



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0040972
 (43) 공개일자 2019년04월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) *A61K 31/155* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 7/00* (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01) *C07K 14/71* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/155 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7005397
- (22) 출원일자(국제) 2017년07월26일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년02월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/043967
- (87) 국제공개번호 WO 2018/022762
 국제공개일자 2018년02월01일
- (30) 우선권주장
 62/367,289 2016년07월27일 미국(US)

- (71) 출원인
악셀레론 파마 인코포레이티드
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 128
- (72) 발명자
쿠마르 라빈드라
 미국 01720 매사추세츠주, 액톤, 알링턴 스트리트 421
벤카타 사이 라자세카르 수라가니 나가
 미국, 02093 매사추세츠주, 렌섬, 블랙 버치 드라이브 85
- (74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 114 항

(54) 발명의 명칭 **골수염증 치료 방법 및 조성물**

(57) 요약

부분적으로, 본 명세서는 골수염증 또는 하나 또는 그 이상의 골수염증의 합병증 (수외조혈, 비장비대증, 빈혈, 및 섬유증)의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법에 관계한다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 환자에서 Janus 키나제 억제제 요법과 연합된 하나 또는 그 이상의 합병증 (가령, 빈혈)의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용되는 ActRIIB 길항제를 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/17 (2013.01)

A61K 38/179 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

A61P 7/00 (2018.01)

A61P 7/06 (2018.01)

C07K 14/71 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

필요로 하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법.

청구항 2

필요로 하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법.

청구항 3

필요로 하는 환자에게: a) Janus 키나제 억제제; 그리고 b) ActRIIB 길항제, 이때 Janus 키나제 억제제 및 ActRIIB 길항제는 효과량으로 투여하는 것을 포함하는, 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법.

청구항 4

청구항 2 또는 3에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증은 비효과적인 조혈, 빈혈, 염증, 섬유증 (가령, 골수 섬유증, 비장 섬유증, 및 간 섬유증), 범혈구감소증, 혈소판감소증, 수외조혈 (가령, 비장성 수외조혈, 간의 수외조혈, 폐의 수외조혈, 및 림프의 수외조혈), 간비대, 비장비대증, 변형적 혈구증가증, 피로, 체중 감소, 식은땀, 열, 소양증, 뼈통증, 조기 포만감, 복부 통증 또는 불편함, 관절통, 근육통, 감각이상, 악액질, 비장성 증색증, 골경화증, 골골수섬유증, 및 출혈로 구성된 군에서 선택되는, 방법.

청구항 5

청구항 1-4중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 하나 또는 그 이상의 골수 섬유증, 비장 섬유증, 간 섬유증, 폐 섬유증, 및 림프절 섬유증을 감소시키는, 방법.

청구항 6

청구항 1-5중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 비장비대증을 감소시키는, 방법.

청구항 7

청구항 1-6중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 간비대를 감소시키는 방법.

청구항 8

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 비장, 간, 폐, 림프절, 및 골수로 구성된 군에서 선택된 장기/조직에서 염증을 감소시키는, 방법.

청구항 9

청구항 1-8중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 비장, 간, 폐, 림프절, 및 골수로 구성된 군에서 선택된 장기/조직의 크기 및/또는 중량을 감소시키는, 방법.

청구항 10

청구항 1-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 수외조혈(extramedullary hematopoiesis)을 감소시키는, 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 이때 상기 방법은 비장 (비장성 수외조혈), 간 (간의 수외조혈), 폐 (폐의 수외조혈), 및 림프 (림프의 수외조혈)로 구성된 군에서 선택된 장기 또는 조직에서 수외조혈을 감소시키는 방법.

청구항 12

청구항 1-11중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 상기 환자에서 적혈구 수준을 증가시키는, 방법.

청구항 13

청구항 1-12중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 상기 환자에서 헤모글로빈 수준을 증가시키는, 방법.

청구항 14

청구항 1-13중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 빈혈을 가지고 있는, 방법

청구항 15

청구항 14에 있어서, 이때 상기 방법은 이 빈혈을 치료하는, 방법

청구항 16

청구항 1-15중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에게 ActRIIB 길항제 치료에 앞서, 하나 또는 그 이상의 적혈구 수혈을 받았던, 방법.

청구항 17

청구항 1-16중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 혈액 세포 수혈-의존적인, 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 이때 상기 방법은 혈액 세포 수혈 부하를 감소시키는, 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 이때 상기 방법은 상기 ActRIIB 길항제 치료를 시작하기 전 동등한 시간에 비례하여 4 내지 8주 동안 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 이상 혈액 세포 수혈을 감소시키는, 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 이때 상기 방법은 상기 ActRIIB 길항제 치료를 시작하기 전 동등한 시간에 비례하여 4 내지 8주 동안 약 50% 이상 혈액 세포 수혈을 감소시키는, 방법.

청구항 21

청구항 1-20중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 철분 과다를 감소시키는, 방법.

청구항 22

청구항 16에 있어서, 이때 상기 방법은 간, 비장, 및 심장으로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 장기/조직에 있는 철 함량을 감소시키는, 방법.

청구항 23

청구항 1-22중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 원발성(primary) 골수섬유증을 가지고 있는, 방법.

청구항 24

청구항 1-22중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 포스트-진성다혈구증 골수섬유증을 가지고 있는 방법.

청구항 25

청구항 1-22중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 포스트-본태성 혈소판증가증 골수섬유증을 가지고 있는, 방법.

청구항 26

청구항 1-25중 임의의 한 항에 있어서, 이때 국제 예후 등급 체계 (IPSS)에 따르면, 상기 환자는 저위험, 중간-1 위험, 중간-2 위험, 또는 고-위험 골수섬유증을 가지고 있는, 방법.

청구항 27

청구항 1-25중 임의의 한 항에 있어서, 이때 역학적 IPSS (DIPSS)에 따르면, 상기 환자는 저-위험, 중간-1 위험, 중간-2 위험, 또는 고-위험 골수섬유증을 가지고 있는, 방법.

청구항 28

청구항 1-25중 임의의 한 항에 있어서, 이때 DIPSS-플러스에 따르면, 상기 환자는 저-위험, 중간-1 위험, 중간-2 위험, 또는 고-위험 골수섬유증을 가지고 있는, 방법.

청구항 29

청구항 26-28중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 골수섬유증 위험 진행이 저-위험에서 중간-1 위험으로, 중간-1 위험에서 중간-2 위험으로, 또는 중간-2 위험에서 고-위험 골수섬유증으로의 진행을 방지 또는 지연시키는 방법.

청구항 30

청구항 26-28중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 골수섬유증 위험을 고 위험에서 중간-2 위험으로, 중간-2 위험에서 중간-1 위험으로, 또는 중간-1 위험에서 저-위험 골수섬유증으로의 퇴행을 촉진 또는 증가시키는 방법.

청구항 31

청구항 1-30중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 골수섬유증은 JAK2 46/1 일배체형의 무접합형 (nullizygoty), JAK2V617F, IDH1, IDH2, EZH2, SRSF2, ASXL1, JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, MPL, CALR, CALR+ASXL1-, CALR-ASKL1+, CALR+ASKL1+, CALR-ASKL1-, TET2, THPO, 및 LNK로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 유전자에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이와 연합된 방법.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 이때 상기 골수섬유증은 JAK2에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이와 연합된, 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 이때 상기 JAK2 돌연변이는 JAK2V617F인, 방법.

청구항 34

청구항 1-31중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 골수섬유증은 증가된 혈청 IL-8 수준, 증가된 혈청 IL-2R 수준, 및 증가된 유리(free) 경쇄 수준으로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 상승된 혈청 표지와 연합된, 방법.

청구항 35

청구항 1-3 및 5-34중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 Janus 키나제 억제제로 치료를 받았던, 방법.

청구항 36

청구항 1-3 및 5-35중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 비내성 of Janus 키나제 억제제에 불내성인 방법.

청구항 37

청구항 1-3 및 5-36중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 Janus 키나제 억제제에 대하여 부적절한 반응을 갖는, 방법.

청구항 38

청구항 4 또는 35-37중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제 치료에 앞서 투여되는, 방법.

청구항 39

청구항 4 또는 35-37중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제 치료 후 투여되는, 방법.

청구항 40

청구항 4 또는 35-37중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제 치료와 동시에 앞서 투여되는, 방법.

청구항 41

청구항 4 및 35-40중 임의의 한 항에 있어서, 이때 Janus 키나제 억제제는 JAK1, JAK2, 및 JAK3로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 Janus 키나제를 억제하는, 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 이때 Janus 키나제 억제제는 세포-기반 분석에서 하나 또는 그 이상의 JAK1, JAK2, 및 JAK3의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 43

청구항 35-42중 임의의 한 항에 있어서, 이때 Janus 키나제 억제제는 루쏘리티니브, 페드라티니브 (SAR302503), 모노에로티니브 (CYT387), 파크리티니브, 레스타우르티니브, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019, 및 AT-9283로 구성된 군에서 선택되는, 방법.

청구항 44

청구항 43, 이때 Janus 키나제 억제제는 루쏘리티니브인, 방법.

청구항 45

청구항 1-44중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질을 더 투여받는, 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질은 수혈 (전체 혈액 또는 적혈구 투입), 철 킬레이트 (가령, 데훼록사민, 데훼리프론 및 데훼라시룩스), 코르티코스테로이드, 프레디니손, ESAs (가령, 에리트로포에틴, 에포에틴 알파, 에포에틴 베타, 다르베포에틴 알파, 및 메톡시 폴리에틸렌 글리콜-에포에틴 베타), 안드로겐, 다나졸, 탈리도미드, 레날리도미드, 세포환원물질, 히드록시우레아, 부술판, 멜팔름, 클라드리빈, 췌장절제술, 방사선요법, 아스피린, 포말리돈미드, mTOR 억제제 (가령, 라파마이신, 시롤리무스, 테포로리무스, 에베로리무스, tem시롤리무스, NVP-BEZ235, BGT226, SF1126, PK1-587, INK128, AZD8055, 및 AZD2014), 및 히스톤 탈아세틸라제 억제제 (가령, 기비노스타트, 파노비노스타트, 및 프라시노스타트)로 구성된 군에서 선택되는, 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 이때 상기 환자는 히드록시우레아를 더 투여받거나 또는 이미 히드록시우레아로 치료를 받은, 방법.

청구항 48

청구항 1-45 및 47중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 히드록시우레아에 비내성이거나, 또는 히드록시

우레아에 대하여 부적절한 반응을 갖는, 방법.

청구항 49

효과량의 ActRIIB 길항제를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것으로 구성된, Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에게서 적혈구 수준 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시키는 방법.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 이때 상기 환자는 빈혈을 가지고 있는 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 이때 상기 방법은 이 빈혈을 치료하는, 방법

청구항 52

효과량의 ActRIIB 길항제를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것으로 구성된, Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에게서 빈혈을 치료하는 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 이때 상기 방법은 상기 환자에서 적혈구 세포 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시키는, 방법.

청구항 54

청구항 49-53중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에게 ActRIIB 길항제 치료에 앞서, 하나 또는 그 이상의 적혈구 수혈을 받았던, 방법.

청구항 55

청구항 49-54중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환자는 혈액 세포 수혈-의존적인, 방법.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 이때 상기 방법은 혈액 세포 수혈 부하를 감소시키는, 방법.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 이때 상기 방법은 상기 ActRIIB 길항제 치료를 시작하기 전 동등한 시간에 비례하여 4 내지 8주 동안 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 이상 혈액 세포 수혈을 감소시키는, 방법.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 이때 상기 방법은 상기 ActRIIB 길항제 치료를 시작하기 전 동등한 시간에 비례하여 4 내지 8주 동안 약 50% 이상 혈액 세포 수혈을 감소시키는, 방법.

청구항 59

청구항 49-58중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 방법은 철분 과다를 감소시키는, 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 이때 상기 방법은 간, 비장, 및 심장으로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 장기/조직에 있는 철 함량을 감소시키는, 방법.

청구항 61

청구항 49-60중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제 치료에 앞서 투여되는, 방법.

청구항 62

청구항 49-61중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제 치료 후 투여되는, 방법.

청구항 63

청구항 49-61중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제 치료와 동시에 앞서 투여되는, 방법.

청구항 64

청구항 49-63중 임의의 한 항에 있어서, 이때 Janus 키나제 억제제는 JAK1, JAK2, 및 JAK3로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 Janus 키나제를 억제하는, 방법.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 이때 Janus 키나제 억제제는 세포-기반 분석에서 하나 또는 그 이상의 JAK1, JAK2, 및 JAK3의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 66

청구항 49-63중 임의의 한 항에 있어서, 이때 Janus 키나제 억제제는 루쏘리티니브, 페드라티니브 (SAR302503), 모노에로티니브 (CYT387), 파크리티니브, 레스타우르티니브, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019, 및 AT-9283로 구성된 군에서 선택되는, 방법.

청구항 67

청구항 66에 있어서, 이때 Janus 키나제 억제제는 루쏘리티니브인, 방법.

청구항 68

청구항 1-67중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 ActRIIB 폴리펩티드인, 방법.

청구항 69

청구항 68에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 다음으로 구성된 군에서 선택되는, 방법:

- a) 서열 번호: 1의 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나에 상응하는 잔기에서 출발하고, 서열 번호: 1의 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나에 상응하는 잔기에서 종료하는 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- b) 서열 번호: 1의 아미노산 29-109에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- c) 서열 번호: 1의 아미노산 25-131에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- d) 서열 번호: 2의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- e) 서열 번호: 3의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- f) 서열 번호: 4의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- g) 서열 번호: 5의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

h) 서열 번호: 6의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

i) 서열 번호: 30의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 그리고

j) 서열 번호: 54의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 위치 79에 상응하는 아미노산 위치에 산성 아미노산을 포함하는, 방법.

청구항 71

청구항 70에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 위치 79에 상응하는 아미노산 위치에 D를 포함하는, 방법.

청구항 72

청구항 70에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 위치 79에 상응하는 아미노산 위치에 E를 포함하는, 방법.

청구항 73

청구항 68-72중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 면역글로블린 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질인, 방법.

청구항 74

청구항 73에 있어서, 이때 상기 면역글로블린 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인으로부터 기인된, 방법.

청구항 75

청구항 74에 있어서, 이때 상기 면역글로블린 Fc 도메인은 서열 번호: 9-13중 임의의 하나에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 76

청구항 73-75중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 융합 단백질은 상기 ActRIIB 도메인과 상기 면역글로블린 Fc 도메인 사이에 위치한 링커 도메인을 더 포함하는, 방법.

청구항 77

청구항 76에 있어서, 이때 상기 링커 도메인은 서열 번호: 14-20중 임의의 하나에 상응하는 아미노산 서열인, 방법.

청구항 78

청구항 73에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 다음으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질인, 방법:

a) 서열 번호: 24의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

b) 서열 번호: 25의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

c) 서열 번호: 28의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

d) 서열 번호: 29의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

e) 서열 번호: 31의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

f) 서열 번호: 45의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

g) 서열 번호: 50의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

h) 서열 번호: 50의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 그리고

i) 서열 번호: 50의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 79

청구항 78에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 위치 79에 상응하는 아미노산 위치에 산성 아미노산을 포함하는, 방법.

청구항 80

청구항 79에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 위치 79에 상응하는 아미노산 위치에 D를 포함하는, 방법.

청구항 81

청구항 79에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 위치 79에 상응하는 아미노산 위치에 E를 포함하는, 방법.

청구항 82

청구항 68-81중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 당화된 아미노산, 폐결화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 바이오티닐화된 아미노산, 그리고 지질 모이어티에 접합된 아미노산에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 83

청구항 82에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 당화되며, 포유류 당화 패턴을 보유하는, 방법.

청구항 84

청구항 83에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 당화되며, 중국 햄스터 난소 세포주로부터 획득가능한 당화 패턴을 보유하는, 방법.

청구항 85

청구항 68-84중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10으로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 리간드에 결합하는, 방법.

청구항 86

청구항 85에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 액티빈 A에 결합하는, 방법.

청구항 87

청구항 85 또는 86에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 액티빈 B에 결합하는, 방법.

청구항 88

청구항 68-68중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10으로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 리간드의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 89

청구항 88에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 액티빈 A 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 90

청구항 88 또는 89에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 액티빈 B 신호생성의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 91

청구항 88-90중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 폴리펩티드는 세포-기반 분석에서 상기 하나 또는 그 이상의 리간드의 신호생성을 억제하는, 방법

청구항 92

청구항 1-67중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 항체 또는 항체의 조합인, 방법.

청구항 93

청구항 92에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10중 하나 또는 그 이상에 결합하는 항체 또는 항체의 조합인, 방법.

청구항 94

청구항 93에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체의 조합은 적어도 액티빈 A에 결합하는, 방법.

청구항 95

청구항 93 또는 94에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체의 조합은 적어도 액티빈 B에 결합하는, 방법.

청구항 96

청구항 92-95중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 97

청구항 96에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체의 조합은 세포-기반 분석에서 상기 하나 또는 그 이상의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 98

청구항 92에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10에 결합하는 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체의 조합인, 방법.

청구항 99

청구항 98에 있어서, 이때 상기 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체의 조합은 하나 또는 그 이상의 ActRIIB, GDF11, GDF8, 액티빈 A, 액티빈 B, BMP6, 및 BMP10의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 100

청구항 99에 있어서, 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체의 조합은 세포-기반 분석에서 상기 하나 또는 그 이상의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 101

청구항 92-100중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 항체는 재조합 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 또는 인간 항체인, 방법.

청구항 102

청구항 92-101중 임의의 한 항에 있어서, 이때 항체는 단일-쇄 항체, F(ab')₂ 단편, 단일-쇄 디아바디, 병렬 단일-쇄 Fv 단편, 병렬 단일-쇄 디아바디, 또는 단일-쇄 디아바디와 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 최소 일부분을 포함하는 융합 단백질인, 방법.

청구항 103

청구항 1-67중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 하나 또는 그 이상의 : ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10의 소분자 억제제인, 방법.

청구항 104

청구항 103에 있어서, 이때 상기 소분자 억제제는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 105

청구항 1-67중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10의 핵산 억제제인, 방법.

청구항 106

청구항 105에 있어서, 이때 상기 핵산 억제제는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10의 신호생성을 억제하는, 방법.

청구항 107

청구항 1-67중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 폴리스테틴 폴리펩티드인, 방법.

청구항 108

청구항 107에 있어서, 이때 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 63의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 109

청구항 107에 있어서, 이때 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 64의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 110

청구항 107에 있어서, 이때 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 65의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 111

청구항 107에 있어서, 이때 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 66의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 112

청구항 107에 있어서, 이때 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 67의 아미노산 서열에 대하여 적어도

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 113

청구항 1-67중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 ActRIIB 길항제는 FLRG 폴리펩티드인, 방법.

청구항 114

청구항 113에 있어서, 이때 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 68의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원들에 대한 상호-참조**

[0002] 본 출원은 2016년 7월 27일자로 제출된 미국 가출원 일련번호 62/367,289에 대한 우선권을 주장한다. 전술한 출원의 명세서에는 본 출원에 전문이 포함된다.

배경 기술

[0003] **발명의 배경**

[0004] 골수섬유증은 주로 나이가 많은 사람들에게 영향을 미치는 희귀병이다. 골수섬유증은 신생(1 차) 또는 진성 다혈구증 (포스트-진성다혈구증) 또는 본 태성 혈소판 증 (포스트-본태성 혈소판증가증)으로 나타날 수 있는 BCR-ABL1 음성 골수증식성 신생물이다. 임상 특징으로는 진행성 빈혈, 현저한 비장비대증, 섬유증 (예: 골수 섬유증), 진신 증상(constitutional symptoms) (예: 피로, 식은땀, 뼈통증, 가려움증, 및 기침) 그리고 체중 감소[Tefferi A (2000) N Engl J Med 342:1255-1265]가 포함된다. 정중 생존율은 현재 확인된 예후 인자에 근거하여, 2 년 미만에서 15 년 이상이다. 골수섬유증 환자에게서 JAK2, MPL, TET2, ASXL1, IDH1/IDH2, CBL, IKZF1, LNK, 및 EZH2와 관련된 돌연변이가 기술되었다[James C et al. (2005) Nature 434:1144-1148, 2005; Scott L M et al. (2007) N Engl J Med 356:459-468, 2007; Pikman Y et al. (2006) PLoS Med 3:e270; Delhommeau F et al. (2009) N Engl J Med 360:2289-2301; Carbuccia N et al. (2009) Leukemia 23:2183-2186; Green A et al. (2010) N Engl J Med 362:369-370; Tefferi A et al. (2010) Leukemia 24:1302-1309; Grand F H et al. (2009) Blood 113:6182-6192; Jager R et al. (2010) Leukemia 24:1290-1298; Oh S T et al. (2010) Blood 116:988-992; 그리고 Ernst T et al., Nat Genet. 42:722-726]. 일부 돌연변이는 골수섬유증 (예: 약 50 % 환자에서의 JAK2 돌연변이)에서 고빈도로 발생하고, JAK-STAT 과다 활성화를 직접적으로 (예: JAK2 또는 MPL 돌연변이) 또는 간접적으로 (예: LNK 또는 CBL 돌연변이) 유도한다.

[0005] 골수섬유증의 유일한 치료법은 골수 이식이다. 그러나, 치료와 관련된 사망률이 높으며, 소수의 환자만 이식을 받을 수 있다. 현재 이용 가능한 다른 많은 치료법은 1차 또는 2차 질병일 수 있는 골수섬유증의 진행을 역전시키는데 효적이 아니다. 골수섬유증 치료는 예를 들면, 세포-환원 요법 (가령, 히드록시우레아를 이용한 치료); 안드로겐 및/또는 에리트로포에틴을 이용한 빈혈 치료; 그리고 췌장질제술을 포함한다. 이러한 치료법은 생존율의 개선을 보여주지 못했고, 완화 치료제로 널리 사용된다 [Cervantes F., Myelofibrosis: Biology and treatment options, European Journal of Haematology, 2007, 79 (suppl. 68) 13-17]. 최근에는 JAK 억제제가 골수섬유증 치료에 사용되었다. JAK 억제제는 골수섬유증 환자에서 비장비대를 감소시키는데 유용할 것으로 보이지만, 그 질병에 대한 그 효과는 대개 임시방편이다[Gupta 등, (2012) Blood 120:1367-1379]. 특히, JAK 억제제는 예를 들어, 혈구감소, 의존성 수혈, 가속화 또는 폭발 상태 질환 및 섬유증을 비롯한 질병의 많은 징후 (합병증)에 거의 또는 전혀 영향을 미치지 못한다. 더욱이, JAK 억제제는 일부 환자에서 혈소판감소증, 빈혈 및 중성구감소증을 유발하거나, 또는 악화시키는 것으로 나타났다.

[0006] 따라서, 골수섬유증 치료를 위한 효과적인 치료법에 대한 충족되지 않은 상당한 필요를 요한다. 따라서, 본 발명의 목적은 골수섬유증의 치료 또는 예방, 특히 골수섬유증의 하나 이상의 합병증의 치료 또는 예방 방법을 제공하는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

발명의 요약

[0008]

부분적으로, 본 명세서는 ActRIIB 길항제 (억제제)가 골수섬유증의 치료, 구체적으로 예를 들면, 비장비대증, 수외조혈(extramedullary hematopoiesis), 및 섬유증을 비롯한 이 질환의 다양한 합병증을 개선하는데 이용될 수 있다는 발견에 관계한다. 특히, 본원에서 제시된 데이터에서 GDF 트랩 폴리펩티드가 골수섬유증 *JAK2V617F* 모델에서 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증을 감소시킨다는 것을 보여준다. 따라서, 특정 양태들에서, 본 명세서는 골수섬유증의 치료, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증 (가령, 비장비대증, 수외조혈, 빈혈, 및 섬유증)을 치료 또는 예방하는 조성물 및 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제, 골수섬유증 치료용 하나 또는 그 이상의 기타 지지 요법 (supportive therapies) 또는 활성물질과 임의선택적으로 조합하여 투여하는 것이다. GDF 트랩 폴리펩티드는 ActRIIB 길항작용 [가령, 하나 또는 그 이상의 GDF11, GDF8, 액티빈 B, BMP6, GDF3, 및 BMP10의 저해는 약제가 아마도 TGF-베타 슈퍼패밀리의 다른 구성원들을 비롯한 추가 제제의 스펙트럼의 활성을 저해하는 경향의 지표일 수 있으며, 그러한 집단적 억제에 예를 들어, 골수섬유증에 원하는 효과를 유도할 수 있다]이외의 기전을 통하여 골수섬유증에 영향을 줄 수 있지만, 그럼에도 불구하고, 바람직한 치료제는 ActRIIB 길항에 기초하여 선택될 수 있음을 입증한다. 따라서, 특정 작용 기전에 결부되는 것을 원하지 않지만, 기타 ActRIIB 길항제 [가령, ActRIIB 수용체의 길항제, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 (가령, GDF11, GDF8, 액티빈 B, BMP6, GDF3, 및 BMP10)의 길항제, 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)의 길항제, 하나 또는 그 이상의 공동-수용체의 길항제, 및/또는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 하류 신호생성 성분들 (가령, Smads)의 길항제], 또는 이러한 길항제들의 조합]는 골수섬유증의 치료, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증 합병증(가령, 비장비대증, 수외조혈, 빈혈, 및 섬유증)의 치료 또는 예방에 유용할 것으로 예상된다. 이러한 작용제는 본원에서 "ActRIIB 길항제" 또는 "ActRIIB 억제제"로 통칭된다. 따라서, 특정 양태들에서, 본 명세서는 골수섬유증 치료 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증을 치료 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 특정 양태들에서, 본 명세서는 골수섬유증 예방법에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증 예방법에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 진행 속도를 감소시키는 것에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도를 감소시키는 것에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 특정 양태들에서, 본 명세서는 골수섬유증의 중증도를 감소시키는 것에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증 합병증의 중증도를 감소시키는 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 1차 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 포스트-진성다혈구증 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 포스트-본태성 혈소판증가증 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 국제 예후 등급 체계 (IPSS)에 따라 저위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 IPSS에 따라 중간-1 위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 IPSS에 따라 중간-2 위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 IPSS에 따라 중간-2 위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 IPSS에 따라 중간-2 위험 골수섬유증을 갖는다.

병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 IPSS에 따라 고위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 역학적 IPSS (DIPSS)에 따라 저위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 DIPSS에 따라 중간-1 위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 DIPSS에 따라 중간-2 위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 DIPSS에 따라 고위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 DIPSS-플러스에 따라 저위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 DIPSS-플러스에 따라 중간-1 위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 DIPSS-플러스에 따라 중간-2 위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 치료, 예방 또는 진행속도 및/또는 중증도를 감소시키는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 DIPSS-플러스에 따라 고위험 골수섬유증을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증에 대해 인지된 위험 계층화 모델(가령, IPSS, DIPPS, 및 DIPPS-플러스)중 하나에 따라 골수섬유증의 위험 진행을 방지 또는 지연 시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 IPSS, DIPPS, 또는 DIPPS-플러스에 따라 저위험에서부터 중간-위험까지 골수섬유증 위험 진행을 방지 또는 지연시키는데 이용될 수 있다. 기타 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 IPSS, DIPPS, 또는 DIPPS-플러스에 따라 중간-1 위험에서부터 중간-2 위험까지 골수섬유증 위험 진행을 방지 또는 지연시키는데 이용될 수 있다. 여전히 구체예들에 있어서, 기타 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 IPSS, DIPPS, 또는 DIPPS-플러스에 따라 중간-2 위험에서부터 고위험까지 골수섬유증 위험 진행을 방지 또는 지연시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증에 대한 인지된 임의의 위험 계층화 모델(가령, IPSS, DIPPS, 및 DIPPS-플러스)에 따라 골수섬유증 위험 퇴행을 촉진 또는 증가시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 IPSS, DIPPS, 및 DIPPS-플러스에 따라, 골수섬유증 위험 퇴행을 고위험으로부터 중간-2 위험으로 촉진 또는 증가시키는데 사용될 수 있다. 기타 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 IPSS, DIPPS, 및 DIPPS-플러스에 따라, 골수섬유증 위험 퇴행을 중간-2 위험으로부터 중간-1 위험으로 촉진 또는 증가시키는데 사용될 수 있다. 여전히 구체예들에 있어서, ActRIIB 길항제는 IPSS, DIPPS, 및 DIPPS-플러스에 따라, 골수섬유증 위험 퇴행을 중간-1 위험으로부터 저위험으로 촉진 또는 증가시키는데 사용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 ActRIIB 길항제를 사용하는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증과 연관된 돌연변이를 포함한다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있으며, 이때 상기 골수섬유증은 JAK2 46/1 일배체형에 대한 무접합상태(nullizyosity), JAK2V617F, IDH1, IDH2, EZH2, SRSF2, ASXL1, JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, MPL, CALR, CALR+ASXL1-, CALR-ASKL1+, CALR+ASKL1+, CALR-ASKL1-, TET2, THPO, 및 LNK로부터 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 유전자 돌연변이와 연관된다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소에 이용될 수 있으며, 이때 상기 골수섬유증은 Janus 키나제 (JAK) (가령, JAK1, JAK2, 및/또는 JAK3)에서 하나 또는 그 이상의 유전자 돌연변이와 연관된다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소에 이용될 수 있으며, 이때 상기 골수섬유증은 JAK2에서 하나 또는 그 이상의 유전자 돌연변이와 연관된다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소에 이용될 수 있으며, 이때 상기 골수섬유증은 JAK2V617F 돌연변이와 연관된다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 ActRIIB 길항제를 사용하는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 골수섬유증은 증가된 혈청 IL-8 수준, 증가된 혈청 IL-2R 수준, 및 증가된 혈청 없는 경쇄 수준으로

구성된 군에서 선택된, 하나 또는 그 이상의 상승된 혈청 표지들과 연합된다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 ActRIIB 길항제를 사용하는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 Janus 키나제 억제제 (가령, 루쏘리티니브(ruxolitinib), 페드라티니브(fedratinib) (SAR302503), 모노에로티니브(monoelotinib) (CYT387), 파크리티니브(pacritinib), 레스타우르티니브(lestaurtinib), AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019, 및 AT-9283)로 치료되었다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있으며, 이때 상기 환자는 Janus 키나제 억제제에 비내성(intolerant)이다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있으며, 이때 상기 환자는 Janus 키나제 억제제에 대하여 부적절한 반응을 갖는다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 ActRIIB 길항제를 사용하는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 히드록시우레아로 치료되었다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있으며 이때 상기 환자는 히드록시우레아에 비내성이다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있으며 이때 상기 환자는 히드록시우레아에 대하여 부적절한 반응을 갖는다.

