



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월12일
(11) 등록번호 10-2520970
(24) 등록일자 2023년04월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7044659(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년03월20일
심사청구일자 2022년12월20일
- (85) 번역문제출일자 2022년12월20일
- (65) 공개번호 10-2023-0004942
- (43) 공개일자 2023년01월06일
- (62) 원출원 특허 10-2016-7029253
원출원일자(국제) 2015년03월20일
심사청구일자 2020년03월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/021880
- (87) 국제공개번호 WO 2015/143403
국제공개일자 2015년09월24일
- (30) 우선권주장
61/969,073 2014년03월21일 미국(US)
62/021,923 2014년07월08일 미국(US)

- (73) 특허권자
악셀레론 파마 인코포레이티드
미국 02139 메사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128
- (72) 발명자
쿠마르, 라빈드라
미국, 메사추세츠 01720, 액톤, 알링턴 스트리트 421
수라가니, 나가 벤카타, 사이 라자세크하르
미국, 메사추세츠 02062, 노우드, 에이피티#05-201, 버크민스터 드라이브 301
크노프, 존
미국, 메사추세츠 01741, 카리슬, 로빈스 드라이브 147
- (74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 15 항

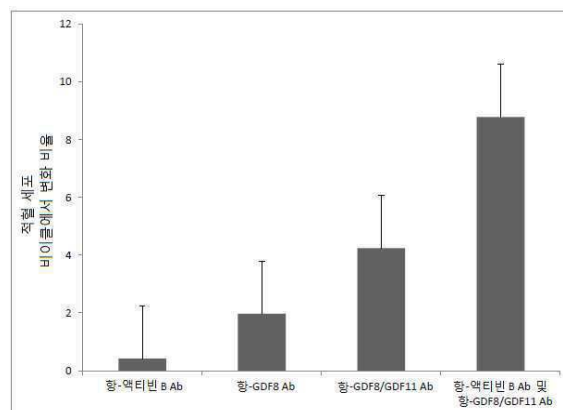
심사관 : 김혜민

(54) 발명의 명칭 액티빈 B 및/또는 GDF11을 억제함으로써 적혈 혈액 세포 수준을 증가시키고 비효율적인 적혈구 생성을 치료하는 방법

(57) 요약

특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 필요로 하는 대상에게서 적혈 세포 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 필요 대상은 예를 들면, 빈혈이 있는 대상, 그리고 비효율적 적혈구 생성 장애를 갖는 대상을 포함한다.

대표도 - 도30



(52) CPC특허분류

A61P 7/06 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상의 적혈 세포 수준을 증가시키는 방법에서 사용되는 약제의 제조에 사용하기 위한, 액티빈 B 및 GDF11을 저해하는 물질들의 조합을 포함하는 조성물로서, 상기 방법은 필요로 하는 대상에게 액티빈 B 및 GDF11을 저해하는 물질들의 조합을 유효량으로 투여하는 것을 포함하고, 상기 조합은 GDF11 및 GDF8에 결합하는 하나의 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 액티빈 B에 결합하는 하나의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 상기 물질들의 조합은 액티빈 A에 결합하지 않는, 조성물.

청구항 2

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 물질의 조합은 세포-기반 분석에서 액티빈 B 및 GDF11 신호전달을 저해시키는, 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 물질의 조합은 액티빈 A를 저해시키지 않는, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 물질의 조합은 세포-기반 분석에서 액티빈 A 신호전달을 저해시키지 않는, 조성물.

청구항 5

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 물질의 조합은 액티빈 C, 액티빈 E, GDF15, Nodal, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상을 추가로 저해하는 적어도 하나의 물질을 더 포함하는, 조성물.

청구항 6

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 물질의 조합은 액티빈 C, 액티빈 E, GDF15, Nodal, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 더 포함하는, 조성물.

청구항 7

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 키메라 항체 또는 이의 단편인, 조성물.

청구항 8

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화된 항체 또는 이의 단편인, 조성물.

청구항 9

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 항체 또는 이의 단편인, 조성물.

청구항 10

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 단일-쇄 항체인, 조성물.

청구항 11

청구항 10에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, 및 Fv에서 선택되는, 조성물.

청구항 12

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이형(heterologous) 모이어티를 포함하는, 조성물.

청구항 13

청구항 12에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 이형 모이어티는 당, 검출가능한 라벨, 또는 안정화 모이어티인, 조성물.

청구항 14

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 물질의 조합은 액티빈 C, 액티빈 E, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상을 추가로 저해하는, 조성물.

청구항 15

청구항 1에 따른 용도의 조성물에 있어서, 상기 물질 또는 물질의 조합은 Smad 2/3 신호전달을 저해하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원들에 대한 교차-참조**

[0002] 본 출원은 2014년 3월 21일자로 제출된 U.S. 가출원 일련 번호 No. 61/969,073 및 2014년 7월 8일자로 제출된 U.S. 가출원 일련 번호 62/021,923의 잇점을 청구한다. 상기 언급된 출원들의 모든 교시는 본 명세서의 참고자료에 편입된다.

배경 기술

[0003] 성숙 적혈 세포, 또는 적혈구는 척추동물의 순환계에서 산소 운반을 담당한다. 적혈구는 폐에서 상대적으로 높은 산소 부분압(pO₂)에서 산소에 결합하여, 상대적으로 낮은 pO₂를 가진 신체 부위로 산소를 운반하는 단백질인, 헤모글로빈을 고 농도로 보유한다.

[0004] 성숙 적혈 세포들은 적혈구생성으로 불리는 공정에서 다능성 조혈 줄기 세포에서 만들어진다. 출생후 적혈구생성은 골수 및 비장의 적색 속질(red pulp)에서 주로 일어난다. 다양한 신호생성 경로의 조직화된 작용(coordinated action)은 세포 증식, 분화, 생존, 및 사멸의 균형을 조절한다. 정상적인 조건하에서, 적혈 세포들은 신체에서 일정한 적혈구 양을 유지시키는 속도로 만들어지며, 증가된 또는 감소된 산소 장력 또는 조직 요구가 포함된 다양한 자극에 반응하여 생산은 증가되거나 또는 감소될 수 있다. 적혈구생성의 공정은 계통 연계된(committed) 전구 세포들의 형성으로 시작하여, 일련의 별개의 전구 세포 유형을 통하여 진행된다. 적혈구생성의 최종 단계는 망상적혈구가 혈류로 방출될 때 일어나며, 성숙 적혈 세포의 형태를 띠는 동안 미토콘드리아와 비로솜을 상실한다. 혈액에서 망상적혈구의 상승된 수준, 또는 망상적혈구:적혈구 비율의 상승은 증가된 적혈 세포 생산율을 나타낸다.

[0005] 에리트로포에틴 (EPO)은 척추동물에서 출생후 적혈구생성의 가장 중요한 양성 조절물질로 널리 인지되고 있다. EPO는 감소된 조직 산소 장력 (저산소증) 및 낮은 적혈 세포 수준 또는 낮은 헤모글로빈 수준에 대하여 상보적인 조혈성 반응을 조절한다. 인간에서, 상승된 EPO 수준은 골수 및 비장에서 적혈구의 선조들의 생성을 자극 시킴으로써, 적혈 세포 형성을 촉진시킨다. 마우스에서 EPO는 비장에서 주로 적혈구생성을 강화시킨다.

[0006] 사이토킨 수용체 슈퍼패밀리에 속하는 세포-표면 수용체에 의해 EPO의 효과가 증대된다. 인간 EPO 수용체 유전자는 483개의 아미노산 막경유 단백질을 인코딩하지만; 그러나, 활성 EPO 수용체는 리간드가 없을 때에도 다중 복합체로 존재하는 것으로 간주된다 [가령, U.S. 특허 6,319,499 참고]. 포유류 세포에서 발현된 클론된 전장(full)의 EPO 수용체는 적혈구의 선조 세포의 고유 수용체와 유사한 친화력으로 EPO에 결합한다. EPO가 이의

수용체에 결합함으로써 형태학적 변화가 야기되고, 이로써 수용체 활성화 그리고 미성숙 적혈모구의 증가된 증식, 미성숙 적혈모구의 증가된 분화, 및 적혈구의 선조 세포의 감소된 자가사멸이 포함된 생물학적 효과가 초래된다 [가령, Liboi *et al.* (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355 및 Koury *et al.* (1990) Science 248:378-381 참고].

[0007] 다양한 임상적 환경, 특히 빈혈의 치료에서 적혈 세포 수준을 증가시키기 위하여 의사는 다양한 형태의 제조합 EPO를 이용한다. 빈혈은 혈액에서 정상 수준의 헤모글로빈 또는 적혈 세포보다 낮은 수준에 의해 특징화되는 광범위하게-특정된 상태다. 일부 경우에 있어서, 적혈 세포의 생산 또는 생존에서 주요 장애(가령, 지중해빈혈 질환 또는 겸상적혈구 빈혈)로 인하여 빈혈이 발생된다. 더욱 흔하게, 빈혈은 다른 계통의 질환에 부차적이다 [가령, Weatherall & Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175 참고]. 빈혈은 적혈 세포 생산의 감소 또는 적혈 세포 파괴 속도의 증가 또는 출혈로 인하여 적혈 세포의 상실로 인하여 야기될 수 있다. 빈혈은 예를 들면, 급성 또는 만성 신부전 또는 말기 신장 질환, 화학요법 치료, 골수형성이상증후군, 류마티스관절염, 그리고 골수 이식을 포함하는 다양한 질환으로 인하여 발생할 수 있다.

[0008] EPO를 이용한 치료는 건강한 인간에서 전형적으로 수주일에 걸쳐 약 1-3 g/dL으로 헤모글로빈의 상승을 초래한다. 빈혈 개체에게 투여될 때, 이 치료 섭생은 대개 헤모글로빈과 적혈 세포 수준의 실질적인 증가를 제공하고, 삶의 질의 개선 및 생존의 연장으로 이어진다. 그러나, EPO가 균일하게 효과적이지 못하며, 많은 개체들은 높은 투여분량에서도 무반응이다 [가령, Horl *et al.* (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50 참고]. 예를 들면, 암 환자의 50% 이상은 EPO에 대하여 부적절한 반응을 가지며, 말기 신장 질환의 대략 10% 환자는 EPO에 대하여 저반응성이며 [가령, Glaspy *et al.* (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234 및 Demetri *et al.* (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425 참고], 그리고 골수형성이상증후군 환자의 10% 미만만이 EPO에 대하여 우호적으로 반응한다 [Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-670 참고]. 염증, 철 및 비타민 결핍, 불충분한 투석, 알루미늄 독성, 및 부갑상선항진을 포함하는 몇 가지 인자들에 의해 부진한 치료 반응을 예상할 수 있다. EPO에 대하여 저항적인 분자 기전은 아직 분명하지 않다. 최근 증거에서 높은 투여분량의 EPO는 심혈관 이환율, 종양 성장, 그리고 일부 환자군에서 치사율의 의 증가된 위험과 연합될 수 있다 [가령, Krapf *et al.* (2009) Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480 ? Glaspy (2009) Annu Rev Med 60:181-192 참고]. 따라서, EPO-기반의 치료 치료 화합물 (가령, 에리트로포에틴-자극 물질, ESAs)은 적혈 세포 수혈을 회피하기 위하여 요구되는 최저 투여분량에서 투여되어야 하는 것으로 권장되었다 [가령, Jelkmann *et al.* (2008) Crit Rev Oncol. Hematol 67:39-61 참고].

[0009] 비효과적 적혈구생성은 조기-단계 적혈구의 세포의 수 증가에도 불구하고, 적혈구 생산이 감소되는 적혈구 질환 집단을 설명하는데 이용되는 용어다 [가령, Tanno (2010) Adv Hematol 2010:358283 참고]. 비효과적 적혈구생성은 대개 빈혈, 상승된 에리트로포에틴 수준, 적혈 세포 전구물질의 과도한 수의 형성, 그리고 철 과부하 (overload)를 야기한다. 이들이 지속되는 경우, 이들 상태는 비장비대, 간 및 심장 장애, 그리고 골 손상 뿐만 아니라 기타 합병증으로 이어질 수 있다. 비효과적 적혈구생성이 있는 환자에서 내생성 에리트로포에틴 수준은 대개 상당히 높기 때문에, EPO-기반 치료는 이들 환자에서 빈혈을 대개 치료할 수 있을 것이며, 및/또는 이를 테면, 비장비대 및 철 과부하와 같은 질환의 다른 측면들의 악화를 야기할 수 있다.

[0010] 따라서, 본 명세서의 목적은 적혈 세포 수준을 증가시키고 및/또는 비효과적 적혈구생성과 관련한 다른 장애를 해결하기 위한 대체 방법을 제공하기 위한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] **본 발명의 요약**

[0012] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 대상에게서 적혈 세포 수준을 증가시키고, 빈혈을 치료 또는 예방하고, 및/또는 비효과적 적혈구생성을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 이를 필요로 하는 대상에게 최소한 액티빈 B 및/또는 GDF11을 길항(저해)하는 효과량의 물질 또는 물질의 조합을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 B를 저해시키는 물질 또는 물질의 조합은 ActRIIB에 결합하고 Smad 2/3를 통하여 신호를 생성시키는 하나 또는 그 이상의 추가 리간드를 더 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11을 저해시키는 물질 또는 물질의 조합은 ActRIIB에 결합하고 Smad 2/3를 통하여 신호를 생성시키는 하나 또는 그 이상의 추가 리간드를 더 저해한다. 예를 들면, 액티빈 B 및/또는 GDF11을 저해시키는 물질 또는 물질의 조합은 GDF8을 더 저해할 것이다. 임의선택적으로, 액티빈 B 및/또는 GDF11을 저해시키는 물질 또는 물질의 조합은 액

티빈 A를 저해하지는 않는다. 특정 구체예들에 있어서, 액티빈 B 및/또는 GDF11을 저해시키는 물질 또는 물질의 조합은 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 E, 액티빈 C, 및 BMP6중 하나 또는 그 이상을 더 저해한다. 특정 구체예들에 있어서, 물질 또는 물질의 조합은 GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, 및 BMP3B중 하나 또는 그 이상을 더 저해할 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 액티빈 B 및/또는 GDF11을 저해시키는 물질 또는 물질의 조합은 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB)와 상호작용하는 것을 더 방해하거나 및/또는 BMP10이 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB)와 상호작용하는 것을 더 방해한다. 바람직하게는, 본 명세서의 방법에 따라 이용되는 물질 또는 물질의 조합은 BMP9와 ALK1 사이 및/또는 BMP10과 ALK1 사이의 상호작용(가령, 결합, Smad 2/3 신호생성, 등의 활성화)을 방해하거나 또는 실질적으로 방해하지 않는다. 저해는 당업계에서 공지된 다양한 생화학적 분석 및 본 명세서에서 제공되는 분석들 (가령, 단백질-기반의 분석, 세포-기반의 분석, 등등)에 의해 평가될 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 일부 구체예들에 있어서, 물질 또는 물질의 조합은 세포-기반의 분석에서 최소한 액티빈 B 및/또는 GDF11 신호생성 (Smad 2/3 신호생성)을 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질 또는 물질의 조합은 액티빈 B 및/또는 GDF11에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질 또는 물질의 조합은 세포-기반의 분석에서 실질적으로 액티빈 A 신호생성을 방해하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 물질 또는 물질의 조합은 실질적으로 액티빈 A에 결합하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 세포-기반의 분석에서 GDF11 및/또는 액티빈 B 신호생성을 저해시키는 물질 또는 물질의 조합은 세포-기반의 분석에서 GDF8, BMP6, 액티빈 C, 액티빈 A, 액티빈 E, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10 신호생성중 하나 또는 그 이상을 더 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B에 결합하는 물질 또는 물질의 조합은 GDF8, BMP6, 액티빈 C, 액티빈 A, 액티빈 E, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상에 더 결합한다.
- [0014] 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 최소한 GDF11 및 액티빈 B에 결합 및/또는 저해하는 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체들의 조합은 실질적으로 액티빈 A에 결합하거나 및/또는 저해하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체들의 조합은 GDF8에 결합 및/또는 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B에 결합하는 및/또는 방해하는 상기 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체들의 조합은 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF8, ActRIIA, ActRIIB, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상에 더 결합하거나 및/또는 더 저해한다.
- [0015] 일부 구체예들에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 이중특이적 항체, 또는 이중특이적 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 이중특이적 항체, 또는 이중특이적 항체들의 조합은 최소한 GDF11 및 액티빈 B에 결합하는 및/또는 방해한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 이중특이적 항체, 또는 이중특이적 항체들의 조합은 실질적으로 액티빈 A에 결합하거나 및/또는 방해하지 않는다.
- [0016] 일부 구체예들에 있어서, 이중특이적 항체는 서로 연합된 상이한 2개의 단일특이적 항체들을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체는 인간화된 항체다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체는 인간 항체다.
- [0017] 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체는 단일-쇄 항체다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체는 F(ab')₂ 단편이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체는 단일-쇄 디아바디(diabody), 텐덤(tandem) 단일-쇄 Fv 단편, 텐덤 단일-쇄 디아바디, 또는 단일-쇄 디아바디와 면역글로블린 중쇄 불변 영역의 최소한 일부분을 포함하는 융합 단백질이다.
- [0018] 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체는 이중 가변-도메인 면역글로블린이다.
- [0019] 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체는 이종성(heterologous) 모이어티(moiety)를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 이종성 모이어티는 슈가, 탐지가능한 라벨, 또는 안정화 모이어티다.
- [0020] 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11/액티빈 B 트랩이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 액티빈 A에 실질적으로 결합하거나 및/또는 저해하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 A 트랩은 서열 번호:1의 위치 79에 대응하는 위치에서 산성 아미노산을 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:129-109에 대하여 최소한 80% (가령

최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11/액티빈 B 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 100 pM 미만, 10pM 미만, 또는 1pM 미만의 K_D 로 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 1 nM-750 pM, 750 pM-500 pM, 500 pM-250 pM, 250pM-100 pM, 100 pM - 50 pM, 50-25 pM, 25-10 pM, 또는 10-1 pM의 K_D 로 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11/액티빈 B 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 GDF11에 대하여 ActRIIB 수용체의 야생형 리간드 결합 도메인의 결합 친화력보다 3-배 더 높은, 4-배 더 높은, 5-배 더 높은, 6-배 더 높은, 7-배 더 높은, 8-배 더 높은, 9-배 더 높은, 10-배 더 높은, 15-배 더 높은, 또는 20-배 더 높은 결합 친화력을 가진다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11/액티빈 B 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 액티빈 B에 대하여 ActRIIB 수용체의 야생형 리간드 결합 도메인의 결합 친화력보다 3-배 미만의, 4-배 더 높은, 5-배 더 높은, 6-배 더 높은, 7-배 더 높은, 8-배 더 높은, 9-배 더 높은, 10-배 더 높은, 15-배 더 높은, 또는 20-배 더 높은 결합 친화력을 가진다.

- [0021] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:1의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호: 3 또는 4의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호: 5 또는 6의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0022] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:23의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0023] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:48의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0024] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:49의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0025] 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11/액티빈 B 트랩이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11/액티빈 B 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11/액티빈 트랩은 GDF11에 대하여 ActRIIA 수용체의 야생형 리간드 결합-도메인의 결합 친화력보다 3-배 더 높은, 4-배 더 높은, 5-배 더 높은, 6-배 더 높은, 7-배 더 높은, 8-배 더 높은, 9-배 더 높은, 10-배 더 높은, 15-배 더 높은, 또는 20-배 더 높은 결합 친화력을 가진다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11/액티빈 B 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 액티빈 B에 대하여 ActRIIA 수용체의 야생형 리간드 결합-도메인의 결합 친화력보다 3-배 더 높은, 4-배 더 높은, 5-배 더 높은, 6-배 더 높은, 7-배 더 높은, 8-배 더 높은, 9-배 더 높은, 10-배 더 높은, 15-배 더 높은, 또는 20-배 더 높은 결합 친화력을 가진다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 대하여 최소한 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0026] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:10의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0027] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:10의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0028] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:20의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

- [0029] 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 본 명세서에서 공개된 GDF11, 액티빈 B과 GDF11/액티빈 B 트랩중 임의의 하나, 또는 이의 조합일 수 있다.
- [0030] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드 도메인에 추가하여, 다 음중 하나 또는 그 이상을 강화시키는 하나 또는 그 이상의 이중성 폴리펩티드 도메인을 포함하는 융합 단백질 이다: *생체내* 반감기, *시험관내* 반감기, 취입/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체들의 형성, 융합 단 백질의 다중화 및/또는 정제. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩 융합 단백질은 면역글로블린 Fc 도메인 및 혈청 알부민으로부터 선택된 이중성 폴리펩티드 도메인을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상 기 면역글로블린 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 면역글로블린 Fc 도메인은 서열 번호: 16 또는 17에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 융합 단백질은 상기 트랩 폴리펩티드 도메인과 상기 면역글로블린 Fc 도메인 사이에 위치한 링커 도메인을 더 포함한다. 일부 구체 예들에 있어서, 상기 링커 도메인은 TGGG 링커 (서열 번호: 45)다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 링커 도메인 은 본 명세서에서 공개된 임의의 링커 도메인일 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 융합 단백질은 정제 준서열, 이를 테면 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열, 및 GST 융합을 포함할 수 있다. 특정 구체 예들에 있어서, GDF11/액티빈 B 트랩 융합은 리더(leader) 서열을 포함할 수 있다. 상기 리더 서열은 고유의 (native) 리더 서열 또는 이중성 리더 서열일 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 상기 리더 서열은 조직 플라 스미노겐 활성화제 (TPA) 리더 서열이다. 한 구체예에서, GDF11/액티빈 B 트랩 융합 단백질은 구성 A-B-C로 제시 된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 B 부분은 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩이다. 상기 A 부분과 C 부분은 독립적으로 0일 수 있고, 하나 또는 하나 이상의 아미노산일 수 있거나, A 부분과 C 부분은 둘다 B에 대하여 이 중성이다. 상기 A 부분 및/또는 C 부분은 링커 서열을 통하여 상기 B 부분에 부착될 수 있다. 일부 구체예들 에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩 융합 단백질은 본 명세서에서 공개된 임의의 융합 단백질을 포함할 수 있 다.
- [0031] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 글리코실화된 아미노산, 폐길화된(PEGylated) 아미노산, 파르네실화된(farnesylated) 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 바이오틴화된 아미노산, 지질 모이머에 접합 된 아미노산, 유기 유도화 물질에 접합된 아미노산으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함 한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 글리코실화되며, 포유류 글리코실화 패턴을 갖는 다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 중국 햄스터 난소 세포 계통으로부터 획득가능한 글 리코실화 패턴을 갖는다. 일반적으로, GDF 트랩은 환자에게서 유익하지 못한 면역 반응의 가능성을 감소시키기 위하여 GDF 트랩의 적절한 천연 글리코실화를 중재하는 포유류 세포 계통에서 발현되는 것이 바람직하다. 인간 및 CHO 세포 계통들이 성공적으로 이용되어 왔으며, 다른 흔한 포유류 발현 벡터들이 유용할 것이라고 예상된다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 본 명세서에서 공개된 임의의 아미노산 변형, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.
- [0032] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 가용성 GDF 트랩 폴리펩티드, 이를 테면 상기에서 설명된 것과 같은 것들에 대한 코딩 서열 을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 공개된 핵산은 발현용 프로모터에 작동가능하도록 연계될 수 있으며, 본 명 세서는 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드들에 의해 형질변형된 세포를 제공한다. 바람직하게는 상기 세포는 포 유류 세포, 이를 테면 CHO 세포이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 숙주 세포는 이러한 목적을 위하여 본 명 세서에서 공개된 임의의 세포들로부터 선택될 수 있다.
- [0033] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드를 만드는 방법들을 제공한다. 이러한 방법 은 적절한 세포, 이를 테면 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 본 명세서에서 공개된 임의의 핵산을 발현시키는 것 을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 다음을 포함할 수 있다: a) GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드의 발현에 적 합한 조건하에 세포를 배양하고, 여기에서 전술한 세포는 GDF11/액티빈 B 트랩 발현 구조체로 형질변환되며; 그 리고 b) 그렇게 발현된 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드를 회수한다. 세포 배양물로부터 단백질을 회수하기 위 한 잘-알려진 기술중 임의의 것을 이용하여 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드는 미정제, 부분적으로 정제된 또는 매우 정제된 분획물로서 회수될 수 있다.
- [0034] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 대상에서 적혈 세포 수준을 증가시키는 또는 빈혈을 치료 또는 예방하는 방 법을 제공하는데, 이 방법은 이를 필요로 하는 대상에게 액티빈 B 및 GDF11의 신호생성을 저해하는 물질들의 조 합의 효과량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 세포 기반 분석에서 물질들의 조합은 액티빈 B 및 GDF11 신호생성을 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 실질적으로 액티빈 A 신호생성을 저해하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 세포 기반 분석에서 물질들의 조합은 실질적으로 액티빈 A 신호생

성을 저해하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 실질적으로 액티빈 A에 결합하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B를 저해하는 하나 또는 그 이상의 물질은 GDF8, BMP6, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상의 신호생성을 더 저해한다.

[0035] 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 GDF11에 결합하는 항체 또는 또는 이의 항원-결합 단편중 최소한 하나의 물질을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 액티빈 B에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편인 최소한 하나의 물질을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 본 명세서에서 공개된 2개 또는 그 이상의 표적에 대항하는 2개 또는 그 이상의 항체 또는 항원-결합 단편들의 조합을 포함한다 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10).

[0036] 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 키메라 항체 또는 이의 단편이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화된 항체 또는 이의 단편이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 항체 또는 이의 단편이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 단일-쇄 항체이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항원-결합 단편은 다음으로 구성된 집단에서 선택된다: Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, Fv, 도메인 항체. 일부 구체예들에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이중성 모이어티를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 이중성 모이어티는 슈가, 탐지가능한 라벨, 또는 안정화 모이어티다.

[0037] 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 GDF11 트랩인 최소한 하나의 물질을 포함하고, 여기에서 상기 GDF11 트랩은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 액티빈 B 트랩인 최소한 하나의 물질을 포함하고, 여기에서 상기 액티빈 B 트랩은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0038] 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 최소한 한 가지 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩을 포함하고, 여기에서 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호:1의 위치 79에 대응하는 위치에서 산성 아미노산을 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%)인 아미노산 서열을 포함하는 GDF11 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11은 100 pM 미만, 10pM 미만, 또는 1pM 미만의 K_D로 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩은 1 nM-750 pM, 750 pM-500 pM, 500 pM-250 pM, 250pM-100 pM, 100 pM - 50 pM, 50-25 pM, 25-10 pM, 또는 10-1 pM의 K_D로 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11 트랩은 GDF11에 대하여 ActRIIB 수용체의 야생형 리간드 결합 도메인의 결합 친화력보다 3-배 더 높은, 4-배 더 높은, 5-배 더 높은, 6-배 더 높은, 7-배 더 높은, 8-배 더 높은, 9-배 더 높은, 10-배 더 높은, 15-배 더 높은, 또는 20-배 더 높은 결합 친화력을 가진다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 액티빈 B 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11 트랩은 트랩은 액티빈 B에 대하여 ActRIIB 수용체의 야생형 리간드 결합 도메인의 결합 친화력보다 3-배 높은, 4-배 더 높은, 5-배 더 높은, 6-배 더 높은, 7-배 더 높은, 8-배 더 높은, 9-배 더 높은, 10-배 더 높은, 15-배 더 높은, 또는 20-배 더 높은 결합 친화력을 가진다.

[0039] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호:1의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 3 또는 4의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 3 또는 4의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

- [0040] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 23의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0041] 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 GDF11 트랩인 최소한 하나의 물질을 포함하고, 여기에서 상기 GDF11 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 액티빈 B 트랩인 최소한 하나의 물질을 포함하고, 여기에서 상기 액티빈 B 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 대하여 최소한 80% (가령 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 GDF11 트랩이며, 여기에서 상기 GDF11 트랩은 GDF11에 대하여 ActRIIA 수용체의 야생형 리간드 결합-도메인의 결합 친화력보다 3-배 더 높은, 4-배 더 높은, 5-배 더 높은, 6-배 더 높은, 7-배 더 높은, 8-배 더 높은, 9-배 더 높은, 10-배 더 높은, 15-배 더 높은, 또는 20-배 더 높은 결합 친화력을 가진다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 물질은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 대하여 최소한 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 액티빈 B 트랩이며, 여기에서 상기 액티빈 B 트랩은 액티빈 B에 대하여 ActRIIA 수용체의 야생형 리간드 결합-도메인의 결합 친화력보다 3-배 더 높은, 4-배 더 높은, 5-배 더 높은, 6-배 더 높은, 7-배 더 높은, 8-배 더 높은, 9-배 더 높은, 10-배 더 높은, 15-배 더 높은, 또는 20-배 더 높은 결합 친화력을 가진다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 대하여 최소한 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0042] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 10의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0043] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 11의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0044] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 20의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0045] 일부 구체예들에 있어서, 상기 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 폴리펩티드 도메인에 추가하여, 다음중 하나 또는 그 이상을 강화시키는 하나 또는 그 이상의 이종성 폴리펩티드 도메인을 포함하는 융합 단백질이다: 생체내 반감기, 시험관내 반감기, 취입/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체들의 형성, 융합 단백질의 다중화 및/또는 정제. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 융합 단백질은 면역글로블린 Fc 도메인 및 혈청 알부민으로부터 선택된 이종성 폴리펩티드 도메인을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 면역글로블린 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 면역글로블린 Fc 도메인은 서열 번호: 16 또는 17에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 융합 단백질은 상기 트랩 폴리펩티드 도메인과 상기 면역글로블린 Fc 도메인 사이에 위치한 링커 도메인을 더 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 링커 도메인은 TGGG 링커다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 링커 도메인은 본 명세서에서 공개된 임의의 링커 도메인일 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 융합 단백질은 정제 준서열, 이를 테면 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열, 및 GST 융합을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, a GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 융합은 리더 서열을 포함한다. 상기 리더 서열은 고유의(native) 리더 서열 또는 이종성 리더 서열일 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 상기 리더 서열은 조직 플라즈미노겐 활성화제 (TPA) 리더 서열이다. 한 구체예에서, GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 융합 단백질은 구성 A-B-C로 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 B 부분은 본 명세서의 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩이다. 상기 A 부분과 C 부분은 독립적으로 0일 수 있고, 하나 또는 하나 이상의 아미노산일 수 있거나, A 부분과 C 부분은 둘다 B에 대하여 이종성이다. 상기 A 부분 및/또는 C 부분은 링커 서열을 통하여 상기 B 부분에 부착될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 융합 단백질은 본 명세서에서 공개된 임의의 융합 단백질을 포함할 수 있다.
- [0046] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 글리코실화된 아미노산, 폐길화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 바이오티닐화된 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 유기 유도화 물질에 접합된 아미노산으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 글리코실화되며, 포유류 글리코실화 패턴을 갖는다. 일

부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 중국 햄스터 난소 세포 계통으로부터 획득가능한 글리코실화 패턴을 갖는다. 일반적으로, GDF11 트랩은 환자에게서 유익하지 못한 면역 반응의 가능성을 감소시키기 위하여 GDF11 트랩의 적절한 천연 글리코실화를 중재하는 포유류 세포 계통에서 발견되는 것이 바람직하다. 인간 및 CHO 세포 계통들이 성공적으로 이용되어 왔으며, 다른 혼한 포유류 발현 벡터들이 유용할 것이라고 예상된다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩은 본 명세서에서 공개된 임의의 아미노산 변형, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0047] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 이를 테면 상기에서 설명된 것과 가용성 GDF11 트랩 폴리펩티드 또는 액티빈 B 트랩 폴리펩티드들에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 공개된 핵산은 발현용 프로모터에 작동가능하도록 연계될 수 있으며, 본 명세서는 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드들에 의해 형질변형된 세포를 제공한다. 바람직하게는 상기 세포는 포유류 세포, 이를 테면 CHO 세포이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 숙주 세포는 이러한 목적을 위하여 본 명세서에서 공개된 임의의 세포들로부터 선택될 수 있다.

[0048] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 폴리펩티드를 만드는 방법들을 제공한다. 이러한 방법은 적절한 세포, 이를 테면 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 본 명세서에서 공개된 임의의 핵산을 발현시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 다음을 포함할 수 있다: a) 상기 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 세포를 배양하고, 여기에서 전술한 세포는 GDF11 트랩 또는 액티빈 B 트랩 발현 구조체로 형질변환되며; 그리고 b) 그렇게 발현된 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드를 회수한다. 세포 배양물로부터 단백질을 회수하기 위한 잘-알려진 기술중 임의의 것을 이용하여 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드는 미정제, 부분적으로 정제된 또는 매우 정제된 분획물로서 회수될 수 있다.

[0049] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 공개된 상기 GDF11, 액티빈 B 및 GDF11/액티빈 B 트랩중 2개 또는 그 이상이 복합될 수 있다.

[0050] 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제는 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 액티빈 B의 작은-분자 길항제인 최소한 한 가지 물질을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 GDF11의 작은-분자 길항제인 최소한 한 가지 물질을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 및/또는 액티빈 B 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제들의 조합은 액티빈 A에 결합하거나 및/또는 저해하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 및/또는 액티빈 B 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제들의 조합은 GDF8에 더 결합하거나 및/또는 GDF8를 더 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 및/또는 액티빈 B 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제들의 조합은 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3 및 BMP10중 하나 또는 그 이상에 더 결합하거나 및/또는 더 저해한다.

[0051] 또다른 측면에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질, 또는 물질의 조합은 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B를 저해하는 폴리뉴클레오티드 길항제이다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 길항제 폴리뉴클레오티드는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B의 발현(가령, 전사, 해독, 및/또는 세포성 배출)을 억제한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제의 조합은 액티빈 A를 저해하지 않는다(가령 액티빈 A의 발현 및/또는 활성을 저해한다). 임의선택적으로, 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제의 조합은 GDF8을 더 저해한다(가령 GDF8의 발현 및/또는 활성을 저해한다). 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B(가령 GDF11 및/또는 액티빈 B의 발현 및/또는 활성)을 저해하는 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제의 조합은 액티빈 E, 액티빈 C, 액티빈 A, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, 및 BMP3B중 하나 또는 그 이상을 더 저해한다(가령, 발현 및/또는 활성을 저해한다).

[0052] 일부 구체예들에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, 및 GDF8, 액티빈 A, GDF15, GDF3, Nodal, BMP3, 및 BMP3B로부터 선택된 유전자의 전사체에 혼성화되어, 이 유전자의 발현을 저해시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 액티빈 B의 전사체에 혼성화되어, 액티빈 B 발현의 발현을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 GDF11의 전사체에 혼성화되어, GDF11 발현을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 본 명세서의 2개 또는 그 이상의 표적(가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, 및 BMP3B)발현을 저해하는 2개 또는 그 이상의 안티센스 올리고뉴클레오티드의 조합을 포함한다.

[0053] 일부 구체예들에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF11, GDF8, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, 및 BMP3B로부터 선택된 유전자의 전사체를 표적으로 하는 RNAi 분자를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 GDF11의 전사체를 표적으로 하는 RNAi 분자를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 액티빈 B의 전사체를 표적으로 하는 RNAi 분자를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 물질들의 조합은 본 명세서의 2개 또는 그 이상의 표적(가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, 및 BMP3B)의 발현을 저해하는 2개 또는 그 이상의 RNAi 분자의 조합을 포함한다.

[0054] 일부 구체예들에 있어서, 상기 RNAi 분자는 siRNA를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 siRNA의 길이는 약 19 내지 약 45개 뉴클레오티드이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 siRNA의 길이는 약 25 내지 약 30개 뉴클레오티드이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 siRNA의 길이는 약 10 내지 약 20개 뉴클레오티드이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 RNAi 분자는 shRNA를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 shRNA 분자는 19-29개 뉴클레오티드의 줄기(stem) 길이를 갖는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 shRNA 분자는 19-23개 뉴클레오티드의 줄기 길이를 갖는다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 shRNA의 루프 영역은 5-9개의 뉴클레오티드 길이를 갖는다.

발명의 효과

[0055] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 공개된 임의의 GDF11 길항제(가령, GDF11 트랩 폴리펩티드, 항-GDF11 항체, 작은-분자 길항제, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 길항제)는 본 명세서의 액티빈 B 길항제(가령, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드, 항-액티빈 B 항체, 작은-분자 길항제, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 길항제)와 복합되어 GDF11 및 액티빈 B 모두의 활성을 저해할 수 있다(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 활성화시키는 능력).

[0056] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 방법은 이를 필요로 하는 대상에게 적혈 세포를 증가시키기 위한 것이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상에게 빈혈을 치료 또는 예방하기 위한 것이다. 일부 구체예들에 있어서, 빈혈은 다발 골수종, 만성 또는 급성 신장 질환 또는 부전, 대상의 화학요법치료, 골수 형성이상증후군, 및 지중해빈혈중 하나 또는 그 이상과 연관된다. 일부 구체예들에 있어서, 지중해빈혈은 베타-지중해빈혈이다. 일부 구체예들에 있어서, 신부전은 말기 신부전이다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 대상은 겸상적혈구 빈혈을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0057] 특허 또는 출원은 칼리로 실행된 최소 한 장의 도면을 포함한다. 특허 또는 출원의 칼리 도면들과 본 출원 공개 사본은 요청에 의해 필요 경비와 함께 특허청에 제공될 것이다.

도 1은 상자로 표시된 직접적 접촉 리간드(리간드 결합 주머니)에 대한 ActRIIB 및 ActRIIA의 다중 결정 구조의 복합 분석에 기초하여 본 명세서에서 유추된 잔기들을 갖는, 인간 ActRIIA(서열 번호: 36) 및 인간 ActRIIB(서열 번호: 46)의 세포의 도메인을 배열한 것을 나타낸다.

도 2는 다양한 척추동물 ActRIIB 단백질 및 인간 ActRIIA(서열 번호: 37-44)의 다중 서열 배열을 나타낸다.

도 3a 및 3b는 인간 GDF11 cDNA 서열(NCBI Reference Sequence No. NM_005811.3)(서열 번호: 24)을 나타낸다.

도 4는 인간 GDF11 전구(precursor) 단백질 서열(NCBI Reference Sequence No. NP_005802.1)의 아미노산 서열(서열 번호: 25)을 나타낸다.

도 5a 및 5b는 인간 액티빈 B cDNA 서열(NCBI Reference Sequence No. NM_002193.2)(서열 번호: 26)을 나타낸다.

도 6은 인간 액티빈 B 전구 단백질(NCBI Reference Sequence No. NP_002184.2)의 아미노산 서열(서열 번호: 27)을 나타낸다.

도 7은 인간 액티빈 E cDNA 서열(GenBank Accession No. NM_031479.3)(서열 번호: 28)을 나타낸다.

도 8은 인간 액티빈 E 전구 단백질(GenBank Accession No. NP_113667.1)아미노산 서열(서열 번호: 29)을 나타낸다.

도 9a 및 9b는 인간 액티빈 C cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_005538.3) (서열 번호: 30)을 나타낸다.

도 10은 인간 액티빈 C 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_005529.1)의 아미노산 서열 (서열 번호: 31)을 나타낸다.

도 11은 인간 GDF8 cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_005259.2) (서열 번호: 32)을 나타낸다.

도 12는 인간 GDF8 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_005250.1)의 아미노산 서열 (서열 번호: 33)을 나타낸다.

도 13은 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 때, 다양한 ActRII 리간드 (GDF11, GDF8, 액티빈 A, 액티빈 B, BMP10, BMP6, 및 BMP9)에 대하여 특징화된 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc의 리간드 결합 프로파일(가령, U.S. 특허: 8,058,229 참고)을 나타낸다.

도 14는 인간 BMP6 cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_001718.4) (서열 번호: 34)을 나타낸다.

도 15는 인간 BMP6 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_001709.1)의 아미노산 서열 (서열 번호: 35)을 나타낸다.

도 16은 인간 GDF15 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_004855.2)의 아미노산 서열 (서열 번호: 50)을 나타낸다.

도 17은 인간 GDF15 cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_004864.2) (서열 번호: 51)을 나타낸다.

도 18은 인간 Nodal 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_060525.3)의 아미노산 서열 (서열 번호: 52)을 나타낸다.

도 19는 인간 Nodal cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_018055.4) (서열 번호: 53)을 나타낸다.

도 20은 인간 GDF3 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_065685.1)의 아미노산 서열 (서열 번호: 54)을 나타낸다.

도 21은 인간 GDF3 cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_020634.1) (서열 번호: 55)을 나타낸다.

도 22는 인간 BMP3 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_001192.2)의 아미노산 서열 (서열 번호: 56)을 나타낸다.

도 23a 및 23b는 인간 BMP3 cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_001201.2) (서열 번호: 57)을 나타낸다.

도 24는 인간 BMP3B 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_004953.1)의 아미노산 서열 (서열 번호: 58)을 나타낸다.

도 25는 인간 BMP3B cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_004962.3) (서열 번호: 59)을 나타낸다.

도 26은 인간 BMP9 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_057288.1)의 아미노산 서열 (서열 번호: 60)을 나타낸다.

도 27은 인간 BMP9 cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_016204.2) (서열 번호: 61)을 나타낸다.

도 28은 인간 BMP10 전구 단백질 (NCBI Reference Sequence No. NP_055297.1)의 아미노산 서열 (서열 번호: 62)을 나타낸다.

도 29는 인간 BMP10 cDNA 서열 (NCBI Reference Sequence No. NM_014482.1) (서열 번호: 63)을 나타낸다.

도 30은 항-액티빈 B 항체 (Ab), 항-GDF8 Ab, 이중특이적 항-GDF8/GDF11 Ab, 또는 항-액티빈 B Ab와 이중특이적 항-GDF8/GDF11 Ab의 조합의 치료에 의해 C57BL6 마우스 (한 집단에서 n = 5마리 마우스)의 적혈 세포 수준에 있어서 치료 효과를 나타낸다. 비이칼 (PBS) 처리된 대상에서 관찰된 것과 비교하여 적혈 세포 수준의 증가 백분율로 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] **발명의 상세한 설명**

[0059] 1. 개요

[0060] 형질변환 성장 인자-베타 (TGF-β) 슈퍼패밀리는 공통 서열 요소들과 구조적 모티프들을 공유하는 다양한 성장 인자들을 포함한다. 이들 단백질은 척추동물들과 무척추동물들에서 상당한 세포 유형에 생물학적 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 슈퍼패밀리의 구성원들은 패턴 형성 및 조직 사양에 있어서 배 발생 동안 중요한 기능을 실행하며, 지방형성, 골형성, 연골형성, 심장발생, 혈액생성, 신경발생 및 상피 세포 분화를 포함하는 다양한 분화 과정에 영향을 줄 수 있다. TGF-β 패밀리의 구성원의 활성을 조절함으로써, 유기체에서 상당한 생리학적 변화를 야기할 수 있는 가능성이 있다. 예를 들면, Piedmontese 및 Belgian Blue 소 품종은 GDF8 (또한 미오스테틴으로 불림) 유전자에서 근육량에 상당한 증가를 야기시키는 기능상실 돌연변이를 휴대하고 있다 [가령, Grobet *et al.* (1997) *Nat* 유전자t. 17(1):71-4 참고]. 더욱이, 인간에서 GDF8의 비활성 대립유전자는 증가된 근육량 및 보기에 따르면 예외적 강도와 관련된다 [가령, Schuelke *et al.* (2004) *N Engl J Med*, 350:2682-8 참고].

[0061] TGF-β 신호는 리간드 자극시 하류 Smad 단백질들 (가령, Smad 단백질 1, 2, 3, 5, 및 8)을 인산화시키고, 활성화시키는 유형 I 및 유형 II 세린/트레오닌 키나제 수용체의 이량체 복합체들에 의해 중재된다 [가령, Massague (2000) *Nat. Rev. Mol. 세포 Biol.* 1:169-178]. 이들 유형 I 및 유형 II 수용체들은 시스테인-풍부 영역을 갖는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 그리고 예상된 세린/트레오닌 특이성을 가진 세포질 도메인으로 구성된 막경유 단백질들이다. 유형 I 수용체는 신호생성을 위하여 필수적이다. 유형 II 수용체는 결합 리간드에 결합에 요구되며, 유형 I 수용체의 발현에 요구된다. 유형 I 및 II 액티빈 수용체들은 리간드 결합 후에 안정적인 복합체를 형성하여, 유형 II 수용체에 의한 유형 I 수용체의 인산화를 초래한다.

[0062] 액티빈은 TGF-β 슈퍼패밀리에 속하는 이량체 폴리펩티드 성장 인자들이다. 밀접하게 관련된 2개의 β 하위단위 3가지 주요 액티빈 형태(A, B, 및 AB)의 동종/이종이량체가 있다 (차례로 β_{ABA}, β_{BβB}, 및 β_{ABB}). 인간 게놈은 간에서 주로 발현되는 액티빈 C 및 액티빈 E를 또한 인코딩하고, β_C 또는 β_E를 포함하는 이종이량체 또한 공지되어 있다.

[0063] 액티빈의 관련된 2개의 유형 II 수용체, ActRIIA (*ACVR2A* 유전자에 의해 인코딩됨) 및 ActRIIB (*ACVR2B* 유전자에 의해 인코딩됨)가 확인되었다 [가령, Mathews and Vale (1991) *Cell* 65:973-982; 및 Attisano *et al.* (1992) *Cell* 68: 97-108]. 액티빈이외에, ActRIIA 및 ActRIIB는 몇 가지 기타 TGF-β 패밀리 단백질, 예를 들면, BMP7, Nodal, GDF8, 및 GDF11를 포함하는 단백질들과 생화학적으로 상호작용할 수 있다 [가령, Yamashita *et al.* (1995) *J. 세포 Biol.* 130:217-226; Lee and McPherron (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:9306-9311; Yeo and Whitman (2001) *Mol. Cell* 7: 949-957; 및 Oh *et al.* (2002) *Genes Dev.* 16:2749-54 참고]. 액티빈-유사 키나제-4 (ALK4)는 액티빈, 특히 액티빈 A의 주요 유형 I 수용체이며, ALK7은 다른 액티빈들에 대한 수용체로써, 특히 액티빈 B에 대한 수용체로써 작용할 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 GDF11 및/또는 액티빈 B를 길항할 수 있는 물질로 ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체의 리간드(또한 ActRIIA 리간드 또는 ActRIIB 리간드라고도 지칭됨)를 길항하는 것에 관계한다.

[0064] 본 명세서에서 설명된 바와 같이, "액티빈 B"에 결합하는 물질은 단리된 β_B 하위단위의 문맥 또는 이량체 복합체 (가령, β_{BβB} 동종이량체 또는 β_{ABB} 이종이량체)이건 간에 β_B 하위단위에 특이적으로 결합하는 물질이다. 이종이량체 복합체 (가령, β_{ABB} 이종이량체)의 경우, "액티빈 B"에 결합하는 물질은 복합체의 β_B 하위단위 안에 존재하는 에피토프에 특이적이지만, 그러나 상기 복합체의 비-β_B 하위단위 안에 존재하는 에피토프(가령, 상기 복합체의 β_A 하위단위)에 결합하지 않는다. 유사하게, "액티빈 B를 길항(저해)하는 본 명세서에서 공개된 물질"은 단리된 β_B 하위단위 또는 이량체 복합체 (가령, β_{BβB} 동종이량체 또는 β_{ABB} 이종이량체)와 상관없이 β_B 하위단위에 의해 중재되는 하나 또는 그 이상의 활성을 억제하는 물질이다. β_{ABB} 이종이량체의 경우에 있어서, "액티빈 B"를 저해시키는 물질은 상기 복합체의 β_B 하위단위의 하나 또는 그 이상의 활성을 특이적으로 저해하지만, 상기 복합체의 비-β_B 하위단위(가령, 상기 복합체의 β_A 하위단위)를 억제시키지 않는 물질이다. 이 원리는 "액티빈 A", "액티빈 C", 및 "액티빈 E"에 결합 및/또는 억제하는 물질에 또한 적용된다.

- [0065] TGF- β 슈퍼패밀리에 있어서, 액티빈은 난소 및 태반 세포에서 호르몬 생산을 자극할 수 있고, 뉴런 세포 생장을 지원하고, 세포 유형에 양성적으로 또는 음성적으로 의존하는 세포-주기 과정에 영향을 주고, 그리고 양서류 배에서 최소한 증배 분화를 유도할 수 있는 독특하고 다기능 인자들이다 [DePaolo *et al.* (1991) Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson *et al.* (1997) Curr Biol. 7:81-84; 및 Woodruff (1998) Biochem Pharmacol. 55:953-963]. 더욱이, 자극된 인간 단핵구 백혈병 세포로부터 단리된 적혈구의 분화 인자 (EDF)는 액티빈 A와 동일한 것으로 밝혀졌다 [Murata *et al.* (1988) PNAS, 85:2434]. 액티빈 A는 골수에서 적혈구생성을 촉진시키는 것으로 제안되었다. 몇 가지 조직에서, 액티빈 신호생성은 이의 관련된 이종이량체, 인히빈(inhibin)에 의해 길항된다. 예를 들면, 뇌하수체로부터 난포-자극 호르몬 (FSH)이 방출되는 동안, 액티빈은 FSH 배출 및 합성을 촉진시키고, 반면 인히빈은 FSH 배출 및 합성을 막는다. 액티빈 생활성을 조절하거나 및/또는 액티빈에 결합할 수 있는 다른 단백질들은 폴리스테틴 (FS), 폴리스테틴-관련된 단백질 (FSRP), 및 α_2 -마크로글로블린을 포함한다.
- [0066] 성장 및 분화 인자-8 (GDF8)는 또한 미오스테틴으로 알려져 있다. GDF8은 골격근량의 음성 조절물질이다. GDF8은 발생중인 및 성인 골격근에서 상당히 발현된다. 마우스에서 GDF8 유전자 결손은 골격근의 두드러진 비대 및 과형성에 의해 특징화된다 [McPherron *et al.*, Nature (1997) 387:83-90]. 골격근량의 유사한 증가는 소에서 GDF8의 자연 발생성 돌연변이에서 명백하며 [가령, Ashmore *et al.* (1974) 성장, 38:501-507; Swatland and Kieffer (1994) J. Anim. Sci. 38:752-757; McPherron and Lee (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12457-12461; 그리고 Kambadur *et al.* (1997) Genome Res. 7:910-915] 및 인간에서 특히 명백하다 [가령, Schuelke *et al.* (2004) N Engl J Med 350:2682-8]. 인간에서 HIV-감염과 관련된 근육-소모는 GDF8 단백질 발현에서 증가와 수반된다는 연구들이 또한 있다 [가령, Gonzalez-Cadavid *et al.* (1998) PNAS 95:14938-43]. 또한, GDF8은 근육-특이적 효소 (가령, 크레아틴 키나제)의 생산을 조절하고, 그리고 근육모세포 세포 증식을 조절할 수 있다 [가령 국제 특허 출원 공개 번호. WO 00/43781]. GDF8 프로펩티드는 성숙 GDF8 도메인 이량체에 비공유적으로 결합하여, 이의 생물학적 활성을 비활성화시킬 수 있다 [가령, Miyazono *et al.* (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield *et al.* (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; 및 Brown *et al.* (1990) 성장 Factors, 3: 35-43]. GDF8 또는 구조적으로 관련된 단백질에 결합하고, 이들의 생물학적 활성을 저해하는 다른 단백질은 폴리스테틴, 그리고 잠재적으로, 폴리스테틴-관련된 단백질들을 포함한다 [가령, Gamer *et al.* (1999) Dev. Biol., 208: 222-232 참고].
- [0067] 골 형태생성 단백질-11 (BMP11)로 또한 공지된 성장 및 분화 인자-11 (GDF11)은 척추동물 발달의 조절물질로써 첫째로 확인된 분비된 단백질이다 [McPherron *et al.* (1999) Nat. Genet. 22: 260-264]. GDF11은 마우스 배 발달 동안 미아(꼬리 bud), 지아(limb bud), 하악궁, 및 배근신경절에서 발현된다 [가령, Nakashima *et al.* (1999) Mech. Dev. 80: 185-189 참고]. GDF11은 증배 및 신경 조직 모두의 패턴화에 독특한 역할을 하고 [가령, Gamer *et al.* (1999) Dev Biol., 208:222-32 참고], 발달 병아리 날개에서 연골생성 및 골재생의 음성 조절물질로 나타났다 [가령, Gamer *et al.* (2001) Dev Biol. 229:407-20 참고]. GDF11은 출생후 조직 항성성의 조절물질로써 연루된다. 예를 들면, 근육에서 GDF11의 발현 또한 GDF8의 것과 유사한 방식으로 근육 성장 조절에서 이 리간드의 역할을 또한 제안한다. 또한, 뇌에서 GDF11의 발현은 GDF11이 신경계 기능을 또한 조절할 수 있고, 및 GDF11은 후각 상피에서 신경형성을 저해하는 것으로 밝혀졌다 [가령, Wu *et al.* (2003) Neuron, 37:197-207 참고].
- [0068] 골형성 단백질-1 (OP-1)로 또한 불리는 골형성 단백질(BMP7)은 연골 및 골 형성을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다. 또한, BMP7은 생리학적 과정의 광범위한 어레이를 조절한다. 예를 들면, BMP7은 상피 골형성의 현상을 담당하는 골유도성 인자일 수 있다. BMP7은 칼슘 조절 및 골 항성성에 또한 역할을 한다. 액티빈과 유사하게, BMP7은 ActRIIA 및 ActRIIB에 결합한다. 그러나, BMP7 및 액티빈은 이종이량체 수용체 복합체들 안으로 명백한 유형 I 수용체를 모집한다. BMP7은 ALK2를 통하여 선호적으로 신호생성을 하는 반면, 액티빈은 ALK4를 통하여 신호를 생성한다. 이 차이로 인하여 BMP7 및 액티빈은 상이한 Smad 경로를 활성화시키고, 명백한 생물학적 반응의 활성화를 허용한다 [가령, Macias-Silva *et al.* (1998) J Biol Chem. 273:25628-36 참고].
- [0069] 특이적 생물학적 성질은 변이체 ActRIIB-Fc 융합 단백질에 의해 시험관내 및 생체내에서 나타나는데, 하나의 변이체는 서열 번호:1에 있어서 위치 79의 산성 아미노산을 갖는, 서열 번호:1의 아미노산 20-134를 포함하고 [이후 "ActRIIB(L79D 20-134)-Fc" 융합 단백질로 언급됨], 두번째 절두된 변이체는 본 서열 번호: 1의 아미노산 25-131을 포함하고, 위치 79에서 산성 아미노산을 또한 편입한다 [이후 "ActRIIB(L79D 25-131)-Fc" 로 언급됨]. 가령, U.S. 특허. 8,058,229 참고. 변형안된 융합 단백질 ActRIIB(20-134)-Fc 및 ActRIIB(25-131)-Fc와 비교하여, 대응하는 L79D 변이체 [차레로 ActRIIB(L79D 20-134)-Fc 및 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc]는 액티빈 A에

대한 결합 친화력의 실질적 상실에 의해 부분적으로 특징화되고, 따라서 액티빈 A 활성을 길항하는 능력이 상당히 감소되나, GDF11의 결합 및 저해는 야생형 수준에 근접하게 유지된다. ActRIIB(L79D 20-134)-Fc 및 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc 변이체는 변형안된 차례로 ActRIIB(20-134)-Fc 및 ActRIIB(25-131)-Fc 융합 단백질과 비교하여 생체내 적혈 세포 수준을 증가시키는 능력이 상당히 더 강력한 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이들 데이터는 관찰된 생물학적 활성은 액티빈 A 저해에 의존적이지 않다는 것을 나타낸다.

[0070] 본 출원은 부분적으로 U.S. 특허. 8,058,229에서 공개된 ActRIIB(L79D 20-134)-Fc 및 ActRIIB(L9D 25-131)-Fc 변이체는 액티빈 A에 대해서는 결합 친화력이 상당히 감소되었지만, 액티빈 B 뿐만 아니라 GDF11를 저해시킬 수 있다는 식견과 관련된다. 따라서, 출원인은 본 명세서에서 적혈구생성은 GDF11 및 액티빈 B 활성을 모두 길항하는 물질, 또는 물질의 조합에 의해 증가될 수 있다는 결론을 내린다. 액티빈 A의 저해는 적혈 세포 형성을 촉진시키는데 필수적이지는 않지만, 액티빈 A를 저해시키는 ActRII-Fc 융합 단백질은 또한 적혈 세포 형성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, 액티빈 A를 저해시키는 물질은 본 명세서의 범위 안에 포함된다.

[0071] 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 다중 ActRII 리간드 (가령, 액티빈 B, GDF11, 및 GDF8)는 이들 리간드들의 많은 것들이 저해될 때, 다양한 혈액 매개변수 (가령, 헤모크릿, 헤모글로빈, 및 적혈 세포 수준)의 수준이 증가되는 경향이 있기 때문에, 적혈구 생성의 조절 물질로 보인다. 예를 들면, 본 명세서에서 제시되는 데이터에서 GDF8 및 GDF11 활성을 저해하는 물질의 투여는 GDF8만을 길항하는 물질과 비교하였을 때, 생체내 적혈 세포 수준 증가에 더욱 실질적인 효과를 가진다는 것이 설명된다. 또한, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11를 저해하는 물질을 이용하는 복합 요법은 GDF8/GDF11 길항제를 이용한 치료와 비교하였을 때, 적혈 세포 증가에 더욱 더 큰 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서, 본 명세서에서 제시된 데이터는 대상에서 적혈구생성을 촉진시키기 위한 효과적인 전략은 다중 (가령, 2개 또는 그 이상의) ActRII 리간드들을 표적으로 하는 것을 나타낸다.

[0072] 따라서, 본 명세서는 GDF11을 길항(저해)하는 물질 또는 물질의 조합 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB를 통하여 Smad2/3 신호생성의 GDF11-중재된 활성화) 및/또는 액티빈 B (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB를 통하여 Smad2/3 신호생성의 액티빈 B-중재된 활성화)로 적혈 세포 수준을 증가시키고, 빈혈을 치료 또는 예방하고, 및/또는 비효과적 적혈구생성을 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상을 치료하는 방법을 부분적으로 제공한다. 임의선택적으로, GDF11 및/또는 액티빈 B를 길항하는 본 명세서의 물질 또는 물질의 조합은 실질적으로 액티빈 A를 길항하지 않는다 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB를 통한 Smad2/3 신호생성의 액티빈 A-중재된 활성화). 임의선택적으로 GDF11 및/또는 액티빈 B를 길항하는 본 명세서의 물질 또는 물질의 조합은 GDF8 활성을 더 저해시킬 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B를 길항하는 본 명세서의 물질 또는 물질의 조합은 GDF8, BMP6, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상을 더 저해시킬 수 있다.

