



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0128405
(43) 공개일자 2018년12월03일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7027012</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2017년02월22일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2018년09월18일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2017/018938</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/147182
국제공개일자 2017년08월31일</p> <p>(30) 우선권주장
62/298,366 2016년02월22일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
악셀레론 파마 인코포레이티드
미국 02139 매사추세츠주 캄브리지 시드니 스트리트 128</p> <p>(72) 발명자
쿠마르 라빈드라
미국, 매사추세츠주 01720, 액톤, 알링턴 스트리트 421
알림자노프 마라트
미국, 매사추세츠주 02482, 웰레슬리, 하이 랫지 애버뉴 15
퍼솔 로버트 스콧
미국, 매사추세츠주 01864, 노쓰 리딩, 윈터베리 레인 8</p> <p>(74) 대리인
강명구</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 70 항

(54) 발명의 명칭 면역 활성 증가에 사용하기 위한 ActRII 길항제

(57) 요약

본 출원은, 예를 들면, 암 환자들을 비롯한 필요로 하는 환자에서 면역 반응들 및/또는 활성을 증가시키기 위한 ActRII 길항제들 및 방법들을 개시한다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 tctRII 길항제들 및 PD1-PDL1 길항제의 투여를 포함하는, 환자의 암 및/또는 종양 치료 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/2863 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 암 또는 종양의 치료 방법:

ActRIIA 및 ActRIIB에 결합하는 항체 (ActRIIA/B 항체); 및

PD1-PDL1 길항제, 이 때 ActRIIA/B 항체 및 PD1-PDL1 길항제는 유효량으로 투여됨.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 PD1-PDL1 길항제는 PD1 항체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, PD1 항체는 니블루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, 및 BGB-A317으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, PD1-PDL1 길항제는 PDL1 항체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, PDL1 항체는 아테졸리주맙, 아벨루맙, 및 더발루맙으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 1-5 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 종양은 증가된 PDL1 발현과 관련됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 종양은 $\geq 1\%$ 의 PDL1 종양 비율 점수 (TPS)를 가짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 종양은 $\geq 50\%$ 의 PDL1 종양 비율 점수 (TPS)를 가짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 암 또는 종양의 치료 방법:

ActRIIA/B 항체, 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합; 및

암 또는 종양을 치료하기 위한 추가 활성제 또는 지지 요법, 이 때 ActRIIA/B 항체, 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합, 및 추가 활성제는 유효량으로 투여됨.

청구항 10

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 암 또는 종양의 치료 방법:

ActRII 길항제; 및

암 또는 종양을 치료하기 위한 추가 활성제 또는 지지 요법, 이 때 ActRII 길항제 및 추가 활성제는 유효량으로 투여됨.

청구항 11

청구항 9 또는 10에 있어서, 추가 활성제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 면역요법제임을 특징으로 하는 방법: PD1-PDL1 길항제 (예컨대, PD1 또는 PDL1 항체), CTLA4 길항제 (예컨대, CTLA4 항체), CD20 항체, CD52 항체, 인터페론 (IFN-감마), 인터루킨 (IL-2), CD47 길항제 (예컨대, CD47 항체), 및 GD2 항체.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 면역요법제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법: 이필리무맙, 리투시맙, 오비누투주맙, 이브리누모맙 티옥세탄, 토시투모맙, 오키라투주맙, 오크렐리주맙, TRU-015, 벨투주맙, 오파투무맙, 알렘투주맙, 트레멜리무맙, 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, BGB-A317, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 및 더발루맙.

청구항 13

청구항 1-12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 환자의 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

청구항 1-13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 암 또는 종양 전이를 억제함을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

청구항 1-15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 환자 생존을 증가시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

청구항 1-16 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 화학치료제로 치료받은 적이 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 환자는 화학치료제 치료 12개월 이내에 질환 진행을 가짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

청구항 17 또는 18에 있어서, 화학치료제는 백금-계 화학치료제임을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

청구항 17 또는 18에 있어서, 환자는 수술전보조요법 (neoadjuvant)으로 또는 백금-함유 화학요법과 함께 보조제로 치료받은 적이 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

청구항 1-20 중 어느 한 항에 있어서, ActRIIA/B 항체, ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합, 또는 ActRII 길항제는 그 자체로는 암 또는 종양의 치료에 유효하지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

청구항 1-21 중 어느 한 항에 있어서, PD1-PDL1 길항제 또는 면역요법제의 양은 그 자체로는 암 또는 종양의 치료에 유효하지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

청구항 1-22 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암 또는 종양을 가짐을 특징으로 하는 방법: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예

컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암(예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종).

청구항 24

청구항 1-23 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

청구항 1-24 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 장기 또는 조직 이식 중이지 않거나 장기 또는 조직 이식을 받았음을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

청구항 1-25 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 이식편-대-숙주 질환을 가지지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 환자의 면역 반응 유도 또는 증강 방법:

ActRII 길항제; 및

면역요법제, 이 때 ActRII 길항제 및 면역요법제는 유효량으로 투여됨.

청구항 28

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는, 환자의 면역 탈진 치료 또는 예방 방법:

ActRII 길항제; 및

면역요법제, 이 때 ActRII 길항제 및 면역요법제는 유효량으로 투여됨.

청구항 29

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 환자의 항원에 대한 면역 반응 유도 또는 증강 방법: i) ActRII 길항제, ii) 면역요법제, 및 iii) 항원, 이 때 ActRII 길항제, 면역요법제, 및 항원은 유효량으로 투여됨.

청구항 30

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 병원체 또는 암에 대한 환자의 예방접종 방법: i) ActRII 길항제, ii) 면역요법제, 및 iii) 병원체 또는 암 항원, 이 때 ActRII 길항제, 면역요법제, 및 항원은 환자를 예방접종하기 위한 유효량으로 투여됨.

청구항 31

환자에서 백신에 의해 유도되는 면역 반응을 증강시킬 수 있는 유효량으로 환자에게 i) ActRII 길항제, 및 ii) 면역요법제를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 백신에 의해 유도되는 면역 반응 증강 방법.

청구항 32

청구항 27-31 중 어느 한 항에 있어서, 면역요법제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법: PD1-PDL1 길항제 (예컨대, PD1 항체 또는 PDL1 항체), CTLA4 길항제 (예컨대, CTLA4 항체), CD20 항체, CD52 항체, 인터페론 (IFN-감마), 인터루킨 (IL-2), CD47 길항제 (예컨대, CD47 항체), 및 GD2 항체.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 면역요법제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법: 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피달리주맙, BGB-A317, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 이필리무맙, 리톡시맙, 오비누투주맙, 이브리누모맙 티옥세탄, 토시투모맙, 오키라투주맙, 오크렐리주맙, TRU-015, 벨투주맙, 오파투무맙, 알렘투주맙, 및

트레멜리무맙.

청구항 34

필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제를 투여하는 것을 포함하는 환자의 면역 반응 유도 또는 증강 방법.

청구항 35

필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제를 투여하는 것을 포함하는 환자의 면역 탈진 치료 또는 예방 방법.

청구항 36

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 환자의 항원에 대한 면역 반응 유도 또는 증강 방법: i) ActRII 길항제, 및 iii) 항원, 이 때 ActRII 길항제, 및 항원은 유효량으로 투여됨.

청구항 37

필요로 하는 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함하는 병원체 또는 암에 대한 환자의 예방접종 방법: i) ActRII 길항제, 및 iii) 병원체 또는 암 항원, 이 때 ActRII 길항제, 및 항원은 환자를 예방접종하기 위한 유효량으로 투여됨.

청구항 38

필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제를 투여하는 것을 포함하는 환자에서 백신에 의해 유도되는 면역 반응 증강 방법.

청구항 39

청구항 27-38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 암 또는 종양을 가짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

청구항 27-39 중 어느 한 항에 있어서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 또는 종양에 대항하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

청구항 27-40 중 어느 한 항에 있어서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 환자에서 암 또는 종양 세포들의 성장을 억제함을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

청구항 27-41 중 어느 한 항에 있어서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

청구항 27-42 중 어느 한 항에 있어서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 또는 종양 전이를 치료 또는 예방함을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

청구항 27-43 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

청구항 27-44 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암 또는 종양을 가짐을 특징으로 하는 방법: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세

포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암(예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종).

청구항 46

청구항 27-38 중 어느 한 항에 있어서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 병원체에 대항하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

청구항 27-38 및 46 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

청구항 27-38, 46, 및 47 중 어느 한 항에 있어서, 상기 병원체는 다음으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법: 세균, 바이러스, 진균, 또는 기생충 병원체.

청구항 49

청구항 10-48 중 어느 한 항에 있어서, ActRII 길항제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 방법:

ActRIIA/B 항체; 및

ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합.

청구항 50

청구항 10-48 중 어느 한 항에 있어서, ActRII 길항제는 서열 번호: 10; 서열 번호: 11; 서열 번호: 9의 아미노산 30-110; 서열 번호: 50; 서열 번호: 54; 및 서열 번호: 57 중 어느 하나의 아미노산 서열에 최소한 0%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIA 폴리펩티드를 특징으로 하는 방법.

청구항 51

청구항 10-48 중 어느 한 항에 있어서, ActRII 길항제는 다음 중 어느 하나의 아미노산 서열에 최소한 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIB 폴리펩티드를 특징으로 하는 방법: 서열 번호: 1의 아미노산 29-109; 서열 번호: 1의 아미노산 25-131; 서열 번호: 2; 서열 번호: 3; 서열 번호: 5; 서열 번호: 6; 서열 번호: 65; 서열 번호: 68; 서열 번호: 69; 서열 번호: 132; 서열 번호: 58; 서열 번호: 60; 서열 번호: 63; 서열 번호: 64; 서열 번호: 66; 서열 번호: 70; 서열 번호: 123; 서열 번호: 128; 서열 번호: 131; 및 서열 번호: 132.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대해 위치 79에서 산성 아미노산을 포함하지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

청구항 10-48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ActRII 길항제는 ALK4 폴리펩티드 및 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 상기 ALK4 폴리펩티드는 다음 중 어느 하나의 아미노산 서열에 최소한 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는 방법.

는 방법: 서열 번호: 14의 아미노산 34-101; 서열 번호: 14의 아미노산 24-126; 서열 번호: 15; 서열 번호: 19; 서열 번호: 34; 서열 번호: 38; 서열 번호: 74; 서열 번호: 76; 서열 번호: 79; 및 서열 번호: 80.

청구항 55

청구항 53 또는 54에 있어서, 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 다음 중 어느 하나의 아미노산 서열에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는 방법: 서열 번호: 1의 아미노산 29-109; 서열 번호: 1의 아미노산 25-131; 서열 번호: 2; 서열 번호: 3; 서열 번호: 5; 서열 번호: 6; 서열 번호: 35; 서열 번호: 39; 서열 번호: 71; 서열 번호: 73; 서열 번호: 77; 및 서열 번호: 78.

청구항 56

청구항 53-55 중 어느 한 항에 있어서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치에 산성 아미노산을 포함하지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

청구항 51-54 중 어느 한 항에 있어서, 이형다량체는 ALK4: ActRIIB이형이량체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

청구항 10-48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ActRII 길항제는 항체 또는 항체들의 조합임을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 상기 항체 또는 항체들의 조합은 다음 중 하나 이상에 결합함을 특징으로 하는 방법: GDF11, GDF8, 액티빈 A, 액티빈 B, BMP10, BMP6, GDF3, BMP9, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4.

청구항 60

청구항 10-48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ActRII 길항제는 소분자 또는 소분자들의 조합임을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 상기 소분자 또는 소분자들의 조합은 다음 중 하나 이상을 억제함을 특징으로 하는 방법: GDF11, GDF8, 액티빈 A, 액티빈 B, BMP10, BMP6, GDF3, BMP9, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4.

청구항 62

청구항 10-48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ActRII 길항제는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들의 조합임을 특징으로 하는 방법.

청구항 63

청구항 62에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들의 조합은 다음 중 하나 이상을 억제함을 특징으로 하는 방법: GDF11, GDF8, 액티빈 A, 액티빈 B, BMP10, BMP6, GDF3, BMP9, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4.

청구항 64

청구항 1-63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 암 또는 종양 또는 병원체를 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 또는 지지 요법을 투여하는 것을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 65

환자의 암 또는 종양을 치료함에 사용하기 위한 ActRII 길항제 및 면역요법제로서, 치료는 ActRII 길항제 및 면역요법제를 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 ActRII 길항제 및 면역요법제.

청구항 66

환자에서 암 또는 종양의 치료를 위한 약제를 제조하기 위한 ActRII 길항제의 용도로서, 암 또는 종양의 치료는 ActRII 길항제 및 면역요법제를 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 용도.

청구항 67

환자에서 암 또는 종양의 치료를 위한 약제를 제조하기 위한 면역요법제의 용도로서, 암 또는 종양의 치료는 면역요법제 및 ActRII 길항제를 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 용도.

청구항 68

청구항 65 또는 청구항 66 또는 67에 있어서, ActRII 길항제는 ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합임을 특징으로 하는 ActRII 길항제 및 면역요법제 또는 용도.

청구항 69

청구항 65 또는 청구항 66 또는 67에 있어서, 면역요법제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 ActRII 길항제 및 면역요법제 또는 용도: PD1-PDL1 길항제 (예컨대, PD1 항체 또는 PDL1 항체), CTLA4 길항제 (예컨대, CTLA4 항체), CD20 항체, CD52 항체, 인터페론 (IFN-감마), 인터루킨 (IL-2), CD47 길항제 (예컨대, CD47 항체), 및 GD2 항체.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 상기 면역요법제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택됨을 특징으로 하는 ActRII 길항제 및 면역요법제 또는 용도: 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, BGB-A317, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, 이필리루맙, 리투시맙, 오비누투주맙, 이브리누모맙 티옥세탄, 토시투모맙, 오카라투주맙, 오크렐리주맙, TRU-015, 벨투주맙, 오파투주맙, 알렘투주맙, 및 트레멜리루맙.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원들에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 2월 22일 출원된 미국 가특허출원 제 62/298,366에 대한 우선권의 이익을 주장한다. 전술한 출원의 명세서 전문은 본 출원에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 암 치료에서, 화학요법은 높은 독성으로 인해 내성 암 세포 변이체들이 나타나게 할 수 있는 것으로 오랫동안 인식되어왔다. 종양 생존 및 성장에 중요한 과발현 또는 활성화된 종양단백질들에 대한 표적화 요법을 이용한다 하더라도, 암 세포들은, 가령, 여분의 경로를 이용함으로써, 표적화된 경로에 대한 의존성을 줄이기 위하여 빈번히 돌연변이하고 적응한다. 암 면역요법은 암 치료에 있어서 암 세포들을 표적화하는 대신에, 면역계의 활성화에 초점을 두는 새로운 패러다임이다. 이러한 원리는 숙주의 면역 반응, 특히, 적응 T 세포 반응을 재무장시키는 것, 암 세포들을 동정하여 사멸시키는 것 그리고 장기-지속성 보호 면역을 구현하는 것이다. 이러한 요법들이 면역계의 활성화 증가를 지향하므로, 암 면역요법제는 또한 병원체가 면역-회피성이거나 및/또는 숙주 면역계를 손상시키는 다른 장애들, 특히, 감염 질환들에서 면역 반응들을 개선하는 능력에 대해 조사되고 있는 중이다.

[0005] 2011년에 흑색종 치료에 대한 항-CTLA-4 항체 이필리루맙의 FDA 승인으로 암 면역요법의 새로운 시대가 시작되었다. 항-PD-1 또는 항-PD-L1 요법이 임상 시험의 흑색종, 신장, 및 폐암에서 지속적인 반응을 유도하였음이 입증된 것은 광범위한 스펙트럼의 암 치료에서 면역요법의 사용 가능성을 더욱 나타내는 것이다 (Pardoll, D. M., Nat Immunol. 2012; 13:1129-32). 그러나 사용가능한 또는 임상 시험 중인 많은 암 면역요법들은 한계를 가지고 있다. 예를 들면, 이필리루맙 요법은 높은 독성 프로파일을 가지는데, 이는 아마도 항-CTLA-4 치료는 일차 T 세포 억제 면역관문을 방해함으로써, 새로운 자가반응성 T 세포들을 생성하게 할 수 있기 때문이다.

PD-L1/PD-1 상호반응을 억제하는 것은 대부분 본래 항바이러스성 또는 항암성인 탈진된 T 세포들에 존재하는 만성 면역 반응들을 탈억제시키는 결과를 가져오는 반면 (Wherry, E. J., Nat Immunol. 2011; 12:492-9), 항-PD-1 요법은 그럼에도 불구하고 때때로 잠재적으로 치명적인 폐-관련 자가면역 이상 사례들을 유발할 가능성이 있다. 또한, 면역 관문 억제제는 일부 환자들에서 효능있는 항암 치료제일 수 있으나, 일반적으로 많은 환자들에서 낮은 효능을 가지는 것 내지 효능이 전혀 없다.

[0006] 그러므로 환자들에서, 특히, 암 또는 감염성 질환을 가지는 환자들에서 면역 반응들을 증가시키기 위한 효과적인 요법의 필요성은 여전히 높으며 충족되지 않고 있다. 더욱이, 기존의 요법들, 가령, PD1-PDL1 길항제들의 항암 효과를 증가시킬 수 있는 공동-요법제의 개발이 필요하다. 따라서, 본 발명의 목적은 필요로 하는 환자들에서 면역 반응을 증가시키는 방법 뿐만 아니라 암 및 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 내용

[0007] 발명의 요약

[0008] 일부에서, 본 출원에 제시된 데이터는 ActRII 길항제들 (억제제)이 암 치료에 사용될 수 있음을 나타낸다. 특히, 각기 ActRIIA 및 ActRIIB (ActRIIA/B 항체), ActRIIA 폴리펩티드, ActRIIB 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형이량체에 결합하는 항체를 이용한 치료는, 암 모델에서, 예를 들어, 종양 부하를 감소시키고 생존 시간을 증가시키는 것을 비롯한 다양한 긍정적인 효과들을 가지는 것으로 나타났다. 더욱이, ActRII 길항제를 면역 관문 억제제와 조합하여 사용하면, 이들 제제를 단독으로 사용하여 관찰된 효과들에 비해 항암 활성을 상승적으로 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 출원은, 일부에서, 암 또는 종양을 치료, 특히, 암 또는 종양의 하나 이상의 합병증들을 예방 또는 이들의 중증도 또는 진행을 감소 (예컨대, 암 또는 종양 부하 감소)시키기 위하여 ActRII 길항제들을, 단독으로 또는 하나 이상의 지지 요법 및/또는 추가 활성제 (예컨대, 면역요법제, 가령, 면역 관문 억제제)와 조합하여 사용하는 방법을 제공한다. 또한, 데이터는 ActRII 길항제 요법의 효능이 면역계에 의존적임을 나타낸다. 그러므로, 일부에서, 본 출원은 ActRII 길항제들이 단독으로 또는 하나 이상의 지지 요법 및/또는 추가 활성제 (예컨대, 면역요법제, 가령, 면역 관문 억제제)와 조합하여, 면역치료제, 특히, 널리 다양한 암 및 종양들 (예컨대, 면역억제 및/또는 면역 탈진과 관련된 암 및 종양들)을 치료하기 위한 면역치료제로서 사용될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 다른 공지된 면역항암제와 같이, ActRII 길항제가 단독으로 또는 하나 이상의 지지 요법 및/또는 추가 활성제 (예컨대, 면역요법제, 가령, 면역 관문 억제제)와 조합하여 환자의 면역 반응을 증강시키는 능력은 암 분야 밖에서 보다 넓은 치료 결과를 가질 수 있다. 예를 들면, 면역 증강제는 널리 다양한 감염 질환, 특히, 면역억제 및/또는 면역 탈진을 촉진하는 병원체들의 치료에 유용할 수 있음이 제시된 바 있다. 또한, 이러한 면역 증강제는 백신 (예컨대, 감염 질환 및 암 백신)의 면역화 효능을 증가시킴에 유용할 수 있다. 따라서, 본 출원은 필요로 하는 대상체에서 면역 반응들을 증가, 암 또는 종양을 치료, 병원체들 (감염 질환)을 치료, 및/또는 면역화 효능을 증가시키기 위해, 단독으로 또는 하나 이상의 지지 요법 및/또는 추가 활성제 (예컨대, 면역요법제, 가령, 면역 관문 억제제)와 조합하여 사용될 수 있는 다양한 ActRII 길항제들을 제공한다.

[0009] 실시예들에 기재된 ActRIIA/B 항체, ActRIIA 폴리펩티드, ActRIIB 폴리펩티드, 및 ALK4: ActRIIB이형이량체는 ActRII 경로의 억제 이외의 메커니즘들을 통해 면역계 및/또는 암에 영향을 줄 수 있으나 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 및 액티빈 AE), BMP6, GDF3, BMP10, BMP9, TGF β 2 중 하나 이상의 억제는, 아마도, TGF-베타 슈퍼패밀리의 다른 구성요소들을 포함하는 스펙트럼의 추가 제제들의 활성을 억제하는 제제의 경향에 대한 지표가 될 수 있으며, 이러한 집합적 억제는, 예를 들면, 암에 원하는 효과를 가져올 수 있다], 예를 들면, ActRII-연관 리간드 억제제; I 형-, II 형-, 및/또는 공동-수용체 억제제 (예컨대, ALK4, ActRIIA, 및 ActRIIB 중 하나 이상의 억제제); 및/또는 하류 신호전달 억제제 (예컨대, 하나 이상의 Smad 단백질, 가령, Smads 2 및 3의 억제제)]를 비롯한 다른 유형의 ActRII 신호전달 억제제는 본 발명의 방법 및 용도에 따라 유용할 것으로 예상된다. 이러한 ActRII 신호전달 억제제에는, 예를 들면, 항체 길항제들 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합), 핵산 길항제들, 소분자 길항제들, 및 리간드 트랩 (예컨대, 가용성 ActRIIA 폴리펩티드, ActRIIB 폴리펩티드, ALK4: ActRIIB이형이량체, 폴리스타틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드)이 포함된다. 본 출원에서 사용되는, ActRII (ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 활성을 억제하는 제제들은 집합적으로 "ActRII 길항제" 또는 "ActRII 억제제"로 지칭된다.

[0010] 일반적으로, 암 면역요법은 면역계를 사용하여 암을 치료하는 것이다. 면역요법은 능동, 수동, 또는 하이브리드로 분류될 수 있다. 이러한 접근방법들은 암 세포들이 종종 면역에 의해 탐지될 수 있는, 그 표면 상에서 발현되는 분자들을 가진다는 사실을 이용한다. 이들 암-특이적 분자들은 종종 종양-연관 항원들로 지칭되는데,

전형적으로 단백질 또는 그 외 다른 거대분자 (예컨대, 탄수화물)이다. 능동 면역요법은 면역계로 하여금 종양-연관 항원들을 표적함으로써 종양 세포들을 공격하게 하는 것이다. 수동 면역요법은 기존의 항-종양 반응을 향상시키며 항체, 림프구, 및 사이토카인의 사용을 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 면역 관문 억제제의 사용에 관한 것이다. 일반적으로, 면역 관문은 면역계 활성화에 영향을 미치며 자극성 또는 억제성일 수 있다. 일부 종양들은 이들 면역관문들을 사용하여 면역계 공격으로부터 자신을 보호한다. 면역관문 치료제는 억제성 면역관문을 차단하여, 면역계 기능을 회복시키며, 그리하여 면역-매개된 항암 반응들을 촉진시킬 수 있다. 예를 들면, 세포 예정사 1 단백질 (PD1), 세포 예정사 리간드 1 (PDL1), 및 세포독성 T-림프구-연관 단백질 4 (CTLA-4)의 억제제를 비롯한 몇 가지 면역관문 억제제들이 암 및 종양의 치료용으로 승인되었거나 또는 임상 시험에서 평가중이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 PD1-PDL1 길항제들, 특히, ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)의 사용에 관한 것이다. 본 출원에 기재된 바와 같이, PD1-PDL1 길항제들은 PD1-PDL1 상호작용, 상호작용으로부터 하류 신호전달 PD1-PDL1, 및/또는 PD1 및/또는 PDL1의 발현을 억제할 수 있는 서로 다른 다양한 제제들 (예컨대, 항체, 소분자, 및 폴리뉴클레오티드)을 포함한다.

[0011]

특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRIIA 및 ActRIIB에 결합하는 항체 (ActRIIA/B 항체) (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 PD1-PDL1 길항제를 투여하는 단계를 포함하는, 암 또는 종양의 치료 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자의 암 또는 종양을 치료하기 위해 PD1-PDL1 길항제와 조합하여 사용하기 위한 ActRIIA/B 항체 (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자의 암 또는 종양을 치료하기 위해 ActRIIA/B 항체 (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)와 조합하여 사용하기 위한 PD1-PDL1 길항제에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 암 또는 종양을 치료하기 위해 PD1-PDL1 길항제와 조합된 ActRIIA/B 항체 (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 암 또는 종양의 하나 이상의 합병증을 예방하거나 이러한 합병증의 중증도 또는 진행을 감소시킨다. 예를 들면, 상기 방법은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 암 또는 종양 전이를 억제할 수 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암 또는 종양을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 바람직한 특정 구체예들에서, 상기 방법은 환자의 생존 시간을 증가시킨다 (예컨대, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 또는 그 이상의 개월 이상 생존 시간을 증가시킴). 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자의 무재발 생존 시간을 증가시킨다 (예컨대, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 또는 그 이상의 개월 이상 무재발 생존 시간을 증가시킴). 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 본 출원에 따라 사용하기 위한 PD1-PDL1 길항제들에는 예를 들면, 항체, 소분자, 및 폴리뉴클레오티드를 비롯한 다양한 분자들이 포함된다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PD1-PDL1 길항제는 PD1 항체이다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PD1 항체는 니블루맙이다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PD1 항체는 펌브롤리주맙이다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PD1 항체는 피딜리주맙이다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PD1 항체는 BGB-A317이다. 다른 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PD1-PDL1 길항제는 PDL1 항체이다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PDL1 항체는 아테졸리주맙이다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PDL1 항체는 아벨루맙이다. 일부 구체예들에서, 본 출원에 따라 사용되는 PDL1 항체는 더발루맙이다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 PDL1 발현 증가와 관련된다. 예를 들면, 본 출원의 방법들은 $\geq 1\%$ 의 PDL1 종양 비율 점수 (TPS) (PDL1 양성 종양 세포들의 $\geq 1\%$, 2% , 3% , 4% , 5% , 10% , 15% , 20% , 25% , 30% , 40% , 45% , 50% 또는 그 이상)를 가지는 암 또는 종양을 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 방법들은 $\geq 50\%$ 의 PDL1 종양 비율 점수 (TPS)를 가지는 암 또는 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 암 또는 종양에서 PDL1 발현 수준을 결정하는 다양한 방법들은 해당 분야에 공지되어 있으며 본 출원에 따라 용이하게 사용될 수 있다. 예를 들면, FDA가 승인한 시험관내 진단 PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako North America, Inc.)는 다양한 다른 조직 유형들로부터 PDL1 단백질에 대해 양성으로 염색된 생존가능한 암 또는 종양 세포들의 백분율을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 화학치료제로 치료받은 적이 있다. 일부 구체예들에서, 환

자는 화학치료제 치료 12 개월 이내 (예컨대, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2 개월 이내)에 질병이 진행되었다. 일부 구체예들에서, 화학치료제는 백금-계 화학치료제이다. 일부 구체예들에서, 환자는 수술전보조요법 (neoadjuvant)으로 또는 백금-함유 화학요법과 함께 보조제로 치료받은 적이 있다. 실시예에서 보는 바와 같이, ActRIIA/B 항체 및 PD1-PDL1 길항제는 암을 상승작용적으로 치료하기 위해 사용될 수 있다. 그러므로, 병용 요법은 ActRIIA/B 항체 및 PD1-PDL1 길항제의 투약량을 저하시키고 및/또는 이의 투약 빈도를 감소시켜, 상기 항체 또는 길항제 중 하나를 단독으로 보다 많은 양으로 및/또는 투약 빈도를 증가시켜 치료할 때 관찰되는 암 치료에 대한 긍정적인 효과를 유사하게 구현할 수 있게 한다. 그러므로, ActRIIA/B 항체 및 PD1-PDL1 길항제 병용 요법은 ActRIIA/B 항체 또는 PD1-PDL1 길항제 단독으로 치료하는 동안 발생할 수 있는 바람직하지 않은 오프-타겟 효과들의 위험을 감소시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRIIA/B 항체 (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 PD1-PDL1 길항제를 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 종양의 치료 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRIIA/B 항체 (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)의 양은 그 자체로는 암 또는 종양을 치료함에 유효하지 않다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRIIA/B 항체 (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 PD1-PDL1 길항제를 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 종양의 치료 방법에 관한 것으로, 이 때 PD1-PDL1 길항제의 양은 그 자체로는 암 또는 종양을 치료함에 유효하지 않다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRIIA/B 항체 (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 PD1-PDL1 길항제를 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 종양의 치료 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRIIA/B 항체 (또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)의 양은 그 자체로는 암 또는 종양을 치료함에 유효하지 않으며, PD1-PDL1 길항제의 양은 그 자체로는 암 또는 종양을 치료함에 유효하지 않다. 바람직하게는, 본 출원에 따라 치료되는 환자들은 자가면역 질병을 가지지 않거나, 장기 또는 조직 이식 중 또는 이식을 받았거나, 또는 이식편-대 숙주 질환을 가지지 않는다. 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)를 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 종양 치료 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자의 암을 치료 또는 예방하기 위해 면역요법제와 조합하여 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자의 암을 치료 또는 예방하기 위해 ActRII 길항제와 조합하여 사용하기 위한 면역요법제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 암 또는 종양의 하나 이상의 합병증을 예방하거나 이러한 합병증의 중증도 또는 진행을 감소시킨다. 예를 들면, 상기 방법은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 암 또는 종양 전이를 억제할 수 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암 또는 종양을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 야교모세포종, 전립선암, 이차암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 바람직한 특정 구체예들에서, 상기 방법은 환자의 생존 시간을 증가시킨다 (예컨대, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 또는 그 이상의 개월 이상 생존 시간을 증가시킴). 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자의 무재발 생존 시간을 증가시킨다 (예컨대, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 또는 그 이상의 개월 이상 무재발 생존 시간을 증가시킴). 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 본 출원에 따라 사용하기 위한 ActRII 길항제에는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들과 같은, 항체 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9의 하나 이상에 결합하는 항체), 리간드 트랩 (예컨대, 가용성 ActRIIA 폴리펩티드, ActRIIB 폴리펩티드, ALK4: ActRIIB이형다량체, 폴리스타틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 소분자 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, BMP9 및 하나 이상의 Smad 단백질들, 가령, Smads 2 및 3 중 하나 이상의 소분자 억제제), 및 폴리뉴클레오티드 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, ALK4, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, BMP9 및 하나 이상의 Smad 단백질들, 가령, Smads 2 및 3 중 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 억제제)를 비롯한 다양한 분자들이 포함된다. 유사하게, 본 출원에 따라 사용하기 위한 면역요법제에는, 예를 들면, 항체, 소분자, 및 폴리뉴클레오티드를 비롯한 다양한 분자들이 포함된다. 일부 구체예들에서, 면역요법제는 면역 관문 억제제이다. 일부 구체예들에서, 면역요법제는 PD1-PDL1 길항제 (예컨대, PD1 또는 PDL1 항체), CTLA4 길항제 (예컨대, CTLA4 항체), CD20 항체, CD52 항체, 인터페론 (IFN-감마), 인터루킨 (IL-2), CD47 길항제 (예컨대, CD47 항체), 및 GD2 항체 중 하나 이상이다. 일부 구체예들에서, 면역요법제는 이필리무맙, 리툭시맙,

오비누투주맵, 이브리누모맵 티옥세탄, 토시투모맵, 오카라투주맵, 오크렐리주맵, TRU-015, 벨투주맵, 오파투무맵, 알렘투주맵, 트레멜리무맵, 니볼루맵, 펠브롤리주맵, 피딜리주맵, BGB-A317, 아테줄리주맵, 아벨루맵, 및 더발루맵 중 하나 이상이다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 PDL1 발현 증가와 관련된다. 예를 들면, 본 출원의 방법들은 $\geq 1\%$ 의 PDL1 종양 비율 점수 (TPS) (PDL1 양성 종양 세포들의 $\geq 1\%$, 2% , 3% , 4% , 5% , 10% , 15% , 20% , 25% , 30% , 40% , 45% , 50% 또는 그 이상)를 가지는 암 또는 종양을 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 방법들은 $\geq 50\%$ 의 PDL1 종양 비율 점수 (TPS)를 가지는 암 또는 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 화학치료제로 치료받은 적이 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 화학치료제 치료 12 개월 이내 (예컨대, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2 개월 이내)에 질병이 진행되었다. 일부 구체예들에서, 화학치료제는 백금-계 화학치료제이다. 일부 구체예들에서, 환자는 수술전보조요법 (neoadjuvant)으로 또는 백금-함유 화학요법과 함께 보조제로 치료받은 적이 있다. 실시예에서 보는 바와 같이, ActRIIA/B 항체 및 PD1-PDL1 길항제는 암을 상승작용적으로 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRII 길항제 및 면역요법제를 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 종양 치료 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRII 길항제의 양은 그 자체로는 암 또는 종양의 치료에 유효하지 않다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRII 길항제 및 면역요법제 길항제를 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 종양의 치료 방법에 관한 것으로, 이 때 면역요법제 길항제의 양은 그 자체로는 암 또는 종양의 치료에 유효하지 않다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRII 길항제 및 면역요법제를 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 종양 치료 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRII 길항제의 양은 그 자체로는 암 또는 종양의 치료에 유효하지 않으며, 면역요법제의 양은 그 자체로는 암 또는 종양의 치료에 유효하지 않다. 바람직하게는, 본 출원에 따라 치료되는 환자들은 자가면역 질병을 가지지 않거나, 장기 또는 조직 이식 중 또는 이식을 받았거나, 또는 이식편-대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0012]

특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)를 투여하는 단계를 포함하는 환자의 면역 반응 유도 또는 증강 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRII 길항제 및 면역요법제는 유효량으로 투여된다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 면역 반응을 유도 또는 증강시키기 위해, 면역요법제와 조합하여 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 면역 반응을 유도 또는 증강시키기 위해, ActRII 길항제와 조합하여 사용하기 위한 면역요법제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 환자는 암 또는 종양을 가진다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 또는 종양에 대한 것이다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 또는 종양의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 또는 종양 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진을 발달시킬 위험이 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 장애를 가진다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 내인성 면역 반응이다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 T 세포 면역 반응을 포함한다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암 또는 종양을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이차암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 병원체에 대한 것이다. 일부 구체예들에서, 개시된 증강된 면역 반응은 환자에서 병원체에 의한 감염을 치료한다. 일부 구체예들에서, 개시된 증강된 면역 반응은 환자에서 병원체에 의한 감염을 예방한다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 병원체는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 세균, 바이러스, 진균, 또는 기생충 병원체. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 또는 병원체에 대하여 환자를 백신접종시킨다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투

여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 병원체를 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 부여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 하나 이상의 추가 면역항암제가 추가 부여된다. 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0013] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의 최소한 하나의 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)를 투여하는 단계를 포함하는 환자에서 면역 반응을 유도 또는 증강시키는 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 면역 반응을 유도 또는 증강시키기 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 환자는 암 또는 종양을 가진다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 환자에서 암 또는 종양 세포들의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 환자에서 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진을 발달시킬 위험이 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 장애를 가진다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 내인성 면역 반응이다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 T 세포 면역 반응을 포함한다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발골수종, 골수형이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서, 환자는 감염 질환을 가진다. 일부 구체예들에서, 환자에게 항원을 추가 부여한다. 일부 구체예들에서, 항원은 비-내인성 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 암 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 감염 질환 항원이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 항원에 대하여 환자를 면역화시킨다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 활성제 및/또는 지지 요법을 추가로 부여한다. 일부 구체예들에서, 환자에게 감염 질환을 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 활성제 및/또는 지지 요법을 추가로 부여한다. 일부 구체예들에서, 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 부여된다. 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0014] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)를 투여하는 단계를 포함하는 환자에서 면역 탈진 치료 또는 예방 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRII 길항제 및 면역요법제는 유효량으로 투여된다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 면역 탈진을 치료 또는 예방하기 위해 면역요법제와 조합하여 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 면역 탈진을 치료 또는 예방하기 위해 ActRII 길항제와 조합하여 사용하기 위한 면역요법제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 환자는 암 또는 종양을 가진다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 암 또는 종양 세포들의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진을 발달시킬 위험이 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 장애를 가진다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 내인성 면역 반응을 증가시킨다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 T 세포 면역 반응을 증가시킨다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직

장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서, 환자는 감염 질환을 가진다. 일부 구체예들에서, 환자에게 항원을 추가 투여한다. 일부 구체예들에서, 항원은 비-내인성 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 암 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 감염 질환 항원이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 항원에 대하여 환자를 면역화시킨다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 활성제 및/또는 지지 요법을 추가로 투여한다. 일부 구체예들에서, 환자에게 감염 질환을 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 활성제 및/또는 지지 요법을 추가로 투여한다. 일부 구체예들에서, 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0015] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)를 투여하는 단계를 포함하는 환자에서 면역 탈진을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 면역 탈진을 치료 또는 예방함에 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 환자는 암 또는 종양을 가진다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 암 또는 종양 세포들의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진을 발달시킬 위험이 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 장애를 가진다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 내인성 면역 반응을 증가시킨다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 T 세포 면역 반응을 증가시킨다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서, 환자는 감염 질환을 가진다. 일부 구체예들에서, 환자에게 항원을 추가 투여한다. 일부 구체예들에서, 항원은 비-내인성 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 암 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 감염 질환 항원이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 항원에 대하여 환자를 면역화시킨다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 활성제 및/또는 지지 요법을 추가로 투여한다. 일부 구체예들에서, 환자에게 감염 질환을 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 활성제 및/또는 지지 요법을 추가로 투여한다. 일부 구체예들에서, 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0016] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)를 투여하는 단계를 포함하는 환자에서 암 또는 종양에 대한 면역 반응을 증강시키는 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 암 또는 종양에 대한 면역 반응을 개시 또는 증강시키기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 환자에서 암 또는 종양 세포들의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 환자에서 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서 암 또는 종양은 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진을 발달시킬 위험이 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 장애를 가진다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 내인성 면역 반응이다. 일부 구체예들에서, 증강된 면역 반응은 T 세포 면역 반응을 포함한다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라

라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서, 환자에게 항원을 추가 투여한다. 일부 구체예들에서, 항원은 비-내인성 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 암 항원이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 항원에 대하여 환자를 면역화시킨다. 일부 구체예들에서, 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 활성제 및/또는 지지 요법을 추가로 투여한다. 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0017] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의: i) ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합), ii) 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제), 및 iii) 항원을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 유도 또는 증강시키는 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRII 길항제, 면역요법제, 및 항원은 유효량으로 투여된다. 일부 양상들에서, 본 출원은 항원에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 면역요법제와 조합하여 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 항원에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 ActRII 길항제와 조합하여 사용하기 위한 면역요법제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 항원은 비-내인성 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 암 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 감염 질환 항원이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 항원에 대하여 환자를 면역화시킨다.

[0018] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의: i) ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 ii) 항원을 투여하는 단계를 포함하는 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 항원에 대한 면역 반응을 증강시킴에 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 항원은 비-내인성 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 비-내인성 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 암 항원이다. 일부 구체예들에서, 항원은 감염 질환 항원이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 항원에 대하여 환자를 면역화시킨다.

[0019] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 암을 치료함에 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 암 또는 종양 세포들의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 암 또는 종양 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 환자에서 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 최소한 하나의 추가 활성제 및/또는 지지 요법을 추가로 투여한다. 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0020] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게: ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합), 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제), 및 암 또는 병원체 항원을 투여하는 단계를 포함하는, 암 또는 병원체에 대한 환자의 백신접종 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRII 길항제, 면역요법제, 및 항원은 환자를 백신접종하기 위한 유효량으로 투여된다. 일부 양상들에서, 본 출원은 암 또는 병원체에 대해 환자를 백신접종하기 위한 면역요법제와 조합하여 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 암 또는 병원체에 대해 환자를 백신접종하기 위한 ActRII 길항제와 조합하여 사용하기 위한 면역요법제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양 항원은 다음으로 구성된 그

룹에서 선택된 암 또는 종양과 연관된다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암, 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서 병원체 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 병원체와 연관된다: 세균 병원체, 바이러스 병원체, 진균 병원체, 또는 기생충 병원체. 일부 구체예들에서, 암 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 종양 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 병원체 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 병원체를 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 하나 이상의 추가 면역항암제가 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 하나 이상의 추가 면역항암제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 알렘투주맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 오파트무맙, 리톡시맙, 펌브롤리주맙, 아텍솔리주맙, 예정사-리간드 1 (PD-L1) 결합제 (예컨대, PD-L1 항체), CD20-지시된 세포용해 결합제 (예컨대, CD-20 항체), 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4) 결합제 (예컨대, CTLA-4 항체), 및 예정사 수용체-1 (PD-1) 결합제 (예컨대, PD-1 항체). 일부 구체예들에서, 암은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 병태를 가진다. 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0021] 특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게: ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 암 또는 병원체 항원을 투여하는 단계를 포함하는, 암 또는 병원체에 대한 환자의 백신접종 방법에 관한 것으로, 이 때 ActRII 길항제 및 항원은 환자를 백신접종하기 위한 유효량으로 투여된다. 일부 양상들에서, 본 출원은 암 또는 병원체에 대해 환자를 백신접종함에 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 암 또는 종양 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암 또는 종양과 연관된다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암, 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서 병원체 항원은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 병원체와 연관된다: 세균 병원체, 바이러스 병원체, 진균 병원체, 또는 기생충 병원체. 일부 구체예들에서, 암 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 종양 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 병원체 항원은 백신접종 프로토콜에 따라 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 병원체를 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 하나 이상의 추가 면역항암제가 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 하나 이상의 추가 면역항암제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 알렘투주맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 오파트무맙, 리톡시맙, 펌브롤리주맙, 아텍솔리주맙, 예정사-리간드 1 (PD-L1) 결합제 (예컨대, PD-L1 항체), CD20-지시된 세포용해 결합제 (예컨대, CD-20 항체), 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4) 결합제 (예컨대, CTLA-4 항체), 및 예정사 수용체-1 (PD-1) 결합제 (예컨대, PD-1 항체). 일부 구체예들에서, 암은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체

예들에서, 종양은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 병태를 가진다. 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0022]

특정 양상들에서, 본 출원은 환자에서 백신에 의해 유도되는 면역 반응을 증강시키는 유효량의 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합) 및 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 백신에 의해 유도되는 면역 반응의 증강 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 환자에서 백신에 의한 면역 반응을 증강시키기 위해 면역요법제와 조합하여 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 환자에서 백신에 의한 면역 반응을 증강시키기 위해 ActRII 길항제와 조합하여 사용하기 위한 면역요법제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 백신은 암 백신이다. 일부 구체예들에서, 백신은 종양 백신이다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 종양의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 환자에서 암 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 환자에서 종양 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 종양 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 암은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암 또는 종양을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이차암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서, 백신은 병원체 백신이다. 일부 구체예들에서, 개시된 증강된 면역 반응은 환자에서 병원체에 의한 감염을 치료한다. 일부 구체예들에서, 개시된 증강된 면역 반응은 환자에서 병원체에 의한 감염을 예방한다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 병원체는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 세균, 바이러스, 진균, 또는 기생충 병원체. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진을 발달시킬 위험이 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 병태를 가진다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 T 세포 면역 반응을 포함한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 또는 병원체에 대하여 환자를 백신접종시킨다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 병원체를 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 하나 이상의 추가 면역항암제가 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 하나 이상의 추가 면역항암제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 알렘투주맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 오파트루맙, 리트시맙, 펌브롤리주맙, 아텍솔리주맙, 예정사-리간드 1 (PD-L1) 결합제 (예컨대, PD-L1 항체), CD20-지시된 세포용해 결합제 (예컨대, CD-20 항체), 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4) 결합제 (예컨대, CTLA-4 항체), 및 예정사 수용체-1 (PD-1) 결합제 (예컨대, PD-1 항체). 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0023]

특정 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는

ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합)를 투여하는 단계를 포함하는 환자에서 면역 반응을 유도 또는 증강시키는 방법에 관한 것이다. 일부 양상들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에서 면역 반응을 유도 또는 증강시키는 데 사용하기 위한 ActRII 길항제에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 환자는 암을 가진다. 일부 구체예들에서, 환자는 종양을 가진다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암에 대한 것이다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 종양에 대한 것이다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 종양의 성장을 억제한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 환자에서 암 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 환자에서 종양 세포 부하를 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 종양 전이를 치료 또는 예방한다. 일부 구체예들에서, 암은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 종양은 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 암은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 종양은 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 환자는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 암 또는 종양을 가진다: 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암 뿐만 아니라 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종). 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 병원체에 대한 것이다. 일부 구체예들에서, 개시된 증강된 면역 반응은 환자에서 병원체에 의한 감염을 치료한다. 일부 구체예들에서, 개시된 증강된 면역 반응은 환자에서 병원체에 의한 감염을 예방한다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자의 면역억제를 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 환자에서 면역 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 T 세포 탈진을 촉진시킨다. 일부 구체예들에서, 병원체는 면역요법에 반응성이다. 일부 구체예들에서, 병원체는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 세균, 바이러스, 진균, 또는 기생충 병원체. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진을 발달시킬 위험이 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 면역 탈진과 연관된 질환 또는 병태를 가진다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 T 세포 면역 반응을 포함한다. 일부 구체예들에서, 개시된 또는 증강된 면역 반응은 암 또는 병원체에 대하여 환자를 백신접종시킨다. 일부 구체예들에서, 환자에게 암 또는 종양을 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 병원체를 치료하기 위한 하나 이상의 추가 활성제 및/또는 지지 요법이 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 환자에게 하나 이상의 추가 면역항암제가 추가 투여된다. 일부 구체예들에서, 하나 이상의 추가 면역항암제는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다: 알렘투주맙, 이필리무맙, 니볼루맙, 오파트무맙, 리툽시맙, 펌브롤리주맙, 아텍솔리주맙, 예정사-리간드 1 (PD-L1) 결합제 (예컨대, PD-L1 항체), CD20-지시된 세포용해 결합제 (예컨대, CD-20 항체), 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4) 결합제 (예컨대, CTLA-4 항체), 및 예정사 수용체-1 (PD-1) 결합제 (예컨대, PD-1 항체). 일부 구체예들에서, 환자는 자가면역 질환을 가지지 않는다. 일부 구체예들에서, 환자는 조직 또는 장기 이식 중인 것이 아니며 또는 조직 또는 장기 이식을 받지 않았다. 일부 구체예들에서, 환자는 이식편 대 숙주 질환을 가지지 않는다.

[0024]

일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 ActRII 수용체 (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB 수용체) 및/또는 ALK4 수용체, 특히, 하류 신호전달을 억제하는 ALK4 수용체 (예컨대, Smads 1, 2, 3, 5, 및/또는 8)를 억제할 수 있는 제제이다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 하나 이상의 ActRII 및/ALK4-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]를 억제할 수 있는 제제이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 ActRII 및/또는 ALK4 신호전달 경로의 하나 이상의 세포내 매개자 (예컨대, Smads 1, 2, 3, 5, 및/또는 8)를 억제할 수 있는 제제이다. 이러한 ActRII 길항제 제제에는, 예를 들면, 리간드 트랩 [예컨대, ActRII (ActRIIA 또는 ActRIIB) 폴리펩티드, 또는 ActRII 폴리펩티드들의 조합, 뿐만 아니라 이의 변이체 (예컨대, GDF 트랩 폴리펩티드); ALK4: ActRIIB이형다량체; 폴리스타틴 폴리펩티드; FLRG 폴리펩티드]; 하나 이상의 ActRII 리간드, ALK4 수용체, 및/또는 ActRII 수용체 (예컨대, ActRIIA/B 항체)를 억제하는 항체, 또는 항체들의 조합; 하나 이상의 ActRII 리간드, ALK4, ActRII 수용체, 및/또는 ActRII 및/또는 ALK4 하류 신호전달 성분 (예컨대,

Smads)을 억제하는 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드들의 조합; 하나 이상의 ActRII 리간드, ALK4, ActRII 수용체, 및/또는 ActRII 및/또는 ALK4 하류 신호전달 성분 (예컨대, Smads)을 억제하는 소분자, 또는 소분자들의 조합, 뿐만 아니라 이의 조합이 포함된다.

[0025] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF11을 억제하는 물질이다. GDF11 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 GDF11 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF11에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF11에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다.

[0026] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF8을 억제하는 물질이다. GDF8 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 GDF8 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF8에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF8에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다.

[0027] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 액티빈 (예컨대 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 및 액티빈 AE)을 억제하는 물질이다. 액티빈 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 액티빈 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 액티빈에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 및/또는 액티빈 E에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 액티빈 B에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 실질적으로 액티빈 A에 결합하지 않거나 (예컨대, 1×10^{-7} M 보다 높은 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나 비교적 보통의 결합, 예컨대, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 가짐) 및/또는 액티빈 A 활성을 억제하지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 액티빈 B에 결합하지만 (예컨대, 최소한 1×10^{-7} M, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M의 K_D 로 결합함), 실질적으로 액티빈 A에는 결합하지 않거나 (예컨대, 1×10^{-7} M 보다 높은 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나 비교적 보통의 결합, 예컨대, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 가짐) 및/또는 액티빈 A 활성을 억제하지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 실질적으로 액티빈 B에 결합하지 않거나 (예컨대, 1×10^{-7} M 보다 높은 K_D 로 액티빈 B에 결합하거나 비교적 보통의 결합, 예컨대, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 가짐) 및/또는 액티빈 B 활성을 억제하지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 액티빈 A에 결합하지만 (예컨대, 최소한 1×10^{-7} M, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M,

또는 최소한 1×10^{-12} M의 K_D 로 결합함), 실질적으로 액티빈 B에는 결합하지 않거나 (예컨대, 1×10^{-7} M 보다 높은 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나 비교적 보통의 결합, 예컨대, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 가짐) 및/또는 액티빈 B 활성을 억제하지 않는다.

[0028] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP6를 억제하는 물질이다. BMP6 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 BMP6 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP6에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP6에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다.

[0029] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF3를 억제하는 물질이다. GDF3 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 GDF3 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF3에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 GDF3에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다.

[0030] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP9를 억제하는 물질이다. BMP9 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 BMP9 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP9에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP9에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다.

[0031] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP10을 억제하는 물질이다. BMP10억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 BMP10 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP10에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 BMP10에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다.

[0032] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 ActRIIA를 억제하는 물질이다. ActRIIA 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 ActRIIA에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 ActRIIA에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한

1×10^{-12} M) 결합한다. 일부 구체예들에서, ActRIIA에 결합 및/또는 이를 억제하는 ActRII 길항제는 추가로 ActRIIB에 결합 및/또는 이를 억제할 수 있다 (예컨대, ActRIIA/B 항체).

[0033] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 ActRIIB를 억제하는 물질이다. ActRIIB 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 ActRIIB에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 ActRIIB에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB에 결합 및/또는 이를 억제하는 ActRII 길항제는 추가로 ActRIIA에 결합 및/또는 이를 억제할 수 있다 (예컨대, ActRIIA/B 항체).

[0034] 특정 양상들에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 ALK4를 억제하는 물질이다. ALK4 억제에 대한 효과는, 예를 들면, 본 출원에 기재된 것들을 포함한 세포-기반 분석법 (예컨대, Smad 신호전달 리포터 분석)을 사용하여 결정될 수 있다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합은 최소한 ALK4에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법들을 비롯한 결합 친화력 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 또는 길항제들의 조합은 최소한 ALK4에 최소한 1×10^{-7} M의 K_D 로 (예컨대, 최소한 1×10^{-8} M, 최소한 1×10^{-9} M, 최소한 1×10^{-10} M, 최소한 1×10^{-11} M, 또는 최소한 1×10^{-12} M) 결합한다.

[0035] 특정 양상들에서, 본 출원은 ActRII 폴리펩티드를 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 용어 "ActRII 폴리펩티드"는 자연 발생 ActRIIA 및 ActRIIB 폴리펩티드 뿐만 아니라, 가령, 본 출원에 기재된 이의 절두부들 및 변이체들 (예컨대, GDF 트랩 폴리펩티드)을 집합적으로 지칭한다. 바람직하게는 ActRII 폴리펩티드는 ActRII 폴리펩티드 또는 이의 변형된 (변이체) 형태의 리간드-결합 도메인을 포함하거나, 이러한 도메인으로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 ActRIIA 폴리펩티드의 ActRIIA 리간드-결합 도메인, 예를 들면, ActRIIA 세포의 도메인의 일부분을 포함하거나, 이러한 도메인으로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드의 ActRIIB 리간드-결합 도메인, 예를 들면, ActRIIB 세포의 도메인의 일부분을 포함하거나, 이러한 도메인으로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 바람직하게는, 본 명세서에 기재된 방법들에 따라 사용되는 ActRII 폴리펩티드는 가용성 폴리펩티드이다.

[0036] 특정 양상들에서, 본 출원은 ActRIIA 폴리펩티드, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 9의 아미노산 30-110의 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 아미노산 서열들로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 다른 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 9의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 다른 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 10의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 11의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 50의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 또한 또 다른 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 54의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 또한 또 다른 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 57의 아미노산 서열과 최소

한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다.

[0037]

[illegible]

[illegible]

는 구성될 수 있으며, 여기서 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대한 위치 79에서 산성 아미노산을 포함한다. 또한 또 다른 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 123의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 다른 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 123의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있으며, 여기서 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대한 위치 79에서 산성 아미노산을 포함한다. 또한 또 다른 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 128의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 128의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있으며, 여기서 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대한 위치 79에서 산성 아미노산을 포함한다. 또한 또 다른 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 131의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 131의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있으며, 여기서 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대한 위치 79에서 산성 아미노산을 포함한다. 또한 또 다른 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 132의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 132의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있으며, 여기서 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대한 위치 79에서 산성 아미노산을 포함한다. 또한 또 다른 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 135의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 133의 아미노산 서열과 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있으며, 여기서 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대한 위치 79에서 산성 아미노산을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 명세서에 기재된 방법들 및 용도에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 L79에 해당하는 위치에 산성 아미노산을 포함하지 않는다.

[0038] 다른 양상들에서, 본 출원은 GDF 트랩 폴리펩티드를 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, GDF 트랩은, 야생형 리간드-결합 도메인에 관한 비율에 비해 최소한 2-, 5-, 10-, 20, 50-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰, 액티빈 A 결합에 관한 K_d 대 GDF11 및/또는 GDF8 결합에 관한 K_d 의 비율을 가지는 변형된 ActRII 리간드-결합 도메인을 포함하거나, 이러한 도메인으로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 선택적으로, 변형된 리간드-결합 도메인을 포함하는 GDF 트랩은 야생형 ActRII 리간드-결합 도메인에 비해, 최소한 2-, 5-, 10-, 20-, 25-, 50-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰, 액티빈 A의 억제에 관한 IC_{50} 대 GDF11 및/또는 GDF8의 억제에 관한 IC_{50} 의 비율을 가진다. 선택적으로, 변형된 리간드-결합 도메인을 포함하는 GDF 트랩은 액티빈 A의 억제에 관한 IC_{50} 보다 최소한 2, 5, 10, 20, 50, 또는 심지어 100 배 더 작은 IC_{50} 으로 GDF11 및/또는 GDF8을 억제한다. 이러한 GDF 트랩들은 면역글로불린 Fc 도메인 (야생형 또는 돌연변이)를 포함하는 융합 단백질 일 수 있다. 특정 경우에서, 대상의 가용성 GDF 트랩들은 GDF8 및/또는 GDF11-매개 세포내 신호전달 (예컨대, Smad 2/3 신호전달)의 길항제 (억제제)이다.

[0039] 일부 구체예들에서, 본 출원은 변형된 리간드-결합 (예컨대, GDF11-결합) 도메인을 포함하는 가용성 ActRIIB 폴리펩티드인 GDF 트랩들을 제공한다. 변형된 리간드-결합 도메인을 보유한 GDF 트랩들은, 예를 들면, 인간 ActRIIB의 아미노산 잔기들에서의 돌연변이, 가령, E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 및 F101를 하나 이상 포함할 수 있다 (서열 번호: 1에 관하여 넘버링함). 선택적으로, 변형된 리간드-결합 도메인은 ActRIIB 수용체의 야생형 리간드-결합 도메인에 비해 일정 리간드, 가령, GDF8/GDF11에 대한 증가된

선택성을 가질 수 있다. 설명하기 위하여, 이들 돌연변이들은, 변형된 리간드-결합 도메인의 선택성을 액티빈에 대하여 보다 GDF11 (그리고, 그에 따라, 아마도, GDF8)에 대하여 증가시킴이 본 명세서에서 증명된다: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E, 및 D80I. 다음과 같은 돌연변이는 GDF11에 대하여 보다 액티빈 결합의 비율을 증가시키는 역효과를 가진다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 전체 (GDF11 및 액티빈) 결합 활성은 "꼬리" 영역 또는, 아마도, 구조화되지 않은 링커 영역을 포함시킴으로써, 그리고 또한 K74A 돌연변이를 사용함으로써 증가될 수 있다. 리간드 결합 친화력의 전체 감소를 유발하였던 다른 돌연변이에는 다음이 포함된다: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M 및 D80N. 돌연변이는 원하는 효과를 구현하기 위해 조합될 수 있다. 예를 들면, GDF11:액티빈 결합의 비율에 영향을 주는 많은 돌연변이들은 리간드 결합에 전체적으로 부정적인 영향을 미치므로, 이들은 일반적으로 리간드 결합을 증가시켜 리간드 선택성을 가지는 개선된 결합 단백질을 생성하는 돌연변이들과 조합될 수 있다. 한 예시적인 구체예에서, GDF 트랩은 L79D 또는 L79E 돌연변이를, 선택적으로 추가 아미노산 치환, 부가, 또는 결실과 조합하여 포함하는 ActRIIB 폴리펩티드이다.

[0040]

본 명세서에 기재된 바와 같이, ActRII 폴리펩티드 및 그의 변이체들 (GDF 트랩들)은 동종다량체, 예를 들면, 동형이량체, 동종삼량체, 동종사량체, 동종오량체, 및 그 이상의 동종다량체 복합체들일 수 있다. 특정 바람직한 구체예들에서, ActRII 폴리펩티드 및 그의 변이체들은 동형이량체다. 특정 구체예에서, 본 명세서에 기재된 ActRII 폴리펩티드 이량체들은 제 2 ActRII 폴리펩티드와 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합되는 제 1 ActRII 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 상기 제 1 폴리펩티드는 하나의 ActRII 도메인 및 상호작용 짝의 제 1 구성요소 (또는 제 2 구성요소)의 하나의 아미노산 서열 (예컨대, 면역글로불린의 불변 도메인)을 포함하고 상기 제 2 폴리펩티드는 상호작용 짝의 제 2 구성요소 (또는 제 1 구성요소)의 하나의 아미노산 서열 및 하나의 ActRII 폴리펩티드를 포함한다.

[0041]

특정 양상들에서, 그의 변이체들 (예컨대, GDF 트랩들)을 비롯한 ActRII 폴리펩티드는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 폴리펩티드는 ActRII 폴리펩티드 도메인과 하나 또는 그 이상의 이종 (비-ActRII) 폴리펩티드 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 폴리펩티드는, 하나의 도메인으로서, ActRII 폴리펩티드 유래의 아미노산 서열 (예컨대, ActRII 수용체 또는 그의 변이체의 리간드-결합 도메인) 및, 원하는 성질, 가령, 개선된 약물동력학, 보다 용이한 정제, 특정 조직들에 대한 표적, 등을 제공하는 하나 이상의 이종 도메인들을 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(multimerization), 및/또는 정제 중 하나 이상을 강화시킬 수 있다. 선택적으로, 융합 단백질의 ActRII 폴리펩티드 도메인은 하나 이상의 이종 폴리펩티드 도메인에 직접 연결(융합)되거나, 또는 ActRII 폴리펩티드의 아미노산 서열과 하나 이상의 이종 도메인의 아미노산 서열 사이에 링커와 같은 개입 서열이 위치할 수 있다. 특정 구체예에서, ActRII 융합 단백질은 이종 도메인과 ActRII 도메인 사이에 위치한 비교적 구조화되지 않은 링커를 포함한다. 이러한 구조화되지 않은 링커는 ActRIIA 또는 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단 단부("꼬리")에 대략 4-15개의 아미노산으로 된 비구조화 영역에 해당할 수 있으며, 또는 링커는 상대적으로 2차 구조가 없는 3 내지 15, 20, 30, 50개 또는 그 이상의 아미노산으로 된 인공 서열일 수 있다. 링커에는 글리신과 프롤린 잔기가 많을 수 있으며, 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 반복 서열들을 내포할 수 있다. 링커의 예로는, 서열 TGGG (서열 번호: 31), SGGG (서열 번호: 32), TGGGG (서열 번호: 29), SGGGG (서열 번호: 30), GGGGS (서열 번호: 33), GGGG (서열 번호: 28), 및 GGG (서열 번호: 27)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예들에서, ActRII 융합 단백질은, 예를 들면, 면역글로불린의 Fc 부위를 비롯한 면역글로불린의 불변 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 아미노산 서열은 IgG (IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgA (IgA1 또는 IgA2), IgE, 또는 IgM 면역글로불린의 Fc 도메인에서 유래한다. 예를 들면, 면역글로불린 도메인의 Fc 부위는 가령, 상호작용 짝의 제 1 구성요소는 서열 번호: 22-26 중 하나와 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 이러한 면역글로불린 도메인들은 변형된 Fc 활성, 예컨대, 하나 이상의 Fc 작동체(effector) 기능들의 감소를 부여하는 하나 이상의 아미노산 변형들 (예컨대, 결실, 부가, 및/또는 치환)을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, ActRII 융합 단백질은 구성 A-B-C로 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들면, B 부분은 본 명세서에 기재된 N- 및 C-말단 절두된 ActRII 폴리펩티드이다. 상기 A 부분과 C 부분은 독립적으로 0, 1 또는 1개 이상의 아미노산일 수 있으며, A 부분과 C 부분은 모두 B에 대하여 이종이다. 상기 A 및/또는 C 부분은 링커 서열을 통하여 상기 B 부분에 부착될 수 있다. 특정 구체예에서, ActRII 융합 단백질은 리더 서열을 포함한다. 리더 서열은 고유 ActRII 리더 서열 (예컨대, 고유 ActRIIA 또는 ActRIIB 리더 서열) 또는 이종 리더 서열일 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 리더 서열은 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA) 리더 서열이다.

[0042] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, ALK4: ActRIIB이형이량체 단백질 복합체는 상응하는 ActRIIB 및 ALK4 동형이량체과 비교하여 상이한 리간드-결합 프로파일/선택성을 가짐을 발견하였다. 특히, ALK4: ActRIIB이형이량체 이형이량체는 동형이량체와 비교하여 액티빈 B에 대하여 강화된 결합을 보이며, ActRIIB 동형이량체에서 관찰된 바와 같이, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11에 대하여 강력한 결합을 유지하고, 그리고 BMP9, BMP10, 및 GDF3에 대하여 실질적으로 감소된 결합을 나타낸다. 특히, BMP9는 ALK4: ActRIIB이형이량체에 대하여 낮은 친화력 내지 탐지불가능한 친화력을 나타내고, 한편 이 리간드는 ActRIIB 동형이량체에 강력하게 결합한다. ActRIIB 동형이량체와 유사하게, ALK4: ActRIIB이형이량체는 에 대한 중간-수준의 결합을 유지한다. 도 19를 참고하라. 이들 데이터는 ALK4: ActRIIB이형이량체가 상응하는 ActRIIB 동형이량체와 비교하였을 때, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11의 더 큰 선택적 길항제 (억제제)임을 설명한다. 따라서, ALK4: ActRIIB이형이량체는 특정 용도에서 ActRIIB 동형이량체보다 더 유용할 것이며, 이때 이러한 선택적 길항작용이 유익하다. 실시예는 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF8, 및 GDF11의 길항작용을 유지하지만, 하나 또는 그 이상의 BMP9, BMP10, 및 GDF3의 길항작용은 최소화시키는 것이 바람직한 치료 용도를 포함한다. 더욱이, ALK4: ActRIIB이형이량체는 환자에서 암을 치료하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 출원은, 부분적으로, ALK4: ActRIIB이형이량체 및 이의 용도에 관한 것이다. 특정 작용 메커니즘에 결부되는 것을 원하지 않지만, 최소한 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 및 액티빈 AC), GDF8, 및/또는 GDF11에 결합하는 ALK4: ActRIIB이형다량체, 뿐만 아니라 이의 변이체들은 암 환자들에서 유익한 효과를 촉진시키기 위한 유용한 제제가 될 것이다.

[0043] 따라서, 본 명세서는 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드 및 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드 (ALK4: ActRIIB이형다량체)를 포함하는 이형다량체 복합체 (이형다량체) 뿐만 아니라 이의 용도를 제공한다. 바람직하게는, ALK4 폴리펩티드는 ALK4 수용체의 리간드-결합 도메인, 예를 들면, ALK4 세포외 도메인의 일부분을 포함한다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드는 일반적으로 ActRIIB 수용체의 리간드-결합 도메인, 예를 들면, ActRIIB 세포외 도메인의 일부분을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 ALK4 및 ActRIIB 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이의 생성된 이형다량체는 가용성이다.

[0044] 특정 측면들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 14의 아미노산 24-34중 임의의 하나에서 시작되고, 서열 번호: 14의 아미노산 101-126중 임의의 하나에서 끝나는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 예를 들면, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 14의 아미노산 34-101대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 15에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또한 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 19에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또한 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 74에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또한 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 76에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또한 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 79에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또한 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 80에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또한 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 143에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또한 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 145에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함

하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다.

[0045]

특정 측면들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 20-29중 임의의 하나에서 시작되고, 서열 번호: 1의 아미노산 25-131중 임의의 하나에서 끝나는 폴리펩티드에 대하여 최소한 70% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성된다. 예를 들면, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 2에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 3에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 5에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 6에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 58에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 60에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 63에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 66에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 71에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 73에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 77에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 78에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 139에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 141에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 바람직한 특정 구체예들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산 (예컨대, E 또는 D)을 포함하는 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하지 않는다.

[0046]

본 명세서에서 설명된 ALK4 및 ActRIIB 폴리펩티드의 다양한 조합 또한 ALK4: ActRIIB이형다량체로 고려된다. 예를 들면, 특정 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 14의 아미노산 34-101에 대하여 최소한

70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이들로 구성된 또는 이들로 구성된 폴리펩티드; 그리고 b) 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이들로 구성된 또는 이들로 구성된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 추가 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 14의 아미노산 34-101에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이들로 구성된 또는 이들로 구성된 폴리펩티드; 그리고 b) 서열 번호: 1의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이들로 구성된 또는 이들로 구성된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 특정 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 14의 아미노산 34-101에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드; 그리고 b) 서열 번호: 1의 아미노산 20-134에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 다른 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 15에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드; 그리고 b) 서열 번호: 2에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또 다른 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 15에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드; 그리고 b) 서열 번호: 3에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또 다른 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 15에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드; 그리고 b) 서열 번호: 5에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 또 다른 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 15에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드; 그리고 b) 서열 번호: 6에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 이로 구성된 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, ALK4: ActRIIB이형다량체 구조는 예를 들면, 이형이량체, 이형삼량체, 이형사량체, 이형오량체, 및 더 높은 차수의 복합체들을 포함한다. 예컨대, 도 21-23을 참고하라. 바람직한 특정 구체예들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 이형이량체이다. 특정 양상들에서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 융합 단백질일 수 있다.

