



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월26일  
(11) 등록번호 10-1871510  
(24) 등록일자 2018년06월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7001138  
(22) 출원일자(국제) 2009년06월26일  
심사청구일자 2014년06월20일
- (85) 번역문제출일자 2011년01월17일  
(65) 공개번호 10-2011-0039265  
(43) 공개일자 2011년04월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/003843  
(87) 국제공개번호 WO 2009/158035  
국제공개일자 2009년12월30일
- (30) 우선권주장  
61/133,354 2008년06월26일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
US20070249022 A1\*  
WO2006012627 A2\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
악셀레론 파마 인코포레이티드  
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128
- (72) 발명자  
세르만, 매튜, 엘.  
미국, 매사추세츠 02459, 뉴턴, 자넷 로드 33  
보르그스테인, 니엘스  
미국, 매사추세츠 02052, 메드필드, 플레인 스트리트 86
- (74) 대리인  
강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 31 항

심사관 : 김정태

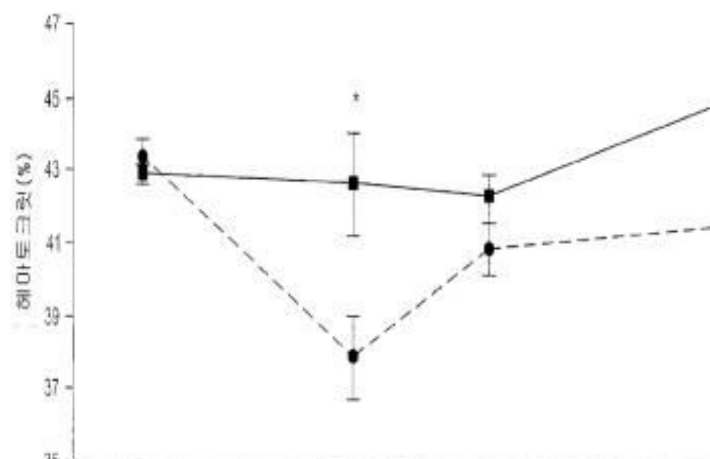
(54) 발명의 명칭 액티빈-ACTRIIA 길항물질을 투약하는 방법 및 치료된 환자의 모니터링

(57) 요약

일정한 측면에서, 본 발명에서는 액티빈-ActRIIa 길항물질을 환자에 투약하는 방법, 그리고 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자를 관리하는 방법을 제시한다. 일정한 측면에서, 이들 방법은 환자에서 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터를 측정하는 단계를 수반한다.

대표도

생쥐에서 화학요법-유도된 빈혈에 대한 ActRIIa-Fc의 효과



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

혈압강하제로 치료를 받았던 환자의 빈혈 치료용 ActRIIa 폴리펩티드의 효과량이 포함된 약학 조제물에 있어서, 상기 ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NOs: 2, 3, 7 또는 12의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 이때 상기 ActRIIa 폴리펩티드는 액티빈 또는 GDF11 또는 액티빈과 GDF11에 결합하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 환자가 다음에서 선택된 하나 이상의 혈액학적 파라미터를 가진다면, 약학 조제물의 투약은 감소, 지연 또는 중단되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물:

- i) 기준을 초과하여 상승된 혈압을 갖거나, 또는 고혈압인 경우;
- ii) 제어되지 않는 고혈압을 갖는 경우;
- iii) 유사한 연령 및 성별의 환자에 대한 정상적인 범위보다 높은 적혈구 세포 수준을 갖는 경우;
- iv) 15g/dl 이상의 헤모글로빈 수준을 갖는 경우; 그리고
- v) 10, 11 또는 12g/dl이 이상의 헤모글로빈 수준을 갖는 경우.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 환자가 기준을 초과하여 상승된 혈압을 갖거나, 또는 고혈압인 경우, 약학 조제물의 투약은 감소되거나, 지연되거나 또는 종료되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 환자가 제어되지 않는 고혈압을 갖는 경우에, 약학 조제물의 투약은 투약은 감소되거나, 지연되거나 또는 종료되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 환자가 유사한 연령과 성별의 환자에 대한 정상적인 범위보다 높은 적혈구 수준을 갖는 경우에, 약학 조제물의 투약은 감소되거나, 지연되거나 또는 종료되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 환자가 15g/dl 이상의 헤모글로빈 수준을 갖는 경우에, 약학 조제물의 투약은 감소되거나, 지연되거나 또는 종료되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 환자가 10, 11 또는 12 g/dl 이상의 헤모글로빈 수준을 갖는 경우에, 약학 조제물의 투약은 감소되거나, 지연되거나 또는 종료되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 환자는 고혈압 환자인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 환자는 전고혈압(pre-hypertensive) 환자인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 10

청구항 1에 있어서, 2주 이내에 1 g/dl 이상의 헤모글로빈 수준에서 상승을 유발하는 위험을 감소시키기 위하여, 약학 조제물이 선택된 양과 간격에서 환자에게 투약하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 11

청구항 1-10 중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 2에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 12

청구항 1-10 중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 13

청구항 1-10 중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 7에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 14

청구항 1-10 중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 12에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 15

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 아래의 특징 중에서 한 가지 이상을 보유하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물:

- i) 최소한  $10^{-7}$  M의  $K_D$ 로 ActRIIa 리간드에 결합하는 특징; 그리고
- ii) 세포 내에서 ActRIIa 신호전달을 저해하는 특징.

#### 청구항 16

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드 도메인 이외에, 생체내 안정성(in vivo stability), 생체내 반감기(in vivo half life), 흡수/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 또는 정제 중에서 한 가지 이상을 증강시키는 하나 이상의 폴리펩티드 부분을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 17

청구항 16에 있어서, 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인과 혈청 알부민으로 구성된 군에서 선택되는 폴리펩티드 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 18

청구항 16에 있어서, 상기 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 19

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 그리고 지질 모이어티에 접합된 아미노산으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 20

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIa-Fc 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 21

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIa-Fc 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 22

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIa-Fc 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 23

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIa-Fc 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 24

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIa-Fc 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 25

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, ActRIIa 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는 ActRIIa-Fc 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 26

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, 60일마다 1회 이하로 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 27

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, 90일마다 1회 이하로 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 28

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, 120일마다 1회 이하로 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 29

청구항 1 내지 10중 어느 한 항에 있어서, 환자는 12 g/dl 이하의 헤모글로빈 수준을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 30

청구항 29에 있어서, 환자는 11 g/dl 이하의 헤모글로빈 수준을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 31

청구항 29에 있어서, 환자는 10 g/dl 이하의 헤모글로빈 수준을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

#### 청구항 32

삭제

#### 청구항 33

삭제

#### 청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련된 출원

[0002] 본 출원은 2008년 6월 26일 제출된 U.S. Provisional Application No. 61/133,354에 우선권을 주장하고, 이의 명세는 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

## 배경 기술

[0003] 배경기술

[0004] 전환 성장 인자-베타(transforming growth factor-beta, TGF-beta) 대과(superfamily)는 공통의 서열 요소(sequence element)와 구조 모티프(structural motif)를 공유하는 다양한 성장 인자를 포함한다. 이들 단백질은 척추동물과 무척추동물 둘 모두에서 다양한 세포 유형에 대한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 대과의 구성원은 배 발생(embryonic development) 동안 패턴 형성(pattern formation)과 조직 특정화(tissue specification)에서 중요한 기능을 수행하고, 지방생성(adipogenesis), 근육발생(myogenesis), 연골형성(chondrogenesis), 심형성(cardiogenesis), 혈액생성(hematopoiesis), 신경생성(neurogenesis), 그리고 상피 세포 분화(differentiation)를 비롯한 다양한 분화 과정(differentiation process)에 영향을 줄 수 있다. 이러한 집단은 2가지 분과: BMP/GDF와 TGF-베타/액티빈(activin)/BMP10 분과로 분류되는데, 이들의 구성원은 다양하고, 종종 상보적인 효과를 나타낸다. TGF-베타 집단의 구성원의 활성을 조종함으로써, 생물체 내에서 현재

한 생리학적 변화를 유도하는 것이 종종 가능하다. 가령, 산록(piedmont)과 벨기에 블루 소(Belgian Blue cattle) 품종은 GDF8(일명, 미오스타틴(myostatin)) 유전자에서 기능 상실 돌연변이(loss-of-function mutation)를 보유하는데, 이는 근육량(muscle mass)에서 눈에 띄는 증가를 유도한다(Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4). 더 나아가, 인간에서, GDF8의 비활성 대립형질(allele)은 증가된 근육량, 그리고 보고된 바에 의하면, 특별한 체력(exceptional strength)과 연관된다(Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8).

[0005] 근육, 뼈, 연골 및 기타 조직에서 변화는 적절한 TGF-베타 집단 구성원에 의해 매개되는 신호전달을 향진하거나, 또는 길항함으로써 달성될 수 있다. 본 발명의 목적은 TGF-베타 대과의 조절물질을 환자에 투여하기 위한 대안적 방법을 제시하는 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 요약

[0007] 부분적으로, 본 발명은 액티빈 길항물질, 그리고 ActRIIa 길항물질(집합적으로, “액티빈-ActRIIa 길항물질”)이 적혈구를 비롯한 다양한 조직에 대해 나타낼 수 있는 효과를 고려하여 적절한 방식으로, 이들 길항물질을 환자에 투여하는 방법에 관계한다. 부분적으로, 본 발명은 액티빈-ActRIIa 길항물질이 적혈구와 헤모글로빈 수준을 증가시키고, 또한 골 밀도를 증가시킬 수 있음을 증명한다. 이러한 이중 효과는 빈혈과 골 손실(bone loss)을 모두 나타내는 환자, 예를 들면, 많은 암 환자(빈혈과 골 손실이 종양의 결과, 또는 방사선 또는 화학요법의 결과일 수 있다), 골다공증(osteoporosis) 환자, 그리고 신부전(renal failure) 환자에서 특히 유익하다. 특히, 본 발명에서는 ActRIIa의 가용성 형태가 액티빈의 저해물질로서 기능하고, 그리고 생체내 투여될 때, 적혈구 수준을 증가시킨다는 것을 증명한다. 가용성 ActRIIa가 액티빈 길항작용(antagonism) 이외의 기전을 통해 적혈구 수준에 영향을 줄 수 있긴 하지만, 그럼에도 불구하고 본 발명에서는 바람직한 치료제가 액티빈 길항작용 또는 ActRIIa 길항작용 또는 둘 모두의 기초에서 선택될 수 있음을 증명한다. 이런 작용제는 집합적으로, 액티빈-ActRIIa 길항물질로서 지칭된다. 본 명세서에서, 그리고 공개된 특허 출원 WO/2009/038745, WO/2008/100384, WO/2008/094708, WO/2008/076437, WO/2007/062188과 WO/2006/012627에서 기술된 바와 같이, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 또한, 예로써 골 성장을 촉진하고, FSH 수준을 감소시키고, 다발성 골수종을 치료하고, 그리고 유방암을 치료하는 것을 비롯한 다양한 다른 치료적 용도를 갖는다. 일정한 사례에서, 골 성장을 촉진하거나, 또는 유방암을 치료하기 위하여 액티빈-ActRIIa 길항물질을 투여할 때, 적혈구에 대한 바람직하지 않은 효과를 감소시키기 위하여, 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여 동안 적혈구에 대한 효과를 모니터링하거나, 또는 액티빈-ActRIIa 길항물질의 용량을 결정하거나 조정하는 것이 바람직하다. 가령, 적혈구 수준, 헤모글로빈 수준, 또는 헤마토크릿 수준에서 과도한 증가는 혈압 또는 기타 바람직하지 않은 부작용에서 증가를 유발할 수 있다. 또한, 적절한 혈액학적 파라미터를 갖는 환자에 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투약을 제한하는 것이 바람직할 수 있다. 가령, 정상 미만(가령, 12 g/dl 미만, 11 g/dl 미만, 10 g/dl 미만, 또는 9 g/dl 미만, 또는 그 이하)의 헤모글로빈 수준을 갖는 환자에게만 투약을 한정하는 것이 바람직하다.

[0008] 이런 이유로, 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 환자에서 적혈구 수준에서 증가와 상관하는 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터, 예를 들면, 적혈구 수준, 혈압, 또는 저장 철을 모니터링함으로써, 예로써 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드, 항-액티빈 항체, 항-ActRIIa 항체, 액티빈- 또는 ActRIIa-표적화된 소형 분자와 압타머, 그리고 액티빈 또는 ActRIIa의 발현을 감소시키는 핵산 분자를 비롯한 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되고 있거나, 또는 치료의 후보인 환자를 관리하는 방법을 제시한다.

[0009] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 액티빈에 결합하는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제시한다. ActRIIa 폴리펩티드는 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드와 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약학적 조제약으로서 조제될 수 있다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 1 마이크로몰(micromolar) 이하, 또는 100, 10 또는 1 나노몰(nanomolar) 이하의  $K_D$ 로 액티빈에 결합할 수 있다. 선택적으로, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 GDF11 및/또는 GDF8에 비하여 액티빈에 선별적으로 결합하고, 선택적으로 GDF11 및/또는 GDF8보다 액티빈에 대하여 최소한 10-배, 20-배 또는 50-배 낮은  $K_D$ 로 결합한다. 특정 작용 기전에 한정 없이, ActRIIa-Fc에서 GDF11/GDF8 저해에 비하여 액티빈 저해에 대한 이러한 정도의 선택성(selectivity)은 근육에 대한 지속적으로 측정가능한 효과를 유발하지 않으면서 뼈 또는 적혈구 생성(erythropoiesis)에 대한 효과를 설명할 것으로 예상된다. 많은 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 적혈구 수준에 대한 바람직한 효과를 달성

하는 용량으로, 근육에서 15% 이하, 10% 이하 또는 5% 이하의 증가를 유발하도록 선택될 것이다. 다른 구체예에서, 근육에 대한 효과는 허용가능하고 선택될 필요가 없다. 조성물은 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에 의한 평가에서 다른 폴리펩티드 성분에 대하여 최소한 95% 순수할 수 있고, 그리고 선택적으로, 조성물은 최소한 98% 순수하다. 이런 조제약에서 이용을 위한 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 본 명세서에 개시된 것들 중의 한 가지, 예를 들면, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 또는 13에서 선택되는 아미노산 서열을 보유하는(즉, 포함하는) 폴리펩티드, 또는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 또는 13에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 보유하는(즉, 포함하는) 폴리펩티드일 수 있다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에는 자연 ActRIIa 폴리펩티드의 기능성 단편, 예를 들면, SEQ ID NO: 1-3에서 선택되는 서열, 또는 C-말단의 10개 내지 15개 아미노산(“꼬리”)이 부재하는 SEQ ID NO: 2의 서열의 최소한 10개, 20개 또는 30개 아미노산을 포함하는 기능성 단편이 포함될 수 있다.

[0010] 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열(가령, 리간드-결합 도메인)에서 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 변형된 ActRIIa 폴리펩티드의 실례는 WO 2006/012627, pp. 59-60과 pp. 55-58, 그리고 U.S. Patent Application Serial No. 12/012,652 전반에서 제공된다. 아미노산 서열에서 변형은 예로써, 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 포유동물, 곤충 또는 다른 진핵생물 세포에서 생산될 때 폴리펩티드의 글리코실화(glycosylation)를 변화시키거나, 또는 폴리펩티드의 단백질 분해 절단(proteolytic cleavage)을 변화시킨다.

[0011] 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 한 도메인으로서 ActRIIa 폴리펩티드(가령, ActRIIa의 리간드-결합 부분) 및 향상된 약물동력학(pharmacokinetics), 더욱 용이한 정제, 특정 조직으로의 표적화 등과 같은 바람직한 특성을 제공하는 하나 이상의 다른 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 가령, 융합 단백질의 도메인은 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡수/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 융합 단백질의 다중화(multimerization) 및/또는 정제 중에서 하나 이상을 강화시킨다. 액티빈-결합 ActRIIa 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인(야생형 또는 변이체), 혈청 알부민, 또는 향상된 약물동력학, 향상된 용해도(solubility) 또는 향상된 안정성과 같은 바람직한 특성을 제공하는 다른 폴리펩티드 부분을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRIIa-Fc 융합은 Fc 도메인과 세포외 ActRIIa 도메인 사이에 위치하는 상대적으로 비구조적 링커를 포함한다. 이러한 비구조적 링커는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 아미노산, 또는 이차 구조가 상대적으로 부재하는 5개 내지 15개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의 아미노산, 또는 양쪽의 혼합물의 인공 서열일 수 있다. 링커는 글리신(glycine)과 프롤린(proline) 잔기가 풍부하고, 예로써, 트레오닌(threonine)/세린(serine)과 글리신(glycine)의 단일 서열 또는 트레오닌/세린과 글리신의 반복 서열(가령, TG<sub>4</sub>(SEQ ID NO:15) 또는 SG<sub>4</sub>(SEQ ID NO: 16) 단일항(singlet) 또는 반복)을 포함할 수 있다. 융합 단백질은 정제 부분서열(suqsequence), 예를 들면, 에피토프 태그(epitope tag), FLAG 태그, 폴리히스티딘(polyhistidine) 서열, GST 융합체를 포함할 수 있다. 선택적으로, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 또는 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 접합된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함한다. 제약학적 조성물은 또한, 하나 이상의 부가적인 화합물, 예를 들면, 골 질환을 치료하는데 이용되는 화합물 또는 빈혈을 치료하는데 이용되는 화합물을 포함한다. 바람직하게는, 제약학적 조성물은 발열원(pyrogen)이 실질적으로 부재한다. 일반적으로, ActRIIa 단백질은 환자에서 부정적인 면역 반응(immune response)의 가능성을 최소화시키기 위하여 ActRIIa 단백질의 적절한 자연적 글리코실화를 매개하는 포유동물 세포주에서 발현시키는 것이 바람직하다. 인간과 CHO 세포주가 성공적으로 이용되고 있고, 다른 통상적인 포유동물 발현 시스템이 유용할 것으로 기대된다.

[0012] 본 명세서에 기술된 바와 같이, ActRIIa-Fc로 명명된 ActRIIa 단백질은 GDF8 및/또는 GDF11에 비하여 액티빈에 대한 선택적 결합, 높은 친화성 리간드 결합, 그리고 동물 모형과 인간 환자에서 2주 이상의 혈청 반감기를 비롯한 바람직한 특성을 갖는다. 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa-Fc 폴리펩티드 및 이런 폴리펩티드와 제약학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 제약학적 조성물을 제시한다.

[0013] 특정 측면에서, 본 발명에서는 가용성 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 제시한다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 앞서 기술된 바와 같은 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 가령, 분리된 핵산은 ActRIIa의 세포외 도메인(가령, 리간드-결합 도메인)을 코딩하는 서열 및 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 내에 위치하거나 세포외 도메인과 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 사이에 위치하는 종결 코돈(stop codon)을 제외하고 ActRIIa의 막통과 도메인 및/또는 세포질 도메인의 일부 또는 전부를 코딩하는 서열을 포함한다. 가령, 분리된 폴리뉴클레오티드는 전장 ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들

면, SEQ ID NO: 4, 또는 ActRIIa의 부분적으로 절두된 이형, 예를 들면, ActRIIa의 세포외 도메인에 상응하는 SEQ ID NO: 5의 핵산 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 3'-말단에서 최소한 600개 뉴클레오티드 앞에, 또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 번역이 전장 ActRIIa의 절두된 부분에 선택적으로 융합된 세포외 도메인을 산출하도록 달리 배치된 전사 종결 코돈(transcription termination codon)을 더욱 포함한다. ActRIIa에 대한 선호되는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 14이다. 본 발명에 개시된 핵산은 발현을 위하여 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 본 발명에서는 이런 재조합 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포를 제시한다. 바람직하게는, 세포는 포유동물 세포, 예를 들면, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포이다.

[0014] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 만드는 방법을 제시한다. 이런 방법은 적절한 세포, 예를 들면, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 인간 세포에서 본 명세서에 개시된 임의의 핵산 분자(가령, SEQ ID NO: 4, 5 또는 14)를 발현하는 단계를 포함할 수 있다. 이런 방법은 a) 가용성 ActRIIa 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 세포를 배양하는 단계, 여기서 상기 세포는 가용성 ActRIIa 발현 구조체로 형질전환되고; 그리고 b) 이렇게 발현된 가용성 ActRIIa 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함할 수 있다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 가공되지 않은, 부분적으로 정제된, 또는 고도로 정제된 분획물(fraction)로서 회수될 수 있다. 정제는 예로써, 임의의 순서로 단백질 A 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피(가령, Q 세파로오스), 소수성 상호작용 크로마토그래피(가령, 페닐세파로오스(phenylsepharose)), 크기 배제 크로마토그래피, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피 중에서 1가지, 2가지 또는 3가지 또는 그 이상을 비롯한 일련의 정제 단계에 의해 달성될 수 있다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 액체 또는 고체(가령, 동결건조된) 형태로 조제될 수 있다.

[0015] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 액티빈-ActRIIa 길항물질을 환자에 투약하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 2주 이내에 0.5 g/dl, 1 g/dl 또는 1.5 g/dl 이상의 헤모글로빈 수준에서 증가를 유발하는 위험을 감소시키기 위하여 선택된 양으로, 그리고 간격에서 환자를 투약하는 단계를 포함한다.

[0016] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 ActRIIa-Fc 융합 단백질을 환자에 투여하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 60일마다, 90일마다, 또는 120일마다 1회 이하로 ActRIIa 융합 단백질을 투여하는 단계를 포함한다. 일정한 구체예에서, 환자는 골 성장이 요구되는 환자, 또는 유방 암 또는 다발성 골수종을 앓고 있거나 이러한 질환이 발병할 위험이 있는 환자, 또는 FSH 감소가 요구되는 환자일 수 있다.

## 과제의 해결 수단

[0017] 발명의 상세한 설명

[0018] 1. 개요

[0019] 전환 성장 인자-베타(transforming growth factor-beta, TGF-beta) 대과(superfamily)는 공통의 서열 요소(sequence element)와 구조 모티프(structural motif)를 공유하는 다양한 성장 인자를 포함한다. 이들 단백질은 척추동물과 무척추동물 모두에서 다양한 세포 유형에 대한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 대과의 구성원은 배 발생(embryonic development) 동안 패턴 형성(pattern formation)과 조직 특정화(tissue specification)에서 중요한 기능을 수행하고, 지방생성(adipogenesis), 근육발생(myogenesis), 연골형성(chondrogenesis), 심형성(cardiogenesis), 혈액생성(hematopoiesis), 신경생성(neurogenesis), 그리고 상피 세포 분화(differentiation)를 비롯한 다양한 분화 과정(differentiation process)에 영향을 줄 수 있다. 이러한 집단은 2가지 분과: BMP/GDF와 TGF-베타/액티빈/BMP10 분과로 분류되는데, 이들의 구성원은 다양하고, 종종 상보적인 효과를 나타낸다. TGF-베타 집단의 구성원의 활성을 조종함으로써, 생물체 내에서 현저한 생리학적 변화를 유도하는 것이 종종 가능하다. 가령, 산록(piedmont)과 벨기에 블루 소(Belgian Blue cattle) 품종은 GDF8(일명, 미오스타틴(myostatin)) 유전자에서 기능 상실 돌연변이(loss-of-function mutation)를 보유하고 있는데, 이는 근육량(muscle mass)에서 눈에 띄는 증가를 유도한다(Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4). 더 나아가, 인간에서, GDF8의 비활성 대립형질(allele)은 증가된 근육량, 그리고 보고된 바에 의하면, 특별한 체력(exceptional strength)에 연관된다(Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8).

[0020] 액티빈(activin)은 TGF-베타 대과에 속하는 이합체(dimeric) 폴리펩티드 성장 인자이다. 2개의 밀접하게 관련된  $\beta$  아단위(subunit)의 동종이합체(homodimer)/이종이합체(heterodimer)(각각,  $\beta_A\beta_A$ ,  $\beta_B\beta_B$ 와  $\beta_A\beta_B$ )인 3가지 주요 액티빈 형태(A, B와 AB)가 존재한다. 인간 게놈은 또한, 액티빈 C와 액티빈 E를 인코딩하는데, 이들은 간에서 주로 발현되고,  $\beta_C$  또는  $\beta_E$ 를 보유하는 이종이합체(heterodimeric) 형태 역시 공지되어 있다. TGF-베타 대과에서, 액티빈은 난소와 태반 세포에서 호르몬 생산을 촉진하고, 신경 세포 생존을 뒷받침하고, 세포 유형

(cell type)에 따라 세포-주기 진행에 긍정적인 또는 부정적인 영향을 주고, 최소한 양서류 배(amphibian embryo)에서 중배엽 분화(mesodermal differentiation)를 유도할 수 있는 독특한 다중기능성 인자이다(DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). 게다가, 자극된 인간 단구성 백혈병 세포(monocytic leukemic cell)로부터 분리된 적혈구 분화 인자(erythroid differentiation factor, EDF)가 액티빈 A에 동일한 것으로 밝혀졌다(Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). 액티빈 A는 골수(bone marrow)에서 조혈(erythropoiesis)을 촉진하는 것으로 제안되었다. 여러 조직에서, 액티빈 신호전달은 관련된 동종이합체, 인히빈(inhibin)에 의해 길항된다. 가령, 뇌하수체(pituitary)로부터 여포-자극 호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH)의 방출 동안, 액티빈은 FSH 분비와 합성을 촉진하는 반면, 인히빈은 FSH 분비와 합성을 예방한다. 액티빈 생물활성(bioactivity)을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질에는 폴라스타틴(follistatin, FS), 폴라스타틴-관련된 단백질(follistatin-related protein, FSRP)과  $\alpha 2$ -마크로글로불린(macroglobulin)이 포함된다.

[0021] TGF- $\beta$  신호는 I형과 II형 세린/트레오닌 키나아제 수용체(kinase receptor)의 이가동의 복합체(heteromeric complex)에 의해 매개되고, 이들은 리간드 자극 이후에 하류 Smad 단백질을 인산화시키고 활성화시킨다(Massague, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). 이들 I형과 II형 수용체는 시스테인-풍부 영역을 공유하는 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 특이성(specificity)을 갖는 세포질 도메인으로 구성되는 막통과 단백질(transmembrane protein)이다. I형 수용체는 신호전달에 필수적이다; II형 수용체는 리간드에 결합하고 I형 수용체의 발현을 위하여 필요하다. I형과 II형 액티빈 수용체는 리간드 결합 이후에 안정한 복합체를 형성하고, II형 수용체에 의한 I형 수용체의 인산화를 유발한다.

[0022] 2개의 관련된 II형 수용체(ActRII), ActRIIa와 ActRIIb는 액티빈에 대한 II형 수용체로서 확인되었다(Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). 액티빈 이외에, ActRIIa와 ActRIIb는 BMP7, Nodal, GDF8과 GDF11을 비롯한 여러 다른 TGF- $\beta$  집단 단백질을 생화학적으로 상호작용할 수 있다(Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4는 액티빈, 특히 액티빈 A에 대한 일차적인 I형 수용체이고, ALK-7은 다른 액티빈, 특히 액티빈 B에 대한 수용체로서 기능한다.

[0023] 본 명세서에서 증명된 바와 같이, 다른 TGF-베타 집단 구성원, 예를 들면, GDF8 또는 GDF11에 대비하여, 액티빈 A에 실질적으로 우선적인 결합을 보이는 가용성 ActRIIa 폴리펩티드(sActRIIa)는 생체내에서 적혈구 수준을 증가시키는데 효과적이다. 특정 기전에 한정됨 없이, sActRIIa의 이러한 효과는 이들 연구에서 이용된 특정 sActRIIa 구조체(구조체)에 의해 나타나는 매우 강한 액티빈 결합(피코몰(picomolar) 해리 상수(dissociation constant))을 고려할 때, 액티빈 길항물질 효과에 의해 주로 유도되는 것으로 기대된다. 기전에 상관없이, 본 명세서로부터, ActRIIa-액티빈 길항물질이 설치류, 원숭이와 인간에서 적혈구 수준을 증가시킨다는 것은 명백하다. 조혈은 에리트로포이에틴(erythropoietin), G-CSF와 철 항상성(homeostasis)을 비롯한 다양한 인자에 의해 조절되는 복잡한 과정이다. 용어 “적혈구 수준 증가”와 “적혈구 형성 촉진”은 임상적으로 관찰가능 지표, 예를 들면, 헤마토크릿, 적혈구 총수와 헤모글로빈 치수를 지칭하고, 이런 변화가 일어나는 기전에 대하여 중립적인 것으로 의도된다.

[0024] 비-인간 영장류에 관하여 본 명세서에서 보고된 데이터는 생쥐, 쥐와 인간에서도 재현가능하고, 이런 이유로 본 발명에서는 설치류 내지 인간 범위의 포유동물에서 적혈구 생산을 촉진하고 적혈구 수준을 증가시키기 위하여 ActRIIa 폴리펩티드 및 기타 액티빈-ActRIIa 길항물질을 이용하는 방법을 제시한다.

