 돌연변이들)하는 것은 생성된 분자의 생물학적 활성에 대하여 주된 영향을 미치지 않을 것임이 타당하게 예상된다. 보존성 대체들은 결 사슬들에 관련된 아미노산들의 한 패밀리 내에서 일어나는 대체들이다. 폴리스타틴 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화가 기능적 상동체를 생성하는지 여부는 야생형 폴리스타틴 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포들에서의 반응을 생성하는, 또는 하나 이상의 리간드, 가령, 액티빈 또는 미오스타틴에 야생형 폴리스타틴과 유사한 방식으로 결합하는 변이체 폴리스타틴 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0076] 특정 구체예들에서, 본 발명은 폴리펩티드의 당화를 변화시키기 위한 폴리스타틴 폴리펩티드의 특이적 돌연변이들을 고려한다. 이러한 돌연변이들은 하나 이상의 당화 부위들, 가령, O-연결된 또는 N-연결된 당화 부위들을 도입하거나 제거하기 위하여 선택될 수 있다. 아스파라긴-연결된 당화 인식 부위들은 일반적으로 트리펩티드 서열인, 아스파라긴-X-트레오닌 (이 때 "X"는 임의의 아미노산임)을 포함하며, 이 서열은 적절한 세포 당화 효소들에 의해 특이적으로 인식된다. 변형은 또한 (O-연결된 당화 부위들에 관한) 야생형 폴리스타틴 폴리펩티드의 서열들에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기들의 부가, 또는 이에 의한 치환에 의해 이루어질 수 있다. 당화 인식 부위 중 제 1 또는 제 3 아미노산 위치의 하나 또는 둘 모두에서의 다양한 아미노산 치환들 또는 결실들 (및/또는 제 2 위치에서의 아미노산 결실)은 변형된 트리펩티드 서열에서의 비-당화를 가져온다. 폴리스타틴 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또다른 수단들은 폴리스타틴 폴리펩티드에 대한 글리코시드들의 화학적 또는 효소적 결합(coupling)에 의한 것이다. 사용되는 결합 방식에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 유리 카르복시기; (c) 유리 술포하이드릴기, 가령, 시스테인 그룹들; (d) 유리 히드록실기, 가령, 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린 그룹들; (e) 방향족 잔기들, 가령, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판 그룹들; 또는 (f) 글루탐인의 아마이드기에 부착될 수 있다. 이러한 방법들은 본 출원에 참고문헌으로 포함된 1987년 9월 11일 공개된 WO 87/05330, 및 Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306에 설명되어 있다. ActRIIB 폴리펩티드에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 이루어질 수 있다. 화학적 탈당화(deglycosylation)는, 예를 들면, 화합물 트리플루오로메탄술폰산, 또는 균등 화합물에 대한 폴리스타틴 폴리펩티드의 노출을 포함할 수 있다. 이러한 처리는 연결당 (N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분의 또는 모든 당들을 절단시키면서, 상기 아미노산 서열을 손상없이 남겨둔다. 화학적 탈당화는 Hakimuddin 외. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 및 Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131에 추가로 설명된다. Thotakura 외. (1987) Meth. Enzymol. 138:350에 설명된 바와 같이 폴리스타틴 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다아제를 사용하여 이루어질 수 있다. 폴리스타틴 폴리펩티드의 서열은 포유동물, 효모, 곤충 및 식물 세포들과 같은, 사용되는 발현계통의 유형에 따라 적절히 조정될 수 있으며 상기 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향받을 수 있는 상이한 당화 패턴들을 모두 도입할 수 있다. 일반적으로, 인간에서 사용하기 위한 폴리스타틴 단백질은 적절한 당화를 제공하는 포유동물 세포주, 가령, HEK293 또는 CHO 세포주들에서 발현되게 될 것이나, 그 외 포유동물 발현 세포주들 또한 유용할 것으로 예상된다.

[0077] 본 출원은 또한 변이체들, 특히, 선택적으로, 절단 변이체들을 포함하는, 폴리스타틴 폴리펩티드의 조합 돌연변이 세트들 생성하는 방법을 고려하는데; 조합 돌연변이 풀(pool)은 기능적 변이체 서열들을 확인하는데 특히 유용하다. 이러한 조합 라이브러리를 선별하는 목적은, 예를 들면, 변형된 성질들, 가령, 변형된 약물동역학, 또는 변형된 리간드 결합을 가지는 폴리스타틴 폴리펩티드 변이체들을 생성하는 것이 될 수 있다. 다양한 선별 분석법들이 하기 제공되며, 이러한 분석법들은 변이체들을 평가하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드 변이체는 폴리스타틴 폴리펩티드에 대한 폴리스타틴 리간드의 결합을 저해하기 위하여 폴리스타틴 폴리펩티드에 결합하는 능력에 관해 선별될 수 있다.

[0078] 폴리스타틴 폴리펩티드 또는 이의 변이체들의 활성은 또한 세포-기반 또는 생체내 분석에서 테스트될 수도 있다. 예를 들면, 근육 생성에 관여하는 유전자들의 발현에 대한 폴리스타틴 폴리펩티드 변이체의 효과가 평가될 수 있다. 이는, 필요에 따라, 하나 이상의 재조합 폴리스타틴 리간드 단백질 (예컨대, 액티빈 A)의 존재 하에 실시될 수 있으며, 세포들은 폴리스타틴 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체들, 그리고 선택적으로, 폴리스타틴 리간드를 생성하기 위하여 형질감염 될 수 있다. 유사하게, 폴리스타틴 폴리펩티드는 마우스 또는 그 외 동물에 투여될 수 있으며 하나 이상의 근육 특성, 가령, 근육 질량 또는 강도가 평가될 수 있다. 이러한 분석법들은 해당 기술 분야에 널리 공지이며 관계적인 것이다. 반응성 리포터 유전자는 하위(downstream) 신호전달에 대한 효과들을 모니터링하기 위하여 이러한 세포주들에서 사용될 수 있다.

[0079] 자연 발생 폴리스타틴 폴리펩티드에 비해 선택적 효능을 가지는 조합적으로-유도된 변이체들이 생성될 수 있다.

재조합 DNA 구조체들로부터 발현된 이러한 변이체 단백질들은 유전자 치료 프로토콜에서 사용될 수 있다. 유사하게, 돌연변이 유발(mutagenesis)은 상응하는 야생형 폴리스타틴 폴리펩티드와 현격히 상이한 세포내 반감기를 가지는 변이체들을 생성할 수 있다. 예를 들면, 변형된 단백질은 단백질 가수분해 또는 네이티브 폴리스타틴 폴리펩티드의 파괴 또는 그 외 다른 비활성화를 가져오는 다른 과정들에 대하여 보다 안정하거나 덜 안정하게 제조될 수 있다. 이러한 변이체들, 그리고 이들을 인코딩하는 유전자들은 폴리스타틴 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 폴리스타틴 폴리펩티드 수준을 변형시키기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 짧은 반감기는 보다 일시적인 생물학적 효과들을 생성할 수 있으며, 유도성 발현 체계의 일부인 경우, 세포 내에서 재조합 폴리스타틴 폴리펩티드 수준을 보다 면밀하게 제어할 수 있게 한다.

[0080] 특정 구체예들에서, 본 출원의 폴리스타틴 폴리펩티드는 폴리스타틴 폴리펩티드에 자연적으로 존재하는 변형 이외에 번역후 변형들을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 변형들에는, 아세틸화, 카르복실화, 당화, 인산화, 지질화, 및 아실화가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 결과적으로, 변형된 폴리스타틴 폴리펩티드는 비-아미노산 요소들, 가령, 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 다당류 또는 단당류, 및 포스페이트를 함유할 수 있다. 폴리스타틴 폴리펩티드의 기능성에 대한 이러한 비-아미노산 요소들의 효과들은 그 외 폴리스타틴 폴리펩티드 변이체들에 대해 본 출원에 기재된 바와 같이 테스트될 수 있다. 폴리스타틴 폴리펩티드가 폴리스타틴 폴리펩티드의 발생 초기 형태를 조깅으로써 세포들에서 생성될 경우, 번역후 처리는 또한 단백질의 올바른 폴딩(folding) 및/또는 기능에 중요할 수 있다. 상이한 세포들(가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)은 이러한 번역후 활성들에 대한 특이적인 세포 기계 (cellular machinery) 및 특징적 기전을 가지며 폴리스타틴 폴리펩티드의 올바른 변형 및 처리를 확보하기 위해 선택될 수 있다.

[0081] 특정 양상들에서, 폴리스타틴 폴리펩티드의 기능적 변이체들 또는 변형된 형태들은 폴리스타틴 폴리펩티드 및 하나 이상의 융합 도메인들의 적어도 일부분을 가지는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 융합 도메인들의 널리 공지된 예들에는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S 전달효소 (GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중사슬 불변 부위 (예컨대, Fc), 말토오스 결합 단백질 (MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 융합 도메인은 원하는 성질을 부여하기 위해 선택될 수 있다. 예를 들면, 일부 융합 도메인들은 친화 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리(isolation)에 특히 유용하다. 친화도 정제를 위하여, 친화 크로마토그래피를 위한 관련 기재들, 가령, 글루타티온-, 아밀라아제-, 및 니켈- 또는 코발트- 공액 수지들이 사용된다. 다수의 이러한 기질들은 (HIS<sub>6</sub>) 융합 파트너들과 함께 유용한 "키트" 형태로, 가령,

Pharmacia GST 정제 시스템 및 QIAexpress™ 시스템 (Qiagen사)에서 사용가능하다. 또다른 예로서, 융합 도메인은 폴리스타틴 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하기 위하여 선택될 수 있다. 이러한 검출 도메인들의 예들에는 다양한 형광 단백질 (예컨대, GFP) 뿐만 아니라 "에피토프 태그(epitope tags)"가 포함되는데, 에피토프 태그는 보통 특이적 항체가 유용한 짧은 펩티드 서열들이다. 특이적 모노클로날 항체들이 용이하게 유용한 널리 공지된 에피토프 태그에는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA), 및 c-myc 태그들이 포함된다. 일부 경우들에서, 융합 도메인들은 가령, 인자 Xa 또는 트롬빈에 대한 프로테아제 절단 부위를 가지는데, 이러한 부위는 관련 프로테아제로 하여금 융합 단백질을 부분적으로 소화할 수 있게 함으로써 그로부터 얻은 재조합 단백질을 유리시킨다. 유리된 단백질은 이후 후속 크로마토그래피 분리법에 의해 융합 도메인으로부터 단리된다.

특정한 바람직한 구체예들에서, 폴리스타틴 폴리펩티드는 생체내에서 폴리스타틴 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인 ("안정화제(stabilizer)" 도메인)과 융합된다. "안정화"는 파괴 감소, 신장에 의한 제거 감소, 또는 그 외 약동학적 효과로 인한 것인지 여부에 관계없이 혈청 반감기를 증가시키는 어떤 것을 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부위와의 융합은 넓은 범위의 단백질에 대해 원하는 약동학적 성질들을 부여하는 것으로 공지되어 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 대한 융합이 원하는 성질들을 부여할 수 있다. 선택될 수 있는 그 외 융합 도메인들의 유형들에는 다량체화 (예컨대, 이량체화, 사량체화) 도메인들 및 (부가적인 생물학적 기능, 가령, 근육 성장의 추가 자극을 부여하는) 기능적 도메인들이 포함된다.

[0082] 구체적인 예들로서, 본 출원은 면역글로불린의 불변 도메인, 가령, 면역글로불린의 CH1, CH2 또는 CH3 도메인 또는 Fc를 포함하는 폴리펩티드에 융합된 폴리스타틴 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 인간 IgG1 및 IgG2로부터 유래한 Fc 도메인들이 하기 제공된다 (각각 서열 번호: 17 및 서열 번호:18). 본 출원에 기재된 바와 같이, IgG2, IgG4 또는 IgG2/4 Fc 도메인은 헤파린 결합 활성을 보유하는 폴리스타틴 폴리펩티드와의 융합에 특히 유리한데, 이는 이들 Fc 종들이 감소된 CDC 및/또는 ADCC 활성을 가지기 때문이며, CDC 및/또는 ADCC 활성은 이러한 헤파린 결합 폴리펩티드가 부착될 수 있는 세포들에 유해할 수 있다. CDC 또는 ADCC 활성을 감소시키는 그 외 돌연변이들이 공지되어 있으며, 집합적으로, 임의의 이들 변이체들이 본 출원에 포함되고 폴리스타틴 융합 단백질의 유리한 성분들로서 사용될 수 있다. 선택적으로, 서열 번호:17의 Fc 도메인은 잔기

에서, 가령, Asp-265, Lys-322, 및 Asn-434 (상응하는 전장 IgG1에 따라 번호붙임)에서 하나 이상의 돌연변이들을 가진다. 특정 경우들에서, 이들 돌연변이들(예컨대, Asp-265 돌연변이) 중 하나 이상을 가지는 돌연변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인에 비해 Fc $\gamma$  수용체에 대한 감소된 결합능력을 가진다. 그 외 경우들에서, 이들 돌연변이들 (예컨대, Asn-434 돌연변이) 중 하나 이상을 가지는 돌연변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인에 비해 MHC 클래스 I-관련 Fc-수용체 (FcRN)에 대한 증가된 결합 능력을 가진다.

[0083] 사용될 수 있는 인간 IgG1 및 IgG2 아미노산 서열들의 예들을 하기에 나타낸다:

[0084] IgG1

```

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)
    
```

[0085] ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)

[0086] (서열 번호:17)

[0087] IgG2

```

VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLVTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:18)
    
```

[0088] HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:18)

[0089] (서열 번호:18)

[0090] 융합 단백질의 상이한 요소들은 원하는 기능성에 일치하는 임의의 방식으로 배열될 수 있는 것으로 생각된다. 예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드는 이종 도메인에 대하여 C-말단에 배치될 수 있거나, 대안적으로, 이종 도메인은 폴리스타틴 폴리펩티드에 대하여 C-말단에 배치될 수 있다. 폴리스타틴 폴리펩티드 도메인 및 이종 도메인은 융합 단백질에 인접할 필요는 없으며, 부가 도메인들 또는 아미노산 서열들은 이들 도메인의 C- 또는 N-말단에 포함되거나 이들 도메인들 사이에 포함될 수 있다.

[0091] 본 출원에서 사용되는 용어 "면역글로불린 Fc 도메인" 또는 간단히 "Fc"는 면역글로불린 사슬 불변 부위, 바람직하게는 면역글로불린 중사슬 불변 부위, 또는 이의 일부의 카르복실-말단 부위를 의미하는 것으로 생각된다. 예를 들면, 면역글로불린 Fc 부위는 1) CH1 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 또는 5) 둘 이상의 도메인들 및 면역글로불린 경첩 부위의 조합을 포함할 수 있다. 한 바람직한 구체예에서 면역글로불린 Fc 부위는 최소한 하나의 면역글로불린 경첩 부위 및 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고, 그리고 바람직하게는 CH1 도메인이 없다. 또한 폴리스타틴 폴리펩티드는 면역글로불린 중 단 하나의 도메인, 가령, CH1 도메인, CH2 도메인 또는 CH3 도메인을 포함할 수 있는 것으로 생각된다. 이들 도메인들 중 다수는 원하는 약동학적 성질들 뿐만 아니라 이량체화 또는 그 보다 높은 차수의 다량체화를 부여한다.

[0092] 한 구체예에서, 중사슬 불변 부위가 유도되는 면역글로불린 클래스는 IgG (Ig $\gamma$ ) ( $\gamma$  서브클래스 1, 2, 3, 또는 4)이다. 그 외 면역글로불린, IgA (Ig $\alpha$ ), IgD (Ig $\delta$ ), IgE (Ig $\epsilon$ ) 및 IgM (Ig $\mu$ ) 클래스들이 사용될 수 있다. 적절한 면역글로불린 중사슬 불변 부위의 선택은 미국 특허 제 5,541,087 및 5,726,044에 상세히 논의되어 있다. 특정한 결과를 구현하기 위해 특정 면역글로불린 클래스들 및 서브클래스로부터 특정 면역글로불린 중사슬 불변 부위 서열들을 선택하는 것은 해당 기술 분야의 숙련자들의 능력 범위에 속하는 것으로 간주된다. 면역글로불린 Fc 부위를 인코딩하는 DNA 구조체의 부위는 바람직하게는 경첩(hinge) 도메인의 최소한 일부, 그리고 바람직하게는 임의의 IgA, IgD, IgE, 또는 IgM에서의 상동 도메인들 또는 Fc 감마의 CH<sub>3</sub> 도메인의 최소한 일부를 포함한다.