[0048] 특정 양상들에서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4 폴리펩티드는 ALK4 폴리펩티드 도메인과 하나 또는 그 이상의 이종 (비-ALK4) 폴리펩티드 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 유사하게, 일부 구체예들에 있어서, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인과 하나 또는 그 이상의 이종 (비-ActRIIB) 폴리펩티드 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들면, 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 설명된 ALK4: ActRIIB이형다량체는 ActRIIB 폴리펩티드와 공유적으로, 또는 비-공유적으로 연합된 ALK4 폴리펩티드를 포함하며, 이때 ALK4 폴리펩티드는 ALK4 도메인과 상호작용 쌍의 제 1 구성요소 (또는 제 2 구성요소)의 아미노산 서열을 포함하며, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드와 상호작용 쌍의 제 2 구성요소 (또는 제 1 구성요소)의 아미노산 서열을 포함한다. 선택적으로, 이러한 ALK4 폴리펩티드는 상호작용 쌍의 제 1 구성요소 (또는 제 2 구성요소)에 직접 연결 (융합)되거나, 또는 ALK4 폴리펩티드의 아미노산 서열과, 상호작용 쌍의 제 1 구성요소 (또는 제 2 구성요소)의 아미노산

서열 사이에 개입 서열, 가령, 링커가 위치할 수 있다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드는 상호작용 짝의 제 2 구성요소 (또는 제 1 구성요소)에 직접 연결 (융합)되거나, 또는 ActRIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열과, 상호작용 짝의 제 2 구성요소 (또는 제 1 구성요소)의 아미노산 서열 사이에 개입 서열, 가령, 링커가 위치할 수 있다. 링커의 예로는, 서열 TGGG (서열 번호: 31), SGGG (서열 번호: 32), TGGGG (서열 번호: 29), SGGGG (서열 번호: 30), GGGGS (서열 번호: 33), GGGG (서열 번호: 28), 미 GGG (서열 번호: 27)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다..

[0049] 본원에서 설명된 상호작용 짝은 이량체화를 촉진하거나 또는 고차 다량체를 형성하도록 설계된다. 예컨대, 도 21-23을 참고하라. 일부 구체예들에서, 상기 상호작용 짝은 상호작용하여, 복합체, 구체적으로, 이형이량체 복합체를 형성하는 임의의 2개 폴리펩티드 서열일 수 있지만, 작업 구체예에서는 동형이량체 서열을 형성하는 상호작용 짝이 이용될 수도 있다. 상호작용 짝의 제 1 및 제 2 구성요소는 비대칭 짝일 수 있는데, 이것은 상기 짝의 구성요소들이 자가 연관보다는 서로에 우선적으로 연관된다(가령, 유도된 상호작용 짝)는 것을 의미한다. 따라서, 비대칭 상호작용 짝의 제 1 및 제 2 구성요소는 연관하여 이형이량체성 복합체를 형성할 수 있다. 대안으로, 상호작용 짝은 비유도될 수 있는데, 이것은 상기 짝의 구성요소들이 실제적인 신호 없이 서로 연관되거나 또는 자가-연관될 수 있으므로, 동일하거나 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 비유도된 상호작용 짝의 제 1 및 제 2 구성요소는 연관하여 동형이량체성 복합체 또는 이형이량체성 복합체를 형성할 수 있다. 선택적으로, 상호작용 작용 짝 (가령, 비대칭 짝 또는 비유도된 상호작용 짝)의 제 1 구성요소는 상호작용 짝의 제 2 구성요소와 공유적으로 연관된다. 선택적으로, 상호작용 작용 짝 (가령, 비대칭 짝 또는 비유도된 상호작용 짝)의 제 1 구성요소는 상호작용 짝의 제 2 구성요소와 비-공유적으로 연관된다. 선택적으로, 상호작용 작용 짝 (가령, 비대칭 짝 또는 비유도된 상호작용 짝)의 제 1 구성요소는 상호작용 짝의 제 2 구성요소와 공유적 그리고 비공유적으로 연관된다.

[0050] 전통적인 Fc 융합 단백질 및 항체는 비유도된 상호작용 짝의 예이고, 반면 다양한 가공된 Fc 도메인은 비대칭 상호작용 짝으로서 설계되었다.[Spiess et al (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106]. 따라서, 본 명세서에 설명된 제 1 구성요소 및/또는 제 2 구성요소는 면역글로불린의 불변 도메인, 예를 들면, 면역글로불린의 Fc 부분을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상호작용 짝의 제 1 구성요소는 IgG (IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgA (IgA1 또는 IgA2), IgE, 또는 IgM 면역글로불린의 Fc 도메인으로부터 유도된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 면역글로불린 도메인은 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 (예컨대, 결실, 부가, 및/또는 치환)을 포함하여, ALK4: ActRIIB이형다량체 형성을 촉진시킬 수 있다. 예를 들면, 상호작용 짝의 제 1 구성요소는 서열 번호: 22-26 중에서 한 가지에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 유사하게, 상호작용 짝의 제 2 구성요소는 IgG (IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgA (IgA1 또는 IgA2), IgE, 또는 IgM의 Fc 도메인으로부터 유래되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 면역글로불린 도메인은 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 (예컨대, 결실, 부가, 및/또는 치환)을 포함하여, ALK4: ActRIIB이형다량체 형성을 촉진시킬 수 있다. 예를 들면, 상호작용 짝의 제 2 구성요소는 서열 번호: 22-26 중에서 한 가지에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 또는 이들로 구성될 수 있다. 일부 구체예에서, 상호작용 짝의 제 1 구성요소 및 제 2 구성요소는 동일한 면역글로불린 클래스 및 아형으로부터 유래된 Fc 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 상호작용 짝의 제 1 구성요소 및 제 2 구성요소는 상이한 면역글로불린 클래스 또는 아형으로부터 유래된 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형이량체는 i) 서열 번호: 76에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ALK4 폴리펩티드, 그리고 ii) 서열 번호: 73에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형이량체는 i) 서열 번호: 80에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ALK4 폴리펩티드, 그리고 ii) 서열 번호: 78에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형이량체는 i) 서열 번호: 139에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ALK4 폴리펩티드, 그리고

ii) 서열 번호: 143에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형이량체는 i) 서열 번호: 141에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ALK4 폴리펩티드, 그리고 ii) 서열 번호: 145에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다.

[0051] 특정 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 71에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 구성된다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 73에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ActRIIB 아미노산 서열을 포함하거나 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 구성된다. 특정 양상들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 74에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 구성된다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 76에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 ALK4 아미노산 서열을 포함하거나 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 구성된다. ALK4: ActRIIB이형다량체에 있어서 본 명세서에서 설명된 ALK4와 ActRIIB의 다양한 조합이 또한 고려된다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 76에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ALK4 폴리펩티드, 그리고 b) 서열 번호: 73에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 a) 서열 번호: 80에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ALK4 폴리펩티드, 그리고 b) 서열 번호: 78에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다.

[0052] ALK4: ActRIIB이형다량체의 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는, ALK4 또는 ActRIIB로부터 유래한 아미노산 서열인 하나의 도메인 (예컨대, ActRIIB 또는 ALK4의 리간드-결합 도메인 또는 이의 변이체) 및 원하는 성질, 가령, 개선된 약물동력학, 보다 용이한 정제, 특정 조직에 대한 표적화, 등을 제공하는 하나 이상의 추가 도메인들을 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(multimerization), 및/또는 정제 중 하나 이상을 강화시킬 수 있다.

[0053] 변이체들 (예컨대, GDF 트랩들)을 포함한 ActRII 폴리펩티드 및/또는 변이체들을 포함한 ALK4 폴리펩티드는 정제 하위서열, 가령, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열, 및 GST 융합을 포함할 수 있다. 선택적으로, ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4 폴리펩티드는 다음에서 선택된 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함한다: 당화된 아미노산, 폐길화(PEGylated) 아미노산, 파르네실화 아미노산, 아세틸화 아미노산, 바이오틴화 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 그리고 유기 유도화 물질에 접합된 아미노산. ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4 폴리펩티드는 최소한 하나의 N-연결된 당을 포함할 수 있고, 그리고 2, 3개 또는 그 이상의 N-연결된 당을 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 또한 O-연결된 당을 포함할 수 있다. 일반적으로, ActRII 길항제 폴리펩티드 및/또는 ALK4 길항제 폴리펩티드가 폴리펩티드의 자연 당화를 적절히 매개하는 포유동물 세포주에서 발현되어, 환자에서 바람직하지 않은 면역 반응 가능성을 감소시키는 것이 바람직하다. ActRII 폴리펩티드 및 ALK 폴리펩티드는 유전자조작된 곤충 또는 효모 세포, 그리고 포유동물 세포, 가령, COS 세포, CHO 세포, HEK 세포 및 NSO 세포를 비롯하여, 환자가 사용하기에 적합한 방식으로 단백질을 당화시키는 다양한 세포주에서 생성될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4 폴리펩티드는 당화된 것이며, 중국 햄스터 난소 세포주로부터 수득가능한 당화 패턴을 갖는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4 폴리펩티드는 포유동물 (예컨대, 마우스 또는 인간)에서 최소한 4, 6, 12, 24, 36, 48, 또는 72 시간의 혈청 반감기를 나타낸다. 선택적으로, ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4 폴리펩티드는 포유동물 (예

컨대, 마우스 또는 인간)에서 최소한 6, 8, 10, 12, 14, 20, 25, 또는 30 일의 혈청 반감기를 나타낼 수 있다.

[0054]

특정 양상들에서, 본 출원은 본 출원의 하나 이상의 ActRII 길항제 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제약학적 약제를 제공한다. 제약학적 약제는 또한 하나 이상의 추가 활성제, 가령, 본 출원에 기재된 장애 또는 병태 [예컨대, 백혈병 (예컨대, 급성 림프모구 백혈병), 흑색종 (예컨대, 전이성 흑색종 또는 피부 흑색종), 폐암 (예컨대, 전이성 및 비-전이성 소세포 폐암, 뿐만 아니라, 전이성 및 비-전이성 비-소세포 폐암, 가령, 편평세포 암종, 대세포 암종, 또는 선암종), 신장 세포 암종, 방광암, 중피종 (예컨대, 전이성 중피종), 두경부암 (예컨대, 두경부 편평세포 암), 식도암, 위암, 결장직장암 (예컨대, 결장직장 암종), 간암 (예컨대, 간 세포 암종), 요로상피세포 암종 (예컨대, 진행성 또는 전이성 요로상피세포 암종), 림프종 (예컨대, 고전적 호지킨 림프종), 다발 골수종, 골수형성이상 증후군, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 다형성 아교모세포종, 전립선 암, 이자암, 및 육종 (예컨대, 전이성 육종)]를 치료 또는 예방하기 위하여 사용되는 화합물을 포함할 수 있다.

[0055]

본 출원에 기재된 임의의 ActRII 길항제들은 제약학적 약제 (조성물)로 제제화될 수 있다. 일부 구체예들에서, 제약학적 약제는 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 제약학적 약제는 바람직하게는 발열원이 없을 것이다 (치료용 제품의 품질을 관리하는 규정에서 요구하는 수준으로 발열원이 없다는 것을 의미한다). 제약학적 약제는 하나 또는 그 이상의 추가 화합물, 가령, 본 명세서에 기재된 장애/병태를 치료하는 화합물을 또한 포함할 수 있다. 일반적으로, ALK4: ActRIIB이형다량체 제약학적 약제는 실질적으로 ALK4 및/또는 ActRIIB 동종다량체가 없다. 예를 들면, 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체 제약학적 약제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 ALK4 동종다량체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체 제약학적 약제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만의, 또는 약 1% 미만의 ActRIIB 동종다량체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체 제약학적 약제는 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만의, 또는 약 1% 미만의 ALK4 및 ActRIIB 동종다량체를 포함한다.

[0056]

특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 ActRII 리간드, ActRII 수용체 (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB), 및 ALK4 중 하나 이상을 억제하는 항체 또는 항체들의 조합이다. 바람직한 특정 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 ActRIIA 및 ActRIIB에 결합하는 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 GDF11에 결합하며, 선택적으로 GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AE), BMP6, GDF3, BMP9, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 GDF8에 결합하며, 선택적으로 GDF11, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AE), BMP6, GDF3, BMP9, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 GDF11, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AE), BMP6, GDF3, BMP9, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 및/또는 액티빈 E)에 결합하며, 선택적으로 GDF11, GDF8, BMP6, GDF3, BMP9, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 액티빈 A 및 액티빈 B에 결합하며, 선택적으로 GDF11, GDF8, BMP6, GDF3, BMP9, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 BMP6에 결합하며, 선택적으로 GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AE), GDF3, BMP9, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 BMP9에 결합하며, 선택적으로 GDF11, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AE), BMP6, GDF3, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 BMP10에 결합하며, 선택적으로 GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AE), BMP6, GDF3, 및 BMP9 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 ALK4에 결합하며, 선택적으로 GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AE), BMP6, GDF3, BMP9, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제는 최소한 ActRII (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB)에 결합하며, 선택적으로 GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AE), BMP6, GDF3, BMP9, 및 BMP10 중 하나 이상에 추가로 결합하는, 항체 또는 항체들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 항체는 다중특이적 항체이다. 일부

구체예들에서, 본 출원의 항체는 이중특이적 항체이다.

[0057]

특정 예들에서, 본 출원에 기재된 장애 또는 병태에 대해 본 출원의 ActRII 길항제, 또는 길항제들의 조합을 투여할 때, 적혈구들에 대한 바람직하지 않은 효과를 감소시키기 위하여 ActRII 길항제를 투여하는 동안 적혈구들에 대한 효과를 모니터링하는 것, 또는 ActRII 길항제의 투여량을 결정 또는 조절하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 적혈구 수준, 헤모글로빈 수준, 또는 적혈구용적률 수준의 증가는 바람직하지 않은 혈압 증가를 유발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058]

도면의 간단한 설명

특허 또는 특허 출원은 컬러로 작성한 최소한 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)과 함께 공개된 본 특허 또는 특허 출원의 사본은 특허청에 요청 및 필요한 요금 지불시 제공될 것이다.

도 1은 다수의 ActRIIB 및 ActRIIA 결정 구조의 복합 분석에 근거하여, 인간 ActRIIB 및 인간 ActRIIA의 세포 외 도메인들의 정렬을, 본 명세서에서 상자로 표시된 리간드와 직접 접촉하는 것으로 추측되는 잔기와 함께 보여준다.

도 2는 다양한 척추동물 ActRIIB 단백질 (서열 번호: 100-105) 및 인간 ActRIIA (서열 번호: 122)의 다수의 서열 정렬, 뿐만 아니라 이러한 정렬로부터 유래한 공통 ActRII 서열 (서열 번호: 106)을 보여준다.

도 3는 다양한 척추동물 ActRIIA 단백질들 및 인간 ActRIIA의 다수의 서열 정렬을 보여준다 (서열 번호: 107-114).

도 4는 다양한 척추동물 ALK4 단백질들 및 인간 ALK4의 다수의 서열 정렬을 보여준다 (서열 번호: 115-121).

도 5는 CHO 세포에서 발현된 ActRIIA-hFc의 정제를 보여준다. 단백질은 크기 컬럼 (상부 패널) 및 쿠마씨 (Coomassie) 염색 SDS-PAGE (하부 패널) (왼쪽 레인: 분자량 표준; 오른쪽 레인: ActRIIA-hFc)에서 보는 바와 같이 하나의, 잘-정의된 피크로 정제된다.

도 6은 BiacoreTM 분석법으로 측정한, 액티빈 (상부 패널) 및 GDF-11 (하부 패널)에 대한 ActRIIA-hFc의 결합을 보여준다.

도 7은 ActRIIB(25-131)-hFc (서열 번호: 123)에 대한 전체 비가공 아미노산 서열을 보여준다. TPA 리더 (잔기들 1-22) 및 이중-절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (잔기들 24-131, 서열 번호: 1의 고유 서열에 기초한 넘버링을 사용)들에 각각 밑줄 표시한다. 서열 번호: 1과 관련하여 위치 25에 있는, 시퀀스에 의해 성숙 융합 단백질의 N-말단 아미노산인 것으로 나타난 글루타메이트를 강조표시하였다.

도 8A 및 8B는 ActRIIB(25-131)-hFc를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보여준다 (코딩 가닥은 상부에 나타내고, 서열 번호: 124, 상보적인 가닥은 하부에 3'-5'로 나타낸다, 서열 번호: 125). TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66) 및 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오티드 73-396)을 인코딩하는 서열들에 밑줄 표시한다. ActRIIB(25-131)에 해당하는 아미노산 서열 또한 보여준다.

도 9A 및 9B는 ActRIIB(25-131)-hFc를 인코딩하는 대안적 뉴클레오티드 서열을 보여준다 (코딩 가닥은 상부에 나타내고, 서열 번호: 126, 상보적인 가닥은 하부에 3'-5'로 나타낸다, 서열 번호: 127). 이러한 서열은 초기 형질전환에서 보다 큰 단백질 발현 수준을 제공하여, 더 신속한 과정으로 세포주를 발달시킨다. TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66) 및 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오티드 73-396)을 인코딩하는 서열들에 밑줄 표시하였으며, ECD의 야생형 뉴클레오티드 서열에서의 치환 (도 8 참고)을 강조하였다. ActRIIB(25-131)에 해당하는 아미노산 서열 또한 보여준다.

도 10은 TPA 리더 서열 (이중 밑줄), ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1의 잔기들 20-134; 한줄 밑줄), 및 hFc 도메인을 포함하는 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (서열 번호: 128)에 대한 전체 아미노산 서열을 보여준다. 고유 서열 내 위치 79에서 치환된 아스파르테이트를 이중 밑줄로 표시하여 강조하고, 서열분석에 의해 성숙 융합 단백질에서 N-말단 잔기가 되는 것으로 나타난 글리신에 대하여도 같다.

도 11A 및 11B는 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 서열 번호: 129은

센스 가닥에 해당하며, 서열 번호: 130은 안티센스 가닥에 해당한다. TPA 리더 (뉴클레오타이드 1-66)에 이중 밑줄 표시하고, ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오타이드 76-420)에 한줄 밑줄 표시한다.

도 12는 TPA 리더 (이중 밑줄), 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1의 잔기들 25-131; 한줄 밑줄), 및 hFc 도메인을 포함하는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (서열 번호: 131)에 대한 전체 아미노산 서열을 보여준다. 고유 서열 내 위치 79에서 치환된 아스파르테이트에 이중 밑줄 표시하여 강조하고, 시퀀싱에 의해 성숙 융합 단백질에서 N-말단 잔기가 되는 것으로 나타난 글루타메이트에 대하여도 같다.

도 13은 리더가 없는 절두된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc에 대한 아미노산 서열을 보여준다 (서열 번호: 132). 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1의 잔기들 25-131)에 밑줄 표시한다. 고유 서열 내 위치 79에서 치환된 아스파르테이트에 이중 밑줄 표시하여 강조하고, 시퀀싱에 의해 성숙 융합 단백질에서 N-말단 잔기가 되는 것으로 나타난 글루타메이트에 대하여도 같다.

도 14는 리더, hFc 도메인, 및 링커가 없는 절두된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 25-131)에 대한 아미노산 서열을 보여준다 (서열 번호: 133). 고유 서열 내 위치 79에서 치환된 아스파르테이트에 밑줄 표시하여 강조하고, 시퀀싱에 의해 성숙 융합 단백질에서 N-말단 잔기가 되는 것으로 나타난 글루타메이트에 대하여도 같다.

도 15A 및 15B는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. 서열 번호: 134는 센스 가닥에 해당하며, 서열 번호: 135는 안티센스 가닥에 해당한다. TPA 리더 (뉴클레오타이드 1-66)에 이중 밑줄 표시하고, 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오타이드 76-396)에 한줄 밑줄 표시한다. ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1의 잔기들 25-131)에 대한 아미노산 서열 또한 도시한다.

도 16A 및 16B는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc를 인코딩하는 대안적 뉴클레오타이드 서열을 보여준다. 서열 번호: 136은 센스 가닥에 해당하며, 서열 번호: 137은 안티센스 가닥에 해당한다. TPA 리더 (뉴클레오타이드 1-66)에는 이중 밑줄 표시하고, 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오타이드 76-396)에는 밑줄 표시하고, 세포외 도메인의 야생형 뉴클레오타이드 서열에서의 치환에 이중 밑줄 표시하여 강조한다 (서열 번호: 134와 비교, 도 15). ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1의 잔기들 25-131)에 대한 아미노산 서열 또한 도시한다.

도 17는 도 16에 도시된 대안적 뉴클레오타이드 서열 (서열 번호: 136)의 뉴클레오타이드 76-396 (서열 번호: 138)을 보여준다. 이 도면에서 도 16에 표시된 것과 동일한 뉴클레오타이드 치환들에도 밑줄 표시하고 이 부분을 강조하였다. 서열 번호: 138은 L79D 치환된 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1의 잔기들 25-131에 해당), 예컨대, ActRIIB(L79D 25-131) 만을 인코딩한다.

도 18은 Clustal 2.1을 사용하여 인간 IgG 아이소형으로부터 얻은 Fc 도메인들의 다수 서열 정렬을 보여준다. 힌지 영역은 점선 밑줄로 표시된다. 이중 밑줄은 비대칭 사슬 짝짓기를 증진하기 위해 IgG1 Fc (서열 번호: 34)에서 조작될 수 있는 위치 및 다른 아이소형 IgG2, IgG3 및 IgG4에 대한 상응하는 위치의 실례를 나타낸다.

도 19는 ActRIIB-Fc 동형이량체와 ALK4-Fc 동형이량체와 비교하여 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체 단백질 복합체에 대한 비교 리간드 결합 데이터를 나타낸다. 각 단백질 복합체의 경우, 리간드는 리간드 신호전달 억제와 관련된 동역학 상수인 k_{off} 에 의해 등급결정되며, 결합 친화력 (가장 단단하게 결합된 리간드가 상위에 열거됨)의 내림 순서로 열거된다. 왼쪽에서 노란색, 빨간색, 녹색 및 파란색 선은 해리 속도 상수의 크기를 나타낸다. 검정색 선은 동형이량체와 비교하여 이형이량체에 대한 결합이 강화되거나 변하지 않은 리간드를 나타내지만, 빨간색 점선은 동형이량체에 비해 결합이 실질적으로 감소한 것을 나타낸다. 나타난 바와 같이, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 이들 동형이량체와 비교하여 액티빈 B에 강화된 결합을 보이고, ActRIIB-Fc 동형이량체에서 관찰된 바와 같이, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11에 강력한 결합을 유지하지만, BMP9, BMP10, 및 GDF3에 대해서 실질적으로 감소된 결합을 나타낸다. ActRIIB-Fc 동형이량체와 유사하게, 상기 이형이량체는 BMP6에 중간-수준 결합을 유지한다.

도 20은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 A-204 Reporter 유전자분석에 의해 측정된 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체/ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체 비교 IC_{50} 데이터를 나타낸다. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체와 유사하게 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11 신호전달 경로를

억제한다. 그러나, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 BMP9 및 BMP10 신호전달 경로 억제는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하여 상당히 감소된 것이다. 이들 데이터는 ALK4: ActRIIB이형이량체가 상응하는 ActRIIB:ActRIIB 동형이량체와 비교하였을 때, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11의 더 큰 선택적 길항제임을 설명한다.

도 21A 및 21B 는 I 형 수용체와 II 형 수용체 폴리펩티드를 포함하는 이형화학 단백질 복합체의 2가지 도식적 예를 보여준다. 도 21A는 한 가지 I 형 수용체 융합 폴리펩티드와 한 가지 II 형 수용체 융합 폴리펩티드를 포함하는 이형이량체 단백질 복합체를 나타내는데, 이때 이들 두 폴리펩티드는 각 폴리펩티드 쇠 안에 함유된 다량체화 도메인을 통하여 공유적으로 또는 비공유적으로 어셈블리될 수 있다. 어셈블리된 두 다량체화 도메인은 유도된 또는 비-유도될 수 있는 상호작용 짝을 구성한다. 도 21B는 도 21A에서 도시된 바와 같이, 2개의 이형이량체 복합체를 포함하는 이형사량체(heterotetrameric) 단백질 복합체를 나타낸다. 더 높은 차수의 복합체도 생각해볼 수 있다.

도 22 는 I 형 수용체 폴리펩티드 ("I"로 나타냄) (가령, 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 인간 또는 다른 종의 ALK4 단백질의 세포외 도메인에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리펩티드)와 II 형 수용체 폴리펩티드 ("II"로 나타냄) (가령, 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 인간 또는 다른 종의 ActRIIB 단백질의 세포외 도메인에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리펩티드)를 포함하는 이형체(heteromeric) 단백질 복합체의 도식적 예를 나타낸다. 도시된 구체예들에 있어서, I 형 수용체 폴리펩티드는 상호작용 짝의 제 1 구성요소 ("C₁")를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부이며, 그리고 II 형 수용체 폴리펩티드는 상호작용 짝의 제 2 구성요소 ("C₂")를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부이다. 각 융합 폴리펩티드에서, 링커는 I 형 또는 II 형 수용체 폴리펩티드와 상호작용 짝의 상응하는 구성요소 사이에 위치할 수 있다. 상호작용 짝의 제 1 및 제 2 구성요소는 유도된 (비대칭) 짝일 수 있는데, 이것은 상기 짝의 구성요소들이 자가 연관보다는 서로에 선호적으로 연관된다는 것을 의미하고, 또는 상호작용 짝은 비유도될 수 있는데, 이것은 상기 짝의 구성요소들이 실제적인 선호 없이 서로 연관되거나 또는 자가-연관될 수 있고 동일하거나 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 전통적인 Fc 융합 단백질 및 항체는 비유도된 상호작용 짝의 실례이고, 반면 다양한 가공된 Fc 도메인은 유도된(비대칭) 상호작용 짝으로서 설계되었다.[Spiess et al (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106].

도 23A-23D는 ALK4 폴리펩티드 (가령, 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 인간 또는 다른 종의 ALK4 단백질의 세포외 도메인에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리펩티드)와 ActRIIB 폴리펩티드(가령, 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 인간 또는 다른 종의 ActRIIB 단백질의 세포외 도메인에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리펩티드)를 포함하는 이형체 단백질 복합체의 도식적 예를 나타낸다. 도시된 구체예들에 있어서, ALK4 폴리펩티드는 상호작용 짝의 제 1 구성요소 ("C₁")를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부이며, 그리고 ActRIIB 폴리펩티드는 상호작용 짝의 제 2 구성요소 ("C₂")를 포함하는 융합 폴리펩티드의 일부이다. 적합한 상호작용 짝은 예를 들면, 중쇄 및/또는 경쇄 면역글로불린 상호작용 짝, 절두(truncations), 및 본 명세서에서 설명된 바와 같은 이의 변이체들 [가령, Spiess et al (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106]을 포함한다. 각 융합 폴리펩티드에서, 링커는 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드와 상호작용 짝의 상응하는 구성요소 사이에 위치할 수 있다. 상호작용 짝의 제1과 제2 구성요소들은 비유도될 수 있는데, 이것은 상기 짝의 구성요소들이 실제적인 선호 없이 서로 연관되거나 또는 자가-연관될 수 있고, 그리고 따라서, 이들은 동일하거나 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 도 23A를 참고하라. 대안으로, 상호작용 짝의 첫 번째와 두 번째 구성요소는 유도된(비대칭) 짝일 수 있는데, 이것은 상기 짝의 구성요소들이 자가 연관보다는 서로에 선호적으로 연관된다는 것을 의미한다. 도 23B를 참고하라. 더 높은 차수의 복합체도 생각해볼 수 있다. 도 23C 및 23D를 참고하라.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

1. 개요

TGFβ 슈퍼패밀리는 TGFβ, 액티빈, 결절(nodals), 뼈 형태발생 단백질(BMPs), 성장 및 분화 인자(GDFs), 그

리고 항-Mullerian 호르몬 (AMH)을 포함하는 30가지 이상의 분비된 인자로 구성된다[Weiss *et al.* (2013) *Developmental Biology*, 2(1): 47-63]. 척추동물과 무척추동물 모두에서 발현되는 상기 슈퍼패밀리의 구성요소들은 동물의 평생 동안 발달의 가장 초기 단계에서 다양한 조직과 기능에 편재되어 발현된다. 게다가, TGF β 슈퍼패밀리 단백질은 줄기 세포의 자가 재생, 생식기, 분화, 기관 형태 형성 및 성인 조직 항상성의 핵심 매개체이다. 이러한 편재된 활성과 일관되게, TGF-베타 슈퍼패밀리의 비정상 신호전달은 다양한 인간 병리에 관련된다.

[0062] TGF β 슈퍼패밀리의 리간드들은 하나의 단량체의 중심 3-1/2 회전 나선이 다른 단량체의 베타-가닥에 의해 형성된 오목한 표면을 채우는 동일한 이량체 구조를 공유한다. 대다수의 TGF β 패밀리 구성요소들은 분자 내 이황화 결합으로 더욱 안정화된다. 이 이황화 결합은 다른 2 개의 이황화 결합에 의해 형성된 고리를 통과하는데, 이로써 '시스테인 결절 (cysteine knot)' 모티프로 불리는 것을 생성된다[Lin *et al.* (2006) *Re생성* 132: 179-190; 그리고 Hinck *et al.* (2012) *FEBS Letters* 586: 1860-1870].

[0063] TGF β 슈퍼패밀리 신호전달은 리간드 자극 시 하류 SMAD 단백질 (가령, SMAD 단백질 1, 2, 3, 5, 및 8) 을 인산화시키고, 활성화시키는 이형체 복합체 of I 형 및 II 형 세린/트레오닌 키나제 수용체에 의해 매개된다 [Massague (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178]. 이들 I 형 및 II 형 수용체는 시스테인-풍부한 영역을 갖는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 특이성을 갖는 세포질 도메인으로 구성된 막경유 단백질이다. 일반적으로, I 형 수용체는 세포내 신호전달을 중재하고, II 형 수용체는 TGF β 슈퍼패밀리 리간드의 결합에 필요하다. I 형 및 II 수용체는 리간드 결합 후 안정적 복합체를 형성하여, II 형 수용체에 의해 I 형 수용체가 인산화된다.

[0064] TGF β 패밀리는 그들이 결합하는 I 형 수용체와 그들이 활성화시키는 Smad 단백질을 기준으로 두 가지 계통 발생적 분류로 나눌 수 있다. 하나는 더 최근에 생긴 분류로서, 가령, TGF β , 액티빈, GDF8, GDF9, GDF11, BMP3 및 nodal을 포함하며, 이는 Smads 2 및 3을 활성화시키는 I 형 수용체를 통하여 신호전달한다 [Hinck (2012) *FEBS Letters* 586:1860-1870]. 다른 분류는 좀더 거리가 먼 슈퍼패밀리 관련 단백질을 포함하는데, 가령, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF1, GDF5, GDF6, 및 GDF7을 포함하며, 이들은 Smads 1, 5, 및 8을 통하여 신호전달한다.

[0065] TGF β 아이소형은 TGF β 슈퍼패밀리의 기초 구성요소들, 이들중 포유류에서 공지된 3가지 아이소형, TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3가 있다. 성숙한 생체활성 TGF β 리간드는 동형이량체로 작용하고, 주로 I 형 수용체 ALK5를 통해 신호전달하지만 내피 세포에서 ALK1을 통해 추가적으로 신호하는 것으로 밝혀졌다[Goumans *et al.* (2003) *Mol Cell* 12(4): 817-828]. TGF β 1은 가장 풍부하고 편재적으로 발현되는 아이소형이다. TGF β 1은 상처 치유에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 구성적으로 활성인 TGF β 1 유전자를 발현하는 마우스는 섬유증을 일으킨다 [Clouthier *et al.* (1997) *J Clin. Invest.* 100(11): 2697-2713]. TGF β 1 발현은 인간 아교모세포종 세포에서 처음 기술되었으며, 배아 신경계의 뉴런 및 성상 세포에서 발생한다. TGF β 3는 인간 횡문근육종 세포계통으로부터 처음 분리되었으며 이후 폐 선암 및 신장 암종 세포계통에서 발견되었다. TGF β 3는 구개 및 폐 형태 형성에 중요하다고 알려져 있다[Kubiczkova *et al.* (2012) *Journal of Translational Medicine* 10:183].

[0066] 액티빈은 TGF β 슈퍼패밀리의 구성요소이며, 구성요소며 처음에는 난포-자극 호르몬의 분비 조절제로 밝혀졌지만, 이후 다양한 생식 및 비 생식-기능이 규명되었다. 2개의 밀접하게 관련된 β 소단위 ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, 및 $\beta_A\beta_B$, 차례로)의 동중/이형이량체인 3가지 주요 액티빈 형태(A, B, 및 AB)가 있다. 인간 게놈은 또한 간에서 발현되는 액티빈 C 및 액티빈 E 를 인코딩하고, 그리고 β_C 또는 β_E 를 함유하는 이형이량체 형태 또한 공지되어 있다. TGF β 슈퍼패밀리에서, 액티빈은 난소 및 태반 세포에서 호르몬 생성을 자극하고, 신경 세포 생존을 지원하고, 세포 유형에 따라 세포주기 진행에 긍정적 또는 부정적 영향을 미칠 수 있고, 그리고 적어도 양서류 태아에서 중배엽 분화를 유도할 수 있는 독특하고 다기능적 요소다[DePaolo *외.* (1991) *Proc Soc Ep Biol Med.* 198:500-512; Dyson *외.* (1997) *Curr Biol.* 7:81-84; 그리고 Woodruff (1998) *Biochem Pharmacol.* 55:953-963]. 몇몇 조직에서, 액티빈 신호전달은 이의 관련된 이형이량체, 인히빈에 의해 길항된다. 예를 들면, 뇌하수체로부터 난포-자극 호르몬 (FSH) 분비 조절에 있어서, 액티빈은 FSH 합성 및 분비를 촉진시키지만, 한편 인히빈은 FSH 합성 및 분비를 감소시킨다. 액티빈 생활성을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질은 폴리스테틴 (FS), 폴리스테틴-관련된 단백질 (FSRP, 또한 FLRG 또는 FSTL3으로도 알려짐), 및 α_2 -마크로글로불린을 포함한다.

[0067] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 단리된 β_A 소단위 또는 이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_A$ 동형이량체 또는 $\beta_A\beta_B$

이형이량체)에서 "액티빈 A"에 결합하는 물질은 β_A 소단위에 특이적으로 결합하는 물질이다. 이형이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_B$ 이형이량체)의 경우, "액티빈 A"에 결합하는 물질은 β_A 소단위 안에 존재하는 에피토프(epitopes)에 특이적이지만, 이 복합체의 비- β_A 소단위 (가령, 복합체의 β_B 소단위) 안에 존재하는 에피토프에는 결합하지 않는다. 유사하게, "액티빈 A"를 길항(억제)하는 것으로 본 명세서에서 공개된 물질은 단리된 β_A 소단위 또는 이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_A$ 동형이량체 또는 $\beta_A\beta_B$ 이형이량체)에서 β_A 소단위에 의해 매개되는 하나 또는 그 이상의 활성을 억제하는 물질이다. $\beta_A\beta_B$ 이형이량체의 경우에, "액티빈 A"를 억제하는 물질은 β_A 소단위의 하나 또는 그 이상의 활성을 특이적으로 억제하지만, 복합체의 비- β_A 소단위 (가령, 복합체의 β_B 소단위)의 활성을 억제하지 않는 물질이다. 이러한 원리는 "액티빈 B", "액티빈 C" 및 "액티빈 E"에 결합하고 및/또는 이를 억제하는 물질에도 적용된다. "액티빈 AB"에 길항작용하는 본 출원에 개시된 물질은 β_A 소단위에 의해 매개된 하나 또는 그 이상의 활성 및 β_B 소단위에 의해 매개된 하나 또는 그 이상의 활성을 억제하는 물질이다.

[0068] BMPs 및 GDFs는 함께, TGF β 슈퍼패밀리의 특징적인 폴드(characteristic fold)를 공유하는 시스테인-결절 사이토카인의 패밀리를 형성한다 [Rider *et al.* (2010) *Biochem J.*, 429(1):1-12]. 이 패밀리는 예를 들면, BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP2a, BMP3, BMP3b (GDF10로도 알려짐), BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP8a, BMP8b, BMP9 (GDF2로도 알려짐), BMP10, BMP11 (GDF11로도 알려짐), BMP12 (GDF7로도 알려짐), BMP13 (GDF6로도 알려짐), BMP14 (GDF5로도 알려짐), BMP15, GDF1, GDF3 (VGR2로도 알려짐), GDF8 (미오스태틴로도 알려짐), GDF9, GDF15, 및 데카펜타플레지(decapentaplegic)를 포함한다. 뼈 형성을 유도 할 수 있는 능력(이로 인하여 BMPs로 불림)외에도, BMP/GDF는 광범위한 조직의 발생에 형태형성적 활성을 보여준다. BMP/GDF 동종-이량체 및 이형-이량체는 I 형과 II 형의 수용체 이량체의 조합과 상호작용하여, 여러 가지 가능한 신호 생성 복합체를 생성하고, SMAD 전사 인자의 두 경쟁 세트 중 하나의 활성화를 유도한다. BMP/GDFs는 매우 특이적이며, 국소화된 기능을 갖는다. 이들은 다양한 방식으로 조절되는데, BMP/GDF 발현의 발생 제한, 그리고 사이토카인에 고친화력으로 결합하는 몇 가지 특이적인 BMP 길항 단백질의 분비를 통하여 조절된다. 신기하게도, 다수의 이들 길항제들은 TGF β 슈퍼패밀리 리간드들을 닮았다.

[0069] 성장 및 분화 인자-8 (GDF8)은 또한 미오스태틴으로 알려져 있다. GDF8은 골격근량의 음성 조절인자로서, 발생 중인 그리고 성인 골격근에서 상당히 발현된다. 유전자삽입 마우스에서 GDF8 null 돌연변이는 골격근의 눈에 띄는 비대 및다형성을 특징으로 한다 [McPherron *et al.* *Nature* (1997) 387:83-90]. 소에서 GDF8의 자연 발생 돌연변이에서 골격근량의 비슷한 증가가 있고, 그리고 인간에서 현저하게 나타난다 [Ashmore *et al.* (1974) *성장*, 38:501-507; Swatland and Kieffer, *J. Anim. Sci.* (1994) 38:752-757; McPherron and Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:12457-12461; Kambadur *et al.* *Genome Res.* (1997) 7:910-915; 그리고 Schuelke *et al.* (2004) *N Engl J Med*, 350:2682-8]. 연구에 따르면, 사람의 HIV 감염과 관련된 근육 소모는 GDF8 단백질 발현 증가를 수반한다[Gonzalez-Cadavid *et al.*, *PNAS* (1998) 95:14938-43]. 또한, GDF8은 근육 특이적 효소 (예: 크레아틴 키나제)의 생산을 조절하고, 근섬유 세포 증식을 조절할 수 있다.[International Patent Application Publication No. WO 00/43781]. GDF8 프로펩티드(pro펩티드)는 성숙한 GDF8 도메인 이량체에 비 공유 결합하여, 그 생물학적 활성을 불활성화시킬 수 있다 [Miyazono *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.*, 263; 7646-7654; 그리고 Brown *et al.* (1990) *성장 인자*s, 3: 35-43]. GDF8 또는 구조적으로 관련된 단백질에 결합하고, 이들의 생물학적 활성을 억제시키는 다른 단백질은 폴리스테틴, 그리고 잠재적으로, 폴리스테틴-관련된 단백질을 포함한다.[Gamer *et al.* (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232].

[0070] BMP11로도 알려진, GDF11은 마우스 발생 동안 꼬리싹(tail bud), 팔다리싹(limb bud), 상악 및 하악 아치, 그리고 후근 신경절에서 발현되는 분비 단백질이다. [McPherron *et al.* (1999) *Nat. Genet.*, 22: 260-264; 그리고 Nakashima *et al.* (1999) *Mech. Dev.*, 80: 185-189]. GDF11은 중배엽 및 신경 조직 모두에서 패턴화에 독특한 역할을 한다 [Gamer *et al.* (1999) *Dev Biol.*, 208:222-32]. GDF11은 병아리 날개 발달에있어서 연골 형성 및 근형성의 음성 조절자인 것으로 나타났다. [Gamer *et al.* (2001) *Dev Biol.*, 229:407-20]. 근육에서 GDF11의 발현은 GDF8과 유사한 방식으로 근육 성장을 조절하는 역할을 암시한다. 또한, 뇌에서 GDF11의 발현은 GDF11이 또한 신경계의 기능과 관련된 활성을 가질 수 있음을 시사한다. 흥미로운 것은, GDF11은 후각 상피의 신경 발생을 억제하는 것으로 밝혀졌다 [Wu *et al.* (2003) *Neuron.*, 37:197-207]. 따라서, GDF11은 근육 질환 및 신경 퇴행성 질환(가령, 근위축성 측색 경화증)과 같은 질병의 치료에서 시험관내 및 생체내 적용될 수

있다.

[0071] 일부에서, 본 출원에 제시된 데이터는 ActRII 길항제들(억제제)이 암 치료에 사용될 수 있음을 나타낸다. 특히, 각기 ActRIIA/B 항체, ActRIIA 폴리펩티드, ActRIIB 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형이량체에 결합하는 항체를 이용한 치료는, 암 모델에서, 종양 부하를 감소시키고 생존 시간을 증가시켰음을 보여주었다. 더욱이, ActRIIA/B 항체를 PD1-PDL1 길항제와 조합하여 사용하면, 이들 제제를 단독으로 사용하여 관찰된 효과들에 비해 항종양 활성을 상승적으로 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 임의의 특정 메커니즘에 제한하고자 하는 것은 아니지만, ActRIIA/B 항체, ActRIIA 폴리펩티드, ActRIIB 폴리펩티드, 및 ALK4: ActRIIB이형이량체의 효과는 주로 ActRII 신호전달 길항제 효과에 의해 유발되는 것으로 예상된다. 메커니즘에 관계없이, 본 출원에 제시된 데이터를 볼 때 ActRII 신호전달 길항제들이 암 환자의 종양 부하의 증중도를 실제로 감소시켜 생존을 연장시키는 명백하다.

[0072] 본 출원에 기재된 연구들에서 사용되었던 암에 관한 동물 모델은 인간에서의 효능을 예측하기 위한 것으로 고려되므로, 본 출원은 암을 치료하기 위해, 특히, 하나 이상의 암 합병증들을 예방 또는 이러한 합병증들의 증중도 및/또는 진행을 감소시켜 (예컨대, 종양 부하 감소 및 생존 시간 증가) 암을 치료하기 위해, ActRII 길항제들을, 단독으로 또는 하나 이상의 지지 요법 및/또는 추가 활성제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 사용하는 방법을 제공한다. 또한, 데이터는 ActRII 길항제 요법의 효능이 면역계에 의존적임을 나타낸다. 그러므로, 일부에서, 본 출원은 ActRII 길항제들이, 면역치료제, 특히, 널리 다양한 암 (예컨대, 면역억제 및/또는 면역 탈진과 관련된 암)을 치료하기 위한 면역치료제로서 사용될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 다른 공지된 면역항암제와 같이, ActRII 길항제가 환자의 면역 반응을 증강시키는 능력은 암 분야 밖에서 보다 넓은 치료 결과를 가질 수 있다. 예를 들면, 면역 증강제는 널리 다양한 감염 질환, 특히, 면역억제 및/또는 면역 탈진을 촉진하는 병원체 물질의 치료에 유용할 수 있음이 제시된 바 있다. 또한, 이러한 면역 증강제는 백신 (예컨대, 감염 질환 및 암 백신)의 면역화 효능을 증가시키는 데 유용할 수 있다. 따라서, 본 출원은 필요로 하는 개체의 면역 반응들을 증가시키고, 암을 치료하고, 감염성 질환 (병원체들)을 치료하고, 및/또는 면역화 효능을 증가시키기 위해, 단독으로 또는 선택적으로 하나 이상의 지지 요법 및/또는 추가 활성제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 사용될 수 있는 다양한 ActRII 길항제들을 제공한다.

[0073] 본 출원에 개시된 용어 ActRII 길항제는 ActRII 신호전달을 길항하기 위해 사용될 수 있는 다양한 제제들을 지칭하며, 예를 들면, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A 및 액티빈 B), GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]를 억제하는 길항제들; 하나 이상의 ActRII-연관 I 형-, II 형-, 또는 공동-수용체 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)를 억제하는 길항제들; 및 하나 이상의 ActRII-연관 하류 신호전달 성분들 (예컨대, Smad 단백질들, 가령, Smads 2 및 3)을 억제하는 길항제들을 포함한다. 본 출원의 방법 및 용도들에 따라 사용되는 ActRII 길항제들에는 다양한 형태들, 예를 들면, 리간드 트랩 (예컨대, 가용성 ActRIIA 폴리펩티드, ActRIIB 폴리펩티드, 및 ALK4: ActRIIB이형이량체), 항체 길항제들 (예컨대, ActRIIA/B 항체 또는 ActRIIA 항체와 ActRIIB 항체의 조합), 소분자 길항제들 [예컨대, 하나 이상의 액티빈 (예컨대, 액티빈 A 및 액티빈 B), GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, BMP9, ALK4, ActRIIA, ActRIIB, 및 하나 이상의 Smad 단백질들 (예컨대, Smads 2 및 3)을 억제하는 소분자], 및 뉴클레오티드 길항제들 [예컨대, 하나 이상의 액티빈 (예컨대, 액티빈 A 및 액티빈 B), GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, BMP9, ALK4, ActRIIA, ActRIIB, 및 하나 이상의 Smad 단백질들 (예컨대, Smads 2 및 3)을 억제하는 뉴클레오티드 서열]을 포함한다.

[0074] 이 명세서에서 사용된 용어는 일반적으로 본 개시 내용 및 각 용어가 사용되는 특정 상황에서 당해 분야의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 명세서의 구성 및 방법을 설명하고, 이를 작성하고 사용하는 방법에 대해 당업자에게 추가 지침을 제공하기 위해 아래 또는 다른 곳에서 논의된다. 어떤 용어의 사용의 범위나 의미는 그것이 사용되는 특정 상황에서 명백해질 것이다.

[0075] 본 출원에서 사용되는 용어 "이형체(heteromer)" 또는 "이형다량체(heteromultimer)"는 최소한 제 1 폴리펩티드 쇄와 제 2 폴리펩티드 쇄를 포함하는 복합체로, 이 때 제 2 폴리펩티드 쇄는 제 1 폴리펩티드 쇄의 서열에서 최소한 하나의 아미노산 잔기가 상이하다. 상기 이형체는 제 1 폴리펩티드 쇄와 제 2 폴리펩티드 쇄에 의해 형성된 "이형이량체"를 포함하거나, 또는 제 1 폴리펩티드와 제 2 폴리펩티드에 추가하여 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드 쇄가 존재하는 더 큰 차수의 구조를 만들 수 있다. 이형다량체의 예시적인 구조는 이형이량체, 이형삼량체, 이형사량체 및 추가 올리고머 구조를 포함한다. 이형이량체는 본 명세서에서 X:Y로 표현되거나, 또는 대등하게 X-Y로 표현되는데, 이때 X는 제 1 폴리펩티드 쇄를 나타내고, Y는 제 2 폴리펩티드 쇄를 나타낸다. 고

차 이형체와 올리고머 구조는 본 명세서에서 상응하는 방식으로 명시된다.

- [0076] 모든 문법적 형태 및 단어 변이에서 "상동성(Homologous,)"이란 동일한 유기체 중에서 슈퍼패밀리의 단백질을 포함하는 "공통적인 진화 기원"을 포함하는 두개 단백질간의 상관관계를 지칭하거나, 뿐만 아니라 상이한 유기체 종의 상동성 단백질을 지칭한다. 이러한 단백질 (및 이의 인코딩 핵산)은 서열 상동성을 갖고, 동일성 (%) 또는 특정 잔기 또는 모티프 및 보존된 위치의 존재 여부와 관계없이, 서열 유사성에 의해 반영되는 바와 같은 서열 상동성을 갖는다. 그러나, 일반적인 용도 및 당해 출원에서, "상동성"이라는 용어는 "매우"와 같은 부사로 수식될 때 서열 유사성을 지칭할 수 있고, 일반적인 진화적 기원과 관련 될 수도 있고 또는 그렇지 않을 수도 있다.
- [0077] 용어 "서열 유사성(서열 similarity)"은 모든 문법적 형태에서 일반적인 진화론적 기원을 공유하거나 공유하지 않을 수 있는 핵산 또는 아미노산 서열 간의 동일성 또는 일치 정도를 의미한다.
- [0078] 기준 폴리펩티드 (또는 뉴클레오티드) 서열에 대한 "서열 동일성 백분율(%)"은 후보 서열의 아미노산 잔기(또는 핵산)이 기준 폴리펩티드(뉴클레오티드) 서열에의 아미노산 잔기(또는 핵산)과 동일한 아미노산 잔기 (또는 핵산)의 백분율로 정의되는데, 이때 서열을 정렬시킨 후 최대 서열 동일성 백분율을 얻기 위하여 필요하다면 갭을 도입하고, 보존적 치환은 상기 서열의 동일성의 일부분으로 간주되지 않는다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방법으로 성취될 수 있다. 숙련된 기술자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 (핵산) 서열 동일성 %값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에 의해 작성되었으며, 소스 코드(source code)는 미국 저작권청 (Washington D.C., 20559)에 사용자 문서로 제출되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코의 Genentech, Inc.에서 공개적으로 입수할 수 있으며, 소스 코드에서 컴파일 할 수도 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 체제에서 사용하도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 가변적이지 않다.
- [0079] "항진하다(Agonize)"는 모든 문법적 형태로 (예컨대, 단백질의 유전자 발현을 활성화 또는 증폭하거나 비활성 단백질을 활성 상태로 유도함으로써) 단백질 및/또는 유전자를 활성화하거나 단백질 및 단백질을 증가시키는 과정을 의미한다.
- [0080] "길항하다(Antagonize)"는 모든 문법적 형태로 (예컨대, 단백질의 유전자 발현을 억제 또는 감소시키거나 활성 단백질을 비활성화상태로 유도함으로써) 단백질 및/또는 유전자를 억제하거나 단백질 및 단백질을 감소시키는 과정을 의미한다.
- [0081] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 다른 언급이 없는 한, "X에 실질적으로 결합하지 않는다"는 한 물질이 "X"에 대하여 약 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 또는 그 이상의 K_D 를 가진다는 의미(가령, "X"에 대하여 K_D 를 결정하는데 이용된 분석에 의해 탐지가능한 결합이 없음, 또는 "X"에 대하여 비교적 약한 결합, 예컨대, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 가짐)이다.
- [0082] 명세서 및 청구 범위에 걸쳐 수치와 관련하여 사용되는 용어 "약(about)" 및 "대략(approximately)"이란 숙련된 기술자에게 친숙하고 수용가능한 정확도의 구간을 나타낸다. 일반적으로, 이러한 정확도 구간은 $\pm 10\%$ 이다. 대안으로, 그리고 특히 생물학적 계통에서, 용어 "약" 및 "대략"은 주어진 값의 크기의 차수, 바람직하게는 ≤ 5 배,보다 바람직하게는 ≤ 2 배 이내의 값을 의미 할 수 있다.
- [0083] 여기에 개시된 수치 범위는 범위를 정의하는 수치를 포함한다.
- [0084] 용어 "a"및 "an"은 용어가 사용된 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 복수형을 포함한다. 용어 "하나" 뿐만 아니라 용어 "하나 이상의" 및 "최소 하나의"는 본 출원에서 호환적으로 사용될 수 있다. 더욱이, 본 명세서에서 사용되는 "및/또는"은 둘 또는 그 이상의 특정한 특징 또는 구성 요소 각각을 특정하여 개시하는 것으로 사용된다. 따라서, 어구에서 사용된 용어 "및/또는", 이를 테면 "A 및/또는 B"는 "A와 B", "A 또는 B", "A" (단독), 및 "B" (단독)을 포함한다. 마찬가지로, "A, B, 및 / 또는 C"와 같은 문구에 사용된 "및/또는"이라는 용어는 다음 각 측면을 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A와

C; A와 B; B와 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

[0085] 본 명세서 전반에 걸쳐, "포함한다"라는 단어 또는 "포함하는" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 명시된 정수 또는 정수 그룹을 포함하지만, 다른 정수 또는 정수 그룹을 배제하지 않는다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0086] 2. ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 및 ALK4: ActRIIB이형다량체

[0087] 특정 양상들에서, 본 출원은 ActRII 폴리펩티드 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체에서 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "ActRII"는 II형 액티빈 수용체들의 패밀리를 지칭한다. 이러한 패밀리는 IIA형 액티빈 수용체 (ActRIIA) 및 IIB형 액티빈 수용체 (ActRIIB)를 포함한다. 일부 양상들에서, 본 출원은, 본 출원에서 일반적으로 "ALK4: ActRIIB이형다량체" 또는 "ALK4: ActRIIB이형다량체 복합체"로 지칭되는, 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드 및 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함하는 이형다량체 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체에서 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)에 관한 것이다.

[0088] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "ActRIIB"는 임의의 종으로부터 얻은 액티빈 수용체 IIB형 (ActRIIB) 단백질 그리고 이러한 ActRIIB 단백질로부터 돌연변이 유발 또는 다른 변형에 의해 유도된 변이체의 패밀리를 나타낸다. ActRIIB의 지칭은 현재 나타난 형태들 중 하나에 대한 지칭으로 이해하면 된다. ActRIIB 패밀리의 구성요소들은 시스테인-풍부 영역을 가지는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 및 예상 세린/트레오닌 키나아제 활성을 가지는 세포질 도메인으로 이루어진 막경유 단백질이다.

[0089] 용어 "ActRIIB 폴리펩티드"는 ActRIIB 패밀리 구성요소의 자연 발생적 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 뿐만 아니라, 유용한 활성을 보유하는 이의 임의의 변이체 (돌연변이체, 단편, 융합체 및 펩티드 모방체 형태들을 포함함)를 포함한다. 이러한 변이체 ActRIIB 폴리펩티드들의 예는 본 명세서 뿐만 아니라 국제 특허 출원 공개 번호. WO 2006/012627, WO 2008/097541, 및 Wo 2010/151426에서 제공되며, 이들은 전문이 본 명세서의 참고자료에 포함된다. 본원에 기술된 모든 ActRIIB 관련 폴리펩티드에 대한 아미노산의 넘버링은 달리 명시하지 않는 한, 하기에 제공된 인간 ActRIIB 전구체 단백질 서열 (서열 번호: 1)의 넘버링에 기초한다.

[0090] 인간 ActRIIB 전구체 단백질 서열은 다음과 같다:

```

1  MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
51  GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPT TAPTLTLVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNECHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
401 KAADGPVDEY MLPFEEIIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPGL
451 AQLCVTIEEC WDHDPEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501 TNVDLPPKES SI (서열 번호: 1)

```

[0091]

[0092] 신호 펩티드는 한줄 밑줄로 표시되어 있고; 세포외 영역은 굵게 표시되며; 잠재적인 내인성 N-연결된 당화 부위는 이중 밑줄로 표시된다.

[0093] 프로세스된 세포외 ActRIIB 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:

[0094] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (서열 번호: 2).

[0095] 일부 구체예들에 있어서, N-말단에 "SGR..." 서열을 가지는 단백질이 만들어질 수 있다. 세포외 도메인의 C-말

단 "꼬리(tail)"는 한줄 밑줄로 나타낸다. 결실된 "꼬리"를 가지는 서열($\Delta 15$ 서열)은 다음과 같다:

- [0096] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (서열 번호: 3).
- [0097] 서열 번호: 1의 위치 64에 알라닌 (A64)을 갖는 ActRIIB 형태 또한 문헌에 보고되었다. 가령, Hilden *et al.* (1994) Blood, 83(8): 2163-2170 참고. A64 치환을 갖는 ActRIIB의 세포의 도메인을 포함하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질이 액티빈과 GDF11에 대하여 상대적으로 낮은 친화력을 가짐이 확인되었다. 대조적으로, 위치 64에 아르기닌 (R64)을 갖는 동일한 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 액티빈과 GDF11에 대하여 낮은 나노몰 내지 높은 피코몰 범위의 친화력을 가진다. 따라서, R64를 갖는 서열은 본 명세서에서 인간 ActRIIB의 "야생형" 기준 서열로 이용된다.
- [0098] 위치 64에 알라닌을 갖는 ActRIIB 형태 는 다음과 같다:
- [0099] 1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLERCE
- [0100] 51GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
- [0101] 101FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPT TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
- [0102] 151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
- [0103] 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
- [0104] 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNECHV AETMSRGLSY
- [0105] 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
- [0106] 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
- [0107] 401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDWLKHPL
- [0108] 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
- [0109] 501 TNVDLPPKES SI (서열 번호: 4)
- [0110] 신호 펩타이드는 한줄 밑줄로 표시되어 있고; 세포의 영역은 굵게 표시된다.
- [0111] 대안적 A64 형태의 프로세스된 세포의 ActRIIB 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:
- [0112] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGG PEVTYEPPTAPT (서열 번호: 5)
- [0113] 일부 구체예들에 있어서, N-말단에 "SGR..." 서열을 가지는 단백질이 만들어질 수 있다. 세포의 도메인의 C-말단 "꼬리"는 한줄 밑줄로 나타낸다. 결실된 "꼬리"를 가지는 서열($\Delta 15$ 서열)은 다음과 같다:
- [0114] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (서열 번호: 6)
- [0115] 인간 ActRIIB 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 하기에 나타내며(서열 번호: 7), 이는 Genbank 기준 서열 NM_001106.3의 뉴클레오티드 25-1560을 나타내며, 이것은 ActRIIB 전구체의 아미노산 1-513를 인코딩한다. 나타낸 바와 같이, 서열은 위치 64에 아르기닌을 제공하며, 대신 알라닌을 제공하기 위하여 변형될 수 있다. 신호 서열은 밑줄로 표시된다.
- [0116] 1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
- [0117] 51 CGGCTCTGGG CGTGGGAGG CTGAGACAG GGAGTGCATC TACTACAACG
- [0118] 101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
- [0119] 151 GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
- [0120] 201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
- [0121] 251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC

- [0122] 301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
- [0123] 351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCG ACAGCCCCCA
- [0124] 401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTTCC
- [0125] 451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCTA
- [0126] 501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
- [0127] 551 TGGTGGGCTT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
- [0128] 601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
- [0129] 651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
- [0130] 701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
- [0131] 751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
- [0132] 801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
- [0133] 851 GGAACGAACT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTCACGAGG CCTCTCATAC
- [0134] 901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
- [0135] 951 TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
- [0136] 1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTGA GCCAGGGAAA
- [0137] 1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
- [0138] 1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
- [0139] 1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
- [0140] 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
- [0141] 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA
- [0142] 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTTGAAACA CCCGGGCCTG
- [0143] 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
- [0144] 1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGAGGT
- [0145] 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
- [0146] 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (서열 번호: 7)
- [0147] 프로세스된 세포외 인간 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다 (서열 번호: 8). 나타낸 바와 같이, 서열은 위치 64에 아르기닌을 제공하며, 대신 알라닌을 제공하기 위하여 변형될 수 있다.
- [0148] 1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAATG
- [0149] 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
- [0150] 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCACAACAG CTCTGGCACC
- [0151] 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
- [0152] 201 TAGGCAGGAG TGTTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT
- [0153] 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTATTT GCCAGAGGCT
- [0154] 301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC
- [0155] (서열 번호: 8)
- [0156] 인간 ActRIIB 세포외 도메인과 인간 ActRIIA 세포외 도메인의 아미노산 서열 정렬은 도 1에 도시된다. 이 정렬

은 ActRII 리간드에 직접적으로 접촉하는 것으로 생각되는 두 수용체 내부의 아미노산 잔기들을 나타낸다. 예를 들면, 상기 복합 ActRII 구조에서 ActRIIB-리간드 결합 포켓은 부분적으로는 잔기 Y31, N33, N35, L38 내지 T41, E47, E50, Q53 내지 K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 내지 N83, Y85, R87, A92, 및 E94 내지 F101에 의해 정의됨을 나타낸다. 이들 위치에서, 보존 돌연변이가 용인될 것으로 예상된다.

[0157] 또한, ActRIIB는 척추동물간에 잘-보존되며, 세포의 도메인의 큰 스트레칭(stretches)은 완벽하게 보존된다. 예를 들면, 도 2는 다양한 ActRIIB 이종상동성 유전자(orthologs)와 비교하여 인간 ActRIIB 세포의 도메인의 다수-서열 정렬을 도시한다. ActRIIB에 결합하는 많은 리간드들이 상당히 보존되어 있다. 따라서, 이들 배열로부터, ActRIIB- 리간드 결합의 정상적 활성화에 중요한 리간드 결합 도메인 안에 주요 아미노산 위치를 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 정상 ActRIIB- 리간드 결합 활성을 크게 변화시키지 않으면서 치환을 용인할 수 있는 아미노산 위치를 예측할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 활성을 가진 인간 ActRIIB 변이체 폴리펩티드는 다른 척추 동물 ActRIIB의 서열의 상응하는 위치에 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 인간 또는 다른 척추 동물 서열에서와 유사한 잔기를 포함 할 수 있다. 다음 예들은 활성 ActRIIB 변이체를 정의하는 방법을 설명하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 인간 세포의 도메인 (서열 번호: 103)의 L46은 제노푸스(*xenopus*) ActRIIB (서열 번호: 105)에서 발현되며, 따라서 이 위치는 변경될 수 있고, 임의선택적으로 또다른 소수성 잔기, 이를 테면 V, I 또는 F로 변경될 수 있거나, 또는 비-극성 잔기 이를 테면 A로 변경될 수 있다. 인간 세포의 도메인에서 E52는 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 부위가 다양한 광범위한 변화, 가령, 극성 잔기, 이를 테면 E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y 그리고 아마도 A를 포함하는 변화를 용인할 것임을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 T93은 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 다양한 구조적 변이를 용인하는데, 극성 잔기, 이를 테면 S, K, R, E, D, H, G, P, G 및 Y를 선호함을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 F108은 제노푸스에서 Y이며, 따라서 Y 또는 다른 소수성 기, 이를 테면 I, V 또는 L이 용인되어야 함을 나타낸다. E111 in the 인간 세포의 도메인에서 E111은 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 D, R, K 및 H, 뿐만 아니라 Q와 N을 포함하는 하전된 잔기가 용인될 수 있음을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 R112는 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 R 및 H를 포함하는 염기성 잔기가 용인됨을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 위치 119의 A는 상대적으로 덜 보존되며, 설치류에서는 P이고, 제노푸스에서는 V이며, 따라서 이 위치는 본질적으로 임의의 아미노산이 용인되어야 함을 나타낸다.

[0158] 더욱이, ActRII 단백질은 당해 분야에서 구조적 및 기능적 특징, 특히 리간드 결합에 관해 특징 지워져 왔다 [Attisano *et al.* (1992) Cell 68(1):97-108; Greenwald *et al.* (1999) Nature Structural Biology 6(1): 18-22; Allendorph *et al.* (2006) PNAS 103(20: 7643-7648; Thompson *et al.* (2003) The EMBO Journal 22(7): 1555-1566; 뿐만 아니라 U.S. 특허 번호: 7,709,605, 7,612,041, 및 7,842,663]. 본 출원의 개시내용 외에도, 이들 참고 문헌은 하나 또는 그 이상의 정상 활성 (예: 리간드 결합 활성)을 보유하는 ActRIIB 변이체를 생성하는 방법에 대한 충분한 지침을 제공한다.

[0159] 예를 들면, 3 개-핑거 독신 폴드(three-finger toxin fold)로 알려진 구조적 모티프는 I형 및 II형 수용체에 의한 리간드 결합에 중요하며, 각각의 단량체 수용체의 세포의 도메인 안에 다양한 위치에 보존된 시스테인 잔기에 의해 형성된다. [Greenwald *et al.* (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; 및 Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. 따라서, 이렇게 보존된 시스테인들의 가장 바깥쪽에 의해 경계가 표시되는 인간 ActRIIB의 핵심 리간드-결합 도메인은 서열 번호 1 (ActRIIB 전구체)의 29-109 위치에 해당한다. 이러한 시스테인으로 경계가 표시되는 코어 서열에 인접한 구조적으로 덜 규칙적인 아미노산은 반드시 리간드 결합을 바꾸지 않고도 N-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28개 잔기 및/또는 C-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 잔기가 절두될 수 있다. N-말단 및/또는 C-말단 절두에 대한 예시적인 ActRIIB 세포의 도메인들은 서열 번호: 2, 3, 5, 및 6을 포함한다.

[0160] Attisano *외.*는 ActRIIB의 세포의 도메인의 C- 말단에서 프롤린 결절의 결실은 액티빈에 대한 수용체의 친화력을 감소시킴을 보여 주었다. 본 출원의 서열 번호: 1의 아미노산 20-119를 함유하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질, "ActRIIB(20-119)-Fc"는 ActRIIB(20-134)-Fc와 비교하여 GDF11 및 액티빈에 대해 감소된 결합을 가지며, 이는 프롤린 결절 영역 및 완벽한 막근접 (juxtamembrane) 도메인을 포함한다 (예컨대, 미국 특허 제 7,842,663 참조). 그러나, ActRIIB(20-129)-Fc 단백질은 프롤린 결절 영역이 파괴되었으나 야생형과 비교하여 유사한, 그러나 다소 감소된 활성을 유지한다.

[0161] 따라서, (서열 번호: 1에 대하여) 아미노산 134, 133, 132, 131, 130 및 129에서 종료되는 ActRIIB 세포의 도메인들은 모두 활성일 것으로 예상되지만, 134 또는 133에서 종료되는 작제물은 대부분 활성일 것이다. 유사하

게, (서열 번호: 1에 대하여) 잔기 129-134 중 임의의 위치에서 돌연변이는 큰 폭으로 리간드-결합 친화력을 변경시키지 않을 것으로 예상된다. 이를 뒷받침하는 것으로, P129 및 P130 (서열 번호: 1에 대하여)의 돌연변이는 실질적으로 리간드 결합을 감소시키지 않는 것으로 알려져있다. 따라서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 아미노산 109 (최종 시스템)와 같이 빨리 종료될 수 있지만, 그러나, 109와 119에서 또는 그 사이 (가령, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119)에서 종료되는 형태는 감소된 리간드 결합을 갖는 것으로 예상된다. 아미노산 119 (서열 번호: 1에 대하여)은 잘 보존되지 않고, 따라서 용이하게 변경 또는 절두된다. (서열 번호: 1에 대하여) 128에서 또는 그 이후에 종료되는 ActRIIB 폴리펩티드 및 ActRIIB-계 GDF 트랩은 리간드-결합 활성을 유지해야만 한다. 서열 번호: 1에 대하여 119와 127에서 또는 그 사이 (가령, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 또는 127)에서 종료되는 ActRIIB 폴리펩티드 및 ActRIIB-계 GDF 트랩들은 중간 결합 능력을 가질 것이다. 이들 중 임의의 것은 임상 또는 실험 환경에 따라 바람직하게 사용될 수 있다.

[0162] ActRIIB의 N-말단에서, (서열 번호: 1에 대하여) 아미노산 29 또는 그 전에 시작하는 단백질은 리간드-결합 활성을 보유하는 것으로 예상된다. 아미노산 29는 초기 시스템을 나타낸다. (서열 번호: 1에 대하여) 위치 24에서 알라닌-에서-아스파라긴으로의 돌연변이는 리간드 결합에 실질적인 영향없이 N-연결된 당화 서열을 도입시킨다[미국 특허 번호. 7,842,663]. 이로써 신호 절단(cleavage) 펩티드와 아미노산 20-29에 상응하는 시스템 간고 영역 사이의 돌연변이는 잘 용인된다는 것이 확인된다. 구체적으로, (서열 번호: 1에 대하여) 위치 20, 21, 22, 23, 및 24에서 시작하는 ActRIIB 폴리펩티드 및 ActRIIB-계 GDF 트랩들은 전반적으로 리간드-결합 활성을 유지해야만 하고, 및 (서열 번호: 1에 대하여) 위치 25, 26, 27, 28, 및 29에서 시작하는 ActRIIB 폴리펩티드 및 ActRIIB-계 GDF 트랩들 또한 리간드-결합 활성을 유지하는 것으로 예상된다. 놀랍게도, 22, 23, 24, 또는 25에서 시작되는 ActRIIB 작제물이 최고 활성을 가지게 될 것임을 예컨대, 미국 특허 제 7,842,663은 입증하였다.