[0009]

본 명세서에서 기술된 바와 같이, 골수섬유증은 환자의 질병 진행 중에 나타날 수 있는 다양한 임상적 합병증과 관련된 조혈의 클론성 신생물 장애다. ActRIIB 길항제는 다수의 이들 임상 합병증을 완화시키는데 사용될 수 있고, ActRIIB 길항제는 골수섬유증에 대한 현재 많은 치료법-오직 한가지 또는 제한된 수의 상기 질환의 합병증만을 치료-과는 반대로 더 광범위하게 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 본 명세서의 실시예에서 입증한다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 비효과적인 조혈의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 수외조혈의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 예를 들면, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 수외조혈의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 기타 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 간에서 수외조혈 (간의 수외조혈)의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 더욱 다른 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 폐에서 수외조혈(폐의 수외조혈)의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 여전히 구체예들에 있어서, ActRIIB 길항제는 림프절에서 수외조혈(림프의 수외조혈)의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 장기 또는 조직의 염증 및/또는 비대 (크기) 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 비장에서 염증 및/또는 비대 (크기) 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 간에서 염증 및/또는 비대 (크기) 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 폐에서 염증 및/또는 비대 (크기) 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 림프절에서 염증 및/또는 비대 (크기) 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 비장비대증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 간비대의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 골수 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 비장 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 간 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 폐 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 림프절 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 골경화증의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또

는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골-골수섬유증(osteomyelofibrosis)의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 하나 또는 그 이상의 혈액-관련된 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 빈혈의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 혈소판감소증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 변형적혈구증가증(poikilocytosis)의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 출혈의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증의 하나 또는 그 이상의 전신 증상(가령, 피로, 소양증, 체중 감소, 식은땀, 열, 복부 통증 또는 불편함, 둔감증, 및 조기 포만감)의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 통증의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 뼈통증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 관절통의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 근육통의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 악액질의 진행 속도 및/또는 중증도의 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, 명세서는 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여함으로써, 골수섬유증 환자에서 적혈구 수준을 증가시키는 것에 관한 것이다. 특정 양태들에 있어서, 명세서는 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여함으로써, 골수섬유증 환자에서 헤모글로빈 수준을 증가시키는 것에 관한 것이다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서에서 기술된 방법에 따라 치료되는 골수섬유증 환자는 빈혈을 가지고 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 빈혈의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 환자에게서 골수섬유증 또는 또는 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 ActRIIB 길항제를 사용하는 방법에 관한 것이며, 이때 상기 환자는 하나 또는 그 이상의 적혈구 수혈(전체 또는 적혈구 수혈)을 투여받았다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 혈액 세포 수혈-의존적 환자에서 골수섬유증 또는 또는 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 ActRIIB 길항제를 사용하는 방법에 관계한다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 혈구 수혈 부담을 줄이기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, ActRIIB 길항제는 상기 ActRIIB 길항제 치료를 시작하기 전 동등한 시간에 비례하여 4 내지 8주 동안 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 이상 혈액 세포 수혈을 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 상기 ActRIIB 길항제 치료를 시작하기 전 동등한 시간에 비례하여 4 내지 8주 동안 약 50% 이상 혈액 세포 수혈을 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자에서 철분 과다를 감소시키는데 이용될 수 있다. 예를 들면, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 장기 또는 조직에서 철분 과다를 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 비장에서 철분 과다를 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 간에서 철분 과다를 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 골수섬유증 환자의 심장에서 철분 과다를 감소시키는데 이용될 수 있다.

[0010] 본 명세서에서 기술된 임의의 방법들에서, 골수섬유증 환자에게 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위하여, 하나 또는 그 이상의 추가 활성물질 및/또는 지지 요법(하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제 투여에 추가하여)을 더 투여될 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 수혈(전체 혈액 또는 적혈구 투입), 철 킬레이트(가령, 데훼록사민, 데훼리프론 및 데훼라시록스), 코르티코스테로이드, 프레디니손, ESAs(가령, 에리트로포에틴, 에포에틴 알파, 에포에틴 베타, 다르베포에틴 알파, 및 메톡시 폴리에틸렌 글리콜-에포에틴 베타), 안드로겐, 다나졸, 탈리도미드, 레날리도미드, 세포환원물질, 히드록시우레아, 부술판, 멜팔름, 클라드리빈, 췌장절제술, 방사선요법, 아스피린, 포말리돈 미드, Janus 키나제 억제제, mTOR 억제제(가령, 라파마이신, 시롤리무스, 테포로리무스, 에베로리무스, 템시롤리무스, NVP-BEZ235, BGT226, SF1126, PK1-587, INK128, AZD8055, 및 AZD2014), 및 히스톤 탈아세틸라제 억제제(가령, 기비노스타트(givinostat), 파노비노스타트(panobinostat), 및 프라시노스타트(pracinostat))로 구

성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질을 환자에게 더 투여할 수 있다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 골수섬유증 또는 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는 것에 관한 것이며, 이 방법은 이를 요하는 환자에게: a) Janus 키나제 억제제; 그리고 b) ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함하고, 이때 Janus 키나제 억제제 및 ActRIIB 길항제는 효과량으로 투여된다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료하기 전, 투여된다. 기타 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료한 후, 투여된다. 더욱 다른 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제와 동시에 투여된다. 본 명세서에서 기술된 방법에 따라 이용되는 Janus 키나제 억제제는 JAK1, JAK2, 및 JAK3군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 Janus 키나제를 억제하는 물질일 수 있다. 예를 들면, Janus 키나제 억제제는 세포-기반 분석에서 하나 또는 그 이상의 JAK1, JAK2, 및 JAK3의 신호생성을 억제하는 물질일 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 방법에 따라 이용되는 Janus 키나제 억제제는 루쏘리티니브, 페드라티니브 (SAR302503), 모노에로티니브 (CYT387), 파크리티니브, 레스타우르티니브, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019, 및 AT-9283으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 바람직한 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 방법에 따라 이용되는 Janus 키나제 억제제는 루쏘리티니브이다.

[0011] Janus 키나제 억제제 (가령, 루쏘리티니브)는 예를 들면, 골수섬유증을 비롯한 다양한 장애의 치료에 승인되었다. 추가적으로, 여러 다른 질병을 치료할 수 있는 효능을 결정하기 위한 여러 가지 임상 시험이 진행 중이다. Janus 키나제 억제제 요법의 흔한 부작용은 빈혈이다. 혈액 세포 수혈 및 EPO 수용체 활성제 요법이 Janus 키나제 억제제로 치료를 받은 환자의 빈혈 치료에 이용될 수 있지만, 이들 빈혈 요법은 또한 환자의 부작용과 관련이 있다 (가령, 철분 과다 축진 또는 증가, EPO에 대한 부적절한 반응, 및 EPO 과민증). 따라서, Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에서 적혈구/헤모글로빈 수준을 증가시키고, 빈혈을 치료하는 대체 방법이 당업계에 필요하다. 부분적으로, 본 명세서는 ActRIIB 길항제 (억제제)가 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에게서 적혈구 및 헤모글로빈 수준을 증가시키는데 이용될 수 있을 것이라는 발견과 관련된다. 따라서, 특정 양태들에서, 본 명세서는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에게서 적혈구/헤모글로빈 수준을 증가시키고, 그리고 빈혈을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법에 관계되는데, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 빈혈 치료용 하나 또는 그 이상의 기타 지지 요법 또는 활성물질의 임의선택적 조합과 함께, 효과량의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것이다. GDF 트랩 폴리펩티드는 ActRIIB 길항작용 [가령, 하나 또는 그 이상의 GDF11, GDF8, 액티빈 B, BMP6, GDF3, 및 BMP10의 저해는 약제가 아마도 TGF-베타 슈퍼패밀리의 다른 구성원들을 비롯한 추가 제제의 스펙트럼의 활성을 저해하는 경향의 지표일 수 있으며, 그러한 집단적 억제는 예를 들어, Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에서 예를 들면, 적혈구 수준 및/또는 헤모글로빈 수준에 원하는 효과를 유도할 수 있다]이외의 기전을 통하여 적혈구 세포 및/또는 헤모글로빈 수준에 영향을 줄 수 있고, 그럼에도 불구하고, 바람직한 치료제는 ActRIIB 길항작용에 근거하여 선택될 수 있음을 입증한다. 따라서, 특정 작용 기전에 결부되는 것을 원하지 않지만, 기타 ActRIIB 길항제 [가령, ActRIIB 수용체의 길항제, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 (가령, GDF11, GDF8, 액티빈 B, BMP6, GDF3, 및 BMP10)의 길항제, 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)의 길항제, 하나 또는 그 이상의 공동-수용체의 길항제, 및/또는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 하류 신호생성 성분들 (가령, Smads)의 길항제], 또는 이러한 길항제의 조합]은 Janus 키나제로 치료를 받은 환자의 치료, 구체적으로 Janus 키나제 요법과 연관된 하나 또는 그 이상의 합병증 (가령, 빈혈, 혈소판감소증, 및/또는 중성구감소증)의 치료 또는 예방에 유용할 것으로 예상된다. 이러한 작용제는 본원에서 "ActRIIB 길항제" 또는 "ActRIIB 억제제"로 통칭된다.

[0012] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에서 적혈구 수준 및/또는 헤모글로빈 수준을 증가시키는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에서 빈혈의 치료 또는 예방에 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에게 ActRIIB 길항제 치료에 앞서, 하나 또는 그 이상의 적혈구 수혈한다. 일부 구체예들에서, Janus 키나제 억제제로 치료된 환자는 혈액 세포 수혈-의존적이다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에서 혈액 세포 수혈 부하를 감소시키기 위하여, ActRIIB 길항제를 사용하는 방법에 관한 것이다. 예를 들면, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에서 ActRIIB 길항제 치료를 시작하기 전 동등한 시간에 비례하여 4 내지 8주 동안 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 이상 혈액 세포 수혈을 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에서 상기 ActRIIB 길항제 치료를 시작하기 전 동등한 시간에 비례하여 4 내지 8주 동안 약 50% 이상 혈액 세포 수혈을 감소시키는데 이용될 수 있다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자에서 철분 과다를 감소시

키기 위하여, ActRIIB 길항제를 사용하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자의 간에서 철 함량을 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자의 비장 에서 철 함량을 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자의 심장에서 철 함량을 감소시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료하기 전, 투여된다. 기타 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제로 치료한 후, 투여된다. 여전히 다른 구체예들에서, ActRIIB 길항제는 Janus 키나제 억제제와 동시에 투여된다. 특정 양태들에 있어서, Janus 키나제 억제제로 치료된 환자는 JAK1, JAK2, 및 JAK3군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 Janus 키나제를 억제하는 물질로 치료되었다. 일부 구체예들에서, Janus 키나제 억제제는 세포-기반 분석에서 하나 또는 그 이상의 JAK1, JAK2, 및 JAK3의 신호생성을 억제한다. 예를 들면, 환자는 루쏘리티니브, 페드라티니브 (SAR302503), 모노에로티니브 (CYT387), 파크리티니브, 레스타우르티니브, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019, 및 AT-9283으로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 Janus 키나제 억제제로 치료될 수 있다. 일부 구체예들에서, 환자는 루쏘리티니브로 치료될 수 있다.

[0013] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 GDF11 (가령, GDF11 길항제)을 억제하는 물질이다. GDF11 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된(가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 GDF11에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 GDF11에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 GDF11을 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, GDF11을 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다.

[0014] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용되는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 GDF8을 억제하는 물질 (가령, GDF8 길항제)이다. GDF8 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된(가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 GDF8에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 GDF8에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 GDF8을 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, GDF8을 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다.

[0015] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용되는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 GDF3을 억제하는 물질 (가령, GDF3 길항제)이다. GDF3 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된(가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 GDF3에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 GDF3에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF

트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 GDF3을 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, GDF3을 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다.

[0016] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 BMP6 (가령, BMP6 길항제)을 억제하는 물질이다. BMP6 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 (가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 BMP6에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 BMP6에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 BMP6을 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, BMP6을 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다.

[0017] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 BMP10 (가령, BMP10 길항제)을 억제하는 물질이다. BMP10 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 (가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 BMP10에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 BMP10에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 BMP10을 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, BMP10을 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다.

[0018] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE) (가령, 액티빈 길항제)을 억제하는 물질이다. 액티빈 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 (가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 액티빈에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 액티빈에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 액티빈을 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, 액티빈을 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다. 특정 바람직한 구체예들에서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 액티빈 B를 억제하는 물질이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제

의 조합은 액티빈 A (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M)에 실질적으로 결합하지 않거나 및/또는 액티빈 A 활성을 억제하지 않는다. 특정 바람직한 구체예들에서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 액티빈 B를 억제하지만, (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M)에 실질적으로 결합하지 않거나 및/또는 액티빈 A 활성을 억제하지 않는다.

[0019] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 ActRIIB를 억제하는 물질(가령, ActRIIB 길항제)이다. ActRIIB 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된(가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 ActRIIB에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 ActRIIB에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 ActRIIB를 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, ActRIIB를 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다.

[0020] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 ALK4를 억제하는 물질 (가령, ALK4 길항제)이다. ALK4 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된(가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 ALK4에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 ALK4에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 ALK4를 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, ALK4를 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK5, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다.

[0021] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 ALK5를 억제하는 물질 (가령, ALK5 길항제)이다. ALK5 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된(가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 ALK5에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 ALK5에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테틴 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 ALK5를 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, ALK5를 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, 및 ALK7을 더 억제할 수 있다.

[0022] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 ALK7을 억제하는 물질 (가령, ALK7 길항제)이다. ALK7 억제에 있어서 효과는 예를 들면, 본 명세서에서 기술된(가령, Smad 신호생성 리포터 분석) 것들을 비롯한 세포-기반 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 따라서, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 ALK7에 결합할 수 있다. 리간드 결합 활성은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 것들을 비롯한 결합 친화력 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 적어도 1×10^{-7} M (가령, 적어도 1×10^{-8} M, 적어도 1×10^{-9} M, 적어도 1×10^{-10} M, 적어도 1×10^{-11} M, 또는 적어도 1×10^{-12} M)의 K_D 로 적어도 ALK7에 결합한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 예를 들면, 리간드 트랩 (가령, ActRIIB 폴리펩티드, GDF 트랩, 폴리스테인 폴리펩티드, 및 FLRG 폴리펩티드), 항체, 소분자, 뉴클레오티드 서열, 및 이의 조합을 비롯한, 본 발명에서 기술된 방법 및 용도에 따라 ALK7을 억제하는 다양한 ActRIIB 길항제가 이용될 수 있다. 특정 구체예들에서, ALK7을 억제하는 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합은 하나 또는 그 이상의 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK5, 및 ALK4를 더 억제할 수 있다.

[0023] 부분적으로, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드인 ActRIIB 길항제에 관한 것이다. 용어 "ActRIIB 폴리펩티드"는 자연 발생적 ActRIIB 폴리펩티드 뿐만 아니라 이의 절두 및 변이체들, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들 (가령, GDF 트랩 폴리펩티드)을 집합적으로 지칭한다. 바람직하게는 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인 또는 이의 변형된 (변이체) 형태를 포함하고, 기본적으로 구성되거나, 또는 이로 구성된다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드의 ActRIIB 리간드-결합 도메인, 예를 들면, ActRIIB 세포의 도메인의 일부분을 포함하고, 기본적으로 구성되거나, 또는 이로 구성된다. 바람직하게는, 본 명세서에서 기술된 방법에 따라 이용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 가용성 폴리펩티드다.

[0024] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 29-109 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이때 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대하여 위치 79에 산성 아미노산 [자연 발생적 (E 또는 D) 또는 인공적인 산성 아미노산]을 포함한다. 기타 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 25-131 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 25-131 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이때 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대하여 위치 79에 산성 아미노산을 포함한다. 기타 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이때 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대하여 위치 79에 산성 아미노산을 포함한다. 더욱 다른 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 2의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 기타 구체예들에서, 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 2의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이때 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대하여 위치 79에 산성 아미노산을 포함한다. 여전히 기타 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 3의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 것에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 3의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이때 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대하여 위치 79에 산성 아미노산을 포함한다. 기타 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 4의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩

번호: 54의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이때 상기 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1에 대하여 위치 79에 산성 아미노산을 포함한다. 여전히 기타 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 58의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 방법 및 용도에 따라 이용된 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산을 포함하지 않는다.

[0025] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 변이체들 (GDF 트랩)은 동중중합체, 예를 들면, 동중이량체(homodimer), 동중삼량체(homotrimer), 동중사량체(homotetramers), 동중오량체(homopentamers), 및 더 높은 차수의 동중다량체 복합물일 수 있다. 특정 바람직한 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 변이체들은 동중이량체들이다. 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 ActRII 폴리펩티드 이량체는 제 2 ActRIIB 폴리펩티드에 공유적으로, 또는 비-공유적으로 연합된 제 1 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하며, 이때 상기 제 1 폴리펩티드는 ActRIIB 도메인과 상호작용 쌍의 제 1 구성부 (또는 제 2 구성부)(가령, 면역글로불린의 불변 도메인)의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제 2 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드와 상기 상호작용 쌍의 제 2 구성부 (또는 제 1 구성부)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 변이체들 (가령, GDF 트랩)은 융합 단백질일 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인과 하나 또는 그 이상의 이종성 (heterologous) (비-ActRIIB) 폴리펩티드 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 하나의 도메인으로써, ActRIIB 폴리펩티드 (가령, ActRIIB 수용체의 리간드-결합 도메인 또는 이의 변이체)로부터 유도된 아미노산 서열과, 이를 테면 개선된 약물동력학, 더 용이한 정제, 특정 조직으로의 표적화, 등을 제공하는 하나 또는 그 이상의 이종성 도메인을 보유하는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들면, 융합 단백질의 도메인은 하나 또는 그 이상의 생체내 안정성, 생체내 반감기, 취입/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 융합 단백질의 다량체화(multimerization), 및/또는 정제를 강화시킬 수 있다. 임의선택적으로, 융합 단백질의 ActRIIB 폴리펩티드 도메인은 하나 또는 그 이상의 이종성 폴리펩티드에 직접 연결(융합)되거나, 또는 ActRIIB 폴리펩티드의 아미노산 서열과 하나 또는 그 이상의 이종성 도메인의 아미노산 서열 사이에 링커와 같은 개입 서열이 위치할 수 있다. 특정 구체예들에서, ActRIIB 융합 단백질은 상기 이종성 도메인과 상기 ActRIIB 도메인 사이에 위치한 상대적으로 비구조적(unstructured) 링커를 포함한다. 이와 같은 비구조적 링커는 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단 단부("꼬리")에 대략 15개의 아미노산으로 된 비구조 영역에 상응할 수 있으며, 또는 링커는 상대적으로 2차 구조가 없는 3 내지 15, 20, 30, 50 또는 그 이상의 아미노산으로 된 인공 서열일 수 있다. 링커는 글리신과 프롤린 잔기가 많고, 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 반복 서열을 함유할 수 있다. 링커의 예로는 서열 TGGG (서열 번호: 18), SGGG (서열 번호: 19), TGGGG (서열 번호: 16), SGGGG (서열 번호: 17), GGGGS (서열 번호: 20), GGGG (서열 번호: 15), 및 GGG (서열 번호: 14)을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 융합 단백질은 면역글로불린의 불변 도메인, 예를 들면, 면역글로불린의 Fc 부분을 포함할 수 있다. 예를 들면, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgA (IgA1 또는 IgA2), IgE, 또는 IgM 면역글로불린의 Fc 도메인으로부터 유도된 아미노산 서열. 예를 들면, 면역글로불린 도메인의 am Fc 부분은 서열 번호: 9-13중에서 한 가지에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 100%인 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 본질적으로 구성되거나, 또는 상기 서열로 구성될 수 있다. 이러한 면역글로불린 도메인은 변경된 Fc 활성, 가령, 하나 또는 그 이상의 Fc 주효(effector) 기능의 감소를 부여하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 (가령, 결손, 추가, 및/또는 치환)을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, ActRIIB 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들면, 상기 B 부분은 본 명세서에서 기술된 바와 같이, N-및 C-말단 절두된 ActRIIB 폴리펩티드이다. 상기 A와 C 부분은 독립적으로 0, 1, 또는 하나 이상의 아미노산일 수 있고, A와 C 부분 모두 B에 대하여 이종성(heterologous)이다. 상기 A 및/또는 C 부분은 B 부분에 링커 서열을 경유하여 부착될 수 있다. 특정 구체예들에서, ActRIIB 융합 단백질은 리더 서열을 포함한다. 상기 리더 서열은 고유의 ActRIIB 리더 서열 또는 이종성 리더 서열일 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 리더 서열은 조직 플라즈미노겐 활성화제 (TPA) 리더 서열이다.

[0027] ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 변이체들 (가령, GDF 트랩)은 정제 하위서열, 이를 테면 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 서열, 및 GST 융합을 포함할 수 있다. 임의선택적으로, ActRIIB 폴리펩티드는 당화된 아미노산, 페길화된(PEGylated) 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 바이오티닐화된 아미노산, 및/또는 지질 모이어티에 접합된 아미노산에서 선택된 하나 또는 그 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함한다.

ActRIIB 폴리펩티드는 최소한 하나의 N-연계된 당을 포함할 수 있고, 그리고 2, 3개 또는 그 이상의 N-연계된 당을 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 또한 O-연계된 당을 포함할 수 있다. 일반적으로, 환자에게서 바람직하지 못한 면역 반응을 감소시키기 위하여, 상기 폴리펩티드의 자연 당화를 적절하게 매개하는 포유류 세포 계통에서 발견되는 ActRIIB 폴리펩티드가 바람직하다. ActRIIB 폴리펩티드는 조작된 곤충 또는 효모 세포, 그리고 포유류 세포, 이를 테면 COS 세포, CHO 세포, HEK 세포 및 NSO 세포가 포함된 환자에게 사용하는데 적합한 방식으로 단백질을 당화시키는 다양한 세포계통에서 생산될 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 당화된 것이며, 중국 햄스터 난소 세포 계통으로부터 획득가능한 당화 패턴을 갖는다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 포유류 (가령, 마우스 또는 인간)에서 최소한 4, 6, 12, 24, 36, 48, 또는 72 시간의 혈청 반감기를 나타낸다. 임의선택적으로, ActRIIB는 포유동물 (가령, 마우스 또는 인간)에서 최소한 6, 8, 10, 12, 14, 20, 25, 또는 30 일의 혈청 반감기를 전시할 수 있다.

[0028] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제와 약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 약학 제제를 제공한다. 약학 제제는 하나 또는 그 이상의 추가 활성물질, 이를 테면 골수섬유증, 구체적으로, 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증 (가령, 비장비대증, 수외조혈, 빈혈, 및 섬유증), 및/또는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자를 치료 또는 예방하는데 이용되는 화합물을 또한 포함할 수 있다. 일반적으로 제제는 바람직하게는 발열원이 없으며 (치료용도로 제품의 질을 관리하는 규정에서 요구하는 수준으로 발열원이 없다는 것을 의미한다).

[0029] 특정 경우들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제, 또는 길항제의 조합을 본 명세서에서 기술된 장애 또는 상태에 투여할 때, 상기 ActRIIB 길항제를 투여하는 동안 적혈구에서의 효과를 모니터링하고, 또는 적혈구 상에서 원하지 않는 효과를 감소시키기 위하여 상기 ActRIIB 길항제의 투여량을 결정 또는 조정하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 적혈구 수준, 헤모글로빈 수준, 또는 헤마토크릿 수준의 증가는 혈압의 바람직하지 못한 증가를 야기할 수 있다.

[0030] 특정 양태들에 있어서, 상기 ActRIIB 길항제는 항체, 또는 항체의 조합이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 적어도 ActRIIB에 결합한다. 특정 구체예들에서 ActRIIB에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ActRIIB 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, ActRIIB에 결합하는 항체는 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드, TGF-베타 슈퍼패밀리 유형 I 수용체, 또는 TGF-베타 슈퍼패밀리 공동-수용체가 ActRIIB에 결합하는 것을 억제한다. 특정 구체예들에서 ActRIIB에 결합하는 항체는 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드들이 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE), GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, BMP9, 및 BMP5로 구성된 군에서 선택된 ActRIIB에 결합하는 것을 억제한다. 일부 구체예들에서, 항체는 적어도 GDF11에 결합한다. 특정 구체예들에서, GDF11에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ActRIIB 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, GDF11에 결합하는 항체는 GDF11-ActRIIB 결합을 억제한다. 일부 구체예들에서, 항체는 적어도 GDF8에 결합한다. 특정 구체예들에서, GDF8에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ActRIIB 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, GDF8에 결합하는 항체는 GDF8-ActRIIB 결합을 억제한다. 일부 구체예들에서, 항체는 적어도 BMP6에 결합한다. 특정 구체예들에서, BMP6에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ActRIIB 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, BMP6에 결합하는 항체는 BMP6-ActRIIB 결합을 억제한다. 일부 구체예들에서, 항체는 BMP10에 결합한다. 특정 구체예들에서, 적어도 BMP10에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ActRIIB 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, BMP10에 결합하는 항체는 BMP10-ActRIIB 결합을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 적어도 GDF3에 결합한다. 특정 구체예들에서, GDF3에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ActRIIB 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, GDF3에 결합하는 항체는 GDF3-ActRIIB 결합을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 적어도 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE)에 결합한다. 특정 구체예들에서, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE)에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ActRIIB 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE)에 결합하는 항체는 액티빈-ActRIIB 결합을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 액티빈 B에 결합한다. 특정 구체예들에서, 액티빈 B에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세

서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ActRIIB 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, 액티빈 B에 결합하는 항체는 액티빈 B-ActRIIB 결합을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB, GDF11, GDF8, 액티빈 A, 액티빈 B, BMP6, 및 BMP10에 결합하는 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체의 조합이다. 일부 구체예들에서, 항체는 적어도 ALK4에 결합한다. 특정 구체예들에서, ALK4에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ALK4 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, ALK4에 결합하는 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드, 유형 II 수용체, 또는 공동-수용체가 ALK4에 결합하는 것을 억제한다. 특정 구체예들에서 ALK4에 결합하는 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드가 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10, 및 GDF3로 구성된 군에서 선택된 ALK4에 결합하는 것을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 적어도 ALK5에 결합한다. 특정 구체예들에서, ALK5에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ALK5 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, ALK5에 결합하는 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드, 유형 II 수용체, 또는 공동-수용체가 ALK5에 결합하는 것을 억제한다. 특정 구체예들에서 ALK5에 결합하는 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드가 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10, 및 GDF3로 구성된 군에서 선택된 ALK5에 결합하는 것을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 ALK7에 결합한다. 특정 구체예들에서, ALK7에 결합하는 항체는 임의선택적으로 세포-기반 분석, 이를 테면 본 명세서에서 기술된 것들에서 측정되었을 때, ALK7 신호생성을 억제한다. 특정 구체예들에서, ALK7에 결합하는 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드, 유형 II 수용체, 또는 공동-수용체가 ALK7에 결합하는 것을 억제한다. 특정 구체예들에서 ALK7에 결합하는 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드가 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10, 및 GDF3로 구성된 군에서 선택된 ALK7에 결합하는 것을 억제한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 적어도 GDF11에 결합한다. 특정 양태들에 있어서 다중특이적 항체, 또는 다중특이적 항체의 조합은 하나 또는 그 이상의 ActRIIB, GDF11, GDF8, 액티빈 A, 액티빈 B, GDF3, BMP6, 및 BMP10의 세포-기반 분석에서 신호생성을 억제한다. 일부 구체예들에서, 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체, 또는 인간 항체이다. 일부 구체예들에서, 상기 항체는 단일-쇄 항체, F(ab')₂ 단편, 단일-쇄 디아바디, 병렬 단일-쇄 Fv 단편, 병렬 단일-쇄 디아바디(diabody), 또는 단일-쇄 디아바디와 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 최소 일부분을 포함하는 융합 단백질이다.

[0031] 특정 양태들에 있어서, 상기 ActRIIB 길항제는 소분자(small molecule) 억제제 또는 소분자 억제제의 조합이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 ActRIIB의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 ALK4의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 ALK5의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 ALK7의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 GDF11의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 GDF8의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 BMP6의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 BMP10의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 GDF3의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE)의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 소분자 억제제는 적어도 액티빈 B의 억제제이다.

[0032] 특정 양태들에 있어서, 상기 ActRIIB 길항제는 핵산 억제제 또는 핵산 억제제의 조합이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 ActRIIB의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 ALK4의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 ALK5의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 ALK7의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 GDF11의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 GDF8의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 BMP6의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 BMP10의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 GDF3의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 E, 액티빈 AE, 및 액티빈 BE)의 억제제이다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 억제제는 적어도 액티빈 B의 억제제이다.

[0033] 특정 양태들에 있어서, 상기 ActRIIB 길항제는 폴리스테틴 폴리펩티드이다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 63의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리

스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 64의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 65의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 66의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리스테틴 폴리펩티드는 서열 번호: 67의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0034]

특정 양태들에 있어서, 상기 ActRIIB 길항체는 FLRG 폴리펩티드이다. 일부 구체예들에서, 상기 FLRG 폴리펩티드는 서열 번호: 68의 아미노산 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0035]

도 1은 다중 ActRIIB 및 ActRIIA 결정 구조의 복합 분석에 근거하여, 상자로 표시된 리간드와 직접 접촉하기 위하여, 본 명세서에서 추측된 잔기를 갖는 인간 ActRIIA의 세포외 도메인(서열 번호: 36)과 인간 ActRIIB의 세포외 도메인 (서열 번호: 2)의 정렬을 나타낸다.

도 2는 다양한 척추동물 ActRIIB 단백질 및 인간 ActRIIA (서열 번호: 37-43)의 다중 서열 정렬 뿐만 아니라 상기 정렬로부터 유도된 콘센수스 ActRII 서열 (서열 번호: 44)을 보여준다.

도 3은 TPA 리더 서열 (이중 밑줄), ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 20-134; 단일 밑줄), 및 hFc 도메인을 비롯한, GDF 트랩 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc에 대한 전장 아미노산 서열 (서열 번호: 45)을 나타낸다. 고유한 서열에서 79 번 위치에 치환된 아스파르테이트는 이중 밑줄로 강조, 표시되고, 시퀀싱에 의해 드러난 글리신이 성숙한 용합 단백질에서 N-말단 잔기가 되기 때문이다.

도 4a 및 4b는 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc을 인코딩하는 뉴클레오티드서열을 나타낸다. 서열 번호: 48은 센스 가닥에 상응하며, 서열 번호: 49는 안티센스 가닥에 상응한다. TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66)는 이중 밑줄로 표시되며, 상기 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오티드 76-420)은 단일 밑줄로 표시된다.

도 5는 TPA 리더 (이중 밑줄), 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131; 단일 밑줄), 및 hFc 도메인을 포함한, 절두된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 전장 아미노산 서열 (서열 번호: 50)을 보여준다. 고유한 서열에서 79 번 위치에 치환된 아스파르테이트는 이중 밑줄로 강조, 표시되고, 시퀀싱에 의해 드러난 글루타메이트는 성숙한 용합 단백질에서 N-말단 잔기가 되기 때문이다.

도 6a 및 6b는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc을 인코딩하는 뉴클레오티드서열을 나타낸다. 서열 번호: 51은 센스 가닥에 상응하며, 서열 번호: 52는 안티센스 가닥에 상응한다. TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66)는 이중 밑줄로 표시되며, 상기 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오티드 76-396)은 단일 밑줄로 표시된다. 상기 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131)의 아미노산 서열을 또한 보여준다.