[0073] 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B 활성을 저해하는 물질, 또는 물질의 조합은 예를 들면 다음을 포함하는, GDF11 및/또는 액티빈 B에 직접적으로 결합하는 물질이다: 최소한 GDF11 및 액티빈 B에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중특이적 항체)(선택적으로 액티빈 A에 실질적으로 결합하지 않는 물질, 또는 물질의 조합); 항-GDF11 항체와 항-액티빈 B 항체를 포함하는 항체의 조합; GDF11 및 액티빈 B에 결합하는 (선택적으로 액티빈 A에 결합하지 않을 수 있음) 변이체 ActRII 폴리펩티드 (가령, 변이체 ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드); GDF11에 결합하는 (그러나 실질적으로 액티빈 B에 결합하지 않는) 최소한 한 가지 변이체 ActRII 폴리펩티드 그리고 액티빈 B에 결합하는 (그러나 실질적으로 GDF11에 결합하지 않는) 최소한 한 가지 가용성, 변이체 ActRII 폴리펩티드를 포함하는 변이체 ActRII 폴리펩티드 (가령, 변이체 ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드)의 조합(선택적으로 상기 GDF- 및 액티빈 B-결합 ActRII 폴리펩티드중 하나 또는 둘 다 실질적으로 액티빈 A에 결합하지 않을 수 있음); GDF11 및/또는 액티빈 B에 직접적으로 결합하는 작은 분자 (선택적으로 액티빈 A에 실질적으로 결합하지 않을 수 있음); 그리고 GDF11에 결합하는 (그러나 실질적으로 액티빈 B에 결합하지 않는) 최소한 하나의 작은 분자 그리고 액티빈 B에 결합하는 (그러나 실질적으로 GDF11에 결합하지 않는) 최소한 하나의 작은 분자들의 조합 (상기 GDF- 및 액티빈 B-결합 작은 분자중 하나 또는 둘 다 실질적으로 액티빈 A에 결합하지 않을 수 있음).

[0074] 대체 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B 활성을 저해하는 물질 또는 복합 물질은 GDF11 및/또는 액티빈 B에 직접적으로 결합하지 않는 간접 길항제 물질이다. 예를 들면, 간접 길항제 물질은 고유의 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하고, 그리고 GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRII 수용체에 결합하고, 및/또는 이를 활성화시키는 것을 방지하는 항체들일 수 있다. 임의선택적으로, 이러한 물질, 또는 물질의 조합은 액티빈 A가 ActRII 수용체에 결합하고 및/또는 활성화시키는 것을 실질적으로 저해하지 않는다. 본 명세서의 다른 간접 길항제 물질은 GDF11 및/또는 액티빈 B의 발현(가령, 전사, 해독, 및/또는 세포성 배출)을

저해하는 물질, 또는 물질들의 조합을 포함한다. 임의선택적으로 이러한 물질, 또는 물질의 조합은 액티빈 A의 발현에 실질적으로 영향을 주지 않는다. 이러한 간접 물질은 예를 들면, GDF11 및/또는 액티빈 B 발현의 작은-분자 저해제를 포함하고, 뿐만 아니라 GDF11 및/또는 액티빈 B 발현을 저해시키기 위하여 다양한 폴리뉴클레오티드 길항제 [가령 안티센스 DNA, RNA 또는 화학적 유사체, 그리고 GDF11 및/또는 액티빈 B mRNA를 표적으로 하는 작은 간섭 RNA (siRNA)를 포함하는 간섭 RNA 분자들, 작은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 microRNA (miRNA) 분자]의 용도를 포함한다.

[0075] 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B 활성을 저해하는 본 발명의 물질, 또는 복합 물질은 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상에 선택적으로 결합하고 및/또는 이의 활성을 선택적으로 저해한다.

[0076] 추가적으로, 본 명세서의 방법은 적혈 세포 형성을 증가시키고, 뿐만 아니라 다양한 빈혈, 그리고 비효과적 적혈구생성 장애 및 연합된 상태를 치료 또는 예방하기 위하여 EPO 수용체 활성화제와 복합하여, 본 명세서에서 설명된 하나 또는 그 이상의 길항제 물질(가령, GDF11 및 액티빈 B를 저해하는 물질 또는 물질의 조합)의 용도에 관계한다. 조혈생성은 에리트로포에틴, G-CSF 및 철 항성성이 포함된 다양한 인자에 의해 조절되는 복합 공정으로 유지되어야 한다. 용어 "적혈 세포 수준을 증가시키다" 및 "적혈 세포 형성을 촉진하다"는 임상적으로 관찰가능한 측정, 이를 테면 헤모크릿, 적혈 세포수 및 헤모글로빈 측정을 말하며, 이러한 변화를 발생시키는 기전에 대하여 중립이라는 것을 의도한다.

[0077] EPO는 적혈구의 선조 세포가 적혈구로의 성장 및 성숙화에 관련된 당단백질 호르몬이다. EPO는 태아 기간 동안 간에 의해, 그리고 성인의 신장에 의해 생산된다. 신부전 결과로 인하여 성인에서 흔히 발생하는 EPO의 생산 감소는 빈혈로 이어진다. EPO는 EPO 유전자에 의해 형질감염된 숙주 세포로부터 단백질의 발현 및 배출에 근거한 유전공학 기술에 의해 생산되어왔다. 이러한 재조합 EPO의 투여는 빈혈 치료에 효과적이었다. 예를 들면, Eschbach *et al.* (1987, N Engl J Med 316:73)는 만성 신부전에 의해 야기되는 빈혈을 고치는데 EPO의 사용을 설명한다.

[0078] EPO의 효과는 사이토킨 수용체 슈퍼패밀리에 속하는, EPO 수용체로 지정된 세포 표면 수용체에 결합 및 이의 활성화를 통하여 중재된다. 인간 및 무린 EPO 수용체는 클론되었고, 발현되었다 [가령, D'Andrea *et al.* (1989) Cell 57:277; Jones *et al.* (1990) 혈액 76:31; Winkelman *et al.* (1990) Blood 76:24; 및 U.S. 특허 5,278,065]. 인간 EPO 수용체 유전자는 대략 224개의 아미노산의 세포의 도메인을 포함하는 483개의 아미노산 막경유 단백질을 인코딩하고, 그리고 무린 EPO 수용체와 대략 82% 아미노산 서열 동일성을 나타낸다 [가령, U.S. 특허 6,319,499 참고. 포유류 세포에서 발현된 클론된, 전장 EPO 수용체 (66-72 kDa)는 적혈구의 선조 세포상의 고유의 수용체와 유사한 친화력 ($K_D = 100-300$ nM)으로 EPO에 결합한다. 따라서, 이 형태는 주요 EPO 결합 결정인자를 포함하는 것으로 간주되며, EPO 수용체로 지칭된다. 다른 밀접하게 관련된 사이토킨 수용체와의 분석에 의해, EPO 수용체는 항진제 결합시 이량체화하는 것으로 간주된다. 그럼에도 불구하고, 다중 복합체일 수 있는 EPO 수용체의 자세한 구조, 및 활성화의 특이적 기전은 완벽하게 이해되지 않았다 [가령, U.S. 특허 6,319,499 참고].

[0079] EPO 수용체의 활성화는 몇 가지 생물학적 효과를 야기한다. 이들에게는 미성숙 적혈모구의 증가된 증식, 미성숙 적혈모구의 증가된 분화, 그리고 적혈구의 선조 세포에서 감소된 자가사멸이 포함한다 [가령, Liboi *et al.* (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury *et al.* (1990) Science 248:378-381 참고]. 증식 및 분화를 중재하는 EPO 수용체 신호 전환 경로는 독특한 것으로 보인다 [가령, Noguchi *et al.* (1988) Mol Cell Biol 8:2604; Patel *et al.* (1992) J Biol Chem, 267:21300; 그리고 Liboi *et al.* (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355]. 일부 결과에서 부속 단백질은 분화 신호의 중재에 요구될 수 있음이 암시된다 [가령, Chiba *et al.* (1993) Nature 362:646; 및 Chiba *et al.* (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:11593]. 그러나, 수용체의 구성적으로 활성화된 형태는 증식 및 분화를 모두 자극할 수 있기 때문에 분화에서 부속 단백질의 역할에 대한 논란이 있다 [가령, Pharr *et al.* (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:938 참고].

[0080] EPO 수용체 활성화제는 작은-분자 적혈구생성-자극 물질 (ESAs) 뿐만 아니라 EPO-기반의 화합물을 포함한다. 전자의 예로는 폴리에틸렌 글리콜에 공유적으로 연계된 이량체 펩티드-기반의 항진제 (상품명 Hematide)이며, 이는 건강한 지원자 및 만성 신장 질환 및 내생성 항-EPO 항체를 가진 환자에서 적혈구생성-자극 성질을 보여주었다 [가령, Stead *et al.* (2006) Blood 108:1830-1834; 및 Macdougall *et al.* (2009) N Engl J Med 361:1848-1855 참고]. 다른 예들에는 비펩티드-기반의 ESAs를 포함한다 [가령, Qureshi *et al.* (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:12156-12161 포함].

- [0081] EPO 수용체 활성제는 EPO 수용체 자체에 접촉없이, 내생성 EPO의 생산을 강화시킴으로써, 간접적으로 적혈구생성을 촉진시키는 화합물을 또한 포함한다. 예를 들면, 저산소증-유도성 전사 인자 (HIFs)는 세포성 조정 기전에 의해 노모식(normoxic) 조건하에 억제되는(와해되는) EPO 유전자 발현의 내생성 자극물질이다. 따라서, HIF 프로필 수산화효소의 억제제는 생체내 EPO-유도하는 활성화에 대하여 연구되고 있다. EPO 수용체의 다른 간접 활성제는 GATA-2 전사 인자의 억제제를 포함하며 [가령, Nakano *et al.* (2004) Blood 104:4300-4307 참고], 이는 EPO 유전자 발현, 및 EPO 수용체 신호 변환의 음성 조절물질로써 기능을 하는 조혈 세포 포스포타제 (HCP 또는 SHP-1)의 억제제를 억제시킨다 [가령, Klingmuller *et al.* (1995) Cell 80:729-738 참고].
- [0082] 본 명세서에서 이용된 용어는 각 용어가 이용된 본 명세서의 내용 및 명세서 내용 안에서 일반적으로 당업계에 서 일반적인 의미를 가진다. 특정 용어는 본 명세서의 조성물 및 방법을 설명하고, 이들을 어떻게 만들고 이용하는지를 설명하는데 있어서 진료의에게 추가 지침을 제공하기 위하여 명세서에서 하기에서 논의되거나 또는 도처에서 논의된다. 용어의 임의의 용도 범위 또는 의미는 명세서 내용으로부터 자명할 것이다.
- [0083] 모든 문법적 형태 및 다양한 철자에서 "상동성(Homologous)"은 동일한 종의 유기체안에 슈퍼패밀리의 단백질 및 뿐만 아니라, 상이한 유기종의 상동성 단백질이 포함된, "공통적인 진화 기원"을 보유하는 2개의 단백질 간의 상관관계를 지칭한다. 이러한 단백질 (및 이들의 인코딩 핵산)은 동일성 백분율 또는 특이적 잔기 또는 모티프 및 보존된 위치의 존재에 의해서건 이들의 서열 유사성에 의해 반영되는, 서열 상동성을 가진다.
- [0084] 모든 문법적 형태에서 용어 "서열 유사성"은 공통적인 진화 기원을 공유하거나 또는 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 간의 동일성 정도 또는 대응을 지칭한다.
- [0085] 그러나, 통상적인 용도 및 본 출원에서, 부사, 이를 테면 "매우"로 변형될 때, 용어 "상동성"은 서열 유사성을 지칭하며, 이들은 공통적인 진화 기원에 관련되거나 또는 관련되지 않을 수 있다.
- [0086] 참고 폴리펩티드(또는 뉴클레오티드) 서열에 대하여 "아미노산 서열 동일성 백분율(%)"은 참고 서열 및 후보 서열들을 배열하고, 필요에 따라 최대 백분율의 서열 동일성을 획득하기 위하여 갭을 도입한 후, 참고 폴리펩티드(뉴클레오티드) 서열에 있는 아미노산 잔기(또는 뉴클레오티드)와 동일한 후보 서열에 있는 아미노산 잔기(또는 뉴클레오티드)의 백분율로 정의되며, 임의의 보존 치환은 서열 동일성 부분으로 간주되지 않는다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 목적으로 배열은 당업자의 기술 분야에 있는 다양한 방법을 통하여 이루어질 수 있는데, 예를 들면, 공개 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 이를 테면 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 이루어질 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 진장에 걸쳐 최대 배열을 획득하기 위한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열 배열을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본 명세서의 목적을 위하여, 아미노산(핵산) 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2을 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.의 것이며, 이의 원천 코드는 U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559에 사용자 문서에 정리되어 있으며, 이것은 U.S. 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 Genentech, Inc., South San Francisco, Calif에서 공개적으로 이용가능하며, 또는 원천 코드로부터 만들 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D이 포함된 UNIX 오퍼레이팅 시스템에서 사용되도록 만들어져야 한다. 모든 서열 비교 매개변수들은 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며, 변화되지 않는다.
- [0087] 본 명세서에서 이용된 바와 같이, "X에 실질적으로 결합하지 않는"이란 "X"에 대하여 약 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 이상 또는 그 이상(가령, K_D 를 측정하는데 유용된 분석에 의해 탐지가능한 결합이 없음)인 K_D 를 가진 물질을 의미한다.
- [0088] **2. 길항제 물질**
- [0089] **A. 항체 길항제**
- [0090] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질, 또는 물질의 조합은 최소한 액티빈 B 및/또는 GDF11에 결합하거나 및/또는 이의 활성화 (가령, ActRIIA- 또는 ActRIIB-기반의 Smad 2/3 신호생성의 활성화)을 저해하는 항체들이다. 임의선택적으로, 본 명세서의 항체, 또는 항체의 조합은 액티빈 A에 결합하거나 및/또는 이의 활성화 (가령, ActRIIA- 또는 ActRIIB-기반의 Smad 2/3 신호생성의 액티빈 A-중재된 활성화)을 저해하지 않는다. 임의선택적으로, 본 명세서의 항체, 또는 항체의 조합은 GDF8에 결합하거나 및/또는 이의 활성화 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad 2/3 신호생성의 GDF8-중재된 활성화)의 을 더 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, 최소한 액티빈 B 및/또는 GDF11에 결합하거나 및/또는 이의 활성을 저해하는 본 명세서의 항체, 또는 항체의 조합은 GDF8, 액

티빈 C, 액티빈 E, BMP6, 액티빈 A, GDF15, Nodal, Gdf3, BMP3, BMP3B, BMP9, 또는 BMP10중 하나 또는 그 이상에 더 결합하거나 및/또는 이의 활성화 (가령, ActRIIA- 또는 ActRIIB-기반의 Smad 2/3 및/또는 Smad 1/5/8 신호 생성의 활성화)을 더 저해시킨다.

[0091] 또다른 측면에 있어서, 본 명세서의 항체, 또는 항체의 조합은 ActRII 수용체에 결합하고, 그리고 최소한 액티빈 B 및/또는 GDF11에 의해 ActRII 수용체의 결합 및/또는 활성화를 막는 항-ActRII 수용체 항체 (가령 ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체 항체)다. 임의선택적으로, 항-ActRII 수용체 본 명세서의 항체, 또는 항체의 조합은 액티빈 A가 ActRII 수용체에 결합하거나 및/또는 활성화시키는 것을 실질적으로 저해하지 않는다. 임의선택적으로, 항-ActRII 수용체 본 명세서의 항체, 또는 항체의 조합은 GDF8에 의해 ActRII 수용체의 결합 및/또는 활성화를 더 방해한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 수용체에 결합하고, 그리고 액티빈 B 및/또는 GDF11에 의해 ActRII 수용체의 결합 및/또는 활성화를 방해하는 항-ActRII 수용체 본 명세서의 항체, 또는 항체의 조합은 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9 및 BMP10중 하나 또는 그 이상에 의해 ActRII 수용체의 결합 및/또는 활성화를 더 방해한다.

[0092] 본 명세서에서 용어 "항체"는 단일클론 항체, 다중클론성 항체, 다중특이적 항체 (예로써, 이중특이적 항체), 그리고 바람직한 항원-결합 활성을 나타내는 항체 단편들이 포함되나, 이에 국한되지 않는 다양한 항체 구조를 포괄하는 최대 범위의 의미로 이용된다. "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 상기 무손상 항체의 부분이 포함된 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편들의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디(diabodies); 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자들 (예로써 scFv); 그리고 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함되나, 이에 국한되지 않는다.[가령, Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; Pluckthun, in *The Pharmacology of 단클론 Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; 및 U.S. 특허 5,571,894; 5,587,458; 그리고 5,869,046 참고]. 본 명세서에서 공개된 항체는 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항체는 이에 부착되고, 탐지될 수 있는 라벨 (가령, 상기 라벨은 방사능동위원소, 형광 화합물, 효소, 또는 효소 보조-인자일 수 있다). 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항체는 단리된 항체다.

[0093] 디아바디는 이가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 가진 항체 단편들이다 [가령, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 및 Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448]. 트리아바디(Triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies) 또한 Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134에서 설명된다.

[0094] 단일-도메인 항체는 이 항체의 중-쇄 가변적 도메인의 전부 또는 일부분 또는 경-쇄 가변적 도메인의 전부 또는 일부분이 포함된 항체 단편들이다. 특정 구체예들에 있어서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체다 (예로써, U.S. 특허번호. 6,248,516 B1 참고).

[0095] 다양한 기술에 의해 무손상 항체의 단백질분해성 절단 뿐만 아니라, 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 재조합 숙주 세포들 (예로써 대장균(*E. coli*) 또는 파아지)에 의해 생산된 것을 포함하는 항체 단편들이 만들어질 수 있다.

[0096] 본 명세서의 항체는 임의의 클래스일 수 있다. 항체의 "클래스(클라스)"란 이의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체는 5가지 주요 클래스가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들중 몇 가지는 하위클래스(이소타입), 예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 더 세분될 수 있다. 면역글로블린의 상이한 클래스에 대응하는 중쇄 불변 도메인은 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 불린다.

[0097] 일반적으로, 본 명세서에서 공개된 상기 방법들에서 이용하기 위한 항체는 바람직하게는 높은 결합 친화력으로, 이의 표적 항원에 특이적으로 결합한다. 친화력은 K_D 값으로 표현되며, 이는 자체 결합 친화력 (가령, 최소화된 항원항체결합력(avidity) 효과)을 반영한다. 전형적으로, 결합 친화력은 세포-없는 또는 세포-연결된 환경에서, 시험관내에서 측정된다. 본 명세서에서 공개된 것들이 포함된, 당분야에 공지된 임의의 다수의 분석을 이용하여 예를 들면, Biacore, 방사능라벨된 항원-결합 분석 (RIA), 및 ELISA가 포함된 결합 친화력 측정을 얻을 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항체는 최소한 1x 10⁻⁷ 또는 더 강한, 1x10⁻⁸ 또는 더 강한, 1x10⁻⁹ 또는 더 강한, 1x10⁻¹⁰ 또는 더 강한, 1x10⁻¹¹ 또는 더 강한, 1x10⁻¹² 또는 더 강한, 1x10⁻¹³ 또는 더 강한, 또는 1x10⁻¹⁴ 또는 더 강한 K_D에 의해 이들의 표적 항원(가령 GDF11, 액티빈 B, GDF8, 액티빈 E, 액티

빈 C, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 또는 BMP10)에 결합한다.

[0098] 특정 구체예들에 있어서, 다음의 분석에 의해 설명되는 바와 같이, 관심 항체의 Fab 형태 및 이의 표적 항원으로 실행된 RIA에 의해 K_D 가 측정된다. 항원에 대한 Fabs의 용액 결합 친화력은 라벨안된 항원의 일련의 역가 존재하에서 방사능라벨된 (가령, 125 I-라벨된) 항원의 최소 농도로 Fab를 평행화시키고, 그다음 결합된 항원은 항-Fab 항체-피복된 플레이트에 포획시킴으로써 측정된다 [가령, Chen *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881 참고]. 분석을 위한 조건을 확립하기 위하여, 다중-웰 플레이트(가령, MICROTITER®, Thermo Scientific)는 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 안에 5 μ g/ml의 포획 항-Fab 항체 (Cappel Labs)로 (가령, 하룻밤 동안) 피복되며, 그리고 후속적으로 소 혈청 알부민(PBS로 바람직하게는 실온 (대략적으로 23°C)에서 차단된다. 비-흡착성 플레이트에서, 방사능라벨된 항원은 관심대상의 Fab의 일련의 희석물로 혼합된다 [가령, Presta *et al.*, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일관되게]. 관심대상의 Fab는 그 다음 바람직하게는 하룻밤 동안 항온처리되고, 평형에 확실하게 이를 수 있도록 더 오랜 기간(예로써, 약 65 시간) 동안 항온처리가 지속될 수 있다. 그 이후, 상기 혼합물은 바람직하게는 실온에서 약 1 시간 동안 항온처리를 위하여 포획 플레이트로 이전된다. 그 다음 상기 용액은 그 다음 제거되며, 상기 플레이트는 0.1% 폴리소르베이트 20과 PBS 혼합물로 여러차례 세척되었다. 상기 플레이트를 건조할 때, 신틸란트(scintillant) (가령, MICROSCINT® Packard)가 추가되며, 플레이트는 감마 카운터 (가령, TOPCOUNT®, Packard)에 탑재된다.

[0099] 또다른 구체예에 따라, 약 10 반응 단위 (RU)에서 고정된 항원 CM5 칩과 함께 예를 들면 BIACORE® 2000 또는 BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)를 이용하여 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 K_D 가 측정된다. 간략하게 설명하자면, 카르복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, BIACORE, Inc.)은 공급업자의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-틸디메아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시수시니미드 (NHS)로 활성화된다. 예를 들면, 항원은 10 mM 나트륨 아세테이트, pH 4.8을 이용하여 5 μ g/ml (약 0.2 μ M)으로 희석시킨 후, 5 μ l/분의 유속으로 주사하여 결합된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 얻는다. 항원의 주사후, 1 M 에탄올아민을 주사하며, 반응안된 집단을 차단시킨다. 운동성 측정을 위하여, 2-배 연속 희석된 Fab (0.78 nM 내지 500 nM)는 대략적으로 25 μ l/분의 유속에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20®) 계면활성제 (PBST)와 함께 PBS에서 주사된다. 예를 들면, 연합(association)과 해리(dissociation) 센서그램을 동시에 피팅함으로써, 단순 일대일 Langmuir 결합 모델 (BIACORE® Evaluation Software 버전 3.2)을 이용하여 연합 속도 (k_{on})와 해리 속도 (k_{off})가 산출된다. 평형 해리 상수 (K_D)는 비율 k_{off} / k_{on} 로 산출된다[가령, Chen *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881 참고]. 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의한 연합 속도(rate)가 예를 들면, $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 를 초과한다면, 그 다음 분광계, 이를 테면 정지-유동(stop-flow) 장착된 분광광도계 (Aviv Instruments) 또는 교반 큐벳(stirred cuvette)이 있는 8000-일련의 SLM-AMINCO® 분광광도계 (ThermoSpectronic)에서 측정되었을 때, 항원 농도를 증가시킨 상태하에서, PBS안에 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 형광 방출 강도 (가령, 여기(excitation)= 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드-대역)에서 증가 또는 감소를 측정하는 형광 ?칭 기술을 이용하여 연합이 결정될 수 있다.

[0100] 일반적으로, 항-GDF11 항체는 충분한 친화력으로 GDF11에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 GDF11의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF11 단백질에 항-GDF11 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, GDF11에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-GDF11 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) GDF11 단백질들간에 보존된 GDF11의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-GDF11 항체는 실질적으로 GDF11 활성을 저해시킬 수 있는 길 항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-GDF11 항체는 GDF11가 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 GDF11-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-GDF11 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다. GDF11은 아미노산 수준에서 GDF8와 높은 서열 동일성을 갖고, 따라서 많은 경우에서 GDF11에 결합하는 항체는 GDF8에 결합하고 및/또는 이를 또한 저해할 수 있다는 것을 알아야 한다.

[0101] 일반적으로, 항-액티빈 B 항체는 충분한 친화력에 액티빈 B에 결합할 수 있어, 상기 항체는 액티빈 B 표적화에 있어서 진단 및/또는 치료 물질이 되는 항체를 말한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-액티빈 B 단백질

에 대한 항-액티빈 B 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, 액티빈 B에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-액티빈 B 항체는 상이한 종들의 오르토톨로고스(orthologous) 액티빈 B 단백질들간에 보존된 액티빈 B의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-액티빈 B 항체는 실질적으로 액티빈 B 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-액티빈 B 항체는 액티빈 B가 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 액티빈 B-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-액티빈 B 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0102] 일반적으로, 항-액티빈 C 항체는 충분한 친화력에 액티빈 C에 결합할 수 있어, 상기 항체는 액티빈 C 표적화에 있어서 진단 및/또는 치료 물질이 되는 항체를 말한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-액티빈 C 단백질에 대한 항-액티빈 C 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, 액티빈 C에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-액티빈 C 항체는 상이한 종들의 오르토톨로고스(orthologous) 액티빈 C 단백질들간에 보존된 액티빈 C의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-액티빈 C 항체는 실질적으로 액티빈 C 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-액티빈 C 항체는 액티빈 C가 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 액티빈 C-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-액티빈 C 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0103] 일반적으로, 항-액티빈 A 항체는 충분한 친화력에 액티빈 A에 결합할 수 있어, 상기 항체는 액티빈 A 표적화에 있어서 진단 및/또는 치료 물질이 되는 항체를 말한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-액티빈 A 단백질에 대한 항-액티빈 A 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, 액티빈 A에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-액티빈 A 항체는 상이한 종들의 오르토톨로고스(orthologous) 액티빈 A 단백질들간에 보존된 액티빈 A의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-액티빈 A 항체는 실질적으로 액티빈 A 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-액티빈 A 항체는 액티빈 A가 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 액티빈 A-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다.

[0104] 일반적으로, 항-액티빈 E 항체는 충분한 친화력에 액티빈 E에 결합할 수 있어, 상기 항체는 액티빈 E 표적화에 있어서 진단 및/또는 치료 물질이 되는 항체를 말한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-액티빈 E 단백질에 대한 항-액티빈 E 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, 액티빈 E에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-액티빈 E 항체는 상이한 종들의 오르토톨로고스(orthologous) 액티빈 E 단백질들간에 보존된 액티빈 E의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-액티빈 E 항체는 실질적으로 액티빈 E 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-액티빈 E 항체는 액티빈 E가 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 액티빈 E-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-액티빈 E 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0105] 일반적으로, 항-GDF8 항체는 충분한 친화력으로 GDF8에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 GDF8의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF8 단백질에 항-GDF8 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, GDF8에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-GDF8 항체는 상이한 종들의 오르토톨로고스(orthologous) GDF8 단백질들간에 보존된 GDF8의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-GDF8 항체는 실질적으로 GDF8 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-GDF8 항체는 GDF8이 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 GDF8-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/

또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-GDF8 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다. GDF8은 아미노산 수준에서 GDF11과 높은 서열 상동성을 갖고, 따라서 많은 경우에서 GDF8에 결합하는 항체는 GDF11에 결합하고 및/또는 이를 또한 저해할 수 있다는 것을 알아야 한다.

[0106] 일반적으로, 항-BMP6 항체는 충분한 친화력으로 BMP6에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 BMP6의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP6 단백질에 항-BMP6 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, BMP6에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP6 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) BMP6 단백질들간에 보존된 GDF8의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP6 항체는 실질적으로 BMP6 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-BMP6 항체는 BMP6이 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 BMP6-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP6 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0107] 일반적으로, 항-GDF15 항체는 충분한 친화력으로 GDF15에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 GDF15의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF15 단백질에 항-GDF15 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, GDF15에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-GDF15 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) GDF15 단백질들간에 보존된 GDF15의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-GDF15 항체는 실질적으로 GDF15 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-GDF15 항체는 GDF15가 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 GDF15-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-GDF15 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0108] 일반적으로, 항-Nodal 항체는 충분한 친화력으로 Nodal에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 Nodal의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-Nodal 단백질에 항-Nodal 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, Nodal에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-Nodal 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) Nodal 단백질들간에 보존된 Nodal의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-Nodal 항체는 실질적으로 Nodal 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-Nodal 항체는 Nodal가 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 Nodal-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-Nodal 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0109] 일반적으로, 항-GDF3 항체는 충분한 친화력으로 GDF3에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 GDF3의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF3 단백질에 항-GDF3 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, GDF3에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-GDF3 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) GDF3 단백질들간에 보존된 GDF3의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-GDF3 항체는 실질적으로 GDF3 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-GDF3 항체는 GDF3가 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 GDF35-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-GDF3 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0110] 일반적으로, 항-BMP3 항체는 충분한 친화력으로 BMP3에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 BMP3의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP3 단백질에 항-BMP3 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, BMP3에 대한 상기 항체의 결합의

약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP3 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) BMP3 단백질들간에 보존된 BMP3의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP3 항체는 실질적으로 BMP3 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-BMP3 항체는 BMP3이 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 BMP3-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP3 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0111] 일반적으로, 항-BMP3B 항체는 충분한 친화력으로 BMP3B에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 BMP3B의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP3B 단백질에 항-BMP3B 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, BMP3B에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP3B 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) BMP3B 단백질들간에 보존된 BMP3B의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP3B 항체는 실질적으로 BMP3B 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-BMP3B 항체는 BMP3B이 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 BMP3B-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP3B 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0112] 일반적으로, 항-BMP9 항체는 충분한 친화력으로 BMP9에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 BMP9의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP9 단백질에 항-BMP9 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, BMP9에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP9 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) BMP9 단백질들간에 보존된 BMP9의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP9 항체는 실질적으로 BMP9 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-BMP9 항체는 BMP9이 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 BMP9-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP9 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP9 항체는 BMP9와 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 사이의 상호작용을 저해한다. 바람직하게는, 항-BMP9 항체는 BMP9와 ALK1 사이의 상호작용을 저해하지 않거나, 또는 실질적으로 저해하지 않는다.

[0113] 일반적으로, 항-BMP10 항체는 충분한 친화력으로 BMP10에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 BMP10의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP10 단백질에 항-BMP10 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, BMP10에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP10 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) BMP10 단백질들간에 보존된 BMP10의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP10 항체는 실질적으로 BMP10 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-BMP10 항체는 BMP10이 동족 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)에 결합하는 것을 실질적으로 저해할 수 있고 및/또는 동족 수용체의 BMP10-중재된 신호 변환 (활성화), 이를 테면 ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 의한 Smad2/3 신호생성을 실질적으로 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-BMP10 항체는 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 실질적으로 저해하지 못한다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP10 항체는 BMP10과 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 사이의 상호작용을 저해한다. 바람직하게는, 항-BMP10 항체는 BMP10과 ALK1 사이의 상호작용을 저해하지 않거나, 또는 실질적으로 저해하지 않는다.

[0114] 항-ActRIIA 항체는 충분한 친화력으로 ActRIIA에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 ActRIIA의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-ActRIIA 단백질에 항-ActRIIA 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, ActRIIA에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-ActRIIA 항체는 상이한 종들의 오르토로그스(orthologous) ActRIIA 단백질들간에 보존된 ActRIIA의 에피토프에

결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-ActRIIA 항체는 ActRIIA 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-ActRIIA 항체는 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 또는 BMP10에서 선택된 하나 또는 그 이상의 ActRIIA 리간드가 ActRIIA 수용체에 결합하는 것을 저해하거나 및/또는 이들 리간드중 하나가 ActRIIA 신호생성을 활성화시키는 것을 저해할 수 있다 (가령, Smad2/3 및/또는 Smad 1/5/8 경로를 통하여). 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-ActRIIA 항체는 GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRIIA 수용체에 결합을 저해하고 및/또는 GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRIIA 신호생성을 활성화시키는 것을 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 항-ActRIIA 항체는 GDF8가 ActRIIA 수용체에 결합하는 것을 더 저해하고 및/또는 GDF8이 ActRIIA 신호생성을 활성화시키는 것을 더 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 항-ActRIIA 항체는 액티빈 A가 ActRIIA 수용체에 결합하는 것을 실질적으로 저해하고 및/또는 ActRIIA 신호생성의 액티빈 A-중재된 활성화를 실질적으로 저해하지 못한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRIIA 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 것을 저해하는 본 명세서의 항-ActRIIA 항체는 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상이 ActRIIA 수용체에 결합하고, 및/또는 이를 활성화시키는 것을 더 저해한다.

[0115] 항-ActRIIB 항체는 충분한 친화력으로 ActRIIB에 결합할 수 있어서, 상기 항체가 ActRIIB의 표적화에서 진단 및/또는 치료 물질로써 유용한, 항체를 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-ActRIIB 단백질에 있어서, 무관한, 비-ActRIIB 단백질에 항-ActRIIB 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA)에 의해 측정되었을 때, ActRIIB에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-ActRIIB 항체는 상이한 종들의 오르토로그(orthologous) ActRIIB 단백질들간에 보존된 ActRIIB의 에피토프에 결합한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-ActRIIB 항체는 ActRIIB 활성을 저해시킬 수 있는 길항체 항체다. 예를 들면, 본 명세서의 항-ActRIIB 항체는 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10에서 선택된 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드가 ActRIIB 수용체에 결합하는 것을 저해하거나 및/또는 이들 리간드중 하나가 ActRIIB 신호생성을 활성화시키는 것을 저해할 수 있다 (가령, Smad2/3 및/또는 Smad 1/5/8 경로를 통하여). 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항-ActRIIB 항체는 GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRIIB 수용체에 결합을 저해하고 및/또는 GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRIIB 신호생성을 활성화시키는 것을 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 항-ActRIIB 항체는 GDF8가 ActRIIB 수용체에 결합하는 것을 더 저해하고 및/또는 GDF8이 ActRIIB 신호생성을 활성화시키는 것을 더 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 항-ActRIIB 항체는 액티빈 A가 ActRIIB 수용체에 결합하는 것을 실질적으로 저해하고 및/또는 ActRIIB 신호생성의 액티빈 A-중재된 활성화를 실질적으로 저해하지 못한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 것을 저해하는 본 명세서의 항-ActRIIB 항체는 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상이 ActRIIB 수용체에 결합하고, 및/또는 이를 활성화시키는 것을 더 저해한다.

[0116] 인간 GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, BMP6, ActRIIB, ActRIIA, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP9의 핵산 및 아미노산 서열은 당업계에서 잘 공지되어 있다. 또한, 항체들을 만드는 방법은 당분야에 공지되어 있고, 이들중 일부는 본 명세서에서 설명된다. 따라서 본 명세서에 따른 용도의 항체 길항체는 당업계 및 본 명세서에서 제공된 기술에 근거하여 당업자에 의해 통상적으로 만들어질 수 있다.

[0117] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 제공된 항체(가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-ActRIIA 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)는 키메라 항체다. 키메라 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정 원천 또는 종들로부터 유도되지만, 한편 이 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분은 상이한 원천 또는 종들로부터 유도된 항체를 지칭한다. 특정 키메라 항체는 예를 들면, U.S. 특허 4,816,567; 및 Morrison *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855에서 설명된다. 일부 구체예들에 있어서, 키메라 항체는 비-인간 가변적 영역(예로써, 마우스, 랫(rat), 햄스터, 토끼, 또는 비-인간 영장류, 이를 테면 원숭이로부터 유도된 가변적 영역)과 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 키메라 항체는 "클래스 전환된(클래스 switched)" 항체로써, 부모 항체의 것과는 다른 클래스 또는 하위클래스로 변화된 것이다. 일반적으로, 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편들을 함유한다.

[0118] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 제공된 키메라 항체(가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-ActRIIA 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)는 인간화된 항체다. A "인간화된" 항체는 비-인간 추가면 영역(HVRs)의 아미노산 잔기들과 인간 틀구조 영역(FRs)의 아미노산 잔기들을 포함하는 키메라 항체를 말한다. 특정 구체예

들에 있어서, 인간화된 항체는 최소한 하나, 그리고 일반적으로 2개의 가변적 도메인 모두를 실질적으로 포함할 것이며, 이때 HVRs (예로써, CDRs)의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 비-인간 항체의 것에 대응하며, 그리고 FRs의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 인간 항체의 것에 대응한다. 인간화된 항체는 임의선택적으로 인간 항체로부터 유도된 항체 불변 영역의 최소 일부분을 포함할 수 있다. 항체, 예로써, 비-인간 항체의 "인간화된 형태"는 인간화를 겪은 항체를 말한다.

[0119] 인간화된 항체 및 이를 만드는 방법은 예를 들면, Almagro and Fransson (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633에서 검토되며, 그리고 예를 들면, Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-329; Queen *et al.* (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; U.S. Pat. Nos. 5,821,337; 7,527,791; 6,982,321; and 7,087,409; Kashmiri *et al.*, (2005) *Methods* 36:25-34 [describing SDR (a-CDR) 그래프팅]; Padlan, *Mol. Immunol.* (1991) 28:489-498 (describing "resurfacing"); Dall'Acqua *et al.* (2005) *Methods* 36:43-60 (describing "FR shuffling"); Osbourn *et al.* (2005) *Methods* 36:61-68; 및 Klimka *et al.* *Br. J. Cancer* (2000) 83:252-260 (describing the "guided selection" approach to FR shuffling)에서 더 설명된다.

[0120] 인간화에 이용될 수 있는 인간 틀구조 영역은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: "베스트-피트(best-fit)" 방법을 이용하여 선별된 틀구조 영역 (예로써, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 (1993) 참고); 경쇄 또는 중쇄 가변적 영역의 특정 하위 집단의 인간항체의 콘센수스 서열로부터 유도된 틀구조영역 (예로써, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 그리고 Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); 인간 성숙 (체세포적으로 돌연변이된) 틀구조 영역 또는 인간 생식계열 틀구조 영역 (예로써, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 참고); 그리고 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유도된 틀구조 영역(예로써, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996) 참고).

[0121] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 제공된 항체(가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-ActRIIA 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)는 인간 항체다. 인간 항체는 당업계에서 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 전반적으로 van Dijk and van de Winkel(2008), *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459에서 설명된다.

[0122] 항원 시험감염(challenge)에 반응하여, 무손상 인간 항체 또는 인간 가변적 영역을 가진 무손상 항체를 만들기 위하여 변형된 유전자삽입 동물에 면역원(가령, GDF11 폴리펩티드, 액티빈 B 폴리펩티드, ActRIIA 폴리펩티드, 또는 ActRIIB 폴리펩티드)을 주사함으로써, 인간 항체를 만들 수 있다. 이러한 동물 전형적으로 상기 인간 면역글로블린 좌(loci)의 전부 또는 부분을 함유하며, 이 좌는 내생적 면역글로블린 좌를 대체하거나, 또는 염색 제외적으로 존재하거나 또는 이 동물의 염색체 안에 무작위로 통합된다. 이러한 유전자삽입 동물에서 상기 내생적 면역글로블린 좌는 일반적으로 비활성화된다. 유전자 삽입 동물로부터 인간 항체를 획득하는 방법을 검토하기 위하여, 예를 들면, Lonberg (2005) *Nat. Biotech.* 23:1117-1125; U.S. Pat. Nos. 6,075,181 and 6,150,584 (describing XENOMOUSE™ technology); U.S. Pat. No. 5,770,429 (describing HuMab® technology); U.S. Pat. No. 7,041,870 (describing K-M MOUSE® technology); 및 U.S. Patent Application Publication No. 2007/0061900 (describing VelociMouse® technology)을 참고하라. 이러한 동물에 의해 생성된 고유 항체로부터 인간 가변 영역은 예를 들면, 상이한 인간 불변 영역과 복합됨으로써, 추가 변형될 수 있다.

[0123] 본 명세서에서 제공된 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반의 방법들에 의해 만들어질 수 있다. 인간 단일클론 항체를 만들기 위하여 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포계가 설명되었다.[가령, Kozbor *J. Immunol.*, (1984) 133: 3001; Brodeur *et al.* (1987) *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York; 및 Boerner *et al.* (1991) *J. Immunol.*, 147: 86 참고]. 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통하여 생성된 인간 항체가 Li *et al.*, (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562에서 설명된다. 추가 방법들은 예를 들면, U.S. 특허번호. 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터 단일클론 인간 IgM 항체의 생산을 설명) 및 Ni, Xiandai Mianyixue, (2006) 26(4):265-268 (인간-인간 하이브리도마를 설명)에서 설명된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (Trioma technology)은 또한 Vollmers 및 Brandlein (2005) *Histol. Histopathol.*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers 및 Brandlein (2005) *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 27(3):185-91에서 설명된다.

[0124] 본 명세서에서 제공된 인간 항체 (가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-ActRIIA 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)는 인간-유도된 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변-도메인 서열을 단리시킴으로써

또한 생성될 수 있다. 이러한 가변-도메인 서열은 그 다음 바람직한 인간 불변 도메인과 복합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하기 위한 기술은 본 명세서에서 설명된다.

[0125] 예를 들면, 본 명세서의 항체들은 바람직한 활성 또는 활성들을 가진 항체에 대한 복합 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리될 수 있다. 파아지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 바람직한 결합 특징들을 보유하는 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 방법들은 예를 들면, Hoogenboom *et al.* (2001) in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J.에서 검토되며, 예를 들면, McCafferty *et al.* (1991) *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Marks 및 Bradbury (2003) in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310; Lee *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093; Fellouse (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472; 및 Lee *et al.* (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132에서 더 설명된다.

[0126] 특정 파아지 디스플레이 방법들에서 VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 별도로 클론되고, 파아지 라이브러리에서 무작위로 복합되며, 이는 그 다음 Winter *et al.*, (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 에서 설명된 바와 같이, 항원-결합 파아지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파아지는 전형적으로 단일-쇄 Fv (scFv) 단편들 또는 Fab 단편들로서 디스플레이 항체 단편들을 나타낸다. 면역화된 원천으로부터 라이브러리는 하이브리도마의 구축 요구없이 면역원(가령, GDF11, 액티빈 B, ActRIIA, 또는 ActRIIB)에 대한 고-친화력 항체를 제공한다. 대안으로, Griffiths *et al.*, (1993) *EMBO J.*, 12: 725-734 에서 설명된 바와 같이 임의의 면역화없이, 광역의 비-자가 및 자가-항원들에 대한 단일 원천 항체를 제공하기 위하여 자연그대로의 (naive) 레퍼토리가 클론될 수 있다(예로써, 인간으로부터). 최종적으로, Hoogenboom and Winter(1992), *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 에서 설명된 바와 같이, 자연그대로의 라이브러리는 줄기 세포들로부터 재배열안된 V-유전자 세그먼트를 클로닝하고, 그리고 초 가변적 CDR3 영역이 인코딩되고, 그리고 시험관내 재배열이 이루어 지도록 PCR 프라이머를 이용하여 합성적으로 만들 수 있다. 인간 항체 파아지 라이브러리를 설명하는 특허 공개는 예를 들면: U.S. 특허 번호 5,750,373, 및 U.S. 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360.

[0127] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들면, 이중특이적 항체다. 다중 특이적 항체 (전형적으로 단클론 항체)는 하나 또는 그 이상의 (가령, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상) 항원상에 최소한 상이한 2개의 에피토프(가령, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상)에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0128] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이적을 가지는데, 최소한 한 가지 결합 특이성은 GDF11 에피토프에 대한 것이며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 결합 특이성은 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF8, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에서 에피토프에 대한 것이다. 특정 구체예들에 있어서, 다중특이적 항체는 GDF11의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직하게는, GDF11 에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF11 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해시키고, 그리고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF8, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)의 활성을 저해시키는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, GDF11에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 액티빈 B에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 GDF11에 결합하고 및/또는 저해하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합않고 및/또는 저해하지 못한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 GDF8에 더 결합하고 및/또는 저해한다.

[0129] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이적을 가지는데, 최소한 한 가지 결합 특이성은 액티빈 B 에피토프에 대한 것이며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 결합 특이성은 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF8, GDF11, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에서 에피토프에 대한 것이다. 특정 구체예들에 있어서, 다중특이적 항체는 액티빈 B의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직하게는, 액티빈 B 에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 액티빈 B 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 능

력)을 저해시키고, 그리고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF8, GDF11, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)의 활성을 저해시키는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, 액티빈 B에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 GDF11에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의선택적으로, 액티빈 B에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합 않고 및/또는 저해하지 못한다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 B에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF8에 더 결합하고 및/또는 저해한다.

[0130] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이적을 가지는데, 최소한 한 가지 결합 특이성은 GDF8 에피토프에 대한 것이며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 결합 특이성은 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에서 에피토프에 대한 것이다. 특정 구체예들에 있어서, 다중특이적 항체는 GDF8의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직하게는, GDF8 에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF8 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해시키고, 그리고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)의 활성을 저해시키는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, GDF8에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 GDF8에 결합하고 및/또는 저해하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합 않고 및/또는 저해하지 못한다.

[0131] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이적을 가지는데, 최소한 한 가지 결합 특이성은 액티빈 C 에피토프에 대한 것이며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 결합 특이성은 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF8, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에서 에피토프에 대한 것이다. 특정 구체예들에 있어서, 다중특이적 항체는 액티빈 C의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직하게는, 액티빈 C 에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 액티빈 C 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해시키고, 그리고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF8, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)의 활성을 저해시키는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, 액티빈 C에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의선택적으로, 액티빈 C에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합 않고 및/또는 저해하지 못한다. 임의선택적으로, 액티빈 C에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF8에 더 결합하고 및/또는 저해한다.

[0132] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이적을 가지는데, 최소한 한 가지 결합 특이성은 액티빈 E 에피토프에 대한 것이며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 결합 특이성은 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF8, GDF11, 액티빈 C, 액티빈 B, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에서 에피토프에 대한 것이다. 특정 구체예들에 있어서, 다중특이적 항체는 액티빈 E의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직하게는, 액티빈 E 에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 액티빈 E 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해시키고, 그리고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF8, GDF11, 액티빈 C, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)의 활성을 저해시키는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, 액티빈 E에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의선택적으로, 액티빈 E에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합 않고 및/또는 저해하지 못한다. 임의선택적으로, 액티빈 E에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF8에 더 결합하고 및/또는 저해한다.

[0133] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이적을 가지는데, 최소한

한 가지 결합 특이성은 BMP6 에피토프에 대한 것이며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 결합 특이성은 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및 BMP6) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에서 에피토프에 대한 것이다. 특정 구체예들에 있어서, 다중특이적 항체는 BMP6의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직하게는, BMP6 에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 BMP6 활성화 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해시키고, 그리고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, 및 BMP10) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)의 활성을 저해시키는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, BMP6에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 BMP6에 결합하고 및/또는 저해하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합않고 및/또는 저해하지 못한다. 임의선택적으로, BMP6에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF8에 더 결합하고 및/또는 저해한다.

[0134] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이성을 가지는데, 최소한 한 가지 결합 특이성은 BMP9 에피토프에 대한 것이며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 결합 특이성은 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, 및 BMP10) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에서 에피토프에 대한 것이다. 특정 구체예들에 있어서, 다중특이적 항체는 BMP9의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직하게는, BMP9 에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 BMP9 활성화 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해시키고, 그리고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, 및 BMP10) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)의 활성을 저해시키는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, BMP9에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 BMP9에 결합하고 및/또는 저해하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합않고 및/또는 저해하지 못한다. 임의선택적으로, BMP9에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF8에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 특정 구체예들에 있어서, BMP9에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9와 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 사이의 상호작용을 저해한다. 바람직하게는, BMP9에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9와 ALK1의 상호작용을 저해하지 않거나, 또는 실질적으로 저해하지 않는다.

[0135] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이성을 가지는데, 최소한 한 가지 결합 특이성은 BMP10 에피토프에 대한 것이며, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 결합 특이성은 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, 및 BMP9) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에서 에피토프에 대한 것이다. 특정 구체예들에 있어서, 다중특이적 항체는 BMP10의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직하게는, BMP10에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 BMP10 활성화 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해시키고, 그리고 선택적으로 하나 또는 그 이상의 상이한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, 및 BMP9) 및/또는 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 수용체)의 활성을 저해시키는데 이용될 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, BMP10에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 BMP10에 결합하고 및/또는 저해하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합않고 및/또는 저해하지 못한다. 임의선택적으로, BMP10에 결합하고 및/또는 저해하는 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF8에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 특정 구체예들에 있어서, BMP10에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP10과 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 사이의 상호작용을 저해한다. 바람직하게는, BMP10에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP10과 ALK1의 상호작용을 저해하지 않거나, 또는 실질적으로 저해하지 않는다.

[0136] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 다중특이적 항체는 2개 또는 그 이상의 결합 특이성을 포함하는데, 결합 특이성의 최소한 한 가지는 GDF11 에피토프에 대한 것이며, 그리고 하나의 다른 결합 특이성은 액티빈 B 에피토프에 대한 것이다. 바람직하게는, GDF11 에피토프와 액티빈 B 에피토프에 대하여 부분적으로 결합 특이성을 가진 본 명세서의 다중특이적 항체는 GDF11와 액티빈 B 활성화 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/

또는 활성화시키는 능력)을 모두 저해하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및 액티빈 B에 결합하고 및/또는 이의 활성을 저해하는 다중특이적 항체는 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF15, Nodal, GDF3, GDF3B, BMP9, BMP10, 및/또는 BMP6의 하나 또는 그 이상에 더 결합하고 및/또는 저해한다. 임의 선택적으로, GDF11 및 액티빈 B에 결합하고, 및/또는 이를 저해하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합하거나 및/또는 방해하지 않는다.

[0137] 다중특이적 항체를 만드는 기술은 상이한 특이성을 보유한 2개의 면역글로블린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공동-발현을 포함하나, 이에 한정되지 않는다 [가령, Milstein and Cuello (1983) Nature 305: 537; International patent publication no. WO 93/08829; 및 Traunecker *et al.* (1991) EMBO J. 10: 3655, 그리고 U.S. 특허 5,731,168 ("구멍내 손잡이(knob-in-hole)" 조각기술) 참고]. 다중특이적 항체는 항체 Fc-이종이량체 분자를 만들고 (가령, WO 2009/089004A1 참고); 2개 또는 그 이상의 항체 또는 단편을 가교시키고 [가령, U.S. 특허 4,676,980; 및 Brennan *et al.* (1985) Science, 229: 81 참고]; 이중특이적 항체를 만들기 위하여 류신 지퍼를 이용하고 [가령, Kostelny *et al.* (1992) J. Immunol., 148(5):1547-1553 참고]; 이중특이적 항체 단편을 만들기 위하여 "디아바디" 기술을 이용하고 [가령, Hollinger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 참고]; 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 이용하고 [가령, Gruber *et al.* (1994) J. Immunol., 152:5368 참고]; 그리고 삼중특이적 항체를 만듦으로써 또한 만들어질 수 있다 (가령, Tutt *et al.* (1991) J. Immunol. 147: 60 참고. 다중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편들로 또한 준비될 수 있다.

[0138] "옥토푸스(Octopus) 항체"를 포함하는, 3개 또는 그 이상 기능성 항원-결합 부위들을 가진 조작제작된 항체가 또한 본 명세서에 포함된다 [예로써 US 2006/0025576A1 참고].

[0139] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 공개된 항체(가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-ActRIIA 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)는 단클론 항체다. "단일클론 항체"는 실질적으로 동질성 항체의 집단으로부터 수득한 항체, 가령, 이러한 집단을 포함하는 개별 항체는 동일하거나 및/또는 동일한 에피토프에 결합하지만, 예로써, 자연 발생적 돌연변이를 포함하는 또는 단일클론 항체 조제물 생산 동안 발생하는 가능한 변이체 항체의 경우는 제외되며, 이러한 변이체들은 일반적으로 소량 존재한다. 상이한 에피토프에 대항하는 상이한 항체를 일반적으로 함유하는 다중클론성 항체 조제물과 대조적으로, 단일클론 항체 조제물의 각 단일클론 항체는 항원에 있는 단일 에피토프를 지향한다. 따라서, 변형인자 "단일클론"은 상기 항체의 특징은 실질적으로 동질성 집단의 항체로부터 획득되나, 이 항체 생산에 임의의 특정 방법이 요구되지 않는 것으로 간주되는 것을 나타낸다. 예를 들면, 본 방법에 따라 이용되는 단일클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법들, 파아지-디스플레이 방법들, 그리고 상기 인간 면역글로블린 좌(loci)의 전부 또는 일부를 포함하는 유전자삽입 동물을 이용하는 방법들을 포함하나, 이에 국한되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있으며, 단일클론 항체를 만드는 이러한 방법들과 다른 예시적인 방법들은 본 명세서에서 설명된다.

[0140] 예를 들면, GDF11 또는 액티빈 B로부터 유도된 면역원을 이용함으로써, 항-단백질/항-펩티드 항혈청 또는 단클론 항체는 표준 프로토콜에 의해 만들어진다 [가령, Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (1988) Cold Spring Harbor Press: 1988 참고]. 포유류, 이를 테면 마우스, 햄스터, 또는 토끼는 상기 GDF11 또는 액티빈 B 폴리펩티드의 면역원 형태, 항체 반응을 유도할 수 있는 항원 단편, 또는 융합 단백질로 면역화될 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성을 부여하는 기술은 당분야에 잘 공지된 운반체 또는 다른 기술에 접합을 포함한다. GDF11 또는 액티빈 B 폴리펩티드의 면역원 부분은 어쥬번트 존재에서 투여될 수 있다. 면역화 과정은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가의 탐지에 의해 모니터링될 수 있다. 표준 ELISA 또는 기타 면역분석은 항체 생산 및/또는 결합 친화력의 수준을 평가하기 위하여 항원으로써 면역원과 함께 이용될 수 있다.

[0141] GDF11 또는 액티빈 B의 항원성 조제물로 동물을 면역주사한 후, 항혈청이 획득될 수 있고, 원하는 경우, 다클론 항체는 혈청으로부터 단리될 수 있다. 단클론 항체를 생산하기 위하여, 항체-생산 세포 (림프구)는 면역주사를 맞은 동물로부터 회수하고, 하이브리도마 세포를 만들기 위하여, 불사화 세포, 이를 테면 골수종 세포를 이용하여 표준 체세포 세포 융합에 의해 융합될 수 있다. 이러한 기술은 당업계에서 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 인간 단클론 항체를 생산하기 위하여 하이브리도마 기술 [가령, Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-497], 인간 B 세포 하이브리도마 기술 [가령, Kozbar *et al.* (1983) Immunology Today, 4:72 참고], 및 EBV-하이브리도마 기술[Cole *et al.* (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96]을 포함한다. 하이브리도마 세포는 GDF11 또는 액티빈 B 폴리펩티드와 특이적 활성의 항체, 그리고 하이브리도마 세포를 포함하는 배양물로부터 단리된 단클론 항체의 생산을 위하여 면역화학적으로 스크리닝될 수 있다.

- [0142] 특정 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형이 본 명세서에서 제공된 항체 (가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-ActRIIA 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)의 Fc 영역 안으로 도입되고, 이로 인하여 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. 상기 Fc 영역 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예로써, 치환, 결손, 및/또는 추가)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예로써, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)를 포함할 수 있다.
- [0143] 예를 들면, 본 명세서는 모든 효과인자 기능을 보유하는 것은 아니지만 일부 기능을 보유하는 항-CD3 항체 변이체를 고려하며, 이는 생체내 항체의 반감기가 중요한 응용분야에 바람직한 후보를 만들고, 특정 효과인자 기능 [가령, 보체-의존성 세포독성 (CDC) 및 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)]은 불필요하거나 또는 유해하다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위하여 시험관 및/또는 생체내 세포독성 분석이 실행될 수 있다. 예를 들면, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석을 실행하여 상기 항체가 Fc γ R 결합이 결여되지만 (그런 이유로 ADCC 활성이 결여될 수 있는), 그러나 FcRn 결합 능력은 유지된다는 것을 확인할 수 있다. ADCC를 증재하는 주요 세포, NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현시키는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈 세포 상에 FcR 발현은 예를 들면, Ravetch and Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492에서 요약된다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석의 비-제한적 실시예는 U.S. 특허 5,500,362; Hellstrom, I. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063]; Hellstrom, I *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502; U.S. Pat. No. 5,821,337; Bruggemann, M. *et al.* (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361에서 설명된다. 대안으로, 비-방사능활성 분석 방법들이 이용될 수 있다 (예를 들면, 유동 세포 측정을 위한 ACTI™ 비-방사능활성 세포독성 분석; CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif; 그리고 CytoTox 96® 비-방사능활성 세포독성 분석, Promega, Madison, Wis). 이러한 분석에 유용한 작동 세포들은 주변 혈액 단핵 세포들 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포들을 포함한다. 대안으로, 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 예로써, Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95:652-656 에서 공개된 바와 같은 동물 모델에서 생체내에서 평가될 수 있다. 상기 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 이로 인하여 CDC 활성이 결여된다는 것을 확인하기 위하여 C1q 결합 분석이 또한 실행될 수 있다. [가령, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA 참고]. 보체 활성화를 평가하기 위하여, CDC 분석이 실행될 수 있다 [예로써, Gazzano-Santoro *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 202:163; Cragg, M. S. *et al.* (2003) *Blood* 101:1045-1052; 및 Cragg, M. S, and M. J. Glennie (2004) *Blood* 103:2738-2743 참고]. FcRn 결합과 생체내 제거/반감기 결정은 당분야에 공지된 방법들을 이용하여 또한 실행될 수 있다 [예로써, Petkova, S.B. *et al.* (2006) *Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769 참고].
- [0144] 감소된 작동체 기능을 가진 본 명세서의 항체 (가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-ActRIIA 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)는 하나 또는 그 이상의 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 (U.S. 특허 6,737,056)의 치환을 가진 것들을 포함한다. 이러한 Fc 돌연변이체들은 잔기 265 및 297의 잔기가 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함하는, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327중 2개 또는 그 이상에서 치환을 가진 Fc 돌연변이체를 포함한다 (US 특허번호. 7,332,581 참고).
- [0145] 특정 구체예들에 있어서, 시스테인 조작된 항체, 예로써, "thioMAbs"를 만드는 것이 바람직할 수 있는데, 이때 항체의 하나 또는 그 이상의 잔기는 시스테인 잔기로 치환된다. 특정 구체예들에서, 상기 치환된 잔기는 상기 항체의 접근가능한 부위들에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환시킴으로써, 반응성 티올 기들은 이로 인하여 상기 항체의 접근가능한 부위에 위치하게 되며, 다른 모이어티, 이를 테면 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 상기 항체를 접합시켜, 본 명세서에서 추가 설명되는 면역접합체를 만들 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 다음 잔기중 임의의 하나 또는 그 이상이 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (Kabat 번호 매김); 중쇄의 A118 (EU 번호매김); 그리고 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 번호매김). 시스테인 조작된 항체는 예를 들면, U.S. 특허번호. 7,521,541에서 설명된 것과 같이 생성될 수 있다.
- [0146] 또한, 바람직한 항체를 확인하기 위하여 항체를 스크리닝하는데 이용된 기술은 수득된 항체의 성질에 영향을 줄 수 있다. 예를 들면, 항체가 용액 안에 항원에 결합하는데 이용되는 경우, 용액 결합을 테스트하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 바람직한 항체를 확인하기 위하여 항체와 항원간의 상호작용을 테스트하는데 다양한 상이한 기술이 이용가능하다. 이러한 기술은 ELISAs, 표면 플라즈몬 공명 결합 분석 (가령, Biacore 결합 분석, Biacore AB, Uppsala, Sweden), 샌드위치 분석 (가령, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland)의 상자성체 비드 시스템, 웨스턴 블랏, 면역침전면역침전 분석, 및 면역조직화학을 포함한다.
- [0147] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 제공된 상기 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체도 고려된다. 예를 들면, 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 상기 결합 친화력 및/또는 다른 생물학적 성질들을 개

선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체들은 상기 항체 및/또는 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 안으로 적절한 변형을 도입시킴으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 변형은 예를 들면, 상기 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열로부터 결손, 및/또는 이들 아미노산 서열 안으로 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 만일 최종 구조체가 바람직한 특징, 예를 들면, 가령, 표적-결합 (GDF11 및/또는 액티빈 B 결합)을 보유한다면, 최종 구조체에 결손, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 있을 수 있다.