[0163] 종합하면, ActRIIB의 활성 부분 (예컨대, 리간드-결합 부분)에 관한 일반식은 서열 번호: 1의 아미노산 29-109를 포함한다. 따라서 ActRIIB 폴리펩티드들은 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 20-29중 임의의 하나에 대응하는 잔기 (가령, 서열 번호: 1의 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 임의의 하나의 아미노산 109-134에 대응하는 잔기에서 종료되는 (가령, 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134 중 임의의 하나에서 종료되는) ActRIIB의 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 다른 예로는 서열 번호: 1의 위치 20-29 (가령, 위치 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나) 또는 21-29 (가령, 위치 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 위치 119-134 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나), 119-133 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 또는 133중 임의의 하나), 129-134 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134), 또는 129-133 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 또는 133중 임의의 하나)에서 끝나는 폴리펩티드들을 포함한다. 다른 예로는 서열 번호: 1의 위치 20-24 (가령, 위치 20, 21, 22, 23, 또는 24중 임의의 하나), 21-24 (가령, 위치 21, 22, 23, 또는 24중 임의의 하나), 또는 22-25 (가령, 위치 22, 23, 또는 25중 임의의 하나)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 위치 109-134 (가령, 위치 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나), 119-134 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나) 또는 129-134 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나)에서 종료되는 작제물들을 포함한다. 이 범위 내의 변이체들, 특히, 서열 번호: 1의 해당부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나, 또는 구성되는 변이체들이 또한 고려된다.

[0164] 본 명세서에 설명된 변형은 다양한 방식으로 조합 될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ActRIIB 변이체는 리간드-결합 포켓내에 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15개의 보존 아미노산을 포함하고, 선택적으로 리간드-결합 포켓내에 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에 0, 1, 또는 그 이상의 비-보존 변경을 포함한다. 가변성이 특히 잘 용인될 수 있는 결합 포켓 외부의 부위들은 세포의 도메인의 아미노 및 카르복시 말단 (상기 언급한 바와 같음) 및 위치 42-46 및 65-73 (서열 번호: 1과 관련)을 포함한다. 위치 65에서 아스파라긴에서-알라닌으로의 변경(N65A)은 R64 배경에서 리간드 결합을 감소시키는 것으로 보이지 않는다 [미국 특허 제 7,842,663]. 이 변

화는 아마도 A64 배경에서 N65의 당화를 제거하므로, 이 영역에서의 유의한 변화가 용인될 수 있음을 입증한다. R64A 변화는 잘 용인되지 않지만, R64K는 잘 용인되고, 따라서 H와 같은 또 다른 염기성 잔기는 64 번 위치에서 용인될 수 있다 [미국 특허 제 7,842,663]. 추가적으로, 해당 분야에 기재된 돌연변이 유발 프로그램의 결과는 ActRIIB에서 종종 보존에 유의한 아미노산 위치들이 있음을 나타낸다. 서열 번호: 1과 관련하여, 이들은 위치 80 (산성 또는 소수성 아미노산), 위치 78 (소수성, 특히 트립토판), 위치 37 (산성, 특히 아스파르트산 또는 글루탐산), 위치 56 (염기성 아미노산), 위치 60 (소수성 아미노산, 특히 페닐알라닌 또는 티로신)을 포함한다. 따라서, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드들에서 보존될 수 있는 아미노산의 틀을 제공한다. 보존되는 것이 바람직할 수 있는 다른 위치들은 다음과 같다: 모두 서열 번호:1에 대하여, 위치 52 (산성 아미노산), 위치 55 (염기성 아미노산), 위치 81 (산성), 98 (극성 또는 하전된, 특히 E, D, R 또는 K).

[0165] 또 다른 N-연결된 당화 부위 (N-X-S/T)의 ActRIIB 세포의 도메인으로의 부가는 잘-용인됨이 이전에 입증된 바 있다 (예컨대, 미국 특허 제 7,842,663 참조). 그러므로, N-X-S/T 서열들은 본 출원의 ActRIIB 폴리펩티드에서, 예를 들면, 도 1에 정의된 리간드 결합 포켓 외부의 위치들에 일반적으로 도입될 수 있다. 특히 비-내인성 N-X-S/T 서열들의 도입에 적합한 부위들은 (서열 번호: 1에 대해) 아미노산 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 또는 129-134를 포함한다. N-X-S/T 서열들은 ActRIIB 서열과 Fc 도메인 또는 그 외 용합 구성성분 간의 링커기에, 뿐만 아니라 선택적으로 용합 구성성분 자체에 도입될 수 있다. 이러한 부위는 기존의 S 또는 T에 대하여 올바른 위치에 N을 도입함으로써, 또는 기존의 N에 상응하는 위치에 S 또는 T를 도입함으로써 최소한의 노력으로 도입될 수 있다. 그러므로, N-연결된 당화 부위들을 생성하게 되는 바람직한 변경들은 다음과 같다: (서열 번호: 1에 대해) A24N, R64N, S67N (N65A 변경과 조합 가능), E105N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S 및 R112T. 당화될 것으로 예상되는 임의의 S는 당화에 의해 제공되는 보호로 인해 면역원 부위를 생성하지 않고 T로 변형될 수 있다. 유사하게, 당화될 것으로 예상되는 임의의 T는 S로 변형될 수 있다. 그러므로 (서열 번호: 1에 대해) 변경 S67T 및 S44T가 고려된다. 유사하게, A24N 변이체에서, S26T 변경이 사용될 수 있다. 따라서, 본 출원의 ActRIIB 폴리펩티드는 상기와 같은 하나 이상의 추가적인, 비-내인성 N-연결된 당화 공통 서열들을 가지는 변이체일 수 있다.

[0166] 특정 구체예들에서, 본 출원은 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드 (이의 단편, 기능적 변이체, 및 변형된 형태들을 포함)를 포함하는 ActRII 길항제들 (억제제) 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 환자의 면역 반응 증가 및 암 치료)에 관한 것이다. 바람직하게는, ActRIIB 폴리펩티드들은 가용성이다 (가령, ActRIIB의 세포의 도메인). 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 하나 이상의 TGF β 수퍼패밀리 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]의 활성화 (예컨대, Smad 신호전달)를 길항한다. 그러므로, 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 하나 이상의 TGF β 수퍼패밀리 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 20-29에 대응하는 잔기 (가령, 서열 번호: 1의 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나에서 시작)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 아미노산 109-134에 대응하는 위치 (가령, 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나에서 종료되는)에서 종료되는 ActRIIB의 부분에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되며, 여기서 서열 번호: 1의 L79에 해당하는 위치는 산성 아미노산 (자연 발생 산성 아미노산 D 및 E 또는 인공 산성 아미노산)이다. 특정 구체예들에서, 본 출원의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 25-131에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다. 특정 구체예들에서, 본 출원의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 25-131에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 구성되거나 본질적으로 구성되며, 여기서 서열 번호: 1의 L79에 대응하는 위치는 산성 아미노산이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1,

2, 3, 4, 5, 6, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 73, 77, 78, 128, 131, 132, 및 133 중 어느 하나의 아미노산 서열에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 구성되거나, 본질적으로 구성된다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 73, 77, 78, 128, 131, 132, 및 133 중 어느 하나의 아미노산 서열에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 구성되거나, 본질적으로 구성되며, 여기서 서열 번호: 1의 L79에 대응하는 위치는 산성 아미노산이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRIIB 폴리펩티드는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성되거나 본질적으로 구성되며, 여기서 서열 번호: 1의 L79에 대응하는 위치는 산성 아미노산이 아니다 (즉, 자연 발생 산성 아미노산 D 또는 E 또는 인공 산성 아미노산 잔기가 아님).

[0167] 특정 구체예에서, 본 출원은 ActRIIA 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "ActRIIA"는 임의의 종으로부터 얻은 액티빈 수용체 IIA형 (ActRIIA) 단백질 그리고 이러한 ActRIIA 단백질로부터 돌연변이 유발 또는 다른 변형에 의해 유도된 변이체의 패밀리를 나타낸다. ActRIIA의 지칭은 현재 나타난 형태들 중 하나에 대한 지칭으로 이해하면 된다. ActRIIA 패밀리의 구성요소들은 시스템-풍부 영역을 가지는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 및 예상 세린/트레오닌 키나아제 활성을 가지는 세포질 도메인으로 이루어진 막 경유 단백질이다.

[0168] 용어 "ActRIIA 폴리펩티드"는 ActRIIA 패밀리 구성요소의 자연 발생적 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 뿐만 아니라, 유용한 활성을 보유하는 이의 임의의 변이체 (돌연변이체, 단편, 융합체 및 펩티드 모방체 형태들을 포함함)를 포함한다. 이러한 변이체 ActRIIA 폴리펩티드들의 예는 본 명세서 뿐만 아니라 국제 특허 출원 공개 번호. WO 2006/012627 및 WO 2007/062188에서 제공되며, 이의 전문은 본 명세서에 참고자료로 포함된다. 본원에 기술된 모든 ActRIIA 관련 폴리펩티드에 대한 아미노산의 넘버링은 달리 명시하지 않는 한, 하기에 제공된 인간 ActRIIA 전구체 단백질 서열 (서열 번호: 9)의 넘버링에 기초한다.

[0169] 인간 ActRIIA 전구체 단백질 서열은 다음과 같다:

```

1  MGAAAKLAFA VFLISCSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC
51  YGDKDKRRHC FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV
101 YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSLVPLMLI
151 AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEVkar
201 GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI
251 GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL
301 AYLHEDIPLG KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG
351 KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR
401 CTAADGPVDE YMLPFEEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV LRDYWQKHAG
451 MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIIVVTM
501 VTNVDFPPKE SSL (서열 번호: 9)

```

[0170]

[0171] 신호 펩티드는 한줄 밑줄로 표시되어 있고; 세포외 영역은 굵게 표시되며; 잠재적인 내인성 N-연결된 당화 부위는 이중 밑줄로 표시된다.

[0172] 프로세스된 세포외 인간 ActRIIA 서열은 다음과 같다:

[0173] ILGRSETQECLFFNANWEKDRNTQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV
TQPTSNPVTPKPP (서열 번호: 10)

- [0174] 세포외 도메인의 C-말단 "꼬리"는 한줄_밑줄로 나타낸다. 결실된 "꼬리"를 가지는 서열($\Delta 15$ 서열)은 다음과 같다:
- [0175] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (서열 번호: 11)
- [0176] 인간 ActRIIA 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 하기에 나타내며 (서열 번호: 12), 이는 Genbank 기준 서열 NM_001616.4의 뉴클레오티드 159-1700에 따른다. 신호 서열은 밑줄로 표시된다.
- [0177] 1 atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc
- [0178] 51 ttcaggtgct atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta
- [0179] 101 atgctaattg ggaaaaagac agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt
- [0180] 151 tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt ttgctacct ggaagaatat
- [0181] 201 ttctgtgtcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg gatgatatca
- [0182] 251 actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag cctgaagta
- [0183] 301 tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt
- [0184] 351 tccggagatg gaagtcacac agccacttc aaatccagtt acacctaagc
- [0185] 401 caccctatta caacatcctg ctctattcct tgggtccact tatgttaatt
- [0186] 451 gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg tacaggcatc acaagatggc
- [0187] 501 ctaccctcct gtacttggtc caactcaaga cccaggacca cccccacctt
- [0188] 551 ctccattact aggtttgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg
- [0189] 601 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc
- [0190] 651 tgtcaaaata ttccaatac aggacaaaca gtcatggcaa aatgaatacg
- [0191] 701 aagtctacag ttgacctgga atgaagcatg agaacatatt acagttcatt
- [0192] 751 ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat gtggatcttt ggctgatcac
- [0193] 801 agcatttcat gaaaaggggt cactatcaga ctttcttaag gctaattgtg
- [0194] 851 tctcttgga tgaactgtgt catattgcag aaacatggc tagaggattg
- [0195] 901 gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc
- [0196] 951 catatctcac agggacatca aaagtaaaaa tgtgtgtgtg aaaaacaacc
- [0197] 1001 tgacagcttg cattgtctgac ttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc
- [0198] 1051 aagtctgcag gcgataccca tggacaggtt ggtaccgga ggtacatggc
- [0199] 1101 tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat gcatttttga
- [0200] 1151 ggatagatat gtagccatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc
- [0201] 1201 tgtactgtcg cagatggacc ttagatgaa tacatgttgc catttgagga
- [0202] 1251 ggaaattggc cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc
- [0203] 1301 ataaaaaaaa gaggcctgtt ttaagagatt attggcagaa acatgctgga
- [0204] 1351 atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa tgttgggatc acgacgcaga
- [0205] 1401 agccaggtta tcagctggat gtgtaggatg aagaattacc cagatgcaga
- [0206] 1451 gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg

- [0207] 1501 gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtcta (서열 번호: 12)
- [0208] 프로세스된 인간 ActRIIA 폴리펩티드의 핵산 서열은 다음과 같다:
- [0209] 1 atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg
- [0210] 51 ggaaaaagac agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca
- [0211] 101 aagataaacg gcggcattgt ttgtctacct ggaagaatat ttctggttcc
- [0212] 151 attgaaatag tgaacaagg ttgttggctg gatgatatca actgctatga
- [0213] 201 caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta tatttttgtt
- [0214] 251 gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccggagatg
- [0215] 301 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc ccccc(서열 번호:13)
- [0216] ActRIIA는 척추동물간에 잘-보존되며, 세포의 도메인의 큰 스트레치(stretches)는 완벽하게 보존된다. 예를 들면, 도 3은 다양한 ActRIIA 이종상동성 유전자(orthologs)와 비교하여 인간 ActRIIA 세포의 도메인의 다수의-서열 정렬을 도시한다. ActRIIA에 결합하는 많은 리간드들이 상당히 보존되어 있다. 따라서, 이들 배열로부터, ActRIIA- 리간드 결합의 정상적 활성화에 중요한 리간드 결합 도메인 안에 주요 아미노산 위치를 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 정상 ActRIIA- 리간드 결합 활성을 크게 변화시키지 않으면서 치환을 용인할 수 있는 아미노산 위치를 예측할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 활성을 가진 인간 ActRIIA 변이체 폴리펩티드는 다른 척추 동물 ActRIIA의 서열의 상응하는 위치에 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 인간 또는 다른 척추 동물 서열에서와 유사한 잔기를 포함 할 수 있다.
- [0217] 다음 예들은 활성 ActRIIA 변이체를 정의하는 방법을 설명하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 도 3에 도시된 바와 같이, 인간 세포의 도메인에서의 F13은 *오비스 아리에스* (서열 번호: 108), *갈루스 갈루스* (서열 번호: 111), *보스 타우루스* (서열 번호: 112), *타이토 알바* (서열 번호: 113), 및 *마이오티스 다비디* (서열 번호: 114) ActRIIA에서 Y이며, 이것은 F, W, 및 Y를 비롯한 방향족 잔기들이 이 위치에서 용인됨을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 Q24는 *보스 타우루스* ActRIIA에서 R이며, 이는 D, R, K, H, 및 E를 비롯한 하전된 잔기들이 이 위치에서 용인될 것임을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 S95는 *갈루스 갈루스* 및 *타이토 알바* ActRIIA에서 F이며, 이는 극성 잔기들, 가령, E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y, 및 아마도 소수성 잔기, 가령, L, I, 또는 F를 비롯한 널리 다양한 변화가 이 부위에서 용인될 수 있음을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 E52는 *오비스 아리에스* ActRIIA에서 D이며, 이는 D 및 E를 비롯한 산성 잔기들이 이 위치에서 용인됨을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 P29는 상대적으로 잘 보존되지 않아, *오비스 아리에스* ActRIIA에서 S 그리고 *마이오티스 다비디* ActRIIA에서 L로 나타나는 것이므로, 본질적으로 임의의 아미노산은 이 위치에서 용인되어야 한다.
- [0218] 더욱이, 상기 논의한 바와 같이, ActRII 단백질은 당해 분야에서 구조적/기능적 특징, 특히, 리간드 결합에 관해 특성화되었다 [Attisano 외. (1992) 세포 68(1):97-108; Greenwald 외. (1999) Nature Structural Biology 6(1): 18-22; Allend또는ph 외. (2006) PNAS 103(20: 7643-7648; Thompson 외. (2003) The EMBO Journal 22(7): 1555-1566; 뿐만 아니라 미국 특허 제 7,709,605, 7,612,041, 및 7,842,663]. 본 출원에 개시된 내용 이외에도, 이들 참고 문헌은 하나 또는 그 이상의 원하는 활성 (예컨대, 리간드-결합 활성)을 보유하는 ActRIIA 변이체를 생성하는 방법에 대한 충분한 지침을 제공한다.
- [0219] 예를 들면, 3 개-핑거 독신 폴드(three-finger toxin fold)로 알려진 구조적 모티프는 I형 및 II형 수용체에 의한 리간드 결합에 중요하며, 각각의 단량체 수용체의 세포의 도메인 안에 다양한 위치에 보존된 시스테인 잔기에 의해 형성된다. [Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; 및 Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. 따라서, 이렇게 보존된 시스테인들의 가장 바깥쪽에 의해 경계가 표시되는 인간 ActRIIA의 핵심 리간드-결합 도메인은 서열 번호 9 (ActRIIA 전구체)의 30-110 위치에 해당한다. 따라서, 이러한 시스테인으로 경계가 표시되는 코어 서열에 인접한 구조적으로 덜 규칙적인 아미노산은 반드시 리간드 결합을 바꾸지 않고도 N-말단에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28개 잔기 그리고 C-말단에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 잔기가 절두될 수 있다. 예시적인 ActRIIA 세포의 도메인들의 절두부들은 서열 번호: 10 및 11을 포함한다.
- [0220] 따라서, ActRIIA의 활성 부분 (예컨대, 리간드 결합)에 대한 일반적인 형식은 서열 번호: 9의 아미노산 30-

110을 포함하거나, 이들로 본질적으로 구성되거나 구성되는 폴리펩티드이다. 따라서 ActRIIA 폴리펩티드들은 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 21-30 중 임의의 하나에 대응하는 잔기 (가령, 서열 번호: 9의 아미노산 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30)에서 시작하고, 서열 번호: 9의 임의의 하나의 아미노산 110-135에 대응하는 잔기에서 종료되는 (가령, 아미노산 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 또는 135 중 임의의 하나에서 종료되는) ActRIIA의 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 본질적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 다른 예들은 서열 번호: 9의 21-30 (예컨대, 아미노산 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 중 임의의 하나에서 시작), 22-30 (예컨대, 아미노산 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 중 임의의 하나에서 시작), 23-30 (예컨대, 아미노산 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 중 임의의 하나에서 시작), 24-30 (예컨대, 아미노산 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 중 임의의 하나에서 시작)에서 선택된 위치에서 시작하여, 서열 번호: 9의 111-135 (예컨대, 아미노산 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 또는 135 중 임의의 하나에서 종료), 112-135 (예컨대, 아미노산 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 또는 135 중 어느 하나에서 종료), 113-135 (예컨대, 아미노산 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 또는 135 중 어느 하나에서 종료), 120-135 (예컨대, 아미노산 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 또는 135 중 어느 하나에서 종료), 130-135 (예컨대, 아미노산 130, 131, 132, 133, 134 또는 135 중 어느 하나에서 종료), 111-134 (예컨대, 아미노산 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134 중 어느 하나에서 종료), 111-133 (예컨대, 아미노산 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 또는 133 중 어느 하나에서 종료), 111-132 (예컨대, 아미노산 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 또는 132 중 어느 하나에서 종료), 또는 111-131 (예컨대, 아미노산 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 또는 131 중 어느 하나에서 종료)에서 선택된 위치에서 종료하는 작제물을 포함한다. 이 범위 내의 변이체들, 특히, 서열 번호: 9의 해당부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나, 또는 구성되는 변이체들이 또한 고려된다. 그러므로, 일부 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 9의 아미노산 30-110에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩티드를 포함하거나, 이러한 폴리펩티드로 본질적으로 구성되거나 또는 구성될 수 있다. 선택적으로, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 9의 아미노산 30-110에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하고, 리간드 결합 포켓에서 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 보존적 아미노산 변화를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0221]

특정 구체예들에서, 본 출원은 최소한 하나의 ActRIIA 폴리펩티드 (이의 단편, 기능적 변이체, 및 변형된 형태들을 포함)를 포함하는 ActRII 길항제들 (억제제) 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 환자의 면역 반응 증가 및 암 치료)에 관한 것이다. 바람직하게는, ActRIIA 폴리펩티드들은 가용성이다 (가령, ActRIIA의 세포외 도메인). 일부 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 하나 이상의 TGF β 수퍼패밀리 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]의 활성화 (예컨대, Smad 신호전달)를 억제한다. 일부 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 하나 이상의 TGF β 수퍼패밀리 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 9의 아미노산 21-30에 대응하는 잔기에서 시작하고 (가령, 서열 번호: 9의 아미노산 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 중 임의의 하나에서 시작), 서열 번호: 9의 아미노산 110-135에 대응하는 위치에서 종료되는 (가령, 아미노산 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135 중 임의의 하나에서 종료되는) ActRIIA의 부분에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 일부 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 30-110에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한

서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다. 특정 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 21-135에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 구성되거나 본질적으로 구성된다. 일부 구체예들에서, ActRIIA 폴리펩티드는 서열 번호: 9, 10, 11, 50, 54, 및 57 중 어느 하나의 아미노산 서열에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 구성되거나, 본질적으로 구성된다.

[0222] 특정 양상들에서, 본 출원은 GDF 트랩 폴리펩티드 (또한 "GDF 트랩"으로도 지칭됨)에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 GDF 트랩은 ActRII 폴리펩티드 (*예컨대*, "야생형" 또는 비변형된 ActRII 폴리펩티드)의 세포외 도메인 (또한 리간드-결합 도메인으로도 지칭됨)에서 하나 이상의 돌연변이 (*예컨대*, 아미노산 부가, 결실, 치환, 및 이의 조합)를 포함하는 변이체 ActRII 폴리펩티드 (*예컨대*, ActRIIA 및 ActRIIB 폴리펩티드)이며, 이러한 변이체 ActRII 폴리펩티드는 대응하는 야생형 ActRII 폴리펩티드에 비해 하나 이상의 변형된 리간드-결합 활성을 가진다. 바람직한 구체예들에서, 본 출원의 GDF 트랩 폴리펩티드는 대응하는 야생형 ActRII 폴리펩티드와 최소한 하나의 유사한 활성을 유지한다. 예를 들면, 바람직한 GDF 트랩은 GDF11 및/또는 GDF8에 결합하여 이의 기능을 억제 (*예컨대*, 길항)한다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 GDF 트랩은 TGF β 슈퍼패밀리의 하나 이상의 리간드에 추가로 결합하여 이를 억제한다. 따라서, 본 출원은 하나 이상의 ActRII 리간드들에 대한 변형된 결합 특이성을 가지는 GDF 트랩 폴리펩티드를 제공한다.

[0223] 이를 설명하기 위해, 하나 이상의 ActRII-결합 리간드들, 가령, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 및/또는 액티빈 E), 특히 액티빈 A에 대하여보다 GDF11 및/또는 GDF8에 대해, 변형된 리간드-결합 도메인의 선택성을 증가시키는 하나 이상의 돌연변이가 선택될 수 있다. 선택적으로, 변형된 리간드-결합 도메인은, 야생형 리간드-결합 도메인의 비율과 비교하여 최소한 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100- 또는 심지어 1000-배 더 큰, 액티빈 결합에 대한 K_d 대 GDF11 및/또는 GDF8 결합에 대한 K_d 의 비율을 가진다. 선택적으로, 변형된 리간드-결합 도메인은 야생형 리간드-결합 도메인에 비해, 최소한 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100-, 또는 심지어 1000-배 더 큰, 액티빈 A의 억제에 관한 IC_{50} 대 GDF11 및/또는 GDF8의 억제에 관한 IC_{50} 의 비율을 가진다. 선택적으로, 변형된 리간드-결합 도메인은 액티빈의 억제에 관한 IC_{50} 보다 최소한 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100- 또는 심지어 1000-배 더 작은 IC_{50} 으로 GDF11 및/또는 GDF8을 억제한다.

[0224] 특정한 바람직한 구체예들에서, 본 출원의 GDF 트랩은 GDF11 및/또는 GDF8 (또한 미오스타틴으로도 공지됨)에 대해 선호적으로 결합하도록 설계된다. 선택적으로, GDF11 및/또는 GDF8-결합 트랩은 액티빈 B에 추가로 결합할 수 있다. 선택적으로, GDF11 및/또는 GDF8-결합 트랩은 BMP6에 추가로 결합할 수 있다. 선택적으로, GDF11 및/또는 GDF8-결합 트랩은 BMP10에 추가로 결합할 수 있다. 선택적으로, GDF11 및/또는 GDF8-결합 트랩은 액티빈 B 및 BMP6에 추가로 결합할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 출원의 GDF 트랩은, *예컨대*, 야생형 ActRII 폴리펩티드에 비해, 액티빈 (*예컨대*, 액티빈 A, 액티빈 A/B, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E)에 대해 감소된 결합 친화력을 가진다. 특정한 바람직한 구체예들에서, 본 출원의 GDF 트랩 폴리펩티드는 액티빈 A에 대해 감소된 결합 친화력을 가진다.

[0225] ActRIIB 단백질들의 아미노산 잔기들 (*예컨대*, 서열 번호: 1에 대해 E39, K55, Y60, K74, W78, L79, D80, 및 F101)은 ActRIIB 리간드-결합 포켓에 존재하며, 예를 들면, 액티빈 A, GDF11, 및 GDF8을 비롯한 그 리간드들에 대한 매개 결합을 돕는다. 그러므로 본 출원은 이들 아미노산 잔기들에서 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, ActRIIB 수용체의 변형된-리간드 결합 도메인 (*예컨대* GDF8/GDF11-결합 도메인)을 포함하는 GDF 트랩 폴리펩티드를 제공한다.

[0226] 구체적인 예로서, ActRIIB의 리간드-결합 도메인의 양으로 하전된 아미노산 잔기 Asp (D80)를 상이한 아미노산 잔기로 돌연변이시켜 GDF8에 선호적으로 결합하나, 액티빈에는 결합하지 않는 GDF 트랩 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 바람직하게는, 서열 번호: 1에 대해 D80 잔기는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 아미노산 잔기로 변화된다: 하전되지 않은 아미노산 잔기, 음의 아미노산 잔기, 및 소수성 아미노산 잔기. 추가 구체예로서, 서열 번호: 1의 소수성 잔기 L79가 변형되어, 변형된 액티빈-GDF11/GDF8 결합 성질들을 제공할 수 있다. 예를 들면, L79P 치환은 액티빈 결합 보다 큰 정도로 GDF11 결합을 감소시킨다. 대조적으로, L79의 산성 아미노산으로의 치환 [아스파르트산 또는 글루탐산; L79D 또는 L79E 치환]은 액티빈 A 결합 친화력을 상당히 감소시키는 반면 GDF11 결합 친화력을 유지시킨다. 예시적인 구체예들에서, 본 명세서에 기재된 방법들은 선택적으로 하나 이상의 추가 아미노산 치환, 부가, 또는 결실과 함께 서열 번호: 1의 위치 79에 대응하는 위치에서 산성 아미노산

(예컨대, D 또는 E)을 포함하는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드인 GDF 트랩 폴리펩티드를 이용한다.

[0227] 특정 양상들에서, 본 출원은 ALK4 폴리펩티드 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 환자에서 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "ALK4"는 임의의 종으로부터 그리고 이 유 발 또는 다른 변형에 의해 그러한 ALK4 단백질로부터 유래된 변이체로부터 액티빈 수용체-유사 키나제-4 단백질의 패밀리를 나타낸다. ALK4에 대한 언급은 현재 확인된 형태중 하나를 참조로 한다. ALK4 패밀리의 구성요소는 시스테인-풍부 영역을 갖는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 및 예상 세린/트레오닌 키나제 활성을 갖는 세포질 도메인을 포함하는 막경유 단백질이다.

[0228] 용어 "ALK4 폴리펩티드"는 뿐만 아니라 ALK4 패밀리의 구성요소의 자연 발생적 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 뿐만 아니라, 유용한 활성을 보유하는 그의 임의의 변이체 (돌연변이 체, 단편, 융합체 및 펩티드 유사체를 포함함)를 포함한다. 본원에 기술된 모든 ALK4-관련 폴리펩티드에 대한 아미노산의 넘버링은 달리 명시하지 않는 한, 하기에 제공된 인간 ALK4 전구체 단백질 서열 (서열 번호: 14)의 넘버링에 기초한다.

[0229] 인간 ALK4 전구체 단백질 서열 (NCBI Ref Seq NP_004293)은 다음과 같다:

[0230] 1 maesagassf fplvvlilag sggsgprgvq allcactsc l qanytcetdg acmvsifnld

[0231] 61 gmehhvrtci pkvelvpagk pfyclssedl rnthccytdy cnridlrps ghlkepehps

[0232] 121 mwgpvelvgi iagpvfllfl iiiivflvin yhrvyhnrq rldmedpsce mclskdktlq

[0233] 181 dlvydlstsg sgsglplfvq rtvartivlq eiigkgrfge vwrgrwrggd vavkifssre

[0234] 241 erswfreaei yqtvmlrhen ilgfiaadnk dngtwtqlwl vsdyhehgs l fdylnryvt

[0235] 301 iegmiklals aasglahlhm eivgtqgkpg iahrdlkskn ilvkknmgca iadlglavrh

[0236] 361 davtdtidia pnqrvgtkry mapevldeti nmkhfdfsfc adiyalglvy weiarrens

[0237] 421 gvheeyqlpy ydlvpsdpsi eemrkvvcdq klrpnipnww qsyealrvmg kmmrecwyan

[0238] 481 gaarlaltri kktlsqslsq edvki (서열 번호: 14)

[0239] 신호 펩타이드는 한줄 밑줄로 표시되어 있고; 세포외 영역은 굵게 표시된다.

[0240] 프로세스된 세포외 인간 ALK4 서열은 다음과 같다:

[0241] SGPRGVQALLCACTSC LQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCI PKVELVPAGKPFYCLSSEDLRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPV E (서열 번호: 15)

[0242] 인간 ALK4 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 하기에 나타내며(서열 번호: 16), 이는 Genbank 기준 서열 NM_004302.4의 뉴클레오티드 78-1592에 상응한다. 신호 서열은 한줄 밑줄로 표시되어 있고; 세포외 영역은 굵게 표시된다.

[0243] ATGGCGGAGTCGGCCGAGCCTCCTCCTTCTCCCCCTTGTTGTCCTCTGCTCGCCGGCAGCGGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGT
GCGTGACACAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACC
TGCATCCCCAAAGTGAGCTGGTCCCTGCCGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAAC
AGGATCGACTTGAGGGTGCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCATGTGGGGCCCCGGTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTT
CTCCTGTTCTCATCATCATCATTGTTTCTTGTGCTAATACTATCATCAGCGTGTCTATCACACCGCCAGAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGTGAG
ATGTGCTCTCCAAGACAAGACGCTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTTGTCCAGCGCACAGTGCC
CGAACCATCGTTTACAAGAGATTATTGGCAAGGGTCGGTTTGGGAAGTATGGCGGGCCGCTGGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCTTCT
CGTGAAAGACGGTCTTGGTTTCAGGGAAGCAGAGATATACAGACGGTCATGCTGCGCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAGATAAT
GGCACCTGGACACAGCTGTGGCTGTTTCTGACTATCATGAGCACGGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAAG
CTGGCCTTGCTGCTGCTAGTGGGTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCACCAAGGAAGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAAC
ATTCTGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCTGGCTGTCGTCATGATGCAGTCACTGACACCATTGACATTGCCCGAATCAGAGG
GTGGGGACCAACGATAACATGGCCCCTGAAGTACTTGATGAAACCATTAAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGATATTTATGCCCTCGGGCTT
GTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCTTGACCCTTCCATTGAGGAA
ATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATGGGAAGATGATGCGAGAGTGT
TGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCTGACGGCCCTGCGCATCAAGAAGACCCTCTCCAGCTCAGCGTGAGGAAGACGTGAAGATC (서열 번호:

16)

세포의 ALK4 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다:

TCCGGGCCCCGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGACACAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTC
AATCTGGATGGGATGGAGACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGAGCTGGTCCCTGCCGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGC
AACACCCACTGTGCTACTACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCAGTGCTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCGGTG
GAG (서열 번호: 17)

인간 ALK4 전구체 단백질 서열의 대체 아이소형, 아이소형 B (NCBI Ref Seq NP_064732.3)은 다음과 같다:

1 mvsifnldgm ehvrtcipk velvpagkpf yclssedlrn thccytdycn ridlrpsgh

61 lkepehpsmw gpvelvgiia gpvflflfllii iivflvinyh qrvyhnqrql dmedpscemc

121 lskdktlqdl vydlstsgsg sglplfvqrt vartivlqei igkgrfgev w rgrwrggdva

181 vkifssreer swfreaei yq tvmlrhenil gfiaadnkdn gtwtqlwlv dyhehgsldf

241 ylnrytvtie gmiklalsaa sglahlhmei vgtqgkpgia hrdlksknil vknmgmaia

301 dlglavrhdv vtdtidiapn qrvgtkryma pevldetinm khfdfsfcad iyalglvywe

361 iarrensaggv heeyqlpyyd lvpsdpsiee mrkvvedqkl rpnipnwwqs yealrvmgkm

421 mrecwyanga arltalrikk tlsqslsvqed vki (서열 번호: 18)

세포의 도메인은 **굵게** 표시된다.

프로세스된 세포의 ALK4 서열은 다음과 같다:

1 mvsifnldgm ehvrtcipk velvpagkpf yclssedlrn thccytdycn ridlrpsgh

61 lkepehpsmw GPVE(서열 번호: 19)

인간 ALK4 전구체 단백질 (아이소형B)을 인코딩하는 핵산 서열은 하기에 나타내며(서열 번호: 20), 이는 Genbank 기준 서열 NM_020327.3의 뉴클레오타이드 186-1547에 상응한다. 세포의 도메인을 인코딩하는 뉴클레오타이드는 **굵게** 표시된다.

1 atggtttcca ttttcaatct **ggatgggatg gagcaccatg tgcgcacctg**

51 catccccaaa **gtggagctgg tccctgccgg gaagcccttc tactgcctga**

101 **gctcggagga cctgcgcaac acccactgct gctacactga ctactgcaac**

151 **aggatcgact tgagggtgcc cagtgggtcac ctcaaggagc ctgagcaccc**

201 **gtccatgtgg ggcccgggtgg agctggtagg catcatcgcc ggcccgggtg**

251 tctctctgtt cctcatcatc atcattgttt tcttgtcat taactatcat

301 cagcgtgtct atcacaaccg ccagagactg gacatggaag atccctcatg

351 tgagatgtgt ctctccaaag acaagacgct ccaggatctt gtctacgac

401 tctccacctc aggggtctggc tcagggttac ccctctttgt ccagcgaca

451 gtggcccgaa ccatcgtttt acaagagatt attggcaagg gtcggtttgg

501 ggaagtatgg cggggccgct ggagggtgg tgatgtggct gtgaaaatat

551 tctcttctcg tgaagaacgg tcttgggtca gggaagcaga gatataccag

601 acggtcatgc tgcgcatga aaacatcctt ggatttattg ctgctgacaa

651 taaagataat ggcacctgga cacagctgtg gcttgtttct gactatcatg

701 agcacgggtc cctgtttgat tatctgaacc ggtacacagt gacaattgag

[0275] 751 gggatgatta agctggcctt gtctgtctgt agtgggctgg cacacctgca
 [0276] 801 catggagatc gtgggcaccc aagggaagcc tggattgct catcgagact
 [0277] 851 taaagtcaaa gaacattctg gtgaagaaaa atggcatgtg tgccatagca
 [0278] 901 gacctgggcc tggctgtccg tcatgatgca gtcactgaca ccattgacat
 [0279] 951 tgccccgaat cagagggtgg ggaccaaagc atacatggcc cctgaagtac
 [0280] 1001 ttgatgaaac cattaatatg aaacactttg actcctttaa atgtgtgat
 [0281] 1051 atttatgccc tcgggcttgt atattgggag attgctcgaa gatgcaattc
 [0282] 1101 tggaggagtc catgaagaat atcagctgcc atattacgac ttagtgccct
 [0283] 1151 ctgacccttc cattgaggaa atgcgaaagg ttgtatgtga tcagaagctg
 [0284] 1201 cgtcccaaca tccccaactg gtggcagagt tatgaggcac tgcgggtgat
 [0285] 1251 ggggaagatg atgcgagagt gttggtatgc caacggcgca gcccgctga
 [0286] 1301 cggccctgcg catcaagaag accctctccc agctcagcgt gcaggaagac
 [0287] 1351 gtgaagatCT AA (서열 번호: 20)

[0288] 세포외 ALK4 폴리펩티드(아이소형 B)를 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다:

[0289] 1 atggtttcca ttttcaatct ggatgggatg gagcaccatg tgcgcacctg
 [0290] 51 catcccaaaa gtggagctgg tccctgccgg gaagcccttc tactgcctga
 [0291] 101 gctcggagga cctgcgcaac acccactgct gctacactga ctactgcaac
 [0292] 151 aggatcgact tgagggtgcc cagtgggtcac ctcaaggagc ctgagcaccc
 [0293] 201 gtccatgtgg ggcccggtgg agctggtagg (서열 번호: 21)

[0294] ALK4는 척추동물간에 잘-보존되며, 세포의 도메인의 큰 스트레치(stretches)는 완벽하게 보존된다. 예를 들면, 도 4는 다양한 ALK4 오르소로그(orthologs)와 비교하여 인간 ALK4 세포의 도메인의 다중-서열 배열을 도시한다. ALK4에 결합하는 많은 리간드들이 매우 보존되어 있다. 따라서, 이들 배열로부터, ALK4- 리간드 결합의 정상적 활성화에 중요한 리간드 결합 도메인 안에 주요 아미노산 위치를 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 정상 ALK4- 리간드 결합 활성을 크게 변화시키지 않으면서 치환을 용인할 수 있는 아미노산 위치를 예측할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 활성을 가진 인간 ALK4 변이체 폴리펩티드는 다른 척추 동물 ALK4의 서열의 상응하는 위치에 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 인간 또는 다른 척추 동물 서열에서와 유사한 잔기를 포함 할 수 있다.

[0295] 다음 실시예들은 활성 ALK4 변이체를 정의하는 접근법을 설명하지만, 이에 제한하고자 함은 아니다. 도 4에 도시된 바와 같이, humALK4 세포의 도메인 (서열 번호: 115)에서 V6은 *무스 무쿨루스(mus musculus)* ALK4 (서열 번호: 119)에서 이소류신이며, 따라서 이 위치는 변경될 수 있고, 임의선택적으로 또다른 소수성 잔기 이를 테면 L, I, 또는 F, 또는 *갈루스 갈루스(gallus gallus)* ALK4 (서열 번호: 118)에서 관찰된 바와 같이, 비-극성 잔기 이를 테면 A로 변경될 수 있다. 인간 세포의 도메인의 E40은 *갈루스 갈루스(gallus gallus)* ALK4에서 K이며, 이것은 이 부위가 극성 잔기, 이를 테면 E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y, 그리고 아마도 비-극성 잔기 이를 테면 A가 포함된 다양한 변화에 내성이 있음을 나타낸다. S15 in the 인간 세포의 도메인의 S15는 *갈루스 갈루스(gallus gallus)* ALK4에서 D이고, 이는 이 위치가 선호되는 극성 잔기, 이를 테면 S, T, R, E, K, H, G, P, G 및 Y로 광범위한 구조적 변이를 용인한다는 것을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 E40은 *갈루스 갈루스(gallus gallus)* ALK4에서 K이며, 이는 D, R, K, H, 뿐만 아니라 Q 및 N를 포함하는 하전된 잔기가 이 위치에서 용인됨을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 R80은 *콘딜루라 크리스타타(condylura cristata)* ALK4 (서열 번호: 60)에서 K이며, 이것은 이 위치에서 R, K, 및 H를 포함하는 염기성 잔기가 용인된다는 것을 나타낸다. 인간 세포의 도메인의 Y77은 *수스 스크로파(sus scrofa)* ALK4 (서열 번호: 120)에서 F이며, F, W, 및 Y를 포함하는 방향족 잔기가 이 위치에서 용인됨을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 P93은 상대적으로 잘 보존되지 않은 것으로써, *에리나세우스 유로파에우스(erinaceus europaeus)* ALK4 (서열 번호: 117)에서 S, 그리고 *갈루스*

갈루스(*gallus gallus*) ALK4에서 N이고, 따라서 본질적으로 임의의 아미노산이 이 위치에서 용인되어야 한다.

[0296] 더욱이, ALK4 단백질은 당해 분야에서 구조적 및 기능적 특징, 특히 리간드 결합에 관해 특징 지워져 왔다[가령, Harrison et al. (2003) J Biol Chem 278(23):21129-21135; Romano et al. (2012) J Mol 모델 18(8):3617-3625; 그리고 Calvanese et al. (2009) 15(3):175-183]. 본원의 교시 외에도, 이들 참고 문헌은 하나 또는 그 이상의 정상 활성 (예컨대, 리간드 결합 활성)을 보유하는 ALK4 변이체를 생성하는 방법에 대한 충분한 지침을 제공한다.

[0297] 예를 들면, 3 개-핑거 독신 폴드(three-finger toxin fold)로 알려진 구조적 모티프는 I형 및 II형 수용체에 의한 리간드 결합에 중요하며, 각각의 단량체 수용체의 세포외 도메인 안에 다양한 위치에 보존된 시스테인 잔기에 의해 형성된다. [Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; 및 Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. 따라서, 이러한 보존된 시스테인의 가장 바깥쪽에 의해 경계가 표시되는 인간 ALK4의 핵심 리간드-결합 도메인은 서열 번호 14 (ALK4 전구체)의 34-101 위치에 상응한다. 이러한 시스테인으로 경계가 표시되는 코어 서열에 인접한 구조적으로 덜 규칙적인 아미노산은 반드시 리간드 결합을 바꾸지 않고도 N-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 또는 33개 잔기 및/또는 C-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 잔기가 절두될 수 있다. N-말단 및/또는 C-말단 절두에 대한 예시적인 ALK4 세포외 도메인은 서열 번호: 15 및 19를 포함한다.

[0298] 이와 함께, ALK4의 일반적인 활성 부분(가령, 리간드-결합 부분)은 서열 번호: 14의 아미노산 34-101을 포함한다. 따라서 ALK4 폴리펩티드는 예를 들면, 서열 번호: 14의 아미노산 24-34중 임의의 하나 (가령, 아미노산 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34중 임의의 하나에서 시작하고) 그리고 서열 번호: 14의 아미노산 101-126중 임의의 하나에 상응하는 위치에서 끝나는 (가령, 아미노산 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나에서 끝나는) ALK4의 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 다른 예들은 서열 번호: 14의 24-34 (가령, 위치 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34중 임의의 하나), 25-34 (가령, 위치 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34중 임의의 하나), 또는 26-34 (가령, 위치 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 또는 34중 임의의 하나)에서 시작하고, 그리고 서열 번호: 14의 위치 101-126 (가령, 위치 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나), 102-126 (가령, 위치 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나), 101-125 (가령, 위치 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 또는 125중 임의의 하나), 101-124 (가령, 위치 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 또는 124중 임의의 하나), 101-121 (가령, 위치 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 또는 121중 임의의 하나), 111-126 (가령, 위치 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나), 111-125 (가령, 위치 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 또는 125중 임의의 하나), 111-124 (가령, 위치 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 또는 124중 임의의 하나), 121-126 (가령, 위치 121, 122, 123, 124, 125, 또는 126중 임의의 하나), 121-125 (가령, 위치 121, 122, 123, 124, 또는 125중 임의의 하나), 121-124 (가령, 위치 121, 122, 123, 또는 124중 임의의 하나), 또는 124-126 (가령, 위치 124, 125, 또는 126중 임의의 하나)에서 끝나는 작제물을 포함한다. 이 범위 안에 변이체들, 특히, 서열 번호: 14의 대응하는 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 변이체들이 특히 고려된다.

[0299] 본 명세서에 설명된 변형은 다양한 방식으로 조합 될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4 변이체는 리간드-결합 포켓 안에 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15개의 보존 아미노산을 포함한다. 가변성이 특히 잘 용인될 수 있는 결합 포켓 외부의 위치는 세포외 도메인의 아미노 및 카르복시 말단 (상기 언급 한 바와 같음)을 포함한다.

[0300] 특정 구체예들에서, 본 출원은 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드 (이의 단편, 기능적 변이체, 및 변형된 형태들을 포함)를 포함하는 이형다량체인 ActRII 길항제들 (억제제) 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 환자의 면역 반

응 증가 및 암 치료)에 관한 것이다. 바람직하게는, ALK4 폴리펩티드는 가용성이다 (가령, ALK4의 세포외 도메인). 일부 구체예들에서, ALK4 폴리펩티드를 포함하는 이형체는 하나 이상의 TGFβ 수퍼패밀리 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]의 활성 (예컨대, Smad 신호전달)을 억제한다. 일부 구체예들에서, ALK4 폴리펩티드를 포함하는 이형체는 하나 이상의 TGFβ 수퍼패밀리 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]에 결합한다. 일부 구체예들에서, 이형다량체는 서열 번호: 14의 아미노산 34-101에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 이형다량체는 서열 번호: 14, 15, 18, 19, 73, 74, 76, 77, 79, 및 80 중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 이형다량체는 서열 번호: 14, 15, 18, 19, 74, 76, 79, 80, 143, 및 145 중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100% 동일한 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드로 구성되거나 본질적으로 구성된 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함한다.

[0301]

특정 양상들에서, 본 출원은 하나 이상의 ALK4 수용체 폴리펩티드 (예컨대, 서열 번호: 14, 15, 18, 19, 74, 76, 79, 80, 143, 및 145 그리고 이의 변이체) 및 하나 이상의 ActRIIB 수용체 폴리펩티드 (예컨대, 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 77, 78, 131, 132, 133, 139, 141 및 이의 변이체)를 포함하는 이형다량체 복합체 (이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 환자의 면역 반응 증가 및 암 치료) 포함)에 관한 것이며, 본 출원에서 이 복합체들은 일반적으로 "ALK4: ActRIIB이형다량체 복합체" 또는 "ALK4: ActRIIB이형다량체"로 지칭된다. 바람직하게는, ALK4: ActRIIB이형다량체는 가용성이다 [예컨대, 이형다량체 복합체는 ALK4 수용체의 가용성 부분(도메인)과 ActRIIB 수용체의 가용성 부분(도메인)을 포함할 수 있음]. 일반적으로, ALK4와 ActRIIB의 세포외 도메인은 이들 수용체의 가용성 부분에 상응한다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 ALK4 수용체의 세포외 도메인과 ActRIIB 수용체의 세포외 도메인을 포함한다. 일부 구체예들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 하나 이상의 TGFβ 수퍼패밀리 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]의 활성 (예컨대, Smad 신호전달)을 억제한다. 일부 구체예들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 하나 이상의 TGFβ 수퍼패밀리 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 14, 15, 18, 19, 74, 76, 77, 79, 80, 143, 및 145 중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 이로 본질적으로 구성된, 또는 구성된 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4: ActRIIB이형다량체 복합체는 서열 번호: 14의 아미노산 24-34, 25-34, 또는 26-34중 임의의 하나에 상응하는 잔기에서 시작하고, 서열 번호: 14의 위치 101-126, 102-126, 101-125, 101-124, 101-121, 111-126, 111-125, 111-124, 121-126, 121-125, 121-124, 또는 124-126의 위치에서 끝나는 ALK4 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 이로 본질적으로 구성된, 또는 구성된 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 14의 아미노산 34-101에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나 구성되는 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4-ActRIIB 이형다량체는 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 77, 78, 131, 132, 133, 139, 141 중 임의의 하나의 아미노산 서열에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나, 또는 구성된 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4: ActRIIB이형다량체 복합체는 서열 번호: 1의 아미노산 20-29, 20-24, 21-24, 22-25, 또는 21-29중 임의의 하나에 상응하는 잔기에서 시작하고, 서열 번호: 1의 위치 109-134, 119-134, 119-133, 129-134, 또는 129-133 of 서열 번호: 1에서 끝나는 ActRIIB 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나, 또는 구성된 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포

함하거나, 본질적으로 구성되거나 구성되는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, ALK4: ActRIIB이형다량체는 서열 번호: 1의 아미노산 25-131에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나 구성되는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4: ActRIIB이형다량체 복합체는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하며, 이때 서열 번호: 1의 L79에 대응하는 위치의 아미노산은 산성 아미노산이 아니다 (즉, 자연 발생적 D 또는 E 아미노산 잔기가 아니거나, 또는 인공적인 산성 아미노산 잔기가 아님). 본 명세서의 ALK4: ActRIIB이형다량체는 가령, 이형이량체, 이형삼량체, 이형사량체, 및 고차 올리고머 구조를 포함한다. 예컨대, 도 21-23을 참고하라. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 발명의 이형다량체 복합체는 ALK4: ActRIIB이형이량체이다.

[0302]

일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 치료 효과 또는 안정성 (예컨대, 생체내 반감기 및 단백질분해에 대한 저항성)을 강화시킬 목적으로, ALK4 폴리펩티드 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 구조를 변경시킴에 의한 기능적 변이체의 제조를 고려한다. 아미노산 치환, 결실, 추가, 또는 이의 조합들에 의해 변이체들이 만들어질 수 있다. 예를 들면, 류신을 이소류신 또는 발린으로 치환, 아스파르테이트를 글루탐산염으로 치환, 트레오닌을 세린으로 치환, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산 (가령, 보존 돌연변이)으로 단리된 치환은 생성 분자의 생물학적 활성에 주요한 영향을 주지 않을 것으로 합리적으로 예측할 수 있다. 보존적 치환은 아미노산 측쇄들이 관련되는, 아미노산 패밀리 안에서 일어나는 것이다. 본 명세서의 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화로 기능적 동소체가 생성되는 지의 여부는 생성된 변이체 폴리펩티드가 이의 야생형 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포 안에서 반응을 만드는 능력, 또는 예를 들면, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 결절, 신경아교세포-유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty을 포함하는 하나 또는 그 이상의 리간드들에 결합하는 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0303]

특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ALK4 폴리펩티드 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 당화를 변경하기 위해 상기 폴리펩티드의 특정한 돌연변이를 고려한다. 이러한 돌연변이는 하나 또는 그 이상의 당화 부위, 이를 테면 O-연결된 또는 N-연결된 당화 부위를 도입 또는 제거하도록 선택될 수 있다. 아스파라긴-연결된 당화 인식 부위는 일반적으로 적절한 세포의 당화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 삼펩티드 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린 (여기서 "X"는 임의의 아미노산임)이다. 이러한 변형은 하나 또는 그 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 상기 폴리펩티드(O-연결된 당화 부위의 경우)에 추가 또는 치환시켜 만들 수도 있다. 당화 인식 부위의 제1 또는 제3 아미노산 위치중 하나 또는 둘 모두에서 다양한 아미노산 치환 또는 결실 (및/또는 제 2 위치에서 아미노산 결실)으로 변형된 삼펩티드 서열에서의 비-당화를 초래한다. 폴리펩티드의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 다른 수단은 상기 단백질에 화학 또는 효소적으로 글리코시드를 결합시키는 것이다. 이용되는 결합 방식에 따라, 이들 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 유리 카르복실 그룹; (c) 유리 설프하이드릴 그룹, 가령, 시스테인의 유리 설프하이드릴 그룹; (d) 유리 하이드록실 그룹, 가령, 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린의 유리 하이드록실 그룹; (e) 방향족 잔기, 가령, 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 방향족 잔기; 또는 (f) 글루탐인의 아미드 그룹에 부착될 수 있다. 폴리펩티드 상에 있는 하나 또는 그 이상의 탄수화물 모이어티는 화학적 및/또는 효소적으로 제거될 수 있다. 화학적 탈당화는 예를 들면, 트라이플루오로메탄설폰산 또는 이와 균등한 화합물에 대한 폴리펩티드의 노출을 수반할 수 있다. 이러한 처리는 아미노산 서열을 손상시키지 않으면서, 연결당 (N-아세틸 글루코사민 또는 N-아세틸 갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당을 절단하게 된다. 폴리펩티드상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura *et al.* [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]에서 설명된 바와 같이, 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 이루어질 수 있다. 포유류, 효모, 곤충 및 식물 세포는 모두 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 당화 패턴을 도입시킬 수 있기 때문에 폴리펩티드의 서열은 이용되는 발현계 유형에 따라 적절하게 조정될 수 있다. 일반적으로, 인간에 사용하기 위한 본 명세서의 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 및 이형다량체는 적절한 당화를 제공하는 포유류 세포주, 이를 테면 HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현될 수 있지만, 다른 포유류 발현 세포주 또한 마찬가지로 유용할 것으로 예상된다.

[0304]

본 명세서는 돌연변이체, 특히 본 명세서의 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드 복합 돌연변이체, 뿐만 아니라 절두 돌연변이체를 만드는 방법을 추가로 고려한다. 복합 돌연변이체의 푸울은 기능적으로 활성인 (가령, TGF β 슈퍼패밀리 리간드 결합) ALK4 및/또는 ActRII 서열을 동정하는데 특히 유용하다. 이러한 복합 라이브러리들을 스크리닝하는 목적은 변경된 성질, 가령, 변경된 약동학적 또는 변경된 리간드 결합을 가지는 폴리펩티드들의

변이체를 만들기 위한 것일 수도 있다. 다양한 스크리닝 분석이 하기에 제공되며, 이러한 분석을 이용하여 변이체들을 평가할 수 있다. 예를 들면, ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 및 ALK4: ActRIIB이형다량체 변이체들은, TGF β 수퍼패밀리 수용체에 대한 TGF β 수퍼패밀리 리간드의 결합을 저해하기 위하여, 및/또는 TGF-베타 수퍼패밀리 리간드에 의해 유발되는 신호전달을 간섭하기 위하여, 하나 이상의 TGF-베타 수퍼패밀리 리간드들 (예컨대, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 결절, 신경아교세포-유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty)에 결합하는 능력에 관해 스크리닝 될 수 있다.

[0305] ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체의 활성은 또한 세포 기반 분석법 또는 *생체내*에서 테스트될 수도 있다. 예를 들면, 암 세포에서 암 성장에 관여하는 유전자들의 발현에 대한 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체의 효과를 평가할 수 있다. 이는 필요에 따라 하나 이상의 재조합 TGF-베타 수퍼패밀리 리간드 단백질들 (예컨대, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 결절, 신경아교세포-유래 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty)의 존재하에 실시될 수 있으며, 세포들은 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체, 및 선택적으로, TGF β 수퍼패밀리 리간드를 제조하기 위하여 형질감염될 수 있다. 유사하게, ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체는 마우스 또는 다른 동물에게 투여될 수 있으며, 하나 또는 그 이상의 측정, 이를 테면 근육 형성 및 강도는 해당 분야에서 알려진 방법들을 이용하여 평가될 수 있다. 유사하게, ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체 또는 이의 변이체의 활성은 암 세포들의 성장에 대한 임의의 효과에 관하여 이러한 세포들에서, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 분석법 및 해당 기술 분야에 통상적으로 공지된 분석법으로 테스트할 수 있다. SMAD-반응성 리포터 유전자를 이러한 세포계에서 이용하여 하류 신호생성에 대한 효과를 모니터링할 수 있다.

[0306] 기준 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체와 비교하여 선택성이 증가된 또는 전반적으로 효능이 증가된 복합-유도된 변이체가 만들어질 수 있다. 이러한 변이체들은 재조합 DNA 작체물로부터 발현될 때, 유전자 요법 프로토콜에 이용될 수 있다. 돌연변이유발은 대응하는 비변형된 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체와 상당히 상이한 세포내 반감기를 갖는 변이체를 만들 수 있다. 예를 들면, 변형된 단백질은 비변형된 폴리펩티드의 파괴 또는 그렇지 않으면 불활성화를 초래하는 단백질분해 또는 다른 세포 과정에 더 안정적이거나 덜 안정적이 될 수 있다. 이러한 변이체 및 이들을 코딩하는 유전자는 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 폴리 펩타이드 복합체 수준을 변경 시키는데 이용 될 수 있다. 예를 들면, 짧은 반감기는 더욱 일시적인 생물학적 효과를 일으킬 수 있고, 유도성 발현 시스템의 일부는 세포 안에 재조합 폴리펩티드 복합체 수준을 더 엄밀하게 조절할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, 돌연변이는 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체의 반감기를 변형시키기 위하여 링커 (존재하는 경우) 및/또는 Fc 부위에서 이루어질 수 있다.

[0307] 잠재적 ALK4 및/또는 ActRII 서열의 최소한 일부분을 포함하는 각 폴리펩티드의 라이브러리를 인코딩하는 유전자의 축중 라이브러리에 의해 복합 라이브러리가 만들어질 수 있다. 예를 들면, 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물은 유전자 서열에 효소적으로 결합되어, 잠재적 ALK4 및/또는 ActRII를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 축중 세트는 개별 폴리펩티드로 발현되거나, 또는 대안으로, 더 큰 융합 단백질 (가령, 파아지 디스플레이의 경우)로 발현가능하다.

[0308] 축중성 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 잠재적 상동체(homologs)의 라이브러리를 만들 수 있는 많은 방법들이 있다. 자동 DNA 합성기에서 축중성 유전자 서열의 화학적 합성을 실행할 수 있고, 그 다음 합성 유전자를 적절한 발현 벡터 안에 결합시킬 수 있다. 축중 올리고뉴클레오타이드 합성은 해당 분야에 공지되어 있다 [Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura *et al.* (1981) 재조합 DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macro분자들, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura *et al.* (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura *et al.* (1984) Science 198:1056; 그리고 Ike *et al.* (1983) Nucleic Acid Res. 11:477]. 이러한 기술은 다른 단백질의 유도된 진화에 이용되어 왔다. [Scott *et al.*, (1990) Science 249:386-390; Roberts *et al.* (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin *et al.* (1990) Science 249: 404-406; Cwirla *et al.*, (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; 뿐만 아니라 U.S. Patent Nos: 5,223,409, 5,198,346, 및 5,096,815].

[0309] 대안으로, 다른 형태의 돌연변이유발을 이용하여 조합 라이브러리를 만들 수 있다. 예를 들면, 본 출원의

ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체가 만들어지고, 예를 들면, 알려진 스캐닝 돌연변이유발을 이용한 스크리닝[가령, Ruf et al. (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al. (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; 낮은man et al. (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; 그리고 Cunningham et al. (1989) *Science* 244:1081-1085], 링커 스캐닝 돌연변이유발 [가령, Gustin et al. (1993) *Virology* 193:653-660; 그리고 Brown et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al. (1982) *Science* 232:316], 포화 돌연변이유발 [가령, Meyers et al., (1986) *Science* 232:613]; PCR 돌연변이유발 [가령, Leung et al. (1989) 방법 세포 *Mol Biol* 1:11-19]; 또는 화학적 돌연변이유발을 포함하는 무작위 돌연변이유발[가령, Miller et al. (1992) *A Short Course in 세균 Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; and Greener et al. (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34]에 의해 단리될 수 있다. 링커 스캐닝 돌연변이유발은 특히 복잡한 환경에서 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 절두된 (생물 활성) 형태를 확인하는 흥미로운 방법이다.

[0310] 점 돌연변이 및 절두에 의해 만들어진 복합 라이브러리의 유전자 산물을 스크리닝하기 위한, 그리고 이와 같은 경우, 특정 성질을 갖는 유전자 산물의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 광범위한 기술이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 기술은 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체의 복합 돌연변이유발에 의해 생성된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝에 일반적으로 적합할 것이다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하는 가장 광범위하게 이용되는 기술은 전형적으로 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터에 클로닝하고, 적절한 세포를 벡터의 생성 라이브러리로 형질전환시키고, 원하는 활성의 탐지는 해당 유전자의 산물이 탐지되는 해당 유전자를 인코딩하는 벡터를 상대적으로 용이하게 단리할 수 있는 조건하에 복합 유전자를 발현시키는 것을 포함한다. 바람직한 분석에는 TGF-베타 리간드 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 결절, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty) 결합 분석 및/또는 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드-매개된 세포 신호생성 분석이 포함된다.

[0311] 특정 구체예들에 있어서, ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체는 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 것에 더하여 번역후 변형을 더욱 포함할 수 있다. 이러한 변형은 아세틸화, 카르복실화, 당화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그 결과, ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체는 비-아미노산 원소, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 다당류 또는 단당류 및 인산염을 포함할 수 있다. 다른 이형다량체 변이체의 기능에 대하여 본 명세서에 기재된 바와 같이, ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 또는 ALK4: ActRIIB이형다량체의 기능에 대한 이러한 비-아미노산 요소들의 효과를 테스트할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드가 초기 형태의 폴리펩티드를 절단함으로써 세포에서 생산되는 경우, 번역 후 가공은 또한 단백질의 정확한 폴딩 및/또는 기능에 중요할 수 있다. 상이한 세포들 (예컨대, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)이, 이러한 번역후 활성들에 대한 특이적인 세포 조직 (세포ular machinery) 및 특징적 메커니즘을 가지며 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 올바른 변형 및 가공을 확보하기 위해 선택될 수 있다.

[0312] 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4 폴리펩티드는 ActRII 폴리펩티드 (예컨대, ActRIIA 또는 ActRIIB 폴리펩티드) 또는 ALK4 폴리펩티드의 최소한 하나의 부위 (도메인) 및 하나 이상의 이중 부위들 (도메인들)을 포함하는 융합 단백질이다. 이러한 융합 도메인의 잘 알려진 예로는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S-전달효소 (GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 (Fc), 말토즈 결합 단백질 (MBP), 또는 인간 혈청 알부민을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 성질을 부여하도록 선택될 수 있다. 예를 들면, 일부 융합 도메인들은 친화 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리에 특히 유용하다. 친화도 정제를 위하여, 친화 크로마토그래피를 위한 관련 기재들, 가령, 글루타티온-, 아밀라아제-, 및 니켈- 또는 코발트- 공액 수지들이 사용된다. 이러한 많은 기질들은 '키트' 형태, 가령, Pharmacia GST 정제 시스템 및 (HIS₆) 융합 짝과 함께 유용한 QIAexpressTM 시스템(Qiagen)로 이용가능하다. 또 다른 예로서, 융합 도메인은 ActRII 폴리펩티드의 탐지를 용이하게 하도록 선택될 수 있다. 이러한 탐지 도메인의 예로는 다양한 형광 단백질 (가령, GFP) 뿐만 아니라 "에피토프 태그"를 포함하는데, 이는 특이적 항체가 이용가능한 짧은 펩티드 서열이 일반적이다. 특정 단클론 항체에 용이하게 이용되는 잘 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA), 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우에서 융합 도메인은 프로테아제 절단 부위, 이를 태면 인자(인자) Xa 또는 트롬빈에 대한 절단부위를 가지는데, 이에 의해 관련 프

로테아제가 이 융합 단백질을 부분적으로 절단하고, 그에 따라 이로부터 재조합 단백질이 유리된다. 유리된 단백질은 후속 크로마토그래피 분리에 의해 융합 단백질로부터 분리될 수 있다. 선택될 수 있는 그 외 융합 도메인들의 유형들에는 다량체화 (예컨대, 이량체화, 사량체화) 도메인들 및 예를 들면, 면역글로불린들의 불변 도메인들 (예컨대, Fc 도메인들)을 비롯한 (추가 생물학적 기능을 부여하는) 기능적 도메인들이 포함된다. 본 출원에 기재된 일부 구체예들에서, 바람직한 다량체화 도메인들은 비대칭 짝형성 (asymmetrical pairing)을 촉진하여 이형다량체 구조 (예컨대, ALK4: ActRIIB이형다량체)를 형성하는 변형된 Fc 도메인이다.

[0313] 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드들을 "안정화"시킬 수 있는 하나 이상의 변형들을 내포한다. "안정화"는 파괴 감소, 신장에 의한 제거 감소, 또는 일정 물질의 약동학적 효과로 인한 것인식 여부에 관계없이 시험관내 반감기, 혈청 반감기를 증가시키는 어떤 것이든 의미한다. 예를 들면, 이러한 변형은 폴리펩티드의 보관 수명을 강화시키고, 폴리펩티드의 순환 반감기를 강화시키고 및/또는 폴리펩티드의 단백질분해를 감소시킨다. 이러한 안정화 변형에는 융합 단백질 (예를 들면, ActRII 폴리펩티드 또는 ALK4 폴리펩티드 도메인 및 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질), 당화 부위의 변형 (예를 들면, 본 명세서의 폴리펩티드에 당화 부위 추가 포함), 및 탄수화물 모이어티의 변형 (예를 들면, 본 명세서의 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티 제거 포함)이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "안정화제 도메인"은 융합 단백질인 경우 융합 도메인 (가령, 면역글로불린 Fc 도메인)을 지칭하고, 뿐만 아니라 비단백질성 변형, 가령, 탄수화물 모이어티, 또는 비단백질성 모이어티, 가령, 폴리에틸렌 글리콜을 또한 포함한다. 바람직한 특정 구체예들에서, ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4 폴리펩티드는 이를 안정화시키는 이중 도메인 ("안정화제" 도메인), 바람직하게는 폴리펩티드의 생체내 안정성을 증가시키는 이중 도메인과 융합된다. 면역글로불린의 불변 도메인 (예컨대, Fc 도메인)과의 융합이 광범위한 단백질들에 바람직한 약동학적 성질들을 부여함은 공지이다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 대한 융합은 원하는 안정화 성질들을 부여할 수 있다.

[0314] 일부 구체예들에서, 본 출원의 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드는 Fc 융합 단백질이다. 인간 IgG1 (G1Fc)의 Fc 부분에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열을 하기에 예시한다 (서열 번호: 22). 점선은 힌지 영역을 나타내며, 직선은 자연 발생적 변이체를 갖는 위치를 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 22에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다. G1Fc에서 자연 발생적 변이체는 서열 번호: 22에서 이용된 넘버링 체계에 따라 E134D 및 M136L을 포함할 수 있다(Uniprot P01857 참고).

[0315] 1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE

[0316] 51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTIVLHQD WLNGKEYKCK

[0317] 101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF

[0318] 151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRRWQQGNV

[0319] 201 FSCSVMEAL HNHYTEQSLS LSPGK (서열 번호: 22)

[0320] 선택적으로, IgG1 Fc 도메인은 잔기들, 가령, Asp-265, 리신 322, 및 Asn-434에서 하나 이상의 돌연변이를 가진다. 특정 경우에서, 이러한 돌연변이 (예컨대, Asp-265 돌연변이)를 하나 이상 가지는 돌연변이체 IgG1 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 대한 결합 능력이 감소된다. 다른 경우들에서, 하나 또는 그 이상의 이들 돌연변이 (가령, Asn-434 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 IgG1 Fc 도메인과 비교하여 MHC 클래스 I-관련된 Fc-수용체 (FcRN)에 결합하는 능력이 증가된다.