도 7은 리더 없이 상기 절두된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 25-131)hFc의 아미노산 서열(서열 번호: 53)을 보여준다. 상기 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131)은 밑줄로 표시된다. 고유한 서열에서 79 번 위치에 치환된 아스파르테이트는 이중 밑줄로 강조, 표시되고, 시퀀싱에 의해 드러난 글루타메이트는 성숙한 용합 단백질에서 N-말단 잔기가 되기 때문이다.

도 8은 리더없는 상기 절두된 GDF 트랩 ActRIIB(L79D 25-131), hFc 도메인, 및 링커의 아미노산 서열 (서열 번호: 54)을 보여준다. 고유한 서열에서 79 번 위치에 치환된 아스파르테이트는 밑줄로 강조, 표시되고, 시퀀싱에 의해 드러난 글루타메이트는 성숙한 용합 단백질에서 N-말단 잔기가 되기 때문이다.

도 9a 및 9b는 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc을 인코딩하는 뉴클레오티드서열을 나타낸다. 서열 번호: 55는 센스 가닥에 상응하며, 서열 번호: 56은 안티센스 가닥에 상응한다. TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66)는 이중 밑줄로 표시되며, 상기 절두된 ActRIIB 세포외 도메인 (뉴클레오티드 76-396)은 단일 밑줄로 표시되고, 세포외 도메인의 야생형 뉴클레오티드서열에서 치환은 이중 밑줄 및 강조표시된다 (서열 번호: 51과 비교, 도 6a 및 6b). 상기 ActRIIB 세포외 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131)의 아미노산 서열을 또한 보여준다.

도 10은 도 9a 및 9b에서 나타난 대체 뉴클레오티드서열 (서열 번호: 55)의 뉴클레오티드 76-396 (서열 번호:

57)을 나타낸다. 도 9a 및 9b에서 표시된 동일한 뉴클레오티드치환 또한 여기에서 밑줄 및 강조표시된다. 서열 번호: 57은 L79D 치환을 갖는, 오직 절두된 ActRIIB 세포의 도메인 (서열 번호: 1에서 잔기 25-131에 상응), 가령, ActRIIB(L79D 25-131)을 인코딩한다.

도 11 은 Clustal 2.1을 이용하여 인간 IgG 아이소타입으로부터 Fc 도메인의 복수 서열 정렬을 보여준다. 힌지 영역은 점선 밑줄에 의해 표시된다.

도 12는ActRIIB(25-131)-hFc에 대한 온전한, 프로세싱되지 않은 아미노산 서열(서열 번호: 58)을 보여준다. TPA 리더 (잔기 1-22) 및 이중-절두된 ActRIIB 세포의 도메인 (서열 번호: 1에서 고유 서열에 근거하여 번호매김할 때, 잔기 24-131)은 각각 밑줄로 표시된다. 시퀀싱에 의해 드러난 글루타메이트는 강조표시되며, 이는 성숙한 용합 단백질에서 N-말단 잔기가 되는데, 이는 서열 번호: 1에서 위치 25가 된다.

도 13a 및 13b는ActRIIB(25-131)-hFc를 인코딩하는 뉴클레오티드서열을 나타낸다 (코딩 가닥은 상단, 서열 번호: 59 에 나타내고, 보체는 바닥 3'-5'에, 서열 번호: 60으로 나타낸다). TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66) 및 ActRIIB 세포의 도메인 (뉴클레오티드 73-396)을 인코딩하는 서열은 밑줄로 표시된다. ActRIIB(25-131)에 대한 대응하는 아미노산 서열을 또한 나타낸다.

도 14a 및 14b는 ActRIIB(25-131)-hFc를 인코딩하는 뉴클레오티드서열을 나타낸다 (코딩 가닥은 상단, 서열 번호: 61 에 나타내고, 보체는 바닥 3'-5'에, 서열 번호: 62로 나타낸다). 이 서열은 초기 형질 전환체에서보다 높은 수준의 단백질 발현을 제공하여, 세포주 개발을 보다 신속하게 진행한다. TPA 리더 (뉴클레오티드 1-66) 및 ActRIIB 세포의 도메인 (뉴클레오티드 73-396) 밑줄로 표시되며, ECD의 야생형 뉴클레오티드서열에서 치환은 강조표시된다 (도 13a 및 13b) . ActRIIB(25-131)에 대한 대응하는 아미노산 서열을 또한 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] **발명의 상세한 설명**

[0037] **1. 개요**

[0038] 형질변환 성장 인자-베타 (TGF-베타) 슈퍼패밀리는 공통의 서열 요소들과 구조적 모티프를 공유하는 다양한 성장 인자들을 함유한다. 이들 단백질은 척추동물과 비척추동물 모두에서 대규모 다양한 세포 유형에서 생물학적 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 슈퍼패밀리의 구성원들은 패턴 형성 및 조직 특화에 있어서 배발달 동안 중요한 기능을 수행하고, 지질생성, 근육 형성, 연골 형성, 심장 형성, 조혈, 신경 발생 및 상피 세포 분화를 비롯한 다양한 분화 과정에 영향을 줄 수 있다. TGF-베타 패밀리의 구성요소의 활성을 조절함으로써, 유기체에서 유의적인 생리학적 변화를 야기시키는 것이 대개 가능하다. 예를 들면, 피에몬테(Piedmontese) 및 벨기에 푸른 소(Blue cattle) 품종은 근육량의 상당한 증가를 야기하는 GDF8 (미오스타틴으로도 불림) 유전체 기능-소실(loss-of-function) 돌연변이를 휴대한다[가령, Grobet 등, (1997) Nat Genet 17(1):71-4]. 더욱이, 인간에 있어서, GDF8의 비활성 대립유전자는 증가된 근육량과 연관있으며, 보고에 따르면 예외적으로 강한 힘과 관련있다[Schuelke 등, (2004) N Engl J Med 350:2682-8].

[0039] TGF-β 신호는 리간드 자극 시 하류 SMAD 단백질 (가령, SMAD 단백질 1, 2, 3, 5, 및 8) 을 인산화시키고, 활성화시키는 유형 I 및 유형 II 세린/트레오닌 키나제 수용체의 이형화학적 복합체에 의해 매개된다[가령, Massague (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178 참고]. 이들 유형 I 및 유형 II 수용체는 시스테인-풍부한 영역을 갖는 리간드-결합 세포의 도메인, 막경유 도메인, 그리고 예측된 세린/트레오닌 특이성을 갖는 세포질 도메인으로 구성된 막경유 단백질이다. 유형 I 수용체는 신호생성에 필수적이다. 유형 II 수용체는 리간드 결합에 요구되며, 유형 I 수용체의 활성화에 필요하다. 유형 I 및 II 액티빈 수용체는 리간드 결합 후 안정적 복합체를 형성하여, 유형 II 수용체에 의한 유형 I 수용체가 인산화(phosphorylation)된다.

[0040] 관련된 2개의 유형 II 수용체 (ActRII), ActRIIA 및 ActRIIB는 액티빈에 대한 유형 II 수용체로 확인되었다 [가령, Mathews 및 Vale (1991) Cell 65:973-982; 그리고 Attisano 등, (1992) Cell 68: 97-108 참고]. 액티빈 이외에, ActRIIA 및 ActRIIB은 예를 들면, BMP6, BMP7, Nodal, GDF8, 및 GDF11을 포함하는 몇 가지 기타 TGF-β 패밀리 단백질과 생화학적으로 상호작용할 수 있다 [가령, Yamashita 등, (1995) J. Cell Biol. 130:217-226; Lee 및 McPherron (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9306-9311; Yeo 및 Whitman (2001) Mol. Cell 7: 949-957; 그리고 Oh 등, (2002) Genes Dev. 16:2749-54 참고]. ALK4는 액티빈, 구체적으로 액티빈 A의 1차 유형 I 수용체이며, ALK-7은 다른 액티빈, 구체적으로 액티빈 B에 대한 수용체로 마찬가지로 기능을 할 수 있

다.

- [0041] 액티빈은 TGF-베타 슈퍼패밀리에 속하는 이량체 폴리펩티드 성장 인자다. 2개의 밀접하게 관련된 β 소단위 ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, 및 $\beta_A\beta_B$, 차례로)의 동형/이형이량체인 3가지 주요 액티빈 형태(A, B, 및 AB)가 있다. 인간 계놈은 또한 주로 간에서 발견되는 액티빈 C 및 액티빈 E 를 인코딩하고, 그리고 β_C 또는 β_E 를 함유하는 이형 이량체 형태 또한 공지되어 있다.
- [0042] TGF-베타 슈퍼패밀리에서, 액티빈은 난소 및 태반 세포에서 호르몬 생성을 자극하고, 신경 세포 생존을 지원하고, 세포 유형에 따라 세포주기 진행에 긍정적 또는 부정적 영향을 미칠 수 있고, 그리고 적어도 양서류 태아에서 중배엽 분화를 유도할 수 있는 독특하고 다기능적 요소다[DePaolo 등, (1991) Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson 등, (1997) Curr Biol. 7:81-84; 그리고 Woodruff (1998) Biochem Pharmacol. 55:953-963]. 더욱이, 자극을 받은 인간 단핵구 백혈병 세포로부터 단리된 적혈구 분화 인자 (EDF)는 액티빈 A와 동일한 것으로 밝혀졌다 [Murata 등, (1988) PNAS, 85:2434]. 액티빈 A는 골수에서 적혈구생성을 촉진시키는 것으로 제시되었다. 몇몇 조직에서, 액티빈 신호전달은 이것의 관련된 이형이량체, 인히빈에 의해 길항된다. 예를 들면, 뇌하수체로부터 난포-자극 호르몬 (FSH)의 방출 동안, 액티빈은 FSH 합성 및 분비를 촉진시키지만, 한편 인히빈은 FSH 분비 및 합성을 저해시킨다. 액티빈 생활성을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질은 폴리스테틴 (FS), 폴리스테틴-관련된 단백질 (FSRP, 또한 FLRG 또는 FSTL3으로도 알려짐), 및 α_2 -마크로 글로블린을 포함한다.
- [0043] 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 단리된 β_A 소단위 또는 이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_A$ 동형이량체 또는 $\beta_A\beta_B$ 이형이량체)에서 "액티빈 A"에 결합하는 물질은 β_A 소단위에 특이적으로 결합하는 물질이다. 이형이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_B$ 이형이량체)의 경우, "액티빈 A"에 결합하는 물질은 β_A 소단위 안에 존재하는 에피토프 (epitopes)에 특이적이지만, 이 복합체의 비- β_A 소단위 (가령, 복합체의 β_B 소단위) 안에 존재하는 에피토프에는 결합하지 않는다. 유사하게, "액티빈 A"를 길항(억제)하는 것으로 본 명세서에서 공개된 물질은 단리된 β_A 소단위 또는 이량체 복합체 (가령, $\beta_A\beta_A$ 동형이량체 또는 $\beta_A\beta_B$ 이형이량체)에서 β_A 소단위에 의해 중개되는 하나 또는 그 이상의 활성을 억제하는 물질이다. $\beta_A\beta_B$ 이형이합체의 경우에, "액티빈 A"를 저해하는 작용제는 β_A 아단위의 하나 또는 그 이상의 활성을 특이적으로 저해하지만, 복합체의 비- β_A 아단위 (가령, 복합체의 β_B 아단위)의 활성을 저해하지 않는 작용제이다. 이러한 원리는 "액티빈 B", "액티빈 C" 및 "액티빈 E"에 결합하고 및/또는 이를 저해하는 작용제에도 적용된다. "액티빈 AB"에 길항작용하는 본원에서 개시된 작용제는 β_A 아단위에 의해 매개된 하나 또는 그 이상의 활성 및 β_B 아단위에 의해 매개된 하나 또는 그 이상의 활성을 저해하는 작용제이다.
- [0044] 성장 및 분화 인자-8 (GDF8)은 또한 미오스타틴으로 알려져 있다. GDF8은 골격근량의 음성 조절인자다. GDF8은 발생중인 그리고 성인 골격근에서 상당히 발현된다. 유전자삽입 마우스에서 GDF8 null 돌연변이는 골격근의 눈에 띄는 비대 및 다형성을 특징으로 한다 [McPherron 등, Nature (1997) 387:83-90]. 소에서 GDF8의 자연 발생 돌연변이에서 골격근량의 비슷한 증가가 있고[가령, Ashmore 등, (1974) Growth, 38:501-507; Swatland 및 Kieffer (1994) J. Anim. Sci. 38:752-757; McPherron 및 Lee (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12457-12461; 그리고 Kambadur 등, (1997) Genome Res. 7:910-915], 그리고 인간에서 현저하게 나타난다[가령, Schuelke 외, (2004) N Engl J Med 350:2682-8]. 연구에 따르면, 사람의 HIV 감염과 관련된 근육 소모는 GDF8 단백질 발현 증가를 수반한다[가령, Gonzalez-Cadavid 등, (1998) PNAS 95:14938-43 참고]. 또한, GDF8은 근육 특이적 효소 (예: 크레아틴 키나제)의 생산을 조절하고, 근섬유 세포 증식을 조절할 수 있다[가령, 국제 특허 출원 공개 번호. WO 00/43781 참고]. GDF8 프로펩티드(propeptide)는 성숙한 GDF8 도메인 이량체에 비공유 결합하여, 그 생물학적 활성을 불활성화시킬 수 있다. [가령, Miyazono 등, (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield 등, (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; 그리고 Brown 등, (1990) Growth Factors, 3: 35-43 참고]. GDF8 또는 구조적으로 관련된 단백질에 결합하고, 이들의 생물학적 활성을 억제시키는 다른 단백질은 폴리스테틴, 그리고 잠재적으로, 폴리스테틴-관련된 단백질을 포함한다[가령, Gamer 등, (1999) Dev. Biol., 208: 222-232 참고].
- [0045] BMP11로도 또한 알려진, 성장 및 분화 인자-11 (GDF11)는 분비된 단백질이다 [McPherron 등, (1999) Nat. Genet. 22: 260-264]. GDF11은 마우스 발생 동안 꼬리싹(tail bud), 팔다리싹(limb bud), 상악 및 하악 아치,

그리고 후근 신경절에서 발현되는 분비 단백질이다[가령, Nakashima 등, (1999) Mech. Dev. 80: 185-189 참고]. GDF11은 중배엽 및 신경 조직 모두에서 패턴화에 독특한 역할을 한다[가령, Gamer 등, (1999) Dev Biol., 208:222-32 참고]. GDF11은 병아리 날개 발달에 있어서 연골 형성 및 근형성의 음성 조절자인 것으로 나타났다[가령, Gamer 등, (2001) Dev Biol. 229:407-20 참고]. 근육에서 GDF11의 발현은 GDF8과 유사한 방식으로 근육 성장을 조절하는 역할을 암시한다. 또한, 뇌에서 GDF11의 발현은 GDF11이 또한 신경계의 기능과 관련된 활성을 가질 수 있음을 시사한다. 흥미로운 것은, GDF11은 후각 상피의 신경 발생을 억제하는 것으로 밝혀졌다[가령, Wu 등, (2003) Neuron. 37:197-207 참고].

[0046] 부분적으로, 본 명세서는 ActRIIB 길항제 (억제제)가 골수섬유증 환자의 치료, 구체적으로 예를 들면, 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증을 비롯한 이 질환의 다양한 합병증을 개선하는데 이용될 수 있다는 발견에 관계한다. 특히, 본원에서 제시된 데이터에서 GDF 트랩 폴리펩티드가 골수섬유증 *JAK2V617F* 모델에서 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증을 감소시킨다는 것을 보여준다. 따라서, 특정 양태들에서, 본 명세서는 골수섬유증의 치료, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증(비장비대증, 수외조혈, 빈혈, 및 섬유증)을 치료 또는 예방하는 조성물 및 방법에 관한 것으로써, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제, 골수섬유증 치료용 하나 또는 그 이상의 기타 지지 요법 또는 활성물질과 임의선택적으로 조합하여 투여하는 것이다.

[0047] 이 발명에서 사용된 용어는 일반적으로 본 개시 내용 및 각 용어가 사용되는 특정 상황에서 당해 분야의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본 발명의 구성 및 방법을 설명하고, 이를 작성하고 사용하는 방법에 대해 당업자에게 추가 지침을 제공하기 위해 아래 또는 다른 곳에서 논의된다. 어떤 용어의 사용의 범위나 의미는 그 용어가 사용되는 특정 상황에서 명백해질 것이다.

[0048] 모든 문법적 형태 및 단어 변이에서 "상동성(homologous)"이란 동일한 유기체 중에서 슈퍼패밀리의 단백질을 포함하는 "공통적인 진화 기원"을 포함하는 두개 단백질간의 상관관계를 지칭하거나, 뿐만 아니라 상이한 유기체 종의 상동성 단백질을 지칭한다. 이러한 단백질 (및 이의 인코딩 핵산)은 서열 상동성을 갖고, 동일성 (%) 또는 특정 잔기 또는 모티프 및 보존된 위치의 존재 여부와 관계없이, 서열 유사성에 의해 반영되는 바와 같은 서열 상동성을 갖는다. 그러나, 일반적인 용도 및 당해 출원에서, "상동성"이라는 용어는 "매우"와 같은 부사로 수식될 때 서열 유사성을 지칭할 수 있고, 일반적인 진화적 기원과 관련될 수도 있고 또는 그렇지 않을 수도 있다.

[0049] 용어 "서열 유사성(sequence similarity)"은 모든 문법적 형태에서 일반적인 진화론적 기원을 공유하거나 공유하지 않을 수 있는 핵산 또는 아미노산 서열 간의 동일성 또는 일치 정도를 의미한다.

[0050] 기준 폴리펩티드 (또는 뉴클레오티드) 서열에 대한 "서열 동일성 백분율(%)"은 후보 서열의 아미노산 잔기(또는 핵산)이 기준 폴리펩티드(뉴클레오티드) 서열에의 아미노산 잔기(또는 핵산)과 동일한 아미노산 잔기 (또는 핵산)의 백분율로 정의되는데, 이때 서열을 정렬시킨 후 최대 서열 동일성 백분율을 얻기 위하여 필요하다면 갭을 도입하고, 보존적 치환은 상기 서열의 동일성의 일부분으로 간주되지 않는다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방법으로 성취될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 (핵산) 서열 동일성 %값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에 의해 작성되었으며, 소스 코드(source code)는 미국 저작권청 (Washington D.C., 20559)에 사용자 문서로 제출되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코의 Genentech, Inc.에서 공개적으로 입수할 수 있으며, 소스 코드에서 컴파일할 수도 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 체제에서 사용하도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 가변적이지 않다.

[0051] "항진하다(agonize)"는 모든 문법적 형태로 단백질 및/또는 유전자를 활성화 (예 : 단백질의 유전자 발현을 활성화 또는 증폭하거나 비활성 단백질을 활성화상태로 유도함으로써)하거나 단백질 및 단백질을 증가시키는 과정을 의미한다.

[0052] "길항하다(antagonize)"는 모든 문법적 형태로 단백질 및/또는 유전자를 억제(예 : 단백질의 유전자 발현을 억제 또는 감소시키거나 활성 단백질을 비활성화상태로 유도함으로써)하거나 단백질 및 단백질을 감소시키는 과정을 의미한다.

[0053] 명세서 및 청구 범위에 걸쳐 수치와 관련하여 사용되는 용어 "약(about)" 및 "대략(approximately)"이란 당업자에게 친숙하고 수용가능한 정확도의 구간을 나타낸다. 일반적으로, 이러한 정확도 구간은 $\pm 10\%$ 이다. 대안으로, 그리고 특히 생물학적 계통에서, 용어 "약" 및 "대략"은 주어진 값의 크기의 차수, 바람직하게는 ≤ 5 배, 보다 바람직하게는 ≤ 2 배 이내의 값을 의미 할 수 있다.

[0054] 여기에 개시된 수치 범위는 범위를 정의하는 수치를 포함한다.

[0055] 용어 단수관사("a" 및 "an")는 용어가 사용된 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 복수형을 포함한다. 용어 "하나 또는 이상의" 및 "최소 하나의"은 물론 교환 할 수 있는 용어로 "단수 관사("a" 또는 "an") 용어를 사용할 수 있다. 더욱이, 본 명세서에서 사용 된 "및/또는"은 둘 또는 그 이상의 특정 특징 또는 구성 요소의 각각의 구체적인 설명으로서 취해질 것이다. 따라서, 구절에서 사용된 용어 "및/또는", 이를 테면 "A 및/또는 B"는 "A와 B", "A 또는 B", "A" (단독), 및 "B" (단독)을 포함한다. 마찬가지로, "A, B, 및 / 또는 C"와 같은 문구에 사용된 "및/또는"이라는 용어는 다음 각 측면을 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A와 C; A와 B; B와 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

[0056] 본 명세서 전반에 걸쳐, "포함한다(comprise)"라는 단어 또는 "포함하는(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 명시된 정수 또는 정수 그룹을 포함하지만, 다른 정수 또는 정수 그룹을 배제하지 않는다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0057] **2. ActRIIB 길항제**

[0058] 부분적으로, 본 명세서는 ActRIIB 길항제 (억제제)가 골수섬유증 환자의 치료, 구체적으로 예를 들면, 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증을 비롯한 이 질환의 다양한 합병증을 개선하는데 이용될 수 있다는 발견에 관계한다. 특히, 본원에서 제시된 데이터에서 GDF 트랩 폴리펩티드가 골수섬유증 *JAK2V617F* 모델에서 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증을 감소시킨다는 것을 보여준다. 가용성 GDF 트랩 폴리펩티드는 ActRIIB 길항작용 [가령, 하나 또는 그 이상의 GDF11, GDF8, 액티빈 B, BMP6, GDF3, 및 BMP10의 저해는 약제가 아마도 TGF-베타 슈퍼패밀리의 다른 구성원들을 비롯한 추가 제제의 스펙트럼의 활성을 저해하는 경향의 지표일 수 있으며, 그러한 집단적 억제제는 예를 들어, 골수섬유증에 원하는 효과를 유도할 수 있다]이외의 기전을 통하여 골수섬유증에 영향을 줄 수 있지만, 그럼에도 불구하고, 바람직한 치료제는 ActRIIB 길항에 기초하여 선택될 수 있음을 입증한다. 따라서, 특정 작용 기전에 결부되는 것을 원하지 않지만, 기타 ActRIIB 길항제 [가령, ActRIIB 수용체의 길항제, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB-결합 리간드 (가령, GDF11, GDF8, 액티빈 B, BMP6, GDF3, 및 BMP10)의 길항제, 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)의 길항제, 하나 또는 그 이상의 공동-수용체의 길항제, 및/또는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 하류 신호생성 성분들 (가령, Smads)의 길항제], 또는 이러한 길항제들의 조합]는 골수섬유증의 치료, 구체적으로 다양한 골수섬유증-연합된 합병증(가령, 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증)의 치료 또는 예방에 유용할 것으로 예상된다. 이러한 작용제는 본원에서 "ActRIIB 길항제" 또는 "ActRIIB 억제제"로 통칭된다.

[0059] **A. ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 변이체들**

[0060] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 변이체들 (가령, GDF 트랩)에 관한 것이다. 특히, 본 명세서는 골수섬유증의 치료, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증 (가령, 비장비대증, 수외조혈, 빈혈, 및 섬유증), 및/또는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자의 치료 또는 예방을 위하여, 단독으로, 또는 하나 또는 그 이상의 추가 지지 요법과 조합하여 ActRIIB 폴리펩티드를 이용하는 방법들을 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "ActRIIB"는 임의의 종으로부터 그리고 이 유발 또는 다른 변형에 의해 그러한 ActRIIB 단백질로부터 유래된 변이체로부터 액티빈 수용체 유형 IIB (ActRIIB) 단백질의 패밀리를 나타낸다. ActRIIB에 대한 언급은 현재 확인된 형태중 하나를 참조로 한다. ActRIIB 패밀리의 구성요소는 시스테인-풍부 영역을 갖는 리간드-결합 세포외 도메인, 막경유 도메인, 및 예상 세린/트레오닌 키나제 활성을 갖는 세포질 도메인을 포함하는 막경유 단백질이다.

[0061] 용어 "ActRIIB 폴리펩티드"는 뿐만 아니라 ActRIIB 패밀리 구성원의 자연 발생적 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 뿐만 아니라, 유용한 활성을 보유하는 그의 임의의 변이체 (돌연변이 체, 단편, 융합체 및 펩티드 유사체를 포함함)를 포함한다. 이러한 변이체 ActRIIB 폴리펩티드들의 예는 본 명세서 뿐만 아니라 국제 특허 출원 공개 번호. WO 2006/012627 및 WO 2008/097541에서 제공되며, 이들은 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다. 본원에 기술된 모든 ActRIIB 관련 폴리펩티드에 대한 아미노산의 넘버링은 달리 명시하지 않는 한, 하기에 제공된 인간 ActRIIB 전구체 단백질 서열 (서열 번호: 1)의 번호에 기초한다.

[0062] 인간 ActRIIB 전구체 단백질 서열은 다음과 같다:

```

1  MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
51 GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPL
451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV

```

[0063] 501 TNVDLPPKES SI (서열 번호: 1)

[0064] 신호 펩티드는 단일 밑줄로 표시되어 있고; 세포외 영역은 굵은 체로 표시되며; 잠재적인 내인성 N-연계된 당화 부위는 이중 밑줄로 표시된다.

[0065] 프로세스된 (성숙) 세포의 ActRIIB 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:

[0066] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPAPT (서열 번호: 2).

[0067] 일부 구체예들에 있어서, N-말단에 "SGR..." 서열을 갖는 상기 단백질이 만들어질 수 있다. 세포외 도메인의 C-말단 "꼬리(tail)"는 단일 밑줄로 나타낸다. 결손된 "꼬리"를 갖는 서열(Δ15 서열)은 다음과 같다:

[0068] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (서열 번호: 3).

[0069] 서열 번호: 1의 위치 64에 알라닌 (A64)을 갖는 ActRIIB 형태 또한 문헌에 보고되었다. [Hilden 등, (1994) 혈액, 83(8): 2163-2170]. A64 치환을 갖는 ActRIIB의 세포외 도메인을 포함하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 액티빈과 GDF11에 대하여 상대적으로 낮은 친화력을 갖는다는 출원인이 확인하였다. 대조적으로, 위치 64에 아르기닌 (R64)을 갖는 동일한 ActRIIB-Fc 융합 단백질은 액티빈과 GDF11에 대하여 낮은 나노몰에서 높은 피코몰 범위의 친화력을 갖는다. 따라서, R64를 갖는 서열은 본 명세서에서 인간 ActRIIB의 "야생형(wild-type)" 기준 서열로 이용된다.

[0070] 위치 64에 알라닌을 갖는 ActRIIB 형태는 다음과 같다:

```

[0071] 1  MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSGLERCE
[0072] 51GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
[0073] 101FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
[0074] 151 LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
[0075] 201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
[0076] 251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
[0077] 301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
[0078] 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRC
[0079] 401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPL
[0080] 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV

```


- [0081] 501 TNVDLPPKES SI (서열 번호: 4)
- [0082] 신호 펩티드는 단일 밑줄로 표시되어 있고; 세포의 영역은 **굵은 체**로 표시된다.
- [0083] 대체 A64 형태의 프로세스된 (성숙) 세포의 ActRIIB 폴리펩티드 서열은 다음과 같다:
- [0084] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGG PEVTYEPPPTAPT (서열 번호: 5)
- [0085] 일부 구체예들에 있어서, N-말단에 "SGR..." 서열을 갖는 상기 단백질이 만들어질 수 있다. 세포의 도메인의 C-말단 "꼬리"는 단일 밑줄로 나타낸다. 결손된 "꼬리"를 갖는 서열($\Delta 15$ 서열)은 다음과 같다:
- [0086] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (서열 번호: 6)
- [0087] 인간 ActRIIB 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 하기에 나타내며(서열 번호: 7), 이는 Genbank 기준 서열 NM_001106.3의 뉴클레오티드 25-1560로 구성되며, 이것은 ActRIIB 전구체의 아미노산 1-513를 인코딩한다. 나타낸 바와 같이, 서열은 위치 64에 아르기닌을 제공하며, 대신 알라닌을 제공하기 위하여 변형될 수 있다. 신호 서열은 밑줄로 표시된다.
- [0088] 1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
- [0089] 51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
- [0090] 101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
- [0091] 151 GCGGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
- [0092] 201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
- [0093] 251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
- [0094] 301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
- [0095] 351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCG ACAGCCCCCA
- [0096] 401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTTC
- [0097] 451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCTA
- [0098] 501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
- [0099] 551 TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
- [0100] 601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
- [0101] 651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
- [0102] 701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
- [0103] 751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
- [0104] 801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
- [0105] 851 GGAACGAACT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTCACGAGG CCTTCATAC
- [0106] 901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
- [0107] 951 TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
- [0108] 1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGCTG TTCGATTTGA GCCAGGGAAA
- [0109] 1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
- [0110] 1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
- [0111] 1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC

- [0112] 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
- [0113] 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA
- [0114] 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTGAAACA CCCGGGCCTG
- [0115] 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
- [0116] 1401 TCGCTTGTC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
- [0117] 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
- [0118] 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (서열 번호: 7)

[0119] 프로세스된 세포의 인간 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 다음과 같다 (서열 번호: 8).

- [0120] 1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAATG
- [0121] 51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
- [0122] 101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GCGCAACAG CTCTGGCACC
- [0123] 151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA ACTGCTACGA
- [0124] 201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT
- [0125] 251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
- [0126] 301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC

[0127] (서열 번호:8)

[0128] 나타낸 바와 같이, 서열은 위치 64에 아르기닌을 제공하며, 대신 알라닌을 제공하기 위하여 변형될 수 있다.

[0129] 인간 ActRIIB 세포의 도메인과 인간 ActRIIA 세포의 도메인의 아미노산 서열 배열은 도 1에 도시된다. 이 정렬은 ActRII 리간드에 직접적으로 접촉하는 것으로 보이는 두 수용체 안에 아미노산 잔기들을 나타낸다. 예를 들면, 상기 복합 ActRII 구조에서 ActRIIB-리간드 결합 포켓은 잔기 Y31, N33, N35, L38 내지 T41, E47, E50, Q53 내지 K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 내지 N83, Y85, R87, A92, 및 E94 내지 F101에 의해 부분적으로 한정됨을 나타낸다. 이들 위치에서, 보존 돌연변이가 용인될 것으로 예상된다.

[0130] 또한, ActRIIB는 척추동물간에 일반적으로 잘-보존되며, 세포의 도메인의 큰 스트레치(stretches)는 완벽하게 보존된다. 예를 들면, 도 2는 다양한 ActRIIB 오르소로그(orthologs)와 비교하여 인간 ActRIIB 세포의 도메인의 다중-서열 배열을 도시한다. ActRIIB에 결합하는 많은 리간드들이 매우 보존되어 있다. 따라서, 이들 배열로부터, ActRIIB-리간드 결합의 정상적 활성에 중요한 리간드 결합 도메인 안에 주요 아미노산 위치를 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 정상 ActRIIB-리간드 결합 활성을 크게 변화시키지 않으면서 치환을 용인할 수 있는 아미노산 위치를 예측할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 활성을 가진 인간 ActRIIB 변이체 폴리펩티드는 다른 척추 동물 ActRIIB의 서열의 상응하는 위치에 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 인간 또는 다른 척추 동물 서열에서와 유사한 잔기를 포함 할 수 있다.

