



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0029836
(43) 공개일자 2021년03월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A61K 31/663* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) *C07K 14/475* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/18 (2013.01)
A61K 31/663 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7006733(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년09월09일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2020-7019417
 원출원일자(국제) 2010년09월09일
 심사청구일자 2020년08월04일
- (85) 번역문제출일자 2021년03월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/048322
- (87) 국제공개번호 WO 2011/031901
 국제공개일자 2011년03월17일
- (30) 우선권주장
 61/276,287 2009년09월09일 미국(US)
- (71) 출원인
 약셀레론 파마 인코포레이티드
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128
- (72) 발명자
 세라, 자스비르
 미국, 매사추세츠 02421-6818, 렉싱턴, 링컨 테라스 3
 크노프, 존
 미국, 매사추세츠 01741, 칼라일, 로빈스 드라이브 147
 아티, 켄
 미국, 매사추세츠 02116, 보스턴, 말보로 스트리트 228
- (74) 대리인
 강명구

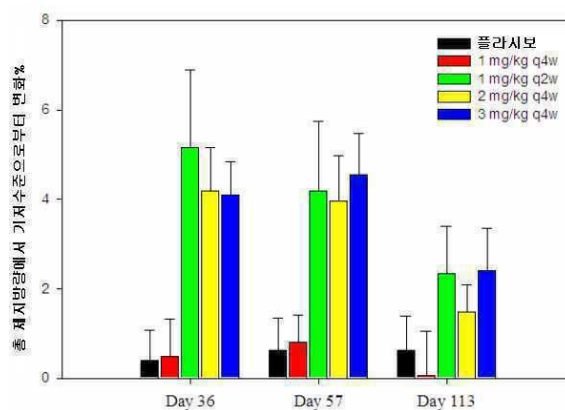
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 ActRIIb 길항제들과 이의 투약 및 용도

(57) 요약

특정 측면들에서, 본 발명은 골 성장을 촉진시키고 골 밀도를 증가시키고, 다발성 골수종을 치료하는 조성물 및 방법들을 제공한다. 환자에게 ActRIIb 길항제를 투약하는 방법 또한 제공한다.

대표도 - 도16



(52) CPC특허분류

A61K 38/179 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

C07K 14/435 (2013.01)

C07K 14/475 (2013.01)

C07K 14/705 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C07K 16/24 (2013.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

ActRIIb-Fc 융합 단백질의 혈장 농도를 최소한 8 mg/ml로 유지시키는 투약 일정에서 환자에게 ActRIIb-Fc 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는 환자에게 ActRIIb-Fc 융합 단백질을 투약하는 방법.

발명의 설명

기술분야

관련 출원들

[0001]

[0002] 본 출원은 2009년 9월 9일자로 제출된 미국 가출원 61/276,287의 장점을 청구한다. 상기 언급된 출원의 모든 교시는 전문이 참고문헌에 통합된다.

배경기술

[0003]

골다공증에서부터 골절에 이르기까지 골 질환은 일련의 병리학적 상태를 나타내는데, 유효한 약제가 거의 없다. 대신 치료는 고정(immobilization), 운동 및 식이요법의 변화를 포함하는 물리적 그리고 거동적 중재에 초점을 두고 있다. 다양한 뼈 질환을 치료하는 목적으로 뼈 성장을 촉진시키고, 그리고 골밀도를 증가시키는 치료제를 얻는 것이 유익할 것이다.

[0004]

뼈 성장 및 광화작용(mineralization)은 연골세포(chondrocytes) 및 맥관구조의 세포들 또한 이들 과정의 주요 측면에 참여하지만, 두 가지 세포 유형 즉, 파골세포(osteoclasts) 및 골아세포(osteoblasts)의 활성화에 따라 달라진다. 발생학적으로, 뼈 형성은 연골속골화(endochondral ossification)와 막속골화(intramembranous ossification)의 두 가지 기전을 통하여 발생하고, 연골속골화는 세로 뼈 형성을 담당하고, 막속골화는 두개골 뼈와 같은 위상적으로 편평한 뼈의 형성을 담당한다. 연골속뼈화는 성장판에서 연골성 구조의 순차적 형성 및 분해를 요구하는데, 이는 골아세포, 파골세포, 맥관구조의 형성 및 후속 광화작용의 주형으로 작용한다. 막속골화 동안, 결합 조직에서 뼈는 바로 형성된다. 이들 두 가지 과정 모두 골아세포의 침투 및 후속 매트릭스 침착을 요구한다.

[0005]

골절 및 뼈의 다른 구조적 파괴는 이 과정을 통하여 치료되는데, 적어도 피상적으로 연골성 조직 형성 및 후속 광화작용을 포함하는 골형성의 발생학적 일련의 사건들을 낚는다. 골절 치유(healing) 과정은 두 가지 방식으로 일어날 수 있다. 직접적 또는 1차 뼈 치유는 가골(callus) 형성 없이 일어난다. 간접적 또는 2차적 뼈 치유는 가골 전조 단계와 함께 일어난다. 골절의 1차 치유는 밀접한 설정(closely-set) 붕괴를 넘어 기계적 연속성의 재형성과 관련된다. 적합한 조건하에서, 붕괴 주변 뼈를 재흡수하는 세포들은 터널식(tunnelling) 재흡수성 반응을 보이고, 혈관의 관통 및 후속 치유를 위한 통로를 제공한다. 뼈의 2차 치유는 염증 과정, 연질 가골 형성, 가골 광화작용 및 가골 개형(remodeling)을 따른다. 염증 단계에서, 혈종 및 출혈 형성은 손상 부위에서 골막(periosteal) 및 골내막(뼈표면) 혈관의 붕괴로 인한 것이다. 염증 세포는 이 부위를 침투한다. 연질 가골 형성 단계에서, 세포는 새로운 맥관, 섬유아세포, 세포내 물질 및 지지 세포를 만들고, 골절 단편 사이 공간내 육아 조직(granulation tissue)을 형성한다. 섬유성 또는 연골성 조직(연질 가골)에 의해 붕괴부위를 가로질러 임상적 연합이 확립된다. 골아세포가 형성되고, 연질 가골의 광화작용을 중재하고, 이는 층판골(lamellar bone)에 의해 대체되어, 정상적인 개형(remodeling) 공정을 거친다.

[0006]

골절 및 뼈 구조의 기타 물리적 붕괴에 추가하여, 다양한 광범위한 조건에 의해 뼈 미네랄 함량 및 골량이 상실될 수 있고, 심각한 의학적 문제를 초래할 수 있다. 골량의 변화는 개인 삶에 있어서 상대적으로 예측가능하게 일어난다. 대략 30세까지 연골내 성장판의 선형 성장 및 방사형 성장을 통하여 남녀 모두 뼈가 최대량으로 성장한다. 약 30세 이후(지주골(trabecular bone), 가령, 척추 및 골반과 같은 평평한 뼈의 경우) 그리고 약 40세 이후(피질골(cortical bone), 가령, 사지에서 볼 수 있는 긴 뼈의 경우), 남녀 모두에게서 골 상실이 서서히 일어난다. 여성의 경우, 폐경후 에스트로겐 결핍으로 인하여 실질적인 골 상실의 최종 상태가 발생한다. 이 상태 동안, 여성들은 피질골에서 골량의 추가 10% 그리고 지주골 격실로부터 25% 추가 골량을 상실할 수도 있다.

점진적 골 상실이 골다공증과 같은 병리적 상태를 초래하는 지에 대해서는 개인의 초기 골량에 대체로 의존적이며, 악화 상태가 있는지에 따라 달라진다.

[0007] 골 상실은 일부 경우 정상적인 뼈 개형 과정의 불균형으로 특징화된다. 건강한 뼈는 지속적으로 재구성된다. 개형은 파골세포에 의한 뼈의 재흡수로 시작한다. 재흡수된 뼈는 새로운 뼈 조직에 의해 대체되며, 이는 골아세포에 의한 콜라겐 형성과 후속 석회화(calcification)에 의해 특징화된다. 건강한 개체에서, 재흡수 및 형성은 균형을 이룬다. 골다공증은 만성적, 진행성 질환으로, 재흡수 쪽으로 이동이 두드러지고, 골량 및 뼈 광화작용이 전반적으로 감소되는 결과를 초래한다. 인간에서 골다공증은 임상적 골감소증(뼈 미네랄 밀도는 젊은 성인 뼈의 경우 1 표준 편차 이상 그러나 2.5 표준 편차 미만)에 선행한다. 전세계적으로, 대략 7천5백만 사람이 골다공증 위험에 처해있다.

[0008] 따라서, 파골세포 및 골아세포 활성간의 균형을 조절하는 방법은 골절 및 뼈에 기타 손상의 치유를 촉진시키고, 그리고 골량의 상실 및 뼈 광화작용과 연관된 골다공증과 같은 질환 치료에 유용할 것이다.

[0009] 골다공증에 있어서, 에스트로겐, 칼시토닌, 오스테오칼신 및 비타민 K, 또는고약량의 규정식 칼슘 모두 치료 증재로 이용한다. 골다공증에 대한 기타 치료 방법은 비스포스포네이트, 부갑상선 호르몬, 칼슘모방제, 스타틴, 동화성 스테로이드, 란탄 및 스트론튬 염, 및 플루오르화 나트륨을 포함한다. 그러나, 이러한 치료제는 흔히 바람직하지 못한 부작용과 연관된다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 뼈 성장 및 광화작용을 촉진하는 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

발명의 내용

[0011] 발명의 요약

[0012] 부분적으로, 본 명세서는 ActRIIb-바탕을 둔 분자들(예를 들면, ActRIIb 세포외 도메인 또는 이의 변이체의 리간드 결합 부분, 예컨대 ActRIIb-Fc을 포함하는 분자들)과 ActRIIb 신호생성의 기타 길항제들을 포함하는 ActRIIb 길항제들을 골 밀도를 증가시키고, 골 성장을 촉진시키고, 및/또는 골 강도를 증가시키는데 이용할 수 있다는 것을 설명한다. 특히, 본 명세서는 가용성 형태의 ActRIIb가 생체내에서 골 밀도, 골 성장, 및 골강도 증가를 촉진시킨다는 것을 설명한다.

[0013] 골 성장을 촉진시키거나 골 상실을 억제하는 대부분의 약제 물질이 항-이화물질들(또는 보통 “이화물질(catabolic agents)”이라고도 함)(예를 들면, 비스포스포네이트) 또는 동화 물질들(예를 들면, 적절하게 투여된 경우 부갑상선 호르몬, PTH)로 작용하지만, 가용성 ActRIIb 단백질은 항-이화 및 동화 효과를 모두 가지는 이중 활성을 나타낸다. 따라서, ActRIIb 길항제들은 골 밀도를 증가시키고 골 성장을 촉진시키는데 이용될 수 있다. 항-ActRIIb 항체들, 그리고 ActRIIb-표적화된 작은 분자들과 aptamer들, 그리고 ActRIIb의 발현을 감소시키는 핵산들은 낮은 골 밀도 또는 낮은 골 강도, 예컨대 골다공증과 관련된 장애를 치료하거나, 또는 이를 필요로 하는 환자들, 예컨대, 뼈 골절 환자들에게서 골 성장을 촉진시키는데 또한 이용할 수 있다(이러한 분자들은 또한 여기에서 사용된 것과 같이 용어 “ActRIIb 길항제들”에 또한 포함된다). 본 명세서에서는 또한 ActRIIb 길항제들은 다발성 골수종 종양들에 의한 뼈 손상을 복구하거나 예방하고, 그리고 뼈로 전이를 예방 또는 복구하는데 유효하며(예를 들면, 유방, 식도, 결장, 전립선 또는 폐 암에서), 추가적으로, ActRIIb 길항제들은 다발성 골수종에서 종양 부하(load)를 감소시킨다고 나타낸다.

[0014] ActRIIb 길항제들은 다양한 장애 또는 몸의 상태, 특히, 근육과 신경근 장애들(예를 들면, 근위축증, 근위축성 측색 경화증(ALS), 그리고 근육 위축증), 지방 조직 장애들(예를 들면, 비만), 대사 장애들(예를 들면, 유형 2 당뇨병), 신경퇴행성 장애들, 그리고 노년 근육 소모(근육감소증), 전립선 암 요법, 그리고 암 약액질의 치료에 또한 이용할 수 있다. 특정 구체예들에서, ActRIIb 길항제들은(예를 들면, 가용성 ActRIIb 폴리펩티드들) ActRIIb 활성과 관련된 임의의 과정에서 ActRIIb 수용체를 길항할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 ActRIIb 길항제들은 ActRIIb 수용체의 하나 이상의 리간드, 예컨대 GDF8(미오스타틴이라고도 부름), GDF11, 악티빈 A, 악티빈 B, 악티빈 AB, Nodal, 및 BMP7(OP-1이라고도 부름)를 선택적으로 길항하도록 기획될 수 있고, 따라서, 추가 장애들의 치료에 유용할 것이다. 예시적인 ActRIIb 길항제들은 자연 발생적 ActRIIb 폴리펩티드들 뿐만 아니라 이의 기능적 변이체들을 포함한다.

[0015] 특정 측면에서, 본 내용은 가용성 ActRIIb 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. ActRIIb 폴리펩티드는 ActRIIb 폴리펩티드 및 약제학적으로 수용되는 운반체를 포함하는 약제학적 조제물로 조제될 수 있다. 선택적으로, ActRIIb 폴리펩티드는 1 마이크로몰 미만의 K_D 또는 100, 10 또는 1 나노몰 미만의 K_D 로 악티빈에 결합

한다. 바람직하게는, 조성물은 크기 압출 크로마토그래피에 의해 평가하였을 때 다른 폴리펩티드 성분들에 대해 조성물은 최소한 95% 순수이며, 더 바람직하게는, 조성물은 최소한 98% 순수하다. 이러한 조제물에 사용하기 위한 ActRIIb 폴리펩티드는 여기에서 설명되는 임의의 것일 수 있는데, 예를 들면, 서열 번호: 2, 3, 13, 17 또는 20로부터 선택된 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드, 또는 서열 번호: 2, 3, 13, 17 또는 20에서 선택된 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드일 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드는 천연 ActRIIb 폴리펩티드의 기능적 단편, 가령,

[0016] 서열 번호: 1 내지 3에서 선택된 서열 또는 C-말단 10 내지 15개 아미노산(“꼬리”)이 부족한 서열 번호: 2의 서열의 최소한 10, 20 또는 30개 아미노산을 포함하는 단편을 포함할 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드는 엄격한(strigent) 조건하에서 서열 번호: 3 또는 5의 핵산에 혼성화되는 핵산에 의해 인코딩될 수 있다.

[0017] 가용성, ActRIIb 폴리펩티드는 자연 발생적 ActRIIb 폴리펩티드와 비교하여, 아미노산 서열(가령, 리간드-결합 도메인에서)에서 하나 이상의 변경(alterations)을 포함할 수 있다. 예시적인 변경된 ActRIIb 폴리펩티드들은 여기에 참고자료로 통합된 WO 2006/012627, pp. 59-60에서 제공된다. 아미노산 서열에서 이러한 변경은 예를 들면, 포유동물, 곤충 또는 기타 진핵 세포에서 만들어질 때 폴리펩티드의 당화를 변경시키거나 또는 자연 발생적 ActRIIb 폴리펩티드에 대해 폴리펩티드의 단백질 절단을 변경시킬 수 있다.

[0018] ActRIIb 폴리펩티드는 하나의 도메인으로, ActRIIb 폴리펩티드(가령, ActRIIb 또는 이의 변이체의 리간드-결합 부분)와 바람직한 성질들, 가령, 개선된 약물동력학, 더 용이한 정제, 특정 조직에 표적화와 같은 성질들을 제공하는 하나 이상의 추가 도메인을 가지는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들면, 융합 단백질의 도메인은 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡수/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 융합 단백질의 다량체화, 및/또는 정제중 하나 이상을 강화시킬 수 있다. 이량체화 또는 다량체화는 증가된 리간드-결합 친화력을 제공할 수 있다. ActRIIb 융합 단백질은 면역글로블린 Fc 도메인(야생형 또는 돌연변이) 또는 혈청 알부민 또는 개선된 약물동력학, 개선된 용해도 또는 개선된 안전성과 같은 바람직한 성질을 제공하는 기타 폴리펩티드 부분을 포함할 수 있다. 전형적으로, ActRIIb-Fc 융합 단백질은 동종이량체 복합체로 만들어질 것이다. 선택적으로, ActRIIb-Fc 융합은 Fc 도메인과 세포의 ActRIIb 도메인 사이에 위치한 상대적으로 일정한 구조가 없는(unstructured) 링커를 포함한다. 이러한 일정한 구조가 없는 링커는 ActRIIb의 세포의 도메인의 C-말단 단부에서 대략 15개 아미노산의 구조가 없는 부분에 상응할 수 있거나, 또는 이 링커는 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산의 인위적인 서열이거나 또는 2차적 구조가 상대적으로 없는 5 내지 15, 20, 30, 50개 이상의 아미노산 길이거나 또는 이들 두 가지의 혼합물일 수 있다. 링커는 글리신 및 프롤린 잔기들이 많을 수 있고, 그리고 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 단일 서열을 포함하거나 또는 트레오닌/세린 및/또는 글리신의 반복 서열을 포함할 수 있다(가령, TG₃, TG₄, SG₃ 또는 SG₄ 단일체 또는 반복체). 융합 단백질은 정제 하위서열, 가령, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열, 및 GST 융합을 포함할 수 있다. 임의로, 가용성 ActRIIb 폴리펩티드는 당화된 아미노산, PEGylated 아미노산, 파르네실화된(farnesylated) 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 바이오틴화된 아미노산, 지질 모이어티에 콘주게이트된 아미노산, 그리고 유기 유도화물질에 콘주게이트된 아미노산으로부터 선택된 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기들을 포함한다. 약제학적 조제물은 또한 골 장애를 치료하는데 이용되는 화합물과 같은 하나 이상의 추가 화합물들을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 약제학적 조제물은 실질적으로 발열물질이 없다. 일반적으로, 환자에서 원치않는 면역 반응 가능성을 감소시키기 위하여 ActRIIb 단백질의 적합한 천연 당화를 중재하는 포유동물 세포계에서 ActRIIb 단백질을 발현시키는 것이 바람직하다. 인간 및 CHO 세포계가 성공적으로 이용되어 왔으며, 그리고 기타 통상적인 포유동물 발현 시스템이 유용할 것으로 예상된다.

[0019] 특정 측면에서, 본 내용은 가용성 ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 상기에서 설명하는 것과 같이, 가용성, ActRIIb 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 단리된 핵산은 ActRIIb의 세포의 도메인(가령, 리간드-결합 도메인)의 코딩 서열, 그리고 ActRIIb의 막통과 도메인 및/또는 세포질 도메인 일부 또는 전부를 코딩하는 서열, 막통과 도메인내에 위치한 또는 세포질 도메인내에 위치한, 또는 세포의 도메인과 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 사이에 위치한 중지 코돈의 코딩 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 단리된 폴리뉴클레오티드는 전장의 ActRIIb 폴리뉴클레오티드 서열, 가령, 서열 번호: 4 또는 5, 또는 부분적으로 절두된 형태를 포함할 수 있고, 이러한 단리된 폴리뉴클레오티드는 3' - 말단 전, 최소한 600개 뉴클레오티드에서 전사 종료 코돈을 더 포함하거나 또는 폴리뉴클레오티드의 해독이 전장 ActRIIb의 절두된 부분에 임의의 융합된 세포의 도메인을 야기하는 위치에 전사 종료 코돈을 포함할 수 있다. 바람직한 핵산 서열은 서열 번호: 18이다. 여기에서 설명되는 핵산들은 발현을 위하여 프로모터에 작용 가능하도록 연결될 수 있으며, 본 내용은 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드로 형질변환된 세포를 제공한다. 바

람직하게는, 세포는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포다.

[0020] 특정 측면에서, 본 내용은 가용성, ActRIIb 폴리펩티드를 만드는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 적절한 세포, 가령, Chinese 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 여기에서 설명하는 임의의 핵산(가령, 서열 번호: 4, 5 또는 18)을 발현시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 다음을 포함할 수 있다: a) ActRIIb 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 세포를 배양하고, 이때 세포는 가용성 ActRIIb 발현 구조체로 형질변환되고; 그리고 b) 발현된 ActRIIb 폴리펩티드를 회수한다. ActRIIb 폴리펩티드는 미정제된, 부분적으로 정제된 또는 고순도로 정제된 분취물형태로 회수될 수 있다. 정제는 일련의 정제 단계, 예를 들면, 임의의 순서로 다음중 하나, 둘, 또는 셋 이상을 포함하는 단계에 의해 이루어질 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 (가령, Q 세파로즈), 소수성 상호작용 크로마토그래피 (가령, 페닐세파로즈), 크기 압출 크로마토그래피, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피.

[0021] 특정 측면에서, 여기에서 설명되는 ActRIIb 길항제, 가령, ActRIIb 폴리펩티드는 개체에서 뼈 성장을 촉진시키기 위한 또는 골밀도를 증가시키기 위한 방법에 이용할 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 내용은 낮은 골밀도와 관련된 질환의 치료, 또는 뼈 성장 촉진이 필요한 개체에서 뼈 성장을 촉진시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 ActRIIb 길항제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 본 내용은 여기에서 설명되는 장애 또는 몸 상태를 치료하는 약물의 제조에 ActRIIb 길항제의 용도를 제공한다.

[0022] 특정 측면에서, 본 내용은 뼈 성장을 촉진시키는, 또는 뼈의 광화작용을 증가시키는 물질을 확인하는 방법을 제공한다. 이 방법은 a) ActRIIb 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인에 결합하는 테스트 물질을 확인하고; 그리고 b) 뼈 성장 또는 뼈 광화작용에 대한 물질의 효과를 평가하는 것을 포함한다.

[0023] 특정 측면들에서, 본 내용은 ActRIIb-Fc 융합 단백질을 환자에게 투여하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 ActRIIb-Fc 융합 단백질의 혈청 농도를 최소한 8 mg/ml²으로 유지시키는 투약 일정으로 환자에게 ActRIIb 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다.

[0024] 특정 측면들에서, 본 내용은 ActRIIb-Fc 융합 단백질을 환자에게 투약하는데 이용되는 화합물을 제공하는데, 여기에서 ActRIIb-Fc 융합 단백질은 ActRIIb-Fc 융합 단백질의 혈청 농도를 최소한 8 mg/ml²으로 유지시키는 일정으로 투여된다. 기타 예시적인 화합물들, 용도 및 투약 섭생은 명세서와 청구범위에서 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0025] 이 특허 또는 출원은 최소한 하나의 컬러로 된 도면을 포함한다. 이러한 도면을 포함하는 본 특허 또는 특허 출원의 사본은 필요한 임의의 요금 지불과 함께 특허청에 제공될 것이다.

도 1은 다양한 척추동물 ActRIIb 단백질들과 인간 ActRIIA의 다중 서열 배열을 나타낸다.

도 2는 피하로 투여된 단일 투약된 ActRIIb-Fc에 대한 인간 환자에서 약물동태학 (PK) 프로파일을 나타낸다.

도 3는 인간 환자에게 ActRIIb-Fc 단일 투약의 피하 투여후 15, 29 또는 27일 시점에서 체지방량(lean body mass)의 평균 변화율(mean percent change)을 나타낸다.

도 4는 인간 환자에게 ActRIIb-Fc 단일 투약의 피하 투여후 15, 29 또는 27일 시점에서 체지방량의 ≥ 0.5 kg (상부 패널) 또는 ≥ 1.0 kg (하부 패널) 증가된 환자의 비율을 나타낸다.

도 5는 인간 환자에게 ActRIIb-Fc 단일 투약의 피하 투여후 다양한 시간대에서 지방 대사의 혈청 생체표식인 렘틴의 변화를 나타낸다.

도 6은 인간 환자에게 ActRIIb-Fc 단일 투약의 피하 투여후 다양한 시간대에서 지방 대사의 혈청 생체표식인 아디포넥틴의 변화를 나타낸다.

도 7은 인간 환자에게 ActRIIb-Fc 단일 투약의 피하 투여후 다양한 시간대에서 골 형성의 혈청 생체표식인 골-특이적 알카리 포스파타제 (BSAP)의 평균 변화율을 나타낸다.

도 8은 인간 환자에게 ActRIIb-Fc 단일 투약의 피하 투여후 다양한 시간대에서 골 재흡수의 혈청 생체표식인 C-말단 유형 1 콜라겐 텔로펩티드 (CTX)의 평균 변화율을 나타낸다.

도 9는 인간 환자에게 ActRIIb-Fc 단일 투약의 피하 투여후 다양한 시간대에서 혈청 난포-자극 호르몬 (FSH)의 평균 변화율을 나타낸다.

도 10은 3 mg/kg ActRIIb-Fc의 단일 피하 투여에 의해 투약된 대표적인 인간 환자에서 대퇴부 단편의 자기공명 영상 (MRI) 스캔을 나타낸다. 상부 패널은 대퇴의 MRI 평가를 나타내고, 중간 패널은 9일 시점에서 기저수준을 나타내고, 아래 패널은 투약후 29일 시점의 결과를 나타낸다. 근육은 회색, 피하 지방은 분홍, 그리고 근육내 지방은 녹색으로 나타낸다.

도 11은 플라시보와 비교하였을 때, 1 mg/kg ActRIIb-Fc 또는 3 mg/kg ActRIIb-Fc의 단일 피하 투여로 투약된 인간 개체의 경우 29일 시점에서 대퇴 근육량에서 기준으로부터 평균 변화율을 나타낸다.

도 12는 서열 번호: 1로부터 ActRIIb의 신호 서열과 세포외 도메인(서열 번호: 1의 잔기 1-134)과 서열 번호: 2로 나타낸 ActRIIb의 세포외 도메인의 배열을 나타낸다. 나타낸 것과 같이, 신호 서열은 길이가 19개인 아미노산이다. 따라서, 서열 번호: 1에서 위치 X의 아미노산은 서열 번호: 2에서 X-19에 대응하는 위치를 가진다. 설명하자면, 서열 번호: 1에서 위치 30의 아미노산은 서열 번호: 2에서 위치 11의 아미노산이다. 여기에서 설명된 다른 ActRIIb 서열에서도 유사한 상관관계를 결정할 수 있다.

도 13은 인간 ActRIIa 및 ActRIIb의 배열을 나타낸다. 박스로 표시된 잔기들은 ActRIIb 및 ActRIIa 다중 결정 구조의 조성 분석에 근거하여 리간드(가령, 리간드 결합 포켓)에 직접적으로 접촉하는 것으로 보이는 아미노산 잔기를 나타낸다.

도 14는 실시예 5에서 설명된 다수의 상승 투약 연구 동안 다양한 시점(일자)에서 혈청내 ActRIIb-hFc의 약물동태학 프로파일을 나타낸다.

도 15에서 위 축에는 ActRIIb-hFc의 혈청 농도를 나타내고, 아래축에는 난포자극 호르몬(FSH)의 변화율을 나타낸다.

도 16은 DXA로 측정하였을 때 ActRIIb-hFc의 투약을 변화시켜 야기된 전체 체지방량의 변화 비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 개요

TGF-베타 슈퍼패밀리는 다양한 성장 인자들을 포함하는데, 이들은 공통적인 서열 요소들 및 구조적 모티프를 공유한다. 이들 단백질들은 척추동물 및 무척추동물 모두에서 매우 다양한 유형의 세포에 생물학적 영향을 발휘하는 것으로 알려져있다. 슈퍼패밀리 구성원들은 패턴 형성 및 조직 설계에서 배발생동안 중요한 기능을 수행하고, 그리고 지방세포분화(adipogenesis), 근육형성(myogenesis), 연골형성(chondrogenesis), 심장형성(cardiogenesis), 혈액생성(hematopoiesis), 신경발생(neurogenesis), 및 상피세포 분화를 포함하는 다양한 분화 과정에 영향을 줄 수 있다. TGF-베타 패밀리의 구성원의 활성을 조절함으로써, 유기체내에서 유의적인 생리적 변화를 일으키는 것이 가능하다. 예를 들면, Piedmontese 및 Belgian Blue 소 품종은 근육량의 상당한 증가를 야기하는 GDF8 (또는 미오스타틴이라고 부름) 유전자에 기능-상실 돌연변이를 가진다. *Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4*. 더욱이, 인간에서, GDF8의 비활성 대립유전자는 증가된 근육량과 연관이 있으며, 예외적 강도라고 보고한다. *Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8*.

악티빈은 TGF-베타 슈퍼패밀리에 속하는 이량체 폴리펩티드 성장 인자다. 두 개의 밀접하게 관련된 β 소단위의 동종/이종이량체($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, 및 $\beta_A\beta_B$)인 3가지 주요 악티빈 형(A, B 및 AB)이다. 인간 계놈은 또한 악티빈 C 와 악티빈 E를 인코딩하는데, 이들은 주로 간에서 발현된다. TGF-베타 슈퍼패밀리에서, 악티빈은 난소 및 태반 세포내에서 호르몬 생산을 자극하고, 신경 세포 생존을 지원하고, 세포 유형에 따라 양성적으로 또는 음성적으로 세포-주기 진행에 영향을 주며, 그리고 최소한 양서류 배에서 중배엽 분화를 유도할 수 있는 독특하고, 다중 기능 인자다(*DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963*). 더욱이, 자극을 받은 인간 단핵구 백혈구 세포들에서 단리된 적혈구 분화 인자 (EDF)는 악티빈 A와 동일한 것으로 밝혀졌다(*Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434*). 악티빈 A는 골수에서 적혈구 생성에 있어서 자연적인, 양성 조절물질로 작용한다고 제시되었다. 몇몇 조직에서, 악티빈 신호생성은 이와 관련된 이종이량체, 인히빈(inhibin)에 의해 길항된다. 예를 들면, 뇌하수체로부터 난포-자극 호르몬 (FSH)이 방출되는 동안, 악티빈은 FSH 분비 및 합성을 촉진시키지만, 인히빈은 FSH 분비 및 합성을 억제한다. 악티빈 생체활성을 조절할 수 있는 및/또는 악티빈에 결합할 수 있는 기타 단백질은 폴리스타틴 (FS), 폴리스타틴-관련된 단백질 (FSRP), 그리고 α_2 -마크로글로블린을 포함한다.