[0321] 인간 IgG2 (G2Fc)의 Fc 부분에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열은 하기에 예시된다 (서열 번호: 23). 점선은 힌지 영역을 나타내며, 이중 밑줄은 이 서열에서 데이터 베이스가 충돌하는 위치를 나타낸다 (UniProt P01859). 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 23에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

[0322] 1 VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ

[0323] 51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS

- [0324] 101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
- [0325] 151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
- [0326] 201 CSVMHEALHN HTQKSLSLS PGK (서열 번호: 23)

[0327] 인간 IgG3 (G3Fc)의 Fc 부분에 이용될 수 있는 2가지 예시 아미노산 서열을 하기에 나타낸다. G3Fc의 힌지 영역은 다른 Fc쇄의 길이의 최대 4배가 될 수 있고, 유사한 17개-잔기 분절을 선행시키는, 3개의 동일한 15개-잔기 분절들을 포함한다. 하기에 나타낸 제 1 G3Fc 서열(서열 번호: 24)은 단일 15개-잔기 분절로 구성된 짧은 힌지 영역을 포함하며, 반면 제 2 G3Fc 서열(서열 번호: 25)은 전장 힌지 영역을 포함한다. 각 경우에서, 점선은 힌지 영역을 나타내며, 직선은 UniProt P01859에 따른 자연 발생적 변이체를 갖는 위치를 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 24 및 25에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

- [0328] 1 EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
- [0329] 51 VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVS LTVLHQDWLN
- [0330] 101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
- [0331] 151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
- [0332] 201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (서열 번호: 24)
- [0333] 1 ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSDTP PPCPRCPEPK
- [0334] 51 SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
- [0335] 101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVSVLTV LHQDWLNGKE
- [0336] 151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
- [0337] 201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
- [0338] 251 QGNIFSCSVM HEALHNRETQ KSLSLSPGK (서열 번호: 25)

[0339] G3Fc (예를 들면, Uniprot P01860)에서 자연 발생적 변이체들은 서열 번호: 24에 이용된 넘버링 체계로 전환될 때 E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y를 포함하며, 본 명세서는 이들 변이 중 하나 또는 그 이상을 함유하는 G3Fc 도메인이 포함된 융합 단백질을 제공한다. 또한, 인간 면역글로불린 IgG3 유전자 (*IGHG3*)는 상이한 힌지 길이에 의해 특징화되는 구조적 다형성을 나타낸다[Uniprot P01859]. 특히, 변이체 WIS는 대부분의 V 영역과 모든 CH1 영역이 부족하다. 힌지 영역에 정상적으로 존재하는 11개에 추가하여 위치 7에 여분의 쇠간 이황화결합이 있다. 변이체 ZUC는 대부분의 V 영역, 모든 CH1 영역, 그리고 일부 힌지가 부족하다. 변이체 OMM은 대립형질 형태 또는 또다른 감마 쇠 하위클래스를 나타낼 수 있다. 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 이들 변이체를 함유하는 G3Fc 도메인이 포함된 추가적인 융합 단백질을 제공한다.

[0340] 인간 IgG4 (G4Fc)의 Fc 부분에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열은 하기에 예시된다 (서열 번호: 26). 점선은 힌지 영역을 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 26에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

- [0341] 1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
- [0342] 51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE
- [0343] 101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
- [0344] 151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
- [0345] 201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (서열 번호: 26)

[0346] Fc 도메인 안에서 다양하게 조작된 돌연변이는 G1Fc 서열 (서열 번호: 22)에 대하여 나타내며, G2Fc, G3Fc, 및 G4Fc에서 유사 돌연변이는 도 18의 G1Fc와 배열하여 유도될 수 있다. 같지 않은 힌지 길이로 인해, 아이소형

정렬 (도 18)을 기준으로 유사한 Fc 위치들은 서열 번호: 22, 23, 24, 25, 및 26에서 상이한 아미노산 번호를 소유한다. 힌지, C_H2, 및 C_H3 영역 (예컨대, 서열 번호: 22, 23, 24, 25, 및 26)으로 구성된 면역글로불린 서열에서 주어진 아미노산 위치는 Uniprot 데이터베이스에서와 같이, 넘버링이 IgG1 중쇄 불변 도메인 (C_H1, 힌지, C_H2, 및 C_H3 영역으로 구성됨) 전체를 포괄하는 경우, 동일한 위치가 아닌 상이한 번호로 확인될 것이라는 것을 또한 인식할 수 있을 것이다. 예를 들면, 인간 G1Fc 서열 (서열 번호: 22), 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 (Uniprot P01857), 및 인간 IgG1 중쇄에서 선택된 C_H3 위치 간의 대응성은 다음과 같다.

상이한 넘버링 체계에서 C _H 3 위치의 대응성		
G1Fc (넘버링은 힌지 영역의 첫번째 트레오닌에서 시작한다)	IgG1 중쇄 불변 도메인 (넘버링은 C _H 1에서 시작한다)	IgG1 중쇄 (Kabat 외., 1991의 EU 넘버링 체계*)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
T144	T249	T366
L146	L251	L368
K170	K275	K392
D177	D282	D399
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409
* Kabat 외. (eds) 1991; pp. 688-696 in <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5 th ed., Vol. 1, NIH, Bethesda, MD.		

[0347]

[0348]

특정 양상들에서, 본 출원에 개시된 폴리펩티드는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드와 공유적으로 또는 비-공유적으로 연관된 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드를 포함하는 단백질 복합체를 형성할 수 있다. 바람직하게는 본 명세서의 폴리펩티드들은 이형이량체성 복합체를 형성하지만, 더욱 고차의 이형이량체 복합체들 (이형다량체), 이를 테면, 이형삼량체, 이형사량체, 및 추가 올리고머 구조를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다 (예컨대, 도 21 -23 참고). 일부 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드는 최소한 하나의 다량체화 도메인을 포함한다. 본 명세서에서 공개된 바와 같이, 용어 "다량체화 도메인(multimerization domain)"은 최소한 제 1 폴리펩티드와 최소한 제 2 폴리펩티드 사이에 공유 또는 비-공유 상호작용을 촉진시키는 아미노산 또는 아미노산 서열을 지칭한다. 본 명세서의 폴리펩티드들은 다량체화 도메인에 공유적 또는 비-공유적으로 결합될 수 있다. 바람직하게는 다량체화 도메인은 이형다량체 형성 (가령, 이형이량체 형성)을 촉진시키고, 임의선택적으로 동형다량체 형성 (가령, 동형이량체 형성)을 방해 또는 그렇지 않으면 이의 형성을 선호하지 않고, 이로 인하여 원하는 이형다량체가 증가되도록 하기 위하여, 제 1 폴리펩티드 (가령, ALK4 폴리펩티드)와 제 2 폴리펩티드 (가령, ActRIIB 폴리펩티드) 간의 상호작용을 촉진시킨다(가령, 도 22 참고).

[0349]

당업계에 공지된 많은 방법을 사용하여 본 발명의ALK4: ActRIIB이형다량체를 생성시킬 수 있다. 예를 들면, 제 1 폴리펩티드 (가령, ALK4 폴리펩티드)에 있는 자연 발생적 아미노산을 자유 티올-함유하는 잔기, 이를 테면 시스테인으로 대체하여, 이러한 자유 티올이 제 2 폴리펩티드 (가령, ActRIIB 폴리펩티드)에 있는 또다른 자유 티올-함유하는 잔기와 반응하고, 이황화결합이 제 1 폴리펩티드와 제 2 폴리펩티드들 사이에 형성되도록 함으로써, 비-자연 발생적 이황화결합이 구축될 수 있다. 이형다량체 형성을 촉진시키는 상호작용의 추가 예로는 Kjaergaard *et al.*, W02007147901에서 설명된 이온 상호작용; Kannan *et al.*, U.S.8,592,562에서 설명된 정전기적 스티어링; Christensen *et al.*, U.S.20120302737에서 설명된 코일드-코일 상호작용; Pack & Plueckthun, (1992) *Biochemistry* 31: 1579-1584에서 설명된 류진 지퍼; Pack *et al.*, (1993) *Bio/Technology* 11: 1271-1277에서 설명된 나선-턴-나선 모티프를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 다양한 분절들의 연결은

가령, 공유 결합 이를 떼면 화학적 교차-연결, 펩티드 링커, 이황화물 다리 등을 통하여 얻어지거나, 또는 친화력 상호작용, 이를 떼면 아비딘-비오틴 또는 류신 지퍼 기술에 의해 획득될 수 있다.

[0350] 특정 측면들에 있어서, 다량체화 도메인은 상호작용 짝의 하나의 성분을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 폴리펩티드들은 단백질 복합체들은 제 2 폴리펩티드와 공유 또는 비-공유적으로 연합된 제 1 폴리펩티드를 포함하는 단백질 복합체를 형성할 수 있으며, 이때 제 1 폴리펩티드는 ALK4 폴리펩티드와 상기 상호작용 짝(pair)의 제 1 구성요소의 아미노산 서열을 포함하며, 그리고 제 2 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열과 상기 상호작용 짝의 제 2 구성요소의 아미노산 서열을 포함한다. 상기 상호작용 짝은 복합체, 구체적으로, 이형이량체 복합체를 형성하기 위하여 상호작용하는 임의의 2개 폴리펩티드 서열일 수 있지만, 작업 구체예에서는 또한 동형이량체 복합체를 형성하는 상호작용 짝이 이용될 수도 있다. 상기 상호작용 짝의 하나의 구성요소는 예를 들면, 서열 번호: 2, 3, 5, 6, 15, 및 19 중 임의의 하나의 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 이로 구성된 또는 구성된 폴리펩티드 서열이 포함된, 본 명세서에 기재된 바와 같은 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 개선된 성질/활성, 이를 떼면, 증가된 혈청 반감기를 부여하거나, 또는 개선된 성질/활성을 제공하기 위하여 또다른 모이어티가 부착된 어댑터로 작용하는 상호작용 짝이 선택될 수 있다. 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 개선된 성질/활성, 이를 떼면 개선된 혈청 반감기를 제공하기 위하여 상호작용 짝의 한 성분 또는 양쪽 성분에 부착될 수 있다.

[0351] 상호작용 짝의 제 1 및 제 2 구성요소는 비대칭 짝일 수도 있는데, 이것은 구성요소들이 자가-연합보다는 서로 선호적으로 연합된다는 것을 의미한다. 따라서, 비대칭 상호작용 짝의 제 1 및 제2 구성요소들은 이형이량체 복합체를 만들 수 있다. (가령, 도 22 참고). 대안으로, 상호작용 짝은 비유도될 수 있는데, 이것은 상기 짝의 구성요소들이 실제적인 선호 없이 서로 연관되거나 또는 자가-연관될 수 있으므로, 동일하거나 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 비유도된 상호작용 짝의 제 1 및 제 2 구성요소는 연관하여 동형이량체성 복합체 또는 이형이량체성 복합체를 형성할 수 있다. 임의선택적으로, 상호작용 짝(가령, 비대칭 짝 또는 비유도 상호작용 짝)의 제 1 구성 요소는 상호작용 짝의 제 2 구성요소와 공유적으로 연합한다. 임의선택적으로, 상호작용 짝(가령, 비대칭 짝 또는 비유도 상호작용 짝)의 제 1 구성 요소는 상호작용 짝의 제 2 구성요소와 비-공유적으로 연합한다.

[0352] 특정 예로서, 본 발명은 이형다량체 형성을 촉진하도록 변형되어 있는 면역글로불린의 불변 도메인, 가령, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4로부터 유도된 면역글로불린의 CH1, CH2 또는 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 융합된 ALK4 또는 ActRIIB를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 단일 세포계로부터 비대칭 면역글로불린-기반의 단백질의 대량 생산에서 발생하는 문제는 "쇄 연합 문제"로 알려져 있다. 이중특이적 항체의 생산에서 주로 직면하게 되는, 쇄 연합 문제는 상이한 중쇄 및/또는 경쇄가 단일 세포주에서 생성될 때 본질적으로 얻어지는 다수의 조합 중에서 원하는 다중 결합 단백질을 유효성적으로 생산하려는 문제에 관한 것이다 [Klein et al (2012) mAbs 4:653-663 참고]. 이 문제는 두 개의 다른 중쇄와 두 개의 다른 경쇄가 동일한 세포에서 생산될 때 가장 심각한데, 이 경우에서 전형적으로 하나만이 필요할 때, 총 16 개의 가능한 사슬 조합이 있다 (그러나 이들 중 일부는 동일하다). 그럼에도 불구하고, 동일한 원리는 오직 2 개의 상이한 (비대칭) 중쇄를 혼입시키는 원하는 다중쇄 융합 단백질의 수율 감소를 설명한다.

[0353] 허용가능한 수율로 바람직한 비대칭 융합 단백질을 생산하기 위해 단일 세포주에서 Fc-함유 융합 폴리펩티드 쇄의 바람직한 페어링을 증가시키는 다양한 방법이 당업계에 공지되어있다[Klein et al (2012) mAbs 4:653-663; 및 Spiess et al (2015) Molecular Immunology 67(2A): 95-106 참고]. Fc-함유 쇄들의 바람직한 페어링을 얻는 방법은 하전-기반의 페어링 (정전기적 스티어링), "노브-인투-홀(knobs-into-holes)" 입체적 페어링, SEEDbody 페어링, 및 류신 지퍼-기반의 페어링을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.[[Ridgway et al (1996) Protein Eng 9:617-621; Merchant et al (1998) Nat Biotech 16:677-681; Davis et al (2010) Protein Eng Des Sel 23:195-202; Gunasekaran et al (2010); 285:19637-19646; Wranik et al (2012) J Biol Chem 287:43331-43339; US5932448; WO 1993/011162; WO 2009/089004, 및 WO 2011/034605]. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 이들 방법을 이용하여 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형다량체 복합체를 만들 수 있다. 예컨대, 도 23 참고.

[0354] ALK4: ActRIIB이형다량체 및 이러한 이형다량체의 제조 방법은 이미 공지된 바 있다. 예를 들면, WO 2016/164497에 기재되어 있으며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.

[0355] 융합 단백질의 상이한 요소들(예컨대, 면역글로불린 Fc 융합 단백질)은 원하는 기능성과 일관된 방식으로 정렬될 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들면, ActRII 폴리펩티드 도메인 또는 ALK4 폴리펩티드 도메인은 이중 도메

인의 C 말단에 배치될 수 있거나, 또는 대안으로, 이중 도메인은 ActRII 폴리펩티드 도메인의 C 말단에 배치될 수 있다. ActRII 폴리펩티드 도메인 또는 ALK4 폴리펩티드 도메인과 이중 도메인은 융합 단백질 내에서 인접할 필요가 없고, 그리고 추가 도메인 또는 아미노산 서열이 어느 한쪽 도메인의 C- 또는 N 말단에 또는 이들 도메인 사이에 포함될 수 있다.

[0356] 예를 들면, ActRII (또는 ALK4) 수용체 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있다. B 부분은 ActRII (또는 ALK4) 폴리펩티드 도메인에 상응한다. A와 C 부분은 독립적으로 0, 1, 또는 하나 이상의 아미노산일 수 있고, A와 C 부분 모두 존재하는 경우 B에 대하여 이중이다. A 및/또는 C 부분은 B 부분에 링커 서열을 경유하여 부착될 수 있다. 링커는 글리신 (가령, 2-10개, 2-5개, 2-4개, 2-3개 글리신 잔기)이 많거나, 또는 글리신과 프롤린 잔기가 많을 수 있고, 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 단일 서열 또는 트레오닌/세린 및/또는 글리신의 반복 서열을 포함할 수 있고, 가령, GGG (서열 번호: 27), GGGG (서열 번호: 28), TGGGG (서열 번호: 29), SGGGG (서열 번호: 30), TGGG (서열 번호: 31), SGGG (서열 번호: 32), 또는 GGGGS (서열 번호: 33) 단일항, 또는 반복부를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, ActRII (또는 ALK4) 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 A는 리더(신호) 서열이며, B는 ActRII (또는 ALK4) 폴리펩티드 도메인으로 구성되며, 그리고 C는 생체내 안정성, 생체내 반감기, 취입/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체 형성, 및/또는 정제중 하나 또는 그 이상을 개선하는 폴리펩티드 부분이다. 특정 구체예들에 있어서, ActRII (또는 ALK4) 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 A는 TPA 리더 서열이며, B는 ActRII (또는 ALK4) 수용체 폴리펩티드 도메인으로 구성되며, 그리고 C는 면역글로불린 Fc 도메인이다. 바람직한 융합 단백질은 다음의 서열 번호중 임의의 하나에서 제시된 아미노산 서열을 포함한다: 50, 54 57, 58, 60, 63, 64, 66, 70, 71, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 123, 128, 131, 132, 139, 141, 143, 및 145.

[0357] 대안으로, ActRII 길항제는 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 단쇄 리간드 트랩을 포함하며, 하나 또는 그 이상의 하나 또는 그 이상의 ALK4 또는 ActRIIB 폴리펩티드 뿐만 아니라 추가 ALK4: ActRIIB 단일 쇠 리간드 트랩에 임의선택적으로 공유적 또는 비-공유적으로 연합될 수 있다 [US 2011/0236309 및 US2009/0010879]. 도 27 참고. 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 단쇄 리간드 트랩은 다가(multivalent)가 되기 위하여 임의의 다량체화 도메인, 이를 테면 코일드-코일 Fc 도메인에 융합을 요구하지 않는다. 일반적으로, 본 명세서의 단쇄 리간드 트랩은 최소한 하나의 ALK4 폴리펩티드 도메인과 하나의 ActRIIB 폴리펩티드 도메인을 포함한다. 본 명세서에서 일반적으로 결합 도메인 (BD)으로써 지칭되는 ALK4와 ActRIIB 폴리펩티드 도메인은 임의선택적으로 링커 영역에 연결될 수 있다. ALK4: ActRIIB단쇄 리간드 트랩은 기존에 문헌에 기재된 바 있다. 예컨대, WO 2016/164497에 기재되어 있으며, 이 문헌의 전문은 본 출원에 참고문헌으로 포함된다.

[0358] 바람직한 특정 구체예들에서, 본 명세서의 방법에 따라 이용되는 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 및 ALK4: ActRIIB이형다량체는 단리된 복합체이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단리된 단백질 (또는 단백질 복합체) 또는 폴리펩티드 (또는 폴리펩티드 복합체)은 자연 환경의 성분으로부터 단리된 것이다. 일부 구체예들에 있어서, 본 출원의 폴리펩티드 또는 이형다량체는 예를 들면, 전기영동 (가령, SDS-PAGE, 등전점조절 (IEF), 모세관전기이동) 또는 크로마토그래피 (가령, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정되었을 때, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 순도로 정제된다. 항체 순도의 측정 방법은 당분야에 공지되어 있다[Flatman *et al.*, (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87].

[0359] 특정 구체예에서, 본 출원의 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드 및 ALK4: ActRIIB이형다량체는 해당 기술 분야에 공지된 다양한 기법들에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 본 출원의 폴리펩티드는 표준 단백질 화학 기술, 예를 들면, Bodansky, M. Principles of 펩티드 Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) 및 Grant G. A. (ed.), Synthetic 펩티드: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)에서 설명된 것들을 이용하여 합성될 수 있다. 이에 더하여, 자동화된 펩티드 합성장치는 상업적으로 가용하다 (Advanced ChemTech 모델 396; Milligen/Bioscience 9600). 대안으로, 본 출원의 폴리펩티드들 및 복합체들 (이의 단편 또는 변이체들 포함)은 당분야에 공지된 다양한 발현 시스템 [예컨대, 대장균(*E. coli*)], 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, COS 세포, 벡로로바이러스]을 이용하여 재조합적으로 만들어질 수 있다. 추가 구체예에서, 본 출원의 변형된 또는 변형되지 않은 폴리펩티드는 예로서, 프로테아제, 예를 들면, 트립신, 서몰리신, 키모트립신, 펩신, 또는 대합된 염기성 아미노산 전환 효소 (PACE)를 이용함으로써 재조합적으로 생산된 전장 LK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드의 소화에 의해 생산될 수 있다. 단백질분해가능한 절단 부위는 컴퓨터 분석(시판되는 소프트웨어, 가령, MacVect 또는, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)을 이용하여 동정해낼 수 있다.

[0360] 3. ActRII 및/또는 ALK4 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산들

[0361] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 본 명세서에서 개시된 ActRII 및/또는 ALK4 폴리펩티드 (이의 단편, 기능적 변이체 및 융합 단백질 포함)를 인코딩하는 단리된 및/또는 재조합 핵산을 제공한다. 예를 들면, 서열 번호: 16은 자연 발생적 humALK4 전구체 폴리펩티드를 인코딩하며, 서열 번호: 17은 ALK4의 프로세스된 세포외 도메인을 인코딩한다. 대상 핵산은 단일-가닥이거나 또는 이중 가닥일 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 이들 핵산은 예를 들면, 본 명세서에 기재된 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 및 ALK4: ActRIIB이형다량체를 만드는 방법에 이용될 수 있다.

[0362] 본 명세서에서 사용되는, 단리된 핵산(들)은 자연 환경의 성분으로부터 단리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 보통 포함하는 세포 안에 있는 핵산 분자를 포함하지만, 상기 핵산 분자는 자연 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 존재하거나 또는 염색체외부에 존재한다.

[0363] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4 또는 ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 서열 번호: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 55, 61, 67, 72, 75, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 144, 및 146 중 임의의 하나, 뿐만 아니라 이의 변이체들을 포함하는 것으로 이해된다. 변이체 뉴클레오타이드 서열은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 치환, 부가 또는 결실에 의해 다른 서열, 예를 들면, 대립형질 변이체를 포함하고; 그리고, 이런 이유로, 서열 번호: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 55, 61, 67, 72, 75, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 144, 및 146 중 하나에서 지정된 코딩 서열의 뉴클레오타이드 서열과 상이한 코딩 서열을 포함할 것이다.

[0364] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ALK4 또는 ActRII 폴리펩티드는 서열 번호: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 55, 61, 67, 72, 75, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 144, 및 146에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함하거나, 본질적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 당업자는 서열 번호: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 55, 61, 67, 72, 75, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 144, 및 146에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열에 상보적인 서열을 포함하는, 이것으로 본질적으로 구성된, 또는 구성된 핵산 서열 또한 본 명세서 범위 안에 있음을 인식할 것이다. 추가 구체예들에서, 본 명세서의 핵산 서열은 단리되거나, 재조합되거나, 및/또는 이중 뉴클레오타이드 서열에 융합되거나 또는 DNA 라이브러리 안에 있을 수 있다.

[0365] 다른 구체예들에서, 본 출원의 핵산들은 또한 엄격한 조건하에서 서열 번호: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 55, 61, 67, 72, 75, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 144, 및 146에 지정된 뉴클레오타이드 서열 및, 서열 번호: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 55, 61, 67, 72, 75, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 144, 및 146의 상보적 서열, 또는 이의 단편에 혼성화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 숙련된 기술자는 DNA 혼성화를 촉진시키는 적절한 엄격 조건은 가변적일 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 예를 들면, 6.0 x 염화나트륨/구연산나트륨 (SSC)에서 약 45 ℃에서 혼성화, 이어서 50 ℃에서 2.0 x SSC의 세척으로 실행할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서 염 농도는 50 ℃에서 약 2.0 x SSC의 낮은 엄격성으로부터 50 ℃에서 0.2 x SSC의 높은 엄격성에서 선택될 수 있다. 또한, 세척 단계의 온도는 약 22 ℃의 낮은 엄격성 조건으로부터 약 65 ℃의 높은 엄격성 조건으로 증가될 수 있다. 온도 및 염이 변화될 수 있거나, 또는 다른 변수가 변화되는 동안 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 명세서는 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄격성 조건하에 혼성화되고, 이어서 실온에서 2 x SSC에서 세척된 핵산을 제공한다.

[0366] 유전자 코드에서 축중성으로 인해 서열 번호: 7, 8, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 55, 61, 67, 72, 75, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 142, 144, 및 146에서 제시된 바와 같은 핵산과 상이한 단리된 핵산들 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들면, 다수의 아미노산이 하나 이상의 삼중항으로 지정된다. 동일한 아미노산을 특정하는 코돈, 또는 이의 동의코돈(예를 들면, CAU와 CAC는 히스티딘에 대한 동의코돈임)으로 이 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않은 "침묵(silent)" 돌연변이가 된다. 그러나, 포유류 세포 중에 본 단백질의 아미노산 서열의 변화를 유도하는 DNA 서열 다형성이 존재할 것으로 기대된다. 숙련된 기술자는 특정 단백질을 코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오타이드 (뉴클레오타이드의 최대 약 3 내지 5 %)에서의 이러한 변이가 자연 대립 유전자 변이로 인해 주어진 종의 개체들 사이에 존재할 수 있음을 인식할 것이다. 임의의 모든 이런 뉴클레오타이드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 안에 있다.

- [0367] 일정한 구체예에서, 본 발명의 재조합 핵산은 발현 작제물 내에서 하나 또는 그 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로, 발현에 이용된 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포에 있어서 다수 유형의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 당분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 전술한 하나 또는 그 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 종료 서열, 해독 개시 및 종료 서열, 및 인핸서 또는 활성자 서열을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 당분야에 공지된 구성 또는 유도성 프로모터는 본 출원에서 고려된다. 상기 프로모터는 자연 발생적 프로모터이거나, 또는 하나 이상의 프로모터 요소들이 복합된 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 작제물은 세포 안 에피솜 상에, 이를 테면 플라스미드로 존재하거나, 또는 발현 작제물은 염색체 안에 삽입될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 발현 벡터는 선택가능한 표지 유전자를 포함하여, 형질전환된 숙주 세포의 선별이 가능하다. 선택가능한 표지 유전자는 당분야에 공지되어 있으며, 이용되는 숙주 세포에 따라 가변적일 것이다.
- [0368] 본 출원의 특정 양상들에서, 본 발명의 핵산은 ALK4 및/또는 ActRIIB 폴리펩티드 폴리펩티드를 인코딩하고 최소한 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터로 제공된다. 조절 서열은 당분야에서 인식되고, 그리고 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 발현을 유도하도록 선별된다. 따라서, 용어 조절 서열은 프로모터, 인핸서, 및 기타 발현 조절 요소들을 포함한다. 예시적인 조절 서열은 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 설명되고 있다. 가령, 자신에게 작동가능하게 연결될 때 DNA 서열의 발현을 제어하는 임의의 매우 다양한 발현 제어 서열이 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현하기 위해 이들 벡터에서 이용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은, 예를 들면, SV40의 초기 및 후기 프로모터, *tet* 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 극초기 프로모터, RSV 프로모터, *lac* 시스템, *trp* 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 RNA 중합효소에 의해 발현이 지시되는 T7 프로모터, 파자지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 피복 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소의 프로모터, 산 포스파타제의 프로모터, *가령*, *Pho5*, 효모 α -메이팅 인자들의 프로모터, 베컬로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터, 또는 진행 세포 또는 이의 바이러스의 발현을 제어하는 것으로 알려진 기타 서열, 및 다양한 이의 조합들을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 형질전환될 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되기를 원하는 단백질의 유형과 같은 인자에 좌우될 수 있음을 알아야 한다. 더욱이, 벡터의 복사체 수, 복사체 수를 조절하는 능력, 그리고 이 벡터에 의해 인코딩되는 임의의 다른 단백질, 가령, 항생제 표지 등의 발현이 또한 고려된다.
- [0369] 본 출원의 재조합 핵산은 원핵 또는 진핵 세포 (효모, 조류, 곤충 또는 포유류), 또는 이들 모두에서 발현하는데 적합한 벡터에 클론된 유전자 또는 이의 일부분을 결합시킴으로써 만들어질 수 있다. 재조합 TGF β 수퍼패밀리 I 형 및/또는 II 형 수용체 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 운반체는 플라스미드 및 다른 벡터를 포함한다. 예를 들면, 적합한 벡터는 다음의 유형의 플라스미드를 포함한다: 원핵 세포, 이를 테면 대장균에서 발현을 위한 pBR322-유도된 플라스미드, pEMBL-유도된 플라스미드, pEX-유도된 플라스미드, pBTac-유도된 플라스미드 및 pUC-유도된 플라스미드.
- [0370] 일부 포유류 발현 벡터는 박테리아에서 벡터의 증식을 실행하는 원핵(prokaryotic) 서열과 진핵 세포에서 발현된 진핵(eukaryotic) 전사 단위를 모두 포함한다. pcDNAI/amp, pcDNAI/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 박테리아 플라스미드, 이를 테면 pBR322의 서열로 변형되어, 진핵 세포와 원핵 세포 모두에서 복제 및 약물 저항성 선별이 가능하다. 대안으로, 바이러스, 이를 테면 소의 유두종 바이러스 (BPV-1), 또는 Epstein-Barr 바이러스 (pHEBo, pREP-유도된 그리고 p205)의 유도체들이 진핵 세포에서 단백질의 일시적 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스 (레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 예는 하기 유전자 요법 운반 시스템의 설명에서 찾아볼 수 있다. 플라스미드의 준비 및 숙주 유기체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 원핵 세포와 진핵 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템, 뿐만 아니라 전반적인 재조합 과정은 가령, [Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)]을 참고한다. 일부 경우들에 있어서, 베컬로바이러스 발현 시스템의 사용에 의해 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 베컬로바이러스 발현 시스템의 예로는 pVL-유도된 벡터 (이를 테면 pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도된 벡터 (이를 테면 pAcUW1), 및 pBlueBac-유도된 벡터 (이를 테면 π -gal 함유 pBlueBac III)을 포함한다.
- [0371] 바람직한 구체예에서, 벡터, 예를 들면, Pcmv-스크립트 벡터 (Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터

(Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터 (Promega, Madison, Wisc.)는 CHO 세포에서 대상 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드를 생산하도록 설계될 것이다. 명백한 바와 같이, 주체 유전자 작제물은 예로서, 정제를 위한 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생산하기 위해, 배양액에서 증식된 세포에서 주체 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 발현을 유발하는데 이용될 수 있다.

[0372] 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드들에 대한 코딩 서열이 포함된 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 또한 관계한다. 상기 숙주 세포는 임의의 원핵 세포 또는 진핵 세포일 것이다. 예를 들면, 본 명세서의 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드는 박테리아 세포, 이를 테면 *대장균*, 곤충 세포 (가령, 벡로로바이러스 발현 시스템을 이용), 효모, 또는 포유류 세포 [가령, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포계]에서 발현될 수 있다. 숙련된 기술자들에게는 다른 적합한 숙주 세포들이 또한 알려져 있다.

[0373] 따라서, 본 명세서는 주체 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드를 생산하는 방법과 더욱 관련된다. 가령, ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 발현이 발생하도록 허용하는 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 분리되고, 이 폴리펩티드를 함유하는 세포와 배지 혼합물로부터 분리될 수 있다. 대안으로, ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드는 수득된 그리고 용해된 세포로부터 획득된 세포질 또는 막 분획으로부터 분리될 수 있다. 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에 공지되어 있다. 해당 폴리펩티드들은 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동, ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체를 이용한 면역침착력 정제, 그리고 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 물질을 이용한 친화력 정제 (가령, 단백질 A 컬럼을 이용하여 ALK4-Fc 및/또는 ActRII-Fc 융합 단백질을 정제할 수 있다)를 포함하는 단백질을 정제하는데 공지된 기술을 이용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 이 둘 모두로부터 분리될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다.

[0374] 일부 구체예들에 있어서, 예를 들면, 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다. ALK4-Fc 및/또는 ActRII-Fc 융합 단백질, 뿐만 아니라 이의 이형체 복합체는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정하였을 때, >90%, >95%, >96%, >98%, 또는 >99%의 순도이고, SDS PAGE에 의해 측정하였을 때 >90%, >95%, >96%, >98%, 또는 >99%의 순도를 가질 수 있다. 목표 수준의 순도는 포유류 시스템, 특히 비-인간 영장류, 설치류(마우스), 및 인간에 바람직한 결과를 얻는데 충분한 정도이어야 한다.

[0375] 다른 구체예에서, 재조합 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드의 원하는 부분의 N 말단에서 정제 리더 서열, 예를 들면, 폴리-(His)/엔테로키나아제 개열 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni^{2+} 금속 수지를 이용한 친화력 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 허용할 수 있다. 이후, 정제 리더 서열은 정제된 ALK4 및/또는 ActRII 폴리펩티드 및 이의 이형체 복합체를 제공하기 위해, 엔테로키나아제로 처리에 의해 차후 제거될 수 있다 [Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; 및 Janknecht et al. (1991) *PNAS USA* 88:8972].

[0376] 융합 유전자 제조 기술은 널리 공지되어 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩티드 서열들을 코딩하는 다양한 DNA 절편의 결합은 결합용 블런트-단부 또는 스테거-단부 말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 소화, 적절한 점성 단부의 충전, 원치않는 결합을 피하기 위한 알칼리 포스파타아제 처리, 및 효소적 결합을 이용하는 종래의 기법들에 따라 수행된다. 또다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화된 DNA 합성기가 포함된 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 유전자 단편들의 PCR 증폭은 2개의 연속 유전자 단편 간에 상보적 오버행(overhangs)을 만드는 앵커 프라이머를 이용하여 실행되고, 후속적으로 어닐링시켜 키메라 유전자 서열을 만들 수 있다. *예컨대*, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel 외., John Wiley & Sons: 2009를 참조하라.

[0377] 4. 항체 ActRII 길항제들

[0378] 특정 양상들에서, 본 출원은 항체인 ActRII 길항제 (억제제), 또는 항체들의 조합에 관한 것이다. ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합할 수 있다. 특히, 본 출원은 ActRII 길항제 항체, 또는 ActRII 길항제 항체들의 조합을, 단독으로 또는 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성

제제와 조합하여 사용하여, 필요로 하는 개체에서 원하는 효과 (예컨대, 필요로 하는 개체에서 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)를 구현하는 방법을 제공한다. 바람직한 특정 구체예들에서, ActRII 길항제 항체는 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 사용될 수 있다.

[0379]

바람직한 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 ActRII 수용체 (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB)를 억제하는 항체이다. 그러므로 일부 구체예들에서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 ActRIIA 및 ActRIIB (ActRII A/B 항체)에 결합한다. 일부 대안적 구체예들에서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은, 최소한 ActRIIA에 결합하지만, ActRIIB에는 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는다 (예컨대, 1×10^{-7} M 보다 큰 K_D 를 가진 ActRIIB에 결합하거나 비교적 보통의 결합, 예컨대, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M의 결합을 가진다). 다른 대안적 구체예들에서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은, 최소한 ActRIIB에 결합하지만, ActRIIA에는 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는다 (예컨대, 1×10^{-7} M 보다 큰 K_D 를 가진 ActRIIA에 결합하거나 비교적 보통의 결합, 예컨대, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M의 결합을 가진다). 본 명세서에서 사용되는, ActRII 항체 (항-ActRII 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 ActRII (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB)에 결합하는 항체를 말하며, 이 항체는 ActRII를 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-ActRII 단백질에 ActRII 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, ActRII에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-ActRII (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 항체는 상이한 종의 ActRII에서 보존된 ActRII의 에피토프에 결합한다. 바람직한 특정 구체예들에서, 항-ActRII 항체는 인간 ActRII (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB)에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-ActRII 항체는 하나 이상의 리간드들 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]이 ActRII (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB)에 결합하는 것을 억제할 수 있다. ActRIIA는 ActRIIB와 서열 상동성을 가지고, 따라서 일부 경우에 ActRIIA에 결합하는 항체는 또한 ActRIIB에 결합하고 및/또는 이를 억제할 수 있으며, 그 역 또한 가능하다. 일부 구체예들에서, 항-ActRII 항체는 ActRII (예컨대, ActRIIA 및/또는 ActRIIB) 및 하나 이상의 리간드 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 항-ActRII 항체는 ActRIIA 및 ActRIIB에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체들의 조합, 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체의 면역 반응 증가 및 암 치료)에 관한 것이며, 이 때 항체들의 조합은 최소한 항-ActRIIA 항체 및 최소한 항-ActRIIB 항체를 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체들의 조합, 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체의 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)에 관한 것이며, 이 때 항체들의 조합은 항-ActRIIA 항체 및, 예를 들면, 하나 이상의 리간드 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체들의 조합, 및 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체의 면역 반응 증가 및 암 치료)에 관한 것이며, 이 때 항체들의 조합은 항-ActRIIA 항체, 항-ActRIIB 항체 및, 예를 들면, 하나 이상의 리간드 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4에 결합하는 최소한 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0380]

바람직한 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 GDF11을 억제하는 항체이다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 GDF11에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, GDF11 항체 (또는 항-GDF11 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 GDF11에 결합하는 항체로, 이 항체는 GDF11을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF11 단백질에 항-GDF11 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, GDF11에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-GDF11 항체는 상이한 종의 GDF11 중에서 보존되는 GDF11의 에피토프에 결합한다. 바람직한 특정 구

체예들에서, 항-GDF11 항체는 인간 GDF11에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-GDF11 항체는 GDF11이 I 형 및/또는 II 형 수용체 (가령, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 이들 수용체들을 통해 GDF11-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. GDF11은 GDF8과 높은 서열 상동성을 가지고, 따라서 일부 경우에 GDF11에 결합하는 항체는 또한 GDF8에 결합하거나 및/또는 GDF8을 억제할 수 있음을 유념하여야 한다. 일부 구체예들에서, 항-GDF11 항체는 하나 이상의 추가 리간드들 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하거나 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체의 조합, 뿐만 아니라 이의 용도에 관한 것이며, 이 때 항체의 조합은 항-GDF11 항체, 및, 예를 들면, 상이한 리간드들 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하는 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0381] 바람직한 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 GDF8을 억제하는 항체이다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 GDF8에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, GDF8 항체 (또는 항-GDF8 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 GDF8에 결합하는 항체로, 이 항체는 GDF8을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF8 단백질에 항-GDF8 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, GDF8에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-GDF8 항체는 상이한 종의 GDF8 중에서 보존되는 GDF8의 에피토프에 결합한다. 바람직한 특정 구체예들에서, 항-GDF8 항체는 인간 GDF8에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-GDF8 항체는 GDF8이 I 형 및/또는 II 형 수용체 (가령, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 이들 수용체들을 통해 GDF8-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. GDF8은 GDF11과 높은 서열 상동성을 가지고, 따라서 일부 경우에 GDF8에 결합하는 항체는 또한 GDF11에 결합하거나 및/또는 GDF11을 억제할 수 있음을 유념하여야 한다. 일부 구체예들에서, 항-GDF8 항체는 하나 이상의 추가 리간드들 [예컨대, GDF11, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하거나 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체의 조합, 뿐만 아니라 이의 용도에 관한 것이며, 이 때 항체의 조합은 항-GDF11 항체, 및, 예를 들면, 상이한 리간드들 [예컨대, GDF11, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하는 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0382] 특정 측면들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC)을 저해하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 액티빈에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 액티빈 항체 (또는 항-액티빈 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 액티빈에 결합하는 항체로, 이 항체는 액티빈을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-액티빈 단백질에 항-액티빈 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, 액티빈에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-액티빈 항체는 상이한 종의 액티빈 중에서 보존되는 액티빈의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-액티빈 항체는 액티빈에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-액티빈 항체는 액티빈이 I 형 및/또는 II 형 수용체 (가령, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 이들 수용체들을 통해 액티빈-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 액티빈들은 서열 상동성을 공유하므로 하나의 액티빈 (예컨대, 액티빈 A)에 결합하는 항체는 하나 이상의 추가 액티빈 (예컨대, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AC)에 결합할 수 있음을 주목하여야 한다. 일부 구체예들에서, 항-액티빈 항체는 최소한 액티빈 A 및 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에서, 항-액티빈 항체는 하나 이상의 추가 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하거나 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체의 조합, 뿐만 아니라 이의 용도에 관한 것이며, 이 때 항체의 조합은 항-액티빈

항체, 및, 예를 들면, 상이한 리간드들 [예컨대, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하는 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0383] 바람직한 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 GDF3을 억제하는 항체이다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 GDF3에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, GDF3 항체 (또는 항-GDF3 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 GDF3에 결합하는 항체로, 이 항체는 GDF3을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF3 단백질에 항-GDF3 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, GDF3에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-GDF3 항체는 상이한 종의 GDF3 중에서 보존된 GDF3의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-GDF3 항체는 인간 GDF3에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-GDF3 항체는 GDF3이 I 형 및/또는 II 형 수용체 (가령, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 이들 수용체들을 통해 GDF3-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-GDF3 항체는 하나 이상의 추가 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하거나 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체의 조합, 뿐만 아니라 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체의 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)에 관한 것이며, 이 때 항체의 조합은 항-GDF3 항체, 및, 예를 들면, 상이한 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 결합하는 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0384] 바람직한 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 BMP6를 억제하는 항체이다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 BMP6에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, BMP6 항체 (또는 항-BMP6 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 BMP6에 결합하는 항체로, 이 항체는 BMP6을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP6 단백질에 대한 항-BMP6 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, BMP6에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP6 항체는 상이한 종의 BMP6 중에서 보존되는 BMP6의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-BMP6 항체는 인간 BMP6에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-BMP6 항체는 BMP6이 I 형 및/또는 II 형 수용체 (가령, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 이들 수용체들을 통해 BMP6-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-BMP6 항체는 하나 이상의 추가 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP10, 및 BMP9]에 결합하거나 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체의 조합, 뿐만 아니라 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체의 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)에 관한 것이며, 이 때 항체의 조합은 항-BMP6 항체, 및, 예를 들면, 상이한 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP10, 및 BMP9]에 결합하는 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0385] 바람직한 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 BMP9를 억제하는 항체이다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 BMP9에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, BMP9 항체 (또는 항-BMP9 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 BMP9에 결합하는 항체로, 이 항체는 BMP9를 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP9 단백질에 대한 항-BMP9 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, BMP9에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP9 항체는 상이한 종의 항-BMP9 중에서 보존된 항-BMP9의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-BMP9 항체는 인간 BMP9에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-BMP9 항체는 BMP9가 I 형 및/

또는 II 형 수용체 (가령, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 이들 수용체들을 통해 BMP9-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-BMP9 항체는 하나 이상의 추가 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP10, 및 BMP6]에 결합하거나 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체의 조합, 뿐만 아니라 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체의 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)에 관한 것이며, 이 때 항체의 조합은 항-BMP9 항체, 및, 예를 들면, 상이한 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP10, 및 BMP6]에 결합하는 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0386] 바람직한 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 BMP10을 억제하는 항체이다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 BMP10에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, BMP10 항체 (또는 항-BMP10 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 BMP10에 결합하는 항체로, 이 항체는 BMP10을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP10 단백질에 대한 항-BMP10 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, BMP10에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-BMP10 항체는 상이한 종의 BMP10 중에서 보존되는 BMP10의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-BMP10 항체는 인간 BMP10에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-BMP10 항체는 BMP10이 I 형 및/또는 II 형 수용체 (가령, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 이들 수용체들을 통해 BMP10-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-BMP10 항체는 하나 이상의 추가 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, 및 BMP9]에 결합하거나 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체의 조합, 뿐만 아니라 이의 용도 (예컨대, 필요로 하는 개체의 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)에 관한 것이며, 이 때 항체의 조합은 항-BMP10 항체, 및, 예를 들면, 상이한 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, 및 BMP9]에 결합하는 및/또는 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0387] 다른 특정 양상들에서, 본 출원의 ActRII 길항제 항체, 또는 항체들의 조합은 최소한 ALK4를 억제하는 항체이다. 따라서, 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 ALK4에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, ALK4 항체 (또는 항-ALK4 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 ALK4에 결합하는 항체로, 이 항체는 ALK4를 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-ALK4 단백질에 ALK4 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, ALK4에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, ALK4항체는 상이한 종의 ALK4에서 보존된 ALK4의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-ALK4 항체는 인간 ALK4에 결합한다. 다른 바람직한 구체예들에서, 항-ALK4 항체는 하나 이상의 TGF- β 리간드들 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]이 ALK4에 결합하는 것을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-ALK4 항체는 ALK4 및 하나 이상의 TGF- β 리간드 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ActRII (ActRIIA 및/또는 ActRIIB)에 결합하는 다중특이적 항체 (예컨대, 이중 특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 항체의 조합, 뿐만 아니라 이의 용도에 관한 것이며, 이 때 항체의 조합은 항-ALK4 항체, 및, 예를 들면, 하나 이상의 리간드들 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ActRII (ActRIIA 및/또는 ActRIIB)에 결합하는 하나 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0388] 용어 항체는 본 명세서에서 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체 (가령, 이중특이적 항체), 그리고 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나, 이에 국한되지 않은 다양한 항체 구조를 포괄하는 광범위한 의미로 이용된다. 항체 단편은 손상되지 않은(intact) 항체가 결합하는 항원에 결합하는 손상되지 않은 항체의 부분을 포함하는 손상되지 않은 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편들의 예로는 Fv, Fab, Fab',

Fab'-SH, F(ab')₂; 다이아바디(diabodies); 선형 항체; 단쇄 항체 분자들 (예로써 scFv); 그리고 항체 분절들로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. *예컨대*, Hudson 외. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; Plückthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; 그리고 미국 특허 제 5,571,894; 5,587,458; 및 5,869,046 참조. 본 명세서에서 공개된 항체는 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체는 거기에 부착되어, 탐지가능하게 만드는 라벨을 포함할 수 있다 (예를 들어, 라벨은 방사성 동위 원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조 인자 일 수 있다). 바람직한 구체예들에서, 본 발명의 항체는 단리된 항체다.

[0389] 다이아바디는 이가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 가진 항체 분절들이다. *예컨대*, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 그리고 Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 참조. 트라이아바디(Triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies) 또한 Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134에서 설명된다.

[0390] 단일 도메인 항체는 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부, 또는 항체의 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구체예들에 있어서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체다. *예컨대*, 미국 특허 제 6,248,516 참조.

[0391] 항체 단편은 다양한 기술에 의해 제조될 수 있으며, 이에는 손상되지 않은 항체의 단백질을 절단뿐만 아니라, 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 제조할 숙주 세포(가령, 대장균(*E. coli*) 또는 파아지)에 의한 생산된 항체를 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0392] 본 발명의 항체는 임의의 클래스일 수 있다. 항체의 클래스는 그 중쇄가 갖는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체에는 5 가지 주요 클래스가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들중 몇몇은 하위클래스(아이소형), 예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 추가 세분될 수 있다. 면역 글로불린의 상이한 클래스에 해당하는 중쇄 불변 도메인은 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤(mu)라고 불린다.

[0393] 일반적으로, 본원에 개시된 방법에서 사용하기 위한 항체는 바람직하게는 높은 결합 친화력으로 그 표적 항원에 결합한다. 친화력은 K_D 값으로 표현될 수 있으며, 고유 결합 친화력을 반영한다 (*예컨대*, 최소화된 항체결합력 (avidity) 효과). 전형적으로, 결합 친화력은 시험 관내에서 무(free)-세포 또는 세포와 관련된 환경에서 측정된다. 예를 들면, 표면 플라즈몬 공명 (Biacore™ 분석법), 방사능라벨된 항원-결합 분석 (RIA), 및 ELISA를 포함하여, 본원에 개시된 분석법을 비롯한 해당 분야에 공지된 다수의 임의의 분석법을 사용하여 결합 친화력을 측정할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체는 최소한 K_D 값이 1x 10⁻⁷ 또는 더 강하게, 1x10⁻⁸ 또는 더 강하게, 1x10⁻⁹ 또는 더 강하게, 1x10⁻¹⁰ 또는 더 강하게, 1x10⁻¹¹ 또는 더 강하게, 1x10⁻¹² 또는 더 강하게, 1x10⁻¹³ 또는 더 강하게, 또는 1x10⁻¹⁴ 또는 더 강하게 이들의 표적 항원 (*예컨대*, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, and BMP9]에 결합한다.

[0394] 특정 구체예들에 있어서, K_D는 하기 분석에 기재된 바와 같이, 관심있는 항체의 Fab 버전 및 그의 표적 항원으로 수행된 RIA에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화력은 라벨되지 않은 항원의 적정 시리즈의 존재하에 방사성 라벨된 항원 (예 : ¹²⁵I-라벨된)의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 다음, 결합된 항원을 항-Fab 항체 -코팅된 플레이트로 채집시킴으로써 측정된다 [*가령*, Chen et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881]. 상기 분석의 조건을 확립하기 위하여, 다중-웰 플레이트 (*예컨대*, MICROTITER[®], Thermo Scientific)는 채집용 항-Fab 항체 (*예컨대*, Cappel Labs)로 피복하고(*예컨대*, 하룻밤동안), 후속적으로 바람직하게는 실온 (*예컨대*, 대략 23°C)에서 소 혈청 알부민으로 차단한다. 비-흡착성 플레이트에서 방사능라벨된 항원은 일련의 관심 대상 Fab 희석물과 혼합된다 [*가령*, Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599에서의 항-VEGF 항체, Fab-12의 측정과 일관됨]. 관심 있는 Fab를 바람직하게는 밤새 배양하지만, 배양은 평형에 도달하도록 더 긴 기간 (예를 들어, 약 65 시간) 동안 계속 될 수 있다. 그 후, 혼합물을 바람직하게는 실온에서 약 1 시간 동안 배양을 위해 채집 플레이트로 이동시킨다. 상기 용액은 제거되고, 플레이트는 바람직하게는 폴리소르베이트 20 및 PBS 혼합물로 수차례 세척된다. 상기 플레이트가 건조되면, 섬광제(scintillant) (*가령*, MICROSCINT[®], Packard)가 추가되고, 이 플레이트는 감마 카운터 (*가령*, TOPCOUNT[®], Packard)상에서 카운트된다.

- [0395] 또다른 구체예에 따르면, K_D 는 예를 들면, Biacore[®] 2000 또는 Biacore[®] 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, N.J.)을 이용하여, 고정된 항원 CM5 칩, 약 10 반응 단위 (RU)에서 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 측정된다. 간략하게 설명하자면, 카르복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, Biacore, Inc.)은 공급업자에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-하이드록시숙시니미드 (NHS)로 활성화시킨다. 예를 들면, 항원은 결합된 단백질의 대략 10 반응 단위(RU)를 얻기 위하여 분당 5 μ l의 유속으로 주사하기 전, 10 mM 아세테이트 나트륨, pH 4.8으로 5 μ g/ml (약 0.2 μ M)로 희석시킬 수 있다. 항원 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 비-반응 그룹을 차단한다. 역동학 측정을 위하여, 0.05% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20[®]) 계면활성제 (PBST)와 함께 Fab의 2-배 일련의 희석물 (0.78 nM 에서 500 nM)은 PBS에서 분당 대략 25 μ l의 유속으로 주사된다. 연합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})는 연합 및 해리 센소그램의 동시 피팅에 의해, 예를 들면, 단순한 일대일(one-to-one) Langmuir 결합 모델 (Biacore[®] Evaluation Software version 3.2)을 이용하여 산출된다. 평형 해리 상수 (K_D)는 k_{off}/k_{on} 비율로 계산된다[가령, Chen *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]. 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 연합 속도가 예를 들면, $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 를 초과한다면, 분광계, 이를 테면 스탑-플로우(stop-flow) 구비된 분광광도계 (Aviv Instruments) 또는 교반 큐비트가 있는 8000-시리즈 SLM-AMINCO[®] 분광광도계(ThermoSpectronic)에서 측정될 때, 항원의 농도를 증가시키면서 PBS 안에 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 형광 방출 강도(가령, 여기=295 nm; 방출=340 nm, 16 nm 밴드-패스)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 -칭 기술에 의해 연합 속도(on-rate)는 측정될 수 있다.
- [0396] 인간 ActRIIB, ActRIIA, ALK4, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9의 핵산 및 아미노산 서열들은 해당 분야에 널리 공지이므로, 본 출원에 따라 사용하기 위한 항체 길항제는 본원에 제공된 기술 및 교시에 기초하여, 숙련된 기술자에 의해 통상적으로 제조될 수 있다.
- [0397] 특정 구체예들에서, 본원에서 제공되는 항체는 키메라 항체다. 키메라 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분은 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 특정 키메라 항체는 예를 들면, 미국 특허 제 4,816,567; 그리고 Morrison *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855에서 설명된다. 일부 구체예들에 있어서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (가령, 마우스, 랫, 햄스터, 토끼, 또는 비-인간 영장류, 이를 테면 원숭이로부터 유도된 가변 영역)과 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 키메라 항체는 클래스 또는 하위클래스가 모 항체의 클래스 또는 하위클래스에서 변경된 "클래스 전환(클래스 switched)"항체다. 일반적으로, 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0398] 특정 구체예들에 있어서, 키메라 본 발명의 항체는 인간화된 항체다. 인간화된 항체는 비-인간 초가변 영역(HVRs)의 아미노산 잔기와 인간 틀-구조 영역 (FRs)의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 말한다. 특정 구체예들에 있어서, 인간화된 항체는 실질적으로 최소한 하나의, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함하는데, 이때 HVRs (가령, CDRs)의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 비-인간 항체에 대응하며, FRs의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 인간 항체의 것에 대응한다. 인간화된 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유도된 항체 불변 영역의 최소한 일부를 포함할 수 있다. 항체의 "인간화된 형태", 가령, 비-인간 항체는 인간화를 거친 항체를 말한다.
- [0399] 인간화된 항체 및 이를 만드는 방법은 예를 들면, Almagro and Fransson (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633에서 검토되며, 그리고 예를 들면 Riechmann *et al.*, (1988) Nature 332:323-329; Queen *et al.* (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; U.S. Pat. Nos. 5,821,337; 7,527,791; 6,982,321; and 7,087,409; Kashmiri *et al.*, (2005) Methods 36:25-34 [describing SDR (a-CDR) grafting]; Padlan, Mol. Immunol. (1991) 28:489-498 (describing "resurfacing"); Dall'Acqua *et al.* (2005) Methods 36:43-60 (describing "FR shuffling"); Osbourn *et al.* (2005) Methods 36:61-68; and Klimka *et al.* Br. J. Cancer (2000) 83:252-260 (describing the "guided selection" approach to FR shuffling)에서 설명되고 있다.
- [0400] 인간화에 이용되는 인간 틀-구조 영역은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: "best-fit" 방법을 이용하여 선택된 틀-구조 영역 [가령, Sims *et al.* (1993) J. Immunol. 151:2296]; 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위집단의 인간 항체의 콘센수스 서열로부터 유도된 틀-구조 영역 [가령, Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; 그리고 Presta *et al.* (1993) J. Immunol., 151:2623]; 인간 성숙 (체세포적으로 성

숙된) 틀-구조 영역 또는 인간 생식계 틀-구조 영역 [가령, Almagro and Fransson (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633]; 그리고 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유도된 틀-구조 영역 [가령, Baca et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; 그리고 Rosok et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618].

[0401] 특정 구체예들에서, 본 명세서에서 제공된 항체는 인간 항체다. 인간 항체는 당분야에 공지된 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 van Dijk and van de Winkel (2001) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg (2008), *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459에서 기술된다.

[0402] 항원 시험감염(challenge)에 반응하여, 무손상 인간 항체 또는 인간 가변적 영역을 가진 무손상 항체를 만들기 위하여 변형된 유전자삽입 동물에 면역원[예컨대, ActRIIB, ActRIIA, ALK4, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]을 주사함으로써, 인간 항체를 만들 수 있다. 그러한 동물은 전형적으로 내인성 면역 글로불린 좌를 대체하거나, 또는 염색체 외적으로 존재하거나 무작위로 동물의 염색체에 통합된 인간 면역 글로불린 좌 전부 또는 일부를 포함한다. 이러한 이식 유전자를 가진 동물에서 내인성 면역 글로불린 유전자 좌는 일반적으로 불활성화되었다. 이식유전자를 가진 동물로부터 인간 항체를 얻는 방법은 예를 들면, Lonberg (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1117-1125; 미국 특허 제 6,075,181 및 6,150,584 (XENOMOUSE™ 기술 설명); 미국 특허 제 5,770,429 (HuMaB™ 기술 설명); 미국 특허 제 7,041,870 (K-M MOUSE™ 기술 설명); 그리고 U.S. 특허 출원 공개 No. 2007/0061900 (VelociMOUSE™ 기술 설명)을 참고한다. 그러한 동물에 의해 생성된 손상되지 않은 항체로부터 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 결합시킴으로써 추가로 변형 될 수 있다.

[0403] 인간 본 발명의 항체는 하이브리도마-기반 방법에 의해 또한 만들어질 수 있다. 인간 단클론 항체를 생산하기 위하여 인간 골수종 및 마우스-인간 이형골수종 세포주가 설명되었다 [가령, Kozbor J. *Immunol.*, (1984) 133: 3001; Brodeur et al. (1987) *단클론 Antibody 생성 Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York; 그리고 Boerner et al. (1991) *J. Immunol.*, 147: 86 참조]. 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통하여 만들어진 인간 항체는 Li et al., (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562에서 설명되고 있다. 추가 방법은 예를 들면, 미국 특허 제 7,189,826 (하이브리도마 세포주에서 단클론 인간 IgM 항체를 생산하는 것을 설명) 및 Ni, Xiandai Mianyixue (2006) 26(4):265-268 (2006) (인간-인간 하이브리도마를 설명)에서 설명된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술(Trioma technology)은 또한 Vollmers and Brandlein (2005) *Histol. Histopathol.*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers and Brandlein (2005) *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 27(3):185-91에서 설명된다.

[0404] 본 발명의 인간 항체는 인간-유래 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다. 이러한 가변-도메인 서열은 그 다음 원하는 인간 불변 도메인에 복합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하기 위한 기술이 본 명세서에 설명된다.

[0405] 예를 들면, 본 발명의 항체는 원하는 활성 또는 작용을 가진 항체에 대하여 복합 라이브러리 스크리닝에 의해 단리될 수 있다. 파아지 디스플레이 라이브러리를 만들고, 원하는 결합 특성을 가진 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 방법들은 예를 들면, Hoogenboom et al. (2001) in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J. and further described, for example, in the McCafferty et al. (1991) *Nature* 348:552-554; Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Marks and Bradbury (2003) in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310; Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093; Fellouse (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472; 그리고 Lee et al. (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132에서 검토된다.

[0406] 특정 파아지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레파토리는 중합효소 체 반응 (PCR)에 의해 별도로 클론되고, 그 다음 파아지 라이브러리에 무작위로 재복합되고, 그 다음 Winter et al. (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455에서 설명된 바와 같이, 항원-결합 파아지에 대하여 스크리닝될 수 있다. 파아지는 전형적으로 단쇄 Fv (scFv) 단편들 또는 Fab 단편들로서 디스플레이 항체 단편들을 나타낸다. 면역화된 원천으로부터 라이브러리는 하이브리도마 구축 없이도 면역원[예컨대, ActRIIB, ActRIIA, ALK4, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 대한 고-친화력 항체를 제공한다. 대안으로, 미감작(naive) 레파토리가 클론되어 (가령, 인간으로부터) Griffiths et al. (1993) *EMBO J.*, 12: 725-734에서 설명된 바와 같이 임의의 면역화없이 광범위의 비-자가 및 자가 항원에 대하여 지시된

항체의 단일 원천을 제공할 수 있다. 끝으로, 순수 라이브러리는 줄기 세포로부터 재배치되지 않은 V- 유전자 단편을 클로닝하고, 고도로 가변적인 CDR3 영역을 인코딩하고, 시험 관내에서 재배열을 수행하기 위하여 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용하여, 합성에 의해 만들어 질 수 있다(Hoogenboom and Winter (1992) J. Mol. Biol., 227: 381-388). 인간 항체 파아지 라이브러리를 설명하는 특허 공개문헌은 예를 들면: 미국 특허 제 5,750,373, 및 미국 특허 공개 번호. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360를 포함한다.

[0407] 특정 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체는 다중특이적 항체, 예를 들면, 이중특이적 항체다. 다중특이적 항체 (전형적으로 단클론 항체)는 하나 또는 그 이상의 (가령, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의) 항원에서 최소한 2 개의 상이한 에피토프 (가령, 2, 3, 4, 5, 또는 6 또는 그 이상의)에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0408] "옥토푸스(Octopus) 항체"를 포함하는, 3개 또는 그 이상 기능성 항원 결합 부위들을 가진 조작제작된 항체가 또한 본 명세서에 포함된다 (예로써 US 2006/0025576A1 참고).

[0409] 특정 구체예에서, 본 명세서에 개시된 항체들은 단클론 항체들이다. 단클론 항체는 실질적으로 동질성 항체 집단으로부터 획득된 항체를 말하는데, 가령, 개별 항체는 동일한 집단 및/또는 같은 에피토프에 결합하는 집단을 포함하는데, 다만, 변이체 항체, 가령, 자연 발생적 돌연변이 또는 단클론 항체 체제를 만드는 동안 발생하는 돌연변이를 가진 변이체 항체 가능성이 있으며, 이러한 변이체들은 일반적으로 소량으로 존재한다. 상이한 에피토프로 지향된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다클론 항체 체제와 대조적으로, 단클론 항체 체제의 각각의 단일 클론 항체는 항원상의 단일 항원 결정기를 지향한다. 따라서, 수식어 "단클론(monoclonal)"은 상기 항체의 특징은 실질적으로 동질성 집단의 항체로부터 획득되나, 이 항체 생산에 임의의 특정 방법이 요구되지 않는 것으로 간주되는 것을 나타낸다. 예를 들면, 본 방법에 따라 사용될 단클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파아지-디스플레이 방법 그리고 인간 면역 글로불린 좌의 전부 또는 일부를 함유하는 이식유전자를 가진 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 제조 될 수 있고, 이들 방법 및 다른 예시적인 방법이 본원에 기술되어 있다.

[0410] 예를 들면, GDF11로부터 유도된 면역원을 이용하여, 항-단백질/항-펩티드 항혈청 또는 단클론 항체를 표준 프로토콜에 의해 만들어질 수 있다 [가령, Antibodies: A Laboratory Manual (1998) ed. by Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Press]. 포유류, 이를 테면 마우스, 햄스터, 또는 토끼는 GDF11 폴리펩티드의 면역원 형태, 항체 반응을 유도할 수 있는 항원 단편, 또는 융합 단백질로 면역화될 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성을 부여하는 기술은 운반체에 대한 접합을 포함하고, 또는 당업계에 널리 공지 된 다른 기술을 포함한다. GDF11 폴리펩티드의 면역원 부분은 어췌든 존재하에 투여될 수 있다. 면역화 과정은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가 탐지에 의해 모니터링 될 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역분석은 항체 생산 수준 및/또는 결합 친화력 수준을 평가하기 위하여 항원으로 면역원을 이용한다.

[0411] GDF11 항원 체제로 동면을 면역화시킨 후, 항혈청이 수득되며, 원하는 경우, 혈청으로부터 다클론 항체가 분리될 수 있다. 단클론 항체를 생산하기 위하여, 항체 생성 세포 (림프구)를 면역화 동물로부터 수확하고, 골수종 세포와 같은 불멸화 세포와의 표준 체세포 융합 과정에 의해 융합시켜 하이브리도마 세포를 수득 할 수 있다. 이러한 기술은 당 업계에 잘 공지되어 있으며, 예를 들면, 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 하이브리도마 기술 [가령, Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-497], 인간 B 세포 하이브리도마 기술 [가령, Kozbar et al. (1983) Immunology Today, 4:72], 및 EBV-하이브리도마 기술[Cole et al. (1985) 단클론 Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96]을 포함한다. 하이브리도마 세포는 GDF11 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체 및 그러한 하이브리도마 세포를 포함하는 배양물로부터 분리된 항체의 생산을 위해 면역화학적으로 스크리닝 될 수 있다.

[0412] 특정 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형이 본 발명의 항체의 Fc 영역 안으로 도입되고, 이로 인하여 Fc 영역 변이체가 만들어질 수 있다. 상기 Fc-영역 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (가령, 치환, 결실, 및/또는 추가)이 포함된 인간 Fc-영역 서열 (가령, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0413] 예를 들면, 본원의 개시 내용은 전체 작동체 기능이 아닌 일부만을 보유하는 항체 변이체를 고려하는데, 이들 변이체는 항체의 반감기도 중요하지만, 특정 작동체 기능 [가령, 보체-의존적 세포독성 (CDC) 및 항체-의존적 세포성 세포독성 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석을 실행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들면, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석을 실행하여, 상기 항체는 FcγR 결합 (이로 인하여 ADCC 활성이 결여될 가능성이 있음)은 없지만, 여전히 FcRn 결합 능력은 유지하고 있다는 것을 확인할 수 있다.

ADCC를 매개하는 일차 세포, NK 세포는 오직 Fc γ RIII만을 발현시키고, 반면 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII를 발현시킨다. 조혈 세포에서 FcR 발현은 예를 들면, Ravetch and Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 분석하기 위한 시험관내 분석의 비-제한적인 예는 미국 특허 제 5,500,362; Hellstrom, I. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063; Hellstrom, I *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502; 미국 특허 제 5,821,337; Bruggemann, M. *et al.* (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361에서 설명된다. 대안으로, 비-방사능활성 분석 방법이 이용될 수 있다(가령, ACTITM, 유동 세포측정용 비-방사능활성 세포독성 분석; CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; 그리고 CytoTox 96^{TE} 비-방사능활성 세포독성 분석, Promega, Madison, Wis.). 이러한 분석을 위한 유용한 작동체 세포는 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 예를 들면, 동물 모델에서 생체내 평가될 수 있는데, 이를 테면 Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656에서 설명된다. 이 항체가 C1q에 결합 할 수 없으므로, CDC 활성이 결핍된다는 것을 확인하기 위하여 C1q 결합 분석이 또한 시행될 수 있다 [가령, C1q 및 C3c 결합 ELISA, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402]. 보체 활성화 평가를 위하여, CDC 분석이 실행될 수 있다[가령, Gazzano-Santoro *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 202:163; Cragg, M. S. *et al.* (2003) *Blood* 101:1045-1052; 그리고 Cragg, M. S. and M. J. Glennie (2004) *Blood* 103:2738-2743]. FcRn 결합 및 생체내 제거/반감기 측정은 당분야에 공지된 방법에 의해 또한 실행될 수 있다 [가령, Petkova, S. B. *et al.* (2006) *Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769].

[0414] 감소된 작동체 기능을 가진 본 발명의 항체는 하나 또는 그 이상의 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329에 치환을 갖는 것들을 포함한다 (미국 특허 제 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체가 포함된, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327중 2개 또는 그 이상이 치환된 Fc 돌연변이체를 포함한다 (미국 특허 제 7,332,581).

[0415] 특정 구체예들에 있어서, 항체의 하나 또는 그 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 대체된, 시스테인 조작된 항체, 가령, "thioMAbs"를 만드는 것이 바람직할 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 치환된 잔기는 항체의 접근 가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올기는 이 상체의 접근가능한 부위에 위치하게 되고, 다른 모이어티, 이를 테면 하기에서 설명되는 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 이 항체가 접합되어 면역접합체가 생성될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 임의의 하나 또는 그 이상의 다음 잔기는 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (Kabat 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 그리고 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는 예를 들면, 미국 특허 제 7,521,541에서 설명된 바와 같이 만들어질 수 있다.

[0416] 또한, 원하는 항체를 동정하기 위하여 항체를 스크리닝하는데 이용되는 기술은 수득되는 항체의 성질에 영향을 줄 수 있다. 예를 들면, 항체가 용액 내 항원을 결합시키는데 사용되는 경우, 용액 결합을 시험하는 것이 바람직할 수 있다. 특히 바람직한 항체를 확인하기 위해, 항체와 항원 사이의 상호 작용을 시험하기 위한 다양한 기술을 이용할 수 있다. 이러한 기술에는 ELISAs, 표면 플라즈몬 공명 결합 분석 (가령, BiacoreTM 결합 분석, Biacore AB, Uppsala, Sweden), 샌드위치 분석 (가령, 반자성 비드 시스템, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), 웨스턴 블랏, 면역침전 분석, 및 면역조직 화학이 포함된다.

[0417] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 제공되는 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체들도 고려된다. 예를 들면, 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 결합 친화력 및/또는 다른 생물학적 성질을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체들은 항체 및/또는 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변형을 도입시키거나, 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 변형은 예를 들면, 이 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 안에 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 만일 최종 작제물이 원하는 성질, 가령, 표적-결합 (ActRIIB, ActRIIA, ALK4, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및/또는 BMP9 결합)을 보유한다면, 최종 작제물에 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 만들어질 수 있다.

[0418] 예를 들면, 항체 친화력을 개선시키기 위하여 변경 (가령, 치환)은 HVRs에서 만들어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟 (hotspots)"에서, 가령, 체세포 성숙 과정 동안 고빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 인코딩되는 잔기에서 만들어질 수 있고[가령, Chowdhury (2008) *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)], 및/또는 SDRs (a-CDRs), 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화력에 대하여 테스트된다. 2 차 라이브러리로부터의 재구성 및

선택에 의한 친화력 성숙은 당업계에 기술되어 있다[가령, Hoogenboom 외., in Methods in Molecular Biology 178:1-37, O'Brien 외., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001) 참조]. 친화력 성숙의 일부 구체예들에 있어서, 다양성은 다양한 방법들 중 임의의 방법에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자들에 도입된다(가령, 오류-발생(error-prone) PCR, 섹서 플링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이생성). 그 후 제 2 라이브러리가 생성된다. 이어서, 이 라이브러리를 스크리닝하여, 원하는 친화력을 갖는 임의의 항체 변이체를 동정한다. 다양성을 도입하는 또다른 방법은 HVR-지시된 접근법을 포함하는데, 이때 몇개 HVR 잔기(가령, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기는 가령, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 특이적으로 동정될 수 있다. 특히 CDR-H3 및 CDR-L3이 대개 표적이 된다.