[0093] 더욱이, 면역글로불린 중사슬 불변 부위들에 속하는 아미노산들의 치환 또는 결실은 본 출원에 개시된 방법들 및 조성물들을 실시함에 유용할 수 있는 것으로 고려된다. 한 예는 Fc 수용체들에 대한 감소된 친화도를 가지

는 Fc 변이체를 생성하기 위하여 CH2 부위 상위에 아미노산 치환을 도입시키는 것이 될 것이다 (Cole *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:3613). 추가적으로, 많은 예들에서, C-말단 리신, 또는 K는, 제거될 것이므로 본 출원에 기재된 임의의 폴리펩티드는, 가령, 서열 번호: 17 또는 서열 번호: 18에 나타난 바와 같은 Fc 도메인에서 발견되는 C-말단 K가 생략될 수 있다.

[0094] 특정 구체예들에서, 본 출원의 폴리스타틴 폴리펩티드는 폴리스타틴 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 이상의 변형들을 함유한다. 예를 들면, 이러한 변형들은 폴리스타틴 폴리펩티드의 *시험관내* 반감기를 향상시키고, 폴리스타틴 폴리펩티드의 순환 반감기를 향상시키고 또는 폴리스타틴 폴리펩티드의 단백질 가수분해를 감소시킨다. 이러한 안정화 변형들에는 융합 단백질 (예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드 및 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함), 당화 부위의 변형들 (예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드에 대한 당화 부위의 부가를 포함), 및 탄수화물 모이어티의 변형들 (예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거를 포함)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 융합 단백질의 경우에서, 폴리스타틴 폴리펩티드는 안정화제 도메인, 가령, IgG 분자 (예컨대, Fc 도메인)으로 융합된다. 본 출원에서 사용되는 용어 "안정화제 도메인"은 융합 단백질의 경우에서와 같이 융합 도메인 (예컨대, Fc)을 의미할 뿐만 아니라, 비단백질 변형들, 가령, 탄수화물 모이어티, 또는 비단백질 폴리머, 가령, 폴리에틸렌 글리콜 또한 포함한다.

[0095] 특정 구체예들에서, 본 발명은 그 외 단백질로부터 단리된 또는 다른 방식으로 그 외 단백질이 실질적으로 없는, 폴리스타틴 폴리펩티드의 단리된 및/또는 정제된 형태들을 이용가능하게 한다.

[0096] 특정 구체예들에서, 본 출원의 (비변형 또는 변형) 폴리스타틴 폴리펩티드는 기술 분야에 공지된 다양한 기법들에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 이러한 폴리스타틴 폴리펩티드는 표준 단백질 화학 기법들, 가령, Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) and Grant G. A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992)에 기재된 기법들을 이용하여 합성될 수 있다. 또한, 자동화된 펩티드 합성장치들을 상업적으로 구매가능하다 (예컨대, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). 대안적으로, 폴리스타틴 폴리펩티드, 이의 절편 또는 변이체들은 해당 기술 분야에 널리 공지된 바와 같은 (또한 하기 참조) 다양한 발현 시스템 (예컨대, 대장균, 중국 햄스터 난소 세포, COS 세포, 배칼로바이러스)을 이용하여 재조합하여 제조될 수 있다. 또다른 구체예에서, 변형된 또는 비변형된 폴리스타틴 폴리펩티드는 자연 발생 또는 재조합하여 생성된 전장폴리스타틴 폴리펩티드를, 예를 들면, 프로테아제, 예컨대, 트립신, 서모리신, 키모트립신, 펩신, 또는 짝 염기성 아미노산 전환 효소 (PACE)를 이용하여 소화함으로써 제조될 수 있다. 단백질 분해 절단 부위들을 확인하기 위하여 (상업적으로 구입가능한, 예컨대, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation사의 소프트웨어를 이용한) 컴퓨터 분석이 사용될 수 있다. 대안적으로, 이러한 폴리스타틴 폴리펩티드는 자연 발생 또는 재조합하여 생성된 전장폴리스타틴 폴리펩티드로부터, 가령, 해당 기술 분야에 공지된 표준 기법들에 의해, 가령, 화학적 절단에 의해 (예컨대, 시아노겐 브로마이드, 히드록실아민) 제조될 수 있다.

[0097] 3. 폴리스타틴 폴리펩티드들을 인코딩하는 핵산들

[0098] 특정 양상들에서, 본 발명은 본 출원에 개시된 임의의 폴리스타틴 폴리펩티드를 인코딩하는 분리된 및/또는 재조합 핵산들을 제공한다. 대상 핵산들은 단일-가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이러한 핵산들은 DNA 또는 RNA 분자들일 수 있다. 이들 핵산들은 예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드 제조 방법들에서 사용될 수 있다.

[0099] 예를 들면, 하기 서열은 자연 발생 인간 폴리스타틴 전구물질 폴리펩티드를 인코딩하고 (서열 번호: 19) (NCBI 등록 번호 BC004107.2, 1032 bp):

atgggtccgcgagcagcaccagccgggtgggctttgcctcctgctgctgct  
gctctgccagttcatggaggaccgagtgcccaggctgggaactgctggc  
tccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccgaactg  
agcaaggaggagtgtgcagcaccggccggctgagcacctcgtggaccga  
ggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacgggg  
gcccccccaactgcatcccctgtaaagaaacgtgtgagaacgtggactgt  
ggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaacaaaccccgctgcgt  
ctgcgccccggattgttccaacatcacctggaaggggtccagctctgcggc  
tggatgggaaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaaggcaagatgt  
aaagagcagccagaactggaagtccagtaaccaaggcagatgtaaaaagac  
ttgtcgggatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtgggtggaccaga  
ccaataatgcctactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagagcctgct  
tccctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtacctaactccagtg  
ctgccacctgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattag  
cctatgagggaaagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtg  
actggtgggaaaaaatgtttatgggatttcaaggtgggagaggccgggtg  
ttccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtct  
gtgccagtgacaatgccacttatgccagcagtggtgccatgaaggaagct  
gctgctcctcaggtgtgctactggaagtaagcactccggatcttgcaa  
ctccatttcggaagacaccgaggaagagggaagatgaagaccaggact  
acagctttcctatatcttctattctagagtgg

[0100]

[0101] 하기 서열은 성숙 FST(315) 폴리펩티드를 인코딩한다 (서열 번호: 20).

gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtaca  
agaccgaaactgagcaaggaggagtgtgcagcaccggccggctgagcacctc  
gtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttc  
aacggggcgcccccaactgcatcccctgtaaagaaacgtgtgagaacgtgg  
actgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaacaaaccccgctg  
cgtctgcgccccggattgttccaacatcacctggaaggggtccagctctgcgg  
ctggatgggaaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaaggcaagatgt  
aagagcagccagaactggaagtccagtaaccaaggcagatgtaaaaagacttg  
tcgggatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtgggtggaccagaccaat  
aatgcctactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagagcctgcttccctctg  
agcaatatctctgtgggaatgatggagtacctaactccagtgctgcccact  
gagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgaggg  
aagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgactggtgggaaaa  
aatgtttatgggatttcaaggtgggagaggccgggtgttccctctgtgatga

[0102]

gctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgcc  
acttatgccagcagtggtgccatgaaggaagctgcctgctcctcaggtgtgc  
tactggaagtaagcactccggatcttgcaactccatttcggaagacaccga  
ggaagaggaggaagatgaagaccaggactacagctttcctatatcttctatt  
ctagagtgg

[0103]

[0104] 하기 서열은 FST(288) 폴리펩티드를 인코딩한다 (서열 번호: 21).

gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccgaactgagcaaggaggagtgtgcagcaccggccggctgagcacc  
tctgtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggggcggcccccaactgcatcccctgtaaagaaacgtgtgagaac  
gtggactgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaacaaaccccgctgcgtctgcgccccggattgttccaacatcacctggaaggggtccagtc  
tgcgggctggatgggaaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaaggcaagatgtaaagagcagccagaactggaagtccagtaaccaaggcagatgtaaa  
aagactgtcgggatgtttctgtccaggcagctccacatgtgtgggtggaccagaccaataatgcctactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagagcct  
gcttccctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtacctaactccagtgctgcccactgagaaaggctacctgctgctgggcagatctattggatt  
gcctatgagggaaagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgactggtgggaaaaaatgtttatgggatgttcaaggtgggagaggccgggtgt  
tccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgccacttatgccagcaggtgtgccatgaaggaagctgcc  
tgctcctcaggtgtgctactggaagtaagcactccggatcttgcaac

[0106] 하기 서열은 성숙 FST(291) 폴리펩티드를 인코딩한다 (서열 번호: 22).

gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccgaactgagcaaggaggagtgtgcagcaccggccggctgagcacc  
tctgtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggggcggcccccaactgcatcccctgtaaagaaacgtgtgagaac

[0107]

gtggactgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaacaaacccccctgcgtctgccccggatgtttccaacatcacctggaagggtccagtc  
 tgcggctggatgggaaacctaccgcaatgaatgtgactcctaaaggcaagatgtaagagcagccagaactggaagtccagtagcaagcagatgtaaa  
 aagacttgtcgggatgtttctgtccaggcagctccacatgtgtggtggaccagaccaataatgcctactgtgtgacctgtaacggatgtgccagagcct  
 gcttctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtacactcctgctgcccactgagaagagctacctgctgctggcgagatctattggatt  
 gcctatgagggaaagtgtatcaagcaagtcctgtgaagatccagtgactggggaaaaaatgtttatgggatcaaggtgggagaggccgggtgt  
 tccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgccactatgccagcgagtgccatgaaggaagctgcc  
 tgcctcctcaggtgtgctactggaagtaagcactccggatcttgcaactccatttctgtgg

[0108] 특정 양상들에서, 폴리스타틴 폴리펩티드를 인코딩하는 대상 핵산들은 또한 서열 번호: 19-22의 변이체들인 핵산들을 포함하는 것으로 생각된다. 변이체 뉴클레오티드 서열들은 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 상이한 서열들, 가령, 대립유전자 변이체들을 포함하며; 그리하여 서열 번호: 19-22에 제시된 코딩 서열의 뉴클레오티드 서열과 상이한 코딩 서열들을 포함하게 될 것이다.

[0109] 특정 구체예들에서, 본 출원은 서열 번호: 19-22에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96% 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한, 단리된 또는 재조합 핵산 서열들, 그리고 특히 폴리스타틴으로부터 유래한 이들의 부분들 (서열 번호:1의 아미노산 95-164에 상응하는 뉴클레오티드들)을 제공한다. 해당 기술 분야의 숙련된 기술자는 서열 번호: 19-22에 상보적인 핵산 서열들 및 서열 번호: 19-22의 변이체들 또한 본 발명의 범위에 속함을 이해할 것이다. 또다른 구체예들에서, 본 출원의 핵산 서열들은 이중 뉴클레오티드 서열과 함께, 또는 DNA 라이브러리에서 단리, 재조합 및/또는 융합될 수 있다.

[0110] 다른 구체예들에서, 본 발명의 핵산들은 또한 서열 번호: 19-22에 제시된 뉴클레오티드 서열, 서열 번호: 19-22의 상보적 서열, 또는 이의 절편 (예컨대, 뉴클레오티드 19-22)에 대하여 매우 엄격한 조건들하에서 하이브리드화된 뉴클레오티드 서열들을 포함한다.

[0111] 해당 기술 분야의 숙련된 기술자는 DNA 하이브리드화를 촉진시키는 적절한 엄격한 조건들이 변화할 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 해당 기술 분야의 숙련된 기술자는 DNA 하이브리드화를 촉진시키는 적절한 엄격한 조건들이 변화할 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 예를 들면, 숙련된 기술자는 45 °C의 6.0 x 소듐 클로라이드/소듐 시트레이트 (SSC)에서 하이브리드화를 실시한 후, 50 °C의 2.0 x SSC로 세척할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서의 염 농도는 50 °C 약 2.0 x SSC의 저 엄격도 내지 50 °C 약 0.2 x SSC의 고 엄격도에서 선택될 수 있다. 또한, 세척 단계에서의 온도는 약 22 °C 실온의 저 엄격도 조건들로부터 약 65 °C의 고 엄격도 조건들로 증가될 수 있다. 온도 및 염 모두 달라질 수 있으며, 또는 온도 또는 염 농도는 그 외 변수들이 변화하는 동안 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명은 실온의 6 x SSC의 저 엄격도 조건하에서 하이브리드화한 후, 실온의 2 x SSC에서 세척하여 핵산을 제공한다.

[0112] 유전 암호의 축퇴성(degeneracy)로 인하여 서열 번호: 19-22에 제시된 핵산들과 상이한 단리된 핵산들 또한 본 출원의 범위에 속한다. 예를 들면, 몇가지 아미노산들은 하나 이상의 트리플렛에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 명시하는 코돈들, 또는 동의어들 (예를 들면, CAU 및 CAC는 히스티딘에 관한 동의어들이다)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 "침묵" 돌연변이들을 생성할 수 있다. 그러나 대상 단백질의 아미노산 서열들의 변화를 초래하는 DNA 서열 다형체들은 포유동물 세포들 중에 존재하게 되는 것으로 예상된다. 해당 기술 분야의 숙련된 기술자는 자연 대립유전자 변화로 인하여, 특정 단백질을 인코딩하는 핵산들의 하나 이상의 뉴클레오티드들에 있어서의 이러한 변화들 (뉴클레오티드들의 최대 약 3-5%)이 주어진 종들의 개체들 중에 존재할 수 있음을 이해할 것이다. 임의의 그리고 모든 이러한 뉴클레오티드 변형들 및 생성된 아미노산 다형체들은 본 출원의 범위에 속한다.

[0113] 특정 구체예들에서, 본 출원의 재조합 핵산들은 하나의 발현 구조체 내의 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열들에 작동적으로 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열들은 발현에 사용되는 숙주 세포에 일반적으로 적절할 것이다. 다양한 숙주 세포들에 관한 수많은 유형들의 적절한 발현 벡터들 및 적합한 조절 서열들이 해당 기술 분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열들에는 프로모터 서열들, 선도 또는 신호 서열들, 리보솜 결합 부위들, 전사 개시 및 종결 서열들, 번역 개시 및 종결 서열들, 및 증강인자(enhancer) 또는 활성인자(activator) 서열들이 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 해당 기술 분야에 공지된 항시발현성(Constitutive) 또는 유도성 프로모터들이 본 출원에서 고려된다. 이 프로모터들은 자연 발생 프로모터들, 또는 하나 이상의 프로모터의 요소들을 조합한 하이브리드 프로모터들 일 수 있다. 발현 구조체는 하나의 에피솜, 가령, 플라스미드에 대하여 하나의 세포내 존재할 수 있거나, 또는 발현 구조체는 염색체에 삽입될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 발현 벡터는 변형된 숙주 세포들의 선택을 가능하게 하는 선

택가능한 표지 유전자를 함유한다. 선택가능한 표지 유전자들은 해당 기술 분야에 널리 공지이며 사용되는 숙주 세포에 따라 달라질 것이다.

[0114] 특정 양상들에서, 대상 핵산은 하나의 폴리스타틴 폴리펩티드를 인코딩하는 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하며 최소한 하나의 조절 서열에 작동적으로 연결되는 발현 벡터에 제공된다. 조절 서열들은 기술분야에 공지이며 폴리스타틴 폴리펩티드의 직접 발현을 위해 선택된다. 따라서, 용어 조절 서열은 프로모터들, 향상인자들, 및 그 외 발현 제어 요소들을 포함한다. 예시적인 조절 서열들은 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)에 기재되어 있다. 예를 들어, DNA 서열에 작동적으로 연결될 때 DNA 서열의 발현을 제어하는 임의의 널리 다양한 발현 제어 서열들은 폴리스타틴 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열들을 발현시키기 위하여 이들 벡터에서 사용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 제어 서열들에는, 예를 들면, SV40의 초기 및 후기 프로모터들, tet 프로모터, 아데노바이러스 또는 거대세포바이러스 극초기 프로모터, RSV 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 RNA 폴리머라제에 의하여 그 발현이 안내되는 T7 프로모터, 파지 람다의 주요 작동유전자 및 프로모터 부위들, fd 외피 단백질에 대한 제어 부위들, 3-포스포글리세레이트 키나아제 또는 그 외 해당 효소들(glycolytic enzymes)에 대한 프로모터, 산성 포스포타아제의 프로모터들, 예컨대, Pho5, 효모  $\alpha$ -교배 인자들의 프로모터들, 배콜로바이러스 시스템의 다면체(polyhedron) 프로모터 및, 원핵 또는 진핵 세포들 또는 이들의 바이러스들의 유전자들 그리고 이의 다양한 조합들의 발현을 제어하는 것으로 공지된 그 외 서열들이 포함된다. 발현 벡터의 설계는 변형될 숙주 세포 및/또는 발현시키고자 하는 단백질의 유형의 선택과 같은 인자들에 따라 달라질 수 있음을 이해하여야 한다. 더욱이, 해당 벡터의 복제수, 항생제 표지자와 같은 해당 벡터에 의해 인코딩되는 임의의 그 외 단백질의 복제수 및 발현을 제어하는 능력 또한 고려되어야 한다.