[0148] 변형 (예로써, 치환들)은 예로써, 항체 친화력을 개선시키기 위하여 HVRs에서 만들어질 수 있다. 이러한 변이는 HVR " 핫스팟(hotspots)", 가령, 체세포 성숙 공정 동안 고 빈도로 돌연변이 되는 코돈에 의해 인코딩된 잔기들 [예로써, Chowdhury, (2008) *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 참고], 및/또는 SDRs (a-CDRs)에서 만들어질 수 있으며, 결과적으로 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화력에 대하여 테스트된다. 제 2 라이브러리를 구축하고, 재선별함으로써 친화력 성숙은 [예로써, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001)에서 설명되었다. 친화력 성숙의 일부 구체예들에 있어서, 다양한 방법들중 임의의 것(예로써, 오류-유발(error-prone) PCR, 쇠 셔플링(chain shuffling), 또는 올리고뉴클레오티드-지향된 돌연변이유발)에 의해 성숙에 대하여 선택된 가변적 유전자 안으로 다양성(diversity)이 도입된다. 제 2 라이브러리가 그 다음 만들어진다. 상기 라이브러리는 그 다음 바람직한 친화력을 가진 임의의 항체 변이체들을 식별해내기 위하여 스크리닝된다. 다양성을 도입시키는 또다른 방법은 HVR-지향된 방식으로써, 이때 몇 가지 HVR 잔기 (예로써, 한번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관련된 HVR 잔기는 예로써, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링(modeling)을 이용하여 구체적으로 식별될 수 있다. 특히, CDR-H3과 CDR-L3이 흔히 표적화된다.

[0149] 특정 구체예들에 있어서, 치환들, 삽입, 또는 결손은 이러한 변이로 인하여 상기 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 HVRs 안에서 발생될 수 있다. 예를 들면, 실질적으로 결합 친화력을 감소시키지 않는 보존성 변이 (예로써, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 보존성 치환들)이 HVRs에서 만들어질 수 있다. 이러한 변형은 HVR " 핫스팟(hotspots)" 또는 SDRs의 외부에 있을 수 있다. 상기에서 제공된 바와 같은 변이체 VH와 VL 서열의 특정 구체예들에 있어서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 또는 단지 1, 2 또는 3개 아미노산 치환만을 포함한다.

[0150] 돌연변이유발의 표적이 될 수 있는 항체 및/또는 결합 단백질의 잔기 또는 영역을 식별하기 위한 유용한 방법은 Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085에서 설명된 바와 같은 " 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 " 이라고 불린다. 이 방법애소, 표적 잔기 또는 표적 잔기들의 집단 (예로써, 하전된 잔기, 이를 테면 arg, asp, his, lys, 및 glu)이 확인되고, 그리고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예로써, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원-항체의 상호작용이 영향을 받았는지를 판단한다. 최초 치환들에 대한 기능성 민감성을 설명하는 아미노산 위치들에 추가 치환들이 도입될 수 있다. 대안으로, 또는 추가적으로, 상기 항체과 항원 사이에 접촉 점들을 확인하기 위한 항원-항체 복합체의 결정 구조가 결정된다. 이러한 접촉 잔기들과 이웃 잔기들이 치환을 위한 후보로써 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 이들 변이체가 바람직한 성질들을 보유하는지를 판단하기 위하여 이들 변이체들이 스크리닝될 수 있다.

[0151] 아미노산 서열 삽입은 한 개 잔기 내지 백개 또는 그 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩티드 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함하고, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 가진 항체를 포함한다. 상기 항체 분자의 다른 삽입 변이체들은 효소 (예로써 ADEPT의 경우)에 항체의 N- 또는 C-말단의 융합 또는 상기 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 항체의 N- 또는 C-말단의 융합을 포함한다.

[0152] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 제공된 항체 및/또는 결합 폴리펩티드는 당분야에 공지된 그리고 용이하게 이용가능한 비단백질성 모이어티를 보유하도록 추가 변형될 수 있다. 상기 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 유도체화에 적합한 모이어티들은 물 가용성 폴리머들을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 물 가용성 폴리머의 비-제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 코폴리머, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥소란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레 무수물 코폴리머, 폴리아미노산 (호모폴리머 또는 무작위 코폴리머), 그리고 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 호모폴리머, 프로리프로필렌 산화물/에틸렌 산화물 코-폴리머, 폴리옥시에틸화된 폴리올 (예로써, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 이의 혼합물을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물 안에서 이의 안정성으로 인하여 제작에 잇점을 가질 수 있다. 상기 폴리머는 임의의 분자량을 가질 수 있으며, 분기화되거나 또는 분기화안된 것일 수 있다. 상기

항체 및/또는 결합 폴리펩티드에 부착된 폴리머의 수는 가변적일 수 있으며, 하나 이상의 폴리머가 부착된 경우, 이들은 동일하거나 또는 상이한 분자들일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 이용된 폴리머의 수 및/또는 유형은 개선되는 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 특정 성질들 또는 기능들, 상기 항체 유도체 및/또는 결합 폴리펩티드가 특정 조건하에서 치료에 이용되는지의 여부를 포함하는 고려사항들에 근거하여 결정될 수 있다.

[0153] 본 명세서에서 공개된 임의의 항체 (가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 A 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-액티빈 C 항체, 항-액티빈 E 항체, 항-GDF8 항체, 항-BMP6 항체, 항-ActRIIA 항체, 항-GDF15 항체, 항-Nodal 항체, 항-GDF3 항체, 항-BMP3 항체, 항-BMP3B 항체, 항-BMP9 항체, 항-BMP10 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)는 원하는 효과를 획득하기 위하여 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 추가 길항제 물질과 복합될 수 있다. 본 명세서에서 공개된 항체(가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 A 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-액티빈 C 항체, 항-액티빈 E 항체, 항-GDF11 항체, 항-GDF8 항체, 항-BMP6 항체, 항-ActRIIA 항체, 항-GDF15 항체, 항-Nodal 항체, 항-GDF3 항체, 항-BMP3 항체, 항-BMP3B 항체, 항-BMP9 항체, 항-BMP10 항체, 또는 항-ActRIIB 항체)는 본 명세서에서 공개된 또다른 항체, 또는 본 명세서에서 공개된 리간드 트랩 폴리펩티드 (가령, GDF11 트랩 폴리펩티드, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드), 또는 본 명세서의 임의의 표적을 지향하는 작은-분자 길항제 (가령, 액티빈 A 작은-분자 길항제, 액티빈 B 작은-분자 길항제, GDF11 작은-분자 길항제, 액티빈 C 작은-분자 길항제, 액티빈 E 작은-분자 길항제, GDF8 작은-분자 길항제, BMP6 작은-분자 길항제, GDF15 작은-분자 길항제, Nodal 작은-분자 길항제, GDF3 작은-분자 길항제, BMP3B 작은-분자 길항제, BMP3B 작은-분자 길항제, BMP9 작은-분자 길항제, 또는 BMP10 작은-분자 길항제), 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, 또는 BMP6의 폴리뉴클레오티드 길항제), 또는 본 명세서에서 공개된 비-항체 결합 폴리펩티드(가령, GDF11 결합 폴리펩티드, 액티빈 A 결합 폴리펩티드, 액티빈 B 결합 폴리펩티드, 액티빈 E 결합 폴리펩티드, 액티빈 C 결합 폴리펩티드, GDF8 결합 폴리펩티드, GDF15 결합 폴리펩티드, Nodal 결합 폴리펩티드, GDF3결합 폴리펩티드, BMP3 결합 폴리펩티드, BMP3B 폴리펩티드, BMP9 결합 폴리펩티드, BMP10 결합 폴리펩티드, 또는 BMP6 결합 폴리펩티드)와 복합될 수 있다. 예를 들면, GDF11 및 액티빈 B 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 활성화시키는 능력)의 모두를 저해하기 위하여, 항-GDF11 항체는 본 명세서의 액티빈 B 길항제(가령, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드, 항-액티빈 B 항체, a 액티빈 B의 작은-분자 길항제, 액티빈 B의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 액티빈 B의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합될 수 있다. 대안 구체예에서, GDF11 및 액티빈 B 활성 모두를 저해하기 위하여, 항-액티빈 B 항체는 본 명세서의 GDF11 길항제(가령, GDF 트랩 폴리펩티드, 항-GDF11 항체, GDF11의 작은-분자 길항제, GDF11의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 GDF11의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합될 수 있다.

[0154] **B. GDF11, 액티빈 B, 및 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드**

[0155] 한 측면에 있어서, 본 명세서의 길항제 (억제성) 물질은 ActRII 폴리펩티드 및 이의 변이체들이다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "ActRII"는 유형 II 액티빈 수용체의 패밀리를 지칭한다. 이 패밀리는 액티빈 수용체 유형 IIA (ActRIIA) 및 액티빈 수용체 유형 IIB (ActRIIB) 모두를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 방법은 다음의 하나 또는 그 이상에 결합하고 및/또는 길항(억제)하는 하나 또는 그 이상의 변이체 ActRII 폴리펩티드 (가령, 변이체 ActRIIA and ActRIIB 폴리펩티드)의 용도에 관계한다: GDF11, GDF8, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, 및 BMP3B (가령, 활성화 of ActRIIA 및/또는 ActRIIB Smad2/3 및/또는 Smad 1/5/8 신호생성). 일부 구체예들에 있어서, 변이체 ActRII 폴리펩티드는 리간드 "트랩" 폴리펩티드 (가령, GDF11 트랩 폴리펩티드, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드, GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드)이다. 일부 구체예들에 있어서, 변이체 ActRII 폴리펩티드, 및 이의 융합 구조체들은 BMP9 및/또는 BMP10에 대하여 감소된 결합 친화력을 갖는다.

[0156] 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "ActRIIB"는 돌연변이 또는 다른 변형에 의해 이러한 ActRIIB 단백질로부터 유도된 임의의 중 및 변이체의 액티빈 수용체 유형 IIB (ActRIIB) 단백질을 말한다. 본 명세서에서 ActRIIB를 지칭하는 것은 현재 확인된 형태중 임의의 하나를 언급하는 것으로 이해된다. ActRIIB 패밀리의 구성요소는 일반적으로 시스템-풍부한 영역을 가진 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 및 예상된 세린/트레오닌 키나제 활성을 가진 세포질 도메인으로 구성된 막경유 단백질이다. 도 1에서는 인간 ActRIIB 가용성 세포외 도메인 and 상기 관련된 ActRIIA 가용성 세포외 도메인의 아미노산 서열을 배열한 것이다.

[0157] 이 용어 "ActRIIB 폴리펩티드"는 ActRIIB 패밀리의 구성요소의 임의의 자연적으로 생성된 폴리펩티드 뿐만 아니라 유용한 활성이 유지된 이의 변이체 (돌연변이체, 단편, 융합, 및 펩티도모방체 형태 포함)가 포함된 폴리펩티드를 포함한다 [가령, 국제 특허 출원 공개 번호. WO 2006/012627 참고]. 본 명세서에서 설명된 모든

ActRIIB-관련된 폴리펩티드 모두에 대한 번호매김은 특이적으로 다른 지정이 없는 한, 서열 번호:1의 번호매김에 기초한다.

[0158] 출원인은 Hilden *et al.* [혈액 (1994) 83(8): 2163-2170]에 공개된 서열을 갖고, 서열 번호:1의 아미노산 64에 상응하는 위치에서 알라닌 (A65)을 갖는 Fc 융합 단백질은 액티빈 및 GDF11에 대한 상대적으로 낮은 친화력을 갖는다는 것을 확인하였다. 대조적으로, 위치에 아르기닌을 갖는 (R65) 동일한 Fc 융합 단백질은 낮은 나노몰 내지 높은 피코몰 범위에서 액티빈 및 GDF11에 대한 친화력을 갖는다. 따라서, R64를 갖는 서열은 본 명세서에서 인간 ActRIIB에 대한 "야생형" 기준 서열로 이용된다.

[0159] 인간 ActRIIB 전구 단백질 서열은 다음과 같다:

[0160] MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFC
CCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCV
WKAQLMNDFAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLQFIAAEKRGSN수준WLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPW
CRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDE
YMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESI (서열 번호:1)

[0161] 상기 신호 펩티드는 한줄 밑줄로 표시되며; 세포의 도메인은 굵게 표시되며; 그리고 잠재적, 고유의 N-연계된 글리코실화 부위는 두줄 밑줄로 표시된다.

[0162] 위치 64에 알라닌을 가진 형태는 다음과 같이 문헌에서 보고된다:

[0163] MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFC
CCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCV
WKAQLMNDFAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLQFIAAEKRGSN수준WLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPW
CRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDE
YMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESI (서열 번호:2).

[0164] 인간 ActRIIB 가용성 (세포외), 가공된 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:

[0165] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGG
PEVTYEPPTAPT (서열 번호:3).

[0166] A64의 또다른 형태는 다음과 같다:

[0167] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGG
PEVTYEPPTAPT (서열 번호:4).

[0168] 일부 구체예들에 있어서, 상기 단백질은 N-말단에서 "SGR..." 서열을 가지도록 만들어질 수 있다. 세포의 도메인의 C-말단 "꼬리(tail)"는 한줄 밑줄로 표시된다. 결손된 "꼬리" (Δ 15 서열)를 가진 서열은 다음과 같다:

[0169] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
(서열 번호:5).

[0170] A64의 또다른 형태는 다음과 같다:

[0171] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
(서열 번호:6).

[0172] 인간 ActRIIB 전구 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다: (Genbank entry NM_001106의 뉴클레오타이드 5-1543; 나타낸 서열은 위치 64에 알라닌을 제공하며, 그리고 대신 아르기닌을 제공하기 위하여 변형될 수 있다)

[0173] GGCTGTTGATTTGAGCCAGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGGCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
CCAGAGAGATGCCTTCTCGCATGACATGTATGCCATGGGGTGGTGTGGGAGCTTGTGCTCGTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTA
CATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAAGATCACTG
GTTGAAACACCCGGGCTGGCCAGCTTGTGTGACCATCGAGGAGTGTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGTGTGTGGAGGAGCGGGT

GTCCCTGATTTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA (서열 번호: 7).

[0174] 인간 ActRIIB 가용성 (세포외) 폴리펩티드을 인코딩하는 핵산은 다음과 같다 나타낸 서열은 위치 64에 알라닌을 제공하며, 그리고 대신 아르기닌을 제공하기 위하여 변형될 수 있다):

[0175] GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCTCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCGAGGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCGGAAGTACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCACC (서열 번호:8).

[0176] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ActRIIA 폴리펩티드에 관련된다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "ActRIIA" 는 돌연변이 또는 다른 변형에 의해 이러한 ActRIIA 단백질로부터 유도된 임의의 종 및 변이체의 액티빈 수용체 유형 IIA (ActRIIA) 단백질을 말한다. 본 명세서에서 ActRIIA를 지칭하는 것은 현재 확인된 형태 중 임의의 하나를 언급하는 것으로 이해된다. ActRIIA 패밀리의 구성요소는 일반적으로 시스테인-풍부한 영역을 가진 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 및 예상된 세린/트레오닌 키나제 활성을 가진 세포질 도메인으로 구성된 막경유 단백질이다.

[0177] 이 용어 "ActRIIA 폴리펩티드" 는 ActRIIA 패밀리의 구성요소의 임의의 자연적으로 생성된 폴리펩티드 뿐만 아니라 유용한 활성이 유지된 이의 변이체 (돌연변이체, 단편, 융합, 및 펩티도모방체 형태 포함)가 포함된 폴리펩티드를 포함한다 (가령, 국제 특허 출원 공개 번호. WO 2006/012627 참고). 본 명세서에서 설명된 모든 ActRIIA-관련된 폴리펩티드 모두에 대한 번호매김은 특이적으로 다른 지정이 없는 한, 서열 번호:9의 번호매김에 기초한다.

[0178] 인간 ActRIIA 전구 단백질 서열은 다음과 같다:

[0179] MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEM
EV
TQPTSNPVTPKPP (서열 번호:9)

[0180] 상기 신호 펩티드는 한줄 밑줄로 표시되며; 세포외 도메인은 굵게 표시되며; 그리고 잠재적, 고유의 N-연계된 글리코실화 부위는 두줄 밑줄로 표시된다.

[0181] 인간 ActRIIA 가용성 (세포외), 가공된 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:

[0182] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEM
EV
TQPTSNPVTPKPP (서열 번호:10)

[0183] 세포외 도메인의 C-말단 " 꼬리(tail) " 는 한줄 밑줄로 표시된다. 결손된 " 꼬리 " (Δ15 서열)를 가진 서열은 다음과 같다:

[0184] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEM
(서열 번호:11)

[0185] 인간 ActRIIA 전구 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다: (Genbank entry NM_001616의 뉴클레오타이드):

[0186] gttggccttaaaattgaggctggcaagtctgcaggcgataccatggacaggttggtaccggaggtacatggctccagaggtatagagggtgctataaac
tccaaaggatgcattttgaggatagatatgcatgcatgggatagtcctatgggaactggcttctcgctgactgctgcagatggacctgtagatgaa
tacctgtgccatttgaggaggaaattggccagcatcctctctgaagacatgcaggaagtgtgtgcataaaaaaaaagaggcctgttttaagagattat
tggcagaacatgctggaatggcaatgctctgtgaaaccatgagaagtgtgggatcacgacgcagaagccaggttatcagctggatgtgtaggtgaaaga
attaccagatgcagagactaacaattatattaccacagaggacattgtacagtggtcacaatggtgacaaatgttgactttcctcccaagaatctagt
ctatga (서열 번호:12)

[0187] 인간 ActRIIA 가용성 (세포외) 폴리펩티드폴리펩티드을 인코딩하는 핵산은 다음과 같다:

[0188] atacttggtagatcagaaactcaggagtgtctttctttaatgctaatgggaaaaagacagaaccaatcaaactggtgtgaaacctgttatggtgacaaa

gataaacggcgccattgttttctgctacctggaagaatatttctggttccattgaaatagtgaacaaggttgttggtggatgatcaactgctatgacaggactgattgtgtgataaaaaaagacagccctgaagtatatatttctgctgtgaggccaatgtgtaatgaaaagtttcttatttccagagatggaagtcacacagcccacttcaaatccagttacacctaagccaccc (서열 번호:13).

[0189] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 가용성 ActRII 폴리펩티드인 ActRII 폴리펩티드 (ActRIIA 및 ActRIIB 폴리펩티드)에 관계한다. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 용어 "가용성 ActRII 폴리펩티드"는 ActRII 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 일반적으로 지칭한다. 용어 "가용성 ActRII 폴리펩티드"는 본 명세서에서 이용된 바와 같이, ActRII 단백질의 임의의 자연발생적 세포외 도메인 뿐만 아니라 유용한 활성 (가령, 본 명세서에서 설명된 바와 같이 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 및 GDF11/액티빈 B 트랩)이 유지된 임의의 변이체 (돌연변이체, 단편, 및 펩티도모방체 형태 포함)를 포함한다. 가용성 ActRII 폴리펩티드의 다른 예로는 ActRII 단백질의 세포외 도메인에 추가하여 신호 서열을 포함한다. 예를 들면, 상기 신호 서열은 ActRIIA 또는 ActRIIB 단백질의 고유의 신호 서열, 또는 또다른 단백질, 예를 들면, 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA) 신호 서열 또는 콜렐 펩티드 (HBM) 신호 서열이 포함된 또다른 단백질의 신호 서열일 수 있다.

[0190] HBM 신호 서열의 예는 다음과 같다:

[0191] MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (서열 번호:14).

[0192] TPA 신호 서열의 예는 다음과 같다:

[0193] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (서열 번호:15).

[0194] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드의 세포외 도메인 (또한 리간드-결합 도메인으로도 지칭됨)에 돌연변이를 만들고, 따라서 ActRII 폴리펩티드는 변경된 리간드-결합 활성 (가령, 결합 특이성)을 갖는다는 것을 고려한다. 특정 측면들에 있어서, 이러한 "리간드 트랩" 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 특이적 ActRII 리간드에 대하여 변경된 (상승된 또는 감소된) 결합 친화력을 갖는다. 다른 측면에 있어서, 리간드 트랩 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 ActRII 리간드에 대한 변경된 결합 특이성을 갖는다

[0195] 예를 들면, 본 명세서는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 선호적으로 결합하는 리간드 트랩 폴리펩티드를 이용하는 방법, 구체적으로 이를 필요로 하는 대상에게서 적혈 세포 수준을 증가시키는 방법 및/또는 빈혈을 치료하는 방법을 제공한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 트랩 폴리펩티드는 액티빈 A에 결합하거나 및/또는 억제하지 못한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 트랩 폴리펩티드는 GDF8에 더 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B에 결합하는 및/또는 억제하는 본 명세서의 트랩 폴리펩티드는 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, 및 GDF8중 하나 또는 그 이상에 더 결합하거나 및/또는 더 저해한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 트랩 폴리펩티드는 BMP9 및/또는 BMP10에 대한 결합 친화력이 없도록 감소되었다.

[0196] 본 명세서에서 공개된 바와 같이, GDF11/액티빈 B 트랩은 GDF11 및 액티빈 B 모두에 결합하고 및/또는 이의 활성 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로의 GDF11- 및 액티빈 B-중재된 활성화)을 길항하는(억제하는) 변이체 ActRII 폴리펩티드 (가령 변이체 ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드)이다. 따라서, 본 명세서는 ActRII 수용체의 변경된 리간드-결합 도메인을 포함하는 GDF11/액티빈 B 트랩[가령, 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이 (가령, 아미노산 치환, 추가, 또는 결손)을 포함하는]을 제공하는데, 이 돌연변이는 ActRII 수용체의 변형안된 (야생형) 리간드-결합 도메인과 비교하여 GDF11 및 액티빈 B에 대한 선택성 증가로 일부 특징화된다. 임의선택적으로, GDF11/액티빈 B 트랩은 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성(가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로의 액티빈 A-중재된 활성화)을 실질적으로 저해하지 못한다.

[0197] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 ActRII 수용체의 변형안된 (야생형) 리간드-결합 도메인과 비교하여 GDF11 및/또는 액티빈 B에 대한 대등한 증가된 결합 친화력 (가령, 2-, 3-, 10-, 100-, 1000-배 증가된 결합 친화력)을 갖는다. 임의선택적으로, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인의 비율과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰 GDF11 결합에 대한 K_D 에 대한 액티빈 A 결합의 K_D 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인의 비율과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰 액티빈 B 결합에 대한 K_D 에 대한 액티빈 A 결합의 K_D 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰,

GDF11을 억제하는 IC₅₀에 대한 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀의 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰, 액티빈B를 억제하는 IC₅₀에 대한 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀의 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀보다 IC₅₀ 최소한 2-, 5-, 10-, 또는 심지어 100-배 적은 IC₅₀로 GDF11을 억제하는 변경된 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀보다 IC₅₀ 최소한 2-, 5-, 10-, 또는 심지어 100-배 적은 IC₅₀로 액티빈 B를 억제하는 변경된 리간드-결합 도메인을 포함한다.

- [0198] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 선택적으로 BMP6, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10, 및 GDF8중 하나 또는 그 이상에 더 결합하고 및/또는 이의 활성을 더 억제한다.
- [0199] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 다른 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호: 1 또는 2에 대하여 위치 79에서 산성 아미노산[가령, 아스파르트산 (D) 또는 글루타민산(E)]을 포함하지 않는다.
- [0200] 다른 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호: 3, 4, 5, 6, 21, 23, 48, 및 49중 임의의 하나에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호: 3, 4, 5, 6, 21, 23, 48, 및 49중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다.
- [0201] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 다른 구체예들에 있어서, 상기 GDF11/액티빈 트랩은 서열 번호: 10, 11, 18, 및 20중 임의의 하나에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11/액티빈 B 트랩은 서열 번호: 10, 11, 18, 및 20중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다.
- [0202] 본 명세서에서 공개된 바와 같이, GDF11 트랩은 GDF11에 결합하고 및/또는 이의 활성(가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로의 GDF11-중재된 활성화)을 길항(억제)하지만, 액티빈 B에는 실질적으로 결합하거나 및/또는 이의 활성 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로의 액티빈 B-중재된 활성화)을 억제하지 않는 변이체 ActRII 폴리펩티드 (가령 변이체 ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드)이다. 따라서, 본 명세서는 ActRII 수용체의 변경된 리간드-결합 도메인을 포함하는 GDF11 트랩[가령, 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이 (가령, 아미노산 치환, 추가, 또는 결손)을 포함하는]을 제공하는데, 이 돌연변이는 ActRII 수용체의 변형안된 (야생형) 리간드-결합 도메인과 비교하여 GDF11에 대한 선택성 증가로 일부 특징화된다. 임의선택적으로, GDF11 트랩은 액티빈 A에 결합하고, 및/또는 이의 활성 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로의 액티빈 A-중재된 활성화)을 억제하지 않는다.
- [0203] 일부 구체예들에 있어서, 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 ActRII 수용체의 변형안된 (야생형) 리간드-결합 도메인과 비교하여 GDF11에 대한 대등한 또는 강화된 결합 친화력 (가령, 2-, 3-, 10-, 100-, 1000-배 증가된 결합 친화력)을 갖는다. 임의선택적으로, 상기 GDF11 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인의 비율과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰 GDF11 결합에 대한 K₀에 대한 액티빈 A 결합의 K₀ 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인의 비율과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰 GDF11 결합에 대한 K₀에 대한 액티빈 B 결합의 K₀ 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11 트랩은 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀에 대한 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀의 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11 트랩은

변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰, GDF11을 억제하는 IC₅₀에 대한 액티빈 B를 억제하는 IC₅₀의 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11 트랩은 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀보다 IC₅₀ 최소한 2-, 5-, 10-, 또는 심지어 100-배 적은 IC₅₀로 GDF11을 억제하는 변경된 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 GDF11 트랩은 액티빈 B를 억제하는 IC₅₀보다 IC₅₀ 최소한 2-, 5-, 10-, 또는 심지어 100-배 적은 IC₅₀로 GDF11을 억제하는 변경된 리간드-결합 도메인을 포함한다.

[0204] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 선택적으로 BMP6, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, BMP10, 및 GDF8중 하나 또는 그 이상에 더 결합하고 및/또는 이의 활성을 더 억제한다.

[0205] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 다른 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 서열 번호: 1 또는 2에 대하여 위치 79에서 산성 아미노산[가령, 아스파르트산 (D) 또는 글루타민산(E)]을 포함하지 않는다.

[0206] 다른 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩은 서열 번호: 3, 4, 5, 6, 21, 23, 48, 및 49중 임의의 하나에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 서열 번호: 3, 4, 5, 6, 21, 23, 48, 및 49중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다.

[0207] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 다른 구체예들에 있어서, 상기 GDF11 트랩은 서열 번호: 10, 11, 18, 및 20중 임의의 하나에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 서열 번호: 10, 11, 18, 및 20중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다.

[0208] 본 명세서에서 공개된 바와 같이, 액티빈 B 트랩은 액티빈 B에 결합하고 및/또는 이의 활성 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로의 액티빈 B-중재된 활성화)을 길항(억제)하지만, GDF11 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로의 GDF11-중재된 활성화)에는 실질적으로 결합하거나 및/또는 이의 활성(가령, GDF11-중재된 활성화 of 상기 ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로)을 억제하지 않는 변이체 ActRII 폴리펩티드 (가령 변이체 ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드)이다. 따라서, 본 명세서는 ActRII 수용체의 변경된 리간드-결합 도메인을 포함하는 액티빈 B [가령, 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이 (가령, 아미노산 치환, 추가, 또는 결손)을 포함하는]을 제공하는데, 이 돌연변이는 ActRII 수용체의 변형안된 (야생형) 리간드-결합 도메인과 비교하여 액티빈 B에 대한 선택성 증가로 일부 특징화된다. 임의선택적으로, 액티빈 B는 액티빈 A에 결합하고, 및/또는 이의 활성 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성 경로의 액티빈 A-중재된 활성화)을 실질적으로 억제하지 않는다.

[0209] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 액티빈 B 트랩은 ActRII 수용체의 변형안된 (야생형) 리간드-결합 도메인과 비교하여 액티빈 B에 대한 대등한 증가된 결합 친화력 (가령, 2-, 3-, 10-, 100-, 1000-배 증가된 결합 친화력)을 갖는다. 임의선택적으로, 상기 액티빈 B 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인의 비율과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰 액티빈 B 결합에 대한 K_D에 대한 액티빈 A 결합의 K_D 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 액티빈 B 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인의 비율과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰 액티빈 B 결합에 대한 K_D에 대한 GDF11 결합의 K_D 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 액티빈 B 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰, 액티빈B를 억제하는 IC₅₀에 대한 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀의 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 액티빈 B 트랩은 변형안된 (야생형) ActRII 리간드-결합 도메인과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더

큰, 액티빈B를 억제하는 IC₅₀에 대한 GDF11을 억제하는 IC₅₀의 비율을 갖는 변경된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 액티빈 B는 액티빈 A를 억제하는 IC₅₀보다 IC₅₀ 최소한 2-, 5-, 10-, 또는 심지어 100-배 적은 IC₅₀로 액티빈 B를 억제하는 변경된 리간드-결합 도메인을 포함한다. 임의선택적으로, 상기 액티빈 B 트랩은 GDF11을 억제하는 IC₅₀보다 IC₅₀ 최소한 2-, 5-, 10-, 또는 심지어 100-배 적은 IC₅₀로 액티빈 B를 억제하는 변경된 리간드-결합 도메인을 포함한다.

- [0210] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 액티빈 B 트랩은 BMP6, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, GDF15, Nodal, BMP3, GDF3, BMP3B, BMP9, BMP10, 및 GDF8중 하나 또는 그 이상에 더 결합하고 및/또는 이의 활성을 선택적으로 더 억제한다.
- [0211] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 액티빈 B 트랩은 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 액티빈 B 트랩은 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 다른 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 GDF11 트랩은 서열 번호: 1 또는 2에 대하여 위치 79에서 산성 아미노산[가령, 아스파르트산 (D) 또는 글루탐산(E)]을 포함하지 않는다.
- [0212] 다른 구체예들에 있어서, 상기 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 3, 4, 5, 6, 21, 23, 48, 및 49중 임의의 하나에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 3, 4, 5, 6, 21, 23, 48, 및 49중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다.
- [0213] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 액티빈 B 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 0-110에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 액티빈 B 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 다른 구체예들에 있어서, 상기 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 10, 11, 18, 및 20중 임의의 하나에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 액티빈 B 트랩은 서열 번호: 10, 11, 18, 및 20중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다.
- [0214] 당업자들이 인지할 수 있는 바와 같이, 설명된 돌연변이, 변이체 또는 변형중 대부분은 핵산 수준 또는 일부 경우에 있어서 해독후 변형 또는 화학적 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 기술은 당분야에 잘 공지되며, 본 명세서에서 설명된다.
- [0215] ActRII 단백질은 구조적 및 기능적 특징, 특히 리간드-결합에 대하여 잘 특징화되어 있다 [가령, Attisano *et al.* (1992) Cell 68(1):97-108; Greenwald *et al.* (1999) Nature Structural Biology 6(1): 18-22; Allendorph *et al.* (2006) PNAS 103(20): 7643-7648; Thompson *et al.* (2003) The EMBO Journal 22(7): 1555-1566; 및 U.S. 특허: 7,709,605; 7,612,041; 및 7,842,663 참고]. 예를 들면, Attisano *et al.*는 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단에서 프롤린 노트(knot)의 결손으로 액티빈에 대한 수용체의 친화력을 감소시킨다는 것을 보여주었다. 서열 번호:1의 아미노산 20-119이 포함된 ActRIIB-Fc 융합 단백질, "ActRIIB(20-119)-Fc"는 ActRIIB(20-134)-Fc에 비교하여 GDF-11 및 액티빈에 대한 결합은 감소되었지만, 프롤린 노트(knot) 영역과 완전한 막측면(juxtamembrane) 도메인을 포함한다 (가령, U.S. 특허. 7,842,663 참고). 그러나, ActRIIB(20-129)-Fc 단백질은 비록 프롤린 노트 영역이 파괴되지만, 야생형과 비교하였을 때, 유사하지만 다소 감소된 활성을 유지한다. 따라서, 아미노산 134, 133, 132, 131, 130 및 129 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)에서 중단되는 ActRIIB 세포외 도메인은 모두 활성이 있는 것으로 예상되지만, 134 또는 133에서 중단되는 구조체는 가장 활성이 있을 수 있다. 유사하게, 잔기 129-134 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)중 임의의 것에서 돌연변이는 큰 차이로 리간드-결합 친화력을 변경시키는 것으로 기재되지 않는다. 이를 뒷받침함에 있어서, P129 및 P130의 돌연변이 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)는 실질적으로 리간드 결합을 감소시키지 않는다. 따라서, ActRIIB 본 명세서의 트랩 폴리펩티드는 아미노산 109와 같이 조기에 중단될 수 있으며 (최종 시스테인), 그러나, 109와 119에서 또는 이 사이에서 종료되는 형태는 감소된 리간드-결합을 가지는 것으로 예상된다. 아미노산 119 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)은 보존이 저조하며, 따라서 쉽게 변경되거나 또는 절두된다. 128 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)에서 또는 그 뒤에 종료되는 ActRIIB-기반의 리간드 트랩은 리간드-결합 활성을 유지한다. 119 및 127 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)에서 또는 그 사이에 종료되는 ActRIIB-기반의 리간드 트랩은 중급 결합 능력을 보유할 것이다. 이들중 임의의 형태는 임상 또는 실험 환경에 따라 사용하기에 바람직할 수 있다.

[0216] ActRIIB의 N-말단에서 아미노산 29 또는 그 전에 (서열 번호:1 또는 2에 대하여) 시작되는 단백질은 리간드-결합 활성을 보유할 것으로 예상된다. 아미노산 29는 초기 시스테인을 나타낸다. 위치 24 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)에서 알라닌을 아스파라진 돌연변이는 실질적으로 리간드-결합에 영향을 주지 않고 N-연계된 글리코실화 서열을 도입시킨다 (가령, U.S. 특허. 7,842,663 참고). 이는 아미노산 20-29에 대응하는 상기 신호 절단 펩티드와 가교-연계된 영역 사이의 영역내 돌연변이가 잘 용인됨을 확인시킨다. 특히, 위치 20, 21, 22, 23, 및 24 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)에서 시작하는 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 구조체는 일반적으로 리간드-결합 활성을 유지할 것이며, 그리고 위치 25, 26, 27, 28, 및 29 (서열 번호:1 또는 2에 대하여)에서 시작하는 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 구조체들 또한 리간드-결합 활성을 유지할 것이다. 가령, U.S. 특허. 7,842,663에서 나타낸 데이터는 22, 23, 24, 또는 25에서 시작하는 ActRIIB 구조체가 놀랍게도 최고 활성을 가질 것이라는 것을 설명한다.

[0217] 이와 함께, ActRIIB의 활성 부분 (가령, 리간드 결합 활성)은 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109를 포함한다. 따라서 본 명세서의 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 구조체들은 예를 들면, 서열 번호: 1 또는 2의 아미노산 20-29 (가령, 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29에서 시작하는)에 상응하는 잔기에서 시작하고, 서열 번호: 1 또는 2의 아미노산 109-134 (가령, 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134에서 종료되는)에 상응하는 위치에서 종료되는 ActRIIB의 부분에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 1 또는 2의 위치 79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산[가령, 아스파르트산(D) 또는 글루타민산(E)]을 포함하지 않는다. 다른 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드는 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109를 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 다른 예들은 서열 번호: 1 또는 2의 20-29 (가령, 위치 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29) 또는 21-29 (가령, 위치 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29)의 위치에서 시작하고, 그리고 119-134 (가령, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134), 119-133 (가령, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 또는 133), 129-134 (가령, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134), 또는 129-133 (가령, 129, 130, 131, 132, 또는 133)의 위치에서 종료되는 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 구조체들을 포함한다. 다른 예들은 서열 번호: 1 또는 2의 20-24 (가령, 20, 21, 22, 23, 또는 24), 21-24 (가령, 21, 22, 23, 또는 24), 또는 22-25 (가령, 22, 23, 또는 25)의 위치에서 시작하고, 109-134 (가령, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134), 119-134 (가령, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134) 또는 129-134 (가령, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134)의 위치에서 종료되는 구조체들을 포함한다. 이들 범위 안에 변이체들이 또한 고려되는데, 구체적으로 서열 번호: 1 또는 2의 상응하는 부분에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%동일성을 보유하고, 선택적으로 이러한 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드는 i) 서열 번호: 1 또는 2의 위치 79에 대응하는 위치에 산성 아미노산 [가령, 아스파르트산(D) 또는 글루타민산(E)]을 포함하지 않고, 그리고 ii) 서열 번호: 1 또는 2의 아미노산 29-109를 포함하거나 또는 구성되지 않는다. 특정 구체예들에 있어서, 상기 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 1 또는 2의 아미노산 잔기 25-131에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 보유한 폴리펩티드를 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 1 또는 2의 아미노산 25-131을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 특정 구체예들에 있어서, 상기 ActRIIB-기반의 트랩 폴리펩티드는 i) 상기 ActRIIB-기반의 트랩 폴리펩티드가 서열 번호: 1 또는 2의 위치 79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산 [가령, 아스파르트산(D) 또는 글루타민산(E)]을 포함하지 않고, 그리고 ii) 상기 ActRIIB-기반의 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 1 또는 2의 아미노산 29-109를 포함하거나 또는 구성되지 않는다면, 서열 번호: 3, 4, 5, 6, 21, 및 23에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0218] 본 명세서는 도 1에 나타낸 것과 같이, 복합 ActRIIB 구조의 분석 결과를 포함하는데, 리간드-결합 주머니는 부분적으로 잔기 Y31, N33, N35, L38 내지 T41, E47, E50, Q53 내지 K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 내지 N83, Y85, R87, A92, 그리고 E94 내지 F101에 의해 한정된다는 것이 설명된다. 이들 위치에서, 비록 K74A 돌연변이가 잘 용인되지만, R40A, K55A, F82A 및 위치 L79에서 돌연변이가 있기 때문에, 보존 돌연변이는 용인될 것으로 예상된다. R40은 제노푸스(제노푸스(Xenopus))에서 K이며, 이는 이 위치에서 염기성 아미노산이 용인될 것이라는 것을 나타낸다. Q53은 소의 ActRIIB에서 R이며, 제노푸스 ActRIIB에서 K이며, 그리고 따라서 R, K,

Q, N 및 H가 포함된 아미노산은 이 위치에서 용인될 것이다. 따라서, ActRIIB-기반의 리간드 트랩 단백질의 일반 식은 서열 번호: 1 또는 2의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하며, 선택적으로 20-24 (가령, 20, 21, 22, 23, 또는 24) 또는 22-25(가령, 22, 23, 24, 또는 25) 범위 위치에서 시작하고, 그리고 129-134 (가령, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134)의 범위 위치에서 종료하고, 그리고 리간드-결합 주머니에서 단지 1, 2, 5, 10 또는 15개의 보존 아미노산 변화를 포함하고, 리간드-결합 주머니에서 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에 0, 하나 또는 그 이상의 비-보존 변경을 포함하는, 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, ActRIIB-기반의 본 명세서의 트랩 폴리펩티드는 서열 번호: 1 또는 2의 위치 79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산[가령, 아스파르트산(D) 또는 글루타민산(E)]을 포함하지 않는다. 다른 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드는 서열 번호:1 또는 2의 아미노산 29-109을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 가변성이 특별히 잘 용인될 수 있는 결합 주머니 밖 부위는 세포의 도메인의 아미노 말단 및 카르복시 말단 (상기에서 명시된 바와 같음), 그리고 위치 42-46 및 65-73 (서열 번호:1에 대하여)을 포함한다. 위치 65에서 아스파라긴이 알라닌으로 변경 (N65A)은 실질적으로 A64 배경에서 리간드-결합을 개선시키고, 그리고 따라서 상기 R64 배경에서 리간드-결합상에 결정적인 효과를 가지지 않는 것으로 예상된다 (가령, U.S. 특허. 7,842,663 참고). 이 변화는 A64 배경에서 N65에서 글리코실화를 잠정적으로 제거하고, 따라서 영역에서 상당한 변화는 용인될 가능성을 설명한다. R64A 변화는 잘 용인되지 않는 반면, R64K는 잘 용인되며, 따라서 또다른 염기성 잔기, 이를 테면 H는 위치 64에서 용인될 수 있다 (가령, U.S. 특허. 7,842,663 참고).

[0219] ActRIIB는 거의 모든 척추동물에 걸쳐 잘-보존되며, 세포의 도메인의 큰 스트레치(stretche)는 완전하게 보존된다. ActRIIB에 결합하는 많은 리간드 또한 매우 보존된다. 따라서, 다양한 척추동물 유기체의 ActRIIB 서열 비교는 변경될 잔기에 대한 통찰력을 제공한다. 따라서, 본 공개된 방법에 유용한 활성, 인간 ActRIIB 변이체 폴리펩티드는 또다른 척추동물 ActRIIB의 서열의 상응하난 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하거나, 또는 인간 또는 다른 척추동물 서열의 것과 유사한 잔기를 포함할 수 있다. 다음의 실시예들은 활성 ActRIIB 변이체를 특징하는 방법을 설명한다. L46은 *제노푸스(Xenopus)* ActRIIB에서 발린이며, 따라서 이 위치는 변경될 수 있고, 그리고 선택적으로 또다른 소수성 잔기, 이를 테면 V, I 또는 F, 또는 비-극성 잔기 이를 테면 A로 변경될 수 있다. E52는 *제노푸스(Xenopus)*에서 K이며, 이 부위는 극성 잔기, 이를 테면 E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y 그리고 아마도 A가 포함된 광범위한 다양성의 내성이 있음을 나타낸다. T93은 *제노푸스(Xenopus)*에서 K이며, 이 위치에서 광범위한 구조적 변이가 용인되며, 극성 잔기, 이를 테면 S, K, R, E, D, H, G, P, G 및 Y가 선호됨을 나타낸다. F108은 *제노푸스(Xenopus)*에서 Y이며, 따라서 Y 또는 다른 소수성 집단, 이를 테면 I, V 또는 L은 용인되어야 한다. E111은 *제노푸스(Xenopus)*에서 K이며, D, R, K 및 H, 뿐만 아니라 Q 및 N이 포함된 하전된 잔기가 이 위치에서 용인될 것이다. R112는 *제노푸스(Xenopus)*에서 K이며, 이 위치에서, R 및 H가 포함된 염기성 잔기가 용인됨을 나타낸다. 위치 119에서 A는 상대적으로 잘 보존되지 않으며, 따라서 설치류에서 P 그리고 *제노푸스(Xenopus)*에서 V는 이 위치에서 임의의 아미노산도 용인될 수 있어야 한다.

[0220] N-연계된 글리코실화 부위 (N-X-S/T)의 추가 첨가는 상기 ActRIIB(R64)-Fc 형태와 비교하여 잘-용인된다는 것은 이미 설명되었다 (가령, U.S. 특허. 7,842,663 참고). 위치 24에서 아스파라긴의 도입에 의해(A24N 구조체; 서열 번호:1에 대하여), 더 긴 반감기를 부여할 수 있는 NXT 서열이 만들어진다. 다른 NX(T/S) 서열은 42-44 (NQS) 및 65-67 (NSS)에서 발견되며, 후자의 경우 위치 64에서 R과 효과적으로 글리코실화되지 않을 수 있다. N-X-S/T 서열은 도 1에서 규정된 리간드 결합 주머니의 밖 위치에서 일반적으로 도입될 수 있다. 비-내생성 N-X-S/T 서열의 도입을 위한 특별히 적절한 부위는 아미노산 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 또는 129-134 (서열 번호:1에 대하여)를 포함한다. N-X-S/T 서열은 상기 ActRIIB 서열과 Fc 도메인 또는 기타 융합 성분 사이의 링커로 또한 도입될 수 있다. 기존 S 또는 T에 대하여 정확한 위치 안에 N을 도입시킴으로써, 또는 기존 N에 상응하는 위치에서 S 또는 R를 도입시킴으로써, 최소 영향으로 이 부위가 도입될 수 있다. 따라서, N-연계된 글리코실화 부위를 만들수 있는 바람직한 변경은 다음과 같다: A24N, R64N, S67N (N65A 변경과 복합이 가능한), E105N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S 및 R112T (서열 번호:1에 대하여). 글리코실화되는 것으로 예상되는 임의의 S는 글리코실화에 의해 제공되는 보호때문에, 면역원성 부위의 창조없이 T로 변경될 수 있다. 유사하게, 글리코실화되는 것으로 예상되는 임의의 T는 S로 변경될 수 있다. 따라서 변경 S67T 및 S44T (서열 번호:1에 대하여)가 고려된다. 유사하게, A24N 변이체에서 S26T 변경이 이용될 수 있다. 따라서, 상기에서 설명된 바와 같이, 본 명세서의 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 추가, 비-내생성 N-연계된 글리코실화 콘센수스 서열을 갖는 ActRIIB 변이체일 수 있다.

[0221] 설명된 변이는 다양한 방식으로 복합될 수 있다. 추가적으로, 본 명세서에서 설명된 돌연변이 프로그램의 결

과는 ActRIIB에서 보존되는 것이 가끔 유익한 아미노산 위치가 있음을 나타낸다. 서열 번호:1에 대하여, 이들은 위치 64 (염기성 아미노산), 위치 80 (산성 또는 소수성 아미노산), 위치 78 (소수성, 및 특히 트립토판), 위치 37 (산성, 및 특히 아스파르트산 또는 글루탐산), 위치 56 (염기성 아미노산), 위치 60 (소수성 아미노산, 특히 페닐알라닌 또는 티로신)을 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 공개된 각 트랩에서, 본 명세서는 보존될 수 있는 아미노산 틀구조(framework)를 제공한다. 보존되는 것이 바람직할 수 있는 다른 위치는 다음과 같다: 모두 서열 번호:1에 대하여 위치 52 (산성 아미노산), 위치 55 (염기성 아미노산), 위치 81 (산성), 98 (극성 또는 하전된, 특히 E, D, R 또는 K).

[0222] 활성 ActRIIA 폴리펩티드에 대한 일반적인 식은 서열 번호:9의 아미노산 30-100에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드를 포함하는 것이다. 따라서, 본 명세서의 ActRIIA-기반의 리간드 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-100에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIA-기반의 리간드 트랩은 서열 번호:9의 아미노산 30-110을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 임의선택적으로, 본 명세서의 ActRIIA-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드는 서열 번호:9의 아미노산 12-82에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하고, 선택적으로 1-5 (가령, 1, 2, 3, 4, 또는 5) 또는 3-5 (가령, 3, 4, 또는 5) 범위의 위치에서 시작하고, 그리고 110-116 (가령, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 또는 116) 또는 110-115 (가령, 110, 111, 112, 113, 114, 또는 115) 범위의 위치에서 종료되며, 리간드 결합 주머니에서 1, 2, 5, 10 또는 15개의 보존 아미노산을 포함하고, 그리고 리간드-결합 주머니 (서열 번호:9에 대하여)에서 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에서 0, 하나 또는 그 이상의 비-보존 변경을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0223] 본 명세서의 리간드 트랩의 기능적으로 활성 단편 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)은 리간드 트랩 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 상응하는 단편으로부터 제조함에 의해 생성된 폴리펩티드를 스크리닝함으로써 획득될 수 있다. 또한, 단편들은 당분야에 공지된 기술 이를 테면, 통상적인 Merrifield 고형상 f-Moc 또는 t-Boc 화학을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 상기 단편들은 생산되고 (제조합적으로 또는 화학적 합성에 의해) 그리고 GDF11 및/또는 액티빈 B의 길항제 (억제제)로 기능을 하지만, 액티빈 A에 실질적으로 결합하고 및/또는 이의 활성을 저해하지 않는 펩티드 단편을 확인하기 위하여 테스트될 수 있다.

[0224] 기능적 변이체들은 치료 효과를 강화시키고, 또는 안정성을 강화시키는 목적 (가령, 생체내에서 반감기 및 단백질 분해에 대한 저항성)으로 본 명세서의 리간드 트랩 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)의 구조를 변형시킴으로써 생성될 수 있다. GDF11 및/또는 액티빈 B 결합을 유지시키기 위하여 선택될 때, 이러한 변형된 리간드 트랩 폴리펩티드는 자연-발생적 ActRII 폴리펩티드의 기능적 등가물로 간주된다. 변형된 리간드 트랩 폴리펩티드는 예를 들면, 아미노산 치환, 결손, 또는 추가에 의해 또한 생성될 수 있다. 예를 들면, 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파르트산을 글루탐산으로, 트레오닌을 세린으로의 단리된 대체, 또는 구조적으로 관련된 아미노산 (가령, 보존 돌연변이)을 갖는 아미노산의 유사한 치환은 생성 분자의 생물학적 활성에 주요 영향을 주지 않을 것으로 예상하는 것이 합당하다. 보존적 대체는 이들의 측쇄에 있어서 관련된 아미노산 패밀리 범위 안에서 일어난다. 리간드 트랩 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화로 기능적 동족체가 되는지의 여부는 변이체 리간드 트랩 폴리펩티드가 야생형 ActRII 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포 안에서 반응을 만드는지, 또는 변형안된 ActRII 폴리펩티드 또는 야생형 ActRII 폴리펩티드와 비교하였을 때, 하나 또는 그 이상의 리간드, 이를 테면 GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, BMP6, BMP9, BMP10, GDF3, BMP3, BMP3B, Nodal, 및 GDF15에 결합하는 능력을 평가함으로써 바로 결정될 수 있다.

[0225] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 상기 폴리펩티드의 글리코실화를 변경시키기 위하여, 본 명세서의 리간드 트랩 폴리펩티드 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)의 특이적 돌연변이를 고려한다. 이러한 돌연변이는 하나 또는 그 이상의 글리코실화 부위, 이를 테면 O-연계된 또는 N-연계된 글리코실화 부위를 도입하거나 또는 제거하기 위하여 선택될 수 있다. 아스파라긴-연계된 글리코실화 인지 부위는 적절한 세포성 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인지되는 삼펩티드 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린 (여기에서 "X"는 임의의 아미노산임)을 일반적으로 포함한다. 상기 변경은 리간드 트랩 폴리펩티드 (O-연계된 글리코실화 부위의 경우)의 서열에 하나 또는 그 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 추가 또는 치환에 의해 또한 만들어질 수 있다. 글리코실화 인지 부위의 제 1 또는 제 3 아미노산 위치 (및/또는 제 2 위치에서 아미노산 결손)중 하나 또는 모두에서 다양한 아미노산 치환 또는 결손으로 변형된 삼펩티드 서열에서 비-글리코실화가 된다. 리간드 트랩 폴리펩티드 상에 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또다른 수단은 상기 폴리펩티드에 글리코시드의 화학적 또는 효소적 커플링에 의한 것이다. 이용되는 커플링 방식에 따라, 슈가(들)은

(a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 자유 카르복실기; (c) 자유 설프히드릴기, 가령, 시스테인의 것들; (d) 자유 히드록실기, 가령, 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린의 것들; (e) 방향족 잔기들 가령, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 것들; 또는 (f) 글루타민의 아미드 기에 부착될 수 있다. ActRII 폴리펩티드 상에 존재하는 하나 또는 그 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 실현될 수 있다. 화학 탈글리코실화는 예를 들면, 화합물 트리플루오르메탄술포산, 또는 등가 화합물에 리간드 트랩 폴리펩티드의 노출과 관련될 수 있다. 이 처리에 의해 이 아미노산 서열은 고유한 상태로 남아 있는 한편, 연계 슈가 (N-아세틸글루코사민 or N-아세틸갈락토사민)를 제외하고 거의 또는 모든 슈가가 절단된다. 리간드 트랩 폴리펩티드 상에 탄수화물 모이어티의 효소 절단은 Thotakura *et al.* [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]에서 설명된 바와 같이, 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 이용에 의해 획득될 수 있다. 리간드 트랩 폴리펩티드의 서열은 적절하다면, 포유류, 효모, 곤충 및 식물 세포의 유형에 따라 상기 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴을 모두 도입시키도록 조정될 수 있다. 일반적으로, 인간에서 사용되기 위한 리간드 트랩 단백질은 글리코실화를 제공하는 포유류 세포, 이를 테면 HEK293 또는 CHO 세포 계통에서 발현될 수 있지만, 다른 포유류 발현 세포 계통도 마찬가지로 유용한 것으로 예상된다.

[0226] 본 명세서는 돌연변이체를 생성하는 방법, 특히 리간드 트랩 폴리펩티드 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)의 복합 돌연변이체, 뿐만 아니라 절두 돌연변이체의 세트를 더 고려하며; 복합 돌연변이체의 풀(pool)은 리간드 트랩 서열들을 식별하는데 특히 유용하다. 이러한 복합 라이브러리의 스크리닝 목적은 예를 들면, 액티빈 B, GDF11에 결합하는 리간드 트랩 펩티드, 그리고 선택적으로 액티빈 A에 실질적으로 결합하지 않는 선택적으로 다른 리간드들을 만드는 것일 수 있다. 다양한 스크리닝 분석이 하기에 제공되며, 이러한 분석은 변이체들을 평가하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 리간드 트랩은 ActRII 리간드가 ActRII 폴리펩티드에 결합하는 것을 방해하거나 또는 ActRII 리간드에 의해 야기되는 신호생성을 간섭하기 위하여 ActRII 리간드 (가령, GDF11 및/또는 액티빈 B)에 결합하는 능력에 대하여 스크리닝될 수 있다.

[0227] 리간드 트랩 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩) 또는 이의 변이체들의 활성은 세포-기반 분석 또는 *생체내* 분석에서 테스트될 수 있다. 예를 들면, 조혈생성에 관련된 유전자들의 발현에서 리간드 트랩의 효과가 평가될 수 있다. 이는 필요에 따라 하나 또는 그 이상의 재조합 ActRII 리간드 단백질 (가령, GDF11 및/또는 액티빈 B) 존재하에서 실행될 수 있고, 그리고 세포들은 리간드 트랩 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 그리고 선택적으로, ActRII 리간드를 도입시키기 위하여 형질감염될 수 있다. 유사하게, 리간드 트랩은 마우스 또는 다른 동물에게 투여될 수 있고, 당분야 인지된 방법들을 이용하여 하나 또는 그 이상의 혈액 측정, 이를 테면 RBC 카운트, 헤모글로빈, 또는 망상적혈구 카운트가 평가될 수 있다.

[0228] 복합-유도된 리간드 트랩 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)은 기준 리간드 트랩과 비교하여 선택적 또는 일반적으로 증가된 효능을 가지도록 생성될 수 있다. 이러한 변이체들이 재조합 DNA 구조체로부터 발현될 때, 유전자 요법 프로토콜에서 이용될 수 있다. 유사하게, 돌연변이생성은 대응하는 변형 안된 리간드 트랩과는 극적으로 상이한 세포내 반감기를 갖는 변이체를 만들 수 있다. 예를 들면, 상기 변경된 단백질은 변형 안된 리간드 트랩의 파괴 또는 비활성화를 야기하는 단백질분해성 분해 또는 다른 세포성 공정에 대하여 더 안정적인 또는 덜 안정적이 되도록 할 수 있다. 이러한 변이체들, 그리고 이를 인코딩하는 유전자들은 상기 리간드 트랩의 반감기를 조절함으로써 리간드 트랩 폴리펩티드 수준에 이용될 수 있다. 예를 들면, 짧은 반감기는 더욱 일시적인 생물학적 효과를 야기시킬 수 있고, 유도성 발현 시스템의 일부는 이 세포 안에서 재조합 리간드 트랩 폴리펩티드 수준을 더 긴밀하게 조절하는 것을 허용할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 단백질의 반감기를 변경시키기 위하여 상기 링커 (존재한다면) 및/또는 Fc 부분에서 돌연변이가 만들어질 수 있다.

[0229] 복합 라이브러리는 가능한 ActRII 폴리펩티드 서열들의 최소한 일부를 각 포함하는 폴리펩티드 라이브러리를 인코딩하는 유전자들의 축중 라이브러리를 통하여 만들어질 수 있다. 예를 들면, 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물은 효소적으로 유전자 서열들에 결합되어 가능한 ActRII 폴리펩티드 뉴클레오타이드 서열들의 축중 세트가 개별 폴리펩티드로 발현되거나, 또는 대안으로, 더 큰 융합 단백질들의 세트 (가령, 과이지 디스플레이를 위한)로 발현가능하다.

[0230] 축중 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 가능한 동족체 라이브러리를 만드는 많은 방법들이 있다. 축중 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기에서 실행될 수 있고, 합성 유전자들은 그 다음 발현을 위하여 적절한 벡터에 결합될 수 있다. 축중 올리고뉴클레오타이드의 합성은 당분야에 잘 공지되어 있다 [가령, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura *et al.* (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd C 수준and Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura *et al.* (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura *et al.* (1984) Science 198:1056; Ike *et al.* (1983) Nucleic Acid Res. 11:477].

이러한 기술들은 다른 단백질의 지시된 진화에 이용되어 왔었다[가령, Scott *et al.*, (1990) Science 249:386-390; Roberts *et al.* (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin *et al.* (1990) Science 249: 404-406; Cwirla *et al.*, (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; 뿐만 아니라 U.S. 특허 5,223,409; 5,198,346; 및 5,096,815) 참고].

[0231] 대안으로, 돌연변이생성의 다른 형태가 복합 라이브러리 생성에 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 리간드 트랩이 생성될 수 있으며, 예를 들면, 알라닌 스캐닝 돌연변이생성을 이용한 스크리닝에 의해 [가령, Ruf *et al.* (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint *et al.* (1993) Gene 137:109-118; Grodberg *et al.* (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman *et al.* (1991) Biochemistry 30:10832-10838; and Cunningham *et al.* (1989) Science 244:1081-1085 참고], 링커 스캐닝 돌연변이생성에 의해 [가령, Gustin *et al.* (1993) Virology 193:653-660; 및 Brown *et al.* (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight *et al.* (1982) Science 232:316) 참고], 포화 돌연변이생성에 의해 [가령, Meyers *et al.*, (1986) Science 232:613 참고]; PCR 돌연변이생성에 의해 [가령, Leung *et al.* (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19 참고]; 또는 화학적 돌연변이생성을 포함하는 무작위 돌연변이 생성 [가령, Miller *et al.* (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 및 Greener *et al.* (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34 참고] 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 특히 복합 세팅에서 링커 스캐닝 돌연변이생성은 ActRII 폴리펩티드의 절두된 (생활성) 형태를 확인하는 매력적인 방법이다.

[0232] 점 돌연변이 및 절두에 의해 만들어진 복합 라이브러리의 유전자 산물을 스크리닝하기 위하여, 그리고 그 경우, 특정 성질을 가진 유전자 산물의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 광범위한 기술들이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 기술은 본 명세서의 리간드 트랩의 복합 돌연변이생성에 의해 생성된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝에 일반적으로 적합할 것이다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위하여 가장 광범위하게 이용되는 기술은 전형적으로 복제가능한 발현 벡터 안으로 유전자 라이브러리의 클로닝, 생성된 벡터 라이브러리로 적절한 세포를 형질변환시키고, 그리고 원하는 활성의 탐지는 유전자의 산물이 탐지되는 이 유전자를 인코딩하는 벡터의 상대적으로 용이한 단리를 실행하게 하는 조건하에 복합 유전자를 발현시키는 것을 포함한다. 선호되는 분석은 GDF11, 액티빈 B, 및/또는 액티빈 결합 분석 및 GDF11-, 액티빈-B-, 및/또는 액티빈-중재된 세포 신호생성 분석을 포함한다.