[0025] 적혈구 수준의 자극 이외에, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 예로써, 골 성장 촉진(참조: PCT Publication No. WO2007/062188, 이는 본 발명에 순전히 참조로서 편입됨), 그리고 유방 암 치료(참조: PCT Application No. PCT/US2008/001429, 이는 본 발명에 순전히 참조로서 편입됨)를 비롯한 다양한 치료 적용에 유용하다. 일정한 사례에서, 골을 증가시키거나, 또는 유방 암을 치료하는 목적으로 액티빈-ActRIIa 길항물질을 투여할 때, 적혈구에 대한 효과를 감소 또는 최소화시키거나, 또는 달리 모니터링하는 것이 바람직하다. 일부 사례에서, 혈액 세포 및 골 또는 기타 조직에 대한 이중 효과가 바람직할 것이지만, 심지어 전형적으로 정상으로 간주되는 수준까지 적혈구에서 제약학적으로 촉진된 증가가 환자에 대한 부작용을 나타낼 수 있고, 따라서 종종 모니터링되거나, 또는 주의 깊게 관리되는 것으로 일반적으로 인정된다. 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되거나, 또는 치료의 후보인 환자에서 다양한 혈액학적 파라미터를 모니터링함으로써, 개별 환자의 요구, 기준선 혈액학적 파라미터, 그리고 치료 목적에 기초하여 적절한 용량(투여의 양과 빈도 포함)이 결정될 수 있다. 게다가, 시간의 흐름에서 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터에 대한 치료 진행과 효과는 환자 관리를 용이하게 하고, 적절한 유지

용량(maintenance dosing)(양과 빈도 둘 모두)을 결정함으로써 액티빈-ActRIIa 길항물질이 투약되는 환자를 관리하는데 유용할 수 있다.

[0026] 액티빈-ActRIIa 길항물질에는 예로써, 액티빈-결합 가용성 ActRIIa 폴리펩티드; 액티빈(특히,  $\beta A$  또는  $\beta B$ 로 지칭되는 액티빈 A 또는 B 아단위)에 결합하고 ActRIIa 결합을 교란시키는 항체; ActRIIa에 결합하고 액티빈 결합을 교란시키는 항체; 액티빈 또는 ActRIIb 결합에 대하여 선택된 비-항체 단백질(이들 단백질의 실례와 이들의 설계와 선택 방법은 WO/2002/088171, WO/2006/055689와 WO/2002/032925를 참조한다); 액티빈 또는 ActRIIa 결합을 위하여 선택되고 Fc 도메인에 종종 부착되는 무작위화 펩티드(randomized peptide) 등이 포함된다. 액티빈 또는 ActRIIa 결합 활성을 갖는 2개의 상이한 단백질(또는 다른 모이어티(moiety)), 특히 I형(가령, 가용성 I형 액티빈 수용체)과 II형(가령, 가용성 II형 액티빈 수용체) 결합 부위를 각각 차단하는 액티빈 접합제(binder)는 이중기능성(bifunctional) 결합 분자를 산출하기 위하여 서로 연결될 수 있다. 핵산 압타머, 소형 분자와 액티빈-ActRIIa 신호전달 축을 저해하는 다른 작용제는 액티빈-ActRIIa 길항물질로서 포함된다. 인히빈(즉, 인히빈 알파 아단위; 하지만, 인히빈이 모든 조직에서 액티빈을 보편적으로 길항하지는 않는다), 폴라스타틴(follistatin)(가령, 폴라스타틴-288과 폴라스타틴-315), FSRP, FLRG, 액티빈 C, 알파(2)-마크로글로불린, 그리고 M108 A(108번 위치에서 메티오닌(methionine)에서 알라닌(alanine)으로 변화) 돌연변이체 액티빈 A를 비롯한 다양한 단백질이 액티빈-ActRIIa 길항물질 활성을 갖는다. 일반적으로, 액티빈의 대안적 형태, 특히 I형 수용체 결합 도메인에서 변형을 보유하는 형태는 II형 수용체에 결합할 수 있지만 활성 3원 복합체(ternary complex)를 형성할 수 없기 때문에, 길항물질로서 기능한다. 부가적으로, 안티센스(antisense) 분자, siRNA, 또는 액티빈 A, B, C 또는 E, 특히 ActRIIa 발현을 저해하는 리보자임(ribozyme)과 같은 핵산이 액티빈-ActRIIa 길항물질로서 이용될 수 있다. 이용되는 이러한 액티빈-ActRIIa 길항물질은 TGF-베타 집단의 다른 구성원, 특히 GDF8과 GDF11에 대하여, 액티빈-매개된 신호전달을 저해하는데 선택성을 나타낼 수 있다.

[0027] 본 명세서에 이용되는 용어는 일반적으로, 본 발명의 배경 내에서, 그리고 각 용어가 이용되는 특정 상황에서, 당분야의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본 발명의 조성물과 방법, 그리고 이들을 만들고 이용하는 방법을 기술함에 있어 실시자(practitioner)에게 부가적인 보도(guidance)를 제공하기 위하여 하기에 또는 본 명세서의 다른 곳에서 논의된다. 이용되는 용어의 범위 또는 의미는 이러한 용어가 이용되는 특정 상황으로부터 명백할 것이다.

[0028] 일반적으로, “대략”은 측정의 특성 또는 정확도를 고려할 때, 측정된 양에 대한 허용 오차(acceptable degree of error)를 의미한다. 전형적으로, 예시적인 허용 오차는 일정한 수치 또는 수치 범위의 20 퍼센트(%) 이내, 바람직하게는, 10% 이내, 더욱 바람직하게는, 5% 이내로 존재한다.

[0029] 대안으로, 특히 생물학적 시스템에서, “대략”은 일정한 수치의 1 크기 자릿수(order of magnitude) 이내, 바람직하게는, 5-배 이내, 더욱 바람직하게는, 2-배 이내의 수치를 의미한다. 본 명세서에 제공된 수치량(numerical quantity)은 달리 명시되지 않는 경우에 근사치(approximate)인데, 이는 “대략”이 명시되지 않는 경우에, 유추될 수 있음을 의미한다.

[0030] 본 발명의 방법은 서열을 서로 비교하는 단계, 예를 들면, 야생형 서열을 하나 이상의 돌연변이체(서열 변이체)와 비교하는 단계를 포함한다. 전형적으로, 이런 비교는 예로써, 당분야에 널리 공지된 서열 정렬 프로그램 및/또는 알고리즘(가령, BLAST, FASTA와 MEGALIGN)을 이용한 고분자 서열의 정렬을 포함한다. 당업자는 이런 정렬에서, 돌연변이가 잔기 삽입 또는 결실을 내포하는 경우에, 서열 정렬이 삽입되거나 결실된 잔기를 보유하지 않는 고분자 서열 내에 “갭(gap)”(전형적으로, 대시(dash), 또는 “A”로 표시됨)을 도입할 것임을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

[0031] “상동한(homologous)”은 모든 문법적 형태와 변화된 스펠링에서, 동일한 종의 생물체에서 대과로부터 단백질, 그리고 상이한 종의 생물체로부터 상동한 단백질을 비롯한, “공통의 진화적 기원(common evolutionary origin)”을 공유하는 두 단백질 사이의 상관관계를 지칭한다. 이들 단백질(또는 이들의 인코딩 핵산)은 동일성 비율(percent identity)의 관점에서, 또는 특정 잔기 또는 모티프와 보존된 위치의 존재에 의해, 그들의 서열 유사성(sequence similarity)에 의해 반영되는 서열 상동성(sequence homology)을 갖는다.

[0032] “서열 유사성”은 모든 문법적 형태에서, 공통의 진화적 기원을 공유하거나 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 동일성 또는 일치성의 정도를 지칭한다.

[0033] 하지만, 통상적인 관례와 본 출원에서, “고도로”와 같은 부사로 수식될 때 “상동한”은 서열 유사성을 지칭하고, 공통의 진화적 기원에 관련되거나 관련되지 않는다.

[0034] 2. ActRIIa 폴리펩티드

[0035] 일정한 측면에서, 본 발명은 ActRIIa 폴리펩티드에 관계한다. 본 명세서에서, “ActRIIa”는 임의의 종으로부터 액티빈 수용체 타입 IIa(ActRIIa) 단백질의 집단 및 돌연변이유발(mutagenesis) 또는 다른 변형에 의해 이런 ActRIIa 단백질로부터 유래된 변이체를 지칭한다. 본 명세서에서 ActRIIa에 대한 언급은 현재까지 확인된 형태 중에서 하나에 대한 언급인 것으로 이해되어야 한다. ActRIIa 집단의 구성원은 일반적으로, 시스테인-풍부한 영역을 포함하는 리간드-결합 세포외 도메인, 막통과 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 키나아제 활성을 갖는 세포질 도메인으로 구성되는 막통과 단백질이다.

[0036] “ActRIIa 폴리펩티드”에는 ActRIIa 집단 구성원의 임의의 자연 발생 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 및 유용한 활성을 유지하는 이들의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체, 펩티드유사 형태(peptidomimetic form) 포함)가 포함된다(참조: WO/2006/012627). 가령, ActRIIa 폴리펩티드에는 ActRIIa 폴리펩티드 서열에 최소한 80% 동일한, 바람직하게는, 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 보유하는, 임의의 공지된 ActRIIa의 서열로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 단백질 및/또는 액티빈에 결합하고 이들의 기능을 저해한다. 바람직하게는, ActRIIa 폴리펩티드는 생체내에서 적혈구 형성을 촉진하는 활성에 대하여 선택될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 인간 ActRIIa 전구체 폴리펩티드(SEQ ID NO: 1) 및 가용성 인간 ActRIIa 폴리펩티드(가령, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12)가 포함된다.

[0037] 인간 ActRIIa 전구체 단백질 서열은 아래와 같다:

[0038] MGAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVLDLWITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLKNNLTACIADFGALKFEAGKSAGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSEDMQEVVHHKKRPVLRDYQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQLTNIITTEDIVTVVTMTNVDFPPKESSL (SEQ ID NO: 1)

[0039] 신호 펩티드는 단일선으로 표시된다; 세포외 도메인은 굵게 표시되고, 잠재적인 N-연결된 글리코실화 부위는 이중선으로 표시된다.

[0040] 인간 ActRIIa 가용성(세포외), 가공된 폴리펩티드 서열은 아래와 같다:

[0041] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

[0042] 세포외 도메인의 C-말단 “꼬리”는 밑줄로 표시된다. “꼬리” 결실된 서열(Δ15 서열)은 아래와 같다:

[0043] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO: 3)

[0044] 인간 ActRIIa 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다(Genbank entry NM\_001616의 뉴클레오타이드 164-1705):

[0045] atgggagctgctgcaagttggcgtttgccgtctttcttatctcctgttcttcagggtgctatacttggtagatcagaaactcaggagtgtctttctttaatgctaattgggaaaaagacagaaccaatcaaactgggtgtgaaccgtgttatgggtgacaaagataaacggcgccattgttttgctacctggaagaatatttctgggtccattgaaatagtgaaacaaggttgttggtggatgatatacaactgctatgacaggactgattgtgtagaaaaaaagacagccctgaagtataatttggtgctgtgagggaatatgtgtaataaaaagttttcttatttccagagatggaagtacacagcccacttcaaataccagttacacctaacgccacctataacaatcctgctctattccttggtgccacttatgttaattgcggggatgtgctatttgtgcattttggtgtacaggcatcacaagatggcctaccctctgtacttgttccaactcaagaccaggaccacccccaccttctccattactagggttgaaaccactgcagttattagaagtgaagcaagggaagatttggttgtgtctggaagcccgattgcttaacgaatatgtggctgtcaaaatatccaatacaggacaaacagtcaggcgaataatgaatacgaagtctacagttgcttggaatgaagcatgagaacatatcacagttcatttggtgcagaaaaacaggcaccagtggtgatgtggatctttggctgatcacagcatctcatgaaaag

gggttcactatcagactttcttaaggctaatgtggtctcttgaatgaactgtgtcatattgcagaaccatggctagaggattggcatattacatgaggat  
atacttggcctaaaagatggccacaacctgccatattcacaggacatcaaaagtaaaaatgtgctgttgaacaaacacgtgacagcttgcatgtgtgac  
tttgggttggccttaaaatttgaggctggcaagtctgcaggcgataccatggacaggttggtaccggagggtacatggctccagaggtattagagggtgct  
ataaacttccaaagggatgcatttttgaggatagatgtatgcatgggat tagtcctatgggaactggcttctcgctgtactgctgcagatggacctgta  
gatgaatacatgttgccatttgaggaggaaattggccagcatccatctcttgaagacatgcaggaagtgtgtgtgcataaaaaaaaagaggcctgttttaaga  
gattattggcagaacatgctggaatggcaatgctctgtgaaaccattgaagaatgttgggatcacgacgcagaagccaggttatcagctggatgtgtagggt  
gaaagaattaccagatgcagagactaacaataattattaccacagaggacattgtaacagtgggcacaaatggtgacaaatgttgactttctccaaagaa  
tctagtctatga (SEQ ID NO: 4)

[0046] 인간 ActRIIa 가용성(세포외) 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다:

[0047] atacttggtagatcagaactcaggagtgtcttttcttaatgctaattgggaaaaagacagaaccaatcaaactgggtgtgaaccgtgttatggtgacaaa  
gataaacggcgcatgttttgcctacgtggaagaatatttctggttccattgaatagtgaacaaggttgttggctggatgatcaactgctatgacagg  
actgattgtgtagaaaaaaaagacagccctgaagtatattttgtgtgtgagggcaatatgtgaatgaaaagttttcttattttccagagatggaagtc  
acacagcccacttcaaactccagtacacctaagccacc (SEQ ID NO: 5)

[0048]

[0049] 일정한 구체예에서, 본 발명은 가용성 ActRIIa 폴리펩티드에 관계한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, “가용성 ActRIIa 폴리펩티드”는 일반적으로, ActRIIa 단백질의 세포외 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 본 명세서에서, “가용성 ActRIIa 폴리펩티드”에는 ActRIIa 단백질의 임의의 자연 발생 세포외 도메인 및 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 펩티드 유사 형태 포함)가 포함된다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 액티빈, 특히 액티빈 AA, AB, BB, 또는 C 또는 E 아단위를 포함하는 형태에 결합하는 능력을 유지하는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 1 nM 이하의 해리 상수로 액티빈 AA에 결합한다. ActRIIa 단백질의 세포외 도메인은 액티빈에 결합하고, 일반적으로 생리학적 조건에서 가용성이며, 따라서 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드로 명명될 수 있다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12, 13에 예시된 가용성 폴리펩티드가 포함된다. SEQ ID NO:7은 ActRIIa-hFc로 지칭되고, 실시예에서 더욱 구체적으로 기술된다. 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드의 다른 실례는 ActRIIa 단백질의 세포외 도메인 이외에, 신호 서열, 예를 들면, 꿀벌 멜리틴(melittin) 리더 서열(SEQ ID NO: 8), 조직 플라스미노겐 활성화인자(tissue plasminogen activator, TPA) 리더(SEQ ID NO: 9) 또는 고유 ActRIIa 리더(SEQ ID NO: 10)를 포함한다. SEQ ID NO: 13에 예시된 ActRIIa-hFc 폴리펩티드는 TPA 리더를 이용한다.

[0050] 활성 ActRIIa 변이체 단백질에 대한 일반적인 방식은 각각, SEQ ID NO: 2의 아미노산 12-82를 포함하지만, 선택적으로 각각, 1-5 또는 3-5 범위의 위치에서 시작되고 110-116 또는 110-115 범위의 위치에서 종결되며 리간드 결합 포켓 내에 1, 2, 5, 10 또는 15개 이하의 보존성 아미노산 변화, 그리고 리간드 결합 포켓 내에 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82번 위치에서 0개, 1개 또는 그 이상의 비-보존성 변경을 포함하는 것이다. 이런 단백질은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 29-109의 서열에 80%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 유지하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0051] ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 활성 단편은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 상응하는 단편으로부터 재조합 방식으로 생산된 폴리펩티드를 선별함으로써 획득될 수 있다. 이에 더하여, 단편은 당분야에 공지된 기술, 예를 들면, 통상적인 Merrifield 고체상(solid phase) f-Moc 또는 t-Boc 화학을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 이들 단편은 생산되고(재조합 방식으로 또는 화학적 합성으로), ActRIIa 단백질, 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항물질(저해물질)로서 기능할 수 있는 펩티드 단편을 확인하기 위하여 검사될 수 있다.

[0052] ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 활성 변이체는 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 상응하는 돌연변이된 핵산으로부터 재조합 방식으로 생산된 변형된 폴리펩티드의 라이브러리(library)를 선별함으로써 획득될 수 있다. 이들 변이체는 생산되고 ActRIIa 단백질, 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항물질(저해물질)로서 기능할 수 있는 변이체를 확인하기 위하여 검사될 수 있다. 일정한 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일정한 사례에서, 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0053] 기능적 변이체는 치료 효능(therapeutic efficacy), 또는 안정성(가령, 탈체 반감기 및 생체내 단백질 분해 변성에

대한 내성)의 강화와 같은 목적을 위하여 ActRIIa 폴리펩티드의 구조를 변형함으로써 산출된다. 액티빈 결합을 유지하도록 선택되는 이런 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 자연-발생 ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 등가물(functional equivalent)로 간주된다. 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 예로써, 아미노산 치환, 결실, 또는 부가에 의해 산출될 수도 있다. 가령, 루이신(leucine)의 이소루이신(isoleucine) 또는 발린(valine)으로의 고립된 치환, 아스파라긴산염(aspartate)의 글루타민산염(glutamate)으로의 고립된 치환, 트레오닌(threonine)의 세린(serine)으로의 고립된 치환, 또는 구조적으로 관련된 아미노산으로 아미노산의 유사 치환(가령, 보존성 돌연변이(conservative mutations))이 생성 분자의 생물학적 활성에 별다른 영향을 주지 않을 것으로 기대하는 것은 합당하다. 보존성 치환(conservative replacement)은 측쇄(side chain)에서 관련된 아미노산 집단 내에서 발생하는 치환이다. ActRIIa 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화가 기능성 동족체(functional homolog)를 결과하는 지의 여부는 야생형 ActRIIa 폴리펩티드에서와 유사한 방식으로 세포내 반응을 산출하는 변이체 ActRIIa 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0054] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 폴리펩티드의 글리코실화를 변화시키는 ActRIIa 폴리펩티드의 특이적인 돌연변이를 고려한다. 이런 돌연변이는 하나 이상의 글리코실화 부위, 예를 들면, O-연결된 또는 N-연결된 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하기 위하여 선택된다. 아스파라긴-연결된 글리코실화 인식 부위는 일반적으로, 적절한 세포 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트리펩티드(tripeptide) 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린(여기서, "X"는 임의의 아미노산이다)을 포함한다. 이러한 변형은 야생형 ActRIIa 폴리펩티드의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기(O-연결된 글리코실화 부위의 경우)의 추가 또는 이런 잔기에 의한 치환에 의해 달성될 수도 있다. 글리코실화 인식 부위의 첫 번째 또는 세 번째 아미노산 위치의 한쪽 또는 양쪽에서 다양한 아미노산 치환 또는 결실(및/또는 두 번째 위치에서 아미노산 결실)은 변형된 트리펩티드 서열에서 비-글리코실화를 유발한다. ActRIIa 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 총수를 증가시키는 다른 수단은 ActRIIa 폴리펩티드에 글리코시드(glycoside)의 화학적 또는 효소적 결합이다. 이용된 결합 양식(coupling mode)에 따라, 당은 (a) 아르기닌(arginine)과 히스티딘(histidine); (b) 유리 카르복실 기(free carboxyl group); (c) 유리 설프드릴 기(free sulfhydryl group), 예를 들면, 시스테인; (d) 유리 히드록실 기(free hydroxyl group), 예를 들면, 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린(hydroxyproline); (e) 방향족 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 또는 트립토판(tryptophan); 또는 (f) 글루타민(glutamine)의 아마이드 기(amide group)에 부착될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드 상에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화(deglycosylation)는 예로써, 화합물 트리플루오르메탄설포산(trifluoromethanesulfonic acid), 또는 등가의 화합물에 ActRIIa 폴리펩티드의 노출을 수반한다. 이러한 처리는 아미노산 서열을 본래 상태로 유지하면서, 연결 당(linking sugar)(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 전체 당의 절단을 결과한다. ActRIIa 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350에 기술된 바와 같이, 다양한 엔도-와 엑소-글리코시다아제의 이용으로 달성될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드의 서열은 포유동물, 효모, 곤충과 식물 세포 모두 상기 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴을 도입하기 때문에, 이용된 발현 시스템의 타입에 따라, 적절히 조정될 수 있다. 일반적으로, 인간에 이용되는 ActRIIa 단백질은 다른 포유동물 발현 세포주 역시 유용할 것으로 기대되긴 하지만, 적절한 글리코실화를 제공하는 포유동물 세포주, 예를 들면, HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현된다. 다른 비-포유동물 세포주(가령, 효모, 대장균(*E. coli*), 곤충 세포)가 이용될 수 있고, 그리고 일부 사례에서, 이런 세포주는 발현된 단백질 상에서 포유동물-타입 글리코실화 패턴을 공여하는 효소를 포함하도록 조작될 수 있다.

[0055] 본 발명에서는 돌연변이체, 특히 ActRIIa 폴리펩티드의 조합 돌연변이체(combinatorial mutant) 세트 및 절두 돌연변이체(truncation mutant)를 산출하는 방법을 더욱 고려한다; 조합 돌연변이체의 집합은 기능적 변이체 서열을 확인하는데 특히 유용하다. 이런 조합 라이브러리(combinatorial library)를 선별하는 목적은 액티빈 또는 다른 리간드에 결합하는 ActRIIa 폴리펩티드 변이체를 산출하는 것이다. 다양한 선별 검사법(screening assay)이 아래에 제공되는데, 이들 검사법은 변이체를 평가하는데 이용될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 변이체는 ActRIIa 리간드에 결합하거나, ActRIIa 폴리펩티드에 ActRIIa 리간드의 결합을 예방하거나, 또는 ActRIIa 리간드에 의해 유발된 신호전달을 간섭하는 능력에 대하여 선별될 수 있다.

[0056] ActRIIa 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 세포-기초된 또는 생체내 검사법으로 조사될 수도 있다. 가령, 조혈에 관여하는 유전자의 발현에 대한 ActRIIa 폴리펩티드 변이체의 효과가 평가된다. 이는 필요에 따라, 하나 이상의 제조합 ActRIIa 리간드 단백질(가령, 액티빈)의 존재에서 수행되고, 세포는 ActRIIa 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 그리고 선택적으로, ActRIIa 리간드를 산출하기 위하여 형질감염된다. 유사하게, ActRIIa 폴리펩

티드는 생쥐 또는 다른 동물에 투여되고, 그리고 하나 이상의 혈액 척도, 예를 들면, RBC 총수, 헤모글로빈, 또는 망상적혈구 총수가 평가된다.

[0057] 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 선별적 또는 전반적으로 증가된 효능을 갖는 조합적으로-유도된 변이체가 산출될 수 있다. 유사하게, 돌연변이유발은 상응하는 야생형 ActRIIa 폴리펩티드와 극적으로 상이한 세포 내 반감기를 갖는 변이체를 산출할 수 있다. 가령, 변형된 단백질은 고유 ActRIIa 폴리펩티드의 파괴, 또는 비활성화(inactivation)를 유발하는 단백질 분해 변성 또는 다른 세포 과정에 더욱 안정한 또는 덜 안정하게 될 수 있다. 이런 변이체 및 이들을 인코딩하는 유전자는 ActRIIa 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 ActRIIa 폴리펩티드 수준을 변화시키는데 이용될 수 있다. 가령, 짧은 반감기는 더욱 일시적인 생물학적 효과를 유도할 수 있고, 유도성 발현 시스템의 일부일 때, 세포 내에서 재조합 ActRIIa 폴리펩티드 수준의 더욱 엄격한 제어를 가능하게 한다. Fc 융합 단백질에서, 돌연변이는 상기 단백질의 반감기를 변화시키기 위하여 링커(존재하면) 및/또는 Fc 부분 내에서 수행될 수 있다.

[0058] 조합 라이브러리는 최소한, 잠재적인 ActRIIa 폴리펩티드 서열의 일부분을 각각 포함하는 폴리펩티드 라이브러리를 인코딩하는 유전자의 축중 라이브러리(degenerate library)에 의해 산출될 수 있다. 가령, 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물은 잠재적인 ActRIIa 폴리펩티드 뉴클레오타이드 서열의 축중 세트가 개별 펩티드로서 발현되거나, 또는 대안으로, 더욱 큰 융합단백질의 한 세트(가령, 파지 전사(phage display)의 경우)로서 발현되도록 유전자 서열 내에 효소적으로 결합될 수 있다.

[0059] 잠재적인 동족체(homolog)의 라이브러리가 축중 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 산출될 수 있는 많은 방법이 존재한다. 축중 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기 내에서 수행될 수 있고, 합성 유전자는 이후, 발현을 위한 적절한 벡터 내로 결합될 수 있다. 축중 올리고뉴클레오타이드의 합성은 당분야에 널리 공지되어 있다(참조: Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). 이들 기술은 다른 단백질의 지향된 진화(directed evolution)에 이용되고 있다(참조: 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; U.S. Patent No: 5,223,409, 5,198,346, 5,096,815).

[0060] 대안으로, 조합 라이브러리를 산출하기 위하여 다른 형태의 돌연변이유발이 이용될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 변이체는 예로써, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발(alanine scanning mutagenesis) 등(Ruf et al., (1994) Biochemistry 33: 1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085); 링커 스캐닝 돌연변이유발(linker scanning mutagenesis)(Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); 포화 돌연변이유발(saturation mutagenesis)(Meyers et al., (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이유발(Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 또는 화학적 돌연변이 등을 비롯한 무작위 돌연변이유발(random mutagenesis)(Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)을 이용한 선별에 의해 라이브러리로부터 산출되고 분리될 수 있다. 특히 조합 세팅(combinatorial setting)에서 링커 스캐닝 돌연변이유발(linker scanning mutagenesis)은 절두된(생물활성) 형태의 ActRIIa 폴리펩티드를 확인하기 위한 매력적인 방법이다.

[0061] 점 돌연변이(point mutation)와 절두(truncation)에 의해 산출된 조합 라이브러리의 유전자 산물을 선별하고, 특히 일정한 특성을 갖는 유전자 산물에 대한 cDNA 라이브러리를 선별하기 위한 다양한 기술이 당분야에 공지되어 있다. 이런 기술은 일반적으로, ActRIIa 폴리펩티드의 조합 돌연변이유발(combinatorial mutagenesis)에 의해 산출된 유전자 라이브러리의 신속한 선별에 적용된다. 대형 유전자 라이브러리를 선별하는데 가장 널리 이용되는 기술은 전형적으로, 이러한 유전자 라이브러리를 복제가능 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 생성된 벡터 라이브러리로 적절한 세포를 형질전환하는 단계, 원하는 활성의 검출이 산물이 검출된 유전자를 인코딩하는 벡터의 상대적으로 용이한 분리를 가능하게 하는 조건 하에 이들 조합 유전자(combinatorial gene)를 발현하는 단계를 포함한다. 바람직한 검사법에는 액티빈 결합 검사법 및 액티빈-매개된 세포 신호전달 검사법이

포함된다.

[0062] 일정한 구체예에서, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 변형 이외에, 번역후 변형을 더욱 포함한다. 이런 변형에는 아세틸화(acetylation), 카르복실화(carboxylation), 글리코실화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 지질화(lipidation), 아실화(acylation) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 결과적으로, 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 지질(lipid), 폴리- 또는 모노-사카라이드, 인산염을 포함한다. ActRIIa 폴리펩티드의 기능성에 대한 이런 비-아미노산 요소의 효과는 다른 ActRIIa 폴리펩티드 변이체에 대하여 본 명세서에 기술된 바와 같이 검사될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드가 ActRIIa 폴리펩티드의 초기 형태(nascent form)를 절단함으로써 세포 내에서 생산될 때, 번역후 가공(post-translational processing) 역시 상기 단백질의 정확한 접힘(folding) 및/또는 기능에 중요하다. 상이한 세포(가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이런 번역후 활성을 위한 특이적인 세포 조직(cellular machinery)과 특징적인 기전을 보유하고, ActRIIa 폴리펩티드의 정확한 변형과 가공을 담보하도록 선택된다.