[0419] 특정 구체예들에 있어서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경으로 이 항체가 항원에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 HVRs에 발생될 수 있다. 예를 들면, 결합 친화력을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(가령, 본 명세서에서 제공된 보존적 치환)이 HVRs에 만들어 질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDRs 밖에 있을 수 있다. 상기에서 제시된 변이체 VH 및 VL의 특정 구체예들에 있어서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이상의 아미노산 치환을 함유한다.

[0420] 돌연변이유발의 표적이 될 수 있는 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 잔기 또는 영역을 동정하는데 유용한 방법은 Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085에서 설명된 바와 같이, "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라고 불린다. 이 방법에서, 표적 잔기 또는 표적 잔기들의 집단(예컨대, 하전된 잔기, 가령, arg, asp, his, lys, 및 glu)이 확인되고, 그리고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예로써, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어, 항원과 항체 또는 결합 폴리펩티드와의 상호작용이 영향을 받았는지를 판단한다. 추가 치환이 상기 아미노산 위치에 도입되어, 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 입증할 수 있다. 대안으로, 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 이용하여 항체와 항원 간의 접촉점들을 동정하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 접촉 잔기와 이웃 잔기는 치환의 후보로 표적화되거나, 또는 제거될 수 있다. 변이체들이 원하는 성질을 보유하는지를 판단하기 위하여 이 변이체들이 스크리닝될 수 있다.

[0421] 아미노산 서열 삽입은 한 개 잔기에서 수백 또는 그 이상의 잔기가 함유된 폴리펩티드 범위, 뿐만 아니라 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 이 항체 분자의 다른 삽입 변이체들은 이 항체의 N- 또는 C-말단을 효소(가령, ADEPT를 위한) 또는 이 항체의 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 융합시킨 것을 포함한다.

[0422] 특정 구체예들에 있어서, 본원에서 제공된 항체 및/또는 결합 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있고, 쉽게 이용가능한 추가의 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 유도체화에 적합한 부분은 수용성 중합체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 수용성 중합체의 예로는 다음을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥소레인, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동중중합체 또는 무작위 공중합체), 그리고 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 동중중합체, 프로일프로필렌 산화물/에틸렌 산화물 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올(가령, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 이의 혼합물. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인하여 제조에 있어 장점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비-분지형일 수 있다. 항체 및/또는 결합 폴리펩티드에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 하나 이상의 중합체가 부착되는 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 항체 유도체 및/또는 결합 폴리펩티드 유도체가 정의된 조건하에서 치료에 사용될 것인지 여부에 관계없이, 개선되는 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 특정 특성 또는 기능을 포함하는, 고려사항에 근거하여 결정될 수 있다.

[0423] 본 출원에 개시된 임의의 ActRII 길항제 항체는 원하는 효과를 구현하기 위하여 하나 이상의 추가 ActRII 길항제들과 조합될 수 있다. 예를 들면, ActRII 길항제 항체는 i) 하나 이상의 추가 ActRII 길항제 항체, ii) 하나 이상의 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형이량체; iii) 하나 이상의 소분자 ActRII 길항제들; iv) 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 ActRII 길항제들; v) 하나 이상의 폴리스타틴 폴리펩티드; 및/또는 vi) 하나 이상의 FLRG 폴리펩티드와 조합하여 사용될 수 있다.

[0424] 5. 소분자 길항제들

[0425] 다른 양상들에서, 본 출원은 소분자인 ActRII 길항제(억제제), 또는 소분자들의 조합에 관한 것이다. ActRII

길항제 소분자는, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9], 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4), 또는 하나 이상의 ActRII 하류 신호전달 성분 (예컨대, Smads 2 및/또는 3)에 결합할 수 있다. 특히, 본 출원은 ActRII 길항제 소분자, 또는 ActRII 길항제 소분자들의 조합을, 단독으로 또는 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성 제제와 조합하여 사용하여, 필요로 하는 개체에서 원하는 효과 (예컨대, 필요로 하는 개체에서 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)를 구현하는 방법을 제공한다. 바람직한 특정 구체예들에서, ActRII 길항제 소분자는 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 사용될 수 있다.

[0426]

일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 ActRIIA 및 ActRIIB를 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, ActRIIA 및 ActRIIB를 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 ActRIIA를 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, ActRIIA를 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 ActRIIB를 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, ActRIIB를 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 GDF11을 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, GDF11을 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9], ActRIIA, ActRIIB, 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 GDF8을 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, GDF8을 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9], ActRIIA, ActRIIB, 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는 최소한 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 및 액티빈 AE)을 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 액티빈을 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9], ActRIIA, ActRIIB, 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 GDF3을 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, GDF3을 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), BMP6, BMP10, 및 BMP9], ActRIIA, ActRIIB, 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 BMP6를 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, BMP6를 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP10, 및 BMP9], ActRIIA, ActRIIB, 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 BMP10을 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, BMP10을 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, 및 BMP9], ActRIIA, ActRIIB, 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 BMP9를 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, BMP9를 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, 및 BMP10], ActRIIA, ActRIIB, 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 ALK4를 억제하는 소분자 길항제 또는 소분자 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, ALK4를 억제하는 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10,

및/또는 BMP9], ActRIIA, 및/또는 ActRIIB를 추가로 억제한다.

[0427] 소분자 ActRII 길항제는 직접 또는 간접 억제제일 수 있다. 예를 들면, 간접 소분자 ActRII 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 최소한 하나 이상의 리간드들 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9], 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체들 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4) 또는 하나 이상의 ActRII 하류 신호전달 성분들 (예컨대, Smads 2 및/또는 2)의 발현 (예컨대, 전사, 번역, 세포 분비 또는 이의 조합)을 억제할 수 있다. 대안적으로, 직접 소분자 ActRII 길항제, 또는 소분자 길항제들의 조합은, 예를 들면, 하나 이상의 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9], 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4), 또는 하나 이상의 ActRII 하류 신호전달 성분 (예컨대, Smads 2 및/또는 3) 중 하나 이상에 직접적으로 결합할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법에 따라 하나 또는 그 이상의 간접 그리고 하나 또는 그 이상의 직접 소분자 ActRII 길항제의 조합이 사용될 수 있다.

[0428] 본 명세서의 유기 소분자 길항제의 결합은 공지의 방법을 이용하여 동정 및 화학적으로 합성될 수 있다 (가령, PCT 공개 특허 출원 제 WO 00/00823 및 WO 00/39585 참조). 일반적으로, 본 명세서의 소분자 길항제는 보통 약 2000 달톤 크기, 대안으로 약 1500, 750, 500, 250 또는 200 달톤 미만의 크기이며, 이때 이러한 유기 소분자는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 폴리펩티드 [예컨대, ALK4, ActRIIB, ActRIIA, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9]에 바람직하게 특이적으로 결합할 수 있다. 이들 소분자 길항제는 잘 알려진 기술을 사용하여 과도한 실험없이 확인 될 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 결합할 수 있는 분자에 대한 유기 소분자 라이브러리를 스크리닝하는 기술은 당업계에 잘 공지되어 있다(가령, 국제 특허 공개 번호. W000/00823 및 W000/39585).

[0429] 본 명세서의 결합 유기 소분자는 예를 들면, 알데히드, 케톤, 옥심, 하이드라존, 세미카르바존, 카르바지드, 1 차 아민, 2 차 아민, 3 차 아민, N-치환된 하이드라진, 하이드라지드, 알코올, 에테르, 티올, 티오에테르, 이황화, 카르복실산, 에스테르, 아마이드, 우레아, 카르바메이트, 카르보네이트, 케탈, 티오케탈, 아세탈, 티오아세탈, 아릴 할로겐화물, 아릴 설포네이트, 알킬 할로겐화물, 알킬 설포네이트, 방향족 화합물, 헤테로시클릭 화합물, 아닐린, 알켄, 알킨, 디올, 아미노 알코올, 옥사졸리딘, 옥사졸린, 티아졸리딘, 티아졸린, 에나민, 술폰아미드, 에폭사이드, 아지리딘, 이소시아네이트, 설포닐 클로라이드, 디아조 화합물 및 산 클로라이드를 포함한다.

[0430] 본 출원에 개시된 임의의 소분자 ActRII 길항제들은 원하는 효과를 구현하기 위하여 하나 이상의 추가 ActRII 길항제들과 조합될 수 있고, 선택적으로 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 추가로 조합될 수 있다.. 예를 들면, 소분자 ActRII 길항제는 i) 하나 이상의 추가 ActRII 길항제 소분자, ii) 하나 이상의 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형이량체; iii) 하나 이상의 항체 ActRII 길항제들; iv) 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 ActRII 길항제들; v) 하나 이상의 폴리스타틴 폴리펩티드; 및/또는 vi) 하나 이상의 FLRG 폴리펩티드와 조합하여 사용될 수 있다.

[0431] 6. 뉴클레오티드 ActRII 길항제들

[0432] 다른 양상들에서, 본 출원은 폴리뉴클레오티드인 ActRII 길항제 (억제제), 또는 폴리뉴클레오티드들의 조합에 관한 것이다. ActRII 길항제 폴리뉴클레오티드는, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9], 하나 이상의 I 형 및/또는 II 형 수용체 (예컨대, ActRIIA, ActRIIB, 및 ALK4), 또는 하나 이상의 ActRII 하류 신호전달 성분 (예컨대, Smads 2 및/또는 3)에 결합할 수 있다. 특히, 본 출원은 ActRII 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 ActRII 길항제 폴리뉴클레오티드들의 조합을, 단독으로 또는 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성 제제와 조합하여 사용하여, 필요로 하는 개체에서 원하는 효과 (예컨대, 필요로 하는 개체에서 면역 반응 증가 및 암 또는 병원체 치료)를 구현하는 방법을 제공한다. 바람직한 특정 구체예들에서, ActRII 길항제 폴리뉴클레오티드는 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 사용될 수 있다.

[0433] 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 ActRIIA 및 ActRIIB를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, ActRIIA 및 ActRIIB를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10,

및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 ActRIIA를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, ActRIIA를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 ActRIIB를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, ActRIIB를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 GDF11을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, GDF11을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 GDF8을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, GDF8을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는 최소한 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 및 액티빈 AE)을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, 액티빈을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9], ActRIIA, ActRIIB, 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 폴리뉴클레오티드는 최소한 GDF3을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, GDF3을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), BMP6, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 BMP6을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, BMP6을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP10, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 BMP10을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, BMP10을 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, 및 BMP9] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 BMP9를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, BMP9를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, 및 BMP10] 및/또는 ALK4를 추가로 억제한다. 일부 구체예들에 있어서, ActRII 길항제는 최소한 ALK4를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합이다. 일부 구체예들에서, ALK4를 억제하는 폴리뉴클레오티드 길항제, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제들의 조합은, 하나 이상의 ActRII-연관 리간드 [예컨대, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC), GDF3, BMP6, BMP10, 및/또는 BMP9], ActRIIA, 및/또는 ActRIIB를 추가로 억제한다.

[0434] 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제는 안티센스 핵산, RNAi 분자 [가령, 작은 간섭 RNA (siRNA), 작은-헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로RNA (miRNA)], 압타머 및/또는 리보자임일 수 있다. 인간 ALK4, ActRIIA, ActRIIB, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9 의 핵산 및 아미노산 서열들은 해당 분야에 널리 공지이므로, 본 출원의 방법들에 따라 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드 길항제는 본원에 제공된 기술 및 교시에 기초하여, 숙련된 기술자에 의해 통상적으로 제조될 수 있다.

[0435] 예를 들면, 안티센스 기술은 안티센스 DNA 또는 RNA를 통해 또는 삼중 나선 형성을 통해 유전자 발현을 조절하는 데 사용될 수 있다. 안티센스 기술은 예를 들면, Okano (1991) J. Neurochem. 56:560;

Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)에서 논의된다. 삼중-나선 형성은 예를 들면, Cooney *et al.* (1988) Science 241:456; 그리고 Dervan *et al.*, (1991) Science 251:1300에서 논의된다. 상기 방법은 상보적 DNA 또는 RNA에 대한 폴리뉴클레오티드의 결합에 기초한다. 일부 구체예들에 있어서, 안티센스 핵산은 본원에 개시된 유전자의 RNA 전사체의 적어도 일부에 상보적인 단일 가닥 RNA 또는 DNA 서열을 포함한다. 그러나, 절대적인 상보성이 바람직하지만, 반드시 요구되지는 않는다.

[0436] 본원에서 언급된 "RNA의 적어도 일부에 상보적인" 서열은 RNA와 혼성화되어 안정한 이중나선을 형성할 수 있는 충분한 상보성을 갖는 서열을 의미하고; 본원에 개시된 유전자의 이중 가닥 센스 핵산의 경우, 상기 이중 가닥 DNA의 단일 가닥을 시험할 수 있거나, 삼중체 형성을 검정할 수 있다. 혼성화하는 능력은 상보성의 정도 및 안티센스 핵산의 길이 모두에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 혼성화되는 핵산이 많을수록 RNA와의 염기 미스매치가 더 많이 포함될 수 있으며, 여전히 안정한 이중나선 (또는 경우에 따라 삼중나선)을 형성할 수 있다. 숙련된 기술자는 혼성화된 복합체의 용점을 결정하기 위하여 표준 절차에 따라 허용가능한 정도의 불일치를 확인할 수 있다.

[0437] 메시지의 5' 말단, 예를 들어 AUG 개시 코돈까지의 5'-비-번역되는 서열과 상보적인 폴리뉴클레오티드는 번역을 억제하는데 가장 유효성적으로 작용해야 한다. 그러나, mRNA의 3'-비-번역 서열에 상보적인 서열은 mRNA의 번역 억제에도 효과적임이 밝혀졌다 [가령, Wagner, R., (1994) Nature 372:333-335]. 따라서, 본 발명의 유전자의 5'- 또는 3'- 비-번역된 비-코딩 영역 중 어느 하나에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 내인성 mRNA의 번역을 억제하기 위한 안티센스 접근법에서 사용될 수 있다. mRNA의 5'-비-번역 영역에 상보적인 폴리뉴클레오티드는 AUG 개시 코돈의 상보체를 포함해야 한다. mRNA 코딩 영역에 상보적인 안티센스 폴리뉴클레오티드는 번역에 다소 효과가 적은 억제제이지만, 본 명세서의 방법에 이용될 수 있다. 본 명세서의 mRNA의 5'-비번역, 3'-비번역 또는 코딩 영역들에 혼성화되도록 기획된다면, 안티센스 핵산은 길이가 최소한 6개 뉴클레오티드이어야 하고, 바람직하게는 올리고뉴클레오티드의 길이는 6 내지 약 50개 뉴클레오티드가 된다. 특정 측면에서 상기 올리고뉴클레오티드는 최소한 10개 뉴클레오티드, 최소한 17개 뉴클레오티드, 최소한 25 개뉴클레오티드 또는 최소한 50개 뉴클레오티드이다.

[0438] 한 구체예에서, 본 명세서의 안티센스 핵산은 외인성 서열로부터 전사에 의해 세포 안에서 생성된다. 예를 들면, 벡터 또는 이의 일부분이 전사되어, 본 명세서의 유전자의 안티센스 핵산 (RNA)이 만들어진다. 이러한 벡터는 원하는 안티센스 핵산을 인코딩하는 서열을 함유할 것이다. 이러한 벡터는 목적하는 안티센스 RNA를 생산하도록 전사될 수 있는 한, 에피솜 (episomal)으로 남아있거나 또는 염색체에 통합될 수 있다. 이러한 벡터는 당업계의 표준 재조합 DNA 기술 방법에 의해 삭제될 수 있다. 벡터는 플라스미드, 바이러스성, 또는 척추동물 세포에서 복제 및 발현에 이용되는 당분야에 공지된 다른 것들이 될 수 있다. 본 명세서의 바람직한 유전자를 인코딩하는 서열 또는 이의 단편은 척추동물, 바람직하게는 인간 세포에서 작용하는 것으로 당분야에 알려진 임의의 프로모터에 의해 발현될 수 있다. 이러한 프로모터는 유도성 또는 항시성 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 SV40 초기 프로모터 영역 [가령, Benoist and Chambon (1981) Nature 290:304-310], Rous 육종 바이러스의 3' 긴-말단 반복부에 포함된 프로모터 [가령, Yamamoto *et al.* (1980) 세포 22:787-797], 허피스 티미딘 프로모터 [가령, Wagner *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445], 그리고 메탈로티오닌 유전자의 조절 서열 [가령, Brinster, *et al.* (1982) Nature 296:39-42]을 포함한다.

[0439] 일부 구체예들에서, 폴리뉴클레오티드 길항제는 하나 이상의 유전자들의 발현을 표적하는 간섭 RNA 또는 RNAi 분자들이다. RNAi는 표적화된 mRNA의 발현을 방해하는 RNA의 발현을 의미한다. 구체적으로, RNAi는 siRNA(작은 간섭 RNA)를 통해 특정 mRNA와 상호작용하여 표적 유전자를 침묵시킨다. 그런 다음 ds RNA 복합체는 이 세포에 의한 분해의 표적이 된다. siRNA 분자는 길이가 10 내지 50개 뉴클레오티드의 이중-가닥으로 된 RNA 듀플렉스로, 충분히 상보적인(가령, 이 유전자에 최소 80% 동일성) 표적 유전자의 발현을 간섭한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 siRNA 분자는 이 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 최소한 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0440] 추가 RNAi 분자는 짧은-헤어핀 RNA (shRNA)을 포함하며; 또한 짧은-간섭 헤어핀 및 마이크로RNA (miRNA)을 포함한다. 상기 shRNA 분자는 루프에 의해 연결된 표적 유전자의 센스 및 안티센스 서열을 함유한다. 상기 shRNA는 핵으로부터 세포질로 운반되며, mRNA와 함께 분해된다. Pol III 또는 U6 프로모터는 RNAi를 위한 RNAs 발현에 이용될 수 있다. Paddison *et al.* [Genes & Dev. (2002) 16:948-958, 2002]는 RNAi에 영향을 주는 수단으로 헤어핀으로 접힌 작은 RNA 분자를 사용했다. 따라서, 이러한 짧은-헤어핀 RNA (shRNA) 분자는 본 명세서에서 기술된 방법에 또한 유익하게 이용된다. 기능적 shRNA의 스템과 루프의 길이는 다양하며; 스템 길이는 약 25 내지

약 30nt 범위일 수 있고, 루프 크기는 침묵 활성화에 영향을 미치지 않고, 4 내지 약 25nt 범위일 수 있다. 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 이들 shRNA는 DICER RNase의 이중 가닥으로 된 RNA (dsRNA)와 유사하며, 특정 유전자 발현 억제에 동일한 능력을 갖는다. 상기 shRNA는 렌티바이러스성 벡터로부터 발현될 수 있다. miRNA는 길이가 약 10 내지 70개 뉴클레오타이드의 단일 가닥으로 된 RNA이며, "스텝 루프 (stem-loop)" 구조를 특징으로 하는 pre-miRNA로 먼저 전사되고, 후속적으로 RISC를 통해 추가 처리후 성숙 miRNA로 처리된다.

[0441] siRNA를 비롯한 (그러나 이에 제한되지 않음), RNAi를 매개하는 분자는 화학적 합성 (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002), dsRNA의 가수분해 (Yang 외., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), T7 RNA 중합효소와 시험관내 전사 (Donzeet 외., 핵산 Res 30:e46, 2002; Yu 외., Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002), 그리고 뉴클레아제, 이를 테면 대장균(e. coli) RNase III를 이용하여 이중-가닥으로 된 RNA의 가수분해 (Yang 외., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002)에 의해 시험관 안에서 만들어질 수 있다.

[0442] 또다른 양상에 따르면, 본 명세서에 decoy DNA, 이중-가닥으로 된 DNA, 단일-가닥으로 된 DNA, 복합체화된 DNA, 채집화된(encapsulated) DNA, 바이러스성 DNA, 플라스미드 DNA, 네이키드(naked) RNA, 채집화된 RNA, 바이러스성 RNA, 이중-가닥으로 된 RNA, RNA 간섭을 만들 수 있는 분자, 또는 이의 조합을 포함하는 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 폴리뉴클레오타이드 길항제를 제공한다.

[0443] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 폴리뉴클레오타이드 길항제는 압타머(aptamers)이다. 압타머는 이중-가닥으로 된 DNA와 단일-가닥으로 된 RNA 분자를 포함하는 핵산 분자로서, 표적 분자, 가령, ALK4, ActRIIB, ActRIIA, GDF11, GDF8, 액티빈 (예컨대, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP9 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여, 4차 구조를 형성한다. 압타머의 일반적 그리고 치료 용도는 당분야에 잘 확립되어 있다. 예컨대, 미국 특허 제 5,475,096호 참조. 압타머에 대한 추가 정보는 U.S. 특허 출원 공개 번호 20060148748에서 찾아볼 수 있다. 핵산 압타머는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 지수적 농축 (SELEX) 프로세스에 의한 리간드의 체계적 진화 (Systemigen Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 과정을 통해 선택된다. SELEX는 가령, U.S. Pat. Nos. 5,475,096; 5,580,737; 5,567,588; 5,707,796; 5,763,177; 6,011,577; 그리고 6,699,843에서 설명된 바와 같이, 표적 분자에 매우 특이적 결합을 하는 핵산 분자의 시험관내 진화를 위한 방법이다. 압타머를 동정하기 위한 또다른 스크리닝 방법은 미국 특허 제 5,270,163에 설명되어 있다. SELEX 과정은 다양한 2-차원 및 3-차원 구조를 형성하기 위한 핵산의 능력 뿐만 아니라, 실제 모든 화합물과 함께 리간드 (특정 결합 짝을 형성)로 작용하는 뉴클레오타이드 단량체 내에서 이용 가능한 화학적 다양성을 기반으로 하는데, 이들 단량체 또는 중합체는 다른 핵산 분자 및 폴리펩티드를 포함할 수도 있고, 포함하지 않을 수도 있다. 임의의 크기 또는 조성의 분자가 표적으로 작용할 수 있다. SELEX 방법은 원하는 결합 친화도 및 선택성을 달성하기 위해, 동일한 일반적 선택 도식과 동일한 방법을 사용하여 후보 올리고 뉴클레오타이드의 혼합물로부터 선택 그리고 결합, 분할 및 증폭의 단계적 반복을 포함한다. 무작위화된 서열의 분절을 포함할 수 있는 핵산 혼합물로부터 시작하여, 상기 SELEX 방법은 결합에 우호적인 조건하에 표적에 상기 혼합물을 접촉시키는 단계; 표적 분자에 특이적으로 결합된 핵산으로부터 결합안된 핵산을 분할시키는 단계; 핵산-표적 복합체를 해리시키는 단계; 핵산-표적 복합체로부터 해리된 핵산을 증폭시켜, 핵산의 리간드 농축된 혼합물을 생산하는 단계를 포함한다. 상기 결합, 분할, 해리 및 증폭 단계들은 표적 분자에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 핵산 리간드를 만들기 위하여 필요한 수의 주기로 반복된다.

[0444] 전형적으로, 이러한 결합 분자는 동물에 별도 투여되지만 [가령, O'Connor (1991) J. Neurochem. 56:560], 그러나 이러한 결합 분자는 숙주 세포가 취한 폴리뉴클레오타이드로부터 발현될 수 있고, 생체내에서 발현될 수 있다 [가령, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)].

[0445] 본 출원에 개시된 임의의 폴리뉴클레오타이드 ActRII 길항제들은 원하는 효과를 구현하기 위하여 하나 이상의 추가 ActRII 길항제들과 조합될 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 ActRII 길항제는 i) 하나 이상의 추가 ActRII 길항제 폴리뉴클레오타이드, ii) 하나 이상의 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형이량체; iii) 하나 이상의 항체 ActRII 길항제들; iv) 하나 이상의 소분자 ActRII 길항제들; v) 하나 이상의 폴리스타틴 폴리펩티드; 및/또는 vi) 하나 이상의 FLRG 폴리펩티드와 조합하여 사용될 수 있다.

[0446] 7. 폴리스타틴 및 FLRG 길항제들

[0447] 다른 양상들에서, 본 출원에 개시된 방법들에 따라 사용하기 위한 ActRII 길항제 (억제제)는 폴리스타틴 또는 FLRG 폴리펩티드이며, 이들은 단독으로 사용되거나, 또는 원하는 효과 (예컨대, 필요로 하는 개체의 면역 반응

증가 및 암 또는 병원체의 치료)를 얻기 위하여 본 명세서에서 개시된 바와 같이 하나 또는 그 이상의 추가 보조 치료제 및/또는 활성 물질과 함께 이용될 수 있다. 바람직한 특정 구체예들에서, 폴리스타틴 또는 FLRG 폴리펩티드는 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 사용될 수 있다.

[0448] 용어 "폴리스타틴 폴리펩티드"는 임의의 자연 발생적 폴리스타틴 폴리펩티드, 뿐만 아니라 유용한 활성을 유지하는 임의의 이의 변이체들 (돌연변이체, 단편, 융합 및 펩티드모방체 형태 포함)를 포함하는 폴리펩티드이며, 임의의 기능성 폴리스타틴 단량체 또는 다량체를 더 포함한다. 특히 바람직한 구체예들에서, 본 출원의 폴리스타틴 폴리펩티드는 액티빈, 특히 액티빈 A에 결합하거나 및/또는 이의 활성을 억제한다. 액티빈 결합 성질을 유지하는 폴리스타틴 폴리펩티드 변이체들은 폴리스타틴 및 액티빈 상호작용과 관련된 기존 연구에 근거하여 동정될 수 있다. 예를 들면, W02008/030367은 액티빈 결합에 중요한 것으로 보이는 특이적 폴리스타틴 도메인 ("FSDs")을 공개한다. 하기 서열 번호: 46-48에 나타난 바와 같이, 폴리스타틴 N-말단 도메인 ("FSND" 서열 번호:46), FSD2 (서열 번호: 48), 그리고 다소 약한 FSD1 (서열 번호: 47)은 액티빈 결합에 중요한 폴리스타틴 안에 있는 예시적인 도메인을 나타낸다. 또한, 폴리펩티드 라이브러리를 만들고 테스트하는 방법은 ActRII 폴리펩티드 관련 내용에서 설명되며, 이러한 방법들 또한 폴리스타틴의 변이체를 만들고, 테스트하는 방법에 속한다. 폴리스타틴 폴리펩티드는 폴리스타틴 폴리펩티드의 서열에 최소한 약 80% 동일한, 그리고 임의선택적으로 최소한 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 임의 공지의 폴리스타틴 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다. 폴리스타틴 폴리펩티드의 예로는 예를 들면, W02005/025601에서 설명된 인간 폴리스타틴 전구체 폴리펩티드 (서열 번호: 44)의 성숙 폴리스타틴 폴리펩티드 또는 더 짧은 아이소형 또는 다른 변이체들을 포함한다.

[0449] 인간 폴리스타틴 전구체 폴리펩티드 아이소형 FST344는 다음과 같다:

[0450] 1 mvrarhqpgg lcllllllcq fmedrsaag ncwlrqakng rcqvlyktel

[0451] 51 skeecstgr lstwteedv ndntlfkwmi fnggapncip cketcenvdc

[0452] 101 gpgkkcrmnk knkprvcap dcsnitwkgp vcglgktyr necallkarc

[0453] 151 keqpelevqy qgrckktrcd vfcpgsstcv vqtnnaycv tcnricpepa

[0454] 201 sseqylcgnd gvyssachl rkaccllgrs iglayegkci kakscediqc

[0455] 251 tggkkclwdf kvgrgrcslc delcpdsksd epvcasdnat yasecamkea

[0456] 301 acssgvlllev khsgscnsis edteeeede dqdysfpiss ilew

[0457] (서열 번호: 44; NCBI 참조 번호 NP_037541.1)

[0458] 상기 신호 펩티드는 밑줄로 표시되며; 또한 상기 밑줄은 하기에 나타난 더 짧은 폴리스타틴 아이소형으로부터 이 폴리스타틴 아이소형을 구별시키는 C-말단 연장을 나타내는 마지막 27개 잔기다.

[0459] 인간 폴리스타틴 전구체 폴리펩티드 아이소형 FST317은 다음과 같다:

[0460] 1 MVRARHQPGG LCLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRAKNG RCQVLYKTEL

[0461] 51 SKEECCSTGR LSTWTEEDV NDNTLFKWMF FNGGAPNCIP CKETCENVDC

[0462] 101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKG P VGLDGKTYR NECALLKARC

[0463] 151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VQTNNAYCV TCNRCPEPA

[0464] 201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC

[0465] 251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA

[0466] 301 ACSSGVLLEV KHSGSCN (서열 번호: 45; NCBI 참조 번호 NP_006341.1)

[0467] 상기 신호 펩티드는 밑줄로 표시된다.

[0468] 폴리스타틴 N-말단 도메인 (FSND) 서열은 다음과 같다:

[0469] gncwlrqakngrcqvlyktelskeecstgrlstwteedvndntlfkwimifnggapncipck (서열 번호: 46; FSND)

[0470] FSD1 및 FSD2 서열은 다음과 같다:

- [0471] etcenvdcgpgkkcrmnknkprcv (서열 번호: 47; FSD1)
- [0472] ktcrdvfcpgsstcvvdqtnnaycv (서열 번호: 48; FSD2)
- [0473] 다른 양상들에 있어서, 본 명세서에 개시된 방법들에 따라 사용하기 위한 ActRII 길항제는 폴리스테틴-유사 관련 유전자(FLRG)이며, 이는 또한 폴리스테틴-관련된 단백질 3 (FSTL3)로도 알려져 있다. 용어 "FLRG 폴리펩티드"는 임의의 자연 발생적 FLRG 폴리펩티드, 뿐만 아니라 유용한 활성을 유지하는 임의의 이의 변이체들 (돌연 변이체, 단편, 융합 및 펩티드모방체 형태 포함)를 포함하는 폴리펩티드이다. 바람직한 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 FLRG 폴리펩티드는 액티빈, 특히 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 저해한다. 액티빈 결합 성질을 유지하는 FLRG 폴리펩티드 변이체들은 FLRG 및 액티빈 상호작용을 분석하는데 이용되는 통상적인 방법(가령, US 6,537,966)을 이용하여 동정될 수 있다. 또한, 폴리펩티드 라이브러리를 만들고 테스트하는 방법은 ActRII 폴리펩티드 관련 내용에서 설명되며, 이러한 방법들 또한 폴리스테틴의 변이체를 만들고, 테스트하는 방법에 속한다. FLRG 폴리펩티드는 FLRG 폴리펩티드의 서열에 최소한 약 80% 동일한, 그리고 임의선택적으로 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 임의 공지의 FLRG 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0474] 인간 FLRG 전구체 (폴리스테틴-관련된 단백질 3 전구체) 폴리펩티드는 다음과 같다:
- [0475] 1 mrpgagpgplw plpwgalawa vgfvsmsgsg npapggvcwl qqgqeatcsl
- [0476] 51 vlqtdvtrae ccasgnidta wsnlthpgnk inllglflglv hclpckdsed
- [0477] 101 gvecpgpkac rmlggrprce capdcsglpa rlqvcgsdga tyrdecelra
- [0478] 151 arcrgpdlis vmrgrcrks cehvvcprpq scvvdqtgsa hcvvcraapc
- [0479] 201 pvpsspgqel cgnnnvtyis schmrqatcf lgrsigvrha gscagtpeep
- [0480] 251 pggesaeeee nf (서열 번호: 49; NCBI 참조 번호 NP_005851.1)
- [0481] 상기 신호 펩티드는 밑줄로 표시된다.
- [0482] 특정 구체예들에 있어서, 폴리스테틴 폴리펩티드와 FLRG 폴리펩티드의 기능성 변이체 또는 변형된 형태는 폴리스테틴 폴리펩티드의 최소한 일부분 또는 FLRG 폴리펩티드와 하나 또는 그 이상의 융합 도메인, 이를 테면, 예를 들면, 폴리펩티드의 단리, 탐지, 안정화 또는 다량체화를 용이하게 하는 도메인을 갖는 융합 단백질을 포함한다. 적합한 융합 도메인은 ActRII 폴리펩티드와 관련하여 상기에서 상세하게 논의된다. 일부 구체예에서, 본 명세서의 길항제 물질은 Fc 도메인에 융합된 폴리스테틴 폴리펩티드의 액티빈-결합 부분이 포함된 융합 단백질이다. 또다른 구체예에서, 본 명세서의 길항제 물질은 Fc 도메인에 융합된 FLRG 폴리펩티드의 액티빈-결합 부분이 포함된 융합 단백질이다.
- [0483] 본 출원에 개시된 임의의 폴리스타틴 폴리펩티드는 원하는 효과를 구현하기 위하여 본 출원의 하나 이상의 추가 ActRII 길항제들과 조합될 수 있다. 예를 들면, 폴리스테틴 폴리펩티드는 i) 하나 이상의 추가 폴리스테틴 폴리펩티드, ii) 하나 이상의 ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체; iii) 하나 이상의 ActRII 길항제 항체들; iv) 하나 이상의 소분자 ActRII 길항제; v) 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 ActRII 길항제; 및/또는 vi) 하나 이상의 FLRG 폴리펩티드와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0484] 유사하게, 본 출원에 개시된 임의의 FLRG 폴리펩티드는 원하는 효과를 구현하기 위하여 본 출원의 하나 이상의 추가 ActRII 길항제들과 조합될 수 있으며, 선택적으로 면역요법제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 추가로 조합될 수 있다. 예를 들면, FLRG 폴리펩티드는 i) 하나 이상의 추가 FLRG 폴리펩티드, ii) 하나 이상의 ActRII 폴리펩티드 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체; iii) 하나 이상의 ActRII 길항제 항체들; iv) 하나 이상의 소분자 ActRII 길항제; v) 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 ActRII 길항제; 및/또는 vi) 하나 이상의 폴리스타틴 폴리펩티드와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0485] **8. 스크리닝 분석**
- [0486] 특정 양상들에서, 본 출원은 ActRII 길항제인 화합물 (제제들)을 동정하기 위한 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체의 사용에 관한 것이다. 이 스크리닝을 통하여 확인된 화합물은 암 및/또는 종양 성장을 조절하는 능력을 평가하기 위해, *생체내* 또는 *시험관내* 암 및/또는 종양 성장을 조절하는 능력을 평가하기 위해 테스트 될 수 있다. 이러한 화합물들은, 예를 들면, 동물 모델에서 테

스트될 수 있다.

[0487] TGFβ 슈퍼패밀리 리간드 신호전달 (가령, SMAD 신호전달)을 표적으로 함으로써, 조직 성장을 조절하는 치료 물질을 스크리닝하는 다수의 접근법이 있다. 특정 구체예들에 있어서, 선택된 세포주에서 TGFβ 슈퍼 패밀리 수용체-매개된 효과를 교란시키는 물질을 동정하기 위해 화합물의 고유효성 스크리닝이 수행될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 이 분석은 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체 및/또는 ALK4: ActRIIB이형 다량체가 이의 결합 파트너, 이를 테면 TGFβ 슈퍼패밀리 리간드 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 AC, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty)에 결합을 특이적으로 억제 또는 감소시키는 화합물을 스크리닝 및 동정하기 위하여 실행된다. 대안으로, 상기 분석은 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형 다량체가 이의 결합 파트너 이를 테면, TGFβ 슈퍼 패밀리 리간드에 대한 결합을 향상시키는 화합물을 동정하는데 사용될 수 있다. 추가 구체예에서, 상기 화합물은 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형 다량체와 상호 작용하는 능력에 의해 동정될 수 있다.

[0488] 다양한 분석 포맷이 충분할 것이며, 본원 명세서에 비추어, 본 명세서에 명백하게 기술되지 않은 것들은 그럼에도 불구하고 숙련된 기술자에 의해 이해될 것이다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 본 발명의 테스트 화합물 (물질)은 임의의 조합적 화학 방법에 의해 생성 될 수 있다. 대안으로, 본 화합물은 생체내 또는 시험관내에서 합성된 자연 발생 생체 분자일 수 있다. 조직 성장의 조절자로서 작용하는 능력에 대하여 테스트되는 화합물 (물질)은 예를 들어, 박테리아, 효모, 식물 또는 다른 유기체 (예 : 천연 생성물)에 의해 생성될 수 있고, 화학적으로 만들어질 수 있거나 (예 펩티도모방체를 포함하는 소분자), 또는 재조합 적으로 생산 될 수 있다. 본 발명에 의해 고려되는 테스트 화합물은 비-펩티드 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티이드 모방체, 당, 호르몬 및 핵산 분자를 포함한다. 특정 구체예들에 있어서, 상기 테스트 물질은 분자량이 약 2,000 달톤 미만인 작은 유기 분자이다.

[0489] 본 명세서의 테스트 화합물은 단일의 별개 엔터티로 제공되거나, 또는 조합 화학에 의해 만들어진, 더 큰 복합체 라이브러리로 제공될 수 있다. 이들 라이브러리는 예를 들어, 알코올, 알킬 할로젠화물, 아민, 아미드, 에스테르, 알데히드, 에테르 및 다른 클래스의 유기 화합물을 포함 할 수 있다. 테스트 화합물을 테스트 시스템에 제시하는 것은 분리된 형태 또는 화합물의 혼합물로서, 특히 초기 스크리닝 단계에서 제시할 수 있다. 임의 선택적으로, 상기 화합물은 임의로 다른 화합물로 유도체화 될 수 있고, 이 화합물의 단리를 용이하게 하는 유도체화 기를 가질 수 있다. 유도체화기의 비-제한적인 예는 바이오틴, 플루오레세인, 디옥시게닌, 녹색 형광 단백질, 동위 원소, 폴리히스티딘, 자성 비드, 글루타티온 S-전이효소(GST), 광활성 가교제 또는 이들의 임의 조합물을 포함한다.

[0490] 화합물 및 천연 추출물의 라이브러리를 테스트하는 많은 약물-스크리닝 프로그램에서, 주어진 시간 동안 조사되는 화합물의 수를 최소화하기 위해서는 고-처리량 분석이 바람직하다. 정제되거나 반-정제된 단백질로 유도될 수 있는 것과 같이, 세포가 없는 시스템에서 수행되는 분석은 테스트 화합물에 의해 중재되는 분자 표적의 신속한 개발 및 변경의 상대적으로 용이한 탐지를 가능하게 하기 위해 생성 될 수 있다는 점에서 종종 "1 차" 스크린으로 선호된다. 더욱이, 테스트 화합물의 세포 독성 또는 생물이용성의 효과는 시험관 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있지만, 대신 이 분석은 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형 다량체와 이의 결합 파트너 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty) 간의 결합 친화력의 변경으로 현시될 수 있는, 분자 표적 상에 약물의 효과에 주로 집중한다.

[0491] 단지 설명하기 위해, 본 발명의 예시적인 스크리닝 분석에서, 목적 화합물은 분석 의도에 적합하다면, TGFβ 슈퍼패밀리 리간드에 통상적으로 결합 할 수 있는, 분리 및 정제된 ALK4: ActRIIB이형 다량체에 접촉시킨다. 그 다음 상기 화합물과 ALK4: ActRIIB이형 다량체 혼합물에 적절한 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty)가 함유된 조성물을 추가한다. 이형 다량체-슈퍼패밀리 리간드 복합체의 탐지 및 정량화는

ALK4: ActRIIB이형다량체와 이의 결합 단백질 사이에 복합체 형성을 억제(또는 강화)하는데 있어서 이 화합물의 효과를 측정하는 수단을 제공한다. 화합물의 효능은 다양한 농도의 테스트 화합물을 사용하여 얻은 데이터로부터 용량-반응 곡선을 생성함으로써 평가할 수 있다. 더욱이, 대조 분석을 수행하여 비교를 위한 기준을 제공할 수도 있다. 예를 들면, 대조군 분석에서, 단리 및 정제된 TGF- β 수퍼패밀리 리간드가 ALK4: ActRIIB이형다량체를 함유하는 조성물에 첨가되고, 이형다량체-리간드 복합체의 형성은 테스트 화합물의 부재하에 정량화된다. 일반적으로, 반응물이 혼합되는 순서는 다양할 수 있고, 동시에 혼합될 수 있음을 이해할 것이다. 더욱이, 정제된 단백질 대신, 세포성 추출물과 용해물을 이용하여 적합한 무-세포 분석 시스템을 제공한다.

[0492] ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체가 또다른 단백질에 결합하는 것은 다양한 기술에 의해 탐지될 수 있다. 예를 들면, 복합체 형성의 조절은 예를 들면, 탐지가능하도록 라벨된 단백질 이를 테면 방사능라벨된 (가령, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C 또는 ^3H), 형광으로 라벨된 (가령, FITC), 또는 효소적으로 라벨된 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체 및/또는 이의 결합 단백질을 이용하거나, 면역분석에 의해, 또는 크로마토그래피 탐지에 의해 정량화될 수 있다.

[0493] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체와 이의 결합 단백질 간에 상호작용을 직접적으로, 또는 간접적으로 측정함에 있어서, 형광 편광 분석 및 형광 공명 에너지 전달 (FRET) 분석의 이용을 고려한다. 더욱이, 다른 방식의 탐지, 이를 테면 광학 도파관(waveguides) (PCT 공개 WO 96/26432 및 미국 특허 제 5,677,196), 표면 플라스몬 공명 (SPR), 표면 전하 센서, 및 표면력 센서등은 본 명세서의 많은 구체예에 양립가능하다.

[0494] 더욱이, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체와 이의 결합 짝 사이의 상호작용을 파괴 또는 강화시키는 물질들을 동정하기 위한 "2-하이드리드 분석"으로 알려진 상호작용 트랩 분석의 사용을 고려한다. 예컨대, 미국 특허 제 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) 세포 72:223-232; Madura *et al.* (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) Biotechniques 14:920-924; 및 Iwabuchi *et al.* (1993) Oncogene 8:1693-1696 참조. 특정 구체예에서, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체와 이의 결합 단백질 간의 상호작용을 해리시키는 화합물 (가령, 소분자 또는 펩티드)를 동정하기 위한 역 2-하이드리드 시스템의 사용을 고려한다 [Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; 및 U.S. 특허 5,525,490; 5,955,280; 그리고 5,965,368 참고].

[0495] 특정 구체예들에 있어서, 상기 대상 화합물은 본 명세서의 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체와 상호작용하는 능력에 의해 동정된다. 상기 화합물과 ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체 간의 상호작용은 공유 또는 비-공유적일 수 있다. 예를 들면, 광-가교, 방사능라벨된 리간드 결합, 및 친화력 크로마토그래피가 포함된 시험관내 생화학적 방법을 이용하여 단백질 수준에서 이러한 상호작용이 동정될 수 있다. [Jakoby WB *et al.* (1974) Methods in Enzymology 46:1]. 특정 경우에서, 상기 화합물은 메커니즘-기반의 분석, 가령, ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체에 결합하는 화합물을 탐지하는 분석에서 스크리닝될 수 있다. 이 분석은 고정-상 또는 유체-상 결합의 경우를 포함할 수 있다. 대안으로, ActRII 폴리펩티드, ALK4 폴리펩티드, ActRIIA/B 항체, 및/또는 ALK4: ActRIIB이형다량체를 인코딩하는 유전자는 리포터 시스템 (가령, β -갈락토시다제, 루시페라제, 또는 녹색 형광 단백질)과 함께 세포 안으로 형질감염되고, 라이브러리, 바람직하게는 고처리량 스크리닝 또는 이 라이브러리의 개별 구성요소들에 대하여 스크리닝될 수 있다. 다른 메커니즘-기반의 결합 분석이 이용될 수 있는데, 예를 들면, 자유 에너지의 변화를 탐지하는 결합 분석이 이용될 수 있다. 결합 분석은 웰, 비드 또는 칩에 고정된 표적으로 또는 고정된 항체에 의해 채집된 표적 또는 모세관 전기영동에 의해 해리되는 표적으로 실행될 수 있다. 상기 결합된 화합물은 발색 종점 또는 형광 또는 표면 플라스몬 공명을 이용하여 탐지될 수 있다.

[0496] 9. 예시적인 치료 용도

[0497] 본 출원에 기재된 바와 같이, 출원인들은 ActRII 길항제들 (억제제)이 단독으로, 또는 면역요법제와 함께, 예를 들면, 암 환자에서의 종양 부하 감소 그리고 생존 시간 증가를 비롯한, 암 치료에 있어서의 놀라운 긍정적인 효과들을 가짐을 발견하였다. 따라서, 본 출원은, 일부에서, 암을 치료하기 위하여 특히, 암의 하나 이상의 합병증들을 치료 또는 예방하기 위하여 (예컨대, 종양 부하 감소) ActRII 길항제들을, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제 (예컨대, 면역요법제)와 조합하여 사용하는 방법을 제공한다. 또한, 데이터는

ActRII 길항제 요법의 효능이 면역계에 의존적임을 나타낸다. 그러므로, 일부에서, 본 출원은 ActRII 길항제들이, 단독으로 또는 하나 이상의 추가 활성제와 조합하여 면역치료제, 특히, 널리 다양한 암 (예컨대, 면역억제 및/또는 면역 탈진과 연관된 암)을 치료하기 위하여 면역치료제로서 사용될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 다른 공지된 면역항암제와 같이, ActRII 길항제가 환자의 면역 반응을 증강시키는 능력은 암 분야 밖에서 보다 훨씬 넓은 치료 결과를 가질 수 있다. 예를 들면, 면역 증강제는 널리 다양한 감염 질환, 특히, 면역억제 및/또는 면역 탈진을 촉진하는 병원체 물질의 치료에 유용할 수 있음이 제시된 바 있다. 또한, 이러한 면역 증강제는 백신 (예컨대, 감염 질환 및 암 백신)의 면역화 효능을 증가시킴에 유용할 수 있다. 따라서, 본 출원은 필요로 하는 개체에서 면역 반응들을 증가시키기 위해, 감염성 질환을 치료하기 위해, 및/또는 예방접종/면역화 효능을 증가시키기 위해 단독으로 또는 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 사용될 수 있는 다양한 ActRII 길항제들을 제공한다.

[0498] 본 출원에 기재된 그리고 청구된 방법들 및 ActRII 길항제들은 악성 또는 전암성 병태를 치료하고 본 출원에 기재된 장애들을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 신생물 또는 악성 상태로의 진행을 방해하기 위하여 사용될 수 있다. 이러한 용도들은 상기 신생물 또는 암으로의 진행이 알려져있는 또는 의심되는 병태들, 특히, 과다형성, 화생, 또는 가장 특히, 이형성으로 이루어지는 비-신생물 세포 성장이 발생하였었던 병태들에서 명시된다.

[0499] 특정 양상들에서, ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체)는 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제 (예컨대, 면역 관문 억제제 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 필요로 하는 환자들의 암 또는 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 필요로 하는 환자들의 암 또는 종양 세포들의 성장을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 필요로 하는 환자들의 암 또는 종양의 전이를 억제 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 필요로 하는 환자들의 암 또는 종양 세포 부하를 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 필요로 하는 환자들의 암 또는 종양 세포들에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 필요로 하는 환자들의 항-암/종양 면역 반응들을 피하기 위하여 면역억제와 관련된 또는 면역억제를 이용하는 암 또는 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0500] 일부 구체예들에서, ActRII 길항제 (예컨대, ActRIIA/B 항체)는 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여, 필요로 하는 환자의 항-암/종양 T 세포 활성을 피하기 위하여 T 세포 탈진과 관련된 또는 T 세포 탈진을 이용하는 암 또는 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 필요로 하는 환자들의 항-암/종양 면역 반응을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 필요로 하는 환자들의 T 세포 활성을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여, 면역억제와 관련된 질환 또는 병태의 위험이 있는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여, 면역억제와 관련된 질환 또는 병태의 위험이 있는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여, 필요로 하는 개체에서 면역억제를 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여, T-세포 탈진과 관련된 질환 또는 병태의 위험이 있는 또는 T-세포 탈진 발달 위험이 있는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여, 필요로 하는 개체에서 T-세포 탈진을 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여, 필요로 하는 개체의 암 또는 세포 증식 질환 또는 장애를 예방, 치료 또는 그 증상을 완화시키기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여, 면역요법에 반응성인 암 또는 종양을 억제, 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여, 이를 필요로 하는 개체의 면역 감시를 증가시키기 위해 사용

될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제 및/또는 활성제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법과 조합하여, 이를 필요로 하는 개체의 암 또는 종양 세포들에 대한 면역성을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제 및/또는 활성제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법과 조합하여, 이를 필요로 하는 개체의 감염 질환에 대한 면역성을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법과 조합하여, 필요로 하는 개체의 표적 (예컨대, 암 세포 또는 감염 물질)에 대하여 수동 면역화를 능동 면역으로 전환하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나 이상의 추가 지지 요법과 조합하여, 필요로 하는 개체 (예컨대, 암 환자 또는 감염 질환을 가진 환자)의 내인성 면역 반응을 증강시키기 위해 사용될 수 있다. 특정 구체예들에서, 치료에 바람직한 개체는 면역 반응 증가가 필요한 환자이다.

[0501] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 장애 또는 병태를 "예방하는" 치료는 통계적 시료에서 처리안된 대조 시료와 비교하여 처리된 시료에서 장애 또는 병태의 발생이 감소되거나, 또는 처리안된 대조 시료와 비교하여 장애 또는 병태의 하나 또는 그 이상의 증상의 개시를 지연시키거나 또는 그 중증도를 감소시키는 화합물을 지칭한다.

[0502] 본 출원에서 사용되는 용어 "치료하는"은 특정 상태가 일단 확립되면 그 상태의 개선 또는 제거를 포함한다. 어느 경우이나, 예방 또는 치료는 의사 또는 다른 건강 관리 제공자에 의해 제공된 진단 및 치료제 투여의 의도된 결과로 동정 될 수 있다.

[0503] 일반적으로, 본 출원에 기재된 질환 또는 병태의 치료 또는 예방은 하나 이상의 ActRII 길항제들을, 선택적으로 하나 이상의 추가 활성제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 유효량으로 투여함에 의해 구현된다. 물질의 유효량이란 필요한 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 본 발명의 제제의 "치료적 유효량"은 질환 상태, 개체의 나이, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 약제의 능력에 따라 달라질 수 있다. 물질의 "예방차원의 유효량 (prophylactically effective amount)"이란 원하는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0504] 일반적으로, 종양은 양성 및 악성 암, 뿐만 아니라 휴면상태의 종양을 지칭한다. 일반적으로, 암은 일차 악성 세포 또는 종양 (예컨대, 본래의 악성 또는 종양 부위가 아닌 개체의 신체 내 부위들로 그 세포들이 이동하지 않은 세포 또는 종양) 및 이차 악성 세포 또는 종양 (예컨대, 본래의 종양 부위와 상이한 이차 부위들로의 악성 세포 또는 종양 세포의 이동인 전이를 발생시키는 악성 세포 또는 종양)을 지칭한다. 전이는 국소 또는 원위일 수 있다. 전이는 대부분 종종 특정 증상들의 모니터링 이외에도 자기 공명 영상 (MRI) 스캔, 컴퓨터 단층촬영 (CT) 스캔, 혈액 및 혈소판 계수, 간 기능 연구, 흉부 X-선, 뼈 스캔, 및 이의 조합을 단독으로 또는 조합하여 사용함을 통해 탐지된다.

[0505] 일반적으로, 면역 반응은 자극에 대한 면역계 세포, 가령, B 세포, T 세포 (CD4 또는 CD8), 조절 T 세포, 항원-제시 세포, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, NKT 세포, NK 세포, 호염기구, 호산구, 또는 호중구에 의한 반응을 지칭한다. 일부 구체예들에서, 반응은 특정 항원 ("항원-특이적 반응")에 대해 특이적이며, 항원-특이적 수용체를 통한 CD4 T 세포, CD8 T 세포, 또는 B 세포에 의한 반응을 지칭한다. 일부 구체예들에서, 면역 반응은 T 세포 반응, 가령, CD4+ 반응 또는 CD8+ 반응이다. 이들 세포들에 의한 이러한 반응들은, 예를 들면, 세포독성, 증식, 사이토카인 또는 케모카인 생성, 이동 (trafficking), 또는 대식작용을 포함할 수 있으며, 반응 중인 면역 세포의 성질에 따라 달라질 수 있다. 면역 반응은 병원체들로 감염된 침습성 병원체들, 세포들 또는 조직들, 암 또는 그 외 이상 세포들, 또는, 자가면역 또는 병리학적 염증의 경우, 정상 세포 또는 조직들의 선택적 표적화, 이에 대한 결핍, 손상, 파괴 및/또는 이의 신체로부터의 제거를 가져올 수 있다.

[0506] 숙주 면역 반응의 면역억제는 다양한 만성 면역 병태, 가령, 지속적인 감염 및 종양 면역억제에 있어 일정한 역할을 한다. 본 출원에서 사용되는 면역계에 대한 "무반응성" 또는 "기능적 탈진"은 일반적으로 자극, 가령, 활성화 수용체 또는 사이토카인을 통한 자극에 대해 면역 세포들의 무반응상태를 지칭한다. 무반응성은, 예를 들면, 면역억제제에 대한 노출, 높은 또는 끊임없는 용량의 항원에 대한 노출로 인해, 또는 억제제 수용체, 가령, PD-1 또는 TIM-3의 활성을 통해 발생할 수 있다. 본 출원에서 사용되는 용어 "무반응성"은 활성화 자극에 대한 무반응상태를 포함한다. 이러한 무반응상태는 일반적으로 항원-특이적이며 항원에 대한 노출이 중단된 후에도 지속된다. 무반응성 면역 세포들은 동일한 유형의 상응하는 대조 면역 세포에 비해 세포독성 활성화, 사이토카인 생성, 증식, 이동, 대식작용 활성화, 또는 이의 임의의 조합에 있어서 최소한 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 100%의 감소를 가질 수 있다.

- [0507] 일반적으로, 면역요법은 면역 반응을 유도, 향상, 억제 또는 그 외 다른 방식으로 변형시키는 것을 포함하는 방법에 의해 질환을 겪는, 또는 질환 재발에 걸릴 또는 겪을 위험이 있는 개체를 치료하는 것을 지칭한다.
- [0508] 일반적으로, 면역 반응을 증강시키는 것은 개체에 존재하는 면역 반응의 유효성 또는 효능을 활성화 또는 증가시키는 것을 지칭한다. 이러한 유효성 및 효능에 있어서의 활성화 또는 증가는, 예를 들면, 내인성 숙주 면역 반응을 억제하는 메커니즘을 극복함으로써 또는 내인성 숙주 면역 반응을 활성화/향상시키는 메커니즘을 자극함으로써 구현될 수 있다.
- [0509] 본 출원의 ActRII 길항제들은, 선택적으로 하나 이상의 추가 활성제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여, 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐, 난소, 자궁경부, 이자, 직장, 전립선, 위, 표피의 암; 림프구 또는 골수계의 조혈 종양; 중간엽 유래 종양, 가령, 섬유육종 또는 횡문근육종; 그 외 다른 종양 유형들, 가령, 흑색종, 기형암종, 신경모세포종, 신경교종, 선암종 및 비소 폐 세포 암종을 비롯한 (그러나 이에 제한되는 것은 아님) 다양한 형태의 암 치료에서 사용될 수 있다. 암의 예들에는, 암종, 림프종, 교모세포종, 흑색종, 육종, 및 백혈병, 골수종, 또는 림프구 악성종양이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 암의 보다 구체적인 예들이 하기 명시되며 다음이 포함된다: 편평세포 암 (예컨대, 상피 편평세포 암), 유잉 육종, 빌름스 종양, 별아교세포종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종을 비롯한 폐암, 복막암, 간세포 암, 위장관 암을 비롯한 위장 또는 위암, 이자암, 다형성 아교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 간암, 간세포 암종, 신경내분비 종양, 갑상선 수질 암, 갑상선 분화 암종, 유방암, 난소암, 결장 암, 직장암, 자궁내막암 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장 또는 콩팥 암, 전립선암, 음문암, 항문 암종, 음경 암종, 뿐만 아니라 두경부 암.
- [0510] 암 또는 악성종양의 다른 예들에는 다음이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다: 급성 소아기 림프모구 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 부신피질 암종, 성인 (일차) 간세포 암, 성인 (일차) 간암, 성인 급성 림프구 백혈병, 성인 급성 골수성 백혈병, 성인 호지킨's 림프종, 성인 림프구 백혈병, 성인 비-호지킨 림프종, 성인 일차 간암, 성인 연조직 육종, AIDS-관련 림프종, AIDS-관련 악성종양, 항문암, 별아교세포종, 담관 암, 뼈암, 뇌간 신경교종, 뇌종양, 유방암, 신우 및 요관암, 중추신경계 (일차) 림프종, 중추신경계 림프종, 소뇌 별아교세포종, 대뇌 별아교세포종, 자궁경부암, 소아기 (일차) 간세포 암, 소아기 (일수 모세포종자) 간암, 소아기 급성 림프모구 백혈병, 소아기 급성 골수성 백혈병, 소아기 뇌간 신경교종, 소아기 소뇌 별아교세포종, 소아기 대뇌 별아교세포종, 소아기 생식샘의 생식세포종, 소아기 호지킨 질환, 소아기 호지킨 림프종, 소아기 시상하부 및 시각 경로 신경교종, 소아기 림프모구 백혈병, 소아기 수모세포종, 소아기 비-호지킨 림프종, 소아기 송과체 및 천막위 원시 신경외배엽성 종양, 소아기 일차 간암, 소아기 횡문근육종, 소아기 연조직 육종, 소아기 시신경로 및 시상하부 신경교종, 만성 림프구 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 결장 암, 피부 T-세포 림프종, 내분비 이자 췌도 세포 암종, 자궁내막암, 뇌실막종, 상피 암, 식도암, 유잉 육종 및 관련 종양, 외분비 이자암, 두개강외 생식 세포 종양, 생식샘외 생식 세포 종양, 간의 담관 암, 눈 암, 여성 유방암, 고셔병, 담낭암, 위암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 종양, 생식 세포 종양, 임신성 용모성 종양, 털 세포 백혈병, 두경부암, 간세포 암, 호지킨 림프종, 고감마글로불린혈증, 하인두 암, 장 암, 안구내 흑색종, 췌도 세포 암종, 췌도 세포 이자암, 카포시 육종, 신장 암, 후두암, 순암 및 구강암, 간암, 폐암, 림프세포증식 장애, 고분자글로불린혈증, 남성 유방암, 악성 중피종, 악성 흉선종, 수모세포종, 흑색종, 중피종, 전이성 잠복 일차 편평 경부 암, 전이성 일차 편평 경부 암, 전이성 편평 경부 암, 다발 골수종, 다발 골수종/형질 세포 신생물, 골수형성이상 증후군, 골수성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수증식성 장애, 비강 및 부비동 암, 코인두 암, 신경모세포종, 비-호지킨 림프종, 비흑색종 피부암, 비-소세포 폐암, 잠복성 일차 전이성 편평 경부 암, 입인두 암, 뼈-/악성 섬유 육종, 뼈육종/악성 섬유 조직구종, 뼈육종/뼈의 악성 섬유 조직구종, 난소 상피 암, 난소 생식 세포 종양, 난소 저 악성 잠재성 종양, 이자암, 파라단백혈증, 부갑상샘암, 음경 암, 크롬친화세포종, 뇌하수체 종양, 일차 중추신경계 림프종, 일차 간암, 전립선암, 직장암, 신장 세포 암, 신우 및 요관 암, 망막모세포종, 횡문근육종, 침샘 암, 사르코이드증 육종, 세자리 증후군, 피부 암, 소세포 폐암, 소장 암, 연조직 육종, 편평 경부 암, 위 암, 천막위 원시 신경외배엽 및 송과체 종양, T-세포 림프종, 고환 암, 흉선종, 갑상선 암, 신우 및 요관의 이행상피세포 암, 이행세포 신우 및 요관 암, 용모성 종양, 요관 및 신우 세포 암, 요도 암, 자궁암, 자궁 육종, 질 암, 시신경로 및 시상하부 신경교종, 음문암, 발덴스트롬 고분자글로불린혈증, 빌름스' 종양, 및 상기 열거된 기관계에 위치한 신생물 이외의 임의의 다른 과다증식성 질환.
- [0511] 이형성은 빈번하게 암의 전조이며, 주로 상피에서 발견된다. 이는 비-신생물 세포 성장 중 가장 장애가 있는 형태이며, 개개 세포 균일성면에서 그리고 세포들의 구조적 배향면에서의 소실과 관련된다. 이형성은 만성 자극 또는 염증이 존재하는 경우 특징적으로 발생한다. 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 선택적으로 하나

이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 이형성 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이형성 장애에는, 무한성 외배엽 이형성, 전방안면 (anterofacial) 이형성, 질식성 흉곽 이형성, 심장사지 이형성, 기관지 폐 이형성, 대뇌 이형성, 자궁경부 이형성, 연골외배엽 이형성, 쇄골두개 이형성, 선천성 외배엽 이형성, 두개 골간 이형성, 머리손목발목 이형성, 두개골간단 이형성, 상아질 이형성, 골간 이형성, 외배엽 이형성, 법랑질 이형성, 뇌-눈 (encephalo-ophthalmic) 이형성, 부분적 사지골단 이형성, 다발성 골단 이형성증, 점상 골단 이형성증, 상피 이형성, 안면지생식기 이형성, 턱의 가족성 섬유 이형성, 가족성 백색 굴곡 이형성, 섬유근 이형성, 뼈의 섬유 이형성, 개화성 골 이형성, 유전성 콩팥-망막 이형성, 발한성 외배엽 이형성, 발한저하성 외배엽 이형성, 림프구감소성 흉선 이형성, 유방 이형성, 하악안면 이형성, 형이상학적 이형성, 몬디니 이형성, 단일골 섬유 이형성, 점막상피 이형성, 다발성 골단 이형성, 안이척추 이형성, 안치지 이형성, 안척추 이형성, 치원 이형성, 안구하악관골 이형성, 치근단 백악질 이형성, 다골성 섬유성 이형성, 가성연골발육부전 척추골단 이형성, 망막 이형성, 중격-시신경 이형성, 척추골단 이형성, 및 뇌실반구 이형성이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0512] 선택적으로 하나 이상의 추가 활성제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 ActRII 길항제로 치료될 수 있는 추가적인 전-신생물 장애에는, 양성 증식이상 장애 (예컨대, 양성 종양, 섬유양종성 병태, 조직 비대, 장 폴립 또는 선종, 및 식도 이형성), 백반증, 각화증, 보웬병, 농부의 피부, 일광 구순염, 및 일광 각화증이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0513] 선택적으로 하나 이상의 추가 활성제 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여 ActRII 길항제로 치료될 수 있는 추가 과다증식성 질환, 장애, 및/또는 병태들에는, 악성종양 및 관련 장애, 가령, 백혈병 (급성 백혈병 (예컨대, 급성 림프구 백혈병, 급성 골수구성 백혈병 (골수모세포, 전골수성세포, 골수단핵세포, 단핵세포, 및 적백혈병을 포함)) 및 만성 백혈병 (예컨대, 만성 골수구성 (과립구) 백혈병 및 만성 림프구 백혈병) 포함), 림프종 (예컨대, 호지킨 질환 및 비-호지킨 질환), 다발 골수종, 발덴스트롬 고분자글로불린 혈증, 중쇄 질환, 및, 육종 및 암종, 가령, 섬유육종, 근육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤향막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 이자암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두모양 암종, 유두모양 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장 세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모암종, 정상피종, 태생기 암종, 비름 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 상피 암종, 신경교종, 별아교세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 핏지교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 및 망막모세포종을 비롯한 (그러나 이에 제한되지 않음) 고형종양의 진행, 및/또는 전이가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0514] 특정 양상들에서, 치료적 암 제제, 가령, 세포독성제, 항-혈관형성제, 전-세포사멸 제제, 면역조절제, 항생제, 호르몬, 호르몬 길항제들, 케모카인, 약물, 전구약물, 독소, 효소 또는 그 외 다른 활성제가 하나 이상의 ActRII 길항제들과 조합하여 사용될 수 있다. 사용 약물은, 예를 들면 다음에서 선택된 제약학적 성질을 보유했을 수 있다: 유사분열제, 항-키나제 제제, 알킬화제, 항대사제, 항생제, 알칼로이드제, 항-혈관형성제, 전-세포사멸 제제, 및 이의 조합.

[0515] 본 출원에서 사용되는 "복합하여", "공동 투여", "공동으로"는 추가 요법(가령, 제2, 제3, 제 4 등)이 여전히 신체에서 효과적일도록 투여하는 임의의 형태를 의미한다 (예를 들어, 다수 화합물이 환자에서 동시에 효과적이며, 이들 화합물의 공조상승효과를 포함할 수 있음). 유효성은 혈액, 혈청 또는 혈장에서 측정가능한 약물 농도와 관련이 없을 수도 있다. 예를 들면, 상이한 치료 화합물은 동일한 제형 또는 별도 제형으로, 동시, 순차적 또는 상이한 일정에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 그러한 치료를 받는 개체는 다른 치료법의 조합 효과로부터 이익을 얻을 수 있다. 본 출원의 하나 이상의 ActRII 길항제들은 하나 이상의 다른 추가 제제들 및/또는 지지 요법 (예컨대, 면역 관문 억제제, 가령, PD1-PDL1 길항제)과 동시에, 이보다 앞서, 또는 후속적으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 각각의 치료제는 특정 제제에 대해 결정된 투여량 및/또는 일정으로 투여될 것이다. 요법에서 사용하는 특정 조합은 본 명세서의 길항제와 치료 및/또는 바람직한 치료 효과의 양립 가능성을 고려할 것이다.

[0516] 예시적인 사용 약물들에는, 플루오로우라실, 아파티닙, 아플리딘, 아자리빈, 아나스트로졸, 안트라사이클린, 엑시티닙, 아미노글루테티미드, 암사크린, AVL-101, AVL-291, 벤다무스틴, 블레오마이신, 부세렐린, 보르테오미드, 보수티닙, 바이칼루타미드, 브리오스타틴-1, 부설판, 카페시타빈, 칼리케아마이신, 캄토테신, 카르보플라틴, 10-하이드록시캄토테신, 카르무스틴, 셀레브렉스, 클로람부실, 시스플라틴 (CDDP), Cox-2 억제제, 이리노테칸 (CPT-11), SN-38, 클라드리빈, 캄토테칸, 크리조티닙, 콜히친, 시클로포스파미드, 시타라빈, 시프로테론, 클로

드로네이트, 다카르바진, 다사티닙, 다이에네스트롤, 디나시클립, 도세탁셀, 닥티노마이신, 다우노루비신, 디에틸stil베스트롤, 독소루비신, 2-피롤리노독소루비신 (2P-DOX), 시아노-모르폴리노 독소루비신, 독소루비신 글루쿠로니드, 에피루비신 글루쿠로니드, 에를로티닙, 에스트라무스틴, 에피도필로톡신, 에를로티닙, 엔티노스타트, 에스트로겐 수용체 결합제, 에토포시드 (VP16), 에토포시드 글루쿠로니드, 에토포시드 포스페이트, 엑스메스탄, 필그라스티프, 핑고리모드, 플록수리딘 (FudR), 플루옥시메스테론, 3',5'-O-다이올레오일-FudR (FudR-dO), 플루드로코르티손, 플루다라빈, 플루타미드, 고세렐린, 파르네실-단백질 전달효소 억제제, 플라보피리돌, 포스타마티닙, 가네테스픽, GDC-0834, GS-1101, 게피티닙, 겐시타빈, 하이드록시우레아, 이브루티닙, 이다루비신, 레바미솔, 이텔라이텔랄리십, 이포스파미드, 이마티닙, 레트로졸, 아스파라기나제, 류프롤라이드, 라파티닙, 레놀리다마이드, 류코보린, 이로노테칸, LFM-A13, 로무스틴, 메클로레타민, 멜팔란, 메르캅토프린, 6-메르캅토프린, 메게스트롤, 메토티렉세이트, 미톡산트론, 닐루타미드, 미쓰라마이신, 미토마이신, 노코다졸, 옥트레오티드, 미토탄, 나벨빈, 네라티닙, 닐로티닙, 니트로소우레아, 올라파립, 플리코마이신, 프로카르바진, 파클리탁셀, 옥살리플라틴, PCI-32765, 펜토스타틴, 플리카마이신, PSI-341, 랄록시펜, 세무스틴, 소라페닙, 스트렙토조신, SU11248, 수니티닙, 타목시펜, 포르피머, 테모졸로마이드, 메스나, 테마졸로미드 (DTIC의 수성 형태), 트랜스플래티늄, 탈리도마이드, 티오구아닌, 랄티트렉시드, 티오테파, 테니포시드, 토포테칸, 우라실 머스터드, 바탈라닙, 비노렐빈, 빈블라스틴, 리톡시맙, 파미드로네이트, 빈크리스틴, 빈카 알칼로이드제 및 ZD1839이 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0517] 사용 독소들에는 리신, 아브린, 알파 독소, 사포린, 리보핵산분해효소 (RNase), 예컨대, 온코네이스, DNase I, 포도구균 장독소-A, 섬자리공 항바이러스 단백질, 겔로닌, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소, 및 슈도모나스 내독소가 포함될 수 있다.