[0131] 다음 실시예들은 활성 ActRIIB 변이체를 정의하는 접근법을 설명하지만, 이에 제한하고자 함은 아니다. 인간 세포의 도메인 (서열 번호: 2)의 L46은 제노푸스(*xenopus*) ActRIIB (서열 번호: 42)에서 발린이며, 따라서 이 위치는 변경될 수 있고, 임의선택적으로 또다른 소수성 잔기, 이를 테면 V, I 또는 F로 변경될 수 있거나, 또는 비-극성 잔기 이를 테면 A로 변경될 수 있다. 인간 세포의 도메인에서 E52는 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 부위가 다양한 광범위한 변화, 가령, 극성 잔기, 이를 테면 E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y 그리고 아마도 A를 포함하는 변화를 용인할 것임을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 T93은 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 다양한 구조적 변이를 용인하는데, 극성 잔기, 이를 테면 S, K, R, E, D, H, G, P, G 및 Y를 선호함을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 F108은 제노푸스에서 Y이며, 따라서 Y 또는 다른 소수성 기, 이를 테면 I, V 또는 L이 용인되어야 함을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 E111은 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 D, R, K 및 H, 뿐만 아니라 Q와 N을 포함하는 하전된 잔기가 용인될 수 있음을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 R112는 제노푸스에서 K이며, 이것은 이 위치에서 R 및 H를 포함하는 염기성 잔기가 용인됨을 나타낸다. 인간 세포의 도메인에서 위치 119의 A는 상대적으로 덜 보존되며, 설치류에서는 P이고(서열 번호: 37 및 39),

제노푸스에서는 V이며, 따라서 이 위치는 기본적으로 임의의 아미노산이 용인되어야 함을 나타낸다.

- [0132] 더욱이, ActRII 단백질은 당해 분야에서 구조적/기능적 특징, 특히 리간드 결합에 관해 특징 지워져 왔다 [Attisano 등, (1992) Cell 68(1):97-108; Greenwald 등, (1999) Nature Structural Biology 6(1): 18-22; Allendorph 등, (2006) PNAS 103(20): 7643-7648; Thompson 등, (2003) The EMBO Journal 22(7): 1555-1566; 뿐만 아니라 U.S. 특허 번호: 7,709,605, 7,612,041, 및 7,842,663]. 본원의 교시 외에도, 이들 참고 문헌은 하나 또는 그 이상의 원하는 활성 (예: 리간드 결합 활성)을 보유하는 ActRII 변이체를 생성하는 방법에 대한 충분한 지침을 제공한다.
- [0133] 예를 들면, 3 개의 핑커-톡신 폴드(three-finger toxin fold)로 알려진 구조적 모티프는 타입 I 및 타입 II 수용체에 의한 리간드 결합에 중요하며, 각각의 단량체 수용체의 세포외 도메인 안에 다양한 위치에 보존된 시스테인 잔기에 의해 형성된다. [Greenwald 등, (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; 그리고 Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. 따라서, 이러한 보존된 시스테인의 가장 바깥쪽에 의해 경계가 표시되는 인간 ActRIIB의 코어 리간드-결합 도메인은 서열 번호:1 1(ActRIIB 전구체)의 29-109 위치에 상응한다. 따라서, 이러한 시스테인으로 경계가 표시되는 코어 서열에 인접한 구조적으로 덜 규칙적인 아미노산은 반드시 리간드 결합을 바꾸지 않고도 N-말단에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28개 잔기 및/또는 C-말단에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 잔기가 절두될 수 있다. N-말단 및/또는 C-말단 절두에 대한 예시적인 ActRIIB 세포외 도메인은 서열 번호: 2, 3, 5, 및 6을 포함한다.
- [0134] Attisano 등,은 ActRIIB의 세포외 도메인의 C-말단에서 프롤린 매듭의 결손은 액티빈에 대한 수용체의 친화력을 감소시킨다는 것을 보여 주었다. 본 서열 번호: 1의 아미노산 20-119를 함유하는 ActRIIB-Fc 융합 단백질, "ActRIIB(20-119)-Fc"는 ActRIIB(20-134)-Fc와 비교하여 GDF11 및 액티빈에 감소된 결합을 가지며, 이는 프롤린 매듭 영역과 완벽한 막에 인접한(juxtamembrane) 도메인을 포함한다 (가령, U.S. 특허 번호. 7,842,663 참조). 그러나, ActRIIB(20-129)-Fc 단백질은 비록 프롤린 매듭 영역이 파괴되었지만, 야생형에 비교하여 유사하지만, 다소 감소된 활성을 유지한다. 따라서, 아미노산 134, 133, 132, 131, 130 및 129 (서열 번호: 1에 대하여)에서 종료되는 ActRIIB 세포외 도메인은 모두 활성인 것으로 예상되지만, 134 또는 133에서 종료되는 구조체는 대부분 활성일 것이다. 유사하게, 잔기 129-134(서열 번호: 1에 대하여)중 임의의 위치에서 돌연변이는 큰 폭으로 리간드-결합 친화력을 변경시키지 않을 것으로 예상된다. 이를 뒷받침하는 것으로, P129 및 P130 (서열 번호: 1에 대하여)의 돌연변이는 실질적으로 리간드 결합을 감소시키지 않는 것으로 알려져있다. 따라서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 아미노산 109 (최종 시스테인)와 같이 빨리 종료될 수 있지만, 그러나, 109와 119에서 또는 그 사이 (가령, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 또는 119)에서 종료되는 형태는 감소된 리간드 결합을 갖는 것으로 예상된다. 아미노산 119 (서열 번호: 1에 대하여)은 잘 보존되지 않고, 따라서 용이하게 변경 또는 절두된다. 128 (서열 번호: 1에 대하여)에서 또는 그 이후에 종료되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 리간드-결합 활성을 유지해야만 한다. 서열 번호: 1에 대하여 119와 127에서, 또는 그 사이 (가령, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 또는 127)에서 종료되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 중간 결합 능력을 가질 것이다. 이들중 임의의 것은 임상 또는 실험 환경에 따라 바람직하게 사용될 수 있다.
- [0135] ActRIIB의 N-말단에서, 아미노산 29 또는 그 전에 (서열 번호: 1에 대하여) 시작하는 단백질은 리간드-결합 활성을 보유하는 것으로 예상된다. 아미노산 29는 초기 시스테인을 나타낸다. 위치 24 (서열 번호: 1에 대하여)에서 알라닌-에서-아스파라긴으로의 돌연변이는 리간드 결합에 실질적인 영향없이 N-연계된 당화 서열을 도입한다[U.S. 특허 번호. 7,842,663]. 이로써 신호 절단(cleavage) 펩티드와 아미노산 20-29에 상응하는 시스테인 교차(cross)-연계된 영역에서 돌연변이는 잘 용인된다는 것이 확인된다. 구체적으로, 위치 20, 21, 22, 23, 및 24 (서열 번호: 1에 대하여)에서 시작하는 ActRIIB 폴리펩티드들은 전반적으로 리간드-결합 활성을 유지해야만 하고, 및 위치 25, 26, 27, 28, 및 29 (서열 번호: 1에 대하여)에서 시작하는 ActRIIB 폴리펩티드들 또한 리간드-결합 활성을 유지하는 것으로 예상된다. 22, 23, 24, 또는 25에서 시작되는 ActRIIB 구조체가 최고 활성을 가질 것이라고 가령, U.S. 특허 번호. 7,842,663에서 설명하고 있다.
- [0136] 이와 함께, ActRIIB의 일반적인 활성 부분(가령, 리간드-결합 부분)은 서열 번호: 1의 아미노산 29-109를 포함한다. 따라서 ActRIIB 폴리펩티드들은 예를 들면, 서열 번호: 1의 아미노산 20-29중 임의의 하나에 대응하는 잔기 (가령, 서열 번호: 1의 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 임의의 하나의 아미노산 109-134에 대응하는 잔기 (가령, 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나에서 끝나는)에서 끝나는 ActRIIB의 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성될 수 있다. 다른 예로는 서열 번호: 1의 위치 20-29 (가령, 위치 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나) 또는 21-29 (가령, 위치 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나)에서 시작하고, 위치 119-134 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나), 119-133 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 또는 133중 임의의 하나), 129-134 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134), 또는 129-133 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 또는 133중 임의의 하나)에서 끝나는 폴리펩티드들을 포함한다. 다른 예로는 서열 번호: 1의 위치 20-24 (가령, 위치 20, 21, 22, 23, 또는 24중 임의의 하나), 21-24 (가령, 위치 21, 22, 23, 또는 24중 임의의 하나), 또는 22-25 (가령, 위치 22, 23, 24, 또는 25중 임의의 하나)에서 시작하고, 109-134 (가령, 위치 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나), 119-134 (가령, 위치 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나) 또는 129-134 (가령, 위치 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나)에서 종료되는 구조체들을 포함한다. 이 범위 안에 변이체들, 특히, 서열 번호: 1의 대응하는 부분에 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 변이체들이 특히 고려된다.

[0137] 본 명세서에 설명된 변형은 다양한 방식으로 결합될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ActRIIB 변이체는 리간드-결합 포켓 안에 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15개의 보존 아미노산을 포함하고, 리간드-결합 포켓에서 위치 40, 53, 55, 74, 79 및/또는 82에 0, 1, 또는 그 이상의 비-보존 변경을 포함한다. 가변성이 특히 잘 용인될 수 있는 결합 포켓 외부의 위치는 세포외 도메인의 아미노 및 카르복시 말단 (상기 언급 한 바와 같음) 및 위치 42-46 및 65-73 (서열 번호: 1과 관련)을 포함한다. 위치 65에서 아스파라긴에서-알라닌으로의 변경 (N65A)은 A64 배경에서 리간드 결합을 실질적으로 개선시키고, 따라서 R64 배경에서 리간드 결합에 유해한 효과를 가지지 않는 것으로 예상된다[U.S. 특허 번호. 7,842,663]. 이 변화는 아마도 A64 배경에서 N65의 당화를 제거하여, 이 영역에서의 중요한 변화가 용인될 수 있음을 보여준다. R64A 변화가 잘 용인되지는 않지만, R64K는 잘 용인되고, 따라서 H와 같은 또 다른 염기성 잔기는 64 번 위치에서 용인될 수 있다[U.S. 특허 번호. 7,842,663]. 추가적으로, 당업계에 기술된 돌연변이 유발 프로그램의 결과는 ActRIIB에서 종종 보존에 유의한 아미노산 위치들이 있음을 나타낸다. 서열 번호: 1에 있어서, 이들은 위치 80 (산성 또는 소수성 아미노산), 위치 78 (소수성, 특히 트립토판), 위치 37 (산성, 특히 아스파르트산 또는 글루탐산), 위치 56 (염기성 아미노산), 위치 60 (소수성 아미노산, 특히 페닐알라닌 또는 티로신)을 포함한다. 따라서, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드들에서 보존될 수 있는 아미노산 틀을 제공한다. 보존되는 것이 바람직할 수 있는 기타 위치는 다음과 같다: 모두 서열 번호:1에 대하여 위치 52 (산성 아미노산), 위치 55 (염기성 아미노산), 위치 81 (산성), 98 (극성 또는 하전된, 특히 E, D, R 또는 K).

[0138] ActRIIB 세포외 도메인에 N-연계된 당화 부위 (N-X-S/T)를 추가 첨가하는 것이 잘 용인된다는 것은 이미 입증되었다(가령, U.S. 특허 번호. 7,842,663 참조). 따라서, N-X-S/T 서열은 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드에서도 1에 정의된 리간드 결합 포켓의 밖에 있는 위치로 일반적으로 도입될 수 있다. 비-내인성 N-X-S/T 서열의 도입에 특히 적합한 부위에는 (서열 번호: 1에 대하여) 아미노산 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 또는 129-134가 포함된다. N-X-S/T 서열은 상기 ActRIIB 서열과 Fc 도메인 또는 기타 융합 성분 사이에 있는 링커 안으로 또한 도입될 수 있다. 이러한 부위는 기존 S 또는 T에 대하여 정확한 위치에 N을 도입함으로써, 또는 기존 N에 대하여 정확한 위치에 S 또는 T를 도입함으로써 최소한의 노력으로 도입될 수 있다. 따라서, N-연계된 당화 부위를 만들어낼 수 있는 바람직한 바람직한 변경은 다음과 같다: A24N, R64N, S67N (N65A 변경과 복합되는 것도 가능하다), E105N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S 및 R112T (서열 번호: 1에 대하여). 당화될 것으로 예측되는 임의의 S는 당화에 의해 제공되는 보호 때문에 면역원성 부위를 생성하지 않고, T로 변형될 수 있다. 유사하게, 당화될 것으로 예측되는 임의의 T는 S로 변경될 수 있다. 따라서, 변경 S67T 및 S44T (서열 번호: 1에 대하여)가 고려된다. 유사하게, A24N 변이체에서, S26T 변경이 이용될 수 있다. 따라서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 상기에서 기술된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 추가, 비-내인성 N-연계된 당화 콘센수스 서열을 보유한 변이체일 수 있다.

[0139] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하는 ActRIIB 길항제에 관계하며, 여기에는 이의 단편들, 기능성 변이체들 그리고 변형된 형태들이 포함된다. 바람직하게는 본 명세서에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 가용성이다 (가령, ActRIIB의 세포외 도메인). 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드들[가령,

GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, 및/또는 BMP10의 활성화(가령, Smad 신호생성 억제)을 억제(길항)한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서에 따라 사용되는 ActRIIB 폴리펩티드들은 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드들[가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 액티빈 E) BMP6, GDF3, BMP10, 및/또는 BMP9]의 활성화(가령, Smad 신호생성 억제)에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1의 아미노산 20-29에 대응하는 잔기 (가령, 서열 번호: 1의 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29중 임의의 하나에서 시작)에서 시작하고, 서열 번호: 1의 아미노산 109-134에 대응하는 위치 (가령, 아미노산 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 134중 임의의 하나에서 종료되는)에서 종료되는 ActRIIB의 부분에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호:1의 아미노산 29-109에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되며, 이때 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치는 산성 아미노산 (자연 발생적 산성 아미노산 D 및 E 또는 인공적인 산성 아미노산)이다. 특정 바람직한 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호:1의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 일부 바람직한 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호:1의 아미노산 25-131에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되며, 이때 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치는 산성 아미노산이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 45, 50, 53, 54, 및 58중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성된다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 45, 50, 53, 54, 및 58중 임의의 하나의 아미노산 서열에 대하여 최소한 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되며, 이때 서열 번호: 1의 L79에 상응하는 위치는 산성 아미노산이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 최소한 하나의 ActRIIB 폴리펩티드를 포함하며, 이때 서열 번호: 1의 L79에 대응하는 위치의 아미노산은 산성 아미노산이 아니다 (가령, 자연 발생적 D 또는 E 아미노산 잔기가 아니거나, 또는 인공적인 산성 아미노산이 아니다).

[0140] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 GDF 트랩 폴리펩티드 ("GDF 트랩"으로도 또한 지칭됨)에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 GDF 트랩은 ActRIIB 폴리펩티드 (가령, "야생형" 또는 변형안된 ActRII 폴리펩티드)의 세포외 도메인 (리간드-결합 도메인으로도 또한 지칭됨)에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이 (가령, 아미노산 추가, 결손, 치환, 및 이의 조합)를 포함하는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드이며, 이러한 변이체 ActRIIB 폴리펩티드는 상응하는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드보다 더 하나 또는 그 이상의 변경된 리간드-결합을 보유한다. 바람직한 구체예들에서, 본 명세서의 GDF 트랩 폴리펩티드는 상응하는 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 적어도 하나의 유사한 활성을 유지한다. 예를 들면, 바람직한 GDF 트랩은 GDF11 및/또는 GDF8에 결합하여, 이의 기능을 억제(가령, 길항)한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 GDF 트랩은 TGF-베타 슈퍼패밀리의 하나 또는 그 이상의 리간드에 결합하여, 이를 억제한다. 따라서, 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드에 대한 변경된 결합 특이성을 갖는 GDF 트랩 폴리펩티드를 제공한다.

[0141] 설명을 위하여, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB-결합 리간드, 이를 테면 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, 및/또는 액티빈 E), 구체적으로 액티빈 A보다 GDF11 및/또는 GDF8에 대한 변경된 리간드-결합 도메인의 선택성을 증가시키도록, 하나 또는 그 이상의 돌연변이가 선택될 수 있다. 임의선택적으로, 상기 변경된 리간드-결합 도메인은 GDF11 및/또는 GDF8에 결합하는 K_d 와 액티빈에 결합하는 K_d 비율이 야생형 리간드-결합 도메인에 대한 비율과 비교하여 적어도 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100-또는 심지어 1000-배 더 크다. 임의선택적으로

로, 상기 변경된 리간드-결합 도메인은 GDF11 및/또는 GDF8을 저해하는 IC₅₀ 와 액티빈을 저해하는 IC₅₀ 비율이 야생형 리간드-결합 도메인과 비교하여 적어도 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100-또는 심지어 1000-배 더 크다. 임의선택적으로, 상기 변경된 리간드-결합 도메인은 액티빈 (가령, 액티빈 A)을 저해하는 IC₅₀ 보다, 적어도 2-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100-또는 심지어 1000-배 더 적은 IC₅₀로 GDF11 및/또는 GDF8을 저해한다.

[0142] 특정 바람직한 구체예들에서, 본 명세서의 GDF 트랩은 GDF11 및/또는 GDF8 (미오스타틴으로도 또한 공지됨)에 선호적으로 결합하도록 기획된다. 임의선택적으로, GDF11 및/또는 GDF8-결합 트랩은 액티빈 B에 더 결합할 수 있다. 임의선택적으로, GDF11 및/또는 GDF8-결합 트랩은 BMP6에 더 결합할 수 있다. 임의선택적으로, GDF11 및/또는 GDF8-결합 트랩은 BMP10에 더 결합할 수 있다. 임의선택적으로, GDF11 및/또는 GDF8-결합 트랩은 액티빈 B 및 BMP6에 더 결합할 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 명세서의 GDF 트랩은 가령, 야생형 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하였을 때, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 A/B, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E)에 대한 감소된 결합 친화력을 보유한다. 특정 바람직한 구체예들에서, 본 명세서의 GDF 트랩 폴리펩티드는 액티빈 A에 대한 감소된 결합 친화력을 보유한다.

[0143] 상기 ActRIIB 단백질의 아미노산 잔기 (가령, E39, K55, Y60, K74, W78, L79, D80, 및 F101)는 상기 ActRIIB 리간드-결합 포켓 안에 있고, 예를 들면, 액티빈 A, GDF11, 및 GDF8을 비롯한 이의 리간드에 대한 중재된 결합을 지원한다. 따라서, 본 명세서는 이들 아미노산 잔기에 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함하는 ActRIIB 수용체의 변경된-리간드 결합 도메인 (가령, GDF8/GDF11-결합 도메인)을 포함하는 GDF 트랩 폴리펩티드를 제공한다.

[0144] 구체적 예로써, ActRIIB의 리간드-결합 도메인의 양으로-하전된 아미노산 잔기 Asp (D80)는 상이한 아미노산 잔기로 돌연변이되어, 액티빈에는 결합하지 않고, GDF8에 선호적으로 결합하는 GDF 트랩 폴리펩티드를 만들 수 있다. 바람직하게는, 서열 번호: 1에 대하여 D80 잔기는 하전안된 아미노산 잔기, 음성 아미노산 잔기, 및 소수성 아미노산 잔기로 구성된 군에서 선택된 아미노산 잔기로 변경된다. 추가 특정 예로써, 서열 번호: 1의 소수성 잔기 L79는 변경된 액티빈-GDF11/GDF8 결합 성질을 부여하기 위하여, 변경될 수 있다. 예를 들면, L79P 치환은 액티빈 결합보다 더 큰 정도로 GDF11 결합을 감소시킨다. 대조적으로, L79을 산성 아미노산 [아스파르트산 또는 글루탐산; L79D 또는 L79E 치환]으로 치환하면 GDF11 결합 친화력은 유지하면서 액티빈 A 결합 친화력은 상당히 감소된다. 예시적인 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 방법은 GDF 트랩 폴리펩티드를 이용하는 데, 이는 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 아미노산 치환, 추가, 또는 결손과 복합되어, 서열 번호: 1의 위치 79에 상응하는 위치에서 산성 아미노산 (가령, D 또는 E)을 포함하는 변이체 ActRIIB 폴리펩티드이다.

[0145] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서는 치료 효과 또는 안정성을 강화시킬 목적으로(가령, 반감기 증가 및/또는 단백질분해에 대한 저항성 증가), ActRIIB 폴리펩티드의 구조를 변경시켜 기능적 변이체의 제조를 고려한다. 아미노산 치환, 결손, 추가, 또는 이의 조합들에 의해 변이체들이 만들어질 수 있다. 예를 들면, 류신을 이소류신 또는 발린으로 치환, 아스파르테이트를 글루탐산염으로 치환, 트레오닌을 세린으로 치환, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산 (가령, 보존 돌연변이)으로 단리된 치환은 생성 분자의 생물학적 활성에 주요한 영향을 주지 않을 것으로 합리적으로 예측할 수 있다. 보존 치환은 아미노산 측쇄가 관련된 아미노산 패밀리 안에서 일어나는 것이다. 본 명세서의 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화로 기능적 동소체가 생성되는 지의 여부는 생성된 변이체 폴리펩티드가 이의 야생형 폴리펩티드와 유사한 방식으로 세포 안에서 반응을 만드는 능력, 또는 예를 들면, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty를 포함하는 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 리간드들에 결합하는 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0146] 특정 구체예들에서, 본 명세서는 상기 폴리펩티드의 당화를 변경하기 위해 ActRIIB 폴리펩티드의 특정한 돌연변이를 고려한다. 이러한 돌연변이는 하나 또는 그 이상의 당화 부위, 이를 테면 O-연계된 또는 N-연계된 당화 부위를 도입 또는 제거하도록 선택될 수 있다. 아스파라긴-연계된 당화 인지 부위는 일반적으로 적절한 세포의 당화 효소에 의해 특이적으로 인지되는 삼펩티드 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린 (여기서 "X"는 임의의 아미노산임)이다. 이러한 변경은 하나 또는 그 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 상기 폴리펩티드(O-연계된 당화 부위의 경우)에 추가 또는 치환시켜 만들 수도 있다. 당화 인지 부위의 제1 또는 제3 아미노산 위치중 하나 또는 둘 모두에서 다양한 아미노산 치환 또는 결손 (및/또는 제 2 위치에서 아미노산 결손)으로 변형된 삼펩티드(tripeptide) 서열에서 비-당화가 초래된다. 폴리펩티드의 탄소화물 모이어티의 수를

증가시키는 또다른 수단은 상기 단백질에 화학 또는 효소적으로 글리코시드를 결합시키는 것이다. 이용되는 결합 방식에 따라, 이들 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 자유 카르복실기; (c) 자유 술폰히드릴기, 이를 테면 시스테인의 기; (d) 자유 히드록실 기, 이를 테면 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린; (e) 방향족 잔기, 이를 테면 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 기; 또는 (f) 글루타민의 아미드 기에 부착될 수 있다. 폴리펩티드 상에 있는 하나 또는 그 이상의 탄수화물 모이어티는 화학적 및/또는 효소적으로 제거될 수 있다.

화학적 탈당화는 예를 들면, 트리플루오로메탄설폰산 또는 이에 등가의 화합물에 대한 폴리펩티드의 노출을 필요할 수 있다. 이 처리는 아미노산 서열을 손상시키지 않으면서, 연계당 (N-아세틸 글루코사민 또는 N-아세틸 갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당을 절단하게 된다. 폴리펩티드상의 탄수화물 모이어티의 효소 절단은 Thotakura 등, [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]에서 설명된 바와 같이, 다양한 엔도-및 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 이루어질 수 있다. 포유류, 효모, 곤충 및 식물 세포는 모두 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 당화 패턴을 도입시킬 수 있기 때문에 폴리펩티드의 서열은 이용되는 발현계 유형에 따라 적절하게 조정될 수 있다. 일반적으로, 인간에 사용하기 위한 본 명세서의 폴리펩티드는 적절한 당화를 제공하는 포유류 세포계, 이를 테면 HEK293 또는 CHO 세포계에서 발현될 수 있지만, 다른 포유류 발현 세포계 또한 마찬가지로 유용할 것으로 예상된다.

[0147] 본 명세서는 돌연변이체, 특히 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드 복합 돌연변이체, 뿐만 아니라 절두 돌연변이체를 만드는 방법을 더 고려한다. 복합 돌연변이체의 푸울은 기능적으로 활성인 (가령, TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드 결합) ActRIIB 서열을 동정하는데 특히 유용하다. 이러한 복합 라이브러리들을 스크리닝하는 목적은 변경된 성질, 이를 테면 변경된 약동학적 또는 변경된 리간드 결합을 갖는 폴리펩티드 돌연변이체를 만들기 위함일 수도 있다. 다양한 스크리닝 분석이 하기에 제공되며, 이러한 분석을 이용하여 변이체들을 평가할 수 있다. 예를 들면, TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드가 TGF-베타 슈퍼패밀리 수용체에 결합하는 것을 저지하기 위하여, 및/또는 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드에 의해 야기되는 신호생성을 간섭하기 위하여, 하나 또는 그 이상의 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 AC, nodal, 교질 세포-유도된 신경 영양 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty)에 결합하는 능력으로 ActRIIB 변이체는 스크리닝될 수 있다.

[0148] ActRIIB 폴리펩티드의 활성은 예를 들면, 세포-기반 또는 생체내 분석에서 또한 테스트될 수 있다. 예를 들면, 골수섬유증 예민함과 관련된 유전자의 발현에 있어서 ActRIIB 폴리펩티드의 효과가 평가될 수 있다. 이것은 필요에 따라, 하나 또는 그 이상의 재조합 ActRII 리간드 단백질 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, nodal, 교질 세포-유도된 신경 영양 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty) 존재하에서 실행될 수 있고, 그리고 세포는 ActRIIB 폴리펩티드, 및 임의선택적으로, ActRIIB 리간드를 생산하기 위하여 형질감염될 수 있다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드는 마우스 또는 다른 동물에게 투여될 수 있으며, 당분야-인지된 방법들을 이용하여 골수섬유증에서 효과가 평가될 수 있다. 유사하게, ActRIIB 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 세포의 성장에 임의의 효과에 대하여, 예를 들면, 본 명세서에서 설명된 바와 같이 분석과 당분야의 공통적인 지식에 의해 테스트될 수 있다. SMAD-반응성 리포터 유전자를 이러한 세포계에서 이용하여 하류 신호생성에 대한 효과를 모니터링할 수 있다.

[0149] 기준 ActRIIB 폴리펩티드와 비교하여 선택성이 증가된 또는 전반적으로 효능이 증가된 복합-유도된 변이체가 만들어질 수 있다. 이러한 변이체들은 재조합 DNA 구조체로부터 발현될 때, 유전자 요법 프로토콜에 이용될 수 있다. 돌연변이유발은 대응하는 변형안된 ActRIIB 폴리펩티드와 상당히 상이한 세포내 반감기를 갖는 변이체를 만들 수 있다. 예를 들면, 변형된 단백질은 변형되지 않은 폴리펩티드의 파괴 또는 그렇지 않으면 불활성화를 초래하는 단백질분해 또는 다른 세포 과정에 더 안정적이거나 덜 안정적이될 수 있다. 이러한 변이체 및 이들을 코딩하는 유전자는 폴리펩티드의 반감기를 조절함으로써 폴리펩티드 복합체 수준을 변경 시키는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 짧은 반감기는 더욱 일시적인 생물학적 효과를 일으킬 수 있고, 유도성 발현 시스템의 일부는 세포 안에 재조합 폴리펩티드 복합체 수준을 더 엄밀하게 조절할 수 있다. Fc 융합 단백질에서, ActRIIB 폴리펩티드의 반감기를 변경하기 위하여, 링커(존재한다면) 및/또는 Fc 부분에 돌연변이를 만들 수 있다.

[0150] 잠재적 ActRIIB 서열의 최소한 일부분을 포함하는 각 폴리펩티드의 라이브러리를 인코딩하는 유전자의 축중 라이브러리에 의해 복합 라이브러리가 만들어질 수 있다. 예를 들면, 합성 올리고뉴클레오티드의 혼합물은 유전자 서열에 효소적으로 결합되어, 잠재적 ActRIIB를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 축중 세트는 개별 폴리펩티

드로 발현되거나, 또는 대안으로, 더 큰 융합 단백질 (가령, 파아지 디스플레이의 경우)로 발현가능하다.

[0151] 잠재적 상동체(homologs)의 라이브러리는 축중 올리고뉴클레오티드 서열로부터 만들어질 수 있는 많은 방법들이 있다. 축중(degenerate) 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기에서 실행될 수 있고, 그 다음 합성 유전자는 적절한 발현 벡터 안에 결합될 수 있다. 축중 올리고뉴클레오티드 합성은 당분야에 공지되어 있다 [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; and Ike *et al.* (1983) Nucleic Acid Res. 11:477]. 이러한 기술은 다른 단백질의 유도된 진화에 이용되어 왔다 [Scott 등, (1990) Science 249:386-390; Roberts 등, (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin 등, (1990) Science 249: 404-406; Cwirla 등, (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; 뿐만 아니라 U.S. 특허 번호: 5,223,409, 5,198,346, 및 5,096,815].

[0152] 대안으로, 다른 형태의 돌연변이유발을 이용하여 조합 라이브러리를 만들 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드가 만들어지고, 예를 들면, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 이용한 스크리닝[가령, Ruf 등, (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang 등, (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint 등, (1993) Gene 137:109-118; Grodberg 등, (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima 등, (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowam 등, (1989) Science 244:1081-1085], 링커 스캐닝 돌연변이유발 [가령, Gustin 등, (1993) Virology 193:653-660; 그리고 Brown 등, (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight 등, (1982) Science 232:316], 포화 돌연변이유발 [가령, Meyers 등, (1986) Science 232:613]; PCR 돌연변이유발 [가령, Leung 등, (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19]; 또는 화학적 돌연변이유발을 포함하는 무작위 돌연변이유발 [가령, Miller 등, (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 그리고 Greener 등, (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34]에 의해 단리될 수 있다. 링커 스캐닝 돌연변이유발은 특히 복잡한 환경에서 ActRIIB 폴리펩티드의 절두된 (생활성) 형태를 확인하는 매력적인 방법이다.