TGF- β 패밀리 신호들은 타입 I 및 타입 II 세린/ 트레오닌 키나제 수용체들의 이종 복합체에 의해 중재되고,

리간드 자극 시에 하류 Smad 단백질을 포스포릴화시키고, 활성화시킨다(Massagu, 2000, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178). 이들 타입 I 및 타입 II 수용체들은 시스테인이 많은 부분을 가진 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 특이성을 가진 세포질 도메인으로 구성된, 막통과 단백질이다. 타입 I 수용체들은 신호생성에 필수적이며; 그리고 타입 II 수용체들은 리간드의 결합과 타입 I 수용체들의 발현에 요구된다. 타입 I 및 II 약티빈 수용체들은 리간드 결합 후에 안정적인 복합체를 형성하여, 타입 II 수용체들에 의한 타입 I 수용체들의 포스포릴화를 초래한다.

[0030] 2가지 관련된 유형 II 수용체, ActRIIa 및 ActRIIb는 약티빈에 대한 유형 II 수용체로 확인되었다(Mathews and Vale, 1991, *Cell* 65:973-982; Attisano et al., 1992, *Cell* 68: 97-108). 게다가 약티빈, ActRIIa 및 ActRIIb는 BMP7, Nodal, GDF8, 그리고 GDF11를 포함하는 몇 가지 다른 TGF-β 패밀리를 포함하는 단백질들과 생화학적으로 상호작용할 수 있다(Yamashita et al., 1995, *J. Cell Biol.* 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, *Mol. Cell* 7: 949-957; Oh et al., 2002, *Genes Dev.* 16:2749-54). ALK4는 약티빈, 특히 약티빈 A의 주요 유형 I 수용체이며, 그리고 ALK-7은 약티빈, 특히 약티빈 B의 수용체로 작용할 수 있다.

[0031] 여기에서 설명된 것과 같이, ActRIIb 폴리펩티드 (ActRIIb[20-134]-Fc)는 생체내에서 뼈 성장을 촉진시키고, 골 밀도를 증가시키는데 유효하며, 근육량 또한 증가시킨다. 임의의 특정 기전에 결부되는 것을 원하지는 않지만, 뼈에서 ActRIIb의 효과는 약티빈 길항 효과에 의해 주로 원인이 되는 것으로 예상된다. 기전과 무관하게, ActRIIb 길항제는 인간에서 동화/항-재흡수 복합 효과와 일치되는 방식으로 골 밀도를 증가시키고, 골 생체표식에 영향을 주는 것이 분명하다. 뼈는 성장 또는 수축하고, 그리고 뼈를 만들고, 광화작용을 자극하는 인자(주로 골아세포)와 뼈를 파괴하고, 탈광화시키는 인자(주로 파골세포)들의 균형에 따라 밀도가 증가 또는 감소되는 동적인 조직이라는 것이다. 뼈 성장 및 광화작용은 생산 인자에 의해 증가되거나, 파괴 인자에 의해 파괴되거나, 또는 이들 모두에 의해 증가 또는 감소될 수 있다. “뼈 성장을 촉진시키고” 그리고 “뼈 광화작용을 증가시키는” 용어는 뼈에서 관찰할 수 있는 물리적 변화를 지칭하며, 뼈에서 일어나는 변화 이전에 중립적인 의도이다.

[0032] 골 성장을 촉진하는 것에 추가하여, 본 내용은 ActRIIb 또는 ActRIIb 리간드의 비정상적인 활성화와 관련된 질환 또는 몸의 상태를 치료 또는 예방하는데 ActRIIb를 이용하는 것을 고려한다. 예를 들면, ActRIIb 길항제들은 인간 또는 동물의 장애들 또는 몸의 상태를 치료하는데 이용할 수 있다. 예시적인 이러한 장애들 또는 몸의 상태는 대사 장애들 예컨대 유형 2 당뇨병, 내당능 장애, 대사 증후군 (예를 들면, 증후군 X), 그리고 외상에 의해 유도된 인슐린 저항성 (예를 들면, 화상 또는 질소 불균형); 지방 조직 장애들 (예를 들면, 비만); 근육 및 신경근 장애들 예컨대, 근위축증 (근위축증 포함); 근위축성 측색 경화증 (ALS); 근육 위축증; 장기 위축; 박약; 수근관 증후군; 울혈성 폐쇄성 폐질환; 그리고 근육감소증, 약액질 및 기타 근육 소모 증후군을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 다른 예들은 골다공증, 특히 노인 및/또는 폐경기 여성에서 골다공증; 글루코코르티코이드-유도된 골다공증; 골감소증; 골관절염; 그리고 골다공증-관련된 골절을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 여전히 추가 예로는 만성 글루코코르티코이드 요법으로 인한 낮은 골량, 조기 성샘 부진, 안드로겐 억제, 비타민 D 결핍, 2차적인 부갑상선항진증, 영양 결핍, 그리고 신경성 식욕부진을 포함한다.

[0033] 본 명세서는 인간에서 뼈 성장을 촉진시키고, 골밀도를 증가시키고, 또한 근육량을 증가시키기 위하여 ActRIIb 폴리펩티드와 기타 ActRIIb 길항제를 이용하는 방법을 제공한다. ActRIIb 길항제는 예를 들면, 리간드-결합 ActRIIb 폴리펩티드들 (예를 들면, ActRIIb-Fc), ActRIIb에 결합하여, 예컨대 약티빈 또는 미오스타틴과 같은 하나 이상의 리간드들의 결합을 방해하는 항체들, ActRIIb 결합에 대해 선택된 비-항체 단백질들(예를 들면, 이러한 단백질의 예시 및 이를 기획하고 선별하는 방법들에 대한 예, WO/2002/088171, WO/2006/055689, 및 WO/2002/032925), Fc 도메인에 흔히 부착된, ActRIIb 결합에 대해 선택된 랜덤화된 펩티드를 포함한다. ActRIIb 결합 활성을 가지는 두 가지 상이한 단백질(또는 기타 모이어티), 특히, 타입 I (가령, 가용성 타입 I 약티빈 수용체) 및 타입 II (가령, 가용성 타입 II 약티빈 수용체) 결합 부위를 차단하는 두 가지 상이한 단백질은 서로 연결되어, 이가가능성 결합 분자를 만들 수 있다. ActRIIb 신호생성 축을 억제하는 핵산 아파타머, 소분자들 및 기타 물질은 ActRIIb 길항제에 포함된다.

[0034] 명세서에서 이용된 용어는 당업계, 그리고 본 내용 및 명세서내에서 이들 용어가 이용된 단락내에서 공지되어 있는 통상의 의미를 가진다. 특정 용어는 명세서 곳곳에서 논의되어 당업자에게 본 발명의 조성물 및 방법을 설명함에 있어서 추가 지침을 제공하며, 이들을 어떻게 만들고 이용하는지를 설명한다. 임의의 용어의 사용 범위 또는 의미는 용어가 이용된 특정 단락으로부터 자명할 것이다.

- [0035] “약” 및 “대략”은 임의의 측정 성질 또는 정밀성에 있어서 제공된 양의 일반적으로 수용되는 오차 범위를 의미한다. 일반적으로 오차 범위의 예는 주어진 값의 또는 값 범위의 20 (%), 바람직하게는 10% 이내, 그리고 더 바람직하게는 5% 이내가 된다.
- [0036] 대안으로, 그리고 특정 생물학적 시스템내에서, 용어 “약” 및 “대략”은 주어진 값의 크기 범위의 10배, 바람직하게는 5-배 그리고 더 바람직하게는 2배가 된다. 여기에서 제공되는 수치량은 다른 언급이 없는 한, 근사값이며, 용어 “약” 또는 “대략”은 명시적으로 언급되지 않을 경우 추론될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 방법은 하나 이상의 돌연변이 (서열 변이체)에 대한 야생형 서열을 포함하는 서열을 비교하는 단계들을 포함할 수 있다. 이러한 비교는 일반적으로 폴리머 서열의 배열을 포함하는데, 가령, 당업계에 공지되어 있는 서열 정렬 프로그램 및/또는 알고리즘(예를 들면, BLAST, FASTA 및 MEGALIGN, 및 그 외 몇가지)을 포함한다. 당업자는 이러한 정렬에서 돌연변이는 잔기 삽입 또는 결손을 포함하는 이러한 정렬에서, 서열 정렬은 삽입된 또는 결손된 잔기를 포함하지 않는 폴리머 서열에 “갭” (일반적으로 - 또는 “A”로 나타냄)을 도입시킨다는 것을 인지할 수 있다.
- [0038] 모든 문법적 형태와 철자의 변이성에서 “상동성(Homologous)”은 동일한 유기체 종의 슈퍼패밀리의 단백질을 포함한 “공통의 진화 기원”을 보유한 단백질과 상이한 유기체 종의 상동성 단백질의 두 단백질 사이에 상관 관계를 지칭한다. 이러한 단백질 (및 이를 인코딩하는 핵산)은 서열 상동성을 가지는데, 동일성 비율 또는 특정 잔기 또는 모티프의 존재 및 보존된 위치들에 의해 서열 유사성이 반영된다.
- [0039] 모든 문법적 형태에서 “서열 유사성(similarity)”은 공통의 진화 지원을 공유하는 또는 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 동일성 또는 일치 정도를 지칭한다.
- [0040] 그러나, 공통의 용도 및 본 출원에서, “매우”와 같은 부사에 의해 수식될 때, “상동성”은 서열 유사성을 지칭하며, 공통의 서열 기원과 관련되거나 관련되지 않을 수 있다.

[0042] **2.ActRIIb 폴리펩티드들**

- [0043] 특정 측면에서, 본 발명은 ActRIIb 폴리펩티드에 관한 것이다. 여기에서 이용된 것과 같이, “ActRIIb”은 임의의 종 및 돌연변이 또는 기타 변형에 의해 ActRIIb로부터 유도된 변이체의 약티빈 수용체 유형 IIb(ActRIIb) 단백질들의 패밀리 종을 지칭한다. 여기에서 ActRIIb로 언급하는 것은 현재 확인된 임의의 형태를 말하는 것으로 이해한다. ActRIIb 패밀리의 구성원들은 일반적으로, 시스테인이 많은 부분을 가진 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 키나제 활성을 가진 세포질 도메인을 포함하는 막통과 단백질이다.
- [0044] “ActRIIb 폴리펩티드”는 ActRIIb 패밀리 구성원의 임의의 자연 발생적 폴리펩티드와 유용한 활성을 보유하는 임의의 이의 변이체(돌연변이, 단편들, 융합, 및 펩티드모방체 형태를 포함)를 포함하는 폴리펩티드들을 포함한다. 예를 들면, WO/2006/012627 참고, 이의 ActRIIb 폴리펩티드들은 여기 참고자료에 포함된다. 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드는 ActRIIb 폴리펩티드의 서열에 최소한 약 80% 동일성, 바람직하게는 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 가지는 임의의 공지의 ActRIIb 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 ActRIIb 폴리펩티드는 ActRIIb 단백질에 결합하고, 이의 기능을 억제할 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드는 생체내에서 적혈구 세포 생성을 촉진시키는 활성으로 선택될 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드의 예는 인간 ActRIIb 전구 폴리펩티드 (서열 번호: 1) 및 가용성 인간 ActRIIb 폴리펩티드 (가령, 서열 번호: 2, 3, 13, 17 또는 20)를 포함한다.

constant)로 악티빈 AA에 결합할 것이다. ActRIIb 단백질의 세포외 도메인은 악티빈에 결합하고, 일반적으로 생리학적 조건에서 가용성이며, 따라서, 가용성, 악티빈-결합 ActRIIb 폴리펩티드라고 칭할 수 있다. 가용성, BMP-결합 ActRIIb 폴리펩티드의 예는 서열 번호: 2, 3, 13, 17 또는 20에서 설명된 가용성 폴리펩티드를 포함한다. 서열 번호:13은 ActRIIb(20-134)-hFc라고 하며, 실시예들에서 추가 설명된다. 또다른 가용성 ActRIIb 폴리펩티드의 다른 예는 ActRIIb 단백질의 세포외 도메인에 추가하여, 신호 서열, 예를 들면, 꿀벌 멜리틴 리더(서열 번호: 14), 조직 플라스미노겐 활성화물질(TPA) 리더(서열 번호: 15) 또는 고유 ActRIIb 리더(서열 번호: 16)를 포함한다. 서열 번호: 17에 설명된 ActRIIb-hFc 폴리펩티드는 TPA 리더를 이용한다.

[0057] 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIb 변이체 폴리펩티드들 (예를 들면, 가용성 ActRIIb 폴리펩티드들)에 관계한다. 선택적으로, 단편들, 기능적 변이체들, 그리고 변형된 형태들은 이들의 대응하는 야생형 ActRIIb 폴리펩티드들과 유사한 또는 동일한 생물학적 활성을 가진다. 예를 들면, 본 발명의 ActRIIb 변이체는 ActRIIb 리간드 (예를 들면, 악티빈 A, 악티빈 AB, 악티빈 B, Nodal, GDF8, GDF11 또는 BMP7)에 결합하고, 이의 기능을 억제할 수 있다. 선택적으로, ActRIIb 폴리펩티드는 조직들, 예컨대 뼈, 연골, 근육 또는 지방의 성장을 조절한다. 예시적인 ActRIIb 폴리펩티드들은 인간 ActRIIb 전구 폴리펩티드 (서열 번호: 1)와 가용성 인간 ActRIIb 폴리펩티드들 (예를 들면, 서열 번호: 2, 3, 13, 17, 또는 20)을 포함한다.

[0058] 다른 언급이 없는 한, 여기에서 논의된 ActRIIb 폴리펩티드에서 아미노산 위치는 전구 ActRIIb 폴리펩티드(즉, 서열 번호: 1)를 기준으로 한다. 또다른 ActRIIb 폴리펩티드에서 대응하는 위치는 여기에서 제공하는 정보에 근거하여 바로 확인될 수 있다는 것을 인지해야 한다. 예를 들면, 전구 ActRIIb 폴리펩티드는 서열 번호: 2에 나타난 것과 같이 ActRIIb의 가용성 세포외 부분에 포함되지 않는 19개 아미노산 리더 서열을 포함한다. 따라서, 서열 번호: 1에서 위치 X의 잔기는 서열 번호: 2에서 잔기 X-19에 대응한다. 예를 들면, 서열 번호: 1의 잔기 30은 서열 번호: 2에서 잔기 11에 대응한다 (도 12 참고). 여기에서 설명된 기타 ActRIIb 서열들에 대해서도 유사한 상관관계를 결정할 수 있다.

[0059] 본 내용은 ActRIIb의 기능적으로 활성 부분들과 변이체들을 확인한다. 출원인들은 *Hilden et al. (Blood. 1994 Apr 15;83(8):2163-70)*에서 공개된 서열을 가진 Fc 융합 단백질(서열 번호: 1의 아미노산 64(A64)에 대응하는 위치에 알라닌을 가지는)은 악티빈 및 GDF-11에 대해 상대적으로 낮은 친화력을 보유한다. 대조적으로, 위치 64 (R64)에 아르기닌을 보유하는 동일한 Fc 융합 단백질은 낮은 나노몰(nanomolar)에서 높은 피코몰(picomolar) 범위에서 악티빈 및 GDF-11에 대해 높은 친화력을 보유한다. 따라서, R64를 가진 서열은 본 명세서에서 인간 ActRIIb에 대한 야생형 기준 서열로 이용된다.

[0060] *Attisano et al. (Cell. 1992 Jan 10;68(1):97-108)*는 ActRIIb의 세포외 도메인의 C-말단에 프롤린 노트(knot)를 삭제하면 악티빈에 대해 수용체의 친화력이 감소되었다는 것을 보여주었다. 서열 번호: 1의 아미노산 20-119를 보유하는 ActRIIb-Fc 융합 단백질, "ActRIIb(20-119)-Fc"는 ActRIIb(20-134)-Fc와 비교하여 GDF-11 및 악티빈에 대해 감소된 결합을 가지는데, 이 단백질은 프롤린 노트 부분과 완벽한 막근접(juxtamembrane) 도메인 (미국 공개 번호 2009/0005308)을 포함한다. 그러나, ActRIIb(20-129)-Fc 단백질은 비록 프롤린 노트 부분이 파괴되었지만, 야생형과 비교하여 유사한 그러나 다소 감소된 활성을 유지하지한다. 따라서, 아미노산 134, 133, 132, 131, 130 및 129에서 중단된 ActRIIb 세포외 도메인은 모두 활성이 있는 것으로 예측되지만, 134 또는 133에서 중단된 구조체는 대부분 활성이 있을 수 있다. 유사하게, 잔기 129-134중 임의에 돌연변이는 리간드 결합 친화력을 큰 차이로 변경시키는 것으로 예상되지 않는다. 이를 뒷받침하기 위하여, P129 및 P130의 돌연변이는 실질적으로 리간드 결합을 감소시키지 않는다. 따라서, ActRIIb-Fc 융합 단백질은 아미노산 109 (최종 시스테인)와 같이 일찍 끝날 수도 있지만, 그러나, 109 및 119에서 또는 이들 사이에서 끝나는 형태는 리간드 결합이 감소된 것으로 예상된다. 아미노산 119는 잘 보존되지 않았고, 바로 변경되거나 또는 절두되었다. 아미노산 128에서 또는 그 이후에서 끝나는 형태는 리간드 결합 활성을 유지한다. 119 및 127에서 또는 이 사이에서 끝나는 형태는 중간 수준의 결합 능력을 보유할 것이다. ActRIIb(25-118)-hFc는 악티빈 및 기타 리간드들을 억제하고, 근육량을 촉진시키는데 유효하다고 보고되었으며, 따라서, 이러한 절두된 ActRIIb-hFc 단백질들은 여기에서 설명된 방법들에 이용될 수 있다(*Zhou et al., 2010, Cell 142:531-543* 참고). 임상적 또는 실험 세팅에 따라 이들 형태중 임의의 것들을 사용하는 것이 바람직하다.

[0061] ActRIIb의 N-말단에서, 아미노산 29에서 또는 이 앞에서 시작하는 단백질은 리간드 결합 활성을 유지할 것으로 예상된다. 아미노산 29는 초기 시스테인을 나타낸다. 위치 24에서 알라닌이 아스파라진으로 돌연변이는 리간드 결합에 실질적인 영향없이 N-연결된 당화 서열을 도입시킨다. 이는 신호 절단 펩티드와 시스테인 교차-연결된 부분 사이 부분, 아미노산 20-29에 대응하는 부분내 돌연변이는 잘 받아들여진다는 것을 확인한다. 특히, 위치 20, 21, 22, 23 및 24에서 시작하는 구조체들은 활성을 유지할 것이고, 위치 25, 26, 27, 28 및 29에서 시작하

는 구조체들 또한 활성을 유지하는 것으로 기대된다. 22, 23, 24 또는 25에서 시작하는 구조체들은 최대 활성을 가질 것이다(미국 공개 번호 2009/0005308 참고).

[0062] 이와 함께, ActRIIb의 활성 부분은 서열 번호: 1의 아미노산 29-109를 포함하며, 구조체는 예를 들면, 아미노산 20-29에 대응하는 잔기에서 시작하고, 아미노산 109-134에 대응하는 위치에서 끝난다. 다른 예들은 위치 20-29 또는 21-29에서 시작하고 위치 118-134, 118-133, 119-134, 119-133 또는 129-134, 129-133에서 끝나는 구조체들을 포함한다. 다른 예들은 위치 20-24 (또는 21-24, 또는 22-25)에서 시작하고, 위치 109-134 (또는 109-133), 118-134 (또는 118-133), 119-134 (또는 119-133) 또는 129-134 (또는 129-133)에서 끝나는 구조체들을 포함한다. 이 범위내의 변이체들 또한 고려되는데, 특히 서열 번호: 2의 대응 부분에 최소한 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 가지는 것들이 고려된다.

[0063] ActRIIb의 구조 기능 분석의 방대한 분석은 미국 공개 번호 2009/0005308에서 제공하며, 이 분석은 여기에 참고 자료로 통합된다. 결합 포켓내 리간드들과 접촉할 것 같은 ActRIIb 잔기들은 서열 번호: 1의 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 F101로 확인되었다. 이들 위치에서, R40A, K55A, F82A와 위치 L79에서 돌연변이와 같이 내성이 있었지만, 보존 돌연변이는 내성이 있을 것으로 기대된다. R40는 발톱개구리(*Xenopus*)에서 K이고, 이는 이 위치에서 염기성 아미노산이 내성이 있을 것을 나타낸다. Q53는 소의 ActRIIb에서 R이며, 발톱개구리 ActRIIb에서 K이며, 따라서 R, K, Q, N 및 H를 포함하는 아미노산은 이 위치에서 내성이 있을 것이다. 이들 잔기 범위 밖에서, 이러한 변경이 전체적으로 단백질의 구조를 파괴하지 않는다면, 변형은 상대적으로 내성이 있을 것으로 예상된다. 단백질 구조가 파괴될 때, 단백질이 배양 배지에서 잘 발현되지 않는 경향이 있거나 또는 분해되기 때문에 명백하다. 따라서, ActRIIb 변이체 활성 단백질의 일반적인 형태는 아미노산 29-109를 포함하지만, 선택적으로 20-24 또는 22-25 범위의 위치에서 시작하며, 129-134의 위치에서 끝나며, 리간드 결합 포켓 안에 1개, 2개, 5개, 10개 또는 15개 보존 아미노산 변화를 포함하고, 그리고 리간드 결합 포켓 안에서 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에서 0, 하나 이상의 비-보존 변경을 포함하는 것이다. 이러한 단백질은 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 80%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 보유할 수 있다. 다양성이 특히 잘 용인되는 결합 포켓 밖의 부위는 세포외 도메인 (상기에서 나타난 것과 같이)의 아미노 및 카르복시 말단, 그리고 서열 번호: 1의 위치 42-46과 65-73을 포함한다. 위치 65 (N65A)에서 아스파라진이 알라닌으로 변경은 실질적으로 A64 배경에서 리간드 결합을 개선시키고, 따라서 R64 배경에서 리간드 결합에 결정적인 효과를 가지지 않는 것으로 예상된다. 이러한 변화는 아마도 A64 배경내 N65에서 당화를 제거할 것이고, 따라서 이 부분안의 유의적인 변화는 잘 받아들여진다는 것을 설명한다. R64A 변화는 잘 용인되지 않지만, R64K는 잘 용인되고, 따라서 또다른 염기성 잔기, 예컨대 H는 위치 64에서 용인될 수 있다.

[0064] ActRIIb는 거의 모든 척추동물에서 잘 보존되며, 세포외 도메인의 큰 부분이 완벽하게 보존된다. ActRIIb에 결합하는 많은 리간드들 또한 상당히 보존된다. 따라서, 다양한 척추동물 유기체로부터 ActRIIb 서열을 비교하면, 변경될 수 있는 잔기에 대해 간파할 수 있다. 따라서, 인간의 ActRIIb 활성 변이체는 또다른 척추동물의 ActRIIb 서열로부터 대응하는 위치에서 하나 이상의 아미노산을 포함하거나, 인간 또는 다른 척추동물 서열에 있는 것과 유사한 잔기를 포함할 수 있다. 다음의 실시예는 ActRIIb 활성 변이체를 정의하는 이 방법을 설명한다. 인간 ActRIIb의 L46은 발톱개구리(*Xenopus*) ActRIIb에서 발린이며, 따라서 이 위치는 변경될 수 있고, 그리고 선택적으로 또다른 소수성 잔기 예컨대 V, I 또는 F, 또는 비-극성 잔기 예컨대, A로 변경될 수 있다. 인간 ActRIIb의 E52는 발톱개구리(*Xenopus*) ActRIIb에서 K이고, 이는 이 부위가 광범위한 다양한 변화, 예컨대 E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y 그리고 아마도 A와 같은 극성 잔기들을 포함하는 변화에 관대할 수 있다. 인간 ActRIIb의 T93은 발톱개구리(*Xenopus*) ActRIIb에서 K이며, 이 위치에서 광범위한 구조적 변이를 용인하며, 예컨대 S, K, R, E, D, H, G, P, G 및 Y와 같은 극성 잔기를 선호한다는 것을 나타낸다. 인간 ActRIIb의 F108은 발톱개구리(*Xenopus*) ActRIIb에서 Y이며, 따라서 Y 또는 다른 소수성 기, 예컨대 I, V 또는 L은 용인되어야만 한다. 인간 ActRIIb의 E111은 발톱개구리(*Xenopus*) ActRIIb에서 K이며, 이 위치에서 D, R, K 및 H, 뿐만 아니라 Q 및 N을 포함하는 하전을 띤 잔기들이 용인될 것이라는 것을 나타낸다. 인간 ActRIIb의 R112는 발톱개구리(*Xenopus*) ActRIIb에서 K이며, 이는 이 위치에서 R 및 H를 포함하는 염기성 잔기가 용인된다는 것을 나타낸다. 인간 ActRIIb의 위치 119의 A는 상대적으로 잘 보존되지 않고, 설치류의 ActRIIb에서는 P 그리고 발톱개구리(*Xenopus*) ActRIIb에서는 V로 나타나고, 따라서 이 위치에서 기본적으로 임의의 아미노산은 용인되어야만 한다.

[0065] 추가 N-연결된 당화 부위(N-X-S/T)를 추가하면 ActRIIb(R64)-Fc 형태(미국 공개 번호 2009/0005308 참고)와 비교하여, ActRIIb-Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 증가시킨다. 위치 24 (A24N 구조체)에서 아스파라진을 도입 시킴으로써, 더 긴 반감기를 부여한 NXT 서열이 만들어진다. 기타 NX(T/S) 서열은 서열 번호: 1의 42-44 (NQS)

및 65-67 (NSS)에서 볼 수 있지만, 후자의 경우는 위치 64에서 R로 효과적으로 당화되지 않을 수 있다. N-X-S/T 서열들은 도 13에서 정의된 리간드 결합 포켓 바깥에 있는 위치에 일반적으로 도입될 수 있다. 비-내생성 N-X-S/T 서열을 도입하기 위한 특별히 적합한 부위는 서열 번호: 1의 아미노산 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 또는 129-134를 포함한다. N-X-S/T 서열은 또한 ActRIIb 서열과 Fc 또는 기타 융합 성분 사이에 있는 링커로 도입될 수 있다. 이러한 부위는 기존 S 또는 T에 대해 정확한 위치에 N을 도입하거나, 또는 기존 N에 상응하는 위치에 S 또는 T를 도입시킴으로써 최소한의 노력으로 도입시킬 수 있다. 따라서, N-연결된 당화 부위를 만들 수 있는 바람직한 변경은 다음과 같다: A24N, R64N, S67N (아마도 N65A 변경과 복합된), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S 그리고 R112T. 당화될 것으로 예측되는 임의의 S는 당화에 의해 제공되는 보호로 인하여, 면역원성 부위를 만들지 않고 T로 변경될 수 있다. 유사하게, 당화될 것으로 예측되는 임의의 T는 S로 변경될 수 있다. 따라서 변경 S67T 및 S44T가 고려된다. 유사하게, A24N 변이체에서, S26T 변경도 이용될 수 있다. 따라서, ActRIIb 변이체는 하나 이상의 추가적인 비-내생성 N-연결된 당화 콘센스 서열을 포함할 수 있다.

[0066] 위치 L79가 변경되어 악티빈 - 미오스타틴 (GDF-11)의 변경된 결합 성질을 부여할 수 있다. L79A 또는 L79P는 악티빈 결합보다 더 큰 수준으로 GDF-11 결합을 감소시킨다. L79E 또는 L79D는 GDF-11 결합을 유지시킨다. 눈에 띄는 것은, L79E 및 L79D 변이체들은 상당히 감소된 악티빈 결합을 가진다. 생체내 실험들에서, 이들 비-악티빈 수용체들은 근육량을 증가시키는 유의적인 능력은 유지하지만 다른 조직들에서는 감소된 효과를 나타낸다. 이들 데이터는 악티빈에서 감소된 효과를 가지는 폴리펩티드들을 수득하는 것이 바람직하며 실현가능하다는 것을 설명한다.

[0067] 설명된 변이는 다양한 방식으로 조합될 수 있다. 추가적으로, 여기에서 설명된 돌연변이생성 프로그램의 결과에서 보존되는 것은 대개 유익한 ActRIIb 내 아미노산 위치들이 있다는 것을 나타낸다. 이들 위치는 위치 64 (염기성 아미노산), 위치 80 (산성 또는 소수성 아미노산), 위치 78 (소수성, 그리고 특히 트립토판), 위치 37 (산성, 그리고 특히 아스파르트산 또는 글루탐산), 위치 56 (염기성 아미노산), 위치 60 (소수성 아미노산, 특히 페닐알라닌 또는 티로신)을 포함한다. 따라서, 여기에서 설명된 각 변이체에서, 본 내용은 보존될 수 있는 아미노산의 골격구조를 제공한다. 보존되는 것이 바람직할 수 있는 기타 위치들은 다음과 같다: 위치 52 (산성 아미노산), 위치 55 (염기성 아미노산), 위치 81 (산성), 98 (극성 또는 하전된, 특히 E, D, R 또는 K).