[0115] 본 출원의 제조합 핵산은 클로닝된 유전자, 또는 이의 일부를, 원핵 세포들, 진핵 세포들 (효모, 조류, 곤충 또는 포유동물), 또는 이들 모두에서 발현하기 적합한 벡터 내부로 결합(ligating)으로써 제조될 수 있다. 제조합 폴리스타틴 폴리펩티드의 제조를 위한 발현 운반체들에는 플라스미드 및 그 외 벡터들이 포함된다. 예를 들어, 적합한 벡터들에는 다음과 같은 유형들의 플라스미드들이 포함된다: 원핵 세포들, 가령, 대장균 (*E. coli*)에서의 발현을 위한 pBR322-유래 플라스미드, pEMBL-유래 플라스미드, pEX-유래 플라스미드, pBTac-유래 플라스미드 및 pUC-유래 플라스미드.

[0116] 일부 포유동물 발현 벡터들은 세균에서 벡터의 번식을 용이하게 하는 원핵세포 서열들, 및 진핵 세포들에서 발현되는 하나 이상의 진핵세포 전사 단위들 모두를 함유한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유래 벡터들은 진핵 세포들의 형질감염에 적합한 포유동물 발현 벡터들의 예들이다. 이들 벡터들의 일부는 세균성 플라스미드, 가령, pBR322로부터의 서열들로 변형되어, 원핵세포 및 진핵 세포들 모두에서의 복제 및 약물 내성 선별을 용이하게 한다. 대안적으로, 바이러스들의 유도체들, 가령, 소 유두종 바이러스 (BPV-1), 또는 엡스타인-바 바이러스 (pHEBo, pREP-유래 및 p205)는 진핵 세포들에서 단백질의 일시적 발현을 위해 사용될 수 있다. 그 외 바이러스 (레트로바이러스 포함) 발현 시스템들의 예들은 하기 유전자 치료 전달 시스템들의 설명에서 찾을 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 유기체들의 변형에 사용되는 다양한 방법들은 해당 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 원핵세포 및 진핵 세포들 모두에 관한 그 외 적합한 발현 시스템들 및 일반적인 제조합 과정들에 관하여는 *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 16 및 17장을 보라. 일부 예들에서, 배콜로바이러스 발현 시스템을 사용하여 제조합 폴리펩티드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 배콜로바이러스 발현 시스템들의 예들에는 pVL-유래 벡터들 (가령, pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유래 벡터들 (가령, pAcUW1), 및 pBlueBac-유래 벡터들 (가령,  $\omega$ -gal을 함유하는 pBlueBac III)이 포함된다.

[0117] 특정 구체예들에서, CHO 세포들에서 대상 폴리스타틴 폴리펩티드의 제조를 위한 벡터, 가령, Pcmv-Script 벡터 (Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터 (Promega, Madison, Wisc.)가 설계될 것이다. 대상 유전자 구조체들을 이용하여 배양물에서 증식된 세포들에서 대상 폴리스타틴 폴리펩티드를 발현시켜, 예컨대, 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 정제용 단백질을 제조할 수 있음이 자명해질 것이다.

[0118] 본 출원은 또한 하나 이상의 대상 폴리스타틴 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 (예컨대, 서열 번호: 19-22)을 포함하는 제조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 관련된다. 숙주 세포는 임의의 원핵세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들면, 본 출원의 폴리스타틴 폴리펩티드는 세균성 세포들, 가령, *대장균*, 곤충 세포들 (예컨대, 배콜로바이러스 발현 시스템을 이용), 효모, 또는 포유동물 세포들에서 발현될 수 있다. 그 외 적합한 숙주 세포

들은 해당 기술 분야의 숙련된 기술자들에게 공지되어 있다.

- [0119] 따라서 본 출원은 또한 대상 폴리스타틴 폴리펩티드의 제조 방법에 관련된다. 예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 폴리스타틴 폴리펩티드의 발현이 일어나게 하는 적절한 조건들하에서 배양될 수 있다. 폴리스타틴 폴리펩티드를 함유하는 배지 및 세포들의 혼합물로부터 폴리스타틴 폴리펩티드가 분리되어 단리될 수 있다. 대안적으로, 폴리스타틴 폴리펩티드는 세포질에 또는 막 분획물 및 수집되어 용해된 세포들, 및 단리된 단백질에 함유되어 있을 수 있다. 세포 배양은 숙주 세포, 배지 및 그 외 부산물들을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 해당 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 대상 폴리스타틴 폴리펩티드는 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 이들 모두로부터, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 초미세여과, 전기영동, 및 폴리스타틴 폴리펩티드의 특정 에피토프들에 특이적인 항체들을 이용한 면역친화성 정제를 비롯하여 단백질 정제를 위해 해당 기술 분야에 공지된 기법들을 이용하여 단리될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 폴리스타틴 폴리펩티드는 그 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다.
- [0120] 또다른 구체예에서, 정제 선도 서열, 가령, 원하는 재조합 폴리스타틴 폴리펩티드 부위의 N-말단에서 폴리-(His)/엔테로키나아제 절단 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는, 발현된 융합 단백질을 Ni<sup>2+</sup> 금속 수지를 이용한 친화 크로마토그래피에 의하여 정제시킬 수 있다. 정제 선도 서열은 그 후 후속적으로 엔테로키나아제를 이용한 처리에 의해 제거되어 정제된 폴리스타틴 폴리펩티드를 제공할 수 있다 (예컨대, Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; 및 Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972를 보라).
- [0121] 융합 유전자를 제조하는 기법들은 널리 공지되어 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩티드 서열들을 코딩하는 다양한 DNA 절편의 결합은 결합용 블런트-단부 또는 스테거-단부 말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 소화, 적절한 점성 단부의 충전, 원치않는 결합을 피하기 위한 알칼리 포스파타아제 처리, 및 효소적 결합을 이용하는 종래의 기법들에 따라 수행된다. 또다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성장치를 비롯한 종래의 기술들에 의해 합성될 수 있다. 대안적으로, 유전자 절편의 PCR 증폭은 두 개의 연속적 유전자 절편들 사이에 상보적 오버행을 생성시키는 앵커 프라이머를 사용하여 실시될 수 있으며, 이러한 오버행은 후속적으로 어닐링되어 키메라 유전자 서열을 생성할 수 있다 (예를 들면, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992를 보라).
- [0122] 4. 예시적인 치료적 용도들
- [0123] 특정 구체예들에서, 예를 들면 FST(288)-IgG1, FST(288)-IgG2, FST(291)-IgG1, FST(291)-IgG2, FST(315)-IgG1, FST(315)-IgG2, 및 본 출원에 개시된 그 외 임의의 폴리스타틴 폴리펩티드를 비롯한 본 출원의 조성물들은, 폴리스타틴 폴리펩티드 및/또는 폴리스타틴 리간드 (예컨대, GDF8)의 이상 활성화와 연관된 질환 또는 장애를 비롯하여 이 부분에 기재되어 있는 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 이들 질환, 장애 또는 병태는 일반적으로 본 출원에서 "폴리스타틴-연관 병태들"로 언급된다. 특정 구체예들에서, 본 출원은 상기 기재된 바와 같은 폴리스타틴 폴리펩티드의 치료적 유효량을 개체에 투여함을 통해 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체를 치료 또는 예방하는 방법들을 제공한다. 이들 방법들은 특히 동물들, 그리고 더욱 특히, 인간들의 치료적 및 예방적 처리에 목적을 두고 있다.
- [0124] 본 출원에서 사용되는, 장애 또는 병태를 "예방"하는 치료제는, 통계적 샘플에서, 처리되지 않은 대조군 샘플에 비해 처리된 샘플에서 장애 또는 병태의 발생을 감소시키는, 또는 처리되지 않은 대조군 샘플에 비해 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상들의 발병을 지연시키거나 중증도를 감소시키는 화합물을 의미한다. 본 출원에서 사용되는 용어 "치료"는 병태가 일단 규명되었다면 이러한 병태의 개선 또는 제거를 포함한다.
- [0125] 폴리스타틴-리간드 복합체들은 조직 성장 뿐만 아니라 초기 발달 과정들, 가령, 다양한 구조들의 올바른 형성에 있어서 또는 성기능 발달, 뇌하수체 호르몬 생성, 및 근육 생성을 비롯한 하나 이상의 발달-후 기능들 (capacities)에 있어서 중요한 역할을 한다. 그러므로 폴리스타틴-연관 병태들에는 비정상적 조직 성장 및 발달 결함들이 포함된다.
- [0126] 치료를 위한 예시적인 병태들에는 신경근육 장애 (예컨대, 근육 디스트로피 및 근육 위축증), 만성 폐쇄성 폐질환 (및 COPD 연관 근육 소모), 근육 소모 증후군, 사르코페니아, 및 카렉시아가 포함된다. 그 외 예시적인 병태들에는 근변성 및 신경근육 장애, 조직 복구 (예컨대, 상처 치유), 및 신경변성 질환 (예컨대, 근위축측삭경화증)이 포함된다.
- [0127] 특정 구체예들에서, 본 발명의 조성물들 (예컨대, FST-Fc 폴리펩티드)은 근육 디스트로피를 위한 치료의 일부로서 사용된다. 용어 "근육 디스트로피"는 골격 근육들 그리고 때때로 심장 및 호흡 근육들의 점진적인 약화 및

악화로 특징지어지는 퇴행성 근육 질환의 그룹을 의미한다. 근육 디스트로피들은 근육에서의 현미경적 변화들로 시작하는 진행성 근육 소모 및 허약으로 특징지어지는 유전적 장애이다. 근육들은 시간이 지남에 따라 악화되므로, 사람의 근육 강도는 감소한다. 대상 폴리스타틴 폴리펩티드를 포함하는 요법으로 치료될 수 있는 예시적인 근육 디스트로피에는 다음이 포함된다: 듀첸 근육 디스트로피 (DMD), 베커 근육 디스트로피 (BMD), 에머리-드라이푸스 근육 디스트로피 (EDMD), 지대(Limb-Girdle) 근육 디스트로피 (LGMD), 얼굴어깨위팔 근육 디스트로피 (FSH 또는 FSHD) (랜도우지-대저린병으로도 공지됨), 근긴장 디스트로피 (MMD) (스타이너트병으로도 공지됨), 눈인두 근육 디스트로피 (OPMD), 원위 근육 디스트로피 (DD), 선천성 근육 디스트로피 (CMD).

[0128] 듀첸 근육 디스트로피 (DMD)는 1860년대에 프랑스 신경학자 Guillaume Benjamin Amand Duchenne에 의해 처음으로 설명되었다. 베커 근육 디스트로피 (BMD)는 1950년대 DMD의 이 변이체를 처음 설명한 독일인 의사인 Peter Emil Becker의 이름을 따서 명명된 것이다. DMD는 3,500명의 소년들 중 한명으로 발생하는 남성들에게서 가장 빈번히 유전되는 질환들 중 하나이다. DMD는 X 염색체의 단원에 위치한 디스트로핀 유전자가 파손된 경우 발생한다. 왜냐하면 남성들만이 X 염색체의 하나의 복사체를 가지기 때문에, 남성들만이 디스트로핀 유전자의 하나의 복사체를 가진다. 디스트로핀 단백질이 없으면, 근육은 수축 및 이완 주기들 동안 쉽게 손상된다. 질환 초기에 근육은 재생에 의해 보상되지만, 그 이후에 근육 조상 세포들은 진행중인 손상을 따라잡을 수 없고 건강한 근육은 비-기능적 섬유-지방 조직으로 대체된다.

[0129] BMD는 디스트로핀 유전자에서의 상이한 돌연변이들로부터 생성된다. BMD 환자들은 약간의 디스트로핀을 가지나, 이는 양적으로 불충분하거나 질적으로 불량하다. 약간의 디스트로핀을 가지는 것은 BMD를 보유한 사람들의 근육들을 DMD를 보유한 사람들의 근육들만큼 나쁘게 또는 신속하게 악화되는 것으로부터 보호한다.

[0130] 예를 들면, 최근의 연구는 생체내에서 GDF8 (폴리스타틴 리간드)의 기능을 차단 또는 제거하는 것이 DMD 및 BMD 환자들에게서 최소한 특정 증상을 효과적으로 치료할 수 있음을 증명한다. 그러므로 대상 폴리스타틴 폴리펩티드는 GDF8 억제제들 (길항제들)로서 기능할 수 있으며, DMD 및 BMD 환자들의 생체내에서 GDF8의 기능들을 차단하는 대안적인 수단들을 구성할 수 있다.

[0131] 유사하게는, 대상 폴리스타틴 폴리펩티드는 근육 성장을 필요로 하는 그 외 질환 병태들에서 근육 질량을 증가시키기 위한 효과적인 수단들을 제공한다. 예를 들면, 루게릭 질환 (운동 뉴런 질환)으로도 불리는 ALS는 뇌를 골격 근육들에 연결하는 CNS의 성분들인 운동 뉴런들을 공격하는, 만성적 불치성인 그리고 막을 수 없는 CNS 장애이다. ALS에서, 사람의 뇌는 정상적으로 완전히 기능을 하고 기민하게 유지된다 하더라도, 운동 뉴런들은 악화되고 결국에는 죽게되며, 움직임을 위한 명령은 결코 근육들에 도달하지 못한다. ALS를 앓는 대부분의 사람들은 40 내지 70세이다. 악화되는 첫번째 운동 뉴런들은 팔과 다리에 이르는 뉴런들이다. ALS를 앓는 사람들은 보행에 어려움을 겪을 수 있으며, 이들은 물건들을 떨어뜨리고, 넘어지며, 발음이 불분명하고, 제어할 수 없을 정도로 웃거나 울 수 있다. 결국 팔다리의 근육들은 사용하지 않음으로 인해 위축되기 시작한다. 이러한 근육 허약은 심신을 소모해지게 할 것이며 사람은 휠체어가 필요하게 되거나 침대 밖에서 제 기능을 하지 못하게 될 것이다. 대부분의 ALS 환자들은 질환 발병으로부터 3-5년에 호흡 기능상실 또는 폐렴과 같은 환기 보조의 합병증으로 사망한다.

[0132] 샤르코-마리-투스 질환 (CMT)은 본 출원에 기재된 폴리스타틴 폴리펩티드의 국소 투여에 의해 치료될 수 있다. CMT는 말초 신경에 영향을 주며 진행성, 그리고 종종 국소성 근육 약화 및 퇴행을 가져오는 유전 장애 그룹이다. 치료될 수 있는 질환의 양상들에는 족부 변형 (매우 움푹한 발); 족하수 (발 수평 지지 불능); "슬래핑(Slapping)" 보행 (족하수로 인해 보행시 발이 바닥에 슬랩됨); 하부 다리의 근육 손실; 발 저림; 균형잡기 어려움; 또는 팔과 손의 약화가 포함된다.

[0133] 다양한 전신 근육 장애를 가진 환자들의 근육들이 본 출원에 개시된 폴리스타틴 폴리펩티드로 치료될 수 있으며, 이러한 장애에는 다음이 포함된다: 람베르트-이튼 근무력 증후군 (LEMS); 대사성 디스트로피; 척수근 위축증 (SMA); 피부근육염 (DM); 원위 근육 디스트로피 (DD); 에머리-드라이푸스 근육 디스트로피 (EDMD); 내분비 근병증; 프리드라이히 운동실조 (FA); 유전된 근병증(Inherited Myopathies); 사립체 근병증; 중증근무력증 (MG); 다발근육염 (PM).

[0134] 하나의 근육 또는 근육들의 수술 후 또는 불사용 위축증을 앓는 환자들의 근육들은 본 출원에 개시된 폴리스타틴 폴리펩티드로 치료될 수 있으며, 다음과 같은 사건 발생 후의 위축증이 포함된다: 고관절 골절; 인공 고관절 전치환술 (Total Hip Arthroplasty, THA); 인공 슬관절 전치환술(Total Knee Arthroplasty, TKA) 또는 회전근개 수술.

