(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052666
(43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) *A61K 31/138* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61K 31/138 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7009673
(22) 출원일자(국제) 2015년09월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년04월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/000100
(87) 국제공개번호 WO 2016/039796
국제공개일자 2016년03월17일
(30) 우선권주장
62/049,869 2014년09월12일 미국(US)
62/141,775 2015년04월01일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파아마슈티컬스, 인크.
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
핫셀 사라 제이
미국 뉴욕주 10591 태리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
이코노미디스 아리스 엔.
미국 뉴욕주 10591 태리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
아이던 빈센트 제이.
미국 뉴욕주 10591 태리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
(74) 대리인
장훈

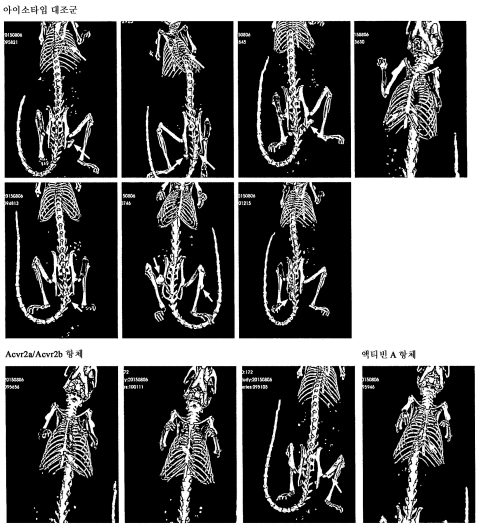
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **진행성 골화성 섬유이형성증의 치료**

(57) 요 약

진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 이러한 방법은 FOP에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 액티빈 수용체 2A형 (ACVR2A) 및/또는 액티빈 수용체 2B형 (ACVR2B) 길항제 또는 액티빈 수용체 1형 (ACVR1) 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 길항제는 ACVR2A, ACVR2B 및/또는 ACVR1의 하나 이상의 세포외 도메인 (ECD) 및 면역글로불린 중쇄의 Fc 도메인의 융합 단백질, 및 ACVR2A, ACVR2B, ACVR1 또는 액티빈 A에 대한 항체를 포함한다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)에 걸린 피검자(subject)에게 유효한 투약체계(regime)의 액티빈 수용체 (activin receptor) 2A형 (ACVR2A) 및/또는 액티빈 수용체 2B형 (ACVR2B) 길항제를 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR2A 또는 ACVR2B 세포외 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR2A 또는 ACVR2B Fc 융합 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 Fc 융합 단백질의 아이소타입(isotype)이 인간 IgG1인, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 길항제가, ACVR2B 세포외 도메인에 연결된 ACVR2A 세포외 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 길항제가 Fc 도메인을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 길항제가, 제1 Fc 도메인에 융합된 ACVR2A 세포외 도메인 및 제2 Fc 도메인에 융합된 ACVR2B 세포외 도메인을 포함하며, 여기서 상기 제1 Fc 도메인과 제2 Fc 도메인은 서로 복합체를 이루는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 길항제가, Fc 도메인에 각각 융합된 상기 ACVR2A 세포외 도메인과 ACVR2B 세포외 도메인 사이에 링커(linker)를 포함하는, 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR2A 세포외 도메인, ACVR2B 세포외 도메인 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 유효한 투약체계의 ACVR2A 길항제 및 ACVR2B 길항제가 투여되는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 ACVR2A 길항제가 ACVR2A Fc 융합 단백질이고, 상기 ACVR2B 길항제가 ACVR2B Fc 융합 단백질인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR2A 또는 ACVR2B에 대한 항체인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 피검자가 II형 당뇨병, 근이영양증(muscular dystrophy), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) (ALS) 또는 골다공증에 걸려 있지 않거나 이의 위험이 없는, 방법.

청구항 14

진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 액티빈 수용체 1형 (ACVR1) 길항제를 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR1 세포외 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR1 융합 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 Fc 융합 단백질의 아이소타입이 인간 IgG1인, 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR1에 대한 항체인, 방법.

청구항 19

진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 액티빈 수용체 2A형 (ACVR2A) 및/또는 액티빈 수용체 2B형 (ACVR2B) 길항제를, 액티빈 수용체 1형 (ACVR1) 길항제와 병용하여 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 세포외 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B Fc 융합 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 Fc 융합 단백질의 아이소타입이 인간 IgG1인, 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 길항제가 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B에 대한 항체인, 방법.

청구항 24

진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 액티빈 A에 대한 항체를 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 항체가, 결합을 위해, H4H10446P, H4H10430P 또는 A1으로 명명되는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는, 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 항체가 H4H10446P, H4H10430P 또는 A1으로 명명되는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 항체가 키메라(chimeric), 베니어드(veneered), 인간화(humanized) 또는 인간 항체인, 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 상기 항체가 무손상(intact) 항체인, 방법.

청구항 29

제24항에 있어서, 상기 항체가 인간 카파 IgG1 항체인, 방법.

청구항 30

제25항에 있어서, 상기 항체가 인간 카파 IgG1 항체인, 방법.

청구항 31

제26항에 있어서, 상기 항체가 인간 카파 IgG1 항체인, 방법.

청구항 32

제27항에 있어서, 상기 항체가 인간 카파 IgG1 항체인, 방법.

청구항 33

제28항에 있어서, 상기 항체가 인간 카파 IgG1 항체인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은, 개시 내용이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 2014년 9월 12일에 출원된 미국 가출원 제62/049,869호 및 2015년 4월 1일에 출원된 제62/141,775호에 대하여 35 USC 119(e) 하에서 이득을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 진행성 골화성 섬유이형성증 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva) (FOP)은, 골격근 및 관련 결합 조직의 조기 발병형(early onset), 일과성(episodic) 및 진행성 골화를 특징으로 하는 보통염색체 우성 장애(autosomal dominant disorder)이다. FOP는, 대다수가 206번 아르기닌을 히스티딘으로 변경 (R206H)시킴에 의한, ACVR1 (ALK2)의 세포내 도메인의 돌연변이에 의해 유발된다 (문헌[Pignolo, R.J. et al. 2011, *Orphanet J. Rare Dis.*6:80]). ACVR1은 골형성 단백질(bone morphogenic protein) (BMP)에 대한 I형 수용체이다. 그 중에서도 R206H 돌연변이는, 활성화에 대한 수용체의 감수성을 증가시키고 이것이 사일런싱(silencing)에 대해 더 저항성이 되게 하는 것으로 믿어진다. FOP에 대한 유효한 의학 요법은 알려져 있지 않다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은 진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)에 걸린 피검자(subject)에게 유효한 투약체계(regime)의 액티빈 수용체(activin receptor) 2A형 (ACVR2A) 및/또는 액티빈 수용체 2B형 (ACVR2B) 길항제(antagonist)를 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법을 제공한다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR2A 또는 ACVR2B 세포외 도메인을 포함한다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR2A 또는 ACVR2B Fc 융합 단백질을 포함한다. 일부의 방법에서, Fc 융합 단백질의 아이소타입(isotype)은 인간 IgG1이다. 일부의 방법에서, 길항제는, ACVR2B 세포외 도메인에 연결된 ACVR2A 세포외 도메인을 포함한다. 일부의 방법에서, 길항제는 Fc 도메인을 추가로 포함한다. 일부의 방법에서, 길항제는 제1 Fc 도메인에 융합된 ACVR2A 세포외 도메인 및 제2 Fc 도메인에 융합된 ACVR2B 세포외 도메인을 포함하며, 여기서 제1 Fc 도메인과 제2 Fc 도메인은 서로 복합체를 이룬다. 일부의 방법에서, 길항제는, Fc 도메인에 각각 융합된, ACVR2A 세포외 도메인과 ACVR2B 세포외 도메인 사이에 링커(linker)를 포함한다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR2A 세포외 도메인, ACVR2B 세포외 도메인 및 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 일부의 방법에서, 유효한 투약체계의 ACVR2A 길항제 및 ACVR2B 길항제가 투여된

다. 일부의 방법에서, ACVR2A 길항제는 ACVR2A Fc 융합 단백질이고, ACVR2B 길항제는 ACVR2B Fc 융합 단백질이다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR2A 또는 ACVR2B에 대한 항체이다. 일부의 방법에서, 피검자는 II형 당뇨병, 근이영양증(muscular dystrophy), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) (ALS) 또는 골다공증에 걸려 있지 않거나 이의 위험이 없다.

[0005] 본 발명은 FOP에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 액티빈 수용체 1형 (ACVR1) 길항제를 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법을 추가로 제공한다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR1 세포외 도메인을 포함한다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR1 융합 단백질을 포함한다. 일부의 방법에서, Fc 융합 단백질의 아이소타입은 인간 IgG1이다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR1에 대한 항체이다.

[0006] 본 발명은 진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 액티빈 수용체 2A형 (ACVR2A) 및/또는 액티빈 수용체 2B형 (ACVR2B) 길항제를, 액티빈 수용체 1형 (ACVR1) 길항제와 병용하여 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법을 추가로 제공한다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 세포외 도메인을 포함한다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B Fc 융합 단백질을 포함한다. 일부의 방법에서, Fc 융합 단백질의 아이소타입은 인간 IgG1이다. 일부의 방법에서, 길항제는 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B에 대한 항체이다.

[0007] 본 발명은 진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 액티빈 A에 대한 항체를 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법을 추가로 제공한다. 선택적으로, 항체는, 결합을 위해, H4H10446P, H4H10430P 또는 A1으로 명명되는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 선택적으로, 항체는 H4H10446P, H4H10430P 또는 A1으로 명명되는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 선택적으로, 항체는 키메라(chimeric), 베니어드(veneered), 인간화(humanized) 또는 인간 항체이다. 선택적으로, 항체는 무손상(intact) 항체이다. 선택적으로, 항체는 인간 카파 IgG1 항체이다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은, ACVR2A-Fc/ACVR2B-Fc 처리의 존재 및 부재 하에서 타목시펜(tamoxifen) 투여의 개시 후 6주째에 전위성 골형성(ectopic bone formation)을 나타내는 마우스로부터의 마이크로CT(microCT) 데이터를 도시한다. 10마리의 대조군 mFc 처리된 마우스 중 9 마리 (1번 내지 9번)는 타목시펜 투여 후 6주째에 전위성 골형성을 나타내었다. 가장 흔한 위치는 뒷다리, 목 영역 및 흉골(sternum)이다. 11 마리의 ACVR2A-Fc/ACVR2B-Fc 처리된 마우스 중 2 마리 (12번 및 14번)가 타목시펜 투여 후 6주째에 전위성 골형성을 나타내었다. 이러한 2 마리의 마우스에서 전위성 골병변(bone lesion)은 mFc 처리된 그룹에서 관찰되는 것들과 비교하여 크기가 작았고, 둘 모두 흉골에 위치하였다.

도 2는, LDN212854 처리의 존재 또는 부재 하에서 타목시펜 투여의 개시 후 4주째에 전위성 골형성을 나타내는 마우스로부터의 마이크로CT 데이터를 도시한다. 1번 내지 8번은 타목시펜 + 비히클(vehicle) 처리된 마우스에 상응한다. 1번, 2번, 3번, 4번, 5번 및 7번 마우스에서는 큰 전위성 골결절(bone nodule)이 형성되었고, 6번 및 8번 마우스에서는 작은 전위성 골결절이 형성되었다. 9번 내지 16번은 타목시펜 + LDN212854 처리된 마우스에 상응한다. 9번, 12번 및 13번 마우스에서는 작은 전위성 골결절이 형성되었다. 10번, 11번, 14번, 15번 또는 16번 마우스에서는 전위성 골결절을 검출할 수 없었다.

도 3은, 액티빈 A에 대한 항체, 아이소타입 일치형 무관련 대조 항체(isotype matched irrelevant control antibody), 및 ACVR2A-Fc로 처리된, 전위성 골형성의 경향이 있는 마우스에 대한 마이크로CT 데이터를 도시한다. 액티빈 A에 대한 항체가 전위성 골결절의 형성을 가장 효과적으로 억제하였다.

도 4는, 액티빈 A에 대한 항체, 아이소타입 일치형 무관련 대조 항체, 및 Acvr2a/Acvr2b에 대한 항체로 처리된, 전위성 골형성의 경향이 있는 마우스에 대한 마이크로CT 데이터를 도시한다. 액티빈 A에 대한 항체 및 Acvr2a/Acvr2b에 대한 항체는 전위성 골결절의 형성을 억제하였다.

도 5는, 아이소타입 일치형 무관련 대조 항체와 비교하여, 여러 가지 용량의 액티빈 A에 대한 항체로 처리된, 전위성 골형성의 경향이 있는 마우스에 대한 마이크로CT 데이터를 도시한다. 1 mg/kg 내지 25 mg/kg의 투여량이 유효한 것으로 나타났는데, 10 mg/kg이 시험된 가장 유효한 용량이었다.

정의

길항제는 전형적으로 단리된 형태(isolated form)로 제공된다. 이것은 길항제가 전형적으로 적어도 50% w/w에 이의 생성 또는 정제로부터 발생하는 간섭 단백질 및 다른 오염물질이 없음을 의미하지만, 길항제가 이의 사용

을 용이하도록 의도되는 과량의 약제학적으로 허용되는 담체(들) 또는 다른 비히클과 배합될 가능성을 배제하지는 않는다는 것을 의미한다. 때때로 길항제는 적어도 60, 70, 80, 90, 95 또는 99% w/w에 생성 또는 정제로부터의 간섭 단백질 및 오염물질이 없다.

아미노산 치환을 보존적 또는 비보존적으로 분류하기 위해, 아미노산은 하기와 같이 그룹화된다: 그룹 I (소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 II (중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III (산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV (염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; 그룹 V (사슬 배향(chain orientation)에 영향을 주는 잔기): gly, pro; 및 그룹 VI (방향족 측쇄): trp, tyr, phe. 보존적 치환은 동일한 클래스(class)의 아미노산들 사이의 치환을 포함한다. 비보존적 치환은 이들 클래스 중 한 클래스의 구성원을 다른 클래스의 구성원으로 교환하는 것이 된다.

서열 동일성 백분율은 가변 영역에 대한 카밧(Kabat) 번호표기 규칙(numbering convention) 또는 불변 영역에 대한 EU 번호표기에 의해 최대로 정렬된 항체 서열을 이용하여 결정된다. 다른 단백질에 대해, 서열 동일성은, 알고리즘, 예를 들어 Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., 미국 위스콘신주 매드슨 소재)의 BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA를 사용하거나, 디폴트 갭 파라미터(default gap parameter)를 사용하거나, 검사(inspection), 및 최상의 정렬에 의해, 서열을 정렬함으로써 결정될 수 있다. 정렬 후, 대상 항체 영역 (예를 들어, 중쇄 또는 경쇄의 전체 성숙 가변 영역)이 기준 항체의 동일한 영역과 비교되고 있는 경우, 대상 항체 영역과 기준 항체 영역 사이의 서열 동일성 백분율은, 대상 및 기준 항체 영역 둘 모두에서 동일한 아미노산에 의해 점유되는 위치들의 개수를, 갭(gap)은 계산되지 않은 두 영역의 정렬된 위치들의 전체 개수로 나누고, 100을 곱하여 백분율로 환산한 것이다.