[0518] 사용 케모카인들에는 RANTES, MCAF, MIP 1-알파, MIP 1-베타 및 IP-10이 포함될 수 있다.

[0519] 특정 구체예들에서, 항-혈관형성제, 가령, 안지오스타틴, 베쿨로스타틴, 칸스타틴, 마스핀, 항-VEGF 항체, 항-PIGF 펩티드 및 항체, 항-혈관 성장 인자 항체, 항-FIk-1 항체, 항-FIt-1 항체 및 펩티드, 항-Kras 항체, 항-cMET 항체, 항-MIF (대식세포 이동-억제 인자) 항체, 라미닌 펩티드, 섬유결합소 펩티드, 플라스미노겐 활성화제 억제제, 조직 금속단백분해효소 억제제, 인터페론, 인터루킨-12, IP-10, Gro-베타, 트롬보스폰딘, 2-메톡시옥스트라디올, 프롤리퍼린-관련 단백질, 카복시아미도트리아졸, CM101, 마리마스타트, 펜토산 폴리설페이트, 안지오펜에틴-2, 인터페론-알파, 허비마이신 A, PNU145156E, 16K 프로락틴 단편, 리노마이드 (로퀴니멕스), 탈리도마이드, 펜톡시필린, 게니스타인, TNP-470, 엔도스타틴, 파클리탁셀, 아쿠티(accut in), 안지오스타틴, 시도포비르, 빈크리스틴, 블레오마이신, AGM-1470, 혈소판 인자 4, ALK1 폴리펩티드 (예컨대, 달란테르셉트) 또는 미노사이클린이 하나 이상의 ActRII 길항제들과 조합하여 사용될 수 있다.

[0520] 사용 면역조절제는 사이토카인, 줄기 세포 성장 인자, 림프독소, 조혈 인자, 집락 자극 인자 (CSF), 인터페론 (IFN), 적혈구형성인자, 혈소판형성인자 및 이의 조합에서 선택될 수 있다. 구체적으로 림프독소, 가령, 종양 괴사 인자 (TNF), 조혈 인자, 가령, 인터루킨 (IL), 집락 자극 인자, 가령, 과립구-집락 자극 인자 (G-CSF) 또는 과립구 대식세포-집락 자극 인자 (GM-CSF), 인터페론, 가령, 인터페론-알파, -베타 또는 -람다, 및 줄기 세포 성장 인자, 가령, "S1 인자"를 나타내는 인자가 유용하다. 사이토카인들 중에서도 부갑상선르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴락신; 프로릴락신; 당단백질 호르몬, 가령, 난포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 및 황체 호르몬 (LH); 간 성장 인자; 프로스타글란딘, 섬유모세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 젖샘자극호르몬, OB 단백질; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 플러관-억제 물질; 마우스 생식샘자극 호르몬-연관 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 혈소판형성인자(TPO); 신경 성장 인자, 가령, NGF-베타; 혈소판-성장 인자; 전환 성장 인자 (TGFs), 가령, TGF-알파 및 TGFβ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 적혈구형성인자 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 가령, 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 집락 자극 인자 (CSFs), 가령, 대식세포-CSF (M-CSF); 인터루킨 (ILs) 가령, IL-1, IL-1알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, 키트-리간드 또는 FLT-3, 안지오스타틴, 트롬보스폰딘, 엔도스타틴, 종양 괴사 인자 및 LT가 포함된다.

[0521] 사용 방사성핵종에는 ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹¹At, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ¹¹¹Ag, ⁶⁷Ga, ¹⁴²Pr, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ²¹²Pb, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁶⁹Er, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²¹¹Pb, 및 ²²⁷Th가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 치료적 방사성핵종은 바람직하게는 오제 방출체 (Auger emitter)에 있어 20 내지 6,000 keV 범위, 바람직하게는 60 내지 200 keV 범위, 베타 방출체에 있어서 100-2,500 keV, 그리고 알파 방출체에 있어서 4,000-6,000 keV의 붕괴-에너지

를 가진다. 유용한 베타-입자-방출 핵종의 최대 붕괴 에너지는 바람직하게는 20-5,000 keV, 더욱 바람직하게는 100-4,000 keV, 그리고 가장 바람직하게는 500-2,500 keV이다. 오제-방출 입자들과 함께 실질적으로 붕괴하는 방사성핵종 또한 바람직하다. 예를 들면, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m 및 Ir-192. 유용한 베타-입자-방출 핵종들의 붕괴 에너지는 바람직하게는 <1,000 keV, 더욱 바람직하게는 <100 keV, 그리고 가장 바람직하게는 <70 keV이다. 알파-입자들을 생성하며 실질적으로 붕괴하는 방사성핵종 또한 바람직하다. 이러한 방사성핵종에는 다음이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Th-227 및 Fm-255. 유용한 알파-입자-방출 방사성핵종의 붕괴 에너지는 바람직하게는 2,000-10,000 keV, 더욱 바람직하게는 3,000-8,000 keV, 및 가장 바람직하게는 4,000-7,000 keV이다. 사용가능한 추가 방사성동위원소들에는 ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁵Br, ¹⁹⁸Au, ²²⁴Ac, ¹²⁶I, ¹³³I, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁷Hg, ²⁰³Hg, ¹²¹mTe, ¹²²mTe, ¹²⁵mTe, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁷Tm, ⁷⁷Br, ¹¹³mIn, ⁹⁵Ru, ⁹⁷Ru, ¹⁶⁸Tm, ¹⁹⁷Pt, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁹⁹Au, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵¹Cr, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ²⁰¹Tl, ²²⁵Ac, ⁷⁶Br, 및 ¹⁶⁹Yb가 포함된다.

- [0522] 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는 최소한 하나의 알킬화제, 니트로소유레아, 항-대사제, 토포아이소머레이스 억제제, 유사분열 억제제, 안트라사이클린, 코르티코스테로이드 호르몬, 성 호르몬, 및/또는 표적된 항-종양 화합물과 조합하여 사용된다.
- [0523] 표적된 항-종양 화합물은 표준 화학요법 약물들보다 더 특이적으로 암 세포들을 공격할 수 있도록 설계된 약물이다. 이러한 화합물들 대부분은 특정 유전자의 돌연변이들을 상주시키는 세포들 또는 이러한 유전자들의 복제수를 과발현시키는 세포들을 공격한다. 한 구체예에서, 항-종양 화합물은 이마티닙 (Gleevec), 게피티닙 (Iressa), 에를로티닙 (Tarceva), 리툭시맵 (Rituxan), 또는 베바시주맵 (Avastin)일 수 있다.
- [0524] 알킬화제는 DNA에 직접 작용하여 암 세포가 번식하는 것을 방해한다. 이러한 알킬화제들은 세포 주기 중 임의의 특정 시기에 특이적이지 않다. 한 구체예에서, 알킬화제는 부설판, 시스플라틴, 카르보플라틴, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 다카르바진 (DTIC), 메클로레타민 (질소 머스터드), 멜팔란, 및 테모졸로마이드에서 선택될 수 있다.
- [0525] 항대사제는 DNA 및 RNA 합성을 방해하는 약물 분류를 구성한다. 이러한 항대사제는 세포 주기의 S 기 동안 작용하며 통상적으로 백혈병, 유방, 난소, 및 위장관의 종양, 뿐만 아니라 그 외 다른 암들을 치료하기 위해 사용된다. 한 구체예에서, 항대사제는 5-플루오로우라실, 카페시타빈, 6-메르캅토피리딘, 메토트렉세이트, 겐시타빈, 시타라빈 (아라-C), 플루다라빈, 또는 페메트렉시드일 수 있다.
- [0526] 토포아이소머레이스 억제제는 DNA 복제에 중요한 토포아이소머레이스 효소들을 방해하는 약물이다. 토포아이소머레이스 I 억제제의 일부 예들에는 토포테칸 및 이리노테칸이 포함되며 토포아이소머레이스 II 억제제의 일부 대표적인 예들에는 에토포시드 (VP-16) 및 테니포시드가 포함된다.
- [0527] 안트라사이클린은 DNA 복제에 관여하는 효소들을 또한 방해하는 화학요법 약물이다. 이들 제제들은 세포 주기의 모든 시기에 작용하므로, 다양한 암에 대한 치료제로서 널리 사용된다. 한 구체예에서, 본 발명과 관련하여 사용되는 안트라사이클린은 다우노루비신, 독소루비신 (Adriamycin), 에피루비신, 이다루비신, 또는 미톡산트론일 수 있다.
- [0528] 종양들은 특히, 종양 항원에 특이적인 T 세포들에서 특정 면역-면역관문 경로를 흡수함에 의해 면역 감시에서 벗어날 수 있다 (Pardoll, 2012, Nature Reviews 암 12:252-264). 암 요법을 위한 면역관문 억제제 항체에 대한 연구는 암 치료에 내성인 것으로 이전에 생각되었던 암을 치료함에 성공적이었다 (예컨대, Ott & Bhardwaj, 2013, Frontiers in Immunology 4:346; Menzies & Long, 2013, Ther Adv Med Oncol 5:278-85; Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-64; Mavilio & Lugli을 참고하라). 다수의 항암제와 대조적으로, 면역관문 억제제는 종양 세포들을 직접적으로 표적하지 않으며, 그보다는 면역계의 내인성 항종양 활성을 향상시키기 위하여 림프구 수용체 또는 그 리간드들을 표적한다. (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264). 이러한 억제제는 질환 세포, 조직 또는 병원체들에 대한 면역 반응을 조절함으로써 주로 작용하기 때문에, 이들은 이러한 제제들의 항-종양 효과를 향상시키기 위한 다른 치료 양상들 (modalities), 가령, 대상의 ActRII 길항제들, ADCs 및/또는 인터페론과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0529] 항-PD1 항체는 흑색종, 비소-세포 폐암, 방광암, 전립선암, 결장직장 암, 두경부암, 삼중-음성 유방암, 백혈병, 림프종 및 신장 세포 암의 치료를 위해 사용되어왔다 (Topalian et al., 2012, N Engl J Med 366:2443-54;

Lipson et al., 2013, Clin Cancer Res 19:462-8; Berger et al., 2008, Clin Cancer Res 14:3044-51; Gildener-Leapman et al., 2013, Oral Oncol 49:1089-96; Menzies & Long, 2013, Ther Adv Med Oncol 5:278-85). 예시적인 항-PD1 항체에는 람브롤리주맵 (MK-3475, MERCK), 니볼루맵 (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb), AMP-224 (Merck), 및 피딜리주맵 (CT-011, Curetech Ltd.)이 포함된다. 항-PD1 항체는 ABCAM (AB137132), Biolegend (EH12.2H7, RMP1-14) 및 Affymetrix Ebioscience (J105, J116, MIH4)사로부터 상업적으로 이용가능하다.

[0530] 항-CTLA4 항체는 흑색종, 전립선암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암의 치료를 위한 임상 시험들에서 사용되어 왔다 (Robert & Ghiringhelli, 2009, Oncologist 14:848-61; Ott et al., 2013, Clin Cancer Res 19:5300; Weber, 2007, Oncologist 12:864-72; Wada et al., 2013, J Transl Med 11:89). 예시적인 항-CTLA4 항체에는 이필리무맵 (Bristol-Myers Squibb) 및 트레멜리무맵 (Pfizer)이 포함된다. 항-PD1 항체는 통상적으로, 예를 들면 ABCAM (AB134090), Sino Biological Inc (11159-H03H, 11159-H08H), 및 Thermo Scientific Pierce (PA5-29572, PA5-23967, PA5-26465, MA1-12205, MA1-35914)사로부터 상업적으로 이용가능하다. 이필리무맵은 전이성 흑색종의 치료에 대해 최근 FDA 승인을 받았다 (Wada et al., 2013, J Transl Med 11:89).

[0531] CTLA4, PD1 및 PD-L1에 대한 면역관문 억제제가 가장 임상적으로 진전된 것이지만, 그 외 다른 잠재성 면역관문 항원들이 공지되어 있으며 대상이 되는 ActRII 길항제들, 가령, LAG3, B7-H3, B7-H4 및 TIM3와 조합하여 치료 억제제의 표적으로서 사용될 수 있다 (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264). 종양 및/또는 병원체들에 대한 면역 반응을 자극하는 이들 그리고 그 외 다른 공지된 제제들은 암 요법 개선을 위해 ActRIIa 길항제들 단독과 또는 인터페론, 가령, 인터페론- α 와, 및/또는 항체-약물 공액체와 추가로 조합된 ActRIIa 길항제들과 조합하여 사용될 수 있다. 조합하여 사용될 수 있는 다른 공지된 공동-자극 경로 조절인자들에는, 아가틀리모드, 벨라타셉트, 블리나투모맵, CD40 리간드, 항-B7-1 항체, 항-B7-2 항체, 항-B7-H4 항체, AG4263, 에리토란, 항-OX40 항체, ISF-154, 및 SGN-70; B7-1, B7-2, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD48, LFA-3, CD30 리간드, CD40 리간드, 열 안정성 항원, B7h, OX40 리간드, LIGHT, CD70 및 CD24가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0532] 치료제들에는 광활성 제제 또는 염료가 포함될 수 있다. 가시광선에 민감성인 형광 조성물, 가령, 형광색소, 및 그 외 다른 색소원, 또는 염료, 가령, 포르피린은, 적합한 빛을 병소에 향하게 함으로써 병소를 탐지하고 치료하기 위해 사용되어 왔다. 치료요법에서, 이는 광방사, 광선요법, 또는 광역학 요법으로 명명되었다. Joni et al. (eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES (Libreria Progetto 1985); van den Bergh, Chem. Britain (1986), 22:430를 참고하라. 더욱이, 단클론 항체는 광선요법을 구현하기 위하여 광활성화되는 염료들과 커플링되었다. Mew et al., J. Immunol. (1983),130:1473; idem., Cancer Res. (1985), 45:4380; Oseroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83:8744; idem., Photochem. Photobiol. (1987), 46:83; Hasan et al., Prog. Clin. Biol. Res. (1989), 288:471; Tatsuta et al., Lasers Surg. Med. (1989), 9:422; Pelegrin et al., Cancer (1991), 67:2529을 참고하라.

[0533] 다른 유용한 치료제들은 올리고뉴클레오티드, 특히, 바람직하게는 종양유전자 및 종양유전자 산물들, 가령, bcl-2 또는 p53에 대해 지시되는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 치료 올리고뉴클레오티드의 한 바람직한 형태는 siRNA이다. 숙련된 기술자는 임의의 siRNA 또는 간섭 RNA 종들이 표적되는 조직으로의 전달을 위해 항체 또는 이의 단편에 부착될 수 있음을 알고 있을 것이다. 널리 다양한 표적들에 대한 많은 siRNA 종들은 해당 분야에 공지이며, 이러한 임의의 공지된 siRNA는 청구범위에 기재된 방법 및 조성물에서 이용될 수 있다.

[0534] 사용 가능성있는 공지된 siRNA 종들에는 IKK-감마에 특이적인 siRNA (미국 특허 제 7,022,828); VEGF, Flt-1 및 Flk-1/KDR (미국 특허 제 7,148,342); Bcl2 및 EGFR (미국 특허 제 7,541,453); CDC20 (미국 특허 제 7,550,572); 트랜스듀신 (베타)-유사 3 (미국 특허 제 7,576,196); KRAS (미국 특허 제 7,576,197); 카보닉 안하이드레이스 II (미국 특허 제 7,579,457); 보체 성분 3 (미국 특허 제 7,582,746); 인터루킨-1 수용체-연관 키나제 4 (IRAK4) (미국 특허 제 7,592,443); 셀비빈 (미국 특허 제 7,608,7070); 수퍼옥사이드 디스무타제 1 (미국 특허 제 7,632,938); MET 원종양유전자 (미국 특허 제 7,632,939); 아밀로이드 베타 전구물질 단백질 (APP) (미국 특허 제 7,635,771); IGF-1R (미국 특허 제 7,638,621); ICAM1 (미국 특허 제 7,642,349); 보체 인자 B (미국 특허 제 7,696,344); p53 (미국 특허 제 7,781,575), 및 아포지질단백질 B (미국 특허 제 7,795,421)가 포함되며, 각 참고 특허 문헌의 실시예 부분이 본 출원에 참고로 포함된다.

[0535] 또 다른 siRNA 종들은 많은 다른 업체들 중에서도, 공지된 상업적 공급업체들, 가령, Sigma-Aldrich사 (St

Louis, Mo.), Invitrogen사 (Carlsbad, Calif.), Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, Calif.), Ambion 사 (Austin, Tex.), Dharmacon사 (Thermo Scientific, Lafayette, Colo.), Promega사 (Madison, Wis.), Mirus Bio사 (Madison, Wis.) 및 Qiagen (Valencia, Calif.)으로부터 구입가능하다. 그 외 다른 공중 이용가능한 siRNA 종들의 출처에는 스톡홀름 Bioinformatics Centre의 siRNadb 데이터베이스, the MIT/ICBP siRNA 데이터베이스, Broad Institute의 RNAi 컨소시엄 shRNA 라이브러리, 그리고 NCBI의 Probe 데이터베이스가 포함된다. 예를 들면, NCBI Probe 데이터베이스에는 30,852개의 siRNA 종들이 존재한다.. 숙련된 기술자는 임의의 관심유전자에 대해, siRNA 종들이 이미 설계되어 있거나, 또는 공중 이용가능한 소프트웨어 툴을 사용하여 용이하게 설계될 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 임의의 siRNA 종들은 대상 DNL.TM. 복합체를 사용하여 전달될 수 있다.

[0536] ActRII 길항제 면역요법은 예방접종 프로토콜과 조합시 더욱 유효할 수 있다. 종양에 대한 예방접종에 관한 많은 실험적 전략들이 고안되었다 (Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; see also Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita, V. et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Edition을 참고하라). 이러한 전략들 중 하나에서, 백신은 자가 또는 동종이계 종양 세포들을 사용하여 준비된다. 이러한 세포 백신은 종양 세포들이 형질도입되어 GM-CSF를 발현시킬 때 증가된 유효성을 가지는 것으로 나타났다 (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 90: 3539-43). 그러므로, 일부 구체예들에서, 하나 이상의 ActRII 길항제들은 면역원성 물질, 가령, 암 세포들, 정제된 종양 항원 (재조합 단백질들, 펩티드, 및 탄수화물 분자들 포함), 세포들, 및 면역 자극 사이토카인을 인코딩하는 유전자로 형질감염된 세포들과 조합될 수 있다 (He et al (2004) J. Immunol. 173:4919-28). 사용될 수 있는 종양 백신의 비-제한적 예들에는 흑색종 항원의 펩티드, 가령, gp100, MAGE 항원, Trp-2, MART1 및/또는 티로시나제의 펩티드, 또는 사이토카인 GM-CSF를 발현하도록 형질감염된 종양 세포들이 포함된다.

[0537] 다양한 종양들에서의 유전자 발현 및 대규모 유전자 발현 패턴에 관한 연구는 소위 종양 특이적 항원들을 정의하게 하였다 (Rosenberg, S A (1999) 면역성 10: 281-7). 많은 사례들에서, 이들 종양 특이적 항원들은 종양에서 그리고 종양이 발생하는 세포에서 발현되는 분화 항원들, 예를 들면 멜라닌세포 항원 gp100, MAGE 항원, 및 Trp-2이다. 이들 항원들 중 많은 수가 숙주에서 발현되는 종양 특이적 T-세포들의 표적이 됨을 알 수 있다는 것이 더욱 중요하다. 종양에서 발현되는 재조합 단백질들 및/또는 펩티드에 대한 면역 반응을 생성하기 위하여 이들 단백질들의 수집과 함께 PDL1 차단이 사용될 수 있다. 이들 단백질들은 면역계에 의해 자기-항원으로 일반적으로 간주되므로 이들에 대해 내성이다. 종양 항원은 또한 단백질 텔로머레이스를 포함할 수 있는데, 이것은 염색체의 텔로미어 합성에 필요하며 인간 암의 85% 이상에서 그리고 오직 제한된 수의 체세포 조직들에서만 발현된다 (Kim, N et al. (1994) Science 266: 2011-2013). 이러한 체세포 조직들은 면역 공격으로부터 다양한 수단에 의해 보호될 수 있다. 종양 항원은 또한 두 개의 관련없는 서열들 (예컨대, 필라델피아 염색체에서 ber-abl) 사이에 융합 단백질을 생성하거나 단백질 서열을 변화시키는 체세포 돌연변이, 또는 B 세포 종양들로부터의 유전형으로 인하여, 암 세포들에서 발현되는 "신생-항원"일 수 있다.

[0538] 다른 종양 백신은 인간 유두종 바이러스 (HPV), 간염 바이러스 (HBV 및 HCV) 및 카포시 헤르페스 육종 바이러스 (KHSV)와 같은 인간 암에 관련된 바이러스로부터의 단백질들을 포함할 수 있다. ActRII 길항제 치료요법과 함께 사용될 수 있는 또 다른 형태의 종양 특이적 항원은 종양 조직 자체에서 단리되어 정제된 열 충격 단백질들 (HSP)이다. 이러한 열 충격 단백질들은 종양 세포들로부터의 단백질들의 단편을 내포하며 이들 HSP는 종양 면역성을 이끌어내기 위한 항원 제시 세포들로의 전달에 매우 효과적이다 (Suot, R & Srivastava, P (1995) Science 269:1585-1588; Tamura, Y. et al. (1997) Science 278:117-120).

[0539] 수지상 세포들 (DC)은 항원-특이적 반응을 프라이밍하기 위해 사용될 수 있는 효능있는 항원 제시 세포들이다. DC는 생체외에서 생성될 수 있으며 다양한 단백질 및 펩티드 항원들, 뿐만 아니라 종양 세포 추출물들로 부하될 수 있다 (Nestle, F. et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332). DC는 또한 유전자적 수단들에 의하여 형질도입되어 이들 종양 항원들을 또한 발현시킬 수 있다. DC는 또한 면역화의 목적으로 종양 세포들에 직접 융합되었다 (Kugler, A. et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336). 예방접종의 한 방법으로서, DC 면역화는 ActRII 길항제와 효과적으로 조합되어, 보다 효능있는 항-종양 반응들을 활성화시킬 수 있다.

[0540] 본 출원의 다른 방법들은 특정 독소 또는 병원체들에 노출되었던 환자들을 치료하기 위해 사용된다. 따라서, 본 출원의 또 다른 양상은 개체에서 감염 질환 (예컨대, 바이러스, 세균 또는 기생충 감염)을 치료 또는 예방하

는 방법을 제공하는데, 이 방법은 필요로 하는 개체에게 치료적 유효량의 하나 이상의 ActRII 길항제들을 투여하는 단계를 포함하고, 선택적으로 감염 질환을 치료하기 위한 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제를 추가로 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 출원은 감염 질환에 걸린 환자의 내인성 면역 반응을 증강시킴으로써, 개체의 감염 질환을 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 치료적 유효량의 하나 이상의 ActRII 길항제들을 개체에게 투여하는 단계를 포함하고, 선택적으로 감염 질환을 치료하기 위한 하나 이상의 추가 지지 요법 및/또는 활성제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0541] 감염 바이러스의 예들에는 다음이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다: 레트로비리다에; 피코르나비리다에 (예를 들면, 폴리오 바이러스, A형 간염 바이러스; 장내바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 에코바이러스); 칼시비리다에 (가령, 위창자염을 유발하는 균주); 토가비리다에 (예를 들면, 말노염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비리다에 (예를 들면, 뎡기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로나비리다에 (예를 들면, 코로나바이러스); 람도비리다에 (예를 들면, 소수포 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로비리다에 (예를 들면, 에볼라 바이러스); 파라믹소비리다에 (예를 들면, 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스); 오르토믹소비리다에 (예를 들면, 인플루엔자 바이러스); 분가비리다에 (예를 들면, 한탄 바이러스, 분가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이로 바이러스); 아레나 비리다에 (출혈열 바이러스); 레오비리다에 (예컨대, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 비르나비리다에; 헤파드나비리다에 (B형 간염 바이러스); 파르보비리다에 (파르보바이러스); 파포바비리다에 (유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리다에 (대부분의 아데노바이러스); 헤르페스비리다에 (단순 헤르페스 바이러스 (HSV) 1 및 HSV-2, 수두 대상포진 바이러스, 거대세포바이러스 (CMV), 헤르페스 바이러스); 폭시이리다에 (천연두 바이러스, 우두종 바이러스, 폭스 바이러스); 및 이리도비리다에 (가령, 아프리카 돼지 열병 바이러스); 및 분류되지 않은 바이러스 (예를 들면, 해면 상뇌증의 병원 물질, 델타 간염 물질 (B형 간염 바이러스의 결합있는 부수체로 생각됨), 비-A형, 비-B형 간염의 물질 (클래스 1 = 내부적으로 전염됨; 클래스 2 = 비경구적으로 전염됨 (즉, C형 간염); 노획 및 관련 바이러스, 및 아스트로바이러스). 본 출원에 기재된 ActRII 길항제들 및 방법들은 이들 바이러스 물질의 감염을 치료함에 사용하기 위해 고려된다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원은, 예를 들면, AIDS, AIDS 관련 복합체, 수두, 감기, 바이러스 기관지염, 거대세포바이러스 감염, 콜로라도 진드기열, 뎡기열, 에볼라 출혈열, 유행성 이하선염, "수족구" 병, 간염, 단순 헤르페스, 헤르페스 대상포진, HPV, 인플루엔자 (Flu), 라싸열, 홍역, 마버그 출혈열, 감염 단핵구증, 볼거리, 회색질척수염, 진행성 다초점 백색질 뇌증, 광견병, 풍진, SARS, 마마, 바이러스 뇌염, 바이러스 위창자염, 바이러스 수막염, 바이러스 폐렴, 웨스트 나일 질환, 및 황열을 비롯한 바이러스 감염을 치료 또는 예방하기 위하여 하나 이상의 ActRII 길항제들을, 선택적으로 하나 이상의 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 사용하는 방법을 제공한다.

[0542] 감염 세균의 예들에는 다음이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다: 헬리코박터 파일로리, 보렐리아 버도르페리, 레지오넬라 뉴모필리아, 마이코박테리아 종 (가령, 결핵균, M. 아비움, M. 인트라셀룰레어, M. 칸사이, M. 고르도나에), 스타필로코쿠스 아우레우스, 임질구균, 수막염균 (Neisseria meningitidis), 리스테리아 모노사이토게네스, 스트렙토코쿠스 파이오게네스 (A군 연쇄상구균), 스트렙토코쿠스 아갈락티에 (B군 연쇄상구균), 스트렙토코쿠스 (비리딘스 군), 스트렙토코쿠스 파에칼리스, 스트렙토코쿠스 보비스, 스트렙토코쿠스 (아나에로빅 종.), 스트렙토코쿠스 폐렴, 병원체성 캄필로박터 속, 엔테로코쿠스 속, 헤모필루스 인플루엔자, 바실루스 안쓰라시아, 코리네박테리움 디프테리아에, 코리네박테리움 속, 돼지단독균, 클로스트리듐 퍼프린젠스, 클로스트리듐 테타니, 엔테로박터 아에로게네스, 클레브시엘라 뉴모니아에, 파스튜렐라 멀토시다, 박테로이데스 속, 후소박테리움 뉴클레아툼, 스트렙토바실루스 모닐리포르미스, 트레포네마 팔리둠, 매독균, 랩토스피라, 및 악티노마이세스 이스라엘리. 본 출원에 기재된 ActRII 조성물들 및 방법들은 이들 박테리아 물질의 감염을 치료함에 사용하기 위해 고려된다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원은, 예를 들면, 탄저, 세균성 성인 호흡 곤란 증후군, 박테리아 수막염, 브루셀라병, 캄필로박터증, 고양이할렘 병, 기관지염, 콜레라, 디프테리아, 발진티푸스, 임질, 레지오넬라증, 나병 (한센병), 랩토스피라증, 리스테리아증, 라임병, 메리오이드증, MRSA 감염, 마이코박테리아 감염, 수막염, 노카르디아증, 신장염, 사구체신염, 치주 질환, 백일해 (백일 기침, Whooping Cough), 흑사병, 폐렴구균 폐렴, 앵무새병, Q 열, 록키 마운틴 열병 (RMSF), 살모넬라증, 성홍열, 이질, 매독, 패혈 쇼크, 혈역학 쇼크, 패혈증 증후군, 과산화, 트라코마, 결핵, 야생토끼병, 장티푸스를 비롯한 세균 감염을 치료 또는 예방하기 위하여 하나 이상의 ActRII 길항제들을, 선택적으로 하나 이상의 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 사용하는 방법을 제공한다.

[0543] 감염성 진균의 예들에는 다음이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다: 크립토코쿠스 네오포르만스, 히스토플라스마 캡슐라툼, 콕시디오이데스 이미티스, 블라스토마이세스 테르마티티디스, 및 칸디다 알비칸스. 본 출원에 기재된 ActRII 길항제들 및 방법들은 이들 진균 물질의 감염을 치료함에 사용하기 위해 고려된다. 그러므로,

일부 구체예들에서, 본 출원은, 예를 들면, 아스페르길루스증; 아구창, 크립토코쿠스증, 분아균증, 콕시디오이데스진균증, 및 히스토플라스마증을 비롯한 진균 감염을 치료 또는 예방하기 위하여 하나 이상의 ActRII 길항제들을, 선택적으로 하나 이상의 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 사용하는 방법을 제공한다.

[0544] 감염성 기생충의 예들에는 다음이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다: 이질 아메바, 발란티디움 콜리, 네글레리아파울러리, 가시아메바 속., 람블 편모충, 와포자충 속, 쥐폐포자충, 삼일열원충, 쥐바베스열원충, 브루스파동편모충, 크루스 파동편모충, 도너반 리슈만편모충, 톡소포자충, 브라질 쥐모양선충. 본 출원에 기재된 ActRII 길항제들 및 방법들은 이들 물질의 감염을 치료함에 사용하기 위해 고려된다. 그러므로, 일부 구체예들에서, 본 출원은, 예를 들면, 아프리카 수면병, 아메바증, 회충증, 바베스열원충증, 샤가스 병, 간흡충증, 와포자충증, 낭미충증, 긴촌충증, 용선충증, 포충증, 요충증, 간질증, 비대흡충증, 사상충증, 자유 아메바 감염 (Free-living amebic infection), 편모충증, 턱구충증, 왜소조충증, 포자충증, 내장리슈만 편모충, 리슈만 편모충증, 말라리아, 요코가와흡충증, 구더기증, 회선사상충증, 이감염증, 요충 감염, 움, 주혈흡충증, 조충증, 개회충증, 톡소포자충증, 선모충증 (Trichinellosis), 선모충증 (Trichinosis), 편충증, 및 파동편모충증을 비롯한 진균 감염을 치료 또는 예방하기 위하여 하나 이상의 ActRII 길항제들을, 선택적으로 하나 이상의 지지 요법 및/또는 활성제와 조합하여 사용하는 방법을 제공한다.

[0545] 일부 구체예들에서, 본 출원은 필요로 하는 환자에게 유효량의 ActRII 길항제를 단독으로 또는 감염 질환 (병원체)을 치료하기 위한 제 2 치료제, 예를 들면, 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 또는 항기생충제와 조합하여 투여함으로써 감염 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0546] 일반적으로, 항생제는 세균의 성장을 억제 또는 사멸시키는 임의의 화합물을 지칭한다. 유용한 항생제의 비-제한적 예들에는 린코사마이드 (클린도마이신); 클로람페니콜; 테트라사이클린 (가령, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린, 데메클로사이클린, 메타사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린); 아미노글리코시드 (가령, 겐타마이신, 토브라마이신, 네틸미신, 아미카신, 카나마이신, 스트렙토마이신, 네오마이신); 베타-락탐 (가령, 페니실린, 세팔로스포린, 이미페넴, 아즈트레오남); 반코마이신; 바시트라신; 마크롤라이드 (에리트로마이신), 암포테리신; 설펜아미드 (가령, 설펜파닐아마이드, 설펜메톡사졸, 설펜세타마이드, 설펜디아진, 설펜속사졸, 설펜사이틴, 설펜독신, 마페나이드, p-아미노벤조익 애시드, 트라이메토프림-설펜메톡사졸); 메테나민; 니트로퓨란토인; 페나조피리딘; 트라이메토프림; 리팜피신; 메트로니다졸; 세파졸린; 린코마이신; 스펙티노마이신; 뮤피로신; 퀴놀론 (가령, 날리딕스산, 시녹사신, 노르플록사신, 시프로플록사신, 퍼플록사신, 오픈록사신, 에녹사신, 플레록사신, 레보플록사신); 노보비오신; 폴리믹신; 그라미시딘; 및 항슈도모나스 (가령, 카르베니실린, 카르베니실린 인단일, 티카르실린, 아즐로실린, 메즐로실린, 피페라실린) 또는 이의 임의의 염 또는 변이체가 포함된다. Physician's Desk Reference, 59.sup.th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N.J.; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 20.sup.th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md.; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis 및 Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N.J 또한 참고하라. 사용되는 항생제는 세균 감염 유형에 따라 달라질 것이다.

[0547] 일반적으로, 항-진균제는 진균의 성장을 억제 또는 사멸시키는 임의의 화합물을 지칭한다. 비-제한적 예들에는 이미다졸 (가령, 그리세오펜, 미코나졸, 테르비나핀, 플루코나졸, 케토코나졸, 보리코나졸, 및 이트라코니졸); 폴리엔 (가령, 암포테리신 B 및 나이스태틴); 플루사이토신; 및 칸디시딘 또는 이의 임의의 염 또는 변이체가 포함된다. Physician's Desk Reference, 59.sup.th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N.J.; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20.sup.th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md.; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15.sup.th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N.J 또한 참고하라. 사용되는 항-진균제는 진균 감염 유형에 따라 달라질 것이다.

[0548] 항-바이러스 약물은 바이러스의 작용을 억제하는 임의의 화합물을 지칭한다. 비-제한적 예들에는 인터페론 알파, 베타 또는 감마, 디다노신, 라미부딘, 자나마비르, 로파니비르, 넬피나비르, 에파비렌즈, 인디나비르, 발라사이클로비르, 지도부딘, 아만타딘, 리만티딘, 리바비린, 간시클로비르, 포스카르네트, 및 아사이클로비르 또는 이의 임의의 염 또는 변이체가 포함된다. Physician's Desk Reference, 59.sup.th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N.J.; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20.sup.th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md.; Braunwald et al., Eds. Harrison's

Principles of Internal Medicine, 15.sup.th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N.J 또한 참고하라. 사용되는 항-바이러스제는 바이러스 감염 유형에 따라 달라질 것이다.

[0549] 항기생충제는 기생충의 성장을 억제 또는 사멸하는 임의의 화합물을 지칭한다. 유용한 항기생충제의 비-제한적 예들에는 클로로퀸, 메플로퀸, 퀴닌, 프리마퀸, 아토바쿠온, 설파속신, 및 피리메타민 또는 이의 임의의 염 또는 변이체가 포함된다. Physician's Desk Reference, 59.sup.th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N.J.; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20.sup.th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md.; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15.sup.th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N.J 또한 참고하라. 사용되는 항기생충제는 기생충 감염 유형에 따라 달라질 것이다.

[0550] 상기 논의한 종양들에 대한 적용과 유사하게, 본 출원에 기재된 ActRII 길항제들은 병원체들, 독소, 및 자가-항원들에 대한 면역 반응을 자극하기 위하여 단독으로, 또는 보조제로서, 백신과 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 접근방법은 다른 형태의 면역요법, 가령, 사이토카인 치료 (예컨대, 인터페론, GM-CSF, G-CSF 또는 IL-2의 투여)와 조합될 수 있다. 이러한 치료적 접근방법이 특히 유용할 수 있는 병원체들의 예들에는, 현재 효과적인 백신이 없는 병원체들, 또는 종래의 백신이 완전히 효과적이지 않은 병원체들이 포함된다. 이러한 병원체들에는 HIV, 간염 (A, B, & C), 인플루엔자, 헤르페스, 편모충, 말라리아, 리슈만 편모충, 스타필로코쿠스 아우레우스, 및 슈도모나스 아에루기노사가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0551] 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 유방암에 걸린 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 다발 골수종에 걸린 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 유방암에 걸린 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 골수형성이상 증후군에 걸린 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 FSH-분비 뇌하수체 종양에 걸린 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 전립선암에 걸린 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 정상인 건강한 환자들에 비하여 바람직하지 않은 상승된 면역 활성화 (예컨대, 증가된 T 세포 활성화)를 가지는 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 자가면역 장애, 또는 자가면역-관련 장애를 가진 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 바람직하지 않은 상승된 T 세포 활성화에 의해 매개되는 자가면역 장애, 또는 자가면역-관련 장애를 가진 환자들에게 투여되지 않는다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 다음 중 하나 이상을 가지는 환자들에게 투여되지 않는다: 급성 파종 뇌척수염, 급성 괴사성 출혈 백색질뇌염, 애디슨병, 무감마글로불린혈증, 원형탈모증, 아밀로이드증, 강직척추염, 항-GBM/항-TBM 신장염, 항인식질항체 증후군 (APS), 자가면역 혈관부종, 자가면역 무형성빈혈, 자가면역 자율신경기능이상, 자가면역 간염, 자가면역 고지질혈증, 자가면역 면역결핍, 자가면역내이질환, 자가면역 심근염, 자가면역 난소염, 자가면역 이차염, 자가면역 망막병증, 자가면역 혈소판감소자색반 (ATP), 자가면역 갑상선 질환, 자가면역 두드러기, 축삭 & 뉴런 신경병증, 발로씨 질환, 베르체트병, 물집유사천포창, 캐슬만 병, 복강병, 샤가스 병, 만성 염증성 탈수초 다발신경병증, 만성 재발성 다초점 골수염, 척-슈트라우스 증후군, 흉터유사천포창/양성 점막 유사천포창, 크론병, 코간 증후군, 저온 응집병, 콕사키 심근염, CREST 질환, 본태성 혼합한랭글로불린혈증, 탈수초 신경병증, 헤르페스모양 피부염, 피부근육염, 데빅 질환 (시신경척수염), 디스코이드 루푸스, 드레즐러 증후군, 자궁내막증, 호산구 식도염, 호산구 근막염, 결절홍반, 실험 알러지성 뇌척수염, 에반스 증후군, 섬유화 폐포염, 거대 세포 동맥염, 거대 세포 심근염, 사구체신염, 굿파스처 증후군, 다발혈관염이 있는 육아종증, 그레이브스병, 길랭-바레증후군, 하시모토 뇌염, 하시모토 갑상선염, 헤노흐-쑤라인 자색반, 임신 헤르페스, 저감마글로불린혈증, IgA신장병증, IgG4-관련 경화 질환, 면역조절 지질단백질들, 봉입체 근육염, 사이질 방광염, 소아 관절염, 소아 근염, 가와사키 증후군, 람베르트-이튼 증후군, 백혈구파괴 혈관염, 편평태선, 경화태선, 목질결막염, 선형 IgA 질환 (LAD), 루푸스 (SLE), 라임병 (만성), 메니에르 질환, 현미경 다발혈관염, 혼합 결합 조직병 (MCTD), 무릎 각막 궤양, 무차-하버만병, 다발성 경화증, 중증근육무력증, 근육염, 시신경 척수염 (데빅병), 안구 반흔성 유사천포창, 시신경염, 재발류머티즘, PANDAS (스트렙토코쿠스 관련 소아 자가면역 신경정신 장애), 신생물탈립 소뇌 퇴행, 발작성 야간 혈색소 (PNH), 페리 롬버그 증후군, 파르소니지-터너 증후군, 평면부염 (말초 포도막염), 천포창, 정맥주위 뇌척수염, POEMS 증후군, 결절다발동맥염, I, II, & III형 자가면역 여러샘 증후군, 다발근육통증 류마티스, 다발근육염, 프로게스테론 피부염, 원발 담관 간경화증, 원발 경화 담관염, 건선, 건선성 관절염, 괴저 고름피부증, 레이노 현상, 반응 관절염, 반사 교감신경 이상증, 라이트 증후군, 재발성 다발연골염, 류마티스열, 류마티

스 관절염, 사르코이드증, 슈미트 증후군, 공막염, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 정맥 & 고환 자가면역성, 스티프 맨 증후군, 수작 증후군, 교감신염증, 타카야수 동맥염, 톨로사-헌트 증후군, 횡단척수염, 케양성 대장염, 미분화 결합조직병 (UCTD), 수포성 피부염, 베게너 육아종증. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 조직 또는 장기 이식 중인 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 조직 또는 장기 이식을 받았던 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 이식편-대-숙주 질환을 가진 환자들에게 투여되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 출원의 ActRII 길항제들은 하나 이상의 면역억제제 및/또는 치료제로 치료받고 있는 환자들에게 투여되지 않는다.

[0552] 일부 구체예들에서, ActRII 길항제는, 단독으로 또는 암을 치료하기 위한 지지 요법 또는 추가 활성제 (예컨대, 면역요법제, 가령, PD1-PDL1 길항제)와 조합하여, 암 환자의 생존을 개선 (사망 위험을 감소)하기 위해 사용될 수 있다. 본 출원에서 사용되는, 암 환자의 생존 개선은 일정 시기의 과정 동안 또는 과정에 걸쳐 대상 모집단이 경험하는 치사 암-관련 사례의 수를 유지 또는 감소시키는 것을 지칭한다. 암 환자의 생존에 있어서의 개선은 일정 시기 동안 또는 일정 시기에 걸쳐 두 그룹의 개체들 사이의 치사 암-관련 사례들의 발생을 비교함으로써 평가 또는 결정될 수 있으며, 여기서 제 1 그룹 (치료 그룹)은 본 발명의 방법에 의해 치료되고, 제 2 그룹 (위약 그룹)은 본 발명의 방법에 의한 치료를 대체하여 또는 치료 대신에 위약을 사용하여 치료된다 (즉, 더미 약). 치료 그룹에 대한 치사 암-연관 사례들의 수가 위약 그룹에 대한 치사 암-연관 사례들의 수 보다 작은 경우, 암 환자의 생존에 있어서 개선이 있었던 또는 개선된 것으로 결정된다. 대안적으로, 치사 심혈관 사례들의 발생률 감소는 제 1 시기에서 대상 모집단에 대한 치사 암-연관 사례들의 기준 수를 결정한 다음 제 2의 차후 시기에서의 대상 모집단에 대한 치사 암-연관 사례들의 수를 측정하여 평가 또는 결정될 수 있다. 차후 제 2 시기에서 대상 모집단에 대한 치사 암-연관 사례들의 수가 제 1 시기에서 대상 모집단에 대한 치사 암-연관 사례들의 수와 동일하거나 작은 경우, 상기 대상 모집단에 대한 암 환자의 생존이 개선된 것으로 결정된다.

[0553] 특정 구체예들에서, 본 출원은 환자에서 하나 이상의 혈액학적 매개변수를 측정함으로써 본 출원의 하나 이상의 ActRII 길항제들로 치료받았거나 치료 받을 후보인 환자를 관리하는 방법을 제공한다. 이러한 혈액학적 매개변수들은 본 출원의 상기 길항제로 치료될 후보인 환자에 대한 적절한 투여량을 평가하기 위해, 치료하는 동안 상기 혈액학적 매개변수들을 모니터링하기 위해, 본 출원의 상기 하나 이상의 길항제들로 치료하는 동안 투여량을 조절해야 하는지 여부를 평가하기 위해, 및/또는 본 출원의 상기 하나 이상의 길항제들의 적절한 유지 용량을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 하나 이상의 혈액학적 매개변수들이 정상 수준에서 벗어난 경우, 하나 이상의 ActRII 길항제 투약은 감소되거나, 지연되거나, 또는 종료될 수 있다.

[0554] 본 명세서에 제공되는 방법들에 따라 측정될 수 있는 혈액학적 매개변수들에는, 예를 들면, 적혈구 수준, 혈압, 철 저장량, 및 해당 기술 분야에 공지된 방법들을 사용하여, 증가된 적혈구 수준과 관계 있는 체액들에서 발견되는 다른 제제들이 포함된다. 이러한 매개변수들은 환자의 혈액 샘플을 사용하여 결정될 수 있다. 적혈구 수준, 헤모글로빈 수준, 및/또는 적혈구용적률 수준의 증가는 혈압의 증가를 유발할 수 있다.

[0555] 한 구체예에서, 하나 이상의 ActRII 길항제로 치료될 후보인 환자에서 하나 이상의 혈액학적 매개변수들이 정상 범위에서 벗어나거나 정상의 높은 쪽에 존재하는 경우, 상기 하나 이상의 길항제의 투여 시작은 혈액학적 매개변수들이 정상 또는, 자연적으로 또는 치료적 개입을 통해 허용가능한 수준으로 다시 돌아갈 때까지 지연될 수 있다. 예를 들면, 후보 환자가 고혈압 또는 고혈압 전단계인 경우, 이 환자는 환자의 혈압을 감소시키기 위하여 혈압 저하제로 치료될 수 있다. 예를 들면, 이노제, (알파 차단제 및 베타 차단제를 비롯한) 아드레날린 억제제, 혈관확장제, 칼슘 채널 차단제, 안지오텐신-전환 효소 (ACE) 억제제, 또는 안지오텐신 II 수용체 차단제를 비롯하여, 개개인 환자들의 조건에 적합한 임의의 혈압 저하제가 사용될 수 있다. 혈압은 대안적으로 식이 및 운동요법을 사용하여 치료될 수 있다. 유사하게, 후보 환자가 정상 보다 낮은, 또는 정상에서 낮은 쪽의 철 저장량을 가지는 경우, 이 환자는 환자의 철 저장량이 정상 또는 허용가능한 수준으로 다시 돌아갈 때까지 적절한 식이 요법 및/또는 철 보충제로 치료될 수 있다. 정상보다 높은 적혈구 수준 및/또는 헤모글로빈 수준을 가지는 환자들의 경우, 본 출원의 상기 하나 이상의 길항제 투여는 이러한 수준이 정상 또는 허용가능한 수준으로 다시 돌아갈 때까지 지연될 수 있다.

[0556] 특정 구체예에서, 하나 이상의 ActRII 길항제로 치료될 후보인 환자에서 하나 이상의 혈액학적 매개변수들이 정상 범위에서 벗어나거나 정상의 높은 쪽에 존재하는 경우, 투여 시작은 지연되지 않을 수 있다. 그러나, 하나 이상의 길항제의 투여량 또는 투여 빈도는 본 출원의 상기 하나 이상의 길항제의 투여시 상승하는 혈액학적 매개변수들의 허용될 수 없는 증가 위험을 감소시키는 양으로 설정될 수 있다. 대안적으로, 해당 환자를 위해 하나 이상의 ActRII 길항제들을 바람직하지 않은 혈액학적 매개변수 수준을 해결하는 치료제와 조합하는 치료 요법 (therapeutic regimen)을 개발할 수 있다. 예를 들면, 환자가 상승된 혈압을 가지는 경우, 하나 이상의

ActRII 길항제와 혈압 저하제의 투여를 포함하는 치료 요법을 설계할 수 있다. 바람직한 철 저장량 보다 낮은 양을 가지는 환자의 경우, 하나 이상의 ActRII 길항제 및 철 보충을 포함하는 치료 요법을 개발할 수 있다.

[0557] 한 구체예에서, 하나 이상의 ActRII 길항제로 치료될 후보인 환자에 대하여 하나 이상의 혈액학적 매개변수들에 관한 기준선 매개변수(들)를 결정할 수 있으며 상기 기준선 값(들)을 기준으로 해당 환자에 대해 적절한 투약 요법을 결정할 수 있다. 대안적으로, 환자의 의학 병력에 기초하여 결정된 기준선 매개변수들은 해당 환자에 대한 적절한 길항제 투약 요법에 관한 정보를 알아내기 위해 사용될 수 있을 것이다. 예를 들면, 건강한 환자가 정의된 정상 범위 이상인, 결정된 기준선 혈압 판독값을 가지는 경우, 환자의 혈압을 본 출원의 하나 이상의 길항제로 치료전 일반 모집단에서 정상으로 고려되는 범위로 되게 할 필요는 없다. 하나 이상의 ActRII 길항제로 치료하기 전 하나 이상의 혈액학적 매개변수들에 관한 환자들의 기준선 값들은 또한 본 명세서에 기재된 하나 이상의 길항제로 치료하는 동안 상기 혈액학적 매개변수들에 대한 임의의 변화를 모니터링하기 위한 관련 비교값으로 사용될 수도 있다.

[0558] 특정 구체예에서, 하나 이상의 혈액학적 매개변수들은 하나 이상의 ActRII 길항제로 치료될 환자들에서 측정된다. 이러한 혈액학적 매개변수들은 치료하는 동안 환자를 모니터링하기 위해 사용되어, 본 출원의 하나 이상의 길항제의 투약 또는 또 다른 치료제를 이용한 추가 투약의 조절 또는 종료를 가능하게 할 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 ActRII 길항제의 투여가 혈압, 적혈구 수준, 또는 헤모글로빈 수준의 증가, 또는 철 저장량의 감소를 가져오는 경우, 본 출원의 하나 이상의 길항제의 투약은 상기 하나 이상의 혈액학적 매개변수들에 대한 본 출원의 하나 이상의 길항제의 효과를 감소시키기 위하여 그 양 또는 빈도가 감소될 수 있다. 하나 이상의 ActRII 길항제의 투여가 환자에게 불리한 하나 이상의 혈액학적 매개변수들의 변화를 가져오는 경우, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 길항제의 투약은 상기 혈액학적 매개변수(들)가 허용가능한 수준으로 다시 돌아갈 때까지 일시적으로, 또는 영구적으로 종료될 수 있다. 유사하게, 하나 이상의 혈액학적 매개변수들이 본 명세서에 기재된 하나 이상의 길항제의 투여량 또는 투여 빈도를 감소시킨 후 허용가능한 범위에 속하게 되지 않는 경우, 투약은 종료될 수 있다. 본 출원에 기재된 하나 이상의 길항제를 이용한 투약을 감소 또는 종료하는 것에 대한 대안으로 또는 이에 더하여, 환자는 바람직하지 않은 혈액학적 매개변수(들) 수준을 해결하는 추가 치료제, 가령, 예를 들면, 혈압 저하제 또는 철 보충제가 투약될 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 ActRII 길항제로 치료되는 환자의 혈압이 상승되는 경우, 본 출원의 하나 이상의 길항제 투약은 동일한 수준으로 지속시키고 혈압-저하제가 하나 이상의 길항제를 이용한 투약 (예컨대, 양 및/또는 빈도) 또는 상기 치료 요법에 추가되고 그리고 혈압-저하제가 이러한 치료 요법에 추가되거나, 또는 하나 이상의 길항제를 이용한 투약이 종료될 수 있고 이 환자는 혈압-저하제로 치료될 수 있다.

[0559] 10. 제약학적 조성물

[0560] 특정 양상들에서, ActRII 길항제들은, 선택적으로 하나 이상의 추가 활성제, 가령, 본 출원의 PD1-PDL1 길항제와 조합하여 단독으로 또는 제약학적 제제 (치료 조성물 또는 제약학적 조성물로도 지칭됨)의 일 성분으로서 투여될 수 있다. 제약학적 제제는 그 안에 포함된 활성 성분 (가령, 본 출원의 물질)의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하고, 그리고 이 제형이 투여될 예정인 대상에 대하여 수용불가능한 독성이 있는 추가 성분을 포함하지 않는 형태의 제제를 말한다. 대상 화합물은 인간 또는 동물용 의약에 사용하기 위한 임의의 편리한 방법으로 투여하기 위해 제형화 될 수 있다. 예를 들면, 본 출원의 하나 또는 그 이상의 물질들은 제약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 제약학적으로 허용가능한 담체는 활성 성분 이외에 제약학적 제제 안에 있는 성분을 말하며, 일반적으로 대상에게 비독성이다. 제약학적으로 허용가능한 담체는 완충액, 부형제, 안정화제, 및/또는 보존제이다. 일반적으로, 본 출원에 이용되는 제약학적 제제는 대상에게 투여될 때, 발열원이 없고, 생리학적으로-수용가능한 형태이다. 본 명세서에서 설명된 것들 이외에 치료에 유용한 물질은 상기에서 설명된 바와 같이, 본 명세서의 방법에서 해당 물질과 조합하여 투여될 수 있다.

[0561] 특정 구체예들에 있어서, 조성물들은 비경구 [가령, 정맥 (I.V.) 주사, 동맥내 주사, 골내 주입, 근육 주사, 척수강 내 주사, 피하 주사 또는 피내 주사]로 투여될 것이다. 비경구 투여에 적합한 제약학적 조성물들은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질들과 하나 이상의 약학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액, 또는 사용 직전에 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성 될 수 있는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 주사가능한 용액 또는 분산액은 항산화제, 완충액, 세균발육억제제, 현탁제, 증점제 또는 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있다. 본 발명의 제약학적 제제에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 오일 (예: 올리브 오일), 주사가능한 유기 에스테르 (예, 에틸 올레이트) 및 이들의 적합한 혼합물을 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅 물질 (예컨대, 레시틴)의 사용, 분산액의 경우

요구되는 입자 크기의 유지 그리고 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

- [0562] 일부 구체예들에서, 화합물들은, 예컨대, 국소 투여, 안구내 (예컨대, 유리체강내) 주사에 의해, 또는 이식물 또는 장치에 의한 방법으로 눈에 투여될 것이다. 유리체강내 주사는, 예를 들면, 유리체를 통해, 가장자리에서 3 mm 내지 4 mm 후방에 주사될 수 있다. 눈에 투여하기 위한 제약학적 조성물은, 예를 들면, 점안약, 안과용 용액, 안과용 현탁액, 안과용 유탁액, 유리체강내 주사, 테논낭하 (sub-Tenon) 주사, 안과용 생분해성 이식물, 및 비-생분해성 안과용 삽입물 또는 데포를 비롯한 다양한 방식으로 제형화될 수 있다.
- [0563] 일부 구체예들에 있어서, 본 출원의 치료 방법은 상기 제약학적 조성물을 전신 투여하거나, 또는 이식물 또는 장치로부터 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. 또한, 상기 제약학적 조성물은 표적 조직 부위 (가령, 골수 또는 근육)에 운반하기 위한 형태에 채집되거나 또는 주입될 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 조성물은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질을 표적 조직 부위 (가령, 골수 또는 근육)로 운반할 수 있는 기질을 포함할 수 있는데, 이 기질은 발생 조직에 대한 구조를 제공하고, 선택적으로 체내로 최적으로 흡수될 수 있다. 예를 들면, 상기 기질은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 물질의 자연 방출을 제공할 수 있다. 이러한 기질은 다른 이식된 의학 용도에 현재 사용되는 재질로 형성될 수 있다.
- [0564] 기질 재료는 생체적합성, 생분해성, 기계적 성질, 미용적 외관 및 경계면 성질중 하나 또는 그 이상에 의해 선택될 수 있다. 해당 조성물의 특정 용도가 적절한 제형을 결정할 것이다. 상기 조성물에 사용가능한 기질은 생분해가능하며, 화학적으로 정의된 황산칼슘, 인산삼칼슘, 히드록시아파타이트, 폴리락트산 및 폴리안하이드리드일 수 있다. 다른 사용가능한 물질은 생분해가능하며, 생물학적으로 잘 규정된 물질로, 예를 들면, 뼈 또는 피부 콜라겐이 포함된다. 또한 기질은 순수 단백질 또는 세포외 기질 성분들로 구성된다. 다른 사용가능한 기질은 비-생분해성이고 화학적으로 정의된 물질로, 예를 들면, 소결(sintered) 히드록시아파타이트, 바이오글라스, 알루미네이트 또는 기타 세라믹이 포함된다. 기질은, 예를 들면, 폴리락트산 및 히드록시아파타이트 또는 콜라겐 및 인산삼칼슘을 포함하는 전술한 유형의 물질의 조합을 포함할 수도 있다. 바이오 세라믹은 공극 크기, 입자 크기, 입자 형태 및 생분해성중 하나 또는 그 이상을 변경시키기 위하여 조성물(예, 칼슘-알루미네이트-포스페이트) 및 공정이 변경될 수 있다.
- [0565] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 제약학적 조성물은 국소적으로 투여될 수 있다. 상기 약학 조성물의 "국소 적용" 또는 "국소적"이라는 것은 피부, 상처 부위 및 점막이 포함된 신체 표면에 상기 제약학적 조성물을 접촉시키는 것을 의미한다. 국소 제약학적 조성물들은 다양한 적용 형태를 가질 수 있고, 전형적으로 조성물이 투여될 때 조직 부근 또는 조직에 직접 접촉되는 약물-함유층을 포함한다. 국소 투여에 적합한 제약학적 조성물은 액체, 겔, 크림, 로션, 연고, 폼, 페이스트, 퍼티 (putty), 반-고체 또는 고체로 제형화된 조합물에 하나 이상의 ActRII 길항제들을, 선택적으로 하나 이상의 추가 활성제, 가령, 본 출원의 PD1-PDL1 길항제와 조합하여 포함할 수 있다. 액체, 겔, 크림, 로션, 연고, 폼, 페이스트, 퍼티 안에 조성물들은 표적 조직에 이 조성물을 퍼바르거나, 분무하거나, 문지르거나, 토닥이거나 또는 롤링시켜 적용시킬 수 있다. 또한 이 조성물은 멸균 드레싱, 경피 패치, 고약 또는 붕대에 스며들어 있을 수 있다. 퍼티, 반고형 또는 고형의 조성물은 변형가능한 형태일 수 있다. 이들은 탄성 또는 비-탄성일 수 있다 (가령, 유연성 또는 경직). 특정 측면들에 있어서, 상기 조성물은 조성물의 일부를 형성하고, 동일하거나 또는 상이한 조성물들의 섬유, 미립자 또는 다중층을 포함할 수 있다.
- [0566] 액체 안에 국소 조성물은 약학으로 수용가능한 용액, 에멀션, 마이크로에멀션, 및 현탁액을 포함할 수 있다. 활성 성분(들)에 추가하여, 액체 투약형은 당분야에서 통상적으로 이용하는 비활성 희석액, 예를 들면, 물 또는 기타 용매, 가용화 물질 및/또는 유화제 [가령, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 또는 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (가령, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 검, 올리브, 피마자, 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이의 혼합물]을 포함할 수 있다.
- [0567] 전형적인 겔, 크림, 로션, 연고, 반고형 또는 고형 조성물은 하나 또는 그 이상의 농후 물질들, 이를 테면 폴리사카라이드, 합성 폴리머 또는 단백질-기반의 폴리머를 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 겔형성 물질은 적절하게 비독성이며, 원하는 점도를 제공하는 것이다. 농후 물질들은 다음의 폴리머, 코폴리머, 및 단량체를 포함한다: 비닐피롤리돈, 메타아크릴아미드, 아크릴아미드 N-비닐이미다졸, 카르복시 비닐, 비닐 에스테르, 비닐 에테르, 실리콘, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜, 비닐알코올, 아크릴레이트 나트륨, 아크릴레이트, 말레산, NN-디메틸아크릴아미드, 디아세톤 아크릴아미드, 아크릴아미드, 아크릴로일 몰포린, 플루로닉, 콜라겐, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐렌, 폴리비닐 실리케이트, 당(가령, 슈크로스,

포도당, 갈락토사민, 갈락토스, 트레할로스, 만노스, 또는 락토즈)로 치환된 폴리아크릴레이트, 아크릴아미도프로판 술폰산, 테트라메톡시오르소실리케이트, 메틸트리메톡시오르소실리케이트, 테트라알콕시오르소실리케이트, 트리알콕시오르소실리케이트, 글리콜, 프로필렌 글리콜, 글리세린, 폴리사카라이드, 알기네이트, 텍스트란, 시클로텍스트린, 셀룰로오스, 변형된 셀룰로오스, 산화된 셀룰로오스, 치토산, 치틴, 구아르, 카라기난, 히알루론산, 이눌린, 전분, 변형된 전분, 아가로스, 메틸셀룰로오스, 식물 검, 히알루로난, 젤라틴, 글리코사미노글리칸, 카르복시메틸 셀룰로오스, 히드록시에틸 셀룰로오스, 히드록시 프로필 메틸 셀룰로오스, 펙틴, 저-메톡시 펙틴, 교차-연계된 텍스트란, 전분-아크릴로니트릴 접합 코폴리머, 전분 폴리아크릴레이트 나트륨, 히드록시에틸 메타아크릴레이트, 히드록실 에틸 아크릴레이트, 폴리비닐렌, 폴리에틸비닐에테르, 폴리메틸 메타크릴레이트, 폴리스티렌, 폴리우레탄, 폴리알카노에이트, 폴리락트산, 폴리락테이트, 폴리(3-히드록시부티레이트), 술폰화된 하이드로겔, AMPS (2-아크릴아미도-2-메틸-1-프로판술폰산), SEM (설포에틸메타크릴레이트), SPM (설포프로필 메타크릴레이트), SPA (설포프로필 아크릴레이트), N,N-디메틸-N-메타아크릴옥시에틸-N-(3-설포프로필)암모늄 베타인, 메타아크릴산 아미노프로필-디메틸 암모늄 설포베타인, SPI (이타코닌산-비스(1-프로필 설포니자이드-3) 에스테르 디-칼륨 염), 이타코닌산, AMBC (3-아크릴아미도-3-메틸부타논산), 베타-카르복시에틸 아크릴레이트 (아크릴산 이량체), 및 말레 무수물-메틸비닐 에테르 폴리머, 이의 유도체들, 이의 염들, 이의 산, 및 이의 조합들. 특정 구체예들에 있어서, 본 출원의 제약학적 조성물들은 예를 들면, 캡슐, 카시에(cachets), 알약, 테블릿, 로젠지(풍미제 베이스, 이를 테면 슈크로스 및 아카시아 또는 트라가탄 이용), 분말, 과립, 또는 수성 또는 비-수성 액체에 용액 또는 현탁액, 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 에멀전 또는 엘릭시르(elixir) 또는 시럽, 또는 캔디 (비활성 베이스, 이를 테면 젤라틴 및 글리세린, 또는 슈크로스 및 아카시아 이용), 및/또는 구강 세척제로 경구 투여될 수 있는데, 이들 각각은 본 명세서의 사전 결정된 양의 화합물 및 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 활성 성분을 함유한다. 본 명세서의 화합물 및 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 다른 활성 성분은 또한 볼루스(bolus), 연질약(electuary), 또는 페이스트로 또한 투여될 수 있다.

[0568] 경구 투여를 위한 고체 투약형 (가령, 캡슐, 테블릿, 알약, 당의정, 분말 및 과립)에서, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 화합물은 예를 들면, 구연산나트륨, 인산이칼슘, 충전제 또는 증량제(extender) (가령, 전분, 락토스, 슈크로스, 포도당, 만니톨, 및 실리카산), 결합제 (가령, 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로스, 및 아카시아), 습윤제 (가령, 글리세롤), 봉해 물질 (가령, 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 실리케이트, 및 탄산 나트륨), 용액 완염제 (가령, 파라핀), 흡수 가속화제 (가령, 4차 암모늄 화합물), 습윤제 (가령, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트), 흡습제 (가령, 카올린 및 벤토나이트 진흙), 윤활제 (가령, 활석, 스테아레이트 칼슘, 스테아레이트 마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 술페이트 나트륨), 발색제, 및 이의 혼합물을 포함하는 하나 또는 그 이상의 제약학적으로 허용가능한 담체와 혼합될 수 있다. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 상기 제약학적 제제 (조성물)는 완충제를 또한 포함할 수 있다. 유사한 형태의 고체 조성물은 가령, 락토스 또는 유당을 포함하는 하나 또는 그 이상의 부형제 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 연질 및 경질 충전된 젤라틴 캡슐 내 충전물로 이용될 수 있다.

[0569] 상기 제약학적 조성물의 경구 투여를 위한 액체 투약형은 제약학적으로 허용가능한 유탁액, 마이크로유탁액, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함할 수 있다. 활성 성분(들)에 추가하여, 액체 투약형은 당분야에서 통상적으로 이용하는 비활성 희석액, 예를 들면, 물 또는 기타 용매, 가용화 물질 및/또는 유화제 [가령, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 또는 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (가령, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 검, 올리브, 피마자, 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이의 혼합물]을 포함할 수 있다. 비활성 희석제 이외에, 경구 제형은 예를 들면, 가습 물질, 유화 및 현탁 물질, 감미 물질, 풍미 물질, 발색제, 향료 물질, 보존 물질, 및 이의 조합들을 포함하는 어쥬번트를 또한 포함할 수 있다.

[0570] 현탁액은 활성 화합물 이외에, 예를 들어 에톡시화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로즈, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 한천-한천, 트라가탄 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0571] 미생물의 작용 및/또는 성장의 예방은 파라벤, 클로로부탄올 및 페놀 소르브산을 비롯한 다양한 항박테리아 및 항진균제를 포함시킴으로써 확보될 수 있다.

[0572] 특정 구체예들에 있어서, 조성물에 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 등장화제를 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 예를 들어, 모노스테아르산 알루미늄 및 젤라틴을 포함하는 흡수를 지연시키는 물질을

포함시킴으로써 주사가능한 약형의 연장된 흡수가 이루어질 수 있다.