[0153] 점 돌연변이 및 절두에 의해 만들어진 복합 라이브러리의 유전자 산물을 스크리닝하기 위한, 그리고 이와 같은 경우, 특정 성질을 갖는 유전자 산물의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 광범위한 기술이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 기술은 ActRIIB 폴리펩티드의 복합 돌연변이유발에 의해 생성된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝에 일반적으로 적합할 것이다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하는 가장 광범위하게 이용되는 기술은 전형적으로 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터에 클로닝하고, 적절한 세포를 벡터의 생성 라이브러리로 형질전환시키고, 원하는 활성의 탐지는 해당 유전자의 산물이 탐지되는 해당 유전자를 인코딩하는 벡터를 상대적으로 용이하게 단리할 수 있는 조건하에 복합 유전자를 발현시키는 것을 포함한다. 바람직한 분석에는 TGF-베타 리간드 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, nodal, 신경아교세포-유도된 신경영양성 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty) 결합 분석 및/또는 TGF-베타 슈퍼패밀리 리간드-매개된 세포 신호생성 분석이 포함된다.

[0154] 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 본원에 기술된 돌연변이, 변이체 또는 변형의 대부분은 핵산 수준에서, 또는 경우에 따라, 해독후(post-translational) 변형 또는 화학 합성에 의해 만들어 질 수 있다. 이러한 기술은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 그 중 일부는 본 명세서에 기술되어 있다. 부분적으로, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드의 기능적 활성 부분 (단편) 및 변이체를 동정하고, 이는 본원에 기술된 본 발명의 범위 내에서 다른 변이체 ActRIIB 폴리펩티드를 생성 및 사용하기 위한 지침으로서 사용될 수 있다.

[0155] 특정 구체예들에서, 본 발명의 ActRIIB 폴리펩티드의 기능적으로 활성 단편은 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 상응하는 단편 (가령, 서열 번호: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 및 62)으로부터 재조합적으로 생산된 폴리펩티드를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 추가적으로, 단편은 이를 테면, 통상의 Merrifield 고체상 f-Moc 또는 t-Boc 화학과 같은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 상기 단편들이 생성되고 (재조합적으로 또는 화학 합성에 의해), 그리고 ActRII 수용체 및/또는 하나 또는 그 이상의 리간드 (가령, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, nodal, 교질 세포-유도된 신경 영양 인자 (GDNF), 뉴르투린, 아르테민, 페르세핀, MIS, 및 Lefty)의 길항제 (억제제)로 기능을 할 수 있는 이들 펩티드 단편을 식별하기 위하여 테스트될 수 있다.

- [0156] 특정 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 것에 대하여 해독후-변형을 더욱 포함할 수 있다. 이러한 변형은 아세틸화, 카르복실화, 당화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그 결과, ActRIIB 폴리펩티드는 비-아미노산 원소, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 다당류 또는 단당류 및 인산염을 포함한다. 기타 ActRIIB 변이체의 기능에 대하여 본 명세서에 기재된 바와 같이, 리간드 트랩 폴리펩티드의 기능에서 이러한 비-아미노산 요소들의 효과를 테스트할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드가 초기 형태(nascent form)의 폴리펩티드를 절단함으로써 세포에서 생산되는 경우, 해독후-가공은 또한 단백질의 정확한 폴딩 및/또는 기능에 중요할 수 있다. 상이한 세포들 (가령, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)은 이러한 해독후 활성화에 대하여 특이적 세포 기전 및 특징들을 보유하고, 그리고 ActRIIB 폴리펩티드의 정확한 변형 및 프로세싱을 확보하도록 선택될 수 있다.
- [0157] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 ActRIIB 폴리펩티드의 부분 (도메인) 및 하나 또는 그 이상의 이종성 부분 (도메인)을 갖는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 융합 도메인의 잘 알려진 예로는 폴리히스티딘, Glu-Glu, 글루타티온 S-전달효소 (GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 (Fc), 말토즈 결합 단백질 (MBP), 또는 인간 혈청 알부민을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 특성을 부여하도록 선택될 수 있다. 예를 들면, 일부 융합 도메인은 친화력 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리에 특히 유용하다. 친화력 정제를 목적으로, 친화력 크로마토그래피를 위한 관련 매트릭스, 이를 테면 글루타티온-, 아밀라제-, 및 니켈-또는 코발트-접합된 수지가 이용된다. 이러한 매트릭스중 많은 것들이 "키트" 형태로 이용가능한데, 이를 테면 Pharmacia GST 정제 시스템 및 (His)₆ 융합 짝과 함께 유용한 QIAexpress™ 시스템(Qiagen)이 있다. 또다른 예로써, 상기 ActRIIB 폴리펩티드의 탐지를 용이하게 하기 위하여 융합 도메인이 선택될 수 있다. 이러한 탐지 도메인의 예로는 다양한 형광 단백질 (가령, GFP) 뿐만 아니라 "에피토프 태그"를 포함하는데, 특이적 항체가 이용가능한 짧은 펩티드 서열이 일반적이다. 특정 단백질 항체에 용이하게 이용되는 잘 공지된 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 (HA), 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우에서 융합 도메인은 프로테아제 절단 부위, 이를 테면 인자(factor) Xa 또는 트롬빈에 대한 절단부위를 가지고, 이에 의해 관련 프로테아제가 이 융합 단백질을 부분적으로 절단하고, 이로 인하여 이로부터 재조합 단백질이 유리된다. 유리된 단백질은 후속 크로마토그래피 분리에 의해 융합 단백질로부터 단리될 수 있다. 선택될 수 있는 다른 유형의 융합 도메인은 예를 들어, 면역 글로불린 (예를 들어, Fc 도메인)으로부터의 불변 도메인을 비롯한 다중 도메인화 (예를 들어, 이량체화, 사량체화) 도메인 및 기능적 도메인 (추가적인 생물학적 기능을 부여하는)을 포함한다.
- [0158] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드를 "안정시킬 수" 있는 하나 또는 그 이상의 변형을 내포한다. "안정화(stabilizing)"란 파괴 감소, 신장의 제거 감소 또는 약물의 다른 약물동태 (pharmacokinetic) 효과로 인한 것인지에 무관하게, 시험관내 반감기, 혈청 반감기를 증가시키는 임의의 것을 의미한다. 예를 들면, 이러한 변형은 폴리펩티드의 반감기를 강화시키고, 폴리펩티드의 순환 반감기를 강화시키고 및/또는 폴리펩티드의 단백질분해를 감소시킨다. 이러한 안정화 변형에는 융합 단백질 (예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드 도메인 및 안정화제 도메인을 포함하는 융합 단백질), 당화 부위의 변형 (예를 들면, 본 명세서의 폴리펩티드에 당화 부위 추가 포함), 및 탄수화물 모이어티의 변형 (예를 들면, 본 명세서의 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티 제거 포함)이 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "안정화제 도메인(stabilizer domain)"은 융합 단백질인 경우 융합 도메인 (가령, 면역글로불린 Fc 도메인)만을 지칭하는 것이 아니고, 뿐만 아니라 비단백질성(nonproteinaceous) 변형 이를 테면 탄수화물 모이어티, 또는 비단백질성 모이어티, 이를 테면 폴리에틸렌 글리콜을 또한 포함한다. 특정 바람직한 구체예들에서, ActRIIB 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드 ("안정화" 도메인)를 안정화시키는 이종성 도메인, 바람직하게는 상기 폴리펩티드의 생체내 안정성을 증가시키는 이종성 도메인과 융합된다. 면역글로불린의 불변 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)과의 융합은 광범위한 단백질에 바람직한 약물 동태 학적 성질을 부여하는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민과의 융합은 바람직한 성질을 부여 할 수 있다.
- [0159] 인간 IgG1의 Fc 부분(G1Fc)에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열은 하기에 예시된다 (서열 번호: 9). 점선은 힌지 영역을 나타내며, 직선은 자연 발생적 변이체를 갖는 위치를 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호:9에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다. G1Fc에서 자연 발생적 변이체는 서열 번호: 9에서 이용된 넘버링 체계에 따라 E134D 및 M136L을 포함할 수 있다(Uniprot P01857 참고).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNQKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGK
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (서열 번호: 9)
    
```

[0160]

[0161]

임의선택적으로, IgG1 Fc 도메인은 잔기, 이를 테면 Asp-265, Lys-322, 및 Asn-434에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 갖는다. 특정 경우들에서, 하나 또는 그 이상의 이들 돌연변이 (가령, Asp-265 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 IgG1 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 대한 결합 능력이 감소된다. 다른 경우들에서, 하나 또는 그 이상의 이들 돌연변이 (가령, Asn-434 돌연변이)를 갖는 돌연변이체 Fc 도메인은 야생형 IgG1 Fc 도메인과 비교하여 MHC 부류 I-관련된 Fc-수용체 (FcRN)에 결합하는 능력이 증가된다.

[0162]

인간 IgG2의 Fc 부분(G2Fc)에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열은 하기에 예시된다 (서열 번호: 10). 점선은 힌지 영역을 나타내며, 이중 밑줄은 이 서열에서 데이터 베이스가 충돌하는 위치를 나타낸다 (UniProt P01859). 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호:10에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

```

1  VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFPY
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PMLDSDGSGF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN HYTQKSL SLS PGK (서열 번호: 10)
    
```

[0163]

[0164]

인간 IgG3의 Fc (G3Fc)부분에 이용될 수 있는 2가지 예시 아미노산 서열을 하기에 나타낸다. G3Fc의 힌지 영역은 다른 Fc 쇄의 길이의 최대 4배가될 수 있고, 유사한 17개-잔기 세그먼트를 앞세우고, 3개의 동일한 15개-잔기 세그먼트를 포함한다. 하기에 나타낸 제 1 G3Fc 서열(서열 번호: 11)은 단일 15개-잔기 세그먼트로 구성된 짧은 힌지 영역을 포함하며, 반면 제 2 G3Fc 서열 (서열 번호: 12)은 전장 힌지 영역을 포함한다. 각 경우에서, 점선은 힌지 영역을 나타내며, 직선은 UniProt P01859에 따른 자연 발생적 변이체를 갖는 위치를 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호: 11 및 12에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

```

1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSV LTVLHQDWLN
101 GREYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFPYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSGF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (서열 번호: 11)
    
```

```

1  ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPP CPR CPEKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPP CPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISR TPE VTCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVSVLTV LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPML DSDGSGFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNR FTQ KSLSLSPGK (서열 번호: 12)
    
```

[0165]

[0166]

G3Fc (예를 들면, Uniprot P01860)에서 자연 발생적 변이체들은 서열 번호: 11에 이용된 넘버링 체계로 전환될 때 E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y를 포함하며, 본 명세서는 이들 변이 중 하나 또는 그 이상을 함유하는 G3Fc 도메인이 포함된 융합 단백질을 제공한다. 또한, 인간 면역글로불린 IgG3 유전자 (*IGHG3*)는 상이한 힌지 길이에 의해 특징화되는 구조적 다형태를 나타낸다[Uniprot P01859]. 특히,

변이체 WIS는 대부분의 V 영역과 모든 CH1 영역이 부족하다. 힌지 영역에 정상적으로 존재하는 11개에 추가하여 위치 7에 여분의 쇠간 이황화결합이 있다. 변이체 ZUC는 대부분의 V 영역, 모든 CH1 영역, 그리고 일부 힌지가 부족하다. 변이체 OMM은 대립형질 형태 또는 또다른 감마 쇠 하위부류를 나타낼 수 있다. 본 명세서에서는 하나 또는 그 이상의 이들 변이체를 함유하는 G3Fc 도메인이 포함된 추가적인 융합 단백질을 제공한다.

[0167] 인간 IgG4 (G4Fc)의 Fc 부분에 이용될 수 있는 고유한 아미노산 서열은 하기에 예시된다 (서열 번호: 13). 접선은 힌지 영역을 나타낸다. 부분적으로, 본 명세서는 서열 번호:13에 대하여 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 필수적으로 구성되거나, 또는 구성되는 폴리펩티드를 제공한다.

```

1  ESKYGPPCPSP...CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPV VTCVVVDVVSQ
51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVV DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNYHTQ KSLSLSLGK (서열 번호: 13)
    