[0063] 일정한 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 변이체 또는 변형된 형태에는 ActRIIa 폴리펩티드의 최소한 일부분 및 하나 이상의 융합 도메인을 보유하는 융합 단백질이 포함된다. 이런 융합 도메인의 널리 공지된 실례에는 폴리히스티딘(polyhistidine), Glu-Glu, 글루타티온 S 전달효소(glutathione S transferase, GST), 티오레독신(thioredoxin), 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토오스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 특성을 공여하도록 선택될 수 있다. 가령, 일부 융합 도메인은 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 분리에 특히 유용하다. 친화성 정제를 위하여, 친화성 크로마토그래피에 적합한 매트릭스(matrix), 예를 들면, 글루타티온-, 아밀라아제-, 그리고 니켈- 또는 코발트-접합된 수지가 이용된다. 대부분의 이들 매트릭스는 “키트” 형태, 예를 들면, Pharmacia GST 정제 시스템 및 (HIS<sub>6</sub>) 융합 파트너와 함께 이용되는 QIAexpress™ 시스템(Qiagen)으로 가용하다. 다른 실례로써, 융합 도메인은 ActRIIa 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 선택된다. 이런 검출 도메인의 실례에는 다양한 형광 단백질(가령, GFP) 및 특이적인 항체가 가용한 일반적으로 짧은 펩티드 서열인 “에피토프 태그(epitope tag)”가 포함된다. 특이적인 단클론 항체가 용이하게 가용한 널리 공지된 에피토프 태그에는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(influenza virus haemagglutinin, HA), c-myc 태그 등이 포함된다. 일부 사례에서, 융합 도메인은 관련된 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 절단하여 이로부터 재조합 단백질을 유리할 수 있도록 하는 프로테아제 절단 부위, 예를 들면, 인자 Xa 또는 트롬빈(thrombin)에 대한 절단 부위를 보유한다. 유리된 단백질은 이후, 차후의 크로마토그래피 분리(chromatographic separation)에 의해 융합 도메인으로부터 분리될 수 있다. 바람직한 특정 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 생체내에서 ActRIIa 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인(“안정화제” 도메인)과 융합된다. “안정화”는 이러한 안정화가 감소된 파괴, 신장에 의한 감소된 제거, 또는 다른 약물동력학적 효과에 기인하는 지에 상관없이, 혈청 반감기를 증가시키는 무언가를 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 단백질에 바람직한 약물동력학적 특성을 공여하는 것으로 알려져 있다. 면역글로불린으로부터 불변 도메인, 특히 IgG 중쇄(heavy chain) 역시 안정화 도메인으로서 이용될 수 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 융합이 바람직한 특성을 공여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 유형의 융합 도메인에는 다합체화(가령, 이합체화, 사합체화) 도메인 및 기능적 도메인(부가적인 생물학적 기능, 예를 들면, 골 성장의 추가적인 자극을 공여한다)이 포함된다.

[0064] 특정 실례로써, 본 발명에서는 Fc 도메인에 융합된 ActRIIa의 가용성 세포외 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제시한다. IgG1 Fc 도메인의 실례는 하기에 도시된다(SEQ ID NO: 6).

[0065] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHPDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKC K(A)VSNAKLPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHN(A)HYTQKSLSPGK\*

[0066] 선택적으로, Fc 도메인은 Asp-265, 리신 322, Asn-434와 같은 잔기에서 하나 이상의 돌연변이를 보유한다. 일정한 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나 이상(가령, Asp-265 돌연변이)을 보유하는 변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 대한 결합 능력이 감소한다. 다른 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나 이상(가령, Asn-434 돌연변이)을 보유하는 변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC 클래스 I-관련된 Fc-수용체(FcRN)에 대한 결합 능력이 증가한다. IgG2, IgG3과 IgG4로부터 Fc 도메인 역시 이용될 수 있다.

[0067] 이들 융합 단백질의 상이한 요소는 원하는 기능성(functionality)과 일치하는 방식으로 정렬될 수 있다. 가령,

ActRIIa 폴리펩티드가 이중성 도메인에서 C-말단에 위치하거나, 또는 대안으로, 이중성 도메인이 ActRIIa 폴리펩티드에서 C-말단에 위치한다. ActRIIa 폴리펩티드 도메인 및 이중성 도메인은 융합 단백질 내에서 반드시 인접할 필요가 없고, 부가적인 도메인 또는 아미노산 서열이 한쪽 도메인에서 C- 또는 N-말단, 또는 이들 도메인 사이에 포함될 수 있다.

[0068] 일정한 구체예에서, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 이상의 변형을 포함한다. 가령, 이런 변형은 ActRIIa 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 증강시키거나, ActRIIa 폴리펩티드의 순환 반감기(circulatory half-life)를 증강시키거나, 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 단백질 분해 변성을 감소시킨다. 이런 안정화 변형에는 융합 단백질(가령, ActRIIa 폴리펩티드와 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질 포함), 글리코실화 부위의 변형(가령, ActRIIa 폴리펩티드에 글리코실화 부위의 추가 포함), 탄수화물 모이어티(carbohydrate moiety)의 변형(가령, ActRIIa 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거 포함) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 명세서에서, “안정화 도메인”은 융합 단백질의 경우에서처럼 융합 도메인(가령, Fc)을 지칭할 뿐만 아니라, 탄수화물 모이어티와 같은 비-단백질성 변형, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비-단백질성 모이어티를 포괄한다.

[0069] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드의 분리된 및/또는 정제된 형태를 이용하는데, 이들은 다른 단백질로부터 분리되거나, 또는 다른 단백질이 실질적으로 부재한다. ActRIIa 폴리펩티드는 일반적으로, 재조합 핵산으로부터 발현으로 생산된다.

### [0070] 3. ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산

[0071] 일정한 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에 기술된 단편, 기능적 변이체와 융합 단백질을 비롯한 임의의 ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)를 인코딩하는 분리된 및/또는 재조합 핵산을 제시한다. 가령, SEQ ID NO: 4는 자연 발생 인간 ActRIIa 전구체 폴리펩티드를 인코딩하는 반면, SEQ ID NO: 5는 ActRIIa의 가공된 세포의 도메인을 인코딩한다. 본 발명의 핵산은 단일-가닥 또는 이중-가닥이다. 이런 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 이들 핵산은 예로써, ActRIIa 폴리펩티드를 제조하는 방법에서, 또는 직접적인 치료제(가령, 유전자 치료법에서)로서 이용된다.

[0072] 일정한 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 핵산에는 SEQ ID NO: 4 또는 5의 변이체 핵산 역시 포함된다.

[0073] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 SEQ ID NO: 4 또는 5에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 분리된 또는 재조합 핵산 서열을 제시한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, SEQ ID NO: 4 또는 5에 상보적인 핵산 서열 및 SEQ ID NO: 4 또는 5의 변이체 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 서열은 분리되고, 재조합되고 및/또는 이중성 뉴클레오티드 서열과, 또는 DNA 라이브러리 내에 융합될 수 있다.

[0074] 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산에는 높은 엄밀도 조건(stringent condition) 하에 SEQ ID NO: 4 또는 5에 열거된 뉴클레오티드 서열, SEQ ID NO: 4 또는 5의 보체 서열, 또는 이들의 단편에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열 역시 포함된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄밀도 조건은 변화될 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 엄밀도 조건은 변화될 수 있다. 가령, 대략 45℃에서 6.0 x 염화나트륨(sodium chloride)/구연산나트륨(sodium citrate)(SSC)에서 혼성화, 이후 50℃에서 2.0 x SSC의 세척을 수행할 수 있다. 가령, 세척 단계에서 염 농도는 50℃에서 대략 2.0 x SSC의 낮은 엄밀도 내지 50℃에서 대략 0.2 x SSC의 높은 엄밀도에서 선택될 수 있다. 이에 더하여, 세척 단계에서 온도는 실온(대략 22℃)에서 낮은 엄밀도 조건에서 대략 65℃에서 높은 엄밀도 조건으로 증가될 수 있다. 온도와 염 모두 변화되거나, 또는 다른 변수가 변하는 반면에 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명에서는 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄밀도 조건하에 혼성화되고, 이후 실온에서 2 x SSC에서 세척되는 핵산을 제시한다.

[0075] 유전자 코드에서 축중으로 인하여 SEQ ID NO: 4 또는 5에 열거된 핵산과 차별되는 분리된 핵산 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 가령, 다수의 아미노산이 하나 이상의 삼중항(triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 명기하는 코돈, 또는 동종이명(synonym)(가령, CAU와 CAC는 히스티딘의 동종이명(synonym)이다)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 “침묵” 돌연변이를 유발한다. 하지만, 본 발명의 단백질의 아미노산 서열에서 변화를 유발하는 DNA 서열 다형성(polymorphism)이 포유동물 세포 사이에 존재할 것으로 예상된다. 당업자가

인지하는 바와 같이, 특정 단백질을 인코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드에서 이들 변이(뉴클레오티드의 최대 3-5%)가 자연적인 대립형질 변이로 인하여 소정의 종의 개체 사이에 존재할 수 있다. 이와 같은 뉴클레오티드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0076] 일정한 구체예에서, 본 발명의 재조합 핵산은 발현 구조체 내에서 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로, 발현에 이용되는 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포에 대한 다양한 유형의 적합한 발현 벡터와 조절 서열이 공지되어 있다. 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에는 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 시작과 종결 서열, 번역 시작과 종결 서열, 인핸서 또는 활성화인자 서열 등이 포함된다. 당분야에 공지된 구조성 또는 유도성 프로모터가 본 발명에 의해 고려된다. 이들 프로모터는 자연 발생 프로모터, 또는 하나 이상의 프로모터의 요소를 통합하는 하이브리드 프로모터이다. 발현 구조체는 세포 내에서 에피솜(episome), 예를 들면, 플라스미드(plasmid) 상태로 존재하거나, 또는 발현 구조체는 염색체 내로 삽입된다. 바람직한 구체예에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선별을 가능하게 하는 선별가능 마커 유전자를 포함한다. 선별가능 마커 유전자는 당분야에 널리 공지되어 있고, 이용된 숙주 세포에 따라 변한다.

[0077] 본 발명의 특정 측면에서, 본 발명의 핵산은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고 최소한 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 발현 벡터(expression vector)에서 제공된다. 조절 서열은 당분야에서 인지되고, ActRIIa 폴리펩티드의 발현을 주동하도록 선택된다. 따라서 조절 서열에는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소가 포함된다. 전형적인 조절 서열은 Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 기술된다. 가령, 작동가능하게 연결되면 DNA 서열의 발현을 제어하는 다양한 발현 제어 서열은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현하기 위하여 이들 벡터에 이용된다. 이런 유용한 발현 제어 서열에는 예로써, SV40의 초기와 후기 프로모터, tet 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토메갈로바이러스 극초기 프로모터, RSV 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 프로모터(이의 발현은 T7 RNA 중합효소에 의해 주동된다), 파지 람다(phage lambda)의 주요 오퍼레이터와 프로모터 영역, fd 외피 단백질에 대한 제어 영역, 3-글리세르산인산 키나아제(phosphoglycerate kinase) 또는 다른 당분해(glycolytic) 효소에 대한 프로모터, 산성 포스파타아제(acid phosphatase)의 프로모터(가령, Pho5), 효모  $\alpha$ -교미 인자(mating factor)의 프로모터, 바쿨로바이러스(baculovirus) 시스템의 다면체(polyhedron) 프로모터, 원핵동물이나 진핵동물 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 알려져 있는 다른 서열, 이들의 다양한 조합 등이 포함된다. 발현 벡터의 설계는 형질전환되는 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되는 원하는 단백질의 타입과 같은 인자에 좌우된다. 게다가, 벡터의 사본수(copy number), 사본수를 제어하는 능력 및 상기 벡터에 의해 인코딩되는 임의의 다른 단백질, 예를 들면, 항생 마커(antibiotic marker)의 발현 역시 고려되어야 한다.

[0078] 본 발명의 재조합 핵산은 원핵동물 세포, 진핵동물 세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유류), 또는 둘 모두에서 발현에 적합한 벡터 내로, 클로닝된 유전자 또는 이의 일부분을 결합함으로써 산출될 수 있다. 재조합 ActRIIa 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 운반체에는 플라스미드 및 다른 벡터가 포함된다. 가령, 원핵동물 세포, 예를 들면, 대장균(*E. coli*)에서 발현에 적합한 벡터에는 아래 유형의 플라스미드가 포함된다: pBR322-유래된 플라스미드, pEMBL-유래된 플라스미드, pEX-유래된 플라스미드, pBTac-유래된 플라스미드 및 pUC-유래된 플라스미드.

[0079] 일부 포유동물 발현 벡터는 세균 내에서 벡터의 증식을 용이하게 하는 원핵동물 서열 및 진핵동물 세포에서 발현되는 하나 이상의 진핵동물 전사 단위(transcription unit)를 모두 포함한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo와 pHyg 유래된 벡터는 진핵동물 세포의 형질감염(transfection)에 적합한 포유동물 발현 벡터의 실례이다. 이들 벡터 중에서 일부는 원핵동물과 진핵동물 세포 둘 모두에서 복제와 내약성(drug resistance) 선별을 용이하게 하는 세균 플라스미드, 예를 들면, pBR322로부터 서열로 변형된다. 대안으로, 소 파필로마 바이러스(bovine papilloma virus)(BPV-1), 또는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus)(pHEBo, pREP-유래된, p205)와 같은 바이러스의 유도체가 진핵동물 세포에서 단백질의 일시적인 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 실례는 하기, 유전자 치료 전달 시스템의 설명에서 확인할 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 생물체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법이 당분야에 널리 공지되어 있다. 원핵동물과 진핵동물 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템 및 전반적인 재조합 절차는 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001을 참조한다. 일부 사례에서, 바쿨로바이러스 발현 시스템의 이용으로 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직하다. 이런 바쿨로바이러스 발현 시스템의 실례에는 pVL-유래된 벡터(가령, pVL1392, pVL1393과 pVL941), pAcUW-유래된 벡터(가령, pAcUW1),

pBlueBac-유래된 벡터(가령,  $\beta$ -gal 보유 pBlueBac III) 등이 포함된다.

[0080] 바람직한 구체예에서, CHO 세포에서 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드의 생산을 위한 벡터, 예를 들면, Pcmv-Script 벡터(Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터(Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터(Promega, Madison, Wise)가 설계된다. 확인되는 바와 같이, 본 발명의 유전자 구조체는 예로써, 정제를 위한, 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생산하기 위하여 배양액 내에서 증식된 세포에서 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드의 발현을 유도하는데 이용될 수 있다.

[0081] 본 발명은 또한, 하나 이상의 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드에 대한 코딩 서열(가령, SEQ ID NO: 4 또는 5)을 비롯한 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 관계한다. 숙주 세포는 임의의 원핵동물 또는 진핵동물 세포이다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 세균 세포(가령, 대장균(*E. coli*)), 곤충 세포(가령, 바콜로바이러스 발현 시스템 이용), 효모, 또는 포유동물 세포에서 발현된다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다.

[0082] 본 발명은 또한, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드를 생산하는 방법에 관계한다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ActRIIa 폴리펩티드의 발현이 진행되도록 하는 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 세포와 배지의 혼합물로부터 분리되고 분리될 수 있다. 대안으로, ActRIIa 폴리펩티드는 세포질에 또는 막 분획(membrane fraction) 내에 유지되고, 세포는 수거되고 용해되며, 상기 단백질은 분리된다. 세포 배양액은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 함유한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과(ultrafiltration), 전기영동(electrophoresis), ActRIIa 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체를 이용한 면역친화성(immunoaffinity) 정제 및 ActRIIa 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 작용제(가령, ActRIIa-Fc 융합체를 정제하는데 단백질 A 칼럼이 이용될 수 있다)를 이용한 친화성 정제를 비롯한, 단백질을 정제하기 위한 당분야에 공지된 기술을 이용하여, 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 둘 모두로부터 분리될 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하는 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 바람직한 구체예에서, 정제는 가령, 임의의 순서로 아래 중에서 3가지 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계로 달성된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. 본 명세서에서 증명된 바와 같이, ActRIIa-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 결정에서 >98% 및 SDS PAGE에 의한 결정에서 >95%의 순도로 정제되었다. 이러한 수준의 순도는 생쥐, 쥐, 비-인간 영장류와 인간에서 바람직한 결과를 달성하는데 충분하였다.

[0083] 다른 구체예에서, 재조합 ActRIIa 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에서 정제 리더 서열, 예를 들면, 폴리-(His)/엔테로키나아제(enterokinase) 절단 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는  $\text{Ni}^{2+}$  금속 수지(metal resin)를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 가능하게 할 수 있다. 정제 리더 서열은 이후, 정제된 ActRIIa 폴리펩티드를 제공하기 위하여 엔테로키나아제 처리에 의해 차후에 제거될 수 있다(참조: Hochuli et al., (1987) J Chromatography 411:177; Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

[0084] 융합 유전자를 만드는 기술은 널리 공지되어 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합은 통상적인 기술에 따라, 결합을 위한 평활-말단(blunt-ended termini) 또는 갈지자-말단(stagger-ended termini), 적절한 말단을 제공하는 제한 효소 절단(restriction enzyme digestion), 점착 말단(cohesive end)의 채움(filling-in), 원치 않는 결합을 차단하는 알칼리성 포스파타아제(alkaline phosphatase) 처리 및 효소 결합(enzymatic ligation)을 이용하여 수행된다. 다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성장치를 비롯한 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 2개의 연속하는 유전자 단편 사이에 상보성 오버행(overhang)을 산출하는 앵커 프라이머(anchor primer)를 이용하여 수행될 수 있고, 이들 유전자 단편은 차후에 어닐링되어 키메라 유전자 서열을 산출할 수 있다(참조: Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

#### [0085] 4. 대안적 액티빈과 ActRIIa 길항물질

[0086] 본 명세서에 제공된 데이터는 액티빈-ActRIIa 신호전달의 길항물질이 적혈구 또는 헤모글로빈 수준을 증가시키는데 이용될 수 있음을 증명한다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드, 특히 ActRIIa-Fc가 선호되는 길항물질이고, 이런

길항물질이 액티빈 길항작용(antagonism) 이외의 기전(가령, 액티빈 저해는 아마도, TGF-베타 대과의 다른 구성원을 비롯한 광범위한 분자의 활성을 저해하는 작용제의 추세의 지표이고, 이런 집합적인 저해는 조혈에 대한 바람직한 효과를 유도한다)을 통하여 적혈구 세포 수준에 영향을 줄 수 있긴 하지만, 항-액티빈(가령, 액티빈  $\beta_A$ ,  $\beta_B$ ,  $\beta_C$ 와  $\beta_E$ ) 항체, 항-ActRIIa 항체, 안티센스, ActRIIa의 생산을 저해하는 RNAi 또는 리보자임 핵산, 그리고 액티빈 또는 ActRIIa의 다른 저해물질, 특히 액티빈-ActRIIa 결합을 파괴하는 저해물질을 비롯한, 다른 유형의 액티빈-ActRIIa 길항물질 역시 유용할 것으로 기대된다.

[0087] ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 폴리펩티드와 경쟁적으로 리간드에 결합하거나, 또는 ActRIIa-매개된 신호전달을 달리 저해하는 항체는 ActRIIa 폴리펩티드 활성의 길항물질로서 이용될 수 있다. 유사하게, 액티빈  $\beta_A$ ,  $\beta_B$ ,  $\beta_C$  또는  $\beta_E$  폴리펩티드, 또는 이들의 이종이합체와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 결합을 파괴하는 항체가 길항물질로서 이용될 수 있다.

[0088] ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드로부터 유래된 면역원(immunogen)을 이용함으로써, 항-단백질/항-펩티드 항혈청(antisera) 또는 단클론 항체가 표준 프로토콜(standard protocol)에 의해 제조될 수 있다(참조: Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). 포유동물, 예를 들면, 생쥐, 햄스터 또는 토끼는 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 면역원성 형태(immunogenic form), 항체 반응(antibody response)을 유도할 수 있는 항원 단편, 또는 융합 단백질로 면역될 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성(immunogenicity)을 공여하는 기술에는 담체(carrier)에 접합(conjugation) 또는 당분야에 널리 공지된 다른 기술이 포함된다. ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드의 면역원성 부분이 어쥬번트(adjuvant)의 존재 하에 투여될 수 있다. 면역화의 진행은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가(antibody titer)의 검출에 의해 모니터링될 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역분석은 상기 면역원을 항원으로 하여 항체 수준을 평가하는데 이용될 수 있다.

[0089] 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 항원성 조제약으로 동물의 면역화이후, 항혈청이 수득될 수 있고, 원하는 경우에, 다클론 항체가 혈청으로부터 분리될 수 있다. 다클론 항체를 생산하기 위하여, 항체-생산 세포(립프구)를 면역화된 동물로부터 수거하고 표준 체세포 융합 절차에 의해 영속 세포(immortalizing cell), 예를 들면, 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마(hybridoma) 세포를 산출할 수 있다. 이런 기술은 당분야에 널리 공지되어 있고, 여기에는 예로써, 하이브리도마 기술(Kohler와 Milstein에 의해 최초로 개발됨((1975) Nature, 256: 495-497)), 인간 B 세포 하이브리도마 기술(Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72), 인간 단클론 항체를 생산하는 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96) 등이 포함된다. 하이브리도마 세포는 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체 및 이런 하이브리도마 세포를 포함하는 배양액으로부터 분리된 단클론 항체의 생산을 위하여 면역 화학적으로 선별될 수 있다.

[0090] 본 명세서에서, “항체”는 예로써, 임의의 아이소타입(IgG, IgA, IgM, IgE 등)의 완전 항체(whole antibody)를 포함하고, 선택된 항원과 반응하는 면역글로불린의 단편 또는 도메인을 포함하는 것으로 의도된다. 항체는 통상적인 기술을 이용하여 단편화될 수 있고, 이들 단편은 유용성 및/또는 목적하는 특정 에피토프와의 상호작용에 대하여 선별될 수 있다. 따라서 상기 용어는 특정 단백질과 선별적으로 반응할 수 있는 항체 분자의 단백질 분해-절단된 또는 재조합-제조된 일부분의 단편을 포괄한다. 이런 단백질 분해 및/또는 재조합 단편의 무제한적 실례에는 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv, 그리고 펩티드 링커에 의해 연결된 V[L] 및/또는 V[H] 도메인을 보유하는 단일 사슬 항체(scFv)가 포함된다. scFv는 공유 또는 비-공유 연결되어 2개 또는 그 이상의 결합 부위를 보유하는 항체를 형성할 수 있다. 항체는 또한, 항체와 재조합 항체의 다클론, 단클론, 또는 다른 정제된 조제약을 포괄한다. “재조합 항체”는 분자 생물학 기술을 이용하여 작제된 핵산으로부터 발현된 항체, 또는 면역글로불린의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 인간화 항체(humanized antibody), 또는 단일 사슬 항체로부터 발생된 완전 인간 항체(human antibody)를 의미한다. 단일 도메인과 단일 사슬 항체 역시 “재조합 항체”에 포함된다.

[0091] 일정한 구체예에서, 본 발명의 항체는 단클론 항체이고, 그리고 일정한 구체예에서, 본 발명은 신규한 항체를 산출하는 방법을 이용한다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 산출하는 방법은 검출가능한 면역 반응을 자극하는데 효과적인 항원 폴리펩티드를 함유하는 면역 조성물(immunogenic composition)의 일정량을 생쥐에 투여하는 단계, 생쥐로부터 항체-생산 세포(가령, 비장으로부터 유래된 세포)를 수득하는 단계, 항체-생산 세포를 골수종 세포와 융합하여 항체-생산 하이브리도마를 수득하는 단계, 그리고 항체-생산 하이브리도마를 검사하여 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하는 단계를 포함한다. 일단 수득된 하이브리도마는 선택적으로, 하이브리도마-유래된 세포가 항

원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 배양 조건 하에 세포 배양액에서 증식될 수 있다. 단클론 항체는 세포 배양액으로부터 정제될 수 있다.

[0092] 항체와 관련하여 이용된 형용사 “특이적으로 반응하는”은 당분야에서 일반적으로 이해되는 바와 같이, 상기 항체가 목적 항원(가령, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드)과 목적하지 않는 다른 항원 사이에 충분히 선별적이고, 상기 항체가 최소한, 특정 타입의 생물학적 시료 내에서 목적 항원의 존재를 검출하는데 유용하다는 것을 의미한다. 치료 적용과 같은 상기 항체를 이용하는 일정한 방법에서, 더욱 높은 수준의 결합 특이성이 바람직하다. 단클론 항체는 일반적으로, 원하는 항원과 교차-반응성(cross-reacting) 폴리펩티드를 효과적으로 구별하는 더욱 높은 추세(다클론 항체와 비교하여)를 갖는다. 항체:항원 상호작용의 특이성에 영향을 주는 한 가지 특징은 항원에 대한 항체의 친화성이다. 원하는 특이성이 일정한 범위의 상이한 친화성으로 달성될 수도 있지만, 일반적으로 선호되는 항체는 대략  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M 또는 그 이하의 친화성(해리 상수)을 갖는다.

[0093] 이에 더하여, 바람직한 항체를 확인하기 위하여 항체를 선별하는데 이용되는 기술은 수득된 항체의 특성에 영향을 줄 수 있다. 가령, 항체가 용해 상태에서 항원에 결합하는데 이용된다면, 용해 결합(solution binding)을 검사하는 것이 바람직하다. 항체와 항원 사이에 상호작용을 검사하여 특히 바람직한 항체를 확인하기 위하여 여러 다양한 기술이 가용하다. 이런 기술에는 ELISA, 표면 플라즈몬 공명 결합 검사(가령, Biacore™ 결합 검사, Biacore AB, Uppsala, Sweden), 샌드위치 검사(sandwich assay)(가령, 상자성 비드(paramagnetic bead) 시스템, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), 웨스턴 블롯(western blot), 면역침전 검사(immunoprecipitation assay), 면역조직화학법(immunohistochemistry) 등이 포함된다.

[0094] 액티빈 또는 ActRIIa 길항물질인 핵산 화합물 종류의 실례에는 안티센스 핵산, RNAi 구조체와 촉매 핵산 구조체가 포함된다. 핵산 화합물은 단일 또는 이중 가닥이다. 이중 가닥 화합물은 오버행 또는 비-상보성 영역 역시 포함할 수 있는데, 여기서 이들 가닥의 한쪽 또는 다른 쪽은 단일 가닥이다. 단일 가닥 화합물은 자기-상보성(self-complementarity) 영역을 포함할 수 있는데, 이는 상기 화합물이 이중 나선 구조의 영역을 보유하는 소위, “헤어핀(hairpin)” 또는 “스텝-루프(stem-loop)” 구조를 형성한다는 것을 의미한다. 핵산 화합물은 전장 ActRIIa 핵산 서열 또는 액티빈  $\beta_A$ ,  $\beta_B$ ,  $\beta_C$  또는  $\beta_E$  핵산 서열의 1000개 이하, 500개 이하, 250개 이하, 100개 이하, 또는 50개, 35개, 25개, 22개, 20개, 18개 또는 15개 이하의 뉴클레오티드로 구성되는 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상보성 영역은 적절하게는, 최소한 8개 뉴클레오티드, 선택적으로, 대략 18개 내지 35개 뉴클레오티드이다. 상보성 영역은 표적 전사체(target transcript)의 인트론(intron), 코딩 서열 또는 비-코딩 서열, 예를 들면, 코딩 서열 부분 내에 존재한다. 일반적으로, 핵산 화합물은 대략 8개 내지 대략 500개 뉴클레오티드 또는 염기쌍 길이를 갖고, 선택적으로, 상기 길이는 대략 14개 내지 대략 50개 뉴클레오티드이다. 핵산은 DNA(특히, 안티센스로서 이용됨), RNA 또는 RNA:DNA 하이브리드이다. 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함한다. 유사하게, 이중 가닥 화합물은 DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA이고, 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함한다. 핵산 화합물은 골격(뉴클레오티드간 연쇄(internucleotide linkage)를 비롯한, 자연 핵산에서 당-인산염 부분) 또는 염기 부분(자연 핵산의 퓨린 또는 피리미딘 부분)에 하나 이상의 변형을 비롯한 임의의 다양한 변형을 포함한다. 안티센스 핵산 화합물은 바람직하게는, 대략 15개 내지 대략 30개의 뉴클레오티드 길이를 갖고, 혈청에서, 세포에서, 또는 화합물이 전달될 가능성이 높은 위치, 예를 들면, 경구 전달된 화합물의 경우에 위(stomach)와 흡입된 화합물의 경우에 폐(lung)에서 안정성과 같은 특성을 향상시키는 하나 이상의 변형을 종종 포함한다. RNAi 구조체의 경우에, 표적 전사체에 상보적인 가닥은 일반적으로, RNA 또는 이의 변형이다. 다른 가닥은 RNA, DNA 또는 임의의 다른 변형일 수 있다. 이중 가닥 또는 단일 가닥 “헤어핀” RNAi 구조체의 이중나선 부분은 일반적으로, 18개 내지 40개 뉴클레오티드 길이, 선택적으로, 대략 21개 내지 23개 뉴클레오티드 길이를 갖는데, 여기서 이는 Dicer 기질(substrate)로서 기능한다. 촉매 또는 효소 핵산은 리보자임 또는 DNA 효소이고, 변형된 형태 역시 포함된다. 핵산 화합물은 생리 조건하에, 난센스(nonsense) 또는 센스(sense) 제어가 거의 또는 전혀 영향을 주지 못하는 농도에서 세포와 접촉할 때, 대략 50%, 75%, 90% 또는 그 이상으로 표적의 발현을 저해한다. 핵산 화합물의 효과를 검사하는데 선호되는 농도는 1, 5와 10 마이크로몰(micromolar)이다. 또한, 핵산 화합물은 예로써, 적혈구 수준에 대한 효과에 대하여 검사될 수 있다.