[0068] 특정 구체예들에서, ActRIIb 폴리펩티드들의 단리된 단편들은 ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산(예를 들면, 서열 번호: 4 및 5)의 대응 단편으로부터 재조합에 의해 만들어진 폴리펩티드들을 스크리닝하여 수득될 수 있다. 또한, 단편들은 당업계 공지된 기술, 예컨대, 통상적인 Merrifield 고행상 f-Moc 또는 t-Boc 화학을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 단편들은 (재조합에 의해 또는 화학적 합성에 의해) 만들어질 수 있고, 그리고 이러한 펩티드 단편들의 기능, 예를 들면, ActRIIb 단백질 또는 ActRIIb 리간드의 길항제들 (억제제) 또는 항진제(활성물질들)로 기능을 하는 펩티드 단편들을 확인하기 위하여 테스트될 수 있다.

[0069] 특정 구체예들에서, ActRIIb 폴리펩티드들의 기능적 변이체는 서열 번호: 2, 3, 13, 17, 또는 20에서 선택된 아미노산 서열에 최소한 75% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 특정 경우들에서, 이러한 기능적 변이체는 서열 번호: 2, 3, 13, 17, 또는 20에서 선택된 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가진다.

[0070] 특정 구체예들에서, 본 발명은 치료 효과 또는 안정성(예를 들면, 생체외 반감기 및 생체내에서 단백질분해에 대한 저항성)을 강화시키는 것과 같은 목적을 위하여 ActRIIb 폴리펩티드의 구조를 변형시킴으로써, 기능적 변이체를 만드는 것을 고려한다. 변형된 ActRIIb 폴리펩티드들은 예를 들면, 아미노산 치환, 결손 또는 추가에 의해 또한 만들 수 있다. 예를 들면, 루신을 이소루신 또는 발린으로, 아스파르트산을 글루타메이트로, 트레오닌을 세린으로 단리된 치환, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 유사 치환 (예를 들면, 보존 돌연변이)하면 생성된 분자의 생물학적 활성에 주요한 영향을 주지 않을 것으로 기대하는 것은 합당하다. 보존성 대체는 이들의 측쇄와 관련된 아미노산 패밀리내에서 생기는 것들이다. ActRIIb 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화가 기능적 상동체를 야기하는 지는 야생형 ActRIIb 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포내에서 반응을 만드는 변이체 ActRIIb 폴리펩티드의 능력을 평가하거나, 또는 야생형과 유사한 방식으로 하나 이상의 리간드들, 예컨대 악티빈, GDF-11 또는 미오스타틴에 결합하는 능력을 평가함으로써 바로 결정할 수 있다.

[0071] 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIb 폴리펩티드의 세포외 도메인(또한 리간드-결합 도메인으로 칭함)에서 돌연변이를 만드는 것을 고려하며, 이러한 변이체 (또는 돌연변이체) ActRIIb 폴리펩티드는 변경된 리간드-결합 활성(예를 들면, 결합 친화력 또는 결합 특이성)을 가진다. 특정 경우에서, 이러한 변이체 ActRIIb 폴리펩티드

들은 특이적 리간드에 대해 변경된 (상승된 또는 감소된) 결합 친화력을 가진다. 다른 경우들에서, 변이체 ActRIIb 폴리펩티드들은 이들의 리간드에 대해 변경된 결합 특이성을 가진다.

[0072] 예를 들면, 본 내용은 악티빈과 비교하여 GDF8/GDF11에 결합하는 것을 더 선호하는 변이체 ActRIIb 폴리펩티드들을 제공한다. 본 내용은 이러한 선택적 변이체들은 치료 효과를 위하여 근육량의 매우 많은 증가가 필요하고, 어느 정도의 오프-타겟 효과가 수용가능한 심각한 질환들을 치료하는데 다소 덜 바람직할 수 있지만, 오프-타겟 효과를 감소시키기 위하여 이러한 폴리펩티드의 바람직한 상황을 더 확립한다. 예를 들면, ActRIIb 단백질의 아미노산 잔기들, 예컨대 E39, K55, Y60, K74, W78, D80, 및 F101은 리간드-결합 포켓 안에 있고, 이의 리간드들 예컨대 악티빈과 GDF8에 결합을 중재한다. 따라서, 본 발명은 ActRIIb 수용체의 변경된 리간드-결합 도메인 (예를 들면, GDF8-결합 도메인)을 제공하며, 이는 이들 아미노산 잔기들에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 ActRIIb 수용체의 야생형 리간드-결합 도메인과 비교하여 리간드 예컨대 GDF8에 대한 증가된 선택성을 보유할 수 있다. 설명하자면, 이러한 돌연변이들은 악티빈보다는 GDF8에 대해 변경된 리간드-결합 도메인의 선택성을 증가시킨다. 선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 GDF8 결합용 K_d 대 악티빈 결합용 K_d 의 비율은 야생형 리간드-결합 도메인용 비율과 비교하여, 최소한 2, 5, 10, 또는 심지어 100 배 이상으로 더 크다. 선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 GDF8 억제용 IC_{50} 대 악티빈 억제용 IC_{50} 의 비율은 야생형 리간드-결합 도메인과 비교하여 최소한 2, 5, 10, 또는 심지어 100 배 더 크다. 선택적으로, 변경된 리간드-결합 도메인은 악티빈 억제용 IC_{50} 보다 최소한 2, 5, 10, 또는 심지어 100 배 적은 IC_{50} 으로 GDF8을 억제한다.

[0073] 특정 예로써, 변이체 ActRIIb 폴리펩티드가 악티빈에는 결합하지 않고 GDF8에 선호적으로 결합하도록 ActRIIb의 리간드-결합 도메인의 양전하를 띤 아미노산 잔기 Asp (D80)는 상이한 아미노산 잔기로 돌연변이될 수 있다. 바람직하게는, D80 잔기는 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 잔기로 바꾼다: 전하를 띄지 않은 아미노산 잔기, 음성 아미노산 잔기, 그리고 소수성 아미노산 잔기. 추가 특정 실시예로써, 소수성 잔기, L79는 산성 아미노산 아스파르트산 또는 글루타민산으로 변경되어 GDF11 결합은 유지되면서 악티빈 결합은 상당히 감소시킬 수 있다. 당업계 숙련자가 인지할 수 있는 바와 같이, 대부분의 설명된 돌연변이, 변이체들 또는 변형은 핵산 수준에서 만들 수 있거나, 일부 경우, 전사후 변형 또는 화학적 변형에 의해 만들 수 있다. 이러한 기술은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0074] 특정 구체예들에서, 본 발명은 폴리펩티드의 글리코실화를 변경시키기 위하여 ActRIIb 폴리펩티드의 특정 돌연변이를 고려한다. ActRIIb 폴리펩티드에서 예시적인 글리코실화 부위는 서열 번호: 1에 나타난다. 하나 이상의 글리코실화 부위, 예를 들면, O-링크된 또는 N-링크된 글리코실화 부위를 도입 또는 제거하기 위하여 이러한 돌연변이를 선택할 수 있다. 아스파라긴-링크된 글리코실화 인식 부위는 일반적으로 적절한 세포의 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인지되는, 삼펩티드 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 (또는 아스파라긴-X-세린) (여기서 "X"는 임의의 아미노산임)을 포함한다. 야생형 ActRIIb 폴리펩티드 (O-링크된 글리코실화 부위를 위하여)의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기들의 추가 또는 치환시켜 변형을 또한 만들 수 있다. 글리코실화 인식 부위의 제 1 또는 제 3 위치중 하나 또는 둘다에서 다양한 아미노산 치환 또는 결손(및/또는 제 2 위치에서 아미노산 결손)으로 변형된 삼펩티드 서열에서 비-글리코실화를 초래한다. ActRIIb 폴리펩티드상에 탄수화물 모이어티 수를 증가시키는 또 다른 수단은 ActRIIb 폴리펩티드에 글리코시드의 화학적 또는 효소적 커플링 (coupling)이다. 사용된 커플링유형에 따라, 당(sugar)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 자유카르복실 기; (c) 시스테인의 것과 같은 자유 설프히드릴 기; (d) 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린의 것과 같은 자유 하이드록실 기; (e) 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판과 같은 방향족 잔기들; 또는 (f) 글루타민의 아미드 기에 부착될 수 있다. 이러한 방법들은 WO 87/05330 (Sep. 11, 1987 공개됨), 및 *Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306*에서 설명하고 있으며, 전문이 참고문헌에 통합된다. ActRIIb 폴리펩티드상에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 이루어질 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드를 화합물 트리플로오르메탄술폰산, 또는 등가의 화합물에 노출시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 처리로 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락타미노스)을 제외하고, 대부분 또는 모든 슈가는 절단되며, 아미노산 서열은 고유한 상태로 남게 된다. 화학적 탈글리코실화는 *Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52* and by *Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131*에서 추가 설명된다. ActRIIb 폴리펩티드상에서 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 *Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350*에서 설명하는 것과 같이 다양한 엔도-글리코시다제 및 엑소-글리코시다제를 이용하여 이루어질 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드의 서열은 이용되는 발현 시스템의 유형에 따라 적절하게 조정될

수 있는데, 포유류, 효모, 곤충 및 식물 세포는 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴들을 도입시킬 수 있기 때문이다. 일반적으로, 인간에서 사용하기 위한 ActRIIb 단백질은 HEK293 또는 CHO 세포계와 같은 적절한 글리코실화를 제공하는 포유류 세포계에서 발현될 수 있지만, 기타 포유류 발현 세포계, 조작된 글리코실화 효소를 가지는 효모 세포계 및 곤충 세포계도 또한 유용할 것으로 기대한다.

[0075] 본 내용은 또한 돌연변이의 생성, 특히 ActRIIb 폴리펩티드의 복합 돌연변이 세트, 그리고 절두 돌연변이 방법을 추가 고려하고; 복합 돌연변이 풀(pool)은 기능적 변이체 서열을 확인하는데 특히 유용하다. 이러한 복합 라이브러리의 스크리닝 목적은 예컨대 변경된 약물동태학, 또는 변경된 리간드 결합과 같은 변경된 성질을 보유한 ActRIIb 폴리펩티드를 만들기 위함일 수도 있다. 다양한 스크리닝 방법은 하기에서 제공하며, 그리고 이러한 분석들을 이용하여 변이체를 평가할 수 있다. 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드 변이체는 ActRIIb 폴리펩티드에 ActRIIb 리간드의 결합을 방해하기 위하여 ActRIIb 폴리펩티드에 결합하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0076] ActRIIb 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 세포-기반의 또는 생체 검사에서 또한 테스트할 수 있다. 예를 들면, 골아세포 또는 이의 전구에서 뼈 생산에 관련된 유전자의 발현에서 ActRIIb 폴리펩티드 변이체의 효과를 평가할 수 있다. 필요하다면, 이 평가는 하나 이상의 재조합 ActRIIb 리간드 단백질 (가령, BMP7) 존재하에 실행할 수 있고, 그리고 ActRIIb 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 그리고 임의의 ActRIIb 리간드를 만들기 위하여 세포에 형질감염시킬 수 있다. 마찬가지로, ActRIIb 폴리펩티드를 마우스 또는 기타 동물에 투여할 수 있고, 하나 이상의 뼈 성질들, 가령, 밀도 또는 체적을 평가할 수 있다. 뼈 골절에 대한 치유률도 평가할 수 있다. 유사하게, ActRIIb 폴리펩티드 또는 이의 변이체들의 활성은 근육 세포들, 지방세포들 그리고 이들 세포의 성장에 임의의 영향을 주는 신경 세포에서 하기에서 설명하는 분석으로 테스트할 수 있다. 이러한 분석은 잘 공지되어 있고, 당업계에서는 일상적인 것이다. SMAD-반응성 리포터 유전자는 하류 신호생성에 대한 효과를 모니터링하기 위하여 이러한 세포계에 이용될 수 있다.

[0077] 복합적으로 유도된 변이체는 자연 발생적 ActRIIb 폴리펩티드에 대해 선택적 강도를 가지도록 만들 수 있다. 이러한 변이체들 단백질은 재조합 DNA 수조에서 발현될 때 유전자 치료 프로토콜에 이용될 수 있다. 마찬가지로, 대응하는 야생형 ActRIIb 폴리펩티드와는 상당히 다른 세포내 반감기를 가지는 변이체를 돌연변이에 의해 만들 수 있다. 예를 들면, 변경된 단백질은 단백질 분해 또는 기타 세포 공정에 더 안정적인 또는 덜 안정적일도록 하여, 고유의 ActRIIb 폴리펩티드를 파괴 또는 그렇지 않으면 비활성화를 초래한다. 이러한 변이체, 및 이를 인코딩하는 유전자들을 이용하여 ActRIIb 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 ActRIIb 폴리펩티드 수준을 변경시킬 수 있다. 예를 들면, 짧은 반감기는 더 일과적인 생물학적 효과를 야기할 수 있고, 그리고 유도성 발현 시스템의 일부는 세포내에서 재조합 ActRIIb 폴리펩티드 수준을 더 엄격하게 조절하도록 허용할 수 있다.

[0078] 특정 구체예들에서, 본 발명의 ActRIIb 폴리펩티드는 ActRIIb 폴리펩티드에 원래 존재하는 임의의 것에 추가하여, 해독후 변형을 더 포함할 수 있다. 이러한 변형은 아세틸화, 카르복실화, 글리코실화, 포스포틸화, 지질화, 그리고 아실화를 포함하나 이에 한정시키지 않는다. 그 결과, 변형된 ActRIIb 폴리펩티드는 비-아미노산 요소들, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 폴리사카라이드 또는 모노사카라이드, 및 포스페이트를 포함할 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드의 기능에서 이러한 비-아미노산 요소들의 효과는 기타 ActRIIb 폴리펩티드 변이체에 대해 여기에서 설명하는 것과 같이 테스트될 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드가 ActRIIb 폴리펩티드의 고유 형태를 절단함으로써 세포에서 만들어질 때, 해독후 프로세싱 또한 정확한 폴딩 및/또는 단백질의 기능에 중요할 것이다. 상이한 세포들(가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)은 이러한 해독후 활성에 대한 특정 세포 조직 및 특정 기전을 가지며, ActRIIb 폴리펩티드의 정확한 변형 및 프로세싱을 담보하기 위하여 선택할 수 있다.

[0079] 특정 측면에서, ActRIIb 폴리펩티드의 기능적 변이체 또는 변형된 형태는 ActRIIb 폴리펩티드의 최소한 일부분 및 하나 이상의 융합 도메인을 가지는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 융합 도메인의 잘 알려진 예는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S 전이효소 (GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로블린 중쇄 불변 부분 (Fc), 말토즈 결합 단백질 (MBP), 또는 인간 혈청 알부민을 포함한다. 융합 도메인은 원하는 성질을 부여하기 위하여 선택될 수 있다. 예를 들면, 일부 융합 도메인은 친화력 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 분리에 특히 유용하다. 친화력 정제를 목적으로, 친화력 크로마토그래피용 관련 매트릭스, 가령 글루타티온-, 아밀라제-, 및 니켈 또는 코발트-콘쥬게이트된 수지를 이용한다. 이러한 많은 매트릭스는 “키트” 형태로 이용 가능하며, 가령 Pharmacia GST 정제 시스템 및 (HIS₆) 융합 파트너에 유용한 QIAexpress™ 시스템 (Qiagen)이 있

다. 또다른 예로서, ActRIIb 폴리펩티드의 용이한 탐지를 위하여 융합 도메인을 선택할 수 있다. 이러한 탐지 도메인의 예는 다양한 형광 단백질 (가령, GFP)과 “에피토프 태그”를 포함하는데, 이들은 특정 항체를 이용할 수 있는 통상 짧은 펩티드 서열이다. 특정 단클론 항체에 대한 잘 공지된, 바로 이용가능한 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA), 그리고 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우, 융합 도메인은 가령 인자 Xa 또는 트롬빈에 대한 프로테아제 절단 부위를 가지며, 이들은 관련 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 절단하여, 이로부터 재조합 단백질을 자유롭게 한다. 유리된 단백질은 그다음 후속 크로마토그래피 분리에 의해 융합 도메인으로부터 단리될 수 있다. 특정 바람직한 구체예들에서, ActRIIb 폴리펩티드는 생체내에서 ActRIIb 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인과 융합된다(“안정화” 도메인). “안정화(stabilizing)”는 감소된 파괴, 신장에 의한 제거의 감소 또는 약물동력학 효과에 의한 제거의 감소 때문인지에 관계없이, 혈청 반감기를 증가시키는 임의의 것을 의미한다. 면역글로블린의 Fc 일부분과의 융합은 광범위한 단백질에서 바람직한 약물동력학 성질들을 부여하는 것으로 알려져 있다. 마찬가지로, 인간 혈청 알부민에 융합은 원하는 성질을 부여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 유형의 융합 도메인은 도메인 및 기능적 도메인(추가 생물학적 기능, 가령 원하는 바와 같이, 뼈 성장 또는 근육 성장의 추가 자극을 부여하는)의 다중화(가령, 이량체화, 사량체화)를 포함한다.

[0080] 특정 예로서, 본 발명은 Fc 도메인(가령, 서열 번호: 6)에 융합된 ActRIIb의 가용성 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. Fc 도메인의 예는 다음과 같다:

[0081] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHPDPEVKFNWYVDG

[0082] VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVP I EKTISKAK

[0083] GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG

[0084] PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK

[0085] 바람직하게는, Fc 도메인은 특정 잔기들, 가령 Asp-265, 리신 322, 및 Asn-434에서 하나 이상의 돌연변이를 가진다. 특정 경우들에서, 하나 이상의 이러한 돌연변이 (가령, Asp-265 돌연변이)를 가지는 돌연변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 결합하는 능력이 감소된다. 다른 경우들에서, 하나 이상의 이러한 돌연변이 (가령, Asn-434 돌연변이)를 가지는 돌연변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC class I-관련된 Fc-수용체 (FcRN)에 결합하는 능력이 증가된다.

[0086] 융합 단백질의 상이한 요소들은 원하는 기능과 일치하도록 배열될 수 있다고 이해한다. 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드는 이종(heterologous) 도메인의 C-말단에 위치할 수 있고, 또는, 대안으로, 이종 도메인이 ActRIIb 폴리펩티드의 C-말단에 위치할 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드 도메인 및 이종 도메인은 융합 단백질에 인접할 필요는 없고, 그리고 추가 도메인 또는 아미노산 서열은 이들 도메인의 C- 또는 N-말단에 포함되거나 또는 이들 도메인 사이에 포함될 수 있다.

[0087] 특정 구체예들에서, 본 발명의 ActRIIb 폴리펩티드는 ActRIIb 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 이상의 변형을 포함한다. 예를 들면, 이러한 변형은 ActRIIb 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 강화시키고, ActRIIb 폴리펩티드의 순환 반감기를 강화시키고, 또는 ActRIIb 폴리펩티드의 단백질 분해를 감소시킨다. 이러한 안정화 변형은 융합 단백질 (예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드 및 안정화 도메인을 포함하는 융합 단백질 포함), 글리코실화 부위의 변형(예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드에 글리코실화 부위 추가를 포함), 그리고 탄수화물 모이어티의 변형(예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거를 포함)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 융합 단백질의 경우, ActRIIb 폴리펩티드는 안정화 도메인 가령, IgG 분자 (가령, Fc 도메인)에 융합된다. 여기에서 이용된 것과 같이, “안정화 도메인”은 융합 단백질의 경우 융합 도메인 (가령, Fc)을 지칭할 뿐만 아니라, 가령, 탄수화물 모이어티, 또는 비-단백질성 폴리머, 가령 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비-단백질성 변형을 포함한다.

[0088] 특정 구체예들에서, 본 발명은 이용가능한 단리된 및/또는 정제된 형태의 ActRIIb 폴리펩티드를 만들고, 이들은 단리된 형태 또는 그렇지 않으면 실질적으로 다른 단백질이 없는 형태다. ActRIIb 폴리펩티드는 재조합 핵산으로부터 유전적으로 만들 수 있다.

[0089] 특정 구체예들에서, 본 발명의 ActRIIb 폴리펩티드들 (변형안된 또는 변형된)은 다양한 당분야에 공지된 기술에 의해 만들어질 수 있다. 예를 들면, 이러한 ActRIIb 폴리펩티드들은 예컨대 *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 표준 단백질 화학 기술을 이용하여 합성할 수

있다. 추가로, 자동화된 펩티드 합성기는 상업적으로 이용가능하다(예를 들면, *Advanced ChemTech Model 396: Milligen/Bioscience 9600*). 대안으로, ActRIIb 폴리펩티드들, 이의 단편들 또는 변이체들은 당분야에 잘 공지된 다양한 발현 시스템 (예를 들면, 대장균, Chinese 햄스터 난소 세포, COS 세포, 벡로로바이러스)을 이용하여 재조합에 의해 만들수도 있다(하기 참고). 추가 구체예에서, 변형된 또는 변형안된 ActRIIb 폴리펩티드들은 예를 들면, 프로테아제, 예를 들면, 트립신, 티모트리핀, 키모트리핀, 펩신 또는 쌍을 이룬 염기성 아미노산 전환 효소(PACE)를 이용하여 자연 발생적 또는 재조합에 의해 생산된 전장의 ActRIIb 폴리펩티드들을 절단하여 만들 수 있다. 컴퓨터 분석(시판되는 이용가능한 소프트웨어, 예를 들면, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)을 이용하여 단백질 분해성 절단 부위를 확인할 수 있다. 대안으로, 이러한 ActRIIb 폴리펩티드들은 당분야에 공지된 표준 기술들, 예컨대 화학적 절단 (예를 들면, 시아노겐 브롬화물, 하이드록실아민)과 같은 기술을 이용하여 자연 발생적 또는 재조합적으로 생산된 전장 ActRIIb 폴리펩티드로부터 만들 수 있다.

[0091] **3.ActRIIb 폴리펩티드들을 인코딩하는 핵산**

[0092] 특정 측면들에서, 본 발명은 여기에서 설명하는 ActRIIb 폴리펩티드 단편들, 기능적 변이체 및 융합 단백질을 포함하는 임의의 ActRIIb 폴리펩티드 (가령, 전장의 가용성 ActRIIb 폴리펩티드)를 인코딩하는 단리된 및/또는 재조합 핵산을 제공한다. 예를 들면, 서열 번호: 4는 자연 발생적 인간 ActRIIb 전조 폴리펩티드를 인코딩하고, 서열 번호: 5는 ActRIIb의 프로세스된 세포의 도메인을 인코딩한다. 대상 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 이들 핵산은 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드를 만드는 방법에 이용되거나 또는 직접적 치료제(가령, 유전자 치료 방법에서)로 이용될 수 있다.

[0093] 특정 측면에서, ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하는 해당 핵산은 서열 번호: 4 또는 5의 변이체인 핵산을 포함할 수 있는 것으로 더 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 추가 또는 결손, 가령, 대립형질 변이체에 의해 상이한 서열들을 포함한다.

[0094] 특정 구체예들에서, 본 발명은 서열 번호: 4, 5 또는 18에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 단리된 또는 재조합 핵산 서열을 제공한다. 당업계에 숙련자는 서열 번호: 4, 5 또는 18에 상보적인 핵산 서열과 서열 번호: 4, 5 또는 18의 변이체 또한 본 발명의 범위내에 있음을 인지할 것이다. 추가 구체예에서, 본 발명의 핵산 서열은 단리된, 재조합, 및/또는 이중 뉴클레오티드 서열과 융합되거나, DNA 라이브러리내에 있다.

[0095] 기타 구체예들에서, 본 발명의 핵산은 매우 엄격한(stringent) 조건하에서 서열 번호: 4, 5 또는 18의 뉴클레오티드 서열, 서열 번호: 4, 5 또는 18의 보체 서열, 또는 이의 단편들에 하이브리드되는 뉴클레오티드 서열과 이러한 핵산에 의해 인코딩된 ActRIIb 폴리펩티드를 또한 포함한다. 상기에서 논의된 바와 같이, 당업자는 DNA 하이브리드화를 촉진시키는 적절한 엄격한 조건은 변화될 수 있다는 것을 바로 인지할 것이다. 당업자는 DNA 하이브리드화를 촉진시키는 적절한 엄격한 조건은 변화될 수 있다는 것을 바로 인지할 것이다. 예를 들면, 약 45°C에서 6.0 x 염화나트륨/구연산나트륨 (SSC)에서 하이브리드화를 실행하고, 50°C에서 2.0 x SSC로 세척하여 실행할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서 염 농도는 50°C에서 약 2.0 x SSC의 낮은 엄격성에서부터 50°C에서 0.2 x SSC의 높은 엄격성까지의 범위에서 선택될 수 있다. 추가로, 세척 단계의 온도는 실온, 약 22°C의 낮은 엄격성 조건으로부터 약 65°C의 높은 엄격성 조건까지 증가될 수 있다. 온도 및 염은 모두 변화될 수 있고, 또는 온도 또는 염 농도를 일정하게 유지하고, 다른 변수들을 변화시킬 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명은 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄격성 조건하에 하이브리드되는 핵산을 제공하고, 실온에서 2 x SSC에서 세척한다.

[0096] 서열 번호: 4, 5 또는 18에서 제시한 핵산과 유전자 코드의 축퇴로 인하여 상이한 단리된 핵산들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들면, 다수의 아미노산이 한 개 이상의 3중 코드에 할당된다. 동일한 또는 유사한 아미노산을 명시하는 코돈(예를 들면, CAU 및 CAC는 히스티딘에 대해 동의적이다)은 “침묵” 돌연변이를 초래하여 단백질의 아미노산 서열에는 영향을 주지 않는다. 그러나, 해당 단백질의 아미노산 서열에 변화를 유도하는 DNA 서열 다형성이 포유류 세포에 존재할 것으로 예상된다. 당업자는 특정 단백질을 인코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드(최대 뉴클레오티드의 약 3-5%까지)에 이러한 변이는 천연 대립형질 변이로 인하여 주어진 종의 개체들간에 존재할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 임의의 그리고 이러한 모든 뉴클레오티드 변이 및 생성된 아미노산 다형성(polymorphisms)은 본 발명의 범위에 속한다.

[0097] 특정 구체예들에서, 본 발명의 재조합 핵산은 발현 구조체내에 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작용가능하도록 링크된다. 조절 뉴클레오티드 서열은 발현에 이용되는 숙주 세포에 일반적으로 적합할 것이다. 다양

한 숙주 세포에 대해 다양한 유형의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열들이 공지되어 있다. 일반적으로, 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 시작 및 종료 서열, 해독 시작 및 종료 서열, 그리고 헨서 또는 활성물질 서열을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 당분야에 공지된 구성 또는 유도성 프로모터도 본 발명에 의해 고려된다. 프로모터는 자연 발생적 프로모터, 또는 한 개 이상의 프로모터의 요소들이 복합된 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 구조체는 세포내 에피솜 상에, 가령, 플라스미드로 존재할 수 있고, 발현 구조체는 염색체에 삽입될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 발현 벡터는 형질변환된 숙주 세포의 선별을 허용하는 선택가능한 표식 유전자를 포함한다. 선택가능한 표식 유전자는 당업계에 잘 공지되어 있고, 이용된 숙주세포에 따라 다양할 것이다.

[0098] 본 발명의 특정 측면에서, ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하고, 최소한 하나의 조절 서열에 작용가능하도록 링크된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 해당 핵산이 발현 벡터에 제공된다. 조절 서열은 당업계에 공지되어 있고, ActRIIb 폴리펩티드의 직접적인 발현에 대해 선택된다. 따라서, 조절 서열은 프로모터, 인헨서, 및 기타 발현 조절 요소들을 포함한다. 예시적인 조절 서열들은 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)*에서 설명된다. 예를 들면, DNA 서열에 작용가능하도록 연결되었을 때, DNA 서열의 발현을 조절하는 다양한 발현 조절 서열중 임의의 것은 ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현시키기 위하여 이들 벡터에 이용할 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은 예를 들면, SV40의 초기 및 후기(early and late) 프로모터, tet 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 바로 초기(immediate early) 프로모터, RSV 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 프로모터(이의 발현은 T7 RNA 폴리머제에 의해 지시받음), 람다 파이지의 주요 오퍼레이트 및 프로모터 부분, fd 코트 단백질의 조절 부분, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 기타 당분야 효소에 대한 프로모터, 산 포스파타제, 가령, Pho5의 프로모터, 효모 α-메이팅(mating) 인자의 프로모터, 베쿨로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터 및 원핵 또는 진핵 세포 또는 이들 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 공지된 기타 서열, 그리고 이들의 다양한 조합을 포함한다. 발현 벡터의 디자인은 형질변환된 숙주 세포의 선택 및/또는 발현시킬 원하는 단백질의 유형과 같은 인자들에 따라 달라진다는 것을 인지해야 한다. 더욱이, 벡터의 카피 수, 카피수를 조절하는 능력, 벡터에 의해 인코딩된 가령, 항생제의 표식과 같은 임의의 기타 단백질의 발현도 또한 고려해야만 한다.

[0099] 본 발명의 재조합 핵산은 클론된 유전자 또는 이의 일부분을 진핵세포, 원핵세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유류) 또는 이들 모두에게 적합한 벡터에 결합시켜 만들 수 있다. 재조합 ActRIIb 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 비이클은 플라스미드 및 기타 벡터를 포함한다. 예를 들면, 적합한 벡터는 원핵세포, 가령, 대장균에서 발현을 위한 다음과 같은 유형의 플라스미드를 포함한다: pBR322-유도된 플라스미드, pEMBL-유도된 플라스미드, pEX-유도된 플라스미드, pBTac-유도된 플라스미드 그리고 pUC-유도된 플라스미드.