하나 이상의 열거된 요소를 "포함하는" 조성물 또는 방법은 구체적으로 열거되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체를 포함하는 조성물은 항체를 단독으로 또는 다른 성분과 배합하여 함유할 수 있다.

인간화 항체는, 비인간(non-human) "도너(donor)" 항체로부터의 CDR이 인간 "억셉터(acceptor)" 항체 서열 내로 이식된, 유전자 조작된(genetically engineered) 항체이다 (예를 들어, Queen의 미국 특허 제5,530,101호 및 제5,585,089호; Winter의 미국 특허 제5,225,539호; Carter의 미국 특허 제6,407,213호; Adair의 미국 특허 제5,859,205호 및 제6,881,557호; Foote의 미국 특허 제6,881,557호 참조). 억셉터 항체 서열은, 예를 들어 성숙 인간 항체 서열, 이러한 서열들의 복합물(composite), 인간 항체 서열의 컨센서스(consensus) 서열, 또는 생식계열(germline) 영역 서열일 수 있다. 따라서, 인간화 항체는, 완전히 또는 실질적으로 도너 항체로부터의 일부 또는 모든 CDR 및, 존재하는 경우, 완전히 또는 실질적으로 인간 항체 서열로부터의 가변 영역 프레임워크(framework) 서열 및 불변 영역을 지닌 항체이다. 유사하게, 인간화 중쇄는, 완전히 또는 실질적으로 도너 항체 중쇄로부터 적어도 1개, 2개 및 통상 모든 3개의 CDR, 및 존재하는 경우, 실질적으로 인간 중쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터의 중쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 중쇄 불변 영역을 지닌다. 유사하게, 인간화 경쇄는, 완전히 또는 실질적으로 도너 항체 경쇄로부터 적어도 1개, 2개 및 통상 모든 3개의 CDR, 및 존재하는 경우, 실질적으로 인간 경쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터의 경쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 경쇄 불변 영역을 지닌다. 나노바디(nanobody) 및 dAb 이외에, 인간화 항체가 인간화 중쇄 및 인간화 경쇄를 포함한다. 각각의 CDR들 사이에, 상응하는 잔기 (카밧에 의해 정의된 바와 같음)의 적어도 85%, 90%, 95% 또는 100%가 동일한 경우, 인간화 항체의 CDR은 실질적으로 비인간 항체의 상응하는 CDR로부터의 것이다. 카밧에 의해 정의된 상응하는 잔기의 적어도 85, 90, 95 또는 100%가 동일한 경우, 항체 사슬의 가변 영역 프레임워크 서열 또는 항체 사슬의 불변 영역은 실질적으로 각각 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역으로부터의 것이다.

인간화 항체가 마우스 항체로부터의 모든 6개의 CDR (바람직하게는 카밧에 의해 정의된 바와 같음)을 종종 포함한다고 하더라도, 그것은 모두보다 더 적은 CDR (예를 들어, 마우스 항체로부터의 적어도 3개, 4개, 또는 5개의 CDR)로 또한 만들어질 수 있다 (예를 들어, 문헌[Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002]; 문헌[Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002]; 문헌[Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999]; 문헌[Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000]).

키메라 항체는, 비인간 항체 (예를 들어, 마우스)의 경쇄 및 중쇄의 성숙 가변 영역이 인간 경쇄 및 중쇄 불변 영역과 조합된 항체이다. 이러한 항체는 마우스 항체의 결합 특이성을 실질적으로 또는 완전히 보유하고, 약 3분의 2가 인간 서열이다.

베니어드 항체는, 비인간 항체의 CDR의 일부 및 통상 전부 및 비인간 가변 영역 프레임워크 잔기의 일부를 보유하지만 B- 또는 T-세포 에피토프에 기여할 수 있는 다른 가변 영역 프레임워크 잔기, 예를 들어 노출된 잔기

(Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991)가 인간 항체 서열의 상응하는 위치로부터의 잔기로 대체된, 인간화 항체의 일 유형이다. 결과는, CDR이 완전히 또는 실질적으로 비인간 항체로부터의 것이고 비인간 항체의 가변 영역 프레임워크가 치환에 의해 더 인간과 유사하게 된, 항체이다.

인간 항체는 인간으로부터 단리되거나 그렇지 않으면 인간 면역글로불린 유전자의 발현으로부터 생성될 수 있다 (예를 들어, 유전자도입(transgenic) 마우스에서, 시험관내에서 또는 파지 디스플레이(phage display)에 의해). 인간 항체를 생성시키는 방법은 Oestberg 등의 트리오마(trioma) 방법 (문헌[*Cys muoma* 2:361-367 (1983)]); Oestberg의 미국 특허 제4,634,664호; 및 Engleman 등의 미국 특허 제4,634,666호를 포함한다. 단클론성(monoclonal) 항체는 인간 면역계 유전자를 함유하는 유전자도입 마우스, 예를 들어 Regeneron Pharmaceuticals, Inc.로부터의 VelocImmune® 마우스 (문헌[Murphy, PNAS 111 no. 14, 5153-5158 (2014)], 문헌[Xenomouse, Jakobovits, Nature Biotechnology 25, 1134-1143 (2007)]) 또는 Medarex, Inc.로부터의 HuMAb 마우스 (문헌[Lonberg, Handbook Exp. Pharmacol. 181, 69-97 (2008)]; Lonberg 등의 국제 특허 출원 공개 WO93/12227호 (1993년); 미국 특허 제5,877,397호, 미국 특허 제5,874,299호, 미국 특허 제5,814,318호, 미국 특허 제5,789,650호, 미국 특허 제5,770,429호, 미국 특허 제5,661,016호, 미국 특허 제5,633,425호, 미국 특허 제5,625,126호, 미국 특허 제5,569,825호, 미국 특허 제5,545,806호, 문헌[*Nature* 148, 1547-1553 (1994)], 문헌[*Nature Biotechnology* 14, 826 (1996)], Kucherlapati의 국제 특허 출원 공개 WO 91/10741호 (1991년))에 의해 또한 생성될 수 있다. 인간 항체는 파지 디스플레이 방법에 의해 또한 생성될 수 있다 (예를 들어, Dower 등의 국제 특허 출원 공개 WO 91/17271호 및 McCafferty 등의 국제 특허 출원 공개 WO 92/01047호, 미국 특허 제5,877,218호, 미국 특허 제5,871,907호, 미국 특허 제5,858,657호, 미국 특허 제5,837,242호, 미국 특허 제5,733,743호 및 미국 특허 제5,565,332호 참조).

길항제가 이것의 유래가 된 모항체(parental antibody)의 특성을 보유한다고 하는 경우, 보유는 완전하거나 부분적일 수 있다. 활성의 완전한 보유는, 길항제의 활성이 이것의 유래가 된 분자의 그것과 실험 오차 내에서 동일하거나 그보다 높다는 것을 의미한다. 활성의 부분적 보유는, 음성 대조군의 백그라운드 수준보다 유의하게 높은 (즉, 실험 오차를 넘는) 활성, 바람직하게는 이것의 유래가 된 분자의 상응하는 활성의 적어도 50%를 의미한다.

하나의 항체의 결합을 감소 또는 제거시키는 항원의 모든 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소 또는 제거시키는 경우, 두 항체는 동일한 에피토프를 지닌다. 하나의 항체의 결합을 감소 또는 제거시키는 일부의 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소 또는 제거시키는 경우, 두 항체는 중첩(overlapping) 에피토프를 지닌다.

항체들 사이의 경쟁은, 시험 중인 항체가 공통 항원(common antigen)에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 억제하는 검정(assay)에 의해 결정된다 (예를 들어, 문헌[Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990] 참조). 경쟁 결합 검정에서 측정되는 바와 같이 과량의 시험 항체 (예를 들어, 적어도 2x, 5x, 10x, 20x 또는 100x)가 기준 항체의 결합을 적어도 50%, 그러나 바람직하게는 75%, 90% 또는 99% 억제하는 경우, 시험 항체는 기준 항체와 경쟁한다. 경쟁 검정에 의해 확인된 항체 (경쟁성(competing) 항체)는, 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 및 입체 장애가 일어날 정도로 기준 항체에 의해 결합되는 에피토프에 충분히 근접해 있는 인접 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] *I. 개요*

[0010] 진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 이러한 방법은 FOP에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 액티빈 수용체 2A형 (ACVR2A) 및/또는 액티빈 수용체 2B형 (ACVR2B) 길항제 및/또는 액티빈 수용체 1형 (ACVR1) 길항제, 및/또는 액티빈 A 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 길항제는 ACVR2A, ACVR2B 및/또는 ACVR1의 하나 이상의 세포외 도메인 (ECD) 및 면역글로불린 중쇄의 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. ACVR2A, ACVR2B, ACVR1 또는 액티빈 A의 항체 길항제가 또한 제공된다.

[0011] *II. ACVR1, ACVR2A, ACVR2B 및 액티빈 A*

[0012] 리간드의 형질전환 성장 인자(transforming growth factor) β (TGFβ) 수퍼패밀리(superfamily)는, 예를 들어 골형성 단백질 (BMP) 및 성장 및 분화 인자(growth and differentiation factor) (GDF)를 포함한다. 이러한 리간드에 대한 수용체는 I형 및 II형 막관통(transmembrane) 세린/트레오닌 키나제 수용체로 구성된 이종복합체성(heteromeric) 수용체 복합체이다. I형 수용체의 예는 액티빈 수용체 IA형 (ACTRIA, ACVR1, 또는 ALK2),

BMP 수용체 IA형 및 BMP 수용체 IB형을 포함한다. II형 수용체의 예는 액티빈 수용체 IIA형 및 IIB형 (ACTRIIA 또는 ACVR2A 및 ACTRIIB 또는 ACVR2B) 및 BMP 수용체 II형을 포함한다. TGFβ 수퍼패밀리의 리간드들은 다양한 I형 및 II형 수용체에 대해 각각 다른 친화도를 지닌다.

[0013] I형 및 II형 수용체 둘 모두는 세포외 리간드 결합 도메인 (ECD) 및 세포내 세린/트레오닌 키나제 도메인을 지닌다. 또한, I형 수용체는 키나제 도메인에 선행하는 글라이신/세린-풍부 영역 (GS-박스(GS-box)) 및 키나제 도메인 내의 L45 루프를 지닌다. 둘 모두의 수용체는 함께 작용하여 리간드가 하류 신호전달(signaling) 경로, 예를 들어 Smad 및 비-Smad 신호전달 경로를 활성화하게 한다. 활성화는 리간드 결합, 리간드-수용체 올리고머화(oligomerization) 및 II형 수용체 키나제에 의한 I형 수용체의 GS 박스의 인산전달(transphosphorylation)을 포함한다. II형 수용체 키나제는 항시적으로 활성(constitutively active)이고, 리간드 결합 및 I형 수용체의 활성화에서 역할을 한다.

[0014] 액티빈 수용체 I형으로도 공지된 ACVR1, ACVR1A, ACVRLK2, 또는 ALK2는 리간드의 TGFβ 수퍼패밀리에 대한 I형 수용체이다. ACVR1은 세린/트레오닌 키나제 활성을 지니고, Smad 단백질을 인산화시키며, 하류 신호전달 경로를 활성화시킨다. ACVR1은 골격근 및 연골을 포함하는 신체의 많은 조직에서 발견되고, 뼈 및 근육의 성장 및 발달을 조절하는 것을 돕는다. 본 명세서의 다른 부분에 기재되어 있는 바와 같이, *ACVR1* 유전자에서의 소정 돌연변이는 FOP를 초래한다. ACVR1 활성의 예는 리간드에 결합하는 능력, II형 수용체와 복합체를 형성하는 능력, 또는 하류 신호전달 경로, 예를 들어 Smad 경로를 활성화시키는 능력을 포함한다.

[0015] 액티빈 수용체 II형으로도 공지된 ACVR2는 리간드의 TGFβ 수퍼패밀리에 대한 II형 수용체이다. 적어도 2개의 ACVR2 수용체, 예를 들어 액티빈 수용체 IIA형 (ACVR2A 또는 ACTRIIA) 및 액티빈 수용체 IIB형 (ACVR2B 또는 ACTRIIB)이 존재한다. ACVR2에 대한 언급은 ACVR2A 및 ACVR2B 중 어느 하나 또는 둘 모두를 포함한다. ACVR2A 및 ACVR2B는 골격근, 위, 심장, 자궁내막, 고환, 전립선, 난소, 및 신경 조직을 포함하는 다수의 조직에서 발현될 수 있다.

[0016] 리간드 결합 시에, ACVR2 수용체는 I형 수용체, 예를 들어 ACVR1과 복합체를 형성하고 I형 수용체의 GS 박스를 인산화시킴으로써, I형 수용체의 키나제 활성을 향상시킨다. ACVR2A 및 ACVR2B 활성의 예는 리간드에 결합하는 능력, I형 수용체와 복합체를 형성하는 능력, 또는 I형 수용체를 인산화시키는 능력을 포함한다.

[0017] 인간 ACVR2의 예시적 형태는 Swiss Prot 수탁 번호(accession number) P27037을 지닌다. 잔기 1 내지 19는 신호 펩티드이고, 잔기 20 내지 135는 세포외 도메인이고, 잔기 59 내지 116은 액티빈 I형 및 II형 수용체 도메인이고, 잔기 136 내지 161은 막관통 도메인이고, 잔기 162 내지 513은 세포질 도메인이다. 인간 ACVR2B의 예시적 형태는 Swiss Prot 번호 Q13705로 배정되어 있다. 잔기 1 내지 18은 신호 서열이고, 잔기 19 내지 137은 세포외 도메인이고, 잔기 27 내지 117은 액티빈 I형 및 II형 수용체 도메인이고, 잔기 138 내지 158은 막관통 도메인이고, 잔기 159 내지 512는 세포질 도메인이다. 인간 ACVR1의 예시적 형태는 Swiss Prot 수탁 번호 Q04771을 지닌다. 잔기 1 내지 20은 신호 서열이고, 잔기 21 내지 123은 세포외 도메인이고, 잔기 33 내지 104는 액티빈 I형 및 II형 수용체 도메인이고, 잔기 124 내지 146은 막관통 도메인이고, 잔기 147 내지 509는 세포질 도메인이다. ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B 중 어느 것에 대한 언급은 이러한 예시적 형태, 이의 공지된 아이소폼(isoform) 및 다형(polymorphism), 예를 들어 Swiss Prot 데이터베이스에 열거된 것들, 다른 종으로부터의 동계(cognate) 형태, 및 예시된 형태와 적어도 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 서열 동일성을 지닌 다른 변이체(variant)를 포함한다.