[0095] 일정한 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 액티빈 생물활성을 길항하고 및/또는 액티빈에 결합하는 플라스타틴 폴리펩티드일 수 있다. “플리스타틴 폴리펩티드”에는 플라스타틴의 임의의 자연 발생 폴리펩티드 및 유용한 활성을 유지하는 이의 임의의 변이체(가령, 돌연변이체, 단편, 융합체, 그리고 펩티드유사체 형태)를 포함하는 폴리펩티드가 포함되고, 그리고 플라스타틴의 임의의 기능성 단량체(monomer)와 다합체(multimer)가 더욱 포

함된다. 액티빈 결합 특성을 유지하는 폴라스타틴 폴리펩티드의 변이체는 폴라스타틴과 액티빈 상호작용을 수반하는 기존 연구에 기초하여 확인될 수 있다. 가령, W02008/030367에서는 액티빈 결합에 중요한 것으로 밝혀진 특정한 폴라스타틴 도메인("FSD")을 개시한다. 하기 SEQ ID NO: 19-21에서 도시된 바와 같이, N-말단 폴라스타틴 도메인("FSND" SEQ ID NO: 19), FSD2(SEQ ID NO: 20), 그리고 정도가 덜하지만, FSD1(SEQ ID NO: 21)은 액티빈 결합에 중요한, 폴라스타틴 내에 전형적인 도메인을 대표한다. 이에 더하여, 폴리펩티드의 라이브러리를 만들고 검사하는 방법은 ActRIIa 폴리펩티드의 배경에서 앞서 기술되고, 그리고 이런 방법은 폴라스타틴의 변이체를 만들고 검사하는 데에도 적합하다. 폴라스타틴 폴리펩티드에는 폴라스타틴 폴리펩티드의 서열에 최소한 대략 80%, 바람직하게는 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 보유하는 임의의 공지된 폴라스타틴의 서열로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다. 폴라스타틴 폴리펩티드의 실례에는 예로써, W02005/025601에서 기술된 바와 같은 인간 폴라스타틴 전구체 폴리펩티드(SEQ ID NO: 17)의 성숙 폴라스타틴 폴리펩티드 또는 더욱 짧은 동종형 또는 기타 변이체가 포함된다.

[0096] 인간 폴라스타틴 전구체 폴리펩티드 동종형 FST344는 아래와 같다:

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL  
SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDC  
GPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARC  
KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNTRICPEPA  
SSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC  
TGKKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA  
ACSSGVLLLEVKGHSCNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSPFISSILEW

[0097]

[0098] (SEQ ID NO: 17; NP\_037541.1 폴라스타틴 동종형 FST344)

[0099] 단일 펩티드는 단일 밑줄로 표시된다; 굵게 표시된 마지막 27개의 잔기는 하기의 더욱 짧은 폴라스타틴 동종형 FST317 (NP\_006341)과 비교하여 추가적인 아미노산을 나타낸다.

[0100] 인간 폴라스타틴 전구체 폴리펩티드 동종형 FST317은 아래와 같다:

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL  
SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDC  
GPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARC  
KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNTRICPEPA  
SSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC  
TGKKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA  
ACSSGVLLLEVKGHSGSCN

[0101]

[0102] (SEQ ID NO: 18)

[0103] 단일 펩티드는 단일 밑줄로 표시된다.

[0104] N-말단 폴라스타틴 도메인(FSND) 서열은 아래와 같다:

[0105] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWKM

[0106] IFNGGAPNCIPCK (SEQ ID NO: 19; FSND)

[0107] FSD1과 FSD2 서열은 아래와 같다:

[0108] ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (SEQ ID NO: 20; FSD1)

[0109] KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVT (SEQ ID NO: 21; FSD2)

[0110] 다른 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 액티빈 생물활성을 길항하고 및/또는 액티빈에 결합하는 폴라스타틴-유사 관련된 유전자(FLRG)이다. "FLRG 폴리펩티드"에는 FLRG의 임의의 자연 발생 폴리펩티드, 그리고 유용한 활성을 유지하는 이의 임의의 변이체(가령, 돌연변이체, 단편, 융합체, 그리고 펩티드유사체 형태)를 포함하는 폴리펩티드가 포함된다. 액티빈 결합 특성을 유지하는 FLRG 폴리펩티드의 변이체는 FLRG와 액티빈 상호작용을 평가하는 일과적인 방법을 이용하여 확인될 수 있다(예로써, US 6,537,966 참조). 이에 더하여, 폴리펩티드의 라이브러리를 만들고 검사하는 방법은 ActRIIa 폴리펩티드의 배경에서 앞서 기술되고, 그리고 이런 방법은 FLRG의 변이체를 만들고 검사하는 데에도 적합하다. FLRG 폴리펩티드에는 FLRG 폴리펩티드의 서열에 최소한 대략 80%, 바람직하게는 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 보유하는 임의의 공지된 FLRG의 서열로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다.

[0111] 인간 FLRG 전구체 폴리펩티드는 아래와 같다:

**MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGVSSMSGNPAPGGVCWLQGGQEQEATCSL**  
**VLQTDVTRAECASGNIDTAWSNLTHPGNKINLLGFLGLVHCLPCKDSCD**  
**GVECGPGKACRMLGGRPRCECAPDCSGLPARLQVCGSDGATYRDECELRA**  
**ARCRGHPDLSVMYRGRCKRSCEHVVCPRPQSCVVDQTGSAHCVVCRAAPC**  
**VPSSPGQELCGNNNVTYISSCHMRQATCFLGRSIGVRHAGSCAGTPPEPP**  
**GGESABEEENFV**

[0112]

[0113] (SEQ ID NO: 22; NP\_005851)

[0114] 단일 펩티드는 단일 밑줄로 표시된다.

[0115] 일정한 구체예에서, 폴라스타틴 폴리펩티드와 FLRG 폴리펩티드의 기능성 변이체 또는 변형된 형태에는 폴라스타틴 폴리펩티드 또는 FLRG 폴리펩티드의 최소한 일부분 및 하나 이상의 융합 도메인, 예를 들면, 상기 폴리펩티드의 분리, 검출, 안정화 또는 다합체화를 촉진하는 도메인을 보유하는 융합 단백질이 포함된다. 적절한 융합 도메인은 ActRIIa 폴리펩티드에 관련하여 상기에서 상세하게 기술된다. 한 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 Fc 도메인에 융합된 폴라스타틴 폴리펩티드의 액티빈 결합 부분을 포함하는 융합 단백질이다. 다른 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 Fc 도메인에 융합된 FLRG 폴리펩티드의 액티빈 결합 부분을 포함하는 융합 단백질이다. 폴라스타틴과 FLRG는 기존 문헌에서, 그리고 FLRG에 관하여 출원인에 의해 피코몰(picomolar) 범위에서 액티빈 A에 대한 친화성을 갖는 것으로 확인되었는데, 이는 이들 작용제가 ActRIIa-Fc와 유사한 정도로, 액티빈 A 신호전달을 저해한다는 것을 지시한다.

## [0116] 5. 전형적인 치료 방법

[0117] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 환자에서 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터를 측정함으로써 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되고 있거나, 또는 치료의 후보인 환자를 관리하는 방법을 제시한다. 이들 혈액학적 파라미터는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보인 환자에 적합한 용량을 평가하고, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료 동안 혈액학적 파라미터를 모니터링하고, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료 동안 용량을 조절할 지를 평가하고, 및/또는 액티빈-ActRIIa 길항물질의 적절한 유지 용량을 평가하는데 이용될 수 있다. 이들 혈액학적 파라미터 중에서 하나 이상이 정상 수준을 벗어나면, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약은 감소되거나, 지연되거나, 또는 종료될 수 있다.

[0118] 본 명세서에 제시된 방법에 따라 측정될 수 있는 혈액학적 파라미터에는 예로써, 적혈구 수준, 혈압, 저장 철, 그리고 당분야에 공지된 방법을 이용하여 증가된 적혈구 수준과 상관하는 체액에서 관찰되는 다른 작인이 포함된다. 이들 파라미터는 환자로 부터 혈액 시료를 이용하여 결정될 수 있다. 적혈구 수준, 헤모글로빈 수준, 및/또는 헤마토크릿 수준에서 증가하는 혈압에서 증가를 유발할 수 있다.

- [0119] 적혈구 수준은 예로써, 적혈구 총수를 측정함으로써, 헤모글로빈 수준을 측정함으로써, 또는 헤마토크릿 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다. 적혈구 총수는 상업적으로 가용한 Coulter 계수기를 이용하여 결정될 수 있다. 적혈구 총수에 대한 정상적인 범위는 4.2-5.9 백만 개 세포/cm이긴 하지만, 개별 편차가 고려되어야 한다. 헤모글로빈 수준은 적혈구를 용해시키고, 헤모글로빈을 시아노메트헤모글로빈(cyanomethemoglobin)으로 전환시키고, 색도계(colorimeter)로 헤모글로빈의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 헤모글로빈에 대한 정상적인 범위는 성인 남성의 경우에 14-18 gm/dl 및 성인 여성의 경우에 12-16 gm-dl이긴 하지만, 개별 편차가 고려되어야 한다. 헤마토크릿(Hct) 또는 충전 세포 용적(packed cell volume, PCV)은 적혈구의 용적 대(對) 전혈의 용적의 비율을 지칭한다. 헤마토크릿은 예로써, 혈액 시료의 원심분리, 그 이후에 생성된 층의 분석에 의해 결정될 수 있다. 헤마토크릿에 대한 정상적인 범위는 대략, 남성의 경우에 41-51% 및 여성의 경우에 35-45%이긴 하지만, 개별 편차가 고려되어야 한다.
- [0120] 수축 혈압, 확장 혈압, 또는 평균 동맥 혈압을 비롯한 혈압은 당분야에 공지된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 혈압은 가장 일반적으로, 혈압계(sphygmomanometer)를 이용하여 측정된다. 휴식중인 건강한 성인 인간에 대한 전형적인 수치는 대략 120 mmHg 수축과 80 mmHg 확장이긴 하지만, 개별 편차가 고려되어야 한다. 고혈압을 앓는 개체는 전형적으로,  $\geq 140$  mmHg 수축 혈압과  $\geq 90$  확장 혈압을 갖는다. 정상을 초과하지만 140/90 mmHg 미만의 수준을 갖는 개체는 일반적으로, 전고혈압(prehypertensive)으로 지칭된다. 혈압을 측정하는 추가적인 방법은 Pickering et al., Hypertension 45: 142-161 (2005)에서 확인된다.
- [0121] 저장 철은 예로써, 혈청 페리틴(SF), 트랜스페린 포화(TSAT), 총철결합능, 헤모글로빈 농도, 아연 프로토포르핀(zinc protoporphyrin), 평균 세포 용적(mean cell volume, MCV), 또는 혈청 내에서 트랜스페린 수용체 중에서 한 가지 이상의 수준을 측정함으로써, 당분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 결정될 수 있다. 혈청 페리틴 수준은 예로써, 면역분석법(immunoassay), 예를 들면, 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 또는 면역혼탁도측정법(immunoturbidometry)을 이용하여 결정될 수 있다. 정상적인 개체에서, 혈청 페리틴 수준은 13 내지 220 ng/ml 범위에 있지만, 개별 편차가 고려되어야 한다. 트랜스페린 포화 수준은 철에 결합된 트랜스페린의 비율을 나타내고 총철결합능(total iron binding capacity, TIBC)으로 혈청 철을 나눗셈함으로써 결정될 수 있다. 정상적인 개체에서, 트랜스페린 포화 수준 범위는 20% 내지 40% 범위에 있지만, 개별 편차가 고려되어야 한다. 혈청 철은 비색법(colorimetry)을 이용하여 측정될 수 있고  $\mu\text{g/dl}$  또는  $\text{umol/l}$ 로서 표시된다. 총철결합능은 철에 결합된 순환 트랜스페린의 총 용량(total capacity)을 반영하고, 시험관내에서 불포화된 트랜스페린에 결합될 수 있는 철의 양을 측정하는 비색 분석법(colorimetric assay)을 이용하여 결정될 수 있다. 총철결합능의 정상적인 범위는 대략 250-450  $\mu\text{g/dl}$ 이지만, 개별 편차가 고려되어야 한다. 저장 철의 측정에 관한 추가적인 정보는 세계보건기구(World Health Organization) 2004년 4월 보고서 "Assessing the Iron Status of Populations" 및 Yamanishi et al., Clinical Chemistry 48: 1565-1570 (2002)에서 확인된다.
- [0122] 한 구체예에서, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터가 정상적인 범위를 벗어나거나, 또는 정상 범위의 높은 쪽에 위치할 때, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보인 환자에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여의 개시는 이들 혈액학적 파라미터가 자연적으로 또는 치료 개입(therapeutic intervention)을 통해 정상적인 또는 허용되는 수준으로 복원될 때까지, 지연될 수 있다. 가령, 후보 환자가 고혈압 또는 전고혈압이면, 환자는 환자의 혈압을 낮추기 위하여 혈압 강하제로 치료될 수 있다. 개별 환자의 상태에 적합한 임의의 혈압 강하제, 예를 들면, 이뇨제(diuretics), 아드레날린성 저해물질(adrenergic inhibitor)(가령, 알파 차단제(alpha blocker)와 베타 차단제(beta blocker)), 혈관확장제(vasodilator), 칼슘 채널 차단제(calcium channel blocker), 엔지오텐신-전환 효소(angiotensin-converting enzyme, ACE) 저해물질, 또는 엔지오텐신 II 수용체 차단제가 이용될 수 있다. 대안으로, 혈압은 식이와 운동 섭생을 이용하여 치료될 수 있다. 유사하게, 후보 환자가 정상 범위보다 낮거나, 또는 정상 범위의 낮은 쪽에 위치하는 저장 철을 가지면, 환자는 환자의 저장 철이 정상적인 또는 허용되는 수준으로 복원될 때까지, 식이 및/또는 철 보충물의 적절한 섭생으로 치료될 수 있다. 정상보다 높은 적혈구 수준 및/또는 헤모글로빈 수준을 갖는 환자의 경우에, 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여는 상기 수준이 정상적인 또는 허용되는 수준으로 복원될 때까지 지연될 수 있다.
- [0123] 일정한 구체예에서, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터가 정상적인 범위를 벗어나거나, 또는 정상 범위의 높은 쪽에 위치할 때, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보인 환자에서, 투여의 개시가 지연되지 않을 수도 있다. 하지만, 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여량과 투여 빈도는 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여 시에 발생하는 혈액학적 파라미터에서 허용되지 않는 증가의 위험을 감소시키는 양으로 설정된다. 대안으로, 혈액학적 파라미터의 바람직하지 않은 수준을 해결하는 치료제와 액티빈-ActRIIa 길항물질을 통합하는, 환자에 대한 치료 섭생이 개발될 수 있다. 가령, 환자가 상승된 혈압을 가지면, 액티빈-ActRIIa 길항물질과 혈압 강하제의 투여를 수반하는

치료 섭생이 설계될 수 있다. 요구되는 수준보다 낮은 저장 철을 갖는 환자의 경우에, 액티빈-ActRIIa 길항물질과 철 보충의 치료 섭생이 개발될 수 있다.

[0124] 한 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보인 환자에 대한 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터에 대한 기준선 파라미터(들)가 확립되고, 그리고 이러한 기준선 수치(들)에 기초하여 상기 환자에 대한 적절한 투약 섭생이 확립될 수 있다. 대안으로, 환자의 병력에 기초된 확립된 기준선 파라미터가 환자에 대한 적절한 액티빈-ActRIIa 길항물질 투약 섭생을 특징짓는데 이용될 수 있다. 가령, 건강한 환자가 정의된 정상적인 범위를 초과하는 확립된 기준선 혈압 시도(reading)를 가지면, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료에 앞서, 일반 대중에서 정상으로 간주되는 범위로 환자의 혈압을 끌어들이 필요 없다. 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료에 앞서, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터에 대한 환자의 기준선 수치는 또한, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료 동안 이들 혈액학적 파라미터에 대한 임의의 변화를 모니터링하기 위한 관련된 비교 수치로서 이용될 수 있다.

[0125] 일정한 구체예에서, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자에서 측정된다. 이들 혈액학적 파라미터는 치료 동안 환자를 모니터링하고 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약 또는 다른 치료제로 추가적인 투약의 조정 또는 종료를 가능하게 하는데 이용될 수 있다. 가령, 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여가 혈압, 적혈구 수준, 또는 헤모글로빈 수준에서 증가, 또는 저장 철에서 감소를 유발하면, 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투약은 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터에 대한 액티빈-ActRIIa 길항물질의 효과를 감소시키기 위하여 양 또는 빈도에서 감소될 수 있다. 투여 또는 액티빈-ActRIIa 길항물질이 환자에게 불리한 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터에서 변화를 유발하면, 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투약은 이들 혈액학적 파라미터가 허용되는 수준으로 복원될 때까지 일시적으로 종료되거나, 또는 영구적으로 종료될 수 있다. 유사하게, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터가 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여량 또는 투여 빈도를 줄인 이후에 허용되는 범위 내에 있지 않으면, 투약이 종료될 수 있다. 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약의 감소 또는 종료에 대안으로, 또는 부가적으로, 환자는 혈액학적 파라미터(들)에서 바람직하지 않은 수준을 해결하는 추가적인 치료제, 예를 들면, 혈압 강하제 또는 철 보충물이 투약될 수 있다. 가령, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자가 상승된 혈압을 가지면, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약이 동일한 수준으로 지속되고 혈압 강하제가 치료 섭생에 추가되거나, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약이 감소되고(가령, 양 및/또는 빈도에서) 혈압 강하제가 치료 섭생에 추가되거나, 또는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약이 종료되고 환자가 혈압 강하제로 치료될 수 있다.

[0126] 일정한 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자 또는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보인 환자가 12 g/dl 이상의 헤모글로빈 수준, 15 g/dl 이상의 헤모글로빈 수준, 혈압  $\geq 120/80$  mmHg, 혈압  $\geq 140/90$  mmHg, 20% 이하의 트랜스페린 포화 수준, 및/또는 100 ng/ml 이하의 페리틴 수준 중에서 한 가지 이상을 나타내면, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약이 감소되거나, 지연되거나 또는 종료된다. 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약의 감소, 지연 또는 종료에 대안으로, 또는 부가적으로, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터의 바람직하지 않은 수준을 해결하는 치료제(가령, 혈압 강하제 또는 철 보충물)가 환자에 투여될 수 있다.

[0127] 한 구체예에서, 본 발명에서는 2주 기간 동안 1 g/dl 이상의 헤모글로빈 수준에서 증가를 유발하는 위험을 감소시키는 양으로, 그리고 빈도에서 액티빈-ActRIIa 길항물질을 환자에 투여함으로써 액티빈-ActRIIa 길항물질을 환자에 투약하는 방법을 제시한다. 이들 방법은 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여를 시작하기에 앞서 및/또는 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여 동안, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터를 측정하는 단계를 포함한다. 액티빈-ActRIIa 길항물질의 초기량은 2주 기간 동안 1 g/dl 이상의 헤모글로빈 수준에서 상승을 유발하는 위험을 감소시키도록 설정된다. 이에 더하여, 용량은 2주 이내에 1 g/dl 이상의 헤모글로빈 수준에서 상승을 유발하는 위험의 감소를 유지하기 위하여 시간의 흐름에서 조정될 수 있다.

[0128] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 60일마다, 90일마다, 또는 120일마다 1회 이하로, 또는 연간 1-6회, 연간 2-6회, 연간 1-5회, 연간 2-5회, 연간 1-4회, 연간 2-4회, 연간 1-3회, 또는 연간 2-3회 ActRIIa 융합 단백질을 투여함으로써 ActRIIa-Fc 융합 단백질을 환자에 투약하는 방법을 제시한다. 본 명세서에서 증명된 바와 같이, 투여에 기인하는 적혈구 수준에서 증가는 투여후 대략 60일 시점에 최고점에 달한다. 투여후 대략 90일 시점에, 적혈구 수준에서 현저한 감소가 관찰되고, 대략 120일후 적혈구 수준이 기준선 수준으로 복원된다. 따라서 액티빈-ActRIIa 길항물질이 적혈구 수준 증가 이외의 목적으로 투여되는 환자의 경우에, 이전 투약으로부터 적혈구 수준에서 피크 증가후, 또는 심지어 적혈구 수준이 정상으로 복원된 이후에, 액티빈-ActRIIa 길항물질의 후속 용량을 투여하는 것이 바람직하다.

[0129] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 환자에서 액티빈-ActRIIa 길항물질 치료의 용량을 결정하고 치료 진전(therapeutic progress)을 모니터링하는 방법을 제시하는데, 여기서 액티빈-ActRIIa 길항물질은 적혈구 수준을

증가시키기 위하여 투여된다. 이들 방법은 액티빈-ActRIIa 길항물질로 투약을 시작하기에 앞서 및/또는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료 동안, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터를 측정하는 단계를 포함한다. 가령, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터는 액티빈-ActRIIa 길항물질의 투여의 후보인 환자에서, 투여량과 투여 빈도의 결정이 용이하도록 혈액 세포 수준을 증가시키기 위하여 측정된다. 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터는 또한, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자에서 치료의 진전을 모니터링하고, 용량 조절을 용이하게 하고, 그리고 유지 용량 수준을 결정하기 위하여 적혈구 수준을 증가시키는 목적으로 측정될 수 있다.

[0130] 본 발명의 이들 방법에 따라서, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터는 다양한 인자, 예를 들면, 환자의 기준선 수준, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료에 대한 반응, 전반적인 건강, 연령, 성별, 체중 등에 기초하여 개별 환자의 요구에 따라 다양한 시점에서, 그리고 다양한 빈도로 측정될 수 있다. 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터의 측정은 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료 이전 및/또는 치료 동안 수행될 수 있다. 다양한 시점에서 혈액학적 파라미터의 복수 측정을 수행하면, 각 시점에서 동일한 세트의 혈액학적 파라미터(들)를 측정할 필요가 없다. 유사하게, 각 시점에서 개별 파라미터에 대한 동일한 검사가 이용될 필요가 없다. 이런 파라미터에 적합한 혈액학적 파라미터와 검사는 소정의 개체에 특유한 인자를 고려하여, 상기 개체에 맞게 선택될 수 있다. 혈액학적 파라미터의 검사는 소정의 개체에 맞게 필요한 빈도로, 예를 들면, 매일 1회, 매주 1회, 격주 1회, 매월 1회, 격월 1회, 3개월마다 1회, 6개월마다 1회, 또는 연1회 수행될 수 있다. 이에 더하여, 검사 빈도는 시간의 흐름에서 변할 수 있다. 가령, 개체의 최초 투약후, 한 가지 이상의 혈액학적 파라미터를 더욱 높은 빈도로, 예를 들면, 매일 1회, 매주 1회, 격주 1회, 또는 매월 1회 검사하고, 이후 시간의 흐름에서, 예를 들면, 1개월, 2개월, 6개월, 1년, 2년, 또는 더욱 오랜 기간 동안 치료후 검사 빈도를 줄이는 것이 바람직한데, 예로써 검사 빈도는 매월 1회, 격월 1회, 3개월마다 1회, 6개월마다 1회, 또는 연1회로 감소될 수 있다. 유사하게, 환자의 액티빈-ActRIIa 길항물질 투약이 조정(가령, 투여량 또는 투여 빈도)될 때 더욱 빈번하게 검사하고, 이후 시간의 흐름에서, 예를 들면, 액티빈-ActRIIa 길항물질에 대한 환자의 반응이 확립되면 검사 빈도를 줄이는 것이 바람직하다.

[0131] 다양한 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자, 또는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보 환자는 포유동물, 예를 들면, 설치류와 영장류, 특히 인간 환자이다.

[0132] 일정한 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자, 또는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보 환자는 골 및/또는 연골 형성, 골 손실의 예방, 증가된 골 무기질화(bone mineralization) 또는 골 탈회(bone demineralization)의 예방이 요구되는 환자, 예를 들면, 낮은 골 밀도, 감소된 골 강도, 또는 파괴, 손실 또는 탈회에 기인하는 골 손상(bone damage)을 갖는 환자이다. 전형적인 구체예에서, 환자 또는 후보 환자는 골다공증(osteoporosis)(2차성 골다공증(secondary osteoporosis) 포함), 부갑상선 기능 항진증(hyperparathyroidism), 쿠싱병(Cushing's disease), 파제트병(Paget's disease), 갑상샘중독증(thyrotoxicosis), 만성 설사 상태(chronic diarrheal state) 또는 흡수불량(malabsorption), 신 세뇨관성 산증(renal tubular acidosis), 또는 신경성 식욕부진증(anorexia nervosa)을 앓고 있거나, 또는 이러한 질환이 발병할 위험이 있는 환자이다. 약물 또는 다른 의학적 장애에 기인하는 골다공증은 2차성 골다공증으로 알려져 있다. 2차성 골다공증을 유발할 수 있는 약제에는 예로써, 코르티코스테로이드(corticosteroid), 메토트렉세이트(methotrexate)(Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), 시클로스포린(cyclosporine)(Sandimmune, Neoral), 황체화 호르몬 방출호르몬(luteinizing hormone-releasing hormone) 작용약(Lupron, Zoladex), 그리고 헤파린(heparin)(Calciparine, Liquaemin)이 포함된다. 암 요법에 기인하는 골 손실은 폭넓게 인지되고 암 요법 유도된 골 손실(cancer therapy induced bone loss, CTIBL)로 불린다.

[0133] 일정한 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자, 또는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보 환자는 유방 암을 앓고 있거나, 또는 유방 암이 발병할 위험이 높은 환자이다. 모든 여성이 유방 암이 발병할 위험에 노출되어 있기 때문에, 유방 암이 발병할 위험이 높은 여성은 일반 대중 또는 일정한 연령 군 내에 여성 개체군과 비교하여, 상기 질환의 더욱 높은 발병 가능성을 제공하는 위험 인자(risk factor)를 보유하는 여성이다. 전형적인 위험 인자에는 연령, 가족력(family history) 또는 유전적 구성(genetic makeup), 생활습관(lifestyle habit), 예를 들면, 훈련과 식이, 방사선 또는 다른 암-유발원에 노출, 첫 아기의 출산 시점에서 연령, 유전적 변화, 그리고 폐경(menopause)후 체중 증가(weight gain)가 포함된다. 전형적인 환자에는 예로써, BRCA1/2 유전자 또는 여성에서 유방 암과 난소 암의 소인이 되는 것으로 밝혀진 다른 유전자에서 돌연변이를 갖는 환자 역시 포함된다. 환자에는 또한, 고형 종양, 전이성 암, 유방의 전암성 병소, 유방의 양성 병소, 또는 정형 증식증(typical hyperplasia), 비정형 증식증(atypical hyperplasia), 그리고 비침습성(noninvasive) 또는 in situ 암종(carcinoma)을 비롯한 임의의 비정상적 증식성 병소(proliferative lesion)를 갖는 개체가 포

함된다. 환자에는 또한, 호르몬-의존성 또는 호르몬-반응성 암(가령, 에스트로겐 수용체 파지티브 암)과 호르몬-독립성 암(가령, 에스트로겐 수용체 네거티브 또는 에스트로겐 수용체 돌연변이체 암)을 앓는 개체가 포함된다. 성장 인자 또는 종양유전자(oncogene)가 활성화되는 암(가령, *c-erbB-2*(일명, *HER-2/Neu*) 티로신 키나아제(tyrosine kinase)가 발현되는 유방 암)으로 고통받는 환자 역시 고려된다.