[0100] 일부 포유류 발현 벡터는 세균에서 벡터의 증식을 용이하게 하는 원핵 서열과 진핵 세포에서 발현되는 하나 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 적합한 포유류 발현 벡터의 예들이다. 이들 벡터중 일부는 세균성 플라스미드, 가령 pBR322의 서열로 변형되어, 원핵 및 진핵 세포 모두에서 복제 및 약물 저항성 선별을 용이하게 한다. 대안으로, 바이러스의 유도체 가령, 소 유두종 바이러스(BPV-1), 또는 Epstein-Barr 바이러스(pHEBo, pREP-유도된 및 p205)를 진핵 세포에서 단백질의 일과적 발현에 이용할 수 있다. 아래 유전자 요법 전달 시스템 설명에서 기타 바이러스(레트로바이러스 포함)의 예를 찾아볼 수 있다. 플라스미드의 조제물 및 숙주 유기체의 형질전환에 이용된 다양한 방법들은 당업계에 공지되어 있다. 원핵 및 진핵 세포용 기타 적합한 발현 시스템과 일반적인 재조합 과정은 *Molecular Cloning Laboratory, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)*을 참고한다. 일부 경우에서, 베쿨로바이러스 발현 시스템을 이용하여 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 것이 바람직할 수도 있다. 이러한 베쿨로바이러스 발현 시스템의 예는 pVL-유도된 벡터(가령 pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도된 벡터(가령 pAcUW1), 및 pBlueBac-유도된 벡터(가령 β-gal을 포함하는 pBlueBac III)를 포함한다.

[0101] 바람직한 구체예에서, 벡터는 CHO 세포에서 해당 ActRIIb 폴리펩티드를 생산하도록 기획할 수 있는데, 가령, Pcmv-Script 벡터(Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터(Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터(Promega, Madison, Wisc.)가 될 수 있다. 자명한 것은, 해당 유전자 구조체를 이용하여 배양물에서 증식된 세포내에서 해당 ActRIIb 폴리펩티드를 발현시켜 정제용 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 포함하는 단백질을 생산할 수 있다.

[0102] 본 내용은 또한 하나 이상의 해당 ActRIIb 폴리펩티드의 코딩 서열(가령, 서열 번호: 4, 5 또는 18)을 포함하는

재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포를 포함한다. 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 ActRIIb 폴리펩티드는 대장균과 같은 세균성 세포, 곤충 세포(가령, 벡칼로바이러스 발현 시스템을 이용한), 효모, 또는 포유류 세포에서 발현될 수 있다. 기타 적합한 숙주 세포들은 당업계에 공지되어 있다.

[0103] 따라서, 본 발명은 대상 ActRIIb 폴리펩티드를 생산하는 방법을 더 포함한다. 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포를 ActRIIb 폴리펩티드의 발현이 일어나는 것을 허용하는 적합한 조건하에 배양할 수 있다. ActRIIb 폴리펩티드를 포함하는 세포와 배지의 혼합물로부터 ActRIIb 폴리펩티드가 분리되고, 그리고 단리시킬 수 있다. 대안으로, ActRIIb 폴리펩티드는 세포질에 또는 막 분취물 및 수거된, 용해된 세포 및 단리된 단백질에 남아있을 수 있다. 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 기타 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당업계에 공지되어 있다. 대상 ActRIIb 폴리펩티드는 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동, ActRIIb 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체로 면역친화력 정제 및 ActRIIb 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 물질로 친화력 정제(가령, 단백질 A 컬럼을 이용하여 ActRIIb-Fc 융합을 정제할 수 있다)를 포함하는 단백질을 정제하기 위하여 당업계에 공지되어 있는 기술을 이용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포 또는 이들로부터 단리할 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRIIb 폴리펩티드는 이의 정제를 용이하게 하는 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 바람직한 구체예에서, 정제는 예를 들면, 다음중 3가지 이상을 임의의 순서로 포함하는 컬럼 크로마토그래피 단계에 의해 이루어진다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다. 선택적으로, 정제 과정은 다음을 포함한다: Tris-완충된 염 용액(pH 8.0)내 단백질과 함께 MabSelect™ 단백질 A 컬럼(GE Healthcare), TBS (150 mM NaCl, pH 8.0) 및 TBS (50 mM NaCl, pH 8.0)에서 세척하였고, 0.1 mM 글리신, pH 3.0에서 용출시키고; 용출액은 TBS pH 8.0에서 Q 세파로즈 컬럼을 통하여 통과시킬 수 있고, 그리고 200-250, 210-250, 220-250, 210-230, 215-225 또는 225-235 mM NaCl중 임의의 것을 포함하는 TBS에서 용출시키고; 용출액은 1.1 M NH₄SO₄, 50 mM Tris pH 8.0로 변경시키고 동일한 완충액으로 세척하였고, 그리고 200-250, 210-250, 220-250, 210-230, 215-225 또는 225-235 mM NH₄SO₄중 임의의 것에서 pH 7.2 또는 7.4의 인산염 완충액에서 용출시켰다. 용출된 물질은 투석시킬 수 있고, 바이러스 여과시킨 후, 최종 제형에 이용될 수 있다.

[0104] 또다른 구체예에서, 정제 리더 서열, 가령 재조합 ActRIIb 폴리펩티드의 원하는 일부의 N-말단에서 poly-(His)/엔테로키나제 절단 부위 서열과 같은 정제 리더 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni²⁺ 금속 수지를 이용하여 친화력 크로마토그래피에 의해 발현된 융합 단백질의 정제를 허용할 수 있다. 그 다음 정제 리더 서열은 엔테로키나제로 처리하여 제거함으로써 정제된 ActRIIb 폴리펩티드를 제공할 수 있다(가령, *Hochuli et al., (1987) J.크로마토그래피 411:177; 및 Janknecht et al., PNAS USA 88:8972* 참고).

[0105] 융합 유전자를 만드는 기술들은 잘 공지되어 있다. 기본적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편들의 결합은 결합용 블런트-단부 또는 스테거-단부를 이용하고, 적절한 말단을 제공하기 위하여 제한효소 절단하고, 원하지 않는 결합을 피하기 위하여 적절한, 알칼리 포스파타제 처리로 코헤시브 엔드를 메우고, 그리고 효소적 결합과 같은 전형적인 기술에 따라 시행된다. 대안으로, 유전자 단편들의 PCR 증폭은 2개 연속 유전자 단편들 사이에 상보적인 오버행을 만들기 위하여 앵커 프라이머를 이용하여 실행하고, 오버행은 후속적으로 어닐링되어, 키메라 유전자 서열을 만들 수 있다(예를 들면, *Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992*).

[0107] **4. 대체 약티빈 ActRIIb 길항제들**

[0108] 가용성 ActRIIb 폴리펩티드, 특히 ActRIIb-Fc는 바람직한 길항제이지만, 항-ActRIIb 항체, 안티센스, ActRIIb의 생산을 억제하는 RNAi 또는 리보자임 핵산, 다른 ActRIIb 억제제들, 특히ActRIIb 결합을 파괴하는 기타 억제제를 포함한 다른 유형의 ActRIIb 길항제들이 유용할 것으로 기대된다.

[0109] ActRIIb 폴리펩티드 (가령, 가용성 ActRIIb 폴리펩티드)와 특이적으로 반응하고, 그리고 ActRIIb 폴리펩티드를 가진 리간드에 경쟁적으로 결합하거나 그렇지 않으면 ActRIIb-중재된 신호생성을 억제하는 항체는 ActRIIb 폴리펩티드 활성의 길항제로 이용할 수 있다. 마찬가지로, BMP 폴리펩티드와 특이적으로 반응하고, 그리고 ActRIIb 결합을 파괴하는 항체를 길항제로 이용할 수 있다.

[0110] ActRIIb 폴리펩티드 또는 BMP 폴리펩티드로부터 유도된 이뮤노젠을 이용함으로써, 표준 프로토콜에 따라 항-단

백질/항-펩티드 항혈청 또는 단클론 항체를 만들 수 있다(예를 들면, *Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)*). 포유동물, 가령, 마우스, 랫스터 또는 토끼를 ActRIIb 폴리펩티드의 면역원 형, 항체 반응, 또는 융합 단백질을 유도할 수 있는 항원 단편으로 면역주사할 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성을 부여하는 기술은 당업계에 공지되어 있는 운반체에 콘주게이션 또는 다른 기술을 포함한다. ActRIIb 폴리펩티드의 면역원성 부분은 어쥬번트 존재하에 투여할 수 있다. 면역 과정은 혈장 또는 혈청중 항체 역가를 탐지함으로써 모니터링할 수 있다. 항체 수준을 평가하기 위하여 항원으로 이뮤노젠과 함께 표준 ELISA 또는 다른 면역 분석을 이용할 수 있다.

[0111] ActRIIb 폴리펩티드의 항원 조제물로 동물을 면역주사하고, 항혈청을 수득할 수 있고, 원하는 경우 다클론 항체를 혈청으로부터 단리시킬 수 있다. 단클론 항체를 생산하기 위하여, 항체를 생산하는 세포(립프구)로 면역주사를 맞은 동물로부터 수거하고, 표준 체세포 융합 과정에 의해 하이브리도마 세포를 생산하는 골수종 세포와 같은 불사화 세포와 융합시킬 수 있다. 이러한 기술은 당업계에 공지되어 있고, 그리고 예를 들면, 하이브리도마 기술(Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497에 의해 독창적으로 개발된), 인간 B 세포 하이브리도마 기술(Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), 그리고 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 EBV-하이브리도마 기술 (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)을 포함한다. 하이브리도마 세포들은 ActRIIb 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체의 생산 및 이러한 하이브리도마 세포를 포함하는 배양물로부터 단리된 단클론 항체를 생산하기 위하여 면역화학적으로 스크리닝할 수 있다.

[0112] 여기에서 사용된 용어 “항체”는 전체 항체들, 예를 들면, 임의의 이소타입(IgG, IgA, IgM, IgE, 등)을 포함하는 의미이며, 그리고 선택된 항원에 반응성이 있는 면역글로블린의 단편들 또는 도메인을 포함한다. 통상적인 기술을 이용하여 항체들을 단편화시킬 수 있고, 그리고 단편들은 유용성 및/또는 관심 대상의 특정 에피토프와의 상호작용에 대해 스크리닝된다. 따라서, 이 용어는 특정 단백질과 선택적으로 반응할 수 있는 항체 분자의 단백질분해에 의해 절단된 또는 재조합에 의해 준비된 부분의 부분들을 포함한다. 비-제한적인 단백질분해성 및/또는 재조합 단편들의 예로는 Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, 및 펩티드 링커에 의해 연결된 V_L 및 V_H 도메인을 포함하는 단일 쇠 항체들(scFv)을 포함한다. scFv's는 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결된 2개 이상의 결합 부위를 가지는 항체를 형성할 수 있다. 이 용어 항체는 또한 다클론, 단클론 또는 항체 및 재조합 항체들의 기타 정제된 조제물을 포함한다. 용어 “재조합 항체”는 분자 생물학 기술을 이용하여 작제된 핵산으로부터 발현된 항체 또는 면역글로블린의 결합 도메인을 의미하며, 예컨대 인간화된 항체 또는 단일 쇠 항체로부터 발생된 완전한 인간 항체를 의미한다. 단일 도메인 및 단일 쇠 항체들은 또한 “재조합 항체” 용어에 포함된다.

[0113] 특정 구체예들에서, 본 발명의 항체는 단클론 항체이며, 특정 구체예들에서, 본 발명은 신규한 항체를 만들기 위한 이용할 수 있는 방법들을 만든다. 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 만드는 방법은 탐지가 가능한 면역 반응을 자극하는데 유효한 항원 폴리펩티드를 포함하는 면역원성 조성물을 마우스에게 투여하고, 마우스로부터 항체를 생산하는 세포(가령, 비장 세포)를 얻고, 그리고 항체를 생산하는 세포에 골수종 세포를 융합시켜, 항체를 생산하는 하이브리도마를 얻고, 그리고 항체를 생산하는 하이브리도마를 테스트하여 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일단 수득되면, 하이브리도마는 세포 배양물, 임의로 하이브리도마-유도된 세포가 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 배양 조건에서 증식시킬 수 있다. 단클론 항체를 세포 배양물로부터 정제할 수도 있다.

[0114] 항체와 관련하여 사용된 부사구 “~와 특이적으로 반응하는”의 의미는 당분야에서 일반적으로 인지되는 바와 같이, 항체는 특정 유형의 생물학적 시료중 관심 항원의 존재를 탐지함에 있어서 관심 항원(가령, ActRIIb 폴리펩티드)과 항체가 이용하지 않는 관심 대상이 아닌 항원 사이에 충분한 선택성이 있는 항체를 의미한다. 항체를 이용하는 특정 방법들에서, 가령 치료 용도에서, 결합에 있어서 더 높은 수준의 특이성이 바람직할 수 있다. 단클론 항체는 일반적으로 원하는 항원과 교차-반응성 폴리펩티드를 효과적으로 구별할 수 있는 경향이 더 크다(다클론 항체와 비교하였을 때). 항체:항원 상호작용의 특이성에 영향을 주는 한 가지 특징은 항원에 대한 항체의 친화력이다. 바람직한 특이성은 광범위한 상이한 친화력을 가질 수 있지만, 일반적으로 바람직한 항체는 약 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ 이하의 친화력(해리상수)을 가질 수 있다.

[0115] 또한, 바람직한 항체를 확인하기 위하여 항체를 스크리닝하는데 이용하는 기술들은 수득된 항체의 성질에 영향을 줄 수 있다. 예를 들면, 항체를 용액중 항원에 결합하는데 이용한다면, 용액 결합을 테스트하는 것이 바람직할 수 있다. 특히 바람직한 항체를 확인하기 위하여 항체와 항원 사이의 상호작용을 테스트하는데 다양한 여

러 기술들을 이용할 수 있다. 이러한 기술들은 ELISAs, 표면 플라즈몬 공명 결합 분석들(가령, Biacore™ 결합 분석, Biacore AB, Uppsala, Sweden), 샌드위치 분석들(가령, 상자성 비드 시스템, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), 웨스턴 블랏, 면역침강 분석, 및 면역조직화학을 포함한다.

[0116] ActRIIb 길항제인 핵산 화합물의 예시적인 범주는 안티센스 핵산, RNAi 구조체 및 촉매성 핵산 구조체를 포함한다. 핵산 화합물은 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥 화합물은 오버행 또는 비-상보성 부분을 또한 포함할 수 있는데, 이때 가닥중 하나 또는 다른 하나는 단일 가닥이다. 단일 가닥 화합물은 자가-상보성 부분을 포함하는데, 이는 화합물이 소위 이중 나선 구조 일부를 가진 “헤어핀” 또는 “스텝-루프” 구조를 형성한다는 의미다. 핵산 화합물은 전장 ActRIIb 핵산 서열 또는 악티빈 β_A , β_B , β_C , 또는 β_E 서열의 경우 1000개, 경우 500개, 경우 250개, 경우 100개 또는 경우 50개, 35개, 30개, 25개, 22개, 20개 또는 18개 뉴클레오티드로 구성된 부분에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상보성 부분은 바람직하게는 최소한 8개 뉴클레오티드, 그리고 임의로 약 18개 내지 35개 뉴클레오티드일 수 있다. 상보성 부분은 가령 인트론, 코딩 서열 또는 표적 전사체, 가령 코딩 서열 일부의 5'-코딩 서열에 포함될 수 있다. 일반적으로, 핵산 화합물은 길이가 약 8 내지 약 500개 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 가질 수 있고, 임의로 길이는 약 14개 내지 약 50개 뉴클레오티드일 수 있다. 핵산은 DNA (특히 안티센스로 이용하기 위한), RNA 또는 RNA:DNA 하이브리드일 수 있다. 임의의 한 가닥은 RNA 및 DNA 혼합물과 DNA 또는 RNA로 바로 분류할 수 없는 변형된 형태를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 이중 가닥 화합물은 DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA일 수 있고, 임의의 한 가닥은 DNA 및 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 바로 분류할 수 없는 변형된 형태를 포함할 수 있다. 핵산 화합물은 기본 골격(인터 뉴클레오티드 링키지를 포함한, 천연 핵산중 슈가-포스페이트 부분) 또는 염기 부분(천연 핵산의 퓨린 또는 피리미딘 부분)을 포함한 다양한 변형을 포함할 수 있다. 안티센스 핵산 화합물은 바람직하게는 약 15 내지 약 30개 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있고, 혈청, 세포 또는 화합물이 운반될 수 있는 위치, 가령, 경구로 운반된 화합물의 경우 위(stomach), 그리고 흡입된 화합물의 경우 폐에서 안전성과 같은 성질을 개선시키기 위하여 하나 이상의 변형을 흔히 포함할 수 있다. RNAi 구조체의 경우, 표적 전사체에 상보적인 가닥은 일반적으로 RNA 또는 이의 변형일 수 있다. 다른 가닥은 RNA, DNA 또는 임의의 기타 변형일 수 있다. 이중 가닥의 듀플렉스 부분 또는 단일 가닥의 “헤어핀” RNAi 구조체는 18 내지 40개 길이의 뉴클레오티드를 가지고, Dicer 기질로 작용하는 한, 임의로 약 21개 내지 23개 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 촉매성 또는 효소적 핵산은 리보자임 또는 DNA 효소일 수 있고, 또한 변형된 형태를 포함할 수 있다. 핵산 화합물은 생리학적 조건하에 그리고 년센스 또는 센스 기준이 거의 효과를 가지지 않는 농도에서 세포와 접촉시켰을 때 약 50%, 75%, 90% 이상 표적의 발현을 억제시킬 수 있다. 핵산 화합물의 효과를 테스트하기 위한 바람직한 농도는 1, 5 및 10 마이크로몰이다. 또한 적혈구 세포 수준에 대한 핵산 화합물들의 영향을 또한 테스트할 수 있다.

[0117] 특정 구체예들에서, ActRIIb 길항제는 악티빈 생체활성을 길항하는 및/또는 악티빈에 결합하는 폴리스타틴 폴리펩티드일 수 있다. 용어 "폴리스타틴 폴리펩티드"는 폴리스타틴의 임의의 자연 발생적 폴리펩티드 뿐만 아니라 유용한 활성을 보유하는 이들의 임의의 변이체들(돌연변이체, 단편들, 융합, 및 펩티도모방체형태를 포함)를 포함하는 폴리펩티드들을 포함하고, 그리고 폴리스타틴의 임의의 기능적 단량체 또는 다량체도 더 포함한다. 악티빈 결합 성질을 보유하는 폴리스타틴 폴리펩티드들의 변이체들은 폴리스타틴 및 악티빈 상호작용들을 포함하는 기존 연구에 근거하여 확인할 수 있다. 예를 들면, WO2008/030367은 악티빈 결합에 중요한 것으로 나타난 특이적 폴리스타틴 도메인 ("FSDs")을 공개한다. 서열 번호: 9-11에서 나타낸 것과 같이, N-말단 폴리스타틴 도메인 ("FSDN" 서열 번호: 9), FSD2 (서열 번호: 10), 그리고 다소 작은 FSD1 (서열 번호: 11)은 악티빈 결합에 중요한 폴리스타틴내 예시적인 도메인을 나타낸다. 또한, 폴리펩티드들의 라이브러리를 만들고 테스트하는 방법은 ActRIIb 폴리펩티드들의 내용에서 설명하고 있으며, 그리고 이러한 방법들은 폴리스타틴의 변이체들을 만들고 테스트하는 것에 또한 관계한다. 폴리스타틴 폴리펩티드들은 폴리스타틴 폴리펩티드의 서열에 최소한 약 80% 동일한 서열을 가진 그리고 선택적으로 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 가진 임의의 공지의 폴리스타틴 서열로부터 유도된 폴리펩티드들을 포함한다. 예시적인 폴리스타틴 폴리펩티드들은 성숙한 폴리스타틴 폴리펩티드 또는 예를 들면, WO2005/025601에서 설명된 인간 폴리스타틴 전구 폴리펩티드(서열 번호: 7)의 더 짧은 이소폼 또는 기타 변이체들을 포함한다.

[0118] 인간 폴리스타틴 전구 폴리펩티드 이소폼 FST344은 다음과 같다:

[0119] MVRARHQPGGLCLLLLLLQCFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL

[0120] SKEECSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKWMIFNGGAPNCIPKCTCENVDC

[0121] GPGKKCRMNKKKPRVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARC

- [0122] KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA
- [0123] SSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC
- [0124] TGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA
- [0125] ACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDQDYSPFISSILEW
- [0126] (서열 번호: 7; NP_037541.1 폴리스타틴 이소폼 FST344)

- [0128] 신호 펩티드는 한줄로 밑줄을 그어 표시하였고; 굵게 표시된 마지막 27개 잔기는 아래의 더 짧은 폴리스타틴 이소폼 FST317 (NP_006341)과 비교하였을 때 추가 아미노산을 나타낸다.
- [0129] 인간 폴리스타틴 전구 폴리펩티드 이소폼 FST317은 다음과 같다:
- [0130] MVRARHQPGLCLLLLLLQCFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL
- [0131] SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWIMIFNGGAPNCIPCKETCENVDC
- [0132] GPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARC
- [0133] KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA
- [0134] SSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC
- [0135] TGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA
- [0136] ACSSGVLLEVKHSGSCN (서열 번호: 8)
- [0137] 신호 펩티드는 한줄로 밑줄을 그어 표시한다.

- [0139] N-말단 폴리스타틴 도메인 (FSND) 서열은 다음과 같다:
- [0140] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWIM
- [0141] IFNGGAPNCIPCK (서열 번호: 9; FSND)

- [0143] FSD1 및 FSD2 서열은 다음과 같다:
- [0144] ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (서열 번호: 10; FSD1)
- [0145] KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVT (서열 번호: 11; FSD2)

- [0147] 다른 구체예들에서, 여기에서 사용하기 위한 길항제는 악티빈 생체활성을 길항하는 및/또는 악티빈 및 ActRIIb-Fc의 것을 닮은 스펙트럼을 가진 기타 리간드들에 결합하는 폴리스타틴-유사 관련 유전자(FLRG)일 수 있다. 용어 "FLRG 폴리펩티드"는 FLRG의 임의의 자연 발생적 폴리펩티드 뿐만 아니라 유용한 활성을 보유하는 이들의 임의의 변이체들(돌연변이체, 단편들, 융합, 그리고 펩티드모방체를 포함)을 포함하는 폴리펩티드들을 포함한다. 악티빈 결합 성질을 보유하는 FLRG 폴리펩티드들의 변이체들은 FLRG 및 악티빈 상호작용을 분석하기 위한 통상의 방법들을 이용하여 확인할 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제6,537,966호 참고. 또한, 폴리펩티드들의 라이브리리를 만들고 테스트하는 방법들은 ActRIIb 폴리펩티드들의 내용에서 설명되며, 이들 방법들은 FLRG의 변이체들을 만들고 테스트하는 것에도 관계한다. FLRG 폴리펩티드들은 FLRG 폴리펩티드의 서열에 최소한 약 80% 동일한 서열과, 선택적으로 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 가진 서열을 보유한 임의의 공지된 FLRG의 서열로부터 유도된 폴리펩티드들을 포함한다.
- [0148] 인간 FLRG 전구 폴리펩티드는 다음과 같다:
- [0149] MRPGAPGLWPLPWGALAWAVGFVSSMGSGNPAPGGVCWLQQQEATCSL
- [0150] VLQTDVTRAECASGNIATAWSNLTHPGNKINLLGFLGLVHCLPCKDSCD

- [0151] GVECGPGKACRMLGGRPRCECAPDCSGLPARLQVCGSDGATYRDECELRA
- [0152] ARCRGHPDLSVMYRGRCKRSCEHVVCPRPQSCVVDQTGSAHCVCVRAAPC
- [0153] VPSSPGQELCGNNNVYI SSCHMRQATCFLGRSIGVRHAGSCAGTPEEPP
- [0154] GGESAEEEENFV (서열 번호: 12; NP_005851)
- [0155] 신호 펩티드는 한줄로 밑줄을 그어 표시한다.

[0157] 특정 구체예들에서, 폴리스타틴 폴리펩티드들 및 FLRG 폴리펩티드들의 기능적 변이체들 또는 변형된 형태들은 폴리스타틴 폴리펩티드들 또는 FLRG 폴리펩티드들의 최소한 일부분과 하나 이상의 융합 도메인, 예컨대, 예를 들면, 폴리펩티드의 분리, 탐지, 안정화 또는 다량체화를 촉진하는 도메인을 가지는 융합 단백질을 포함한다. 적합한 융합 도메인들은 ActRIIb 폴리펩티드들을 언급하는 상기 부분에서 상세하게 논의된다. 한 구체예에서, 길항제는 Fc 도메인에 융합된 폴리스타틴 폴리펩티드의 악티빈 결합 부분을 포함하는 융합 단백질이다. 또다른 구체예에서, 길항제는 Fc 도메인에 융합된 FLRG 폴리펩티드의 악티빈 결합 부분을 포함하는 융합 단백질이다. 폴리스타틴 및 FLRG는 문헌에 나타나있으며, FLRG에 대해 출원인은 피코몰 범위로 악티빈 A에 대한 친화력을 보 유하는 것을 나타내는데, 이는 이들 물질이 ActRIIb-Fc와 같은 유사한 수준으로 악티빈 A 신호생성을 억제할 것 임을 나타낸다.

[0159] **5. 스크리닝 분석**

[0160] 특정 측면에서, 본 발명은 ActRIIb 신호생성 경로의 항진제 또는 길항제인 화합물(물질)을 확인하기 위하여 ActRIIb 폴리펩티드 (가령, 가용성 ActRIIb 폴리펩티드) 및 BMP 폴리펩티드를 사용하는 용도에 관한 것이다. 이러한 스크리닝을 통하여 확인된 화합물들은 시험관에서 뼈 성장 또는 광화작용을 조절하는 화합물의 능력을 평가하기 위하여 테스트할 수 있다. 임의로, 이들 화합물들은 생체내에서 조직 성장을 조절하는 화합물의 능 력을 평가하기 위하여 동물 모델에서 추가 테스트할 수 있다.

[0161] ActRIIb 폴리펩티드를 표적으로하여 조직 성장을 조절하는 치료제를 스크리닝하는 많은 방법들이 있다. 특정 구체예들에서, 화합물의 고처리량 스크리닝은 뼈에서 ActRIIb 중재된 효과를 교란하는 물질을 확인하기 위하여 실행할 수 있다. 특정 구체예들에서, 이러한 분석은 악티빈 또는 또다른 리간드에 ActRIIb 폴리펩티드의 결합 을 특이적으로 억제 또는 감소시키는 화합물을 스크리닝하고 확인하기 위하여 실행한다. 대안으로, 악티빈 또 는 또다른 리간드에 ActRIIb 폴리펩티드의 결합을 강화시키는 화합물을 확인하기 위하여 이 분석을 이용할 수 있다. 추가 구체예에서, 화합물이 ActRIIb 폴리펩티드와 상호작용하는 능력에 의해 화합물을 확인할 수 있다.

[0162] 다양한 분석 포맷이 충분할 것이지만, 본 내용에 근거하여, 여기에서 명시적으로 설명되지 않은 분석들도 당업 계에 숙련자에 의해 인지될 수 있을 것이다. 여기에서 설명하는 것과 같이, 본 발명의 테스트 화합물(물질)은 임의의 복잡한 화학 방법에 의해 만들어질 수 있다. 대안으로, 대상 화합물은 생체 또는 시험관에서 합성된 자연 발생적 생물분자일 수 있다. 조직 성장의 조절자로 작용하는 화합물(물질)의 능력에 대해 테스트를 받는 화 합물(물질)은 예를 들면, 세균, 효모, 식물 또는 기타 유기체에 의해 만들어지거나(가령, 천연 산물), 화학적으 로 생산된(가령, 펩티드모방체를 포함하는 소분자들), 또는 재조합으로 생산될 수 있다. 본 발명에서 테스트 화합물은 비-펩티드 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드모방체, 슈가, 호르몬, 및 핵산 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, 테스트 물질은 약 2,000 daltons 미만의 분자량을 가진 작은 유기 분자다.

[0163] 본 발명의 테스트 화합물은 단일, 분리된 엔터티로 제공되거나 또는 복합 화학에 의해 만들어진 더 복잡한 라이 브러리로 제공될 수 있다. 이러한 라이브러리들은 예를 들면, 알코올, 알킬 할로젠화물, 아민, 아미드, 에스테 르, 알데히드, 에테르 및 다른 부류의 유기 화합물을 포함할 수 있다. 테스트 시스템에서 테스트 화합물은 단 리된 형태 또는 화합물의 혼합물의 형태로 특히 초기 스크리닝 단계로 제공될 수 있다. 임의로, 화합물은 임의 로 다른 화합물로 유도화될 수 있으며, 이 화합물의 분리를 용이하게 하기 위한 유도화 기를 가질 수 있다. 유 도화기의 비-제한적 기는 바이오틴, 플루오레신, 디옥시게닌, 그린 형광 단백질, 동위원소, 폴리히스티딘, 자성 비드, 글루타티온 S 전이효소 (GST), 광활성가능한 교차링커 또는 이의 임의의 복합물을 포함한다.

[0164] 화합물 및 천연 추출물의 라이브러리를 테스트하는 많은 약물 스크리닝 프로그램에서, 주어진 시간내에 조사할 화합물의 수를 최대화하기 위하여 고처리량(high throughput) 분석들이 바람직할 수 있다. 무-세포 시스템, 가

령, 정제된 또는 반-정제된 단백질로 유도될 수 있는 무-세포 시스템에서 실행되는 분석들은 테스트 화합물에 의해 중재된 분자 표적에서의 변화의 신속한 전개(rapid development) 및 상대적으로 용이한 탐지를 허용하기 위하여 만들어 질 수 있는 “1차” 스크린으로 흔히 바람직하다. 더욱이, 테스트 화합물의 세포 독성 또는 생체 이용성의 효과는 시험관 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있고, 대신, 이 분석은 ActRIIb 폴리펩티드 및 악티빈 사이의 결합 친화력의 변화가 명백히 나타날 수 있기 때문에 표적 분자에서 약물의 효과에 주로 집중한다.