[0233] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 리간드 트랩 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)은 ActRII 폴리펩티드 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드)에 자연적으로 존재하는 임의의 것에 추가하여 해독후 변형을 더 포함할 수 있다. 이러한 변형은 아세틸화, 카르복실화, 글리코실화, 포스포릴화, 지질화, 그리고 아실화를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 그 결과, 변형된 리간드 트랩 폴리펩티드는 비-아미노산 요소들, 이를 테면 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 폴리- 또는 모노-사카라이드 및 포스페이트를 포함할 수 있다. 리간드 트랩 폴리펩티드의 기능에 있어서 이러한 비-아미노산 요소들의 효과는 다른 리간드 트랩 폴리펩티드 변이체들에 대하여 본 명세서에서 설명된 바와 같이 테스트될 수 있다. 리간드 트랩 폴리펩티드는 리간드 트랩 폴리펩티드의 고유 형태를 절단함으로써 세포에서 생성되고, 해독-후 처리과정은 단백질의 정확한 폴딩 및/또는 기능에 또한 중요할 수 있다. 상이한 세포 (가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이러한 해독-후 활성에 대하여 특이적 세포성 기전 및 특징을 보유하며, 리간드 트랩 폴리펩티드의 정확한 변형 및 가공이 확보되도록 선택될 수 있다.

[0234] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서의 리간드 트랩 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)은 ActRII 폴리펩티드 (가령, ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드)의 최소한 한 부분(도메인) 및 하나 또는 그 이상의 이종성 부분(도메인)을 갖는 융합 단백질들을 포함한다. 이러한 융합 도메인의 잘 알려진 예로는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S 전이효소 (GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로블린 중쇄 불변영역 (Fc), 말토즈 결합 단백질 (MBP), 또는 인간 혈청 알부민을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 원하는 성질을 부여하기 위하여 융합 도메인이 선택될 수 있다. 예를 들면, 일부 융합 도메인은 친화력 크로마토그래피에 의해 융합 단백질의 단리에 특히 유용하다. 친화력 정제를 목적으로 친화력 크로마토그래피의 관련 매트릭스, 이를 테면 글루타티온-, 아밀라제-, 및 니켈- 또는 코발트-공액된 수지가 이용된다. 이러한 매트릭스의 많은 것들이 "키트" 형태, 이를 테면 Pharmacia GST 정제 시스템 및 (HIS₆) 융합 짝과 함께 유용한 QIAexpressTM 시스템 (Qiagen) 이 이용될 수 있다. 또다른 예로써, 리간드 트랩 폴리펩티드의 탐지를 실행하기 위하여 융합 도메인이 선택될 수 있다. 이러한 탐지 도메인의 예로는 다양한 형광 단백질 (가령, GFP) 뿐만 아니라 "에피토프 태그" 를 포함하는데, 이들은 특이적 항체에 대하여 이용가능한 유용한 짧은 펩티드 서열이다. 용이하게 이용가능한 특이적 단클론 항체에 대하여 잘 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마

글루티닌 (HA), 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우에 있어서, 융합 도메인은 이를 테면, 인자 Xa 또는 트롬빈에 대한 프로테아제 절단 부위를 보유하며, 이는 상기 관련 프로테아제가 상기 융합 단백질들을 부분적으로 절단하도록 허용하고, 이로 인하여 이로부터 상기 재조합 단백질을 해방시킨다. 그 다음 해방된 단백질들은 후속적으로 크로마토그래피 분리에 의해 융합 도메인으로부터 단리될 수 있다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 리간드 트랩은 생체내에서 리간드 트랩 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인과 융합된다 ("안정화" 도메인). "안정화"란 감소된 파괴, 신장에 의한 제거 감소, 또는 다른 약역학적 효과로 인한 것이건 간에, 혈청 반감기를 증가시키는 임의의 것을 의미한다. 면역글로블린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 단백질에서 바람직한 약역학적 성질을 부여하는 것으로 공지되어 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 대한 융합은 바람직한 성질을 부여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 유형의 융합 도메인은 다중화 (가령, 이량체화, 사량체화) 도메인 및 기능적 도메인 (추가 생물학적 기능, 이를 테면 근육 성장의 추가 자극을 부여하는)을 포함한다.

[0235] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 다음의 Fc 도메인에 융합된 ActRII 단백질의 변이체 세포의 도메인 (가령, 리간드-결합 도메인)을 포함하는 리간드 트랩 융합 단백질을 제공한다:

[0236] THTCPPEPELLGGPSVFLFPPKPKDILMI SRTPEVTCVVVD(A) VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVP I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G P F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N (A) H Y T Q K S L S L S P G K (서열 번호:16).

[0237] 다른 구체예들에 있어서, 본 명세서는 다음의 Fc 도메인에 융합된 ActRIIB 단백질의 변이체 세포의 도메인 (가령, 리간드-결합 도메인)을 포함하는 리간드 트랩 융합 단백질을 제공한다:

[0238] SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWLD D F N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V Y F C C E G N F C N E R F T H L P E A G G P E V T Y E P P T A P T G G G T H T C P P C A P E L L G G P S V F L F P P K P K D I L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P V P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (서열 번호:47)

[0239] A64 치환을 가진 또다른 형태는 다음과 같다:

[0240] SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGT IELVKKGCWLD D F N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V Y F C C E G N F C N E R F T H L P E A G G P E V T Y E P P T A P T G G G T H T C P P C A P E L L G G P S V F L F P P K P K D I L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P V P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (서열 번호:17).

[0241] 임의선택적으로, Fc 도메인은 잔기에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이, 이를 테면 Asp-265, 리신 322, 및 Asn-434을 갖는다. 특정 경우에서, 이들 돌연변이중 하나 또는 그 이상 (가령, Asp-265 돌연변이)을 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여, Fc γ 수용체에 대한 결합 능력이 감소된다. 다른 경우들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 이들 돌연변이 (가령, Asn-434 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC 클래스 I-관련된 Fc-수용체 (FcRN)에 결합하는 결합 능력이 증가된다.

[0242] 융합 단백질의 상이한 요소들은 원하는 기능이 일관되도록 임의의 방식으로 배열될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들면, 리간드 트랩 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)은 이중성 도메인의 C-말단에 위치할 수 있거나, 대안으로, 이중성 도메인은 리간드 트랩 도메인에 대하여 C-말단에 위치될 수 있다. 리간드 트랩 도메인과 상기 이중성 도메인은 융합 단백질에서 인접해있을 필요가 없으며, 추가 도메인 또는 아미노산 서열들은 어느 쪽 도메인의 C- 또는 N-말단에 포함되거나 또는 도메인 사이에 포함될 수 있다.

[0243] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 리간드 트랩 (가령 GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)은 리간드 트랩 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 또는 그 이상의 변형을 포함한다. 예를 들면, 이러한 변형은 리간드 트랩 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 강화시키고, 리간드 트랩 폴리펩티드의 순환 반감기를 강화시키고, 및/또는 리간드 트랩 폴리펩티드의 단백질분해성 분해를 감소시킨다. 이러한 안정화 변형은 융합 단백질 (예를 들면, 리간드 트랩 및 안정화 도메인을 포함하는 융합 단백질이 포함되며), 글리코실화 부위의 변형 (예를 들면, 리간드 트랩 폴리펩티드에 글리코실화 부위의 추가를 포함), 그리고 탄수화물 모이어티의 변형 (예를 들면, 리간드 트랩 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거를 포함)을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 용어 "안정화 도메인"은 융합 도메인 (가령, 면역글로블린 Fc 도메인)을 지칭할 뿐만 아니라, 융합 단백질의 경우, 비-단백질성 변형 이를 테면 탄수화물 모이어티, 또는 비-단백질성 모이어티, 이를 테면 폴리에틸렌 글리콜을 또한 포함한다.

- [0244] TPA 링커가 포함된 ActRIIA-Fc 융합 단백질의 예는 하기에서 제공된다:
- [0245] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAA ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRDTCVEKKDS
PEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVQTPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호:18).
- [0246] TPA 리더 서열은 한줄 밑줄로 표시되며; TGGG 링커 도메인은 두줄 밑줄로 표시되며; 그리고 상기 번역글로블린 Fc 도메인은 굵은 글자로 표시된다.
- [0247] 이 폴리펩티드는 다음의 핵산 서열에 의해 인코딩된다:
- [0248] ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCGGGTAATGAGAATTC (서열 번호:19)
- [0249] CHO 세포 계통으로부터 정제된 성숙 ActRIIA-Fc 융합 단백질의 예는 하기에 제공된다:
- [0250] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV
 TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호:20)
- [0251] TGGG 링커 도메인은 두줄 밑줄로 표시되며; 그리고 상기 번역글로블린 Fc 도메인은 굵은 글자로 표시된다.
- [0252] TPA 링커가 포함된 ActRIIB-Fc 융합 단백질의 예는 하기에서 제공된다:
- [0253] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEEN
PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 21)
- [0254] TPA 리더 서열은 한줄 밑줄로 표시되며; TGGG 링커 도메인은 두줄 밑줄로 표시되며; 그리고 상기 번역글로블린 Fc 도메인은 굵은 글자로 표시된다.
- [0255] 이 폴리펩티드는 다음의 핵산 서열에 의해 인코딩된다:
- [0256] ATGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG
 AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG GCTCGATGAC TTCAACTGCT
 ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGG CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA
 AGCCCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCT ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA
 CCTGCCCC ATCCCGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT CAGCTGACC TGCTGGTCA AAGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTTCTCTC TATAGCAAGC
 TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCCTCT GTCTCCGGT AAATGA (서열 번호:22).
- [0257] CHO 세포 계통으로부터 정제된 성숙 ActRIIB-Fc 융합 단백질 [본 명세서에서 ActRIIB(20-134)-Fc로 지칭됨]의 예는 하기에 제공된다:
- [0258] *GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG
 GPEVYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호:48)
- [0259] 번역글로블린 Fc 도메인은 한줄 밑줄로 표시된다.

- [0260] L79D 치환 [ActRIIB(L79D 20-134)-Fc로 지칭됨]을 가진 또다른 형태는 다음과 같다:
- [0261] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP^{IE}KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TT}TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHY^TQKSLS^LSPGK (서열 번호:23)
- [0262] 면역글로블린 Fc 도메인은 한줄 밑줄로 표시된다.
- [0263] 이중-절두된 ActRIIB 도메인 및 L79D 치환을 포함하는 대안 형태 [ActRIIB(L79D 25-131)-Fc로 지칭됨]는 다음과 같다:
- [0264] ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP^{IE}KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TT}TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHY^TQKSLS^LSPGK (서열 번호:49)
- [0265] 면역글로블린 Fc 도메인은 한줄 밑줄로 표시된다.
- [0266] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 리간드 트랩 융합 단백질 (가령, GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)은 서열 번호: 18, 20, 21, 23, 48, 및 49중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 리간드 트랩 융합 단백질은 서열 번호: 18, 20, 21, 23, 48 및 49중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 다른 바람직한 구체예들에 있어서, 서열 번호: 21 또는 23의 아미노산 서열에 대하여 최소한 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열이 포함된 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 융합 단백질은 서열 번호: 1 또는 2의 위치 79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산을 포함하지 않는다.
- [0267] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드의 이용가능한 단리된 및/또는 정제된 형태를 만드는데, 이는 다른 단백질로부터 단리되거나, 또는 실질적으로 다른 단백질이 없다.
- [0268] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 리간드 트랩 폴리펩티드는 다양한 당분야에 공지된 기술에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들면, 리간드 트랩 폴리펩티드는 표준 단백질 화학 기술, 이를 테면 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)에서 설명된 것들을 이용하여 합성될 수 있다. 또한, 자동화된 펩티드 합성기는 상업적으로 이용가능하다 (가령, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600 참고). 대안으로, 리간드 트랩 폴리펩티드, 이의 단편들 또는 이의 변이체는 당분야에 공지된 바와 같이 다양한 발현계 (가령, 대장균, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, COS 세포, 배큘로바이러스)를 이용하여 제조합적으로 만들어질 수 있다. 추가 구체예에서, 변형된 변형안된 리간드 트랩 폴리펩티드는 예를 들면, 프로테아제, 가령, 트립신, 토모리신, 키모트립신, 펩신, 또는 쌍을 이룬 염기성 아미노산 전환 효소 (PACE)를 이용하여 제조합에 의해 만들어진 전장 리간드 트랩 폴리펩티드를 절단하여 만들어질 수 있다. 컴퓨터 분석 (상업적으로 이용가능한 소프트웨어, 가령, Mac벡터, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)을 이용하여 단백질분해성 절단 부위들을 확인할 수 있다. 대안으로, 이러한 리간드 트랩 폴리펩티드는 이를 테면 당분야에 공지된 표준 기술, 이를 테면 화학적 절단 (가령, 시아노젠 브롬화물, 히드록실아민)에 의해, 제조합적으로 생산된 전장 리간드 트랩 폴리펩티드로부터 생산될 수 있다.
- [0269] 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 설명된 방법에 따라 이용되는 본 명세서의 모든 단백질 및 폴리펩티드(가령, GDF11/액티빈 B 트랩, GDF11 트랩, 및 액티빈 B 트랩)는 단리된 단백질 및 폴리펩티드다. 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 단리된 단백질 또는 폴리펩티드는 이의 자연 환경 성분으로부터 분리되었다. 일부 구체예들에 있어서, 단백질 또는 폴리펩티드는 예를 들면, 전기영동의 (예로써, SDS-PAGE, 등전초점조절 (IEF), 모세관전기이동) 또는 크로마토그래프 (예로써, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정되었을 때 95% 또는 99% 순도이상으로 정제된다. 항체 순도의 평가 방법은 당분야에 잘 공지되어 있다 [가령, Flatman *et al.*, (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87 참고].
- [0270] 본 명세서에서 공개된 임의의 리간드 트랩 폴리펩티드 (가령, GDF11 트랩, 액티빈 B 트랩, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩)는 원하는 효과를 획득하기 위하여 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 추가 길항제 물질과 복합될 수 있다.

본 명세서에서 공개된 리간드 트랩 폴리펩티드(가령, GDF11 트랩 폴리펩티드, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드)는 본 명세서에서 공개된 또다른 리간드 트랩 폴리펩티드, 또는 본 명세서의 임의의 표적을 지향하는 항체(가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 A 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-액티빈 C 항체, 항-액티빈 E 항체, 항-GDF8 항체, 항-BMP6 항체, 항-ActRIIA 항체, 항-ActRIIB 항체, 항-GDF15 항체, 항-Nodal 항체, 항-GDF3 항체, 항-BMP3 항체, 항-BMP3B 항체, 항-BMP9 항체, 또는 항-BMP10 항체), 또는 본 명세서의 임의의 표적을 지향하는 작은-분자 길항제 (가령, 액티빈 B 작은-분자 길항제, 액티빈 B 작은-분자 길항제, GDF11 작은-분자 길항제, 액티빈 C 작은-분자 길항제, 액티빈 E 작은-분자 길항제, GDF8 작은-분자 길항제, BMP6 작은-분자 길항제, GDF15 작은-분자 길항제, Nodal 작은-분자 길항제, GDF3 작은-분자 길항제, BMP3 작은-분자 길항제, BMP3B 작은-분자 길항제, BMP9 작은-분자 길항제, 또는 BMP10 작은-분자 길항제), 또는 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, 또는 BMP6의 폴리뉴클레오티드 길항제), 또는 본 명세서에서 공개된 비-항체 결합 폴리펩티드 (가령, GDF11 결합 폴리펩티드, 액티빈 B 결합 폴리펩티드, 액티빈 B 결합 폴리펩티드, 액티빈 E 결합 폴리펩티드, 액티빈 C 결합 폴리펩티드, GDF8 결합 폴리펩티드, BMP6 결합 폴리펩티드, GDF15 결합 폴리펩티드, Nodal 결합 폴리펩티드, BMP3 결합 폴리펩티드, GDF3 결합 폴리펩티드, BMP3B 결합 폴리펩티드, BMP9 결합 폴리펩티드, 또는 BMP10 결합 폴리펩티드)와 복합될 수 있다. 예를 들면, GDF11 및 액티빈 B 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합하고 및/또는 활성화시키는 능력)의 모두를 저해하기 위하여, GDF11 트랩 폴리펩티드는 본 명세서의 액티빈 B 길항제(가령, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드, 항-액티빈 B 항체, 액티빈 B의 작은-분자 길항제, 액티빈 B의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 액티빈 B의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합될 수 있다. 대안 구체예에서, 대안 구체예에서, GDF11 및 액티빈 B 활성 모두를 저해하기 위하여, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드는 본 명세서의 GDF11 길항제(가령, GDF 트랩 폴리펩티드, 항-GDF11 항체, GDF11의 작은-분자 길항제, GDF11의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 GDF11의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합될 수 있다.

[0271] **C. 트랩 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 및 재조합 방법들**

[0272] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 및/또는 재조합 핵산 (가령, 가용성 ActRIIA 폴리펩티드 및 가용성 ActRIIB 폴리펩티드)을 제공하고, 여기에는 본 명세서에서 공개된 단편, 기능적 변이체, 및 융합 단백질이 포함된다. 예를 들면, 서열 번호:12는 자연 발생 인간 ActRIIA 전구물질 폴리펩티드를 인코딩하고, 서열 번호:13은 ActRIIA의 가공된 세포외 도메인을 인코딩한다. 예를 들면, 서열 번호:7은 자연 발생 인간 ActRIIB 전구물질 폴리펩티드 (상기 설명된 A64 변이체)를 인코딩하고, 한편 서열 번호:8은 ActRIIB의 가공된 세포외 도메인 (상기 설명된 A64 변이체)을 인코딩한다. 상기 대상 핵산은 단일-가닥으로 된 또는 이중-가닥으로 된 것일 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 이들 핵산은 예를 들면, 본 명세서의 ActRII-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드를 만드는 방법에 이용될 수 있다.

[0273] 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 단리된 핵산(들)은 이의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 보통 함유하는 세포들 안에 포함된 핵산 분자를 포함하지만, 상기 핵산 분자는 염색체의 또는 이의 천연 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 존재한다

[0274] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIA-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 서열 번호: 12 또는 13의 변이체인 핵산을 포함하는 것으로 이해된다. 특정 측면들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 서열 번호: 7 또는 8의 변이체인 핵산을 포함하는 것으로 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열들은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 치환, 추가 또는 결손에 의해 상이한 서열, 이를 테면 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 명세서의 핵산은 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 A에 결합하여, 이의 활성을 길항하는 ActRIIA- 및 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드를 인코딩한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 핵산은 액티빈 A에 실질적으로 결합하지 않고 및/또는 이를 저해하지 않는 ActRIIA- 및 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드를 인코딩한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B에 결합하고 및/또는 이를 저해하는 ActRIIA- 및 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 핵산은 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, 및 BMP6중 하나 또는 그 이상에 더 결합하고 및/또는 이를 저해한다.

[0275] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIA- 및 ActRIIB-기반의 리간드 트랩은 서열 번호: 8, 13, 19, 및 22에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 단리된 또는 재조합 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIA- 및 ActRIIB-기반의 리간드 트랩은 서열 번호: 8, 13, 19, 및 22중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되지 않는다. 당업자는 서열 번호: 8, 13, 19, 및 22에 상보적인 서열에 대하여 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%

동일한 핵산 서열, 및 이의 변이체 또한 이 서열들이 서열 번호 8, 13, 19, 및 22에 대하여 보체인 서열을 포함하거나 이로 구성되지 않는 한, 본 명세서의 범위 안에 있음을 인지할 것이다. 추가 구체예들에 있어서, 본 명세서의 핵산 서열들은 단리되거나, 재조합되거나, 및/또는 이중성 뉴클레오티드 서열과 융합되거나, 또는 DNA 라이브러리 안에 있다.

[0276] 다른 구체예들에 있어서, 본 명세서의 핵산은 서열 번호: 8, 13, 19, 및 22의 뉴클레오티드를 포함하거나 또는 구성되지 않는 한, 서열 번호: 8, 13, 19, 및 22로 지정된 뉴클레오티드 서열, 서열 번호: 8, 13, 19, 및 22의 보체 서열, 또는 이의 단편들에게 매우 엄격한 조건하에서 혼성화되는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함한다. 상기 논의된 바와 같이, 당업자는 DNA 혼성화를 촉진시키는 적절한 엄격한 조건은 변화될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들면, 약 45 °C에서 6.0 x 염화나트륨/구연산나트륨 (SSC)에서 혼성화할 수 있고, 50 °C에서 2.0 x SSC의 세척을 실행할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서 염 농도는 50 °C에서 약 2.0 x SSC의 낮은 엄격성에서부터 약 0.2 x SSC at 50 °C에서 약 0.2 x SSC의 높은 엄격성으로부터 선택될 수 있다. 또한, 세척 단계에서 온도는 실온, 약 22 °C에서 낮은 엄격성 조건으로부터 약 65 °C에서 높은 엄격성 조건으로 증가될 수 있다. 온도와 염은 모두 변화될 수 있거나, 또는 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지되면서, 다른 변수들이 변화된다. 한 구체예에서, 본 명세서는 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄격성 조건하에 혼성화하고, 실온에서 2 x SSC로 세척되는 핵산이 제공된다.

[0277] 유전적 코드에서 축중성으로 인하여 서열 번호: 8, 13, 19, 및 22에서 제시된 핵산과는 상이한 단리된 핵산 또는 본 명세서의 범위 안에 있다. 예를 들면, 얼마간의 아미노산이 하나이상의 트리플렛에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 명시한 코돈, 또는 동의어 (예를 들면, CAU 와 CAC는 히스티딘에 대하여 동의코드다)는 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 "침묵" 돌연변이를 야기할 수 있다. 그러나, 상기 대상 단백질의 아미노산 서열에서 변화를 유도하는 DNA 서열 다형성은 포유류 세포 간에 존재할 수 있는 것으로 예상된다. 당분야의 업자는 특정 단백질을 인코딩하는 핵산의 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 (뉴클레오티드의 최대 3-5%)에서 이러한 변화는 자연적 대립 유전자 변이로 인하여 주어진 종의 개체 간에 존재할 수 있음을 인지할 것이다. 임의의 그리고 모든 이러한 뉴클레오티드 변이 및 생성된 아미노산 다형성은 이 명세서의 범위 안에 있다.

[0278] 특정 구체예들에 있어서, 재조합 본 명세서의 핵산은 발현 구조체에서 하나 또는 그 이상의 조정 뉴클레오티드 서열에 작동가능하도록 연계될 수 있다. 조정 뉴클레오티드 서열은 발현을 위하여 이용되는 숙주 세포에 일반적으로 적절할 것이다. 다양한 숙주 세포에 대하여 다수 유형의 적절한 발현 벡터 및 적절한 조정 서열들이 당업계에 공지되어 있다. 전형적으로, 전술한 하나 또는 그 이상의 조정 뉴클레오티드 서열들은 프로모터 서열들, 리더 또는 신호 서열들, 리보솜 결합 부위, 전사 시작 및 종료 서열들, 해독 시작 및 종료 서열들, 및 인핸서 또는 활성제 서열들을 포함하나, 이에 국한되지 않을 수 있다. 당분야에 공지된 바와 같이 구성 또는 유도성 프로모터는 본 명세서에 의해 고려된다. 프로모터는 자연 발생 프로모터, 또는 하나 이상의 프로모터의 요소들을 복합시키는 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 구조체는 세포 안 에피솜, 이를 테면 플라스미드 상에 존재할 수 있거나, 또는 발현 구조체는 염색체 안에 삽입될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 발현 벡터는 형질변환된 숙주 세포의 선별을 허용하는 선택가능한 표지 유전자를 포함한다. 선택가능한 표지 유전자들은 당분야에 잘 공지되어 있고, 이용된 숙주 세포 안에서 변화될 것이다.

[0279] 본 명세서의 특정 측면들에 있어서, 최소한 한 가지 조정 서열에 작동가능하도록 연계된 ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 포함된, 대상 핵산이 제공된다. 조정 서열들은 당업계에서 인지되고 있으며, ActRII 폴리펩티드의 발현을 지시하기 위하여 선택된다. 따라서, 용어 조정 서열은 프로모터, 인핸서, 및 기타 발현 조절 요소들을 포함한다. 예시적인 조정 서열들은 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 설명된다. 예를 들면, ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열들을 발현시키기 위하여, 작동가능하도록 연계된 DNA 서열의 발현을 조절하는 광범위한 발현 조절 서열이 이용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열들은 예를 들면, SV40의 초기 및 후기 프로모터, *tet* 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터, RSV 프로모터, *lac* 시스템, *trp* 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 RNA 폴리메라제에 의해 이의 발현이 지시되는 T7 프로모터, 파아지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질에 대한 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소에 대한 프로모터, 산 포스포타제, *gpr*, Pho5의 프로모터, 효모 α -작짓기 인자의 프로모터, 베크로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터 및 원핵 또는 진핵 세포의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 다른 서열 또는 이의 다양한 조합을 포함한다. 발현 벡터의 기획은 형질변환되는 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되기를 바라는 단백질 유형과 같은 인자에 따라 달라질 수 있음을 이해해야 한다. 더욱이, 벡터의 복사체 수, 복사체 수를 조절하는 능력 그리고 이 벡터에 의해 인코딩된 임의의 다른 단백질의 발현, 이를 테면 항생제 표지

들이 또한 고려되어야 한다.

- [0280] 본 명세서의 재조합 핵산은 원핵 세포, 진핵 세포 (효소, 조류, 곤충 또는), 또는 이들 모두에서 발현에 적절한 벡터 안으로 클론된 유전자 또는 이의 부분을 결찰시킴으로써 만들어질 수 있다. 재조합 ActRII 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 비이클은 플라스미드 및 기타 벡터를 포함한다. 예를 들면, 적절한 벡터는 다음 유형의 플라스미드를 포함한다: 원핵 세포, 이를 테면 대장균(*E. coli*) 안에서 발현을 위하여 pBR322-유도된 플라스미드, pEMBL-유도된 플라스미드, pEX-유도된 플라스미드, pBTac-유도된 플라스미드 그리고 pUC-유도된 플라스미드.
- [0281] 일부 포유류 발현 벡터는 박테리아 안에서 벡터의 증식을 촉진시키기 위한 원핵 서열들, 그리고 진핵 세포에서 발현되는 하나 또는 그 이상의 진핵 전사 단위를 모두 포함한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유도된 벡터는 진핵 세포의 형질감염에 적절한 포유류 발현 벡터의 예들이다. 이들 벡터중 일부는 진핵 및 원핵 세포 모두에서 복제 및 약물 저항성 선택을 촉진시키기 위하여 박테리아성 플라스미드, 이를 테면 pBR322의 서열로 변형된다. 대안으로, 바이러스의 유도체들, 이를 테면 소의 파필로마 바이러스 (BPV-1), 또는 Epstein-Barr 바이러스 (pHEBo, pREP-유도된 그리고 p205)는 진핵 세포 안에서 단백질의 일시적인 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스 (레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 예는 유전자 요법 전달 시스템의 설명에서 하기에서 볼 수 있다. 플라스미드의 조제물 및 숙주 유지체의 형질변환에 이용되는 다양한 방법들은 당분야에 잘 공지되어 있다. 원핵 및 진핵 세포를 위한 기타 적절한 발현 시스템, 뿐만 아니라 일반적인 재조합 과정 [가령, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) 참고]. 일부 경우들에 있어서, 베칼로바이러스 발현 시스템의 이용에 의해 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 베칼로바이러스 발현 시스템은 pVL-유도된 벡터 (이를 테면 pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도된 벡터 (이를 테면 pAcUW1), 그리고 pBlueBac-유도된 벡터 (이를 테면 β -gal 함유하는 pBlueBac III)를 포함한다.
- [0282] 일부 구체예들에 있어서, CHO 세포에서 대상 ActRII 폴리펩티드를 생산하기 위하여 기획될 수 있는데, 이를 테면 Pcmv-Script 벡터 (Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터 (Promega, Madison, Wisc.)이다. 명백한 것은, 상기 대상 유전자 구조체는 배양물에서 증식된 세포 안에 상기 대상 ActRII 폴리펩티드의 발현을 야기시키기 위하여, 가령, 정제를 위하여 용합 단백질 또는 변이체 단백질이 포함된 단백질을 생산하기 위하여 이용될 수 있다.
- [0283] 이 명세서는 하나 또는 그 이상의 대상 ActRII 폴리펩티드를 위한 코딩 서열이 포함된 재조합 유전자에 의해 형질감염된 숙주 세포와 관련된다. 이 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들면, ActRII 폴리펩티드는 박테리아 세포 이를 테면 대장균(*E. coli*), 곤충 세포 (가령, 베칼로바이러스 발현 시스템을 이용), 효모, 또는 포유류 세포에서 발현될 수 있다. 다른 적절한 숙주 세포들은 당업계 숙련자들에게 공지되어 있다.
- [0284] 따라서, 본 명세서는 상기 대상 ActRII 폴리펩티드를 생산하는 방법에 더 관계한다. 예를 들면, ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ActRII 폴리펩티드의 발현을 허용하는 적절한 조건하에서 배양될 수 있다. 상기 ActRII 폴리펩티드는 분비되고, 그리고 ActRII 폴리펩티드가 포함된 세포와 배지 혼합물로부터 단리될 수 있다. 대안으로, 상기 ActRII 폴리펩티드는 세포질에 유지되거나 또는 막 분획안에 유지될 수 있고, 이들 세포를 수거하고, 용해하여, 단백질이 단리된다. 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양을 위한 적절한 배지는 당분야에 잘 공지되어 있다. 상기 대상 ActRII 폴리펩티드는 이 단백질을 정제하기 위하여, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외 여과, 전기영동, ActRII 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체를 이용한 면역 친화력 정제 및 ActRII 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 물질을 이용한 친화력 정제 (가령, 단백질 A 컬럼은 ActRIIA-Fc 또는 ActRIIB-Fc 융합을 정제하기 위하여 이용될 수 있다)이 포함된, 당분야에 공지된 기술을 이용하여, 세포 배양 배지, 숙주 세포 또는 이들 모두로부터 단리될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 ActRII 폴리펩티드는 이의 정제를 용이하게 하는 도메인이 포함된 융합 단백질이다. 일부 구체예들에 있어서, 예를 들면, 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 컬럼 크로마토그래피 단계에 의해 정제가 이루어진다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 환층액 교환에 의해 완성될 수 있다. ActRIIB-hFc 또는 ActRIIA-hFc 단백질은 크기 압출 크로마토그래피에 의해 측정될 경우 >90%, >95%, >96%, >98%, 또는 >99%의 순도로 그리고 SDS PAGE에 의해 측정될 경우 >90%, >95%, >96%, >98%, 또는 >99% 순도로 정제될 수 있다. 순

도의 목표 수준은 포유류 시스템, 특히 비-인간 영장류, 설치류 (마우스), 및 인간에서 바람직한 결과를 얻는데 충분한 것이어야 한다.

[0285] 또다른 구체예에서, 정제 리더 서열을 코딩하는 융합 유전자, 이를 테면 재조합 ActRII 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에서 폴리-(His)/엔테로키나제 절단 부위 서열은 Ni²⁺ 금속 수지를 이용하여 친화력 크로마토그래피에 의해 발현된 융합 단백질의 정제를 허용할 수 있다. 그 다음 상기 정제 리더 서열은 엔테로키나제에 의해 처리됨으로써 후속적으로 제거되어, 정제된 ActRII 폴리펩티드가 제공될 수 있다. *가령*, Hochuli *et al.* (1987) *J. Chromatography* 411:177; 및 Janknecht *et al.* *PNAS USA* 88:8972 참고).

[0286] 융합 유전자들을 만드는 기술은 잘 공지되어 있다. 기본적으로, 상이한 폴리펩티드 서열들을 코딩하는 다양한 DNA 단편들의 연결은 결찰을 위한 블린트(blunt)-말단 또는 스테그(stagger)-말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 절단, 코헤시드 단부를 채우고, 바람직하지 못한 연결은 회피되도록 적절한 알칼리 포스파타제 처리, 그리고 효소 결찰을 이용하는 통상적인 기술에 따라 실행된다. 또다른 구체예에서, 상기 융합 유전자는 자동화된 DNA 합성기를 이용하는 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 2개의 연속 유전자 단편 사이에 임의의 상보적인 오버행을 만드는 앵커 프라이머를 이용하여 실행되고, 이들 연속 단편은 후속적으로 어닐되어, 키메라 유전자 서열이 만들어진다 [*가령*, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992 참고].

[0287] **D. 기타 결합 폴리펩티드**

[0288] 또다른 측면에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질 또는 물질의 조합은 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 결합하고, 및/또는 이의 활성 (*가령*, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성의 활성화)을 억제하는 비-항체 결합 폴리펩티드다. 임의선택적으로, 본 명세서의 비-항체 결합 폴리펩티드, 또는 비-항체 결합 폴리펩티드의 조합은 액티빈 A에 결합하고, 및/또는 이의 활성 (*가령*, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성의 액티빈 A-중재된 활성화)을 억제하지 못한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 비-항체 결합 폴리펩티드, 또는 비-항체 결합 폴리펩티드의 조합은 GDF8에 더 결합하고 및/또는 이의 활성 (*가령*, GDF8-중재된 활성화 of ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성)을 더 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B에 결합하고 및/또는 이의 활성을 저해하는 본 명세서의 비-항체 결합 폴리펩티드, 또는 비-항체 결합 폴리펩티드의 조합은 액티빈 E, 액티빈 C, 액티빈 A, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상에 더 결합하고 및/또는 이의 활성 (*가령*, ActRIIA 또는 ActRIIB Smad2/3 및/또는 Smad 1/5/8 신호생성의 활성화)을 더 저해한다. 특정 구체예들에 있어서, BMP9 및/또는 BMP10에 결합하는 비-항체-결합 폴리펩티드는 BMP9와 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체 (*가령*, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 간의 상호작용 및/또는 BMP10와 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체 (*가령*, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 간의 상호작용을 저해한다. 바람직하게는, BMP9 및/또는 BMP10에 결합하는 비-항체-결합 폴리펩티드는 BMP9와 ALK1 및/또는 BMP10과 ALK1 사이의 상호작용을 저해하지 않거나, 또는 실질적으로 저해하지 않는다.

[0289] 본 명세서의 결합 폴리펩티드는 공지의 폴리펩티드 합성 방법을 이용하여 화학적으로 합성되거나 또는 재조합 기술을 이용하여 준비되고, 정제될 수 있다. 결합 폴리펩티드의 길이는 보통 최소한 약 5개 아미노산이며, 대안으로 최소한 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100개 또는 그 이상의 아미노산이며, 여기에서 이러한 결합 폴리펩티드는 바람직하게는 본 명세서에서 설명된 바와 같은 표적 (*가령*, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 E, 액티빈 C, GDF8, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10)에 특이적으로 결합할 수 있다. 결합 폴리펩티드는 공지된 기술을 이용하여 과도한 실험없이 확인될 수 있다. 이 점에 있어서, 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 폴리펩티드에 대한 폴리펩티드 라이브러리를 스크리닝하기 위한 기술은 예를 들면, U.S. 특허 5,556,762; 5,750,373; 4,708,871; 4,833,092; 5,223,409; 5,403,484; 5,571,689; 및 5,663,143; PCT 공개 WO 84/03506 및 W084/03564; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:178-182; Geysen *et al.* (1986) in *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149; Geysen *et al.* (1987) *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274; Schoofs *et al.* (1988) *J. Immunol.*, 140:611-616, Cwirlla, S. E. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378; Lowman, H. B. *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. *et al.* (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang,

A. S. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, and Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668과 같이 당분야에 잘 공지되어 있다.

- [0290] 이 점에 있어서, 박테리오파아지 (파아지) 디스플레이는 표적 폴리펩티드 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 E, 액티빈 C, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10)에 특이적으로 결합할 수 있는 이들 라이브러리의 구성요소(들)를 확인하기 위하여 큰 폴리펩티드 라이브러리를 스크리닝할 수 있는 하나의 잘 공지된 기술이다. 파아지 디스플레이는 박테리오파아지 입자의 표면 상에 피복 단백질에 융합 단백질로 나타난다 [가령, Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science, 249: 386 참고]. 파아지 디스플레이의 유용성은 선택적으로 무작위화된 단백질 변이체 (또는 무작위로 클론된 cDNAs)는 높은 친화력으로 표적 분자에 결합하는 이들 서열에 대하여 신속하고 효과적으로 분류될 수 있다는 사실에 있다. 파아지 상의 펩티드 [가령, Cwirlla, S. E. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378] 또는 단백질 [Lowman, H. B. *et al.* (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. *et al.* (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A. S. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363] 라이브러리의 디스플레이는 특이적 결합 성질을 가진 것에 대하여 수만개의 폴리펩티드 또는 올리고펩티드를 스크리닝하는데 이용되어 왔었다 [가령, Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668 참고]. 무작위 돌연변이체의 파아지 라이브러리의 분류는 다수 변이체들을 구축하고 증폭시키는 전력, 표적 수용체를 이용한 친화력 정제 과정, 그리고 결합 농축 결과를 평가하는 수단을 요구한다 (가령, U.S. 특허 5,223,409; 5,403,484; 5,571,689; 및 5,663,143).
- [0291] 대부분 파아지 디스플레이 방법은 필라멘트 파아지를 이용하지만, 람도이드(lambdoid) 파아지 디스플레이 시스템 (가령, WO 95/34683; 및 U.S. 특허 5,627,024 참고), T4 파아지 디스플레이 시스템 [가령, Ren *et al.* (1998) 유전자, 215: 439; Zhu *et al.* (1998) Cancer Research, 58(15): 3209-3214; Jiang *et al.* (1997) 감염 & Immunity, 65(11): 4770-4777; Ren *et al.* (1997) Gene, 195(2):303-311; Ren (1996) Protein Sci., 5: 1833; Efimov *et al.* (1995) 바이러스 Genes, 10: 173 참고] 그리고 T7 파아지 디스플레이 시스템 [가령, Smith and Scott (1993) Methods in Enzymology, 217: 228-257; 및 U.S. 특허 5,766,905 참고] 또한 공지되어 있다.
- [0292] 선택된 표적 분자들에 대한 결합에 대한 펩티드 라이브러리를 스크리닝하고, 원하는 성질에 대한 이들 단백질의 스크리닝 능력을 가진 기능적 단백질을 나타내는 디스플레이 시스템의 능력을 개선시키는 추가 개선은 당분야에 공지되어 있다. 파아지 디스플레이 반응을 위한 복합 반응 기구가 개발되었고(가령, WO 98/14277 참고) 그리고 파아지 디스플레이 라이브러리는 생분자 상호작용을 분석 및 조절하고(가령, WO 98/20169; 및 WO 98/20159 참고) 그리고 통제된 나선 펩티드의 성질을 분석 및 조절하는데 이용되어 왔었다(가령, WO 98/20036 참고). 국제 특허 출원 WO 97/35196은 친화력 리간드를 단리시키는 방법을 설명하며, 이때 파아지 디스플레이 라이브러리는 리간드가 표적 분자에 결합하는 한 용액, 그리고 결합 리간드를 선택적으로 단리시키기 위하여, 친화력 리간드가 상기 표적 분자에 결합하지 않는 제 2 용액과 접촉된다. 국제 특허 출원 WO 97/46251은 친화력 정제된 항체로 무작위 파아지 디스플레이 라이브러리를 바이오패닝(biopanning)하고, 그 다음 결합 파아지를 단리하고, 이어서 높은 친화력 결합 파아지를 단리하기 위하여 마이크로플레이트 웰을 이용한 마이크로패닝 공정 방법이 설명된다. 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 단백질 A를 친화력 테그로 이용하는 것 또한 보고되었다[가령, Li *et al.* (1998) Mol. Biotech., 9:187 참고].
- [0293] WO 97/47314는 복합 라이브러리를 이용하여 효소 특이성을 구별하기 위하여 기질 차감 라이브러리를 이용하는 것이 설명되는데, 이 라이브러리는 파아지 디스플레이 라이브러리일 수 있다. 파아지 디스플레이를 이용하여 세제에 이용을 위한 효소를 선택하는 방법이 국제 특허 공개 WO 97/09446에 설명된다. 특이적 결합 단백질을 선택하는 추가 방법은 예를 들면, U.S. 특허 5,498,538; 5,432,018; 및 국제 특허 공개 WO 98/15833에서 설명된다.
- [0294] 펩티드 라이브러리를 생성하고, 이들 라이브러리를 스크리닝하는 방법은 예를 들면, U.S. 특허 5,723,286; 5,432,018; 5,580,717; 5,427,908; 5,498,530; 5,770,434; 5,734,018; 5,698,426; 5,763,192; 및 5,723,323에서 또한 공개된다.
- [0295] 본 명세서에서 공개된 임의의 비-항체 결합 폴리펩티드 (가령, GDF11 결합 폴리펩티드, 액티빈 B 결합 폴리펩티드, 액티빈 B 결합 폴리펩티드, 액티빈 E 결합 폴리펩티드, 액티빈 C 결합 폴리펩티드, GDF8 결합 폴리펩티드, BMP6 결합 폴리펩티드, GDF15 결합 폴리펩티드, Nodal 결합 폴리펩티드, GDF3 결합 폴리펩티드, BMP3결합 폴리펩티드, BMP3B 결합 폴리펩티드, BMP9 결합 폴리펩티드, 또는 BMP6 결합 폴리펩티드)는 원하는 효

과를 얻기 위하여 본 발명의 하나 또는 그 이상의 추가 길항제 물질과 복합될 수 있다. 본 명세서에서 공개된 비-항체 결합 폴리펩티드(가령, GDF11 결합 폴리펩티드, 액티빈 A 결합 폴리펩티드, 액티빈 B 결합 폴리펩티드, 액티빈 E 결합 폴리펩티드, 액티빈 C 결합 폴리펩티드, GDF8 결합 폴리펩티드, BMP6 결합 폴리펩티드, GDF15 결합 폴리펩티드, Nodal 결합 폴리펩티드, GDF3 결합 폴리펩티드, BMP3결합 폴리펩티드, BMP3B 결합 폴리펩티드, BMP9 결합 폴리펩티드, 또는 BMP6 결합 폴리펩티드)는 본 명세서의 또다른 비-항체 결합 폴리펩티드, 또는 본 명세서의 임의의 표적을 지향하는 항체(가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-액티빈 C 항체, 항-액티빈 E 항체, 항-GDF11 항체, 항-GDF8 항체, 항-BMP6 항체, 항-ActRIIA 항체, 항-ActRIIB 항체, 항-GDF15 항체, 항-Nodal 항체, 항-GDF3 항체, 항-BMP3 항체, 항-BMP3B 항체, 항-BMP9 항체, 또는 항-BMP10 항체) 또는 본 명세서에서 공개된 리간드 트랩 폴리펩티드(가령, GDF11 트랩 폴리펩티드, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드, 또는 GDF11/액티빈 B 트랩 폴리펩티드), 또는 본 명세서의 임의의 표적에 지향되는 작은 분자 또는 본 명세서의 임의의 표적에 지향되는 작은-분자 길항제(가령, 액티빈 B 작은-분자 길항제, 액티빈 B 작은-분자 길항제, GDF11 작은-분자 길항제, 액티빈 C 작은-분자 길항제, 액티빈 E 작은-분자 길항제, GDF8 작은-분자 길항제, BMP6 작은-분자 길항제, GDF15 작은-분자 길항제, Nodal 작은-분자 길항제, GDF3 작은-분자 길항제, BMP3 작은-분자 길항제, BMP3B 작은-분자 길항제, BMP9 작은-분자 길항제, 또는 BMP10 작은-분자 길항제), 또는 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제(가령, 액티빈 B의 폴리뉴클레오티드 길항제, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, 또는 BMP6의 폴리뉴클레오티드 길항제)와 복합될 수 있다. 예를 들면, GDF11-결합 폴리펩티드는 본 명세서의 액티빈 B 길항제(가령, 액티빈 B 트랩 폴리펩티드, 항-액티빈 B 항체, 액티빈 B의 작은-분자 길항제, 액티빈 B의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 액티빈 B의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합되어 GDF11 및 액티빈 B 모두의 활성(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해할 수 있다. 대안 구체예에서, 액티빈-B-결합 폴리펩티드는 본 명세서의 GDF11 길항제(가령, GDF-트랩 폴리펩티드, 항-GDF11 항체, GDF11의 작은-분자 길항제, GDF11의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 GDF11의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합되어, GDF11 및 액티빈 B의 모든 활성이 억제될 수 있다.

[0296] **E. 작은-분자 길항제**

[0297] 또다른 측면에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질 또는 물질의 조합은 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B의 발현(가령, 전사, 해독, 및/또는 세포성 배출)을 저해시키는 작은-분자 길항제다. 임의선택적으로, 본 명세서의 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제의 조합은 액티빈 A의 발현을 저해하지 않는다. 임의선택적으로, 본 명세서의 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제의 조합은 GDF8의 발현을 더 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B의 발현을 저해하는 본 명세서의 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 E, 액티빈 C, 액티빈 A, GDF8, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, 및 BMP3B의 발현을 더 저해한다.

[0298] 또다른 측면에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질 또는 물질의 조합은 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B에 결합하고, 이의 활성(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성의 활성화)을 저해하는 작은-분자 물질이다. 임의선택적으로, 본 명세서의 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제의 조합은 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성(가령, 액티빈 A-중재된 활성화 of ActRIIA 및/또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성)을 저해하지 않는다. 임의선택적으로, 본 명세서의 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제의 조합은 GDF8에 결합하고 이의 활성(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB Smad 2/3 신호생성의 GDF8-중재된 활성화)을 더 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B에 결합하고, 이의 활성을 저해하는 본 명세서의 작은-분자 길항제, 또는 작은-분자 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 E, 액티빈 C, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10에 결합하고, 이의 활성(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB Smad2/3 및/또는 Smad 1/5/8 신호생성의 활성화)을 더 저해한다. 특정 구체예들에 있어서, BMP9 및/또는 BMP10에 결합하는 작은 분자는 BMP9와 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 및/또는 BMP10와 TGFβ 슈퍼패밀리의 유형 II 수용체(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB)간의 상호작용을 저해한다. 바람직하게는, BMP9 및/또는 BMP10에 결합하는 작은 분자는 BMP9와 ALK1 및/또는 BMP10과 ALK1 사이의 상호작용을 저해하지 않거나, 또는 실질적으로 저해하지 않는다.

[0299] 추가 측면에서, 본 명세서의 길항제 물질 또는 물질의 조합은 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B 활성을 간접적으로 길항하는 작은-분자 물질이다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 간접 작은-분자 길항제, 또는 간접 작은-분자 길항제의 조합은 ActRII 수용체(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에 결합하고, 그리고 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRII 수용체에 결합하거나 및/또는 이를 활성화(가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB Smad2/3 신호생성의 활성화)를 저해하는 작은 분자다. 임의선택적으로, 본 명세서의 간접 작은-분자 길항제,

또는 간접 작은-분자 길항제의 조합은 액티빈 A가 ActRII 수용체에 결합 및/또는 활성화 (가령, 액티빈 A-중재된 ActRIIA 및/또는 ActRIIB Smad 2/3 신호생성)시키는 것을 실질적으로 저해하지 않는다. 임의선택적으로, 본 명세서의 간접 작은-분자 길항제, 또는 간접 작은-분자 길항제의 조합은 ActRII 수용체에 결합하고, GDF8에 의해 상기 ActRII 수용체에 결합하고, 및/또는 이의 활성화를 더 저해한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 수용체에 결합하고, 그리고 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B가 ActRII 수용체에 결합 및/또는 이를 활성화시키는 본 명세서의 간접 작은-분자 길항제, 또는 간접 작은-분자 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, BMP6, 액티빈 A, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10가 상기 ActRII 수용체에 결합하고, 및/또는 이를 활성화 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB Smad 2/3 및/또는 Smad 1/5/8 신호생성의 활성화)를 더 저해한다.

[0300] 본 명세서의 유기 작은-분자 길항제의 결합은 공지 방법으로 식별되고, 화학적으로 합성될 수 있다 (가령, PCT 공개 WO 00/00823 및 WO 00/39585 참고). 일반적으로, 본 명세서의 작은-분자 길항제는 크기가 약 2000 달톤 미만이며, 대안으로 약 1500, 750, 500, 250 또는 200 달톤 미만이며, 여기에서 이러한 작은 유기 분자는 바람직하게는 본 명세서에서 설명된 바와 같이 폴리펩티드 (액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, 및 BMP6)에 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 작은-분자 길항제는 공지 기술을 이용하여 과도한 실험없이 확인될 수 있다. 이 점에 있어서, 폴리펩티드 표적에 결합할 수 있는 분자의 작은 유기 분자 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 당분야에 공지되어 있다 (가령, 국제 특허 공개 W000/00823 및 W000/39585).

[0301] 본 명세서의 결합 유기 작은 분자는 예를 들면, 알데히드, 케톤, 옥심, 하이드라존, 세미카르바존, 카르바지드, 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민, N-치환된 하이드라진, 하이드라지드, 알코올, 에테르, 티올, 티오에테르, 디설피드, 카르복실산, 에스테르, 아마이드, 우레아, 카르바메이트, 카르보네이트, 케탈, 티오케탈, 아세탈, 티오아세탈, 아릴 할로겐화물, 아릴 술포네이트, 알킬 할로겐화물, 알킬 술포네이트, 방향족 화합물, 이형고리 화합물, 아닐린, 알켄, 알킨, 디올, 아미노 알코올, 옥사졸리딘, 옥사졸린, 티아졸리딘, 티아졸린, 엔아민, 술폰아מיד, 에폭사이드, 아지리딘, 이소시아네이트, 술폰닐 클로라이드, 디아조 화합물, 및 산 클로라이드일 수 있다.

[0302] 본 명세서에서 공개된 임의의 작은-분자 길항제 (가령, a 액티빈 B의 작은-분자 길항제, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 또는 BMP10)는 원하는 효과를 획득하기 위하여 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 추가 길항제 물질과 복합될 수 있다. 본 명세서에서 공개된 작은-분자 길항제 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 또는 BMP10의 작은-분자 길항제)는 본 명세서의 또다른 작은-분자 길항제, 또는 본 명세서의 임의의 표적을 지향하는 항체 (가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-액티빈 C 항체, 항-액티빈 E 항체, 항-GDF8 항체, 항-BMP6 항체, 항-ActRIIA 항체, 항-ActRIIB 항체, 항-ActRIIB 항체, 항-GDF15 항체, 항-Nodal 항체, 항-GDF3 항체, 항-BMP3 항체, 항-BMP3B 항체, 항-BMP9 항체, 또는 항-BMP10 항체), 또는 본 명세서에서 공개된 비-항체 결합 폴리펩티드 (가령, GDF11-결합 폴리펩티드, 액티빈-B-결합 폴리펩티드, 액티빈-B-결합 폴리펩티드, 액티빈-E-결합 폴리펩티드, 액티빈-C-결합 폴리펩티드, GDF8-결합 폴리펩티드, BMP6-결합 폴리펩티드, GDF15-결합 폴리펩티드, Nodal-결합 폴리펩티드, GDF3-결합 폴리펩티드, BMP3-결합 폴리펩티드, BMP3B-결합 폴리펩티드, BMP9-결합 폴리펩티드, 또는 BMP10-결합 폴리펩티드), 또는 본 명세서에서 공개된 리간드 트랩 폴리펩티드 (가령, GDF11-트랩 폴리펩티드, 액티빈-B 트랩 폴리펩티드, 또는 GDF/액티빈-B 트랩 폴리펩티드), 또는 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제 (가령, 액티빈 A, 폴리뉴클레오티드 길항제, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, 또는 BMP3B의 폴리뉴클레오티드 길항제)와 복합될 수 있다. 예를 들면, GDF11의 작은-분자 길항제는 본 명세서의 액티빈-B 길항제 (가령, 액티빈-B 트랩 폴리펩티드, 항-액티빈-B 항체, 액티빈 B의 작은-분자 길항제, 액티빈 B의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 액티빈 B의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합되어 GDF11 및 액티빈 B 모두의 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해할 수 있다. 대안 구체예에서, 액티빈-B 항체의 작은-분자 길항제는 본 명세서의 GDF11 길항제 (가령, GDF-트랩 폴리펩티드, 항-GDF11 항체, GDF11의 작은-분자 길항제, GDF11의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 GDF11의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합되어, GDF11 및 액티빈 B의 모든 활성이 억제될 수 있다.

[0303] **F. 길항제 폴리뉴클레오티드**

[0304] 또다른 측면에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질, 또는 물질의 조합은 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B를 저해하는 폴리뉴클레오티드 길항제이다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 길항제 폴리뉴클레오티드는 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B의 발현 (가령, 전사, 해독, 및/또는 세포성 배출)을 억제한다. 임의선택적으로, 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제의 조합은 액티빈 A를 저해하지 않는다 (가령 액

티빈 A의 발현 및/또는 활성을 저해한다). 임의선택적으로, 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제의 조합은 GDF8을 더 저해한다 (가령 GDF8의 발현 및/또는 활성을 저해한다). 일부 구체예들에 있어서, GDF11 및/또는 액티빈 B (가령 GDF11 및/또는 액티빈 B의 발현 및/또는 활성)을 저해하는 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제의 조합은 액티빈 E, 액티빈 C, 액티빈 A, GDF8, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B중 하나 또는 그 이상을 더 저해한다(가령, 발현 및/또는 활성을 저해한다).

[0305] 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제는 안티센스 핵산, RNAi 분자 [가령, 작은 간섭 RNA (siRNA), 작은-헤어핀 RNA (shRNA), microRNA (miRNA)], 압타머 및/또는 리보자임일 수 있다. 인간 GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B의 핵산 및 아미노산 서열은 당분야에 공지되어 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드 길항제를 만드는 많은 상이한 방법들이 당분야에 잘 공지되어 있다. 따라서 본 명세서에 따른 용도의 폴리뉴클레오티드 길항제는 당업계 및 본 명세서에서 제공된 기술에 근거하여 당업자에 의해 통상적으로 만들어질 수 있다.

[0306] 안티센스 기술은 안티센스 DNA 또는 RNA를 통하여, 또는 트리플-헬릭스 형성을 통하여 유전자 발현을 조절하는데 이용될 수 있다. 안티센스 기술은 예를 들면, Okano (1991) J. Neurochem. 56:560; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)에서 논의된다. 트리플-헬릭스 형성은 예를 들면, Cooney *et al.* (1988) Science 241:456; 및 Dervan *et al.*, (1991) Science 251:1300에서 논의된다. 상기 방법은 상보성 DNA 또는 RNA의 결합에 기반을 둔다. 일부 구체예들에 있어서, 안티센스 핵산은 본 명세서에서 공개된 유전자의 RNA전사체 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B)의 최소한 일부에 상보적인 단일-가닥으로 된 RNA 또는 DNA 서열을 포함한다. 그러나, 절대적인 상보성이 비록 바람직하지만, 요구되지는 않는다.

[0307] 본 명세서에서 지칭되는 "RNA의 최소 일부에 상보적인" 서열은 상기 RNA와 혼성화될 수 있는 충분한 상보성을 갖고, 안정적인 듀플렉스를 형성하는 서열을 의미하며; 본 명세서에서 공개된 유전자(가령, GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B)의 이중-가닥으로 된 안티센스 핵산의 경우, 듀플렉스 DNA의 단일 가닥이 테스트될 수 있고, 트리플렉스 형성이 분석될 수 있다. 혼성화되는 능력은 안티센스 핵산의 상보성 정도 및 길이 모두에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 혼성화 핵산이 클수록, RNA와 염기 불일치가 더 많고, 안정적인 듀플렉스를 포함하거나, 형성할 수 있다(또는 트리플렉스가 형성될 수 있다). 당업자는 혼성화된 복합체의 용융점을 결정하기 위하여 표준 과정에 의해 용인가능한 부정합 수준을 확인할 수 있다.

[0308] 메세지의 5' 단부에 상보적인 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, AUG 개시 코돈이 포함된 5'-비해독 서열이 해독 저해시에 가장 효과적으로 작용되어야 한다. 그러나, mRNAs의 3'-해독안된 서열들에 대하여 상보적인 서열이 마찬가지로 mRNAs의 해독 저해시에 효과적이라는 것을 보여주었다 [가령, Wagner, R., (1994) Nature 372:333-335 참고]. 따라서, 본 명세서의 유전자(가령, GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B)의 5'- 또는 3'-비-해독된, 비-코딩 영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 내생성 mRNA (가령, GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B)의 해독을 저해하기 위한 안티센스 방법에 이용될 수 있다. mRNA의 5'-해독안된 영역에 상보적인 폴리뉴클레오티드는 AUG 시작 코돈의 보체를 포함하여야 한다. mRNA 코딩 영역에 상보적인 안티센스 폴리뉴클레오티드는 효과가 덜한 해독 억제제이지만, 본 발명의 방법에 따라 이용될 수 있다. 본 명세서의 mRNA(가령, GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B)의 5'-, 3'- 또는 코딩 영역에 혼성화되도록 기획함에 있어서, 안티센스 핵산은 길이가 최소한 6개 뉴클레오티드이어야 하고, 바람직하게는 길이가 6 내지 약 50개의 올리고뉴클레오티드 범위가 된다. 특이적 측면에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 10개 뉴클레오티드, 최소한 17개 뉴클레오티드, 최소한 25개 뉴클레오티드 또는 최소한 50개 뉴클레오티드다.