[0134] 일정한 구체예에서, 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료되는 환자, 또는 액티빈-ActRIIa 길항물질로 치료의 후보 환자는 바람직하지 않게 낮은 적혈구 또는 헤모글로빈 수준을 갖는 환자, 예를 들면, 빈혈 환자, 그리고 바람직하지 않게 낮은 적혈구 또는 헤모글로빈 수준이 발생할 위험이 있는 환자, 예를 들면, 큰 수술, 또는 상당한 혈액 손실을 유발하는, 예를 들면, 혈액이 채취되거나 나중에 수혈(transfusion)에 이용을 위하여 보관되는 다른 절차를 받을 예정인 환자이다. 환자와 후보 환자에는 또한, Epo에 충분히 반응하지 않는 적혈구 및/또는 헤모글로빈 수준에서 증가가 요구되는 환자가 포함될 수 있다. 인간에서 헤모글로빈 수준을 조사할 때, 적절한 연령과 성별 범주에 대한 정상 이하의 수준은 빈혈을 지시하긴 하지만, 개별 편차가 고려되어야 한다. 빈혈의 잠재적 원인에는 혈액 손실(blood-loss), 영양 결핍(nutritional deficits), 약물 반응(medication reaction), 골수에서 다양한 문제점, 그리고 많은 질환이 포함된다. 더욱 구체적으로, 빈혈은 예로써, 만성 신부전(chronic renal failure), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 골수 이식(bone marrow transplantation)을 비롯한 다양한 질환과 연관된다. 빈혈은 또한, 아래의 장애: 고형 종양(가령, 유방 암, 폐 암, 결장 암); 림프계(lymphatic system)의 종양(가령, 만성 림프성 백혈병(chronic lymphocyte leukemia), 비-호지킨(non-Hodgkins)과 호지킨(Hodgkins) 림프종); 조혈계(hematopoietic system)의 종양(가령, 백혈병(leukemia), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 다발성 골수종); 방사선요법(radiation therapy); 화학요법(chemotherapy)(가령, 백금 포함 섭생); 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 다른 염증성 관절염(inflammatory arthritis), 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus, SLE), 급성 또는 만성 피부 질환(가령, 건선(psoriasis)), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease)(가령, 크론병(Crohn's disease)과 궤양성 대장염(ulcerative colitis))이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 염증 질환과 자가면역 질환; 특발성(idiopathic) 또는 선천성(congenital) 장애를 비롯한 급성 또는 만성 신장 질환 또는 신부전; 급성 또는 만성 간 질환; 급성 또는 만성 출혈; 환자 동종- 또는 자기-항체로 인하여 및/또는 종교적 이유(가령, 여호와의 증인)로 인하여 적혈구의 수혈이 불가능한 상황; 감염(가령, 말라리아, 골수염(osteomyelitis)); 예로써, 겸상적혈구 빈혈(sickle cell disease), 지중해 빈혈(thalassemias)을 비롯한 혈액소병증(hemoglobinopathy); 약물 복용 또는 남용, 예를 들면, 알코올 남용(alcohol misuse); 어떤 이유로 수혈을 피해야 하는 소아 빈혈 환자; 그리고 순환혈액량 과부하(circulatory overload)에 대한 우려로 수혈을 받을 수 없는 노인 빈혈 환자, 또는 잠재적 심폐성 질환(underlying cardiopulmonary disease)을 앓는 빈혈 환자와 연관될 수 있다.

[0135] 본 명세서에서, 질환 또는 장애를 “예방”하는 치료제는 통계학적 샘플에서, 처리되지 않은 대조 시료에 비하여 처리된 시료에서 상기 질환 또는 장애의 발생을 감소시키거나, 또는 처리되지 않은 대조 시료에 비하여 상기 질환 또는 장애의 한 가지 이상의 증상의 개시를 지연시키거나 이들 증상의 심각도를 감소시키는 화합물을 지칭한다. 본 명세서에서 “치료”는 지정된 장애의 예방조치(prophylaxis), 또는 일단 확립된 장애의 향상 또는 제거를 포함한다. 어떤 경우든, 예방 또는 치료는 의사 또는 다른 건강 관리 제공자(health care provider)에 의해 제공된 진단, 그리고 치료제의 투여의 의도된 결과에서 식별될 수 있다.

## [0136] 6. 제약학적 조성물

[0137] 일정한 구체예에서, 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항물질(가령, ActRIIa 폴리펩티드)은 제약학적으로 허용되는 담체로 조제된다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드는 단독으로, 또는 제약학적 제제(치료 조성물)의 한 성분으로서 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 의학 또는 수의학에 이용하기 편리한 방식으로 투여를 위하여 조제된다.

[0138] 일정한 구체예에서, 본 발명의 치료 방법은 이식물(implant) 또는 장치로서 전신적으로 또는 국소적으로 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 투여될 때, 본 발명에 이용되는 치료 조성물은 당연히, 발열원-없는, 생리학적으로 허용되는 형태를 취한다. 앞서 기술된 바와 같은 조성물에 선택적으로 포함되는, 액티빈-ActRIIa 길항물질 이외의 치료제는 본 발명의 방법에서, 본 발명의 화합물과 동시에 또는 순차적으로 투여된다.

[0139] 전형적으로, 액티빈-ActRIIa 길항물질은 비경구(parental) 투여된다. 비경구 투여에 적합한 제약학적 조성물은 하나 이상의 제약으로 허용되는 무균 등장성 수용액이나 비-수용액, 분산액(dispersion), 현탁액(suspension)이나 에멀전(emulsion), 또는 사용 직전에 무균 주사가능 용액이나 분산액으로 재구성되는 무균 분말(sterile

powder)과의 조합으로 하나 이상의 ActRIIa 폴리펩티드를 함유하고, 항산화제(antioxidant), 완충제(buffer), 정균제(bacteriostat), 의도된 수용자의 혈액과 제제가 등장성이 되도록 하는 용매, 현탁제, 또는 농후제(thickening agent)를 포함할 수 있다. 본 발명의 제약학적 조성물에 이용될 수 있는 적절한 수성과 비-수성 담체의 실례에는 물, 에탄올, 폴리에틸렌(가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)과 이들의 적절한 혼합물, 식물성 오일(vegetable oil)(가령, 올리브 오일(olive oil)), 그리고 주사가능 유기 에스테르(injectable organic ester)(가령, 에틸 올레이트(ethyl oleate))가 포함된다. 적절한 유동성(fluidity)은 예로써, 레시틴(lecithin)과 같은 코팅 물질의 이용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다.

[0140] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 표적 조직 부위(가령, 골수)로의 전달을 위한 형태로 캡슐화되거나 주입될 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 치료 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)을 표적 조직 부위(골수)로 전달할 수 있는 기반(matrix)을 포함하는데, 이는 발달중인 조직에 대한 구조물을 제공하고 최종적으로, 체내 재흡수될 수 있다. 가령, 기반은 ActRIIa 폴리펩티드의 느린 방출(slow release)을 제공한다. 이런 기반은 다른 이식된 의학 적용에 현재 이용되고 있는 물질로 형성될 수 있다.

[0141] 기반 물질(matrix material)의 선택은 생체적합성(biocompatibility), 생물분해성(biodegradability), 기계적 특성, 미용적 외관(cosmetic appearance) 및 접촉면 특성(interface property)에 기초한다. 본 발명의 조성물의 특정 적용은 적절한 제제를 정의할 것이다. 이들 조성물에 적합한 잠재적인 기반은 생물분해가능하고 화학적으로 정의된 황산칼슘(calcium sulfate), 트리칼슘포스페이트(tricalciumphosphate), 수산화인회석(hydroxyapatite), 폴리락트산(polylactic acid)과 폴리무수물(polyanhydride)이다. 다른 잠재적인 물질은 생물분해가능하고 생물학적으로 충분히 정의된 물질, 예를 들면, 꿀 또는 피부 콜라겐이다. 추가의 기반은 순수한 단백질 또는 세포의 기반 성분으로 구성된다. 다른 잠재적인 기반은 생물분해가능하고 화학적으로 정의된 물질, 예를 들면, 소결된 수산화인회석(sintered hydroxyapatite), 바이오글라스(bioglass), 알루미네이트(aluminate), 또는 다른 세라믹이다. 기반은 앞서 언급된 유형의 물질의 조합, 예를 들면, 폴리락트산과 수산화인회석, 또는 콜라겐과 트리칼슘포스페이트로 구성될 수도 있다. 바이오세라믹(bioceramic)은 칼슘-알루미네이트-포스페이트(calcium-aluminate-phosphate)에서처럼 조성(composition), 그리고 구멍 크기, 입자 크기, 입자 형태와 생물분해성(biodegradability)을 변경하는 가공(processing)에서 변화될 수 있다.

[0142] 일정한 구체예에서, 본 발명의 길항물질은 예로써, 캡슐, 교각(cachet), 알약(pill), 정제(tablet), 마름모꼴 정제(lozenge)(방향성 기부(flavored basis), 통상적으로, 수크로오스(sucrose)와 아카시아(acacia) 또는 트래거캔스(tragacanth) 이용), 분말, 과립, 또는 수용성이나 비-수용성 액체에 담긴 용액이나 현탁액, 또는 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 액상 에멀전, 또는 엘릭시르 또는 시럽, 또는 향정(pastille)(불활성 기부(inert base), 예를 들면, 젤라틴(gelatin)과 글리세린(glycerin), 또는 수크로오스와 아카시아 이용) 및/또는 구강세정제(mouth wash) 등의 형태로 경구 투여될 수 있고, 이들 각각은 미리 결정된 양의 작용제를 활성 성분으로 함유한다. 작용제는 거환약(bolus), 연질약(electuary) 또는 페이스트(paste)로 투여될 수도 있다.

[0143] 경구 투여용 고형 약형(캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 본 발명의 하나 이상의 치료 화합물은 한 가지 이상의 제약학적으로 허용되는 담체, 예를 들면, 구연산나트륨 또는 이인산칼슘 및/또는 (1) 충전제 또는 증량제, 예를 들면, 전분, 락토오스, 수크로오스, 글루코오스, 만니톨, 또는 규산; (2) 접합제, 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로오스, 또는 아카시아; (3) 보습제, 예를 들면, 글리세롤; (4) 붕해제, 예를 들면, 아가-아가, 탄산칼슘, 감자나 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 또는 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예를 들면, 파라핀; (6) 흡수 가속화제, 예를 들면, 4가 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 예를 들면, 세틸 알코올과 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예를 들면, 고령토와 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예를 들면, 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 소디움라우릴 설페이트, 또는 이들의 혼합물; (10) 착색제와 혼합된다. 캡슐, 정제와 알약의 경우에, 제약학적 조성물은 완충제를 함유할 수도 있다. 유사한 유형의 고형 조성물은 또한, 락토오스 또는 유당과 같은 부형제 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용한 연성과 경성-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제(filler)로 사용될 수 있다.

[0144] 경구 투여용 액상 제형에는 제약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽과 엘릭시르가 포함된다. 활성 성분 이외에, 액상 제형은 당분야에 통상적으로 이용되는 불활성 희석제, 예를 들면, 물 또는 다른 용매, 용해제(solubilizing agent)와 유화제(emulsifier), 예를 들면, 에틸 알코올(ethyl alcohol), 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 에틸 카보네이트(ethyl carbonate), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 벤질 알코올(benzyl alcohol), 벤질 벤조에이트(benzyl benzoate), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 점(germ), 올리브, 피마자와 참깨 기름), 글리세롤(glycerol),

테트라하이드로푸릴 알코올(tetrahydrofuryl alcohol), 소르비탄의 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 지방산 에스테르(fatty acid ester), 또는 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 습윤제, 유화제와 현탁제, 감미료, 풍미제, 착색제, 방향제, 보존제 등과 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다.

[0145] 현탁액은 활성 화합물 이외에, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올(ethoxylated isostearyl alcohol), 폴리옥시에틸렌 소르비톨(polyoxyethylene sorbitol)과 소르비탄 에스테르(sorbitan ester), 미세결정성 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 알루미늄 메타히드록시드(aluminum metahydroxide), 벤토나이트(bentonite), 아가-아가(agar-agar)와 트래거캔스(tragacanth), 이들의 혼합물 등과 같은 현탁제를 함유할 수 있다.

[0146] 본 발명의 조성물은 또한, 보존제, 습윤제, 유화제와 분산제(dispersing agent)와 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다. 미생물의 작용 예방은 다양한 항균제와 항진균제, 예를 들면, 파라벤(paraben), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀 소르빈산(phenol sorbic acid) 등의 내포에 의해 담보될 수 있다. 또한, 등장성화제(isotonic agent), 예를 들면, 당, 염화나트륨 등을 조성물 내로 포함시키는 것이 바람직하다. 이에 더하여, 주사가능 제약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트(aluminum monostearate)과 젤라틴의 내포로 달성될 수 있다.

[0147] 투약 섭생(dosage regimen)은 본 발명의 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)의 작용을 변화시키는 다양한 인자를 고려하여 담당 의사에 의해 결정될 것이다. 다양한 인자에는 환자의 적혈구 총수, 헤모글로빈 수준 또는 기타 진단적 평가, 원하는 목표 적혈구 총수, 환자의 연령, 성별과 식이, 하락한 적혈구 수준의 원인이 되는 임의의 질환의 심각도, 투여 기간, 그리고 다른 기타 인자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 최종 조성물에 다른 공지된 성장 인자의 첨가 역시 용량에 영향을 줄 수 있다. 진행은 적혈구와 헤모글로빈 수준의 주기적인 평가, 그리고 망상적혈구 수준 및 조혈 과정의 다른 지표의 평가에 의해 모니터링될 수 있다.

[0148] 영장류와 인간을 이용한 실험은 적혈구 수준에 대한 ActRIIa-Fc의 효과가 화합물이 최소한 대략 20 내지 30일의 기간 동안 대략 100 ng/ml 또는 그 이상의 혈청 농도를 달성할 만큼 충분한 양과 간격으로 투약될 때, 검출될 수 있음을 증명하였다. 최소한 20 내지 30일의 기간 동안 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml 또는 그 이상의 혈청 수준을 획득하는 용량 역시 이용될 수 있다. 골 효과(bone effect)는 대략 200 ng/ml의 혈청 수준에서 관찰될 수 있고, 실질적인 효과는 최소한 대략 20 내지 30일의 기간 동안 대략 1000 ng/ml 또는 그 이상에서 시작된다. 따라서 골에 거의 영향을 주지 않으면서 적혈구에 대한 효과를 달성하는 것이 바람직하다면, 대략 20 내지 30일의 기간 동안 대략 100 내지 1000 ng/ml의 혈청 농도를 전달하는 투약 계획이 설계될 수 있다. 대안으로, 적혈구 수준에 거의 영향을 주지 않거나, 또는 적혈구 수준에 대한 영향을 감소시키면서 골, 유방 암 등에 대한 효과를 달성하는 것이 바람직하다면, 60일마다, 90일마다, 또는 120일마다 1회 이하의 투약 빈도(dosing frequency)로 대략 100 내지 1000 ng/ml의 혈청 농도를 전달하는 투약 계획이 설계될 수 있다. 인간에서, 200 ng/ml의 혈청 수준은 0.1 mg/kg 또는 그 이상의 단일 투약으로 달성되고, 1000 ng/ml의 혈청 수준은 0.3 mg/kg 또는 그 이상의 단일 투약으로 달성된다. 상기 분자의 관찰된 혈청 반감기는 대략 20 내지 30일이고, 대부분의 Fc 융합 단백질들보다 훨씬 길고, 따라서 예로써, 매주 또는 격주 기초에서 대략 0.05 내지 0.5 mg/kg을 투약함으로써 지속적으로 효과적인 혈청 수준이 달성될 수 있고, 또는 더욱 높은 용량이 투약 간에 더욱 긴 간격에서 이용될 수 있다. 가령, 0.1 내지 1 mg/kg의 용량이 매일 또는 격월 기준에서 이용될 수도 있다.

[0149] 일정한 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 제시한다. 이런 요법은 앞서 열거된 질환에 관련된 세포 또는 조직 내로 ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 도입에 의해 치료 효과를 달성하게 된다. ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 키메라 바이러스와 같은 재조합 발현 벡터 또는 콜로이드성 분산 시스템을 이용하여 달성될 수 있다. ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 치료적 전달(therapeutic delivery)에는 표적화된 리포솜(liposome)의 이용이 바람직하다.

[0150] 본 명세서에 교시된 바와 같이 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터에는 아데노바이러스(adenovirus), 포진 바이러스(herpes virus), 우두(vaccinia), 또는 레트로바이러스(retrovirus)와 같은 RNA 바이러스가 포함된다. 레트로바이러스 벡터는 무린 또는 조류 레트로바이러스의 유도체일 수 있다. 단일 외래 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 실례에는 Moloney 무린 백혈병 바이러스(MoMuLV), Harvey 무린 육종 바이러스(HaMuSV), 무린 유방 종양 바이러스(MuMTV), 그리고 Rous 육종 바이러스(RSV)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다수의 부가적인 레트로바이러스 벡터는 복수 유전자를 통합할 수 있다. 이들 모든 벡터는 형질도입된 세포가 확인되고 산출될 수 있도록 선별가능 마커에 대한 유전자를 전달하거나 통합할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예로써, 당, 당지질(glycolipid), 또는 단백질을 부착함으로써 표적-특이적으로 만들어질

수 있다. 바람직한 표적화는 항체를 이용함으로써 달성된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특이적인 폴리뉴클레오티드 서열은 레트로바이러스 게놈 내로 삽입되거나, 또는 ActRIIa 폴리뉴클레오티드를 포함하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적인 전달을 가능하게 하는 바이러스 외피(viral envelope)에 부착될 수 있다.

[0151] 대안으로, 조직 배양 세포는 전통적인 인산칼슘(calcium phosphate) 형질감염(transfection)에 의해, 레트로바이러스 구조 유전자 gag, pol과 env를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포는 이후, 목적 유전자를 포함하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성된 세포는 배양 배지 내로 레트로바이러스 벡터를 방출한다.

[0152] ActRIIa 폴리뉴클레오티드에 대한 다른 표적화된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템에는 거대분자 복합체, 나노캡슐(nanocapsule), 마이크로캡슐(microsphere), 비드(bead), 그리고 지질-기초된 시스템(가령, 수중유 에멀전, 미셀(micell), 혼합된 미셀, 리포솜 등)이 포함된다. 본 발명에서 바람직한 콜로이드성 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 시편관내와 생체내에서 전달 운반체(delivery vehicle)로서 유용한 인공 막 소포(membrane vesicle)이다. RNA, DNA와 원형 비리온(virion)은 수성 내부에 내포될 수 있고, 생물학적 활성 형태로 세포에 전달될 수 있다(참조: Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). 리포솜 소포를 이용한 효율적인 유전자 전달 방법은 당분야에 공지되어 있다(참조: Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988). 리포솜의 조성은 통상적으로, 스테로이드(steroid), 특히 콜레스테롤(cholesterol)과 공동으로 인지질(phospholipid)의 조합이다. 다른 인지질 또는 다른 지질 역시 이용될 수 있다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온 강도(ionic strength)와 이가 양이온(divalent cation)의 존재에 좌우된다.

[0153] 리포솜 생산에 유용한 지질의 실례에는 포스파티딜(phosphatidyl) 화합물, 예를 들면, 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol), 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 스펅고지질(sphingolipid), 세레브로시드(cerebroside) 및 강글리오시드(ganglioside)가 포함된다. 예시적인 인지질에는 난 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine), 그리고 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine)이 포함된다. 또한, 리포솜의 표적화는 예로써, 장기-특이성(organ-specificity), 세포-특이성(cell-specificity), 그리고 세포소기관-특이성(organelle-specificity)의 기초에서 가능하고, 당분야에 공지되어 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0154] 도면의 간단한 설명

도 1에서는 CHO 세포에서 발현된 ActRIIa-hFc의 정제를 도시한다. 상기 단백질은 크기 칼럼(왼쪽 패널)과 Coomassie 염색된 SDS-PAGE(오른쪽 패널)(왼쪽 레인: 분자량 기준; 오른쪽 레인: ActRIIa-hFc)에 의해 시각화될 때, 단일의 충분히 정의된 피크로서 정제된다.

도 2에서는 BiaCore™ 분석법에 의한 측정에서, 액티빈과 GDF-11에 ActRIIa-hFc의 결합을 도시한다.

도 3에서는 암컷 비-인간 영장류에서 적혈구 총수에 대한 ActRIIa-hFc의 효과를 도시한다. 암컷 필리핀 원숭이(cynomolgus monkey)(각각 5마리 원숭이의 4가지 군)는 0일, 7일, 14일과 21일 시점에, 위약 또는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 ActRIIa-hFc로 치료되었다. 도 3A에서는 적혈구(RBC) 총수를 도시한다. 도 3B에서는 헤모글로빈 수준을 도시한다. 통계학적 유의성(statistical significance)은 각 치료 군에 대한 기준선에 비례한다. 57일 시점에, 각 군에서 2마리 원숭이가 남아있었다.

도 4에서는 수컷 비-인간 영장류에서 적혈구 총수에 대한 ActRIIa-hFc의 효과를 도시한다. 수컷 필리핀 원숭이(cynomolgus monkey)(각각 5마리 원숭이의 4가지 군)는 0일, 7일, 14일과 21일 시점에, 위약 또는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 ActRIIa-hFc로 치료되었다. 도 4A에서는 적혈구(RBC) 총수를 도시한다. 도 4B에서는 헤모글로빈 수준을 도시한다. 통계학적 유의성(statistical significance)은 각 치료 군에 대한 기준선에 비례한다. 57일 시점에, 각 군에서 2마리 원숭이가 남아있었다.

도 5에서는 암컷 비-인간 영장류에서 망상적혈구(reticulocyte) 총수에 대한 ActRIIa-hFc의 효과를 도시한다. 필리핀 원숭이(cynomolgus monkey)(각각 5마리 원숭이의 4가지 군)는 0일, 7일, 14일과 21일 시점에, 위약 또는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 ActRIIa-hFc로 치료되었다. 도 5A에서는 절대 망상적혈구 총수를 도시한다. 도 5B에서는 RBC에 상대적인 망상적혈구의 백분율을 도시한다. 통계학적 유의성(statistical significance)은 각 치료 군에 대한 기준선에 비례한다. 57일 시점에, 각 군에서 2마리 원숭이가 남아있었다.

도 6에서는 수컷 비-인간 영장류에서 망상적혈구(reticulocyte) 총수에 대한 ActRIIa-hFc의 효과를 도시한다. 필리핀 원숭이(cynomolgus monkey)(각각 5마리 원숭이의 4가지 군)는 0일, 7일, 14일과 21일 시점에, 위약 또는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 ActRIIa-hFc로 치료되었다. 도 6A에서는 절대 망상적혈구 총수를 도시한다. 도 6B에서는 RBC에 상대적인 망상적혈구의 백분율을 도시한다. 통계학적 유의성(statistical significance)은 각 치료 군에 대한 기준선에 비례한다. 57일 시점에, 각 군에서 2마리 원숭이가 남아있었다.

도 7에서는 실시예 5에서 기술된 인간 임상 시험으로부터 결과를 도시하는데, 여기서 ActRIIa-hFc의 곡선 아래 면적(area-under-curve, AUC)과 투여량은 ActRIIa-hFc가 정맥내(IV) 또는 피하(SC) 투여되는 지에 상관없이, 선형 상관관계(linear correlation)를 갖는다.

도 8에서는 IV 또는 SC 투여된 환자에서 ActRIIa-hFc의 혈청 수준의 비교를 도시한다.

도 9에서는 ActRIIa-hFc의 상이한 용량 수준에 응하여, 골 알칼리성 포스파타아제(bone alkaline phosphatase, BAP) 수준을 도시한다. BAP는 단백질화 골 성장에 대한 마커이다.

도 10에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 헤마토크릿 수준의 기준선으로부터 변화(median change)를 도시한다. ActRIIa-hFc는 지정된 용량에서 정맥내(IV) 투여되었다.

도 11에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 헤모글로빈 수준의 기준선으로부터 변화(median change)를 도시한다. ActRIIa-hFc는 지정된 용량에서 정맥내(IV) 투여되었다.

도 12에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 RBC(적혈구) 총수의 기준선으로부터 변화(median change)를 도시한다. ActRIIa-hFc는 지정된 용량에서 정맥내(IV) 투여되었다.

도 13에서는 실시예 5에 기술된 인간 임상 시험으로부터 망상적혈구 총수의 기준선으로부터 변화(median change)를 도시한다. ActRIIa-hFc는 지정된 용량에서 정맥내(IV) 투여되었다.

도 14에서는 상자로 표시된 직접적으로 접촉하는 리간드(리간드 결합 포켓(ligand binding pocket))에 복합 ActRIIB와 ActRIIA 결정 구조(crystal structure)의 복합 분석(composite analysis)에 기초하여, 본 발명에서 추론되는 잔기를 포함하는 인간 ActRIIA와 ActRIIB의 정렬을 도시한다.

도 15에서는 화학요법-유도된 빈혈의 생쥐 모형에서 헤마토크릿에 대한 ActRIIA-mFc의 효과를 도시한다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. \*,  $P < 0.05$  vs. 동일한 시점에서 운반제. 화학요법에 앞서 ActRIIA-mFc의 단일 투약은 화학요법 파클리탁셀의 투여 이후에 관찰되는 헤마토크릿 수준에서 감소를 예방하였다.

도 16에서는 화학요법-유도된 빈혈의 생쥐 모형에서 헤마토크릿에 대한 ActRIIA-mFc의 용량-의존성 효과를 도시한다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. 동일한 시점에서 운반제. 파클리탁셀 투여 후 2주 시점에, ActRIIA-mFc 치료는 투약 횟수의 함수로서 헤마토크릿 수준을 증가시켰다.

도 17에서는 만성 신장 질환의 부분적으로 신장절제된(NEPHX) 생쥐 모형에서 헤마토크릿에 대한 ActRIIA-mFc의 효과를 도시한다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다. \*,  $P < 0.05$  vs. 동일한 시점에서 운반제. ActRIIA-mFc 치료는 그렇지 않으면 4주 시점에 관찰되는 헤마토크릿 수준에서 감소를 예방하고, 8주 시점에 헤마토크릿에서 유의한 추세를 유발하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0155]

실시예

[0156]

본 발명은 앞서 전반적으로 기술되었고, 아래의 실시예를 참조하면 더욱 용이하게 이해될 수 있는데, 이들 실시예는 본 발명의 특정 측면과 구체예를 예시하는 목적으로 포함되고 본 발명을 한정하지 않는다.

[0157]

실시예 1: ActRIIa-Fc 융합 단백질

[0158]

출원인은 인간 또는 생쥐 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIa의 세포외 도메인을 포함하고 이들 사이에 최소 링커(minimal linker)가 존재하는 가용성 ActRIIa 융합 단백질을 작제하였다. 이들 구조체는 각각, ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc로 지칭된다.

[0159]

아래에 도시된 ActRIIa-hFc는 CHO 세포주로부터 정제된다(SEQ ID NO: 7):

- [0160] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV  
TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT  
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0161] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3가지 상이한 리더 서열(leader sequence)이 고려되었다:
- [0162] (i) 꿀벌 멜리틴(mellitin)(HBML): MKFLVNVALVFMVVISYIYA (SEQ ID NO: 8)
- [0163] (ii) 조직 플라스미노겐 활성화인자(TPA): MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)
- [0164] (iii) 코유: MGAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).
- [0165] 선택된 형태는 TPA 리더를 이용하고 아래의 가공되지 않은 아미노산 서열을 보유한다:
- [0166] MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDS  
PEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)
- [0167] 상기 폴리펩티드는 아래의 핵산 서열에 의해 인코딩된다:
- [0168] ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCGGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAG  
TGTCTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAAGCGCGCATTGTTTTGCTACCT  
GGAAGAATATTTCTGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTGTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCC  
TGAAGTATATTTCTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGAATGAAAGTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACC  
TAAGCCACCCACCGTGGTGAACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGA  
CACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA  
GGTGCAATATGCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTGCAGCGTCTCACCCTGTCACCCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGTCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCT  
GCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGACAAGAGCAGGTGGCAGCA  
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID  
NO: 14)
- [0169] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 둘 모두 제조합 발현에 상당히 용이하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 단백질은 단  
백질의 단일한 충분히-정의된 피크로서 정제되었다. N-말단 염기서열분석(sequencing)에서 -ILGRSETQE의 단일  
서열(SEQ ID NO: 11)이 확인되었다. 정제는 예로써, 임의의 순서로 아래 중에서 3가지 이상을 비롯한 일련의 칼  
럼 크로마토그래피 단계로 달성될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파  
로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과  
(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. ActRIIa-hFc 단백질은 크기 배제 크  
로마토그래피에 의한 결정에서 >98% 및 SDS PAGE에 의한 결정에서 >95%의 순도로 정제되었다.
- [0170] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc는 리간드, 특히 액티빈 A에 대한 높은 친화성을 보였다. GDF-11 또는 액티빈 A (“  
ActA”)는 표준 아민 결합 절차를 이용하여 Biacore CM5 칩 상에 고정되었다. ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백  
질은 상기 시스템으로 적하되고, 결합이 측정되었다. ActRIIa-hFc는  $5 \times 10^{-12}$ 의 해리 상수( $K_D$ )로 액티빈에 결합하  
고, 상기 단백질은  $9.96 \times 10^{-9}$ 의  $K_D$ 로 GDF11에 결합하였다(도 2 참조). ActRIIa-mFc는 유사하게 작용하였다.
- [0171] ActRIIa-hFc는 약물동력학 연구에서 매우 안정하였다. 쥐는 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg의 ActRIIa-hFc 단  
백질이 투여되고, 24시간, 48시간, 72시간, 144시간과 168시간 시점에서 상기 단백질의 혈장 수준이

측정되었다. 별개의 연구에서, 쥐는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg이 투약되었다. 쥐에서, ActRIIa-hFc는 11-14일 혈청 반감기를 보였고, 상기 약물의 순환 수준(circulating level)은 2주후 매우 높았다(1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 최초 투여에서, 각각 11  $\mu\text{g/ml}$ , 110  $\mu\text{g/ml}$  또는 304  $\mu\text{g/ml}$ ). 필리핀 원숭이(cynomolgus monkey)에서, 상기 약물의 혈장 반감기는 14일보다 훨씬 크고, 순환 수준은 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 최초 투여에서, 각각 25  $\mu\text{g/ml}$ , 304  $\mu\text{g/ml}$  또는 1440  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 인간에서 예비 결과는 혈청 반감기가 대략 20일 내지 30일이라는 것을 암시한다.