[0018] 상기 정의된 예시적 서열 이외의 ACVR2A, ACVR2B 및 ACVR1의 형태의 잔기는, 상응하는 예시적 서열과의 최대 정렬에 의해 번호가 표기되어, 정렬된 잔기가 동일한 번호를 할당받도록 한다. 예시된 서열로부터의 치환은 보존적 또는 비보존적 치환일 수 있다. ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B에 대한 언급은 무손상 세포외 도메인 (예를 들어, 각각 ACVR2A, ACVR2B 및 ACVR1의 잔기 20 내지 135, 19 내지 137 또는 21 내지 123), 또는 막관통 및 세포질 부분이 없거나 실질적으로 없는 이의 일부를 또한 포함한다. 세포외 도메인의 일부는, 무손상 세포외 도메인에 결합하는 적어도 하나의 리간드 또는 상대 수용체(counter receptor)와 결합하여 관련 수용체를 길항하기에 충분한, 무손상 세포외 도메인의 잔기를 보유한다 (예를 들어, 각각 ACVR2A, ACVR2B 및 ACVR1의 잔기 59 내지 116, 27 내지 117 또는 33 내지 104).

[0019] 인간의 경우 액티빈 A는 동종이량체성(homodimeric) 또는 이종이량체성(heterodimeric) 단백질로서 존재할 수 있다. 동종이량체성 단백질은 동종이량체성 베타 A 서브유닛(subunit) 쌍을 함유한다. 이종이량체성 단백질은 베타 서브유닛 및 베타 B, 베타 C 또는 베타 E 서브유닛 (즉, 베타 A 베타 B, 베타 A 베타 C, 또는 베타 A 베타 E)을 함유한다. 서브유닛은 신호 펩티드, 프로펩티드(propeptide) 및 성숙 폴리펩티드를 포함하는 전구체 폴리

펩티드로서 각각 발현된다. 인간 베타 A 서브유닛 전구체의 예시적 형태는 Swiss Prot P08476로 명명되는 426개 아미노산 길이의 폴리펩티드이며, 이것의 잔기 1 내지 20은 신호 펩티드이고, 잔기 21 내지 310은 프로펩티드이고, 잔기 311 내지 426은 성숙 폴리펩티드이다. 베타 B 서브유닛 전구체 폴리펩티드의 예시적 형태는 Swiss Prot P09529로 명명되고, 이것의 잔기 1 내지 28은 신호 펩티드이고, 잔기 29 내지 292는 프로펩티드이고, 잔기 293 내지 407은 성숙 폴리펩티드이다. 베타 C 서브유닛의 예시적 형태는 Swiss Prot P55103으로 명명되고, 이것의 잔기 1 내지 18은 신호 펩티드이고, 잔기 19 내지 236은 프로펩티드이고, 잔기 237 내지 352는 성숙 폴리펩티드이다. 베타 E 서브유닛 전구체의 예시적 형태는 Swiss Prot P58166으로 명명되고, 이것의 잔기 1 내지 19는 신호 펩티드이고, 잔기 20 내지 236은 프로펩티드이고, 잔기 237 내지 350은 성숙 폴리펩티드이다. 이러한 서열의 몇몇 변이체가 Swiss Prot 데이터베이스에 기재된 바와 같이 공지되어 있다. 액티빈 A에 대한 언급은, 베타 A 동종이량체, 베타 A 베타 B, 베타 A 베타 C 및 베타 A 베타 E 이종이량체 형태, 뿐만 아니라 이들의 서브유닛, 뿐만 아니라 제공된 예시적 Swiss Prot 서열 또는 이러한 서열의 다른 자연 발생적 인간 형태에 의해 정의된 프로펩티드 및/또는 신호 펩티드에 서브유닛이 결합되어 있는 이들의 전구체 중 어느 것을 포함한다. 액티빈 A는 ACVR2A 또는 ACVR2B에 결합하는 것을 통해 신호를 전달하지만, ACVR1에 대한 리간드인 것으로 공지되어 있지 않다.

[0020] *III. ACVR1, ACVR2A, ACVR2B의 길항제*

[0021] I형 수용체 ACVR1 및 II형 수용체 ACVR2 단백질 (예를 들어, ACVR2A 및/또는 ACVR2B)의 길항제가 FOP를 치료하기 위해 제공된다. 이러한 길항제는, 다른 메커니즘 중에서도, 수용체에 결합함으로써 직접적으로 (ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B에 대한 항체의 경우) 또는 리간드 또는 상대 수용체에 결합하여 리간드 또는 상대 수용체가 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B에 결합하는 것을 억제함으로써 간접적으로 (ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B의 융합 단백질의 경우), 수용체를 길항할 수 있다. ACVR2A 및 ACVR2B의 길항제는 액티빈 A에 또한 결합할 수 있다.

[0022] 본 명세서에 제공된 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 길항제는, 길항제를 받지 못한 대조 세포 또는 동물 모델과 비교하여, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B의 활성을 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상 억제 또는 감소시킬 수 있다.

[0023] ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B의 임의의 길항제가 FOP를 치료하기 위한 방법에서 사용될 수 있다. 길항제는, 예를 들어 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 폴리펩티드, 예를 들어 세포외 도메인, 길항제 항체, 또는 소분자(small molecule) 억제제를 포함할 수 있다.

[0024] *A. ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B 폴리펩티드의 세포외 도메인*

[0025] 길항제는 각각 ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B 중 적어도 하나의 활성을 억제하기에 유효한 ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B 단백질 및 이들의 단편을 포함한다. 이러한 길항제는 전형적으로 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B의 세포외 도메인 또는 이의 일부를 포함한다. 바람직하게는, 이러한 세포외 도메인은 막관통 및 세포질 영역이 전혀 없거나 실질적으로 없다 (즉, 이러한 영역으로부터의 남아있는 어떠한 잔기도 세포외 도메인의 기능에 대해 유의한 효과를 지니지 않음). 바꾸어 말하면, 이러한 길항제의 ACVR2A, ACVR2B 또는 ACVR1 구성성분은 상기 정의된 바와 같은 ACVR2A, ACVR2B 또는 ACVR1의 전체 세포외 도메인 또는 이의 일부로 이루어지거나 본질적으로 이루어진다. 이러한 길항제는, 하기 추가로 설명되는 바와 같이, ACVR2A, ACVR2B 또는 ACVR1과 구분되는 다른 구성성분(들)을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 막관통 및 세포질 도메인이 없거나 실질적으로 없는 이러한 세포외 도메인은 가용성이다. 이러한 세포외 도메인은, 가용성 리간드 또는 상대 수용체에 결합하여 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 세포 표면 수용체에 결합하는 리간드 또는 상대 수용체와 효과적으로 경쟁함으로써 생체내(in vivo)에서 리간드 또는 상대 수용체의 이용가능성을 조절함 (감소시킴)으로써 길항제로서 기능할 수 있다.

[0026] 가용성 세포외 도메인은 신호 서열과 함께 처음 발현될 수 있으며, 이때 신호 서열은 발현 과정에서 절단된다. 신호 서열은, ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B의 천연(native) 신호 서열, 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 제7,709,605호에 기재된 것들이거나, 상이한 단백질, 예를 들어 꿀벌 멜리틴(honey bee melittin) (HBM) 또는 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator) (TPA)로부터의 신호 서열일 수 있다. 대안적으로, 가용성 세포외 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 폴리펩티드는 신호 서열 없이 합성 또는 발현될 수 있다.

[0027] ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B의 ECD 또는 리간드 결합 도메인은 마우스 및 인간을 포함하는 종 사이에서 고도로 보존된다. ECD는 시스테인 풍부 영역 및 C-말단 꼬리 영역을 함유한다. ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B의 ECD는, 예를 들어 액티빈 A, 미오스타틴(myostatin) (GDF-8), GDF-11 및 BMP를 포함하는, 다양한 그룹의 TGFβ 패밀리

리간드에 결합한다. 예를 들어, 문헌[Souza et al. (2008) Molecular Endocrinology 22(12):2689-2702)]을 참조한다.

[0028] ACVR2A 및 ACVR2B 폴리펩티드 및 가용성 ACVR2A 및 ACVR2B 폴리펩티드의 예는, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 제7,842,633호; 미국 특허 제7,960,343호; 및 미국 특허 제7,709,605호에 개시된 것들을 포함한다.

[0029] ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 폴리펩티드의 ECD는, 변이체 폴리펩티드가 변경된 리간드 결합 특성 (예를 들어, 결합 특이성 또는 친화도)을 지니게 되도록 돌연변이될 수 있다. 일부의 변이체 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 폴리펩티드는 특정 리간드에 대해 변경된 (예를 들어, 상승된 또는 감소된) 결합 친화도를 지닌다. 변이체는 자연 발생적 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 서열 동일성을 지니고, 생물학적 활성을 보유하며, 그리하여 본 명세서의 다른 부분에 기재된 바와 같은 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 활성을 지닌다. ACVR2A 및 ACVR2B의 활성 변이체 및 단편은, 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 제7,842,633호; 미국 특허 제7,960,343호; 및 미국 특허 제7,709,605호에 기재되어 있다.

[0030] ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 활성을 측정하기 위한 검정은, 예를 들어 미국 특허 제7,842,633호; 미국 특허 제7,960,343호; 및 미국 특허 제7,709,605호에 개시되어 있다. 예를 들어, ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 폴리펩티드 변이체는, 리간드와 결합하는 능력 또는 리간드가 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 수용체 단백질에 결합하는 것을 방지하는 능력에 대해 스크리닝(screening)될 수 있다.

[0031] *B. 융합 단백질*

[0032] 상기 기재된 ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B 폴리펩티드는 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 폴리펩티드의 적어도 일부 및 하나 이상의 융합 도메인을 지닌 융합 단백질로서 발현될 수 있다.

[0033] 융합 도메인은 면역글로불린 중쇄 불변 영역 (Fc), 인간 혈청 알부민 (HSA), 글루타티온 S 트랜스퍼라제 (glutathione S transferase) (GST), 단백질 A, 단백질 G, 또는 융합 단백질을 안정화, 가용화, 단리 또는 다량체화(multimerizing)하는 데에 유용할 수 있는 임의의 융합 도메인을 포함한다.

[0034] 면역글로불린 중쇄의 Fc 도메인이 융합 단백질을 위한 바람직한 도메인이다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 단백질에 대해 바람직한 약물동력학적 특성을 부여한다 (예를 들어, 단백질의 안정성 및/또는 혈청 반감기를 증가시킴). 따라서, 본 발명은, 면역글로불린의 Fc 도메인에 융합된, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 중 적어도 하나의 ECD를 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0035] 본 발명의 방법에 사용되는 Fc 도메인은 임의의 면역글로불린으로부터의 것일 수 있다. IgG, IgA, IgM, IgD 및 IgE를 포함하는 다양한 클래스의 면역글로불린 중 어느 것이 사용될 수 있다. IgG 클래스 내에는, 예를 들어 IgG_1, IgG_2, IgG_3 및 IgG_4를 포함하는 다양한 서브클래스 또는 아이소타입이 존재한다. 일 실시 형태에서, Fc 융합 단백질은 IgG 분자의 Fc 도메인을 포함한다. 추가의 실시 형태에서, Fc 도메인은 IgG_1 분자로부터의 것이다. 면역글로불린 분자는, 예를 들어 포유동물, 설치류, 인간, 마우스, 래트(rat), 햄스터 또는 토끼를 포함하는, 임의의 동물 유형의 것일 수 있다. 일 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 포유동물로부터의 것이다. 다른 실시 형태에서, Fc 도메인은 인간으로부터의 것이다. 또 다른 실시 형태에서, Fc 도메인은 설치류, 예를 들어 마우스 또는 래트로부터의 것이다. 특정 실시 형태에서, 융합 단백질의 Fc 도메인은 인간 IgG1로부터의 것이다.

[0036] 본 명세서에 제공된 Fc-융합 단백질은 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. Fc-융합 단백질은, 적어도 CH2 및 CH3 영역, 및 전형적으로 힌지(hinge) 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. CH1 영역이 존재할 수 있지만, 이것은 융합 단백질에서 전형적으로 생략된다.

[0037] 융합은 면역글로불린 불변 도메인의 Fc 부분 내의 임의의 부위에서 이루어질 수 있다. 융합은 불변 도메인의 Fc 부분의 C-말단에 대해, 또는 중쇄의 CH1 영역의 바로 N-말단에서 이루어질 수 있다. Fc-융합 단백질의 생물학적 활성, 분비 또는 결합 특징을 최적화하도록 특정 부위가 선택될 수 있다

[0038] 일부의 경우에, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B의 ECD를 인코딩(encoding)하는 핵산이, 면역글로불린 불변 도메인 서열의 N-말단을 인코딩하는 핵산의 C-말단에 융합된다. 다른 경우에, N-말단 융합이 또한 가능하다. ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B의 ECD를 면역글로불린 불변 도메인 서열의 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 융합시키

는 것이 또한 가능하다.

[0039] 면역글로불린 융합체의 생성에 대해서는, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 제5,428,130호, 미국 특허 제5,843,725호, 미국 특허 제6,018,026호 및 국제 특허 출원 공개 WO2005/070966호를 또한 참조한다.

[0040] 융합 단백질은, 예를 들어 융합 단백질을 인코딩하는 핵산의 재조합적 발현에 의해, 생성될 수 있다. 예를 들어, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B의 ECD를 인코딩하는 핵산을, Fc 도메인을 인코딩하는 핵산에 융합시킴으로써 융합 단백질이 제조될 수 있다. ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B ECD 핵산은, Fc 도메인을 인코딩하는 핵산의 N-말단에 융합될 수 있거나 Fc 도메인을 인코딩하는 유전자의 C-말단에 융합될 수 있다. 대안적으로, ECD는 Fc 도메인의 임의의 위치에서 융합될 수 있다.

[0041] ECD 융합 단백질은 링커를 또한 포함할 수 있다. Fc 융합 단백질의 경우, 링커는 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B ECD와 Fc 도메인 사이에 위치되어, 힌지 영역의 일부 또는 전부를 선택적으로 대체할 수 있다. 링커는, 2차 구조가 비교적 없는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의 아미노산일 수 있다. 링커는 글라이신 및 프롤린 잔기가 풍부할 수 있으며, 예를 들어 트레오닌/세린 및 글라이신의 반복 서열 (예를 들어, TG_4 또는 SG_4 반복체(repeat))을 함유할 수 있다.