```

[0168]

[0169] Fc 도메인 안에 다양하게 조작된 돌연변이는 G1Fc 서열 (서열 번호: 9)에 대하여 나타내며, G2Fc, G3Fc, 및 G4Fc에서 유사 돌연변이는 도 11에서 G1Fc와의 배열로부터 유도될 수 있다. 부등한(unequal) 힌지 길이로 인해, 아이소타입 정렬 (도 11)에 근거된 유사한 Fc 위치는 서열 번호: 9, 10, 11, 12 및 13에서 상이한 아미노산 번호를 소유한다. 힌지, C_H2, 및 C_H3 영역 (가령, 서열 번호: 9, 10, 11, 12, 또는 13)으로 구성된 번역글로불린 서열에서 주어진 아미노산 위치는 Uniprot 데이터베이스와 같이, IgG1 중쇄 불변 도메인 (C_H1, 힌지, C_H2, 및 C_H3 영역으로 구성됨) 전체를 포괄할 때, 동일한 위치가 아닌 상이한 번호로 확인될 것이라는 것을 또한 인지할 수 있을 것이다. 예를 들면, 인간 G1Fc 서열 (서열 번호: 9), 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 (Uniprot P01857), 및 인간 IgG1 중쇄에서 선택된 C_H3 위치 간의 대응성은 다음과 같다.

상이한 번호매김 시스템에서 C _H 3 위치에 상응		
G1Fc (힌지 영역에서 제 1 트레오닌에서 번호매김 시작)	IgG1 중쇄 불변 도메인 (C _H 1 에서 번호매김 시작)	IgG1 중쇄 (Kabat 등, 1991*의 EU 번호매김 계획)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
T144	T249	T366
L146	L251	L368
K170	K275	K392
D177	D282	D399
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409

* Kabat 등, (eds) 1991; pp. 688-696, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Vol. 1, NIH, Bethesda, MD.

[0170]

[0171] 융합 단백질의 상이한 요소 (예를 들어, 번역 글로불린 Fc 융합 단백질)는 원하는 기능성과 일치하는 임의의 방식으로 배열될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, ActRIIB 폴리펩티드 도메인은 이중성 도메인에 대해 C-말단에 놓일 수 있거나, 또는 이중 도메인은 ActRIIB 폴리펩티드 도메인에 대해 C-말단에 놓일 수 있다. ActRIIB 폴리펩티드 도메인 및 이형성 도메인은 융합 단백질에서 인접할 필요는 없으며, 어느 한 도메인 또는 도메인 사이에서 C 또는 N 말단에 추가 도메인 또는 아미노산 서열이 포함될 수 있다.

[0172] 예를 들면, ActRIIB 수용체 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 B 부분은

ActRIIB 폴리펩티드 도메인에 상응한다. 상기 A와 C 부분은 독립적으로 0, 1, 또는 하나 이상의 아미노산일 수 있고, A와 C 부분 모두 존재하는 경우 B에 대하여 이종성(heterologous)이다. 상기 A 및/또는 C 부분은 B 부분에 링커 서열을 경유하여 부착될 수 있다. 링커는 글리신 (가령, 2-10개, 2-5개, 2-4개, 2-3개 글리신 잔기)이 많거나, 또는 글리신과 프롤린 잔기가 많을 수 있고, 예를 들면, 트레오닌/세린 및 글리신의 단일 서열 또는 트레오닌/세린 및/또는 글리신의 반복 서열을 포함할 수 있고, 가령, GGG (서열 번호: 14), GGGG (서열 번호: 15), TGGGG (서열 번호: 16), SGGGG (서열 번호: 17), TGGG (서열 번호: 18), 또는 GGGGS (서열 번호: 20) 단일항, 또는 반복부를 포함할 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, ActRIIB 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 A는 리더(신호) 서열이며, B는 ActRIIB 폴리펩티드 도메인으로 구성되며, 그리고 C는 생체내 안정성, 생체내 반감기, 투입/투여, 조직 국소화 또는 분포, 단백질 복합체 형성, 및/또는 정제중 하나 또는 그 이상을 강화하는 폴리펩티드 부분이다. 특정 구체예들에 있어서, ActRIIB 융합 단백질은 A-B-C 형태로 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 A는 TPA 리더 서열이며, B는 ActRIIB 수용체 폴리펩티드 도메인으로 구성되며, 그리고 C는 면역글로불린 Fc 도메인이다. 바람직한 융합 단백질은 다음의 서열 번호: 24, 25, 28, 29, 31, 33, 34, 45, 50, 53 및 58중 임의의 하나에서 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0173] 바람직한 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 방법에 따라 이용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 단리된 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단리된 단백질 또는 폴리펩티드 (또는 폴리펩티드 복합체)는 자연 환경의 성분으로부터 단리된 것이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 폴리펩티드는 예를 들면, 전기영동 (가령, SDS-PAGE, 등전초점조절 (IEF), 모세관전기이동) 또는 크로마토그래피 (가령, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정되었을 때, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 순도로 정제된다. 항체 순도의 측정 방법은 당분야에 공지되어 있다[Flatman 등, (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87]. 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 방법에 따라 이용되는 ActRIIB 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드다.

[0174] 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 당업계에 공지된 다양한 기술에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 폴리펩티드는 표준 단백질 화학 기술, 예를 들면, Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) 및 Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)에서 설명된 것들을 이용하여 합성될 수 있다. 이에 더하여, 자동화된 펩티드 합성장치는 상업적으로 가용하다 (가령, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). 대안으로, 본 명세서의 폴리펩티드들과 이의 변이체들은 당분야에 공지된 다양한 발현 시스템 [가령, 대장균, 중국 헵스터 난소 (CHO) 세포, COS 세포, 벡로로바이러스]을 이용하여 재조합적으로 만들어질 수 있다. 추가 구체예에서, 본 명세서의 변형된 또는 변형되지 않은 폴리펩티드는 예로서, 프로테아제, 예를 들면, 트립신, 서몰리신, 키모 트립신, 펩신, 또는 대합된 염기성 아미노산 전환 효소 (PACE)를 이용함으로써 재조합적으로 생산된 전장 ActRIIB 폴리펩티드의 소화에 의해 생산될 수 있다. 단백질분해가능한 절단 부위는 컴퓨터 분석(시판되는 소프트웨어, 가령, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.)을 이용하여 식별해낼 수 있다. 대안으로, 이러한 폴리펩티드는 화학적 절단 (예: 시아노겐 브로마이드, 하이드록실아민, 등)을 사용하여 재조합적으로 생성된 전장 ActRIIB 폴리펩티드로부터 생산될 수 있다.

[0175] **B. ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산**

[0176] 특정 구체예들에서, 본 명세서는 상기 ActRIIB 폴리펩티드 (이의 단편들, 기능적 변이체 (가령, GDF 트랩), 및 이의 융합 단백질 포함)을 인코딩하는 단리된 및/또는 재조합 핵산을 제공한다. 예를 들면, 서열 번호: 7은 자연 발생적 인간 ActRIIB 전구체 폴리펩티드 (상기에서 기술된 64 변이체)를 인코딩하고, 반면 서열 번호: 8은 ActRIIB (상기에서 기술된 64 변이체)의 프로세싱된 세포의 도메인을 인코딩한다. 대상 핵산은 단일-가닥이거나 또는 이중 가닥일 수 있다. 이러한 핵산은 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 이들 핵산은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 바와 같은 ActRIIB-기반의 리간드 트랩 폴리펩티드를 만드는 방법에 이용될 수 있다.

[0177] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단리된 핵산(들)은 자연 환경의 성분으로부터 단리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 보통 포함하는 세포 안에 있는 핵산 분자를 포함하지만, 상기 핵산 분자는 자연 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 존재하거나 또는 염색체외부에 존재한다.

[0178] 특정 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 서열 번호: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 및 62중 임의의 하나의 변이체인 핵산을 포함하는 것으로 이해된다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 다른 서열, 예를 들면, 대립형질 변이체를 포함하고; 그리고, 이런 이유로, 서열 번호: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 또는 62중 하나에서 지정된 코딩 서열의 뉴클레오티드 서열과 상이한 코딩 서열을 포함할 것이다.

- [0179] 특정 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 서열 번호: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 및 62중 임의의 하나에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 단리된 및/또는 재조합 핵산 서열에 의해 인코딩된다. 서열 번호: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 및 62 그리고 이의 변이체들에 상보적 서열에 대하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 핵산 서열 또한 본 명세서 범위 안에 있음을 당업자는 인지할 것이다. 추가 구체예들에서, 본 명세서의 핵산 서열은 단리되거나, 재조합되거나, 및/또는 이중성 뉴클레오티드 서열에 융합되거나 또는 DNA 라이브러리 안에 있을 수 있다.
- [0180] 다른 구체예들에 있어서, 본 명세서 핵산은 또한, 고도로 엄격한 조건 하에, 서열 번호: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 및 62에서 지정된 뉴클레오티드 서열, 서열 번호: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 또는 62의 보체 서열, 또는 이들의 단편에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기에서 논의된 바와 같이, 당업자는 DNA 혼성화를 촉진시키는 적절한 엄격 조건은 가변적일 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 당업자는 DNA 혼성화를 촉진시키는 적절한 엄격 조건은 가변적일 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 예를 들면, 6.0 x 염화나트륨/구연산나트륨 (SSC)에서 약 45 °C에서 혼성화, 이어서 50 °C에서 2.0 x SSC의 세척으로 실행할 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서 염 농도는 50 °C에서 약 2.0 x SSC의 낮은 엄격성으로부터 50 °C에서 0.2 x SSC의 높은 엄격성에서 선택될 수 있다. 또한, 세척 단계의 온도는 약 22 °C의 낮은 엄격성 조건으로부터 약 65 °C의 높은 엄격성 조건으로 증가될 수 있다. 온도 및 염이 변화될 수 있거나, 또는 다른 변수가 변화되는 동안 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 명세서는 실온에서 6 x SSC의 낮은 엄격성 조건하에 혼성화되고, 이어서 실온에서 2 x SSC에서 세척된 핵산을 제공한다.
- [0181] 유전자 코드에서 축중성으로 인해 서열 번호: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 또는 62에서 진술된 바와 같은 핵산과 상이한 단리된 핵산 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들면, 다수의 아미노산이 하나 이상의 삼중항으로 지정된다. 동일한 아미노산을 특징하는 코돈, 또는 동의코돈 (예를 들면, CAU와 CAC는 히스티딘의 경우 동의코돈임)으로 이 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않은 "침묵(silent)" 돌연변이가 된다. 그러나, 포유류 세포 중에 본 단백질의 아미노산 서열의 변화를 유도하는 DNA 서열 다형성이 존재할 것으로 기대된다. 당업자는 특정 단백질을 코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드 (뉴클레오티드의 최대 약 3 내지 5 %)에서의 이러한 변이가 자연 대립 유전자 변이로 인해 주어진 종의 개체들 사이에 존재할 수 있음을 인식할 것이다. 임의의 모든 이런 뉴클레오티드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 안에 있다.
- [0182] 일정한 구체예에서, 본 명세서의 재조합 핵산은 발현 구조체 내에서 하나 또는 그 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로, 발현에 이용된 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포에 있어서 다수 유형의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 당분야에 공지되어 있고, 다양한 숙주 세포에서 이용될 수 있다. 전형적으로, 하나 또는 그 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 종료 서열, 해독 개시 및 종료 서열, 및 인핸서 또는 활성자 서열을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 당분야에 공지된 구성 또는 유도성 프로모터는 본 명세서에서 고려된다. 상기 프로모터는 자연 발생적 프로모터이거나, 또는 하나 이상의 프로모터 요소들이 복합된 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 구조체는 세포 안 에피솜 상에, 이를 테면 플라스미드로 존재하거나, 또는 발현 구조체는 염색체 안에 삽입될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 발현 벡터는 선택가능한 표지 유전자를 포함하여, 형질전환된 숙주 세포의 선별이 가능하다. 선택가능한 표지 유전자는 당분야에 공지되어 있으며, 이용되는 숙주 세포에 따라 가변적일 것이다.
- [0183] 일정한 양상에서, 주제 핵산은 ActRIIB 폴리펩티드 폴리펩티드를 인코딩하고 최소한 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터에서 제공된다. 조절 서열은 당분야에서 인식되고, 그리고 ActRIIB 폴리펩티드의 발현을 주도하도록 선별된다. 따라서, 용어 조절 서열은 프로모터, 인핸서, 및 기타 발현 조절 요소들을 포함한다. 예시적인 조절 서열은 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 설명되고 있다. 가령, 자신에게 작동가능하게 연결될 때 DNA 서열의 발현을 제어하는 임의의 매우 다양한 발현 제어 서열이 ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 발현하기 위해 이들 벡터에서 이용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은, 예를 들면, SV40의 초기 및 후기 프로모터, *tet* 프로모터, 아데노바이러스 또는 사이토포갈로바이러스 즉각 초기 프로모터, RSV 프로모터, *lac* 시스템, *trp* 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 RNA 중합효소에 의해 발현이 지시되는 T7 프로모터, 파

아지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 피복 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소의 프로모터, 산 포스포타제의 프로모터, 가령, Pho5, 효모 α -메이팅 인자들의 프로모터, 베클로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터, 또는 진핵 세포 또는 이의 바이러스의 발현을 제어하는 것으로 알려진 기타 서열, 및 다양한 이의 조합들을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 형질전환될 숙주 세포의 선택 및/또는 발현되기를 원하는 단백질의 유형과 같은 인자에 좌우될 수 있음을 알아야 한다. 더욱이, 벡터의 복사체 수, 복사체 수를 조절하는 능력, 그리고 이 벡터에 의해 인코딩되는 임의의 다른 단백질, 가령, 항생제 표지 등의 발현이 또한 고려된다.

[0184] 본 명세서의 재조합 핵산은 원핵 또는 진핵 세포 (효모, 조류, 곤충 또는 포유류), 또는 이들 모두에서 발현하는데 적합한 벡터에 클론된 유전자 또는 이의 일부분을 결합시킴으로써 만들어질 수 있다. 재조합 ActRIIB 폴리펩티드의 생산을 위한 발현 수송체는 플라스미드 및 다른 벡터를 포함한다. 예를 들면, 적합한 벡터는 다음의 유형의 플라스미드를 포함한다: 원핵 세포, 이를 테면 대장균에서 발현을 위한 pBR322-유도된 플라스미드, pEMBL-유도된 플라스미드, pEX-유도된 플라스미드, pBTac-유도된 플라스미드 및 pUC-유도된 플라스미드.

[0185] 일부 포유류 발현 벡터는 박테리아에서 벡터의 증식을 실행하는 원핵(prokaryotic) 서열과 진핵 세포에서 발현된 진핵(eukaryotic) 전사 단위를 모두 포함한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유도된 벡터는 진핵 세포의 형질감염에 적합한 포유류 발현 벡터의 예들이다. 이들 벡터중 일부는 박테리아 플라스미드, 이를 테면 pBR322의 서열로 변형되어, 진핵 세포와 원핵 세포 모두에서 복제 및 약물 저항성 선별이 가능하다. 대안으로, 바이러스, 이를 테면 소의 유두종 바이러스 (BPV-1), 또는 Epstein-Barr 바이러스 (pHEBo, pREP-유도된 그리고 p205)의 유도체들이 진핵 세포에서 단백질의 일시적 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스 (레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 예는 하기 유전자 요법 운반 시스템의 설명에서 찾아볼 수 있다. 플라스미드의 준비 및 숙주 유기체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 원핵 세포와 진핵 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템, 뿐만 아니라 전반적인 재조합 과정은 가령, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)을 참고한다. 일부 경우들에 있어서, 베클로바이러스 발현 시스템의 사용에 의해 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 베클로바이러스 발현 시스템의 예로는 pVL-유도된 벡터 (이를 테면 pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도된 벡터 (이를 테면 pAcUW1), 및 pBlueBac-유도된 벡터 (이를 테면 β -gal 함유하는 pBlueBac III) 을 포함한다.

[0186] 바람직한 구체예에서, 벡터, 예를 들면, Pcmv-스크립트 벡터 (Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터 (Promega, Madison, Wisc.)는 CHO 세포에서 대상 ActRIIB 폴리펩티드를 생산하도록 설계될 것이다. 명백한 바와 같이, 주체 유전자 구조체는 예로서, 정체를 위한 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생산하기 위해, 배양액에서 증식된 세포에서 대상 ActRIIB 폴리펩티드의 발현을 유발하는데 이용될 수 있다.

[0187] 본 명세서는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 폴리펩티드들에 대한 코딩 서열이 포함된 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 또한 관계한다. 상기 숙주 세포는 임의의 원핵 세포 또는 진핵 세포일 것이다. 예를 들면, 본 명세서의 ActRIIB 폴리펩티드는 박테리아 세포, 이를 테면 대장균, 곤충 세포 (가령, 베클로바이러스 발현 시스템을 이용), 효모, 또는 포유류 세포 [가령, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포계]에서 발현될 수 있다. 당업자들에게는 다른 적합한 숙주 세포들이 또한 알려져 있다.

[0188] 따라서, 본 명세서는 대상 ActRIIB 폴리펩티드를 생산하는 방법과 더욱 관련된다. 예를 들면, ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ActRIIB 폴리펩티드의 발현이 발생하도록 허용하는 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 분리되고, 이 폴리펩티드를 함유하는 세포와 배지 혼합물로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, ActRIIB 폴리펩티드는 세포질 또는 막 분획 내에 보유될 수 있으며, 세포는 수거되고, 용해되고, 단백질은 분리된다. 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에 공지되어 있다. 해당 폴리펩티드들은 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동, ActRIIB 폴리펩티드의 특정 에피토포에 특이적인 항체를 이용한 면역친화력 정제, 그리고 ActRIIB 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 물질을 이용한 친화력 정제 (가령, 단백질 A 컬럼을 이용하여 ActRIIB-Fc 융합 단백질을 정제할 수 있다)를 포함하는 단백질을 정제하는데 공지된 기술을 이용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 이들 모두로부터 단리될 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, ActRIIB 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다.

[0189] 일부 구체예들에 있어서, 예를 들면, 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다. ActRIIB 단백질은 크기 압출 크로마토그래피에 의해 측정하였을 때, >90%, >95%, >96%, >98%, 또는 >99%의 순도이고, SDS PAGE에 의해 측정하였을 때 >90%, >95%, >96%, >98%, 또는 >99%의 순도를 가질 수 있다. 목표 수준의 순도는 포유류 시스템, 특히 비-인간 영장류, 설치류(마우스), 및 인간에 바람직한 결과를 얻는데 충분한 정도이어야 한다.

[0190] 다른 구체예에서, 재조합 ActRIIB 폴리펩티드의 원하는 부분의 N 말단에서 정제 리더 서열, 예를 들면, 폴리-(His)/엔테로키나아제 개열 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni²⁺ 금속 수지를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 허용할 수 있다. 이후, 정제 리더 서열은 정제된 ActRIIB 폴리펩티드를 제공하기 위해, 엔테로키나아제로 처리에 의해 차후 제거될 수 있다. 가령, Hochuli 등, (1987) *J. Chromatography* 411:177; 그리고 Janknecht 등, (1991) *PNAS USA* 88:8972 참고.

[0191] 융합 유전자를 만드는 기술은 공지되어 있다. 기본적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합은 결합을 위한 블린트-단부 또는 스테거(stagger)-단부를 이용, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 절단, 바람직하지 못한 결합 및 효소적 결합을 피하기 위하여 적절한 알칼리 포스포타제 처리와 같은 코헤시브 단부(cohesive ends)의 메우기를 이용하는 통상의 기술에 따라 실행된다. 또다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화된 DNA 합성기가 포함된 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 유전자 단편들의 PCR 증폭은 2개의 연속 유전자 단편 간에 상보적 오버행(overhangs)을 만드는 앵커 프라이머를 이용하여 실행되고, 후속적으로 어닐링시켜 키메라 유전자 서열을 만들 수 있다. 가령, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel 등, John Wiley & Sons: 1992 참고.

[0192] **C. 항체 길항제**

[0193] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제는 항체 (ActRIIB 길항제 항체), 또는 항체의 조합이다. ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB-결합 리간드 (가령, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10, 및 BMP6), ActRIIB 수용체, 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 ActRIIB 공동-수용체에 결합할 수 있다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, ActRIIB 길항제 항체는 골수섬유증을 치료하기 위하여, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증 (가령, 비장비대증, 수외조혈, 빈혈, 및 섬유증), 및/또는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자를 치료 또는 예방하기 위하여, 단독으로 또는 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질과 조합되어 이용될 수 있다.

[0194] 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 및/또는 액티빈 BE)을 저해하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 액티빈에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 액티빈 항체 (또는 항-액티빈 항체)은 일반적으로 충분한 친화력으로 액티빈에 결합하고, 따라서 이 항체는 액티빈을 표적으로 하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용한 것을 지칭한다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-액티빈 단백질에 액티빈항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, 액티빈에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 액티빈 항체는 상이한 종의 액티빈에서 보존된 액티빈의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에서, 항-액티빈 항체는 인간 액티빈에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 항체는 액티빈이 유형 I 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 액티빈-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 항체는 액티빈이 ActRIIB 공동-수용체에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 액티빈-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 액티빈 A는 액티빈 B에 일부 서열 상동성을 공유하고, 따라서 일부 경우에 액티빈 A에 결합하는 항체는 또다른 액티빈 B에 결합하고 및/또는 이를 저해할 수 있고, 이는 또한 항-액티빈 B 항체에 적용된다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 액티빈에 결합하고, 그리고 추가로 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10, 및 BMP6], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체), 및 이의 용도에 관계한다. 일부 구체예들에서, 일

부 구체예들에 있어서, 액티빈에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 BMP9에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 일부 구체예들에 있어서, 액티빈에 결합하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 상기 항체의 조합은 액티빈 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 슈퍼패밀리 리간드 [가령, GDF8, GDF11, GDF3, 및 BMP6], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 BMP10 항체 그리고 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 항체를 포함하는 항체의 조합은 BMP9 항체를 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 항체를 포함하는 항체의 조합은 액티빈 A 항체를 포함하지 않는다.

[0195]

특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 액티빈 B를 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 액티빈 B에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 액티빈 B 항체 (또는 항-액티빈 B 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 액티빈 B에 결합할 수 있고, 따라서 이 항체는 액티빈 B를 표적으로 하는 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-액티빈 B 단백질에 액티빈 B 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, 액티빈 B에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 액티빈 B 항체는 상이한 종의 액티빈 B에서 보존된 액티빈 B의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-액티빈 B 항체는 인간 액티빈 B에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 B 항체는 액티빈 B가 유형 I 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 inhibit 액티빈 B-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 B 항체는 액티빈 B가 공동-수용체에 결합하는 것을 저해할 수 있고, 따라서 액티빈 B-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 액티빈 B는 액티빈 A와 유사한 서열 상동성을 가지며, 따라서 일부 경우에 액티빈 B에 결합하는 항체는 또한 액티빈 A에 결합 및/또는 이를 저해할 수 있음을 유의해야 한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 액티빈 B에 결합하고, 그리고 추가로 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10, 및 BMP6], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체), 및 이의 용도에 관계한다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 B에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 BMP9에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 B에 결합하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 상기 항체의 조합은 액티빈 B 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6 및 BMP10], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 B 항체를 포함하는 항체의 조합은 BMP9 항체를 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, 액티빈 B 항체를 포함하는 항체의 조합은 액티빈 A 항체를 포함하지 않는다.

[0196]

특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 GDF8을 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 GDF8에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, GDF8 항체 (또는 항-GDF8 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 GDF8에 결합하는 항체로, 이 항체는 GDF8을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF8 단백질에 GDF8 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, GDF8에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%,

5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, GDF8 항체는 상이한 종의 GDF8에서 보존된 GDF8의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-GDF8 항체는 인간 GDF8에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF8 항체는 GDF8이 유형 I 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 GDF8-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, GDF8 항체는 GDF8이 공동-수용체에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 GDF8-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. GDF8은 GDF11과 높은 서열 상동성을 가지고, 따라서 일부 경우에 GDF8에 결합하는 항체는 GDF11에 결합하고 및/또는 이를 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 GDF8에 결합하고, 그리고 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE), GDF11, GDF3, BMP10, 및 BMP6], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체), 및 이의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예들에 있어서, GDF8에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 BMP9에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 일부 구체예들에 있어서, GDF8에 결합하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 항체의 조합은 GDF8 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE), GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, 및 BMP15], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF8 항체를 포함하는 항체의 조합은 BMP9 항체를 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, GDF8 항체를 포함하는 항체의 조합은 액티빈 A 항체를 포함하지 않는다.

[0197]

특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 GDF11을 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 GDF11에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, GDF11 항체 (또는 항-GDF11 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 GDF11에 결합하는 항체로, 이 항체는 GDF11을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF11 단백질에 GDF11 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, GDF11에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, GDF11 항체는 상이한 종의 GDF11에서 보존된 GDF11의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-GDF11 항체는 인간 GDF11에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 항체는 GDF11이 유형 I 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 GDF11-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 항체는 GDF11이 공동-수용체에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 GDF11-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. GDF11은 GDF8과 높은 서열 상동성을 가지고, 따라서 일부 경우에 GDF11에 결합하는 항체는 GDF8에 결합하고 및/또는 이를 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 GDF11에 결합하고, 그리고 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE), GDF8, GDF3, BMP10, 및 BMP6], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체), 및 이의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 BMP9에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 일부 구체예들에 있어서, GDF11에 결합하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 본 명세

서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 상기 항체의 조합은 GDF11 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE), GDF8, GDF3, BMP6, 및 BMP10], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 항체를 포함하는 항체의 조합은 BMP9 항체를 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, GDF11 항체를 포함하는 항체의 조합은 액티빈 A 항체를 포함하지 않는다.

[0198]

특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 BMP6을 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 BMP6에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, BMP6 항체 (또는 항-BMP6 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 BMP6에 결합하는 항체로, 이 항체는 BMP6을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP6 단백질에 BMP6 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, BMP6에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, BMP6 항체는 상이한 종의 BMP6에서 보존된 BMP6의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-BMP6 항체는 인간 BMP6에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, BMP6 항체는 BMP6이 유형 I 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 BMP6-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, BMP6 항체는 BMP6이 공동-수용체에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 BMP6-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 BMP6에 결합하고, 그리고 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE), GDF8, GDF3, BMP10, 및 GDF11], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체), 및 이의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예들에 있어서, BMP6에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 BMP9에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 일부 구체예들에 있어서, BMP6에 결합하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 상기 항체의 조합은 BMP6 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE), GDF8, GDF11, GDF3, 및 BMP10], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, BMP6 항체를 포함하는 항체의 조합은 BMP9 항체를 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, BMP6 항체를 포함하는 항체의 조합은 액티빈 A 항체를 포함하지 않는다.

[0199]

특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 GDF3을 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 GDF3에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, GDF3 항체 (또는 항-GDF3 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 GDF3에 결합하는 항체로, 이 항체는 GDF3을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-GDF3 단백질에 GDF3 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, GDF3에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, GDF3 항체는 상이한 종의 GDF3에서 보존된 GDF3의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-GDF3 항체는 인간 GDF3에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF3 항체는 GDF3이 유형 I 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 GDF3-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, GDF3 항체는 GDF3이 공동-수용체에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 GDF3-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 BMP3에 결합하고, 그리고 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티

빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE), GDF8, BMP6, BMP10, 및 GDF11], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체), 및 이의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예들에 있어서, GDF3에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 BMP9에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 일부 구체예들에 있어서, GDF3에 결합하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 상기 항체의 조합은 GDF3 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 액티빈 BE), GDF8, GDF11, BMP6, 및 BMP10], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, GDF3 항체를 포함하는 항체의 조합은 BMP9 항체를 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, GDF3 항체를 포함하는 항체의 조합은 액티빈 A 항체를 포함하지 않는다.

[0200]

특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 BMP10을 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 BMP10에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, BMP10 항체 (또는 항-BMP10 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 BMP10에 결합하는 항체로, 이 항체는 BMP10을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-BMP10 단백질에 BMP10 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, BMP10에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, BMP10항체는 상이한 종의 BMP10에서 보존된 BMP10의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-BMP10 항체는 인간 BMP10에 결합한다. 일부 구체예들에 있어서, BMP10 항체는 BMP10이 유형 I 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7)에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 BMP10-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에 있어서, BMP10 항체는 BMP10이 공동-수용체에 결합하는 것을 저해시킬 수 있고, 따라서 BMP10-매개된 신호전달 (가령, Smad 신호전달)을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 BMP10에 결합하고, 그리고 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE), GDF8, GDF11, GDF3, 및 BMP6], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체), 및 이의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예들에 있어서, BMP10에 결합하는 다중특이적 항체는 BMP9에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 BMP9에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 일부 구체예들에 있어서, BMP10에 결합하는 다중특이적 항체는 액티빈 A에 결합하지 않거나, 또는 실질적으로 결합하지 않는다 (가령, 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 액티빈 A에 결합하거나, 또는 상대적으로 보통의 결합, 가령, 약 1×10^{-8} M 또는 약 1×10^{-9} M을 갖는다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 상기 항체의 조합은 BMP10 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 추가 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE), GDF8, GDF3 BMP6, BMP10, 및 GDF11], 하나 또는 그 이상의 유형 I 수용체 및/또는 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 하나 또는 그 이상의 공동-수용체에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, BMP10 항체를 포함하는 항체의 조합은 BMP9 항체를 포함하지 않는다. 일부 구체예들에 있어서, BMP10 항체를 포함하는 항체의 조합은 액티빈 A 항체를 포함하지 않는다.

[0201]

특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 ActRIIB를 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 ActRIIB에 결합한다. 본 명세서에서 사

용된 바와 같이, ActRIIB 항체 (항-ActRIIB 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 ActRIIB에 결합하는 항체를 말하며, 이 항체는 ActRIIB를 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-ActRIIB 단백질에 ActRIIB 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, ActRIIB에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, ActRIIB 항체는 상이한 종의 ActRIIB에서 보존된 ActRIIB의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-ActRIIB 항체는 인간 ActRIIB에 결합한다. 일부 구체예들에서, 항-ActRIIB 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE) GDF11, BMP6, GDF3, 및 BMP10]가 ActRIIB에 결합하는 것을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-ActRIIB 항체는 ActRIIB에 결합하고, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, 및 BMP10], 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 공동-수용체, 및/또는 추가 유형 II 수용체 (가령, ActRIIA)수용체에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 항체의 조합은 항-ActRIIB 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE) BMP6, GDF3, 및 BMP10], 공동-수용체, 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 및/또는 추가 유형 II 수용체 (가령, ActRIIA)에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다. ActRIIB는 ActRIIA와 서열 유사성을 가지고, 따라서 일부 경우에 ActRIIB에 결합하는 항체는 ActRIIA에 결합하고 및/또는 이를 저해할 수 있다.

[0202] 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 BALK4를 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 ALK4에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, ALK4 항체 (또는 항-ALK4 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 ALK4에 결합하는 항체로, 이 항체는 ALK4를 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-ALK4 단백질에 ALK4 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, ALK4에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-ALK4항체는 상이한 종의 ALK4에서 보존된 ALK4의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-ALK4 항체는 인간 ALK4에 결합한다. 일부 구체예들에서, 항-ALK4 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE) GDF11, BMP6, GDF3, 및 BMP10]가 ALK4에 결합하는 것을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-ALK4 항체는 ALK4에 결합하고, 그리고 하나 또는 그 이상의 GDF/BMP 리간드 [가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, 및 BMP10], 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 공동-수용체, 및/또는 추가 유형 I 수용체 (가령, ALK5 및/또는 ALK7)에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 항체의 조합은 항-ALK4 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE) BMP6, 및 BMP10], 공동-수용체, 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 및/또는 추가 유형 I 수용체 (가령, ALK5 및/또는 ALK7)에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0203] 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 ALK5를 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 ALK5에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, ALK5 항체 (또는 항-ALK5 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 ALK5에 결합하는 항체로, 이 항체는 ALK5를 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-ALK5 단백질에 ALK5 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, ALK5에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-ALK5항체는 상이한 종의 ALK5에서 보존된 ALK5의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-ALK5 항체는 인간 ALK4에 결합한다. 일부 구체예들에서, 항-ALK5 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE) GDF11, BMP6, GDF3, 및 BMP10]가 ALK5에 결합하는 것을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-ALK5 항체는 ALK5 및 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티

빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, 및 BMP10], 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 공동-수용체, 및/또는 추가 유형 I 수용체 (가령, ALK4 및/또는 ALK7)에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 항체의 조합은 항-ALK5 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE) BMP6, 및 BMP10], 공동-수용체, 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 및/또는 추가 유형 I 수용체 (가령, ALK4 및/또는 ALK7)에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0204] 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 적어도 ALK7을 억제하는 항체다. 따라서, 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 항체, 또는 항체의 조합은 최소한 ALK7에 결합한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, ALK7 항체 (또는 항-ALK7 항체)는 일반적으로 충분한 친화력으로 ALK7에 결합하는 항체로, 이 항체는 ALK7을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 특정 구체예들에 있어서, 무관한, 비-ALK7 단백질에 ALK7 항체의 결합 정도는 예를 들면, 방사능면역분석 (RIA), Biacore, 또는 다른 단백질-단백질 상호작용 또는 결합 친화력 분석에 의해 측정하였을 때, ALK7에 이 항체가 결합하는 것의 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 약 1% 미만이다. 특정 구체예들에 있어서, 항-ALK7 항체는 상이한 종의 ALK7에서 보존된 ALK7의 에피토프에 결합한다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 항-ALK7 항체는 인간 ALK7에 결합한다. 일부 구체예들에서, 항-ALK7 항체는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및 액티빈 BE) GDF11, BMP6, GDF3, 및 BMP10]가 ALK7에 결합하는 것을 저해할 수 있다. 일부 구체예들에서, 항-ALK7항체는 ALK7 및 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, 및 BMP10], 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 공동-수용체, 및/또는 추가 유형 I 수용체 (가령, ALK4 및/또는 ALK5)에 결합하는 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체)이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 항체의 조합, 및 이의 용도에 관계하는데, 이때 항체의 조합은 항-ALK7 항체 및 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, GDF11, GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC) GDF3, BMP6, 및 BMP10], 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 공동-수용체, 및/또는 추가 유형 I 수용체 (가령, ALK4 및/또는 ALK5)에 결합하는 하나 또는 그 이상의 추가 항체를 포함한다.

[0205] 용어 항체는 본 명세서에서 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체 (가령, 이중특이적 항체), 그리고 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나, 이에 국한되지 않은 다양한 항체 구조를 포괄하는 광범위한 의미로 이용된다. 항체 단편은 손상되지 않은(intact) 항체가 결합하는 항원에 결합하는 손상되지 않은 항체의 부분을 포함하는 손상되지 않은 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디(diabodies); 선형 항체; 단일 쇠 항체 분자 (예: scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함하나, 이에 국한되지 않는다[가령, Hudson 등, (2003) Nat. Med. 9:129-134; Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; 그리고 U.S. 특허 번호. 5,571,894; 5,587,458; 및 5,869,046]. 디아바디는 2가 또는 이중-특이적일 수 있는 2 개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다 [see, 가령, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson 등, (2003) Nat. Med. 9:129-134 (2003); 그리고 Hollinger 등, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448]. 트리아바디(Triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies) 또한 Hudson 등, (2003) Nat. Med. 9:129-134에서 설명된다. 단일 도메인 항체는 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부, 또는 항체의 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구체예들에 있어서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체다 [가령, U.S. 특허 번호. 6,248,516]. 본 명세서에서 공개된 항체는 다클론 항체 또는 단클론 항체일 수 있다. 특정 구체예들에 있어서, 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체는 거기에 부착되어, 탐지가능하게 만드는 라벨을 포함할 수 있다 (예를 들어, 라벨은 방사성 동위 원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조 인자일 수 있다). 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항체는 단리된 항체다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 항체는 재조합 항체다.

[0206] 본 발명의 항체는 임의의 부류일 수 있다. 항체의 부류는 그 중쇄가 갖는 불변 영역 또는 불변 영역의 유형을 말한다. 항체에는 5 가지 주요 부류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들중 몇몇은 하위부류(아 이소타입), 예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 추가 세분될 수 있다. 면역 글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤(mu)라고 불린다.

[0207] 일반적으로, 본원에 개시된 방법에서 사용하기 위한 항체는 바람직하게는 높은 결합 친화력으로 그 표적 항원에

결합한다. 친화력은 K_D 값으로 표현될 수 있으며, 고유 결합 친화력을 반영한다 (가령, 최소화된 항체결합력 (avidity) 효과). 전형적으로, 결합 친화력은 시험 관내에서 무(free)-세포 또는 세포와 관련된 환경에서 측정된다. 예를 들면, Biacore, 방사능라벨된 항원-결합 분석 (RIA), 및 ELISA가 포함된 본원에 개시된 것들을 포함하여, 당해 분야에 공지된 다수의 임의의 분석을 사용하여 결합 친화력 측정할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 항체는 최소한 K_D 값이 1×10^{-7} 또는 더 강하게, 1×10^{-8} 또는 더 강하게, 1×10^{-9} 또는 더 강하게, 1×10^{-10} 또는 더 강하게, 1×10^{-11} 또는 더 강하게, 1×10^{-12} 또는 더 강하게, 1×10^{-13} 또는 더 강하게, 또는 1×10^{-14} 또는 더 강하게 이들의 표적 항원(가령, ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, GDF3, 액티빈, GDF11, GDF8, BMP10, 및/또는 BMP6)에 결합한다.