[0172] 실시예 2: ActRIIa-hFc 단백질의 특성화

[0173] ActRIIa-hFc 융합 단백질은 SEQ ID NO:9의 조직 플라스미노겐 리더 서열(tissue plasminogen leader sequence)을 이용하여, pAID4 벡터(SV40 ori/인헨서, CMV 프로모터)로부터 안정적으로 형질감염된 CHO-DUKX BII 세포에서 발현되었다. 실시예 1에서 앞서 기술된 바와 같이 정제된 상기 단백질은 SEQ ID NO:7의 서열을 보유하였다. Fc 부분은 SEQ ID NO:7에 도시된 바와 같이 인간 IgG1 Fc 서열이다. 시알산 분석(sialic acid analysis)에서, 상기 단백질은 평균적으로, ActRIIa-hFc 융합 단백질 분자당 대략 1.5 내지 2.5 몰의 시알산(sialic acid)을 포함하였다.

[0174] 이러한 정제된 단백질은 인간 환자에서 25-32일의 반감기를 비롯하여, 조사된 모든 동물에서 현저하게 긴 혈청 반감기(serum half-life)를 보였다(하기 실시예 6 참조). CHO 세포 발현된 물질은 인간 293 세포에서 발현된 ActRIIa-hFc 융합 단백질에서 보고된 것보다 액티빈 B 리간드에 대한 더욱 높은 친화성(affinity)을 갖는다(del Re et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51): 53126-35.). 부가적으로, tPa 리더 서열의 이용은 다른 리더 서열보다 더욱 많은 생산을 제공하고, 고유 리더로 발현된 ActRIIa-Fc와 달리, 고도로 순수한 N-말단 서열을 제공하였다. 이러한 고유 리더 서열의 이용은 2가지 주요 종류의 ActRIIa-Fc를 발생시켰는데, 이들은 각각 상이한 N-말단 서열을 보유하였다.

[0175] 실시예 3. ActRIIa-hFc는 비-인간 영장류에서 적혈구 수준을 증가시킨다

[0176] 본 연구에서는 각각, 5마리 수컷과 5마리 암컷 필리핀 원숭이의 4가지 군을 이용하고, 군당 성별로 3마리씩 29 일자에 종료가 예정되고, 그리고 군당 성별로 2마리씩 57일자에 종료가 예정되었다. 각 동물은 1, 8, 15와 22일 시점에 정맥내(IV) 주사를 통해 운반제(1 군), 또는 1, 10 또는 30 mg/kg의 용량에서 ActRIIa-Fc(각각, 2, 3과 4 군)가 투여되었다. 용량 체적(dose volume)은 3 mg/kg에 유지되었다. 적혈구 수준의 다양한 척도는 첫 투여 2 일 전에, 그리고 첫 투여후 15, 29와 57일(남아있는 2마리 동물) 시점에 평가되었다.

[0177] ActRIIa-hFc는 본 연구 동안 모든 용량 수준과 시점에서, 수컷과 암컷에 대한 평균 적혈구 파라미터(적혈구 총수 [RBC], 헤모글로빈 [HGB], 그리고 헤마토크릿 [HCT])에서 통계학적으로 유의한 증가를 유도하였고, 절대와 상대 망상적혈구 총수(ARTC; RTC)에서 상승을 동반하였다(도 3 - 6 참조).

[0178] 통계학적 유의성은 기준선에서 치료 군에 대한 평균과 비교하여, 각 치료 군에 대하여 계산되었다.

[0179] 흥미롭게도, 적혈구 총수와 헤모글로빈 수준에서 증가는 에리트로포이에틴(erythropoietin)에서 보고된 효과에 크기에서 거의 동등하다. 이들 효과의 개시는 에리트로포이에틴에서보다 ActRIIa-Fc에서 더욱 신속하다. 유사한 결과가 쥐와 생쥐에서 관찰되었다.

[0180] 실시예 4. ActRIIa-hFc는 인간 환자에서 적혈구 수준 및 골 형성의 마커를 증가시킨다

[0181] 실시예 1에서 기술된 ActRIIa-hFc 융합 단백질은 일차적으로, 건강한 폐경후 여성에서 상기 단백질의 안정성을 평가하기 위하여 수행된 무작위 이중-맹검 위약-대조 연구(randomized, double-blind, placebo-controlled study)에서 인간 환자에 투여되었다. 48명의 개체가 단일 투약의 ActRIIa-hFc 또는 위약(5 활성제:1 위약)을 복용하도록 6가지 군에 무작위화되었다. 용량 수준 범위는 0.01 내지 3.0 mg/kg 정맥내(IV), 그리고 0.03 내지 0.1 mg/kg 피하(SC)이었다. 모든 개체는 120일 동안 추적되었다. 약동학적(PK) 분석 이외에, ActRIIa-hFc의 생물학적 활성 역시 골 형성과 재흡수, 그리고 FSH 수준의 생화학적 마커의 측정에 의해 평가되었다.

[0182] 잠재적 변화를 조사하기 위하여, 헤모글로빈과 RBC 총수가 본 연구의 과정 동안 모든 개체에 대하여 상세하게 조사되고 기준선 수준과 비교되었다. 혈소판 총수는 대조와 동일한 시점에서 비교되었다. 혈소판 총수의 경우

시간의 흐름에서 기준선 수치로부터 임상적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

[0183] ActRIIa-hFc의 PK 분석은 용량과의 선형 프로파일(linear profile), 그리고 대략 25-32일의 평균 반감기(mean half-life)를 보였다. ActRIIa-hFc에 대한 곡선 아래 면적(area-under-curve, AUC)은 용량에 선형으로 관련되고, 그리고 SC 투약후 흡수가 본질적으로 완전하였다(도 7과 8 참조). 이들 데이터는 SC가 투약에 바람직한 접근법임을 지지하는데, 그 이유는 SC가 첫 며칠간의 IV 투약과 연관된 약물의 혈청 농도에서 스파이크(spike)를 회피하면서 상기 약물에 대한 동등한 생체이용효율(bioavailability)과 혈청-반감기를 제공하기 때문이다(도 8 참조). ActRIIa-hFc는 단백동화 골 성장에 대한 마커인 골-특이적 알칼리성 포스파타아제(bone-specific alkaline phosphatase, BAP)의 혈청 수준에서 신속하고 지속된 용량-의존성 증가(dose-dependent increase), 그리고 골 재흡수에 대한 마커인 C-말단 1형 콜라겐 텔로펩티드(telopeptide)와 타르타르산염-저항성 산성 포스파타아제(tartrate-resistant acid phosphatase) 5b 수준에서 용량-의존성 감소(dose-dependent decrease)를 유도하였다. 다른 마커, 예를 들면, P1NP는 확정적이지 못한 결과를 보였다. BAP 수준은 약물의 최대 용량에서 거의 포화 효과(saturating effect)를 보였는데, 이는 이러한 단백동화 골 생물마커에 대한 반-극대 효과(half-maximal effect)가 0.3 mg/kg, 그리고 3 mg/kg 범위까지 증가하는 용량에서 달성될 수 있음을 지지하였다. 약물에 대한 AUC에 약역학적 효과(pharmacodynamic effect)의 상관관계로서 계산된, EC50은 51,465(day\*ng/ml)이다(도 9 참조). 이들 골 생물마커 변화는 조사된 최대 용량 수준에서 대략 120일 동안 지속되었다. 또한, 액티빈의 저해와 일치하는 혈청 FSH 수준에서 용량-의존성 감소가 관찰되었다.

[0184] 전반적으로, 연구 첫 주 동안, IV 또는 SC로 제공되는 지에 상관없이 0.01과 0.03 mg/kg 군에서 아마도 방혈(phlebotomy) 연구에 관련된 헤모글로빈에서 매우 작은 비-약물 관련된 감소가 관찰되었다. 0.1 mg/kg SC와 IV 헤모글로빈 결과는 안정적이거나, 또는 8-15일 시점까지 완만한 증가를 보였다. 0.3 mg/kg IV 용량 수준에서, 빠르면 2일 시점에 HGB 수준에서 명백한 증가가 관찰되었고, 15-29일 시점에 위약 개체에서는 관찰되지 않는 정점(peaking)이 종종 관찰되었다. 1.0 mg/kg IV 용량과 3.0 mg/kg IV 용량에서, 1 g/dl 이상의 헤모글로빈에서 평균 증가가 단일 투약에 응하여 관찰되고, RBC 총수와 헤마토크릿에서 상응하는 증가가 관찰되었다. 이들 혈액학적 파라미터는 투약후 대략 60일 시점에 최고점에 달하고 120일 시점에 실질적으로 감소하였다. 이는 적혈구 수준을 증가시키는 목적으로 투약이 120일 이하(즉, 기준선으로 복원에 앞서), 바람직하게는 90일 이하 또는 60일 이하의 투약 간격(dosing interval)으로 수행되면, 더욱 효과적일 수 있음을 지시한다. 혈액학적 변화의 개요를 위하여, 도 10-13을 참조한다.

[0185] 전반적으로, ActRIIa-hFc는 적혈구 총수와 망상적혈구 총수에 대한 용량-의존성 효과, 그리고 골 형성의 마커에 대한 용량-의존성 효과를 보였다.

#### [0186] 실시예 5. ActRIIa-hFc로 빈혈 환자의 치료

[0187] 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg과 1.0 mg/kg의 용량 수준에서 ActRIIa-hFc의 복수 투약, 그리고 30일마다 투약으로, 환자를 치료하는 임상 연구가 설계되었다. 본 시험에서 정상적인 건강한 환자는 헤모글로빈과 헤마토크릿이 정상적인 범위를 초과하여 상승한 일부 사례를 제외하고, 실시예 4에서 보고된 I기 임상 시험에서 관찰되는 증가와 일치하는 헤모글로빈과 헤마토크릿에서 증가를 보였다. 대략 7.5의 헤모글로빈을 갖는 빈혈 환자 역시 1 mg/kg 수준에서 2회 투약되고, 2개월후 헤모글로빈 수준이 대략 10.5로 증가하였다. 상기 환자의 빈혈은 만성 철 결핍(chronic iron deficiency)에 의해 유발되는 것으로 생각되는 소적혈구성 빈혈(microcytic anemia)이었다.

#### [0188] 실시예 6. ActRIIa-mFc는 비장 적혈구 방출의 자극으로 생쥐에서 적혈구 수준을 증가시킨다

[0189] 본 연구에서, 골수와 비장에서 조혈 전구세포(hematopoietic progenitor)의 빈도에 대한 ActRIIa-mFc의 생체내 투여의 효과가 분석되었다. 첫 번째 생쥐 군은 대조로서 PBS가 투여되고, 두 번째 생쥐 군은 10 mg/kg에서 ActRIIa-mFc가 2회 투여되고, 양쪽 군은 8일후 희생되었다. 전체 혈구 계산(complete blood count)을 수행하기 위하여 말초혈(peripheral blood)이 이용되었고, 그리고 각 장기에서 림프구(lymphoid), 적혈구(erythroid)와 골수(myeloid) 전구세포 함량을 평가하는 시험관내 집락형성 분석(clonogenic assay)을 수행하기 위하여 대퇴골(femur)과 비장이 이용되었다. 말초혈에서, 적혈구와 헤모글로빈 함량에서 현저한 증가가 화합물 치료된 생쥐에서 관찰되었다. 대퇴골에서, 대조 군과 치료 군 사이에 유핵 세포 숫자(nucleated cell number) 또는 전구세포 함량에서 차이는 관찰되지 않았다. 비장에서, 화합물 치료된 군은 적혈구 용해 이전에 유핵 세포 숫자에서, 그리고 접시당 성숙 적혈구 전구세포(CFU-E) 집락 숫자, 빈도와 비장(spleen)당 총 전구세포 숫자에서 통계학적으로

로 유의한 증가를 보였다. 이에 더하여, 비장(spleen)당 골수(CFU-GM), 미성숙 적혈구(BFU-E)와 총 전구세포의 숫자에서 증가가 관찰되었다.

- [0190] 동물:
- [0191] 16 마리의 6-8 주령 BDF1 암컷 생쥐가 본 연구에 이용되었다. 8 마리 생쥐는 1일과 3일 시점에 10 mg/kg의 용량에서 검사 화합물 ActRIIa-mFc이 피하 주사되고, 그리고 8 마리 생쥐는 생쥐당 100  $\mu$ l의 체적에서 운반제 대조(vehicle control), 인산염 완충된 염수(PBS)가 피하 주사되었다. 모든 생쥐는 적절한 동물 관리 가이드라인(Animal Care Guideline)에 따라서, 첫 번째 주사후 8일 시점에 희생되었다. 개별 동물로부터 말초혈(PB) 시료는 심장 천자(cardiac puncture)에 의해 수집되고 전체 혈구 계산과 감별 계산(CBC/Diff)에 이용되었다. 대퇴골과 비장은 각 생쥐로부터 수거되었다.
- [0192] 수행된 검사:
- [0193] CBC/Diff 계산
- [0194] 각 생쥐로부터 PB는 심장 천자를 통해 수집되고 적절한 microtainer 튜브 내로 배치되었다. 시료는 CellDyn 3500 계수기에서 분석을 위하여 CLV로 발송되었다.
- [0195] 집락형성 분석
- [0196] 골수, 적혈구와 림프구 계통(lineage)의 집락형성 전구세포는 하기에 기술된 시험관내 메틸셀룰로오스(methylcellulose)-기초된 배지 시스템을 이용하여 평가되었다.
- [0197] 성숙 적혈구 전구세포:
- [0198] 성숙 적혈구(CFU-E) 계통의 집락형성 전구세포는 MethoCult™ 3334: 제조함 인간(rh) 에리트로포이에틴(3 U/ml)을 포함하는 메틸셀룰로오스-기초된 배지에서 배양되었다.
- [0199] 림프구 전구세포:
- [0200] 림프구(CFU-pre-B) 계통의 집락형성 전구세포는 MethoCult® 3630: rh 인터루킨 7(10 ng/ml)을 포함하는 메틸셀룰로오스-기초된 배지에서 배양되었다.
- [0201] 골수와 미성숙 적혈구 전구세포:
- [0202] 과립구-단구(CFU-GM), 적혈구(BFU-E)와 다능성(multipotential)(CFU-GEMM) 계통의 집락형성 전구세포는 MethoCult™ 3434: 제조함 뮤린(rm) 줄기 세포 인자(50 ng/ml), rh 인터루킨 6(10 ng/ml), rm 인터루킨 3(10 ng/ml)과 rh 에리트로포이에틴(3 U/ml)을 포함하는 메틸셀룰로오스-기초된 배지에서 배양되었다.
- [0203] 방법:
- [0204] 생쥐 대퇴골과 비장은 표준 프로토콜에 의해 처리되었다. 간단히 말하면, 골수는 21 게이지(gauge) 바늘과 1 cc 주사기를 이용하여, 2% 소 태아 혈청(IMDM 2% FBS)을 포함하는 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지로 대퇴부 공동(femoral cavity)을 씻어냄으로써 획득되었다. 비장 세포는 70  $\mu$ m 필터를 통해 비장을 분쇄하고 상기 필터를 IMDM 2% FBS로 행균으로써 획득되었다. 이후, 3% 빙초산(glacial acetic acid)에서 유핵 세포 계산은 장기(organ)당 전체 세포가 계산될 수 있도록 Neubauer 카운팅 챔버(counting chamber)를 이용하여 단일 세포 현탁액(single cells suspension)에서 수행되었다. 오염 적혈구를 제거하기 위하여, 전체 비장 세포는 이후, 3배 체적의 염화암모늄 용해 완충액(ammonium chloride lysis buffer)으로 희석되고 얼음 위에서 10분 동안 배양되었다. 이들 세포는 이후, 세척되고 IMDM 2% FBS에서 재현탁되고, 그리고 용해후 이들 세포의 세포 농도를 결정하기 위한 2차 세포 계산이 수행되었다.
- [0205] 세포 스톡(cell stock)이 만들어지고, 각 배지 성분(media formulation) 내에 각 조직에 대한 최적 도말 농도(optimal plating concentration)를 획득하기 위하여 각각의 메틸셀룰로오스-기초된 배지 성분에 첨가되었다. 골수 세포는 성숙 적혈구 전구세포를 평가하기 위하여 MethoCult™ 3334에서 접시당  $1 \times 10^5$ 개 세포, 림프구 전구세포를 평가하기 위하여 MethoCult™ 3630에서 접시당  $2 \times 10^5$ 개 세포, 그리고 미성숙 적혈구와 골수 전구세포를

평가하기 위하여 MethoCult™ 3434에서 접시당  $3 \times 10^4$ 개 세포로 도말되었다. 비장 세포는 성숙 적혈구 전구세포를 평가하기 위하여 MethoCult™ 3334에서 접시당  $4 \times 10^5$ 개 세포, 림프구 전구세포를 평가하기 위하여 MethoCult™ 3630에서 접시당  $4 \times 10^5$ 개 세포, 그리고 미성숙 적혈구와 골수 전구세포를 평가하기 위하여 MethoCult™ 3434에서 접시당  $2 \times 10^5$ 개 세포로 도말되었다. 삼중 접시(triplicate dish)에 도말된 배양액은 집락 계산과 평가가 숙련된 인원에 의해 수행될 때까지, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양되었다. 성숙 적혈구 전구세포는 2일 동안 배양되고, 림프구 전구세포는 7일 동안 배양되고, 그리고 성숙 적혈구와 골수 전구세포는 12일 동안 배양되었다.

- [0206] 분석:
- [0207] 평균  $\pm 1$  표준 편차(standard deviation)는 집락형성 분석의 삼중 배양액, 그리고 대조 군과 치료 군에서 모든 데이터 세트에 대하여 계산되었다.
- [0208] 각 조직 내에서 집락 형성 세포(colony forming cell, CFC)의 빈도는 아래와 같이 계산되었다:
- [0209] 접시당 도말된 세포
- [0210] 접시당 기록된 평균 CFC
- [0211] 대퇴골 또는 비장에 대해 총 CFC는 아래와 같이 계산되었다:
- [0212] 기록된 총 CFC x 대퇴골 또는 비장에 대해 유핵 세포 숫자(RBC 용해후)
- [0213] 배양된 유핵 세포의 숫자
- [0214] PBS 대조 생쥐와 화합물 치료된 생쥐 사이에 세포 또는 조혈 전구세포의 평균 숫자에서 차이가 있는 지를 평가하기 위하여, 표준 t-검정(standard t-test)이 수행되었다. 집락 계산의 잠재적 주관성(subjectivity)으로 인하여, 0.01 미만의 p 값은 유의한 것으로 간주된다. 각 군에 대한 평균값( $\pm$  SD)은 하기 표에 제시된다.

**표 1**

혈액학적 파라미터

| 치료 군              | 백혈구( $\times 10^9$ /L) | 적혈구( $\times 10^9$ /L) | 헤모글로빈(g/L)        | 헤마토크릿(L/L)        |
|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| PBS (n=8)         | 6.37 $\pm$ 2.83        | 10.9 $\pm$ 0.7         | 154.5 $\pm$ 5.9   | 0.506 $\pm$ 0.029 |
| ActRIIa-mFc (n=8) | 8.92 $\pm$ 3.69        | 11.8 $\pm$ 0.3*        | 168.3 $\pm$ 4.3** | 0.532 $\pm$ 0.014 |

- [0216] \* = p < 0.01
- [0217] \*\* = p < 0.0005

**표 2**

대퇴골과 비장으로부터 CFC

| 치료 군              | 대퇴골에 대해 총 CFC    | 비장에 대해 총 CFC     | 대퇴골에 대해 총 CFU-E   | 비장에 대해 총 CFU-E    |
|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| PBS (n=8)         | 33437 $\pm$ 7118 | 4212 $\pm$ 1148  | 27185 $\pm$ 12893 | 6743 $\pm$ 1591   |
| ActRIIa-mFc (n=8) | 31068 $\pm$ 8024 | 6816 $\pm$ 1516* | 18118 $\pm$ 6672  | 27313 $\pm$ 11790 |

[0219] \* =  $p < 0.005$

[0220] \*\* =  $p < 0.0001$

[0221] ActRIIa-mFc로 생쥐의 치료는 다수의 혈액학적 파라미터에서 현저한 증가를 유도하였다. 말초혈에서, 적혈구와 헤모글로빈 함량에서 현저한 증가가 화학물 치료된 생쥐에서 관찰되었다. 대퇴골에서, 대조 군과 치료 군 사이에 유핵 세포 숫자 또는 전구세포 함량에서 차이가 관찰되지 않았다. 비장에서, 화학물 치료된 군은 적혈구 용해 이전에 유핵 세포 숫자에서, 그리고 접시당 성숙 적혈구 전구세포(CFU-E) 집락 숫자, 빈도와 비장(spleen)당 총 전구세포 숫자에서 통계학적으로 유의한 증가를 경험하였다. 이에 더하여, 비장(spleen)당 골수(CFU-GM), 미성숙 적혈구(BFU-E)와 총 전구세포의 숫자에서 증가가 관찰되었다.

[0222] 실시예 7: 대안적 ActRIIa-Fc 단백질

[0223] 본 발명에 개시된 방법에 따라 이용될 수 있는 다양한 ActRIIa 변이체(variant)는 International Patent Application WO2006/012627(가령, pp. 55-58)에서 기술되고, 상기 문헌은 본 명세서에 순전히 참조로서 편입된다. 대안적 구체예는 ActRIIa의 세포외 도메인의 C-말단 꼬리(최종 15개 아미노산)의 결실을 포함한다. 이런 구조체에 대한 서열은 아래에 제공된다(Fc 부분은 밑줄로 표시됨)(SEQ ID NO: 12):

[0224] ILGRSETQECLFFNANWEKDRNTQGTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMTG  
GGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPVPVIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFELYSLTKVDSRWQOGNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0225] 실시예 8: 생쥐에서 화학요법-유도된 빈혈에 대한 ActRIIa-mFc의 효과

[0226] 본 출원인은 생쥐에서 화학요법-유도된 빈혈에 대한 ActRIIa-mFc의 효과를 조사하였다. 첫 2번의 연구에서, 6-주령 암컷 C57BL/6 생쥐는 화학요법 파클리탁셀(20 mg/kg, i.p.)의 단일 투약 3일 전에, ActRIIa-mFc(10 mg/kg, s.c.) 또는 운반제(인산염-완충된 염수)의 단일 투약으로 치료되었다. 혈액 시료는 화학요법 이전에, 그리고 파클리탁셀 투약후 3, 7과 14일 시점에 수집되었다(각 시점마다 군당 n = 6). ActRIIa-mFc는 파클리탁셀 투약후, 그렇지 않으면 관찰되는 헤마토크릿 수준에서 하락을 예방하고(도 15), 그리고 헤모글로빈 농도와 RBC 총수에 대한 유사한 효과가 관찰되었다. 두 번째 연구에서, 6-주령 암컷 C57BL/6 생쥐는 파클리탁셀(20 mg/kg 단일 투약, i.p.)에 앞서 시작되고 3 또는 4일의 간격으로 지속되는, 다양한 횟수의 ActRIIa-mFc 용량(10 mg/kg, s.c.), 또는 운반제(PBS)가 제공되었다. 혈액 시료가 파클리탁셀 투약후 3, 7과 14일 시점에 수집되었다(각 시점마다 군당 n = 8). 14일 시점에, ActRIIa-mFc 치료는 투약 횟수(dose number)의 함수로서 헤마토크릿 수준을 점진적으로 증가시켰다(도 16). 따라서 ActRIIa-mFc는 화학요법-유도된 빈혈을 약화시키거나 예방할 수 있을 만큼 충분한 조혈(erythropoiesis)을 촉진할 수 있다.

[0227] 실시예 9: 만성 신장 질환의 생쥐 모형에서 빈혈에 대한 ActRIIa-mFc의 효과

[0228] 본 출원인은 만성 신장 질환의 모형으로서 생쥐에서 신장절제술(nephrectomy)-유도된 빈혈에 대한 ActRIIa-mFc의 효과를 조사하였다. 첫 2번의 연구에서, 암컷 C57BL/6 생쥐는 에리트로포이에틴의 생산을 감소시키기 위하여, 부분적인 외과적 신장절제술을 받아 전체 신장 용적(total kidney volume) 중에서 대략 5/6이 제거되었다. 생쥐는 신장 결함을 더욱 조장하기 위하여 4-주 회복 기간 동안 고-지방 식이(high-fat diet)가 제공되고, 이후 총 8주 동안 ActRIIa-mFc(10 mg/kg, s.c.) 또는 운반제(PBS)로 주2회 치료되었다. 혈액 시료는 투약의 개시 이전에, 4주간 치료후, 그리고 8주간 치료후 수집되었다(각 시점마다 군당 n = 8). 대조 생쥐는 8-주 치료 기간 동안 헤마토크릿 수준에서 하락을 보이는 반면, ActRIIa-mFc 치료는 4주 시점에 이러한 하락을 예방하고, 또한 8주 시점에 유의한 추세를 산출하였다(도 17). 주로, 더욱 긴 회복 기간(2 개월) 및 표준 식이(standard diet)의 이용에서 상이한 두 번째 연구에서, 대조와 비교하여 ActRIIa-mFc 치료의 유사한 이점이 관찰되었다. 따라서 ActRIIa-mFc는 만성 신장 질환의 모형에서 빈혈을 예방하거나 약화시킬 수 있을 만큼 충분한

조혈을 촉진할 수 있다.

[0229] 종합하면, 이들 조사결과는 가용성 ActRIIA-Fc 융합 단백질이 적혈구의 순환 수준(circulating level)을 증가시키고, 따라서 만성 질환, 예를 들면, 암과 신장 질환, 그리고 잠재적으로 다른 염증성 또는 전염성 질환에 기인하는 저증식성 빈혈(hypoproliferative anemia)을 치료하는, TGF-집단 리간드에 의한 신호전달의 길항물질로서 이용될 수 있음을 지시한다. 흥미롭게도, 인간 환자에서 빈혈에 대한 ACE-011의 효과는 설치류에서 더욱 온건한 효과와 비교하여, 전형적으로 강력하다.