[0042] 둘 이상의 ECD-Fc 융합 단백질은 링커에 의해 함께 결합될 수 있다. 그러한 경우, 링커는 ECD들 사이에 위치되거나 링커는 Fc 도메인들 사이에 위치되어 융합 단백질들을 함께 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B Fc 융합 단백질이 함께 연결될 수 있다.

[0043] ACVR2A 및/또는 ACVR2B ECD 융합 단백질의 예가 기재되어 왔는데, 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 제7,842,633호; 미국 특허 제7,960,343호; 및 미국 특허 제7,709,605호에 개시된 것들이다.

[0044] ACVR2A 길항제의 일 예는 Sotatercept (ACE-011로도 일컬어짐)로서 공지되어 있다. Sotatercept는 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 ACVR2A의 ECD를 함유하며, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 문헌[Carrancio *et al.*, (2014) *British J Haematology.* 165(6):870-872]에 상세히 기재되어 있다.

[0045] ACVR2B 길항제의 일 예는 ACE-031로서 공지되어 있다. ACE-031은 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 ACVR2B의 ECD를 함유하며, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 문헌[Sako *et al.*, (2010) *J. Biol.*Chem. 285(27):21037-21048]에 기재되어 있다.

[0046] ACVR1 ECD 융합 단백질의 예가 공지되어 있는데, 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 문헌[Berasi, *et al.*, (2011) *Growth Factors*, 29(4):128-139]에 개시된 것들이다.

[0047] *C. 하이브리드(Hybrid) ECD 융합 단백질*

[0048] 하이브리드 또는 다중특이적(multispecific) ECD 융합 단백질 길항제가 또한 제공된다. 하이브리드 ECD 융합 단백질은 둘 이상의 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B ECD의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B ECD 분자를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 길항제는 ACVR2B ECD에 연결된 ACVR2A ECD를 포함한다. 추가의 실시 형태에서, 길항제는 Fc 도메인을 추가로 포함한다.

[0049] 일 실시 형태에서, 융합 단백질은 하나 이상의 ACVR2A ECD 분자 및 하나 이상의 ACVR2B ECD 분자를 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 융합 단백질은 하나 이상의 ACVR1 ECD 분자 및 하나 이상의 ACVR2A ECD 분자를 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 융합 단백질은 하나 이상의 ACVR1 ECD 분자 및 하나 이상의 ACVR2B ECD 분자를 포함할 수 있다.

[0050] 일 실시 형태에서, 융합 단백질은, 함께 복합체를 이루는, 하나 이상의 ACVR2A ECD-Fc 융합 단백질 및 하나 이상의 ACVR2B ECD-Fc 융합 단백질을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 융합 단백질은, 함께 복합체를 이루는, 하나 이상의 ACVR1 ECD-Fc 융합 단백질 및 하나 이상의 ACVR2A ECD-Fc 융합 단백질을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 융합 단백질은, 함께 복합체를 이루는, 하나 이상의 ACVR1 ECD-Fc 융합 단백질 및 하나 이상의 ACVR2B ECD-Fc 융합 단백질을 포함한다. 이러한 경우, 융합 단백질들은, 예를 들어 적어도 하나의 이황화물 결합(disulfide linkage)에 의해 또는 링커 서열에 의해, 이들의 Fc 도메인을 통해 함께 결합될 수 있다. 대안적으로, 융합 단백질의 ECD 부분들은 링커 서열에 의해 함께 결합될 수 있다.

[0051] 일 실시 형태에서, 길항제는 제1 Fc 도메인에 융합된 ACVR2A ECD 및 제2 Fc 도메인에 융합된 ACVR2B ECD를 포함한다. 이러한 경우, Fc 도메인은 서로 복합체를 이룰 수 있다. 다른 실시 형태에서, 길항제는, Fc 도메인에 각각 융합된, ACVR2A ECD와 ACVR2B ECD 사이에 링커를 포함한다.

[0052] 탠덤 포맷(tandem format)의 ACVR1, ACVR2A, 및/또는 ACVR2B 길항제를 발생시키도록 융합 단백질이 작제(construct)될 수 있다. 일 실시 형태에서, 융합 단백질은 탠덤 형태로(in tandem) 된 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B로부터의 둘 이상의 ECD에 이어 Fc 도메인을 포함한다. 일부의 경우에, 탠덤 형태로 배열된 ECD들은 링커 서열에 의해 나뉘어진다. 이러한 탠덤 융합 단백질은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B ECD를 포함할 수 있다.

[0053] *D. 항체 길항제*

[0054] ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 길항제는 이러한 수용체들 중 어느 것에 대한 (바꾸어 말하면 이에 특이적으로 결합하는) 항체, 바람직하게는 세포외 도메인 내에 에피토프를 지닌 항체를 포함한다. 항체 또는 융합 단백질의 이의 표적 항원에 대한 특이적 결합은 적어도 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 또는 10^{10} M^{-1}의 친화도를 의미한다. 특이적 결합은 적어도 하나의 비관련된 표적에 대해 일어나는 비특이적 결합보다 검출가능할 정도로 크기가 높고 그와 구별될 수 있다. 항체를 제조하기 위한 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Kohler & Milstein (1975) *Nature* 256:495-497]; 및 문헌[Harlow & Lane (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY]을 참조한다.

[0055] ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B의 활성을 억제 또는 감소시키는 임의의 항체 (예를 들어, 길항제 항체)가 사용될 수 있다. 이러한 ACVR2A 및 ACVR2B 항체는, 예를 들어, 각각 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 제8,486,403호, 미국 특허 제8,128,933호, 국제 특허 출원 공개 WO2009/137075호, 및 문헌[Lach-Trifilieff, *et al.* (2014) *Mol. Cell Biol.* 34(4):606-618]에 개시된 항체를 포함한다. 이러한 항체들 중 어느 것의 인간화, 키메라 및 베니어드 형태가, 결합을 위해 이와 경합하는 항체인 경우, 포함된다.

[0056] 일 실시 형태에서, 항체는 항-ACVR2A 항체이다. 다른 실시 형태에서, 항체는 항-ACVR2B 항체이다. 다른 실시 형태에서, 항체는 ACVR2A 및 ACVR2B 둘 모두에 대한 이중특이적(bispecific) 항체일 수 있다. 다른 실시 형태에서, 항체는 항-ACVR1 항체이다. 다른 실시 형태에서, 항체는 ACVR1 및 ACVR2A 둘 모두에 대한 또는 ACVR1 및 ACVR2B 둘 모두에 대한 이중특이적 항체일 수 있다.

[0057] 용어 "항체"는 두 쌍의 중쇄 및 경쇄를 지닌 무손상 항체, 항원과 결합할 수 있는 항체 단편 (예를 들어, Fab, $F(ab')_2$, Fv, 단일 사슬 항체, 다이아바디(diabody), 항체 키메라, 하이브리드 항체, 이중특이적 항체, 인간화 항체 등), 및 전술한 것을 포함하는 재조합 펩티드를 포함한다.

[0058] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, F(ab')2, 및 Fv 단편; 다이아바디; 선형 항체 (문헌[Zapata *et al.* (1995) *Protein Eng.* 10:1057-1062]); 단일-사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0059] 항체는 단클론성 또는 다클론성(polyclonal)일 수 있다. "단클론성 항체"는 실질적으로 균일한 항체의 집단으로부터 얻어지는 항체인데, 즉, 집단을 구성하는 개개의 항체는 미량(minor amount)으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단클론성 항체는 단일 항원 부위에 대해 유도되는 바 종종 고도로 특이적이다. 또한, 다양한 결정기(determinant) (에피토프)에 대해 유도된 다양한 항체를 전형적으로 포함하는 통상적인 (다클론성) 항체 조제물과 대조적으로, 각각의 단클론성 항체는 전형적으로 항원 상의 단일 결정기에 대해 전형적으로 유도된다. 수식어 "단클론성"은 실질적으로 균일한 항체 집단, 예를 들어 B-세포의 클론 집단(clonal population)에 의해 생성되는 것들로부터 얻어지는 것으로서의 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생성을 필요로 하지 않는다.

[0060] 본 명세서에 제공된 방법에 따라 사용되는 단클론성 항체는, 문헌[Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495]에 최초로 기재된 하이브리도마(hybridoma) 방법 또는 이의 변형에 의해 제조될 수 있다. 전형적으로, 동물, 예를 들어 마우스가, 항원 (예를 들어, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 폴리펩티드, 또는 액티빈 A, 특히 세포외 도메인 (수용체의 경우) 또는 이의 일부)을 함유하는 용액으로 면역화된다.

[0061] 면역화는, 식염수 중에, 바람직하게는 애쥬번트(adjuvant), 예를 들어 프로인트 완전 애쥬번트(Freund's complete adjuvant) 중에 항원-함유 용액을 혼합 또는 유화시키고, 혼합물 또는 에멀전을 비경구 주사함으로써 수행될 수 있다. 동물의 면역화 후, 비장 (및 선택적으로 몇몇 큰 림프절)을 적출하고, 단일 세포로 분리한다.

관심 항원으로 코팅된 플레이트 또는 웰(well)에 세포 현탁액을 적용함으로써 비장 세포가 스크리닝될 수 있다. 항원에 대해 특이적인 막 결합된 면역글로불린을 발현하는 B-세포가 플레이트에 결합하고 씻겨 나가지 않는다. 이어서, 생성된 B-세포, 또는 모든 분리된 비장 세포가, 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 형성하도록 유도되고, 선택 배지(selective medium)에서 배양된다. 생성된 세포는 연속 희석에 의해 플레이팅되고, 관심 항원과 특이적으로 결합하는 (그리고 비관련 항원에 결합하지 않는) 항체의 생성에 대해 검정된다. 이어서, 선택된 단클론성 항체 (mAb)-분비 하이브리도마가 시험관내에서(*in vitro*) (예를 들어, 조직 배양 병 또는 중공 섬유 반응기 내에서), 또는 생체내에서(*in vivo*) (마우스 내의 복수(ascites)로서) 배양된다.

[0062] 대안적으로, 단클론성 항체는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조). 단클론성 항체는, 예를 들어 문헌[Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628]; 문헌[Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597]; 및 미국 특허 제5,514,548호에 기재된 기법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 또한 단리될 수 있다.

[0063] "항체"는 상기 정의된 ACVR1, ACVR2A, ACVR2B 및 액티빈 A 중 어느 것에 대한 키메라, 베니어드, 인간화 및 인간 단클론성 항체를 포함한다.

[0064] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 다양한 클래스로 배정될 수 있다. 하기의 5개의 주요 면역글로불린 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (아이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2로 추가로 나뉘어질 수 있다. 다양한 면역글로불린 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤로 일컬어진다. 다양한 면역글로불린 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원 배치는 널리 공지되어 있다.

[0065] 본 발명의 단클론성 항체 또는 Fc 융합 단백질은 다양한 항체 클래스 중 어느 것일 수 있다. 일 실시 형태에서, 단클론성 항체는 IgG 클래스 항체이다. 다른 실시 형태에서, 단클론성 항체는 IgM, IgE, IgD, 또는 IgA 클래스를 지닐 수 있다. 특정 실시 형태에서, 항체는 IgG의 아이소타입, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, 특히 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다.

[0066] 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노 또는 카르복시 말단에 있는 1개 또는 수개의 아미노산, 예를 들어 중쇄의 C-말단 라이신이, 분자의 일부 또는 전부에서 누락 또는 유도체화될 수 있다. 이펙터(effector) 기능, 예를 들어 보체-매개된 세포독성 또는 ADCC를 감소 또는 증가시키기 위해 (예를 들어, Winter 등의 미국 특허 제5,624,821호; Tso 등의 미국 특허 제5,834,597호; 및 문헌[Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006] 참조), 또는 인간에서 반감기를 연장시키기 위해 (예를 들어, 문헌[Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004 참조]), 불변 영역에서 치환이 이루어질 수 있다. 예시적 치환은, 항체의 반감기를 증가시키기 위한 250번 위치의 Gln 및/또는 428번 위치의 Leu을 포함한다 (EU 번호표기). 234번, 235번, 236번 및/또는 237번 위치 중 어느 것에서의 치환은 Fcɣ 수용체, 특히 FcɣRI 수용체에 대한 친화도를 감소시킨다 (예를 들어, 미국 특허 제6,624,821호 참조). 선택적으로, 인간 IgG2에서 234번, 236번 및/또는 237번 위치는 알라닌으로 그리고 235번 위치는 글루타민으로 치환된다 (예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호 참조). 이펙터 기능은 232번 내지 236번 위치에서 EFLG가 PVA로 치환됨으로써 또한 감소될 수 있다 (국제 특허 출원 공개 WO14/121087호 참조). 선택적으로, 내인성 면역글로불린과 외인성 면역글로불린 사이의 교환을 감소시키기 위해, 특히 인간 IgG4에서, 428번 위치의 S가 P로 대체될 수 있다. 다른 변이가, 번역후 변형(post-translational modification), 예를 들어 N-X-S/T 모티프(motif)에서의 N-연결된 글라이코실화의 부위를 부가하거나 제거할 수 있다. 이중특이적 항체의 생성을 위해 다양한 중쇄들 사이의 이종이량체의 형성을 촉진하도록, 변이는 노브(knob) (즉, 하나 이상의 아미노산의 더 큰 아미노산으로의 대체) 또는 홀(hole) (즉, 하나 이상의 아미노산의 더 작은 아미노산으로의 대체)의 도입을 또한 포함할 수 있다. 노브 및 홀 쌍을 형성하기 위한 예시적 치환은 각각 T336Y 및 Y407T이다 (문헌[Ridgeway et al., Protein Engineering vol.9 no.7 pp.617-621, 1996]). 변이는, EU 번호표기 시스템에서 단백질 A 상호작용을 감소시키는 돌연변이 (예를 들어, H435R 및 Y436F)를 또한 포함할 수 있다. 하나의 중쇄는 그러한 변이를 지니고 다른 중쇄는 그렇지 않은 이중특이적 항체가, 단백질-A 친화성 크로마토그래피에 의해 이의 모항체로부터 분리될 수 있다.