[0165] 단순히 설명하기 위하여, 본 발명의 예시적인 스크리닝 분석에서, 관심 화합물은 악티빈에 일반적으로 결합할 수 있는 단리된 그리고 정제된 ActRIIb 폴리펩티드와 접촉한다. 그 다음 화합물 및 ActRIIb 폴리펩티드의 혼합물에 ActRIIb 리간드를 포함하는 조성물을 첨가한다. ActRIIb/악티빈 복합체의 탐지 및 정량화는 ActRIIb 폴리펩티드 및 악티빈 사이에 복합체 형성을 억제(또는 강화)함에 있어서 화합물의 효과를 판단하기 위한 평균을 제공한다. 화합물의 효과는 테스트 화합물의 다양한 농도를 이용하여 수득한 데이터로부터 약량 반응 곡선을 만들어서 평가할 수 있다. 더욱이, 대조군 분석은 조성물에 대한 기준을 제공하기 위하여 또한 실행할 수 있다. 예를 들면, 대조군 분석에서, 단리된 그리고 정제된 악티빈을 ActRIIb 폴리펩티드를 포함하는 조성물에 추가하고, ActRIIb/악티빈 복합체의 형성은 테스트 화합물 없이 정량화한다. 일반적으로, 반응물이 혼합될 수 있는 순서는 가변적일 수 있고, 동시에 혼합될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 더욱이, 정제된 단백질을 대신하여, 세포의 추출물 및 용해물을 이용하여 적합한 무-세포 분석 시스템을 제공할 수 있다.

[0166] ActRIIb 폴리펩티드 및 악티빈 사이에 복합체 형성은 다양한 기술에 의해 탐지할 수 있다. 예를 들면, 복합체 형성의 조절은 면역 분석 또는 크로마토그래피 탐지에 의해 예를 들면, 탐지가능한 라벨된 단백질 가령 방사능 라벨된 (가령, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C 또는 ³H), 형광 라벨된 (가령, FITC), 또는 효소적으로 라벨된 ActRIIb 폴리펩티드 또는 악티빈을 이용하여 정량화할 수 있다.

[0167] 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIb 폴리펩티드 및 이의 결합 단백질 사이에 상호작용 수준을 직접 또는 간접적으로 측정함에 있어서 형광 편광 분석물과 형광 공명 에너지 전달(FRET) 분석의 사용을 고려한다. 더욱이, 다른 양식의 탐지, 가령, 광도 파도 파도(PCT 공개 WO 96/26432 및 미국 특허 제5,677,196호), 표면 플라즈몬 공명 (SPR), 표면 하전 센서, 그리고 표면 포스 센스와 같은 것들은 본 발명의 많은 구체예에 허용된다.

[0168] 더욱이, 본 발명은 ActRIIb 폴리펩티드 및 이의 결합 단백질 사이에 상호작용을 파괴 또는 강화시키는 물질을 확인하기 위하여 “2개 하이브리드 분석” 이라고도 알려진 상호작용 트랩 분석의 사용을 고려한다, 예를 들면, 미국 특허 제5,283,317호; *Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232*; *Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054*; *Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924*; and *Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696*을 참고한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 ActRIIb 폴리펩티드 및 이의 결합 단백질 사이에 상호작용을 끊어놓는 화합물(가령, 소분자들 또는 펩티드)를 확인하기 위한 역 두 개 하이브리드(reverse two hybrid) 시스템의 사용을 고려한다. 예를 들면, *Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29*; *Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81*; 및 미국 특허 제5,525,490호; 제5,955,280호; 및 제 5,965,368호를 참고.

[0169] 특정 구체예들에서, 대상 화합물들은 본 발명의 ActRIIb 또는 악티빈 폴리펩티드와 상호작용하는 화합물의 능력으로 확인된다. 화합물과 ActRIIb 또는 악티빈 폴리펩티드 사이의 상호작용은 공유 또는 비-공유적일 수 있다. 예를 들면, 이러한 상호작용은 광-교차결합, 방사능라벨된 리간드 결합, 및 친화력 크로마토그래피를 포함하는 시험관 생물화학적 방법을 이용하여 단백질 수준에서 확인할 수 있다(*Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1*). 특정 경우들에서, 화합물들은 악티빈 또는 ActRIIb 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 탐지하기 위한 분석에 근거한 기전에서 스크리닝할 수 있다. 이는 고체 상 또는 유체 상 결합 과정을 포함할 수 있다. 대안으로, 악티빈 또는 ActRIIb 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자는 리포터 시스템 (가령, β-갈락토시다제, 루시페라제, 또는 그린 형광 단백질)과 함께 세포내에 형질감염시키고, 그리고 바람직하게는 고처리량 스크리닝으로 라이브러리에 대해 스크리닝될 수 있고, 또는 라이브러리의 개별 구성요소로 스크리닝될 수 있다. 예를 들면, 자유 에너지에서 변화를 탐지하는 결합 분석과 같은 결합 분석들에 근거한 다른 기전들을 이용할 수 있다. 결합 분석들은 웰, 비드 또는 칩에 고정된 표적 또는 고정된 항체에 의해 포획된 또는 모세관 전기영동에 의해 분해된 표적으로 실행할 수 있다. 결합된 화합물은 비색(colorimetric) 또는 형광 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 통상적으로 탐지할 수 있다.

[0170] 특정 측면에서, 본 발명은 뼈 형성을 조절(자극 또는 억제)하는 그리고 골량을 증가시키는 방법 및 물질을 제공한다. 따라서, 확인된 임의의 화합물은 시험관 또는 생체에서 전체 세포 또는 조직에서 테스트하여 뼈 또는 연골 성장을 조절하는 화합물의 능력을 확인할 수 있다. 당업계에 공지된 다양한 방법들을 이 목적에 이용할 수

있다.

- [0171] 예를 들면, 뼈 또는 연골 성장에서 ActRIIb 또는 악티빈 폴리펩티드 또는 테스트 화합물의 효과는 세포 기준 분석들에서 Msx2의 유도 또는 골조상세포의 골아세포로의 분화를 측정함으로써 결정할 수 있다(가령, *Daluiski et al., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino et al., Front Biosci. 2004, 9:1520-9* 참고). 세포-기반 분석들의 또다른 예는 간엽(mesenchymal) 선조세포 및 골아세포에서 대상 ActRIIb 또는 악티빈 폴리펩티드 및 테스트 화합물의 골형성 활성을 분석하는 것을 포함한다. 설명을 위하여, 전능(pluripotent) 간엽 선조세포 C3H10T1/2 세포, 전골아세포성 C2C12 세포, 및 골아세포성 TE-85 세포를 감염시키기 위하여 악티빈 또는 ActRIIb 폴리펩티드를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 작제할 수 있다. 그 다음 골형성 활성은 알칼리 포스파타제, 오스테오칼신, 및 매트릭스 광화작용의 유도를 측정함으로써 결정한다(가령, *Cheng et al., J Bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8):1544-52* 참고).
- [0172] 본 발명은 뼈 또는 연골 성장을 측정하기 위한 생체내 분석도 고려한다. 예를 들면, *Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001)*은 골절 연구 후 초기 동안 뼈가 복구되는 쥐 골다공증 모델을 설명한다. *Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999)*는 또한 골절을 연구한 후 늦은 기간 동안 뼈가 복구되는 쥐 골다공증 모델을 설명한다. *Andersson et al., J. Endocrinol. 170:529-537*는 마우스의 난소를 제거하여 지주골의 뼈 미네랄 밀도의 약 50%를 상실하고, 실질적인 뼈 미네랄 함량 및 뼈 미네랄 밀도를 감소시킨 마우스 골 다공증 모델을 설명한다. 가령, 부갑상선 호르몬과 같은 인자의 투여에 의해 난소가 제거된 마우스에서 골밀도를 증가시킬 수 있다. 특정 측면에서, 본 발명은 당업계에서 공지되어 있는 골절 치유 분석들을 이용한다. 이러한 분석들은 골절 기술, 조직 분석 및 생물기계적 분석을 포함하는데, 이들은 예를 들면, 미국 특허 제6,521,750호에서 설명하고 있으며, 골절의 원인 및 정도를 측정하는 실험 프로토콜과 이의 복구 과정을 설명하는 전문이 참고문헌에 통합된다.
- [0173] 특정 측면들에서, 본 발명은 ActRIIb 폴리펩티드 및/또는 ActRIIb 리간드의 기능을 길항시킴으로써 근육 성장을 촉진시키고, 근육량을 증가시키기 위한 방법 및 물질들을 제공한다. 따라서, 임의의 확인된 화합물은 시험관 또는 생체에서 전체 세포 또는 조직에서 근육 성장을 조절하는 능력을 확인하기 위하여 테스트될 수 있다. 당분야에 공지된 다양한 방법들을 이 목적을 위하여 이용할 수 있다. 예를 들면, ActRIIb 리간드 (예를 들면, GDF8)에 결합함으로써 활성화된 ActRIIb 단백질을 통하여 신호 변환이 감소되거나 억제되도록 본 발명의 방법을 실행한다. 유기체내 근육 조직의 성장은 ActRIIb 단백질을 통하여 신호 변환이 효과를 가지지 못한 대응하는 유기체(또는 유기체 집단)의 근육량과 비교하였을 때, 유기체내에서 근육량의 증가를 야기할 수 있다는 것을 인지할 것이다.
- [0174] 예를 들면, 근육 세포 성장/분화에서 ActRIIb 폴리펩티드들 또는 테스트 화합물들의 효과는 근원성 세포의 증식과 관련된 Pax-3 및 Myf-5 유전자의 발현과 근육 분화와 관련된 MyoD 유전자의 발현을 측정함으로써 결정할 수 있다(예를 들면, *Amthor et al., Dev Biol. 2002, 251:241-57*). GDF8은 Pax-3 및 Myf-5의 유전자 발현을 하향-조절하고, MyoD의 유전자 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. ActRIIb 폴리펩티드들 또는 테스트 화합물들은 GDF8의 활성을 길항하는 것으로 예상된다. 세포-기반 분석의 또다른 예는 ActRIIb 폴리펩티드들 또는 테스트 화합물들 존재하에 근원세포, 예컨대 C(2)C(12) 근원세포의 증식을 측정하는 것을 포함한다(예를 들면, *Thomas et al., J Biol Chem. 2000, 275:40235-43*).
- [0175] 본 발명은 근육량 및 강도를 측정하기 위한 생체내 분석을 또한 고려한다. 예를 들면, *Whittemore et al. (Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300:965-71)*는 마우스에서 증가된 골근 근육량과 증가된 악력(grip strength)을 측정하는 방법을 공개한다. 선택적으로, 이 방법을 이용하여 근육 질환 또는 몸의 상태, 예를 들면 근육량이 제한적인 질환에서 테스트 화합물(가령, ActRIIb 폴리펩티드들)의 치료 효과를 결정할 수 있다.
- [0176] 본 발명의 스크리닝 분석은 해당 ActRIIb 폴리펩티드들과 ActRIIb 폴리펩티드들의 변이체들, 뿐만 아니라 ActRIIb 폴리펩티드들의 항진제와 길항제를 포함하는 임의의 테스트 화합물들에 적용할 수 있다는 것을 이해해야 한다. 나아가, 이러한 스크리닝 분석은 약물 표적 확인 및 품질 관리 목적에 유용하다.
- [0178] **6. 예시적인 치료 용도**
- [0179] 특정 구체예들에서, 본 발명의 ActRIIb 길항제 (가령, ActRIIb 폴리펩티드)는 동화성 뼈 성장, 골형성 뼈 종양, 및/또는 근육 성장으로부터 이익을 얻게 될 질환 또는 몸의 상태를 치료 또는 예방하는데 이용할 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIb 길항제, 특히 ActRIIb-Fc 구조체들은 암-관련된 골 상실을 치료 또는 예방

하는데 이용할 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIb 길항제, 특히 ActRIIb 폴리펩티드의 치료 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여함으로써, 개체에서 뼈 손상을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 이러한 방법들은 동물, 그리고 더욱 바람직하게는, 인간의 치료 및 예방을 목적으로 한다. 특정 구체예들에서, 본 내용은 낮은 골밀도 또는 감소된 골강도와 연관된 질환 치료를 위하여 ActRIIb 길항제 (특히 가용성 ActRIIb 폴리펩티드 및 ActRIIb를 표적으로 하는 중화 항체)의 용도를 제공한다.

[0180] 여기에서 이용된 것과 같이, 질환 또는 이상을 “예방하는(prevent)” 치료제는 통계적 시료에서 처리안된 대조군 시료와 비교하여 처리된 시료에서 질병 또는 이상의 발생을 감소시키거나, 또는 처리안된 대조군 시료와 비교하여 하나 이상의 질병 또는 이상의 증상의 심각성을 지연 또는 감소시키는 화합물을 지칭한다. “치료(treating)” 는 언급된 이상의 예방 또는 일단 정착된 이상의 개선 또는 제거를 포함한다. 어떤 경우이건, 예방 또는 치료는 의사가 제공하는 진단 및 치료제의 투여로 인한 의도된 결과에 의해 구별할 수 있다.

[0181] 본 내용은 뼈 및/또는 연골 형성을 유도하는 방법, 골 상실을 예방하는 방법, 뼈 광화작용을 증가시키는 방법 또는 뼈의 탈광화작용을 예방하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 대상 ActRIIb 길항제는 인간 및 다른 동물들의 골 상실 질환, 가령, 골다공증의 치료 및 뼈 골질의 치유 그리고 연골 결함 또는 기타 뼈 결함, 손상 및 질환의 치료에 용도를 가진다. ActRIIb 폴리펩티드는 준임상적 낮은 골밀도로 진단을 받은 환자에게서 골다공증 발생에 대한 보호 수단으로서 유용할 수 있다.

[0182] 한 특정 구체예에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 인간 및 기타 동물의 뼈 골질 및 연골 결함의 치유에 의학적 용도로 유용성을 발견할 것이다. 대상 방법 및 조성물들은 폐쇄 및 개방 골절 감소 및 인공 관절의 개선된 고정예 예방적 용도를 또한 가질 수 있다. 골형성 물질에 의해 유도된 새로운 뼈 형성은 선천적, 외상에 의해 유도된 또는 중앙 절단에 의해 유도된 두개안면(craniofacial) 결함의 복구에 기여하고, 그리고 또한 미용 성형 수술에 유용하다. 특정 경우들에서, 대상 ActRIIb 길항제는 뼈-형성 세포를 유인하고, 뼈-형성 세포의 성장을 촉진시키고 또는 뼈-형성 세포의 선조세포의 분화를 유도하는 환경을 제공할 수 있다. 본 발명의 ActRIIb 길항제는 또한 골다공증의 치료에 유용할 수 있다.

[0183] 본 발명의 방법들 및 조성물은 뼈 상실, 예컨대 골다공증 (2차 골다공증을 포함), 부갑상선항진증, Cushing 질환, Paget 질환, 갑상선항진, 만성 설사 상태 또는 흡수 불량, 만성 신장 질환, 신세관성 산증, 또는 신경성 식욕부진에 의한 또는 이들을 야기하는 것을 특징으로 하는 몸의 상태에 적용할 수 있다.

[0184] 골다공증은 다양한 인자들에 의해 야기되거나 또는 이와 연관될 수 있다. 여성이거나, 특히 저체중의 폐경기 여성, 그리고 주로 좌식 생활을 하는 여성은 골다공증 (뼈 미네랄 밀도의 상실로 골절 위험으로 이어진다)에 대해 모두 위험 인자들이다. 다음의 임의의 프로파일을 가진 사람은 ActRIIb 길항제를 이용한 치료에 후보자가 될 수 있다: 폐경기 여성 및 에스트로겐 또는 기타 호르몬 대체 요법을 받지 않는 자; 엉덩이 골절 또는 흡연을 한 개인적 또는 모계력을 가진 자; 키가 크고(5 feet 7 inches 이상(170cm)) 또는 마른(125 파운드(56kg) 미만)의 폐경기 여성; 골 상실과 관련된 임상적 이상을 가진 남성; 코르티코스테로이드 가령, 프레드니손™을 포함하는 골 상실의 원인으로 알려진 약물, 가령 Dilantin™ 및 특정 바르비투르산염과 같은 다양한 항-발작제 약물, 또는 고약량의 갑상선 대체 약물을 복용한 자; 타입 1 당뇨병, 간질환, 신장질환, 골다공증의 가족력을 가진 자; 높은 뼈 회전율(turnover)(가령, 소변 시료에서 과도한 콜라겐)을 가진 자; 갑상선 이상, 가령 갑상선항진증을 가진 자; 약한 외상후에도 골절을 경험한 자; 척추 골절 또는 기타 골다공증 징후가 x-선 사진에 나타난 자.

[0185] 상기에서 명시한 바와 같이, 골다공증은 또다른 질병과 연관된 또는 특정 약물의 사용으로 인한 결과일 수도 있다. 약물 또는 또다른 의학 이상으로 인한 골다공증은 2차 골다공증이라고 한다. Cushing 질환으로 알려진 이상에서, 체내에서 생산된 과도한 양의 코르티솔은 골다공증 및 골절을 야기한다. 2차 골다공증과 연관된 가장 흔한 약물은 부신에 의해 자연적으로 생산되는 호르몬인 코르티솔과 유사한 작용을 하는 약물 종류인 코르티코스테로이드이다. 골격 발달에 적정 수준의 갑상선 호르몬(갑상선샘에서 생산되는)이 필요하지만, 과도한 갑상선 호르몬은 시간을 두고 골량을 감소시킬 수 있다. 2차 골다공증을 야기할 수 있는 기타 약물은 발작을 예방하는데 사용되는 페니토인 (Dilantin) 및 바르비투르산염; 메토틱렉세이트 (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), 일부 형태의 관절염, 암 및 면역 질환에 대한 약물; 사이클로스포린 (Sandimmune, Neoral), 자가면역 질환을 치료하고, 장기 이식 환자에서 면역 시스템을 억제하는데 이용되는 약물; 전립선 암 및 자궁내막염의 치료에 이용되는 황체형성 호르몬-방출 호르몬 항진제(Lupron, Zoladex); 헤파린 (Calciparine, Liquaemin), 응고방지 약물; 그리고 고콜레스테롤 치료에 이용된 콜레스티라민 (Questran) 및 콜레스티폴 (Colestid)을 포함한다.

[0186] 암 요법으로 인한 골 상실은 광범위하게 인지되고 있고, 암 요법에 의해 유도된 골 상실 (CTIBL)이라고 명한다.

뼈 전이는 뼈에 구멍을 만들 수 있고, ActRIIb 길항제를 이용한 치료에 의해 교정될 수 있다.

[0187]

바람직한 구체예에서, 여기에서 공개된 ActRIIb 길항제들, 특히 가용성 ActRIIb는 암 환자에게 이용될 수 있다. 여기에서 설명된 것과 같이, ActRIIb-Fc 융합 단백질은 인간 환자들에게서 동화성 골 성장을 촉진시킬 수 있다. 동화성 뼈 물질들은 다발성 골수종을 치료하는데 유용하다고 설명하였다 (예를 들면, *Yaccoby et al., Blood, 109(5):2106-11 (2007); Oyajobi et al., Br J Haematol. 139(3):434-8 (2007); Fulciniti et al., Blood, 114(2): 371-9 (2009); Stewart et al. Journal of Cellular Biochemistry 98:1-13 (2006)*). 따라서, 여기에서 설명된 악티빈-ActRIIb 길항제들은 다발성 골수종 및 기타 뼈 종양들을 치료하는데 유용할 것으로 본다. 특정 종양 (가령, 전립선, 유방, 다발성 골수종 또는 부갑상선기능항진증을 야기하는 임의의 종양)을 가진 환자들은 종양에 의해 유도된 골 상실 뿐만 아니라 뼈 전이 및 치료제로 인한 골상실로 인하여 골 상실의 위험에 있다. 이러한 환자들은 골 상실 또는 뼈 전이의 증거 없이도 ActRIIb 길항제로 치료를 할 수 있다. 골 상실 또는 뼈 전이 증거에 대해 환자들은 또한 모니터링하고, 위험이 증가되었다고 지표가 제안하는 경우 ActRIIb 길항제로 치료할 수 있다. 일반적으로, DEXA 스캔을 이용하여 골밀도의 변화를 평가하고, 뼈 재구성의 지표를 이용하여 뼈 전이 가능성을 평가할 수 있다. 혈청 표식을 모니터링할 수 있다. 뼈 특이적 알칼리 포스파타제 (BSAP)는 골아세포에 존재하는 효소다. BSAP의 혈액 수준은 뼈 전이 및 뼈 재구성을 증가시키는 기타 이상을 가진 환자에서 증가한다. 오스테오칼신 및 프로콜라겐 펩티드는 또한 뼈 형성 및 뼈 전이와 또한 관련된다. 전립선암으로 인한 뼈전이 환자에서 BSAP가 증가되었음이 탐지되었고, 다소 정도는 약하지만 유방암으로부터 뼈 전이된 환자에서도 BSAP가 증가되었음이 탐지되었다. 뼈 형성 단백질-7 (BMP-7) 수준은 뼈로 전이된 전립선 암에서 높지만, 방광, 피부, 간 또는 폐암으로 인한 뼈 전이에서는 높지 않다. 타입 I 카르복시-말단 텔로펩티드 (ICTP)는 뼈의 재흡수 동안 형성된 콜라겐에서 발견되는 교차링크(crosslink)다. 뼈는 끊임없이 분해되고, 재형성되기 때문에, ICTP는 신체 어느 부위에서도 발견할 수 있다. 그러나, 뼈 전이 부위는 정상 뼈 부위보다 더 높은 수준일 것이다. ICTP는 전립선, 폐 및 유방암으로 인한 뼈 전이에서 높은 수준임을 발견하였다. 또다른 콜라겐 교차링크, 타입 I N-말단 텔로펩티드 (NTx)는 뼈 회전(turnover) 동안 ICTP와 함께 생성된다. NTx의 양은 폐암, 전립선암, 및 유방암을 포함하는 상이한 많은 유형으로 인한 뼈 전이에서 증가된다. 또한, NTx 수준은 뼈 전이의 진행과 함께 증가한다. 따라서, 이러한 표식을 이용하여 전이를 탐지하고 질환의 정도를 측정할 수 있다. 재흡수의 다른 표식은 피리디노린(pyridinoline) 및 테옥시피리디노린을 포함한다. 재흡수 표식 또는 뼈 전이 표식에서 임의의 증가는 환자에서 ActRIIb 길항제 요법이 필요하다는 것을 나타낸다.

[0188]

ActRIIb-Fc는 골아세포 활성화 (예를 들면, BSAP 수준)의 표식들에 대해 명백한 효과를 가지기 때문에, ActRIIb-Fc 분자들은 암-관련된 뼈 손실에 특히 유용할 것이고, 이때 뼈 질환은 골아세포성 특징 보다는 골용해성 성질을 가진다. 이는 일반적으로 다발성 골수종과 다양한 종양들로부터 뼈 전이의 사실이다. 그러나, 특히, 전립선암으로부터 뼈 전이는 골아세포성 성질인 경향을 가지기 때문에, ActRIIb-Fc 융합 단백질들은 이러한 경우에 유용하지 않을 수 있다.

[0189]

ActRIIb 길항제는 다른 약제학적 물질과 공동으로 투여할 수 있다. 공동 투여는 단일 공동-제형, 동시 투여 또는 분리된 시간에 투여에 의해 이루어질 수 있다. ActRIIb 길항제는 다른 뼈-활성 물질과 투여한다면 특히 유익할 수 있다. 환자는 ActRIIb 길항제와 칼슘 보충제, 비타민 D, 적절한 운동 및/또는, 일부 경우 다른 약물을 함께 제공받음으로써 이익을 얻을 수 있다. 기타 약물의 예는 비스포스포네이트 (알렌드로네이트, 이반드로네이트 및 리세드로네이트), 칼시토닌, 에스트로겐, 부갑상선 호르몬 및 람옥시펜을 포함한다. 비스포스포네이트 (알렌드로네이트, 이반드로네이트 및 리세드로네이트), 칼시토닌, 에스트로겐 및 람옥시펜은 뼈 재구성 주기에 영향을 주고, 그리고 항-재흡수성 약물로 분류된다. 뼈 재구성은 두 가지 별개 단계로 구성된다: 뼈 재흡수 및 뼈 형성. 항-재흡수성 약제는 뼈-재구성 주기의 뼈 재흡수 부분을 지연 또는 중단시키지만, 주기의 뼈 형성 부분을 지연시키지는 않는다. 그 결과, 새로운 형성은 뼈 재흡수보다 더 빠른 속도로 지속되고, 그리고 골밀도는 시간이 경과함에 따라 증가할 수 있다. 부갑상선 호르몬 형태인 테리파라티드는 뼈 재구성 주기에서 뼈 형성 속도를 증가시킨다. 알렌드로네이트(Alendronate)는 폐경후 골다공증의 예방(1주에 1회 일일 5 mg 또는 35 mg) 및 치료 (1주일에 1회, 일일 10 mg 또는 70 mg)용으로 승인을 받았다. 알렌드로네이트는 골 상실을 감소시키고, 골밀도를 증가시키고, 척추, 손목, 엉덩이 골절 위험을 감소시킨다. 알렌드로네이트는 글루코코르티코이드 약제(가령, 프레드니손 및 코르티손)의 장기 사용 결과로 남녀에서 글루코코르티코이드 유도된 골다공증의 치료 및 남성의 골다공증 치료에 승인받았다. 알렌드로네이트와 비타민 D는 폐경기 여성에서 골다공증의 치료 (일주일에 1회 70 mg+ 비타민 D)와 골다공증을 가진 남성에서 골량을 개선시키기 위한 치료에 승인을 받았다. 이반드로네이트(Ibandronate)는 폐경후 골다공증의 예방 및 치료용으로 승인되었다. 한 달에 한 알(150 mg)을 복용할 경우, 이반드로네이트는 매일 동일한 날짜에 복용해야만 한다. 이반드로네이트는 골 상실을 감소시키고, 골밀도를 증가시키고, 척추 골절 위험을 감소시킨다. 리센드로네이트(Risedronate)는 폐경후 골다공증의 예방

및 치료용으로 승인되었다. 매일(5 mg 1회분 투여량) 또는 매주(35 mg 1회분 투여량 또는 35 mg 1회분 투여량+칼슘) 복용한다면, 리센드로네이트는 골 상실을 지연시키고, 골밀도를 증가시키고 그리고 척추 및 비-척추 골절 위험을 감소시킨다. 리센드로네이트는 또한 글루코코르티코이드 약제 (가령, 프레드니손 또는 코르티손)의 장기 복용으로 인한 글루코코르티코이드-유도된 골다공증의 예방 및/또는 치료용으로 남녀에 사용 승인받았다. 칼시토닌은 칼슘 조절 및 뼈 대사에 관련된 자연 발생 호르몬이다. 5년 이상 생리가 중단된 여성의 경우, 칼시토닌은 골 상실을 지연시키고, 척추 골밀도를 증가시키고, 그리고 뼈 골절과 관련된 통증을 완화시킬 수 있다. 칼시토닌은 척추 골절 위험을 감소시킨다. 칼시토닌은 주사(일일 50-100 IU) 또는 비강 스프레이(일일 200 IU)로 이용가능하다. 에스트로겐 요법 (ET)/호르몬 요법 (HT)은 골다공증 예방에 승인을 받았다. ET는 척추 및 엉덩이 모두에서 골 상실을 감소시키고, 골밀도를 증가시키고, 그리고 폐경 여성의 엉덩이 및 척추 골절 위험을 감소시킨다. ET는 낮은 1회분 투여량인 대략 0.3 mg의 일일 투여량 또는 일일 대략 0.625 mg의 표준 1회분 투여량을 제공하는 알약 또는 피부 패취의 형태로 흔히 대부분 투여되며, 70세 이후에도 효과가 있다. 에스트로겐만을 복용할 경우, 자궁 내면의 암 발생(자궁내막암) 위험을 증가시킬 수 있다. 이러한 위험을 감소시키기 위하여, 의료 제공자는 자궁이 온전한 여성들에게 호르몬 프로게스틴을 에스트로겐 (호르몬 대체 요법 또는 HT)과 복합하여 처방한다. ET/HT는 폐경 증후를 완화시키고, 뼈 건강에 유익한 영향을 주는 것으로 나타났다. 부작용은 질 출혈, 유방 유연함, 변덕 및 담당 질환을 포함할 수 있다. 일일 60mg의 랄옥시펜(Raloxifene)은 폐경 골다공증의 예방 및 치료로 승인되었다. 랄옥시펜은 잠재적 단점없이 에스트로겐의 유익한 효과를 제공하기 위해 개발된 선택적 에스트로겐 수용체 조절물질 (SERMs)로 불리는 약물 부류다. 랄옥시펜은 골량을 증가시키고 척추 골절 위험을 감소시킨다. 랄옥시펜이 엉덩이 및 다른 비-척추 골절의 위험을 감소시킬 수 있다고 설명할 만한 데이터는 없다. 부갑상선 호르몬 형태인 테리파라티드(Teriparatide)는 폐경 여성의 골다공증 및 골절 위험이 있는 남성의 골다공증 치료에 승인되었다. 이 약물은 새로운 뼈 형성을 자극하고 그리고 뼈 미네랄 밀도를 상당히 증가시킨다. 폐경 여성의 척추, 엉덩이, 발, 늑골 및 손목에서 골절 감소가 기록되었다. 남성의 경우, 척추의 골절 감소가 기록되었지만, 다른 부위에서 골절 감소를 평가할 충분한 데이터는 없었다. 테리파라티드는 최대 24시간 동안 매일 주사에 의해 자가-투여한다.