- [0573] 투여 섭생은 본 발명의 하나 이상의 물질의 작용을 변형시키는 다양한 인자를 고려하는 주치의에 의해 결정될 것이다. 적혈구 세포 형성을 촉진시키는 ActRII 길항제의 경우, 환자의 적혈구 수, 헤모글로빈 수치, 원하는 목표 적혈구 수, 환자의 나이, 환자의 식단, 억제된 적혈구 세포 수준에 원인이 될 수 있는 질병의 중증도, 기여할 수 있는 질병의 중증도, 투여 시간 및 다른 임상 인자들을 비롯한 다양한 인자들을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 최종 조성물에 대한 기타 공지의 활성물질 추가는 투약에 또한 영향을 줄 수 있다. 적혈구 수준, 헤모글로빈 수준, 망상세포 수준, 및 조혈 과정의 다른 지표 중 하나 또는 그 이상을 주기적 측정하여 진행을 모니터링할 수 있다.
- [0574] 특정 구체예들에 있어서, 본 출원은 본 출원에 따른 하나 또는 그 이상의 물질의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 또한 제공한다. 이러한 요법은 상기 열거된 바와 같은 하나 이상의 장애를 가지는 세포 또는 조직 내로 이러한 물질을 순서대로 도입함으로써 치료 효과를 구현하게 될 것이다. 이러한 물질 순서의 전달은 예를 들어, 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산 시스템과 같은 재조합 발현 벡터를 사용하여 구현 될 수 있다. 본 출원의 하나 또는 그 이상의 물질 순서의 바람직한 치료 전달은 표적화된 리포솜을 사용하는 것이다.
- [0575] 본 출원에서 개시된 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 유두종, 또는 RNA 바이러스 (가령, 레트로바이러스)를 포함한다. 레트로바이러스 벡터는 쥐과 또는 조류 레트로바이러스의 유도체일 수 있다. 단일 외부 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 예들에는 다음이 포함되나, 이에 제한되지 않는다: 모로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), 하베이 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 및 라우스 육종 바이러스 (RSV). 다수의 또 다른 레트로바이러스 벡터는 복수의 유전자를 포함할 수 있다. 이들 모든 벡터는 선택가능한 표지의 유전자를 전달 또는 포함 하므로, 형질도입된 세포를 동정 및 생성할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예를 들면, 당, 당지질, 또는 단 백질을 부착시킴으로써, 표적-특이적으로 만들어질 수 있다. 바람직한 표적화는 항체를 이용하여 이루어진다. 숙련된 기술자는 특이적 폴리뉴클레오티드 서열을 레트로바이러스 게놈 안에 삽입시키거나 또는 바이러스 외피 에 부착시켜, 본 출원의 하나 또는 그 이상의 물질을 함유하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적 운반이 가능 하다는 것을 인식할 것이다.
- [0576] 대안으로, 조직 배양 세포는 통상적인 인산칼슘 형질감염에 의해 레트로바이러스 구조 유전자 (gag, pol, 및 env)를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포는 관심 대상의 유전자를 함유하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성되는 세포는 레트로바이러스 벡터를 배양 배지로 방출한다.
- [0577] 본 발명의 하나 또는 그 이상의 물질에 대한 또다른 표적화된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로 이드성 분산 시스템은 예를 들면, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 그리고 수중유 유탁액, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 특정 구체예들에 있어서, 본 출원의 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 인공 막 소포로, 시험관내 및 생체내 운반 운반체로 유용하다. RNA, DNA, 및 고유 비리온은 수성 내부에 채집되고, 생물학적 활성 형태로 세포로 운반된다 [Fraley, et al. (1981) Trends Biochem. Sci., 6:77]. 리포솜 비히클을 이용한 효과적인 유전자 전달 방법은 해당 분야에 공지되어 있다.[Mannino, et al. (1988) Biotechniques, 6:682, 1988].
- [0578] 리포솜의 조성물은 통상 인식질의 조합으로, 스테로이드 (가령, 콜레스테롤)를 포함할 수 있다. 리포솜의 물리 적 성질은 pH, 이온 강도 그리고 이가양이온 존재에 따라 달라진다. 다른 인식질 또는 다른 지질이 또한 이용 될 수 있는데, 예를 들면 포스파티딜 화합물 (가령, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포 스파티딜에탄올아민, 스프고리피드, 세레브로시드, 및 강글리오시드), 난 포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티 디콜린, 및 디스테아로일포스파티딜콜린이 포함된다. 리포솜의 표적화는 예를 들면, 장기(organ)-특이성, 세포 -특이성, 및 소기관-특이성에 기반을 두고, 해당 분야에 공지되어 있다.
- [0579] 실시예
- [0580] 지금부터 본 발명이 일반적으로 기술되며, 단지 본 발명의 특정 구체예 및 실시 양태는 예시하기 위한 목적으로 포함되는 것으로, 이에 본 발명을 제한하려는 의도는 아니며, 하기 실시 예를 참조함으로써 보다 용이하게 이해 될 것이다.
- [0581] 실시예 1: ActRIIa-Fc 융합 단백질들
- [0582] 출원인은 인간 또는 마우스 Fc 도메인에, 이들 사이에 링커로 융합된 인간 ActRIIa의 세포외 도메인을 가지는

가용성 ActRIIA 융합 단백질을 작제하였다. 이 작제물들은 각각 ActRIIA-hFc 및 ActRIIA-mFc로서 지칭된다.

ActRIIA-hFc는 CHO 세포주로부터 정제된 것으로 하기와 같이 나타낸다 (서열 번호: 50):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRNTQGTVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV
TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHODWNLNGKEYCKVSKNALPVP~~IEKTI~~SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

ActRIIA-hFc 및 ActRIIA-mFc 단백질들은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3개의 상이한 리더 서열들이 고려되었다:

(i) 꿀벌 멜리틴 (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (서열 번호: 51)

(ii) 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA): MDAMKRG LCCVLLLCGAVFVSP (서열 번호: 52)

(iii) 고유: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (서열 번호: 53).

선택된 형태는 TPA 리더를 사용하며 다음과 같은 프로세스되지 않은 아미노산 서열을 가진다:

MDAMKRGKCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDS
PEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTPQTSNPVTPKPPTGGGHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPVP I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 54)

이 폴리펩티드는 다음 핵산 서열에 의해 인코딩된다:

ATGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCGCGCGCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAG
TGTCTTTTTTAAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCT
GGAAGAATATTTCTGTTCCATTGAATAGTGAACAAGGTGTGGTGGATGATCAACTGCATAGCAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCC
TGAAGTATATTTCTGTGTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAAATCCAGTTACACC
TAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAAACCAAGGA
CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGTCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTT
GCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCACAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGAATTC (서열
번호: 55)

ActRIIA-hFc 및 ActRIIA-mFc 모두는 확실히 재조합 발현이 가능했다. 도 5에 도시된 바와 같이, 단백질은 하나의 잘 정의된 단백질 피크로 정제되었다. N-말단 시퀀싱은 -ILGRSETQE (서열 번호: 56)의 하나의 서열을 나타내었다. 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다. ActRIIA-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피로 측정시 >98%, 그리고 SDS PAGE로 측정시 >95% 순도로 정제되었다.

ActRIIA-hFc 및 ActRIIA-mFc는 리간드들에 대한 높은 친화력을 보였다. GDF-11 또는 액티빈 A를 표준 아민-커플링 절차를 사용하는 Biacore™ CM5 칩 상에 고정시켰다. ActRIIA-hFc 및 ActRIIA-mFc 단백질들을 시스템에 적재하고 결합을 측정하였다. ActRIIA-hFc는 액티빈에 5×10^{-12} 의 해리 상수 (K_D)로 결합되었으며, GDF11에 9.96×10^{-9} 의 K_D 로 결합되었다. 도 6 참고. ActRIIA-mFc는 유사하게 행동하였다.

ActRIIA-hFc는 약동학 연구에서 매우 안정하였다. 래트들에게 1 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 10 mg/kg의 ActRIIA-hFc 단백질을 투여하고, 단백질의 혈장 수준을 24, 48, 72, 144 및 168 시간에 측정하였다. 별도의 연구에서, 래트들에게 1 mg/kg, 10 mg/kg, 또는 30 mg/kg를 투여하였다. 래트에서, ActRIIA-hFc는 11-14일의 혈청 반감기를 가졌으며, 약물의 순환 수준은 2주 후 상당히 높았다 (1 mg/kg, 10 mg/kg, 또는 30 mg/kg의 초기 투여에 관하여 각각 11 µg/ml, 110 (µg/ml), 또는 304 (µg/ml)). 시노몰구스 원숭이들에서, 혈장 반감기는 실질적

으로 14 일 보다 컸으며, 약물의 순환 수준은 1 mg/kg, 10 mg/kg, 또는 30 mg/kg의 초기 투여에 관하여 각각 25 µg/ml, 304 (µg/ml), 또는 1440 (µg/ml)였다.

[0596] 실시예 2: ActRIIA-hFc 단백질의 특성화

[0597] ActRIIA-hFc 융합 단백질은 서열 번호: 52의 조직 플라스미노겐 리더 서열을 사용하여 pAID4 벡터 (SV40 원점/인핸서, CMV 프로모터)로부터 안정하게 형질감염된 CHO-DUKX B11 세포들에서 발현되었다. 상기 실시예 1에서 기재한 바와 같이 정제된 단백질은 서열 번호: 50의 서열을 가졌다. Fc 부위는 서열 번호: 50에 나타난 인간 IgG1 Fc 서열이다. 단백질 분석은 ActRIIA-hFc 융합 단백질이 이황화 결합을 보유한 동형이량체로 형성됨을 나타낸다.

[0598] CHO-세포-발현된 물질은 인간 293 세포들에서 발현된 ActRIIA-hFc 융합 단백질에 대해 보고되었던 친화력보다 액티빈 B 리간드에 대해 더 높은 친화력을 가진다 [del Re 외. (2004) J Biol Chem. 279(51):53126-53135 참조]. 또한, TPA 리더 서열을 사용하여 다른 리더 서열들 보다 더 많이 제조하였으며 고유 리더를 사용하여 발현된 ActRIIA-Fc와 달리, 매우 순도 높은 N-말단 서열을 제공하였다. 고유 리더 서열을 사용하여 각각 상이한 N-말단 서열을 가지는 ActRIIA-Fc의 2가지 주요 종들을 생성하였다.

[0599] 실시예 3: 대체 ActRIIA-Fc 단백질들

[0600] 본 명세서에 기재된 방법들에 따라 사용될 수 있는 다양한 ActRIIA 변이체들은 W02006/012627로 공개된 국제 특허 출원에 기재되어 있으며 (예컨대, pp. 55-58 참조), 이 문헌의 전문은 본 명세서에 참고로 포함된다. 대안적 작제물은 C-말단 꼬리 (ActRIIA의 세포외 도메인의 마지막 15개 아미노산)의 결실을 가질 수 있다. 이러한 작제물에 관한 서열을 하기에 나타낸다 (Fc 부위 밑줄) (서열 번호: 57):

[0601] ILGRSETQECLFFNANWEKDRNTQTVGEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCKEFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0602] 실시예 4: ActRIIB-Fc 융합 단백질들의 생성

[0603] 출원인은 인간 또는 마우스 Fc 도메인에, 이들 사이에 링커(3개의 글리신 아미노산)로 융합된 인간 ActRIIB의 세포외 도메인을 가지는 가용성 ActRIIB 융합 단백질을 작제하였다. 이 작제물들은 각각 ActRIIB-hFc 및 ActRIIB-mFc로서 지칭된다.

[0604] ActRIIB-hFc는 CHO 세포주로부터 정제된 것으로 하기와 같이 나타낸다 (서열 번호: 58):

[0605] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0606] ActRIIB-hFc 및 ActRIIB-mFc 단백질들은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3개의 상이한 리더 서열들이 고려되었다: (i) 꿀벌 멜리틴 (HBM), ii) 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA), 및 (iii) 고유: MGAAKLAFVFLISCSGA (서열 번호: 59).

[0607] 선택된 형태는 TPA 리더를 사용하며 다음과 같은 프로세스되지 않은 아미노산 서열을 가진다 (서열 번호: 60):

[0608] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0609] 이 폴리펩티드는 다음 핵산 서열 (서열 번호: 61)에 의해 인코딩된다:

[0610] A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG
AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG GCTAGATGAC TTCAACTGCT
ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC

ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCGCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
CAGCACTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA
AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGCG ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA
CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTTCTCTC TATAGCAAGC
TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

- [0611] CHO-세포-제조된 물질의 N-말단 시퀀스는 -GRGEAE (서열 번호: 62)의 주요 서열을 나타내었다. 명백하게, 문헌에 기재된 다른 작제물들은 -SGR... 서열로 시작한다.
- [0612] 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.
- [0613] ActRIIB-Fc 융합 단백질은 또한 HEK293 세포들 및 COS 세포들에서 발현되었다. 모든 세포주 및 합당한 배양 조건들로부터 얻은 물질은 *생체내* 근육형성 활성을 가진 단백질을 제공하였으나, 아마도 세포주 선택 및/또는 배양 조건들과 관련하여 효능의 변동성이 관찰되었다.
- [0614] 출원인들은 ActRIIB의 세포의 도메인에서 일련의 돌연변이를 제조하였으며 세포의 ActRIIB와 Fc 도메인 사이에 가용성 융합 단백질로서 이들 돌연변이 단백질을 제조하였다. 기준 ActRIIB-Fc 융합은 서열 번호: 58의 서열을 가진다.
- [0615] N- 및 C-말단 절두들을 비롯한 다양한 돌연변이가 기준 ActRIIB-Fc 단백질에 도입되었다. 본 명세서에 제시된 데이터에 기초하여, TPA 리더를 사용하여 발현되는 경우 이들 작제물들은, N-말단 세린이 없을 것으로 예상된다. PCR 돌연변이유발에 의해 ActRIIB 세포의 도메인에 돌연변이들을 생성하였다. PCR 후, 단편들을 Qiagen 컬럼을 통해 정제하고, SfoI 및 AgeI로 분해하고 겔 정제하였다. 이들 단편들을 발현 벡터 pAID4 (WO2006/012627 참고)에 결합시켜, 결합시 인간 IgG1을 가지는 융합 키메라를 생성하였다. 대장균 (E. coli) M50 알파로 형질전환시, 집락들을 채취하여 DNA를 분리하였다. 쥐과 작제물 (mFc)을 위해, 인간 IgG1을 쥐과 IgG2a로 치환하였다. 모든 돌연변이들의 서열들을 확인하였다.
- [0616] 모든 돌연변이들이 일과성 형질감염에 의해 HEK293T 세포들에서 제조되었다. 요약하면, 500ml 스피너에서, HEK293T 세포들을 250ml 부피의 프리스타일 (Invitrogen) 배지에 6×10^5 세포들/ml로 셋업하고 하룻밤 성장시켰다. 다음날, 이들 세포들을 0.5 ug/ml의 최종 DNA 농도의 DNA:PEI (1:1) 복합체로 처리하였다. 4시간 후, 250 ml 배지를 추가하고 세포들을 7일 동안 성장시켰다. 세포들을 회전시켜 조정 배지를 수집하고 농축시켰다.
- [0617] 돌연변이들을, 예를 들면, 단백질 A 컬럼을 비롯한 다양한 기법들로 정제하고, 저 pH (3.0)의 글리신 완충액으로 용리시켰다. 중성화처리 후, 이들을 PBS에 대해 투석시켰다.
- [0618] 돌연변이들을 또한 유사한 방법으로 CHO 세포들에서 제조하였다. 돌연변이들을 WO 2008/097541 및 WO 2006/012627에 기재된 결합 분석 및/또는 생물분석법으로 테스트하였으며, 이 문헌들은 본 출원에 참고문헌으로 포함된다. 일부 예들에서, 분석은 정제된 단백질들 보다는 조정 배지로 수행되었다. 또 다른 ActRIIB의 변이체들이 미국 특허 7,842,663호에 기재되어 있다.
- [0619] 출원인은 ActRIIB(25-131)-hFc 융합 단백질을 생성하였는데, 이는 고유 ActRIIB 리더에 대해 치환된 TPA 리더 서열이 N-말단에 그리고 최소 링커 (3개의 글리신 잔기들)를 통해 인간 Fc 도메인이 C-말단에 융합된, 말단 및 C-말단 절두 (고유 단백질 서열 번호: 1의 잔기들 25-131)된 인간 ActRIIB 세포의 도메인을 포함한다 (도 7, 서열 번호 123). 이러한 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 도 8에 나타낸다 (코딩은 서열 번호: 124 그리고 상보적 가닥은 서열 번호: 125). 코돈들은 변형되었으며 초기 형질전환 발현 수준의 실질적 개선을 제공하였던 ActRIIB(25-131)-hFc 단백질을 인코딩하는 변이체 핵산이 발견되었다 (도 9; 코딩은 서열 번호: 126 그리고 상보적 가닥은 서열 번호: 127).
- [0620] 성숙 단백질은 다음과 같은 아미노산 서열을 가진다 (N-말단은 N-말단 시퀀스에 의해 확인됨)(서열 번호: 63):
- [0621] ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

[0622] KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV

[0623] TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

[0624] VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

[0625] WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQ

[0626] VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV

[0627] DKSRWQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPGK

[0628] 아미노산 1-107은 ActRIIB에서 유래한 것이다.

[0629] 발현된 분자를, 예를 들면, 다음 중 3 또는 그 이상을 임의의 순서로 포함하는, 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계를 사용하여 정제하였다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.

[0630] ActRIIB(25-131)-hFc 및 이의 전장 대응 (counterpart) ActRIIB(20-134)-hFc에 대한 몇 가지 리간드들의 친화력들을 Biacore™ 장치로 시험관내 평가하였으며, 그 결과를 아래 표에 요약한다. Kd값들은, k_{on} 및 k_{off} 를 정확하게 결정하지 못하게 하는 복합체의 매우 신속한 결합 및 해리로 인해 정상-상태 친화력 적함에 의해 수득되었다. ActRIIB(25-131)-hFc는 액티빈 A, 액티빈 B, 및 GDF11을 높은 친화력으로 결합시켰다.

[0631] ActRIIB-hFc 형태들의 리간드 친화력:

융합 작제물	액티빈 A (e-11)	액티빈 B (e-11)	GDF11 (e-11)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
ActRIIB(25-131)-hFc	1.8	1.2	3.1

[0632]

[0633] 실시예 5: GDF 트랩의 생성

[0634] 출원인들은 다음과 같이 GDF 트랩을 작제하였다. (서열 번호:1의 위치 79에서 류신이 아스파르테이트로 치환된 결과로서) GDF11 및/또는 미오스타틴에 비해 상당히 감소된 액티빈 A 결합을 가지는 ActRIIB의 변형된 세포외 도메인을 가지는 폴리펩티드 (L79D 치환을 가지는 서열 번호: 1의 아미노산 20-134)는 사이에 최소 링커 (3개의 글리신 아미노산)로 인간 또는 마우스 Fc 도메인에 융합되었다. 이 작제물들은 각각 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 및 ActRIIB(L79D 20-134)-mFc로 지칭된다. 위치 79에 아스파르테이트가 아닌 글루타메이트를 이용한 대안적 형태들을 유사하게 실시하였다 (L79E). 서열 번호: 64에 있어서 위치 226에 발린이 아닌 알라닌을 이용한 하기 대안적 형태들을 또한 생성하였으며 모든 면에서 동등하게 테스트를 수행하였다. (서열 번호: 1에 관하여, 또는 서열 번호: 64에 대하여 위치 60) 아스파르테이트가 아래 이중 밑줄로 표시된다. 서열 번호: 64에 대하여 위치 226의 발린 또한 아래 이중 밑줄로 표시된다.

[0635] CHO 세포주 (서열 번호: 64)로부터 정제된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc를 아래 나타낸다.

[0636] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCENFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0637] GDF 트랩의 ActRIIB-유래 부위는 아래 제시된 아미노산 서열을 가지며 (서열 번호: 65), 이 부위는 단량체로서 또는 단량체, 이량체, 또는 그 이상 차수의 복합체와 같은 비-Fc 융합 단백질로서 사용될 수 있을 것이다.

[0638] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCENFCNERFTHLPEAGG

PEVTYEPPTAPT (서열 번호: 65)

[0639] GDF 트랩 단백질은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3개의 상이한 리더 서열들이 고려되었다:

[0640] (i) 꿀벌 벨리틴 (HBML), (ii) 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA), 및 (iii) 고유.

[0641] 선택된 형태는 TPA 리더를 사용하며 다음과 같은 프로세스되지 않은 아미노산 서열을 가진다:

[0642] MDAMKRGLLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWDDDFNCYDRQECVATEEN
PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (서열 번호: 66)

[0643] 이 폴리펩티드는 다음 핵산 서열 (서열 번호: 67)에 의해 인코딩된다:

[0644] A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG
 AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT
 ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCGCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA
 AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCACATGA GAAAACCATC TCCAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA
 CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTGTGTA AAGGCTTCTA TCCGACGCAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTTCTCTC TATAGCAAGC
 TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0645] 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다. 정제 도식의 한 예에서, 세포 배지를 단백질 A 컬럼을 통해 통과시키고, 150 mM Tris/NaCl (pH 8.0)로 세정한 후, 50 mM Tris/NaCl (pH 8.0)로 세정하고; pH 3.0의 0.1 M 글리신으로 용리시킨다. 바이러스 제거 단계로서 낮은 pH의 용리액을 실온에서 30분 동안 유지시킨다. 그 후 용리액을 중화시키고 Q-세파로즈 이온-교환 컬럼을 통과시키고 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl로 세척하고 150 mM 내지 300 mM 농도의 NaCl과 함께 50 mM Tris pH 8.0로 용리시킨다. 그 후 용리액을 50 mM Tris pH 8.0, 1.1 M 암모늄 설페이트로 교환하고 페닐 세파로즈 컬럼을 통과시키고, 세척하고, 150 내지 300 mM의 암모늄 설페이트와 함께 50 mM Tris pH 8.0에서 용리시킨다. 사용하기 위해 이 용리액을 투석하고 여과시킨다.

[0646] 또 다른 GDF 트랩 (미오스타틴 또는 GDF11 결합에 비해 액티빈 A 결합의 비율을 감소시키기 위해 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질)은 WO 2008/097541 및 WO 2006/012627에 기재되어 있으며, 이 문헌들은 본 출원에 참고로 포함된다.

[0647] 실시예 6: GDF-11- 및 액티빈-매개 신호전달에 관한 생물학적분석법

[0648] A-204 리포터 유전자 분석법을 사용하여 GDF-11 및 액티빈 A에 의한 신호전달에 대한 ActRIIB-Fc 단백질들 및 GDF 트랩의 효과를 평가하였다. 세포주: 인간 횡문근육종 (근육에서 유래함). 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12 (Dennler 외, 1998, EMBO 17: 3091-3100에 기재). CAGA12 모티프는 TGFβ-반응성 유전자 (예컨대, PAI-1 유전자)에 존재하며, 이 벡터는 SMAD2 및 SMAD3을 통한 신호생성 인자에 일반적으로 사용된다.

[0649] 1일차: 48-웰 플레이트에 A-204 세포를 분열시킨다.

[0650] 2일차: A-204 세포는 10 ug pGL3(CAGA)12 또는 pGL3(CAGA)12(10 ug)+pRLCMV (1 ug) 및 Fugene로 형질감염시킨다.

[0651] 3일차: 인자들을 추가한다 (배지+0.1% BSA로 희석됨). 억제제는 세포에 추가하기 전, 1 시간 동안 인자들로 사전 배양될 필요가 있다. 6시간 후, 세포들을 PBS로 행구고 용해시켰다.

[0652] 루시퍼라제 분석이 후속된다. 어떠한 억제제들도 없이, 액티빈 A는 리포터 유전자 발현의 10-배 자극 및 ED50 ~ 2 ng/mL을 보였다. GDF-11: 16배 자극, ED50: ~ 1.5 ng/mL.

[0653] ActRIIB(20-134)는 이 분석법에서 액티빈 A, GDF-8, 및 GDF-11 활성화의 효능있는 억제제이다. 하기 설명하는 바와 같이, ActRIIB 변이체들을 또한 이 분석법으로 테스트하였다.

[0654] 실시예 7: ActRIIB-Fc 변이체들, 세포-기반 활성화

[0655] ActRIIB-Fc 단백질들 및 GDF 트랩의 활성을 상기 기재한 바와 같은 세포-기반 분석법으로 테스트하였다. 연구 결과를 하기 표에 요약한다. 일부 변이체들을 상이한 C-말단 절두 작제물들에서 테스트하였다. 상기 논의한 바와 같이, 5개 또는 15개 아미노산의 절두는 활성 감소를 유발하였다. GDF 트랩 (L79D 및 L79E 변이체들)은 GDF-11의 야생형 억제를 거의 유지하면서 액티빈 A 억제를 실질적으로 소실함을 보여주었다.

[0656] **GDF11 및 액티빈 A에 대한 가용성 ActRIIB-Fc 결합:**

ActRIIB-Fc 변이체	(서열 번호:1 의 아미노산에 대응하는) ActRIIB 의 부분	GDF11 억제 활성	액티빈 억제 활성
R64	20-134	+++ (대략. 10^{-8} M K_i)	+++ (대략. 10^{-8} M K_i)
A64	20-134	+ (대략. 10^{-6} M K_i)	+ (대략. 10^{-6} M K_i)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+

[0657]

R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

[0658]

[0659] + 열등한 활성 (대략 1×10^{-6} K_i)

[0660] ++ 중등도 활성 (대략 1×10^{-7} K_i)

[0661] +++ 우수한 (야생형) 활성 (대략 1×10^{-8} K_I)

[0662] ++++ 야생형 활성 보다 큼

[0663] 실시예 8: GDF-11 및 액티빈 A 결합.

[0664] 특정 ActRIIB-Fc 단백질 및 GDF 트랩의 리간드들에 대한 결합을 Biacore™ 분석법에서 테스트하였다.

[0665] ActRIIB-Fc 변이체들 또는 야생형 단백질을 항-hFc 항체를 사용하여 상기 시스템 상에서 채집하였다. 리간드들을 주입하고 채집된 수용체 단백질을 위로 흐르게 하였다. 결과를 하기 표에 요약한다.

[0666] 리간드-결합 특이성 IIB 변이체들.

	GDF11		
단백질	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1.21e-6	6.35e-5	5.19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.77e-5	2.41e-5	3.56e-11
	GDF8		
단백질	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2.25e-5	4.71e-5	2.1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9

[0667]

ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11
액티빈 A			
단백질	k_온 (1/Ms)	k_{오프} (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			낮은 결합
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			낮은 결합
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7.46e6	6.28e-4	8.41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11

[0668]

[0669]

세포-유리 분석법에서 얻은 이러한 데이터들은, A24N 변이체가 ActRIIB(20-134)-hFc 분자와 유사한 리간드-결합 활성을 유지하며 L79D 또는 L79E 분자는 미오스타틴 및 GDF11 결합을 유지하지만 액티빈 A에 대하여 현저히 감소된 (정량불가) 결합을 보여줌을 입증하는 세포-기반 분석법 데이터를 확인시켜준다.

[0670]

W02006/012627에 기재된 바와 같이, 다른 변이체들을 생성하고 테스트하였다 (이 문헌의 전문은 본 출원에 참고로 포함됨). *예컨대*, pp. 59-60, 상기 장치에 커플링된 리간드들을 사용하고 커플링된 리간드들 위에 수용체를 흐르게 하는 것을 참조하라. 특히, K74Y, K74F, K74I (그리고 아마도 K74에서 다른 소수성 치환, 가령, K74L), 및 D80I는, 야생형 K74 분자에 비해, GDF11 결합에 대한 액티빈 A (ActA) 결합 비율의 감소를 유발하였다. 이들 변이체들에 관한 데이터의 표를 하기에 다시 만든다:

[0671] GDF11 및 액티빈 A에 대한 가용성 ActRIIB-Fc 변이체들 결합 (Biacore™ 분석법)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	해당없음	KD= 8.6e-8M (+++)
+15 꼬리	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M +++++	KD=5.3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--

[0672]

K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

[0673]

[0674] * 결합 관찰되지 않음

[0675] -- < 1/5 WT 결합

[0676] - ~ 1/2 WT 결합

- [0677] + WT
- [0678] ++ < 2x 증가된 결합
- [0679] +++ ~5x 증가된 결합
- [0680] ++++ ~10x 증가된 결합
- [0681] +++++ ~ 40x 증가된 결합

[0682] 실시예 9: 절두된 ActRIIB 세포외 도메인을 보유한 GDF 트랩의 생성

[0683] 류신의 아스파르테이트로의 치환 (서열 번호:1의 잔기 79에서)을 내포하는 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호:1의 잔기들 20-134)에 TPA 리더를 N-말단 융합시키고 최소 링커 (3개의 글리신 잔기들)로 인간 Fc 도메인을 C-말단 융합시켜 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc로 지칭되는 GDF 트랩을 생성하였다 (도 10; 서열 번호: 128). 이러한 융합 단백질에 상응하는 뉴클레오티드 서열은 도 11에 나타난다 (서열 번호: 129, 센스 가닥; 그리고 서열 번호: 130, 안티센스 가닥).

[0684] 류신의 아스파르테이트로의 치환 (서열 번호:1의 잔기 79에서)을 내포하는 절두된 세포외 도메인 (서열 번호:1의 잔기들 25-131)에 TPA 리더를 N-말단 융합시키고 링커 (3개의 글리신 잔기들)로 인간 Fc 도메인을 C-말단 융합시켜 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc로 지칭되는 절두된 ActRIIB 세포외 도메인의 GDF 트랩을 생성하였다 (도 12, 서열 번호: 131). ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 세포 정제된 형태의 서열은 도 13에 제시되며 (서열 번호: 132) 리더없는 성숙 세포외 도메인, 링커 또는 Fc 도메인은 도 14에 제시된다 (서열 번호: 133). 이러한 융합 단백질을 인코딩하는 하나의 뉴클레오티드 서열을 그 상보적 서열 (서열 번호: 135)과 함께 도 15에 도시하고 (서열 번호: 134), 정확하게 동일한 융합 단백질을 인코딩하는 대체 뉴클레오티드 서열을 그 상보적 서열 (서열 번호: 137)과 함께 도 16에 도시한다 (서열 번호: 136).

[0685] 실시예 10: 이중-절두된 ActRIIB 세포외 도메인을 보유하는 GDF 트랩에 의한 선택적 리간드 결합

[0686] 몇 가지 리간드들에 대한 GDF 트랩 및 다른 ActRIIB-hFc 단백질들의 친화력을 Biacore™ 장치로 시험관내에서 평가하였다. 연구 결과를 하기 표에 요약한다. K_d값들은, K_{on} 및 K_{off}를 정확하게 결정하지 못하게 하는 복합체의 매우 신속한 결합 및 해리로 인해 정상-상태 친화력 적합에 의해 획득되었다.

[0687] **ActRIIB-hFc 변이체들의 리간드 선택성:**

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

[0688]

[0689] 절두된 세포외 도메인, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc을 보유하는 GDF 트랩은, 보다 긴 변이체인, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc에 의해 나타났던 리간드 선택성과 동일하거나 이를 능가하며, L79D 치환이 없는 ActRIIB-hFc 대응물에 비해 액티빈 A 결합이 두드러지게 소실되고, 액티빈 B 결합이 부분적으로 소실되고, GDF11 결합이 거의 완전히 유지된다. 절두 단독 (L79D 치환 없음)은 본 출원에서 나타났던 리간드에서 선택성을 변화시키지 않았음을 유념하라 [ActRIIB(L79 25-131)-hFc를 ActRIIB(L79 20-134)-hFc와 비교]. ActRIIB(L79D 25-131)-hFc는 또한 Smad 2/3 신호전달 리간드 GDF8 및 Smad 1/5/8 리간드들 BMP6 및 BMP10에 대하여 강한 내지 중간의 결합을 유지시킨다.

[0690] 실시예 11: ActRIIB5로부터 유도된 GDF 트랩

[0691] ActRIIB 막경유 도메인을 포함하여 엑손 4가 상이한 C-말단 서열로 대체되어 있는 ActRIIB의 대안적 가용성 형태 (ActRIIB5로 표시)가 보고된 바 있다 (예컨대, WO 2007/053775 참조).

- [0692] 리더가 없는 고유 인간 ActRIIB5의 서열은 다음과 같다:
- [0693] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
- [0694] KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
- [0695] TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGAHE (서열 번호: 68)
- [0696] 다음 서열을 가지는 변이체 ActRIIB5(L79D)를 삭제하기 위해 기재된 바와 같이 류신의 아스파르테이트로의 치환, 또는 다른 산성 치환이 고유 위치 79에서 이루어질 수 있다:
- [0697] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
- [0698] KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
- [0699] TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGAHE (서열 번호: 69)
- [0700] 이러한 변이체는 TGGG 링커 (한줄 밑줄)로 인간 Fc (이중 밑줄)에 연결되어 다음 서열을 가지는 인간 ActRIIB5(L79D)-hFc 융합 단백질을 생성할 수 있다:
- GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
- KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
- TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
- FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
- STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
- PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
- SKLTVDSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 70).
- [0701]
- [0702] 이러한 삭제물은 CHO 세포들에서 발현될 수 있다.
- [0703] 실시예 12. 마우스에서 ActRIIA-Fc 및 ActRIIB-Fc의 항종양 활성
- [0704] 출원인들은 동계 쥐과 백혈병 모델에서 동형이량체 ActRIIA-Fc (서열 번호: 50의 동형이량체) 및 ActRIIB-Fc (서열 번호: 58의 동형이량체) 융합 단백질들의 잠재적 항종양 활성을 조사하였다. 7주령의 BALB/c 마우스들을 무작위로 치료에 할당하고 (그룹 당 n = 10) 종양 이식 2일 전에 시작하여 ActRIIA-mFc (10 mg/kg), ActRIIB-mFc (10 mg/kg), 또는 비히클 (포스페이트-완충 식염수, PBS, 5 ml/kg)을 주 2회 복강내 처리하였다. 0일차에, 각 마우스에 PBS (100 μ L)에 현탁시킨 1×10^6 RL σ 1 (RL수컷1) 세포들을 피하에 접종하였다. RL수컷1은 BALB/c 유래의 x-선-유도 백혈병이고 (Sato H et al., 1973, J Exp Med 138:593-606), 세포들을 일본 MEXT사의 National BioResource Project를 통해 RIKEN BRC (BioResource Center) 세포 은행에서 얻었으며, 본 연구에서 사용하기 위해 서브클로닝하였다. 마우스에 접종 후, 체중 및 종양 부피를 주 2회 측정하였다. 캘리퍼스를 이용하여 얻은 2차원 측정치들로부터 다음과 같이 종양 부피를 계산하였다: 종양 부피 (mm^3) = $(L \times W \times W)/2$, 여기서 L 및 W는 각각 종양 길이 및 폭 (mm)이다. 완전 종양 퇴행 및 무-종양 생존은 모두 Teicher BA (ed) Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval; Humana Press, 1997에 따라 정의되었다. 로컬 IACUC 규정에 따르면, 생존 분석에 사용되는 변수들은 2000 mm^3 보다 큰 종양 부피, 20% 보다 큰 체중 감소, 또는 뒷다리 마비이다. 상이한 그룹들의 생존 곡선들을 생존 중앙값으로 뿐만 아니라 GraphPad Prism 5 소프트웨어를 사용하는 로그 순위 (Mantel-Cox) 검정법으로 비교하였다.

[0705] 하기 표에 나타난 바와 같이, ActRIIA-mFc 및 ActRIIB-mFc는 항종양 활성을 나타내었다.

테스트 제품	계통	n	용량 (mg/kg)	경로	일정	무종양 % (56 일차)	생존 중앙값 (일)	로그- 순위 검정 (P 값)
비히클	BALB/c	10	--	i.p.	biw	0	14.5	--
ActRIIA-mFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	20	21.5	0.008
ActRIIB-mFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	20	32.5	< 0.0001

[0706]

[0707] ActRIIA-mFc 또는 ActRIIB-hFc로 치료한 결과 56일차에 비히클-처리 마우스 중에는 무-종양 상태가 없는 것과 비교하여 10 마리 중 2 마리 마우스 (20%)가 무-종양 상태였다. 증가된 생존 중앙값 및 로그-순위 검정법에서의 높은 유의도 (표 참조)는 또한 ActRIIA-mFc 및 ActRIIB-mFc 각각이 종양-보유 마우스의 생존을 촉진시켰음을 나타낸다. ActRIIB-mFc-처리된 마우스 중 50%가 34일차에 완전 종양 퇴행을 보였으며 이에 비해 비히클-처리된 그룹에서는 완전 종양 퇴행이 전혀 없었음을 볼 때 ActRIIB-mFc에 대한 초기 반응이 특히 강력하였다. 이러한 결과는 ActRIIA-mFc 및 ActRIIB-mFc가 생체내에서 항종양 활성을 보유함을 나타낸다. 더욱이, 이러한 데이터는 그 외 다른 ActRII 길항제들이 환자들의 암 및 종양 치료에 유용할 수 있음을 나타낸다.

[0708] 실시예 13 마우스에서 ActRIIA-Fc 및 ActRIIB-Fc의 항종양 활성은 T 세포들을 필요로 한다

[0709] 출원인들은 다음으로 동일한 쥐과 백혈병 모델에서 ActRIIB-hFc가 ActRIIB-mFc와 유사한 항종양 활성을 가지는 지 그리고 항종양 활성이 T 세포-매개 면역성에 따라 달라지는지 여부를 조사하였다. 7주령의 BALB/c 마우스들을 무작위로 치료에 할당하고 (그룹 당 n = 10) 종양 이식 2일 전에 시작하여 ActRIIB-mFc (10 mg/kg), ActRIIB-hFc (10 mg/kg), 또는 비히클 (PBS, 5 ml/kg)을 주 2회 복강내 처리하였다. 또한, 결실성 T 세포 면역을 가지는 7주령의 NCr-누드 마우스를 무작위로 치료에 할당하고 (그룹 당 n = 10) 종양 이식 2일 전에 시작하여 ActRIIB-mFc (10 mg/kg), ActRIIB-hFc (10 mg/kg), 또는 비히클 (PBS, 5 ml/kg)을 주 2회 복강내 처리하였다. 마지막으로, 앞선 실험 동안 대략 7주간 무종양 상태를 유지했던 4마리 마우스 (실시예 12; ActRIIA-mFc로 처리된 2마리 마우스 및 ActRIIB-mFc로 처리된 2마리 마우스)를 항종양 면역 기억에 대해 테스트하기 위하여 본 실험에서 RL수컷1 세포들로 재시험감염시켰다. 0일차에, 각 마우스에 PBS (100 µL)에 현탁시킨 1×10^6 RL ♂1 (RL수컷1) 세포들을 피하에 접종하였다. 마우스에 접종 후, 체중 및 종양 부피를 주 2회 측정하였다. 로컬 IACUC 규정에 따르면, 생존 분석에 사용되는 변수들은 2000 mm³ 보다 큰 종양 부피, 20% 보다 큰 체중 감소, 또는 뒷다리 마비이다.

[0710] 하기 표에 나타나 있는 바와 같이, ActRIIB-mFc 및 ActRIIB-hFc의 항종양 효과들은 마우스 계통에 따라 달랐다.

테스트 제품	계통	n	용량 (mg/kg)	경로	일정	무종양 % (56 일차)	생존 중앙값 (일)	로그- 순위 검정 (P 값)
비히클	BALB/c	10	--	i.p.	biw	0	17	--
ActRIIB- mFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	10	36	0.002
ActRIIB- hFc	BALB/c	10	10	i.p.	biw	30	27.5	0.003
비히클	NCr-누드	10	--	i.p.	biw	0	12	--
ActRIIB- mFc	NCr-누드	10	10	i.p.	biw	0	12	0.07
ActRIIB- hFc	NCr-누드	10	10	i.p.	biw	0	12	0.03
ActRIIA- mFc	BALB/c 재시험감염 마우스	2	--	--	--	100	--	--
ActRIIB- mFc	BALB/c 재시험감염 마우스	2	--	--	--	100	--	--

[0711]

[0712]

앞선 실험에서 관찰된 바와 같이, ActRIIB-hFc 및 ActRIIB-mFc는 면역적격 BALB/c 마우스에서 항종양 활성을 나타내었다. 비히클-처리 마우스는 전혀 무-종양 상태가 없었던 것에 비해 ActRIIB-mFc 또는 ActRIIB-hFc를 이용한 치료는 각각 마우스의 10% 또는 30%를 56일차에 무-종양 상태가 되게 하였다. 증가된 생존 중앙값 및 로그-순위 검정법에서의 높은 유의도 (표 참조)는 또한 ActRIIA-mFc 및 ActRIIB-hFc 각각이 종양-보유 마우스의 생존을 촉진시켰음을 나타내었다. 중요한 것은, NCr-누드 마우스에서 ActRIIB-mFc 및 ActRIIB-hFc의 항종양 효과는 없거나 BALB/c 마우스에 비해 두드러지게 둔화되었는데 (표 참조), 이는 이러한 ActRIIB 리간드의 억제제에 대한 작용 메커니즘에 있어서 T 세포 면역성이 관련됨을 보여준다. 더욱이, 앞선 실험에서 가져온 4마리 무-종양 마우스 모두는 RL수컷1 종양 세포들로 반복 접종하였음에도 불구하고 본 실험 전반에 걸쳐 탐지가능한 종양 성장을 전혀 나타내지 않았다. 이러한 결과들은 면역 세포들이 BALB/c 배경에 대해 ActRIIA-mFc 또는 ActRIIB-mFc를 이용한 치료에 의해 유발된 RL수컷1 종양들의 퇴행을 매개하며, 그리고 효과적인 항종양 면역 반응은 종양 항원들에 대한 면역 기억을 생성시켰다는 추가적인 증거를 제공한다. 종합하면, 이 결과들은 ActRIIB-hFc 및 ActRIIB-mFc의 생체내 항종양 활성을 확인시켜 주며 ActRII 길항제들에 관한 이러한 활성에서 T 세포 면역이 관련되어 있음을 강하게 나타낸다. 그러므로, 데이터는 ActRII 길항제가, 특히, 암을 치료하기 위한 면역항암제로서 면역 활성을 촉진시키기 위하여 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0713]

실시예 14 ALK4: ActRIIB이형이량체의 생성

[0714]

출원인은 인간 ActRIIB 및 인간 ALK4의 세포외 도메인을 포함하는 가용성 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형체 복합체를 작제하였으며, 상기 세포외 도메인 각각은 이 세포외 도메인과 Fc 도메인 사이에 위치한 링커와 함께, 각각 별도로 Fc 도메인에 융합되어 있다. 개별 작제물은 차례로 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드로 지칭되며, 이들 각 서열은 하기에서 제시된다.

[0715]

ActRIIB-Fc 또는 ALK4-Fc 동형이량체 복합체와 반대로, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형체 복합체의 형성을 촉진하는 방법은 비대칭 이형체 복합체 형성을 유도하기 위하여 Fc 도메인의 아미노산 서열에 변경을 도입시키는 것이다. Fc 도메인을 이용하여 비대칭 상호작용 짝을 만드는 많은 상이한 방법들이 본 명세서에서 설명된다.

[0716]

한 가지 방법에서, 차례로 서열 번호: 71 및 73 그리고 서열 번호: 74 및 76의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 폴리펩티드 서열에서 설명된 바와 같이, 하나의 Fc 도메인이 상호작용 면에 있는 양이온 아미노산을 도입시키도록 변경되고, 한편 또다른 Fc 도메인은 이 상호작용 면에 음이온 아미노산을 도입시키도록 변경된다. ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 및 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 각각 조직 플라스미노겐 활성화자 (TPA) 리터를 이용한다.

[0717] ActRIIB-Fc 폴리펩티드 서열 (서열 번호: 71)은 하기에 나타낸다:

```

1   MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQ5
51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열 번호: 71)

```

[0719]

[0720] 리더 (신호) 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 가능한 동형이량체 복합체보다는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 형성을 촉진시키기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (산성 아미노산이 리신으로 대체됨)이 ActRIIB 융합 단백질의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신 (K)이 제거된, 서열 번호: 71의 아미노산 서열이 제공된다.

[0721] 이 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 다음의 핵산 서열 (서열 번호: 72)에 의해 인코딩된다:

```

1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
[0722]
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
[0723]
101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
[0724]
151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
[0725]
201 CTCCTGGGCG AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
[0726]
251 GGCTAGATGA CTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
[0727]
301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
[0728]
351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
[0729]
401 CACCCCGGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
[0730]
451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCTT TCCCCCAAA
[0731]
501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
[0732]
551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
[0733]
601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
[0734]
651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
[0735]
701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
[0736]
751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
[0737]
801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC AAGAACCAGG
[0738]
851 TCAGCCTGAC CTGCTGGTGC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
[0739]
901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
[0740]

```

[0741] 951 CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG

[0742] 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT

[0743] 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG

[0744] 1101 TAAA (서열 번호: 72)

[0745] 성숙 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 73)는 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신(K)이 제거된다.

[0746] 1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

[0747] 51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

[0748] 101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS

[0749] 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS

[0750] 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS

[0751] 251 RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLKSDGSF

[0752] 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKLSLS PGK

[0753] (서열 번호: 73)

[0754] 상보적 형태의 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 74)는 다음과 같다:

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD

51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD

101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF

151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP

201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG

251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY

301 DTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTKSL

351 SLSPG (서열 번호: 74)

[0755]

[0756]

[0757] 리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 상기 서열 번호: 71 및 73의 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 함께 이형 이량체 형성을 유도하기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (리신이 아스파르트산으로 대체됨)이 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인으로 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단에 리신(K)이 추가된, 서열 번호: 74의 아미노산 서열이 제공될 수 있다.

[0758] ALK4-Fc 융합 단백질은 다음 핵산 (서열 번호: 75)에 의해 인코딩된다:

[0759] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC

[0760] 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC

[0761] 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT

[0762] 151 GGGGCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT

[0763] 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
 [0764] 251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
 [0765] 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
 [0766] 351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAACCTACA
 [0767] 401 CATGCCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
 [0768] 451 CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
 [0769] 501 GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
 [0770] 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
 [0771] 601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT
 [0772] 651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
 [0773] 701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
 [0774] 751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT
 [0775] 801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA
 [0776] 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
 [0777] 901 GACACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG
 [0778] 951 CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
 [0779] 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
 [0780] 1051 TCCCTGTCTC CGGGT (서열 번호: 75)

[0781] 상속 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 76)는 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단에 리신(K)이 추가된다.

[0782] 1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
 [0783] 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
 [0784] 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 [0785] 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 [0786] 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
 [0787] 251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP PVLDSGGSFF LYSDLTVDKS
 [0788] 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP G (서열 번호: 76)

[0789] 차례로 서열 번호: 73 및 서열 번호: 76의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 단백질은 CHO 세포계에서 공동-발현되고, 정제되어, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc을 포함하는 이형체 복합체가 생성될 수 있다.

[0790] 비대칭 Fc 융합 단백질을 이용한 이형다량체 복합체들의 형성을 촉진시키는 또다른 방법에서, 차례로 서열 번호: 77 및 78 그리고 서열 번호: 79 및 80의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 폴리펩티드 서열에서 설명된 바와 같이, 상보적 소수성 상호작용과 추가적인 분자간 이황화결합을 도입하도록 Fc 도메인이 변경된다. ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 및 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 각각 조직 플라스미노겐 활성화자 (TPA) 리더를 이용한다.

[0791] ActRIIB-Fc 폴리펩티드 서열 (서열 번호: 77)은 하기에 나타낸다:

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQ S

51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE

101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC

151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV

[0792]

201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV

301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH

[0793]

351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열 번호: 77)

[0794]

리더 (신호) 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 가능한 동형이량체 복합체보다는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 형성을 촉진시키기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (세린이 시스테인으로 그리고 트레오닌이 트립토판으로 대체됨)이 상기 융합 단백질의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신 (K)이 제거된, 서열 번호: 77의 아미노산 서열이 제공된다.

[0795]

성숙 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 다음과 같다:

[0796]

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

[0797]

51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

[0798]

101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS

[0799]

151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS

[0800]

201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC

[0801]

251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLDSDGSF

[0802]

301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

[0803]

(서열 번호: 78)

[0804]

상보적 형태의 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 79) 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신 (K)이 제거될 수 있다.

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD

51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD

[0805]

101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY
 301 KTTTPVLDSG GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL

351 SLSPGK (서열 번호: 79)

리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 상기 서열 번호: 77 및 78의 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 함께 이형 이량체 형성을 유도하기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 4개의 아미노산 치환이 ALK4 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인으로 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신 (K)이 제거된, 서열 번호: 79의 아미노산 서열이 제공된다.

성숙 ALK4-Fc 융합 단백질 서열은 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신(K)이 제거될 수 있다.

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV
 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG
 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL
 251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTTP PVLDSGGSFF LVSKLTVDKS
 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (서열 번호: 80)

차례로 서열 번호: 78 및 서열 번호: 80의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 단백질은 CHO 세포계에서 공동-발현되고, 정제되어, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc을 포함하는 이형체 복합체가 생성될 수 있다.

다양한 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 복합체들의 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.

비대칭 Fc 융합 단백질을 이용한 이형다량체 복합체들의 형성을 촉진시키는 또 다른 방법에서, 차례로 서열 번호: 139-142 및 143-146의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 폴리펩티드 서열에서 설명된 바와 같이, 알짜 분자 전하에 기초하여 정제를 용이하게 하기 위한 두 개의 Fc 도메인들 간의 정전기 차이, 추가적인 분자간 이황화결합, 및 상보적 소수성 상호작용을 도입하도록 Fc 도메인이 변형된다. ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드 및 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 각각 조직 플라스미노겐 활성화자 (TPA) 리더를 이용한다.

[0819] ActRIIB-Fc 폴리펩티드 서열 (서열 번호: 139)은 하기에 나타낸다:

```

1      MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQ5
51     GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101    ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPTAPT GGGTHTCPPC
151    PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201    DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251    APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREMT ENQVSLWCLV KGFYPSDIAV
301    EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351    EALHNHYTQD SLSLSPG (서열 번호: 139)

```

[0820]

[0821] 리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 가능한 동형이량체 복합체보다는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 형성을 촉진시키기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (세린이 시스테인으로 그리고 트레오닌이 트립토판으로 대체됨)이 상기 융합 단백질의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 정제를 용이하게 하기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시한 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (리신이 산성 아미노산들로 대체됨)이 융합 단백질의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단에 리신(K)이 추가된, 서열 번호: 139의 아미노산 서열이 제공될 수 있다.

[0822] ActRIIB-Fc 융합 단백질은 다음 핵산 (서열 번호: 140)에 의해 인코딩된다:

```

[0823] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
[0824] 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
[0825] 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
[0826] 151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
[0827] 201 CTCCTGGGCG AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
[0828] 251 GGCTAGATGA CTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
[0829] 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
[0830] 351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
[0831] 401 CACCCCGGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
[0832] 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAAA
[0833] 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
[0834] 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
[0835] 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
[0836] 651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
[0837] 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
[0838] 751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGCAGC CCCGAGAACC
[0839] 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATGCCGGA GGAGATGACC GAGAACCAGG
[0840] 851 TCAGCCTGTG GTGCCGTGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
[0841] 901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC

```

[0842] 951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
 [0843] 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 [0844] 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGGAC AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
 [0845] 1101 T (서열 번호: 140)

[0846] 성숙 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드는 다음과 같으며 (서열 번호: 141) 선택적으로 C-말단에 추가된 리신이 제공될 수 있다.

[0847] 1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
 [0848] 51 IELVKKG CWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 [0849] 101 GGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 [0850] 151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 [0851] 201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
 [0852] 251 REEMTENQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLDSGDSF
 [0853] 301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTDLSLS PG
 [0854] (서열 번호: 141)

[0855] 이러한 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드는 다음과 같은 핵산 (서열 번호: 142)에 의해 인코딩된다:

[0856] 1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAAC TG
 [0857] 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
 [0858] 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCAACAG CTCTGGCACC
 [0859] 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
 [0860] 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT
 [0861] 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
 [0862] 301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACCGGTGG
 [0863] 351 TGGAATCAC ACATGCCCAC CGTGCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC
 [0864] 401 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC
 [0865] 451 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC
 [0866] 501 TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
 [0867] 551 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
 [0868] 601 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGA CTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG
 [0869] 651 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA
 [0870] 701 AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACACAGG TGTACACCCT GCCCCATGC
 [0871] 751 CGGGAGGAGA TGACCGAGAA CCAGGTCAGC CTGTGGTGCC TGGTCAAAGG
 [0872] 801 CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG
 [0873] 851 AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
 [0874] 901 TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA
 [0875] 951 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC
 [0876] 1001 AGGACAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGT (서열 번호: 142)

[0877] 상보적 형태의 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 (서열 번호: 143) 다음과 같고, 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거될 수 있다.

[0878] 1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC LQANYTCETD
51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSED LRNTHCCYTD
101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG
251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESRGQPENNY
301 KTTTPVLDSR GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351 SLSPGK (서열 번호: 143)

[0879] The 리더 서열 및 링커는 밑줄로 표시된다. 상기 서열 번호: 139 및 141의 ActRIIB-Fc 융합 폴리펩티드와 함께 이형이량체 형성을 유도하기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시된 바와 같이, 4개의 아미노산 치환 (티로신을 시스테인으로, 트레오닌을 세린으로, 류신을 알라닌으로, 그리고 티로신을 발린으로 대체)이 ALK4 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인으로 도입될 수 있다. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 정제를 용이하게 하기 위하여, 상기 이중 밑줄로 표시한 바와 같이, 2개의 아미노산 치환 (아스파라긴을 아르기닌으로 그리고 아스파르테이트를 아르기닌으로 대체)이 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인에 도입될 수 있다. 임의선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거된, 서열 번호: 143의 아미노산 서열이 제공된다.

[0880] ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 핵산 (서열 번호: 144)에 의해 인코딩된다:

[0881] 1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
[0882] 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC CAGGCTCTGC
[0883] 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG TGAGACAGAT
[0884] 151 GGGGCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG AGCACCATGT
[0885] 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG AAGCCCTTCT
[0886] 251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG CTACACTGAC
[0887] 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC TCAAGGAGCC
[0888] 351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT GGAATCACA
[0889] 401 CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
[0890] 451 CTCTTCCCC CAAAACCAA GGACACCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
[0891] 501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
[0892] 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
[0893] 601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTACCGT
[0894] 651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
[0895] 701 ACAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCAA AGCCAAAGGG
[0896] 751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTGCACCTG CCCCATCCC GGGAGGAGAT
[0897] 801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGTCTGCGC CGTCAAAGGC TTCTATCCCA

[0898] 851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCCGCG GGCAGCCGGA GAACAACTAC

[0899] 901 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGA CTCCGCG GGCTCCTTCT TCCTCGTGAG

[0900] 951 CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT

[0901] 1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC

[0902] 1051 TCCCTGTCTC CGGGTAAA (서열 번호: 144)

[0903] 성숙 ALK4-Fc 융합 폴리펩티드 서열은 다음과 같고 (서열 번호: 145) 선택적으로 C-말단으로부터 리신이 제거될 수 있다.

[0904] 1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME HHVRTCIPKV

[0905] 51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG

[0906] 101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD

[0907] 151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN

[0908] 201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPSPR EEMTKNQVSL

[0909] 251 SCAVKGFYPS DIAVEWESRG QPENNYKTP PVLDSESGSF LVSCLTVDKS

[0910] 301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK (서열 번호: 145)

[0911] ALK4-Fc 융합 폴리펩티드는 다음 핵산 (서열 번호: 146)에 의해 인코딩된다:

[0912] 1 TCCGGGCCCC GGGGGGTCCA GGCTCTGCTG TGTGCGTGCA CCAGCTGCCT

[0913] 51 CCAGCCAAC TACACGTGTG AGACAGATGG GGCCTGCATG GTTCCATTT

[0914] 101 TCAATCTGGA TGGGATGGAG CACCATGTGC GCACCTGCAT CCCCAGGTG

[0915] 151 GAGCTGGTCC CTGCCGGGAA GCCCTTCTAC TGCCTGAGCT CGGAGGACCT

[0916] 201 GCGCAACACC CACTGCTGCT AACTGACTA CTGCAACAGG ATCGACTTGA

[0917] 251 GGGTGCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC CATGTGGGGC

[0918] 301 CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCACCGT GCCCAGCACC

[0919] 351 TGAACCTCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCAAGG

[0920] 401 ACACCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC

[0921] 451 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT

[0922] 501 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA

[0923] 551 CGTACCGTGT GGTACGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT

[0924] 601 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT

[0925] 651 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT

[0926] 701 GCACCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG

[0927] 751 TCCTGCGCCG TCAAAGGCTT CTATCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA

[0928] 801 GAGCCGCGGG CAGCCGAGGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG

[0929] 851 ACTCCGCGGG CTCCTTCTTC CTCGTGAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC

[0930] 901 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT

[0931] 951 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAA

[0932] (서열 번호: 146)

[0933] 차례로 서열 번호: 141 및 서열 번호: 145의 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 단백질은 CHO 세포계에서 공동-발현되고, 정제되어, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc을 포함하는 이형체 복합체가 생성될 수 있다.

[0934] 다양한 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 복합체들의 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피, 에피토프-기반 친화력 크로마토그래피 (예컨대, LK4 또는 ActRIIB 상의 에피토프에 대해 지시되는 항체 또는 기능적으로 균등한 리간드 이용), 및 다중모드 크로마토그래피 (예컨대, 정전기 및 소수성 리간드 모두를 내포하는 수지 이용). 상기 정제는 바 이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.

[0935] 실시예 15. ActRIIB-Fc 동형이량체 및 ALK4-Fc 동형이량체와 비교하여 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 리간드 결합 프로파일

[0936] 상기에서 설명된 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체성 복합체의 리간드 결합 선택성을 ActRIIB-Fc 및 ALK4-Fc 동형이량체 복합체의 것과 비교하기 위하여 Biacore™-기반의 결합 분석이 이용되었다. 복합체, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체, ActRIIB-Fc 동형이량체, 및 ALK4-Fc 동형이량체는 항-Fc 항체를 이용하여 상기 시스템에 독립적으로 채집되어 있다. 리간드들을 주입하고, 채집된 수용체 단백질 위로 흐르도록 하였다. 결과는 아래 표에 요약되어 있고, 효과적인 리간드 트랩의 리간드 해리속도(k_d)는 회색 음영으로 나타낸다.

ActRIIB-Fc 동형이량체와 ALK4-Fc 동형이량체와 비교한 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 리간드 결합 프로파일									
리간드	ActRIIB-Fc 동형이량체			ALK4-Fc 동형이량체			ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체		
	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
	(1/Ms)	(1/s)	(pM)	(1/Ms)	(1/s)	(pM)	(1/Ms)	(1/s)	(pM)
액티빈 A	1.2 x10 ⁷	2.3 x10 ⁻⁴	19	5.8 x10 ⁵	1.2 x10 ⁻²	20000	1.3 x10 ⁷	1.5 x10 ⁻⁴	12
액티빈 B	5.1 x10 ⁶	1.0 x10 ⁻⁴	20	결합 없음			7.1 x10 ⁶	4.0 x10 ⁻⁵	6
BMP6	3.2 x10 ⁷	6.8 x10 ⁻³	190	---			2.0 x10 ⁶	5.5 x10 ⁻³	2700
BMP9	1.4 x10 ⁷	1.1 x10 ⁻³	77	---			일과성*		3400
BMP10	2.3 x10 ⁷	2.6 x10 ⁻⁴	11	---			5.6 x10 ⁷	4.1 x10 ⁻³	74
GDF3	1.4 x10 ⁶	2.2 x10 ⁻³	1500	---			3.4 x10 ⁶	1.7 x10 ⁻²	4900
GDF8	8.3 x10 ⁵	2.3 x10 ⁻⁴	280	1.3 x10 ⁵	1.9 x10 ⁻³	15000†	3.9 x10 ⁵	2.1 x10 ⁻⁴	550
GDF11	5.0 x10 ⁷	1.1 x10 ⁻⁴	2	5.0 x10 ⁶	4.8 x10 ⁻³	270†	3.8 x10 ⁷	1.1 x10 ⁻⁴	3
* 상호작용의 일시적 성질로 인한 중간생성물									
† 매우 낮은 신호									
--- 테스트안됨									

[0937]

[0938] 이들 비교 결합 데이터는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc 또는 ALK4-Fc 동형이량체에 대하여 변경된 결합 프로파일/선택성을 갖는다는 것이 실증한다. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 동형이량체와 비교하여 액티빈 B에 대하여 강화된 결합을 보이며, ActRIIB-Fc 동형이량체에서 관찰된 바와 같이, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11에 대하여 강력한 결합을 유지하고, 그리고 BMP9, BMP10, 및 GDF3에 대하여 실질적으로 감소된 결합을 나타낸다. 특히, BMP9는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체에 대하여 낮은 친화력 또는 탐지불가능한 친화력을 나타내고, 한편 이 리간드는 ActRIIB-Fc 동형이량체에 강력하게 결합한다. ActRIIB-Fc 동형이량체와 마찬가지로, 상기 이형이량체는 BMP6에 대하여 중간-수준의 결합을 유지한다. 도 19를 참고하라.

[0939] 또한, A-204 리포터(Reporter) 유전자분석을 이용하여 액티빈 A, 액티빈 B, GDF11, GDF8, BMP10, 및 BMP9에 의한 신호전달에 있어서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체와 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체의 효과를 평가하였

다. 세포주: 인간 횡문근육종 (근육에서 유도). 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12 (Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100에서 설명됨). CAGA12 모티프는 TGF β -반응성 유전자 (예를 들면, PAI-1 유전자)에 존재하며, 이 벡터는 SMAD2 및 SMAD3을 통한 신호생성 인자에 일반적으로 사용된다. 예시적인 A-204 리포터 유전자분석은 하기에 개요가 설명된다.

[0940] 1일차: 48-웰 플레이트에 A-204 세포를 분열시킨다. 2일차: A-204 세포는 10 ug pGL3(CAGA)12 또는 pGL3(CAGA)12(10 ug)+pRLCMV (1 ug) 및 Fugene로 형질감염시킨다.

[0941] 3일차: 인자들을 추가한다 (배지+0.1% BSA로 희석됨). 억제제는 세포에 추가하기 전, 약 한 시간 동안 인자로 사전 배양될 필요가 있다. 약 6시간 후, 세포는 PBS로 행구고, 그 다음 용해된다.

[0942] 상기 단계 후, 출원인은 루시페라제 분석을 시행하였다.

[0943] ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체와 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체는 모두 이 분석에서 액티빈 A, 액티빈 B, GDF11, 및 GDF8의 강력한 억제제로 결정되었다. 특히, 도 19에서 설명된 비교 동형이량체/이형이량체 IC₅₀ 데이터에서 볼 수 있는 바와 같이, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체와 유사하게 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11 신호전달 경로를 억제한다. 그러나, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 BMP9 및 BMP10 신호전달 경로 억제는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하여 상당히 감소된 것이다. 이 데이터는 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체와 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체 모두가 액티빈 B, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11에 강력한 결합을 나타내지만, BMP10 및 BMP9는 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하여, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체에 대하여 상당히 감소된 친화력을 갖는 것으로 관찰된 상가-논의된 결합 데이터와 일치한다.

[0944] 이와 함께, 이들 데이터에서 따라서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하였을 때, 액티빈 B, 액티빈 A, GDF8, 및 GDF11의 더 강한 선택적 길항제임을 실증한다. 이와 함께, 이들 데이터에서 따라서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 ActRIIB-Fc 동형이량체와 비교하였을 때, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF8, 및 GDF11의 더 강한 선택적 길항제임을 실증한다. 따라서, ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체는 특정 용도에서 ActRIIB-Fc 동형이량체보다 더 유용할 것이며, 이때 이러한 선택적 길항작용이 유익하다. 실시예는 하나 또는 그 이상의 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AC, GDF8, 및 GDF11의 길항작용을 유지하지만, 하나 또는 그 이상의 BMP9, BMP10, GDF3, 및 BMP6의 길항작용은 최소화시키는 것이 바람직한 치료 용도를 포함한다.

[0945] 실시예 16. 마우스에서 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 이형이량체의 항종양 활성

[0946] 출원인은 동형이량체 ALK4-Fc 또는 ActRIIB-Fc에 비해 변형된 리간드-결합 프로파일을 나타내는 이형이량체 융합 단백질 ALK4-hFc:ActRIIB-hFc의 잠재적인 항종양 활성을 조사하였다 (상기 참고). 8주령의 BALB/c 마우스들을 무작위로 치료에 할당하고 (그룹 당 n = 10) 종양 이식 2일 전에 시작하여 ALK4-hFc:ActRIIB-hFc (5 mg/kg), 또는 비히클 (PBS, 5 ml/kg)을 주 2회 복강내 처리하였다. 0일차에, 각 마우스에 PBS (100 μ L)에 현탁시킨 1 x 10⁶ RL δ 1 (RL수컷1) 세포들을 피하에 접종하였다. 마우스에 접종 후, 체중 및 종양 부피를 주 2회 측정하였다. IACUC 규정에 따르면, 생존 분석에 사용되는 변수들은 2000 mm³ 보다 큰 종양 부피, 20% 보다 큰 체중 감소, 또는 뒷다리 마비이다.

[0947] 연구 결과를 하기 표에 나타낸다.

테스트 제품	계통	n	용량 (mg/kg)	경로	일정	무종양 % (41 일차)	생존 중앙값 (일)	로그- 순위 검정 (P 값)
비히클	BALB/c	10	--	i.p.	biw	0	17	--
ALK4-hFc: ActRIIB-hFc	BALB/c	10	5	i.p.	biw	40	31	0.004

[0948]

[0949] ALK4-hFc:ActRIIB-hFc 이형이량체로 치료한 결과 41일차에 비히클-처리 마우스 중에는 무-종양 상태가 없는 것과 비교하여 10 마리 중 4 마리 마우스 (40%)가 무-종양 상태였다. 증가된 생존 중앙값 및 로그-순위 검정법에 의한 높은 유의도 (표 참조)는 또한 ALK4-hFc:ActRIIB-hFc이 종양-보유 마우스의 생존을 촉진시켰음을 나타내었

다. 이러한 결과는 이형이량체 ALK4-hFc:ActRIIB-hFc 융합 단백질이 생체내에서 항종양 활성을 보유함을 나타낸다.

[0950] 종합하면, 전술한 결과들은 동형이량체 ActRIIA-Fc, 동형이량체 ActRIIB-Fc, 및 이형화합체 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 융합 단백질 복합체가 암의 설치류 모델에서 항종양 활성을 보유함을 보여준다. 이러한 활성은 최소한 일부 분은 변형된 T 세포 면역성에 의해 매개되는 것으로 보인다. 그러므로 이 데이터는 ActRII 길항제들이 필요로 하는 환자에서 면역 활성을 증가시키며, 특히, 암을 치료하기 위한 면역항암제로서 유용할 수 있음을 나타낸다.

[0951] 실시예 17 마우스 종양 모델에서 ActRIIA/B 항체 단독 및 PD1-PDL1 길항제와 조합시 항종양 활성

[0952] 출원인은 동계 쥐과 백혈병 모델에서 ActRIIA/B 단클론 항체의 잠재적인 항종양 활성을 조사하였다. 7주령의 BALB/c 마우스를 무작위로 치료 그룹에 할당하고 (그룹 당 n = 10) ActRIIA/B 항체 (10 mg/kg), 항-PD1 항체 (3 mg/kg), ActRIIA/B 항체와 항-PD1 항체의 조합물 (10 mg/kg and 3 mg/kg, 각각), 또는 비히클 단독 (PBS, 5 ml/kg; 대조 마우스)을 복강내 처리하였다. 종양 이식 2일 전 마우스를 ActRIIA/B 항체로 처리하였으며 그 후 주 2회 기준으로 처리하였다. 종양 이식 후 마우스들을 3, 6, 및 9일차에 항-PD1 항체로 처리하였다. 0일차에, 각 마우스에 PBS (100 μ L)에 현탁시킨 1×10^6 RL δ 1 (RL δ 1) 세포들을 피하에 접종하였다. RL δ 1은 BALB/c 유래의 x-선-유도 백혈병이고 (Sato H et al., 1973, J Exp Med 138:593-606), 세포들을 일본 MEXT사의 National BioResource Project를 통해 RIKEN BRC (BioResource Center) 세포 은행에서 얻었으며, 본 연구에서 사용하기 위해 서브클로닝하였다. 마우스에 접종 후, 체중 및 종양 부피를 주 2회 측정하였다. 캘리퍼스를 이용하여 얻은 2차원 측정치들로부터 다음과 같이 종양 부피를 계산하였다: 종양 부피 (mm^3) = (L \times W \times W)/2, 여기서 L 및 W는 각각 종양 길이 및 폭 (mm)이다. 로컬 IACUC 규정에 따르면, 생존 분석에 사용되는 변수들은 2000 mm^3 보다 큰 종양 부피, 20% 보다 큰 체중 감소, 또는 뒷다리 마비이다.

[0953] 하기 표에서 보는 바와 같이, 조합 요법은 단일치료제들 중 어느 하나 보다도 암 치료에 있어 보다 큰 놀라운 효과를 가졌다.

테스트 제품	계통	n	용량 (mg/kg)	경로	일정	무종양 % (34 일차)	로그- 순위 검정 (P 값)
비히클	BALB/c	10	--	i.p.	biw	0	--
ActRIIA/B mAb	BALB/c	10	10	i.p.	biw	20	0.06
PD1 mAb	BALB/c	10	3	i.p.	3,6,9 일차	20	0.16
ActRIIA/B mAb + PD1 mAb	BALB/c	10	10; 3	i.p	Biw; 3,6,9 일차	60	0.0002

[0954]

[0955] 각각의 단일요법은 암 치료에 대하여 마우스의 20%가 34일차에 무종양 상태인 보통의 효과를 보였다 (비히클 그룹의 모든 마우스는 20일차에 최대 종양 크기에 도달하였음과 대조). 대조적으로, ActRIIB/A mAb 및 PD-1 mAb 조합물의 치료는 항-종양 활성에 있어서 놀랍고 유의한 증가를 초래하였다. 특히, 조합 요법은 34일차에 마우스의 60%가 무종양 상태인 결과를 가져왔는데, 이는 각각의 별도 효과들의 총합보다 더 큰 것이다. 이러한 유형의 상승작용은 일반적으로 개개의 물질들이 상이한 세포 메커니즘을 통해 작용함에 대한 증거로 간주된다. 종양 부하에 대한 효과의 증가는 또한 조합 요법을 투여받은 마우스에서의 증가된 생존 시간과도 상관관계가 있다. 34일차에, ActRIIA/B mAb 또는 PD1 mAb를 투여받은 마우스 중 단 20% 만이 살아있었다. 대조적으로, ActRIIA/B mAb 및 PD1 mAb 조합 요법을 투여받은 마우스의 60%는 연구 34일차에 여전히 살아있었다.