[0309] 한 구체예에서, 본 명세서의 안티센스 핵산 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B 및/또는 안티센스 핵산)은 외색 서열로부터 전사에 의해 세포내에서 만들어진다. 예를 들면, 벡터 또는 이의 부분이 전사되어, 본 명세서의 유전자의 안티센스 핵산 (RNA)가 생성된다. 이러한 벡터는 원하는 안티센스 핵산을 인코딩하는 서열을 포함할 것이다. 이러한 벡터는 원하는 안티센스 RNA를 만들기 위하여 전사될 수 있는 한, 예피솜에 남아있거나 또는 염색체에 통합될 수 있다. 이러한 벡터는 당분야에서 재조합 DNA 기술 분야에 의해 구성될 수 있다. 벡터는 척추동물 세포에서 복제 및 발현에 이용되는, 당분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 다른 공지된 것들이 될 수 있다. 본 명세서의 원하는 유전자,

또는 이의 단편을 인코딩하는 서열은 척추동물, 바람직하게는 인간 세포 안에서 작용하기 위하여 당업계에 공지된 임의의 프로모터에 의해 발현될 수 있다. 이러한 프로모터는 유도성 또는 구성적일 수 있다. 이러한 프로모터는 SV40 초기 프로모터 영역 [가령, Benoist and Chambon (1981) Nature 290:304-310 참고], Rous 육종 바이러스의 3' 긴-말단 반복부에 포함된 프로모터 [가령, Yamamoto *et al.* (1980) 세포 22:787-797 참고], 페르페스 티미딘 프로모터 [가령, Wagner *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445 참고], 그리고 메탈로티오닌 유전자의 조정 서열들 [가령, Brinster, *et al.* (1982) Nature 296:39-42 참고]을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0310] 일부 구체예들에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 길항제는 다음중 하나 또는 그 이상의 발현을 표적으로 하는 간섭 RNA (RNAi) 분자다: GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 및 GDF3B. RNAi는 표적화된 mRNA의 발현을 간섭하는 RNA의 발현을 지칭한다. 구체적으로, RNAi는 siRNA (작은 간섭 RNA)를 통하여 특이적 mRNA와 상호작용에 의해 표적화된 유전자를 침묵시킨다. 그 다음 ds RNA 복합체는 상기 세포에 의한 분해를 표적으로 한다. siRNA 분자는 길이가 10 내지 50개의 뉴클레오티드의 이중-가닥으로 된 RNA 듀플렉스이며, 이는 충분히 상보적인 (가령, 이 유전자에 대하여 최소한 80% 동일성)인 표적 유전자의 발현을 간섭한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 siRNA 분자는 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열에 최소한 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0311] 추가 RNAi 분자는 짧-헤어핀 RNA (shRNA); 또한 짧은-간섭 헤어핀 및 microRNA (miRNA)를 포함한다. 상기 shRNA 분자는 루프에 의해 연결된 표적 유전자의 센스 및 안티센스 서열들을 포함한다. 상기 shRNA는 핵으로부터 세포질로 이동되며, mRNA와 함께 분해된다. Pol III 또는 U6 프로모터는 RNAi를 위한 RNAs를 발현하는데 이용될 수 있다. Paddison *et al.* [Genes & Dev. (2002) 16:948-958, 2002]는 RNAi에 영향을 주는 수단으로써, 헤어핀으로 폴딩되는 작은 RNA 분자를 이용하였다. 따라서, 이러한 짧은-헤어핀 RNA (shRNA) 분자들은 본 명세서에서 설명된 방법에 또한 유익하게 이용된다. 기능적 shRNAs의 스템과 루프의 길이는 가변적이며; 스템 길이는 어디에서건 약 25 내지 약 30개 nt 범위가 될 수 있으며, 루프 크기는 침묵 활성화에 영향 없이 4 내지 약 25개 nt 사이의 범위가 될 수 있다. 임의의 특정 이론에 결부되지 않고, 이들 shRNAs는 DICER RNase의 이중-가닥으로 된 RNA (dsRNA) 산물이며, 임의의 경우, 특이적 유전자의 발현을 저해하기 위한 동일한 능력을 보유하는 것으로 본다. 상기 shRNA는 렌티바이러스 벡터로부터 발현될 수 있다. miRNA는 길이가 약 10 내지 70개의 뉴클레오티드의 단일-가닥으로 된 RNA이며, 이는 "스템-루프" 구조에 의해 특징화된 사전-miRNA로 최초 전사되며, 이는 후속적으로 RISC를 통하여 프로세싱된 후 성숙 miRNA로 프로세스된다.

[0312] siRNA가 포함되나, 이에 국한되지 않은 RNAi를 중재하는 분자는 화학적 합성 (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002), dsRNA의 가수분해 (Yang *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), T7 RNA 폴리메라제에 의한 시험관내 전사 (Donzeet *et al.*, Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002), 그리고 뉴클레아제, 이를 테면 E. coli RNase III를 이용한 이중-가닥으로 된 RNA의 가수분해 (Yang *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002)에 의해 시험관내에서 만들어질 수 있다.

[0313] 또다른 측면에 따르면, 본 명세서는 데코이(decoy) DNA, 이중-가닥으로 된 DNA, 단일-가닥으로 된 DNA, 복합체화된 DNA, 포집화된 DNA, 바이러스 DNA, 플라스미드 DNA, 네이키드 RNA, 포집화된 RNA, 바이러스 RNA, 이중-가닥으로 된 RNA, RNA 간섭을 만들 수 있는 분자, 이의 조합을 포함하나, 이에 국한되지 않는 폴리뉴클레오티드 길항제를 제공한다.

[0314] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제는 압타머다. 압타머는 이중-가닥으로 된 DNA 및 단일-가닥으로 된 RNA 분자를 포함하는 핵산 분자로서, 표적 분자, 이를 테면 GDF11, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 또는 GDF3B 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 3차 구조를 형성한다. 압타머의 생성 및 치료 용도는 당분야에 잘 확립되어 있다(가령, U.S. 특허 5,475,096 참고). 압타머에 대한 추가 정보는 U.S. 특허 출원 공개 20060148748에서 볼 수 있다. 핵산 압타머는 당분야에 공지된 방법, 예를 들면 Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) 프로세스를 통하여 선택된다. SELEX는 가령, U.S. 특허 5,475,096; 5,580,737; 5,567,588; 5,707,796; 5,763,177; 6,011,577; 및 6,699,843에서 설명된 바와 같이, 표적 분자에 매우 특이적으로 결합되는 핵산 분자의 시험관내 진개를 위한 방법이다. 압타머를 확인하기 위한 또다른 스크리닝 방법은 U.S. 특허 5,270,163에서 설명된다. SELEX 프로세스는 핵산들은 다양한 2-차 및 3-차 구조를 형성하는 충분한 능력에 기반을 두고, 뿐만 아니라 실질적으로 임의의 화학적 화합물, 다른 핵산 분자 및 폴리펩티드가 포함된 단량체 또는 중합체인 간에 화합물과 실질적으로 리간드로 작용하기 위하여(가령, 특이적 결합 쌍을 형성) 단량체 안에 이용가능한 화학적 다능성을 보유한다는 독특한 이해에 바탕이 된다. 임의의 크기의 분자 또는 조성물이 표적으로 작용될 수 있다. SELEX 방법은 후보

올리고뉴클레오타이드의 혼합물로부터 선택, 그리고 결합의 단계별 반복, 바람직한 결합 친화력 및 선택성을 획득하기 위하여 동일한 일반 선별 일정을 이용하여 분할 및 증폭을 포함한다. 무작위화된 서열 세그먼트를 포함할 수 있는 핵산 혼합물로부터 출발하여, SELEX 방법은 결합을 위하여 선호되는 조건하에서 상기 혼합물에 상기 표적을 접촉시키는 단계; 이들 표적 분자들에게 특이적으로 결합된 핵산로부터 결합안된 핵산을 분할화시키는 단계; 상기 핵산-표적 복합체들을 해리하는 단계; 상기 핵산-표적 복합체들로부터 해리된 핵산을 증폭시켜 리간드-농축된 핵산 혼합물을 얻는 단계를 포함한다. 결합, 분할화, 해리 및 증폭 단계들은 표적 분자에 높은 친화력 및 특이성으로 결합하는 핵산 리간드를 획득하기 위하여 원하는 횟수만큼 반복된다.

[0315] 전형적으로, 이러한 결합 분자들은 동물에게 별도로 투여되지만 [가령, O'Connor (1991) J. Neurochem. 56:560 참고], 그러나 이러한 결합 분자들은 숙주 세포에 의해 취입된 폴리뉴클레오타이드로부터 생체내 발현되고, 생체내 발현될 수 있다 [가령, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988) 참고].

[0316] 본 명세서에서 공개된 임의의 상기 폴리뉴클레오타이드 길항제 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 또는 GDF3B의 폴리뉴클레오타이드 길항제)는 원하는 효과를 획득하기 위하여 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 추가 길항제 물질과 복합될 수 있다. 본 명세서에서 공개된 폴리뉴클레오타이드 길항제 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF11, GDF8, BMP6, Nodal, GDF3, BMP3, 또는 GDF3B의 폴리뉴클레오타이드 길항제)는 본 명세서의 또다른 폴리뉴클레오타이드 길항제, 또는 본 명세서의 임의의 표적을 지향하는 항체(가령, 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-액티빈 B 항체, 항-GDF8 항체, 항-액티빈 C 항체, 항-액티빈 E 항체, 항-BMP6 항체, 항-BMP6 항체, 항-GDF15 항체, 항-Nodal 항체, 항-GDF3 항체, 항-BMP3 항체, 항-BMP3B 항체, 항-BMP9 항체, 또는 항-BMP10 항체), 또는 본 명세서의 비-항체 결합 폴리펩티드(가령, GDF11 결합 폴리펩티드, 액티빈 B 결합 폴리펩티드, 액티빈 B 결합 폴리펩티드, 액티빈 E 결합 폴리펩티드, 액티빈 C 결합 폴리펩티드, GDF8 결합 폴리펩티드, BMP6 결합 폴리펩티드, GDF15 결합 폴리펩티드, Nodal 결합 폴리펩티드, GDF3 결합 폴리펩티드, BMP3 결합 폴리펩티드, BMP3B 결합 폴리펩티드, BMP9 결합 폴리펩티드, 또는 BMP10 결합 폴리펩티드), 또는 본 명세서에서 공개된 리간드-트랩 폴리펩티드 (가령, GDF11-트랩 폴리펩티드, 액티빈-B 트랩 폴리펩티드, 또는 GDF11/액티빈-B 트랩 폴리펩티드), 또는 본 명세서의 임의의 표적을 지향하는 작은-분자 길항제 (가령, 액티빈-A 작은-분자 길항제, 액티빈-B 작은-분자 길항제, GDF11 작은-분자 길항제, 액티빈-C 작은-분자 길항제, 액티빈-E 작은-분자 길항제, GDF8 작은-분자 길항제, BMP6 작은-분자 길항제, BMP6 작은-분자 길항제, GDF15 작은-분자 길항제, Nodal 작은-분자 길항제, GDF3 작은-분자 길항제, BMP3 작은-분자 길항제, BMP3B 작은-분자 길항제, BMP9 작은-분자 길항제, 또는 BMP10 작은-분자 길항제)와 복합될 수 있다. 예를 들면, GDF11의 안티센스 길항제는 본 명세서의 액티빈-B 길항제 (가령, 액티빈-B 트랩 폴리펩티드, 항-액티빈-B 항체, 액티빈 B의 작은-분자 길항제, 액티빈 B의 폴리뉴클레오타이드 길항제, 또는 액티빈 B의 비-항체 폴리펩티드 길항제 of 액티빈 B)와 복합되어 GDF11 및 액티빈 B 모두의 활성 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체에 결합 및/또는 이를 활성화시키는 능력)을 저해할 수 있다. 대안 구체예에서, 액티빈-B 항체의 안티센스 길항제는 본 명세서의 GDF11 길항제 (가령, GDF-트랩 폴리펩티드, 항-GDF11 항체, GDF11의 작은-분자 길항제, GDF11의 폴리뉴클레오타이드 길항제, 또는 GDF11의 비-항체 폴리펩티드 길항제)와 복합되어, GDF11 및 액티빈 B의 모든 활성이 억제될 수 있다.

[0317] **3. 스크리닝 분석(스크리닝 Assays)**

[0318] 특정 측면들에 있어서, 본 명세서는 공개된 ActRII 폴리펩티드 (가령, 가용성 ActRIIA 및 ActRIIB 폴리펩티드 그리고 이의 변이체)를 하나 또는 그 이상의 GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 길항제, 특히 길항제 that inhibit 하나 또는 그 이상의 이들 리간드가 ActRII 수용체 (가령, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체)에 결합하고 및/또는 이의 활성화를 저해하지만, 액티빈 A가 ActRII 수용체에 결합하고 및/또는 이를 활성화시키는 것을 저해하지 못하는 길항체를 확인하는 용도에 관계한다. 본 명세서에서 공개된 스크리닝 분석을 통하여 확인된 화합물은 생체내 또는 시험관내 적혈 세포, 헤모글로빈 및/또는 망상적혈구 수준을 조정하는 이들의 능력을 평가하기 위하여 테스트될 수 있다. 이들 화합물은 예를 들면, 동물 모델에서 테스트될 수 있다.

[0319] ActRII 신호생성을 표적으로 함으로써, 적혈 세포 또는 헤모글로빈 수준을 증가시키기 위한 치료 물질을 스크리닝하는 다수의 방법들이 있다. 특정 구체예들에 있어서, 선택된 세포 계통 상에 ActRII-중재된 효과를 교란시키는 물질을 확인하기 위하여 고-처리량 화합물 스크리닝이 실행될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, ActRII 폴리펩티드가 이의 결합 짝, 이를 테면 ActRII 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10)에 결합을 특이적으로 저해 또는

감소시키는 화합물을 스크리닝하고 확인하기 위하여 상기 분석이 실행된다. 대안으로, 상기 분석은 ActRII 폴리펩티드가 이의 결합 짝, 이를 테면 ActRII 리간드 (가령, 액티빈 A)에 결합에 실질적으로 영향을 주지 않는 화합물을 확인하는데 이용될 수 있다. 추가 구체예에 있어서, 상기 화합물은 ActRII 폴리펩티드와 상호작용하는 이의 능력에 의해 식별될 수 있다.

[0320] 다양한 분석 포맷이 충분할 것이며, 본 명세서의 내용에 근거하여 명시적으로 표현되지 않는 것들 또한 당업자들이 이해할 것이다. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 본 명세서의 테스트 화합물 (물질)들은 임의의 복합 화학 방법에 의해 만들어질 수 있다. 대안으로, 상기 대상 화합물은 생체내 또는 시험관내에서 합성된 자연 발생 생분자일 수 있다. 조직 성장의 조절물질로 작용하는 이들의 능력에 대하여 테스트되는 화합물(물질)은 생산될 수 있는데, 예를 들면, 박테리아, 효모, 식물 또는 다른 유기체에 의해 화학적으로 생산된(가령, 펩티도 모방체들이 포함된, 작은 분자), 또는 재조합에 의해 생산될 수 있다 (가령, 천연 산물). 본 명세서에서 고려되는 테스트 화합물은 비-펩티드 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티도모방체, 슈가, 호르몬, 및 핵산 분자를 포함한다. 특이적 구체예에서, 상기 테스트 물질은 약 2,000 달톤 미만의 분자량을 가진 작은 유기 분자다.

[0321] 본 명세서의 테스트 화합물은 단일의, 별개의 엔터티로 제공될 수 있거나, 또는 더 큰 복합체, 이를 테면 복합 화학에 의해 만들어진 라이브러리로 제공될 수 있다. 이들 라이브러리는 예를 들면, 알코올, 알킬 할로겐화물, 아민, 아미드, 에스테르, 알데히드, 에테르 및 다른 분류의 유기 화합물을 포함할 수 있다. 테스트 시스템에 테스트 화합물의 제공은 특히 초기 스크리닝 단계들에서 단리된 형태 또는 화합물 혼합물로 제공될 수 있다. 임의선택적으로, 상기 화합물은 다른 화합물에 의해 유도화될 수 있고, 화합물의 단리를 촉진시키기 위한 유도화 기를 가질 수 있다. 유도화 기들의 비-제한적인 예로는 바이오틴, 플로오레신, 디옥시게닌, 녹색 형광 단백질, 동위원소, 폴리히스티딘, 자석 비드, 글루타티온 S 전이효소 (GST), 광활성화가능한 가교 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0322] 화합물 및 천연 추출물의 라이브러리를 테스트하는 많은 약물 스크리닝 프로그램에서, 주어진 시간 안에 조사되는 화합물의 수를 최대화하기 위하여 고-처리량 분석이 바람직하다. 정제된 또는 반-정제된 단백질로 유도될 수 있는, 무-세포(cell-free) 시스템에서 실행되는 분석은 대개 "1차(primary) 스크린이라고 하는데, 이때, 테스트 화합물에 의해 중재되는 분자 표적내 변경의 신속한 전개 및 상대적으로 용이한 탐지를 허용하도록 만들어질 수 있다. 더욱이, 테스트 화합물의 세포 독성 또는 생물이용성 효과는 시험관내 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있고, 대신 분자 표적 상에 이 약물의 효과에 주로 초점을 둔 분석은 ActRII 폴리펩티드와 이의 결합 짝 (가령, GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, etc.) 사이의 결합 친화력의 변경에 나타날 수 있다.

[0323] 단순히 설명하기 위하여, 본 명세서의 예시적인 스크리닝 분석에서 관심 화합물은 분석의 의도에 적절한, ActRIIB 리간드 (가령, GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, BMP6, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및/또는 BMP10)에 보통 결합할 수 있는 단리된 그리고 정제된 ActRIIB 폴리펩티드와 접촉된다. 그 다음 화합물 및 ActRIIB 폴리펩티드의 혼합물에 ActRIIB 리간드가 포함된 조성물이 첨가된다. ActRIIB/ActRIIB 리간드 복합체들의 탐지 및 정량화는 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 복합체 형성 저해(또는 강화)에 있어서 화합물의 효과를 측정하는 수단을 제공한다. 상기 화합물의 효과는 테스트 화합물의 다양한 농도를 이용하여 획득된 데이터로부터 약량 반응 곡선을 생성시킴으로써 평가될 수 있다. 더욱이, 비교를 위한 기준을 제공하기 위하여 대조 분석 또한 실행될 수 있다. 예를 들면, 대조 분석에서, 단리된 그리고 정제된 ActRIIB 리간드는 상기 ActRIIB 폴리펩티드가 포함된 조성물에 추가되며, ActRIIB/ActRIIB 리간드 복합체의 형성은 테스트 화합물이 없는 상태에서 정량화된다. 일반적으로, 상기 반응물이 혼합되는 순서는 변화될 수 있고, 동시에 혼합될 수 있음도 이해할 것이다. 더욱이, 정제된 단백질 대신, 세포성 추출물 및 용해물은 적절한 무-세포 분석 시스템을 제공하는데 이용될 수 있다.

[0324] 상기 ActRII 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 복합체 형성은 다양한 기술에 의해 탐지될 수 있다. 예를 들면, 예를 들면, 탐지가가능하도록 라벨된 단백질 이를 테면 방사능라벨된 (가령, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C or ³H), 형광적으로 라벨된 (가령, FITC), 또는 효소적으로 라벨된 ActRII 폴리펩티드 또는 이의 결합 단백질을 이용하여, 면역 분석에 의해, 또는 크로마토그래프 탐지에 의해 복합체 형성 조절이 정량화될 수 있다.

[0325] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 상호작용 정도를 직접적으로 또는 간접적으로 측정함에 있어서 형광 편광 분석 및 형광 공명 에너지 전달 (FRET) 분석의 용도를 고려한다. 더욱이, 다른 탐지 방식, 이를 테면 광학 도파관(waveguides) (가령, PCT 공개 WO 96/26432 및 U.S. 특허 5,677,196), 표면 플라즈몬 공명 (SPR), 표면 하전 센서, 그리고 표면력 센서에 근거된 것들이 본 명세서의 많은 구체예들과 필적된다.

[0326] 더욱이, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 짝 사이에 상호작용을 파괴 또는 강화시키는 물질을 확인하기 위한 "이중 하이브리드 분석"으로 또한 알려진 상호작용 트랩 분석의 사용을 고려한다 [가령, U.S. 특허 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; 및 Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696]. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 간의 상호작용을 분리시키는 화합물(가령, 작은 분자 또는 펩티드)을 확인하기 위한 역 이중 하이브리드 시스템의 사용을 고려한다 [가령, Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal and Legrain (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; 및 U.S. 특허 5,525,490; 5,955,280; 및 5,965,368].

[0327] 특정 구체예들에 있어서, 상기 대상 화합물은 ActRII 폴리펩티드와 상호작용하는 이의 능력에 의해 식별된다. 화합물과 상기 ActRII 폴리펩티드 사이의 상호작용은 공유 또는 비-공유적일 수 있다. 예를 들면, 이러한 상호작용은 광-가교, 방사능라벨된 리간드 결합, 및 친화력 크로마토그래피가 포함된 시험관내 생화학 방법을 이용하여 단백질 수준에서 확인될 수 있다 [가령, Jakoby WB *et al.* (1974) *Methods in Enzymology* 46: 1 참고]. 특정 경우에서, 상기 화합물은 기전 기반 분석, 이를 테면 ActRII 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 탐지하는 분석에서 스크리닝될 수 있다. 이는 고정 상 또는 유동 상 결합 과정을 포함할 수 있다. 대안으로, ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자는 리포터 시스템 (가령, β -갈락토시다제, 루시페라제, 또는 녹색 형광 단백질)과 함께 세포 안으로 형질감염되고, 라이브러리 바람직하게는 고-처리량 스크리닝 또는 또는 라이브러리의 개별 구성요소와 함께 라이브러리에 의해 스크리닝될 수 있거나 다른 기전 기반 결합 분석은 자유 에너지에서 변화를 탐지하는 예를 들면, 결합 분석을 위하여 이용될 수 있다. 결합 분석은 웰, 비드, 또는 칩에 고정된 표적 또는 고정된 항체에 의해 포획된 또는 모세관 전기영동에 의해 해리된 표적에 의해 실행될 수 있다. 결합된 화합물은 발색 또는 형광 또는 표면 플라즈몬 공명에 의해 통상 탐지될 수 있다.

[0328] **4. 예시적인 치료학적 용도**

[0329] 특정 측면들에 있어서, 최소한 GDF11 및/또는 액티빈 B을 저해하는 본 명세서의 길항제 물질 또는 물질의 조합은 이를 필요로 하는 대상에서 적혈 세포 수준을 증가시키고, 빈혈을 치료 또는 예방하고, 및/또는 비효과적 적혈구생성을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 임의선택적으로, 본 명세서의 방법에 따라 이용되는 길항제 물질, 또는 물질의 조합은 액티빈 A을 저해하지 않는다. 임의선택적으로, 본 명세서의 방법에 따라 이용되는 길항제 물질, 또는 물질의 조합은 GDF8을 더 저해한다. 특정 측면들에 있어서, 본 명세서의 방법에 따라 GDF11 및/또는 액티빈 B을 저해하는 것에 추가하여 길항제 물질, 또는 물질의 조합은 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 A, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10을 더 저해한다.

[0330] 용어 "대상", "개체" 또는 "환자"는 명세서를 통하여 상호교환가능하고, 일반적으로 포유류를 지칭한다. 포유류는 길들여진 동물 (예를 들면, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들면, 인간 및 비-인간 영장류, 이를 테면 원숭이), 토끼, 그리고 설치류 (예를 들면, 마우스 및 랫(rats))을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 특정 측면들에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질은 적혈 세포 수준, 특히 다중 기원의 빈혈을 치료하기 위하여 이용된 이들에서 적혈 세포 수준을 증가시키는 통상적인 치료 방법과 복합되어 이용될 수 있다. 적혈 세포 수준을 증가시키는 통상적인 치료 방법은 예를 들면, 적혈 세포 주입, 하나 또는 그 이상의 EPO 수용체 활성제, 조혈 줄기 세포 이식, 면역억제성 생물제(biologics) 및 약물 (가령, 코르티코스테로이드)의 투여를 포함한다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질은 이를 필요로 하는 대상에게서 빈혈을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질은 이를 필요로 하는 대상에게서 비효과적 적혈구생성을 치료 또는 예방 및/또는 비효과적 적혈구생성과 연관된 장애를 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 특정 측면들에 있어서, 본 명세서의 길항제 물질은 빈혈을 치료 또는 예방 or 비효과적 적혈구생성 장애를 치료 또는 예방하기 위한, 특히 다중 기원의 빈혈을 치료하기 위하여 이용된 이들을 위한 통상적인 치료 방법과 복합될 수 있다.

[0331] 본 명세서에서 이용된 바와 같이, 통계적인 시료에서 질환 또는 장애를 "예방하는" 치료는 처리안된 대조 시료와 비교하여 처리된 시료에서 장애 또는 상태의 발생을 감소시키고, 또는 처리안된 대조 시료와 비교하여 질환 또는 장애의 하나 또는 그 이상의 징후의 개시를 지연 또는 심각성을 감소시키는 화합물을 지칭한다.

[0332] 본 명세서에서 이용된 바와 같이 "처리하는"이란 이미 확립된 상태의 개선 또는 제거를 포함한다.

[0333] 어느 경우던, 예방 또는 치료는 의사 또는 다른 건강 관리 제공자에 의해 제공된 진단에서 그리고 치료 물질의 투여의 의도된 결과에 의해 명확해질 것이다.

- [0334] 일반적으로, 본 명세서에서 설명된 바와 같이 질환 또는 상태의 치료 또는 방지는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)의 "효과량(effective amount)"의 투여에 의해 이루어진다. 물질의 효과량은 바람직한 치료요법적 또는 예방적 결과를 얻기 위하여 필요한 투여량(dosages)에서 그리고 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 본 명세서의 물질의 "치료요법적 효과량"은 인자들, 이를 테면 개인의 질환 상태, 연령, 성별, 그리고 개인의 체중에 따라, 그리고 개인에서 바람직한 반응을 유도하기 위한 그 물질의 능력에 따라 변화될 수 있다. "예방적으로 효과적인 양"은 바람직한 예방적 결과를 얻기 위하여 필요한 투여량에서 그리고 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.
- [0335] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)은 EPO 수용체 활성화제와 복합되어, 건강한 개인 및 선택된 환자 집단에서 적혈 세포, 헤모글로빈, 또는 망상적혈구 수준을 증가시키는데 이용될 수 있다. 적절한 환자 집단의 예는 바람직하지 못하게 낮은 적혈 세포 또는 헤모글로빈 수준을 가진 사람들, 이를 테면 빈혈이 있는 환자들, 그리고 바람직하지 않게 낮은 적혈 세포 또는 헤모글로빈 수준이 발생될 위험에 처한 사람들, 이를 테면 실질적으로 혈액 상실을 초래할 수 있는 큰 외과술 또는 다른 과정을 겪게될 환자들을 포함한다. 한 구체예에서, 적절한 적혈 세포 수준을 가진 환자는 적혈 세포 수준을 증가시키기 위하여 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)로 처리되고, 그 다음 혈액을 빼내고, 수혈에 나중에 사용하기 위하여 보관된다.
- [0336] EPO 수용체 활성화제와 함께 선택적으로 복합된 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)은 빈혈을 가진 환자에서 적혈 세포 수준, 헤모글로빈 수준, 및/또는 헤모크릿 수준을 증가시키기 위하여 이용될 수 있다. 인간에서 헤모글로빈 및/또는 헤모크릿 수준을 관찰할 때, 개인별 변이는 고려해야하지만, 적절한 나이 및 성별 범주에 있어서 정상 수준 아래의 수준이 빈혈을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 비록 치료법에 있어서, 더 낮은 목표 수준은 소수의 심혈관 부작용을 야기할 수 있지만 10-12.5 g/dl의 헤모글로빈 수준, 그리고 전형적으로 약 11.0 g/dl의 수준은 건강한 어른에서 정상적인 범위 안에 있다 [가령, Jacobs et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19 참고]. 대안으로, 빈혈의 척도로써 헤모크릿 수준 (상기 세포에 의해 차지하게 되는 혈액 용적의 백분율)이 이용될 수 있다. 건강한 개인의 헤모크릿 수준은 성인 남성의 경우 약 41-51% 범위가 되며, 성인 여성의 경우 35-45% 범위가 된다. 특정 구체예들에 있어서, 환자는 환자의 적혈 세포, 헤모글로빈, 및/또는 헤모크릿의 표적 수준으로 회복시키기 위하여 의도된 투여분량 섭생으로 치료될 수 있다. 헤모글로빈 및 헤모크릿 수준은 사람마다 변화되기 때문에, 최종으로, 표적 헤모글로빈 및/또는 헤모크릿 수준은 각 환자를 위하여 맞춤화될 수 있다.
- [0337] 조직 손상, 감염, 및/또는 만성 질환, 특히 암 환자에서 빈혈이 빈번하게 관찰된다. 일부 대상에서, 골수에서 낮은 에리트로포에틴 수준 및/또는 에리트로포에틴에 대한 불충분한 반응에 의해 빈혈이 식별된다 [가령, Adamson (2008) Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634 참고]. 빈혈의 잠재적 원인은 예를 들면, 혈액 상실, 영양 결핍 (가령 단백질 식품 섭취 감소), 약물 반응, 골수와 관련된 다양한 문제들, 그리고 많은 질환을 포함한다. 좀더 구체적으로, 빈혈은 예를 들면, 골수 이식; 고형 종양 (가령, 유방암, 폐암 및 결장암); 림프계 종양 (가령, 만성 임파세포 백혈병, 비-Hodgkins 림프종, 및 Hodgkins 림프종); 조혈 시스템의 종양 (가령, 백혈병, 골수형성이상증후군 및 다발 골수종); 방사능 요법; 화학요법 (가령, 백금 포함된 섭생); 류마티스관절염, 다른 염증성 다른 염증성 관절염, 전신 홍반성 낭창 (SLE), 급성 또는 만성 피부 질환 (가령, 건선), 염증성 장 질환 (가령, Crohn 질환 및 궤양성 결장염)이 포함되나 이에 국한되지 않는 염증 및 자가면역 질환; 특발성 또는 선천적 상태가 포함된 급성 또는 만성 신장 질환 또는 부전; 급성 또는 만성 간 질환; 급성 또는 만성 출혈; 환자 동계 또는 자가 항체때문에 및/또는 종교적 이유 (가령, 일부 여호와의 증인)로 인하여 적혈 세포의 주입이 불가능한 상황; 감염 (가령, 말라리아 및 골수염); 예를 들면, 겸상적혈구 질환 (빈혈), 지중해빈혈이 포함된 이상혈색소증; 약물 이용 또는 남용 (가령, 알코올 오용); 수혈을 피하기 위한 임의의 원인으로 인한 소아 환자; 그리고 노인 환자 또는 심혈관 과부하 염려로 인하여 수혈을 받을 수 없는 빈혈이 있는 심폐 질환을 겪는 환자 [가령, Adamson (2008) Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634 참고]를 포함하는 다양한 질환 및 상태와 관련되어 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티

빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, 및 BMP6의 선택적 추가 길항제)은 본 명세서에서 공개된 하나 또는 그 이상의 장애 또는 상태와 연관된 빈혈을 치료 또는 방지하는데 이용될 수 있다.

[0338] 많은 인자들이 암-관련된 빈혈에 관련될 수 있다. 일부는 질환 프로세스 자체와 연관되며, 염증성 사이토킨, 이를 테면 인터루킨-1, 인터페론-감마, 및 중앙 피사 인자의 생성과 관련된다 [Bron *et al.* (2001) *Semin Oncol* 28(Suppl 8):1-6]. 이의 효과중에서, 염증은 주요 철-조정 펩티드 헵시딘(hepcidin)을 유도하고, 이로 인하여 대식세포로부터 철 유출을 저해하고, 이로 인하여 적혈구생성에 있어서 철 이용성을 일반적으로 제한한다 [가령, Ganz (2007) *J Am Soc Nephrol* 18:394-400]. 다양한 경로를 통한 혈액 손실 또한 암-관련된 빈혈에 기여할 수 있다. 암 진행으로 인한 빈혈 유병율은 암의 유형에 따라, 변화되는데, 전립선 암의 경우 5%에서부터 다발 골수종의 경우 최대 90% 범위에 이른다. 암-관련된 빈혈은 환자들에게 피로, 삶의 질 감소, 치료 효과 감소, 그리고 사망률 증가의 심각한 결과를 가진다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)은 EPO 수용체 활성제와 선택적으로 복합되어, 암-관련된 빈혈을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0339] 과소증식성 빈혈은 골수의 주요 기능이상 또는 부준으로 결과될 수 있다. 과소증식성 빈혈은 만성 질환의 빈혈, 신장 질환의 빈혈, 대사저하 상태와 연관된 빈혈, 그리고 암과 연관된 빈혈을 포함한다. 이들 각 유형에서, 내생성 에리트로포에틴 수준은 관찰된 빈혈 정도에 대하여 부적절하게 낮다. 다른 과소증식성 빈혈은 초기-단계 철-결핍 빈혈, 및 골수 손상에 의한 빈혈을 포함한다. 이들 유형에서, 내생성 에리트로포에틴 수준은 관찰된 빈혈 정도에 대하여 적절하게 상승된다. 주요 예는 암 및/또는 화학요법 약물 또는 암 방사능 요법에 의한 골수 억제일 수 있다. 임상 시험의 광범위한 검토에서 화학요법 후 환자 100%에서 약한 빈혈이 발생하고, 한편, 이런 환자의 최대 80%에서 다소 심각한 빈혈이 발생할 수 있음이 밝혀졌다[가령, Gropman *et al.* (1999) *J Natl Cancer Inst* 91:1616-1634 참고]. 골수억제성 약물은 예를 들면, 다음을 포함한다: 1) 알킬화 물질, 이를 테면 질소 무스타드 (가령, 멜파란) 및 니트로소우레아 (가령, 스트렙토조신); 2) 항대사물질, 이를 테면 엽산 길항제 (가령, 메토틱세이트), 퓨린 유사체 (가령, 티오구아닌), 및 피리딘 유사체 (가령, 겐시타빈); 3) 세포독성 항생제, 이를 테면 안트라사이클린 (가령, 독소루비친); 4) 키나제 억제제 (가령, 게피티니브); 5) 유사분열 억제제, 이를 테면 탁산 (가령, 파클리탁셀) 및 빈카 알칼로이드 (가령, 비노렐빈); 6) 단클론 항체 (가령, 리투시마브); 그리고 7) 토포이소메라제 억제제 (가령, 토포테칸 및 이토포시드). 또한, 저대사율을 초래하는 상태는 약한 내지 중간수준의 저증식성 빈혈을 초래할 수 있다. 이러한 상태중 내분비 결핍 상태가 있다. 예를 들면, Addison 질환, 갑상선저하증, 부갑상선항진에서 발생하거나 또는 거세된 또는 에스트로겐 치료를 받은 남성에서 빈혈이 발생할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)은 EPO 수용체 활성제와 선택적으로 복합되어, 저증식성 빈혈을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0340] 만성 신장 질환은 때로 저증식성 빈혈과 연관되고, 빈혈 수준은 신장 손상 수준의 심각성에서 변화된다. 이러한 빈혈은 주로 불충분한 에리트로포에틴 생산과 적혈 세포의 생산 감소때문이다. 만성 신장 질환은 보통 수년 또는 수십년간에 걸쳐 또는 환자 생존을 위하여 투석 또는 신장 이식이 요구되는 시점인 말기(단계-5)로 진행된다. 빈혈은 보통 이 과정의 초기에 발생되며, 질환이 진행됨에 따라 악화된다. 신장 질환의 빈혈의 임상적 결과는 잘 정리되어 있고, 좌 심실 비대, 발생, 손상된 인지 기능, 삶의 질 감소, 및 변경된 면역 기능의 발생을 포함한다 [가령, Levin *et al.* (1999) *Am J Kidney Dis* 27:347-354; Nissenson (1992) *Am J Kidney Dis* 20(Suppl 1):21-24; Revicki *et al.* (1995) *Am J Kidney Dis* 25:548-554; Gafter *et al.*, (1994) *Kidney Int* 45:224-231 참고]. 일부 구체예들에 있어서, EPO 수용체 활성제와 선택적으로 복합된 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)은 급성 또는 만성 신장 질환 또는 부전과 연관된 빈혈을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0341] 이를 테면 외상 또는 분만후 출혈로 인한 충분한 양의 급성 혈액 손실로 인한 빈혈은 급성 출혈후 빈혈로 알려져 있다. 급성 혈액 손실은 우선 빈혈 없이 혈량 저하의 원인인데, 다른 혈액 구성성분과 함께 RBCs의 비례적 손실 때문이다. 그러나, 혈량저하는 신속하게 유체를 혈관밖으로부터 맥관 격실로 이동시키는 생리학적 기전을 신속하게 촉발시키고, 이는 혈액회색 및 빈혈을 초래한다. 만성인 경우, 혈액 손실은 점진적으로 신체 보관 철을 고갈시키고, 결국 철 결핍으로 이어진다. 일부 구체예들에 있어서, EPO 수용체 활성제와 선택적으로

복합된 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)은 급성 혈액 손실로 인한 빈혈을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0342] 철-결핍 빈혈은 중급 단계로써 음성 철 균형 및 철-결핍을 포함하는 철 결핍을 증가시키는 진행에서 최종 단계다. 철 결핍은 철 요구의 증가, 철 섭취 감소, 또는 철 손실 증가로 인한 것일 수 있는데, 이를 테면 임신, 불충분한 식사, 장 흡수장애, 급성 또는 만성 염증, 그리고 급성 또는 만성 혈액 손실과 같은 상태로 구체화된다. 이러한 형태의 약한 내지 중간 빈혈과 함께, 골수는 저증식성으로 남아있고, RBC 형태는 대개 정상이며; 그러나, 약한 빈혈은 일부 소적혈구 RBCs를 초래하고, 심각한 철-결핍 빈혈로의 전이는 골수의 과증식 및 증가되는 만연한 소적혈구 RBCs와 수반된다[가령, Adamson (2008) Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634 참고]. 철-결핍 빈혈을 위한 적절한 치료는 이의 원인 및 심각성에 따라 달라지며, 주요 통상적인 선택으로써, 경구 철 제제, 장관외 철 제형, 및 RBC 주입이 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)은 EPO 수용체 활성화제와 선택적으로 복합되어, 만성 철-결핍을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0343] 골수형성이상증후군 (MDS)은 골수성 혈액 세포의 비효과적 생산 및 급성 골수성 백혈병으로 변화 위험을 특징으로 하는 다양한 혈액 상태의 집합이다. MDS 환자에서 혈액 줄기 세포는 건강한 적혈 세포, 백혈액 세포, 또는 혈소판으로 성숙되지 못한다. MDS 장애는 예를 들면, 무반응성 빈혈, 환 철적모구(ringed sideroblasts)를 갖는 무반응성 빈혈, 과도한 모구를 갖는 무반응성 빈혈, 변형에서 과도한 모구를 갖는 무반응성 빈혈, 다중계통형성장애와 함께 무반응성 혈구감소, 그리고 단리된 5q 염색체 비정상과 연합된 골수형성이상증후군을 포함한다. 이들 장애는 조혈 세포의 양과 질 모두에서 비가역적 결함으로 나타나기 때문에, 대부분 MDS 환자는 만성 빈혈을 앓는다. 따라서, MDS 환자들은 결국 적혈 세포 수를 증가시키기 위하여 혈액 수혈 및/또는 성장인자 (가령, 에리트로포에틴 또는 G-CSF)의 치료가 요구된다. 그러나, 많은 MDS 환자에서 이러한 치료 빈도 때문에 부작용이 발생된다. 예를 들면, 빈번한 적혈 세포 주입을 받는 환자들은 과도한 철 비축으로 조직 및 장기 손상을 나타낼 수 있다. 따라서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, 및 BMP6의 선택적 추가 길항제)은 MDS를 갖는 환자를 치료하는데 이용될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, MDS를 앓는 환자는 선택적으로 EPO 수용체 활성화제와 복합되어, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)을 이용하여 치료될 수 있다. 다른 구체예들에 있어서, MDS를 앓고 있는 환자는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 of GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)와 예를 들면, 탈리도미드, 레날도미드, 아자씨타빈, 데시타빈, 에리트로포에틴, 테페록사민, 안티티모사이트 글로불린, 그리고 필그라스트림 (G-CSF)이 포함된, MDS 치료를 위한 하나 또는 그 이상의 추가 치료 물질과 복합되어 치료될 수 있다.

[0344] 철 역학(ferrokinetic) 연구에 근거하여 재생불량성 빈혈, 출혈, 또는 말초 용혈과 원래 구별되게[가령, Ricketts *et al.* (1978) Clin Nucl Med 3:159-164 참고], 비효과적 적혈구생성은 다양한 집단의 빈혈을 설명하는데, 이때 골수 안에 다수의 적혈구의 전구물질 (적혈모구)이 존재한다면, 성숙 RBCs의 생산은 예상보다 적다 [Tanno *et al.* (2010) Adv Hematol 2010:358283]. 이러한 빈혈에서, 성숙 RBCs의 비효과적 생산으로 인하여 에리트로포에틴 수준의 상승에도 불고하고 조직 저산소증이 지속된다. 공격적인 주기가 결결 발생되는데, 이때 상승된 에리트로포에틴 수준은 적혈모구의 방대한 팽창을 구동시키고, 골수의 적혈구생성으로 인하여 잠재적으로 비장비대(비장 확장) [가령, Aizawa *et al.* (2003) Am J Hematol 74:68-72 참고], 적아구-유도된 골 병증 [가령, Di Matteo *et al.* (2008) J Biol Regul Homeost Agents 22:211-216 참고], 그리고 치료 RBC 수혈이 없어도 조직 철 과부하[가령, Pippard *et al.* (1979) Lancet 2:819-821 참고]로 이어진다. 따라서, 적혈구생성 효과를 부양함으로써, 본 명세서의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제가 상기 주기를 파괴시킬 수 있고, 따라서 근본적인 빈혈을 완화시키고, 뿐만 아니라 상승된 에리트로포에틴 수준, 비장비대, 골 병증, 및 조직 철 과부하의 연합된 합병증을 완화시킬 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제 물질 (가령, GDF11, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, GDF8, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및/또는 BMP10 길항제)은 빈혈 및 상승된 EPO 수준 뿐만 아니라 합병증 이를 테면 비장비대, 적아구-유도된 골 병리학, 철 과부하, 및 이의 수반 병리가 포함된, 비효과적 적혈구 생성을 치료 또는 방지하는데 이용될 수 있다. 비장비대와 함께, 이러한 병리는 흉부 또는 복부 통증 및 망상내피 과형성을 포함한다. 골수의 조혈생성은 골수의 조혈 허위증양의 형태로 비장 뿐만 아니라 잠재적으로 다른 조직에서도 발생할 수 있다 [가령,

Musallam *et al.* (2012) Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482 참고]. 적아구-유도된 골 병리학과 함께, 수반 병리는 낮은 골 미네랄 밀도, 골다공증 및 골 통증을 포함한다 [가령, Haidar *et al.* (2011) Bone 48:425-432 참고]. 철 과부하와 함께, 수반 병리는 헵시딘 억제 및 식이 철의 과다흡수 [가령, Musallam *et al.* (2012) Blood Rev 26(Suppl 1):S16-S19 참고], 다중 내분비병증 및 간 섬유증/경화증 [가령, Galanello *et al.* (2010) Orphanet J Rare Dis 5:11 참고], 그리고 철-과다부하 심근병 [Lekawanvijit *et al.*, 2009, Can J Cardiol 25:213-218]을 포함한다.

[0345] 비효과적 적혈구생성의 가장 흔한 원인은 지중해빈혈 증후군, 유전적 헤모글로빈병증이 있으며, 이때 고유의 알파- 및 베타-헤모글로빈 쇠의 생산에서 불균형은 적아구 성숙 과정동안 아팍토시스의 증가로 이어진다 [가령, Schrier (2002) Curr Opin Hematol 9:123-126 참고]. 지중해빈혈은 전세계적으로 집합적으로 가장 빈번한 유전적 장애중에 하나이며, 유행병 패턴의 변화는 U.S. 및 전세계적으로 커지는 보건 문제에 원인이 되는 것으로 예상된다 [Vichinsky (2005) Ann NY Acad Sci 1054:18-24]. 이의 심각성에 따라 지중해빈혈 증후군이 명명된다. 따라서, α-지중해빈혈은 α-지중해빈혈 마이너 (α-지중해빈혈 성향으로도 공지됨; 2개의 병에 걸린 α-글로빈 유전자), 헤모글로빈 H 질환 (3개의 병에 걸린 α-글로빈 유전자), 그리고 α-지중해빈혈 메이저 (또한 테아수증으로도 또한 알려짐; 4개의 병에 걸린 α-글로빈 유전자)를 포함한다. β-지중해빈혈은 β-지중해빈혈 마이너 (또한 β-지중해빈혈 성향으로도 알려짐; 하나의 병에 걸린 β-글로빈 유전자), β-지중해빈혈 중간 (2개의 병에 걸린 β-글로빈 유전자), 헤모글로빈 E 지중해빈혈 (2개의 병에 걸린 β-글로빈 유전자), 그리고 β-지중해빈혈 메이저 (Cooley 빈혈로 또한 알려짐; 2개의 병에 걸린 β-글로빈 유전자는 β-글로빈 단백질의 완전한 부재를 초래함)을 포함한다. β-지중해빈혈은 다중 장기에 영향을 주고, 상당한이환율 및 치사률과 연합되고, 현재 평생 관리를 요한다. β-지중해빈혈 환자의 기대 수명은 철 킬레이트화와 복합하여 정규적인 혈액 수혈로 인하여 최근 증가되기는 했지만, 수혈과 철의 과도한 위장 흡수로 인한 철 과부하는 심각한 합병증 이룰 때면 심장 질환, 혈전증, 생식기능저하증, 갑상선기능저하증, 당뇨병, 골다공증, 및 골연화증을 야기할 수 있다 [가령, Rund *et al.* (2005) N Engl J Med 353:1135-1146 참고]. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)은 EPO 수용체 활성제와 선택적으로 복합되어, 지중해빈혈 증후군을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0346] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 추가 길항제)은 EPO 수용체 활성제와 선택적으로 복합되어, 지중해빈혈 증후군 이외에 비효과적 적혈구 생성 장애를 치료하는데 이용될 수 있다. 이러한 장애는 철적모구성 빈혈 (유전 또는 후천적); 적혈구형성이상 빈혈 (유형 I 및 II); 겸상적혈구 빈혈; 유전적 구상적혈구증; 피루베이트 키나제 결핍; 상태 이를 테면, 엽산 결핍 (선천적 질환, 감소된 섭취 또는 증가된 요구로 인하여), 코발아민 결핍 (선천적 질환, 악성 빈혈, 손상된 흡수, 채식 기능부전, 또는 감소된 섭취로 인하여), 특정 약물, 또는 설명안되는 원인 (선천적 적혈구생성이상 빈혈, 무반응성 거대적혈모구성 빈혈, 또는 적백혈병)에 의해 잠재적으로 원인이 되는 거대적혈모구성 빈혈; 예를 들면, 골수섬유증 (골수화생) 그리고 골수황폐를 포함하는 골수로성 빈혈; 선천적 적혈구조혈포르핀증; 그리고 납중독을 포함한다.

[0347] 특정 구체예들에 있어서, MDS를 앓는 환자는 선택적으로 EPO 수용체 활성제와 복합되어, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)은 비효과적 적혈구생성에 대한 보조 요법과 복합되어 이용될 수 있다. 이러한 요법은 빈혈을 치료하기 위하여 적혈 세포 또는 전혈액의 주입을 포함한다. 만성 또는 유전적 빈혈에서, 철 항상성을 위한 정상 기전은 반복 수혈에 의해 압도되어, 결국 주요 조직, 이를 테면 심장, 간, 및 내분비선에서 독성 및 잠재적으로 치명적인 철 축적으로 이어진다. 따라서, 비효과적 적혈구생성을 만성적으로 앓고 있는 환자를 위한 보조 요법은 소변 및/또는 대변에서 철 배출을 촉진시키고, 이로 인하여 조직 철 과부하를 방지 또는 역전시키기 위하여, 하나 또는 그 이상의 철-킬레이팅 분자로 치료하는 것을 또한 포함한다 [가령, Hershko (2006) Haematologica 91:1307-1312; Cao *et al.* (2011), Pediatr Rep 3(2):e17 참고]. 효과적인 철-킬레이팅 물질은 히드록실 라디칼 및 산화 산물의 촉매 생산을 통하여 대부분 철 독성을 설명할 수 있는 비-트란스페린 결합된 철의 산화된 형태인 제2철 이온에 선택적으로 결합하고, 그리고 중화시킬 수 있어야 한다[가령, Esposito *et al.* (2003) Blood 102:2670-2677 참고]. 이들 물질은 구조적으로 다양하지만, 그러나 모두 1:1 (헥사덴테이트 물질), 2:1 (트리덴테이트), 또는 3:1 (비덴테이트)의 화학량론에서 개별 철 원자와 함께 옥타헤드랄 배위결합복합체를 중화시킬 수 있는 산소 또는 질소 제공 원자를 보유한다 [Kalinowski *et al.* (2005) Pharmacol Rev 57:547-583]. 일반적으로, 효과적인 철-킬레이팅

물질은 또한 병에 걸린 조직에 접근할 수 있도록 물과 지질 모두에서 용해도를 가진, 상대적으로 낮은 분자량 (가령, 700 달톤 미만)이다. 철-킬레이트 분자의 특이적 예는 데페록사민, 매일 장관의 투여를 요하는 세균성 기원의 헥사텐테이트 물질, 경구 활성 합성 물질 데페리프론(비텐테이트) 및 데페라시록스(트리텐테이트)를 포함한다. 2개의 철-킬레이트 물질의 동일 투여로 구성된 복합 요법은 킬레이트 단일요법에 반응을 하지 않는 환자에서 전망이 있고, 데레옥사민 단독에 열악한 적응성 문제를 또한 극복하는데 전망이 있음을 보여준다.[Cao *et al.* (2011) *Pediatr Rep* 3(2):e17; Galanello *et al.* (2010) *Ann NY Acad Sci* 1202:79-86].

[0348] 본 명세서에서 이용된 바와 같이, "~와 복합되어" 또는 "병용 투여"는 제 2 요법이 신체에서 여전히 효과적인 (가령, 2개의 화합물이 환자에서 동시에 효과적이며, 여기에는 두 화합물의 공조 효과를 포함할 수 있다) 임의 형태의 투여를 지칭한다. 효과는 혈액, 혈청, 또는 혈장에서 상기 물질의 측정가능한 농도와 관련없을 수 있다. 예를 들면, 상기 상이한 치료 화합물은 동일한 제형 또는 별도의 제형으로 동시에 또는 연속적으로, 그리고 상이한 일정에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 이러한 치료를 받은 개체는 상이한 요법의 복합 효과로부터 이익을 얻을 수 있다. 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 하나 또는 그 이상의 선택적 추가 길항제)은 하나 또는 그 이상의 추가 추가 물질 또는 보조 요법과 동시에, 또는 이전에 또는 이후에 투여될 수 있다. 일반적으로, 각 치료 물질은 특정 물질을 위한 결정된 일정 및/또는 투여분량으로 투여될 것이다. 섭생에 이용되는 특정 조합은 치료요법 및/또는 바람직한 효과와 본 명세서의 길항제의 적합성을 고려해야 할 것이다.

[0349] 특정 구체예들에 있어서, MDS를 앓는 환자는 선택적으로 EPO 수용체 활성제와 복합되어, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)은 비효과적 적혈구생성에 대한 헵시딘 또는 헵시딘 항진제와 복합되어 이용될 수 있다. 간에서 주로 생산되는 순환 폴리펩티드, 헵시딘은 흡수성 장세포, 간세포 및 대식세포에 국소화된 철-배출 단백질인 페로포르핀의 분해를 유도하는 이의 능력에 의해 철 대사의 주요 조절물질로 간주된다. 넓은 의미로, 헵시딘은 세포의 철 이용성을 감소시켜, 헵시딘 항진제는 비효과적 적혈구생성 치료에 유의할 수 있다 [가령, Nemeth (2010) *Adv Hematol* 2010:750643 참고]. 이러한 검토는 β -지중해빈혈의 마우스 모델에서 증가된 헵시딘 발현의 유의한 효과에 의해 뒷받침된다 [Gardenghi *et al.* (2010) *J Clin Invest* 120:4466-4477].

[0350] 선택적으로 EPO 수용체 활성제와 복합된, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)은 병이든 RBC 성숙 빈혈을 적절하게 치료하는데 또한 유용할 것이며, 이러한 빈혈은 보통보다 작은(소구성), 보통보다 큰(대구성), 기형의 또는 비정상적 색을 띤(색소감소성) RBCs에 의해 특징화된다.

[0351] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 치료요법적 효과량의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)와 EPO 수용체 활성제를 개신에게 투여함으로써, 치료를 요하는 개체의 빈혈을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)을 EPO 수용체 활성제와 복합하여, EPO의 부작용을 겪게 될 것 같은 환자들에게서 이들 활성제의 요구되는 투여분량을 감소시키는데 이용될 수 있다. 이들 방법은 환자의 치료 또는 예방 치료에 유용할 수 있다.

[0352] 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)은 EPO 수용체 활성제와 복합되어, 특히 EPO 수용체 활성제의 더 낮은 투여 분량에서 적혈 세포의 증가를 획득할 수 있다. 이는 높은 투여분량의 EPO 수용체 활성제와 연합된 공지의 부정확한 효과 및 위험을 감소시키는데 유의할 수 있다. EPO의 주요 부작용은 예를 들면, 헤모크릿 또는 헤모글로빈 수준의 과도한 증가 및 적혈구증가증을 포함한다. 상승된 헤모크릿 수준은 고혈압(더 구체적으로 고혈압의 악화) 및 혈관 혈전증으로 이어질 수 있다. 보고된 EPO의 다른 부작용, 이들중 일부는 고혈압과 연관되는데, 두통, 인플루엔자-유사 증후군, 단락 폐쇄 (obstruction of shunts), 심근 경색 및 혈전증으로 인한 뇌 발작, 고혈압뇌병, 그리고 적색 세포 혈액 세포 무형성이다. 가령, Singibarti (1994) *J. Clin Investig* 72(suppl 6), S36-S43; Horl *et al.* (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15(suppl 4), 51-56; Delanty *et al.* (1997) *Neurology* 49, 686-689; 및 Bunn (2002) *N Engl*

J Med 346(7), 522-523 참고).

- [0353] 본 명세서의 길항제가 EPO와는 다른 기전에 의해 작용한다면, 이들 길항제는 EPO에 잘 반응하지 않는 환자들에서 적혈 세포 및 헤모글로빈 수준을 증가시키는데 유용할 것이다. 예를 들면, 본 명세서의 길항제는 정상 내지 증가된 투여 분량의 EPO (>300 IU/kg/week) 투여로 헤모글로빈 수준의 증가를 최대 표적 수준으로 증가시키지 못하는 환자들에게 유의할 것이다. 불충분한 EPO 반응을 하는 환자는 모든 유형의 빈혈에서 볼 수 있지만, 특히 더 많은 수의 비-반응자들은 암 환자 및 말기 신장 질환 환자에서 특히 빈번하게 관찰되었다. EPO에 대한 불충분한 반응은 구성적(EPO를 이용한 제 1 치료에서 관찰됨) 또는 획득적(EPO를 이용하여 반복 치료시 관찰됨)일 수 있다.
- [0354] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제) 로 치료된 또는 치료되는 후보를 관리하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 이 환자에서 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수를 측정하는 것이다. 상기 혈액학 매개변수는 본 명세서의 길항제로 치료받게 될 후보의 환자에게 적절한 투여분량을 평가하고, 치료 동안 혈액학 매개변수를 모니터링하고, 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제로 치료하는 동안 투약량을 조정해야하는지를 평가하고, 및/또는 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 적절한 유지 투여분량을 평가하는데 이용될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수가 정상 범위 밖에 있는 경우, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)의 투여는 감소되거나, 지연되거나 또는 종료될 수 있다.
- [0355] 본 명세서에서 제공되는 상기 방법에 따라 측정된 혈액학 매개변수는 당분야에서 인지된 방법들을 이용하여 예를 들면, 적혈 세포 수준, 혈압, 철 보관, 및 증가된 적혈 세포 수준과 관련된 체액에서 발견되는 다른 물질을 포함한다. 이러한 매개변수는 환자의 혈액 시료를 이용하여 측정될 수 있다. 적혈 세포 수준, 헤모글로빈 수준, 및/또는 헤모크릿 수준의 증가는 혈압의 증가를 야기할 수 있다.
- [0356] 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수가 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)로 치료받게 될 환자에서 정상 범위 밖에 있거나 또는 정상의 높은 측면에 있는 경우, 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여 개시는 혈액학 매개변수가 자연적으로 또는 치료 중재를 통하여 정상 수준 또는 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 지연될 수 있다. 예를 들면, 후보 환자가 고혈압 또는 사전-고혈압인 경우, 이 환자는 환자의 혈압을 낮추기 위하여 혈압 강하 물질로 치료될 수 있다. 개별 환자 상태에 적합한 임의의 혈압 강하 물질은 예를 들면, 이노제, 아드레날린 억제제 (알파 차단제 및 베타 차단제 포함), 혈관확장제, 칼슘 채널 차단제, 앙지오텐신-전환 효소 (ACE) 억제제, 또는 앙지오텐신 II 수용체 차단제를 포함한 것들이 이용될 수 있다. 대안으로 혈압은 식사 및 운동 섭생을 이용하여 치료될 수 있다. 유사하게, 후보 환자가 정상보다 낮은 수준 또는 정상범위의 하위 측면의 철 저장을 갖는 경우, 이 환자는 이 환자의 철 저장이 정상 수준 또는 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 적절한 식사 섭생 및/또는 철 보충물로 치료될 수 있다. 정상적 적혈 세포 수준 및/또는 헤모글로빈 수준보다 더 높은 수준을 보유한 환자의 경우, 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여는 이 수준이 정상적 또는 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 지연될 수 있다.
- [0357] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)로 치료받게 될 후보인 환자에서 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수가 정상 범위 밖에 있거나 또는 정상의 높은 측면에 있는 경우, 투여 개시가 지연되지 않을 수 있다. 그러나, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제 투여의 투여량 또는 빈도는 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여시 발생하는 혈액학 매개변수의 수용불가능한 증가 위험을 감소시킬 수 있는 양으로 설정될 수 있다. 대안으로, 이 환자를 위하여 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)과 바람직하지 못한 혈액학 매개변수 수준을 해결하는 치료 물질과 복합시킨 치료 섭생이 개발될 수 있다. 예를 들면, 환자의 혈압이 상승된 경우, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)과 혈압-강하 물질의 투여와 관련된 치료 섭생이 기획될 수 있다. 바람직한 철 저장보다 더 낮은 수준을 갖는 환자의 경우, 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물

질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제) 및 철 보충의 치료 섭생이 개발될 수 있다.

[0358] 한 구체예에서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)로 치료되는 후보인 환자를 위하여 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수에 대한 기준 매개변수(들)이 확립될 수 있고, 기준 값(들)에 근거하여 이 환자에게 맞는 적절한 투여 섭생이 확립될 수 있다. 대안으로, 환자의 병력에 근거하여 확립된 기준 매개변수는 이 환자에게 적절한 길항제 투여 섭생에 대한 정보를 제공하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 건강한 환자는 명시된 정상적 범위 위상의 확립된 기준 혈압 관독을 가진다면, 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제로 치료하기 전, 일반적 집단에 대하여 정상적인 것으로 간주되는 범위 안에 환자의 혈압을 가져갈 필요는 없다. 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)로 치료받기 전, 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수에 대한 환자의 기준 값은 또한 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제를 이용한 치료 동안 혈액학 매개변수로의 임의의 변화를 모니터링하기 위한 관련된 비교 값으로 이용될 수 있다.