- [0135] 근육 손실 또는 약화를 유발하는 그 외 다양한 질환을 앓고 있는 환자들의 근육들이 본 출원에 개시된 폴리스타틴 폴리펩티드로 치료될 수 있으며, 다음 질환을 보유한 환자들의 근육들이 포함된다: 사르코페니아, 카척시아, 폐, 결장 및 난소 암을 비롯한 다양한 유형들의 암, 장기간 환기 보조 중인 환자들, 당뇨병, 만성 폐쇄성 폐질환, 신장 기능상실, 심장 기능상실, 외상 및 말초신경 장애.
- [0136] 폴리스타틴 폴리펩티드-유도된 근육 질량 증가는 또한 근육 소모 질환을 앓고 있는 사람들에게 유익할 수 있을 것이다. GDF8 발현은 인간에 있어서 체지방 질량과 역의 상관관계에 있으며 GDF8 유전자의 이러한 발현 증가는 AIDS 소모 증후군을 가진 남자의 체중 손실과 연관된다. AIDS 환자들에서 GDF8의 기능을 억제함으로써, AIDS의 최소한 특정 증상들은 완전히 제거되는 않는다 하더라도 경감될 수 있으므로, AIDS 환자들의 삶의 질을 상당히 개선시킬 수 있다.
- [0137] 5. 제약상 조성물
- [0138] 특정 구체예들에서, 본 발명의 화합물들 (예컨대, 폴리스타틴 폴리펩티드)은 제약상 허용가능한 담체와 함께 제제화된다. 예를 들면, 폴리스타틴 폴리펩티드는 단독으로 또는 제약상 제제 (즉, 치료 조성물)의 한 성분으로서 투여될 수 있다. 대상 화합물들은 인간 또는 수의학에서 사용하기 편리한 임의의 방식으로 투여하기 위하여 제제화될 수 있다.
- [0139] 특정 구체예들에서, 본 발명의 치료방법은 조성물을 이식물 또는 장치로서 국소적으로, 전신적으로, 또는 국부적으로 투여하는 것을 포함한다. 투여시, 본 발명에 사용하기 위한 치료 조성물은, 물론, 발열원이 제거된, 생리학적으로 허용가능한 형태이다. 더욱이, 상기 조성물은, 바람직하게는, 표적 조직 부위 (예컨대, 뼈, 연골, 근육, 지방 또는 뉴런), 예를 들면, 조직 손상이 있는 부위로 전달하기 위하여 점성 형태로 캡슐화되거나 주사될 수 있다. 국소 투여는 상처 치유 및 조직 복구에 적합할 수 있다. 상기 설명한 조성물에 선택적으로 또한 포함될 수 있는, 폴리스타틴 폴리펩티드 이외의 치료적으로 사용되는 제제들은 대안적으로 또는 부가적으로, 본 발명의 방법들에서 대상 화합물들 (예컨대, 폴리스타틴 폴리펩티드)와 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0140] 특정 구체예들에서, 본 발명의 조성물들은 하나 이상의 치료적 화합물들 (예컨대, 폴리스타틴 폴리펩티드)을 표적 조직 부위로 전달하는 기질을 포함할 수 있는데, 이러한 기질은 발달중인 조직을 위한 구조를 제공하여 신체에 최적으로 흡수될 수 있게 한다. 예를 들면, 기질은 폴리스타틴 폴리펩티드의 서방(slow release)을 제공할 수 있다. 이러한 기질들은 다른 이식된 의학적 응용에 있어서 현재 사용중인 물질들로 형성될 수 있다.
- [0141] 기질 물질은 생체적합성, 생분해성, 기계적 특성, 미용상의 외형 및 경계면 특성(interface properties)에 기초하여 선택된다. 대상 조성물들의 특정 응용은 적절한 제형을 결정할 것이다. 조성물들에 가능한 기질들은 생분해성인 그리고 화학적으로 정의된 칼슘 설페이트, 트리칼슘포스페이트, 히드록시아파타이트, 폴리락틱 애시드 및 폴리무수물 일 수 있다. 그 외 가능한 물질들은 생분해성인 그리고 생물학적으로 잘 정의되어 있으며, 가령, 뼈 또는 진피 콜라겐이 있다. 또다른 기질들은 순수한 단백질 또는 세포외 기질 성분들로 이루어진다. 그 외 가능한 기질들은 비-생분해성인 그리고 화학적으로 정의된, 가령, 소결된 히드록시아파타이트, 생체유리 (bioglass), 알루미늄이트, 또는 그 외 세라믹이 있다. 기질들은 임의의 상기 언급한 유형들의 물질의 조합들, 가령, 폴리락틱 애시드와 히드록시아파타이트 또는 콜라겐과 트리칼슘포스페이트로 구성될 수 있다. 바이오세라믹스는 조성, 가령, 칼슘-알루미늄이트-포스페이트, 및 공경(pore size), 입경, 및 입자 형상 및 생분해성을 변화시키기 위한 처리에 있어 변화될 수 있다.
- [0142] 특정 구체예들에서, 본 발명의 방법들은 경구로, 예컨대, 캡슐, 카세제, 알약, 정제, 로젠지 (착향 기재, 통상 설탕 및 아카시아 또는 트라가칸트 사용), 분말, 과립의 형태로, 또는 수성 또는 비-수성 액체 중의 용액 또는 현탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전으로서, 또는 엘릭서제 또는 시럽으로서, 또는 파스틸제(사탕형알약, pastilles)로서 (불활성 기재, 가령, 젤라틴 및 글리세린, 또는 설탕 및 아카시아 사용) 및/또는 구강 세정제로서 등으로 투여될 수 있으며, 각각은 활성 성분으로서 예정된 양의 제제를 함유한다. 제제는 또한 거환약(bolus), 연질약 또는 페이스트(paste)로서 투여될 수도 있다.
- [0143] 경구 투여를 위한 고체 투약 형태들 (캡슐, 정제, 알약, 당제, 분말, 과립 등)에서, 본 발명의 하나 이상의 치료적 화합물들은 하나 이상의 제약상 허용가능한 담체들, 가령, 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트, 및/또는 다음 중 임의의 것들과 혼합될 수 있다: (1) 충전제 또는 증량제, 가령, 전분, 락토스, 설탕, 글루코스, 만니톨, 및/또는 규산; (2) 결합제, 가령, 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산, 젤라틴, 폴리비닐 피리롤리돈, 설탕, 및/또는 아카시아; (3) 보습제, 가령, 글리세롤; (4) 붕해제, 가령, 한천-한천, 칼슘

카보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트, 및 소듐 카보네이트; (5) 용액 지체제, 가령, 파라핀; (6) 흡수 가속화제, 가령, 4차 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 가령, 세틸 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 가령, 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 유허제, 가령, 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트, 및 이의 혼합물; 및 (10) 착색제. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 제약상 조성물들은 또한 완충제들을 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물들은 또한 가령, 락토스 또는 유당, 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜과 같은 부형제를 사용하는 연질 및 경질-충진된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 사용될 수도 있다.

[0144] 경구 투여용 액체 투약 형태들에는 제약상 허용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽, 및 엘릭서제가 포함된다. 또한 활성 성분 이외에도, 액체 투약 형태들은 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 비활성 희석제, 가령, 물 또는 그 외 용매들, 가용화제 및 유허제, 가령, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히, 면실, 땅콩, 옥수수, 배아, 올리브, 피마자, 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라하이드로퓨틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이의 혼합물을 함유할 수 있다. 비활성 희석제 이외에도, 경구 조성물들은 또한 보조제, 가령, 습윤제, 유허 및 현탁제, 감미제, 착향제, 착색제, 향료, 및 보존제를 포함할 수도 있다.

[0145] 현탁액들은 활성 화합물들 이외에도 현탁화제, 가령, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 및 소르비탄 에스테르, 미결정 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록사이드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸트, 및 이들의 혼합물들을 함유할 수 있다.

[0146] 본 출원에 개시된 특정 조성물들은 피부에 또는 점막에 국소적으로 투여될 수 있다. 국소 제제는 추가로 피부 또는 각질층 투과 증강인자들로서 유효한 것으로 공지된 널리 다양한 하나 이상의 제제들을 포함할 수 있다. 이들의 예들은 2-피롤리돈, N-메틸-2-피롤리돈, 디메틸아세트아마이드, 디메틸포름아마이드, 프로필렌 글리콜, 메틸 또는 이소프로필 알코올, 디메틸 설펝사이드, 및 아존(azone)이 있다. 상기 제제를 미용적으로 허용가능하게 하는 추가 제제들 또한 포함될 수 있다. 이들의 예들은 지방, 왁스, 오일, 염료, 향료, 보존제, 안정화제, 및 계면활성제이다. 해당 기술 분야에 공지된 각질용해제 또한 포함될 수 있다. 그 예는 살리실산 및 황이 있다.

[0147] 국소 또는 경피 투여용 투약 형태들에는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제가 포함된다. 활성 화합물은 멸균 조건하에서 제약상 허용가능한 담체와, 그리고 필요할 수 있는 임의의 보존제, 완충제, 또는 분사제와 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 본 발명의 대상 화합물 (예컨대, 폴리스타틴 폴리펩티드) 이외에도, 부형제, 가령, 동물성 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 활석 및 아연 산화물 또는 이의 혼합물들을 함유할 수 있다.

[0148] 분말 및 스프레이는, 대상 화합물 이외에도, 부형제 가령, 락토스, 활석, 규산, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트, 및 폴리아마이드 분말, 또는 이들 물질들의 혼합물들을 함유할 수 있다. 스프레이는 추가적으로 종래의 분사제, 가령, 클로로플루오로탄화수소 및 휘발성의 비치환 탄화수소, 가령, 부탄 및 프로판을 함유할 수 있다.

[0149] 특정 구체예들에서, 비경구 투여에 적합한 제약상 조성물들은 하나 이상의 제약상 허용가능한 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전과 조합한 하나 이상의 폴리스타틴 폴리펩티드, 또는 사용 직전 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말을 포함할 수 있는데, 이러한 조성물은 항산화제, 완충제, 정균제, 상기 제제를 의도한 수용자의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질, 또는 현탁제 또는 증점제를 함유할 수 있다. 본 발명의 제약상 조성물들에서 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체들의 예들에는 물, 에탄올, 폴리올 (가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 등), 및 이의 적합한 혼합물들, 식물성 오일, 가령, 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르, 가령, 에틸 올레이트가 포함된다. 예를 들면, 코팅 물질, 가령, 레시틴을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입경을 유지함으로써, 그리고 계면활성제를 사용함으로써 적절한 유동성이 유지될 수 있다.

[0150] 본 발명의 조성물들은 또한 보조제, 가령, 보존제, 습윤제, 유허제 및 분산제를 함유할 수도 있다. 미생물 활동은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산, 등을 포함시켜 저해될 수 있다. 또한 등장화제, 가령, 당, 소듐 클로라이드 등을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 주사가능한 제약상 형태의 장기 흡수(prolonged absorption)는 흡수를 지연시키는 제제들, 가령, 알루미늄 모노

스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

- [0151] 투여 요법은 본 발명의 대상 화합물들 (예컨대, 폴리스타틴 폴리펩티드)의 작용을 변형시키는 다양한 인자들을 고려하여, 담당의에 의하여 결정되는 것으로 생각된다. 이러한 다양한 인자들은 치료될 질환에 따라 달라질 것이다.
- [0152] 특정 구체예들에서, 본 발명은 또한 폴리스타틴 폴리펩티드 또는 본 출원에 개시된 그 외 화합물들의 생체내 생성을 위한 유전자 치료요법을 제공한다. 이러한 요법은 상기 열거된 장애를 보유한 세포들 또는 조직들로 폴리스타틴 폴리뉴클레오티드 서열들을 도입시킴으로써 치료 효과를 구현하게 될 것이다. 폴리스타틴 폴리뉴클레오티드 서열들의 전달은 재조합 발현 벡터, 가령, 키메라 바이러스 또는 콜로이드 분산 시스템을 이용하여 구현될 수 있다. 폴리스타틴 폴리뉴클레오티드 서열들의 치료적 전달을 위하여 표적 리포솜을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0153] 본 출원에 개시된 유전자 치료요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터들에는 아테노바이러스, 헤르페스 바이러스, 우두증, 또는, 바람직하게는, RNA 바이러스, 가령, 레트로바이러스가 포함된다. 바람직하게는, 레트로바이러스 벡터는 쥐과 또는 조류 레트로바이러스의 유도체이다. 단일 외부 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터들의 예들에는 다음이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다: Moloney 쥐과 백혈병 바이러스 (MoMuLV), Harvey 쥐과 육종 바이러스 (HaMuSV), 쥐과 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 및 Rous 육종 바이러스 (RSV). 많은 추가적 레트로바이러스 벡터들은 다중 유전자들을 혼입할 수 있다. 이러한 벡터들 모두는 선택가능한 표지자를 위한 유전자를 전달 또는 혼입할 수 있어, 형질도입된 세포가 식별되어 생성될 수 있다. 레트로바이러스 벡터들은 예를 들면, 당, 당지질 또는 단백질을 부착함으로써 표적-특이성이 되게 할 수 있다. 바람직한 표적화는 항체를 사용하여 이루어진다. 해당 기술 분야의 숙련된 기술자들은 특정 폴리뉴클레오티드 서열들이 레트로바이러스 유전체 내부에 삽입되거나 바이러스 외피에 부착되어 폴리스타틴 폴리뉴클레오티드를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적 전달을 가능하게 할 수 있음을 알고 있을 것이다. 한 바람직한 구체예에서, 벡터는 뼈, 연골, 근육 또는 뉴런 세포/조직을 표적으로 한다.
- [0154] 대안적으로, 조직 배양 세포는 종래의 칼슘 포스페이트 형질감염에 의해 레트로바이러스 구조 유전자들인 gag, pol 및 env를 인코딩하는 플라스미드를 이용하여 곧바로 형질감염 될 수 있다. 이러한 세포들은 그 후 관심 유전자들을 함유하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성된 세포는 레트로바이러스 벡터를 배양 배지 내부로 방출한다.
- [0155] 폴리스타틴 폴리뉴클레오티드를 위한 또다른 표적화 전달 시스템은 콜로이드 분산 시스템이다. 콜로이드 분산 시스템들에는 거대분자 복합체들, 나노캡슐, 미세구, 비드, 및 수중유 에멀전, 미포(micelles), 혼합 미포, 및 리포솜을 비롯한 지질계 시스템들이 포함된다. 본 발명의 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 시험관내 및 생체내에서 전달 운반체들로서 유용한 인공 막 소포이다. RNA, DNA 및 고유 바이러스 입자(intact virion)는 수성 내부 안에 캡슐화되어 생물학적 활성 형태로 세포에 전달될 수 있다 (예컨대, Fraley, 외, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981를 보라). 리포솜 운반체를 사용하는 효율적인 유전자 절단 방법들은, 해당 기술분야에 공지이며, 예컨대, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988를 보라. 보통 리포솜 조성물은 보통 스테로이드, 특히 콜레스테롤과 조합된 인지질 조합물이다. 그 외 인지질 또는 그 외 지질 또한 사용될 수 있다. 리포솜의 물리적 특성은 pH, 이온 강도, 및 이가 양이온들의 존재에 따라 달라진다.
- [0156] 리포솜 생성에 유용한 지질의 예들에는 포스파티딜 화합물들, 가령, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 스펅고지질, 세레브로시드, 및 강글리오시드가 포함된다. 예시적인 인지질에는 난황 포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린, 및 디스테아로일포스파티딜콜린이 포함된다. 또한 리포솜의 표적화는 예를 들면, 장기-특이성, 세포-특이성, 및 소기관-특이성에 기초하여 가능하며 해당 기술 분야에 공지되어 있다.
- [0157] 실시예
- [0158] 이제 일반적으로 설명될 본 발명은 하기 실시예들을 참고하여 더욱 용이하게 이해될 것이며, 이러한 실시예들은 단지 본 발명의 특정 구체예들을 설명하기 위해 포함되는 것이다. 이러한 실시예들은 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다.
- [0159] 실시예 1: 폴리스타틴-Fc 단백질의 생성
- [0160] 폴리스타틴 (FST)은 복합적인 약동학적 거동을 보유하는 것으로 공지되어 있다. 짧은 형태의 FST(288)는 리간드를 차단함에 더욱 효과적인 것으로 보고되며 마스킹되지 않은(unmasked) 헤파린 결합 도메인으로 인해 세포

표면들에 부분적으로 결합한다. FST(315)는 덜 효과적이고 헤파린 결합 도메인을 중성화시키는 산 농후 C-말단 아미노산 서열로 인해 세포 표면들에 덜 끌리는 것으로 생각된다. 문헌에서, 폴리스타틴은 일반적으로 전신 효과들을 가지는 것으로 보고된다. 출원인들은 폴리스타틴 구조체가 투여 조직 (가령, 주사되는 근육)에 효과를 가지기 쉽도록 설계될 수 있는지, 그리고 폴리스타틴의 이량체화가 조직 잔류를 향상시킬 것인지 여부를 결정하고자 하였다. 면역글로불린들의 Fc 도메인들은 이량체를 형성하는 것으로 공지되어 있다. 근육 및 그 외 조직에 대한 폴리스타틴-Fc 융합 단백질의 효과를 연구하기 위하여, 그리고 폴리스타틴 폴리펩티드의 약동학적 성질에 대한 Fc-매개 이량체화의 효과를 평가하기 위하여, 출원인들은 IgG1의 Fc 부위에 융합된 FST(288) 또는 FST(315)를 함유하는 융합 단백질을 생성하였다. 각각의 폴리스타틴 폴리펩티드를 Fc 부위에 결합시키기 위하여 TGGG 링커 서열이 선택되었다.