[0067] 항체는 액티빈 A에 특이적으로 결합하는 항체를 또한 포함할 수 있다. 이러한 항체는 액티빈 A의 베타 A 베타 A, 베타 A 베타 B, 베타 A 베타 C 및 베타 A 베타 E 형태 중 어느 것 또는 전부에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부의 항체는 이러한 형태들 중 단지 하나 (즉, 베타 A 베타 A, 베타 A 베타 B, 베타 A 베타 C 또는 베타 A 베타 E)에만 특이적으로 결합한다. 베타 A 베타 B, 베타 A 베타 C 및 베타 A 베타 E 형태에 대한 특이성은, 각각 베타 B, 베타 C 또는 베타 E 서브유닛 내의 에피토프에 의해 또는 이종이량체의 둘 모두의 구성성분이 기여하는

에피토프에 대해 부여될 수 있다. 베타 A 베타에 대한 특이성은 동종이량체 내의 둘 모두의 분자가 기여하는 (예를 들어, 서브유닛의 경계면에 있는) 에피토프에 의해 부여될 수 있다. 일부의 항체는 액티빈 A의 이들 형태 전부에 특이적으로 결합하며, 이러한 경우 에피토프는 전형적으로 베타 A 서브유닛 상에 존재한다. 항체는 전형적으로 전구체 단백질의 성숙 폴리펩티드 구성성분 내에 에피토프를 지닌다. 일부의 항체는, 알파 (Swiss Prot P05111) 베타 A 또는 알파 베타 B 이종이량체의 형태로 존재하는 인간 인히빈(inhibin)에 결합함이 없이 임의의 또는 모든 형태의 액티빈 A에 특이적으로 결합한다. 일부의 항체는 임의의 또는 모든 형태의 액티빈 A에 특이적으로 결합하고, 인간 인히빈의 어느 하나 또는 둘 모두의 형태에 결합한다. 이러한 항체가 이의 상대 수용체, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 및/또는 BMPR2 중 하나 이상을 통해 액티빈 A의 신호 전달(signal transduction)을 억제하는 것으로 믿어지지만, FOP를 치료하는 방법에서 이러한 항체를 사용하기 위해 메커니즘의 이해는 필요하지 않다.

[0068] 액티빈 A에 대한 상당수의 항체가 보고되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2015/00373339호에는 H4H10423P, H4H10424P, H4H10426P, H4H10429P, H4H10430P, H4H10432P2, H4H10433P2, H4H10436P2, H4H10437P2, H4H10438P2, H4H10440P2, H4H10442P2, H4H10445P2, H4H10446P2, H4H10447P2, H4H10447P2, H4H10448P2, H4H10452P2로 명명되는 인간 항체가 개시되어 있다. 미국 특허 제8,309,082호에는 인간 항체 A1 내지 A14가 개시되어 있다. 액티빈 A에 대한 마우스 항체가 몇몇 상업적 공급처, 예를 들어 R&D Systems로부터의 MAB3381 또는 Novus Biologicals로부터의 9H16 또는 MM0074-7L18 (ab89307) AbCam으로부터 입수가능하다.

[0069] 바람직한 항체는 액티빈 A에 대해 적어도 10^{8} M^{-1}, 10^{9} M^{-1}, 10^{10} M^{-1}, 10^{11} M^{-1}, 10^{12} M^{-1}, 또는 10^{13} M^{-1}의 친화도 (미국 특허 출원 공개 제2015/00373339호의 실시예 3에서와 같이 25℃에서 측정됨)를 지닌다. 일부의 항체는 10^{9} 내지 10^{12} M^{-1}의 범위 내의 친화도를 지닌다. 바람직한 항체는 4 nM 미만, 바람직하게는 400 pM 미만 또는 40 pM 미만의 IC50으로 액티빈 A의 신호 전달을 억제한다. 일부의 항체는 4 nM 내지 10 pM 또는 3.5 nM 내지 35 pM 범위의 IC50으로 신호 전달을 억제한다.

[0070] 신호 전달 억제는 미국 특허 출원 공개 제20150037339호의 실시예 6에서와 같이 측정될 수 있으며, 이는 하기와 같이 요약된다. 인간 A204 횡문근육종 세포주를 Smad 2/3-루시퍼라제 리포터 플라스미드로 형질감염시켜 A204/CAGAx12-Luc 세포주를 생성시킨다. A204/CAGAx12-Luc 세포를, 10% 우태아 혈청, 페니실린/스트렙토마이신/글루타민 및 250 ㎍/mL의 G418이 보충된 맥코이 5A(McCoy's 5A)에서 유지시켰다. 생물학적 검정(bioassay)을 위해, A204/CAGAx12-Luc 세포를 저혈청 배지, 0.5% FBS 및 OPTIMEM 중에서 웰 당 10,000개 세포로 96-웰 검정 플레이트 상으로 시딩(seeding)하고, 37℃ 및 5% CO_2 에서 하룻밤(overnight) 인큐베이션(incubation)하였다. 액티빈 A를 100 nM으로부터 0.002 nM까지 1:3으로 연속 희석하고, 세포에 첨가하는데, 액티빈을 함유하지 않는 대조군과 함께 시작한다. 적절한 아이소타입 대조 항체를 함유하거나 항체를 함유하지 않는 대조군 샘플을 포함하여, 항체를 100 nM으로부터 출발해서 0.002 nM까지, 1000 nM으로부터 출발해서 0.02 nM까지, 또는 300 nM으로부터 출발해서 0.005 nM까지 1:3으로 연속 희석하고, 100 pM의 일정한 농도의 액티빈 A와 함께 세포에 첨가한다.

[0071] 수용체가 세포로부터 발현되거나, 세포외 도메인이 융합 단백질로서 Fc 도메인과 융합되고, 융합 단백질이 지지체(support) (예를 들어, Biacore 센서 칩(sensor chip))에 고정화되는 경우 측정될 때, 일부의 항체는 액티빈 A가 ACVR2A 및/또는 ACVR2B 및/또는 BMPR2에 결합하는 것을 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 억제한다. 이러한 측정에서, 항체 및 액티빈 A는 등몰량으로 그리고 수용체 또는 세포외 도메인은 과량으로 존재해야 한다.

[0072] 일부의 항체는, 성숙 단백질의 C11 내지 S33 및 C81 내지 E111에 상응하는 전체 길이 액티빈 A의 잔기 321 내지 343 또는 391 내지 421 내의 에피토프에 결합한다.

[0073] 본 발명의 실시예에서 사용되는 예시적 항체는 미국 특허 출원 공개 제2015037339호에서 H4H10446P로 명명되어 있다. 이의 중쇄 가변 영역 및 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3은 미국 특허 출원 공개 제2015/00373339호의 각각 서열 번호 162, 164, 166 및 168의 아미노산 서열을 지닌다 (각각 서열 번호 1 내지 4를 나타냄). 이의 경쇄 가변 영역 및 경쇄 CDR인 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 미국 특허 출원 공개 제2015/0037339호의 각각 서열 번호 146, 148, 150 및 152의 아미노산 서열을 지닌다 (각각 서열 번호 5 내지 8을 나타냄). H4H10446P는, ACVR2A 및/또는 ACVRIIB를 통한 액티빈 A 매개된 신호전달을 억제하지만, 액티빈 A가 ACRIIA 또는 ACVR2B에 결합하는 것에 대해서는, 억제한다고 하더라도, 강하게 억제하지 않는다. 인간 액티빈 A에 결합하거나 H4H10446P와 동일한 인간 액티빈 A 상의 에피토프에 결합하는 것에 대해 H4H10446P와 경쟁하는 다른 항체가 포함되고, 이것의 신

호전달 억제를 공유하는 다른 항체가 또한 포함된다.

[0074] 본 발명의 방법에서 사용되는 다른 예시적 항체는 미국 특허 출원 공개 제20150373339호에서 H4H10430P로 명명되어 있다. 이의 중쇄 가변 영역 및 중쇄 CDR인 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 미국 특허 출원 공개 제2015/00373339호에서 각각 서열 번호 66, 68, 70 및 72의 아미노산 서열을 지닌다 (각각 서열 번호 9 내지 12를 나타냄). 이의 경쇄 가변 영역 및 경쇄 CDR인 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 미국 특허 출원 공개 제2015/0037339호에서 각각 서열 번호 74, 76, 78 및 80의 아미노산 서열을 지닌다 (각각 서열 번호 13 내지 16을 나타냄). 이러한 항체는 액티빈 A가 ACRV2A 및/또는 ACVR2B에 결합하는 것을 억제하고, 이들 수용체 중 하나 또는 둘 모두를 통한 신호 전달을 억제한다. 액티빈 A에 결합하거나 H4H10430P와 동일한 액티빈 A 상의 에피토프에 결합하는 것에 대해 H4H10430P와 경쟁하며 ACVR2A 및 ACVR2B에 대한 액티빈 A의 결합 및 이것들을 통한 신호 전달을 억제하는 이의 특성을 공유하는 다른 항체가 또한 포함된다.

[0075] 본 발명의 방법에서 사용되는 다른 예시적 항체는 미국 특허 제8,309,082호에서 A1으로 명명되는 항체이며, 이는 미국 특허 제8,309,082호에서 서열 번호 9 및 10의 서열을 지닌 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 특징으로 한다 (각각 서열 번호 17 및 18을 나타냄). 이의 경쇄 CDR인 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 미국 특허 제8,309,082호에서 각각 서열 번호 11, 12, 및 13의 서열을 지니고 (각각 서열 번호 19 내지 21을 나타냄), 이의 중쇄 CDR인 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 미국 특허 제8,309,082호에서 각각 서열 번호 62, 63 및 64의 서열을 지닌다 (각각 서열 번호 22 내지 24를 나타냄). 액티빈 A에 결합하거나 H4H10430P와 동일한 액티빈 A 상의 에피토프에 결합하는 것에 대해 H4H10430P와 경쟁하며 ACVR2A 및/또는 ACVR2B에 대한 액티빈 A의 결합 및 이것들을 통한 신호 전달을 억제하는 이의 특성을 공유하는 다른 항체가 또한 포함된다.

[0076] 상기 언급된 항체들 중 어느 것의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 cDNA의 돌연변이유발(mutagenesis)에 의해 다른 항체가 얻어질 수 있다. 성숙 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 있어서 상기 언급된 항체들 중 어느 것과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일하며 이의 기능적 특성을 유지하고, 및/또는 적은 수의 기능적으로 중요하지 않은 아미노산 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 결실 또는 삽입에 의해 각각의 항체와 달라지는, 단클론성 항체가 또한 본 발명에 포함된다. 예시된 항체들 중 어느 것의 상응하는 CDR과 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 바람직하게는 6개 모두의 CDR(들)을 지닌 단클론성 항체가 또한 포함된다. CDR은 바람직하게는 카밧에 의해 정의된 바와 같지만, 임의의 통상적인 대안적 정의, 예를 들어 초티아(Chothia), 복합 카밧-초티아(composite Kabat-Chothia), 접촉 정의(contact definition) 또는 AbM 정의에 의해 정의될 수 있다 (world wide web bioinf.org.uk/abs 참조).

[0077] *E. 소분자 길항제*

[0078] ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B의 길항제는 또한 소분자 길항제일 수 있다. 이러한 소분자 길항제는 ACVR1, ACVR2A, ACVR2B 또는 액티빈 A의 활성을 억제할 수 있다. ACVR1의 소분자 길항제는, 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 문헌[Mohedas *et al.*, (2013) *ACS Chem. Biol.* 8:1291-1302]에 기재된 LDN-212854를 포함한다.

[0079] *IV. 스크리닝 검정*

[0080] 본 명세서에 제공된 다양한 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제 및 이의 변이체 또는 단편의 활성은 다양한 검정으로 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제 및 이의 변이체는, 리간드에 결합하거나 ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 수용체에 결합하는 이의 능력에 대해, 리간드가 ACVR1 및/또는 ACVR2 폴리펩티드에 결합하는 것을 억제하는 이의 능력에 대해, 및/또는 ACVR1 또는 ACVR2 수용체의 활성을 억제하는 이의 능력에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0081] ACVR1 또는 ACVR2 길항제 또는 이의 변이체 또는 단편의 활성은 시험관내에서 또는 세포 기반 검정에서 시험될 수 있다. 시험관내 결합 검정 및 수용체 활성의 억제를 측정하기 위한 검정은 널리 공지되어 있다. ACVR1, ACVR2A 또는 ACVR2B 길항제의 활성을 측정하기 위한 다양한 검정은, 예를 들어, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 제7,842,663호에 상세히 기재되어 있다.

[0082] ACVR1 또는 ACVR2 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 복합체 형성을 조절하는 길항제의 능력은 다양한 기법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 복합체 형성의 조절은, 예를 들어 검출가능하게 표지된 단백질, 예를 들어 방사성표지된 (예를 들어, ^{32}P, ^{35}S, ^{14}C 또는 ^{3}H), 형광 표지된 (예를 들어, FITC), 또는 효소 표지된 ACVR1 또는 ACVR2 폴리펩티드 또는 이의 결합 단백질을 사용하여, 면역검정에 의해, 또는 크로마토그래피 검출에 의해

정량화될 수 있다.

[0083] ACVR1 또는 ACVR2 수용체-매개된 신호전달을 억제하는 ACVR1 또는 ACVR2 길항제의 능력이 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 하류 신호전달, 예를 들어 Smad 활성화의 효과는 Smad-반응성(responsive) 리포터 유전자를 사용하여 모니터링될 수 있다.

[0084] ACVR1 및/또는 ACVR2 길항제 및 이의 변이체 또는 단편은, 생체내 검정으로 활성에 대해 또한 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, ACVR1 또는 ACVR2 길항제 또는 이의 변이체는, FOP의 마우스 모델에서 FOP를 치료하는 이의 능력 (예를 들어, 전위성 골형성을 감소시키는 능력)에 대해 스크리닝될 수 있다. Acvr1[R206H]을 인코딩하는 조건적 대립유전자(conditional allele)를 함유하는 유전자도입 녹-인(knock-in) 마우스가 개발되어 왔다. 이러한 *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$ 마우스는, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 출원 제14/207,320호 및 PCT/US2014/026582호에 기재되어 있다. 이러한 대립유전자는, Cre 재조합효소에 의한 활성화 후에만 R206H 변이체를 발현시킨다. 이것은, 다양한 유형의 Cre 드라이버 라인(driver line)을 사용함으로써 특정 조직에서 그리고 특정 시간에 *Acvr1*[R206H] 발현의 Cre-의존성 활성화를 가능하게 한다. 이러한 방식으로, 생성된 마우스는, *Acvr1*[R206H]의 비조절된 녹-인 대립유전자의 경우 관찰되었던 출생전 치사(perinatal lethality)를 또한 우회한다. 어린 또는 성체 마우스에서 *Acvr1*[R206H] 발현의 활성화는 전위성 골형성을 야기한다. 예를 들어, *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$; *Gt(ROSA26)Sor*$^{CreERt2/+}$ 마우스 (여기서, CreERt2는, *Gt(ROSA26)Sor* 유전자좌(locus) 내로 도입된, 타목시펜-조절가능한 재조합효소이며 (문헌[Feil et al. (1997) *Biochem Biophys Res Commun.* 237(3):752-7] 참조), 그리하여 이것은 항시적으로 및 전역적으로 발현됨)는 타목시펜에 노출된 후 FOP를 발생시킨다.