[0359] 특정 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)로 치료받는 환자들에서 측정된다. 상기 혈액학 매개변수는 치료 동안 환자를 모니터링하고, 그리고하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제로 투여분량의 조정 또는 종료 또는 또다른 치료 물질의 추가 투여에 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)의 투여가 혈압, 적혈 세포 수준, 또는 헤모글로빈 수준의 증가, 또는 철 저장의 감소를 유도한다면, 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여분량은 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수에서 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 효과를 감소시키기 위한 양과 빈도로 감소될 수 있다. 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)의 투여가 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수를 이 환자에게 불리하도록 변화시킨다면, 그 다음 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여는 혈액학 매개변수(들)이 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 일시적으로, 또는 영구적으로 종료될 수 있다. 유사하게, 하나 또는 그 이상의 혈액학 매개변수가 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여 분량 또는 투여 빈도를 감소한 후 수용가능한 범위 안에 들지 못하는 경우, 그 다음 투여는 종료될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여의 감소 또는 종료에 대안으로, 또는 추가적으로, 이 환자에게 혈액학 매개변수(들)에서 바람직하지 못한 수준을 해결하는 추가 치료 물질, 이를 테면, 예를 들면, 혈압-강하 물질 또는 철 보충물이 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)로 치료되는 환자가 상승된 혈압을 가진다면, 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여는 동일한 수준에서 지속될 수 있고, 혈압-강하 물질은 치료 섭생에 추가되며, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투여가 감소될 수 있고 (가령, 양 및/또는 빈도) 그리고 혈압-강하 물질이 치료 섭생에 추가되거나, 또는 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 길항제의 투여가 종료될 수 있고, 그리고 환자는 혈압-강하 물질로 치료될 수 있다.

[0360] **5. 약학 조성물**

[0361] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)는 단독으로 또는 약학 제제 (치료 조성물 또는 약학 조성물)의 성분으로써 투여될 수 있다. "약제(pharmaceutical formulation)"란 이란 이 조성물 안에 포함된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하기 위한 형태의 조제물을 지칭하며, 제형이 투여되는 대상에게 수용불가능한 독성을 주는 추가 성분들은 포함하지 않는다. 상기 대상 화합물은 인간 또는 동물 의약에 이용하기 위한 임의의 통상적인 방식으로 투여하기 위하여 제형화될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)는 약학적으로 수용가능한 운반체와 함께 제형화될 수 있다. 약학적으로

수용가능한 운반체는 대상에게 일반적으로 비독성이며, 활성 성분 이외의 약학 제제에 포함된 성분을 지칭한다. 약학적으로 수용가능한 운반체는 완충액, 부형제, 안정화제, 또는 보존제를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 일반적으로, 본 명세서에서 이용하기 위한 약학 제제는 발열원 없는, 대상에게 투여될 때 생리학적으로 수용가능한 형태다. 본 명세서의 길항제이외에 상기에서 설명된 바와 같이 제제 안에 선택적으로 포함될 수 있는 치료요법적으로 유용한 물질은 본 명세서의 방법에서 대상 화합물과 복합되어 투여될 수 있다.

[0362] 전형적으로, 화합물은 장관외로 투여될 수 있다 [가령, 정맥 (I.V.) 주사, 동맥내 주사, 골내 주사, 근육내 주사, 척추강내 주사, 피하 주사, 또는 피내 주사]. 장관외 투여에 적절한 약학 조성물은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, 및 BMP6의 선택적으로 추가 길항제)와 하나 또는 그 이상의 약학적으로 수용가능한 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전 또는 사용 직전 멸균 주사용 용액 또는 분산액에 재구성될 수 있는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 주사가능한 용액 또는 분산액은 항산화제, 완충액, 정균제, 현탁물질, 농후 물질 또는 의도된 수령자의 혈액과 등장성이 되도록 만드는 용질을 포함할 수 있다. 본 명세서의 약학 제제에 이용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 운반체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올 (가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 등), 식물성 오일 (가령, 올리브 오일), 주사가능한 유기 에스테르 (가령, 에틸 올레이트), 및 이의 적절한 혼합물을 포함한다. 예를 들면, 피복제(이를 테면 레시틴)의 이용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 이용에 의해 적절한 유동성이 유지될 수 있다.

[0363] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 치료 방법은 임플란트 또는 장치로부터 상기 제제를 전신으로 또는 국소로 투여하는 것을 포함한다. 더욱이, 상기 조성물은 표적 조직 부위 (가령, 골수 또는 근육)로 운반하기 위한 형태로 포획 또는 주사될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 조성물은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)을 표적 조직 부위 (가령, 골수 또는 근육)로 운반할 수 있는 매트릭스를 포함하는데, 이는 발생 조직을 위한 구조를 제공하고, 최적으로 신체 안으로 재흡수될 수 있다. 예를 들면, 상기 매트릭스는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)의 서방출을 제공한다. 이러한 매트릭스는 다른 이식된 의료 장치에 현재 이용되는 물질로 형성될 수 있다.

[0364] 매트릭스 물질의 선택은 생체적합성, 생분해 능력, 기계적 성질, 미용적 외관, 그리고 경계면(interface) 성질 중 하나 또는 그 이상에 근거될 수 있다. 상기 대상 조성물의 특정 용도는 적절한 제제를 한정할 것이다. 상기 조성물을 위한 가능한 매트릭스는 생분해가능하며, 화학적으로 명확한 칼슘 술페이트, 트리칼슘포스페이트, 히드록시아파타이트, 폴리락타산, 그리고 폴리안하이드리드일 수 있다. 다른 가능한 물질은 생분해가능하며, 그리고 생물학적으로 잘 정의된, 예를 들면, 골 또는 피부 콜라겐을 포함한 물질이다. 추가 매트릭스는 순수 단백질 또는 세포의 매트릭스 성분들로 구성된다. 다른 가능한 물질인 생분해되지 않고, 화학적으로 특정한, 예를 들면, 소결화된 히드록시아파타이트, 바이오글래스, 알루미늄이트 또는 다른 세라믹이 포함된 것들이다. 매트릭스는 예를 들면, 폴리락타산, 및 히드록시아파타이트 또는 콜라겐 그리고 트리칼슘포스페이트가 포함된 상기 언급된 유형들의 임의의 조합으로 구성될 수 있다. 바이오세라믹은 조성물에서 변경될 수 있고 (가령, 칼슘-알루미늄이트-포스페이트) 그리고 포어 크기, 입자 크기, 입자 모양 및 생분해능력중 하나 또는 그 이상을 변경시키기 위하여 가공될 수 있다.

[0365] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 제제 (조성물)은 예를 들면, 캡슐, 샷세, 알약, 테블릿, 로젠지 (풍미제 베이스, 이를 테면 슈크로스 및 아카시아 또는 트라가칸 이용), 분말, 과립, 용액 또는 수성 또는 비-수성 액체 내 현탁액, 또는 엘룩시르, 또는 시럽 또는 빨아먹는 캔디 (비활성 베이스, 이를 테면 젤라틴, 슈크로스 및 아카시아), 및/또는 구강세척제의 형태로 경구 투여될 수 있으며, 이들 각각은 본 명세서의 예정된 양의 화합물 및 선택적으로 하나 또는 그 이상의 다른 활성 성분들이 포함된다. 본 명세서의 화합물 및 선택적으로 하나 또는 그 이상의 다른 활성 성분들은 볼루스, 연질약 또는 연고로 투여될 수 있다.

[0366] 경구 투여를 위한 고형 투약형 (가령, 캡슐, 테블릿, 알약, 당의정, 분말 및 과립)에 있어서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 화합물은 하나 또는 그 이상의 약학적으로 수용가능한 운반체, 예를 들면, 구연산 나트륨, 인산 이칼슘, 충전제 또는 증량제 (가령, 전분, 락토스, 슈크로스, 포도당, 만니톨, 그리고 시알산), 결합제 (가령 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로스 및 아카시아), 습윤제 (가령, 글리세롤), 붕해 물질 (가령, 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 실리케이트 및 탄산 나트륨), 용액 지체 물질 (가령 파라핀), 흡수 가속물질 (가령 4차 암모늄 화합물), 가습 물질 (가령, 세틸 알코올 및 글

리세롤 모노스테아레이트), 흡수제 (가령, 카올린 및 벤토나이트 클레이), 윤활제 (가령, 활석, 스테아레이트 칼슘, 스테아레이트 마그네슘, 고흥 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 술페이트 나트륨), 발색 물질, 이의 혼합물과 함께 혼합될 수 있다. 캡슐, 테블릿 및 알약의 경우에 있어서, 약학 제제 (조성물)는 완충 물질을 또한 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고흥 조성물은 가령, 락토스 또는 우유 슈가 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜이 포함된 하나 또는 그 이상의 부형제를 이용하여 연질 및 경질-충진된 젤라틴에서 충전물질로 또한 이용될 수 있다.

[0367] 본 제제 (조성물)의 경구 투여를 위한 액체 투약형은 약학적으로 수용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함할 수 있다. 활성 성분(들)에 추가하여, 액체 투약형은 당분야에 흔히 이용되는 비활성 희석제, 예를 들면, 물 또는 다른 용매, 가용화 물질 및/또는 유화제 [가령, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 또는 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (가령, 목화씨유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이의 혼합물]을 포함할 수 있다. 비활성 희석제이외에, 경구 제제는 예를 들면, 가습 물질, 유화 및 현탁 물질, 감미 물질, 풍미 물질, 발색 물질, 향료 물질, 보존제 물질, 및 이의 조합이 포함된 어쥬번트를 또한 포함할 수 있다.

[0368] 활성 화합물에 추가하여, 현탁액은 예를 들면, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 소르비탄 에스테르, 미소겔정 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천-한천, 트라가탄 및 이의 조합이 포함된 현탁 물질을 포함할 수 있다.

[0369] 미생물의 작용 및/또는 성장의 방지는 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 그리고 페놀 소르브산이 포함된 다양한 항균 및 항곰팡이 물질의 포함에 의해 보장될 수 있다.

[0370] 특정 구체예들에 있어서, 예를 들면, 슈가 또는 염화나트륨이 포함된 등장성 물질이 포함된 조성물에 포함되는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 약제형의 연장 흡수는 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴이 포함된 흡수를 지연하는 물질의 포함에 의해 야기될 수 있다.

[0371] 투약형 섭생은 주치의가 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)의 작용을 변형시키는 다양한 인자를 고려함으로써 결정될 수 있다. 상기 다양한 인자는 환자의 적혈 세포 카운트, 헤모글로빈 수준, 원하는 표적 적혈 세포 카운트, 환자의 나이, 환자의 성별, 환자의 식사, 억제된 적혈 세포 수준에 원인이 될 수 있는 임의의 질환의 심각성, 투여 시간 및 기타 임의의 인자를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 최종 조성물에 기타 공지의 활성 물질의 추가는 투약형에 영향을 줄 수 있다. 이 과정은 적혈 세포 수준, 헤모글로빈 수준, 망상적혈구 수준, 및 조혈 과정의 다른 지시물질중 하나 또는 그 이상의 주기적 평가에 의해 모니터링될 수 있다.

[0372] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 또한 제공한다. 이러한 요법은 상기 열거된 하나 또는 그 이상의 장애를 갖는 세포 또는 조직안으로 길항제 서열들의 도입에 의해 이의 치료 효과를 얻을 수 있다. 길항제 서열들의 전달은 예를 들면, 재조합 발현 벡터, 이를 테면 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산계의 이용에 의해 획득될 수 있다. 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)의 바람직한 치료요법적 전달은 표적화된 리포솜의 이용이다.

[0373] 본 명세서에서 교시된 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스성 벡터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 백시니아, 또는 RNA 바이러스 (가령, 레트로바이러스)를 포함한다. 상기 레트로바이러스 벡터는 뮤린 또는 레트로바이러스의 유도체일 수 있다. 단일 외부 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 예는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), 하르베이(Harvey) 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 및 Rous 육종 바이러스 (RSV). 다수의 추가 레트로바이러스 벡터는 다중 유전자를 통합할 수 있다. 이들 모든 벡터는 선택가능한 표지를 위한 유전자를 전달 또는 통합할 수 있고, 이에 의해 형질도입된 세포가 확인될 수 있고, 생성될 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예를 들면, 슈가, 당지질, 또는 단백질의 부착에 의해 표지-특이적으로 만들어질 수 있다. 바람직한 표적화는 항체를 이용하여 실행된다. 당업자는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9,

및 BMP10의 선택적 추가 길항제)이 포함된 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적 전달이 허용되도록 특이적 폴리뉴클레오티드 서열들이 바이러스 외피에 부착되거나, 또는 레트로바이러스 게놈 안에 삽입될 수 있음을 인지할 것이다.

[0374] 대안으로, 조직 배양 세포는 레트로바이러스 구조 유전자 (gag, pol, 및 env)가 인코딩된 플라스미드를 통상적인 인산염 칼슘 형질감염에 의해 직접적으로 형질감염될 수 있다. 그 다음 이들 세포는 관심 유전자가 포함된 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 상기 생성 세포는 상기 레트로바이러스 벡터를 배양 배지로 방출한다.

[0375] 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 GDF11 및/또는 액티빈 B 길항제 물질 (하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, GDF15, Nodal, GDF3, BMP3, BMP3B, BMP9, 및 BMP10의 선택적 추가 길항제)를 위한 또다른 표적화된 운반은 콜로이드 분산계다. 콜로이드성 분산계는 예를 들면, 거대분자 복합체들, 나노캡슐, 미소구, 비드 및 수중유 유체가 포함된 지질-기반의 시스템, 미셀, 혼합된 미셀 및 리포솜을 포함한다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 시험관내 및 생체내 운반 비이클로 유용한 인공 막 소포다. RNA, DNA, 및 고유 비리온은 수성 내부 안에 포집될 수 있고, 이는 생물학적 활성 형태로 세포로 전달될 수 있다 [가령, Fraley, et al. (1981) Trends Biochem. Sci., 6:77 참고]. 리포솜 비이클을 이용하여 효과적인 유전자 전달을 위한 방법은 당분야에 공지되어 있다 [가령, Mannino, et al. (1988) Biotechniques, 6:682, 1988].

[0376] 리포솜 조성물은 스테로이드(가령콜레스테롤)이 포함될 수 있는 인지질 조합이다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온 강도 및 이가 양이온의 존재에 따라 달라진다. 예를 들면, 포스파티딜 화합물 (가령, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 스펅고리피드, 세레브로시드, 및 강글리오시드), 난 포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린, 및 디스테아릴포스파티딜콜린이 포함된 다른 인지질 또는 다른 지질이 또한 이용될 수 있다. 리포솜의 표적화는 예를 들면, 장기-특이성, 세포-특이성, 그리고 소기관(organelle)-특이성에 기반을 두는 것 또한 가능하며, 당업계에 공지되어 있다.

[0377] 예시

[0378] 본 발명은 지금 일반적으로 설명되지만, 다음의 실시예를 참고하면 더 잘 이해될 것이며, 본 발명의 실시예는 특정 구체예의 설명을 위한 것이며, 본 발명에 국한시키려는 의도는 없다.

[0379] **실시예 1: ActRIIB(L79D 20-134)-Fc 및 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc에 대한 리간드 결합 특이성의 특징**

[0380] 서열 번호:1에 대하여 위치 79에 산성 아미노산을 갖는 본 서열번호:1의 아미노산 20-134가 포함된 변이체 ActRIIB-Fc 융합 단백질[본 명세서에서 " ActRIIB(L79D 20-134)-Fc " 융합 단백질, 구조체, 변이체, 등으로 지칭됨; 본 명세서의 서열 번호:23]은 시험관 및 생체내 독특한 생물학적 성질에 의해 특징화된다고 이미 보고된 바 있다 (가령, U.S. 특허. 8,058,229 참고). 변형안된 융합 단백질 (ActRIIB(20-134)-Fc 융합 단백질)의 대응하는 시료와 비교하여, 상기 ActRIIB(L79D 20-134)-Fc 변이체는 액티빈 A에 대한 결합 친화력의 실질적인 상실, 그리고 따라서 액티빈 A 활성을 길항하는 능력이 감소되나, GDF11의 결합 및 저해는 거의 야생형 수준을 유지하는 것을 특징으로 한다. 생체내에서, 상기 ActRIIB(L79D 20-134)-Fc 변이체는 변형안된 ActRIIB(20-134)-Fc 융합 단백질과 비교하여, 적혈 세포 수준을 증가시키는 능력에서 상당히 더 효력있는 것이 밝혀졌다. 따라서 이들 데이터는 관찰된 생물학적 활성은 액티빈 A 저해에 의존적이지 않다는 것을 나타낸다.

[0381] 이중-절두된 변이체 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc (가령, 본 명세서의 서열 번호:49 뿐만 아니라 U.S. 특허. 8,058,229 참고)에 대하여 유사한 결과가 이미 보고되었으며, 그리고 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc에 대한 리간드 결합 프로파일은 표면 플라즈몬 공명에 의해 다양한 ActRII 리간드 (가령, GDF11, GDF8, 액티빈 A, 액티빈 B, BMP10, BMP6, 및 BMP9)에 의해 더 특징화되었다. 상기 결과는 도 13에 나타낸다.

[0382] 이 데이터와 다른 데이터를 고려할 때, , 출원인은 증가된 적혈 세포 수준을 촉진시키기 위하여 저해되어야 하는 ActRII 리간드는 GDF11 및 액티빈 B이라는 것을 판단하였다. 이 데이터는 대상에서 적혈 세포 수준을 증가시키는 방법의 내용에서 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E, BMP6, 및 GDF8을 길항(저해)하는 것이 또한 허용가능하다는 것을 제시한다.

[0383] **실시예 2: GDF-11, GDF-8, 액티빈 B, 액티빈 C, 및 액티빈 E-중재된 신호생성에 대한 생물학적 분석**

[0384] A-204 리포터 유전자 분석을 이용하여 GDF11, 액티빈 B, 액티빈 A 및/또는 GDF8에 의한 신호생성에서 항-GDF11/액티빈 B 이중특이적 항체의 효과를 평가한다. 이 분석은 당분야에 이미 설명되었다 (가령, U.S. 특허 출원 번호 2013/0243743). 간단히 설명하자면, 상기 A-204 리포터 유전자 분석은 근육으로부터 유도된 인간 횡문근육

중 세포 계통과 Dennler *et al.* (1998) EMBO 17: 3091-3100에서 설명된 리포터 벡터 pGL3(CAGA)12를 이용한다. CAGA12 모티프는 TGF- β 반응성 유전자 (가령, PAI-1 유전자)에 존재하며, 따라서 이 벡터는 Smad2 및 3을 통하여 신호생성하는 인자들 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 A, 및 GDF8)을 위하여 일반적으로 이용된다.

[0385] 첫날, A-204 세포는 하나 또는 그 이상의 48-웰 플레이트로 전달된다. 2일차, 상기 A-204 세포는 10 μ g pGL3(CAGA)12 또는 pGL3(CAGA)12(10 μ g) + pRLCMV (1 μ g) 및 Fugene으로 형질감염된다. 3일차, 배지 + 0.1% BSA에 희석된 리간드 인자들 (가령, GDF11, 액티빈 B, 액티빈 A)은 항-GDF11/액티빈 B 이중특이적 항체와 함께 세포에 추가된다. 전형적으로, 항-GDF11/액티빈 B 이중특이적 항체는 세포에 추가되기 전 1시간 동안 인자들로 사전항온처리될 필요가 있다. 대략 6시간 후, 상기 세포는 PBS로 세척되며, 용해된다.

[0386] 그 다음 상기 세포 용해물은 루시퍼라제 분석을 받게 되고, Smad2/3 활성화 정도가 결정된다. 항-GDF11/액티빈 B 이중특이적 항체의 저해 정도는 적절한 대조와 비교하여 결정된다.

[0387] **실시예 3: 항-GDF11/항-액티빈 B 이중특이적 항체로 처리**

[0388] 19주령의 수컷 C57BL/6NTac 마우스들은 무작위로 2개 집단중 하나에 할당된다. 마우스에게 3주 동안 주당 2회 피하 주사에 의해 비이클 (10 mM Tris-완충된 염, TBS) 또는 항-GDF11/항-액티빈 B 이중특이적 항체가 투여된다. 기준선에서 혈액이 수집되고, 투여 3주 후에 혈액이 수집된다. 혈액 시료들은 혈액학 분석기 (가령, HM2, Abaxis, Inc.)를 이용하여 세포 분포에 대하여 분석될 것이다. 특히, 예를 들면, 적혈 세포 카운트 (RBC), 헤모글로빈 (HGB), 및 헤모크릿 (HCT)이 포함된 적혈 세포 매개변수에 있어서 변화에 대하여 마우스들이 모니터링 될 것이다.

[0389] **실시예 4: 항-GDF11 항체 및 항-액티빈 B 항체의 연합 투여**

[0390] 19주령의 수컷 C57BL/6NTac 마우스는 4개 집단중 하나에 무작위로 할당된다: 마우스들은 비이클 (10 mM TBS), 항-GDF11 항체, 항-액티빈 B 항체, 또는 항-GDF11 및 항-액티빈 B 항체를 투여받는다. 기준선에서 혈액이 수집되고, 투여 3주 후에 혈액이 수집된다. 혈액 시료들은 혈액학 분석기 (가령, HM2, Abaxis, Inc.)를 이용하여 세포 분포에 대하여 분석될 것이다. 특히, 예를 들면, 적혈 세포 카운트 (RBC), 헤모글로빈 (HGB), 및 헤모크릿 (HCT)이 포함된 적혈 세포 매개변수에 있어서 변화에 대하여 마우스들이 모니터링 될 것이다.

[0391] **실시예 5: 적혈구생성에 있어서 항-액티빈 B, 항-GDF8, 및 항-GDF8/GDF11 항체들의 효과**

[0392] 3가지 항체, 항-액티빈 B, 항-GDF8 항체, 및 이중특이적 항-GDF8/GDF11 항체들은 마우스에서 적혈구생성을 자극 하는 이들의 능력 (가령, 적혈 세포, 헤모글로빈, 및 헤모크릿 수준의 증가)에 대하여 평가된다. C57BL6 마우스 (8-10 주령)는 다음 5개 치료 집단으로 나뉘었다: i) 비이클 (TBS, 주당 2회; 피하)로 치료, ii) 항-액티빈 B 항체 (10 mg/kg; 주당 2회; 피하)로 치료, iii) 항-GDF8 항체 (10 mg/kg, 주당 2회; 피하)로 치료, iv) 이중 특이적 항-GDF8/GDF11 항체 (10 mg/kg, 주당 2회; 피하)로 치료, 그리고 v) 항-액티빈 B 항체 (10 mg/kg, 주당 2회; 피하)와 상기 이중특이적 항-GDF8/GDF11 항체 (10 mg/kg, 주당 2회; 피하)의 조합으로 치료. 치료 2주 후, 마우스는 안락사되고, 완전한 혈액 카운트 매개변수가 측정되었다.

[0393] 비이클 처리된 대상(대조군)과 비교하여, 항-액티빈 B 항체 단독으로 처리된 마우스와, 항-GDF8 항체 단독으로 처리된 마우스의 적혈 세포수준의 약간의 증가가 있었다. 도 16 참고 상기 이중특이적 항-GDF8/GDF11 항체로 처리된 마우스에서 적혈 세포 수준에 저 실질적인 효과가 관찰되었다. 도 16 참고 그러나, 적혈구생성에서 최대 효과는 항-액티빈 B 항체와 상기 이중특이적 항-GDF8/GDF11 항체의 조합으로 처리된 마우스에서 관찰되었고, 가령, 상기 조합 요법은 대조 개체와 비교하였을 때 증가된 적혈 세포 수준이 상당히 증가되었다 (8.8%). 도 16 참고 또한, 항-액티빈 B 항체와 상기 이중특이적 항-GDF8/GDF11 항체의 조합 치료는 대조 개체와 비교하였을 때 증가된 수준의 헤모글로빈 (9.6%) 및 헤모크릿 (9.1%)을 야기한다는 것이 관찰되었다.

[0394] 따라서, 검사된 리간드들 중에서 추가 ActRII 리간드 길항제 (억제제)가 동물에 투여될 때, 혈액 세포, 헤모크릿, 및 헤모글로빈 수준이 증가되는 경향이 뚜렷하다. 흥미롭게도, 단일 ActRII 리간드의 저해는 적혈 세포 수준에 있어서 유의적인 효과를 가지지 않았다. 그러나, 최소한 2개의 ActRII 리간드의 저해는 적혈구생성을 촉진시킬 수 있는 것으로 보이며, 3개 ActRII 리간드들이 저해될 때 적혈 세포 수준, 뿐만 아니라 헤모글로빈 및 헤모크릿 수준에 있어서 더 큰 효과가 관찰되었다. 이와 함께, 이들 데이터는 다중 ActRII 리간드가 적혈구생성에 기여한다는 것을 설명하고, 이들 리간드중 단순히 하나를 저해시키는 것은 헤모크릿, 헤모글로빈, 및/또는 적혈 세포 수준에서 상당한 증가를 획득하는데 충분하지 않을 수 있음을 나타낸다. 따라서, 이들 실험으로부터 대상에서 적혈구생성을 촉진시키기 위한 효과적인 전략은 다중 (가령, 최소 2개) ActRII 리간드들을 표적으로

하는 것을 나타낸다.

[0395]

참고자료의 편입

[0396]

본 명세서에서 언급된 모든 공개물, 및 특허는 각 개별 공개, 또는 특허 출원이 특이적으로 그리고 개별적으로 참고문헌에 통합된 것과 동일한 수준으로 참고자료에 통합된다.

[0397]

주제의 특이적 구체예들이 논의되었지만, 상기 명세서는 설명을 위한 것이며, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서 및 하기 청구범위 검토시 당업자들에게는 많은 변수들이 자명할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 명세서 및 청구범위와 함께, 이들의 등가의 범위, 변이에 의해 결정되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3a

1 tccccgcccc ccagtcctcc ctccccctccc ctccagcatg gtgctcggcg cccgctgct
 61 gctggggcttc ctgctcctcg ccctggagct gcgcccccg ggggagggcg ccgagggccc
 121 cgcggcggcg gcggcggcg cgggcggcgc ggcagcggcg ggggtcgggg gggagcgctc
 181 cagccggcca gccccgtccg tggcgcccga gccggacggc tgccccgtgt gcgtttggcg
 241 gcagcacagc cgcgagctgc gcctagagag catcaagtgc cagatcttga gcaaactgcg
 301 gctcaaggag gcgcccaca tcagcccgga ggtggtgaag cagctgctgc ccaaggcgcc
 361 gccgctgcag cagatcctgg acctacacga cttccagggc gacgcgctgc agcccaggga
 421 cttcctggag aaggacagat accacgccac caccgagacc gtcattagca tggcccagga
 481 gacggaccga gcagtacaga cagatggcag ccctctctgc tgccattttc acttcagccc
 541 caaggtgatg ttcacaaagg tactgaaggc ccagctgtgg gtgtacctac ggctgtacc
 601 ccgccagcc acagtctacc tgcagatctt gcgactaaaa cccctaactg gggaggggac
 661 gcaggggga gcggggcgag gccggcgtca catccgtatc cgctcactga agattgagct
 721 gcactcacgc tcaggccatt ggcagagcat cgacttcaag caagtgtctac acagctggtt
 781 ccgccagcca cagagcaact ggggcacoga gatcaacgcc tttgatccca gtggcacaga
 841 cctggctgtc acctccctgg ggccgggagc cgaggggctg catccattca tggagcttcg
 901 gggaaagggg aagcaggggc gttcccggcg gaacctgggt ctggactgcg acgagcactc
 961 aagcaggtcc cgctgctgcc gatatcccct cacagtggac tttgaggctt tcggctggga
 1021 ctggatcatc gcacctaacg gctacaaggc caactactgc tccggccagt gcgagtaeat
 1081 gttcatgcaa aatatccgc ataccattt ggtgcagcag gccaatccaa gaggctctgc
 1141 tgggccctgt tgtaccacca ccaagatgtc ccaatcaac atgctctact tcaatgaaa
 1201 gcagcagatt atctacggca agatccctgg catggtggtg gatcgctgtg gctgctctta
 1261 aggtggggga tagaggatgc ctccccaca gaccctacc caagaccctc agcctgccc
 1321 ccaccccccc aagccctaga gctcccctca ctcttcccgc gaacatcaca ccgttcccc
 1381 accaagcctg gtgcaatata acagagggag gcaggtggga attgagggtg aggggtttg
 1441 gggaaagggg aagcaggggc atagtcaggg tggggagtggt ttgaaagttg cagatgaaa
 1501 ggtttgacaa aaagacagag agatgtagag acagtgatag agacagagga aaaaaagag
 1561 cagcagtgag aaggcaaaaga gagagccaga agagacagac gaggcagaga caaaactg
 1621 agaagagac tgaatggag taataaatga aagccccaca ccaagcctcc tttctccac
 1681 tggcaaggtg aggggcttgg tatagtttgg ggagatcccc tgactattca gtaggagaag
 1741 aatcaaaaaa tccattcttt tctccttctc tccctccaac agtggccagg ggaaggggaa
 1801 gtgagggcag gggcaaaaag atttgggaat ttttatttat ttatttatg tgacttttca
 1861 tttttttggt atttggcttt actggaatag gaggggcccct gccactgtg ccccgtttat
 1921 cccttattcc ccaaacctcg ctctcccaaa cacctactca ccttaagcact tgtataaagc
 1981 ctccagggtt gggaatggga gtaaaggcca agagggcgga cacatgaagt ttagtttcta
 2041 accatcatc accctaactc aaccttttct gagccaaatg gcttgaattg aagccagtgtg
 2101 tcatggaaat agtaagaggt tagggtttaa gagctgggga tgcgggggtg ggagagaaa
 2161 ccctcaacat ccaggatcta tataatgaga gctactttaa accctcaggt ccacctcat
 2221 gatgctgagt tatttagcca gaggggtcag cctgcttatg cccaaattcc ctgagccaag
 2281 agagagacca aagagcctct ggaatggccc tgctcccagc ctctatcttc aggtcaatta
 2341 gagagagtat agagacccca gagtcccctg ggtctggaaa gcgttaggag aggtcaagaa
 2401 aggagcagta aggagcctga aggttacag gcaattgaaat ccaaatcact gctctgggct
 2461 agggaataga gccagcagac caaggtggga aggattctgg aagggggaca ttttagtctc
 2521 ctaaccccaa agctcagggg ggaagagggg agaacaagga agcagagtgat ataattattt
 2581 tttcctttta tttttgaaat ctaacagtac ctggcagcag ggaggggaaa gtacagtggg
 2641 gaaaagcatc tgacaaggcc agttagaaca gaggatggga aggatggaga ctcccgggct
 2701 tggaaaggcta ggaagcaggc agagactggt tgccatttca agtactagc tagggccatt
 2761 cattcctccc acaacctga cccattctcc tctggactca ctgtgcctca gttcttccc
 2821 ctcaatggaa tgagaaatga cagcaccgc cacagccaag agatgaattc tgagcactta
 2881 ccacgggcac tttatggaca taaaatacct ctcgctgtgg gacagataac cagggcacca
 2941 gagtagtggt gaagagatgt gaggcttaag aggagtocaa ggcttcagag tacaagttcc
 3001 cctctgcctc ccagctggac agtgcctaga agccaaggag ttgagaatct cctgatccac
 3061 acctatcct tacttccaca ccaggcctct tggctccagg caagagctta gaggatgta
 3121 ggagaggtgg gggtaagaat cttcagcaaa actgtcactc taagtagagc cagcagttac

도면3b

3181 gggctctgata aaaacagtac tgaactaaag taaagcccaa gctgggtgagc aaactggat
 3241 ggctcattct tcccaagagc atgactctcc cccttggcca gttgggtgaa ggggcaaagg
 3301 tatgtgacca cccttgagaa ggtgatgttg gtgagcttta acatcttatt cctattctta
 3361 tagtgagaaa gtgaaacaag atctttcagt agaggaatgg gcagggctgt aggctcttc
 3421 agcttgcctt caccatata gcagctatgc taaccccaag cctctctggc cctgttcttc
 3481 atccttcctt ctgccccaat cctgaaggac aagacacacc cggccatcaa accactcac
 3541 atttccttgg tgggaaggaaa ggaacagaga agtgaagaac agatacctcc ctccaaggtc
 3601 aaatgcctcg tgatcttggc agagtaggga ttgggcaata agcatcaggt atcttccctc
 3661 tacagattct agagagctgg gcattaat atgggggaca cttagaatac agctccttaa
 3721 ataccaccaa ataaagacct ttgtgtgtgt gtggtgggtg gggggggggc aggggtcttt
 3781 ctcttatgaa cataaatctg tgagctgaag tctcattccc ctgttctctc ctaccccaa
 3841 agaggcacag agtgaaggga cttggggggc acagctcagc aaccagtggt gatttagcac
 3901 cccctcccac cttatgatgt gtgtggacct ggccagtgcc cctctgaaca tatcattatt
 3961 agtgtaatta tcatttattt tgtgtatttg tcacattgtg tgcatgacag cctttgttaa
 4021 ggggtgtctga ggagtatgga gctgacaggg gcattggaat gccaggaaag aacttcttca
 4081 actgagatca aggcttctctg gagggaacca ctgcaaaaag gccatcaggc agttttcaag
 4141 ttatgtgaca gagggcaaaag acggccatag ggtgctctga gttttgggat ggtcacatga
 4201 cacaatccag cacttgaacc tgaaaaaaaaa aataaaagcg gtcaaagagt ttagaattca

도면4

1 mvlaapl11lg fl11lalelrp rgeaaegpaa aaaaaaaaa agvvggerssr apsvapepd
 61 gcpvcvwrqh srelrlesik sqilsklrlk eapnisrevv kqllpkap1l qqildlhdfq
 121 gdalqpedfl eedayhatte tvismaqetd pavqtdgspl cchfhfspkv mftkvlkaql
 181 wvylrpvprp atvylqilrl kpltgegtag ggggrrhir irslkielhs rsghwqsidf
 241 kqvlhswfrq pqsnwgiein afdpsgtdla vtslgpgaeg lhpfmelrvl entkrsrnl
 301 glcdcdehsse srccrypltv dfeafgdwi iapkrykany csgqceymfm qkyphthlvq
 361 qanprgsagp cctptkmspi nmlyfndkqq iiykipgmv vdrcgcs

도면5a

1 actcggtctcg cctcggggcg gggccctctg tgcagcggc cgcaccatgg acgggctgcc
 61 cggctcggcg ctggggggcg cctgccttct gctgctggcg gccggctggc tggggcctga
 121 ggcctggggc tcaccacgc ccccggcgac gcctgcggcg ccgcccacc ccccgccacc
 181 cggatccccg ggtggctcgc aggacacctg tacgtcgtgc ggcggcttcc ggcggccaga
 241 ggagctcggc cgagtggacg cgcacttctt ggagcggtg aagcggcaca tcttgagccg
 301 cctgcagatg cggggccggc ccaacatcac gcacgccgtg cctaaggccg ccatggtcac
 361 ggcctcgcg aagctgcacg cgggcaaggt gcgcgaggac ggccgctgg agatcccgca
 421 cctcgacggc cacgccagcc cggggcggca cggccaggag cgcgtttccg aaatcatcag
 481 cttcggccgag acagatggcc tcgcctcctc ccgggtccgc ctatacttct tcatctcaa
 541 ogaaggcaac cagaacctgt ttgtgggtca ggccagcctg tggctttacc tgaacctcct
 601 gccctacgtc ctggagaagg gcagccggcg gaaggtgagg gtcaaagtgt acttccagga
 661 gcagggccac ggtgacaggt ggaacatggt ggagaagagg gtggacctca agcgcagcgg
 721 ctggcatacc ttcccactca cggaggccat ccaggccttg tttgagcggg gcgagcggcg
 781 actcaaccta gacgtgcagt gtgacagctg ccaggagctg gccgtggtgc cgggttctgt
 841 ggaccacggc gaagagtgc accggcctt tgtggtggtg caggctcggc tgggcgacag
 901 caggcacccg attcgaagc gaggcctgga gtgcgatggc cggaccaacc tctggttcag
 961 gcaacagttc ttattgact tccgcctcat cggctggaac gactggatca tagcaccac
 1021 cggctactac gggaactact gtgagggcag ctgcccagcc tacctggcag gggctcccgg
 1081 ctctgcctcc tccctccaca cggtgtggt gaaccagtac ccatgcccgg gtctgaacc
 1141 cggcacggtg aactcctgct gcattcccac caagctgagc accatgtcca tgctgtactt
 1201 cgatgatgag tacaacatcg tcaagcggga cgtgcccaac atgattgtgg aggagtggc
 1261 ctgcgcctga cagtcaagg caggggcacg gtggtggggc acggaggcca gtcccgggtg
 1321 ggcttcttcc agcccccgcg ggaacggggg tacacggtgg gctgagtaca gtcattctgt
 1381 tgggctgtgg agatagtgcc aggggtgcggc ctgagatatt tttctacagc ttcatagagc
 1441 aaccagtcaa aaccagagcg agaaccctca actgacatga aatactttaa aatgcacacg
 1501 tagccacgca cagccagacg catcctgcca cccacacagc agcctccagg ataccagcaa
 1561 atggatcgcg tgacaaatgg cagcttagct acaaatgcct gtcagtggga gagaatggg
 1621 tgagcagcca ccattcccac cagctggccc ggccactctg aattggcctc tccgagcaca
 1681 cataaaagca caaagacaga gacgcagaga gagagagaga gccacggaga ggaaaagcag
 1741 atgcaggggt ggggagcgc gctcggcggg ggctgcgtgt gccccgtggc tttaccagg
 1801 cctgctctgc ctggctcgat gtctgcttct tccccagcct gggatccttc gtgcttcaag
 1861 gcctggggag cctgccttcc catgcccttg tgcaggaaa gagaccaga aaggacaaa
 1921 cccgtcagag acctgggagc aggggcaatg accgtttgac tgtttgtggc ttgggctct
 1981 gacatgactt atgtgtgtgt gtgtttttg ggtggggagg gaggagaga agagggggct
 2041 aaatttgatg ctttaactga tctccaacag ttgacaggtc atccttgcca gttgtataac
 2101 tgaaaaagga cttttctacc aggtatgacc ttttaagtga aaatctgaat tgttctaat
 2161 ggaaagaaaa aaagttgcaa tctgtgcctc tcattgggga cattcctcta ggactggtt
 2221 ggggacgggt gggaatgacc cctaggcaag gggatgagac cgcaggagga aatggcggg
 2281 aggaggcatt cttgaactgc tgaggatggg ggggtgtccc tcagcggagg ccaagggagg
 2341 ggagcagcct agttgtctt ggagagatgg ggaaggctt cagctgatt gcagaagtg
 2401 cccatgtggg ccccagccat cagggtggc cgtggacgtg gccctgccc actcacctgc
 2461 ccgctgccc gcccgcccgc atagcacttg cagacctgca tgaacgcaca tgacatagca
 2521 cttgcccgatc tgctgtgtc cagaagtggc ccttgccga cgcgcaact cgctcgcct
 2581 ctagatgtcc aagtgccacg tgaactatg aatttaagg gttgaccac actagacgaa
 2641 actggactcg tacgactctt tttatattt ttatacttga aatgaaatcc tttgcttctt
 2701 ttttaagcga atgattgctt ttaatgttt cactgattta gttgcatgat tagtcagaaa
 2761 ctgccatttg aaaaaagtt atttttatag cagcaaaaa aaaaaaaaa gaatacagtt
 2821 aatgtatta tacataatt tgaacaaaa gaggccaaca gatcagttt aattttatta

도면5b

2881 gacggtgagg ccatctgaga tgaggtggac gttctgagca gtccttgag gcctgcca
 2941 acgtttcagg gtatgaatgg attttgttta ttoggtttga tgtgtctttt ccatccttac
 3001 acaccagaa gtagagtaa aaatgactat gatagaatgc aggtgtgtat ccttaaatcc
 3061 tcatctttat gtttatttaa taaagctccc cttagattct gtttcataat aatttaaac
 3121 caaacaattt tcccatagac ttgctgttaa agtattgtac gtttgtgtac agtttaagaa
 3181 aataaaagat tgagtgccac gggaaaaaaa aaaaaaaaa

도면6

1 mdg1pgralg aac1111aag wlgpeawgsp tppptpaapp pppppgspgg qdtctscgg
 61 frrpeelgrv dgdfleavkr hilsrlqmrq rpnithavpk aamvtalrkl hagkvredgr
 121 veiphldgha spgadgqerv seiisfaetd glassrvrly ffisnegnqn lfvvqaslwl
 181 ylkllpyvle kgsrrkvrk vyfqqghgd rwnmvekrvd lkrsqwhfpl lteaiqalfe
 241 rgerrlnldv qdscqelav vpvfvdpgge shrpfvqvq rlgdsrhrr krglecdgrt
 301 nlccrqqffi dfrligwndw iiaptgyygn ycegscpayl agvpgsassf htavvnqyrm
 361 rglnpgtvns ccipktklstm smlyfddeyn ivkrdvpnmi veecgca

도면7

1 cagacatgag ctgtgagggt caagcacagc tatccatcag atgatctact ttcagccttc
 61 ctgagtccca gacaatagaa gacaggtggc tgtacccttg gccaaaggta ggtgtggcag
 121 tgggtgtctgc tgtcactgtg ccctcattgg cccccagcaa tcagactcaa cagacggagc
 181 aactgccatc cgaggctcct gaaccagggc cattcaccag gagcatgagg ctccctgatg
 241 tccagctctg gctgggtctg ctgtgggcac tgggtgcgagc acaggggaca gggctctgtg
 301 gtccctctg tgggggctcc aaactggcac cccaagcaga acgagctctg gtgctggagc
 361 tagccaagca gcaaactcctg gatgggttgc acctgaccag tctgtcccaga ataactcatc
 421 ctccacccca ggagcgcctg accagagccc tccggagact acagccaggg agtgtggctc
 481 cagggaatgg ggaggaggtc atcagctttg ctactgtcac agactccact tcagcctaca
 541 gctccctgct cacttttcac ctgtccactc ctcggtccca ccactgtac catgcccgcc
 601 tgtggctgca cgtgctcccc acccttcctg gcaactcttg cttgaggatc ttcgatggg
 661 gaccaaggag gaggcgccaa gggccccgca ctctcctggc tgagcaccac atcaccaacc
 721 tgggctggca taccttaact ctgccctcta gtggcttgag gggtgagaag tctgggtgctc
 781 tgaaactgca actagactgc agaccctag aaggcaacag cacagttact ggacaaccga
 841 ggcggctctt ggacacagca ggacaccagc agcccttct agagcttaag atccgagcca
 901 atgagcctgg agcaggccgg gccaggagga ggacccccac ctgtgagcct ggcacccct
 961 tatgttgcag gcgagaccat tacgtagact tccaggaact gggatggcgg gactggatac
 1021 tgcagccca ggggtaccag ctgaattact gcagtgggca gtgccctccc cacctggctg
 1081 gcagcccaag cacttctgcc tcttctcatt ctgcccgtct cagcctcctc aaagccaaca
 1141 atccttgccc tgcagctacc tctgttctg tccctactgc ccgaaggccc ctctctctcc
 1201 tctacctgga tcataatggc aatgtgggtca agacggatgt gccagatatg gtgggtggag
 1261 cctgtggctg cagctagcaa gaggacctgg ggctttggag tgaagagacc aagatgaagt
 1321 tcccagga cagggcatct gtgactggag gcatcagatt cctgatccac accccaacc
 1381 aacaaccacc tggcaatatg actcacttga cccctatggg acccaaatgg gcactttctt
 1441 gtctgagact ctggcttatt ccaggttggc tgatgtgttg ggagatgggt aaagcgtttc
 1501 ttctaaagg gtctaccag aaagcatgat ttctgccc aagtccctgt agaagatgct
 1561 agggactagg gagggagga gggaaagcag agaaaaatta cttagcctct ccaagatga
 1621 gaaagtcctc aagtgaggg aggaaggaagc agatagatgg tccagcaggc ttgaagcagg
 1681 gtaagcaggc tggcccagg taagggtctg tgaggtaact taagggaagg tcaagagga
 1741 gatgggcaag gcgctgaggg aggatgctta ggggaccccc agaaacagga gtcaggaaaa
 1801 tgaggcacta agcctaagaa gttccctggg ttttccagg ggacaggacc cactgggaga
 1861 caagcattta tactttctt cttctttttt attttttga gatcgagtct cgctctgtca
 1921 ccaggctgga gtgcagtgac acgatcttgg ctcaactgcaa cctccgtctc ctgggttcaa
 1981 gtgattcttc tgccctcagc tcccagcag ctgggattac aggcgcccac taatttttgt
 2041 attcttagta gaaacgaggt ttcaacatgt tggccaggat ggtctcaatc tcttgacctc
 2101 ttgatccacc cgacttggcc tcccgaagtg atgagattat aggcgtgagc caccgcctc
 2161 ggcttatact ttcttaataa aaaggagaaa gaaaatcaac aaatgtgagt cataaagaag
 2221 ggtaggggtg atggtccaga gcaacagttc ttcaagtgta ctctgtaggc tctgggag
 2281 tcccttttca ggggtgtcca caaagtcaaa gctattttca taataatact aacatgttat
 2341 ttgccttttg aattctcatt atcttaaaat tgtattgtgg agttttccag aggcctgtg
 2401 acatgtgatt acatcatctt tctgacatca ttgttaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa

도면8

1 mrlpdvqlwl vllwalvraq gtgsvpcscg gsklapqaer alvlelakqg ildghltsr
 61 prithpppqa altralrrlq pgsvapngge evisfatvtd stsaysllt fh1stprshh
 121 lyharlwlhv lptlpgtlcl rifrwgprrr rqsrtllae hhitnlght ltlpssglrg
 181 eksgvlklql dcrplegnst vtgqprllld taghqqpfle lkiranepga grarrtptc
 241 epatplccrr dhyvdfqelg wrdwilqpeg yqlnycsgqc pphlagspgi aasfhsavfs
 301 llkannpwa stscvptar rplsllyldh ngvvtkdvp dmvveacgcs

도면9a

```

1 agattctgcc aagttctacc tgtaactggc ttcattttca agtcagacgt ttggctgctg
61 ctctgtcccc tgcaacaagg agccatgcca gctggacaca cacttcttcc agggcctctg
121 gcagccagga cagagttgag accacagctg ttgagaccct gagccctgag tctgtattgc
181 tcaagaaggg ccttccccag caatgacctc ctcatgtgct ctggcctttc tcctcctggc
241 tccaaccaca gtggcactc ccagagctgg cggtcagtgt ccagcatgtg gggggccac
301 cttggaactg gagagccagc gggagctgct tcttgatctg gccaaagaaa gcatcttggg
361 caagctgcac ctcaccacagc gcccaacact gaaccgccct gtgtccagag ctgctttgag
421 gactgcactg cagcacctcc acgggggtccc acagggggca cttctagagg acaacaggga
481 gcacctgacc ctggagctgg tctttgctga gacaggcctc tccaccatca accgactcg
541 tcttgatttt cacttctcct ctgatagaac tgctggtgac agggagggtcc agcaggccag
601 tctcatgttc tttgtgagc tccttccaa taccacttgg acctgaaag tgagagtcct
661 tgtgtgggt ccacataata ccaacctcac cttggctact cagtacctgc tggagtgga
721 tgccagtggc tggcatcaac tccccctagg gcctgaagct caagctgcct gcagccaggg
781 gcacctgacc ctggagctgg tacttgaagg ccaggtagcc cagagctcag tcatcctggg
841 tggagctgcc cataggcctt ttgtggcagc ccgggtgaga gttgggggca aacaccagat
901 tcaccgacga ggcactgact gccaaaggag gtccaggatg tgctgtcgac aagagttttt
961 tgtgacttcc cgtgagattg gctggcacga ctggatcacc cagcctgagg gctacgccat
1021 gaacttctgc atagggcagt gccactaca catagcaggc atgcctggta ttgctgctc
1081 ctttcacatg agcagtgctca atcttctcaa ggccaacaca gctgcaggca ccaactggagg
1141 gggctcatgc tgtgtacca cggcccggcg cccctgtct ctgctctatt atgacaggga
1201 cagcaacatt gtcaagactg acatacctga catggtagta gaggcctgtg ggtgcagtta
1261 gtctatgtgt ggtatgggca gcccaaggtt gcatgggaaa acacgcccct acagaagtgc
1321 acttcttga gaggagggaa tgacctcatt ctctgtccag aatgtggact cctcttctc
1381 gagcatctta tggaaattac cccacctttg acttgaagaa acctcatct aaagcaagtc
1441 actgtgcat cttcctgacc actaccctct ttctagggc atagtcctc cggctagtcc
1501 atcccgttag cccactcca gggactcaga ccatctcca accatgagca atgcatctg
1561 gttcccaggc aaagacacc ttagctcacc ttaatagac ccataacc actatgcctt
1621 cctgtccttt ctactcaatg gtcccactc caagatgagt tgacacaacc ccttcccca
1681 atttttgtgg atctccagag aggccttct ttggattcac caaagtttag atcactgctg
1741 cccaaaatag aggcttacct acccccctct ttgttgtag cccctgtcct tcttagttgt
1801 ccaggatgac tactaaagct ctctttgcat accttcatcc atttttgtc cttctctgcc
1861 tttctctatg ccttaaggg ctgacttgc tgagctctat cacctgagct cccctgcct
1921 ctggcttct gctgaggtca gggcatttct tatccctgtt cctctctgt ctagggtgca
1981 tggttctgtg taactgtggc tattctgtgt ccctacacta cctggctacc ccttccatg
2041 gccccagctc tgcctacatt ctgatataac tgcttcaaca ctagggggtc ctaaaggctt
2101 tctatcttgg tagtccctgg ggcctcaaca tctcatactg gttcccttaa ctctgcctat
2161 acctctgtaa ataattcctt cactaagttc tcttgatgaa gcaaaaacag acagctgaaa
2221 agtctctat ctctacaag ggccttaact ggcaaccag atgacacaga gcctgcctgc
2281 ttatgtgta gtctgcctac tctgctgtct cttcacatgg tctcctcaga actgaactat
2341 tgtatccatc tcacacttta tgctcttct ttcttaggca cccctgcct ccatccttcc
2401 agaaccatct ttgaggtctc atggctaata aaaaactagg ctttaactgt tccctctgta
2461 atccctccaa aagatgagac agatctatgc ttggtcatcc agtaactga ccagctgtgg
2521 gcacgcaagt gtgggaggca gaggcctgct cagagctggc tgccaggacc tctgacttgc
2581 cttcctttca cccaccoca gtgctccacc caggagctct gcctggaagc tggaatgggc
2641 aaggctgct ggagtgggac agggagaaga ggaaggcctg gatgaggaga ggggtggcatt
2701 tgctctgaga ctgggtcctt tttagacctg tggcctcct ccccacatc tcctccttt
2761 ggctggacag tctgaacca tgaggctgat aatgtctgca gcccaaggcc gagtttgcgc
2821 aaaaccatg tgttctttgg taaacgtgat gtctgtgtt gctcagttta tgaccctc
2881 ctatgagggt aagaggtccc tgaatatgga acctagagg agaaagtctg aaaaggactg

```

도면9b

```

2941 cctgggggac tgtaaatctg agcttgagg cttcctgagc aaccatgga agttatccca
3001 cctttgactt gaggagacct tcactaagc agaatctaag gaggccttct ggtgtctccc
3061 ccacacatcc cagaccoca gatctaacct ccttccaat tacagcttag tctccagggc
3121 taggactggg gtaaagcaa gtgagtcatt cacctggggg ggctaaatt taaggggggtg
3181 gtgaacaatt tattaatcaa gataggactt taatgcaata ttattttaa tcaaaatta
3241 atgcaaaaaa tccatgatga acaaatagc ctacttttaa ataaaaacag gatcagcatt
3301 aaaaaaaaaa aaaaa

```

도면10

```

1 mtsslllfl lllapttvatp ragggcpagc gptlelesqr ellldlakrs ldklhltr
61 ptlnrpvsra alrtalqhlh gvpqgalled nregeceiis faetglstin qtrldfhfss
121 drtagdrevq qaslmffvql psnttwtlkv rvlvlghpnt nltlatqyll evdasgwhql
181 plgpeaqaac sqghltelelv legqvaqssv ilggaahrpf vaarvrvggk hqihrrgidc
241 qggsrmccrq effvdfreig whdwiiqpeg yamnficgqc plhiagmpgi aasfhtavl n
301 llkantaagt tgggscvpt arrplsilly drdsnivktd ipdmvveacg cs

```

도면11

1 agattcactg gtgtggcaag ttgtctctca gactgtacat gcattaaaat tttgcttggc
 61 attactcaaa agcaaaagaa aagtaaaagg aagaaacaag aacaagaaaa aagattatat
 121 tgattttaaa atcatgcaaa aactgcaact ctgtgtttat atttacctgt ttatgctgat
 181 tgttgctggt ccagtggatc taaatgagaa cagtggagca aaagaaaatg tggaaaaaga
 241 ggggctgtgt aatgcatgta cttggagaca aaacactaaa tcttcaagaa tagaagccat
 301 taagatacaa atcctcagta aacttcgtct ggaacacagct cctaacaatca gcaaagatgt
 361 tataagacaa cttttaccba aagctcctcc actccgggaa ctgattgatc agtatgatgt
 421 ccagagggat gacagcagcg atggctcttt ggaagatgac gattatcacg ctacaacgga
 481 aacaatcatt accatgccta cagagtctga ttttctaag caagtggatg gaaaacccaa
 541 atgttgcttc tttaaattta gctctaaaat acaatacaat aaagtagtaa aggcccaact
 601 atggatataat ttgagaccog tcgagactcc tacaacagtg tttgtgcaaa tcttgagact
 661 catcaaacct atgaaagacg gtacaaggta tactggaatc cgatctctga aacttgacat
 721 gaacccaaggc actgggtatth ggcagagcat tgatgtgaag acagtgttgc aaaattggct
 781 caaacaacct gaatccaact taggcattga aataaaagct ttagatgaga atggtcataga
 841 tcttgctgta accttcccag gaccaggaga agatgggctg aatccgtttt tagaggtcaa
 901 ggtaacagac acaccaaaaa gatccagaag ggattttggt cttgactgtg atgagcactc
 961 aacagaatca cgatgctgtc gttaccctct aactgtggat tttgaagctt ttggatggga
 1021 ttggattatc gtccttaaaa gatataaggc caattactgc tctggagagt gtgaatttgt
 1081 atttttacaa aaatatcctc atactcatct ggtacaccaa gcaaacccca gaggttcagc
 1141 aggccttgc tgtactccca caaagatgtc tccaattaat atgctatatt ttaatggcaa
 1201 agaacaataa atatatggga aaattccagc gatggtagta gaccgctgtg ggtgctcatg
 1261 agattttatat taagcgttca taacttccta aaacatggaa ggttttcccc tcaacaattt
 1321 tgaagctgtg aaattaagta ccacaggcta taggcctaga gtatgctaca gtcaacttaag
 1381 cataagctac agtatgtaaa ctaaaagggg gaatatatgc aatggttggc atttaacct
 1441 ccaaacaat catacaagaa agttttatga tttccagagt ttttgagcta gaaggagatc
 1501 aaattacatt tatgttcccta tatattacaa catcggcgag gaaatgaaag cgattctcct
 1561 tgagttctga tgaattaaag gagtatgctt taaagtctat ttctttaaag ttttgtttaa
 1621 tatttacaga aaaaaccaca tacagtattg gtaaaatgca ggattgttat ataccatcat
 1681 tcgaatcatc cttaaactact tgaatttata ttgtatggta gtatacttgg taagataaaa
 1741 ttccacaaaa atagggatgg tgcagcatat gcaatttcca ttctattat aatgacaca
 1801 gtacattaac aatccatgcc aacggtgcta atacgatagg ctgaatgtct gaggctacca
 1861 ggtttatcac ataaaaaaca ttcagtaaaa tagtaagttt ctcttttctt caggtgcatt
 1921 ttctacacc tccaatgag gaatggattt tctttaatgt aagaagaatc atttttctag
 1981 aggttgctt tcaattctgt agcatacttg gagaaactgc attatcttaa aaggcagtca
 2041 aatgggtgtt gtttttatca aaatgtcaaa ataacatact tggagaagta tgaattttg
 2101 tctttggaaa attacaacac tgccttgca acactgcagt ttttatggta aaataataga
 2161 aatgatcgac tctatcaata ttgtataaaa agactgaaac aatgcattta tataatatgt
 2221 atacaatatt gttttgtaaa taagtgtctc cttttttatt tactttggta tatttttaca
 2281 ctaaggacat tcaaatataa gtactaaggc acaagacat gtcatgcatc acagaaaagc
 2341 aactacttat atttcagagc aaattagcag attaaatagt ggtcttaaaa ctccatagt
 2401 taatgattag atggttatat tacaatcatt ttatattttt ttacatgatt aacattcact
 2461 tatggattca tgatggctgt ataaagtgaa ttgaaattt caatggttta ctgtcattgt
 2521 gtttaaatct caacgttcca ttattttaat acttgcaaaa acattactaa gtataccaaa
 2581 ataattgact ctattatctg aaatgaagaa taactgatg ctatctcaac aataactgtt
 2641 acttttattt tataatttga taatgaatat atttctgcat ttatttactt ctgttttgta
 2701 aattgggatt ttgttaatca aatttattgt actatgacta aatgaaatta tttcttcat
 2761 ctaatttgta gaaacagtat aagttatatt aaagtgtttt cacatttttt tgaagacaa
 2821 aaa

도면12

1 mqklqlcvyi ylfmlivagp vdlnenseqk envekeglcn actwrqntks srieaikiqi
 61 lsklrletap niskdivrql lpkapplrel idqydvqrdd ssdgsleddd yhattetiit
 121 mptesdfmlq vdgpkccff kfsskiqynk vvkaqlwiyl rpvetpttvf vqilrlikpm
 181 kdgtrytgir slklmnpgt giwqsidvkt vlqnlkqpe snlgieikal denghdlavt
 241 fpgpgedgln pflevkvtdt pkrsrrdfgl dcdehstesr ccrypltvdf eafgwdwiia
 301 pkrykanycs gecefvlqk yphthlvhqa nprgsagpcc tptkmspinm lyfngkeqii
 361 ykipamvvd rcgcs

도면13

유형	리간드	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (pM)
Smad2/3	GDF11	3.46e6	2.56e-4	74
	GDF8	1.18e6	2.42e-4	200
	액티빈 B	3.52e6	2.19e-3	620
	액티빈 A	5.35e6	1.23e-1	23000
Smad1/5/8	BMP10	1.67e7	1.45e-3	87
	BMP6	6.05e6	5.46e-4	90
	BMP9	5.04e6	1.37e-2	2700