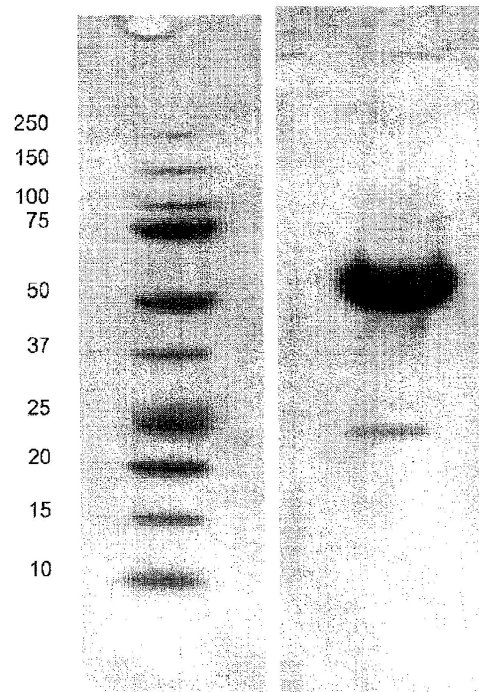
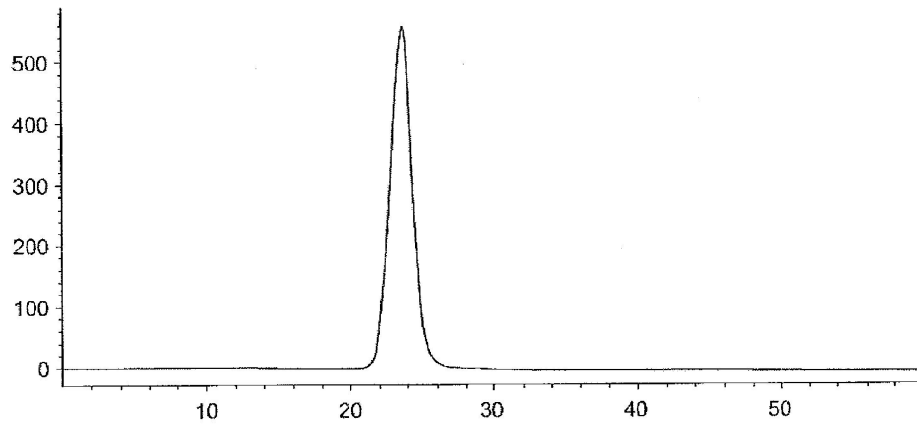
[0230] 참조로서 편입

[0231] 본 명세서에 언급된 모든 간행물과 특허는 순전히 참조로서 편입된다.

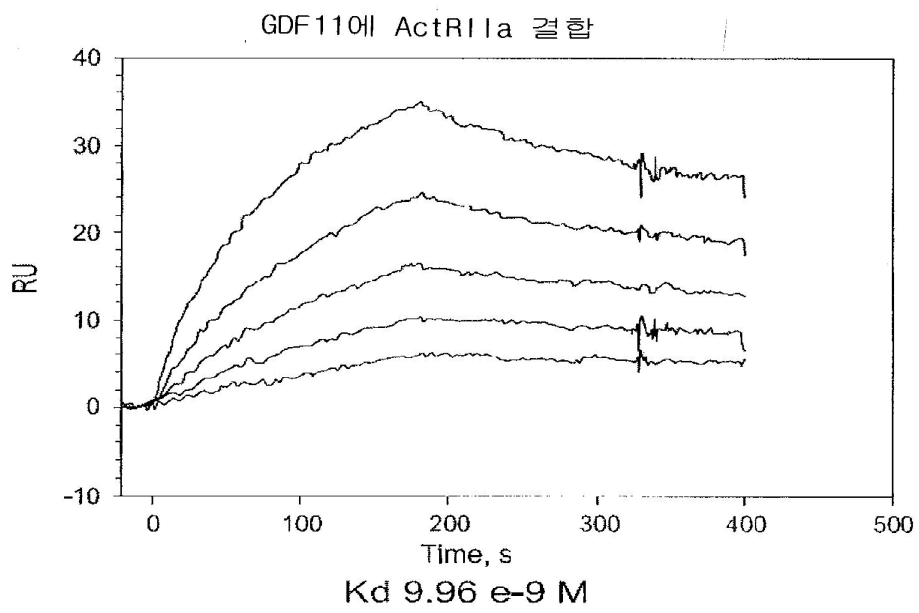
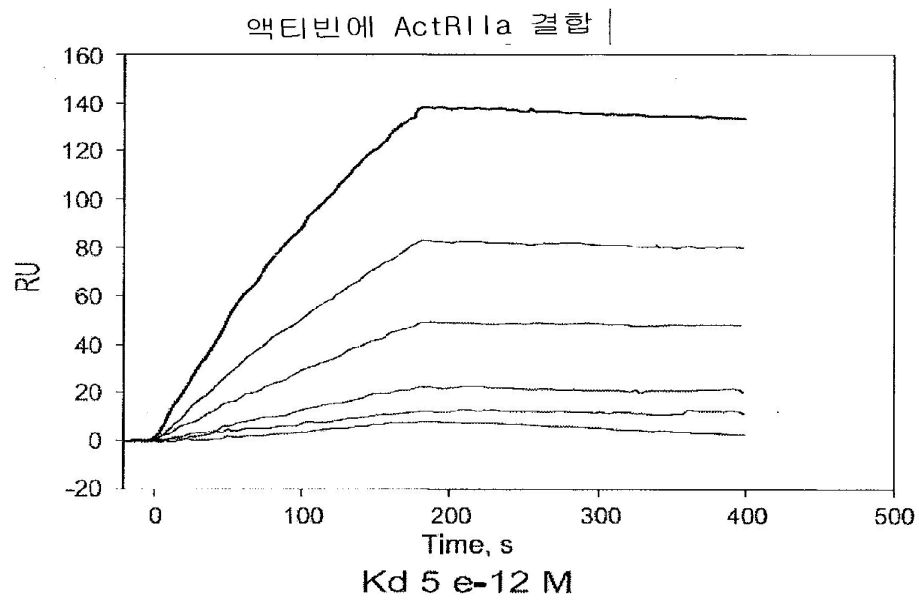
[0232] 요부(subject matter)의 특정 구체예가 논의되긴 했지만, 상기 명세서는 설명을 목적으로 하고, 본 발명을 한정하지 않는다. 본 명세서와 하기 특허청구범위를 검토한 이후, 다수의 개변은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 특허청구범위와 이의 균등한 범위, 그리고 명세서와 이의 개변에 기준하여 결정될 것이다.