[0085] 요약하면, 타목시펜이 없는 경우, CreERt2는 비활성인 상태이다. 타목시펜은 Cre의 발현을 활성화시키고, 이어서 Cre는 *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$에 대해 작용하여 이를 *Acvr1*$^{[R206H]/+}$로 전환시킴으로써, ACVR1[R206H]인 FOP 환자의 유전자형을 반영하도록 마우스의 유전자형을 전환시킨다. *Acvr1*$^{[R206H]}$ 대립유전자는 Acvr1[R206H]을 발현시키며, 그것은 *Acvr1*$^{[R206H]/+}$;*Gt(ROSA26)Sor*$^{CreERt2/+}$ 마우스에서 FOP의 발생을 유발하기에 적합하다. 이는 통상적인 *Acvr1*$^{[R206H]}$ 녹-인 마우스인 *Acvr1*^{tm1Emsh} (http://www.informatics.jax.org/allele/key/828153)의 경우 겪게 되는 배아 치사(embryonic lethality)를 우회한다. 타목시펜 처리 후, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제 또는 대조군이 *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$; *Gt(ROSA26)Sor*$^{CreERt2/+}$ 마우스에 투여될 수 있고, 동물들은 전위성 골형성에 대해 모니터링될 수 있다. 문헌[Chakkalakal SA, et al. (20120 An Acvr1 R206H knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. J Bone Miner Res. 27(8):1746-56]을 참조한다. 이러한 검정은 하기 실시예에 상세히 기재되어 있다.

[0086] *V. 진행성 골화성 섬유이형성증 (FOP)*

[0087] FOP는 이소성(heterotopic) 골화가 골격외(extraskeletal) 부위, 예를 들어 결합 조직에서 조직학적으로 및 생체역학적으로 '정상인(normal)' 뼈를 형성하는 희귀 유전성 장애이다. 이러한 장애는, 일과성이지만, 누적되어, 그 결과 중증도가 증가하는 영구적 불능(disability)으로 이어진다.

[0088] FOP의 전세계적 유병률은 대략 1/2,000,000이다. FOP에 대한 민족(ethnic), 인종(racial), 성별, 또는 지리적 선호는 없다. 이것은 극도로 불능인 상태가 되게 하는(extremely disabling) 질병일 뿐만 아니라 상당히 단축된 수명의 질환이다.

[0089] FOP의 특징은, 예를 들어 엄지 발가락의 선천성 기형, 염증을 동반하는 머리, 목, 및/또는 등에서의 고통스러운 연조직 종창(swelling)을 특징으로 하는 재연(flare-up) 및 연골내(endochondral) 골화를 통한 진행성 이소성 골형성을 포함한다.

[0090] FOP는 엄지 발가락의 기형의 존재에 근거하여 임상적으로 의심될 수 있다. 진단 검사, 예를 들어 x-레이 또는 뼈 스캔(bone scan)은 엄지 발가락 비정상을 입증할 수 있고, 이소성 골화의 존재를 확인할 수 있다. FOP 진단은 유전자 검사에 의해, 예를 들어 *ACVR1* 유전자에서 617번 G에서 A로의 (R206H) 돌연변이를 검출함으로써 또한 확인될 수 있다.

[0091] FOP가 이소성 골화의 다른 질환을 포함하는 몇몇 다른 장애로 오진되는 것이 통상적이다. FOP는 차별적 진단에 의해, 예를 들어 단독형(isolated) 선천성 기형, 림프부종, 연조직 육종, 데스모이드 종양(desmoid tumor), 공

격성 청소년 섬유종증(aggressive juvenile fibromatosis), 청소년 건막류(juvenile bunion), 단독형 단지증(brachydactyly), 진행성 골 이형성증(progressive osseous heteroplasia) 및 이소성 골화를 포함하는 장애와 구별되어야 한다. 엄지 발가락 선천성 기형의 존재 및 고통스러운 연조직 재연을 이용하여 FOP를 다른 장애와 구별할 수 있다.

[0092] FOP에 걸린 환자는 엄지 발가락의 선천성 기형을 지니지만, 그 외에는 출생시 정상인 것으로 보인다. FOP와 관련된 재연은 생애의 처음 십년 도중에 시작한다. 재연은, 예를 들어 연조직 손상, 낙상(fall), 피로, 바이러스 감염 또는 근내 주사에 의해 촉발될 수 있다. 재연의 결과는 연조직, 예를 들어 인대, 골격근 또는 힘줄의 이소성 뼈로의 변환이다.

[0093] 이전에 FOP에 대한 치료적 처치는 존재하지 않았다. FOP는 예방적 조치, 예를 들어 손상을 최소화하기 위한 안전 및 전략 개선, 근내 주사 회피 및 치과 진료 시 주의에 의해 관리되었다. 재연의 처음 24시간 이내에 시작된 고용량(high dose) 코르티코스테로이드 치료는 재연과 관련된 염증 및 부종을 감소시키는 것을 도울 수 있다. 이소성 뼈를 제거하는 수술 전략은 권장되지 않는데, 이는 이것이 역효과를 가져오며 새로운 외상 유도된 이소성 골화를 초래하기 때문이다.

[0094] FOP는, GS 도메인과 억제 분자인 FKBP12의 상호작용을 불안정하게 하는 것으로 보이는, *ACVR1* (*ALK2*로도 공지되어 있음)의 돌연변이에 의해 초래된다 (문헌[Groppe, J., *et al.* 2011, *Cells Tissues Organs*, 194:291-295]). FKBP12는 ACVR1의 음성 조절자(negative modulator)이고, 수용체를 비활성 입체형태로 안정화시키는 기능을 한다 (문헌[Huse, M., *et al.* 1999, *Cell*, 96:425-436]). 문헌[Kaplan, F.S., *et al.* 2012, *Disease Models & Mechanisms*, 5:756-762]을 참조한다.

[0095] FOP와 관련된 ACVR1의 돌연변이의 예는 세포내 도메인에서의 206번 아르기닌의 히스티딘으로의 (R206H) 돌연변이이다.

[0096] FOP가 발생될 위험이 있는 피검자는, ACVR1 R206H 돌연변이 또는 FOP와 관련된 다른 돌연변이를 지닌 임의의 피검자, 엄지 발가락의 기형을 지닌 채 출생한 피검자, 또는 당 분야에서 인정되는 기준에 의해 FOP의 진단을 내리기에 충분한 FOP의 증상을 아직 나타내지 않은 FOP의 가족력이 있는 피검자를 포함한다.

[0097] *VI. 치료 방법*

[0098] FOP에 걸린 피검자에게 유효한 투약체계의 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제를 투여하는 것을 포함하는, FOP의 치료 방법이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 유효한 투약체계의 ACVR2A 길항제 및 ACVR2B 길항제가 투여된다. 추가의 실시 형태에서, ACVR2A 길항제는 Fc 융합 단백질이고, ACVR2B 길항제는 Fc 융합 단백질이다. 다른 실시 형태에서, 유효한 투약체계의 액티빈 A에 대한 항체를 투여함으로써 FOP가 치료된다.

[0099] FOP에 걸린 피검자를 "치료한다"는 것은 유효한 투약체계의 ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체를, FOP에 걸린 피검자에게 투여하는 것을 의미하는데, 여기서 목적은 FOP의 하나 이상의 증상의 상태를 치료, 치유, 완화, 경감, 변경, 교정, 개선, 향상시키거나, 이에 영향을 미치는 것이다

[0100] "피검자"는, FOP의 치료가 요망되는, 임의의 동물 (즉, 포유동물), 예를 들어 인간, 영장류, 설치류, 예를 들어 마우스 및 래트, 농업용 및 가축화된 동물, 예를 들어 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 등이다. 본 발명의 방법들 중 어느 것에 있어서, 피검자는 포유동물, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0101] 액티빈 A, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체의 유효한 투약체계는, FOP의 적어도 하나의 징후 또는 증상에서 긍정적 반응을 가져오는, 길항제의 용량, 빈도 및 투여 경로의 조합을 의미한다. 긍정적 반응은 FOP의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 감소, 제거, 개선, 이의 악화를 억제, 또는 지연시키는 것을 포함할 수 있다. 긍정적 반응의 대상일 수 있는 FOP의 징후 또는 증상은, 예를 들어 전위성 또는 이소성 골형성, FOP 재연, 또는 재연과 관련된 통증 및 종창을 포함한다. 투약체계는 치료 전과 후에 징후 및 증상을 비교함으로써 단일 환자에서 평가될 수 있다. 투약체계는 적어도 하나의 징후 또는 증상이 치료 후에 긍정적 반응을 나타내는 경우 유효한 것으로 간주된다. 본 발명의 길항제 또는 길항제들로 치료된 피검자 집단의 징후 및 증상을, 치료를 받지 않은 대조 피검자 집단과 비교함으로써, 투약체계가 대안적으로 또는 추가적으로 평가될 수 있다. 이러한 비교를 위한 피검자는 임상 실험 (예를 들어, I상, II상, IIa상, IIb상, 또는 III상) 중인 동물 모델, 또는 인간 피검자일 수 있다. 적어도 하나의 징후 또는 증상에서 집단들 사이에 통계적으로 유의한 긍정적 반응이 존재하는 경우 투약체계는 유효한 것으로 간주된다.

[0102] FOP를 치료하기 위한 일부의 방법에 있어서, 피검자는 ACVR1, ACVR2A, 및/또는 ACVR2B에 대한 길항제, 또는 액

티빈 A에 대한 항체로 치료될 수 있는 다른 질환에 걸려 있지 않고, 이의 위험이 없다. 예를 들어, 피검자는 II형 당뇨병, 근이영양증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS) 또는 골다공증 중 어느 것 또는 전부가 없을 수 있다.

[0103] A. *투여 방법*

[0104] ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체는 단백질 또는 소분자로서 통상 직접적으로 투여되지만, 단백질인 경우에는 이러한 단백질을 인코딩하는 핵산으로서 또한 투여될 수 있다. 이러한 길항제는 다양한 방법, 예를 들어 세포 형질감염, 유전자 요법, 전달 비히클 또는 약제학적으로 허용되는 담체에 의한 직접 투여, 본 명세서에 제공된, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 세포를 제공함에 의한 간접 전달에 의해 투여될 수 있다.

[0105] 본 명세서에 제공된, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체를 투여하기 위해 다양한 전달 시스템, 예를 들어 리포솜 내, 미세입자(microparticle) 내, 마이크로캡슐(microcapsule) 내 캡슐화, 화합물을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개된 엔도사이토시스(receptor-mediated endocytosis) (예를 들어, 문헌[Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432] 참조), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서의 핵산의 작제 등이 사용될 수 있다.

[0106] 투여 방법은 장내(enteral) 또는 비경구 투여일 수 있으며, 피내, 근내, 복막내, 정맥내, 피하, 폐, 비강내, 안내, 경막외(epidural) 또는 경구 경로를 포함한다. 화합물은 임의의 편리한 경로, 예를 들어 주입(infusion) 또는 일시 주사(bolus injection)에 의해, 상피 또는 점막피부 내층(mucocutaneous lining) (예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신적 또는 국소적일 수 있다. 또한, 뇌실내(intraventricular) 및 수강내(intrathecal) 주사를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 본 발명의 약제학적 조성물을 중추 신경계 내로 도입시키는 것이 바람직할 수 있는데, 뇌실내 주사는, 예를 들어 옴카나(Omcana) 저장소(reservoir)와 같은 저장소에 결합된, 뇌실내 카테터에 의해 촉진될 수 있다. 폐 투여가, 예를 들어, 흡입기(inhaler) 또는 분무기(nebulizer), 및 에어로졸화제와의 제형의 사용에 의해, 또한 사용될 수 있다.

[0107] 본 발명의 약제학적 조성물은 치료가 필요한 영역에 국소적으로 투여될 수 있으며, 이는 예를 들어 수술 중 국소 주입, 국소 적용에 의해, 예를 들어 주사에 의해, 카테터에 의해, 또는 삽입물(implant)에 의해 달성될 수 있고, 상기 삽입물은 막, 예를 들어 시알라스틱 막(sialastic membrane), 섬유, 또는 시판용 피부 대체물(substitute)을 포함하는 다공성, 비다공성, 또는 젤라틴성 물질(gelatinous material)로 이루어진다.

[0108] 다른 실시 형태에서, 활성제는 소포(vesicle), 특히 리포솜으로 전달될 수 있다 (문헌[Langer (1990) Science 249:1527-1533] 참조). 다른 실시 형태에서, 활성제는 제어된 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 일 실시 형태에서, 펌프가 사용될 수 있다 (상기 문헌[Langer (1990)] 참조). 다른 실시 형태에서, 중합체 물질이 사용될 수 있다 (문헌[Howard *et al.* (1989) *J. Neurosurg.* 71:105] 참조). 본 발명의 활성제가 단백질을 인코딩하는 핵산인 다른 실시 형태에서, 핵산은, 이의 인코딩되는 단백질의 발현을 촉진하기 위해, 이것을 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 작제하고, 이것이 세포내에 존재하게 되도록 투여함으로써, 예를 들어 레트로바이러스 벡터의 사용에 의해 (참조: 예를 들어, 미국 특허 제4,980,286호), 또는 직접 주사에 의해, 또는 미세입자 충격(bombardment), 또는 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질감염제로의 코팅의 사용에 의해, 또는 핵에 진입하는 것으로 공지된 호메오박스-유사 펩티드(homeobox-like peptide)에 연결된 상태로 이것을 투여함에 의해 (예를 들어, 문헌[Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868] 참조) 등에 의해 투여함으로써, 생체내 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산은 세포내 도입될 수 있고, 동종 재조합(homologous recombination)에 의해, 발현을 위한 숙주 세포 DNA 내에 혼입될 수 있다.

[0109] B. *병용 요법*

[0110] 본 명세서에 제공된, ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체는 서로 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 일 실시 형태에서, FOP를 치료하는 방법은 ACVR2A 길항제 및 ACVR2B 길항제의 병용 투여(co-administration)를 포함한다. 다른 실시 형태에서, FOP를 치료하는 방법은 ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B 길항제의 병용 투여를 포함한다. 다른 실시 형태에서, ACVR1 길항제는 ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제와 병용 투여될 수 있다. ACVR1, ACVR2A 및 ACVR2B 길항제는 개별적 약제학적 조성물로서 투여될 수 있거나 이들 작용제의 병용물을 포함하는 단일 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다. ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체는, 단독으로 또는 병용하여, 하나 이상의 추가의 치료 화합물과 함께 투여될 수 있다. 병용 요법은 동시 또는 교대 투여를 포함할 수 있다. 또한, 병용 요법은 급성 또는 만성 투여를 포함할 수 있

다.