도면14

```

1 caactggggg cgccccggac gaccatgaga gataaggact gagggccagg aaggggaagc
61 gagcccggcg agaggtggcg gggactgctc acgccaaggg ccacagcggc cgcgctccgg
121 cctcgcctccg ccgctccacg cctcgcggga tccgcggggg cagcccggcc gggcggggat
181 gccggggctg gggcgagagg cgcaagtggc gtgctgggtg tggggctgc tgtgcaactg
241 ctgcggggccc ccgcccctgc ggcccctt gcccgctgcc gcggccggcg ccgcccgggg
301 gcagctgctg ggggacggcg ggagccccgg ccgcacggag cagccggcgc cgtcgcgcga
361 gtcctcctcg ggcttctgt accggcggct caagacgcag gagaagcggg agatgcagaa
421 ggagatcttg tcgggtgctg ggctcccgca ccggccccgg cccctgcacg gcctccaaca
481 gccgcagccc ccggcgctcc ggacagcagga ggagcagcag cagcagcagc agctgcctcg
541 cggagagccc cctcccgggc gactgaagtc cgcgcccctc ttcagtgtgg atctgtacaa
601 cgccctgtcc gccgacaacg acgaggacgg ggctcgggag ggggagaggc agcagtcctg
661 gccccacgaa gcagccagct cgtcccagcg tcggcagcgg cccccgggcg ccgcccaccc
721 gtcgaacccg aagagccttc tggccccgg atctggcagc gcggcgcgct ccccactgac
781 cagcgcgcag gacagcgcct tcctcaacga cgcggacatg gtcagtgtgg ttgtgaacct
841 ggtggagtac gacaaggagt tctcccctcg tcagcgcac cacaagagt tcaagttcaa
901 cttatcccag attcctgagg gtgaggtggg gacggctgca gaattccgca tctacaagga
961 ctgtgttatg gggagttaa aaaaccaaac ttttctatc agcatttacc aagtcttaca
1021 ggagcatcag cacagagact ctgacctgt tttgtggac acccgtgtag tatggcctc
1081 agaagaaggc tggctggaat ttgacatcac ggccactagc aatctgtggg ttgtgactcc
1141 acagcataac atggggcttc agctgagcgt ggtgacaagg gatggagtcc acgtccaccc
1201 ccgagccgca ggcctggtgg gcagagacgg cccttacgac aagcagccct tcagtgtggc
1261 tttcttcaaa gtgagtggg tgcacgtgcg caccaccagg tcagcctcca gccggcgccg
1321 acaacagagt cgtaatcgct ctaccagtc ccaggacgtg gcgggggtct ccagtgttc
1381 agattacaac agcagtgaat tgaaaacagc ctgcaggaag catgagctgt atgtgagttt
1441 ccaagacctg ggatggcagg actggatcat tgcacccaag ggctatgctg ccaattactg
1501 tgatggagaa tgcctcttc cactcaacgc acacatgaat gcaaccaacc acgcgattgt
1561 gcagaccttg gttcacctta tgaaccccga gtatgtccc aaaccgtgct gtgcccac
1621 taagctaaat gccatctcgg ttctttactt tgatgacaac tccaatgtca ttctgaaaaa
1681 atacaggaat atggttgtaa gagcttgtgg atgccaacta ctcgaaacca gatgtggggg
1741 acacacattc tgcctggat tcctagatta catctgcctt aaaaaaacac ggaagcacag
1801 ttggaggtgg gcagatgaga ctttgaact atctcatgcc agtgccttat taccaggaa
1861 gattttaaag gacctatta ataattgct cacttggtaa atgacgtgag tagttgttg
1921 tctgtagcaa gctgagttt gatgtctgta gcataaggtc tggttaactgc agaaacataa
1981 ccgtgaagct cttctacc tcctcccca aaaaccacc aaaattagtt ttagtgtag
2041 atcaagctat ttgggtgtt tggtagtaa tagggaaaat aatctcaaag gagttaaag
2101 tattcttggc taaaggatca gctggttcag tactgtctat caaaggtaga ttttacagag
2161 aacagaaatc ggggaagtgg ggggaacgcc tctgttcagt tcatcccag aagtccacag
2221 gacgcacagc ccaggccaca gccagggtc cacggggcgc ccttgtctca gtcattgctg
2281 ttgtatgttc gtctggagt tttgtgggt tgaaaataca cttatttcag ccaaaacata
2341 ccatttctac acctcaatcc tccatttgc gtactcttg ctagtaccaa aagtagactg
2401 attacactga ggtgaggcta caaggggtgt gtaaccgtgt aacacgtgaa ggcaatgctc
2461 acctcttctt taccagaacg gttctttgac cagcacatta acttctggac tgccggctct
2521 agtacctttt cagtaaagtg gttctctgcc ttttactat acagcatacc acgccacagg
2581 gttagaacca acgaagaaaa taaaatgagg gtgcccagct tataagaatg gtgttagggg
2641 gatgagcatg ctgtttatga acggaaatca tgatttccct tgtagaaagt gaggctcaga
2701 ttaaatttta gaatattttc taaatgtctt tttcacaatc atgtactggg aaggcaattt
2761 cataactaac tgattaaata atacatttat aatctacaac tgtttgcact tacagctttt
2821 tttgtaataa taaactataa tttattgtct atttatatac tgttttgcgt taacattgaa
2881 ggaaagacca gacttttaaa aaaaaagagt ttatttagaa agtatcatag tgtaaacaaa
2941 caaattgtac cactttgatt ttcttggaa acaagactcg tgatgcaaag ctgaagttgt
3001 gtgtacaaga ctcttgacag ttgtgcttct ctaggagggt gggttttttt aaaaaagaa
3061 ttatctgtga accatcgtg attaataaag atttcttta aggca

```

도면15

```

1 mpglrraqw lcwwwllcs ccgppplrpp lpaaaaaag gqllgdggsp grteqpppsp
61 qsssgflyrr lktqekremq keilsvlglp hrprplhglq qpqppalrqq eeqqqqqqlp
121 rgeppppgrlk saplfmldly nalsadnded gasegerqqs wpheaasssq rrqppppgaaah
181 plnrksllap vsgsggaspl tsaqdsafln dadmvmfsvn lveydkefsp rqrhhkefkg
241 nlsqipegev vtaaeфриyк dcvmgfknq tflisiyqvl qehqhrdsdl flldtrvwa
301 seegwlefdi tatsnlwvvt pqhnmglqls vvtrdgvvhv praaglvgrd gpydkqpfmv
361 affkvsevhv rttrsassrr rqqsrnrstq sqdvarvssa sdynsselkt acrkhelyvs
421 fqdlgwqdwі iapkgyaany cdgecsfpln ahmnatnhai vqtlvhlmp eyvvpkpcap
481 tklnaisvly fddnsnvilk kyrnmvvrac gch

```

도면16

1 mppqelrtvn gsqmllvllv lswlphggal slaeasrasf pppselhsed srfrelrkry
 61 edllltrlran qswedsntdl vpapavrilt pevrlgsggh lhrlisraal peglpeasrl
 121 hralfrlspt asrswdvtrp lrrqlslarp qapalhlrls pppsqsdl1 aesssarpl
 181 elhlrppaar grrrararnq dhcplpggrc crlhtvrasl edlgwadwvl sprevqvtmc
 241 igacpsqfra anmhaqikts lhrlkpdvtp apccvpasyn pmvliqktdt gvslqtyddl
 301 lakdchci

도면17

1 agtcccagct cagagccgca acctgcacag ccatgcccgg gcaagaactc aggacggtga
 61 atggctctca gatgctcctg gtgttgctgg tgctctcgtg gctgcccgat gggggcgccc
 121 tgtctctggc cgaggcgagc cgcgcaagt tcccgggacc ctcagagttg cactccgaag
 181 actccagatt ccgagagttg cggaaacgct acgaggacct gctaaccagg ctgcgggcca
 241 actcagctg ggaagattcg aacaccgacc tcgtcccggc ccctgcagtc cggataactca
 301 cgccagaagt ggggctggga tccggcgccc acctgcacct gcgtatctct cgggccgccc
 361 ttcccagagg gctccccgag gcctcccgcc ttcaccgggc tctgttccgg ctgtccccga
 421 cggcgtcaag gtcgtgggac gtgacacgac cgctgcggcg tcagctcagc cttgcaagac
 481 cccaggcgcc cgcgctgcac ctgcgactgt cgcccgccgc gtcgcagtcg gaccaactgc
 541 tggcagaatc ttcgtccgca cggccccagc tggagttgca cttgcggccg caagccgcca
 601 gggggcgccg cagagcgctg gcgcgcaacg gggaccactg tccgctcggg cccgggcggt
 661 gctgccgtct gcacacggtc cgcgctgcgc tggaaagacct gggctgggccc gattgggtgc
 721 tgtcgccacg ggaggtgcaa gtgaccatgt gcatcgggcg gtgcccgagc cagtccggg
 781 cggcaaacat gcacgcgacg atcaagacga gcctgcaccg cctgaagccc gacacggtgc
 841 cagcgcctg ctgcgtgccc gccagctaca atcccatggt gctcattcaa aagaccgaca
 901 cgggggtgtc gctccagacc tatgatgact tgtagccaa agactgccac tgcatatgag
 961 cagtccctgt ccttccactg tgcacctgcg cggaggacgc gacctcagtt gtcctgcct
 1021 gtggaatggg ctcaaggttc ctgagacacc cgattcctgc ccaaacagct gtatttatat
 1081 aagtctgtta tttattatta atttattggg gtgaccttct tggggactcg gggctggtc
 1141 tgatggaact gtgtatttat ttaaaactct ggtgataaaa ataaagctgt ctgaactggt
 1201 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

도면18

1 mhahclpfill hawwallqag aatvatallr trgqpsspsp laymlslyrd plpradiirs
 61 lqaedvavdg qnwtfafdfs flsqedlaw aelrlqlssp vdlptegsla ieifhqpkpd
 121 teqasdscler fqmdlftvt lsqvtfslgs mvlevtrpls kwlkhpqale kqmsrvagec
 181 wprpptppat nvllmlysnl sqeqrqlggs tllweaessw raqegqlswe wgrhrrhhl
 241 pdrsqlcrkv kfqvdfnlig wgswiypkq ynayrcegec pnpvgeefhp tnhayiqsll
 301 kryqphrvps tccapvktkp lsmlyvdngr vlldhkdmi veecgcl

도면19

```

1  ataagggctg gaggtgctgc tttcaggcct ggccagccca ccatgcacgc ccactgcctg
61  cccttccttc tgcacgcctg gtggggccta ctccaggcgg gtgctgcgac ggtggccact
121 gcgctcctgc gtacgcgggg gcagccctcg tcgccatccc ctctggcgta catgctgagc
181 ctctaccgcg acccgctgcc gagggcagac atcatccgca gcctacaggc agaagatgtg
241 gcagtgatg ggcagaactg gacgtttgct tttgacttct ccttcctgag ccaacaagag
301 gatctggcat gggtgagct cgggtgcag ctgtccagcc ctgtggacct cccactgag
361 ggctcacttg ccattgagat tttccaccag ccaaagccc acacagagca ggcttcagac
421 agctgcttag agcggtttca gatggaccta ttcactgtca ctttgtccca ggtcaccttt
481 tccttgggca gcatggtttt ggagtgacc aggcctctct ccaagtggct gaagcaccct
541 ggggccctgg agaagcagat gtccagggta gctggagagt gctggccgcg gccccccaca
601 ccgcctgcca ccaatgtgct cttatgctc tactccaacc tctcgcagga gcagaggcag
661 ctgggtgggt ccaccttgct gtgggaagcc gagagctcct ggccggccca ggagggacag
721 ctgtcctggg agtggggcaa gaggcaccgt cgacatcact tgccagacag aagtcaactg
781 tgtcggaaag tcaagttcca ggtggacttc aacctgatcg gatggggctc ctggatcatc
841 taccccaagc agtacaacgc ctatcgctgt gagggcgagt gtctaatacc tgttggggag
901 gatttccatc ccaccaacca tgatacatc cagagtctgc tgaaacgtta ccagcccac
961 cgagtccctt ccacttgttg tgcccagtg aagaccaacc cgctgagcat gctgtatgtg
1021 gataatggca gagtgtcct agatcaccat aaagacatga tcgtggaaga atgtgggtgc
1081 ctctgatgac atcctggagg gagactggat ttgcctgcac tctggaaggc tgggaaactc
1141 ctggaagaca tgataacat ctaatccagt aaggagaaac agagaggggc aaagtgtctc
1201 tgcccaccag aactgaagag gaggggctgc cactctgta aatgaagggc tcagtggagt
1261 ctggccaagc acagaggctg ctgtcaggaa gagggaggaa gaagcctgtg cagggggctg
1321 gctggatgtt ctctttactg aaaagacagt ggcaaggaaa agcacaagtg catgagtctt
1381 ttactggatt ttttaaaaac ctgtgaacc cccgaaactg tatgtgaaag ttgagacata
1441 tgtgcatgta ttttggaggt gggatgaagt cacctatagc tttcatgtat tctccaaagt
1501 agtctgtgtg tgacctgtcc ccctcccaa agattaagga tccactgtata gattaaaag
1561 agtccgtcaa tctcattgcc tcaggctggg ttgggggagc cccacagctt tctggctggc
1621 cagtggcaat ctactggcct tgtccagagg ctactggag tggttctctg ctaatgagct
1681 gtacaacaat aaagccattg tctagtctc ctggccagc tgggtcctgt gaaggcagag
1741 gcaggaactc atccaagagg accggccatg ttgggttaca gaagacatcc ctgctcagt
1801 ctgcttcggc agacacagcc tgagtttgtt aaagtgtgtg acaatccacc tcagtctctc
1861 aatgtgtgct attaatgagg cctctgagct tcctatccag cagtggtgaa ggccttgccc
1921 tgggtggcaa gatacttgct ctatggctac agctcagcca ctggaagctg tgcgacctca
1981 ggtgagcaat tccactgtcca gtctccact gtaaaaggaa cgctggtgaa tcctaagca
2041 ttcatattaa atgtctgttg tcaggctcag aagagccatg agcttt

```

도면20

```

1  mlrflpdlaf sflilalgg avqfzeyvfl qflgldkaps pqkfqvpyi lkkifqdrea
61  aattgvsrdl cyvkelgvrq nvlrflpdqg fflypkkisq assclqkly fnlsaikere
121 qltlaqlgld lgpnsyynlg pelelalflv qephwgqtt pkpgkmfvlr svpwpqgavh
181 fnlldvakdw ndnprknfgl fleilvkedr dsgvnfqpel tcarlrcslh asllvvtlnp
241 dqchpsrkr raaipvpklsc knlchrhqlf infrdlgwhk wiiapkpfma nychgecpfs
301 ltislnessny afmqalmhav dpeipqavci ptklspism l yqdnndnvil rhyedmvvde
361 cgcg

```

도면21

```

1 ggagctctcc ccggtctgac agccactcca gaggccatgc ttcgtttctt gccagatttg
61 gcttttcagct tctgtttaat tctggctttg ggccaggcag tccaatttca agaatatgtc
121 tttctccaat ttctgggctt agataaggcg ccttcacccc agaagttcca acctgtgcct
181 tatactctga agaaaatttt ccaggatcgc gaggcagcag cgaccactgg ggtctcccga
241 gacttatgct acgtaaagga gctgggcgtc cgcgggaatg tacttcgctt tctcccagac
301 caaggtttct ttctttaccc aaagaaaatt tcccaagctt cctcctgcct gcagaagtc
361 ctctacttta acctgtctgc catcaaagaa agggaacagt tgacattggc ccagctgggc
421 ctggacttgg ggccaattc ttactataac ctgggaccag agctggaact ggctctgttc
481 ctggttcagg agcctcatgt gtggggccag accacccta agccaggtaa aatgtttgtg
541 ttgcggtcag tcccatggcc acaagggtgct gttcacttca acctgctgga tgtagctaag
601 gattggaatg acaacccccg gaaaaatttc gggttattcc tggagatact ggtcaaagaa
661 gatagagact caggggtgaa ttttcagcct gaagacacct gtgccagact aagatgctcc
721 cttcatgctt ccctgctggt ggtgactctc aacctgatc agtgccaccc ttctcggaaa
781 aggagagcag ccattccctgt cccaagctt tcttgtaaga acctctgcca ccgtcaccag
841 ctattcatta acttccggga cctgggttg cacaagtgga tcattgcccc caaggggttc
901 atggcaaatt actgccatgg agagtgtccc ttctcactga ccatctctct caacagctcc
961 aattatgctt tcatgcaagc cctgatgcat gccgttgacc cagagatccc ccaggctgtg
1021 tgtatcccca ccaagctgtc tcccatttcc atgctctacc aggacaataa tgacaatgct
1081 attctacgac attatgaaga catggtagtc gatgaatgtg ggtgtgggta ggatgacaga
1141 aatgggaata gaaggagtgt tcttaggta aatcttttaa taaaactacc tatctggttt
1201 atgaccactt agatcgaat gtca

```

도면22

```

1 magasrllfl wlgcfcvsla qgerpkppfp elrkavpdr tagggpdsel qpqdkvsehm
61 lrlydrystv qaartpgsle ggsqpwrprl lregntvrsf raaaaetler kglyifnlts
121 ltksenilsa tlyfcigelg nislscpvsg gcshhaqrkh iqidlsawtl kfsrnqsqll
181 ghlsvdmaks hrdimswlsk ditqllrkak eneeffligfn itskgrqlpk rrlpfpepyi
241 lvyandaais epesvsslq ghrnfptgtv pkwdshiraa lsierrkkrs tgvllplqnn
301 elpgaeyqyk kdevweerkp yktlqaqape ksknkkkqrk gphrksqtlq fdeqtlkkr
361 rkqwieprnc arrylkvdfa digwsewiis pksfdayycs gacqfmpks lkpsnhatiq
421 sivravgvvp gipepccvpe kmsslslilff denknvvlkv ypnmtvesca cr

```

도면23a

1 agatcttgaa aacacccggg ccacacacgc cgcgacctac agctctttct cagcgttgga
 61 gtggagacgg cgcccgcagc gccctgcgcy ggtgaggtcc gcgcagctgc tggggaagag
 121 cccacctgtc aggctgcgct gggtcagcgc agcaagtggg gctggccgct atctcgtgcy
 181 acccggccgc gtcccgggct ccgtgcgccc tcgccccagc tggtttgag ttcaaccctc
 241 ggtcccgccg ccggctcctt gcgccttcgg agtgtcccgc agcgacgccg ggagccgacg
 301 cgcccgcgcy gtacctagcc atggctgggy cgagcaggct gctctttctg tggctgggct
 361 gcttctgcyt gagcctggcy cagggagaga gaccgaagcc acctttcccg gagctccgca
 421 aagctgtgcc aggtgaccgc acggcaggty gtggcccgga ctccgagctg cagccgcaag
 481 acaaggtctc tgaacacatg ctgcygctct atgacaggta cagcacgctc cagggcgccc
 541 ggacaccggg ctccctggag ggaggctcgc agccctggcy ccctcggctc ctgcygcaag
 601 gcaacacggt tcgcagcttt cgggcygcy cagcagaaac tcttgaaga aaaggactgt
 661 atatcttcaa tctgacatcy ctaaccaagt ctgaaaaat tttgtctgcy aactgtatt
 721 tctgtattgy agagctgga aacatcagcc tgagttgtcc agtgtctgga ggatgctccc
 781 atcatgctca gaggaaacac attcagattg atctttctgc atggaccctc aaattcagca
 841 gaaaccaaag tcaactcctt ggccatctgt cagtggatat ggccaaatct catcgagata
 901 ttatgtcctg gctgtctaaa gatatcactc aactcttgag gaaggccaaa gaaaatgag
 961 agttcctcat aggatttaac attacgtcca agggacgcca gctgccaaag aggaggttac
 1021 cttttccaga gccttatatc ttggtatatg ccaatgatcy cgccatttct gagccagaaa
 1081 gtgtggatc aagcttacag ggacaccgga attttccac tggactgtt cccaaatggg
 1141 atagccacat cagagctgcy ctttccattg agcggaggaa gaagcgtctc actggggtct
 1201 tgctgcctct gcagaaacac gagcttctg gggcagaata ccagtataaa aaggatgaggy
 1261 tgtgggagga gaaaaagcct tacaagacc ttcaggctca ggcccctgaa aagagtaaga
 1321 ataaaaagaa acagagaaag gggcctcatc ggaagagcca gacgctcaa tttgatgagc
 1381 agaccctgaa aaaggcaaggy agaaagcagtt ggattgaacc tcggaattgc gccaggagat
 1441 acctcaaggt agactttgca gatattggct ggagtgaaat gattatctcc cccaagtctc
 1501 ttgatgccta ttattgctct ggagcatgcy agttcccct gccaaagtct ttgaagccat
 1561 caaatcatgc taccatccag agtatagtga gagctgtggg ggtcgttctc gggattcctg
 1621 agccttgctg tgtaccagaa aagatgtcct cactcagtat tttattcttt gatgaaaata
 1681 agaatgtagtt gcttaaagta taccctaaca tgacagtaga gtcttgcyct tgcagataac
 1741 ctggcaagaa actcatttga atgcttaatt caatcattag tttattttta tggacttctt
 1801 cctgtttttt tttttttttt ttttgactg ccaatgcatt ttgtttcaaa agattatttc
 1861 tatagtcaga ggggaatgag caaatagact gaagattgcy accaaggaaa agaactgtat
 1921 ttgtttctga atgtaactta aagcaagatt tttagtaaat atggacatct atttctcttt
 1981 ttgtaatcaa acacaacaac ttatcaaact gtttttagaa ctgttagaga acacactggt
 2041 ttatttttgt aatgttcttt gaaaacagaa tggagaagca gcaatagctt gtcatttata
 2101 tcatttaagt actaatggga aatagagaac aatttcgcyt tttgaattag gcttattgcy
 2161 ttagaatcct gagaaagtgc taaataatca actctgatgt ttttcttaag ttcttgagac
 2221 tcttgtttat ccttgttttt cctccacaag tcattgtcta agtgtaattg aaagtttatg
 2281 ctgagcgtta gtgtgatgt atgtgcgtac atgcgcccag tgcctgtgcy ctctgtagga
 2341 tggtttgctt aatatggttt tataattcag tttacacaggy attctttatt ttttttaatt
 2401 ttgtattttg gcaaacacca ttcagttata agaactttgc caaatatgat agaataattc
 2461 aagagcatat acagagagtt accacttgac ccagctattt aattgcaat acagttgttt
 2521 tcatttcatt tctaccaga aaaaggaatc agaaacctag tttttgaaaa cacaagtgta
 2581 attcctcttt tgtacttctt tttcacaaat gcttttattt attctaatt gaatttaaaa
 2641 atccttcta aagccattaa ctctttaatt ctctgatat gcctttactt cctatgaagt
 2701 tattggtaga tgttgaggy caaaaactgy tagaatattg aagatctct taaatgacca
 2761 atttaaccat aaccaaatat tgaatatcat tcttcagtca catctaagtc aggcactttt
 2821 tcacatagat cagggctttt ggtcagtca cgaaatctac aagttagcaa agcttcaaaa

도면23b

2881 acattattcg tcaggtagtg gaatcaaata tagacacttg tttgtctttg tttccattt
 2941 ctatgtgtca catacatata tgtgtcctct tataacttta gtcttcaaaa ttatttcaat
 3001 atccttcttc tcactatatt tatttgtgtg atggaaatgc tttcaggccg tagatcattg
 3061 ttgggtgtaa tctgtgggta atcctcattt tagttccgtc ttatctgata cttagaata
 3121 tctcagccat tttggaggct gtgcagtatc agaagacgtg gagtttgttc tgtctctgcc
 3181 tgtagctaata tatgggtggt cagtcattta ataaatattg tttgagcatc tattttgtga
 3241 aaggcactgt gttacctgtg tgtcttttagt gtcctcactg gtaaaatgaa gaggctggcc
 3301 atgagctgga agggttaagt ttataattcc agctatttca caccctgctt ccttgaagga
 3361 atgatagtga tagatataaa aacactgtaa gtcctccttt taataaacta aatgaaagaa
 3421 catcctatac ttcgctggtt gtaaattagt atggcattcg ctttggttta agtggtattt
 3481 tattgcaaac ccattaaaag aataactcat gaaaagaagc tctttgacac cttggggtac
 3541 acaaatgttg gtgtgggtgt gtgttaattc tgtgagttag acacaccagt tctaaaaaaa
 3601 atgagtgaag tctgggtgcc tgagttacca tgctttcttc tagttcttac agtagcataa
 3661 aattaaagat caaagttag atggaggata aaattacttt ttaatacatg ttctcaaca
 3721 tttgaaaata aaagtatatg atagaagggg gccagagtgt ggccaccatc ctgatcgtac
 3781 tgtttttcaa taagaaaac tttttcattg gtagatttgg tgaaattcta aatttaggtt
 3841 tttttctaga gctgtatcaa ccaaaacttc tggcaattcc cagtatcact tcttagcctt
 3901 cttatatcca aatgcctgtt tattaccctt ctttaatttga atcaatgcct agttattaca
 3961 gattgcaccc caaatggcc aaaaaccacac tacataataa aatttacagg tactaactag
 4021 ttaagattat attttaagta gcaattgata taaaattaca acacaatgaa agaacttggg
 4081 taactctcta gcaatggaaa taggttttaa ccagcagttt ttctgggtgc tttgtaacta
 4141 tcatttttact aatgaattga ggatgtatta tggtttaaat tggaagagtt ttattcccaa
 4201 agaataaagc aagattatct ttcagtagta gagattgaag taaatgtatt aatattttaa
 4261 ttaatacaga ttactaaga gtagttagaa aatttagtaa gtgcctgttt tacaattgt
 4321 taggtactag tttctgtata attcctacac agaagcttta gaaatctcct gatattaat
 4381 tattaaattg gcattcatga aaagagaagc tacaattata aactccattt gctaaatcat
 4441 gcataaact ctctctctct cttccccac aagtaatctc tctaccccat gcagtgtgca
 4501 cacacacaca cacacagtca gttactgaaa aaaataattc tttttctttt tttttttaa
 4561 tggagtttca ctctgtgoc ccaggctgga gtgcagtgcc gtgatctcgg cccactgcaa
 4621 cctccacctc ccaggttcaa gcagttctcc tgcctcagcc tcctgagtag ctgggattac
 4681 aggtgtccgc caccatgcct ggctaatttt tttattttag aaaaagaatt ctttttctca
 4741 ataactgttc tcttgaattc aaattaaggg actgccaaag tcaattagaa tattttaaaa
 4801 ataacttgtt gtaacctgtg taaataatat acaatttaca ggatttggga ttgtagaact
 4861 taaactggaa gactggattc ctcagatctc aggactataa cattccagat aaatttttac
 4921 attccccttg ctgtatatta actgatgatc atttatattg taagattttt taccttaata
 4981 tttctgaata aaactcttat tgcccattta atattttcat aggcaatcaa atgtgagtaa
 5041 tactgctaag agtctgattt attaaaaata tttgtataat tcattcagtt tagtttttca
 5101 gtttagtctt tctgctttca cttttctctg tgctaacaag taactaatgt ctgggcattg
 5161 acttcttatt gaatcaaagt tgggttaggc atagctatgc acacctgatg tgtaagatta
 5221 aagaagagat taaataagaa atcttgggta agttggactt ttctgtatag ctcttttttc
 5281 ctctgagttg tattttaatg tagtttataa gtgataaaat gatccttgtt ttctaaaagc
 5341 cagtccttcc cttcagcttt ccacagtttc tgtaaatggt taactcttgt acagtcaatg
 5401 gcaattttta atatatatat atatatataa tatgtatatg gaaaagggtc aaagatgctt
 5461 ttaattttat taatgactat tgccttccta taataataat tttcatcctt aattatgata
 5521 atacttttag caagaaaaat tcctttttac tacagttttt agatgcaaaa tgcagtttgg
 5581 ttcttttagtc aaatccactt agagggtata ttgcagttaa actgtgaagg atacttcaact
 5641 accaatgtat aagctttgtt gaatttgtat cattttcttt cagtaaatgaa aagctattca
 5701 ttatacagta tggaaataaa aattgcttca ttga

도면24

1 mahvpartsp gpgpql1111 lplfllllrd vagshrapaw salpaaadgl qgdrdlqrhp
 61 gdaaatlgps aqdmvavhnh rlyekysrqq arpggntvr sfrarlevvd qkavyffnlt
 121 smqdsemilt atfhfysepp rwpralevlc kpraknasgr plplgpptrq hllfrslsqn
 181 tatqglrga malappprgl wqakdispiv kaarrdgell lsaqldseer dpgvprpspy
 241 apyilvyand laisepnsva vtlqrydpfp agdpepraap nnsadprvr aaqatgplqd
 301 nelpglderp prahaqhfhk hqlwpspfra lkprpgrkdr rkkggevfma asqvlfddek
 361 tmqkarrkqw deprvcsrry lkvdvfadigw newlispksf dayycagace fpmpkivrps
 421 nhatiqsvr avgiipgipe pccvpdkmns lgvlflden nvvlkvypnm svdtcacr

도면25

1 gggccaggga cgaccctgtc agctgcagcc ccagaggtcc ggggcgca gccgggtccc
 61 ctcgagggcg cagccggccg ccccgccccg cccctcgaag cagccgggccc gggcgcgcaag
 121 tgggctacaa actttcggcg cgcgagtcgg ccaaggcagc gcgcccactc gggctcggct
 181 cggctctgcy ctgctccgga cggctgtgac cgctggccgg gggctcgggc cgccgggtacc
 241 cagggaccgc gcgcccgggt gcctgctccg ctaagcccct cgccccgccc ggacctcggc
 301 atccagcgcc ctgctgcccg ggctctcccc ggcgccccta ctgcccggag gtcagtcgcy
 361 agcctccggt gcgcccagcg tcgctctcct cctcctggac ttcggccctt tgcccctc
 421 accacgcat ggctcatgtc cccgctcgga ccagcccggg acccgggccc cagctgctgc
 481 tgctgctgct gccgttgttt ctgctgttgc tccgggatgt ggccggcagc cacagggccc
 541 ccgctggtc cgactgccc gggcgccgac acggcctgca gggggacagg gatctccagc
 601 ggcaccctgg ggacgccc gccacgttg gccccagcgc ccaggacatg gtcgctgtcc
 661 acatgcacag gctctatgag aagtacagc ggcagggcgc gcgcccggga gggggcaaca
 721 cggctccgag cttcagggcc aggtggaag tggctgacca gaagccgtg tatttcttca
 781 acctgacttc catgcaagac tcggaatga tccttacggc cactttccac ttctactcag
 841 agccgctcgt gtggcctcga gcgctcaggg tgctatgca gccgcccggc aagaacgctt
 901 cagggcccgc gctgcccctg gggcccaca cagccagca cctgctcttc cgcagcctc
 961 cgcagaacac ggccacacag gggctactcc gcggggccat ggccctggcg ccccaccgc
 1021 gcggcctgtg gcaggccaag gacatctccc ccatcgtcaa ggcggcccgc cgggatggcg
 1081 agctgctcct ctccgcccag ctggattctg aggagaggga cccgggggtg ccccgcccga
 1141 gccctatgc gccctacatc ctagtctatg ccaacgatct ggccatctcg gagcccaca
 1201 gcgtggcagt gacgctgag agatacgacc ccttccctgc cggagacccc gagcccgcg
 1261 cagcccccaa caactcagcg gaccccgcg tgcgcccagc cgcgaggcc actgggccc
 1321 tccagacaaa cgagctgccc gggctggatg agaggcccgc gcgcccac gcacagcact
 1381 tccacaagca ccagctgtg cccagcccct tccgggctg gaaaccccgc ccagggcgca
 1441 aagaccgag gaagaaggc caggaggtgt tcatggccgc ctgaggggtg ctggactttg
 1501 acgagaagc gatgcagaaa gcccggagga agcagtgga tgagccgagg gtgtgctccc
 1561 ggagttacct gaaggtggc ttcgagaca tcggtggaa tgaatggata atctaccga
 1621 aatcttttga tgccactac tgcgcccggag catgtgagtt cccatgcct aagatgctt
 1681 gtccatccaa ccatgccacc atccagagca ttgtcagggc tgtgggcatc atccctggca
 1741 tcccagagcc ctgctgtgtt cccgataaga tgaactcct tggggtctc ttctggatg
 1801 agaatcgaa tgtggttctg aaggtgtacc ccaacatgtc cgtggacacc tgtgctgct
 1861 ggtgagacca ctccagggtg gaaagaagc acgcccagca gagctgcctt ctggagcct
 1921 tctgcaacca gacttgtg tgcagctgca gacacagagc acagctcatg ggcaacatca
 1981 ctggggcccga gagagagctg tccgcccagtc catcattagg gggcttttca ttgctagtga
 2041 ctagcccctt aaatgccagc ctgagtaact gaaggaatct ggggaattagc cctggcctga
 2101 aagtggcccga tcattcatac ccactgttct gaaggcttga aaacaaaaca tatccacaac
 2161 attggcttga tgtgatcctc atctcataac tgagcaagaa gactatgcaa atctagggc
 2221 gctcgctccc tgcacacgga aagaactctg ttaaatgct cagttcagaa cactttggc
 2281 cacatagtga ttttgaaaa caggataatc gtggtgtaaa tgagtgtttc ctttcaaagt
 2341 cactgcagca gcttttatcc atatggtatg cacatgtagc caatattggt ttcttttct
 2401 taatatatat atttatattt aaaacaacaa aaaggaggcg cgttgacacc attcccaca
 2461 gagatagtca tgctgagtg ggggtgttta aacatgcata ttgaaataac acatatagta
 2521 acgtgggaat actaaaaaat aaccaagatt ttatattttt gtaaattata ctttctatac
 2581 tgtagattgt gtatgttatg tgttttatg gaaagctaataaattaaagg tacagtggtga
 2641 tcttgaaaaa aaaaaaa

도면26

1 mcpgalwval plllslagsl gkplqswgr gsaggnahsp lgvpgglpe htfnlkmfle
 61 nvkvdflrsl nlsqvpsqdk trveppqymi dlynrytsdk sttpasnivr sfsmedaisi
 121 tatedfpfqk hillfnisip rheqitrael rlyvscqnhv dphshdlkgsv viydvldgtd
 181 awdsatetkt flvsqdiqde gwetlevssa vkrwvrsdst ksknklevtv eshrkgcdtl
 241 disvppgsrn lpffvvsnd hssgketr1 elremisheq esvlkklskd gsteagessh
 301 eedtdghvaa gstlarrkrs agagshcqt slrvnfedig wdsiiapke yeayeckggc
 361 ffpladdvtp tkhaiqvltv hlkfptkvgk accvptklsp isvlykddmg vptlkyhyeg
 421 msvaecgr

도면27

1 aagcacaagt ggaggacaat ccagcccggc agcgggtgag agtgggtgct ggccaggacg
 61 gttccttcag agcaaacagc agggagatgc cggcccgtc cttcccagct cctcccgtg
 121 cccgctaaca cagcacggcc gcctgcagtc tctctctggt gtgattgcgc gggcctaaga
 181 tgtgtcctgg ggcactgtgg gtggccctgc ccctgctgtc cctgctggct ggctccctac
 241 aggggaagcc actgcagagc tggggacgag ggtctgctgg gggaaacgcc cacagcccac
 301 tgggggtgcc tggaggtggg ctgcctgagc acacctcaa cctgaagatg tttctggaga
 361 acgtgaaggt ggatttctg cgcagcctta acctgagtgg ggtcccttcg caggacaaaa
 421 ccagggtgga gccgcccag tacatgattg acctgtacaa caggtacacg tccgataagt
 481 cgactacgcc agcgtccaac attgtgcgga gcttcagcat ggaagatgcc atctccataa
 541 ctgccacaga ggacttcccc ttccagaagc acatcttgct cttcaacatc tccattccta
 601 ggcatgagca gatcaccaga gctgagctcc gactctatgt ctctgtcaa aatcacgtgg
 661 acccctctca tgacctgaaa ggaagcgtgg tcaattatga tgttctggat ggaacagatg
 721 cctgggatag tgctacagag accaagacct tctggtgtc ccaggacatt caggatgagg
 781 gctgggagac cttggaagtg tccagcggcc tgaagcgtg ggtccggctc gactccacca
 841 agagcaaaaa taagctgga gtgactgtgg agagccacag gaagggctgc gacacgtgg
 901 acatcagtgt cccccaggt tccagaaacc tgcccttctt tgttgtctt tccaatgacc
 961 acagcagtgg gaccaaggag accaggctgg agctgaggga gatgatcagc catgaacaag
 1021 agagcgtgct caagaagctg tccaaggacg gctccacaga ggcaggtgag agcagtcacg
 1081 aggaggacac ggatggccac gtggctgctg ggtcgcactt agccaggcgg aaaaggagcg
 1141 ccggggctgg cagccactgt caaaagacct cctgctgggt aaacttcgag gacatcggct
 1201 gggacagctg gatcattgca cccaaggagt atgaagccta cgagtgtgag ggcggctgct
 1261 tcttcccctt ggctgacgat gtgacgccga cgaaacacgc tctcgtgag accctggtgc
 1321 atctcaagtt cccacaaaag gtgggcaagg cctgctgtgt gccaccaa ctgagcccca
 1381 tctccgtcct ctacaaggat gacatggggg tgcccaccct caagtacatc tacgagggca
 1441 tgagcgtggc agagtgtggg tgcaggtagt atctgcctgc ggggctgggg aggcaggcca
 1501 aaggggctcc acatgagagg tcctgcatgc ccctgggac aacaaggact gattcaatct
 1561 gcatgccagc ctggagagg aaaggagcc tgctctccct cccacacacc caccacaagc
 1621 atacaccgct gagctcaact gccagggaag gctaaggaaa tggggatttg agcacaacag
 1681 gaaagcctgg gagggttggt gggatgcaag gaggtgatga aaaggagaca gggggaaaaa
 1741 taatccatag tcagcagaaa acaacagcag tgagccagag gagcacaggc gggcaggtca
 1801 ctgcagagac tgatggaagt tagagaggtg gaggagcca gctcgtcca aaacccttg
 1861 ggagtagagg gaaggagcag gccgctgtc acaccatca ttgtatgtta tttccacaa
 1921 ccagttgga ggggcatggc ttccaattta gagac

도면28

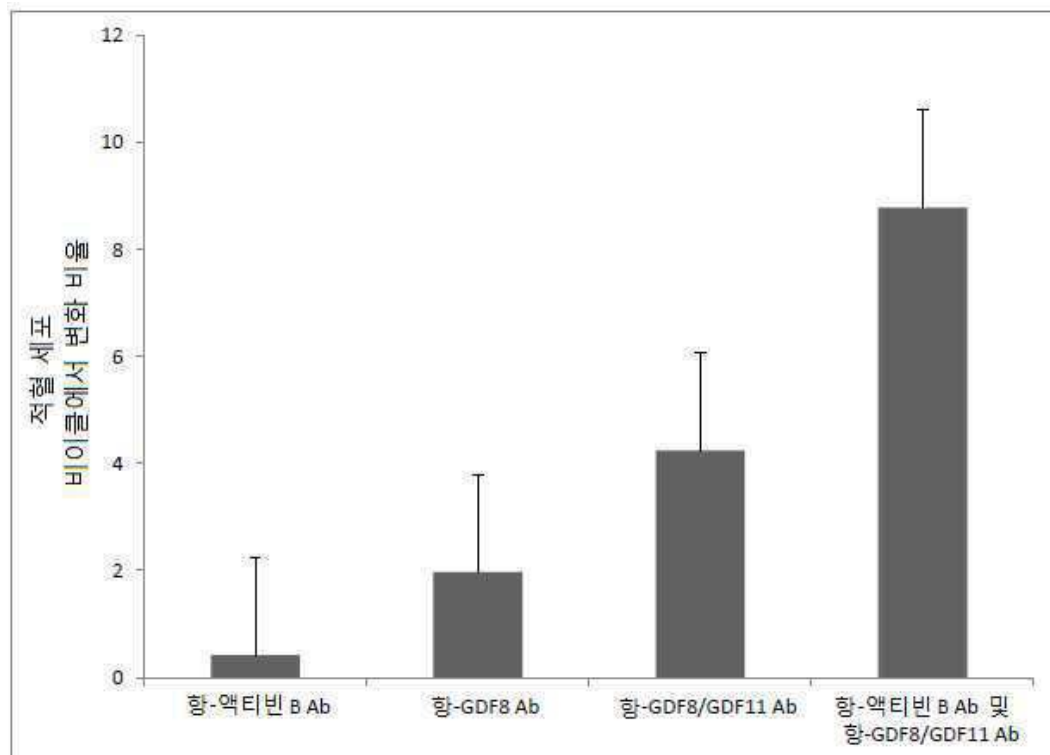
1 mgslvltlca lfclaaylvs gspimnleqs pleedmslfg dvfseqdgvd fntllqsmkd
 61 eflktlnlsd iptqdsakvd ppeymlelyn kfatdrtsmp saniirsfkn edlfsqpvsvf
 121 nglrkypllf nvsiphheev imaelrlytl vqrdmiydg vdrkitifev leskgdnege
 181 rnmlvlvsge iygtnewet fdvtdairrw qksgssthql evhieskhde aedassgrle
 241 idtsagnkhn pllivfsddq ssdkerkeel nemisheslp eldnlgldsf ssgpgeeall
 301 qmrsniyds tarirrnakg nyckrtplyi dfkeigwds iiappgyeay ecrvcnypl
 361 aehltpkha iiqalvhlkn sqkaskaccv ptklepisil yldkgvvtyk fkyegmavse
 421 cgcr

도면29

```

1  ggggagagga agagtggtag ggggagggag agagagagga agagtttcca aacttgtctc
61  cagtgcacagg agacatttac gttccacaag ataaaactgc cacttagagc ccaggaagc
121 taaaccttcc tggcttgcc taggagctcg agcggagtca tgggctctct ggtcctgaca
181 ctgtgcgctc ttttctgcct gccagcttac ttggtttctg gcagcccat catgaaccta
241 gagcagtctc ctctggaaga agatatgtcc ctctttggtg atgttttctc agagcaagac
301 ggtgtcgact ttaacacact gctccagagc atgaaggatg agtttcttaa gacactaaac
361 ctctctgaca tccccacgca ggattcagcc aagggtggacc caccagagta catgttgaa
421 ctctacaaca aatttgcaac agatcggacc tccatgcct ctgccaacat cattaggagt
481 ttcaagaatg aagatctggt tccccagccg gtcagtttta atgggctccg aaaatacccc
541 ctctcttca atgtgtccat tcctcaccat gaagaggtea tcatggctga acttaggcta
601 tacacactgg tgcaaaggga tcgtatgata tacgatggag tagaccgaa aattaccatt
661 tttgaagtgc tggagagcaa aggggataat gagggagaaa gaaacatgct ggtcttggg
721 tctggggaga tatatggaa caacagtgg tgggagactt ttgatgtcac agatgccatc
781 agacgttggc aaaagtcagg ctcatccacc caccagctgg aggtccacat tgagagcaaa
841 cagcatgaag ctgaggatgc cagcagtgga cggctagaaa tagataccag tgcccagaat
901 aagcataacc ctttgctcat cgtgttttct gatgacaaa gcagtgaca ggagaggaag
961 gaggaactga atgaaatgat ttcccatgag caacttcag agctggaca cttgggcctg
1021 gatagctttt ccagtggacc tggggaagag gctttgttgc agatgagatc aaacatcatc
1081 tatgactcca ctgcccgaat cagaaggaac gccaaaggaa actactgtaa gaggaccccg
1141 ctctacatcg acttcaagga gattgggtgg gactcctgga tcatcgctcc gcctggatac
1201 gaagcctatg aatgccgtgg tgttgtaac taccctgg cagagcatct cacaccaca
1261 aagcatgcaa ttatccaggc cttggtccac ctcaagaatt cccagaaagc ttcaaagcc
1321 tgctgtgtgc ccacaaagct agagccatc tccatcctct atttagaca aggcgtcgtc
1381 acctacaagt ttaaatacga aggcattggc gtctccgaat gtggctgtag atagaagaag
1441 agtcctatgg cttatttaat aactgtaaat gtgtatattt ggtgttcta tttaatgaga
1501 ttatttaata aggggtgaca gtaatgagc cttgctgcct tcaggaaatg gacaggtcag
1561 tttgtttagt gaaatgcata tttt
    
```

도면30



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA, INC.

<120> METHODS FOR INCREASING RED BLOOD CELL LEVELS AND TREATING
INEFFECTIVE ERYTHROPOIESIS

<130> PHPH-076-W01

<140> PCT/US2015/021880

<141> 2015-03-20

<150> 62/021,923

<151> 2014-07-08

<150> 61/969,073

<151> 2014-03-21

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

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

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

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

 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu

305 310 315 320
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val

 325 330 335
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro

 340 345 350
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu

 355 360 365
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile

 370 375 380
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys

385 390 395 400
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu

 405 410 415
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val

 420 425 430
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro

 435 440 445
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp

 450 455 460
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu

465 470 475 480
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu

 485 490 495
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile

 500 505 510

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110

Ala Pro Thr
 115

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

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

Ala Pro Thr
 115

<210> 5

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

Leu Pro Glu Ala
 100

<210> 6

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His

85 90 95

Leu Pro Glu Ala

100

<210> 7

<

211> 1539

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

atgacggcgc cctgggtggc cctcgcctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg      60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcatc tactacaacg ccaactggga gctggagcgc      120
accaaccaga gcgccctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac      180
gcctcctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat      240
gacttcaact gctacgatg gcaggagtgt gtggccactg aggagaacct ccagggttac      300
ttctgtctgt gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatTTGCC agaggctggg      360

ggccccgaag tcacgtacga gccacccccg acagccccca cctgctcac ggtgctggcc      420
tactactgc tgccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac      480
cggcatcgca agcccccta cggtcattgt gacatccatg aggacctgg gcctccacca      540
ccatcccctc tggTGGGcct gaagccactg cagctgctgg agatcaagc tCGGGGgcgc      600
tttggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca      660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtgaa cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag      720
cacgagaacc tgetacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag      780

ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac      840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcagagg cctctcatac      900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg      960
    
```

gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
 ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc 1080
 acgagacggg acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
 ttcttgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gctctgctgc 1200

aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgcctt ttgaggaaga gattggccag 1260
 cacccttctg tggaggagct gcaggagggt gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt 1320
 aaagatcact ggttgaacaa cccgggcttg gccagcttt gtgtgacat cgaggagtgc 1380
 tgggaccatg atgcagagcg tcgcttctcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtcctg 1440
 attcggagggt cggtaacagg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500
 accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

<210> 8

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gggcgtgggg aggctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag 60
 cgcaccaacc agagcggcct ggagcgtgct gaaggcgagc aggacaagcg gctgcaactg 120
 tacgctctct gggccaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctggcta 180
 gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccaggtg 240
 tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgagcgtc tcaactcatt gccagaggct 300
 gggggcccg aagtcacgta cgagccaccc ccgacagccc ccacc 345

<210> 9

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
 50 55 60

Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu
 65 70 75 80

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
 85 90 95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
 100 105 110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
 115 120 125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
 130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val
 145 150 155 160

Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln
 165 170 175

Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu
 180 185 190

Gln Leu Leu Glu Val Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys
 195 200 205

Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln
 210 215 220

Asp Lys Gln Ser Trp Gln Asn Glu Tyr Glu Val Tyr Ser Leu Pro Gly
 225 230 235 240

Met Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Ile Gly Ala Glu Lys Arg Gly
 245 250 255

Thr Ser Val Asp Val Asp Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Glu Lys
 260 265 270

Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu
 275 280 285

Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110
 Lys Pro Pro
 115

<210> 11

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320
 ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380

tgttgggac acgacgcaga agccaggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500
 gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga 1542

<210> 13
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

atacttgga gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
 agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttgctg 180

gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag cctgaagta 240
 tatttttgtt gctgtgagg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagt acacctaagc caccc 345

<210> 14
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Apis sp.
 <400> 14

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> 15
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:
 TPA signal sequence peptide
 <400> 15

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> 16
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Asp or Ala
 <220><221> MOD_RES
 <222> (100)..(100)

 <223> Lys or Ala
 <220><221> MOD_RES
 <222> (212)..(212)
 <223> Asn or Ala
 <400> 16

 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 Xaa 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 Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val 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 Pro 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 Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

210 215 220
 Lys

225

<210> 17

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

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

1 5 10 15
 Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu

20 25 30
 Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser

35 40 45
 Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe

50 55 60

305 310 315 320
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

 325 330 335
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

340

<210> 18

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 18

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 Gly Ala Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr

20 25 30

Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn

35 40 45

Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His

50 55 60

Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys

65 70 75 80

Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys

85 90 95

Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly

100 105 110

Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr

115 120 125

Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 165 170 175
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 180 185 190
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 195 200 205
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 210 215 220

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

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

 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365
 Lys

<210> 19

<211> 1114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 19

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt      60
tcgcccggcg cgcctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt ttaaatgcta      120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata      180

aacggcggca ttgttttgct acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaacaa      240
aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga      300
cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta      360
ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccac      420
cgggtggtgga actcacacat gccaccctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccctc      480
agtcttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt      540
cacatgctgt gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt      600

ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac      660
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtctgaat gcaaggagta      720
caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca tctcaaagc      780
caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac      840
caagaaccag gtcagcctga cctgctggtt caaagcttc tatcccagcg acatgcccgt      900
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga      960
ctccgacggc tcctttctcc tctatagcaa gctcacctgt gacaagagca ggtggcagca     1020

ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca ttaggctctg cacaaccact acacgcagaa     1080
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatagaga attc                                     1114

```

<210> 20

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 20

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn

1 5 10 15
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30

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

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

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

 Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 21

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

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 Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
 20 25 30

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

Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
 50 55 60

Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
 65 70 75 80

Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
 85 90 95

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

360

365

<210> 22

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 22

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt      60
tcgccggcgc cctctggcgc tggggaggct gagacacggg agtgcactca ctacaacgcc      120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac      180
aagcggctgc actgctacgc ctctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag      240
aagggtctgt ggctcgatga cttcaactgc tacgatagc aggagtgtgt ggccactgag      300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact      360

catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc      420
ggtgtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtea      480
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctcccgac cctgaggtc      540
acatgcgtgg tgggtggactg gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagcccgagg aggagcagta caacagcacg      660
taccgtgagg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      720
aagtgaagg tctccaacaa agcctccca gtcccatcg agaaaacat ctccaaagcc      780