[0190] 여기에서 나타난 것과 같이, ActRIIb 길항제들은 또한 근육 성장을 촉진시키는데 유용하며, 그리고 그것 자체로 근육-관련된 장애들을 가진 숙주에 유용할 것이다. 예시적인 근육-관련된 몸의 상태는 신경근 장애들 (예를 들면, 근위축증과 근육 위축증), 울혈성 폐쇄성 폐질환 (그리고 COPD와 관련된 근육 소모), 근육 소모증후군, 근육감소증, 악액질, 지방 조직 장애들 (예를 들면, 비만), 유형 2 당뇨병, 그리고 뼈 퇴행성 질환 (예를 들면, 골다공증)을 포함한다. 기타 몸의 상태는 근퇴행성 및 신경근 장애들, 조직 복구(예를 들면, 상처 치유), 신경 퇴행성 질환 (예를 들면, 근위축성 측색 경화증), 면역 장애들 (예를 들면, 림프구의 비정상적인 증식 또는 기능과 관련된 장애들), 그리고 합지방 세포의 비정상적인 증식과 관련된 비만 또는 장애들을 포함한다.

[0191] 특정 구체예들에서, ActRIIb 길항제들은 근위축증의 치료 일부로 이용한다. 용어 “근위축증”은 골격 근육 및 일부 경우 심장 및 호흡기 근육의 점진적 쇠약 및 악화를 특징으로 하는 퇴행성 근육 질환군을 말한다. 근위축증은 근육에서 미시적인 변화로 시작되는 진행성 근육 소모 및 쇠약을 특징으로 하는 유전적 장애다. 근육이 시간이 경과함에 따라 퇴행되면, 인간의 근육 강도는 쇠퇴한다. ActRIIb 폴리펩티드들을 포함하는 섭생으로 치료할 수 있는 예시적인 근위축증은 다음을 포함한다: Duchenne 근위축증 (DMD), Becker 근위축증 (BMD), Emery-Dreifuss 근위축증 (EDMD), 지대형(Limb-Girdle) 근위축증 (LGMD), 안면견갑상완형 (Faciocapulothoracic) 근위축증 (FSH 또는 FSHD) (Landouzy-Dejerine으로도 알려짐), 위축성 근경직증(MMD) (또한 Steinert 질환으로도 알려짐), 안인두형(Oculopharyngeal) 근위축증 (OPMD), 원위(Distal) 근위축증 (DD), 선천성 근이영양증(CMD).

[0192] Duchenne 근위축증 (DMD)은 1860년대에 프랑스 신경학자, Guillaume Benjamin Amand Duchenne에 의해 처음으로 설명되었다. Becker 근위축증 (BMD)은 1950년대 DMD의 변이체를 처음으로 설명한 독일의 의사 Peter Emil Becker의 이름을 딴 것이다. DMD는 남성에서 3,500명당 한 명꼴로 영향을 주는 가장 빈번한 유전 질환중의 하나다. X 염색체의 짧은 팔에 있는 디스트로핀(dystrophin) 유전자가 파괴될 때 DMD이 일어난다. 남자만 X 염색체의 하나의 복사체를 가지고 있기 때문에, 오직 남자들만 디스트로핀 유전자의 하나의 복사체를 가진다. 디스트로핀 단백질이 없다면, 근육은 수축과 이완 주기 동안 쉽게 손상을 받는다. 질환 근육의 초기에는 재생에 의해 보상되지만, 나중에 근육 조상 세포는 진행중인 손상을 따라갈 수 없고, 건강한 근육은 비-기능적 섬유-지방 조직으로 대체된다. 근육 및 뼈에 이중 효과는 근위축증 환자들에게 유용할 것이다.

[0193] BMD는 디스트로핀 유전자에서 상이한 돌연변이로 인한 것이다. BMD 환자들은 약간의 디스트로핀을 가지고 있지만, 양적으로 불충분하고, 질적으로도 좋지 않다. 일부 디스트로핀은 BMD 환자의 근육을 DMD 환자와 같이 대단

히 또는 신속하게 퇴행되는 것으로부터 보호한다.

- [0194] 예를 들면, 최근 연구는 생체내에서 GDF8 (ActRIIb 리간드)의 기능을 차단 또는 제거하면 DMD 및 BMD 환자들에게서 최소한 특정 증상을 효과적으로 치료할 수 있다는 것을 설명한다. 따라서, 해당 ActRIIb 길항제들은 GDF8 억제제들(길항제들)처럼 작용할 수 있으며, 그리고 DMD 및 BMD 환자들에서 생체내 GDF8 및/또는 ActRIIb의 기능을 차단하는 대안 수단을 구성할 수 있다. ActRIIb-Fc 단백질은 근위축증 마우스 모델에서 근육량을 증가시키는 것을 보여주었다(미국 공개 번호 2009/0005308 참고).
- [0195] 유사하게, 해당 ActRIIb 길항제들은 근육 성장이 필요한 기타 질환 상태에서 근육량을 증가시키는 효과적인 수단을 제공한다. 예를 들면, Lou Gehrig 질환으로도 불리는 ALS (운동 신경 질환)은 뇌를 골 근육에 연결시키는 CNS의 성분인 운동 뉴우런을 공격하는 만성적, 불치의 그리고 막을 수 없는 CNS 장애다. ALS에서, 비록 인간의 뇌는 정상적으로 기능을 유지하고 기민하지만, 운동 뉴우런은 쇠퇴하여 결국에는 죽게 되고, 움직이라는 명령은 결코 근육에 도달하지 못한다. ALS에 걸리는 대부분 사람은 40 내지 70내다. 약화된 첫 운동 신경은 팔 또는 다리로 이어지는 신경들이다. ALS에 걸린 사람들은 보행 장애가 있을 수 있고, 물건을 떨어뜨리고, 넘어지고, 발음이 명확하지 않거나 또는 감당하기 어려울 정도로 울 수도 있다. 결국, 사지의 근육은 사용하지 않음으로 퇴화되기 시작한다. 이러한 근육은 쇠약하게 될 것이며, 사람은 휠체어가 필요하게 될 것이며 또는 침대 밖에서 정상적으로 활동할 수 없게 될 것이다. 대부분 ALS 환자들은 질병 개시 3-5년 폐렴과 같이 호흡 부전 또는 인공 호흡 장치의 합병증으로 죽게된다. ActRIIb-Fc 단백질은 ALS의 마우스 모델의 외양, 근육량 및 수명을 개선시키는 것을 보여주었다(미국 공개 번호 2009/0005308 참고).
- [0196] ActRIIb 길항제들-유도된 증가된 근육량 또한 근육 소모질환을 앓고 있는 사람들에게 유익할 수 있다. GDF8 발현은 인간에서 체지방량 지수와 역관계에 있으며, GDF8 유전자의 증가된 발현은 AIDS 소모증후군을 앓는 남성에서 체중 감소와 연관있는 것으로 관찰되었다. AIDS 환자들에게서 GDF8의 기능을 억제시킴으로써, ADIS의 최소한 특정 증상은 완전히 제거되지 않는다면 경감될 수 있고, 따라서 AIDS 환자들의 삶의 질을 상당히 개선시킨다.
- [0197] GDF8 (ActRIIb 리간드) 기능의 상실은 영양소 섭취 감소없이 지방 손실과 또한 관련있기 때문에, 해당 ActRIIb 길항제들은 나아가 비만 및 유형 II 당뇨병의 발달을 낮추거나 억제하는 치료제로 이용될 수 있다. 이러한 방법은 여기에서 제공되는 데이터로 확인되고 뒷받침되며, 이로 인하여 ActRIIb-Fc 단백질은 비만 아무스에서 대사 상태를 개선시키는 것을 보여주었다.
- [0198] 암 식욕 부진-악액질 증후군은 암의 가장 쇠약하게 만들고, 생명을 위협하는 측면이다. 암 식욕 부진-악액질 증후군에서 진행성 체중 감소는 많은 유형의 암의 공통적인 특징이며, 열악한 삶의 질과 화학요법에 대한 저조한 반응의 원인이며, 뿐만 아니라 체중 감소 없는 필적하는 종양을 가진 환자에서 볼 수 있는 것보다 더 짧은 생존 시간의 원인이다. 식욕 부진, 지방 및 근육 조직 소모, 심리학적 고통 및 낮은 삶의 질과 관련된 악액질은 암과 숙주간의 복잡한 상호작용으로 일어난다. 암 환자들의 사망의 가장 흔한 원인 중에 하나이며, 사망시 80%에 존재한다. 이는 단백질, 탄수화물 및 지방 대사에 영향을 주는 대사 혼란의 복잡한 예가 된다. 현재, 이 과정을 조절하거나 역전시키는 치료는 없다.
- [0199] 암 식욕 부진-악액질 증후군은 중간 대사에서 사이토킨 생산, 지질-이동 및 단백질분해-유도 인자들의 방출에 영향을 준다. 식욕 부진은 공통적이지만, 음식물 섭취의 감소만으로 암환자들에서 볼 수 있는 체성분의 변화를 설명할 수 없고, 영양분 섭취를 증가시키는 것으로 소모증후군을 역전시킬 수 없다. 암 환자에서 병이 있기 전 체중의 5% 이상 본의 아니게 6개월 이내에 감소된다면 악액질을 의심해야 한다.
- [0200] 성취에서 GDF8의 전신 과발현은 인간 악액질 증후군에서 볼 수 있는 것과 유사한 심각한 근육 및 지방 감소를 유도하는 것으로 나타났기 때문에, 약제학적 조성물으로써 해당 ActRIIb 길항제들은 근육 성장이 바람직한 악액질 증후군의 증상을 예방, 치료 또는 경감시키는데 유익하게 이용될 수 있다.
- [0201] 다른 구체예들에서, 본 발명은 동물에서 체지방 함량을 조절하고, 이와 관련된 몸의 상태, 특히 건강을 해치는 상태를 치료 또는 예방하는 조성물 및 방법들을 제공한다. 본 발명에 따르면, 체중을 조절(관리)하는 것은 체중의 감소 또는 증가, 체중 증가율을 감소 또는 증가시키거나, 또는 체중 감소율을 증가 또는 감소시키는 것을 말할 수 있으며, 그리고 또한 체중을 적극적으로 유지시키거나, 또는 체중이 심각하게 변화되지 않는 것(예를 들면, 체중의 증가 또는 감소시킬 수 있는 외부 또는 내부 영향에 대항하여)을 포함한다. 본 발명의 한 구체예는 ActRIIb 길항제를 필요로 하는 동물(예를 들면, 인간)에 ActRIIb 길항제를 투여하여 체중을 조절하는 것에 관한 것이다.

[0202] 한 특정 구체예에서, 본 발명은 동물에서 체중의 감소 및/또는 체중 증가의 감소를 위한 화합물 및 방법들, 특히, 비만 위험이 있는 또는 비만으로 고통을 받는 환자들에게서 비만을 치료하거나 경감시키는 화합물 및 방법들에 관한 것이다. 또다른 특정 구체예에서, 본 발명은 체중 증가가 불가능한 또는 체중 유지가 안되는 동물(예를 들면, 소모중후군을 앓는 동물)을 치료하기 위한 방법들 및 화합물들에 관한 것이다. 이러한 방법들은 체중 및/또는 체질량을 증가 또는 감소시키는데 유효하며, 또는 바람직하지 않을 정도로 낮은(예를 들면, 건강하지 못한) 체중 및/또는 체질량과 관련된 또는 이로 인한 몸의 상태를 개선시키는데 유효하다.

[0204] **7. 투여량(Dosing)**

[0205] 특정 구체예들에서, 본 내용은 환자에게 ActRIIb 폴리펩티드를 투여하는 방법들을 제공한다. 본 내용의 방법들은 원하는 기간동안 ActRIIb 단백질의 최적의 혈청 농도를 제공하는 투약 일정으로 ActRIIb 단백질을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 환자는 환자에게 투여되는 ActRIIb 폴리펩티드의 양과 ActRIIb 폴리펩티드가 환자에게 투여되는 빈도의 바람직한 조합을 포함하는 일정으로 투약을 받을 수 있다. 이러한 투약 일정에 이용되는 ActRIIb 폴리펩티드는 여기에서 설명된 임의의 것일 수 있으며, 예컨대 서열 번호: 2, 3, 13, 17, 또는 20으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 서열 번호: 2, 3, 13, 17, 또는 20으로부터 선택된 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. ActRIIb 폴리펩티드는 천연 ActRIIb 폴리펩티드의 기능적 단편, 예컨대, 서열 번호: 1-3로부터 선택된 서열 또는 C-말단에서 10 내지 15개 아미노산 (“꼬리”)가 없는 서열 번호: 2의 서열의 최소한 10, 20 또는 30개 아미노산을 포함하는 단편을 포함한다. 특정 구체예들에서, ActRIIb 폴리펩티드는 ActRIIb의 부분에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하며, 여기에서 ActRIIb 폴리펩티드의 N-말단은 서열 번호:1의 아미노산 19-25로부터 선택된 아미노산 잔기에 상응하며 그리고 ActRIIb 폴리펩티드의 C-말단은 서열 번호:1의 아미노산 109-134로부터 선택된 아미노산 잔기에 상응한다. 바람직한 구체예들에서, ActRIIb 폴리펩티드는 여기에서 설명된 ActRIIb-Fc 융합 단백질이다.

[0206] ActRIIb 폴리펩티드의 최적의 혈청 농도를 얻기위하여 환자는 투약받을 수 있다. 최적의 혈청 농도는 예를 들면, 생체내에서 원하는 생물학적 효과를 촉진시키는데 충분한 혈청 농도이다. 이러한 생물학적 효과들은 골 성장을 촉진시키고, 골 밀도를 증가시키고, 낮은 골 밀도와 연관된 장애의 치료 또는 예방하고, 신경근 장애들, 지방 조직 장애들, 대사 장애들, 신경퇴행성 장애들, 근육 소모장애들, 또는 암을 치료하는 것을 포함하는 여기에서 설명된 임의의 치료 효과들을 포함한다.

[0207] 여기에서 설명된 것과 같이, 본 내용의 ActRIIb 폴리펩티드들은 환자들의 ActRIIb 폴리펩티드 혈청 농도가 최소한 10 µg/ml에 도달하여 유지할 때 일관적인 생물학적 효과를 설명한다. 따라서, 특정 구체예들에서, 최소한 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12.5 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 또는 최소한 70 µg/ml의 ActRIIb 혈청 농도를 유지하는 투약 일정으로 ActRIIb 폴리펩티드를 환자에게 투여할 수 있다. 특정 구체예들에서, ActRIIb 폴리펩티드의 혈청 농도를 최적의 범위, 예를 들면, 약 8 µg/ml 내지 약 100 µg/ml 범위(예를 들면, 8-100 µg/ml, 8-70 µg/ml, 8-50 µg/ml, 8-40 µg/ml, 8-35 µg/ml, 8-30 µg/ml, 8-25 µg/ml, 8-20 µg/ml, 8-15 µg/ml, 8-12.5 µg/ml, 8-10 µg/ml, 10-100 µg/ml, 10-70 µg/ml, 10-50 µg/ml, 10-40 µg/ml, 10-35 µg/ml, 10-30 µg/ml, 10-25 µg/ml, 10-20 µg/ml, 10-15 µg/ml, 10-12.5 µg/ml, 12-100 µg/ml, 12-70 µg/ml, 12-50 µg/ml, 12-40 µg/ml, 12-35 µg/ml, 12-30 µg/ml, 12-25 µg/ml, 12-20 µg/ml, 12-15 µg/ml, 15-100 µg/ml, 15-70 µg/ml, 15-50 µg/ml, 15-40 µg/ml, 15-35 µg/ml, 15-30 µg/ml, 15-25 µg/ml, 15-20 µg/ml, 20-70 µg/ml, 20-50 µg/ml, 20-35 µg/ml, 또는 20-30 µg/ml) 범위내로 유지시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0208] 특정 구체예들에서, 본 내용의 투약 일정은 원하는 기간 동안 ActRIIb 단백질의 바람직한 혈청 농도를 유지시키는데 충분한 양과 간격으로 ActRIIb 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함한다. 환자에게서 ActRIIb의 바람직한 혈청 농도를 유지하기 위한 바람직한 기간은 원하는 생물학적 효과 (예를 들면, 뼈 장애의 치료)에 따라 달라질 것이다. 예를 들면, 약 1주 내지 1년 또는 그 이상의 기간(예를 들면, 5 일, 7 일, 10 일, 11 일, 12 일, 13 일, 14 일, 15 일, 16 일, 20 일, 25 일, 30 일, 1 내지 2주, 1주 내지 1개월, 2개월, 4개월, 6개월, 1년 또는 2년 이상에 걸쳐 원하는 혈청 농도를 유지하기 위하여)에 걸쳐 원하는 혈청 농도를 유지하는데 충분한 양과 간격으로 ActRIIb 단백질을 환자에게 투여할 수 있다. 바람직하게는, 치료 과정에서 원하는 혈청 농도를 유지하는데 충분한 양과 간격으로 ActRIIb 단백질을 환자에게 투여할 수 있다. 특정 구체예들에서, 투약 일정은 투약 간격 사이(예를 들면, ActRIIb 투여 사이) ActRIIb의 원하는 혈청 농도를 유지하는데 충분하다.

[0209] 여기에서 공개된 것과 같이, ActRII 폴리펩티드들의 생물학적 효과들은 0.3 mg/kg 또는 이 이상의 투약으로 수

득될 수 있다. 따라서, 특정 구체예들에서, 약 0.3 내지 약 15 mg/kg (예를 들면, 0.3mg/kg, 0.5mg/kg, 1.0mg/kg, 1.5mg/kg, 2.0mg/kg, 3.0mg/kg, 4.0mg/kg, 5.0mg/kg, 7.0mg/kg, 10.0mg/kg, 12.0mg/kg, 또는 15.0 mg/kg)의 ActRIIb 폴리펩티드를 환자에게 투여할 수 있다. 바람직한 구체예들에서, 최소한 1.0 mg/kg을 환자에게 투여한다. 추가로, 하기 실험에서 ActRIIb-Fc 융합 단백질의 혈청 반감기는 약 10일 내지 16 일 사이인 것을 나타낸다. 따라서, 특정 측면들에서, 본 발명의 ActRIIb 단백질은 최소 한 달에 한번 환자에게 투약될 수 있다(예를 들면, 5-30 일, 10-16 일, 5 일, 7 일, 10 일, 11 일, 12 일, 13 일, 14 일, 15 일, 또는 16 일에 한번; 또는 한달에 한번 또는 2달에 한번꼴).

[0211] **8. 약제학적 조성물**

[0212] 특정 구체예들에서, 본 발명의 ActRIIb 길항제 (가령, ActRIIb 폴리펩티드)는 약제학적으로 수용되는 운반체와 함께 조제한다. 예를 들면, ActRIIb 폴리펩티드는 단독으로 투여할 수 있거나 또는 약제학적 조제물(치료 조성물)의 성분으로 투여할 수 있다. 대상 화합물은 인간 또는 동물 약물에 이용하기 위한 임의의 통상적인 방식으로 투여하도록 조제될 수 있다.

[0213] 특정 구체예들에서, 본 발명의 치료 방법은 조성물을 전신으로 투여하거나 또는 이식물 또는 장치로 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. 투여하였을 때, 본 발명에 이용되는 치료 조성물은 발열물질-없는, 생리학적으로 수용되는 형태다. 상기에서 설명한 것과 같이, 조성물에 또한 임의로 포함시킬 수 있는 ActRIIb 길항제 이외의 치료에 유용한 물질은 본 발명의 방법에서 대상 화합물(가령, ActRIIb 폴리펩티드)과 동시에 또는 연속적으로 투여할 수 있다.

[0214] 전형적으로, ActRIIb 길항제는 장관외, 특히 정맥내 또는 피하로 투여할 것이다. 장관외 투여에 적합한 약제학적 조성물은 하나 이상의 ActRIIb 폴리펩티드와 하나 이상의 약제학적으로 수용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 유상액, 또는 사용직전 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 재구성시킬 수 있는 멸균 분말을 포함할 수 있고, 항산화제, 완충액, 세균발육억제제, 예정 수용자의 혈액과 제형이 등장성이 되도록 만드는 용질, 또는 현탁 또는 농후제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 이용될 수 있는 예시적인 적합한 수성 및 비수성 운반체는 물, 에탄올, 폴리올 (가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 그리고 이와 유사한 것들), 및 이의 적합한 혼합물들, 식물성 오일, 가령, 올리브 오일, 그리고 주사용 유기 에스테르, 가령, 에틸 올레이트를 포함한다. 예를 들면, 가령 레시틴과 같은 피복 물질을 이용함으로써, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기를 유지시킴으로써, 그리고 계면활성제를 사용함으로써 적절한 유동성을 유지시킬 수 있다.

[0215] 더욱이, 조성물은 표적 조직 부위 (가령, 뼈 또는 근육)로 전달하기 위하여 포집 또는 주사될 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 표적 조직 부위 (가령, 뼈)에 하나 이상의 치료 화합물(가령 ActRIIb 폴리펩티드)를 운반할 수 있는 매트릭스를 포함할 수 있는데, 매트릭스는 조직을 발달시키고, 신체로 재흡수될 수 있는 구조를 제공한다. 예를 들면, 매트릭스는 ActRIIb 폴리펩티드의 지연 방출을 제공할 수 있다. 이러한 매트릭스는 기타 이식된 의료 용도에 현재 사용하는 물질의 형태일 수 있다.

[0216] 매트릭스 물질의 선택은 생체적합성, 생체분해성, 기계적 성질, 미용적 외양 및 접촉(interface) 성질에 근거한다. 해당 조성물의 특정 용도는 적절한 제형을 한정시킬 것이다. 조성물용 잠재적 매트릭스는 생분해가능하고, 화학적으로 정의된 황산 칼슘염, 삼인산칼슘염, 하이드록시아파타이트, 폴리락트산 및 폴리안하이드리드이다. 기타 잠재적 물질은 생분해가능한 그리고 생물학적으로 잘 정의된 가령 뼈 또는 피부 콜라겐이다. 추가 매트릭스는 순수 단백질 또는 세포의 매트릭스 성분들을 포함한다. 기타 잠재적 매트릭스는 생분해불가능한, 그리고 화학적으로 한정된, 가령 소결 하이드록시아파타이트, 바이오글라스, 알루미늄산염, 또는 기타 세라믹이다. 매트릭스는 상기 언급된 유형의 임의의 물질의 조합물을 포함할 수 있는데, 가령 폴리락트산 및 하이드록시아파타이트 또는 콜라겐 및 삼인산칼슘염을 포함할 수 있다. 바이오세라믹은 가령 칼슘-알루미늄산염-인산염의 조성물로 변경될 수 있고, 포어 크기, 입자 크기, 입자 모양 및 생분해성을 변경시키도록 처리될 수 있다.

[0217] 특정 구체예들에서, 본 발명의 방법은 가령, 캡슐, 교감, 알약, 정제, 마름모꼴 알약(향이 나는 베이스, 통상 슈크로즈 및 아카시아 또는 트라가탄을 이용), 분말, 과립형태의 또는 수성 또는 비-수성 액체의 용액 또는 현탁액, 또는 수중유 또는 유중수 유상액, 또는 엘릭시르 또는 시럽 또는 향이 든 정제(가령 젤라틴 및 글리세린 또는 슈크로즈 및 아카시아와 같은 비활성 베이스를 이용), 및/또는 구강 세척제 및 이와 유사한 형태로 경구로

투여할 수 있으며, 각각은 활성 성분으로 예정된 양을 포함한다. 물질은 큰 환약(bolus), 연약(electuary) 또는 페스트(paste)로 투여할 수도 있다.

[0218] 경구 투여 (캡슐, 정제, 알약, 당과, 분말, 과립 및 이와 유사한 것)용 고형 투약형의 경우, 본 발명의 하나 이상의 치료 화합물은 하나 이상의 약제학적으로 수용되는 운반체, 가령 구연산나트륨 또는 인산이칼슘, 및/또는 다음중 임의의 것과 혼합될 수 있다: (1) 충전제 또는 증량제, 가령 전분, 락토즈, 슈크로즈, 글루코즈, 만니톨, 및/또는 규산; (2) 결합제, 가령, 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오즈, 알긴산, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로즈, 및/또는 아카시아; (3) 흡습제, 가령 글리세롤; (4) 붕해제, 가령 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산나트륨; (5) 용액 지체제, 가령 파라핀; (6) 흡수 가속화제, 가령 4가 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 가령, 예를 들면, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 가령 카올린 및 벤토나이트 클레이; (9) 윤활제, 가령, 활석, 스테아레이트 칼슘, 스테아레이트 마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 설페이트 나트륨, 및 이의 혼합물; 그리고 (10) 발색제. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약제학적 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 타입의 고체 조성물은 락토즈 또는 유당 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 및 이와 유사한 것을 부형제를 이용하여 연질 및 경질 충전된 젤라틴 캡슐의 충전제로 이용할 수 있다.

[0219] 경구 투여를 위한 액체 투약형은 약제학적으로 수용되는 유상액, 미소유상액, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 성분에 추가로, 액상 투약형은 당업계 통상적으로 이용되는 비활성 희석제, 가령, 물 또는 기타 용매, 가용화제 및 유화제, 가령, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조네이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 배, 올리브, 카스터 및 참깨유), 글리세롤, 테트라하이드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 비활성 희석제에 추가하여, 경구 조성물은 어쥬번트, 습윤제, 유화제, 현탁제, 감미제, 풍미, 향료, 발색제, 및 보존제를 포함할 수 있다.

[0220] 활성 화합물에 추가하여, 현탁액은 현탁제 가령, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 및 소르비탄 에스테르, 미소결정 셀룰로오즈, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸 그리고 이의 혼합물을 포함한다.

[0221] 본 발명의 조성물은 어쥬번트, 가령, 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 포함할 수 있다. 다양한 항균 및 항곰팡이제, 예를 들면, 파라젠, 클로로부탄올, 페놀 소르브산, 및 이와 유사한 것을 포함시켜 미생물 작용 억제력을 담보할 수 있다. 등장 물질, 가령, 슈가, 염화나트륨, 및 이와 유사한 것을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 약제형의 장시간 흡수는 흡수를 지연시키는 물질, 가령 모노스테아레이트 알루미늄 및 젤라틴을 포함시켜 야기시킬 수 있다.

[0222] 투약 섭생은 본 발명의 대상 화합물(가령, ActRIIb 길항제들)의 작용을 변형시키는 다양한 인자들을 고려하여 담당 의사가 결정할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 다양한 인자는 형성되는 바람직한 뼈의 양, 상실된 골밀도 수준, 뼈 손상 부위, 손상된 뼈의 상태, 환자의 나이, 성별 및 식이, 골 상실에 기여할 수 있는 임의 질환의 중증도, 투여 시간 및, 기타 임상적 인자들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 임의로, 투약은 재구성에 이용된 매트릭스 유형 및 조성물내 화합물의 유형에 따라 달라질 것이다. 최종 조성물에 기타 공지의 성장 인자를 추가하면 투약에 영향을 줄 수 있다. 진행은 뼈 성장 및/또는 복구의 주기적 평가, 예를 들면, X-rays (DEXA 포함), 조직형태학적 판단 및 테트라사이클린 라벨링에 의해 모니터링할 수 있다.

[0223] 하기에 나타난 실험에서 뼈에 대한 ActRIIb-Fc의 효과는 1 mg/kg 또는 이 이상의 단일 투약으로 얻을 수 있다는 것을 설명한다. 이 분자의 관찰된 혈청 반감기는 약 10 일 내지 16 일 사이이다. 따라서 지속된 효과적인 혈청 수준은 예를 들면, 매주 또는 2주마다 약 0.5 내지 5 mg/kg의 양을 투약하여 얻을 수 있다. 예를 들면, 0.3mg/kg, 0.5mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg, 3mg/kg 또는 5 mg/kg 또는 이 사이 값의 투약을 7일에 한번, 10일에 한번, 15일에 한번 또는 한달에 한번 또는 두달에 한번 이용할 수 있다. 다른 예시적인 투약 일정은 상기에서 제공한다.

[0224] 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIb 폴리펩티드의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 또한 제공한다. 이러한 요법은 상기 언급한 질환을 가진 세포 또는 조직으로 ActRIIb 폴리뉴클레오티드 서열을 도입시킴으로써 이의 치료 효과를 달성할 수 있다. ActRIIb 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 재조합 발현 벡터 가령, 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산 시스템을 이용하여 이루어질 수 있다. ActRIIb 폴리뉴클레오티드 서열의 치료요법적 전달에 바람직한 것은 표적화된 리포솜의 이용이다.

[0225] 여기에서 교시하는 것과 같이, 유전자 요법으로 이용할 수 있는 다양한 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 백시니아, 또는, 바람직하게는, RNA 바이러스 가령, 레트로바이러스를 포함한다. 바람직하게는, 레트로바이러스 벡터는 뮤린 또는 조류 레트로바이러스의 유도물이다. 단일 외부 유효량을 삽입할 수 있는 레트로바이러스 벡터의 예는 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), Harvey 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 및 라우스 육종 바이러스 (RSV)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 많은 추가적인 레트로바이러스 벡터는 다중 유전자를 통합할 수 있다. 이들 모든 벡터는 선택가능한 표식에 대한 유전자를 운반 또는 통합할 수 있어, 형질전환된 세포를 확인 및 생성할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예를 들면, 슈가, 당지질 또는 단백질을 부착함으로써 표적-특이적으로 만들 수 있다. 바람직한 표적화는 항체를 이용하여 실시한다. 당업자는 특정 폴리뉴클레오티드 서열을 레트로바이러스 게놈으로 삽입하거나 바이러스 외피에 부착시켜, ActRIIb 폴리뉴클레오티드를 포함하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적 전달을 허용할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 바람직한 구체예에서, 벡터는 뼈 또는 연골을 표적으로 한다.