[0111] C. *약제학적 조성물*

[0112] 본 발명은, 본 명세서에 제공된, 액티빈 A, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 또한 제공한다. 용어 "약제학적으로 허용되는"은 연방 정부 또는 주정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전(U.S. Pharmacopeia) 또는 동물, 더욱 특히 인간에 사용하기 위해 다른 일반적으로 인정되는 약전에 등재된 것임을 의미한다. 용어 "담체"는, 치료제와 함께 투여되는, 희석제, 애쥬번트, 부형제 또는 비히클을 의미한다. 이러한 약제학적 담체는 무균 액체, 예를 들어 물 및 오일일 수 있으며, 이에는 석유(petroleum), 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들, 예를 들어 땅콩유, 대두유, 광유(mineral oil), 참기름 등이 포함된다. 적합한 약제학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크(chalk), 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석(talc), 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은, 요망되는 경우, 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다.

[0113] 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환제(pill), 캡슐, 분말, 지속방출성 제형(sustained-release formulation) 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은, 전통적 결합제 및 담체, 예를 들어 트라이글리세라이드와 함께, 좌제(suppository)로서 제형화될 수 있다. 경구용 제형은 표준 담체, 예를 들어 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다. 적합한 약제학적 담체의 예는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin]에 기재되어 있다.

[0114] 일 실시 형태에서, 조성물은 인간에 대한 정맥내 투여에 적합하게 된 약제학적 조성물로서 일상적 절차에 따라 제형화된다. 필요한 경우, 조성물은 주사 부위에서의 통증을 완화시키기 위해 가용화제 및 국소 마취제, 예를 들어 리도카인을 또한 포함할 수 있다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 이것은 약제학적 등급의 무균수 또는 무균 식염수를 함유하는 주입 병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 식염수의 앰풀(ampoule)이 제공될 수 있다.

[0115] 본 명세서에 제공된, 액티빈 A, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체는 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 유리 아미노 기와 함께 형성된 것들, 예를 들어 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도된 것들, 및 유리 카르복실 기와 함께 형성된 것들, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화제2철(ferric hydroxide), 아이소프로필아민, 트라이에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 것들을 포함한다.

[0116] FOP의 치료에 유효한 특정 경로에 의해 투여되는, 액티빈 A, ACVR1, ACVR2A 및/또는 ACVR2B 길항제, 또는 액티빈 A에 대한 항체의 양 및 빈도 (예를 들어, 유효한 투약체계)는 본 명세서에 근거하여 표준 임상 기법에 의해 결정될 수 있다. 또한, 최적 투여량 범위를 확인하는 것을 돕기 위해 시험관내 검정이 사용될 수 있다. 제형에 사용하고자 하는 정확한 용량은, 투여 경로, 및 질환의 중증도에 또한 좌우되며, 의사의 판단 및 각각의 피검자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 그러나, 비경구 투여, 바람직하게는 정맥내 또는 피하 투여를 위한 적합한 투여량 범위는 대체로 체중 kg 당 활성 화합물 약 20 내지 50000 마이크로그램이다. 액티빈 A에 대한 항체의 경우, 적합한 투여량 범위는 1 내지 25 mg/kg, 2 내지 20 mg/kg, 5 내지 15 mg/kg, 8 내지 12 mg/kg 및 10 mg/kg을 포함한다.

[0117] 비내 투여를 위한 적합한 투여량 범위는 대체로 약 0.01 pg/kg 체중 내지 1 mg/kg 체중이다. 유효한 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 도출되는 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0118] 투여 빈도는, 다른 요인들 중에서도, 질환의 중증도 및 작용제의 반감기에 따라 또한 달라지지만, 전형적으로, 예를 들어 1주에 2회, 매주, 격주, 매월, 격월을 포함하는, 일 단위(daily) 내지 분기 단위(quaterly)이다. 작용제는, 다른 요인들 중에서도, 환자의 상태 또는 작용제의 혈청 수준의 임계치 미만으로의 감소에 반응하여 불규칙적 간격으로 또한 투여될 수 있다.

[0119] 상기 또는 하기 인용된 모든 특허 출원, 웹사이트, 다른 간행물, 수탁 번호 등은 각각의 개별 항목이 구체적으로 및 개별적으로 그렇게 참고로 포함되도록 지시되어 있는 것처럼 그와 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 포함된다. 다양한 버전(version)의 서열이 다양한 시점에서 수탁 번호와 관련되는 경우, 본 출원의 유효 출원일에서 수탁 번호와 관련된 버전이 의도된다. 유효 출원일은 실제 출원일 또는 적용가능한 경우 수탁 번호를 언급하는 우선 출원의 출원일 중 더 빠른 것을 의미한다. 마찬가지로 다양한 버전의 간행물, 웹사이트 등이 다양한 시점에서 공개된 경우, 달리 지시되지 않는 한 본 출원의 유효 출원일에서 가장 최근에 공개

된 버전이 의도된다. 본 발명의 임의의 특징부, 단계, 요소, 실시 형태, 또는 태양은 달리 구체적으로 지시되지 않는 한 임의의 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다.

[0120] **실시예**

[0121] **실시예 1: FOP의 마우스 모델에서 전위성 골형성을 억제하기 위한 ACVR2A-Fc/ACVR2B-Fc의 용도.**

[0122] *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$; *Gt(ROSA26)Sor*$^{CreERt2/+}$는 ACVR2A-Fc/ACVR2B-Fc 처리에 의해 타목시펜 처리 후에 전위성 골형성으로부터 보호되었다.

[0123] *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$; *Gt(ROSA26)Sor*$^{CreERt2/+}$로 지칭되는 FOP의 마우스 모델에 타목시펜을 1 mg/마우스의 용량으로 8일 동안 복막내(i.p.) 투여하였다. 6주 동안, 11 마리의 마우스를 10 mg/kg의 ACVR2A-Fc 및 10 mg/kg의 ACVR2B-Fc로 1주에 2회 처리하고, 10 마리의 마우스를 10 mg/kg의 대조 mFc로 1주에 2회 처리하였다. 타목시펜 투여의 개시 후 기선(baseline), 2주, 4주 및 6주째에 생체내 μCT를 사용하여 마우스를 모니터링하였다. 6주 후, mFc 그룹에서는 10 마리의 마우스 중 9 마리가 적어도 하나의 위치에서 전위성 뼈를 발생시켰고, 대조적으로 ACVR2A-Fc 및 ACVR2B-Fc 그룹에서는 11 마리의 마우스 중 단지 2 마리만이 전위성 뼈의 발생을 나타내었으며 이러한 뼈는 크기가 작았다. 이러한 결과는 도 1에 도시되어 있다

[0124] **실시예 2: FOP의 마우스 모델에서 전위성 골형성을 억제하기 위한 ACVR1 키나제 소분자 억제제의 용도.**

[0125] *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$; *Gt(ROSA26)Sor*$^{CreERt2/+}$는 ACVR1 키나제 억제제 LDN-212854 처리에 의해 타목시펜 처리 후 전위성 골형성으로부터 보호되었다.

[0126] 16 마리의 *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$; *Gt(ROSA26)Sor*$^{CreERt2/+}$ 마우스에게 타목시펜을 1 mg/마우스의 용량으로 8일 동안 복막내 투여하였다. 8 마리의 마우스는 4주 동안 1일 2회 3 mg/kg의 ACVR1 키나제 억제제 LDN-212854 (문헌 [Mohedas *et al.* (2013) *ACS Chem. Biol.* 8:1291-1302])로 처리하였다. 8 마리의 마우스는 4주 동안 1일 2회 비히클 대조군으로 처리하였다. 타목시펜 투여의 개시 후 기선, 2주 및 4주째에 생체내 μCT를 사용하여 마우스를 모니터링하였다. 4주 후, 비히클 대조군 그룹에서는 8 마리의 마우스 중 8 마리가 전위성 골형성을 나타내었으며, 이들 마우스 중 6 마리에서는 전위성 골병변의 크기가 컸다. 대조적으로, LDN-212854 처리된 그룹에서는, 8 마리의 마우스 중 3 마리가 전위성 골형성을 나타내었으며, 3 마리의 마우스에서 형성된 전위성 골병변의 크기는 비히클 대조군 그룹과 비교하여 작았다. 이러한 결과는 도 2에 도시되어 있다.

[0127] **실시예 3: FOP의 마우스 모델에서 전위성 골형성을 억제하기 위한 액티빈 A에 대한 항체의 용도.**

[0128] 23 마리의 *Acvr1*$^{[R206H]COIN/+}$; *Gt(ROSA26)*$^{SorCreERt2/+}$ 마우스에게 타목시펜을 1 mg/마우스의 용량으로 8일 동안 복막내 처리하였다. 3주 동안, 7 마리의 마우스는 25 mg/kg의 아이소타입 대조 항체로 1주에 2회 처리하였고, 8 마리의 마우스는 25 mg/kg의 액티빈 A 항체 (H4H10446P)로 1주에 2회 처리하였고, 8 마리의 마우스는10 mg/kg의 ACVR2a-Fc로 1주에 2회 처리하였다. 이들 작용제로의 처리는 타목시펜 처리를 개시함과 동시에 시작하였다. 타목시펜 투여의 개시 후 기선, 2주 및 3주째에 생체내 마이크로 컴퓨터 단층촬영 (μCT)을 사용하여 마우스를 모니터링하였다. 도 3은 3주 후, 아이소타입 대조 항체 그룹에서의 모든 마우스가 적어도 하나의 위치에서 전위성 뼈를 발생시켰고, 대조적으로 액티빈 A 항체 그룹에서는 이러한 시점에서 어떠한 마우스도 전위성 뼈의 발생을 나타내지 않았음을 도시한다. ACVR2a-Fc 그룹에서는 2 마리의 마우스가 3주째에 전위성 뼈를 발생시켰다.

[0129] **실시예 4:**

[0130] Acvr1[R206H]COIN/+; Gt(ROSA26)SorCreERt2/+는 액티빈 A 및 Acvr2a 및 b 차단 항체(blocking antibody) 둘 모두에 의해 타목시펜 처리 후 전위성 골형성으로부터 보호되었다.

[0131] 26 마리의 Acvr1[R206H]COIN/+; Gt(ROSA26)SorCreERt2/+ 마우스에게 타목시펜을 40 mg/kg의 용량으로 8일 동안 복막내 투여하였다. 6주 동안, 8 마리의 마우스는 10 mg/kg 아이소타입 대조 항체 (REGN1945)로 처리하였고, 9 마리의 마우스는 10 mg/kg의 액티빈 A 항체 (H4H10446P) (REGN2477)로 처리하였으며, 9 마리의 마우스는 10 mg/kg의 Acvr2a/Acvr2b 항체로 1주에 2회 처리하였다. 타목시펜 투여의 개시 후 기선, 2주, 3주 및 4주째에 생체내 μCT를 사용하여 마우스를 모니터링하였다. 도 4는 4주 후, 아이소타입 대조 항체 그룹에서는 8 마리의 마우스 중 7 마리가 적어도 하나의 위치에서 전위성 뼈를 발생시켰고, 대조적으로 액티빈 A 항체 처리된 그룹에서는 단지 1 마리의 마우스만이, 그리고 Acvr2a/Acvr2b 항체 처리된 그룹에서는 3 마리의 마우스가 4주째에 전위성 뼈를 발생시켰음을 도시한다. 항체 처리된 그룹에서 형성된 전위성 뼈의 크기는 아이소타입 대조군 처리

된 그룹보다 작았다.

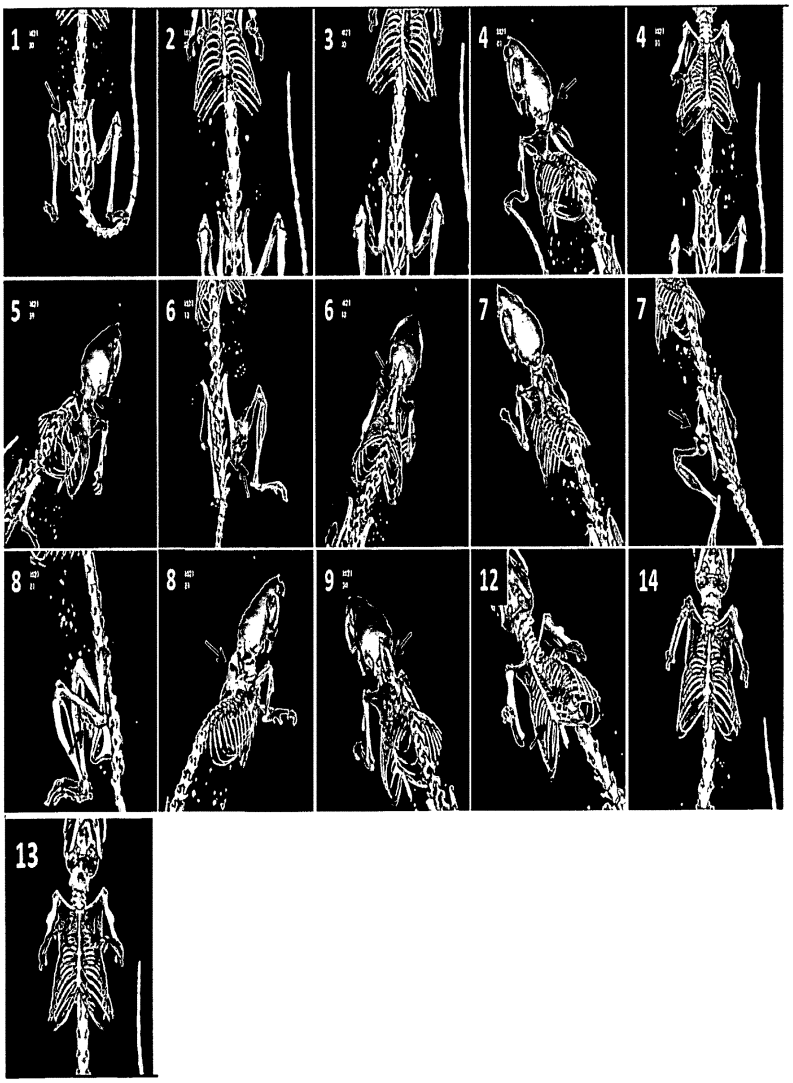
[0132] **실시예 5:**

[0133] Acvr1[R206H]COIN/+; Gt(ROSA26)SorCreERt2/+는 액티빈 A 차단 항체에 의해 타목시펜 처리 후 전위성 골형성으로부터 보호되었다.