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccggga ggagatgacc      840
aagaaccagg tcagcctgac ctgctgggtc aaaggttct atcccagcga catcgccgtg      900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      960
tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      1020
gggaactgt tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cacgcagaag      1080
agcctctccc tgctccggg taaatga      1107

```

<210> 23

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 23

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

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45

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

50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95

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

Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

115 120 125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 130 135 140

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 145 150 155 160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 165 170 175

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

180 185 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205

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

aagtgatgt tcacaaaggt actgaaggcc cagctgtggg tgtacctacg gcctgtaccc 600

cgcccagcca cagictacct gcagatcttg cgactaaaac ccctaactgg ggaagggacc 660
gcagggggag ggggaggagg ccggcgtcac atccgtatcc gctcactgaa gattgagctg 720
cactcacgct caggccattg gcagagcatc gacttcaagc aagtgtaca cagctggttc 780
cgccagccac agagcaactg gggcatcgag atcaacgcct ttgatcccag tggcacagac 840
ctggctgtca cctccctggg gccgggagcc gaggggctgc atccattcat ggagcttcca 900
gtcctagaga acacaaaacg ttcccggcgg aacctgggtc tggactgcga cgagcactca 960
agcaggtccc gctgctgccg atatcccctc acagtggact ttgaggcttt cggtgggac 1020

tggatcatcg cacctaagcg ctacaaggcc aactactgct ccggccagtg cgagtacatg 1080
ttcatgcaaa aatatccgca taccatttg gtgcagcagg ccaatccaag aggctctgct 1140
gggcctgtt gtaccccc caagatgtcc ccaatcaaca tgctctactt caatgacaag 1200
cagcagatta tciacggcaa gatccctggc atggtggtgg atcgctgtgg ctgctcttaa 1260
ggtgggggat agaggatgcc tccccacag accctacccc aagacccta gcctgcccc 1320
catccccca agcctagag ctccctccac tcttcccgg aacatcacac cgttcccga 1380
ccaagccgtg tgcaatacaa cagagggagg caggtgggaa ttgagggtga ggggtttggg 1440

ggaaaagggga agcaggggca tagtcagggt ggggagtgtt tgaagtttgc agatgagaag 1500
gtttgacaaa aagacagaga gatgtagaga cagtgataga gacagaggaa caaaaagagc 1560
agcagtgaga aggcaaagag agaggcagaa gagacagacg aggcagagac aaaactga 1620
gaaagagact gaaatggagt aataaatgaa agccccacac caagcctcct ttcttccact 1680
ggcaaggtga ggggcttggg atagtttggg gagatccct gactattcag taggagaaga 1740
aatcaaaaat ccattctttt ctcttctct cctccaaca gtggccaggg gaaggggaag 1800
tgagggcagg ggcaaaaaga tttgggaatt ttattttatt tattttattg gacttttcat 1860

tttttggta ttggcttta ctggaatagg agggcccctg cccactgtgc cccgtttatc 1920
ccttatccc caaacctgc tctcccac acctaactac ttaagcactt gtataaagcc 1980
tccagggttg ggaatgggag taaaggcaa gagggcggac acatgaagt tagtttctaa 2040
cccatcatca ccctaactca acctttctg agccaaatgg cttgaattga agccagtgt 2100
catggaata gtaagaggtt agggtttaag agctggggat gcgggggtgg gagagagaac 2160
cctcaacatc caggatctat ataatgagag ctactttaaa ccctcagtc caccctcatg 2220
atgctgagtt atttagccag aggggtgcagc ctgcttatgc ccaaattccc tcagccaaga 2280

gagagaccaa agagcctctg gaatggcct gctcccagcc tctatcttca ggtcaattag 2340
 agagagtata gagacccagc agtcccttgg gctctgaaag cgtaggaga ggtcaagaaa 2400
 ggagcagtaa ggaggctgaa ggttacaggc ctttgaatc caaatcactg ctctgggcta 2460
 gggaatagag ccagcagacc aagggtggaa ggattctgga agggggacat ttagtctcc 2520
 taaccccaaa gctcagggtg gaagagggga gaacaaggaa gcagagtgtg taattatctt 2580
 ttcttttat ttttggaaac taacagtacc tggcagcagg gaggggaaag tacagtgggg 2640
 aaaagcatct gacaaggcca gttagaacag aggatgggaa ggatggagac tcccgggctt 2700

 ggaaggctag gaagcaggca gagactggtt gccatttcaa gtcactagct aggccattc 2760
 attctccca caacctgac ccattctcct ctggactcac tgtgcctcag tttcttcccc 2820
 tcaatggaat gagaaatgac agcacccgcc acagccaaga gatgaattct gacacttac 2880
 cacgggcact ttatggacat aaaatacctc tcgctgtggg acagataacc agggcaccag 2940
 agtagtggtg aagagatgtg aggcttaaga ggagtcacag gcttcagagt acaagtctcc 3000
 ctctgcctcc cagctggaca gtgcctagaa gccaaggagt tgagaatctc ctgatccaca 3060
 ccctatcctt acttcaccac caggcctctt ggctccaggc aagagcttag aggatgtcag 3120

 gagaggtggg ggtlaagaatc ttcagcaaaa ctgtcactct aagtagagcc agcagttacg 3180
 ggtctgataa aaacagtact gaactaaagt aaagccaag ctggtgagca aactggatgg 3240
 ctcatcttc ccaagagcat gactctcccc ctggccagt tgggtggaagg ggcaaaagta 3300
 tgtgaccacc ctigagaagg tgatgttggf gagctttaac atcttattcc tattcttata 3360
 gtgagaaagt gaaacaagat ctttcagtag aggaatgggc agggctgtag gctcttcagc 3420
 ttgccttacc ccatatagca gctatgctaa cccaagcct ctctggccct gttcttcac 3480
 cttccttctg cccaatcct gaaggacaag acacaccgg ccatcaaacc actcacattt 3540

 ctttgggtgga aggaaaggaa cagagaagtg aagaacagat acctccctcc aaggtcaaat 3600
 gcctctgat ctggcagag tagggattgg gcaataagca tcaggtatct tcctctaca 3660
 gattctagag agctggggca ttaaatatgg gggacactta gaatacagct ccttaatac 3720
 caccaataa agaccttgt gtgtgtgtgg tgggtggggg gggggcaggg gtctttctct 3780
 tatgaacata aatctgtgag ctgaagtctc attcccctgt tcctccctac cccaagag 3840
 gcacagagt aagggacttg gggggcacag ctcagcaacc cagtgggagt tagcaccccc 3900
 tcccactta tgatgtgtgt ggacctggcc agtgccectc tgaacatac attattagt 3960

 taattatcat ttattttgtg tatttgtcac atgtgtgca tgacagcctt tgttaagggt 4020
 gtctgaggag tatggagctg acaggggcat tggaatgcca ggaaagaact tcttcaactg 4080
 agatcaaggc ttctggagg gaacctgtc aaaaaggcca tcaggcagtt ttcaagttat 4140

gtgacagagg gcaaacgacgg ccataggggtg cctctgagttt tgggatggtc acatgacaca 4200
atccgacct tgaacctgaa aaaaaaata aaagcgtca aagagtttag aattca 4256
<210> 25
<211> 406
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25
Met Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15
Glu Leu Arg Pro Arg Gly Glu Ala Ala Glu Gly Pro Ala Ala Ala Ala
20 25 30
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Gly Gly Glu Arg Ser
35 40 45
Ser Arg Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly Cys Pro Val Cys
50 55 60
Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu Ser Ile Lys Ser

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

130 135 140
Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly Ser Pro Leu Cys
145 150 155 160
Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr Lys Val Leu Lys
165 170 175
Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr Val
180 185 190

Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly Glu Gly Thr Ala

195 200 205

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu Lys

210 215 220

Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser Ile Asp Phe Lys

225 230 235 240

Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly Ile

245 250 255

Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu Ala Val Thr Ser

260 265 270

Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys

325 330 335

Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr

340 345 350

Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly

355 360 365

Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe

370 375 380

Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val

385 390 395 400

Asp Arg Cys Gly Cys Ser

405

<210> 26

<211> 3217

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

actcggctcg cctcgcggcg ggcgccctcg tccagcgg cgccacatgg acgggctgcc 60
 cggctgggcg ctgggggccc cctgcttct gctgctggcg gccggctggc tggggcctga 120
 ggctggggc tcacccacgc ccccgcgac gcctgccg cgccgccac ccccgccacc 180
 cggatcccc ggtggctcgc aggacacctg tacgtcgtgc ggcggttcc ggcgccaga 240
 ggagctcggc cgagtggacg gcgacttct ggaggcggg aagcggcaca tcttgagccg 300

cctgcagatg cggggccggc ccaacatcac gcacgccgtg cctaaggccg ccatggtcac 360
 ggccctgcgc aagctgcacg cgggcaaggt gcgcgaggac ggcccggtgg agatccgca 420
 cctgcacggc cacgccagcc cgggcgccga cgccaggag cgcgtttccg aatcatcag 480
 cttcgccgag acagatggcc tcgctctc ccgggtccgc ctatacttct tcattccaa 540
 cgaaggcaac cagaacctgt ttgtggtcca ggccagcctg tggctttacc taaaactcct 600
 gccctacgtc ctggagaagg gcagccggcg gaaggtcgg gtcaaagtgt acttcagga 660
 gcagggccac ggtgacaggt ggaacatggt ggagaagagg gtggacctca agcgcagcgg 720

ctggcatacc ttccactca cggaggccat ccaggccttg tttgagcggg gcgagcggcg 780
 actcaaccta gacgtgcagt gtgacagctg ccaggagctg gccgtggtgc cgggttctgt 840
 ggaccagcga gaagagtcgc accggccctt tgtggtggtg caggctcggc tgggcgacag 900
 caggcaccgc attcgaagc gaggcctgga gtgcgatggc cggaccaacc tctgttcag 960
 gcaacagttc ttattgact tccgctcat cggctggaac gactggatca tagcaccac 1020
 cggctactac gggaactact gtgagggcag ctcccagcc tacctggcag ggtccccgg 1080
 ctctgctcc tccttcaca cggctgtggt gaaccagtac cgcattgcggg gtctgaacc 1140

cggcacggtg aactcctgct gcattcccac caagctgagc accatgtcca tgctgtactt 1200
 cgatgatgag tacaacatcg tcaagcggga cgtgcccaac atgattgtgg aggagtgcgg 1260
 ctgcgcctga cagtcaagg caggggcacg gtggtggggc acggagggca gtcccgggtg 1320
 ggcttcttc agcccccgcg ggaacggggg tacacggtgg gctgagtaca gtcattctgt 1380
 tgggctgtgg agatagtcc agggcgcggc ctgagatatt tttctacagc ttcatagagc 1440
 aaccagtcaa aaccagagcg agaacctca actgacatga aatactttaa aatgcacacg 1500
 tagccacgca cagccagacg catctgcca cccacacagc agcctccagg ataccagcaa 1560

atggatgcgg tgacaaatgg cagcttagct acaaatgcct gtcagtcgga gagaatgggg 1620
 tgagcagcca ccattcccac cagctggccc ggccactctg aattgcgct tccgagcaca 1680
 cataaaagca caagacaga gacgcagaga gagagagaga gccacggaga ggaaaagcag 1740

atgcaggggt ggggagcgca gctcggcgga ggctgcgtgt gccccgtggc ttttaccagg 1800
 cctgctctgc ctggctcgat gtctgcttct tccccagcct gggatccttc gtgcttcaag 1860
 gcctggggag cctgtccttc catgcccttg tcgagggaaa gagaccaga aaggacacaa 1920
 cccgtcagag acctgggagc aggggcaatg accgtttgac tgtttgtggc ttgggcctct 1980

 gacatgactt atgtgtgtgt gtgtttttgg ggtggggagg gagggagaga agagggggct 2040
 aaatttgatg cttaactga tctccaacag ttgacaggtc atccttgcca gttgtataac 2100
 tgaaaaagga cttttctacc aggtatgacc ttttaagtga aaatctgaat tgttctaata 2160
 ggaaaagaaa aaagttgcaa tctgtgccct tcattgggga cattcctcta ggactggttt 2220
 ggggacgggt gggaatgacc cctaggaagc gggatgagac cgcaggagga aatggcgggg 2280
 aggaggcatt ctigaactgc tgaggatggg ggggtgtccc tcagcggagg ccaaggagg 2340
 ggagcagcct agttggtctt ggagagatgg ggaaggcttt cagctgattt gcagaagttg 2400

 cccatgtggg ccccagccat cagggtggc cgtggacgtg gccccgtccc actcacctgc 2460
 ccgctgccc gcccggcgc atagcacttg cagacctgcc tgaacgcaca tgacatagca 2520
 ctgcccgate tgcgtgtgtc cagaagtggc ccttggecga gcgccgaact cgctgcctc 2580
 ctagatgtcc aagtgccacg tgaactatgc aatttaaagg gttgaccac actagacgaa 2640
 actggactcg tacgactctt tttatatttt ttatacttga aatgaaatcc tttgcttctt 2700
 ttttaagcga atgattgctt ttaatgtttg cactgattta gttgcatgat tagtcagaaa 2760
 ctgccatttg aaaaaagtt attttatag cagcaaaaaa aaaaaaaaaa gaatacagtt 2820

 aaatglatia tacataatit tggaaacaaa gaggccaaca gatcagtttt aatitlatia 2880
 gacggtgagg ccatctgaga tgaggtggac gttctgagca gtccttgag gcctgcca 2940
 cgtttcaggg tatgaatgga tttgtttat tcggtttgat gtgtctttc catccttaca 3000
 cacccagaag gtagagtaaa aatgactatg atagaatgca ggtgtgtatc cttaaatcct 3060
 catctttatg tttatitaa aaagctccc ttagattctg tttcataata atttaaaacc 3120
 aaacaatit ccatagact tgctgttaaa gtattgtacg tttgtgtaca gtttaagaaa 3180
 ataaaagatt gagtgccacg ggaaaaaaaa aaaaaaa 3217

<210> 27

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Asp Gly Leu Pro Gly Arg Ala Leu Gly Ala Ala Cys Leu Leu Leu

1 5 10 15
 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Gly Pro Glu Ala Trp Gly Ser Pro Thr Pro
 20 25 30
 Pro Pro Thr Pro Ala Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Ser Pro
 35 40 45
 Gly Gly Gln Asp Thr Cys Thr Ser Cys Gly Gly Phe Arg Arg Pro Glu

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

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

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

 245 250 255

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

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

370 375 380
 Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg Asp Val Pro Asn Met Ile Val
 385 390 395 400
 Glu Glu Cys Gly Cys Ala
 405

<210> 28

<211> 2453

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

cagacatgag ctgtgagggt caagcacagc tatccatcag atgatctact ttcagccttc 60
 ctgagtccca gacaatagaa gacaggtggc tgtacccttg gccaagggtg ggtgtggcag 120
 tgggtgtctgc tgtcactgtg ccctcattgg cccccagcaa tcagactcaa cagacggagc 180

 aactgccatc cgaggctcct gaaccagggc cattcaccag gagcatgcgg ctccctgatg 240
 tccagctctg gctgggtctg ctgtgggcac tgggtgcgagc acaggggaca ggtctctgtg 300
 gtccctcctg tgggggctcc aaactggcac cccaagcaga acgagctctg gtgctggagc 360
 tagccaagca gcaaatcctg gatgggttgc acctgaccag tcgtcccaga ataactcatc 420

ctccaccca ggcagcgtg accagagccc tccggagact acagccaggg agtgtggctc 480
cagggaatgg ggaggaggtc atcagctttg ctactgtcac agactccact tcagcctaca 540
gctccctgct cacttttcac ctgtccactc ctcggtccca ccacctgtac catgcccgcc 600

tgtggctgca cgtgctcccc acccttcttg gcactctttg cttgaggatc ttccgatggg 660
gaccaaggag gaggcgcca gggctccgca ctctctggc tgagcaccac atcaccaacc 720
tgggctggca taccttaact ctgcccctca gtggcttgag gggtgagaag tetgggtgtec 780
tgaactgca actagactgc agaccctag aaggcaacag cacagt tact ggacaaccga 840
ggcggctctt ggacacagca ggacaccagc agcccttct agagcttaag atccgagcca 900
atgagcctgg agcaggccgg gccaggagga ggacccccac ctgtgagcct gcgacccct 960
tatgttcag gcgagacat tacgtagact tccaggaact gggatggcgg gactggatac 1020

tgcagcccga ggggtaccag ctgaattact gcagtgggca gtgccctccc cacctggctg 1080
gcagcccagg cattgctgcc tctttccatt ctgccgtctt cagcctcctc aaagccaaca 1140
atccttggcc tgccagtacc tctgtttgtg tcctactgc ccgaaggccc ctctctctcc 1200
tctacctgga tcataatggc aatgtgggtca agacggatgt gccagatatg gtggtggagg 1260
cctgtggctg cagctagcaa gaggacctgg ggctttggag tgaagagacc aagatgaagt 1320
ttcccaggca cagggcatct gtgactggag gcatcagatt cctgatccac accccaacc 1380
aacaaccacc tggcaatatg actcacttga ccctatggg acccaaatgg gcactttctt 1440

gtctgagact ctggcttatt ccagttggc tgatgtttg ggagatgggt aaagcgtttc 1500
ttctaagggt gtctaccag aaagcatgat ttctgcctt aagtctgtg agaagatgtc 1560
agggactagg gagggagggg gggaaggcag agaaaaatta cttagcctct cccaagatga 1620
gaaagtctc aagtgagggg aggaggaagc agatagatgg tccagcaggc ttgaagcagg 1680
gtaagcagge tggcccagg taagggtgt tgaggtaact taagggaagg tcaagaggga 1740
gatgggcaag gcgctgagg aggatgctta ggggaccccc agaacagga gtcaggaaaa 1800
tgaggcacta agcctaagaa gttccctggt tttcccagg ggacaggacc cactgggaga 1860

caagcattta tactttcttt cttctttttt attttttga gatcgagtct cgctctgtca 1920
ccaggctgga gtgcagtac acgatcttg ctactgcaa cctccgtctc ctgggttcaa 1980
gtgattcttc tgcctcagc tcccagcag ctgggattac aggcgcccac taatttttgt 2040
attcttagta gaaacaggt ttcaacatgt tggccaggat ggtctcaatc tcttgacctc 2100
ttgatccacc cgacttgcc tcccgaagtg atgagattat aggcgtgagc caccgcct 2160
ggcttatact ttcttaataa aaaggagaaa gaaaatcaac aatgtgagt cataaagaag 2220

ggtaggggtg atgggccaga gcaacagttc ttcaagtga ctctgtaggc ttctgggagg 2280

 tccttttca ggggtgtcca caaagtcaaa gctattttca taataatact aacatgttat 2340
 ttgccttttg aattctcatt atcttaaaat tgtattgtgg agttttccag aggccgtgtg 2400
 acatgtgatt acatcatctt tctgacatca ttgttaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 2453
 <210> 29
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Met Arg Leu Pro Asp Val Gln Leu Trp Leu Val Leu Leu Trp Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Arg Ala Gln Gly Thr Gly Ser Val Cys Pro Ser Cys Gly Gly Ser
 20 25 30

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

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

 His His Ile Thr Asn Leu Gly Trp His Thr Leu Thr Leu Pro Ser Ser
 165 170 175

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

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

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

<210> 30

<211> 3314

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

agattctgcc aagtctacc tgtaactggc ttcattttca agtcagacgt ttggctgctg 60
 ctctgtcccc tgcaacaagg agccatgcca gctggacaca cacttcttcc agggcctctg 120
 gcagccagga cagagttgag accacagctg ttgagaccct gagccctgag tctgtattgc 180
 tcaagaaggg ccttccccag caatgacctc ctcattgctt ctggcctttc tctcctggc 240
 tccaaccaca gtggccactc ccagagctgg cggtcagtgt ccagcatgtg gggggcccac 300

cttggaactg gagagccagc gggagctgct tcttgatctg gccaagagaa gcatcttggg 360

 caagctgcac ctaccaccagc gcccaacact gaaccgcctt ggtccagag ctgctttgag 420
 gactgcactg cagcacctcc acggggtecc acagggggca cttctagagg acaacagga 480
 acaggaatgt gaaatcatca gctttgctga gacaggcctc tccacatca accagactcg 540
 tcttgatctt cactttctct ctgatagaac tgcctggtgac agggaggtcc agcaggccag 600
 tctcatgttc tttgtgcagc tcccttccaa taccacttgg accttgaaag tgagagtctt 660
 tgtgctgggt ccacataata ccaacctcac cttggctact cagtacctgc tggaggtgga 720
 tgccagtggc tggcatcaac tcccctagg gcctgaagct caagctgcct gcagccaggg 780

 gcacctgacc ctggagctgg tacttgaagg ccaggtagcc cagagctcag tcatcctggg 840
 tggagctgcc cataggcctt ttgtggcagc ccgggtgaga gttgggggca aacaccagat 900
 tcaccgacga ggcacagact gcccaaggagg gtccaggatg tgctgtcgac aagagttttt 960
 tgtggacttc cgtgagattg gctggcacga ctggatcatc cagcctgagg gctacgcat 1020
 gaactttctg atagggcagt gcccaactaca catagcaggc atgcctggtg ttgctgcctc 1080
 ctttcacact gcagtgtca atcttctcaa ggccaacaca gctgcaggca ccaactggagg 1140
 gggctcatgc tigtaccaca cggcccggcg ccccctgtct ctgctctatt atgacagga 1200

 cagcaacatt gtcaagactg acatacctga catggtagta gaggcctgtg ggtgcagtta 1260
 gtctatgtgt ggiatgggca gcccaagggt gcatgggaaa acacgccctt acagaagtgc 1320
 acttcttga gaggaggaa tgacctcatt ctctgtccag aatgtggact ccctcttctt 1380
 gagcatctta tggaaattac cccacctttg acttgaagaa accttcatct aaagcaagtc 1440
 actgtgcat ctctctgacc actacctctt ttcttagggc atagtcctc ccgctagtcc 1500
 atcccctag ccccaactca gggactcaga cccatctca accatgagca atgcatctg 1560
 gtcccagge aaagacacc tttagctcacc ttaatatagac cccataacce actatgcctt 1620

 cctgtccttt ctactcaatg gtccccactc caagatgagt tgacacaacc cttccccca 1680
 atttttgtgg atctccagag aggccttctt ttggattcac caaagtttag atcaactgtg 1740
 ccaaaaatag aggcttacct acccccctct ttgtttgag cccctgtcct tcttagttgt 1800
 ccaggtgaac tactaaagct ctctttgcat accttcatcc atttttgtc cttctctgcc 1860
 tttctctat cccttaaggg ctgacttggc tgagctctat cacctgagct cccctgcctt 1920
 ctggcttctt gctgaggta gggcatttct taccctgtt cctctctgt ctagggtca 1980
 tggttctgtg taactgtggc tattctgtgt cctacacta cctggctacc cccttccatg 2040

gccccagctc tgctacatt ctgatataac tgcttcaaca ctagggggtc ctaaaggctt 2100
 tctatcttgc tagtccctgg ggcctcaaca tctcactg gttcccttaa ctctgcctat 2160
 acctctgtaa ataattcctt cactaagttc tcttgatgaa gcaaaaacag acagctgaaa 2220
 agtcctctat ctctacaag ggcctaaact ggcaccccag atgacacaga gcctgcctgc 2280
 ttatgctgta gtctgcctac tctgctgtct cttcacatgg tctcctcaga actgaactat 2340
 tgtatccatc teacacttta tgccctttct ttcttaggca ccccgccct ccatccttcc 2400
 agaaccatct ttgaggcttc atggctaata aaaacctagg ctttacctgt tcctctgta 2460

atccctccaa aagatgagac agatctatgc ttggtcatcc agtaaactga ccagctgtgg 2520
 gcacgcaagt gtgggaggca gaggcattgct cagagctggc tgccaggacc tctgacttgc 2580
 cttcctttca cccaccccca gtgctccacc caggagtctt gcctggaagc tggaatgggc 2640
 aagggtctgt ggagtgggac agggagaaga ggaaggcctg gatgaggaga ggggtggcatt 2700
 tgctctgaga ctgggtcctt tttagacctt tgeccgtcct cccccacatc tctcctttt 2760
 ggctggacag tctgaacca tgaggtcgt aatgtctgca gccaaggcc gagtttgcgc 2820
 aaaacccatg tgttctttgg taaactgat gtctgtgttt gctcagttta tgacccctc 2880

ctatgagggt aagaggtccc tgaatagga accctagagg agaaagtctg aaaaggactg 2940
 cctgggggac tgtaaatctg agcttgaggg cttcctgagc aacctatgga agttatccca 3000
 cctttgactt gaggagacct tcatctaagg agaactaag gaggccttct ggtgtctccc 3060
 ccacacatcc cgcaccccca gatctaacct ccttccaat tacagcttag tctccagggc 3120
 taggactggg gtaagcaaa gtgagtcatt cacctggggg ggctaaattt taagggggtg 3180
 gtgaacaatt tattaatcaa gataggactt taatgcaata ttattttaaa tcaaaattaa 3240
 tgcaaaaaat ccatgatgaa caaaatagcc tactttttaa taaaacagg atcagcatta 3300

aaaaaaaaaaaa 3314

<210> 31

<211> 351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Thr Ser Ser Leu Leu Leu Ala Phe Leu Leu Leu Ala Pro Thr Thr
 1 5 10 15
 Val Ala Thr Pro Arg Ala Gly Gly Gln Cys Pro Ala Cys Gly Gly Pro
 20 25 30
 Thr Leu Glu Leu Glu Ser Gln Arg Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Lys

Ile Ala Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala Asn
 290 295 300

Thr Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr Ala
 305 310 315 320

Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile Val
 325 330 335

Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser
 340 345 350

<210> 32

<211> 2823

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

agattcactg gtgtggcaag ttgtctctca gactgtacat gcattaaaat ttgcttggc 60

attactcaaa agcaaaagaa aagtaaaagg aagaacaag aacaagaaa aagattatat 120

tgattttaa atcatgcaaa aactgcaact ctgtgtttat atttacctgt ttatgctgat 180

tgttgctggt ccagtggatc taaatgagaa cagtggagca aaagaaaatg tggaaaaaga 240

ggggctgtgt aatgcatgta cttggagaca aaactctaaa tcttcaagaa tagaagccat 300

taagatacaa atcctcagta aacttcgtct ggaacagct cctaacaatca gcaaagatgt 360

tataagacaa cttttaccca aagctcctcc actccgggaa ctgattgac agtatgatgt 420

ccagagggat gacagcagcg atggctcttt ggaagatgac gattatcacg ctacaacgga 480

aacaatcatt accatgccta cagagtctga ttttctaag caagtggatg gaaaacccaa 540

atgttgcttc tttaaattta gctctaaaat acaatacaat aaagtagtaa aggccaact 600

atggatata ttgagaccgc tcgagactcc tacaacagtg tttgtgcaaa tctgagact 660

catcaaacct atgaaagacg gtacaaggta tactggaatc cgatctctga aacttgacat 720

gaaccaggc actggtatgt ggcagagcat tgatgtgaag acagtgttgc aaaattggct 780

caacaacct gaatccaact taggcattga aataaaagct ttagatgaga atggtcatga 840

tcttctgtga accttcccag gaccaggaga agatgggctg aatccgtttt tagaggtcaa 900

ggtaacagac acaccaaaaa gatccagaag ggatttttgt cttgactgtg atgagcactc 960

aacagaatca cgatgctgtc gttaccctct aactgtggat tttgaagctt ttggatggga 1020

ttggattatc gctcctaaaa gatataaggc caattactgc tctggagagt gtgaatttgt 1080

atttttacaa aaatatcctc atactcatct ggtacaccaa gcaaacccca gaggttcagc 1140
 aggccttgc tgiactccca caaagatgic tccaattaat atgctatatt ttaatggcaa 1200
 agaacaaata atatatggga aaattccagc gatggtagta gaccgctgtg ggtgctcatg 1260
 agatttatat taagcgttca taacttccia aaacatggaa ggttttcccc tcaacaattt 1320

 tgaagctgtg aaattaagta ccacaggcta taggcctaga gtatgtaca gtcacttaag 1380
 cataagctac agtatgtaaa ctaaaagggg gaatatatgc aatggttggc atttaacat 1440
 ccaacaaat cacacaagaa agttttatga tttccagagt ttttgagcta gaaggagatc 1500
 aaattacatt tatgttccta tatattacaa catcggcgag gaaatgaaag cgattctcct 1560
 tgagtctga tgaattaaag gagtatgctt taaagtctat ttcittaaag ttttgittaa 1620
 tatttacaga aaaatccaca tacagtattg gtaaaatgca ggattgttat ataccatcat 1680
 tcgaatcacc cttaaacact tgaatttata ttgtatggta gtatacttgg taagataaaa 1740

 tcccaaaaa atagggatgg tgcagcatat gcaatttcca ttcctattat aattgacaca 1800
 gtacattaac aatccatgcc aacggtgcta atacgatagg ctgaatgtct gaggtacca 1860
 ggtttatcac ataaaaaaca ttcagtaaaa tagtaagttt ctcttttctt caggtgcatt 1920
 ttcctacacc tccaaatgag gaatggattt tctttaatgt aagaagaatc atttttctag 1980
 aggttggctt tcaattctgt agcatacttg gagaaactgc attatcttaa aaggcagtea 2040
 aatggtgttt gttttatca aaatgtcaaa ataacatact tggagaagta tgtaattttg 2100
 tctttggaaa attacaacac tgcctttgca aactgcagt ttttatggta aaataataga 2160

 aatgatcgac tctatcaata ttgtataaaa agactgaaac aatgcattta tataatatgt 2220
 atacaatatt gttttgtaaa taagtgctc cttttttatt tactttggta tatttttaca 2280
 ctaaggacat ttcaaatfaa gtactaagge acaaagacat gtcatgcac acagaaaage 2340
 aactacttat atttcagagc aaattagcag attaaatagt ggtcttaaaa ctccatagt 2400
 taatgattag atggttatat tacaatcatt ttataatfff ttacatgatt aacattcact 2460
 tatggattca tgatggctgt ataaagtga tttgaaattt caatggttta ctgtcattgt 2520
 gtttaaatct caacgttcca ttattttaat acttgcaaaa acattactaa gtataccaaa 2580

 ataattgact ctattatctg aaatgaagaa taaactgatg ctatctcaac aataactggt 2640
 acttttattt tataattga taatgaatat atttctgcat ttatttactt ctgttttgta 2700
 aattgggatt ttgttaatca aatttattgt actatgacta aatgaaatta tttcttacet 2760
 ctaatttgta gaaacagtat aagtatatat aaagtgtttt cacatttttt tgaagacaaa 2820
 aaa 2823

<211> 375

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile

1 5 10 15

Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn

20 25 30

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

35 40 45

Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu

50 55 60

Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu

65 70 75 80

Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val

85 90 95

Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His

100 105 110

Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu

115 120 125

Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser

130 135 140

Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu

145 150 155 160

Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu

165 170 175

Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu

180 185 190

Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val

195 200 205

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

210 215 220
 Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
 225 230 235 240
 Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
 245 250 255
 Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys

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

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

<210> 34

<211> 3105

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

caactggggg cgccccggac gaccatgaga gataaggact gagggccagg aaggggaagc 60
 gagcccgcgg agaggtggcg gggactgctc acgccaaggg ccacagcggc cgcgctccgg 120
 cctcgctcgg ccgctccacg cctcgcggga tccgcggggg cagcccggcc gggcggggat 180
 gccggggctg gggcggaggg cgcagtggct gtgctggtgg tgggggctgc tgtgcagctg 240
 ctgcggggcc ccgcccgtgc ggcccctt gcccgctgcc gcggccgccc ccgcccgggg 300
 gcagctgctg ggggacggcg ggagccccgg ccgcacggag cagccgccc cgtcggccga 360

gtcctcctcg ggcttctgt accggcggct caagacgag gagaagcggg agatgcagaa 420
 ggagatcttg tcggtgctgg ggctcccga cggccccgg cccctgcacg gcctccaaca 480

gccgcagccc cggcgctcc ggcagcagga ggagcagcag cagcagcagc agctgcctcg 540
 cggagagccc cctcccggc gactgaagtc cgcgccctc ttcattgctgg atctgtacaa 600
 cgcctgtcc gccgacaacg acgaggacgg ggcgtcggag ggggagagc agcagtcctg 660
 gccccacgaa gcagccagct cgtcccagcg tcggcagccg cccccggcg ccgcgcaccc 720
 gctcaaccgc aagagccttc tggccccgg atctggcagc ggcggcgcgt cccactgac 780
 cagcgcgcag gacagcgcct tctcaacga cgcggacatg gtcatgagct ttgtgaacct 840
 ggtggagtac gacaaggagt tctcccctcg tcagcgacac cacaagagt tcaagttcaa 900

cttatcccag attcctgagg gtgaggtgt gacggctgca gaattccga tctacaagga 960
 ctgtgttatg gggagtntta aaaaccaaac ttttcttate agcatttate aagtcttaca 1020
 ggagcatcag cacagagact ctgacctgt tttgttgac acccgtgtag tatgggcctc 1080
 agaagaagc tggttgaat ttgacatcac ggccactagc aatctgtggg ttgtgactcc 1140
 acagcataac atggggcttc agctgagcgt ggtgacaagg gatggagtcc acgtccaccc 1200
 ccgagccgca ggcttggg gacagagcgg cccttacgac aagcagccct tcatgtggc 1260
 tttcttcaaa gtgagtgagg tgcacgtgcg caccaccagg tcagcctcca gccggcgccg 1320

acaacagagt cgiaatcgt ctaccagtc ccaggacgtg gcgcgggtct ccagtgttc 1380
 agattacaac agcagtgat tgaaaacagc ctgcaggaag catgagctgt atgtgagttt 1440
 ccaagacctg ggatggcagg actggatcat tgcaccaag ggctatgtg ccaattactg 1500
 tgatggagaa tgctcctcc cactcaacgc acacatgaat gcaaccaacc acgcgattgt 1560
 gcagacctg gttcacctta tgaaccccga gtatgtcccc aaaccgtgct gtgcgccaac 1620
 taagctaaat gccatctcgg tttttactt tgatgacaac tccaatgtca tttgaaaaa 1680
 atacaggaat atggttgtaa gagcttgtgg atgccactaa ctcgaaacca gatgctgggg 1740

acacacattc tgccttggat tcttagatta catctgcctt aaaaaaacac ggaagcacag 1800
 ttggaggtgg gacgatgaga ctttgaaact atctcatgcc agtgccttat taccaggaa 1860
 gatnttaaag gacctatta ataattgct cacttggtaa atgacgtgag tagttgttg 1920
 tctgtagcaa gctgagtttg gatgctgta gcataaggtc tggtaactgc agaaacataa 1980
 ccgtgaagct ctctctacc tctccccca aaaaccacc aaaattagtt ttagctgtag 2040
 atcaagctat ttgggtgtt tgttagtaaa tagggaaaat aatctcaaag gagttaaatg 2100

tattcttggc taaaggatca gctggttcag tactgtctat caaaggtaga ttttacagag 2160

aacagaaatc ggggaagtgg ggggaacgcc tctgttcagt tcattcccag aagtccacag 2220

gacgcacage ccaggccaca gccagggtct cacggggcgc ccttgtctca gtcattgctg 2280

ttgtatgttc gtgctggagt tttgttggig tgaaaataca cttatttcag ccaaaacata 2340

ccattttctac acctcaatcc tccatttgct gtactctttg ctagtaccaa aagtagactg 2400

attacactga ggtgaggcta caaggggtgt gtaaccgtgt aacacgtgaa ggcaatgctc 2460

acctcttctt taccagaacg gttctttgac cagcacatta acttctggac tgccggctct 2520

agtacctttt cagtaaagtg gttctctgcc tttttactat acagcatacc acgccacagg 2580

gtagaacca acgaagaaaa taaatgagg gtgccagct tataagaatg gtgttagggg 2640

gatgagcatg ctgtttatga acggaatca tgatttcct ttagaaaagt gaggctcaga 2700

ttaaatttta gaatattttc taaatgtctt tttcacaatc atgtactggg aaggcaattt 2760

catactaaac tgattaaata atacatttat aatctacaac tgtttgact tacagctttt 2820

tttgtaaata taaactataa tttattgtct attttatatc tgtttgctg taacattgaa 2880

ggaaagacca gacttttaaa aaaaaagagt ttatttagaa agtatcatag tgtaaacaaa 2940

caaattgtac cactttgatt ttcttggaaat acaagactcg tgatcaaag ctgaagtgt 3000

ggtacaaga ctcttgacag ttgtgcttct ctaggaggtt gggttttttt aaaaaaagaa 3060

ttatctgtga accatacgtg attaataaag atttccttta aggca 3105

<210> 35

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Pro Gly Leu Gly Arg Arg Ala Gln Trp Leu Cys Trp Trp Trp Gly

1 5 10 15

Leu Leu Cys Ser Cys Cys Gly Pro Pro Pro Leu Arg Pro Pro Leu Pro

 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gln Leu Leu Gly Asp Gly Gly

 35 40 45

Ser Pro Gly Arg Thr Glu Gln Pro Pro Pro Ser Pro Gln Ser Ser Ser

 50 55 60

Gly Phe Leu Tyr Arg Arg Leu Lys Thr Gln Glu Lys Arg Glu Met Gln

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

His

<210> 36

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn

1 5 10 15
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110

Lys Pro Pro Thr
 115

<210> 37

<211> 150

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 37

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Pro
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

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

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu

130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser

145 150

<210> 38

<211> 150

<212> PRT

<213> Sus sp.

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu

130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser

145 150

<210> 39

<211> 150

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu

130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser

145 150

<210> 40

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

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

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

130 135 140
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

- <210> 41
- <211> 150
- <212> PRT
- <213> Bos sp.
- <400> 41

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

Cys Glu Gly Glu Arg Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140
 Pro Val Gly Gly Leu Ser
 145 150
 <210> 42
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Xenopus sp.
 <400> 42
 Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe
 1 5 10 15
 Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 20 25 30
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu
 35 40 45
 Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
 50 55 60
 Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
 65 70 75 80
 Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu
 85 90 95
 Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Tyr Cys Asn

<210> 44
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 consensus polypeptide

<220><221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Thr, Ala or not present

<220><221> MOD_RES
 <222> (121)..(121)
 <223> Pro, Ala, Val or Met

<400> 44
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu
 1 5 10 15
 Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 20 25 30
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
 35 40 45

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

 Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Xaa Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr
 115 120 125
 Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr
 130 135 140
 Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

115 120 125

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

180 185 190

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

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

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

 325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340
 <210> 49
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 49
 Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
 20 25 30

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 165 170 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 180 185 190

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 195 200 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 210 215 220

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 260 265 270

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 275 280 285

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 305 310 315 320

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

<210> 50

<211> 308

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Pro Gly Gln Glu Leu Arg Thr Val Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu

1 5 10 15

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

260 265 270
 Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr
 275 280 285
 Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp
 290 295 300
 Cys His Cys Ile
 305
 <210> 51
 <211> 1220
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 agtcccagct cagagccgca acctgcacag ccatgcccg gcaagaactc aggacggtga 60

 atggctctca gatgctcctg gtgttgctgg tgcctcctg gctgccgcat gggggcgccc 120
 tgtctctggc cgaggcgagc cgcgcaagt tcccgggacc ctacagattg cactccgaag 180
 actccagatt ccgagagttg cggaaacgct acgaggacct gctaaccagg ctgcgggcca 240
 accagagctg ggaagattcg aacaccgacc tcgtcccggc cctgcagtc cggatactca 300
 cgccagaagt gcggtggga tccggcggcc acctgcacct gcgtatctct cgggcccgcc 360
 ttcccagggg gctccccgag gcctcccgcc ttaccgggc tctgttccgg ctgtcccga 420
 cggcgtcaag gtcgtgggac gtgacacgac cgtgcggcg tcagctcagc ctgcaagac 480

 cccaggcgcc cgcgctgcac ctgcgactgt cgccgccgcc gtcgcagtgc gaccaactgc 540
 tggcagaatc ttctccgca cggccccagc tggagttgca cttgcggccg caagccgcca 600
 gggggcgccg cagagcgcgt gcgcgcaacg gggaccactg tccgctcggg cccgggcgctt 660
 gctgccctct gcacacggtc cgcgcgtcgc tggaaacct gggctgggcc gattgggtgc 720
 tgtgccacg ggaggtgcaa gtgacatgt gcatcggcgc gtgcccgagc cagttccggg 780
 cggcaaacat gcacgcgag atcaagacga gcctgcaccg cctgaagccc gacacggtgc 840
 cagcgcctg ctgcgtgccc gccagctaca atccatggt gctcattcaa aagaccgaca 900

 ccggggtgtc gctccagacc tatgatgact tgttagccaa agactgccac tgcataatgag 960
 cagtctggt cctccactg tgcacctgcg cggaggacgc gacctcagtt gtctgcctt 1020
 gtggaatggg ctcaagttc ctgagacacc cgattcctgc ccaaacagct gtatttatat 1080
 aagtctgtta tttattatta atttattggg gtgaccttct tggggactcg ggggctggtc 1140
 tgatggaact gtgtatttat ttaaaactct ggtgataaaa ataaagctgt ctgaactggt 1200

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa

1220

<210> 52

<211> 347

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met His Ala His Cys Leu Pro Phe Leu Leu His Ala Trp Trp Ala Leu

1 5 10 15

Leu Gln Ala Gly Ala Ala Thr Val Ala Thr Ala Leu Leu Arg Thr Arg

 20 25 30

Gly Gln Pro Ser Ser Pro Ser Pro Leu Ala Tyr Met Leu Ser Leu Tyr

 35 40 45

Arg Asp Pro Leu Pro Arg Ala Asp Ile Ile Arg Ser Leu Gln Ala Glu

50 55 60

Asp Val Ala Val Asp Gly Gln Asn Trp Thr Phe Ala Phe Asp Phe Ser

65 70 75 80

Phe Leu Ser Gln Gln Glu Asp Leu Ala Trp Ala Glu Leu Arg Leu Gln

 85 90 95

Leu Ser Ser Pro Val Asp Leu Pro Thr Glu Gly Ser Leu Ala Ile Glu

 100 105 110

Ile Phe His Gln Pro Lys Pro Asp Thr Glu Gln Ala Ser Asp Ser Cys

115 120 125

Leu Glu Arg Phe Gln Met Asp Leu Phe Thr Val Thr Leu Ser Gln Val

130 135 140

Thr Phe Ser Leu Gly Ser Met Val Leu Glu Val Thr Arg Pro Leu Ser

145 150 155 160

Lys Trp Leu Lys His Pro Gly Ala Leu Glu Lys Gln Met Ser Arg Val

 165 170 175

Ala Gly Glu Cys Trp Pro Arg Pro Pro Thr Pro Pro Ala Thr Asn Val

180 185 190

Leu Leu Met Leu Tyr Ser Asn Leu Ser Gln Glu Gln Arg Gln Leu Gly

tccttgggca gcatggtttt ggaggtgacc aggcctctct ccaagtggct gaagcacct 540
 ggggccttg agaagcagat gtccagggtg gctggagagt gctggccgcg gccccccaca 600

ccgcctgcca ccaatgtgct ccttatgctc tactccaacc tctcgcagga gcagaggcag 660
 ctgggtgggt ccaccttgct gtgggaagcc gagagctcct ggcgggcca ggaggacag 720
 ctgtcctggg agtggggcaa gaggcacctg cgacatcact tgccagacag aagtcaactg 780
 tgtcgaagg tcaagttcca ggtggacttc aacctgatcg gatggggctc ctggatcacc 840
 taccccaagc agtacaagc ctatcgctgt gagggcgagt gtcctaacc tgttggggag 900
 gattttcacc cgaccaacca tgcatacacc cagagtctgc tgaaacgtta ccagccccac 960
 cgagtcctt ccaattgttg tgccccagtg aagaccaagc cgctgagcat gctgtatgtg 1020

gataatggca gagtgcctct agatcacat aaagacatga tcgtggaaga atgtgggtgc 1080
 ctctgatgac atcctggagg gagactggat ttgcctgcac tctggaagcc tgggaaactc 1140
 ctggaagaca tgataacat ctaatccagt aaggagaaac agagaggggc aaagtgtctc 1200
 tgcccaccag aactgaagag gaggggctgc ccactctgta aatgaaggcc tcagtggagt 1260
 ctggccaagc acagagctg ctgtcaggaa gagggaggaa gaagcctgtg cagggggctg 1320
 gctggatgtt ctctttactg aaaagacagt ggcaaggaaa agcacaagtg catgatttct 1380
 ttactggatt ttttaaaac ctgtgaacc cccgaaactg tatgtgaaag ttgagacata 1440

tgtgcatgta ttttggaggt gggatgaagt cacctatagc tttcatgtat tctccaaagt 1500
 agtctgtgtg tgacctgtcc cctcccca agattaagga tcactgtata gattaaaag 1560
 agtccgtcaa tctcattgcc tcaggctggg ttgggggagc cccacagctt tctggctggc 1620
 cagtggcaat ctactggcct tgtccagagg ctactggag tggttctctg ctaatgagct 1680
 gtacaacaat aaagccattg tctagttctc ctggccagc tgggtcctgt gaaggcagag 1740
 gcaggaacte atccaaggg accgccaatg ttgggttaca gaagacatcc ctgcgtcagt 1800
 ctgcttcggc agacacagcc tgagtttgtt aaagttggtg acaatccacc tcagtctctc 1860

aatgtgtgct attaatgagg cctctgagct tcctatccag cagtgggtgaa ggccttgccc 1920
 tgggtggcaa gatacttgct ctatggtcac agctcagcca ctggaagctg tgcgacctca 1980
 ggtgagcaat tcaactgtcca gtctccactt gtaaaaggaa cgctgggtgaa tcctaatgca 2040
 ttcataatga atgtctgttg tcaggctcag aagagccatg agcttt 2086

<210> 54

<211> 364

<212> PRT

<213> Homo sapiens

Asp Gln Cys His Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro
 245 250 255

Lys Leu Ser Cys Lys Asn Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn
 260 265 270

Phe Arg Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe
 275 280 285

Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser
 290 295 300

Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val
 305 310 315 320

Asp Pro Glu Ile Pro Gln Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro
 325 330 335

Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Asn Asn Asp Asn Val Ile Leu Arg His
 340 345 350

Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly
 355 360

<210> 55

<211> 1224

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

ggagctctcc ccggtctgac agccactcca gaggccatgc ttcgtttctt gccagatttg 60
 gctttcagct tctgtttaat tctggctttg ggccaggcag tccaatttca agaatatgtc 120
 tttctccaat tctgggctt agataaggcg ccttcacccc agaagttcca acctgtgcct 180
 tatatcttga agaaaatttt ccaggatcgc gaggcagcag cgaccactgg ggtctcccga 240

 gacttatgct acgtaaagga gctgggcgtc cgcgggaatg tacttcgctt tctcccagac 300
 caaggtttct tcttttacc aaagaaaatt tccaagctt cctcctgcct gcagaagctc 360
 ctctacttta acctgtctgc catcaaagaa agggaacagt tgacattggc ccagctgggc 420
 ctggacttgg ggccaattc ttactataac ctgggaccag agctggaact ggctctgttc 480
 ctggttcagg agcctcatgt gtggggccag accacccta agccaggtaa aatgtttgtg 540
 ttgcggtcag tcccatggcc acaagtgct gttcacttca acctgctgga ttagctaaag 600

gattggaatg acaacccccg gaaaaatttc gggttattcc tggagatact ggtcaaagaa 660

gatagagact caggggtgaa ttttcagcct gaagacacct gtgccagact aagatgctcc 720

cttcatgctt cctgctggt ggtgactctc aacctgac agtgccaccc ttctcggaaa 780

aggagagcag ccatccctgt cccaagctt tcttgtaaga acctctgcca cgtcaccag 840

ctattcatta acttccggga cctgggttgg cacaagtga tcattgcccc caaggggttc 900

atggcaaatt actgccaatg agagtgtccc ttctcaactga ccatctctct caacagctcc 960

aattatgctt tcatgcaagc cctgatgcat gccgttgacc cagagatccc ccaggctgtg 1020

tgtatcccca ccaagctgtc tcccatttcc atgctctacc aggacaataa tgacaatgtc 1080

attctacgac attatgaaga catggtagtc gatgaatgtg ggtgtgggta ggatgtcaga 1140

aatgggaata gaaggagtgt tcttagggta aatcttttaa taaaactacc tatctggttt 1200

atgaccactt agatcgaat gtca 1224

<210> 56

<211> 472

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

1 5 10 15

Val Ser Leu Ala Gln Gly Glu Arg Pro Lys Pro Pro Phe Pro Glu Leu

20 25 30

Arg Lys Ala Val Pro Gly Asp Arg Thr Ala Gly Gly Gly Pro Asp Ser

35 40 45

Glu Leu Gln Pro Gln Asp Lys Val Ser Glu His Met Leu Arg Leu Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Arg Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ala Glu Thr Leu Glu Arg Lys Gly

100 105 110

Leu Tyr Ile Phe Asn Leu Thr Ser Leu Thr Lys Ser Glu Asn Ile Leu

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

Ala Thr Ile Gln Ser Ile Val Arg Ala Val Gly Val Val Pro Gly Ile
 420 425 430
 Pro Glu Pro Cys Cys Val Pro Glu Lys Met Ser Ser Leu Ser Ile Leu
 435 440 445
 Phe Phe Asp Glu Asn Lys Asn Val Val Leu Lys Val Tyr Pro Asn Met
 450 455 460
 Thr Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg
 465 470

<210> 57

<211> 5733

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

agatcttgaa aacacccggg ccacacacgc cgcgacctac agctctttct cagcgttgga 60
 gtggagacgg cgcccgcagc gccctgcgcg ggtgaggtcc ggcgagctgc tggggaagag 120
 cccacctgtc aggctgcgct gggtcagcgc agcaagtggg gctggccgct atctcgctgc 180
 acccggccgc gtcccgggct ccgtgcgccc tcgccccagc tggtttgag ttcaaccctc 240
 ggctccgccc ccggctcctt gcgccttcgg agtgtcccgc agcgacgccg ggagccgacg 300
 cgccgcgagg gtacctagcc atggctgggg cgagcaggct gctctttctg tggctgggct 360
 gcttctgcgt gagcctggcg caggagagaga gaccgaagcc acctttcccg gagctccgca 420

 aagctgtgcc aggtgaccgc acggcagggtg gtggcccgga ctccgagctg cagccgcaag 480
 acaaggtctc tgaacacatg ctgcggtctt atgacaggta cagcacggtc caggcggccc 540
 ggacaccggg ctccctggag ggaggctcgc agccctggcg ccctcggctc ctgcgcaag 600
 gcaacacggt tcgcagcttt cgggcggcag cagcagaaac tcttgaaaga aaaggactgt 660
 atatcttcaa tctgacatcg ctaaccaagt ctgaaaacat tttgtctgcc aactgtatt 720
 tctgtattgg agagctagga aacatcagcc tgagttgtcc agtgtctgga ggatgctccc 780

atcatgctca gaggaaacac attcagattg atctttctgc atggaccctc aaattcagca 840

gaaaccaaag tcaactcctt ggccatctgt cagtggatat ggccaaatct catcgagata 900
ttatgtcctg gctgtctaaa gatatactc aactcttgag gaaggccaaa gaaaatgaag 960
agtctctcat aggattaac attactcca agggacgcca gctgccaaag aggaggttac 1020
ctttccaga gccttatatc ttggtatatg ccaatgatgc cgccatttct gagccagaaa 1080
gtgtggatc aagcttacag ggacaccgga atttccac tggaactgtt cccaaatggg 1140
atagccacat cagagctgcc cttccattg agcggaggaa gaagcgtct actggggtct 1200
tgctgcctct gcagaacaac gagcttctg gggcagaata ccagtataa aaggatgagg 1260

tgtgggagga gagaaagcct tacaagacc ttcaggctca ggcccctgaa aagagtaaga 1320
ataaaaagaa acagagaaag gggcctcatc ggaagagcca gacgctcaa ttgatgagc 1380
agacctgaa aaaggcaagg agaaagcagt ggattgaacc tcggaattgc gccaggagat 1440
acctcaaggt agactttgca gatattggct ggagtgaatg gattatctcc cccaagtcct 1500
ttgatgcta ttattgctct ggagcatgcc agttcccat gccaaagtct ttgaagccat 1560
caaatcatgc taccatccag agtatagtga gagctgtggg ggtcgttctt gggattcctg 1620
agccttgctg tgiaccagaa aagatgtcct cactcagtat tttattctt gatgaaaata 1680

agaatgtagt gcttaaagta taccetaaca tgacagtaga gtcttgcgt tgcagataac 1740
ctggcaaaga acicattga atgcttaatt caatcattag tttatttta tggacttctt 1800
cctgttttt ttttttttt ttttgactg ccaatgcatt ttgtttcaa agattatctt 1860
tatagtcaga ggggaatgag caaatagact gaagattgcc accaaggaaa agaactgtat 1920
ttgtttctga atgtaacta aagcaagatt tttagtaaat atggacatct atttctctt 1980
ttgtaatcaa acacaacaac ttatcaact gtttttagaa ctgtagaga acacactggt 2040
ttattttgt aatgttctt gaaaacagaa tggagaagca gcaatagctt gtcatttacc 2100

tcatttaatg actaatggga aatagagaac aatttcgct tttgaattag gcttattgcc 2160
ttagaatcct gagaaagtgc taaataatca actctgatgt tttcttaag ttcttgagac 2220
tcttgtttat cctgttttt cctccacaag tcattgicta agtgtaatgg aaagttatg 2280
ctgagcgtta gtgtgtatgt atgtgcgtac atgcgccagg tgccgtgcc ctctgtagga 2340
tggtttgctt aatatggtt tataattcag ttacacagg attctttatt ttttttaatt 2400
ttgtatttg gcaaacacca ttcagttata agaacttgc caaatatgat agaataattc 2460
aagagcatat acagagagtt accacttgac ccagctattt aattgcaaat acagttgttt 2520

tcatttcatt tcctaccaga aaaaggaatc agaaacctag tttttgaaaa cacaagtgt 2580
 attcctcttt tgiacttctt ttccacaaat gcttttattt attctaaatt gaatttaaaa 2640
 atccttccta aagccattaa ctctttaatt ctctgatat gcctttactt cctatgaagt 2700
 tattggtaga tgitgaggcc caaaaactgg tagaatattg aagatcttct taaatgacca 2760
 atttaacat aaccaaafat tgaatatcat tcttcagtca catctaagtc aggcactttt 2820
 tcacatagat cagggtcttt ggctcagtca cgaaatctac aagtagcaa agcttacaaa 2880
 acattattcg tcaggatagg gaatcaaaata tagacacttg tttgtctttg tttccatttc 2940

 tatgtgtcac atacatata gtgtcctctt ataactttag tcttcaaat tatttcaata 3000
 tccttcttct cactatattt atttgtgtga tggaaatgct ttcaggccgt agatcattgt 3060
 tgggtgtaat ctgtggttaa tcctcatttt agttccgtct tatctgatac ttagaaatat 3120
 ctgagccatt ttggaggctg tgcagtatca gaagacgtgg agtttgttct gtctctgctt 3180
 gtagctaatt atgggtgttc agtcatttaa taaatatggt ttgagcatct attttgtgaa 3240
 aggcactgtg ttacctgtgt gtctttagtg tcctcactgg taaaatgaag aggcaggcca 3300
 tgagctggaa ggggttaagtt tataattcca gctatttcac acccgtcttc ctigaaggaa 3360

 tgatagtgat agatataaaa acactgtaag tcctctttt aataaactaa atgaaagaac 3420
 atcctatact tcgctgtttg taaattagta tggcattcgc tttggtttaa gtggtatttt 3480
 attgcaaacc cattaaaaga ataactcatg aaaagaagct ctttgacacc ttggggtaca 3540
 caaatgttgg tgtgggtgtg tgttaattct gtgagtgaga cacaccagtt ctaaaaaaaa 3600
 tgagtgaagt tctgggtgct gagttacat gctttcttct agttcttaca gtagcataaa 3660
 attaaagatt caaagtgaga tggaggataa aattactttt taatacatgt tctcaaacat 3720
 ttgaaaataa aagtatatga tagaaggggg ccagagtgtg gccaccatcc tgatcgtact 3780

 gtttttcaat aaagaaaact ttttcattgg tagatttggg gaaattctaa atttaggttt 3840
 ttttctagag ctgtatcaac caaaacttct ggcaattccc agtatcactt cttagccttc 3900
 ttatatcaa atgcctgttt attacctttc ttaatttgaa tcaatgccta gttattacag 3960
 attgcacccc acaatggcca aaaaccact acataataaa atttacaggt actaactagt 4020
 taagattata ttttaagtag caattgatat aaaattacaa cacaatgaaa gaacttgggt 4080
 aatctcttag caatggaat aggttttaac cagcagtttt tctgggtgct ttgtaactat 4140
 cattttacta atgaattgag gatgtattat ggtttaaatt ggaagagttt tattcccaaa 4200

 gaataagca agattatctt tcagtagtag agattgaagt aaatgtatta atattttaat 4260
 taatacagat ttactaagag tagttagaaa atttagtaag tgctgtttt acaaattggt 4320
 aggtactagt ttctgtataa ttcctacaca gaagcttttag aaatctcctg atattaaatt 4380

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

325 330 335
 Arg Lys Asp Arg Arg Lys Lys Gly Gln Glu Val Phe Met Ala Ala Ser
 340 345 350
 Gln Val Leu Asp Phe Asp Glu Lys Thr Met Gln Lys Ala Arg Arg Lys
 355 360 365
 Gln Trp Asp Glu Pro Arg Val Cys Ser Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp
 370 375 380
 Phe Ala Asp Ile Gly Trp Asn Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe

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

450 455 460
 Lys Val Tyr Pro Asn Met Ser Val Asp Thr Cys Ala Cys Arg
 465 470 475

<210> 59

<211> 2658

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

gggccagggga cgacctgtc agctgcagcc ccagaggtcc ggggcgcgca gccgggtccc

60

ctcgaggcg cagccggccg ccccgccccg ccctcgaag cagccgggcc gggcgcgag 120
 tgggctacaa actttcgcg cgcgagtccg ccaaggcagc gcgccgactc gggctcggt 180
 cggctctgcg ctgctccgga cggctgtgac cgtggccgg gggctcgggc cgccgtacc 240

cacggaccgc gcggcgggt gcctgtccg ctaagccct cggccgcgc ggacctcgt 300
 atccagcgc ctgctgccc ggctctccc gcgcgccta ctgccgag gtcagtccg 360
 agcctccgt gcgccagcgc tcgcttct cctctggac ttggccctt tgccgcctc 420
 accacccat ggctcatgtc cccgctcggg ccagcccggg acccgggccc cagctgctgc 480
 tgctgtgct gccgttgtt ctgctgttg tccgggatgt ggccggcagc cacaggccc 540
 ccgctggtc cgactgcc gcggccggc acggcctgca gggggacagg gatctccagc 600
 ggcacctgg ggacgggccc gccacgttg gccccagcgc ccaggacatg gtcgctgtcc 660

acatgcacag gctctatgag aagtacagc ggcaggcgc gggccggga gggggcaaca 720
 cggctccgag cttcaggccc aggttgaag tggcagca gaagccctg tattttca 780
 acctgactc catgcaagac tcggaatga tcctacggc cactttcac ttctactcag 840
 agccgctcg gtggcctcga gcgctcgagg tctatgcaa gcccgggcc aagaacgctt 900
 caggccccc gctgcccctg gccccccca cagccagca cctgctctc gcagcctct 960
 cgagaacac ggccacacag gggctactc gcggggccat ggccctggc cccccaccg 1020
 gcggcctgtg gcagccaag gacatctcc ccacgtcaa ggcggcccgc ggggatggc 1080

agctgctct ctccgccag ctggattctg aggagaggga cccgggggtg ccccgccca 1140
 gccctatgc gccctacac ctagtctatg ccaacgatct ggccatctg gagcccaaca 1200
 gcgtggcagt gacgctgag agatacgacc cttccctgc cggagacccc gagccccgcg 1260
 cagccccaa caactcagc gacccccgc tgcgccgagc cgcgcaggcc actgggccc 1320
 tccaggaaa cgagctccg gggctggatg agaggccgc gcgcgccac gcacagcact 1380
 tccacaagca ccagctgtg cccagcccct tccggcgct gaaacccgg ccaggcgca 1440
 aagaccgag gaagaaggc caggaggtgt tcatggccg ctcgcaggtg ctggactttg 1500

acgagaagac gatcagaaa gcccggagga agcagtggga tgagccgagg gtgtgctcc 1560
 ggaggtacct gaaggtggac ttcgagaca tcggctggaa tgaatggata atctaccga 1620
 aatctttga tgcctactac tgcgcccgg catgtgagt cccatgcct aagatcgttc 1680
 gtccatcaa ccatgccacc atccagagca ttgtcaggc tgtggcacc atccctggca 1740
 tcccagagc ctgctgtgt cccgataaga tgaactcct tgggtcctc ttctggatg 1800
 agaatcgaa tgtggttctg aaggtgtacc ccaacatgc cgtggacacc tgtgctgcc 1860

ggtgagacca ctccagggtg gaaagaagcc acgcccagca gagctgcctt ctcgagcct 1920

 tctgcaacca ggacttggg tgcagctgca gacacagagc acagctcatg ggcaacatca 1980
 ctggggccca gagagagctg tccgccagtg catcattagg gggcttttca ttgctagtga 2040
 ctagccctt aaatgccagc ctgagtacct gaaggaatct gggaattagc cctggcctga 2100
 aagtggccca tcattcatac ccactgttct gaaggcttga aaacaaaaca tatccacaac 2160
 attggcttga tigtatcatc atctcataac tgagcaagaa gactatgcaa atcttagggc 2220
 gctcgtccc tgcacacgga aagaactctg tttaaatgct cagttcagaa cactttgggc 2280
 cacatagtga ttttggaaaa caggataatc gtggtgtaaa tgagtgttc ctttcaaagt 2340

 ccactgcaga gcttttatcc atatggtatg cacatgtagc caatattggt ttcttttct 2400
 taatatatat atttatttt aaaacaaca aaaggaggcg cgttgacacc attcccaca 2460
 gagatagtca tgetgagtgt gggttgttta aacatgcata ttgaaataac acatatagta 2520
 acgtgggaat actaaaaaat aaccaagatt ttatatTTTT gtaaattata ctttctatac 2580
 tgtagattgt gtatgttatg tgtttttatg gaaagctaataa aattaaagg tacagtggta 2640
 tcttgaaaaa aaaaaaaaa 2658

 <210> 60
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

 Asp Phe Leu Arg Ser Leu Asn Leu Ser Gly Val Pro Ser Gln Asp Lys
 65 70 75 80
 Thr Arg Val Glu Pro Pro Gln Tyr Met Ile Asp Leu Tyr Asn Arg Tyr
 85 90 95

Thr Ser Asp Lys Ser Thr Thr Pro Ala Ser Asn Ile Val Arg Ser Phe
 100 105 110
 Ser Met Glu Asp Ala Ile Ser Ile Thr Ala Thr Glu Asp Phe Pro Phe
 115 120 125

 Gln Lys His Ile Leu Leu Phe Asn Ile Ser Ile Pro Arg His Glu Gln
 130 135 140
 Ile Thr Arg Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Val Ser Cys Gln Asn His Val
 145 150 155 160
 Asp Pro Ser His Asp Leu Lys Gly Ser Val Val Ile Tyr Asp Val Leu
 165 170 175
 Asp Gly Thr Asp Ala Trp Asp Ser Ala Thr Glu Thr Lys Thr Phe Leu
 180 185 190

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

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

 Ala Gly Ala Gly Ser His Cys Gln Lys Thr Ser Leu Arg Val Asn Phe
 325 330 335
 Glu Asp Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Lys Glu Tyr Glu

acatcagtgt cccccagggt tccagaaacc tgccttctt tgttgtcttc tccaatgacc 960
 acagcagtgg gaccaaggag accaggctgg agctgaggga gatgatcagc catgaacaag 1020
 agagcgtgct caagaagctg tccaaggacg gctccacaga ggcaggtgag agcagtcacg 1080
 aggaggacac ggatggccac gtggctgcgg ggtcgacttt agccaggcgg aaaaggagcg 1140
 ccggggctgg cagccactgt caaaagacct ccttcggggt aaacttcgag gacatcggct 1200
 gggacagctg gatcattgca cccaaggagt atgaagccta cgagtgtgag ggcggctgct 1260
 tcttcccctt ggctgacgat gtgacgccga cgaaacacgc tatcgtgcag accctggtgc 1320

atctcaagtt cccacaaag gtgggcaagg cctgctgtgt gcccacaaa ctgagcccca 1380
 tctccgtcct ctacaaggat gacatggggg tgcccacct caagtacat tacgagggca 1440
 tgagcgtggc agagtgtggg tgcaggtagt atctgcctgc ggggctgggg aggcaggcca 1500
 aagggctcc acatgagagg tcttgcctgc ccctgggcac aacaaggact gattcaatct 1560
 gcatgccagc ctggaggagg aaaggagacc tctctcctt cccacaccc caccxaaagc 1620
 atacaccgct gagctcaact gccaggaag gctaaggaaa tggggatttg agcacaacag 1680
 gaaagcctgg gagggttgtt gggatgcaag gaggtgatga aaaggagaca gggggaaaaa 1740

taatccatag tcagcagaaa acaacagcag tgagccagag gagcacaggc ggcaggtca 1800
 ctgcagagac tgatggaagt tagagaggtg gaggaggcca gctcgtcca aaaccttgg 1860
 ggagtagagg gaaggagcag gccgcgtgtc acaccatca ttgtatgta tttcccacia 1920
 cccagttgga ggggcatggc ttccaattta gagac 1955

<210> 62

<211> 424

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Met Gly Ser Leu Val Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala

1 5 10 15

Tyr Leu Val Ser Gly Ser Pro Ile Met Asn Leu Glu Gln Ser Pro Leu

20 25 30

Glu Glu Asp Met Ser Leu Phe Gly Asp Val Phe Ser Glu Gln Asp Gly

35 40 45

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

50 55 60

Thr Leu Asn Leu Ser Asp Ile Pro Thr Gln Asp Ser Ala Lys Val Asp

Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gly

325 330 335

Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu Ala Tyr Glu Cys

340 345 350

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

355 360 365

His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn Ser Gln Lys Ala

370 375 380

Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg

420

<210> 63

<211> 1584

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

ggggagagga agagtggtag ggggagggag agagagagga agagtttcca aacttgtctc 60
 cagtgcagg agacatttac gttccacaag ataaaactgc cacttagagc ccaggaagc 120
 taaaccttcc tgcttggcc taggagctcg agcggagtca tgggtctctc ggtcctgaca 180
 ctgtgcgctc ttttctgect ggcagcttac ttggttctg gcagcccat catgaaccta 240
 gagcagctc ctctggaaga agatatgtcc ctcttgggtg atgtttctc agagcaagac 300

ggtgtcgact ttaacacact gctccagagc atgaaggatg agtttcttaa gacactaac 360
 ctctctgaca tccccacgca ggattcagcc aaggtggacc caccagagta catgttgaa 420
 ctctacaaca aatttgcaac agatcggacc tccatgcct ctgccaacat cattaggagt 480
 ttcaagaatg aagatctgtt ttcccagccg gtcagtitta atgggctcgc aaaatacccc 540
 ctctcttca atgtgtccat tctcaccat gaagaggtca tcatggctga acttaggcta 600
 tacacactgg tgcaaggga tcgtatgata tacgatggag tagaccgaa aattaccatt 660
 tttgaagtgc tggagagcaa aggggataat gagggagaaa gaaacatgct ggtcttgggtg 720

tctggggaga tatatggaac caacagtgag tgggagactt ttgatgtcac agatgccatc 780
 agacgttggc aaaagtcagg ctcatccacc caccagctgg aggtccacat tgagagcaaa 840
 cacgatgaag ctgaggatgc cagcagtgga cggctagaaa tagataccag tgcccagaat 900
 aagcataacc ctttgctcat cgtgttttct gatgaccaaa gcagtgacaa ggagaggaag 960
 gaggaactga atgaaatgat ttcccatgag caacttccag agctggacaa cttgggcctg 1020
 gatagctttt ccagtggacc tggggaagag gctttgttgc agatgagatc aaacatcatc 1080
 tatgactcca ctgcccgaat cagaaggaac gccaaaggaa actactgtaa gaggaccccg 1140

ctctacatcg acttcaagga gattgggtgg gactcctgga tcatcgctcc gcctggatac 1200
 gaagcctatg aatgccgtgg tgtttgtaac taccctctgg cagagcatct cacaccaca 1260
 aagcatgcaa ttatccaggc cttggtccac ctcaagaatt cccagaaagc ttccaagcc 1320
 tgctgtgtgc ccacaaagct agagcccatc tccatcctct atttagacaa aggcgtcgtc 1380
 acctacaagt ttaaatacga aggcattggc gtctccgaat gtggctgtag atagaagaag 1440
 agtcctatgg cttatttaat aactgtaaat gtgtatattt ggtgttccta tttaatgaga 1500
 ttatttaata aggtgtgaca gtaatagagg cttgctgcct tcaggaaatg gacaggtcag 1560

tttgtttag gaaatgcata tttt 1584

<210> 64

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

6xHis tag

<400> 64

His His His His His His

1

5