[0226] 대안으로, 조직 배양 세포에 전형적인 인산칼슘염 형질감염에 의해 레트로바이러스 구조적 유전자 *gag*, *pol* 및 *env*를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염시킬 수 있다. 그 다음 이들 세포들은 관심 유전자를 포함하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성 세포는 배양 배지로 레트로바이러스 벡터를 방출한다.

[0227] ActRIIb 폴리뉴클레오티드의 또다른 표적화된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드 및 수중유 유상액, 혼합된 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 본 발명의 바람직한 콜로이드성 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 시험관 및 생체에서 전달 비이클로 유용한 인공 막 소포다. RNA, DNA 및 고유 비리온은 수성 내부안에 포집되어, 생물학적 활성 형태로 세포에 전달될 수 있다(가령, *Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981* 참고). 리포솜 비이클을 이용하여 효과적으로 유전자를 전달하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 가령, *Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988*을 참고한다. 리포솜 조성물은 인지질과 통상적으로 스테로이드, 특히 콜레스트롤과 복합물이다. 기타 인지질 또는 기타 지질을 이용할 수도 있다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온 강도 및 이가 양이온의 존재에 따라 달라진다.

[0228] 리포솜 생산에 유용한 예시적인 지질은 포스파티딜 화합물, 가령 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 스펅고리피드, 세레브로시드, 및 강글리오시드를 포함한다. 실례가 되는 인지질은 난 포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린, 및 디스테아로일포스파티딜콜린을 포함한다. 리포솜의 표적화는 예를 들면, 장기-특이성, 세포-특이성, 및 기관-특이성에 기초하여 가능하며, 당업계에 공지되어 있다.

[0229] **구체예**

[0230] 본 발명은 지금 일반적으로 설명하며, 본 발명의 특정 구체예를 설명하기 위한 목적으로 포함된 다음의 실시예들을 참고하여, 더 용이하게 이해할 수 있지만, 본 발명을 이에 한정시키지는 않는다.

[0231] **실시예 1: ActRIIb-Fc 융합 단백질들.**

[0232] 출원인은 인간 또는 마우스 Fc 도메인과 인간 ActRIIb의 세포의 도메인이 이들 사이에 최소한의 링커(3개 글리신 아미노산)에 의해 융합된 가용성 ActRIIb 융합 단백질을 만들었다. 이 구조체를 각각 ActRIIb-hFc 와 ActRIIb-mFc로 명명하였다.

[0233] CHO 세포계로부터 정제된 ActRIIb-hFc는 다음과 같다(서열 번호: 13)

[0234] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK

[0235] GCWLDDFNCYDRQECVATEENPVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT

[0236] APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK

[0237] FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL

[0238] PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

[0239] PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLS

[0240] LSPGK

[0242] ActRIIb-hFc 및 ActRIIb-mFc 단백질들은 CHO 세포계에서 발견되었다. 3가지 상이한 리더 서열을 고려하였다:

[0243] (i) 꿀벌 벨리틴(HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (서열 번호: 14)

[0244] (ii) 조직 플라스미노겐 활성화물질(TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (서열 번호: 15)

[0245] (iii) 고유: MGAAAKLAFVFLISCSGA (서열 번호: 16).

[0247] 선택된 형태는 TPA 리더와 다음의 처리안된 아미노산 서열을 가진다:

[0248] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCE

[0249] GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCE

[0250] GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD

[0251] TLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV

[0252] LTVLHODWLNKKEYKCKVSNKALPVPVEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ

[0253] VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ

[0254] GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 17)

[0256] 이 폴리펩티드는 다음의 핵산 서열에 의해 인코딩된다(서열 번호:18):

[0257] A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG
 AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGTGCA CTGACTACGC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG GCTAGATGAC TTCAACTGCT
 ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGTTCCTACTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 CAGCACCTGA ACTCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA
 AGCCGCGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACATC TCCAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA
 CCCTGCCCC ATCCGGGAG GAGATGACCA AGAACAGGT CAGCCTGACC TGCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTCTCTC TATAGCAAGC
 TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGT AAATGA

[0258] CHO-세포에서 생산된 물질의 N-말단 서열에서 GRGEAE의 주요 서열이 나타났다 (서열 번호: 19). 명백하게는 문헌에서 보고된 다른 구조체들은 SGR... 서열로 시작한다.

[0259] 정제는 예를 들면, 다음의 세 가지 이상의 연속 컬럼 크로마토그래피를 포함하는 일련의 컬럼 크로마토그래피를 임의의 순서로 실시하여 정제를 할 수 있다. : 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 마무리될 수 있다.

[0260] ActRIIb-Fc 융합 단백질들은 또한 HEK293 세포 및COS 세포에서 발견되었다. 모든 세포계의 물질 및 합당한 배양 조건이 생체내 근육을 구축하는 단백질을 제공하였지만, 세포계 선택 및/또는 배양 조건과 관련하여 효능의 다양성이 관측되었다. 정제는 상기 명세서에서 설명된 것과 같이 이루어졌다.

[0262] **실시예 2: ActRIIb-Fc 돌연변이체의 생성**

[0263] 출원인은 ActRIIb의 세포의 도메인에서 일련의 돌연변이를 만들고, 세포의 ActRIIb와 Fc 도메인 사이에 가용성 융합 단백질로서 이들 돌연변이 단백질들을 만들었다. 기본 ActRIIb-Fc 융합체는 다음의 서열을 가진다(밑줄부분은 Fc 부분)(서열 번호:20):

- [0264] SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHGYASWRNSSGTIELVK
- [0266] *KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCEGFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP
- [0267] TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
- [0268] KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
- [0269] LPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
- [0270] QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
- [0271] SLSPGK

[0273] N- 및 C-말단 절두를 포함하는 다양한 돌연변이들은 기본 ActRIIb-Fc 단백질로 도입되었다. 실시예 1에서 제시한 데이터에 근거하여, TPA 리더와 함께 발현된다면, 이들 구조는 N-말단 세린이 부족할 것으로 예상된다. PCR 돌연변이 유발에 의해 ActRIIb 세포의 도메인에서 돌연변이가 생성되었다. PCR 후, Qiagen 컬럼을 통하여 단편들을 정제하였고 SfoI 및 AgeI으로 절단하였고, 겔 정제하였다. 이들 단편들을 발현 벡터 pAID4 (W02006/012627)에 결합시켜, 결합에 의해 인간 IgG1와 융합 키메라가 만들어졌다. 대장균(*E. coli*) DH5 알파로 형질변환시에, 콜로니를 선택하여, DNA를 단리시켰다. 뮤린 구조체(mFc)의 경우, 뮤린 IgG2a는 인간 IgG1를 대신하였다. 모든 돌연변이체는 서열로 확인하였다.

[0274] 모든 돌연변이체는 일시적 형질감염에 의해 HEK293T 세포에서 생산되었다. 요약하면, 500ml 스피너에서, HEK293T 세포는 250ml 용적의 Freestyle (Invitrogen) 배지에서 6×10^5 세포/ml에서 셋업되었고, 하룻밤 동안 성장시켰다. 다음 날, 이들 세포를 0.5 µg/ml의 최종 DNA 농도에서 DNA:PEI (1:1)로 처리하였다. 4시간 후, 250 ml 배지를 추가하였고, 세포는 7일간 성장시켰다. 조건화 배지는 세포를 회전에 의해 가라앉히고(spin down), 농축시켜 수거하였다.

[0275] 돌연변이체는 예를 들면, 단백질 A 컬럼과 낮은 pH (3.0)의 글리신 완충액으로 용리시키는 것을 포함한 다양한 기술을 이용하여 돌연변이체를 정제하였다. 중화후, PBS에 대해 투석하였다.

[0276] 유사한 방법으로 CHO 세포에서 돌연변이를 또한 만들었다.

[0277] 하기에서 설명하는 결합 분석 및/또는 생체분석으로 돌연변이체를 테스트하였다. 일부 경우에서, 분석은 정제된 단백질보다는 조건화 배지로 실시하였다.

[0279] **실시예 3. GDF-11 및 악티빈-매개된 신호생성에 대한 생체분석.**

[0280] A-204 리포터 유전자 분석을 이용하여 GDF-11 및 악티빈 A에 의한 신호생성에서 ActRIIb-Fc 단백질들의 효과를 평가하였다. 세포계: 인간 황문근육종(근육으로부터 유도됨). 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12 (*Denler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100*에서 설명됨.) 도 1 참고. CAGA12 모티프는 TGF-베타 반응성 유전자(PAI-1 유전자)에 존재하여, 이 벡터는 Smad2 및 3을 통한 인자 신호생성에 일반적으로 이용된다.

[0281] 1일: A-204 세포를 48-웰 플레이트에 분배한다.

[0282] 2일: A-204 세포는 10 µg의 pGL3(CAGA)12 또는 pGL3(CAGA)12(10 µg)+ pRLCMV (1 µg)과 Fugene으로 형질감염된다.

[0283] 3일: 인자들을 첨가한다(배지+ 0.1 % BSA로 희석됨). 억제제들은 세포에 첨가하기 전 1시간 동안 인자들과 사전-향온처리할 필요가 있다. 6 시간 후, 세포를 PBS로 헹구고, 세포를 용해시킨다.

[0284] 이 다음 Luciferase 분석을 한다. 임의의 억제제들 없이, 악티빈 A는 리포터 유전자 발현의 10배 자극 및 ~ 2 ng/ml의 ED50을 나타낸다. GDF-11: 16배 자극, ED50: ~ 1.5 ng/ml.

[0285] 이 분석에서 ActRIIb(R64, 20-134)는 악티빈, GDF-8 및 GDF-11 활성의 강력한 억제제다. 변이체들도 이 분석에서 테스트되었다.

[0287] **실시예 4: 인간 임상 시험, 단일 상승 투약.**

[0288] 건강한 폐경기 여성에서 이 단백질의 안전성을 주로 평가하기 위하여 실행된 무작위, 이중맹검, 플라시보-조절된 연구에서 실시예 1에서 설명된 ActRIIb(20-134)-hFc 단백질은 인간 환자들에게 투여하였다. 48명의 개체를 8명씩 6개 군으로 무작위로 나누고, ActRIIb-hFc 또는 플라시보의 단일 투약을 제공받았다(6명은 활성물질: 2명은 플라시보). 투약 수준은 피하(SC) 투여된 0.02 내지 3.0 mg/kg의 범위였다. 모든 개체들은 57일간 추적하였다. 연구 참가 6개월 이내에 뼈 대사에 영향을 주는 약물을 복용한 개체들은 연구 참가에서 배제시켰다. 안전성 평가는 투약 점증을 결정하기 위하여 각 군에서 다음과 같이 실행되었다. 약물동태학 (PK) 분석에 추가하여, ActRIIb-hFc의 생물학적 활성은 뼈 형성 및 재흡수 그리고 FSH 수준의 생화학적 표식을 측정함으로써 또한 평가되었다.

[0289] 본 연구에서 심각한 부작용은 보고되지 않았다.

[0290] ActRIIb-hFc의 PK 분석에서 투약에 대해 선형 프로파일을 나타내고, 대략 10-16 일의 평균 반감기를 나타내었다(도 2 참고). ActRIIb-hFc에 대한 곡선 아래 면적(AUC)는 투약에 대해 선형이었으며, SC 투약후 흡수도는 기본적으로 완벽하였다. 더 높은 양으로 투약후, ActRIIb-hFc는 이중 에너지 X-레이 흡광 광도 분석(DXA) 스캔을 이용하여 설명된 것과 같이(도 3 참고) 체지방량(LBM)을 증가시켰다. 기저선과 비교하였을 때, 3 mg/kg에서 투약 후 2개월 시점에서 2.6% (0.92 kg)이었다. 플라시보 처리된 군은 0.2% 감소되었다. 더 높은 약량(1 및 3 mg/kg)에서 투약된 더 많은 개체는 ActRIIb-hFc으로 투약한 후 빠르면 15일 이내 LBM이 최소 0.5kg 증가되었고, 플라시보와 더 낮은 약량으로 투약한 경우와 비교하였을 때, 57일까지 유지되었다(도 4 참고). 1 mg/kg 및 3 mg/kg에서 ActRIIb-hFc을 투약받은 개체들에게서 지방 대사의 혈청 생체표식에서 유의적인 투약-의존적 변화가 측정되었다(증가된 아디포넥틴과 감소된 렙틴) (도 5 및 6 참고). ActRIIb-hFc는 동화적 골 성장의 표식인 골-특이적 알카리 포스파타제 (BSAP)의 혈청 수준에서 신속하고, 지속적인 투약-의존적 증가를 야기하였고, 뼈 재흡수의 표식인 C-말단 유형 1 콜라겐 텔로펩티드 (CTX)에서 투약-의존적 감소를 야기하였다(도 7 및 8 참고). BSAP 수준은 약물의 최대 투약에서 거의 포화 효과를 나타내었는데, 이는 이러한 동화적 뼈 생체 표식에서 최대 효과의 절반은 1 mg/kg 또는 이보다 낮은 약량에서 수득될 수 있음을 나타낸다. 이러한 뼈 생체표식 변화는 테스트된 최대 투약 수준에서 대략 57일 지속되었다. 또한 악티빈의 억제와 일관되게 혈청 FSH 수준에서도 투약-의존적 감소가 있었다(도 9 참고).

[0291] ActRIIb-hFc를 1 및 3 mg/kg에서 단일 투약후 29일 시점에서 자기공명영상(MRI)으로 대퇴부 근육 체적의 증가를 관찰하였는데, 플라시보와 비교하였을 때 최대 투약 (3 mg/kg)에서 유의적인 증가가 있었다(도 10 참고). 특히, 3 mg/kg의 ActRIIb-hFc를 단일 투약으로 투여한 후 29일 시점에서, 근육 면적이 16.4% 증가, 근육 체적이 11.5% 증가, 그리고 피하 지방이 2.2% 감소되었음이 관찰되었다. 플라시보와 비교하였을 때, 1 및 3 mg/kg 투약 수준에서 29일 시점에서 대퇴부 근육 체적의 기저선으로부터 평균 변화율은 도 11에 나타난다.

[0292] 건강한 폐경기 여성에게 제공된 단일투약의 ActRIIb-hFc는 테스트된 투약 범위에서 안전하고, 내성이 있었다. 이러한 임상 시험은 인간에서 ActRIIb-hFc가 뼈 형성의 증가 및 뼈 재흡수의 감소에 대한 생물학적 증거를 가진 골동화물질(osteoblastic agent)임을 설명한다. ActRIIb-hFc는 또한 근육 크기 및 기능을 증가시킨다.

[0294] **실시예 5: 인간 임상 시험, 다중 상승 투약.**

[0295] 건강한 폐경기 여성에게서 ActRIIb-hFc의 안전성, 내성, PK 및 PD 효과들을 주로 평가하기 위하여, 무작위, 이중맹검, 플라시보-조절된 다중-투약, 투약-상승 연구를 실시하였다. 각 10명으로 구성된 6개 군이 연구에 포함되었다. 각 군의 개체들은 무작위로 ActRIIb-hFc 또는 플라시보(군당 8명의 활성 물질을 제공받은 개체와 2명의 플라시보를 제공받은 개체를 포함)를 제공받았다.

[0296] 각군은 다음과 같이 투약받았다: 1군 (0.1 mg/kg), 2군 (0.3 mg/kg) 및 3군 (1 mg/kg)은 1일, 15일 및 29일 시점에 총 3회 투약으로 매 14일 마다 ActRIIb-hFc를 피하(SC)로 제공받았다. 4군(1 mg/kg), 5군 (2 mg/kg), 및 6군(3 mg/kg)은 1일 및 29일 시점에서 총 2회 투약으로 매 28일 마다 ActRIIb-hFc SC로 제공받았다.

[0297] 다음의 데이터를 평가하였다: 부작용, 임상 시험실 테스트(혈액학, 화학, 소변검사, 내분비 기능 테스트, 부신 기능 테스트, ACTH 자극 테스트), 양와위 혈압 (최소한 5 분후) 및 기립 혈압 (2분 ± 30 초 후)을 포함하는 생명 징후, ECG, 초음파 심전도(ECHO), 신체 검사 및 항-약물 항체들. 약물동태학: 혈청 ActRIIb-hFc 농도 곡선

아래 면적(AUC), 피크 농도(Cmax), 피크 농도까지의 시간(Tmax), 제거 반감기($t_{1/2}$), 제거(CI/F) 및 분포 체적(V_z/F). 약력학: FSH, 전신 DXA 스캔으로 측정된 체지방량, 요추, 엉덩이 및 전신 DXA 스캔으로 측정된 뼈 광물 밀도(BMD), 3-6군에서 MRI 스캔으로 측정된 근육 크기, 그리고 약력학 효과의 기타 표식들.

[0298] 도 14에서 볼 수 있는 것과 같이, ActRIIb-hFc의 혈청 농도는 투약량과 빈도와 관련있었다. 눈에 띄는 것은, 28일마다 2 mg/kg 및 3 mg/kg 투약으로 현저한 파곡(trough)과 함께 높은 피크 농도를 얻었다. 14일마다 제공된 1 mg/kg 투약은 더 작은 파곡과 함께 상승하는 농도를 얻었다. 제2 투약 후, 14일 마다 제공된 1 mg/kg는 환자들에서 대략 $12\mu\text{g/ml}$ 이상의 평균 혈청 농도를 유지하였고, 28일마다 제공된 2 mg/kg 및 3 mg/kg 투약은 각각 약 $8\mu\text{g/ml}$ 과 $10\mu\text{g/ml}$ 의 평균 파곡을 나타내었다. 도 15에서 나타난 바와 같이, 혈청 농도에서 파곡은 FSH에서의 효과가 반영되었다. FSH 생산은 악티빈에 의해 자극된 것으로 보이며, 따라서 악티빈 길항제, 예컨대 ActRIIb-hFc를 이용하면 FSH 생산이 억제될 것으로 예상된다. 사실, ActRIIb-hFc의 모든 투약에서 FSH의 약간의 억제가 나타났다. 이는 도 15에서 X-축 아래로 떨어지는 자취로 나타난다. 흥미로운 것은, 14일마다 제공된 1 mg/kg 투약으로 투약 기간 동안 FSH 억제에서 큰 감소는 나타나지 않았지만, 28일 마다 제공된 2 mg/kg 및 3 mg/kg 투약은 FSH 생산에서 실질적으로 증가되었고(그러므로 FSH 억제의 감소), 이는 혈청 농도의 파곡에 상응하였다(대략 15일 내지 36일 시점 사이). 우리는 혈청 농도를 8 또는 $10\mu\text{g/ml}$ 과 같이 낮게 떨어뜨리는 방식으로 ActRIIb-hFc 단백질들을 투약하면 약물에 의한 악티빈 신호생성의 억제와 아마도 에서 기타 리간드들, 예컨대 미오스타틴 또는 GDF-11의 억제도 일시적으로 없어지게 된다는 결론을 내렸다. 눈에 띄는 것은 14일 마다 제공된 1 mg/kg 투약은 2 mg/kg 및 3 mg/kg으로 덜 빈번하게 투약한 것보다는 총 체지방량으로 측정하였을 때 근육량이 더 많이 증가된 것으로 보였다(도 16 참고). 28일마다 제공된 2 mg/kg 및 3 mg/kg 투약에서 환자들은 연구 동안 총 4 또는 6 mg/kg을 제공받았고, 14일마다 제공된 1 mg/kg 투약에서 환자들은 연구 동안 겨우 총 3 mg/kg을 제공받았다. 그럼에도 불구하고, 더 낮은, 더 빈번한 투약은 근육량에 명백한 더 큰 효과를 제공하였다(이 연구에서 통계학적 유의성에 도달하지 않는 경향으로 나타났다). 더 낮은 투약에서 이러한 우수한 효과는 FSH에서 효과로 나타난 것과 같이 더 빈번한 투약 섭생으로 더 지속된 리간드 억제가 발생하기 때문인 것으로 예측된다. 결과적으로, 약 $8\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$ 또는 $12\mu\text{g/ml}$ 이상으로 혈청 농도를 유지시키는 투약 섭생은 ActRIIb-hFc 작용 방식에 근거한 약물에 대해 최적의 효과를 제공할 것으로 예상된다. 이 결론은 혈청 반감기에도 불구하고, 이러한 단백질들이 야생형 ActRIIb-hFc와 같은 범위에서 악티빈 및 미오스타틴/GDF-11에 대한 친화력을 보유한다면, 광범위한 배열의 ActRIIb-hFc 단백질들에 적용되어야 할 것이다.

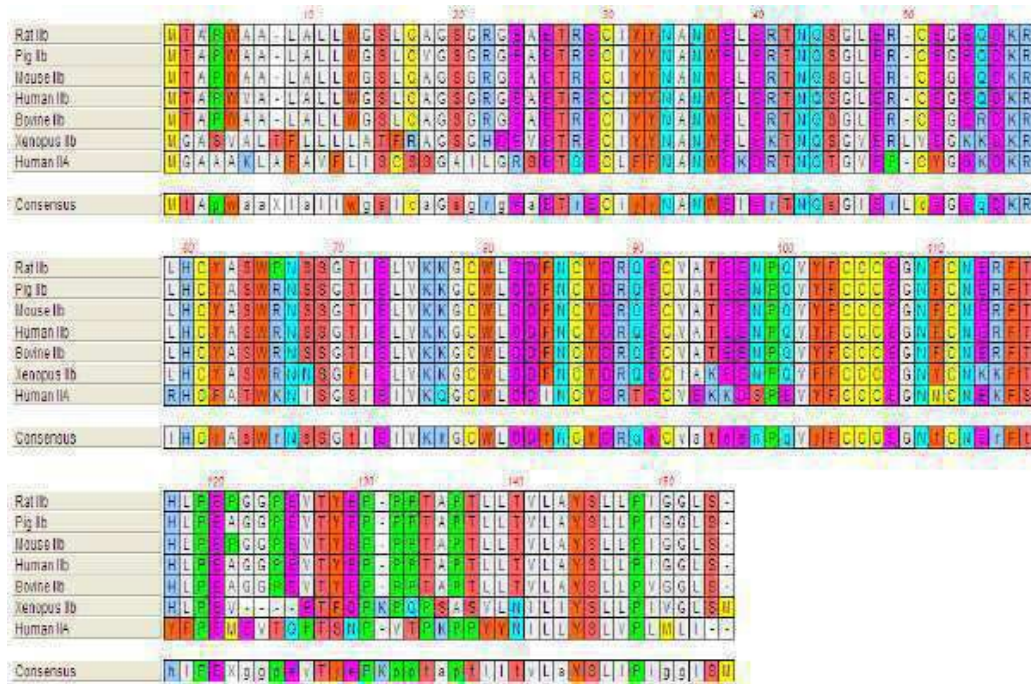
[0299] **참고자료에 통합**

[0300] 여기에서 언급한 모든 공고 및 특허는 각 개별 공고 또는 특허가 전문이 참고문헌에 명시적으로 그리고 특별히 언급된 것처럼 이들의 전문이 참고문헌에 통합된다.

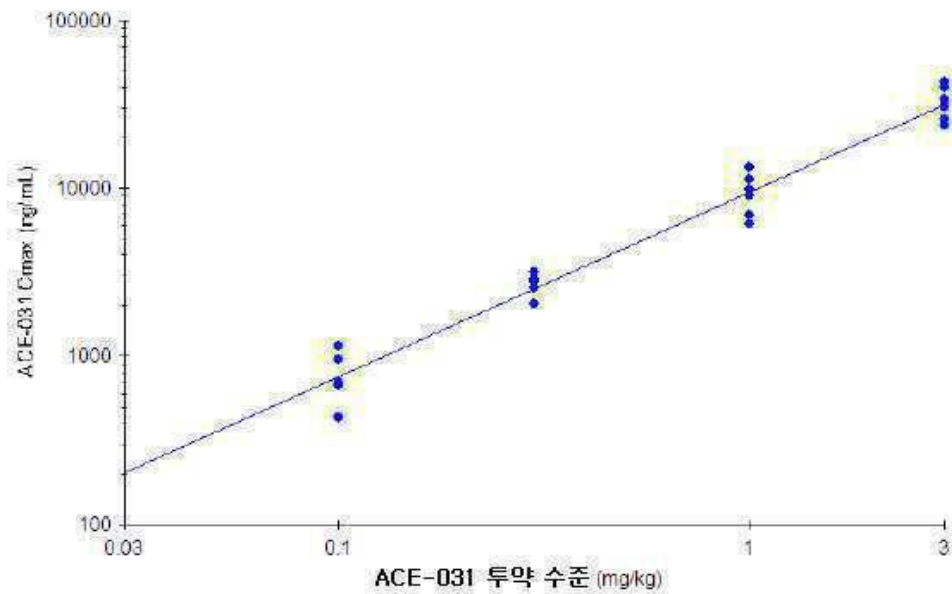
[0301] 주체의 특정 구체예들이 논의되고, 상기 명세서에서 설명하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 명세서 및 하기 청구범위에 의거하여 당업계에 공지되어 숙련자에게는 많은 변이들이 자명할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 청구 범위 및 이에 등가의 범위, 명세서 및 이러한 명세서의 변이를 참고하여 결정되어야만 한다.