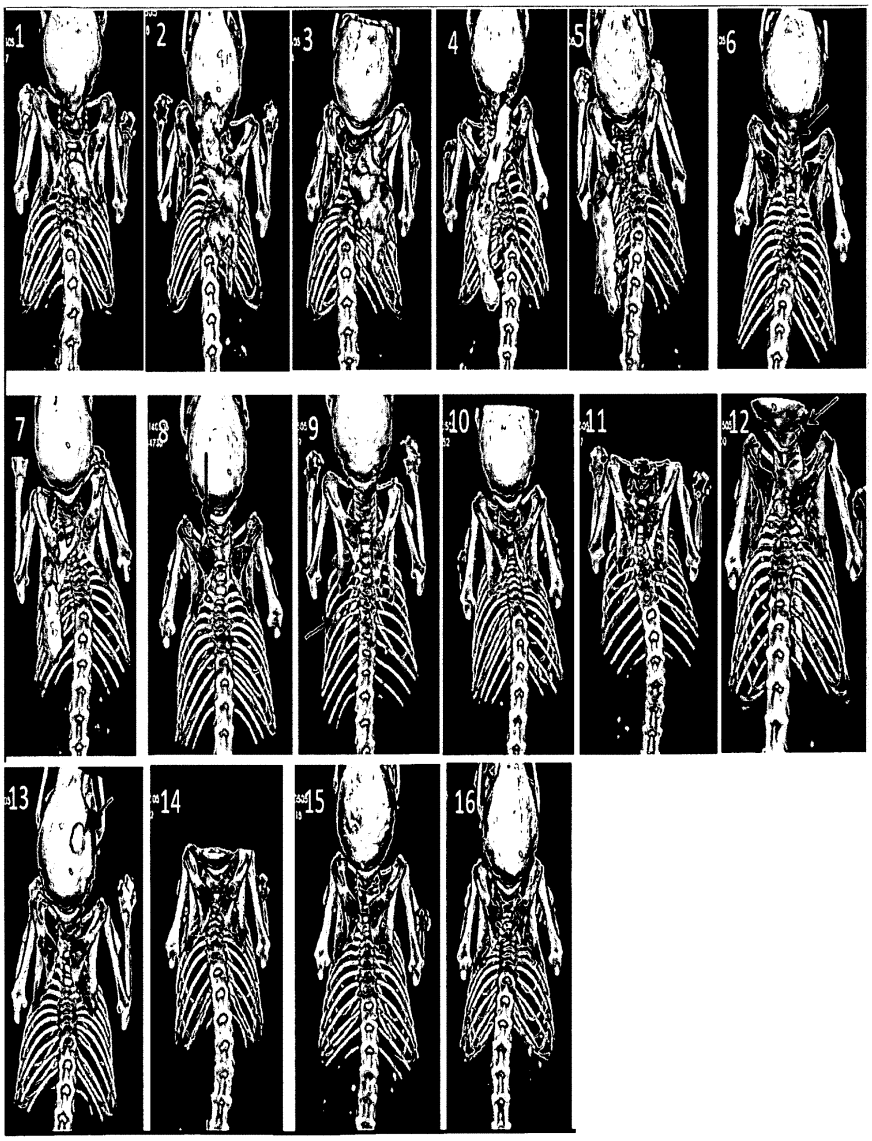
[0134] 35 마리의 Acvr1[R206H]COIN/+; Gt(ROSA26)SorCreERt2/+ 마우스에게 타목시펜을 40 mg/kg으로 8일 동안 복막내 투여하였다. 6주 동안 매주, 8 마리의 마우스는 25 mg/kg의 아이소타입 대조 항체 (REGN1945)로 처리하였고, 9 마리의 마우스는 25 mg/kg의 액티빈 A 항체 (H4H10446P) (REGN2477)로 처리하였고, 9 마리의 마우스는 10 mg/kg의 액티빈 A 항체 (REGN2477)로 처리하였고, 9 마리의 마우스는 1 mg/kg의 액티빈 A 항체 (REGN2477)로 처리하였다. 타목시펜 투여의 개시 후 기선, 2주, 3주, 4주 및 6.5주째에 생체내 μCT를 사용하여 마우스를 모니터링하였다. 각각의 마우스에서 전위성 뼈의 부피를 μCT 이미지로부터 계산하였다. 도 5는 4주 후, 아이소타입 대조 항체 그룹에서의 모든 마우스가 적어도 하나의 위치에서 전위성 뼈를 발생시킨 반면, 액티빈 A 항체 처리된 그룹들은 각각 단지 2 마리의 마우스만이 그러하였음을 도시한다. 6.5주째에, 아이소타입 처리된 그룹에서의 전위성 뼈의 평균 전체 부피는 65.4 ㎣이었는데, 이는 25 mg/kg의 액티빈 항체 처리된 그룹에서의 1.87 ㎣, 10 mg/kg의 액티빈 항체 처리된 그룹에서의 0.3 ㎣ 그리고 1 mg/kg의 액티빈 항체 처리된 그룹에서의 7.3 ㎣과 비교된다.

도면

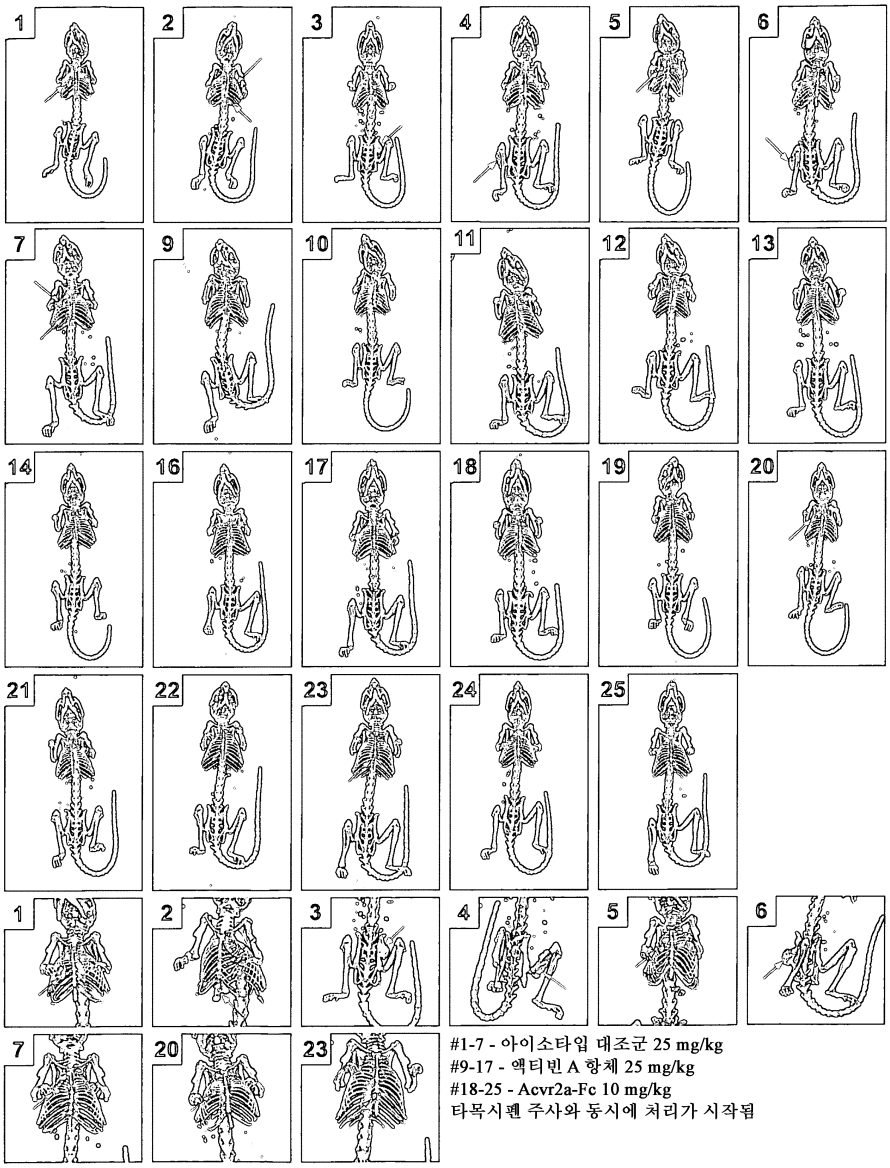
도면1



도면2

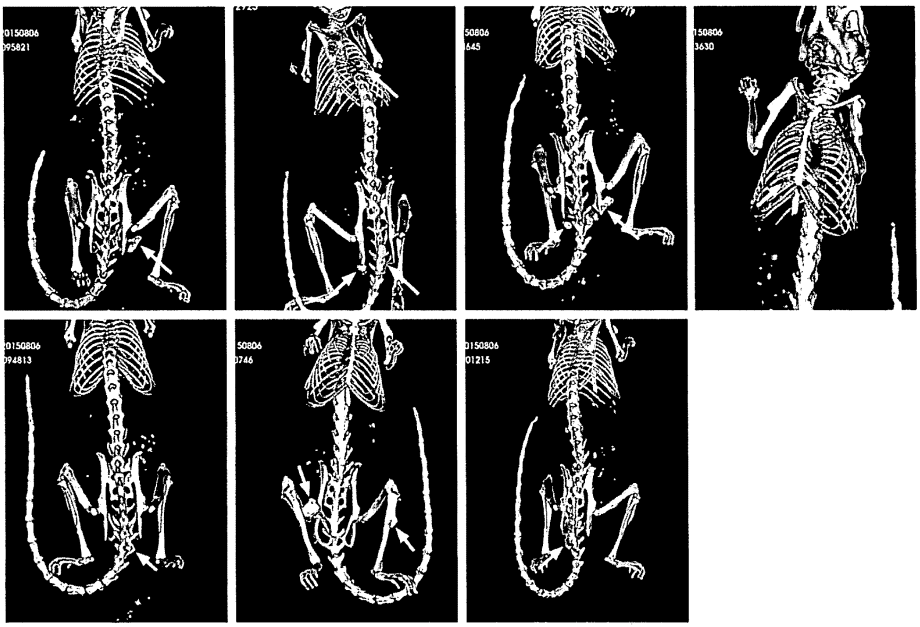


도면3

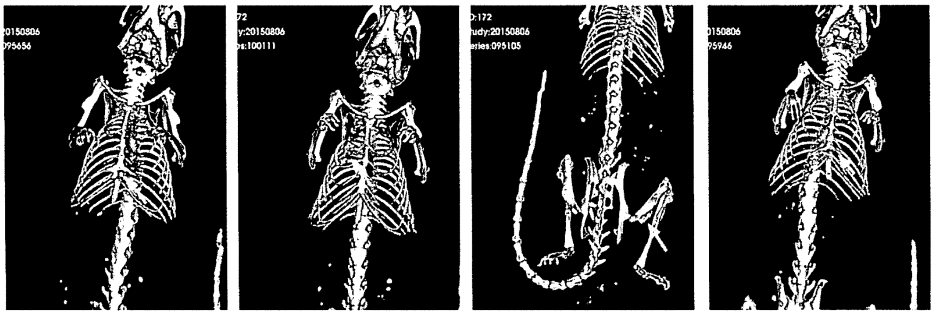

1
2
3
4
5
6
7
9
10
11
12
13
14
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
1
2
3
4
5
6
7
20
23
#1-7 - 아이소타입 대조군 25 mg/kg
#9-17 - 액티빈 A 항체 25 mg/kg
#18-25 - Acvr2a-Fc 10 mg/kg
타목시펜 주사와 동시에 처리가 시작됨

도면4

아이소타입 대조군

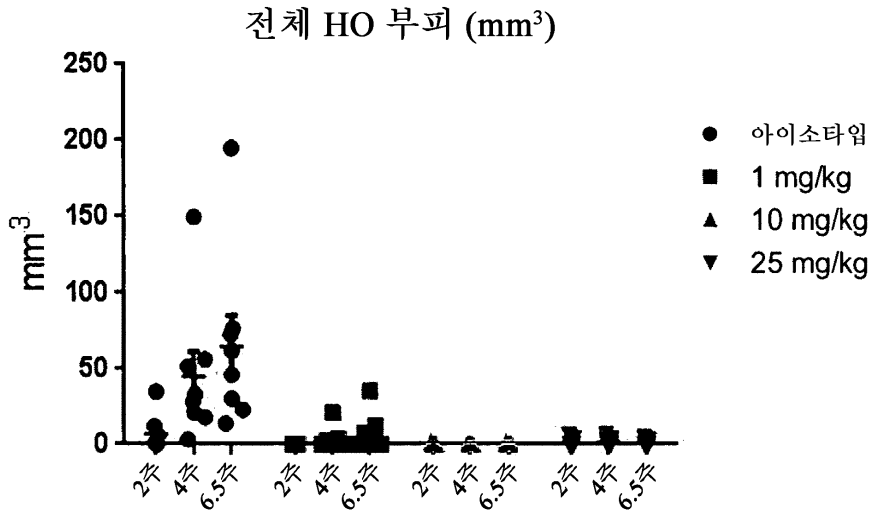


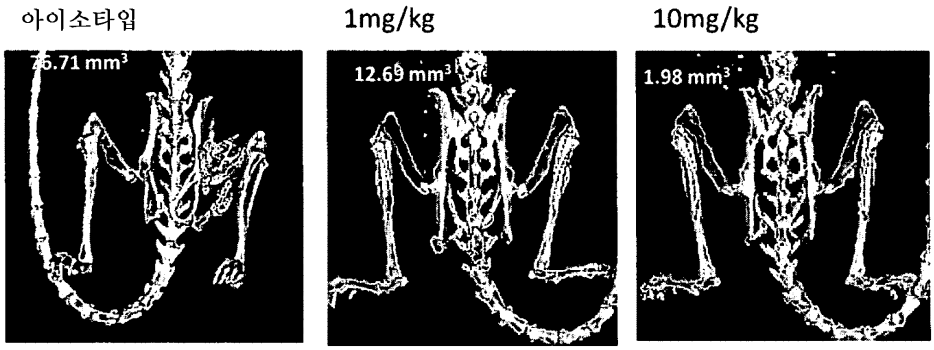
Acvr2a/Acvr2b 항체



액티빈 A 항체

도면5





서 열 목 록

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> Treatment Of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva

<130> 057766/469360

<140> PCT/US2015/000100

<141> 2015-09-14

<150> US 62/049,869

<151> 2014-09-12

<150> US 62/141,775

<151> 2015-04-01

<160> 24

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser His
20 25 30

Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Leu Tyr Thr Gly Gly Thr Ser Phe Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Ser Met Ser Val Gly Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Thr Gly Ile Ile Val Pro Gly Ser
100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 2

Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 3

Ile Leu Tyr Thr Gly Gly Thr

1 5

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 4

Ala Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Thr Gly Ile Ile Val Pro Gly

1 5 10 15

Ser Phe Asp Ile

20

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 6

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 7

Gly Ala Ser

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 8

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 9

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

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

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 10
Gly Phe Ala Phe Asp Asp Phe Ala
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 11
Ile Val Trp Asn Ser Gly Asp Ile
1 5

<210> 12
<211> 18
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 12

Val Lys Asp Met Val Arg Gly Leu Met Gly Phe Asn Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Val

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Arg Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 14

Gln Thr Ile Ser Thr Tyr

1 5

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 15

Asp Ala Ser

1

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 16

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr

1 5

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ser Tyr Glu Val Thr Gln Ala Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Ser Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Tyr Gly Val Asn Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Cys

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val

1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Leu Ser

1 5 10

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Trp Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Ser Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10