[0161] 각각의 FST-IgG1 구조체에 있어서, 하기 세 가지 선도 서열들이 고려되었다:

[0162] (1) 폴리스타틴 선도 서열: MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQFMEDRSAQA (서열 번호: 23)

[0163] (2) 조직 플라스미노겐 활성인자 (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (서열 번호: 24)

[0164] (3) 꿀벌 벨리틴 (HBML): MKFLVNVLFVFMVYISYIYA (서열 번호: 25)

[0165] 선택된 FST-Fc 단백질을 상기 폴리스타틴 선도서열에 혼입시켰다. FST(288)-IgG1 융합체는 하기 나타낸 바와 같은 비처리 및 성숙 아미노산 서열들을 가진다.

[0166] 비처리 FST(288)-IgG1 (서열 번호:26)

```
MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSK
EECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK
KCRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPEL
EVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLGC
NDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDF
KVGRGRCSL CDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKH
SGSCNTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0167]

[0168] 성숙 FST(288)-IgG1 (서열 번호:27)

```
GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFFKWMIF
NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKGPVCG
LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN
NAYCVTCNRICPEPASSEQYLGCNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG
KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSL CDELCPDSKSDEPVCASDNA
TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0169]

[0170] 초기 "GN" 서열이 제거되어 하기 폴리펩티드를 산출할 수 있다. (서열 번호: 28)

```
CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFFKWMIFNG
GAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKGPVCGLD
```

[0171]

```
GKTYRNECALLKARCKEQPELEEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLGCNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGK
IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSL CDELCPDSKSDEPVCASDNATY
ASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0172]

[0173] FST(315)-IgG1 융합체는 하기 나타낸 바와 같은 비처리 및 성숙 아미노산 서열들을 가진다.

[0174] 비처리 FST(315)-IgG1 (서열 번호:29)

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSK  
 EECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFLKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK  
 KCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPEL  
 EVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCG  
 NDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDF  
 KVGRGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKH  
 SGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSEILEWTGGGTHTCPPCPAPELLGGP  
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
 K

[0175]

[0176] 성숙 FST(315)-IgG1 (서열 번호:30)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFLKWMIF  
 NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG  
 LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTN  
 NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG  
 KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNA  
 TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSEI  
 LEWTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  
 FYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0177]

[0178] 초기 "GN" 서열이 제거되어 하기 폴리펩티드를 산출할 수 있다. (서열 번호: 31)

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFLKWMIFNG  
 GAPNCIPCKETCENVDCGPGKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLD  
 GKTYRNECALLKARCKEQPELEEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA  
 YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI  
 KAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATY  
 ASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSEI  
 WTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

[0179]

KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC  
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0180]

[0181] 단백질들은 HEK-293 세포 또는 CHO 세포에서 발현되었으며 여과 및 단백질 A 크로마토그래피에 의해 조건화 배 지로부터 정제되었다. 일부 예들에서 음이온 교환 및 소수성 상호반응 크로마토그래피 및/또는 겔 여과 또한 사용되었다.

[0182] 액티빈 A 또는 GDF11에 대한 결합으로 단백질 활성을 평가하였다. 각 경우에, 단백질은 10 pM 미만의  $K_D$ 로 결합한다.

[0183] 실시예 2: 마우스에서 근육 질량 및 강도에 대한 폴리스타틴-Fc 단백질의 전신 투여 효과

[0184] 출원인들은 전신 투여 이후 야생형 마우스에서 근육 질량 및 강도를 증가시키는 폴리스타틴-Fc 단백질의 능력을 결정하였다. 실질적인 전신(whole-body)의 제 근육 질량 증가를 자극하는 것으로 널리 공지되어 있는 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0185] C57BL/6 마우스들에게 FST(288)-IgG1 단백질, 인간 FST(315)-IgG1 단백질, 또는 인간 ActRIIB-Fc 단백질을 2회 /1주로 4주간 투여하였다(10 mg/kg; 피하 (s.c.)). 전신 체지방 조직 질량의 백분율 변화를 결정하기 위하여 마우스들을 전신 핵자기 공명 (NMR) 스캐닝하였다. ActRIIB-Fc 처리된 마우스들은 운반체-대조군 그룹에 비해 체 조직의 현저한 (대략 35%) 증가를 보였다. FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1 단백질로 처리된 마우스들은 대조군 코호트에 비해 체지방 조직 질량의 증가를 거의 보이지 않았다. 도 2를 보라. 연구 마지막에, 흉근, 전경 골근 (TA), 비복근, 및 대퇴 근육들을 해부하여 계량하였다. 도 4에 나타난 바와 같이, ActRIIB-Fc 처리는 이들 근육 그룹들 각각에 있어서 근육 질량을 현저히 증가시켰다. 대조적으로, FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1 처리 그룹들에서는 근육 질량의 증가가 거의 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 2를 보라.

[0186] 본 연구를 하는 동안, 마우스들을 근육 강도 변화에 관하여 또한 조사하였다. 힘 변환기를 밀 때 마우스가 발

휘하는 힘을 측정하여 앞다리 그립 강도(grip strength)를 결정한다. 출원인들은 ActRIIB-Fc 단백질로 처리된 마우스들이 증가된 근육 강도를 보였음을 관찰하였다. 대조적으로, FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1 처리 그룹들에서는 그립 강도의 증가가 전혀 관찰되지 않았다. 도 3을 보라.

[0187] 이에 더하여, 상기 결과들은 ActRIIB-Fc의 전신 투여가 마우스에서 운반체-대조군 동물들에 비해 근육 질량 및 강도 모두를 크게 증가시킴을 확인시킨다. 대조적으로, 폴리스타틴-Fc 융합 단백질 FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1로 처리된 마우스에서 근육 질량 또는 강도의 증가가 거의 내지 전혀 관찰되지 않았다. 그러므로 폴리스타틴-Fc 융합 단백질은 전신으로 투여될 때 생체내 근육 질량 또는 강도에 거의 또는 전혀 영향을 주지 않는 것으로 나타난다.

[0188] 실시예 3: FSH 수준에 대한 폴리스타틴-Fc 단백질의 전신 투여 효과

[0189] 폴리스타틴은 주로 신호전달 단백질들인 TGF-베타 슈퍼패밀리의 구성원들을 결합시켜 억제하는 능력으로 특징지어진다. 특히, 폴리스타틴은 액티빈 활성의 잠재적 억제인자인 것으로 공지되어 있다. 액티빈은 난포-자극 호르몬 (FSH) 생성의 잠재적 유도인자이다. FSH는 뇌하수체 전엽의 생식샘자극세포들에 의해 합성되고 분비되어, 사춘기 성숙 동안 성장 및 발달을, 그리고 신체에서의 다양한 생식 과정들을 조절한다. 폴리스타틴-Fc 폴리펩티드의 전신 효과를 평가하기 위하여, FSH 수준에 대한 효과들을 평가하였다.

[0190] FST(288)-IgG1으로 처리 (10 mg/kg; 피하 (s.c.) 2회/1주)는 3.836 (± 5.22) µg/mL의 약물 순환 수준을 가져왔다. FST(315)-IgG1을 이용한 유사한 처리는 실질적으로 더욱 높은 19.31 (± 1.85) µg/mL의 약물 혈청 수준을 가져왔다. 도 5에 나타낸 바와 같이, FST(288)-IgG1은 FSH의 혈청 수준에 대해 어떠한 현저한 효과도 보이지 않았는데, 이는 FST(288)-IgG1 처리 요법이 전신 액티빈 활성에 현저히 영향을 미치지 않음을 제시하는 것이다. 대조적으로, FST(315)-IgG1 처리는 FSH의 순환 수준을 감소시켰는데, 이는 FST(315)-IgG1의 전신 투여가 전신 액티빈 신호전달에 효과를 보임을 나타내는 것이다. 전반적으로, 이들 데이터는, 이량체화를 매개하는 Fc 도메인에 융합된, 마스킹되지 않은 헤파린 결합 도메인을 가진 폴리스타틴 폴리펩티드, 가령, FST(288)-IgG1의 사용이, 전신 활성을 거의 또는 전혀 가지지 않는 단백질을 생성하는 반면, 마스킹된 헤파린 결합 도메인을 가진 FST(315)-IgG1은, 전신 효과를 구현하기 위해 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0191] 실시예 4: 마우스에서 근육 질량 및 강도에 대한 폴리스타틴-Fc 단백질의 국소 투여의 효과

[0192] 전신 투여 후 현저한 효과가 전혀 없었으나, 출원인들은 폴리스타틴이 야생형 마우스에서 근육내 (i.m.) 투여 후 근육 질량 및 강도를 국소적으로 증가시키기 위해 사용될 수 있는지 여부를 결정하기 위하여 유사한 실험적 접근을 사용하였다.

[0193] C57BL/6 마우스에게 FST(288)-Fc 단백질, FST(315)-Fc 단백질, 또는 인간 ActRIIB-Fc 단백질을 2회/1주 4주간 투약하였다(50 마이크로그램; i.m. 우측 비복근 근육 내). 전신 체지방 조직 질량의 백분을 변화를 결정하기 위하여, 초기 처리 후 다양한 시점들에서, 마우스들을 전신(whole-body) 핵자기 공명 (NMR) 스캐닝하였다. ActRIIB-Fc 처리된 마우스들은 운반체-대조군 그룹에 비해 체 조직의 현저한 증가를 보였다. 대조적으로, FST(288)-Fc 또는 FST(315)-Fc 단백질로 처리된 마우스들 어떤 것도 대조군 코호트에 비해 체지방 조직 질량의 현저한 증가를 보이지 않았다. 연구 마지막에, 주사된 우측 비복근 근육 및 반대쪽 좌측 비복근 근육 모두를 해부하여 계량하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이, ActRIIB-Fc 처리는 운반체-처리된 마우스들에 비해 우측 및 좌측 비복근 근육들 모두의 근육 질량을 현저히 증가시켰다. 그러므로, ActRIIB-Fc는 단일 근육에서 국소 투여에 제한될 경우조차도 근육 질량 증가에 대하여 전신 효과를 가진다. 대조적으로, FST(288)-Fc 및 FST(315)-Fc 모두는 우측 비복근 근육의 근육 질량을 현저히 증가시켰으나 반대쪽 근육의 질량에는 전혀 효과가 없었다. 그러므로, 전신 투여 후 관찰된 효과들과 대조적으로, 폴리스타틴 단백질은 근육 내부에 직접 투여될 때 근육 질량의 잠재적인 자극인자인 것으로 보인다. 더욱이, 폴리스타틴은 근육 질량에 대한 효과가 투여 부위에 국한된다는 점에서 ActRIIB-Fc와 같은 그 외 제제들 이상의 뚜렷한 이점을 가지는 것으로 보이는데, 이는 폴리스타틴이 주변을 둘러싼 비표적 근육들의 정상적인 성장/활성에 영향을 미치지 않고 선택된 근육, 또는 근육 그룹들의 표적 치료요법에 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0194] 출원인들은 또한 i.m. 투여 후 폴리스타틴-Fc 융합 단백질의 혈청 수준을 면밀히 모니터링하였다. FST(288)-IgG1의 처리는 0.156 (± 0.245) µg/mL의 약물 순환 수준을 가져왔다. FST(315)-IgG1을 이용한 유사한 처리는 약간 더 높은 3.58 (± 1.73) µg/mL의 약물 혈청 수준을 가져왔으나, 이러한 수준은 FST(315)-IgG1의 전신 투여 후 관찰된 수준보다 실질적으로 더 낮았다. FST(288)-IgG1 및 FST(315)-IgG1 모두가 FST(288)-IgG1의 전신 투여 후 관찰된 i.m. 주사 후의 보다 낮은 수준으로 (즉., 3.836 (± 5.22) µg/mL) 환자의 혈청에서 순환하므로,

FST(288)-IgG1가 s.c. 투여 후 이러한 효과가 전혀 없는 것과 같이 FST(288)-IgG1 또는 FST(315)-IgG1 어떤 것도 FSH의 혈청 수준에 현저한 효과를 보이지 않을 것으로 예상된다.. 도 5를 보라. 따라서 이들 데이터는 FST(288)-IgG1 및 FST(315)-IgG1 모두가 생식적으로 활성인 또는 생식 시스템에 대한 효과를 최소화하고자 하는 환자들에 있어서 표적 근육 성장을 촉진시키는데 특히 잘 적합할 것임을 나타낸다.

[0195] 유사한 실험을 수행하여, 근육 질량 및 질에 대한 FST(288)-IgG1의 효과에 관한 용량-반응 곡선을 그렸다. C57BL/6 마우스들에 다양한 양 (1 내지 100 마이크로그램)을 투여하였다; 우측 비복근 근육 내부에 2회/1주로 4주간 i.m.. 도 8에 나타난 바와 같이, 반대쪽 근육에 대한 주사된 근육의 근육 질량에 있어서의 선택적 증가는 더 많은 투여량의 FST(288)-IgG1을 사용함에 따라 커졌다. 근육 횡단면들은 향상된 근육 질량이 형성저하증 보다는 근육 섬유 비대의 결과임을 보여주었다.

[0196] 실시예 5: 국소적으로-작용하는 폴리스타틴-Fc 융합 단백질의 Fc 최적화

[0197] 전술한 실시예들에서 설명한 바와 같이, 폴리스타틴-Fc 융합 단백질 가령, FST(288)-IgG1 및 FST(315)-IgG1은 근육 및 그 외 조직에 대하여 좋지 못한 전신 효과를 가지며, 특히 상기 단백질의 FST(288) 형태들은 주사 부위에서 활성을 띤다. 출원인들 및 그 외 사람들은 FST(288)가 헤파린 결합 도메인에 의해 세포에 결합하며 이러한 결합은 외인성 헤파린에 의해 제거될 수 있음을 규명하였다. 결과적으로, 출원인들은 표적 세포에 대한 CDC 및 ADCC 효과를 매개하는 것으로 공지된 면역글로불린 도메인들이 헤파린-결합 폴리스타틴 구조체들로 처리된 세포에 손상을 유발할 수 있음을 알아냈다. 이러한 손상은 표적 조직에서 또는 성장이 감소된 표적 조직에서 면역 반응으로서 나타날 수 있다. 그러므로 출원인들은 CDC 및 ADCC 활성을 자극하는 능력이 감소되어 있는 것으로 공지된 IgG 불변 도메인의 한 예인 인간 IgG2의 Fc 부위를 이용하는 폴리스타틴 폴리펩티드 형태들을 생성하였다. 이 실험은 대안적인 Fc 도메인들을 사용하는 폴리스타틴-Fc 융합 단백질이 활성을 보유히게 되는지 여부를 확인하기 위하여 수행되었다.

[0198] 출원인들은 IgG2의 Fc 부위에 융합된 FST(288) 또는 FST(315)를 함유하는 융합 단백질을 생성하였다. 각각의 폴리스타틴 폴리펩티드를 Fc 부위에 결합시키기 위하여 TGGG 링커 서열이 선택되었다.

[0199] 각 FST-IgG2 구조체에 대하여, 폴리스타틴 선도서열이 사용되었다.

[0200] FST(288)-IgG2 융합체는 하기 나타낸 바와 같은 비처리 및 성숙 아미노산 서열들을 가진다.

[0201] 비처리 FST(288)-IgG2 (서열 번호:32)