도면

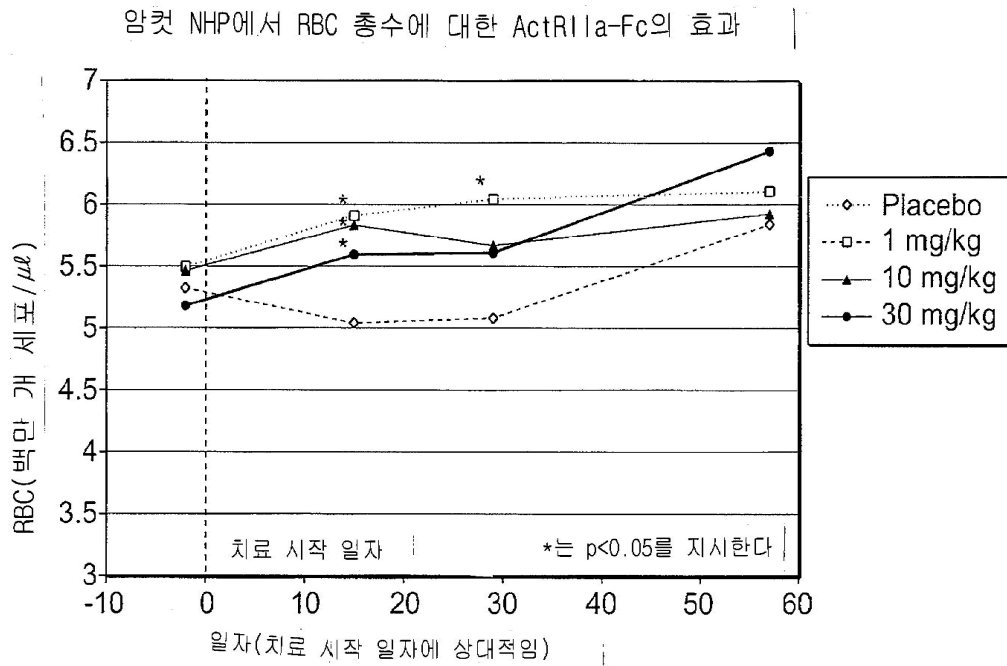
도면1



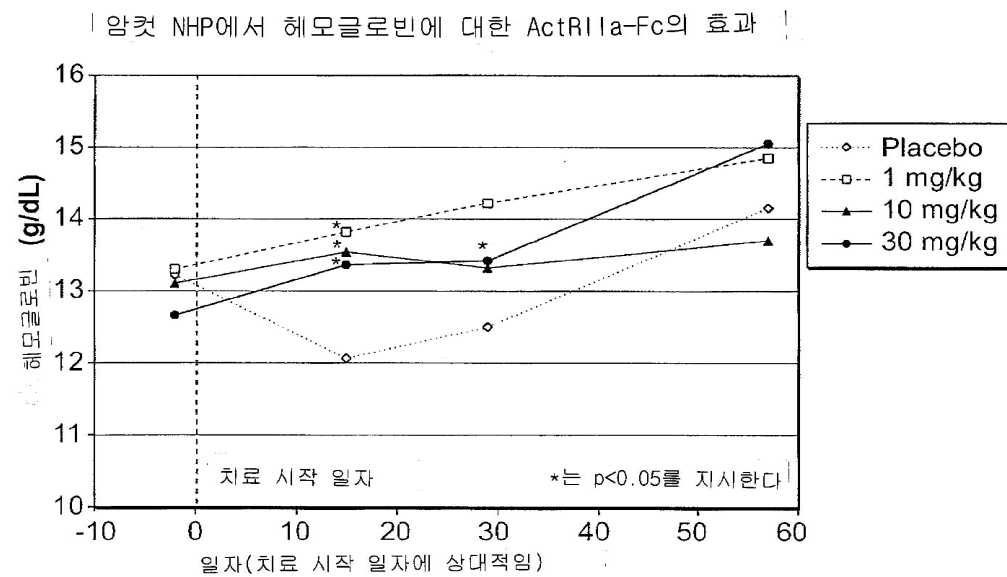
도면2



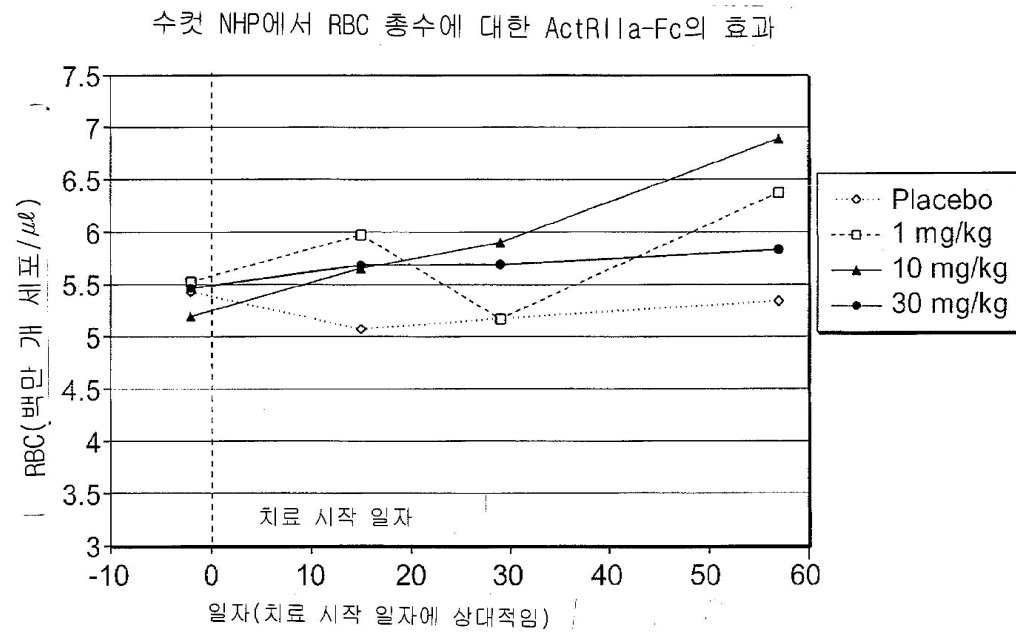
도면3a



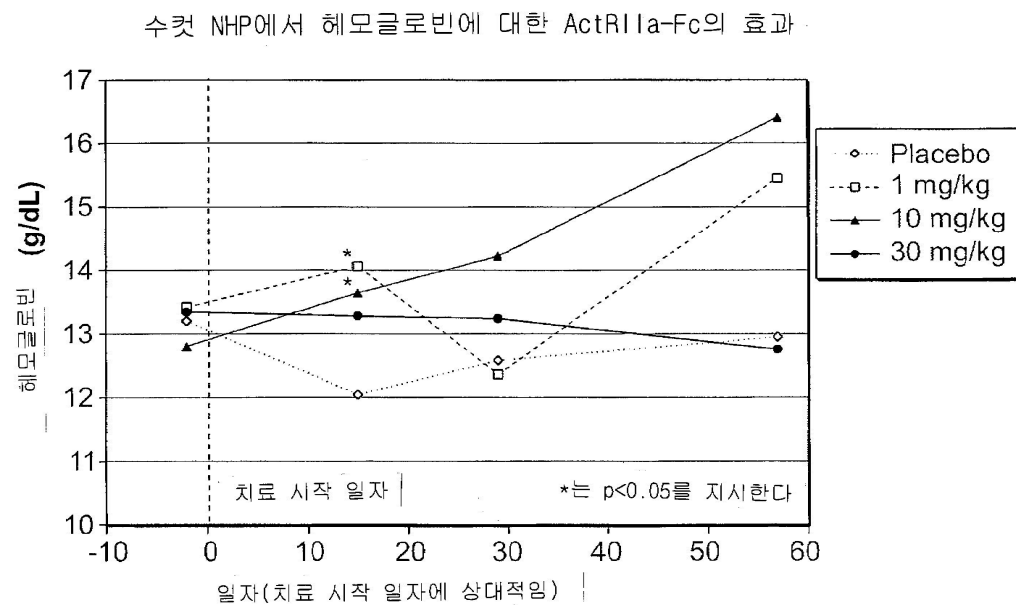
도면3b



도면4a

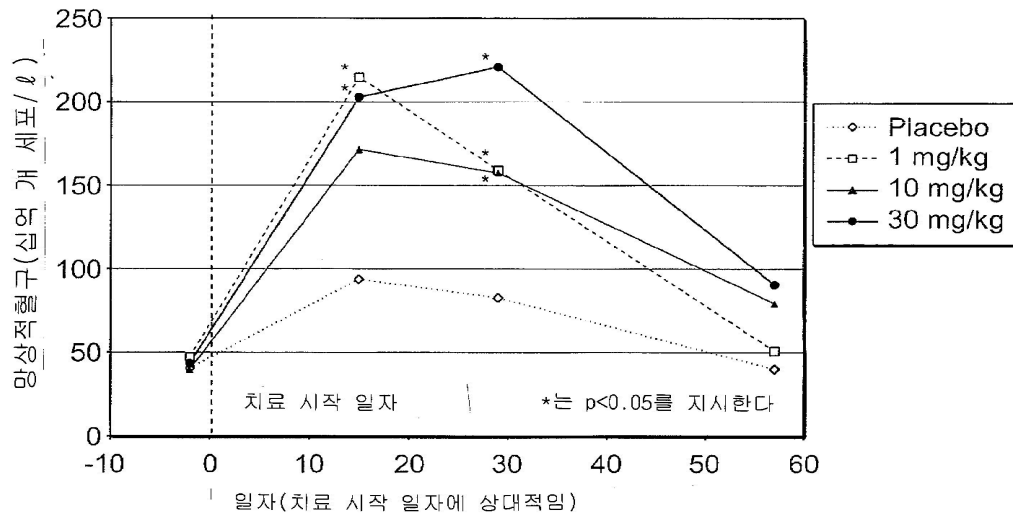


도면4b



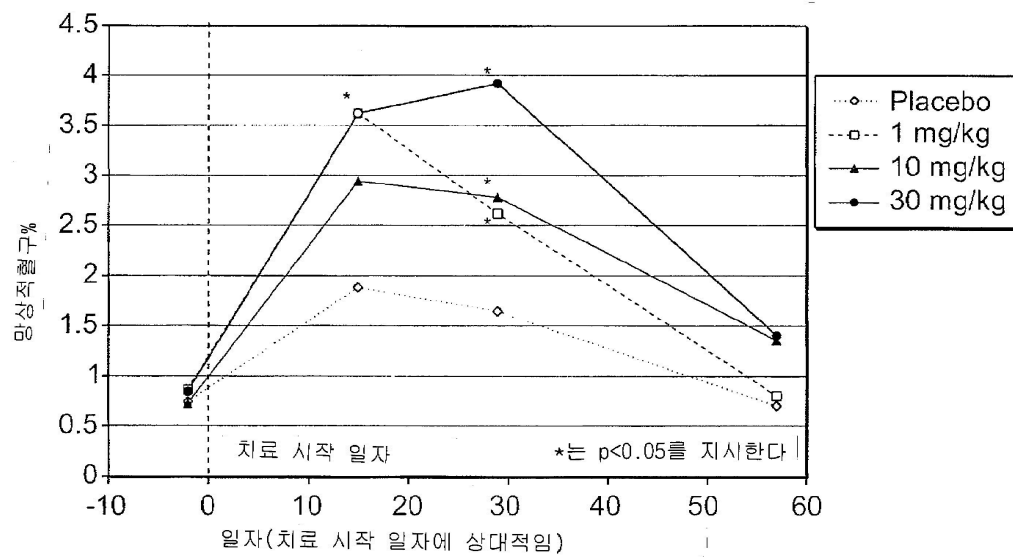
도면5a

암컷 NHP에서 망상적혈구 총수에 대한 ActRIIa-Fc의 효과

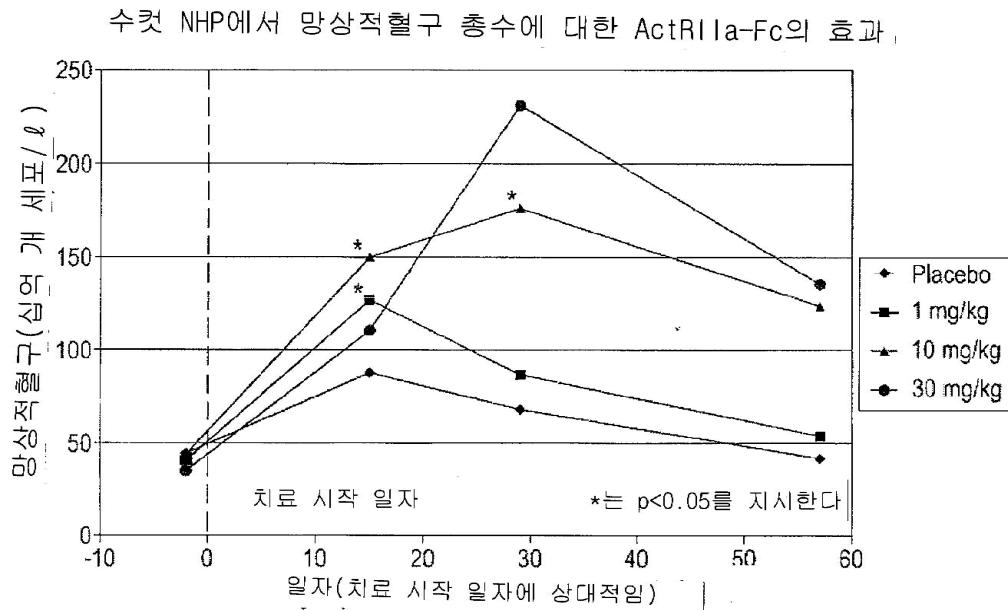


도면5b

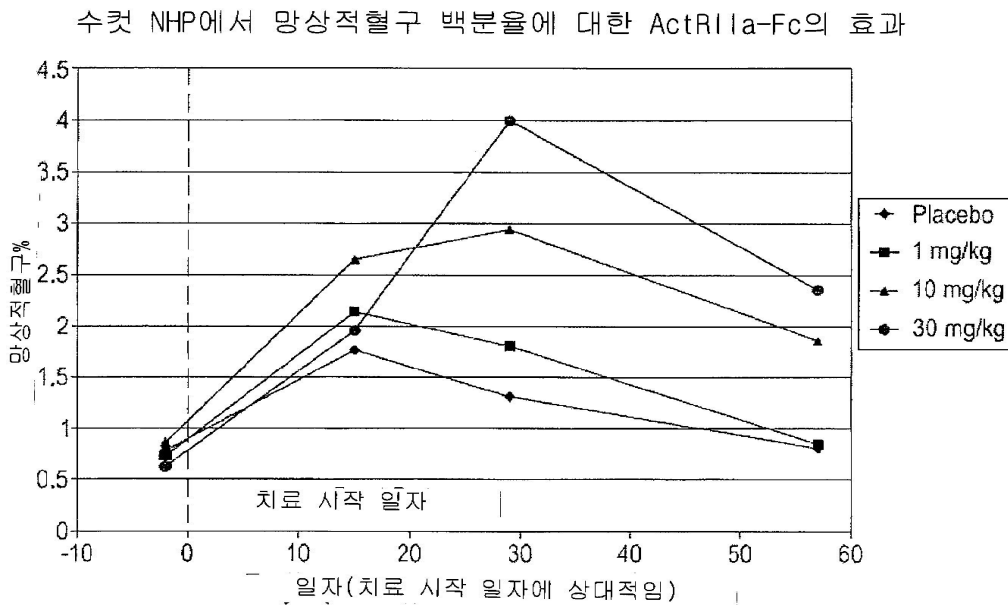
암컷 NHP에서 망상적혈구 백분율에 대한 ActRIIa-Fc의 효과



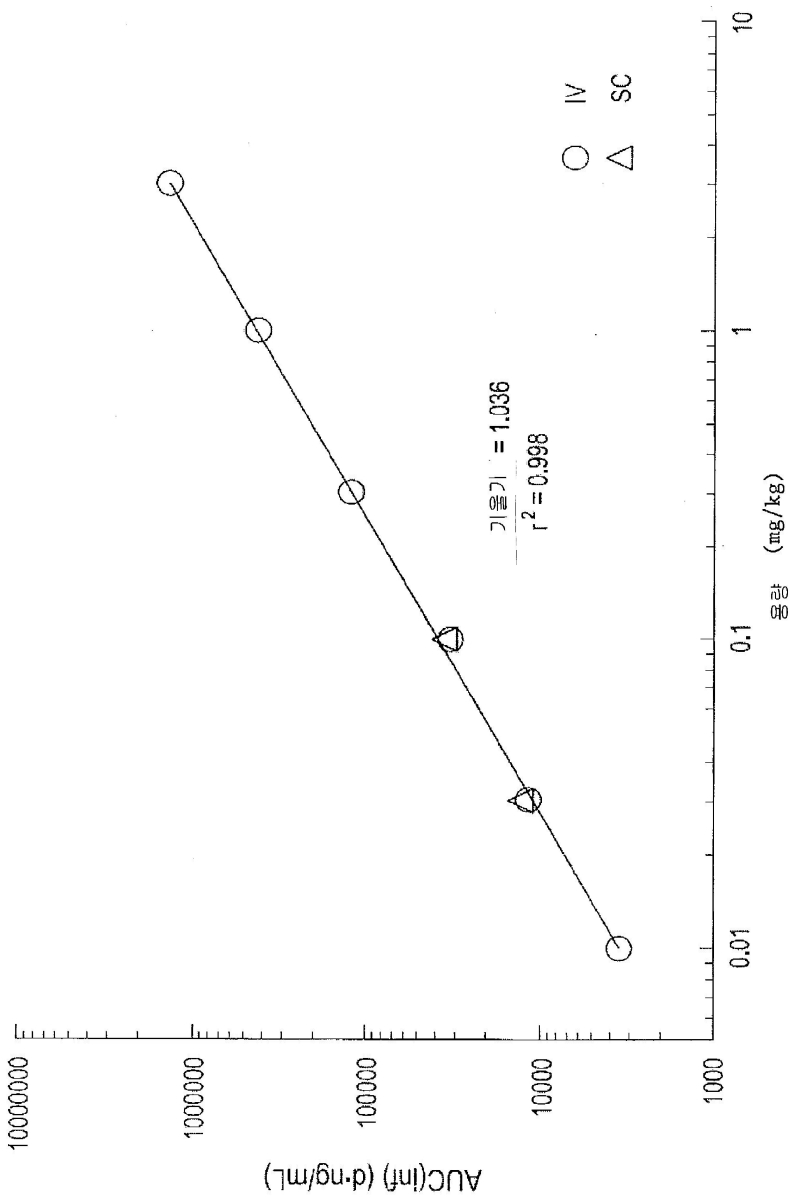
도면6a



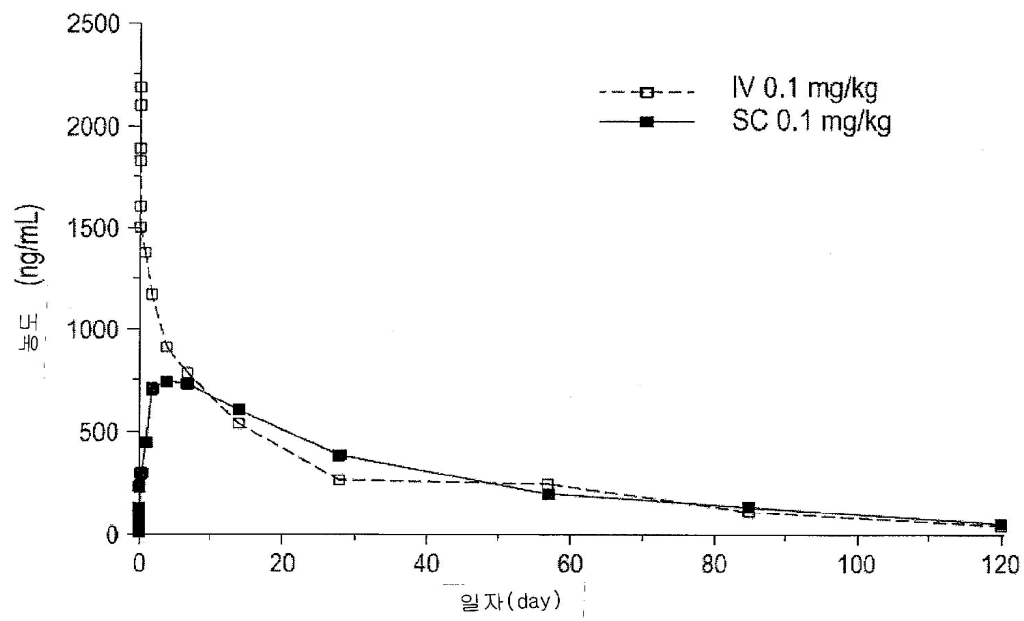
도면6b



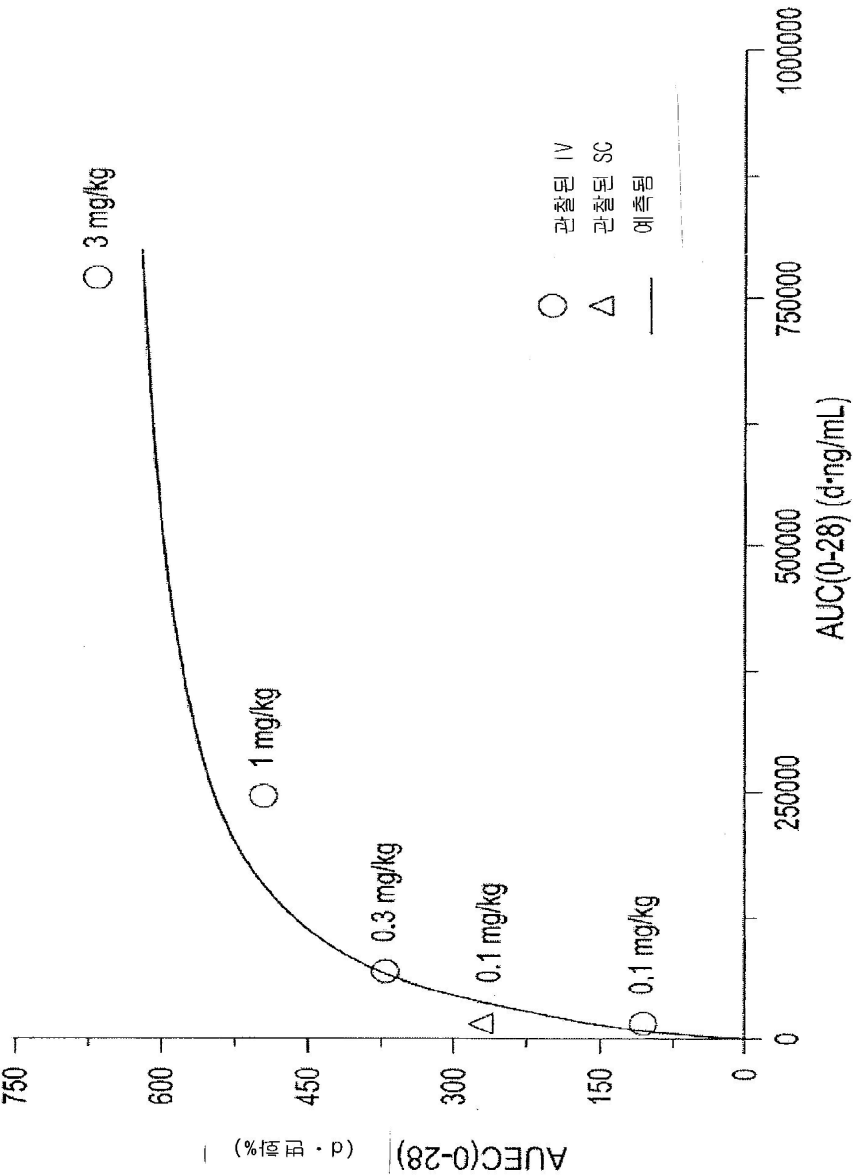
도면7



도면8

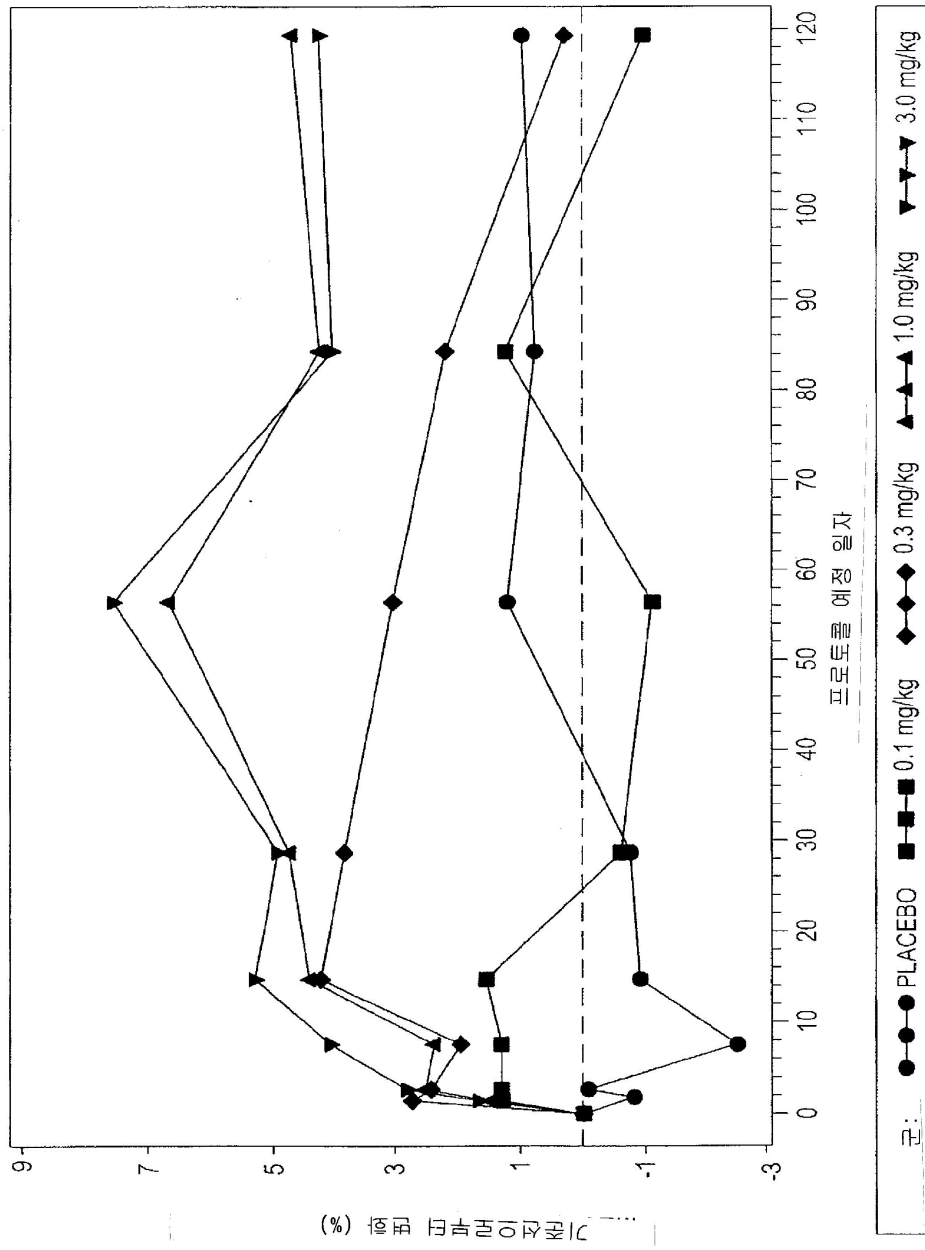


도면9



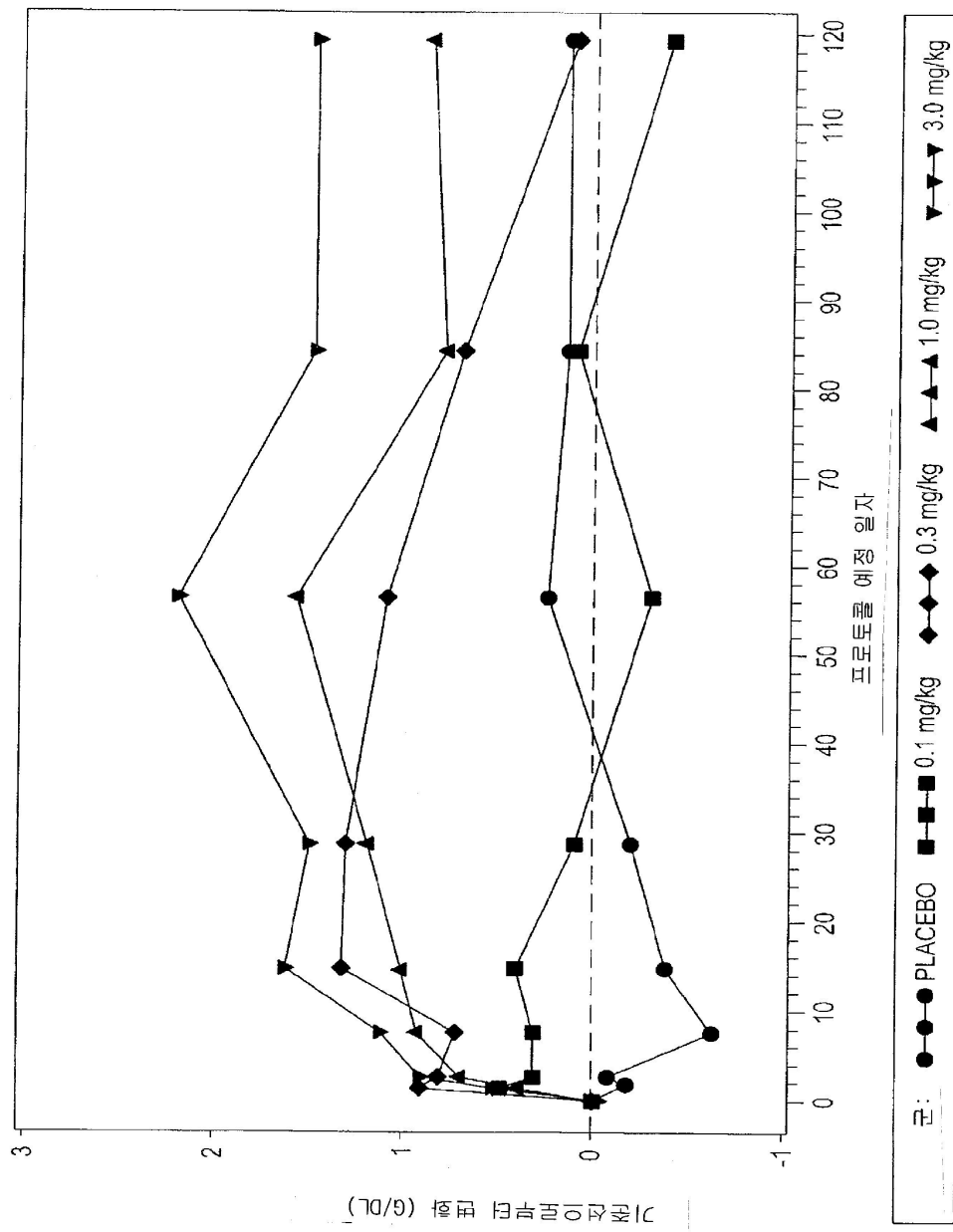
도면10

기준선 - 헤마토크릿으로부터 IV 변화 및 변화 범위

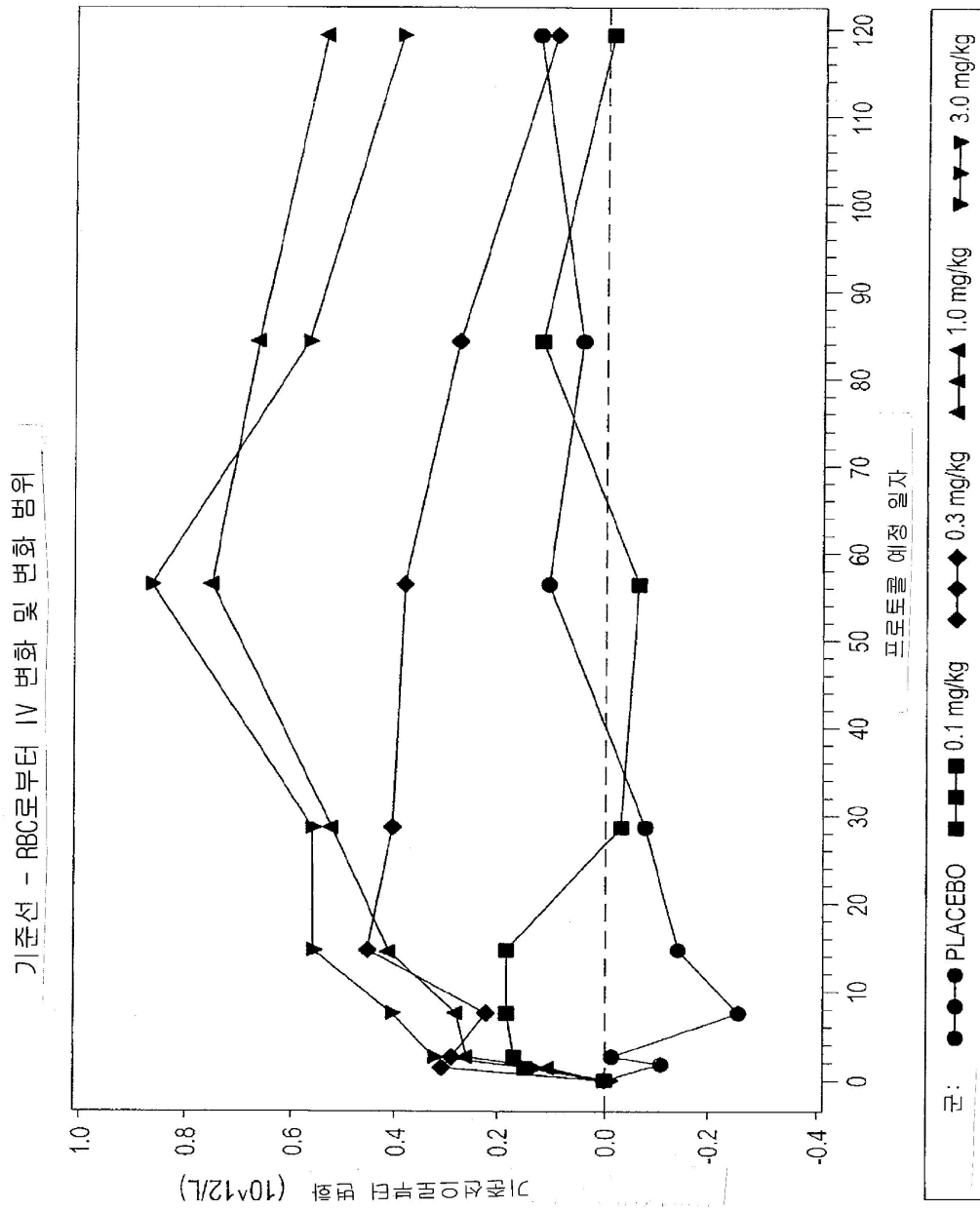


도면11

기준선 - 헤모글로빈으로부터 IV 변화 및 변화 범위

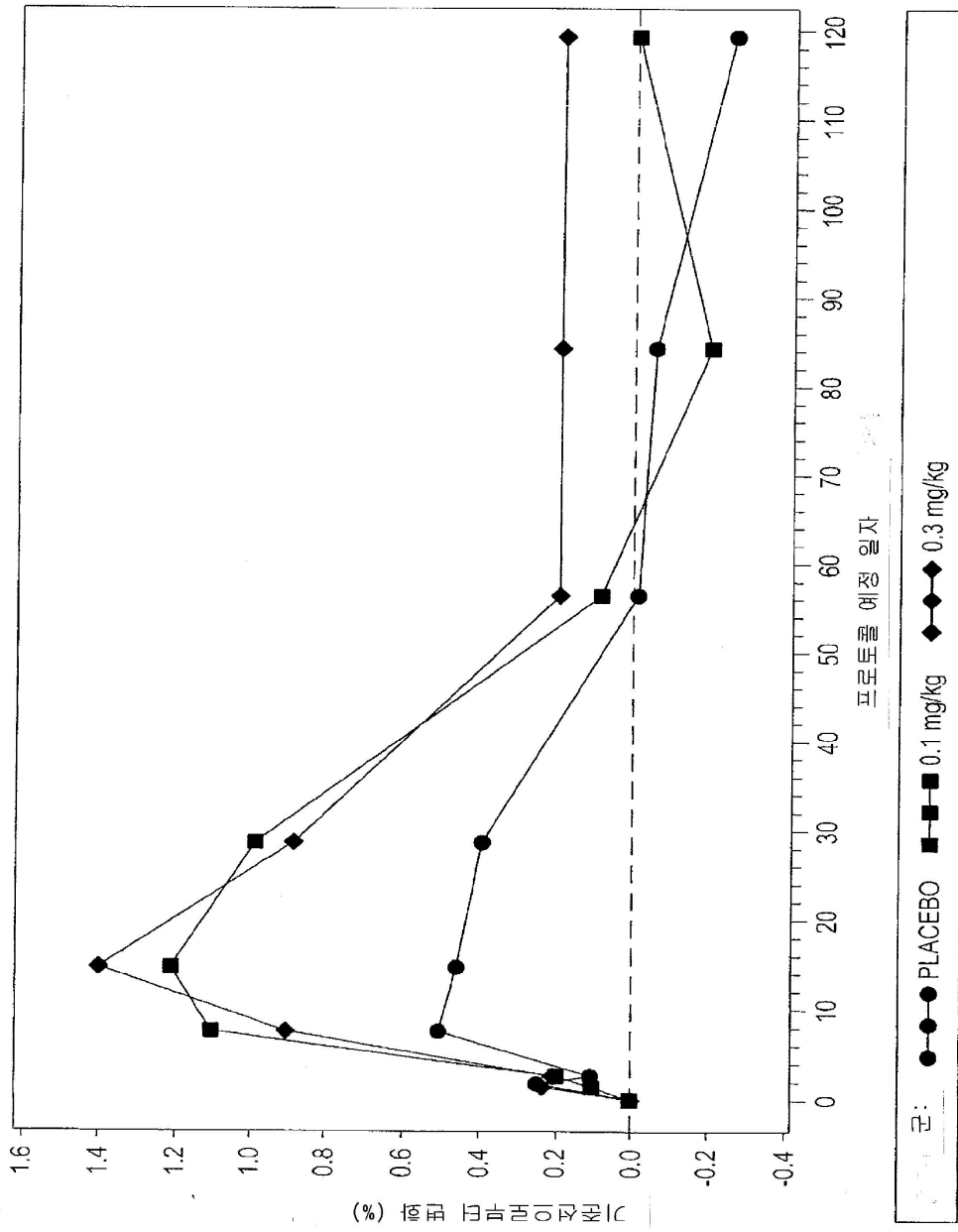


도면12



도면13

기준선 - 망상적혈구 총수(%)로부터 IV 변화 및 변화 범위

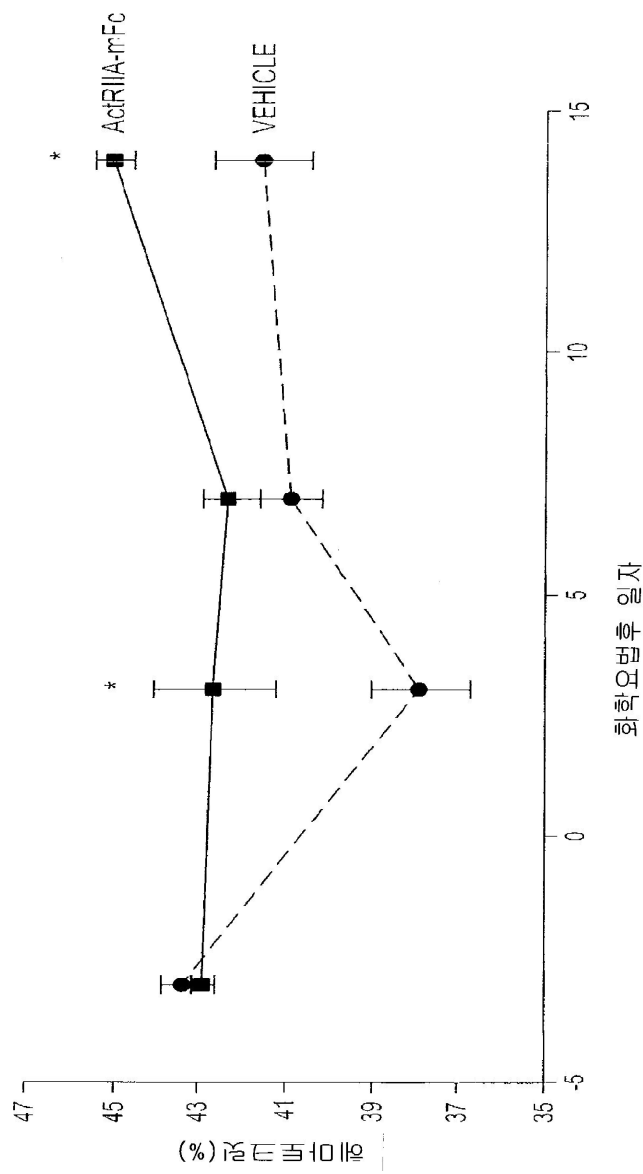


도면14

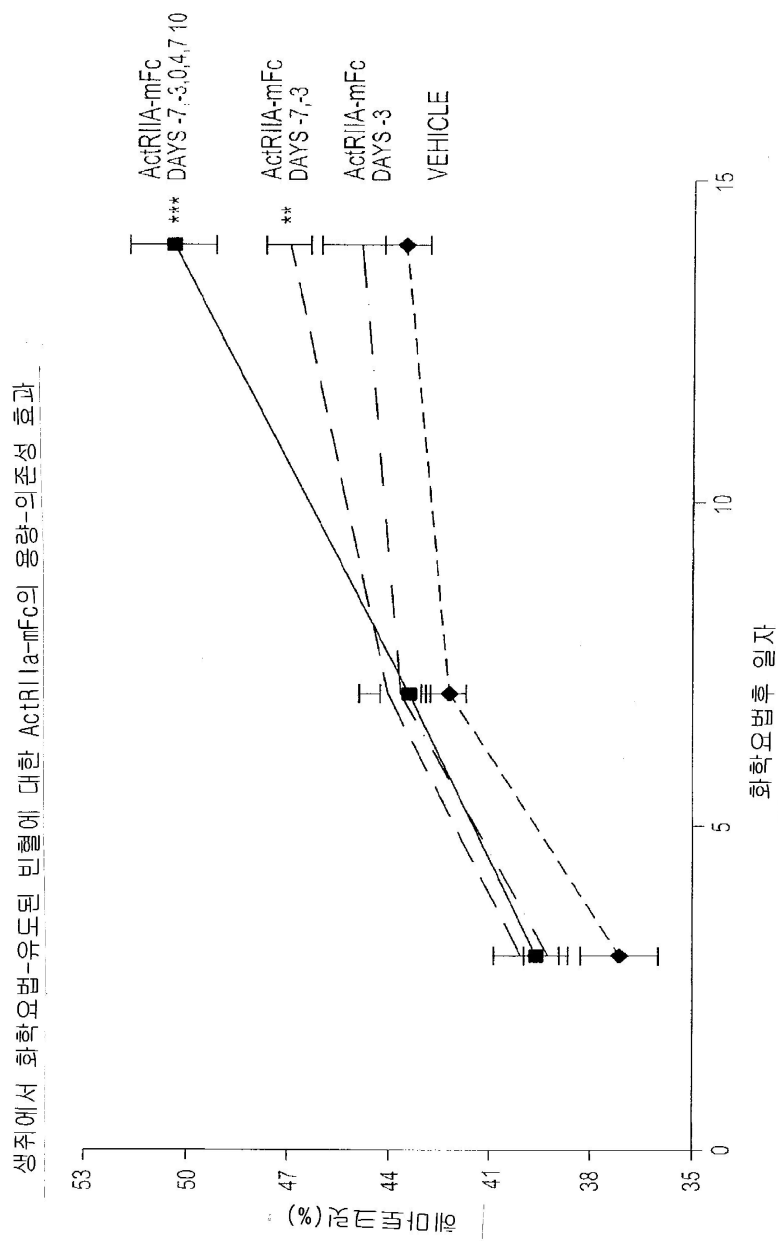
|         |            |            |            |            |         |            |          |      |        |
|---------|------------|------------|------------|------------|---------|------------|----------|------|--------|
| ActRIIa | ILGRSETQEC | LEFNANWEKD | RTNQTV     | EP         | YGD     | KDKR       | RHC      | FATQ | KNISGS |
| ActRIIb | GRGEAETREC | IYNANWELE  | RTNQSGIERC | EGEQDKRLHC | YASWRN  | SSGT       |          |      |        |
|         | IEIVKQGCWL | DDINCYCR   | TD         | CV         | KKDSPEV | YFCCCEGNMC | NEKFSYFP | PEM  |        |
|         | IELVKKGCWL | DDENCYDRQE | CVATEENPQV | YFCCCEGNFC | NERFTHL | PEA        |          |      |        |
|         | EVTQPTSNPV | TPKPPT     |            |            |         |            |          |      |        |
|         | GGPEVTYEPP | PTAPT      |            |            |         |            |          |      |        |

도면15

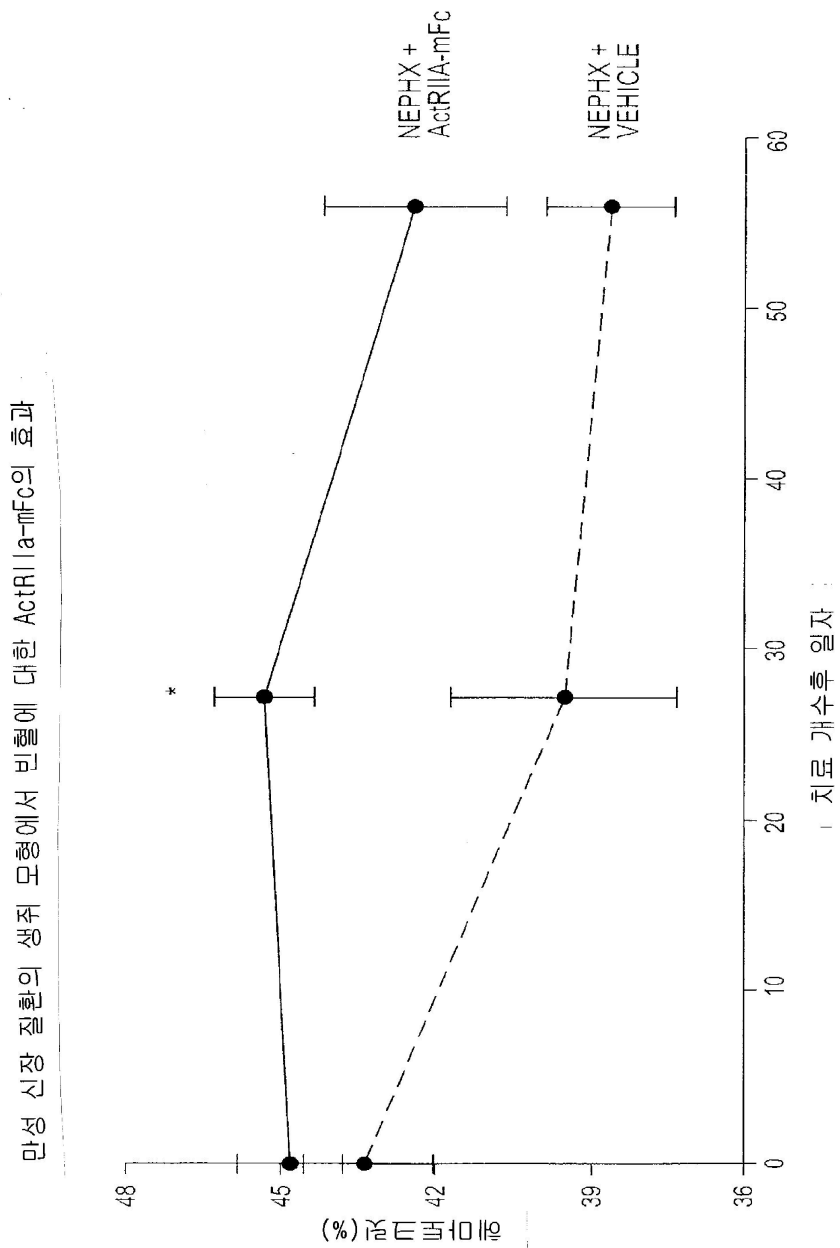
생쥐에서 화학요법-유도된 빈혈에 대한 ActRIIa-Fc의 효과



도면16



도면17



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

- <110> SHERMAN, MATTHEW L.  
BORGSTEIN, NIELS
- <120> METHODS FOR DOSING AN ACTIVIN-ACTRIIA ANTAGONIST AND MONITORING  
OF TREATED PATIENTS
- <130> PHPH-037-W01
- <140> PCT/US2009/003843
- <141> 2009-06-26

<150> 61/133,354

<151> 2008-06-26

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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> 4

<211> 1542

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60

atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120

agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180

tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 240

gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300

tatTTTTgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360

gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg 420

ctctattcct tggtagccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480  
 tacaggcatc acaagatggc ctacctcct gtacttgttc caactcaaga cccaggacca 540  
 cccccacctt ctccattact aggggtgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600  
 ggaagatttg gtigtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660

tttccaatac aggacaaaca gtcattggcaa aatgaatagc aagtctacag ttgacctgga 720  
 atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780  
 gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840  
 gctaattgtg tctcttggaa tgaactgtgt catattgcag aaacctggc tagaggattg 900  
 gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960  
 agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac 1020  
 tttaggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgataacca tggacaggtt 1080

ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140  
 gcatttttga ggatagatat gtatgccatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200  
 tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260  
 cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320  
 ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380  
 tgttgggac acgacgcaga agccagggtta tcagctggat gtgtaggatg aagaattacc 1440  
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500

gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga 1542

<210> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60  
 agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120  
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 180  
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240  
 tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300

gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacc 345

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD\_RES

<222> (43)..(43)

<223> Asp or Ala

<220><221> MOD\_RES

<222> (100)..(100)

<223> Lys or Ala

<220><221> MOD\_RES

<222> (212)..(212)

<223> Asn or Ala

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
                                  210                      215                      220

Lys

225

<210> 7

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

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> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis sp.

<400> 8

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> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: Tissue plasminogen activator leader  
sequence

<400> 9

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> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

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

<400> 10

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> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Thr Gln Glu

1 5

<210> 12

<211

> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

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> 13

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

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> 14

<211> 1114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60  
 tcgcccggcg ccgctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120

attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata 180  
 aacggcggca ttgttttgct acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240  
 aggttggttg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300  
 cagccctgaa gtatatcttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360  
 ttttcgggag atggaagtca cacagccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccac 420  
 cgggtggtgga actcacacat gccacccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480  
 agtcttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt 540

cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 600  
 ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660  
 gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720  
 caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agtcccacg gagaaaacca tctccaaagc 780  
 caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840  
 caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggttc tatcccagcg acatcgccgt 900

ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960

ctccgacggc tcctttcttc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020

ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080

gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatagaga attc 1114

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

Thr Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 17

<211> 343

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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 Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser Glu  
 305 310 315 320  
 Asp Thr Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe Pro  
 325 330 335  
 Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp

340

<210> 18

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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> 19           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 63           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> PRT          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> Homo sapiens |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 19           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 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> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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> 21

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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> 22

<211> 262

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

1 5 10 15

Leu Ala Trp Ala Val Gly Phe Val Ser Ser Met Gly Ser Gly Asn Pro

20 25 30

Ala Pro Gly Gly Val Cys Trp Leu Gln Gln Gly Gln Glu Ala Thr Cys

35 40 45

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

50 55 60

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

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

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 23

His His His His His His

1 5

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Pro Pro Thr

115

<210> 25

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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                                                             |     |     |    |