도면

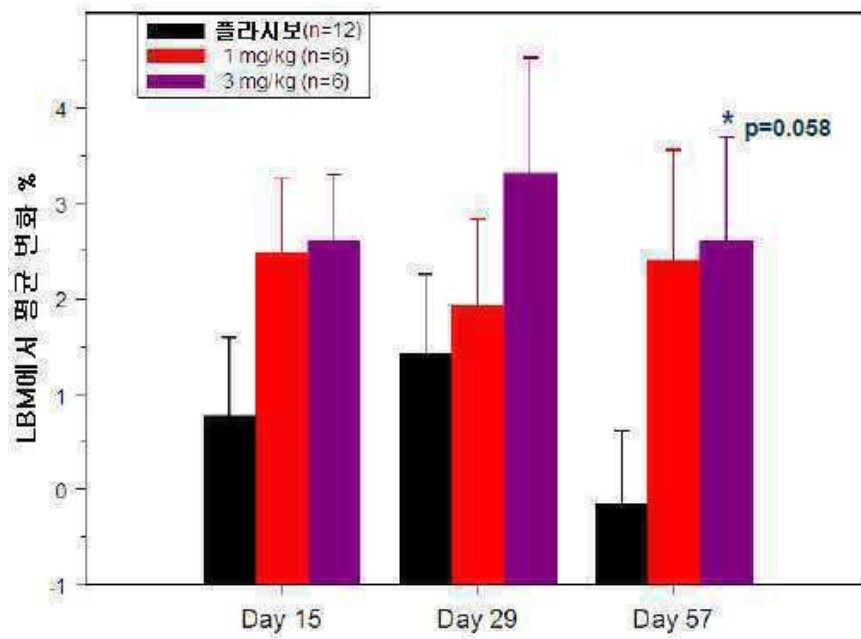
도면1



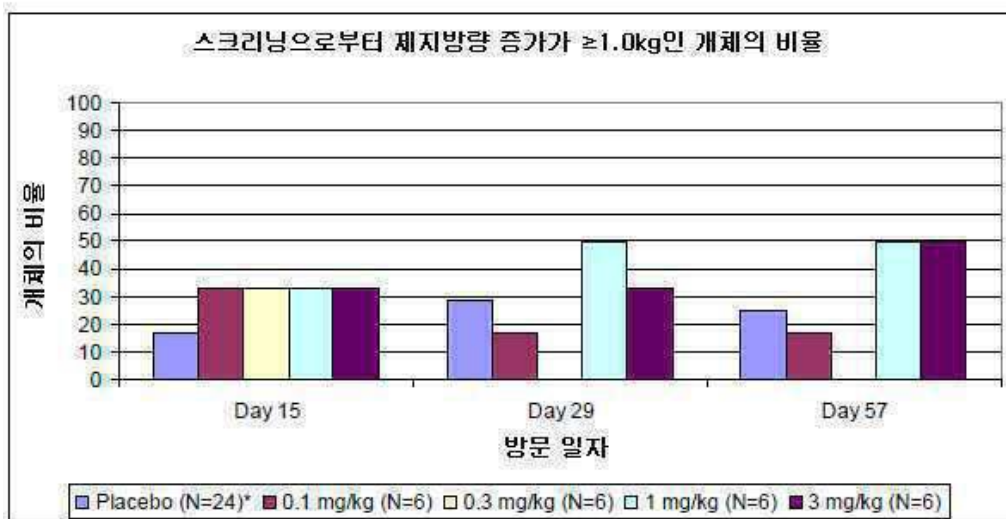
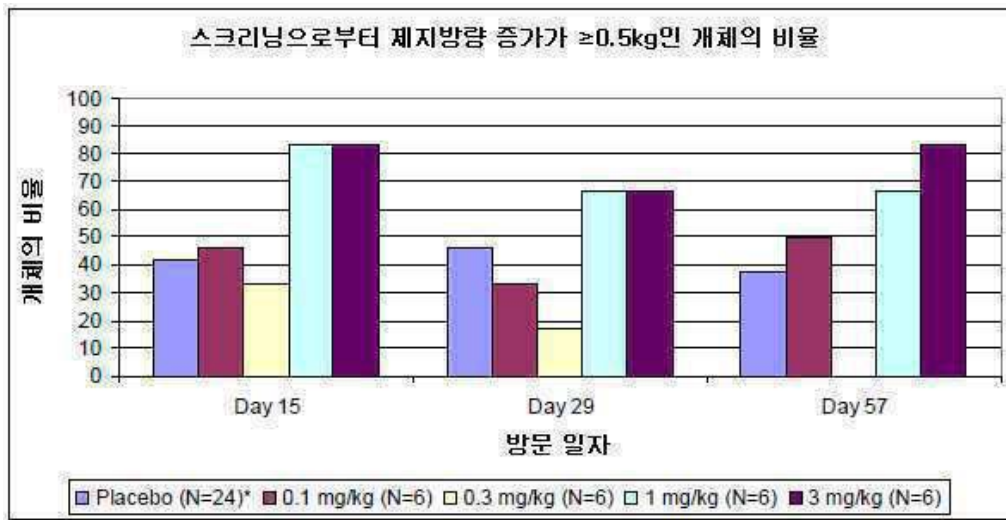
도면2



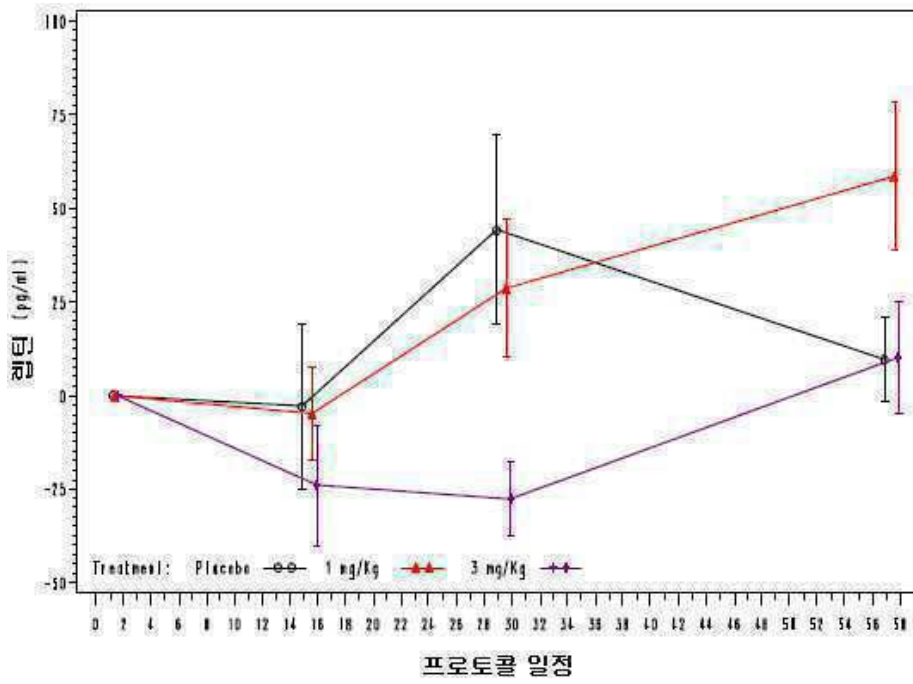
도면3



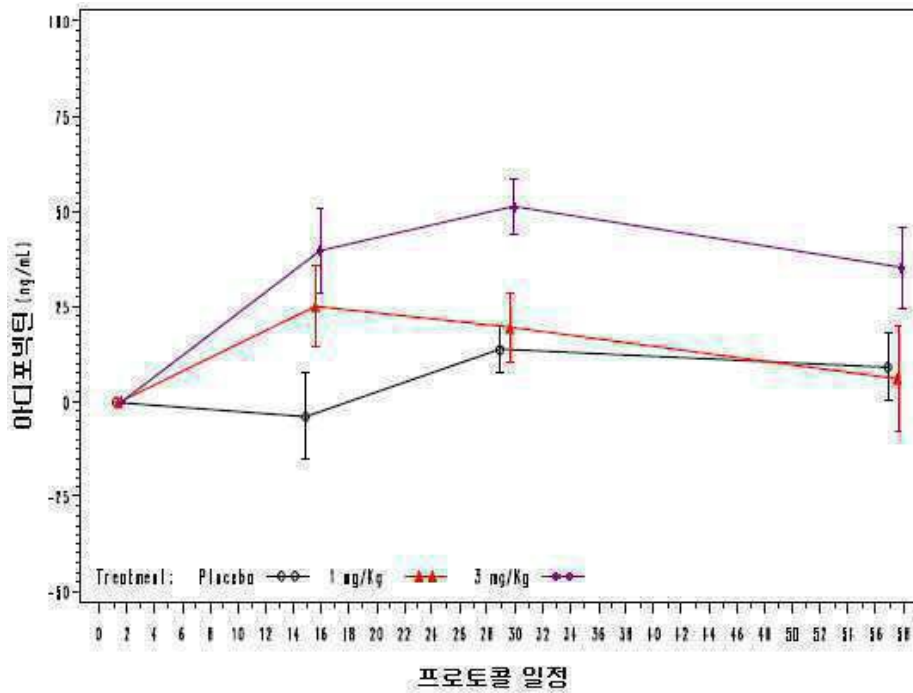
도면4



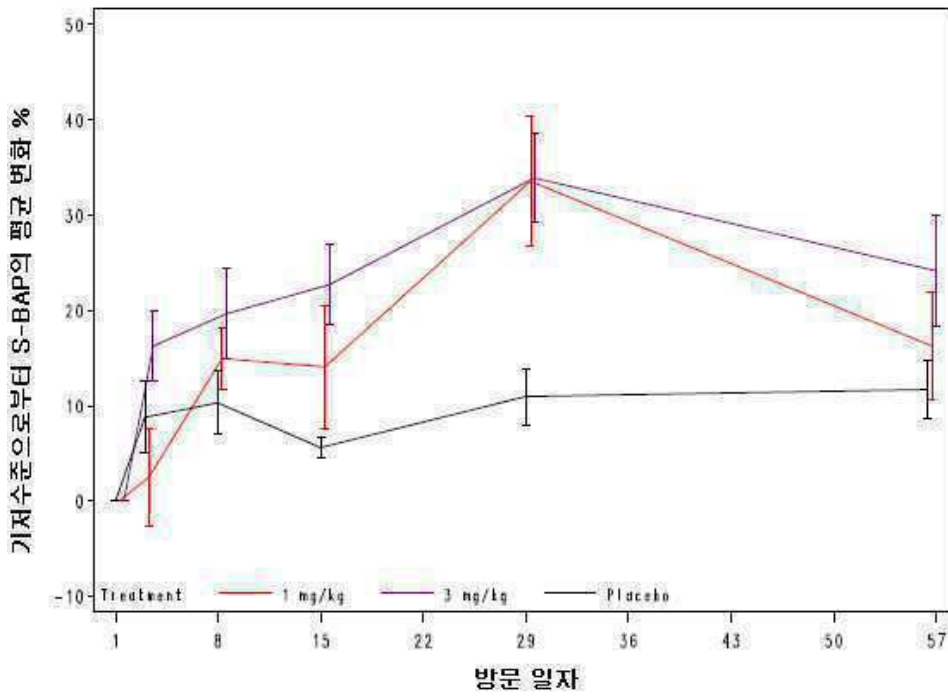
도면5



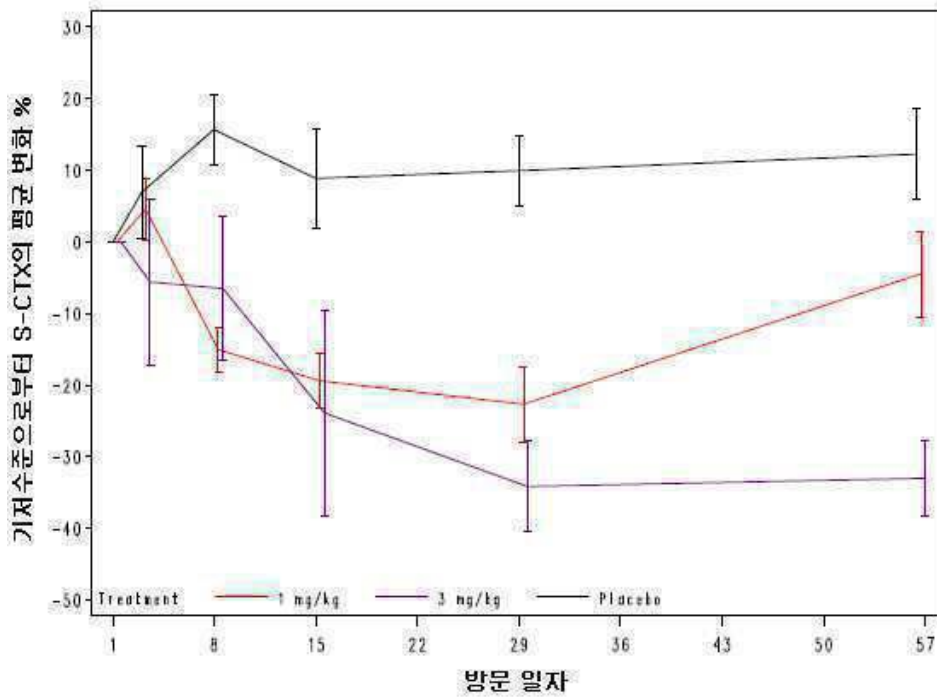
도면6



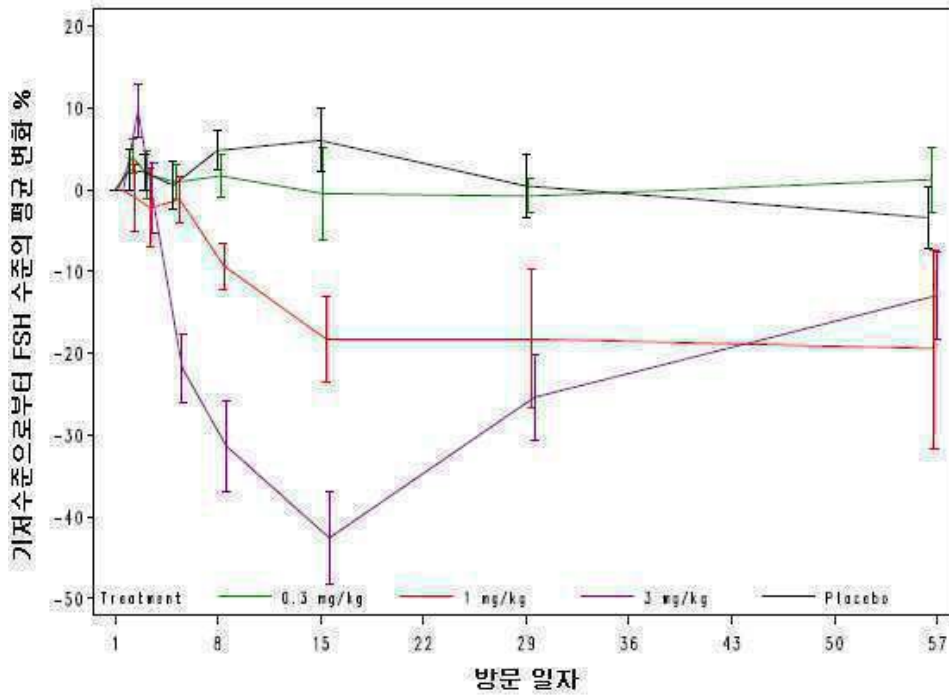
도면7



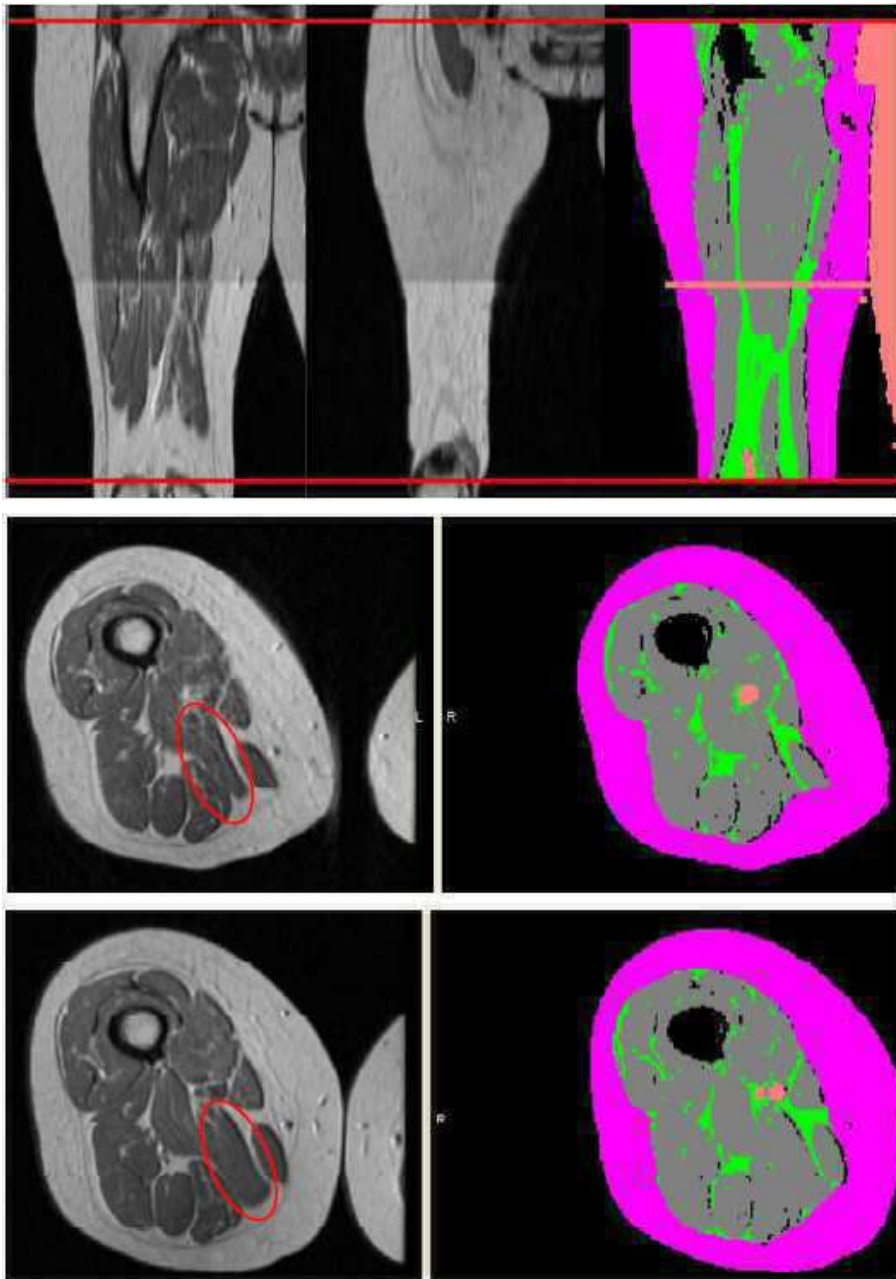
도면8



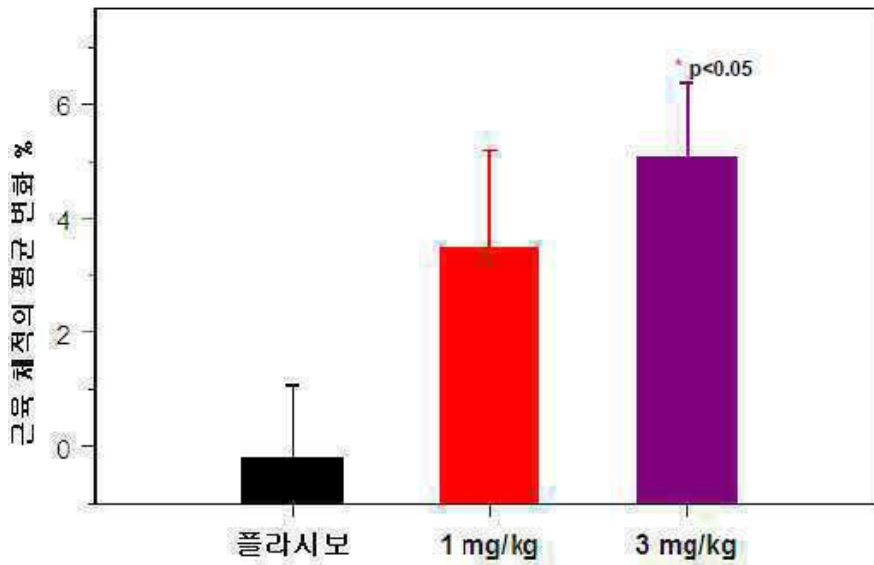
도면9



도면10



도면11



도면12

ActRIIb(서열 번호:1의 잔기 1-134)와 서열번호:2(세포외)

```

1-134 of SEQ.1: 10 20 30 40 50 60
                M I A P W V A L A L L W G S L W P G S G R G E A E T R E C I Y Y N A N W E L E R T N Q S G L E R C E G E Q D K R L H C Y 60
SEQ.2          -----
                G R G E A E T R E C I Y Y N A N W E L E R T N Q S G L E R C E G E Q D K R L H C Y 41
                *
                1 11 21 31 41

1-134 of SEQ.1: 70 80 90 100 110 120
                A S W A N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V Y F C C C E G N F C N E R F T H L P E A G 120
SEQ.2          A S W A N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V Y F C C C E G N F C N E R F T H L P E A G 101
                *
                51 61 71 81 91 101

1-134 of SEQ.1: 130
                G P E V T Y E P P T A P T 134
SEQ.2          G P E V T Y E P P T A P T 115
                *
                111
    
```

도면13

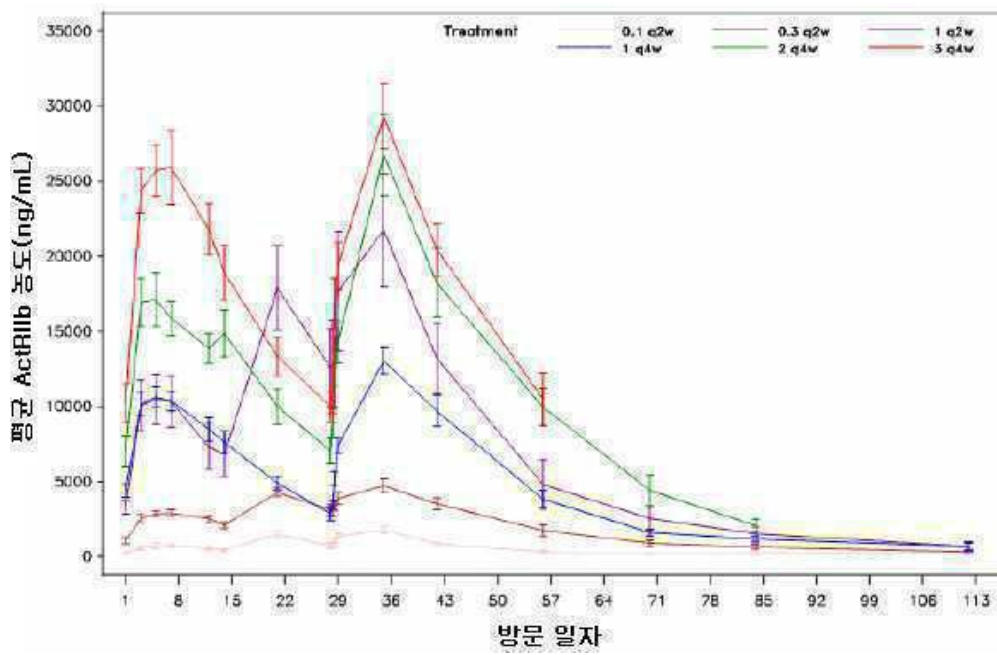
```

ActRIIa:  I L G R S E T Q E C  I I F F N A N W E K D  R T N Q T G V E P C  Y G D K D R R R H C  F A T W K N I S G S
ActRIIb:  G R G E A E T R E C  I Y Y N A N W E L E  R T N Q S G L E R C  E G E Q D K R L H C  Y A S W R N S S G T

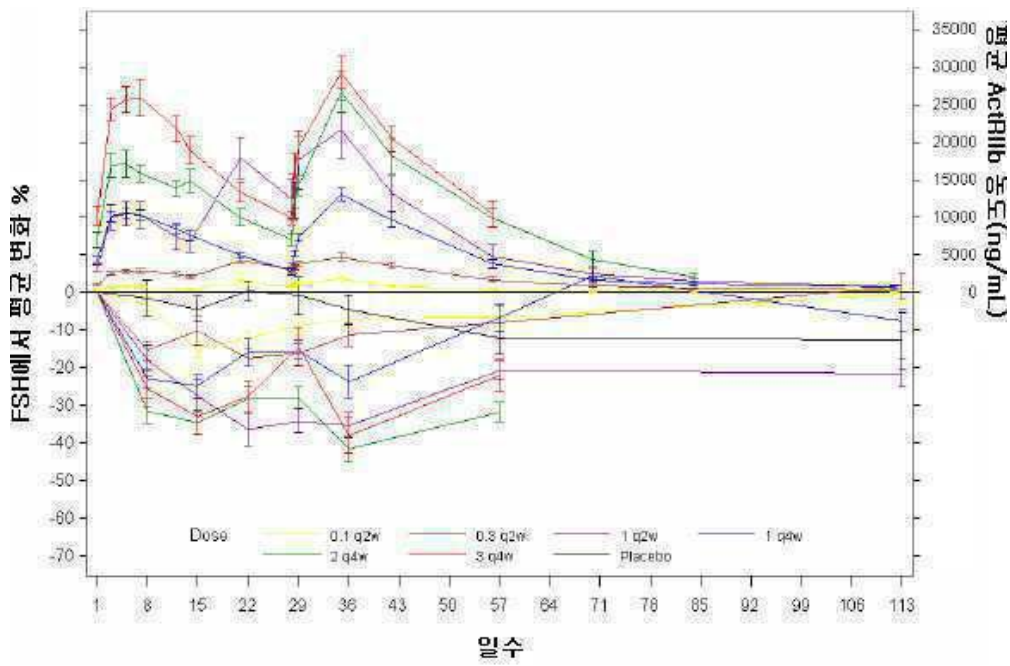
I E I V R Q G C W L  D D I N C Y D R T D  C V E K K D S P E V  Y F C C C E G N M C  N E K F S Y F P E M
I E L V K K G C W L  D D F N C Y D R Q E  C V A T E E N P Q V  Y F C C C E G N F C  N E R F T H L P E A

E V T Q P T S N P V  T P K P P T
G G P E V T Y E P P  P T A P T
    
```

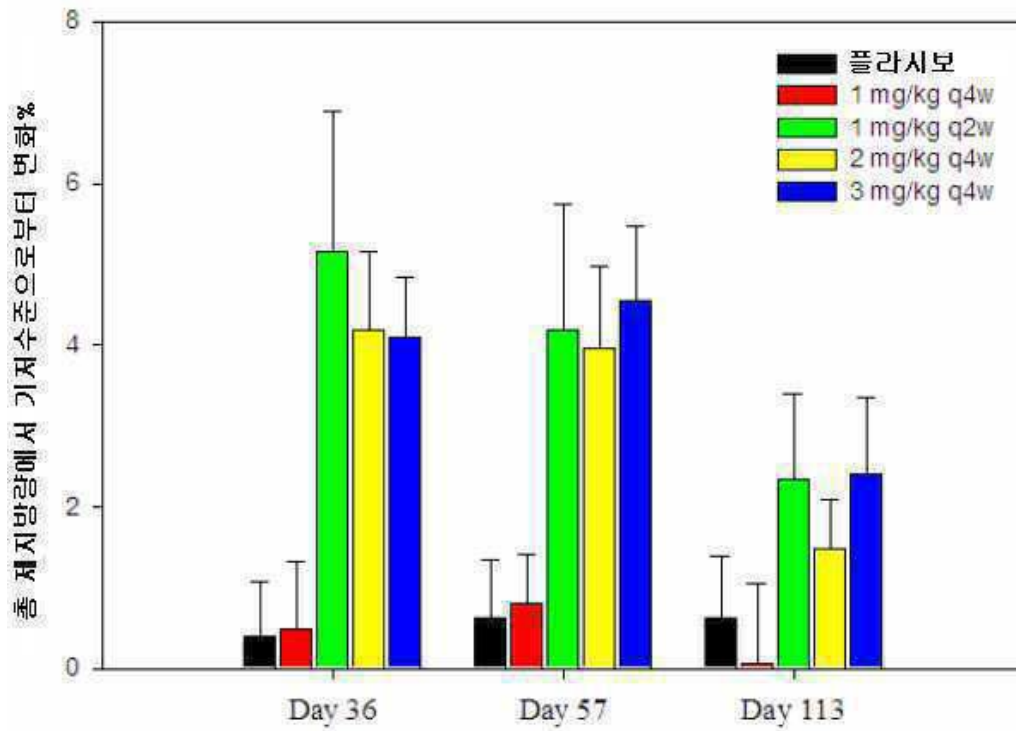
도면14



도면15



도면16



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> ACTRIIB ANTAGONISTS AND DOSING AND USES THEREOF

<130> PHPH-053-W01

<140> PCT/US2010/048322

<141> 2010-09-09

<150> 61/276,287

<151> 2009-09-09

<160> 35

<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 Ala
 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
 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> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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> 3

<211> 100

<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 Ala Asn Ser Ser

acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140

ttcctgcga ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc 1200

aaggetgcag acggaccctt ggatgagtac atgctgcctt ttgaggaaga gattggccag 1260

cacccttctg tggaggagct gcaggagggt gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320

aaagatcact ggttgaaca cccgggcttgc gccagctttt gtgtgacct cgaggagtgc 1380

tgggacctg atgcagaggc tcgcttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440

attcggaggt cggtaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500

accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

<210> 5

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tctggcgtg gggagctga gacacgggag tgcatctact acaacgcaa ctgggagctg 60

gagcgacca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggaaa gcggctgcac 120

tgctacgct cctgggcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180

ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg ccaactgagga gaacccccag 240

gtgtacttct gctgctgta aggcaacttc tgcaacgagc gtttactca ttgcccagag 300

gctgggggcc cggaaagtac gtacagcca cccccgacag cccccacc 348

<210> 6

<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> 6

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> 7

<211> 343

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

<211> 262

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Trp Pro Leu Pro Trp Gly Ala

1 5 10 15
 Leu Ala Trp Ala Val Gly Phe Val Ser Ser Met Gly Ser Gly Asn Pro

 20 25 30
 Ala Pro Gly Gly Val Cys Trp Leu Gln Gln Gly Gln Glu Ala Thr Cys

 35 40 45
 Ser Leu Val Leu Gln Thr Asp Val Thr Arg Ala Glu Cys Cys Ala Ser

 50 55 60
 Gly Asn Ile Asp Thr Ala Trp Ser Asn Leu Thr His Pro Gly Asn Lys

65 70 75 80
 Ile Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gly Leu Val His Cys Leu Pro Cys Lys

 85 90 95
 Asp Ser Cys Asp Gly Val Glu Cys Gly Pro Gly Lys Ala Cys Arg Met

 100 105 110
 Leu Gly Gly Arg Pro Arg Cys Glu Cys Ala Pro Asp Cys Ser Gly Leu

 115 120 125
 Pro Ala Arg Leu Gln Val Cys Gly Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Arg Asp

 130 135 140
 Glu Cys Glu Leu Arg Ala Ala Arg Cys Arg Gly His Pro Asp Leu Ser

145 150 155 160
 Val Met Tyr Arg Gly Arg Cys Arg Lys Ser Cys Glu His Val Val Cys

 165 170 175
 Pro Arg Pro Gln Ser Cys Val Val Asp Gln Thr Gly Ser Ala His Cys

 180 185 190
 Val Val Cys Arg Ala Ala Pro Cys Val Pro Ser Ser Pro Gly Gln Glu

 195 200 205
 Leu Cys Gly Asn Asn Asn Val Thr Tyr Ile Ser Ser Cys His Met Arg

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> 14

<211> 21

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Honey bee mellitin peptide

<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: Tissue plasminogen activator
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> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Native leader peptide

<400> 16

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys

1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala

20

<210> 17

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

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

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 260 265 270
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 275 280 285
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 290 295 300
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 305 310 315 320
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 325 330 335
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

340 345 350
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 18

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 18

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
 tcgcccggcg ccctcgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcaccta ctacaacgcc 120
 aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac 180

 aagcggctgc actgctacgc ctctggcgcc aacagctctg gcaccatcga getcgtgaag 240
 aagggtgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300
 gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcaact 360
 catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc cacccecgac agccccacc 420
 ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcactg aactcctggg gggaccgtca 480
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc 540
 acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720
 aagtgcaagg tctccaacaa agcctccca gtcccatcg agaaaacat ctccaaagcc 780
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccggga ggagatgacc 840
 aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 900
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
 tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag 1080
 agcctctccc tgctccggg taaatga 1107

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 19

Gly Arg Gly Glu Ala Glu

1 5

<210> 20

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

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

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> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

Thr Gly Gly Gly

1

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

Thr Gly Gly Gly Gly

1 5

<

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 23

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 24

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 24
 Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 25
 His His His His His His
 1 5

<210> 26
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 26
 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> 27

<211> 150

<212> PRT

<213> Sus sp.

<400> 27

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> 28

<211> 150

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 28

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> 29

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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> 30

<211> 150

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Bovine ActRIIb polypeptide

<400> 30

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

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

Ile Val Gly Leu Ser Met
 145 150

<210> 32

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

145 150

<210> 33

<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 or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (121)..(121)

<223> Pro, Ala, Val or Met

<400> 33

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
 145 150
 <210> 34
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 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> 35
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 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