```
MVRARHQPGGLCLLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSK
EECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK
KCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPEL
EVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSCTVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYL CG
NDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDF
KVGRGRCSLDELCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKH
SGSCNTGGGVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLVTVVHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
```

[0202] 이것은 하기 핵산 서열 (서열 번호:44)에 의해 인코딩되고,  
 [0203]

[0204] aaaaccaagacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggacgtgagccacgaagaccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactgctgaacggcaaggagtaacaagtgcaaggtctccaacaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaacaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcagcatcgccgtggagtgggagagcaatggcgagccggagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaatgagaattc

[0205] 성숙 FST(288)-IgG2 (서열 번호:33)

[0206] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSCTVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLDELCPDSKSDPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLVVKHSGSCNTGGGVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLVTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTK

GQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0207] 초기 "GN" 서열이 제거되어, 하기 폴리펩티드를 산출할 수 있다. (서열 번호: 34)

[0209] \*CWLRAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKRCRMNKNKPRVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNTGGGVEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0210] FST(315)-IgG2 융합체는 하기 나타낸 바와 같은 비처리 및 성숙 아미노산 서열들을 가진다.

[0211] 비처리 FST(315)-IgG2 (서열 번호:35)

[0212] MVRARHQPGGLCLLLLLLQFMEDRSAQAGNCWLRAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKRCRMNKNKPRVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSI SEDTEEEEEEDEDQDYSFP ISSILEWTTGGGVEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0213] 이것은 하기 핵산 서열 (서열 번호:45)에 의해 인코딩되고,

[0214] agagtggaccggtggaggagtcgagtgccccaccgtccccagcaccacctgtggcaggaccgtcagcttctctctccccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggaggagtcgagtcgaccacgaagaccggaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggatgcataatgccaagacaagaccacggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggcagcgtcctcacctcgtgaccaggactggcgaacggcaaggagtaacagtgcaaggtctcaacaagaagcctcccagccccatcgagaaaacctctcaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggtctctaccaccagacatcgccgtggagtgaggagacatgggcagccggaagaacaactacaagaccacacctccatgctggactccgacgctccttctctctctacagcaagctcacctggacaagaagcaggtggcagcaggggaacctcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatgagaattc

[0215] 성숙 FST(315)-IgG2 (서열 번호:36)

[0216] GNCWLRAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKRCRMNKNKPRVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSI SEDTEEEEEEDEDQDYSFP ISSILEWTTGGGVEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0217] 초기 "GN" 서열이 제거되어, 하기 폴리펩티드를 산출할 수 있다. (서열 번호: 37)

[0218] CWLRAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKRCRMNKNKPRVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRS IGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSI SEDTEEEEEEDEDQDYSFP ISSILEWTTGGGVEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0219] 단백질들은 HEK-293 세포 또는 CHO 세포에서 발현되었으며 여과 및 단백질 A 크로마토그래피에 의해 조건화 배지로부터 정제되었다. 일부 예들에서 음이온 교환 및 소수성 상호반응 크로마토그래피 및/또는 겔 여과 또한 사용되었다.

[0220] 액티빈 A 또는 GDF11에 대한 결합으로 단백질 활성을 평가하였다. 각 경우에, 단백질은 10 pM 미만의  $K_D$ 로 결합한다. 이러한 데이터들은 폴리스타틴-IgG2 융합 단백질이 생성되고 발현되어 피코몰 리간드 결합 활성을 보유했을 수 있음을 나타낸다.

[0221] 실시예 6: 최적화된 국소적으로-작용하는 폴리스타틴-Fc 융합 단백질

[0222] 최적의 폴리스타틴-Fc 융합 단백질이 생성될 수 있는지 여부를 평가하기 위하여, FST(288) 및 FST(315)의 C-말단들 사이에 다양한 절단들을 생성하였다. 이러한 절단들 중 하나는, 아미노산 291에서 종결하여 명명된 FST(291)은 FST(315)의 마스킹 도메인의 작은 부위를 함유함에도 불구하고 원하는 해파린 결합 활성을 보유한 그 외 형태들에 비해 더 우수한 발현 성질들을 보여주었다. 이러한 형태는 인간 IgG1 및 IgG2의 Fc 부위에 융합되어 FST(291)-IgG1 및 FST(291)-IgG2를 생성하였다.

[0223] 각각의 폴리스타틴 폴리펩티드를 Fc 부위에 결합시키기 위하여 TGGG 링커 서열이 선택되었다.

[0224] 각각의 FST-IgG1 구조체들에 대하여, 폴리스타틴 선도서열이 사용되었다.

[0225] FST(291)-IgG1 융합체는 하기 나타낸 바와 같은 비처리 및 성숙 아미노산 서열들을 가진다.

[0226] 비처리 FST(291)-IgG1 (서열 번호:38)

```
MVRARHQPGGLLLLLLQCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSK
EECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK
KCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPEL
EVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYL
CGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDF
KVGRGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKH
SGSCNSISTGGGTHTCPPELLEGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0227]

[0228] 성숙 FST(291)-IgG1 (서열 번호:39)

```
GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKMI F
NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVCGL
LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTN
NAYCVTCNRICPEPASSEQYL CGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG
KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNA
TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISTGGGTHTCPPELLEGGPS
VFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
PVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0229]

[0230] 초기 "GN" 서열이 제거되어, 하기 폴리펩티드를 산출할 수 있다. (서열 번호: 40)

```
CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKMI FNG
GAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVCGLD
GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYL CGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGK
CIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATY
ASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISTGGGTHTCPPELLEGGPSV
FLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0231]

[0232] FST(291)-IgG2 융합체는 하기 나타낸 바와 같은 비처리 및 성숙 아미노산 서열들을 가진다.

[0233] 비처리 FST(291)-IgG2 (서열 번호:41)

[0234] MVRARHQPGGLLLLLLQCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGP  
GKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQ  
YLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGV  
LLEVKHSGSCNSISTGGGVECPPEPAPPVAGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV  
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDSGSFFLYSKL  
TVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0235] 성숙 FST(291)-IgG2 (서열 번호:42)

[0236] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVP

CGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGL  
 AYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISTGGGVECPAPPV  
 AGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS  
 KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK  
 SLSLSPGK

[0237] 초기 "GN" 서열이 제거되어, 하기 폴리펩티드를 산출할 수 있다. (서열 번호: 43)

[0238] CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCG  
 LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRI CPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGL  
 EGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISTGGGVECPAPPVAG  
 PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK  
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSL  
 SLSLSPGK

[0239] 단백질들은 HEK-293 세포 또는 CHO 세포에서 발현되었으며 여과 및 단백질 A 크로마토그래피에 의해 조건화 배  
 지로부터 정제되었다. 일부 예들에서 음이온 교환 및 소수성 상호반응 크로마토그래피 및/또는 겔 여과 또한  
 사용되었다.

[0240] 액티빈 A 또는 GDF11에 대한 결합으로 단백질 활성을 평가하였다. 각 경우에, 단백질은 10 pM 미만의  $K_D$ 로 결  
 합한다.

[0241] 처리된 조직에서 잔류하고자 하는 강한 경향 및 처리된 조직에서 염증 또는 면역 반응을 생성하는 낮은 경향을  
 가지는 고 효능의 폴리펩티드를 생성하기 위하여, TGGG 링커와 관련하여, 최적의 리간드 및 헤파린 결합 활성을  
 보이는 폴리스타틴-IgG2 구조체들을 확인하기 위한 추가적인 절단 실험들이 수행되었다. 이를 위해, 일련의  
 구조체들을 생성하여, FST(278)-IgG2, FST(284)-IgG2, FST(291)-IgG2 및 FST(303)-IgG2라 명명하고, 서로에 대  
 해 그리고 FST(288)-IgG2 및 FST-(315)-IgG2에 대해 비교하였다. 헤파린 결합은 헤파린의 존재 또는 부재에서  
 세포로부터의 단백질 회수를 측정하고, ELISA로 정량화하고, 헤파린의 부재시 회수된 단백질에 대한 헤파린의  
 존재시 회수된 단백질의 비율로 표현하여 평가하였다. 하기 표에 나타난 바와 같이, FST(278)-IgG2, FST(284)-  
 IgG2, FST(288)-IgG2 및 FST(291)-IgG2는 모두 3.00-4.00의 유사한 비율을 보여주는 반면, FST(303)-IgG2 및  
 FST(315)-IgG2는 각각 1.50 및 0.97의 비율을 보여준다. 이는 보다 많은 아미노산들이 위치 291과 303 사이에  
 포함됨에 따라, 헤파린 결합 활성이 급격히 감소됨을 나타낸다.

[0242] **FST-IgG2 절단들의 헤파린 결합**

FST-IgG2 구조체	비율 (헤파린과 함께 회수된 단백질/헤파린 없이 회수된 단백질)
FST(278)-IgG2	4.18
FST(284)-IgG2	3.54
FST(288)-IgG2	3.34
FST(291)-IgG2	3.00
FST(303)-IgG2	1.50
FST(315)-IgG2	0.97

[0243] 액티빈 및 GDF11의 억제를 평가하기 위하여 세포-계 리포터 유전자 분석들 (A-204 리포터 유전자 분석,  
 WO/2006/012627에 기재)이 수행되었다. 하기 표에 나타난 바와 같이, 위치 288이상으로 연장하는 구조체들이  
 향상된 리간드 억제를 제공한다.

[0245] **FST-IgG2 절단의 리간드 억제**

FST-IgG2 구조체	IC50 (ng/ml) 액티빈 A	IC50 (ng/ml) GDF-11
FST(278)-IgG2	521	91
FST(284)-IgG2	369	123
FST(288)-IgG2	30	41
FST(291)-IgG2	20	26
FST(303)-IgG2	2	18
FST(315)-IgG2	10	15

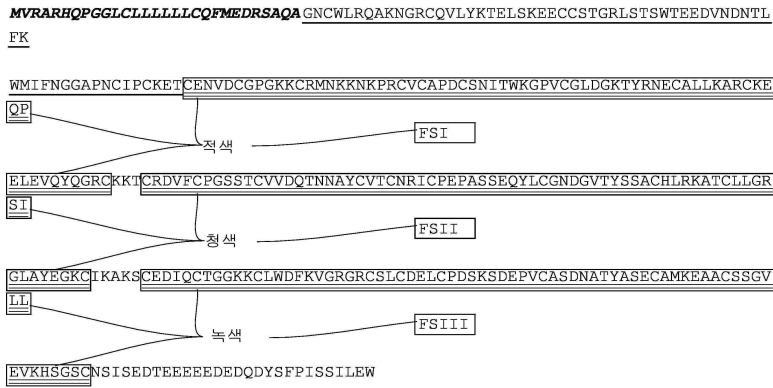
[0246] 헤파린 결합 및 리간드 억제 데이터를 함께 고려할 때, 본 출원에서 사용되는 TGGG 링커 또는 유사한 크기의 링  
 커들 (예컨대, 1-10개 아미노산, 선택적으로 3-8개 아미노산 크기의 링커들)과 관련하여, 위치 291-302에서 끝  
 나는 FST-IgG2 구조체들은 FST(288)-IgG2에 비해 향상된 리간드 억제 및 FST(315)-IgG2에 비해 향상된 헤파린

결합을 가질 것이며, FST(291)-IgG2는 국소 투여 및 효과에 있어 최적의 단백질임을 나타냄이 자명하다.

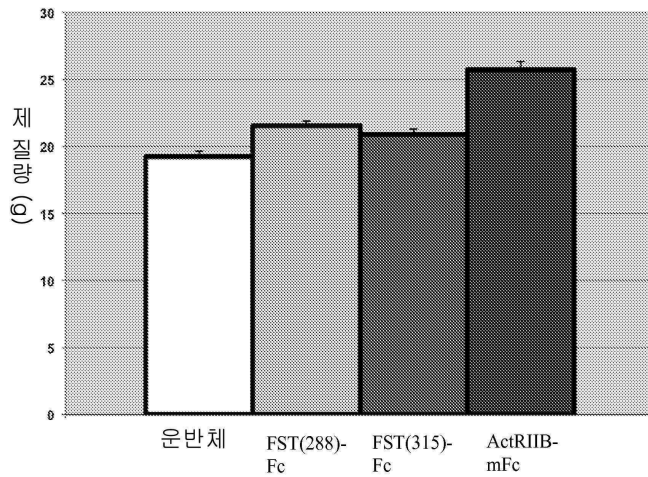
- [0248] 실시예 7: 마우스에서 근육 질량 및 강도에 대한 FST(291)-IgG2 단백질의 국소 투여의 효과
- [0249] 출원인들은 야생형 마우스에서 근육내 (i.m.) 투여 후 근육 질량 및 강도를 국소적으로 증가시키기 위하여 사용되었을 때 최적화된 FST(291)-IgG2 단백질의 활성을 평가하였다.
- [0250] C57BL/6 마우스들을 운반체 (PBS), FST(291)-IgG2 또는 IgG1으로부터의 대조군 Fc로 2회/1주로 4주간 투여하였다 (50 마이크로리터에 100 마이크로그램; 좌측 비복근 근육 내부로 i.m.). 연구 마지막에, 주사된 좌측 비복근 근육 및 반대쪽 우측 비복근 근육 모두를 해부하여 계량하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, FST(291)-IgG2 처리는 주사된 좌측 비복근 근육들에서의 근육 질량을 반대쪽 근육에서 효과가 전혀 관찰되지 않았던 운반체-처리된 마우스와 비교하여 놀랄만한 정도로 현저히 증가시켰다. 추가적으로, 운반체 또는 FST(291)-IgG2 투여 결과로서 가슴 및 대퇴 근육들을 계량하였으며 전혀 변화를 보이지 않았다. 그러므로, FST(291)-IgG2는 전신 효과가 거의 또는 전혀 없었던 주사된 근육 그룹에 대하여 제한된 효과를 가진다. 유사한 실험들이 수행되었으나, 삼두근 및 전경 골근을 비롯한 상이한 근육 그룹들에 주사하였다. 각 경우에서, 주사된 근육의 선택적 비대가 관찰되었다.
- [0251] 근육 성장에 대한 FST(288)-IgG1 및 FST(291)-IgG2의 효과들을 직접적으로 비교하기 위하여 추가적인 실험들이 수행되었다. 두가지 구조체들 모두 주사된 근육 (비복근)에서 현저한 근육 질량 증가를 촉진시켰던 반면, FST(291)-IgG2는 반대쪽 근육에 비하여 주사된 근육에서 대략 42% 증가를 유발하였으며, FST(288)-IgG1은 반대쪽 근육에 비하여 주사된 근육에서 대략 22% 증가를 유발하였다.
- [0252] 따라서, 이들 데이터는 FST(291)-IgG2가 이를 필요로하는 환자에서 표적 근육 성장을 촉진시키는데 최적의 화합물임을 나타낸다.
- [0253] 실시예 8: 듀첸 근육 디스트로피의 마우스 모델에서 근육에 대한 FST(291)-IgG2 단백질 국소 투여의 효과
- [0254] 근육 질량에 대한 FST(291)-IgG2의 효과를 듀첸 근육 디스트로피의 마우스 모델에서 평가하였다. 마우스의 C57BL/10ScCN-Dmd<sup>mdx</sup>/J (*mdx*) 균주는 잘-구축된 인간 듀첸 근육 디스트로피 모델이다.
- [0255] *mdx* 마우스 및 야생형 배경 균주, C57BL/10SnJ (WT)를 이용하여 두 가지 별도의 연구들을 실시하였다. 첫 번째 연구에서, 마우스들이 6주령에 도달하였을 때 처리 (FST(291)-IgG2 또는 운반체 대조군)를 개시했다. 두 번째 연구에서, 마우스들이 4주령에 도달하였을 때 처리를 개시했다. 두 연구에서, 마우스들에게 100 µg FST(291)-IgG2를 좌측 비복근 근육 내부로, 1회 주사시 50 µL의 고정 부피로 주 2회 근육내 투여하였다. 4주령의 마우스들은 4주간 처리하였으며, 6주령의 마우스들은 6주간 처리하였다.
- [0256] 부검에서 주사된 (좌측) 및 반대쪽의 비-주사된 (우측) 다리로부터 얻은 비복근 근육들을 절제하여 계량하였다. 두 연구 모두에서 FST(291)-IgG2로 처리된 WT 동물들로부터 얻은 주사된 비복근 근육들은 반대쪽 다리들 뿐만 아니라 운반체 대조군에 비하여 크기가 보다 현저히 컸다 ( $P < 0.001$ ). 두 연구 모두에서, FST(291)-IgG2로 처리된 비복근 근육은 WT 및 *mdx* 마우스 모두에서 반대쪽 근육 및 운반체-처리된 동물들에 비해, 체중으로 정규화시켰을 때 크기가 보다 현저히 컸다. 근육 질량의 증가는 고 연령의 동물들에서보다 저 연령의 동물들에서 어느 정도 더욱 두드러졌다. 반대쪽 근육에 관한 백분율 증가 면에서, FST(291)-IgG2는 6-주령의 WT 및 *mdx* 마우스에서 근육 질량을 각각 34.2% 및 16.4%만큼 증가시켰다. 4-주령의 WT 및 *mdx* 마우스에서 각각 62.8% 및 41.8%의 근육 질량 증가가 관찰되었다.
- [0257] 이들 데이터는 주 2회 근육내 FST(291)-IgG2 투여를 이용한 액티빈/미오스타틴 신호전달의 차단이 근육 디스트로피의 마우스 모델에 있어서 근육 질량을 증가시킴을 증명한다. 근육 질량의 증가는 주사된 근육에서만 국소적으로 발생한다.
- [0258] 참고문헌의 포함
- [0259] 본 출원에 언급된 모든 공개문헌 및 특허들은, 마치 각각 개개의 공개문헌 또는 특허가 구체적으로 그리고 개별적으로 참고문헌으로 포함되는 것으로 나타내어진 것과 같이 온전히 참고문헌으로 포함된다.
- [0260] 대상 주체의 구체적인 구체예들이 이미 논의되었으나, 상기 명세서는 설명을 위한 것이며 제한이 되지 않는다. 이 명세서 및 하기 청구범위를 고려시 해당 기술 분야의 숙련된 기술자들에게는 많은 변화들이 자명해질 것이다. 본 발명의 전체 보호범위는 전범위의 균등물들과 함께 청구범위를, 그리고 이러한 변화와 함께 명세서를 참고하여 결정되어야 한다.