[0956] 그러므로 상기 데이터는 ActRII 또는 PD1-PDL1 신호전달 경로의 억제에 암 치료에 유용할 수 있으며, 이 두 경로 모두의 억제는 항종양 활성 증가가 바람직한 실험 또는 임상 상황에서 항종양 활성을 상승작용적으로 증가시키기 위해 사용될 수 있음을 증명한다. 예를 들면, 보완적이지만 정의되지는 않은 메커니즘을 통해 작용하는, ActRII 길항제와의 공동 처리는 보다 적은 용량의 PD1-PDL1 길항제로 항종양 효과를 얻을 수 있게 하고, 그 결

과 잠재적인 유해 부작용 또는 보다 높은 수준의 PD1-PDL1 길항제와 관련되는 그 외 다른 문제점들을 없앨 수 있다. 그러므로, 데이터는 ActRII 길항제들이 단독으로, 그러나 특히 암 및 종양을 치료하기 위한 다른 면역요법제와 조합하여 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0957] 참고문헌으로 포함

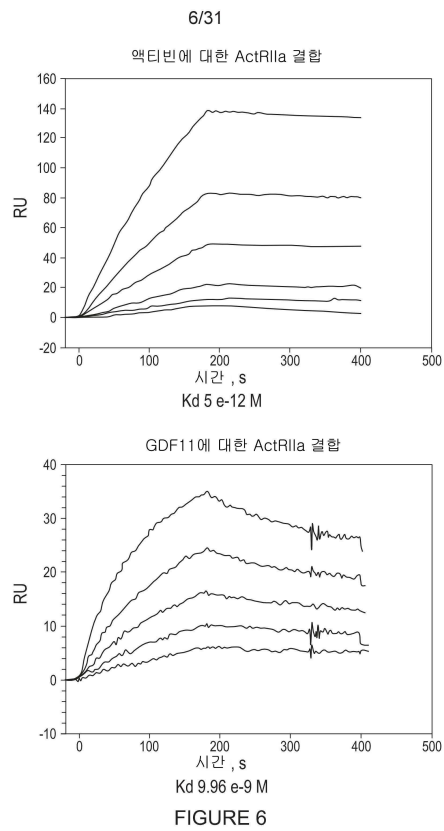
[0958] 여기에 언급 된 모든 간행물 및 특허는 각각의 개별 간행물 또는 특허가 구체적으로 개별적으로 참조로 포함되도록 지시 된 것처럼 본원에 참고로 인용된다. 주제의 특정 실시 예들이 논의되었지만, 상기 명세서는 예시적이고, 이에 한정되지 않는다. 본 명세서 및 청구 범위를 검토시 숙련된 기술자들에게 많은 변형예들이 명백해질 것이다. 본 발명의 전체 범위는 균등물의 전체 범위 및 명세서 그리고 이러한 변형예들과 함께 청구항을 참조하여 결정되어야 한다.

도면

도면1

ActRIIa	ILGRSETQEC	LFFNANWEKD	RTNQTGVEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTNQSGLERC	EGEQDKRLHC	YASWRNSSGT
	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFPPEM
	IELVKKGCWL	DDFNICYDRQE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA
	EVTQPTSNPV	TPKPF			
	GGPEVTYEPP	PTAPT			

도면6



도면7

```

1  MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGAATREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51  EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKQQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (서열 번호 : 123)

```

도면8a

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

A E T R E C I Y Y

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C

101 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S

151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

S G T I E L V K K G C W L D D F

201 CTCTGGCACC TAGGCAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCGAT CTACTGAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V

251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

Y F C C C E G N F C N E R F T H L

301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

P E A G G P E V T Y E P P P T

351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAAGTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAGT CCTGGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

도면8b

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGTTTCT TGGTCCAGTC GGAAGTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CCGCACCTCA CCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC ACAAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTGTA GTTCTGTGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTCTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (서열 번호 : 124)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (서열 번호 : 125)

도면9a

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
                                     A E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGCTTTG GCGCTTACA TAAATAATGT
                                     N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ATGCTAATTG GGAATCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT
   TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA
                                     E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC
   CTCCCCCTTG TCCTATTTCG GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG
                                     S G T I E L V K K G C W L D D F
201 CTCCGGGACG ATTGAAGTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GACGATTTC
   GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCGAC CTGCTAAAGT
                                     N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTTGCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
   TAACAATACT GCGGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG
                                     Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
   ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTAATTGCCA AATGGGTGGA
                                     P E A G G P E V T Y E P P P T
351 CCCCGAAGCC GCGGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCGG CCCACCGGTG
   GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC
401 GTGGAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAGT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGAATTGA GGACCCCTCT
451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT CCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTG CGCACACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG
551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG CCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG
601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCAATG CACACCAGTC
651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA
701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTTCCAGAG GTTGTTCGGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
   TTTGCGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG

```

도면9b

```

801  CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGAAGTGGAG GACCAGTTTC
851  GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC
901  GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTCTGTGTC CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA
951  CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT
1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC
1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (서열 번호 : 126)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (서열 번호 : 127)

```

도면10

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE
 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301 EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열 번호 :128)

도면11a

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCC
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
 TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG
 151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
 CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG
 201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA
 251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC
 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT
 351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
 CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG
 401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAAA
 GGTCTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 TGGGTTCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC
 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC
 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 CTGCCGACCC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT
 651 CAACAGCAGC TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
 GTTGTCTGTC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGTCCTGA
 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTGTGT TCGGGAGGGT
 751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
 CGGGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

도면11b

751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
CGGGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
TGTCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
CTCACCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCGGG
CTCCGAGACG TGTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCCC

1101 TAAATGA (서열 번호 :129)
ATTTACT (서열 번호 :130)

도면12

1 MDAMKRLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC

51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV

101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPPT PTGGGTHTCP PCPAPELLGG

151 PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA

201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS

251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP

301 ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT

351 QKSLSLSPGK (서열 번호 : 131)

도면13

1 ETRECIYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV

101 TYEPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ

251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV

301 DKSRWQQGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (서열 번호 : 132)

도면14

1 E T R E C I Y Y 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 L V K
51 K G C W D 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 G P E V
101 T Y E P P P T (서열 번호 : 133)

도면15a

1 A T G G A T G C A A T G A A G A G A G G G C T C T G C T G T G T G C T G C T G T G T G G A G C
T A C C T A C G T T A C T T C T C T C C C G A G A C G A C A C A C G A C G A C A C A C C T C G
E T R E C I Y Y
51 A G T C T T C G T T T C G C C C G G C G C C G C T G A G A C A C G G G A G T G C A T C T A C T A C A
T C A G A A G C A A A G C G G G C C G C G G C A C T C T G T G C C C T C A C G T A G A T G A T G T
N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 A C G C C A A C T G G G A G C T G G A G C G C A C C A A C C A G A G C G G C C T G G A G C G C T G C
T G C G G T T G A C C C T C G A C C T C G C G T G G T T G T C T C G C C G G A C C T C G C G A C G
E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 G A A G G C G A G C A G G A C A A G C G G C T G C A C T G C T A C G C C T C C T G G C G C A A C A G
C T T C C G C T C G T C C T G T T C G C G A C G T G A C G A T G C G G A G G A C C G C G T T G T C
S G T I E L V K K G C W D D D F
201 C T C T G G C A C C A T C G A G C T C G T G A A G A A G G G C T G C T G G G A C G A T G A C T T C A
G A G A C C G T G G T A G C T C G A G C A C T T C T C C C G A C G A C C C T G C T A C T G A A G T
N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 A C T G C T A C G A T A G G C A G G A G T G T G T G G C C A C T G A G G A G A A C C C C A G G T G
T G A C G A T G C T A T C C G T C C T C A C A C A C C G G T G A C T C C T C T T G G G G T C C A C
Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 T A C T T T C T G C T G C T G T G A A G G C A A C T T C T G C A A C G A G C G C T T C A C T C A T T T
A T G A A G A C G A C G A C A C T T C C G T T G A A G A C G T T G C T C G C G A A G T A G A T A A A
P E A G G P E V T Y E P P P T
351 G C C A G A G G C T G G G G C C C G G A A G T C A C G T A C G A C C A C C C C G A C A G G T G
C G G T C T C C G A C C C C G G G C T T C A G T G C A T G C T C G G T G G G G G C T G T C C A C
401 G T G G A A C T C A C A C A T G C C C A C C G T G C C C A G C A C C T G A A C T C C T G G G G G G A
C A C C T T G A G T G T G T A C G G G T G G C A C G G G T C G T G G A C T T G A G G A C C C C C T
451 C C G T C A G T C T T C C T C T T C C C C C A A A A C C C A A G G A C A C C C T C A T G A T C T C
G G C A G T C A G A A G G A G A A G G G G G T T T T G G G T T C C T G T G G G A G T A C T A G A G
501 C C G G A C C C C T G A G G T C A C A T G C G T G G T G G A C G T G A C C A C G A A G A C C
G G C C T G G G G A C T C C A G T G T A C G C A C C A C C A C C T G C A C T C G G T G C T T C T G G
551 C T G A G G T C A A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G C G T G G A G G T G C A T A A T G C C
G A C T C C A G T T C A A G T T G A C C A T G C A C C T G C C G C A C C T C C A C G T A T T A C G G

도면15b

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CGTTCCAGAG GTTGTTCG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGAAGTGGAC GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC AACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTTGA TGTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (서열 번호: 134)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (서열 번호: 135)

도면16a

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

E T R E C I Y Y

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTTG GGCGCTTACA TAAATAATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C

101 ATGCTAATTG GGAACCTCGAA CCGACGAAAC AATCCGGGCT CGAACGGTGT
TACGATTAA CTTTGAAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S

151 GAGGGGGAAC AGGATAAAGC CTTCCATTGC TATGCTCTGT GGAGGAACCTC
CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

S G T I E L V K K G C W D D D F

201 CTCCGGGACG ATTGAACCTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTC
GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V

251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGCA CCGAAGAGAA TCCGAGGTG
TAACAATACT GCGGCTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

Y F C C C E G N F C N E R F T H L

301 TATTTCTGTT GTTGGGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
ATAAAGACA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTAATTGCCA AATGGGTGGA

P E A G G P E V T Y E P P P T

351 CCCGGAAGCC GCGGGGCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CCGACCGGTG
GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGG GGTGCGCCAC

401 GTGGAACCTA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT CCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
GGCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

도면16b

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGAAGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC AACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTTGA TGTCTTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (서열 번호 : 136)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (서열 번호 : 137)

도면17

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAAGTCGAA CGGACGAACC

AATCCGGGCT CGAACGTGT GAGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCTCGT

GGAGGAACTC CTCGGGACG ATTGAAGTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGAATTCA

ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT

GTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGCT TTACCCACCT CCCGGAAGCC GGCGGCCCG

AGGTGACCTA TGAACCCCG CCACC (서열 번호 : 138)

도면18

```

IgG1  -----THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF  53
IgG4  ---ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQF  57
IgG2  -----VECPPCPAPFVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF  51
IgG3  EFKSCDTPPPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF  60

      **  ***  .  *  *****:*****:*****:

IgG1  NQYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  113
IgG4  NQYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT  117
IgG2  NQYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT  111
IgG3  KQYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  120

      .:*****:***:*****:*****:*****:***:..***

IgG1  ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  173
IgG4  ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  177
IgG2  ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  171
IgG3  ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP  180

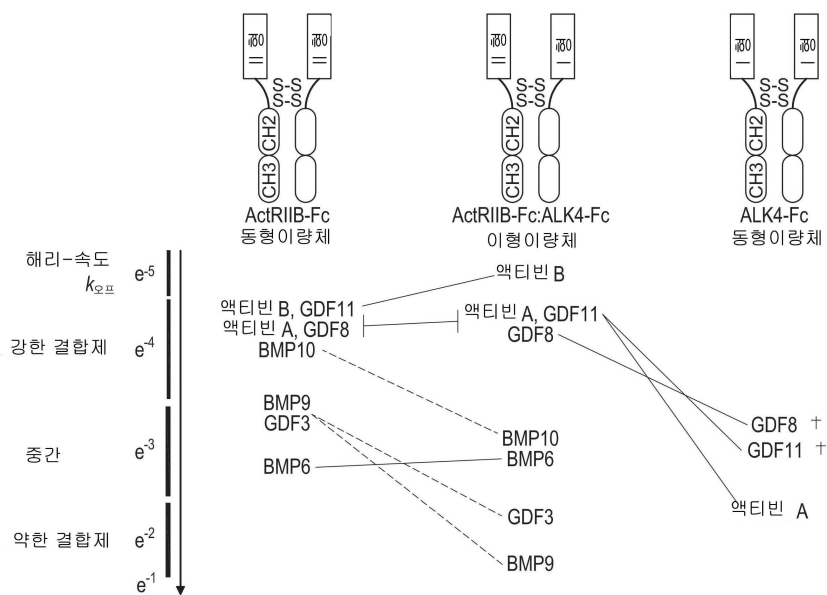
      ***:*****:*****:*****:*****:*****:***

IgG1  PVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  225
IgG4  PVLDSGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  229
IgG2  PMLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  223
IgG3  PMLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK  232

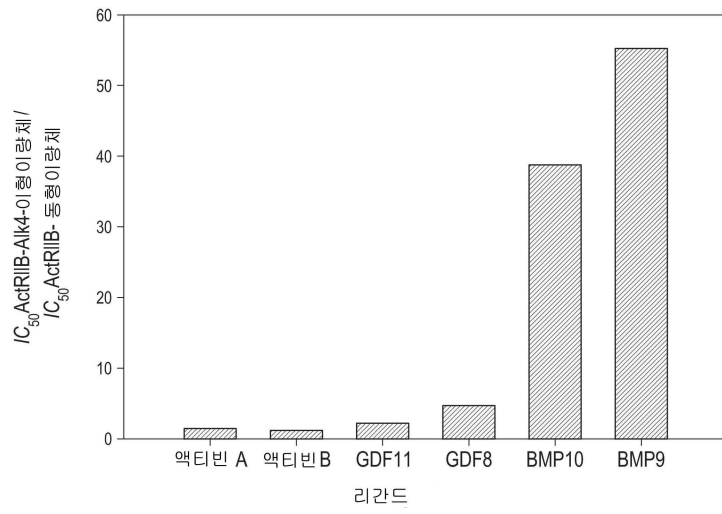
      *:*****:*****:***:*****:*****:*****:***

```

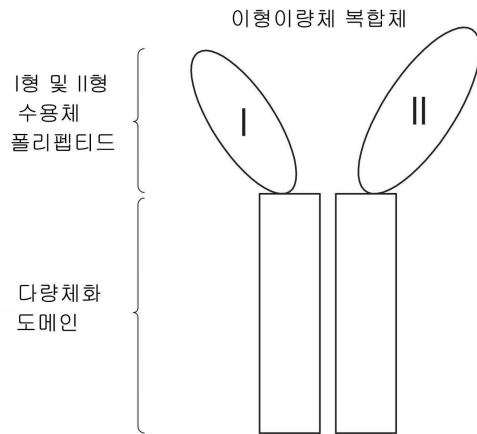
도면19



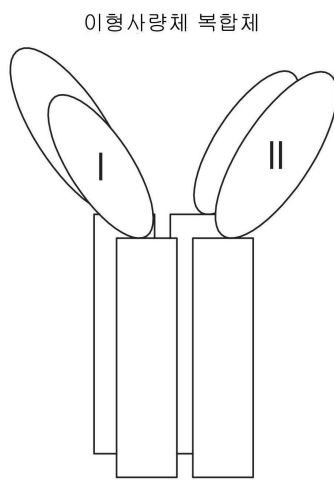
도면20



도면21



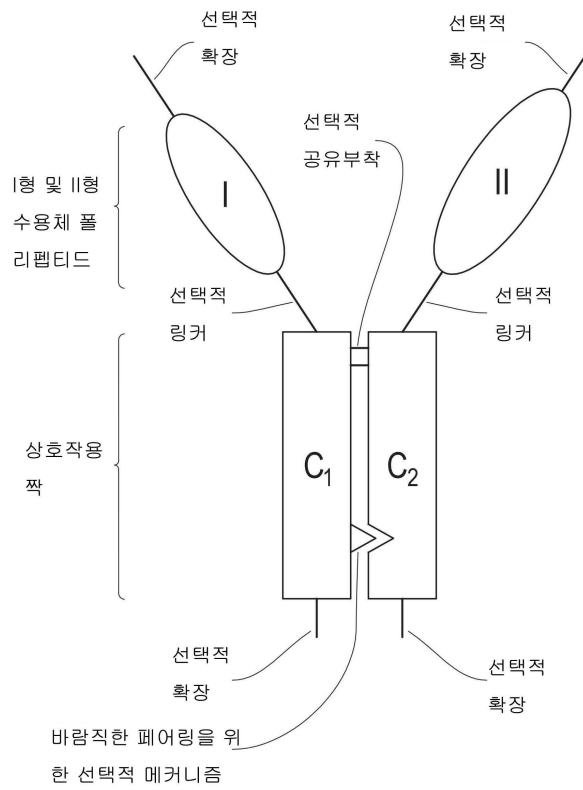
도 21A



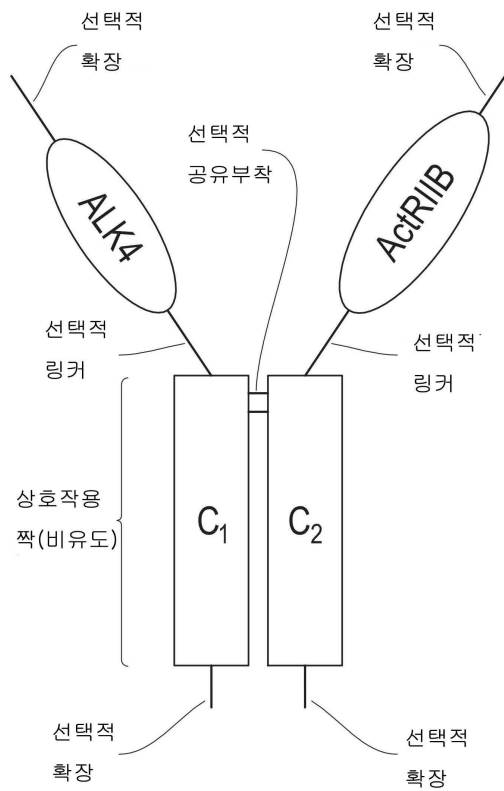
도 21B

도면22

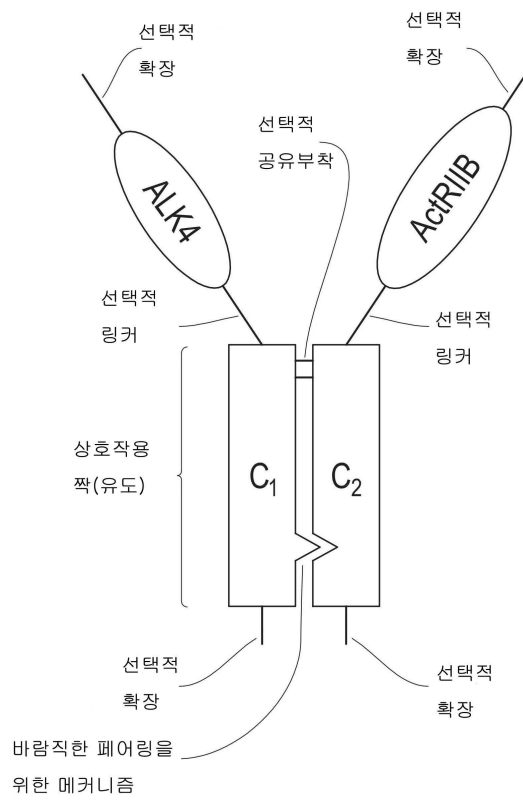
이형이량체 단백질 복합체 도식



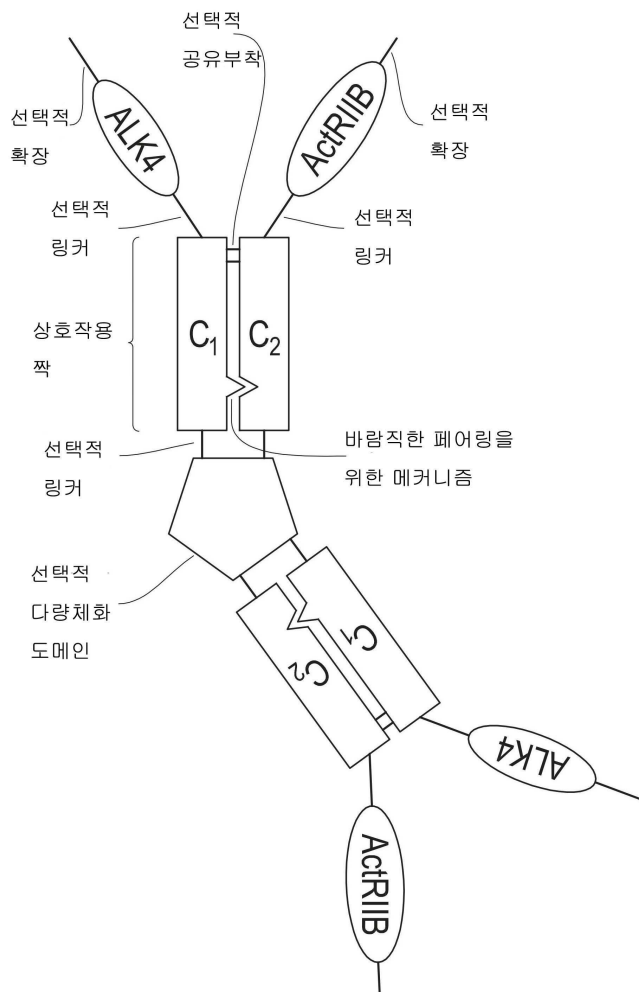
도면23a



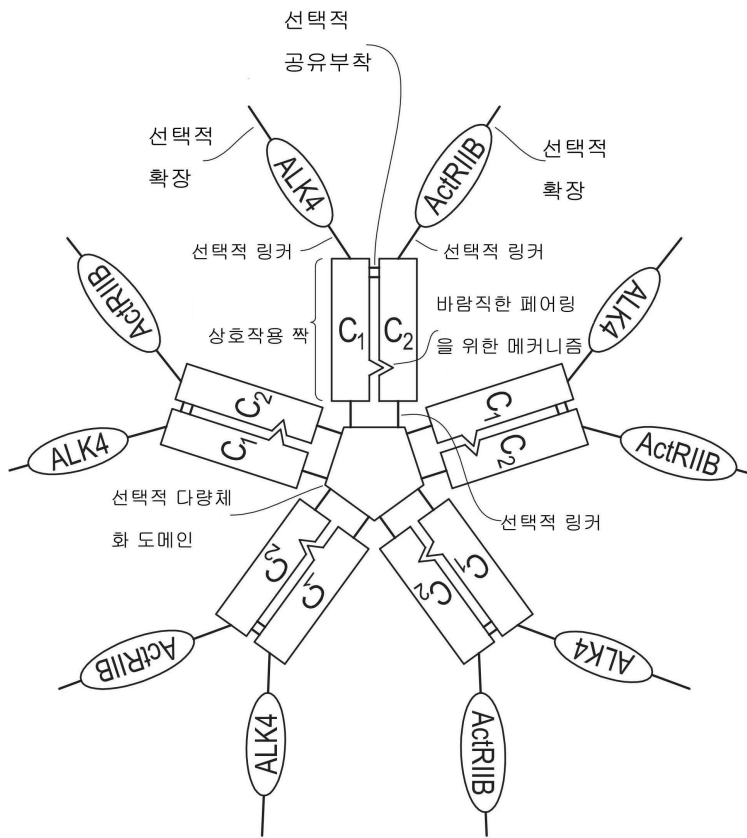
도면23b



도면23c



도면23d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> ACTRII ANTAGONISTS FOR USE IN INCREASING IMMUNE ACTIVITY

<130> 1848179-0002-097-W01

<140> PCT/US2017/018938

<141> 2017-02-22

<150> 62/298,366

<151> 2016-02-22

<160> 148

<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 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 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 Arg Asn Ser Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Pro Thr

115

<210> 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 Arg Asn Ser Ser
35 40 45

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

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

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

Leu Pro Glu Ala
100

<210> 4

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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 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> 5
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp 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> 6
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser
 35 40 45

 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala
 100
 <210> 7
 <211> 1536
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 atgacggcgc cctgggtggc cctgccctc ctctggggat cgctgtgcgc cggctctggg 60

 cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
 accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180

gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat 240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccagggttac 300
ttctgtctgt gtgaaggcaa cttctgcaac gaacgcttca ctcatttgcc agaggctggg 360
ggcccgaag tcacgtacga gccacccccg acagccccc cctgctcac ggtgctggcc 420
tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcacgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480

cggcacgcga agcccccta cggatcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540
ccatccctc tggtaggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggagc 600
tttggtgtgt tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
cacgagaacc tgctacagtt cattgtctgc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caagggaac 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacagg cctctcatac 900

ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgtgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
ggcttggctg ttcgatttga gccagggaac cctccagggg acaccacagg acaggtaggc 1080
acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtgc 1200
aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgcctt ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320

aaagatcact ggttgaacaa cccgggcttg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc 1380
tgggacctg atgcagaggc tcgctgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggaggt cggtaacagg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatc 1536

<210> 8
<211> 345
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 8

gggcgtgggg aggtgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag 60
cgaccaacc agagcggcct ggagcgctgc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc 120

tacgcctcct ggcgcaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctggcta 180

gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccaggtg 240
tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgaacgct tcactcattt gccagaggct 300
gggggcccgg aagtcacgta cgagccaccc ccgacagccc ccacc 345

<210> 9

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu

65 70 75 80

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp

85 90 95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu

100 105 110

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

115 120 125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu

130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val

145 150 155 160

Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln

165 170 175

Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu

180 185 190

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

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

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

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

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

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

Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His
290 295 300

Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His
305 310 315 320

Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala
325 330 335

Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser
340 345 350

Ala Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro
355 360 365

Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg
370 375 380

Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Ala Ser Arg
385 390 395 400

Cys Thr Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu
405 410 415

Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Asp Met Gln Glu Val Val
420 425 430

Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His

435 440 445
Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His
450 455 460
Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Gly Glu Arg Ile Thr

465 470 475 480
Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
485 490 495
Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
500 505 510
Leu

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
1 5 10 15

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

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
85 90 95
Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
100 105 110
Lys Pro Pro
115

<210> 11

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100

<210> 12

<211> 1539

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60

atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120

agaaccaatc aaactggigt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180

tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 240

gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300

tatTTTTgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccggagatg 360

gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg 420

ctctattcct tgggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480

tacaggcatc acaagatggc ctacctcct gtacttggtc caactcaaga cccaggacca 540
 cccccacctt ctccattact aggtttgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600
 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660
 ttccaatac aggacaaaca gtcatggcaa aatgaatagc aagtctacag ttgcctgga 720

atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780
 gtggatcttt ggctgatcac agcatttcac gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840
 gctaattgtg tctcttgga tgaactgtgt catattgcag aaacatggc tagaggattg 900
 gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960
 agggacatca aaagtaaaaa tgtgtgtgtt aaaaacaacc tgacagcttg cattgtctgac 1020
 tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgatacca tggacaggtt 1080
 ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140

gcatttttga ggatagatat gtatgccaatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200
 tgtactgtg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260
 cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320
 ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380
 tgttgggac acgacgcaga agccagggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500
 gtgacaaatg ttgactttcc tccaaagaa tctagtcta 1539

<210> 13

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atacttggta gatcagaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg gaaaaagac 60
 agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 180
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
 tatttttgtt gcgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccggagatg 300
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacc 345

<210> 14

<211> 505

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Ala Glu Ser Ala Gly Ala Ser Ser Phe Phe Pro Leu Val Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu

20 25 30

Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr

35 40 45

Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His

50 55 60

His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys

65 70 75 80

Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys

85 90 95

Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His

100 105 110

Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Leu Val

115 120 125

Gly Ile Ile Ala Gly Pro Val Phe Leu Leu Phe Leu Ile Ile Ile Ile

130 135 140

Val Phe Leu Val Ile Asn Tyr His Gln Arg Val Tyr His Asn Arg Gln

145 150 155 160

Arg Leu Asp Met Glu Asp Pro Ser Cys Glu Met Cys Leu Ser Lys Asp

165 170 175

Lys Thr Leu Gln Asp Leu Val Tyr Asp Leu Ser Thr Ser Gly Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Leu Gln Glu Ile Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly

210 215 220

Arg Trp Arg Gly Gly Asp Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu

225 230 235 240
 Glu Arg Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu

 245 250 255
 Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp Asn
 260 265 270
 Gly Thr Trp Thr Gln Leu Trp Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly
 275 280 285
 Ser Leu Phe Asp Tyr Leu Asn Arg Tyr Thr Val Thr Ile Glu Gly Met
 290 295 300
 Ile Lys Leu Ala Leu Ser Ala Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Met

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

 370 375 380
 Val Leu Asp Glu Thr Ile Asn Met Lys His Phe Asp Ser Phe Lys Cys
 385 390 395 400
 Ala Asp Ile Tyr Ala Leu Gly Leu Val Tyr Trp Glu Ile Ala Arg Arg
 405 410 415
 Cys Asn Ser Gly Gly Val His Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp
 420 425 430
 Leu Val Pro Ser Asp Pro Ser Ile Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys

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

Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln
485 490 495

Leu Ser Val Gln Glu Asp Val Lys Ile
500 505

<210> 15

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys
1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser
20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro
35 40 45

Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg
65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro
85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu
100

<210> 16

<211> 1515

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

atggcggagt cggccggagc ctctctcttc ttcccccttg ttgtctctct gctcgcgggc 60

agcggcgggt ccgggccccg gggggtccag gctctgtctgt gtgcgtgcac cagctgcctc 120

caggccaact acacgtgtga gacagatggg gctgcatgg tttccatttt caatctggat 180

gggatggagc accatgtgcg cacctgcac cccaaagtgg agctgggtccc tgccgggaag 240

cccttctact gcctgagctc ggaggacctg cgcaacaccc actgtgtcta cactgactac 300
 tgcaacagga tcgacttgag ggtgcccagt ggtcacctca aggagcctga gcacccgtcc 360
 atgtggggcc cggtaggagct ggtaggcata atcgccggcc cgggtgttctt cctgttcctc 420
 atcatcatca ttgttttctt tgtcattaac tatcatcagc gtgtctatca caaccgccag 480

agactggaca tggaagatcc ctcatgtgag atgtgtctct ccaaagacaa gacgtccag 540
 gatcttgtct acgatctctc cacctcaggg tctggctcag ggttaccctt ctttgtccag 600
 cgcacagtgg cccgaacctt cgttttacia gagattattg gcaagggtcg gtttggggaa 660
 gtatggcggg gccgctggag ggggtggtgat gtggctgtga aaatattctc ttctctgaa 720
 gaacggtctt gggtcagga agcagagata taccagacgg tcatgtctcg ccatgaaaac 780
 atccttggat ttattgtctc tgacaataaa gataatggca cctggacaca gctgtggctt 840
 gtttctgact atcatgagca cgggtccctg ttgtattatc tgaaccggtt cacagtgaca 900

attgagggga tgattaagct ggccttgtct gctgctagtg ggctggcaca cctgcacatg 960
 gagatcgtgg gcacccaagg gaagcctgga attgtctatc gagacttaaa gtcaaagaac 1020
 attctggtga agaaaaatgg catgtgtgcc atagcagacc tgggcctggc tgtccgtcat 1080
 gatgcagtca ctgacacctt tgacattgcc ccgaatcaga ggggtggggac caaacgatac 1140
 atggcccttg aagtacttga tgaaaccatt aatatgaaac actttgactc ctttaaatgt 1200
 gctgatattt atgccctcgg gcttgtatat tgggagattg ctggaagatg caattctgga 1260
 ggagtccatg aagaatatca gctgccatat tacgacttag tgcctcttga cccttcatt 1320

gaggaaatgc gaaaggttgt atgtgatcag aagctgcgtc ccaacatccc caactggtgg 1380
 cagagttatg aggcactcgc ggtgatgggg aagatgatgc gagagtgttg gtatgccaac 1440
 ggcgagccc gcctgacggc cctgcgcata aagaagaccc tctcccagct cagcgtgcag 1500
 gaagacgtga agatc 1515

<210> 17
 <211> 309
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

tccgggcccc ggggggtcca ggctctgtct tgtgcgtgca ccagctgcct ccaggccaac 60
 tacacgtgtg agacagatgg ggcctgcatg gtttcattt tcaatctgga tgggatggag 120

cacatgtgc gcacctgcat ccccaaagtg gagctggtcc ctgccgggaa gcccttctac 180
 tgcctgagct cggaggacct gcgcaacacc cactgtgtct aactgacta ctgcaacagg 240

atcgacttga ggggtgccag tggtcacctic aaggagcctg agcacccgctc catgtggggc 300
 ccggtggag 309
 <210> 18
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr
 1 5 10 15
 Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys
 20 25 30
 Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr
 35 40 45
 Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro
 50 55 60
 Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Leu Val Gly Ile Ile Ala
 65 70 75 80
 Gly Pro Val Phe Leu Leu Phe Leu Ile Ile Ile Ile Val Phe Leu Val
 85 90 95
 Ile Asn Tyr His Gln Arg Val Tyr His Asn Arg Gln Arg Leu Asp Met
 100 105 110
 Glu Asp Pro Ser Cys Glu Met Cys Leu Ser Lys Asp Lys Thr Leu Gln
 115 120 125
 Asp Leu Val Tyr Asp Leu Ser Thr Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro
 130 135 140
 Leu Phe Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Thr Ile Val Leu Gln Glu Ile
 145 150 155 160
 Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly Arg Trp Arg Gly
 165 170 175
 Gly Asp Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu Glu Arg Ser Trp
 180 185 190
 Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu Arg His Glu Asn

195 200 205
Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp Asn Gly Thr Trp Thr

210 215 220
Gln Leu Trp Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly Ser Leu Phe Asp
225 230 235 240

Tyr Leu Asn Arg Tyr Thr Val Thr Ile Glu Gly Met Ile Lys Leu Ala
245 250 255

Leu Ser Ala Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Met Glu Ile Val Gly
260 265 270

Thr Gln Gly Lys Pro Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn

275 280 285
Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Met Cys Ala Ile Ala Asp Leu Gly Leu
290 295 300

Ala Val Arg His Asp Ala Val Thr Asp Thr Ile Asp Ile Ala Pro Asn
305 310 315 320

Gln Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu
325 330 335

Thr Ile Asn Met Lys His Phe Asp Ser Phe Lys Cys Ala Asp Ile Tyr

340 345 350
Ala Leu Gly Leu Val Tyr Trp Glu Ile Ala Arg Arg Cys Asn Ser Gly
355 360 365

Gly Val His Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Val Pro Ser
370 375 380

Asp Pro Ser Ile Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys Asp Gln Lys Leu
385 390 395 400

Arg Pro Asn Ile Pro Asn Trp Trp Gln Ser Tyr Glu Ala Leu Arg Val

405 410 415
Met Gly Lys Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala Ala Arg
420 425 430

Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser Val Gln
435 440 445

Glu Asp Val Lys Ile

450

<210> 19

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr

1 5 10 15

Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys

20 25 30

Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr

35 40 45

Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro

50 55 60

Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

65 70

<210> 20

<211> 1362

<212>

DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

atggtttcca ttttcaatct ggatgggatg gagcaccatg tgcgcacctg catcccaaaa 60

gtggagctgg tccctgccgg gaagcccttc tactgcctga gctcggagga cctgcgcaac 120

accactgct gctacaactga ctactgcaac aggatcgact tgagggtgcc cagtggtcac 180

ctcaaggagc ctgagcaccc gtccatgtgg ggcccgttgg agctggtagg catcatcgcc 240

ggcccgtgt tctcctgtt cctcatcatc atcattgttt tcttgtcat taactatcat 300

cagcgtgtct atcacaaccg ccagagactg gacatggaag atccctcatg tgagatgtgt 360

ctctccaaag acaagacgct ccaggatcct gtctacgac tctccacctc aggggtctggc 420

tcagggttac cctcttttgt ccagcgaca gtggcccgaa ccatcgtttt acaagagatt 480

attggcaagg gtcggtttgg ggaagtatgg cggggccgct ggaggggtgg tgatgtggct 540

gtgaaaatat tctcttctcg tgaagaacgg tcttggttca gggaagcaga gatataccag 600

acggtcatgc tgcgccaatga aaacatcctt ggattttattg ctgctgacaa taaagataat 660
ggcacctgga cacagctgtg gcttgtttct gactatcatg agcacgggtc cctgtttgat 720
tatctgaacc ggtacacagt gacaattgag gggatgatta agctggcctt gtctgctgct 780
agtgggctgg cacacctgca catggagatc gtgggcaccc aagggaagcc tgggaattgct 840

catcgagact taaagtcaaa gaacattctg gtgaagaaaa atggcatgtg tgccatagca 900
gacctgggcc tggtgtccg tcatgatgca gtcactgaca ccattgacat tgccccgaat 960
cagagggtgg ggaccaaacg atacatggcc cctgaagtac ttgatgaaac cattaatatg 1020
aaacactttg actcctttta atgtgctgat atttatgccc tcgggcttgt atattgggag 1080
attgctcgaa gatgcaattc tggaggagtc catgaagaat atcagctgcc atattacgac 1140
ttagtgccct ctgacccttc cattgaggaa atgcgaaagg ttgtatgtga tcagaagctg 1200
cgtcccaaca tccccactg gtggcagagt tatgaggcac tgcgggtgat ggggaagatg 1260

atgcgagagt gttggtatgc caacggcgca gcccgcctga cggccctgcg catcaagaag 1320
acctctccc agctcagcgt gcaggaagac gtgaagatct aa 1362

<210> 21

<211> 230

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

atggtttcca ttttcaatct ggatgggatg gagcaccatg tgcgcacctg catccccaaa 60
gtggagctgg tcctgcccgg gaagcccttc tactgcctga gctcggagga cctgcgcaac 120
accactgct gctacactga ctactgcaac aggatcgact tgagggtgcc cagtggtcac 180
ctcaaggagc ctgagcaccc gtccatgtgg ggcccgtgg agctggtagg 230

<210> 22

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

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

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

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

Lys

225

<210> 23

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

1 5 10 15

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

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

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

 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 24
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val
50 55 60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80
Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
115 120 125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175
Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 25

<211> 279

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

195 200 205

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn

210 215 220
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser

 245 250 255
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
 260 265 270
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275
 <210> 26
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

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

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

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 27

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

Gly Gly Gly

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 29

Thr Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 30

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 31

Thr Gly Gly Gly

1

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 32

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 33
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 34
 <400> 34
 000
 <210> 35
 <400> 35
 000
 <210> 36
 <400> 36
 000
 <210> 37
 <400> 37
 000
 <210> 38
 <400> 38
 000
 <210> 39

 <400> 39
 000
 <210> 40
 <400> 40
 000
 <210> 41
 <400> 41
 000
 <210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400> 43

000

<210> 44

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

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

<210> 45

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

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

35 40 45
 Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
 50 55 60
 Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile

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

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

 195 200 205
 Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
 210 215 220
 Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
 225 230 235 240
 Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys
 245 250 255
 Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu

 260 265 270
 Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
 275 280 285

Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
290 295 300

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

<210> 46

<211> 63

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

<210> 47

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

Asn Lys Lys Asn Lys Pro Arg Cys Val

20 25

<210> 48

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10 15

Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr

20

25

<210> 49

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

245 250 255
 Glu Glu Glu Glu Asn Phe Val
 260

<210> 50

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 50

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

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

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110
 Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

115	120	125	
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
130	135	140	
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
145	150	155	160
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
165	170	175	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
180	185	190	
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
195	200	205	
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
210	215	220	
Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
225	230	235	240
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr			
245	250	255	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
260	265	270	
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
275	280	285	
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
290	295	300	
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
305	310	315	320
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
325	330	335	
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
340			

<210> 51

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis sp.

<400> 51

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> 52

<211> 22

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Tissue plasminogen activator peptide

<400> 52

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> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Native peptide

<400> 53

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> 54

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

225 230 235 240
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
 245 250 255
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 260 265 270

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 340 345 350
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365
Lys

<210> 55

<211> 1114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 55

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccgcg ccgtatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120

attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata 180

aacggcgcca ttgttttgc acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240

aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300

cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360

ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatacca gttacaccta agccacccac 420
 cgggtggtgga actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480

agtcttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccttgaggt 540
 cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 600
 ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac 660
 gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtctgaatg gcaaggagta 720
 caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca tctccaaagc 780
 caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgagg aggagatgac 840
 caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 900

ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
 ctccgacggc tcttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
 ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
 gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgaga attc 1114

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 56

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu

1 5

<210> 57

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 57

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 Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110

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

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

 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 58

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 58

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 Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
115 120 125

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

130 135 140
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

145 150 155 160
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

165 170 175
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

180 185 190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

195 200 205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

210 215 220
Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

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

245 250 255
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

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

275 280 285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

290 295 300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

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

325 330 335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

340

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Native peptide

<400> 59

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> 60

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 60

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> 61

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 61

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcaccta ctacaacgcc	120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac	180
aagcggctgc actgctacgc ctcttgccgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag	240
aagggtctgt ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag	300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact	360
catttgccag aggttggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc	420
ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	480
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc	540
acatgcgtgg tggtagcgtg gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg	660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	720
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gtcccatcg agaaaacat ctccaaagcc	780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	960
tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag	1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag	1080
agcctctccc tgtctccggg taaatga	1107

<210> 62

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 62

Gly Arg Gly Glu Ala Glu

1 5

<210> 63

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 63

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu

35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly

85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His

100 105 110

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 210 215 220
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 225 230 235 240
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 245 250 255

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

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

<210> 64

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 64

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

 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn
 50 55 60

Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val
65				70				75				80			
Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His
85				90				95							
Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Pro	Thr
100				105				110							
Ala	Pro	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
115				120				125							
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
130				135				140							
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
145				150				155				160			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
165				170				175							
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
180				185				190							
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
195				200				205							
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
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> 65

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 65

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

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

<210> 66

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 66

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 Asp 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 Ala 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> 67

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 67

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgccccggcg cctctggggc tggggaggct gagacacggg agtgcattcta ctacaacgcc	120
aactggggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac	180
aagcggctgc actgctacgc ctcttggegc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag	240
aagggtctgt gggacgatga ctccaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag	300

gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga ggcgttact 360
catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc cccccccgac agccccacc 420

ggtgggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480
 gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 540
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720

 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gtcccatcg agaaaacat ctccaaagcc 780
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 840
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 900
 gagggggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
 tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag 1080
 agcctctccc tgctccggg taaatga 1107

<210> 68

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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 Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile
 100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser

115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu

130 135 140

<210> 69

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile

100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser

115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu

130 135 140

<210> 70

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile

100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

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

 245 250 255
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 260 265 270
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 275 280 285
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 290 295 300
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

 305 310 315 320
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 325 330 335
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 340 345 350
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 355 360 365
 Gly Lys
 370
 <210> 71
 <211> 368
 <212>
 PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 71
 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 Ala 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 Lys 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 Lys
 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> 72

<211> 1104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 72

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccgcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcattcta ctacaacgcc	120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac	180
aagcggctgc actgctacgc ctctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag	240
aagggtgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag	300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgttcact	360
catttgccag aggtggggg cccggaagtc acgtacgagc caccctcgac agccccacc	420
ggtggtggaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	480
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc	540
acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgagg aggagcagta caacagcacg	660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	720
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	780

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgaa ggagatgacc 840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atccagcga catcgccgtg 900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctgaag 960
tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cagcagaag 1080
agcctctccc tgtctccggg taaa 1104

<210> 73

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 73

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 165 170 175

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 180 185 190
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220
 Pro Ala 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 Lys 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 Lys 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> 74

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 74

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

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

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

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

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

260 265 270
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

275 280 285
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro

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

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

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

340 345 350

Ser Pro Gly

355

<210> 75

<211> 1065

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 75

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgccggcg cctccgggcc ccgggggggc caggctctgc tgtgtgcgtg caccagctgc 120

ctccaggcca actacacgtg tgagacagat ggggcctgca tggtttccat tttcaatctg 180

gatgggatgg agcacatgt gcgcacctgc atcccaaag tggagctggt cctgcccggg 240

aagccttct actgctgag ctccgaggac ctgcgcaaca cccactgctg ctacactgac 300

tactgcaaca ggatcgactt gaggtgccc agtggtcacc tcaaggagcc tgagcacccg 360

tccatgtggg gcccgggtga gaccggtggt ggaactcaca catgccacc gtgccagca 420

cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 480

atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 540

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 600
 cgggaggagc agtacaacag caggtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 660
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 720
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 780
 ccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 840
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 900
 gacaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctatag cgacctcacc 960

gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1020
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggt 1065

<210> 76

<211> 331

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 76

Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

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

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro

85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro

100 105 110

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

115 120 125

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
130 135 140

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

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

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325 330

<210> 77

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 77

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 Ala 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 Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 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> 78
<211> 343
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 78
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 Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Ala 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 Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys

245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Trp 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> 79

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 79

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 Pro Arg Gly Val Gln Ala

20 25 30

Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu

35 40 45

Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu

50 55 60

His His Val Arg Thr Cys Ile Pro Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly

65 70 75 80

Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys

85 90 95

Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly

100 105 110

His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ser Pro Gly Lys

355

<210> 80

<211> 332

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 80

Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

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

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro

85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro

100 105 110

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

115 120 125

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

130 135 140

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

145 150 155 160

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

165 170 175

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

180 185 190

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

195 200 205

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

210 215 220

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg

225 230 235 240

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly

245 250 255

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

260 265 270

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

275 280 285

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330

<210> 81

<400> 81

000

<210> 82

<400> 82

000

<210> 83

<400> 83

000

<210> 84

<400> 84

000

<210> 85

<400> 85

000

<210> 86

<400> 86

000

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<400> 89

000

<210> 90

<400> 90

000

<210> 91

<400> 91

000

<210> 92

<400> 92

000

<210> 93

<400> 93

000

<210> 94

<400> 94

000

<210> 95

<400> 95

000

<210> 96

<400> 96

000

<210> 97

<400> 97

000

<210> 98

<400> 98

000

<210> 99

<400> 99

000

<210> 100

<211> 150

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 100

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> 101

<211> 150

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 101

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> 102

<211> 150

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 102

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> 103

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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> 104

<211> 150

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 104

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

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

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

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Val Gly Gly Leu Ser

145 150

<210> 105

<211> 150

<212> PRT

<213> Xenopus sp.

<400> 105

Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu

35 40 45

Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp

65 70 75 80

Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu

85 90 95

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

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> 106

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

consensus sequence

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Thr, Ala or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (121)..(121)

<223> Pro, Ala, Val or Met

<400> 106

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> 107

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110

Lys Pro Pro

115

<210> 108

<211> 115

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 108

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

85 90 95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro

100 105 110

Lys Pro Pro

115

<210> 109

<211> 115

<212> PRT

<213> *Condylura cristata*

<400> 109

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

1 5 10 15

Trp Glu Arg 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 Ile 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 Ala Pro

115

<210> 110

<211> 115

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 110

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

1 5 10 15
 Trp Glu Arg 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 Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110

Lys Pro Pro

115

<210> 111

<211> 115

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 111

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Lys Asp Lys Thr Asn Arg Ser Gly Ile 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 Asn Asp Cys Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Phe Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Arg Phe Phe Tyr
 85 90 95

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

Lys Pro Pro
 115

<210> 112

<211> 115

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 112

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Ile Phe Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

Trp Glu Arg Asp Arg Thr Asn Arg Thr Gly Val Glu Ser 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 Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80

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

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

Lys Pro Pro
 115

<210> 113

<211> 115

<212> PRT

<213> Tyto alba

<400> 113

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

1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Lys Thr Asn Arg Ser Gly Ile 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 Asn Asp Cys Ile Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val

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

<210> 114

<211> 115

<212> PRT

<213> Myotis davidii

<400> 114

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Ile Phe Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15

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

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Arg Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro

100 105 110

Lys Pro Pro

115

<210> 115

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

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

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Tyr Cys Asn Arg

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro

85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 116

<211> 103

<212> PRT

<213> Condylura cristata

<400> 116

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Leu Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Leu Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45
 Lys Val Glu Leu Val Pro Ala Gly Lys Pro Phe Tyr Cys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Phe Cys Asn Lys
 65 70 75 80
 Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Val Lys Glu Pro Glu Arg Pro
 85 90 95
 Ser Val Trp Gly Pro Val Glu
 100

<210> 117

<211> 103

<212> PRT

<213> *Erinaceus europaeus*

<400> 117

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

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

<210> 118

<211> 102

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 118

Ala Pro Gly Gly Ala Arg Ala Leu Thr Cys Leu Cys Ser Asp Cys Lys

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

65 70 75 80
Asp Leu Met Val Pro Ser Gly His Leu Lys Asp Asn Glu Pro Pro Ser
 85 90 95
Ser Trp Gly Pro Val Glu
 100

<210> 119

<211> 103

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 119

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys
1 5 10 15
Leu Gln Thr Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

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

85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 120

<211> 103

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 120

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

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

50 55 60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Thr Asp Phe Cys Asn Lys

65 70 75 80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro

85 90 95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 121

<211> 103

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 121

Ser Gly Pro Arg Gly Ile Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1 5 10 15

Leu Gln Thr Asn Tyr Thr Cys Glu Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser

20 25 30

Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu His His Val Arg Thr Cys Ile Pro

35 40 45

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

50

55

60

Glu Asp Leu Arg Asn Thr His Cys Cys Tyr Ile Asp Phe Cys Asn Lys

65

70

75

80

Ile Asp Leu Arg Val Pro Ser Gly His Leu Lys Glu Pro Glu His Pro

85

90

95

Ser Met Trp Gly Pro Val Glu

100

<210> 122

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

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> 123

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 123

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

1 5 10 15

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

<210> 124

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> CDS

<222> (73)..(396)

<400> 124

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg cc gct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg	111
Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp	
1 5 10	
gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag	159
Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu	
15 20 25	
cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc	207
Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly	
30 35 40 45	
acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg cta gat gac ttc aac tgc	255
Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys	
50 55 60	
tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac	303
Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr	
65 70 75	
ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg	351
Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu	
80 85 90	
cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca	396
Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr	
95 100 105	
ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	456
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	516
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	576
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	636
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	696
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	756
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	816
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atccagcga catcgccgtg	876
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	936

tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 996

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag 1056

agcctctccc tgtccccggg taaatga 1083

<210> 125

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 125

tcatattacc ggggacagg agaggtctct ctgcgtgtag tggttgtgca gacgtcatg 60

catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagctt 120

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct ttagttgtt 180

ctcggctgc ccattgtctt cccactccac ggcatgtcg ctgggataga agcctttgac 240

caggcaggtc aggtgacct ggttcttggc catctctcc cgggatggg gcagggtgta 300

cacctgtgtt tctcggggct gccctttggc ttggagatg gttttctcga tggggctgg 360

gagggtttt ttggagacct tgcacttgta ctcttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420

gacggtgagg acgtgacca caggtacgt gctgtgttac tgctcctccc gcggctttgt 480

cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc 540

gtggctcacg tccaccacca cgcatgtgac ctgaggggtc cgggagatca tgagggtgtc 600

cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttcag gtgctgggca 660

cgggtgggcat gtgtgagttc caccacctgt cgggggtggc tcgtacgtga cttccgggcc 720

cccagcctct ggcaaatgag tgaagcgctc gttgcagaag ttgccttcac agcagcagaa 780

gtacacctgg gggttctcct cagtggccac aactcctgc ctatcgtac agttgaagtc 840

atctagccag cagcccttct tcacgagctc gatggtgcca gagctgttgc gccaggaggc 900

glagcagtgc agccgttgt cctgctcgcc ttcgcagcgc tccaggccgc tctggttgtt 960

gcgtccagc tcccagttgg cgttgtagta gatgactcc cgtgtctcag cggcgccggg 1020

cgaaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080

cat 1083

<210> 126

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<220><221> CDS

<222> (73)..(396)

<400> 126

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccggcg cc gcc gaa acc cgc gaa tgt att tat tac aat gct aat tgg 111

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

1 5 10

gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa 159

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

15 20 25

cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tcg tgg agg aac tcc tcc ggg 207

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

30 35 40 45

acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg ctg gac gat ttc aat tgt 255

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

50 55 60

tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat 303

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

65 70 75

ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac ctc 351

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

80 85 90

ccc gaa gcc ggc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc 396

Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr

95 100 105

gggtgtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 456

gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 516

acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 576
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 636
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 696
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 756
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc 816
aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 876
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 936

tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 996
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctgtc acaaccacta cacgcagaag 1056
agcctctccc tgtccccggg taaatga 1083

<210> 127

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 127

tcatttacc ggggacagg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaggctcatg 60
catcacggag catgagaaga cgttccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagctt 120

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggctgtgtct ttagttgtt 180
ctccggctgc ccattgtct cccactccac ggcatgtcg ctgggataga agcctttgac 240
caggcaggtc aggtgacct ggttcttgg catctctcc cgggatggg gcagggtgta 300
cacctgtgtt tctcggggct gccctttggc ttggagatg gtttctcga tgggggctgg 360
gagggtttt ttggagacct tgcacttgta ctcttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420
gacgtgagg acgtgacca cagggtacgt gctgtgttac tgctctccc gcggctttgt 480
cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc 540

gtggctcag tccaccacca cgcattgtac ctacggggtc cgggagatca tgagggtgtc 600
cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttcag gtgctgggca 660
cggtaggcat gtgtgagttc caccaccgtt ggccgggggt tcataggtca cctcgggccc 720
gccggtctc gggaggtggg taaaccgttc attacagaaa tccccctgc aacaacagaa 780
atagacctgc ggattctctt cggtcgcgac acattcctgg cggtcataac aattgaaatc 840
gtccagccag caccctttct tgaccagttc aatcgtccc gaggagttcc tccacgacgc 900

atagcaatgg aggcgtttat cctgttcccc ctcacaccgt tcgagcccgg attggttcgt 960

ccgttcgagt tcccaattag cattgtaata aatacattcg cgggtttcgg cggcgccggg 1020

cgaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcac 1080

cat 1083

<210> 128

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 128

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 Asp 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 Ala 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> 129

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 129

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcaccta ctacaacgcc	120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac	180
aagcggctgc actgctacgc ctctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag	240
aagggtgctt gggatgatga cttcaactgc tacgatagc aggagtgtgt ggccactgag	300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgttcact	360
catttgccag aggttggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc	420
ggtgggtgaa ctcacacatg cccacgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	480
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc	540
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgaggg aggagcagta caacagcacg	660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	720
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga ggagatgacc	840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgttc aaaggcttct atccagcga catcgccgtg	900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	960
tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag	1080
agcctctccc tgtccccggg taaatga	1107

<210> 130

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 130

tcatttaccg ggggacagg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gagcctcatg	60
catcacggag catgagaaga cgttccccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagctt	120
gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggctgtgtct ttagttgtt	180
ctccggctgc ccattgtctt cccactccac ggcatgtcg ctgggataga agcctttgac	240

caggcaggtc aggcctgacct ggtttcttggc catctctctcc cgggatgggg gcagggtgta 300
cacctgtggc tctcggggct gccctttggc ttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360
gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctctttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420
gacgggtgagg acgtgacca cacggtacgt gctgttgtag tgctctctcc gcggctttgt 480
cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc 540

gtggctcacg tcaccacca cgcatgtgac ctccagggtc cgggagatca tgagggtgac 600
cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttag gtgctgggca 660
cgggtgggcat gtgtgagttc caccaccggt gggggctgac ggggggtggc cgtacgtgac 720
ttccggggcc ccagcctctg gcaaatgagt gaagcgctcg ttgcagaagt tgccttcaca 780
gcagcagaag tacacctggg ggttctctc agtggccaca cactcctgcc tatcgtagca 840
gttgaagtca tcatccagc agcccttctt cagagctcg atggtgccag agctgttgcg 900
ccaggaggcg tagcagtga gccgctgtc ctgctgcct tcgcagcgt ccaggccgct 960

ctggttggc cgctccagc cccagttggc gttgtagtag atgcactccc gtgtctcagc 1020
ctccccagc ccagaggcg cgggcgaaac gaagactgct ccacacagca gcagcacaca 1080
gcagagccct ctcttcattg catccat 1107

<210> 131

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 131

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

1 5 10 15

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

50 55 60

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

65				70				75				80			
Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu
				85				90				95			
Asn	Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu
				100				105				110			
Arg	Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu
				115				120				125			
Pro	Pro	Pro	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
130				135				140							
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
145				150				155				160			
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
				165				170				175			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
				180				185				190			
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
195				200				205							
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
210				215				220							
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
225				230				235				240			
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
				245				250				255			
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
260				265				270							
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
275				280				285							
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
290				295				300							
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
305				310				315				320			

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
325 330 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 132

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 132

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

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

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

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60

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

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His
100 105 110

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
130 135 140

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

145 150 155 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

<210> 133

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 133

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

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

<210> 134

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<220><221> CDS

<222> (76)..(396)

<400> 134

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccggcg ccgct gag aca cgg gag tgc atc tac tac aac gcc aac tgg 111

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

1 5 10

gag ctg gag cgc acc aac cag agc ggc ctg gag cgc tgc gaa ggc gag 159

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

15 20 25

cag gac aag cgg ctg cac tgc tac gcc tcc tgg cgc aac agc tct ggc 207

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

30	35	40	
acc atc gag ctc gtg aag aag ggc tgc tgg gac gat gac ttc aac tgc			255
Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys			
45	50	55	60
tac gat agg cag gag tgt gtg gcc act gag gag aac ccc cag gtg tac			303
Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr			
65	70	75	
ttc tgc tgc tgt gaa ggc aac ttc tgc aac gag cgc ttc act cat ttg			351
Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu			
80	85	90	
cca gag gct ggg ggc ccg gaa gtc acg tac gag cca ccc ccg aca			396
Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr			
95	100	105	
ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca			456
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc			516
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg			576
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg			636
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac			696
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc			756
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc			816
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atccagcga catcgccgtg			876
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac			936
tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag			996
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cacgcagaag			1056
agcctctccc tgtccccggg taaatga			1083

<210> 135

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 135

tcatttaccc ggggacaggg agaggtctct ctgcgtgtag tggttgtgca gacccatg	60
catcacggag catgagaaga cgttccccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagctt	120
gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct ttagttgtt	180
ctccggctgc ccattgtctt cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac	240
caggcaggtc aggtgacct ggttcttggc catctctcc cgggatgggg gcagggtgta	300
cacctgtggt tctcggggct gccctttggc ttggagatg gttttctcga tgggggctgg	360
gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctcttgcca ttcagccagt cctggtgcag	420
gacggtgagg acgtgacca cacgtacgt gctgtgtac tgctcctccc gcggctttgt	480
cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc	540
gtggctcac tccaccacca cgcatgtgac ctcaggggtc cgggagatca tgagggtgac	600
cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttag gtgctgggca	660
cggtagggcat gtgtgagttc caccacctgt cgggggtggc tcgtacgtga cttccgggcc	720
cccagctct ggcaaatgag tgaagcgtc gttgcagaag ttgccttcac agcagcagaa	780
glacacctgg gggttctct cagtggccac aactcctgc ctatcgtagc agttgaagtc	840
atcgtcccag cagccctct tccagagtc gatggtgcca gagctgttc gccaggaggc	900
gtagcagtc agccgttgt cctgtctgcc ttgcagcgc tccaggccgc tctggttgg	960
gcgtccagc tcccagttg cgtttagta gatgactcc cgtgtctcag cggcgccggg	1020
cgaacgaag actgtccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcac	1080
cat	1083

<210> 136

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> CDS

<222> (76)..(396)

<400> 136

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtctgtctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg ccgcc gaa acc cgc gaa tgt att tat tac aat gct aat tgg	111
Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp	

1	5	10	
gaa ctc gaa cgg acg aac caa tcc ggg ctc gaa cgg tgt gag ggg gaa			159
Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu			
15	20	25	
cag gat aaa cgc ctc cat tgc tat gcg tgc tgg agg aac tcc tcc ggg			207
Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly			
30	35	40	
acg att gaa ctg gtc aag aaa ggg tgc tgg gac gac gat ttc aat tgt			255
Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys			
45	50	55	60
tat gac cgc cag gaa tgt gtc gcg acc gaa gag aat ccg cag gtc tat			303
Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr			
65	70	75	
ttc tgt tgt tgc gag ggg aat ttc tgt aat gaa cgg ttt acc cac ctc			351
Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu			
80	85	90	
ccc gaa gcc ggc ggg ccc gag gtg acc tat gaa ccc ccg ccc acc			396
Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr			
95	100	105	
ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca			456
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc			516
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg			576
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg			636
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac			696
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc			756
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccggga ggagatgacc			816
aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc aaaggttct atccacgca catgccgtg			876
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac			936
tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag			996

gggaacgtct ttcacatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag	1056
agcctctccc tgtccccggg taaatga	1083
<210> 137	
<211> 1083	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide	
<400> 137	
tcatttaccg ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gacccatg	60
catcacggag catgagaaga cgttccccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagctt	120
gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggctgtgtct ttagttgtt	180
ctcggctgc ccattgtct cccactccac ggcatgtcg ctgggataga agcctttgac	240
caggcaggtc aggtgacct ggtttttggt catctctcc cgggatgggg gcagggtgta	300
cacctgtggt tctcggggct gccctttggc ttggagatg gttttctcga tgggggctgg	360
gagggtttt ttggagacct tgcacttgta ctcttgcca ttcagccagt cctggtgcag	420
gacggtagg acgtgacca caggtagct gctgtgtac tgctctccc gcggtttgt	480
cttggcatta tgcacctca cgcgtccac gtaccagttg aactgacct cagggtcttc	540
gtggctcacg tccaccacca cgcagtgtac ctacgggtc cgggagatca tgagggtgtc	600
cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttag gtgctgggca	660
cggtaggcat gtgtgagttc caccaccgtt gggcgggggt tcataggtca cctcgggccc	720
gccggttcg gggaggtggg taaaccgttc attacagaaa ttcctctgc aacaacagaa	780
atagacctgc ggattctctt cggtcgcgac acattcctgg cggtcataac aattgaaatc	840
gtcgtccag caccctttct tgaccagttc aatcgtccg gaggagttcc tccacgacgc	900
atagcaatgg aggcgtttat cctgttcccc ctacaccgt tcgagcccg attggttcgt	960
ccgttcgagt tccaattag cattgtaata aatacttcg cgggtttcgg cggcgccggg	1020
cgaacgaag actgtccac acagcagcag cacacagcag agcctctct tcattgcatc	1080
cat	1083
<210> 138	
<211> 321	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 138

gaaacccgcg aatgtattta ttacaatgct aattgggaac tcgaacggac gaaccaatcc	60
gggctcgaac ggtgtgaggg ggaacaggat aaacgcctcc attgctatgc gtcgtggagg	120
aactcctccg ggacgattga actggtcaag aaaggggtgct gggacgacga tttcaattgt	180
tatgaccgcc aggaatgtgt cgcgaccgaa gagaatccgc aggtctatct ctgttgttgc	240
gaggggaatt tctgtaatga acggtttacc cacctccccg aagccggcgg gcccagagtg	300
acctatgaac cccgcccac c	321

<210> 139

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 139

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 Ala 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 Cys Arg Glu Glu Met Thr Glu Asn Gln Val Ser Leu Trp 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 Asp Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
355	360	365	

<210> 140

<211> 1101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 140

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcactta ctacaacgcc	120
aactggggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac	180
aagcgctgc actgctacgc ctctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag	240
aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag	300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttact	360
catttgccag aggttggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc	420
ggtgttgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	480
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc	540
acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg	660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	720
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga ggagatgacc	840
gagaaccagg tcagcctgtg gtgcctgttc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg	900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	960
tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcaggac	1080
agcctctccc tgtctccggg t	1101

<210> 141

<211> 342

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 141

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Ala 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 Cys Arg Glu Glu Met Thr Glu
 245 250 255
 Asn Gln Val Ser Leu Trp 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 Asp Ser
 325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 340

<210> 142

<211> 1026

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 142

gggcgtgggg aggctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag	60
cgcaccaacc agagcggcct ggagcgctgc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc	120
tacgcctcct ggcgcaacac ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctggcta	180
gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccaggtg	240
tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgagcgct tcaactcattt gccagaggct	300
gggggcccgg aagtcacgta cgagccaccc ccgacagccc ccaccggtgg tggaactcac	360
acatgcccac cgtgcccage acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc	420
ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg	480
gagctgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	540
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	600
gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc	660

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 720
gaaccacagg tgtacacct gcccccatgc cgggaggaga tgaccgagaa ccaggtcagc 780

ctgtggtgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 840
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggtccttc 900
ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 960
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc aggacagcct ctccctgtct 1020
ccgggt 1026

<210> 143

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 143

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 Pro Arg Gly Val Gln Ala
20 25 30
Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys Leu Gln Ala Asn Tyr Thr Cys Glu
35 40 45
Thr Asp Gly Ala Cys Met Val Ser Ile Phe Asn Leu Asp Gly Met Glu
50 55 60

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

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

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

 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 195 200 205
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 210 215 220
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 245 250 255

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

 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 325 330 335
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 340 345 350
 Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 144

<211> 1068

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 144

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg cctccgggcc ccgggggggc caggctctgc tgtgtgcgtg caccagctgc	120
ctccaggcca actacacgtg tgagacagat ggggcctgca tggtttccat tttcaatctg	180
gatgggatgg agcacatgt gcgcacctgc atcccaaaag tggagctggt ccctgccggg	240
aagcccttct actgcctgag ctccggaggac ctgcgcaaca cccactgctg ctacactgac	300
tactgaaca ggatcgactt gagggtgccc agtggtcacc tcaaggagcc tgagcacccg	360
tccatgtggg gcccggtgga gaccggtggt ggaactcaca catgcccacc gtgccagca	420
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc	480
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct	540
gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg	600
cgggaggagc agtacaacag cactaccgt gtggtcagcg tcctaccgt cctgcaccag	660
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc	720
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg	780
ccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgtcctgcgc cgtcaaaggc	840
ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagccgcg ggcagccgga gaacaactac	900
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgc ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc	960
gtggacaaga gcaggtgcca gcagggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	1020
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa	1068

<210> 145

<211> 332

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 145

Ser Gly Pro Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu Cys Ala Cys Thr Ser Cys

1	5	10	15
---	---	----	----

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

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

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

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

260 265 270

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

275 280 285

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330

<210> 146

<211

> 996

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 146

tccggggcccc ggggggtcca ggctctgctg tgtgcgtgca ccagctgcct ccaggccaac 60
tacacgtgtg agacagatgg ggcctgcatg gtttcattt tcaatctgga tgggatggag 120
caccatgtgc gcacctgcat ccccaaagtg gagctggtcc ctgccgggaa gcccttctac 180
tgcttgagct cggaggacct gcgcaacacc cactgctgct aactgacta ctgcaacagg 240
atcgacttga ggggtgccag tggtcacctc aaggagcctg agcacccgtc catgtggggc 300

ccggtggaga ccggtggtgg aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 360
gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctccgg 420
accctgagg tcacatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 480
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 540
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 600
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 660
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg 720

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg tcctgcgccg tcaaaggctt ctatcccagc 780
gacatcgccg tggagtggga gagccgctgg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 840
cccgtgctgg actccccgcg ctccttcttc ctctgtgagca agctcaccgt ggacaagagc 900

agggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 960

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 996

<210> 147

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

6xHis tag

<400> 147

His His His His His His

1 5

<210> 148

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 148

Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu

35 40 45

Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala

85 90 95

Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr

100 105