도면

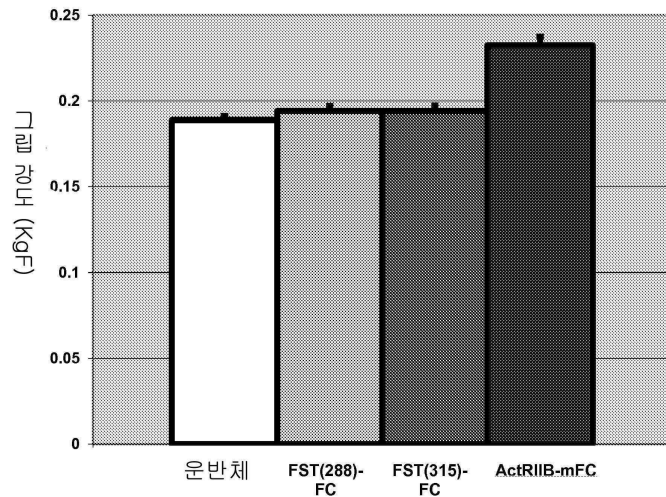
도면1



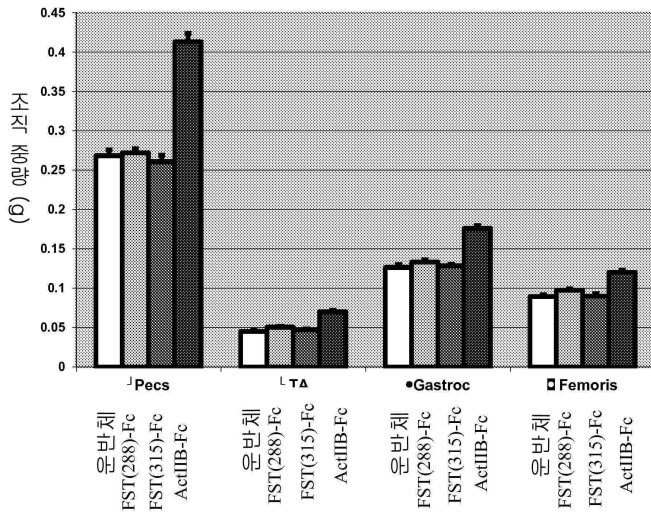
도면2



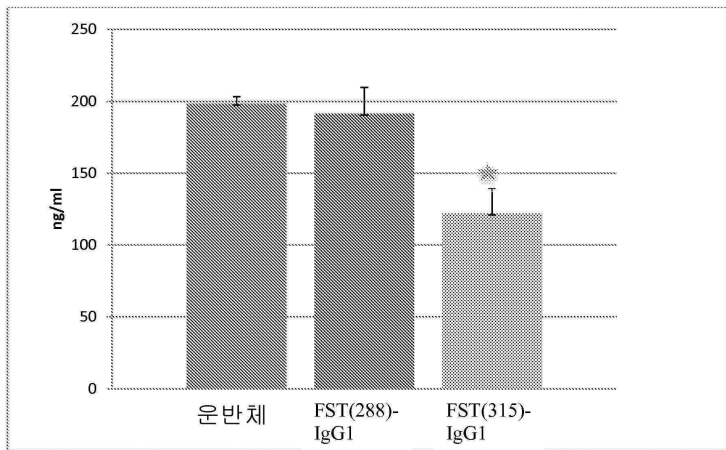
도면3



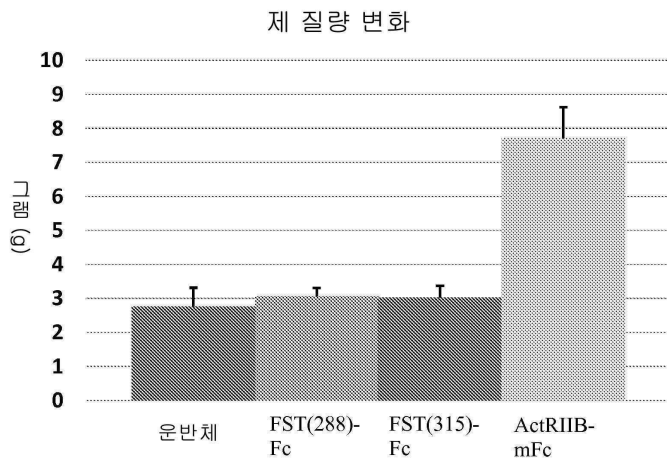
도면4



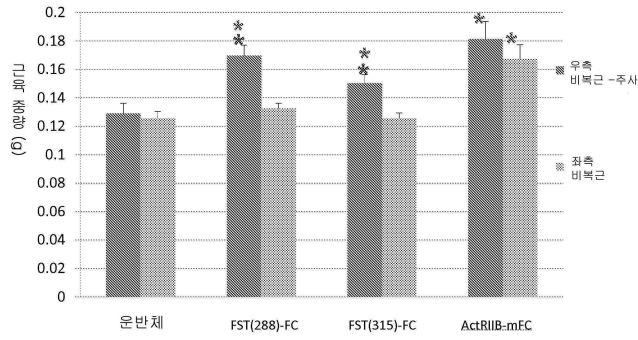
도면5



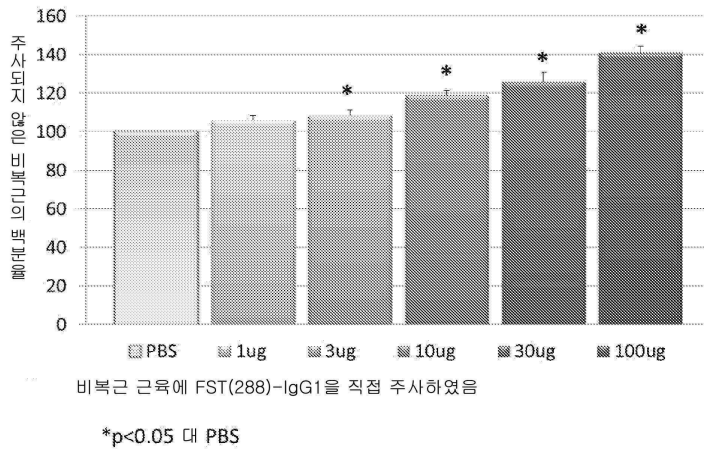
도면6



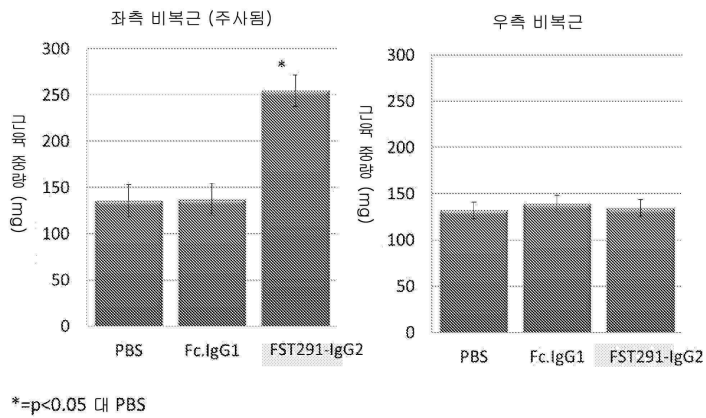
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF DISORDERS WITH  
FOLLISTATIN POLYPEPTIDES

<130> PHPH-065-W01

<140> PCT/US2015/034245

<141> 2015-06-04

<150> 62/007,908

<151> 2014-06-04

<160> 47

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu  
1                    5                    10                    15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys  
                  20                    25                    30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr  
                  35                    40                    45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser  
                  50                    55                    60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile  
65                    70                    75                    80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu  
                  85                    90                    95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn  
                  100                    105                    110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys  
                  115                    120                    125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala  
                  130                    135                    140

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

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

Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn  
                                  275                      280                      285  
 Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser  
                                  290                      295                      300  
 Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn  
 305                      310                      315

<210> 2

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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



<210> 3

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys  
                   20                    25                    30  
 Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr  
                   35                    40                    45  
 Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser  
                   50                    55                    60  
 Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu  
                   85                    90                    95  
 Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn  
                   100                    105                    110  
 Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys  
                   115                    120                    125  
 Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala  
                   130                    135                    140  
 Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr  
 145                    150                    155                    160  
 Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser  
                   165                    170                    175  
 Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys  
                   180                    185                    190  
 Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly  
                   195                    200                    205  
 Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr

210 215 220  
 Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile

225 230 235 240  
 Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys

245 250 255  
 Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu

260 265 270  
 Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn

275 280 285  
 Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser

290 295 300  
 Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser

305 310 315 320  
 Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe

325 330 335  
 Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp

340

<210> 4

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15  
 Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

20 25 30  
 Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

35 40 45  
 Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu

50 55 60  
 Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn



<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg

1

5

10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(2)

<223> Any basic amino acid, particularly Lys or Arg

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Any basic amino acid, particularly Lys or Arg

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(6)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(8)

<223> Any basic amino acid, particularly Lys or Arg

<220><221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Any basic amino acid, particularly Lys or Arg

<220><221> MOD\_RES

<222> (11)..(11)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> Any basic amino acid, particularly Lys or Arg

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 7

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 7

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Thr

65

<210> 8

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 8

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

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

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

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

<210> 9

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 9

Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys  
 1                    5                    10                    15

Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr  
                   20                    25                    30

Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu  
                   35                    40                    45

Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val  
                   50                    55                    60

Gln Tyr Gln Gly Arg Cys  
 65                    70

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 10

Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr  
                   20                    25                    30  
 Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met  
                   35                    40                    45  
 Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys  
  
                   50                    55                    60  
 Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys  
 65                    70                    75                    80  
 Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp  
                   85                    90                    95  
 Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys  
                   100                    105                    110  
 Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln

                  115                    120                    125  
 Tyr Gln Gly Arg Cys  
                   130

<210> 11  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                   polypeptide

<400> 11  
 Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr  
                   20                    25                    30  
  
 Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met  
                   35                    40                    45  
 Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys



Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val  
 50 55 60

Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro  
 65 70 75 80

Gly Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val  
 85 90 95

Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu  
 100 105 110

Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys  
 115 120 125

Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys  
 130 135 140

Cys

145

<210> 13

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 13

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

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

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

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

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

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

<210> 14

<211> 320

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu



<213> Homo sapiens

<400> 15

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

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

180                    185                    190

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

195                    200                    205

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

210                    215                    220

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

225                      230                      235                      240  
 Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala  
                                  245                      250                      255  
  
 Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala  
                                  260                      265                      270  
 Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn  
                                  275                      280                      285  
 Ser Ile Ser  
                                  290  
 <210> 16  
 <211> 289  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16  
 Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys  
 1                      5                      10                      15  
 Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr  
  
                                  20                      25                      30  
 Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met  
                                  35                      40                      45  
 Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys  
                                  50                      55                      60  
 Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys  
 65                      70                      75                      80  
 Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp  
  
                                  85                      90                      95  
 Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys  
                                  100                      105                      110  
 Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln  
                                  115                      120                      125  
 Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly  
                                  130                      135                      140

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

145 150 155 160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser

260 265 270

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

275 280 285

Ser

<210> 17

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 180 185 190  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 195 200 205  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 210 215 220

Lys

225

<210> 18

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

1 5 10 15

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



cgctgccagg tcctgtacaa gaccgaactg agcaaggagg agtgcctgcag caccggccgg 180  
 ctgagcacct cgtggaccga ggaggacgtg aatgacaaca cactcttcaa gtggatgatt 240

ttcaacgggg gcgccccaa ctgcatcccc tgtaagaaa cgtgtgagaa cgtggactgt 300  
 ggacctggga aaaaatgccg aatgaacaag aagaacaaac cccgctgcgt ctgcgccccg 360  
 gattgttcca acatcacctg gaagggtcca gctgcgggc tggatgggaa aacctaccgc 420  
 aatgaatgtg cactcctaaa ggcaagatgt aaagagcagc cagaactgga agtccagtac 480  
 caaggcagat gtaaaaagac ttgtcgggat gttttctgtc caggcagctc cacatgtgtg 540  
 gtggaccaga ccaataatgc ctactgtgtg acctgtaatc ggatttgccc agagcctgct 600  
 tcctctgagc aatctctctg tgggaatgat ggagtcacct actccagtgc ctgccacctg 660

agaaaggcta cctgcctgct gggcagatct attggattag cctatgaggg aaagtgtatc 720  
 aaagcaaagt cctgtgaaga tatccagtgc actggtggga aaaaatgttt atgggatitc 780  
 aaggttggga gaggccggtg ttccctctgt gatgagctgt gccctgacag taagtccgat 840  
 gagcctgtct gtgccagtga caatgccact tatgccagcg agtgtgccat gaaggaagct 900  
 gcctgtcctc caggtgtgct actggaagta aagcactccg gatcttgcaa ctccattteg 960  
 gaagacaccg aggaagagga ggaagatgaa gaccaggact acagctttcc tatatcttct 1020  
 attctagagt gg 1032

<210> 20

<211> 945

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gggaactgct ggetccgtca agcgaagaac ggccgctgcc aggtcctgta caagaccgaa 60  
 ctgagcaagg aggagtgtg cagcaccggc cggctgagca cctcgtggac cgaggaggac 120  
 gtgaatgaca acacactctt caagtggatg attttcaacg ggggcccc caactgcatc 180  
 ccctgtaaag aaacgtgtga gaactggac tgtggacctg ggaaaaaatg ccgaatgaac 240  
 aagaagaaca aaccccctg cgtctgcgcc ccgattgtt ccaacatcac ctggaagggt 300  
 ccagtctgcg ggetggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgcactcct aaaggcaaga 360

tgtaagagc agccagaact ggaagtccag taccaaggca gatgtaaaaa gacttgtcgg 420  
 gatgttttct gtccaggcag ctccacatgt gtggtggacc agaccaataa tgectactgt 480  
 gtgacctgta atcggatttg cccagagcct gcttctctg agcaatatct ctgtgggaat 540  
 gatggagtca cctactccag tgccctgccac ctgagaaagg ctacctgcct gctgggcaga 600

tctattggat tagcctatga gggaaagtgt atcaaagcaa agtcctgtga agatatccag 660  
 tgcactggtg ggaaaaaatg tttatgggat ttcaaggttg ggagaggccg gtgttcctc 720  
 tgtgatgagc tgtgccctga cagtaagtcg gatgagcctg tctgtgccag tgacaatgcc 780

acttatgcc a gcgagtgtgc catgaaggaa gctgcctgct cctcaggtgt gctactggaa 840  
 gtaaagcact ccggatcttg caactccatt tcggaagaca ccgaggaaga ggaggaagat 900  
 gaagaccagg actacagctt tcctatatct tctattctag agtgg 945

<210> 21

<211> 864

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gggaactgct ggctccgtca agcgaagaac ggccgctgcc aggtcctgta caagaccgaa 60  
 ctgagcaagg aggagtgtc cagcaccggc cgctgagca cctcgtggac cgaggaggac 120  
 tgaatgaca acacactctt caagtggatg attttcaacg ggggcgcccc caactgcatc 180

ccctgtaaag aaactgtgga gaactggac tgtggacctg ggaaaaatg ccgaatgaac 240  
 aagaagaaca aaccccgtg cgtctgcgcc ccggattgtt ccaacatcac ctggaagggt 300  
 ccagtctcgc ggctggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgcactcct aaaggcaaga 360  
 tgtaaagagc agccagaact ggaagtccag taccaaggca gatgtaaaaa gacttgcgg 420  
 gatgttttct gtccaggcag ctccacatgt gtggtggacc agaccaataa tgccactgt 480  
 gtgacctgta atcggatttg ccagagcct gcttcctctg agcaatatct ctgtgggaat 540  
 gatggagtca cctactccag tgccctgccac ctgagaaagg ctactgcct gctgggcaga 600

tctattggat tagcctatga gggaaagtgt atcaaagcaa agtcctgtga agatatccag 660  
 tgcactggtg ggaaaaaatg tttatgggat ttcaaggttg ggagaggccg gtgttcctc 720  
 tgtgatgagc tgtgccctga cagtaagtcg gatgagcctg tctgtgccag tgacaatgcc 780  
 acttatgcc a gcgagtgtgc catgaaggaa gctgcctgct cctcaggtgt gctactggaa 840  
 gtaaagcact ccggatcttg caac 864

<210> 22

<211> 876

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

gggaactgct ggctccgtca agcgaagaac ggccgctgcc aggtcctgta caagaccgaa 60

ctgagcaagg aggagtgtcg cagcaccggc cgctgagca cctcgtggac cgaggaggac 120

gtgaatgaca acacactctt caagtggatg attttcaacg ggggcgcccc caactgcatc 180

ccctgtaaag aaacgtgtga gaacgtggac tgtggacctg ggaaaaaatg ccgaatgaac 240

aagaagaaca aaccccgtg cgtctgcgcc ccgattgtt ccaacatcac ctggaagggt 300

ccagtctgcg ggctggatgg gaaaacctac cgcaatgaat gtgcactcct aaaggcaaga 360

tgtaaagagc agccagaact ggaagtccag taccaaggca gatgtaaaaa gacttgtcgg 420

gatgttttct gtccaggcag ctccacatgt gtggtggacc agaccaataa tgctactgt 480

gtgacctgta atcggatttg cccagagcct gcttcctctg agcaatatct ctgtgggaat 540

gatggagtca cctactccag tgcctgccac ctgagaaagg ctactgcct gctgggcaga 600

tctattggat tagcctatga gggaaagtgt atcaaagcaa agtctctgta agatatccag 660

tgcactgggtg ggaaaaaatg tttatgggat ttcaagttg ggagaggccg gtgttcctc 720

tgtgatgagc tgtgccctga cagtaagtcg gatgagcctg tctgtgccag tgacaatgcc 780

acttatgcca gcgagtgtgc catgaaggaa getgcctgct cctcaggtgt getactggaa 840

gtaaagcact ccgatcttg caactccatt tcgtgg 876

<210> 23

<211> 29

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Follistatin leader sequence

<400> 23

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1                    5                    10                    15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala

20                    25

<210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Tissue plasminogen activator (TPA) sequence

<400> 24

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

1                    5                    10                    15

Ala Val Phe Val Ser Pro

20

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 25

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile

1                    5                    10                    15

Ser Tyr Ile Tyr Ala

20

<210> 26

<211> 546

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 26

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1                    5                    10                    15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65                    70                    75                    80

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

325                      330                      335  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 340                      345                      350  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 355                      360                      365  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
  
 370                      375                      380  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 385                      390                      395                      400  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 405                      410                      415  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 420                      425                      430  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
  
 435                      440                      445  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 450                      455                      460  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 465                      470                      475                      480  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 485                      490                      495  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
  
 500                      505                      510  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 515                      520                      525  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 530                      535                      540  
 Gly Lys  
 545  
 <210> 27  
 <211> 517  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 27

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

1                    5                    10                    15  
Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

                  20                    25                    30  
Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

                  35                    40                    45  
Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu

                  50                    55                    60  
Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn

65                    70                    75                    80  
Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile

                  85                    90                    95  
Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn

                  100                    105                    110  
Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu

                  115                    120                    125  
Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys

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

145                    150                    155                    160  
Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr

                  165                    170                    175  
Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg

                  180                    185                    190  
Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly

                  195                    200                    205  
Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly

210                                  215                                  220  
 Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu  
 225                                  230                                  235                                  240  
 Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala  
    245                                  250                                  255  
 Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala  
  
    260                                  265                                  270  
 Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn  
    275                                  280                                  285  
 Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
    290                                  295                                  300  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 305                                  310                                  315                                  320  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
  
    325                                  330                                  335  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
    340                                  345                                  350  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
    355                                  360                                  365  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
    370                                  375                                  380  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
  
 385                                  390                                  395                                  400  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
    405                                  410                                  415  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
    420                                  425                                  430  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
    435                                  440                                  445  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
  
 450                                  455                                  460

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 465 470 475 480

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 485 490 495

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 500 505 510

Leu Ser Pro Gly Lys  
 515

<210

> 28

<211> 515

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

130                      135                      140  
 Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr  
 145                      150                      155                      160  
 Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys  
                                  165                      170                      175  
  
 Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala  
                                  180                      185                      190  
 Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys  
                                  195                      200                      205  
 Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys  
                                  210                      215                      220  
 Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp  
 225                      230                      235                      240  
  
 Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp  
                                  245                      250                      255  
 Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser  
                                  260                      265                      270  
 Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Thr Gly  
                                  275                      280                      285  
 Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
                                  290                      295                      300  
  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 305                      310                      315                      320  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                                  325                      330                      335  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                                  340                      345                      350  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
                                  355                      360                      365  
  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
                                  370                      375                      380

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 385                      390                      395                      400  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
                                  405                      410                      415  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                                  420                      425                      430

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
                                  435                      440                      445  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
                                  450                      455                      460  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 465                      470                      475                      480  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                                  485                      490                      495

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                                  500                      505                      510  
 Pro Gly Lys  
                                  515

<210> 29

<211> 573

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 29

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

50                    55                    60  
 Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu  
  
                          85                    90                    95  
 Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn  
                          100                    105                    110  
 Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys  
                          115                    120                    125  
 Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala  
 130                    135                    140  
 Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr  
  
 145                    150                    155                    160  
 Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser  
                          165                    170                    175  
 Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys  
                          180                    185                    190  
 Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly  
                          195                    200                    205  
 Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr  
  
 210                    215                    220  
 Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile  
 225                    230                    235                    240  
 Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys  
                          245                    250                    255  
 Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu  
                          260                    265                    270  
 Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn  
  
                          275                    280                    285  
 Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser  
                          290                    295                    300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser  
 305                            310                            315                            320  
 Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe  
                                   325                            330                            335  
 Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys  
                                   340                            345                            350  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
                                   355                            360                            365  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
                                   370                            375                            380  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 385                            390                            395                            400  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
                                   405                            410                            415  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
                                   420                            425                            430  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
                                   435                            440                            445  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
                                   450                            455                            460  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
                                   465                            470                            475                            480  
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
                                   485                            490                            495  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
                                   500                            505                            510  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
                                   515                            520                            525  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
                                   530                            535                            540  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

545                    550                    555                    560  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                          565                    570

<210> 30  
 <211> 544  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                          polypeptide  
 <400> 30  
 Gly Asn Cys Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu

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

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

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

Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg  
 180 185 190  
 Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly  
 195 200 205  
 Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly  
 210 215 220  
 Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala  
 245 250 255  
 Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala  
 260 265 270  
 Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn  
 275 280 285  
 Ser Ile Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp  
 290 295 300  
 Tyr Ser Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Gly Thr  
 305 310 315 320  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 325 330 335  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 340 345 350  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 355 360 365  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 370 375 380  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 385 390 395 400  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 405 410 415  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr



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

325 330 335  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

340 345 350  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

355 360 365  
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

370 375 380  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

385 390 395 400  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

405 410 415  
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

420 425 430  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

435 440 445  
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

450 455 460  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

465 470 475 480  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

485 490 495  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

500 505 510  
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

515 520 525  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

530 535 540

<210> 32

<211> 544

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 32

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1                    5                    10                    15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65                    70                    75                    80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu

85                    90                    95

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

100                    105                    110

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

115                    120                    125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser

165                    170                    175

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

180                    185                    190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly

195                    200                    205

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

210                    215                    220

Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile  
 225                      230                      235                      240  
 Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys  
                                  245                      250                      255  
 Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu  
                                  260                      265                      270  
 Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn  
                                  275                      280                      285  
 Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser  
 290                      295                      300  
 Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Thr Gly Gly  
 305                      310                      315                      320  
 Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser  
                                  325                      330                      335  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
                                  340                      345                      350  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 355                      360                      365  
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
                                  370                      375                      380  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val  
 385                      390                      395                      400  
 Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
                                  405                      410                      415  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 420                      425                      430  
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
                                  435                      440                      445  
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
                                  450                      455                      460  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

465                    470                    475                    480  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp

                          485                    490                    495  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

                          500                    505                    510  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

                          515                    520                    525  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

                          530                    535                    540  
 <210> 33

<211> 515

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 33

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

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

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

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

                          50                    55                    60  
 Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn

65                    70                    75                    80  
 Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile

                          85                    90                    95  
 Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn

                          100                    105                    110  
 Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu



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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Pro Gly Lys

515

<210> 34

<211> 513

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met  
 35 40 45  
 Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys  
 50 55 60  
 Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys  
 65 70 75 80  
 Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp  
 85 90 95  
  
 Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys  
 100 105 110  
 Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln  
 115 120 125  
 Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly  
 130 135 140  
 Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr  
 145 150 155 160  
  
 Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys  
 165 170 175  
 Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala  
 180 185 190  
 Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys  
 195 200 205  
 Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys  
 210 215 220  
  
 Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp  
 245 250 255  
 Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser  
 260 265 270  
 Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Thr Gly



<210> 35

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 35

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu

1                    5                    10                    15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

65                    70                    75                    80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu

85                    90                    95

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

100                    105                    110

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

115                    120                    125

Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser

165                    170                    175

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

180                    185                    190

Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly



Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys  
 450 455 460

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu  
 465 470 475 480

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 485 490 495

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 500 505 510

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 515 520 525

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 530 535 540

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 545 550 555 560

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 565 570

<210> 36

<211> 542

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60



305                    310                    315                    320  
 Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe

                         325                    330                    335  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
                          340                    345                    350

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
                          355                    360                    365

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
                          370                    375                    380  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val

385                    390                    395                    400  
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
                          405                    410                    415

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
                          420                    425                    430

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
                          435                    440                    445  
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

                         450                    455                    460  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 465                    470                    475                    480

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp  
                          485                    490                    495

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
                          500                    505                    510

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

                         515                    520                    525  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

                         530                    535                    540

<210> 37

<211> 540

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 37

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

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

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

100                    105                    110

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

115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys

165                    170                    175

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

180                    185                    190

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

195                    200                    205

Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys  
 210 215 220  
 Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp  
 245 250 255  
 Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser  
 260 265 270  
 Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile  
 275 280 285  
 Ser Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser  
 290 295 300  
 Phe Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp Thr Gly Gly Gly Val Glu Cys  
 305 310 315 320  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 325 330 335  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 340 345 350  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 355 360 365  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 370 375 380  
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 385 390 395 400  
 Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 405 410 415  
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
 420 425 430  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 435 440 445  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly





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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Leu Ser Pro Gly Lys

545

<210

> 39

<211> 520

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 39

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

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

                  180                    185                    190

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

                  195                    200                    205

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

                  210                    215                    220

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



Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 485 490 495

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 500 505 510

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 515 520

<210> 40

<211> 518

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

385                    390                    395                    400  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

                         405                    410                    415  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
                          420                    425                    430

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
                          435                    440                    445

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
                          450                    455                    460  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

465                    470                    475                    480  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
                          485                    490                    495

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
                          500                    505                    510  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys

                         515

<210> 41

<211> 547

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

<400> 41

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

50	55	60
Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile		
65	70	75
Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu		
	85	90
Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn		
	100	105
Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys		
	115	120
		125
Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala		
130	135	140
Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr		
145	150	155
Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser		
	165	170
Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys		
	180	185
		190
Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly		
195	200	205
Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr		
210	215	220
Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile		
225	230	235
Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys		
	245	250
		255
Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu		
260	265	270
Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn		
275	280	285
Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser		
290	295	300

Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser  
 305 310 315 320

Thr Gly Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala  
 325 330 335

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 340 345 350

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 355 360 365

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 370 375 380

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe  
 385 390 395 400

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 405 410 415

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile  
 420 425 430

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 435 440 445

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 450 455 460

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 465 470 475 480

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 485 490 495

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 500 505 510

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 515 520 525

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 530 535 540

Pro Gly Lys

545

<210> 42

<211> 518

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 42

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

1                    5                    10                    15  
Tyr Lys Thr Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu

                  20                    25                    30  
Ser Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys

                  35                    40                    45  
Trp Met Ile Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu

                  50                    55                    60  
Thr Cys Glu Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn

65                    70                    75                    80  
Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile

                  85                    90                    95  
Thr Trp Lys Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn

                  100                    105                    110  
Glu Cys Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu

                  115                    120                    125  
Val Gln Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys

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

145                    150                    155                    160  
Val Thr Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr

                  165                    170                    175  
Leu Cys Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg

                  180                    185                    190

Lys Ala Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly  
 195 200 205  
 Lys Cys Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly  
 210 215 220  
 Lys Lys Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Cys Asp Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala  
 245 250 255  
 Ser Asp Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala  
 260 265 270  
 Cys Ser Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn  
 275 280 285  
 Ser Ile Ser Thr Gly Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 290 295 300  
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 325 330 335  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 340 345 350  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 355 360 365  
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 370 375 380  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 385 390 395 400  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 405 410 415  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 420 425 430  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile



100	105	110
Ala Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln		
115	120	125
Tyr Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly		
130	135	140
Ser Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr		
145	150	155
Cys Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys		
165	170	175
Gly Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala		
180	185	190
Thr Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys		
195	200	205
Ile Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys		
210	215	220
Cys Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp		
225	230	235
Glu Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp		
245	250	255
Asn Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser		
260	265	270
Ser Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile		
275	280	285
Ser Thr Gly Gly Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val		
290	295	300
Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
305	310	315
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
325	330	335
His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
340	345	350

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
 355 360 365

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn  
 370 375 380

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro  
 385 390 395 400

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 405 410 415

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 420 425 430

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 435 440 445

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 450 455 460

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 465 470 475 480

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 485 490 495

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 500 505 510

Ser Pro Gly Lys  
 515

<210> 44

<211> 1641

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polynucleotide

<400> 44

atggtccgcg cgaggcacca gccgggtggg ctttgctctc tgctgctget gctctgccag 60

ttcatggagg accgcagtgc ccaggctggg aactgctggc tccgtcaagc gaagaacggc 120

cgctgccagg tcctgtacaa gaccgaactg agcaaggagg agtgctgcag caccggccgg 180

ctgagcacct cgtggaccga ggagacgtg aatgacaaca cactcttcaa gtggatgatt 240

ttcaacgggg gcgccccaa ctgcatcccc tgtaaagaaa cgtgtgagaa cgtggactgt 300

ggacctggga aaaaatgccg aatgaacaag aagaacaaac cccgtgcgt ctgcgccccg 360

gattgttcca acatcacctg gaagggtcca gtctgcgggc tggatgggaa aacctaccgc 420

aatgaatgtg cactcctaaa ggcaagatgt aaagagcagc cagaactgga agtccagtac 480

caaggcagat gtaaaaagac ttgtcgggat gttttctgtc caggcagctc cacatgtgtg 540

gtggaccaga ccaataatgc ctactgtgtg acctgtaatc ggatttgccc agagcctgct 600

tcctctgagc aatatctctg tgggaatgat ggagtcacct actccagtgc ctgccacctg 660

agaaaggcta cctgcctgct gggcagatct attggattag cctatgaggg aaagtgtatc 720

aaagcaaagt cctgtgaaga tatccagtgc actggtggga aaaaatgttt atgggatitc 780

aaggttggga gaggccggtg ttccctctgt gatgagctgt gccctgacag taagtccgat 840

gagcctgtct gtgccagtga caatgccact tatgccagcg agtgtgccat gaaggaagct 900

gcctgtcctc caggtgtgct actggaagta aagcactccg gatcttgcaa caccggtggt 960

ggagtcgagt gccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 1020

ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggacce ctgaggtcac gtgcgtggtg 1080

gtggactgta gccacgaaga ccccagggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1140

gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 1200

agcgtcctca ccgtcgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1260

tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaacatct ccaaaaccaa agggcagccc 1320

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1380

agcctgacct gcctggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1440

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcca tgctggactc cgacggctcc 1500

tttttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1560

tcatgtcctg tgatgcatga ggctctgcac aacctacta cgcagaagag cctctcctg 1620

tctccgggta aatgagaatt c 1641

<210> 45

<211> 1722

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 45

atggtccgcg cgaggcacca gccgggtggg ctttgcctcc tgctgctgct gctctgccag 60

t tcatggagg accgcagtgc ccaggctggg aactgctggc tccgtcaagc gaagaacggc 120

cgctgccagg tctgtacaa gaccgaactg agcaaggagg agtctgcag caccggccgg 180

ctgagcacct cgtggaccga ggaggacgtg aatgacaaca cactcttcaa gtggatgatt 240

ttcaacgggg gtgccccaa ctgcatccc tgtaaagaaa cgtgtgagaa cgtggactgt 300

ggacctggga aaaaatgccg aatgaacaag aagaacaaac cccgctgcgt ctgcgcccg 360

gattgttcca acatcacctg gaagggtcca gtctgcgggc tggatgggaa aacctaccgc 420

aatgaatgtg cactcctaaa ggcaagatgt aaagagcagc cagaactgga agtccagtac 480

caaggcagat gtaaaaagac ttgtcgggat gttttctgtc caggcagctc cacatgtgtg 540

gtggaccaga ccaataatgc ctactgtgtg acctgtaatc ggatttgccc agagcctgct 600

tcctctgagc aatatctctg tgggaatgat ggagtcacct actccagtgc ctgccacctg 660

agaaaggcta cctgcctgct gggcagatct attggattag cctatgaggg aaagtgtatc 720

aaagcaaagt cctgtgaaga tatccagtgc actggtggga aaaaatgttt atgggatttc 780

aaggttggga gaggccggtg ttccctctgt gatgagctgt gccctgacag taagtcggat 840

gagcctgtct gtgccagtga caatgccact tatgccagcg agtgtgcat gaaggaagct 900

gcctgtcct caggtgtgct actggaagta aagcactccg gatcttgcaa ctccatttcg 960

gaagacaccg aggaagagga ggaagatgaa gaccaggact acagctttcc tatatcttct 1020

attctagagt ggaccggtgg tggagtcgag tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca 1080

ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 1140

cctgaggtea cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac 1200

tggtactggt acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccacggga ggagcagttc 1260

aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc accgtcgtgc accaggactg gctgaacggc 1320

aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1380

tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1440

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgectggtca aaggttcta ccccagcgac 1500

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc 1560

atgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1620

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggetctgca caacctact 1680

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatgagaat tc

1722

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 46

Thr Gly Gly Gly

1

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
6xHis tag

<400> 47

His His His His His His

1

5