[0208] 특정 구체예들에 있어서, K_D 는 하기 분석에 기재된 바와 같이, 관심있는 항체의 Fab 버전 및 그의 표적 항원으로 수행된 RIA에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화력은 라벨되지 않은 항원의 적정 시리즈의 존재하에 방사성 라벨된 항원 (예 : ^{125}I -라벨된)의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 다음, 결합된 항원을 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획시킴으로써 측정된다 [가령, Chen 등, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]. 상기 분석의 조건을 확립하기 위하여, 다중-웰 플레이트 (가령, MICROTITER®, Thermo Scientific)는 포획용 항-Fab 항체 (가령, Cappel Labs)로 피복하고(가령, 하룻밤동안), 후속적으로 바람직하게는 실온 (대략 23°C)에서 소혈청 알부민으로 차단한다. 비-흡착성 플레이트에서 방사능라벨된 항원은 일련의 관심 대상 Fab 희석물과 혼합된다 [가령, 항-VEGF 항체, Fab-12의 측정과 일관되게, Presta 등, (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]. 관심있는 Fab을 바람직하게는 밤새 배양하지만, 배양은 평형에 도달하도록 더 긴 기간 (예를 들어, 약 65 시간) 동안 계속될 수 있다. 그 후, 혼합물을 바람직하게는 실온에서 약 1 시간 동안 배양을 위해 포획 플레이트로 이동시킨다. 상기 용액은 제거되고, 플레이트는 바람직하게는 폴리소르베이트 20 및 PBS 혼합물로 수차례 세척된다. 상기 플레이트가 건조되면, 섬광제(scintillant) (가령, MICROSCINT®, Packard)가 추가되고, 이 플레이트는 감마 카운터 (가령, TOPCOUNT®, Packard)상에서 카운트된다.

[0209] 또다른 구체예에 따르면, K_D 는 예를 들면 a BIACORE® 2000 또는 BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)을 이용하여, 고정된 항원 CM5 칩, 약 10 반응 단위 (RU)와 함께 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 측정된다. 간략하게 설명하자면, 카르복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, BIACORE, Inc.)은 공급업자에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙시니미드 (NHS)로 활성화시킨다. 예를 들면, 항원은 결합된 단백질의 대략 10 반응 단위(RU)를 얻기 위하여 분당 5 μl 의 유속으로 주사하기 전, 10 mM 아세트이트 나트륨, pH 4.8으로 5 $\mu\text{g/ml}$ (약 0.2 μM)로 희석시킬 수 있다. 항원 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미-반응 그룹을 차단한다. 역동학 측정을 위하여, 0.05% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20®) 계면활성제 (PBST)와 함께 Fab의 2-배 일련의 희석물 (0.78 nM 에서 500 nM)은 PBS에서 분당 대략 25 μl 의 유속으로 주사된다. 연합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})는 연합 및 해리 센소그램의 동시 피팅에 의해, 예를 들면, 단순한 일대일(one-to-one) Langmuir 결합 모델 (BIACORE® Evaluation Software version 3.2)을 이용하여 산출된다. 평형 해리 상수 (K_D)는 k_{off}/k_{on} 비율로 산출된다[가령, Chen 등, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]. 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 연합 속도가 예를 들면, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 를 초과한다면, 분광계, 이를 테면 스탑-플로우(stop-flow) 구비된 분광광도계 (Aviv Instruments) 또는 교반 큐비트가 있는 8000-시리즈 SLM-AMINCO® 분광광도계(ThermoSpectronic)에서 측정될 때, 항원의 농도를 증가시키면서 PBS 안에 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 형광 방출 강도(가령, 여기=295 nm; 방출=340 nm, 16 nm 밴드-패스)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술에 의해 연합 속도(on-rate)는 측정될 수 있다.

[0210] 항체 단편은 다양한 기술에 의해 제조될 수 있으며, 이에 손상되지 않은 항체의 단백질분해 절단뿐만 아니라, 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 재조합 숙주 세포(가령, 대장균(E. coli) 또는 파아지)에 의한 생산된 항체를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 인간 ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 및 액티빈 E), GDF11, GDF8, BMP10, GDF3, 및 BMP6의 핵산 및 아미노산 서열은 당분야에 공지되어 있다. 또한, 항체를 생성하기 위한 수많은 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 그 중 일부는 본원에 기술되어 있다. 따라서, 본 개시 내용에 따라 사용하기 위한 항체 길항제는 본원에 제공된 기술 및 교시에 기초하여, 당업자에 의해 통상적으로 제조될 수 있다.

[0211] 특정 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체는 키메라 항체다. 키메라 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분은 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 특정 키메라 항체는 예를 들면, U.S. 특허 번호. 4,816,567; 그리고 Morrison 등, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855에서 설명된다. 일부 구체예들에 있어서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (가령, 마우스, 랫, 햄스터, 토끼, 또는 비-인간 영장류, 이를 테면 원숭이로부터 유도된 가변 영역)과 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예들에 있어서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 부류 또는 하위부류에서 변경된 "부류 전환(class switched)"항체다. 일반적으로, 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0212] 특정 구체예들에 있어서, 키메라 본 발명의 항체는 인간화된 항체다. 인간화된 항체는 비-인간 초가변 영역 (HVRs)의 아미노산 잔기와 인간 틀-구조 영역 (FRs)의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 말한다. 특정 구체예들에 있어서, 인간화된 항체는 실질적으로 최소한 하나의, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함하는데, 이때 HVRs (가령, CDRs)의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 비-인간 항체에 대응하며, FRs의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 인간 항체의 것에 대응한다. 인간화된 항체는 임의선택적으로 인간 항체로부터 유도된 항체 불변 영역의 최소한 일부를 포함할 수 있다. 항체의 "인간화된 형태", 가령, 비-인간 항체는 인간화를 겪은 항체를 말한다. 인간화된 항체 및 이를 만드는 방법은 예를 들면, Almagro and Fransson (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633에서 검토되며, 그리고 예를 들면 Riechmann 등, (1988) Nature 332:323-329; Queen 등, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; U.S. 특허 번호. 5,821,337; 7,527,791; 6,982,321; 그리고 7,087,409; Kashmiri 등, (2005) Methods 36:25-34 [SDR (a-CDR) 그래프팅을 설명]; Padlan, Mol. Immunol. (1991) 28:489-498 ("재표면화"를 설명); Dall'Acqua 등, (2005) Methods 36:43-60 ("FR 서플링"을 설명); Osbourn 등, (2005) Methods 36:61-68; 그리고 Klimka 등, Br. J. Cancer (2000) 83:252-260 (FR 서플링에 대한 "유도된 선별" 방식을 설명)에서 설명되고 있다. 인간화에 이용되는 인간 틀-구조 영역은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: "best-fit" 방법을 이용하여 선택된 틀-구조 영역 [가령, Sims 등, (1993) J. Immunol. 151:2296]; 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위집단의 인간 항체의 콘센수스 서열로부터 유도된 틀-구조 영역 [가령, Carter 등, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; 그리고 Presta 등, (1993) J. Immunol., 151:2623]; 인간 성숙 (체세포적으로 성숙된) 틀-구조 영역 또는 인간 생식계 틀-구조 영역 [가령, Almagro and Fransson (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633]; 그리고 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유도된 틀-구조 영역 [가령, Baca 등, (1997) J. Biol. Chem. 272:10678-10684; 그리고 Rosok 등, (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618].

[0213] 특정 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체는 인간 항체다. 인간 항체는 당분야에 공지된 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 van Dijk and van de Winkel (2008) Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459에서 기술된다. 예를 들면, 인간 항체는 항원 공격에 대하여 손상되지 않은 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 가진 손상되지 않은 항체를 만들도록 변형된 이식 유전자를 가진 동물에게 면역원 (가령, GDF11 폴리펩티드, 액티빈 B 폴리펩티드, ActRII 폴리펩티드, 또는 ActRIIB 폴리펩티드)을 투여하여 만들 수 있다. 그러한 동물은 전형적으로 내인성 면역 글로불린 좌를 대체하거나, 또는 염색체 외적으로 존재하거나 무작위로 동물의 염색체에 통합된 인간 면역 글로불린 좌 전부 또는 일부를 포함한다. 이러한 이식유전자를 가진 동물에서 내인성 면역 글로불린 유전자 좌는 일반적으로 불활성화되었다. 이식유전자를 가진 동물로부터 인간 항체를 얻는 방법은 예를 들면, Lonberg (2005) Nat. Biotech. 23:1117-1125; U.S. Pat. Nos. 6,075,181 및 6,150,584 (XENOMOUSE™ technology 설명); U.S. 특허 번호. 5,770,429 (HuMab® technology 설명); U.S. 특허 번호. 7,041,870 (K-MMOUSE® technology 설명); 그리고 U.S. 특허 출원 공개 No. 2007/0061900 (Veloci마우스® technology 설명)을 참고한다. 그러한 동물에 의해 생성된 손상되지 않은 항체로부터 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 결합시킴으로써 추가로 변형될 수 있다.

[0214] 본 발명의 인간 항체는 하이브리도마-기반 방법에 의해 또한 만들어질 수 있다. 인간 단클론 항체를 생산하기 위하여 인간 골수종 및 마우스-인간 이형골수종 세포 계통이 설명되었다 [가령, Kozbor J. Immunol., (1984) 133: 3001; Brodeur et al. (1987) Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York; 그리고 Boerner et al. (1991) J. Immunol., 147: 86]. 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통하여 생성된 인간 항체는 또한 Li 등, (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562에서 기술된다. 추가 방법은 예를 들면, U.S. Pat. No. 7,189,826 (하이브리도마 세포 계통에서 단클론 인간 IgM 항체를 생산하는 것을 설명) 및 Ni, Xiandai Mianyixue (2006) 26(4):265-268 (2006) 인간 하이브리

도마 기술(Trioma technology)은 또한 Vollmers and Brandlein (2005) *Histol. Histopathol.*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers and Brandlein (2005) *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 27(3):185-91에서 설명된다. 본 발명의 인간 항체는 인간-유래 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다. 이러한 가변-도메인 서열은 그 다음 원하는 인간 불변 도메인에 복합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하는 기술은 당분야에 공지되어 있으며, 본 명세서에서 기술하고 있다.

[0215] 예를 들면, 본 발명의 항체는 원하는 활성 또는 작용을 가진 항체에 대하여 복합 라이브러리 스크리닝에 의해 단리될 수 있다. 파아지 디스플레이 라이브러리를 만들고, 원하는 결합 특성을 가진 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 방법들은 예를 들면, Hoogenboom *et al.* (2001) in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J. and further described, for example, in the McCafferty *et al.* (1991) *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Marks and Bradbury (2003) in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310; Lee *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093; Fellouse (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472; 그리고 Lee *et al.* (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132에서 검토된다.

[0216] 특정 파아지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 중합효소 체 반응 (PCR)에 의해 별도로 클론되고, 그 다음 파아지 라이브러리에 무작위로 재복합되고, 그 다음 Winter *et al.* (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455에서 설명된 바와 같이, 항원-결합 파아지에 대하여 스크리닝될 수 있다. 파아지는 전형적으로 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편의 항체 단편을 디스플레이한다. 면역화된 원천으로부터 라이브러리는 하이브리도마 구축 없이도 면역원(가령, ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10, 또는 BMP6)에 대한 고-친화력 항체를 제공한다. 대안으로, 순수(naive) 레퍼토리가 클론되어(가령, 인간으로부터) Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J*, 12: 725-734에서 설명된 바와 같이 임의의 면역화없이 광범위의 비-자가 및 자가 항원에 대한 항체의 단일 원천을 제공할 수 있다. 끝으로, 순수 라이브러리는 줄기 세포로부터 재배치되지 않은 V-유전자 단편을 클로닝하고, 고도로 가변적인 CDR3 영역을 인코딩하고, 시험 관내에서 재배열을 수행하기 위하여 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용하여, 합성에 의해 만들어 질 수 있다(Hoogenboom and Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388). 인간 항체 파아지 라이브러리를 설명하는 특허 공개는 예를 들면: U.S. Pat. No. 5,750,373, 및 U.S. 특허 공개 번호. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360를 포함한다.

[0217] 특정 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체는 다중특이적 항체, 예를 들면, 이중특이적 항체다. 다중특이적 항체(전형적으로 단클론 항체)는 하나 또는 그 이상의(가령, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의) 항원에서 최소한 2개의 상이한 에피토프(가령, 2, 3, 4, 5, 또는 6 또는 그 이상의)에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0218] 다중특이적 항체를 만드는 기술은 상이한 특이성을 가진 2개의 면역글로블린 중쇄/경쇄의 재조합 공동-발현을 포함하나, 이에 국한되지 않는다 [가령, Milstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537; 국제특허공개. WO 93/08829; 그리고 Traunecker *et al.* (1991) *EMBO J*. 10: 3655, and U.S. Pat. No. 5,731,168 ("knob-in-hole" engineering)]. 다중특이적 항체는 항체 Fc-이형이량체 분자를 만드는 정전기적 스테어링 효과(가령, WO 2009/089004A1); 2개 또는 그 이상의 항체 또는 단편의 가교 [가령, U.S. Pat. No. 4,676,980; 그리고 Brennan *et al.* (1985) *Science*, 229: 81]; 이중특이적 항체를 만들기 위하여 류신 지퍼 이용 [가령, Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553]; 이중특이적 항체 단편을 만들기 위하여 "디아바디" 기술 이용 [가령, Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448]; 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체 이용 [가령, Gruber *et al.* (1994) *J. Immunol.*, 152:5368]; 그리고 삼중특이적 항체 준비(가령, Tutt *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147: 60)에 의해 또한 만들어질 수 있다. 다중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로 준비될 수 있다. "Octopus 항체"를 포함하는 3개 또는 그 이상의 기능성 항원-결합 부위를 가진 조작된 항체 또한 본 명세서에 포함된다 [가령, US 2006/0025576A1].

[0219] 특정 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체는 단클론 항체다. 단클론 항체는 실질적으로 동질성 항체 집단으로부터 획득된 항체를 말하는데, 가령, 개별 항체는 동일한 집단 및/또는 같은 에피토프에 결합하는 집단을 포함하는데, 다만, 변이체 항체, 가령, 자연 발생적 돌연변이 또는 단클론 항체 체제를 만드는 동안 발생하는 돌연변이를 가진 변이체 항체 가능성이 있으며, 이러한 변이체들은 일반적으로 소량으로 존재한다. 상이한 에피토프로 지향된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다클론 항체 체제와 대조적으로, 단클론 항체 체제의 각각의 단

일 클론 항체는 항원상의 단일 항원 결정기를 지향한다. 따라서, 수식어 "단클론(monoclonal)"은 실질적으로 동질성 항체 집단으로부터 수득된 것으로서의 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로서 해석되어서는 안된다. 예를 들면, 본 방법에 따라 사용될 단클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파아지-디스플레이 방법 그리고 인간 면역 글로불린 좌의 전부 또는 일부를 함유하는 이식유전자를 가진 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있고, 이들 방법 및 다른 예시적인 방법이 본원에 기술되어 있다.

[0220] 예를 들면, 액티빈으로부터 유도된 면역원을 이용하여, 항-단백질/항-펩티드 항혈청 또는 단클론 항체를 표준 프로토콜에 의해 만들어질 수 있다 [가령, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (1988) Cold Spring Harbor Press: 1988]. 포유류, 이를 태먼 마우스, 햄스터, 또는 토끼는 액티빈 폴리펩티드의 면역원 형태, 항체 반응을 유도할 수 있는 항원 단편, 또는 융합 단백질로 면역화될 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성을 부여하는 기술은 운반체에 대한 접합을 포함하고, 또는 당업계에 널리 공지된 다른 기술을 포함한다. 액티빈 폴리펩티드의 면역원 부분은 어췌버트 존재하에 투여될 수 있다. 면역화 과정은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가 탐지에 의해 모니터링될 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역분석은 항체 생산 수준 및/또는 결합 친화력 수준을 평가하기 위하여 항원으로 면역원을 이용한다.

[0221] 액티빈 항원 제제로 동면을 면역화시킨 후, 항혈청이 수득되며, 원하는 경우, 혈청으로부터 단클론 항체가 단리될 수 있다. 단클론 항체를 생산하기 위하여, 항체 생성 세포 (립프구)를 면역화 동물로부터 수확하고, 골수종 세포와 같은 불멸화 세포와의 표준 체세포 융합 과정에 의해 융합시켜 하이브리도마 세포를 수득할 수 있다. 이러한 기술은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 예를 들면, 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 하이브리도마 기술 [가령, Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-497], 인간 B 세포 하이브리도마 기술 [가령, Kozbar *et al.* (1983) *Immunology Today*, 4:72], 및 EBV-하이브리도마 기술 [Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96]을 포함한다. 하이브리도마 세포는 액티빈 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체 및 그러한 하이브리도마 세포를 포함하는 배양 물로부터 단리된 항체의 생산을 위해 면역화학적으로 스크리닝될 수 있다.

[0222] 특정 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형이 본 발명의 항체의 Fc 영역 안으로 도입되고, 이로 인하여 Fc 영역 변이체가 만들어질 수 있다. 상기 Fc 영역 변이체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (가령, 치환, 결손, 및/또는 추가)이 포함된 인간 Fc 영역 서열 (가령, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0223] 예를 들면, 본원의 개시 내용은 전체 작동체 기능이 아닌 일부만을 보유하는 항체 변이체를 고려하는데, 이들 변이체는 항체의 반감기도 중요하지만, 특정 작동체 기능 [가령, 보체-의존적 세포독성 (CDC) 및 항체-의존적 세포성 세포독성 (ADCC)]은 불필요하거나 또는 유해한 용도에 바람직한 후보물질이될 수 있다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석을 실행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들면, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석을 실행하여, 상기 항체는 Fc γ R 결합 (이로 인하여 ADCC 활성이 결여될 가능성이 있음)은 없지만, 여전히 FcRn 결합 능력은 유지하고 있다는 것을 확인할 수 있다. ADCC를 증개하는 일차 세포, NK 세포는 오직 Fc γ RIII만을 발현시키고, 반면 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현시킨다. 조혈 세포에서 FcR 발현은 예를 들면, Ravetch and Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 분석하기 위한 시험관내 분석의 비-제한적인 예는 U.S. Pat. No. 5,500,362; Hellstrom, I. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063; Hellstrom, I *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502; U.S. Pat. No. 5,821,337; Bruggemann, M. *et al.* (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361에서 설명된다. 대안으로, 비-방사능활성 분석 방법이 이용될 수 있다(가령, ACTI™, 유동 세포측정용 비-방사능활성 세포독성 분석; CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; 그리고 CytoTox 96® 비-방사능활성 세포독성 분석, Promega, Madison, Wis.). 이러한 분석을 위한 유용한 작동체 세포는 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 예를 들면, 동물 모델에서 생체에서 평가될 수 있는데, 이를 태먼 Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656에서 설명된다. 이 항체가 C1q에 결합 할 수 없으므로, CDC 활성이 결핍된다는 것을 확인하기 위하여 C1q 결합 분석이 또한 시행될 수 있다 [가령, C1q 및 C3c 결합 ELISA, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402]. 보체 활성화 평가를 위하여, CDC 분석이 실행될 수 있다[가령, Gazzano-Santoro *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 202:163; Cragg, M. S. *et al.* (2003) *Blood* 101:1045-1052; 그리고 Cragg, M. S. and M. J. Glennie (2004) *Blood* 103:2738-2743 참고] FcRn 결합 및 생체내 제거/반감기 측정은 당분야에 공지된 방법에 의해 또한 실행될 수 있다 [가령, Petkova, S. B. *et al.* (2006) *Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769]. 감소된 작동체

기능을 가진 본 발명의 항체는 하나 또는 그 이상의 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329에 치환을 갖는 것들을 포함한다 (U.S. 특허, 7,332,056) 이러한 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체가 포함된, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327중 2개 또는 그 이상이 치환된 Fc 돌연변이체를 포함한다 (U.S. Pat. No. 7,332,581).

[0224] 특정 구체예들에 있어서, 항체의 하나 또는 그 이상의 잔기가 시스템 잔기로 대체된, 시스템 조작된 항체, 가령, "thioMAbs"를 만드는 것이 바람직할 수 있다. 구체적으로 구체예에서, 상기 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스템으로 치환함으로써, 반응활성 티올기는 이 상체의 접근가능한 부위에 위치하게 되고, 다른 모이어티, 이를 테면 하기에서 설명되는 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 이 항체가 접합되어 면역접합체가 생성될 수 있다. 특정 구체예들에서, 다음 잔기중 임의의 하나 또는 그 이상은 시스템으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (Kabat 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 그리고 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스템 조작된 항체는 예를 들면, U.S. 특허 번호. 7,521,541에서 설명된 바와 같이 만들어질 수 있다.

[0225] 또한, 원하는 항체를 동정하기 위하여 항체를 스크리닝하는데 이용되는 기술은 수득되는 항체의 성질에 영향을 줄 수 있다. 예를 들면, 항체가 용액 내 항원을 결합시키는데 사용되는 경우, 용액 결합을 시험하는 것이 바람직할 수 있다. 특히 바람직한 항체를 확인하기 위해, 항체와 항원 사이의 상호 작용을 시험하기 위한 다양한 기술을 이용할 수 있다. 이러한 기술에는 ELISAs, 표면 플라즈몬 공명 결합 분석 (가령, Biacore 결합 분석, Biacore AB, Uppsala, Sweden), 샌드위치 분석 (가령, 반자성 비드 시스템, IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), 웨스턴 블랏, 면역침전 분석, 및 면역조직 화학이 포함된다.

[0226] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서에서 제공되는 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체들도 고려된다. 예를 들면, 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 결합 친화력 및/또는 다른 생물학적 성질을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체들은 항체 및/또는 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변형을 도입시키거나, 또는 펩티드 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 변형은 예를 들면, 이 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 안에 잔기의 결손 및/또는 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 만일 최종 구조체가 원하는 성질, 가령, 표적-결합 (가령, 및 액티빈 이를 테면 액티빈 E 및/또는 액티빈 C 결합)을 보유한다면, 최종 구조체에 결손, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 만들어질 수 있다.

[0227] 예를 들면, 항체 친화력을 개선시키기 위하여 변경 (가령, 치환)은 HVRs에서 만들어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR에서 "hotspots", 가령, 체세포 성숙 과정 동안 고빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 인코딩되는 잔기에서 만들어질 수 있고[가령, Chowdhury (2008) Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)], 및/또는 SDRs (a-CDRs), 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화력에 대하여 테스트된다. 2 차 라이브러리로부터의 재구성 및 선택에 의한 친화성 성숙은 당업계에 기술되어 있다[가령, Hoogenboom 외, in Methods in Molecular Biology 178:1-37, O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001). 친화력 성숙의 일부 구체예들에 있어서, 다양성은 다양한 방법들 중 임의의 방법에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자들에 도입된다(가령, 오류-발생(error-prone) PCR, 쇠 서플링, 또는 올리고뉴클레오티드-지향된 돌연변이생성). 제 2 이브러리가 생성된다. 이어서, 이 라이브러리를 스크리닝하여, 원하는 친화력을 갖는 임의의 항체 변이체를 동정한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-지향된 접근법을 포함하는데, 이때 몇개 HVR 잔기 (가령, 한번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기는 가령, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 특이적으로 동정될 수 있다. CDR-H3 및 CDR-L3이 특히 대개 표적이 된다.

[0228] 특정 구체예들에 있어서, 치환, 삽입, 또는 결손은 이러한 변경으로 이 항체가 항원에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되지 않는 한, 하나 또는 그 이상의 HVRs에 발생될 수 있다. 예를 들면, 결합 친화력을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (가령, 본 명세서에서 제공된 보존적 치환)이 HVRs에 만들어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "hotspots" 또는 SDRs 밖에 있을 수 있다. 상기에서 제시된 변이체 VH 및 VL의 특정 구체예들에 있어서, 각 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이상의 아미노산 치환을 함유한다.

[0229] 돌연변이유발의 표적이 될 수 있는 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 잔기 또는 영역을 동정하는데 유용한 방법은 Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085에서 설명된 바와 같이, "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라고 불린다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기 집단 (가령, 하전된 잔기, 이를 테면 Asp, Arg, His, Lys, 및 Glu)는 동정되고, 그리고 항체-항원의 상호작용이 영향을 받는지를 판단하기 위하여 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가령, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체된다. 추가 치환이 상기 아미노산 위치에 도입되어, 초

기 치환에 대한 기능적 민감성을 입증할 수 있다. 대안으로, 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정(crystal) 구조를 결정하여 항체와 항원 간의 접촉 점을 동정한다. 이러한 접촉 잔기와 이웃 잔기는 치환의 후보로 표적화되거나, 또는 제거될 수 있다. 변이체들이 원하는 성질을 보유하는지를 판단하기 위하여 이 변이체들이 스크리닝될 수 있다.

[0230] 아미노산 서열 삽입은 한 개 잔기에서 수백 또는 그 이상의 잔기가 함유된 폴리펩티드 범위, 뿐만 아니라 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된 아미노-및/또는 카르복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 이 항체 분자의 다른 삽입 변이체들은 이 항체의 N-또는 C-말단을 효소 (가령, ADEPT를 위한) 또는 이 항체의 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 융합된 것을 포함한다.

[0231] 특정 구체예들에 있어서, 본원에서 제공된 항체 및/또는 결합 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있고, 쉽게 입수할 수 있는 추가의 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 유도체화에 적합한 부분은 물 가용성 중합체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 수용성 중합체의 예로는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥소레인, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (동중중합체 또는 무작위 공중합체), 그리고 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 동중중합체, 프로일프로필렌 산화물/에틸렌 산화물 공동-중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올 (가령, 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 이의 혼합물. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인하여 제작에서 장점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비-분지형일 수 있다. 항체 및/또는 결합 폴리펩티드에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 하나 이상의 중합체가 부착되는 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 항체 유도체 및/또는 결합 폴리펩티드 유도체가 규정된 상태하에 치료에 사용될 것인지 여부에 관계없이, 개선되는 항체 및/또는 결합 폴리펩티드의 특정 특성 또는 기능을 포함하는, 고려사항에 근거하여 결정될 수 있다.

[0232] **D. 소분자 길항제**

[0233] 다른 양태들에서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제는 소분자 (ActRIIB 길항제 소분자), 또는 소분자 길항제의 조합이다. ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 (가령, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및/또는 BMP10), 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 및/또는 공동-수용체를 억제할 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 본 명세서에서 기술된 것들, 이를 테면, 세포-기반 분석에서 측정되었을 때, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드에 의해 매개된 신호전달을 억제한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, ActRIIB 길항제 소분자는 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위하여, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증-연합된 합병증 (가령, 비장비대증, 수외조혈, 빈혈 및 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위하여 및/또는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자를 치료하기 위하여, 단독으로, 또는 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질과 복합되어 이용될 수 있다.

[0234] 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 GDF11, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 GDF8, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF11, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 BMP6, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제

소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 GDF3, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP15, BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 BMP10, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 ActRIIB, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, BMP10, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 ALK4, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, BMP10, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 ALK5, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, BMP10, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 ALK7, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 BMP10을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 본 명세서에서 개시된 바와 같이 BMP9를 억제하지 않거나, 또는 실질적으로 억제하지 않는다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 소분자, 또는 소분자 길항제의 조합은 본 명세서에서 개시된 바와 같이 액티빈 A를 억제하지 않거나, 또는 실질적으로 억제하지 않는다.

[0235] ActRIIB 길항제 소분자는 직접 또는 간접 억제제일 수 있다. 예를 들면, 간접적 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제의 조합은 적어도 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 B, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 또는 액티빈 BE), GDF11, BMP10, BMP9, BMP6, BMP5, GDF3, 및/또는 GDF8], 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 공동-수용체, 및/또는 하나 또는 그 이상의 하류 ActRIIB 신호생성 성분들 (가령, Smads)의 발현 (가령, 전사, 해독, 세포성 분비, 또는 이의 조합)을 억제할 수 있다. 대안으로, 직접적 소분자 길항제, 또는 소분자 길항제의 조합은 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 [가령, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 B, 액티빈 BC, 액티빈 AE, 또는 액티빈 BE), GDF11, BMP10, BMP9, BMP6, BMP5, GDF3, 및/또는 GDF8], 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5 및/또는 ALK7), 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 공동-수용체, 및/또는 하나 또는 그 이상의 하류 ActRIIB 신호생성 성분들 (가령, Smads)에 직접적으로 결합하여, 이를 억제할 수 있다. 하나 또는 그 이상의 간접적 그리고 하나 또는 그 이상의 직접적 ActRIIB 길항제 소분자의 조합은 본 명세서에 따라 이용될 수 있다.

[0236] 본 명세서의 소-분자 길항제의 결합은 공지의 방법을 이용하여 동정 및 화학적으로 합성될 수 있다 (가령, PCT 공개번호 WO 00/00823 및 WO 00/39585). 일반적으로, 본 명세서의 소분자 길항제는 보통 약 2000 달톤 크기, 대안으로 약 1500, 750, 500, 250 또는 200 달톤 미만의 크기이며, 이때 이러한 유기 소분자는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 폴리펩티드에 바람직하게 특이적으로 결합할 수 있다. 이들 소분자 길항제는 잘 알려진 기술을 사용하여 과도한 실험없이 확인될 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 결합할 수 있는 분자에 대한 유기 소분자 라이브러리를 스크리닝하는 기술은 당업계에 잘 공지되어 있다(가령, 국제 특허 공개 번호. W000/00823 및 W000/39585).

[0237] 본 명세서의 결합 유기 소분자는 예를 들면, 알데히드, 케톤, 옥심, 히드라존, 세미카르바존, 카르바지드, 1 차 아민, 2 차 아민, 3 차 아민, N-치환된 히드라진, 히드라지드, 알코올, 에테르, 티올, 티오에테르, 디설파이드, 카르복실산, 에스테르, 아마이드, 우레아, 카르바메이트, 카르보네이트, 케탈, 티오케탈, 아세탈, 티오아세탈, 아릴 할로젠화물, 아릴 술포네이트, 알킬 할로젠화물, 알킬 술포네이트, 방향족 화합물, 헤테로시클릭 화합물, 아닐린, 알켄, 알킨, 디올, 아미노 알코올, 옥사졸리딘, 옥사졸린, 티아졸리딘, 티아졸린, 에나민, 술폰아미드, 에폭시드, 아지리딘, 이소시아네이트, 술포닐 클로라이드, 디아조 화합물 및 산 클로라이드를 포함한다.

[0238] **E. 폴리뉴클레오티드 길항제**

[0239] 다른 양태들에서, 본 명세서의 방법 및 용도에 따라 사용된 ActRIIB 길항제는 ActRIIB 길항제는 폴리뉴클레오티

드(ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드), 또는 폴리뉴클레오티드의 조합이다. An ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드 (가령, 액티빈, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6, 및/또는 BMP10,), 유형 I 수용체 (가령, ALK4, ALK5, 및/또는 ALK7), 유형 II 수용체 (가령, ActRIIB), 공동-수용체, 및/또는 하류 신호생성 성분 (가령, Smads)을 억제할 수 있다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 본 명세서에서 기술된 것들, 이를 테면, 세포-기반 분석에서 측정되었을 때, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 리간드에 의해 매개된 신호 전달을 억제한다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, ActRIIB ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드는 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위하여, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증-연합된 합병증 (가령, 비장비대증, 수외조혈, 빈혈 및 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위하여 및/또는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자를 치료하기 위하여, 단독으로, 또는 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질과 복합되어 이용될 수 있다.

[0240] 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 GDF11, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 GDF8, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF11, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 액티빈 B, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 BMP6, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 BMP10, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 ActRIIB, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP6, GDF11, GDF3, BMP10, ALK4, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 ALK4, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, BMP10, ALK5, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 ALK5, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, BMP10, 및 ALK7을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드의 조합길항제는 적어도 ALK7, 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 GDF8, 액티빈 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 E, 액티빈 AB, 액티빈 AC, 액티빈 BC, 액티빈 AE 및/또는 액티빈 BE), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5, 및 BMP10을 더 저해한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 공개된 바와 같이, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제의 조합은 BMP9를 억제하지 않거나, 또는 실질적으로 억제하지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 공개된 바와 같이, ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리뉴클레오티드 길항제의 조합은 액티빈 A를 억제하지 않거나, 또는 실질적으로 억제하지 않는다.

[0241] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 폴리뉴클레오티드 길항제는 안티센스 핵산, RNAi 분자 [가령, 작은 간섭

RNA (siRNA), 작은-헤어핀 RNA (shRNA), microRNA (miRNA)], 압타머 및/또는 리보자임일 수 있다. 인간 GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 및 액티빈 E), BMP6, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7, 및 BMP10의 핵산 및 아미노산 서열은 당분야에 공지되어 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드 길항제를 만드는 상이한 많은 방법들이 당분야에 공지되어 있다. 따라서, 본 개시 내용에 따라 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드 길항제는 본원에 제공된 기술 및 교시에 기초하여, 당업자에 의해 통상적으로 제조될 수 있다.

[0242] 안티센스 기술은 안티센스 DNA 또는 RNA를 통해 또는 삼중 나선 형성을 통해 유전자 발현을 조절하는 데 사용될 수 있다. 안티센스 기술은 예를 들면, Okano (1991) *J. Neurochem.* 56:560; *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)에서 논의된다. 삼중-나선 형성은 예를 들면, Cooney 외. (1988) *Science* 241:456; 그리고 Dervan 외. (1991) *Science* 251:1300에서 논의된다. 상기 방법은 상보적 DNA 또는 RNA에 대한 폴리뉴클레오티드의 결합에 기초한다. 일부 구체예들에 있어서, 안티센스 핵산은 본원에 개시된 유전자의 RNA 전사체의 적어도 일부에 상보적인 단일 가닥 RNA 또는 DNA 서열을 포함한다. 그러나, 절대적인 상보성이 바람직하지만, 반드시 요구되지는 않는다

[0243] 본원에서 언급된 "RNA의 적어도 일부에 상보적인" 서열은 RNA와 혼성화되어 안정한 이중을 형성할 수 있는 충분한 상보성을 갖는 서열을 의미하고; 본원에 개시된 유전자의 이중 가닥 센스 핵산의 경우, 상기 이중 가닥 DNA의 단일 가닥을 시험할 수 있거나, 삼중체 형성을 검정할 수 있다. 혼성화하는 능력은 상보성의 정도 및 안티센스 핵산의 길이 모두에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 혼성화되는 핵산이 많을수록 RNA와의 염기 미스 매치가 더 많이 포함될 수 있으며, 여전히 안정한 이중 (또는 경우에 따라 트리나선)을 형성할 수 있다. 당업자는 혼성화된 복합체의 용점을 결정하기 위하여 표준 절차에 따라 허용가능한 정도의 불일치를 확인할 수 있다.

[0244] 메시지의 5' 말단, 예를 들어 AUG 개시 코돈까지의 5'-비-해독되는 서열과 상보적인 폴리뉴클레오티드는 해독을 억제하는데 가장 효율적으로 작용해야 한다. 그러나, mRNA의 3'-비-해독 서열에 상보적인 서열은 mRNA의 해독 저해에도 효과적임이 밝혀졌다 [가령, Wagner, R., (1994) *Nature* 372:333-335]. 따라서, 본 발명의 유전자의 5'-또는 3'-비-해독된 비-코딩 영역 중 어느 하나에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 내인성 mRNA의 해독을 억제하기 위한 안티센스 접근법에서 사용될 수 있다. mRNA의 5'-비-해독 영역에 상보적인 폴리뉴클레오티드는 AUG 개시 코돈의 보체를 포함해야 한다. mRNA 코딩 영역에 상보적인 안티센스 폴리뉴클레오티드는 해독에 다소 효과가 적은 억제제이지만, 본 명세서의 방법에 이용될 수 있다. 본 명세서의 mRNA의 5'-, 3'-또는 코딩 영역에 혼성화되도록 기획된다면, 안티센스 핵산은 길이가 최소한 6개 뉴클레오티드이어야 하고, 바람직하게는 올리고뉴클레오티드의 길이는 6 내지 약 50개 뉴클레오티드가 된다. 특이적 측면에서 상기 올리고뉴클레오티드는 최소한 10개 뉴클레오티드, 최소한 17개 뉴클레오티드, 최소한 25개 뉴클레오티드 또는 최소한 50개 뉴클레오티드이다.

[0245] 한 구체예에서, 본 명세서의 안티센스 핵산은 외인성 서열로부터 선자에 의해 세포 안에서 생성된다. 예를 들면, 벡터 또는 이의 부분이 전사되어, 본 명세서의 유전자의 안티센스 핵산 (RNA)이 만들어진다. 이러한 벡터는 원하는 안티센스 핵산을 인코딩하는 서열을 함유할 것이다. 이러한 벡터는 목적하는 안티센스 RNA를 생산하도록 전사될 수 있는 한, 에피솜 (episomal)으로 남아있거나 또는 염색체에 통합될 수 있다. 이러한 벡터는 당업계의 표준 재조합 DNA 기술 방법에 의해 작제될 수 있다. 벡터는 플라스미드, 바이러스성, 또는 척추동물 세포에서 복제 및 발현에 이용되는 당분야에 공지된 다른 것들이될 수 있다. 본 명세서의 바람직한 유전자를 인코딩하는 서열 또는 이의 단편은 척추동물, 바람직하게는 인간 세포에서 작용하는 것으로 당분야에 알려진 임의의 프로모터에 의해 발현될 수 있다. 이러한 프로모터는 유도성 또는 구성적 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 SV40 초기 프로모터 영역 [가령, Benoist and Chambon (1981) *Nature* 290:304-310], Rous 육종 바이러스의 3' 긴-말단 반복부에 포함된 프로모터 [가령, Yamamoto *et al.* (1980) *Cell* 22:787-797], 허피스 티미딘 프로모터 [가령, Wagner *et al.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445], 그리고 메탈로티오닌 유전자의 조절 서열 [가령, Brinster, *et al.* (1982) *Nature* 296:39-42]을 포함한다.

[0246] 일부 구체예들에서, 상기 폴리뉴클레오티드길항제는 하나 또는 그 이상의 : GDF11, GDF8, 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 C, 및 액티빈 E), BMP6, ActRIIB, GDF3, ALK4, ALK5, ALK7, 및 BMP10의 발현을 표적으로 하는 간섭 RNA(RNAi) 분자다. RNAi는 표적화된 mRNA의 발현을 방해하는 RNA의 발현을 의미한다. 구체적으로, RNAi는 siRNA(작은 간섭 RNA)를 통해 특정 mRNA와 상호작용하여 표적 유전자를 침묵시킨다. 그런 다음 ds RNA 복합체는 이 세포에 의한 분해의 표적이 된다. siRNA 분자는 길이가 10 내지 50개 뉴클레오티드의 이중-가닥으로 된 RNA 듀플렉스로, 충분히 상보적인(가령, 이 유전자에 최소 80% 동일성) 표적 유전자의 발현을 간섭한다. 일부 구체예들에 있어서, 상기 siRNA 분자는 이 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 최소한 85, 90, 95,

96, 97, 98, 99, 또는 100% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0247] 추가 RNAi 분자는 짧은-헤어핀 RNA (shRNA)을 포함하며; 또한 짧은-간섭 헤어핀 및 microRNA (miRNA)을 포함한다. 상기 shRNA 분자는 루프에 의해 연결된 표적 유전자의 센스 및 안티센스 서열을 함유한다. 상기 shRNA는 핵으로부터 세포질로 운반되며, mRNA와 함께 분해된다. Pol III 또는 U6 프로모터는 RNAi의 RNAs를 발현시키는 데 이용될 수 있다. Paddison 등, [Genes & Dev. (2002) 16:948-958, 2002]은 RNAi에 영향을 주는 수단으로 헤어핀으로 접힌 작은 RNA 분자를 사용했다. 따라서, 이러한 짧은-헤어핀 RNA (shRNA) 분자는 본 명세서에서 기술된 방법에 또한 유익하게 이용된다. 기능적 shRNA의 줄기와 루프의 길이는 다양하며; 줄기 길이는 약 25 내지 약 30nt 범위일 수 있고, 루프 크기는 침묵 활성에 영향을 미치지 않고, 4 내지 약 25nt 범위일 수 있다. 특정 이론에 구속되지 않지만, 이들 shRNA는 DICER RNase의 이중 가닥으로 된 RNA (dsRNA)와 유사하며, 특정 유전자 발현 억제에 동일한 능력을 갖는다. 상기 shRNA는 렌티바이러스성 벡터로부터 발현될 수 있다. miRNA는 길이가 약 10 ~ 70개 뉴클레오타이드의 단일 가닥으로 된 RNA이며, "스텝 루프 (stem-loop)" 구조를 특징으로 하는 pre-miRNA로 먼저 전사되고, 후속적으로 RISC를 통해 추가 처리 후 성숙 miRNA로 처리된다.

[0248] siRNA를 포함하나, 이에 국한되지 않는 RNAi를 매개하는 분자는 화학적 합성 (Hohjoh, FEBS Lett 521:195-199, 2002), dsRNA의 가수분해 (Yang *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), T7 RNA 중합효소와 시험관내 전사 (Donzeet *et al.*, Nucleic Acid Res 30:e46, 2002; Yu *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002), 그리고 뉴클레아제, 이를 테면 대장균(*e. coli*) RNase III를 이용하여 이중-가닥으로 된 RNA의 가수분해 (Yang *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002)에 의해 시험관 안에서 만들어질 수 있다.

[0249] 또다른 측면에 따르면, 본 명세서는 decoy DNA, 이중-가닥으로 된 DNA, 단일-가닥으로 된 DNA, 복합체화된 DNA, 포집화된(encapsulated) DNA, 바이러스성 DNA, 플라스미드 DNA, 네이키드(naked) RNA, 포집화된 RNA, 바이러스성 RNA, 이중-가닥으로 된 RNA, RNA 간섭을 만들 수 있는 분자, 또는 이의 조합을 포함하나, 이에 국한되지 않는 폴리뉴클레오타이드 길항제를 제공한다.

[0250] 일부 구체예들에 있어서, 본 명세서의 폴리뉴클레오타이드 길항제는 아타머(aptamers)이다. 아타머는 이중-가닥으로 된 DNA와 단일-가닥으로 된 RNA 분자를 포함하는 핵산 분자로서, 표적 분자에 특이적으로 결합하여, 4차 구조를 형성한다. 아타머의 일반적 그리고 치료 용도는 당분야에 잘 확립되어 있다 (가령, U.S. 특허 5,475,096) 아타머에 대한 추가 정보는 U.S. 특허 출원 공개 번호 20060148748에서 찾아볼 수 있다. 핵산 아타머는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 지수적 농축 (SELEX) 프로세스에 의한 리간드의 체계적 진화 (Systemigen Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 과정을 통해 선택된다. SELEX는 가령, U.S. Pat. Nos. 5,475,096; 5,580,737; 5,567,588; 5,707,796; 5,763,177; 6,011,577; 그리고 6,699,843에서 설명된 바와 같이, 표적 분자에 매우 특이적 결합을 하는 핵산 분자의 시험관내 진화를 위한 방법이다. 아타머를 동정하기 위한 또다른 스크리닝 방법은 U.S. 특허 번호. 5,270,163에 설명되어 있다. SELEX 과정은 다양한 2-차원 및 3-차원 구조를 형성하기 위한 핵산의 능력 뿐만 아니라, 실제 모든 화합물과 함께 리간드 (특정 결합 쌍을 형성)로 작용하는 뉴클레오타이드 단량체 내에서 이용 가능한 화학적 다양성을 기반으로 하는데, 이들 단량체 또는 중합체는 다른 핵산 분자 및 폴리펩티드를 포함할 수도 있고, 포함하지 않을 수도 있다. 임의의 크기 또는 조성의 분자가 표적으로 작용할 수 있다. SELEX 방법은 후보 올리고 뉴클레오타이드의 혼합물로부터의 선택 및 원하는 결합 친화도 및 선택성을 달성하기 위해, 동일한 일반 선택 방안을 사용하여 결합, 분할 및 증폭의 단계적 반복을 포함한다. 무작위화된 서열의 세그먼트를 포함할 수 있는 핵산 혼합물로부터 시작하여, 상기 SELEX 방법은 결합에 우호적인 조건하에 표적에 상기 혼합물을 접촉시키는 단계; 표적 분자에 특이적으로 결합된 핵산으로부터 결합안된 핵산을 분할시키는 단계; 핵산-표적 복합체를 해리시키는 단계; 핵산-표적 복합체로부터 해리된 핵산을 증폭시켜, 핵산의 리간드 농축된 혼합물을 생산하는 단계를 포함한다. 상기 결합, 분할, 해리 및 증폭 단계들은 표적 분자에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 핵산 리간드를 만들기 위하여 필요한 수의 주기로 반복된다.

[0251] 전형적으로, 이러한 결합 분자는 동물에 별도 투여되지만 [가령, O'Connor (1991) J. Neurochem. 56:560], 그러나 이러한 결합 분자는 숙주 세포가 취한 폴리뉴클레오타이드로부터 발현될 수 있고, 생체내에서 발현될 수 있다 [가령, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)].

[0252] **F. 폴리스테틴 및 FLRG 길항제**

[0253] 다른 양태들에서, ActRIIB 길항제는 폴리스테틴 또는 FLRG 폴리펩티드이다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이,

폴리스테틴 및/또는 FLRG 폴리펩티드는 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위하여, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증-연합된 합병증 (가령, 비장비대증, 수외조혈, 빈혈 및 섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위하여 및/또는 Janus 키나제 억제제로 치료된 환자를 치료하기 위하여, 단독으로, 또는 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질과 복합되어 이용될 수 있다.

[0254] 용어 "폴리스테틴 폴리펩티드"는 임의의 자연 발생적 폴리스테틴 폴리펩티드, 뿐만 아니라 유용한 활성을 유지하는 임의의 이의 변이체들 (돌연변이체, 단편, 융합 및 펩티드모방체 형태 포함)를 포함하는 폴리펩티드이며, 임의의 기능성 폴리스테틴 단량체 또는 다량체를 더 포함한다. 특정 바람직한 구체예들에서, 폴리스테틴 드본 명세서의 폴리펩티드는 액티빈, 구체적으로 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 억제한다. 액티빈 결합 성질을 유지하는 폴리스테틴 폴리펩티드 변이체들은 폴리스테틴 및 액티빈 상호작용과 관련된 기존 연구에 근거하여 동정될 수 있다. 예를 들면, W02008/030367은 액티빈 결합에 중요한 것으로 보이는 특이적 폴리스테틴 도메인 ("FSDs")을 공개한다. 하기 서열 번호: 65-67에 나타낸 바와 같이, 폴리스테틴 N-말단 도메인 ("FSND" 서열 번호: 65), FSD2 (서열 번호: 67), 그리고 다소 약한 FSD1 (서열 번호: 66)은 액티빈 결합에 중요한 폴리스테틴 안에 있는 예시적인 도메인을 나타낸다. 또한, 폴리펩티드 라이브러리를 만들고 테스트하는 방법은 ActRII 폴리펩티드 관련 내용에서 설명되며, 이러한 방법들 또한 폴리스테틴의 변이체를 만들고, 테스트하는 방법에 속한다. 폴리스테틴 폴리펩티드는 폴리스테틴 폴리펩티드의 서열에 최소한 약 80% 동일한, 그리고 임의 선택적으로 최소한 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 임의 공지의 폴리스테틴 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다. 폴리스테틴 폴리펩티드의 예로는 예를 들면, W02005/025601에서 설명된 인간 폴리스테틴 전구체 폴리펩티드 (서열 번호: 63)의 성숙 폴리스테틴 폴리펩티드 또는 더 짧은 아이소폼 또는 다른 변이체들을 포함한다.

[0255] 인간 폴리스테틴 전구체 폴리펩티드 아이소폼 FST344는 다음과 같다:

```

1  MVRARHQPGG LCLLLLLLQC FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNAYCV TCNRICPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS EDTEEEEEDE DQDYSFPISS ILEW
    
```

[0256]

(서열 번호: 63; NCBI Reference No. NP_037541.1)

[0257]

상기 신호 펩티드는 밑줄로 표시되며; 또한 상기 밑줄은 하기에 나타낸 더 짧은 폴리스테틴 아이소폼으로부터 이 폴리스테틴 아이소폼을 구별시키는 C-말단 연장을 나타내는 마지막 27개 잔기다.

[0258]

[0259] 인간 폴리스테틴 전구체 폴리펩티드 아이소폼 FST317은 다음과 같다:

```

1  MVRARHQPGG LCLLLLLLQC FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG
RCQVLYKTEL
51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR
NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNAYCV TCNRICPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT
YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCN (서열 번호: 64; NCBI Reference No. NP_006341.1)
    
```

[0260]

상기 신호 펩티드는 밑줄로 표시된다.

[0261]

[0262] 폴리스테틴 N-말단 도메인 (FSND) 서열은 다음과 같다:

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDN
TLFKWMIFNGGAPNCIPCK (서열 번호: 65; FSND)

[0263]

[0264] FSD1 및 FSD2 서열은 다음과 같다:

ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (서열 번호: 66; FSD1)
KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVT (서열 번호: 67; FSD2)

[0265]

[0266] 다른 양태들에서, 본 명세서에 따라 사용되는 물질은 폴리스테틴-유사 관련된 유전자(FLRG)이며, 이는 또한 폴리스테틴-관련된 단백질 3 (FSTL3)로도 알려져 있다. 용어 "FLRG 폴리펩티드"는 임의의 자연 발생적 FLRG 폴리펩티드, 뿐만 아니라 유용한 활성을 유지하는 임의의 이의 변이체들 (돌연변이체, 단편, 융합 및 펩티드모방체 형태 포함)를 포함하는 폴리펩티드이다. 특정 바람직한 구체예들에 있어서, 본 명세서의 FLRG 폴리펩티드는 액티빈, 특히 액티빈 A에 결합하고 및/또는 이의 활성을 저해한다. 액티빈 결합 성질을 유지하는 FLRG 폴리펩티드 변이체들은 FLRG 및 액티빈 상호작용을 분석하는데 이용되는 통상적인 방법(가령, US 6,537,966)을 이용하여 동정될 수 있다. 또한, 폴리펩티드 라이브러리를 만들고 테스트하는 방법은 ActRII 폴리펩티드 관련 내용에서 설명되며, 이러한 방법들 또한 FLRG의 변이체를 만들고, 테스트하는 방법에 속한다. FLRG 폴리펩티드는 FLRG 폴리펩티드의 서열에 최소한 약 80% 동일한, 그리고 임의선택적으로 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 임의 공지의 FLRG 서열로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다.

[0267] 인간 FLRG 전구체 (폴리스테틴-관련된 단백질 3 전구체) 폴리펩티드는 다음과 같다:

1 MRPGAPGPLW PLPWGALAWA VGFVSSMSG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL
51 VLQTDVTRAE CCASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD
101 GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECCELRA
151 ARCRGHPDLS VMYRGRCKRS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC
201 PVPSSPGQEL CGNNNVTYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP
251 PGGESAEIEEE NFV (서열 번호: 68; NCBI Reference No. NP_005851.1)

[0268]

[0269] 상기 신호 펩티드는 밑줄로 표시된다.

[0270] 특정 구체예들에 있어서, 폴리스테틴 폴리펩티드와 FLRG 폴리펩티드의 기능성 변이체 또는 변형된 형태는 폴리스테틴 폴리펩티드의 최소한 일부분 또는 FLRG 폴리펩티드와 하나 또는 그 이상의 융합 도메인, 이를 테면, 예를 들면, 폴리펩티드의 단리, 탐지, 안정화 또는 다량체화를 용이하게 하는 도메인을 갖는 융합 단백질을 포함한다. 적합한 융합 도메인은 ActRIIB 폴리펩티드와 관련하여 상기에서 상세하게 논의된다. 일부 구체예에서, 본 명세서의 길항제 물질은 Fc 도메인에 융합된 폴리스테틴 폴리펩티드의 액티빈-결합 부분이 포함된 융합 단백질이다. 또다른 구체예에서, 본 명세서의 길항제 물질은 Fc 도메인에 융합된 FLRG 폴리펩티드의 액티빈-결합 부분이 포함된 융합 단백질이다.

[0271] **3. 스크리닝 분석**

[0272] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드의 항진제 또는 길항제인 화합물(물질)을 동정하는데 대상 ActRIIB 폴리펩티드 및 이의 변이체들 (가령, GDF8 트랩)의 이용에 관한 것이다. 이 스크리닝 분석을 통하여 확인된 화합물은 예를 들면, 동물 모델에서 골수염유증을 치료하는 이들의 능력 평가를 위하여 테스트될 수 있다.

[0273] ActRIIB 신호생성 (가령, Smad 신호생성)을 표적으로 함으로써, 골수염유증 치료용 치료 물질을 스크리닝하는 다수의 접근법이 있다. 특정 구체예들에 있어서, 선택된 세포 계통에서 ActRIIB-매개된 효과를 교란시키는 물질을 동정하기 위해 화합물의 고효율 스크리닝이 수행될 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 분석은 ActRIIB 폴리펩티드가 이의 결합 짝, 이를 테면 ActRIIB 리간드 (가령, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB, 액티빈 C, GDF8, GDF3, GDF11 또는 BMP10)에 결합하는 것을 특이적으로 억제 또는 감소시키는 화합물을 스크리닝 및 동정하기 위하여 실행된다. 대안으로, 상기 분석은 ActRII 폴리펩티드가 이의 결합 짝, 이를 테면 ActRIIB 리간드에 대한

결합을 향상시키는 화합물을 동정하는데 사용될 수 있다. 추가 구체예에서, ActRIIB 폴리펩티드와 상호 작용하는 능력에 의해 이 화합물이 동정될 수 있다.

[0274] 다양한 분석 포맷이 충분할 것이며, 본원 명세서에 비추어 여기에 명백하게 기술되지 않은 것들은 당업자에 의해 이해될 것이다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 본 발명의 테스트 화합물 (물질)은 임의의 조합적 화학 방법에 의해 생성될 수 있다. 대안으로, 본 화합물은 생체내 또는 시험관내에서 합성된 자연 발생 생체 분자일 수 있다. 조직 성장의 조절자로서 작용하는 능력에 대하여 테스트되는 화합물 (물질)은 예를 들어, 박테리아, 효모, 식물 또는 다른 유기체 (예 : 천연 생성물)에 의해 생성될 수 있고, 화학적으로 만들어질 수 있거나 (예: 펩티도모방체를 포함하는 소분자), 또는 재조합 적으로 생산될 수 있다. 본 발명에 의해 고려되는 테스트 화합물은 비-펩티딜 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드 모방체, 당, 호르몬 및 핵산 분자를 포함한다. 특정 구체예들에 있어서, 상기 테스트 물질은 분자량이 약 2,000 달톤 미만인 작은 유기 분자이다.

[0275] 본 명세서의 테스트 화합물은 단일의 별개 엔터티로 제공되거나, 또는 조합 화학에 의해 만들어진, 더 큰 복합체 라이브러리로 제공될 수 있다. 이들 라이브러리는 예를 들어, 알코올, 알킬 할로겐화물, 아민, 아미드, 에스테르, 알데히드, 에테르 및 다른 부류의 유기 화합물을 포함 할 수 있다. 테스트 화합물을 테스트 시스템에 제시하는 것은 분리된 형태 또는 화합물의 혼합물로서, 특히 초기 스크리닝 단계에서 제시할 수 있다. 임의선택적으로, 상기 화합물은 임의로 다른 화합물로 유도체화될 수 있고, 이 화합물의 단리를 용이하게 하는 유도체화 기를 가질 수 있다. 유도체화기의 비-제한적인 예는 바이오틴, 플루오레세인, 디옥시게닌, 녹색 형광 단백질, 동위 원소, 폴리히스티딘, 자성 비드, 글루타티온 S-전이효소(GST), 광활성 가교제 또는 이들의 임의 조합물을 포함한다.

[0276] 화합물 및 천연 추출물의 라이브러리를 테스트하는 많은 약물-스크리닝 프로그램에서, 주어진 시간 동안 조사되는 화합물의 수를 최대화하기 위해서는 고-처리량 분석이 바람직하다. 정제되거나 반-정제된 단백질로 유도될 수 있는 것과 같이, 세포가 없는 시스템에서 수행되는 분석은 테스트 화합물에 의해 중재되는 분자 표적의 신속한 개발 및 변경의 상대적으로 용이한 탐지를 가능하게 하기 위해 생성될 수 있다는 점에서 종종 "1 차" 스크린으로 선호된다. 더욱이, 테스트 화합물의 세포 독성 또는 생물이용성의 효과는 시험관 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있지만, 대신 이 분석은 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 파트너 (가령, ActRIIB 리간드) 간의 결합 친화력의 변경으로 현시될 수 있는, 분자 표적 상에 약물의 효과에 주로 집중한다.

[0277] 단지 설명하기 위해, 본 발명의 예시적인 스크리닝 분석에서, 목적 화합물은 분석 의도에 적합하다면, ActRIIB 리간드에 통상적으로 결합 할 수 있는, 분리 및 정제된 ActRIIB 폴리펩티드에 접촉시킨다. 상기 화합물 및 ActRIIB 폴리펩티드의 혼합물에 ActRIIB 리간드 (가령, GDF11)가 함유된 조성물이 추가된다. ActRIIB/ActRIIB-리간드 복합체의 탐지 및 정량화는 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 복합체 형성을 억제(또는 강화)하는데 있어서 이 화합물의 효과를 측정하는 수단을 제공한다. 화합물의 효능은 다양한 농도의 테스트 화합물을 사용하여 얻은 데이터로부터 용량-반응 곡선을 생성함으로써 평가할 수 있다. 더욱이, 대조 분석을 수행하여 비교를 위한 기준을 제공할 수도 있다. 예를 들면, 대조군 분석에서, 단리 및 정제된 ActRIIB 리간드가 ActRIIB 폴리펩티드를 함유하는 조성물에 첨가되고, ActRIIB/ActRIIB 리간드 복합체의 형성은 테스트 화합물의 부재하에 정량화된다. 일반적으로, 반응물이 혼합되는 순서는 다양할 수 있고, 동시에 혼합될 수 있음을 이해할 것이다. 더욱이, 정제된 단백질 대신, 세포성 추출물과 용해물을 이용하여 적합한 무-세포 분석 시스템을 제공한다.

[0278] ActRIIB 폴리펩티드과 이의 결합 단백질 사이에 복합체 형성은 다양한 기술에 의해 탐지될 수 있다. 예를 들면, 복합체 형성의 조절은 예를 들면, 탐지가가능하도록 라벨된 단백질 이를 테면 방사능라벨된 (가령, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C 또는 ³H), 형광으로 라벨된 (가령, FITC), 또는 효소적으로 라벨된 ActRIIB 폴리펩티드 및/또는 이의 결합 단백질을 이용하거나, 면역분석에 의해, 또는 크로마토그래피 탐지에 의해 정량화될 수 있다.

[0279] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 간에 상호작용을 직접적으로, 또는 간접적으로 측정함에 있어서, 형광 편광 분석 및 형광 공명 에너지 전달 (FRET) 분석의 이용을 고려한다. 더욱이, 다른 방식의 탐지, 이를 테면 광학 도파관(waveguides) (가령, PCT 공개 WO 96/26432 및 U.S. 특허 번호 5,677,196 참고), 표면 플라스몬 공명 (SPR), 표면 전하 센서, 및 표면력 센서등은 본 명세서의 많은 구체예에 양립가능하다.

[0280] 더욱이, 본 명세서는 ActRIIB 폴리펩티드와 이의 결합 짝 사이의 상호작용을 파괴 또는 강화시키는 물질들을 동정하기 위한 "2-하이브리드 분석"으로 알려진 상호작용 트랩 분석의 사용을 고려한다. 가령, U.S. 특허 번호

5,283,317; Zervos 등, (1993) Cell 72:223-232; Madura 등, (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel 등, (1993) Biotechniques 14:920-924; 그리고 Iwabuchi 등, (1993) Oncogene 8:1693-1696). 특정 구체예에서, 본 명세서는 ActRII 폴리펩티드 또는 GDF 트랩과 이의 결합 단백질 간의 상호작용을 해리시키는 화합물 (가령, 소분자 또는 펩티드)를 동정하기 위한 역 2-하이브리드 시스템의 사용을 고려한다 [Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; 및 U.S. 특허 5,525,490; 5,955,280; 그리고 5,965,368 참고].

[0281] 특정 구체예들에 있어서, 상기 대상 화합물은 본 명세서의 ActRII 폴리펩티드와 상호작용하는 능력에 의해 동정된다. 상기 화합물과 ActRII 폴리펩티드 간의 상호작용은 공유 또는 비-공유적일 수 있다. 예를 들면, 광-가교, 방사능라벨된 리간드 결합, 및 친화력 크로마토그래피가 포함된 시험관내 생화학적 방법을 이용하여 단백질 수준에서 이러한 상호작용이 동정될 수 있다. [Jakoby WB *et al.* (1974) Methods in Enzymology 46:1]. 특정 경우에서, 상기 화합물은 기전-기반의 분석, 이를 테면 ActRIIB 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 탐지하는 분석에서 스크리닝될 수 있다. 이 분석은 고형-상 또는 유체-상 결합 사건을 포함할 수 있다. 대안으로, ActRIIB 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자는 리포터 시스템 (가령, β -갈락토시다제, 루시페라제, 또는 녹색 형광 단백질)과 함께 세포 안으로 형질감염되고, 라이브러리, 바람직하게는 고처리량 스크리닝 또는 이 라이브러리의 개별 구성요소들에 대하여 스크리닝될 수 있다. 다른 기전-기반의 결합 분석이 이용될 수 있는데, 예를 들면, 자유 에너지의 변화를 탐지하는 결합 분석이 이용될 수 있다. 결합 분석은 웰, 비드 또는 칩에 고정된 표적으로 또는 고정된 항체에 의해 포집된 표적 또는 모세관 전기영동에 의해 해리되는 표적으로 실행될 수 있다. 상기 결합된 화합물은 발색 종점 또는 형광 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 탐지될 수 있다.

[0282] **4. 예시적인 치료 용도**

[0283] 본 명세서의 실시예에서 기술된 바와 같이, ActRIIB 길항제 (억제제)는 골수섬유증 환자, 구체적으로 예를 들면, 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증을 비롯한 이 질환의 다양한 합병증을 개선하는데 이용될 수 있다는 발견에 관계한다. 특히, 본원에서 제시된 데이터에서 GDF 트랩 폴리펩티드가 골수섬유증 JAK2V617F 모델에서 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증을 감소시킨다는 것을 보여준다. 따라서, 특정 양태들에서, 본 명세서는 골수섬유증의 치료, 구체적으로 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증(비장비대증, 수외조혈, 빈혈, 및 섬유증)을 치료 또는 예방하는 조성물 및 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 이를 요하는 환자에게 효과량의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제, 골수섬유증 치료용 하나 또는 그 이상의 기타 지지 요법 또는 활성물질과 임의선택적으로 조합하여 투여하는 것이다.

[0284] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 장애 또는 상태를 "방지하는" 치료는 통계적 시료에서 처리안된 대조 시료와 비교하여 처리된 시료에서 장애 또는 상태의 발생이 감소되거나, 또는 처리안된 대조 시료와 비교하여 장애 또는 상태의 하나 또는 그 이상의 증상의 개시를 지연시키거나 또는 그 중증도를 감소시키는 화합물을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 특정 상태가 일단 확립되면 그 상태의 개선 또는 제거를 포함한다. 어느 경우이나, 예방 또는 치료는 의사 또는 다른 건강 관리 제공자에 의해 제공된 진단 및 치료제 투여의 의도된 결과로 식별될 수 있다.

[0285] 일반적으로, 본 명세서에서 설명된 질환 또는 상태의 치료 또는 예방은 ActRIIB 길항제의 "유효량"을 투여하여 이루어진다. 물질의 유효량이란 필요한 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 본 발명의 약제의 "치료학적 유효량"은 질환 상태, 개체의 나이, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 약제의 능력에 따라 달라질 수 있다. 물질의 "예방차원의 유효량"이란 원하는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0286] 용어 "피험자", "개인", 또는 "환자"는 명세서를 통하여 호환되며, 일반적으로 포유류를 지칭한다. 포유류에는 가축 (예 : 암소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예 : 인간 및 원숭이와 같은 사람이 아닌 영장류), 토끼 및 설치류 (예 : 마우스 및 랫)가 포함된다.

[0287] 골수섬유증은 일반적으로 점차적으로 비효율적인 조혈, 골수 이식 (scrammedullary hematopoiesis), 다양한 염증성 합병증 및 생존 단축을 초래하는 진행성 골수 섬유화를 특징으로 하는 조혈의 종양성 질환이다 [Mascarenhas 등, (2012) *Curr Med Chem* 19:4399-4413; 그리고 Vannucchi 등, (2011) *Hematol Am Soc Hematol Educ Prog* 2011:222-230]. 이는 과도한 세포가 생성되는 골수의 골수 증식 질환 중 하나이다. 비정상 조혈 세포 클론에 의한 섬유 모세포 성장 인자와 같은 사이토킨의 생성은 콜라겐 섬유증을 통한 결합 조직에 의한 골수의 조혈 조직의 치환을 유도한다. 조혈 조직이 감소하면 새로운 혈액 세포를 생성할 수 있는 환자의 능력이 손상되어 모든 혈액형이 부족한 점진적인 범혈구 감소증이 생긴다. 그러나, 증식 및 섬유모세포 및 콜라겐의 침

작은 2 차 현상이며, 섬유모세포 자체는 비정상 세포 클론의 일부가 아니다. 골수의 진행성 반흔 또는 섬유화의 결과로써, 조혈 세포는 다른 부위, 특히 간 및 비장으로 이동해야하기 때문에, 환자는 수외조혈을 일으키게 된다. 이는 이러한 장기들의 비대를 초래한다. 간에서, 이 상태는 간비대라고 부른다. 비장의 비대는 비장비대증이라 하며, 이는 범혈구감소증, 구체적으로 혈소판감소증 및 빈혈에 원인이 된다. 폐와 림프절에서 수외조혈이 발생한다는 보고도 있다. 수외조혈의 또 다른 합병증은 비정상적으로 형성된 적혈구의 존재, 변형적 혈구증가증(poikilocytosis)이다. 골수섬유증의 통상적인 임상적 현시는 진행성 간비장비대증, 비정상적 혈액 수, 및 쇠약증상(debilitating symptoms), 이를 테면 피로, 체중 감소, 식은땀, 열, 소양증, 뼈통증, 조기 포만감, 복부 통증 또는 불편함, 관절통, 근육통, 감각이상, 악액질, 비장성 증색증 및 출혈을 포함한다. 최근까지, 질병 진행에 있어서 명확하게 입증된 유일한 치료법은 동종 조혈 모세포 이식에 있었으나, 치료와 관련된 사망률은 높았고, 소수의 환자만이 이 집중 치료를 받을 수 있다[Gupta 등, (2012) 혈액 120: 1367-1379].

[0288] 특정 양태들에 있어서, ActRIIB 길항제는 단독으로, 또는 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질과 복합되어, 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도 (가령, 1차 골수섬유증, 포스트-진성다혈구증 골수섬유증, 및 포스트-본태성 혈소판증가증 골수섬유증)를 치료, 예방 또는 감소시킬 수 있다. 특히, ActRIIB 길항제는 단독으로, 또는 하나 또는 그 이상의 지지 요법 또는 활성물질과 복합되어, 하나 또는 그 이상의 골수섬유증의 합병증, 예를 들면, 비효과적인 조혈, 빈혈, 염증, 섬유증 (가령, 골수 섬유증, 비장 섬유증, 및 간 섬유증), 범혈구감소증, 혈소판감소증, 수외조혈 (가령, 비장성 수외조혈, 간의 수외조혈, 폐의 수외조혈, 및 림프의 수외조혈), 간비대, 비장비대증, 골경화증, 골골수섬유증, 변형적 혈구증가증, 피로, 체중 감소, 식은땀, 열, 소양증, 뼈통증, 조기 포만감, 복부 통증 또는 불편함, 관절통, 근육통, 감각이상, 악액질, 비장성 증색증, 및 출혈의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시킬 수 있다.

[0289] 원발성 골수섬유증 (PMF)의 현재 진단은 세계 보건기구 (WHO)의 기준에 기반하며 임상 및 실험실 특징의 종합 평가를 포함한다 [Tefferi A 등, (2007) 혈액. 110:1092-1097]. WHO의 진단 기준에는 세 가지가 있다: 1) 레티쿨린 및/또는 콜라겐 섬유증을 수반하거나, 또는 레티쿨린 섬유증 없이, 거핵구 증식 및 비정형성 (이상한 핵/세포질 비율 및 과다염색과 불규칙적으로 폴드된 핵 및 조밀한 클러스터링을 갖는 작은 것부터 큰 거핵구), 거핵구 변화는 증가된 골수 세포질, 과립구 증식이 반드시 수반되어야 하며, 흔히 적혈구생성 (가령, 전-섬유증 1차 골수섬유증)이 감소되고, 2) 만성 골수성 백혈병, 진성다혈구증, 골수이형성 증후군, 또는 기타 골수성 신생물에 대한 WHO 기준에 부합되지 않고, 및 3) 입증 of *JAK2V617F* 또는 기타 클론성 표지의 또는 반응성 골수 섬유증의 증거 없음. 추가적으로, 4 가지 WHO 진단 부작용이 있다: 1) 백적혈구모세포종, 2) 증가된 혈청 LDH 수준, 3) 빈혈, 및 4) 손으로 만져지는 비장비대증. 말초 혈액 백혈구모세포종 (즉, 유헤 적혈구, 미성숙 과립구 및 비장 세포의 존재)은 PMF의 전형적이지만 변하지 않는 특징이며; 선섬유증 PMF는 명백한 백적혈구모세포종을 나타내지 않을 수도 있다 [Kvasnicka 등, (2010) Am J Hematol. 85:62-69]. PMF에서 골수 섬유증은 대개 *JAK2V617F* 또는 돌연변이 *CALR* 또는 *MPL*, 세염색체중 9, del (13q)골수 섬유증과 연관된다[Hussein 등, (2009) Eur J Haematol. 82:329-338]. 따라서, 이러한 유전자 표지의 존재는 골수 섬유증과 관련된 골수 신생물의 존재 하에서 PMF의 진단을 강력히 뒷받침한다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 1차 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소, 구체적으로 1차 골수섬유증의 하나 또는 그 이상의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 있어서, ActRIIB 길항제의 방법 및 용도와 관계한다.

[0290] 포스트-진성다혈구증 골수섬유증 (포스트-PV MF) 및 포스트-본태성 혈소판증가증 골수섬유증 (포스트-ET MF)의 현재 진단은 MPN 연구 및 치료 (IWG-MRT)의 국제 작업단에 의해 공개된 기준에 근거한다[Barosi G 등, (2008) Leukemia. 22:437-438]. 포스트-PV MF에 대한 2 가지 IWG-MRT 1차 기준이 있다: 1) WHO 기준에서 정의한 바와 같이, 진성다혈구증의 기존 진단의 문서화, 및 2) 골수 섬유증 등급 2-3 (0-3 척도에서) 또는 등급 3-4 (0-4 척도에서). 유럽 분류에 따른 등급 2-3: 콜라겐화 (부적절한 삼색염색 착색)의 증거가 없는 확산성의, 종종 거친 섬유 네트워크, 또는 콜라겐 화 (양성 삼색염색 착색)의 영역을 가진 확산성, 거친 섬유 네트워크[Thiele 등, (2005) Haematologica. 90:1128-1132]. 표준 분류에 따른 등급 3-4: 광범위한 교차점을 가지고, 경우에 따라서는 오직 콜라겐의 집중 변들 및/또는 국소적인 골경화증을 만들 가진 레티쿨린에서 확산 및 밀도 증가, 또는 종종 심각한 골 경화를 동반하는, 거친 콜라겐 변들과의 광범위한 교차점을 갖는 레티쿨린의 확산 및 밀도 증가 [Manoharan 등, (1979) Br J Haematol 43:185-190]. 추가적으로, 4 개의 IWG-MRT 2차적 진단 기준이 있으며, 그 중 2 개는 포스트-PV MF 진단을 위한 IWG-MRT 기본 기준과 함께 환자에서 탐지되어야 한다: 1) 세포 감소 치료가 없을 때 정맥 절개를 위한 빈혈 또는 지속적 상실, 2) 백적모혈구성 말초 혈액 사진, 3) 비장비대 증가, 이는 ≥ 5 cm의 손으로 만져지는 비장의 증가하거나, 새로이 만져지는 비장비대증이 나타나는 것으로 정의됨, 4) 3가지 전신 증상 중 1 가지 이상 발달 : 6 개월 안에 >10 %의 체중 감소, 야간 발한, 원인 불명의 발열. 포스트-ET MF에 대한 2 가지 IWG-MRT 1차 기준이 있다: 1) WHO 기준에서 정의한 바와 같이, 진성다혈구증의 기존 진단

단의 문서화, 2) 골수 섬유증 등급 2-3 (0-3 척도에서) 또는 등급 3-4 (0-4 척도에서). 추가적으로, 5 개의 IWG-MRT 2차적 진단 기준이 있으며, 그 중 2 개는 포스트-ET MF 진단을 위한 IWG-MRT 기본 기준과 함께 환자에서 탐지되어야 한다: 1) 빈혈 및 기저수준 헤모글로빈 수준으로부터 ≥ 2 g/dL 감소, 2) 백적모혈구성 말초 혈액 사진, 3) 비장비대 증가, 이는 ≥ 5 cm의 손으로 만져지는 비장의 증가하거나, 새로이 만져지는 비장비대증이 나타나는 것으로 정의됨, 4) 증가된 락테이트 탈수소효소, 및 5) 3가지 전신 증상 중 1 가지 이상 발달: 6 개월 안에 >10 %의 체중 감소, 야간 발한, 원인 불명의 발열. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 포스트-진성다혈구증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소, 구체적으로 포스트-진성다혈구증의 하나 또는 그 이상의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 있어서, ActRIIB 길항제의 방법 및 용도와 관계한다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 포스트-본태성 혈소판증가증 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소, 구체적으로 포스트-본태성 혈소판증가증 골수섬유증의 하나 또는 그 이상의 합병증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는데 있어서, ActRIIB 길항제의 방법 및 용도와 관계한다.

[0291] 골수섬유증에서 강력한 예후 모델링은 2009년 국제 예후 등급 체계 (IPSS)의 개발로 시작되었다 [Cervantes F 등, (2009) 혈액 113:2895-2901]. 골수섬유증에 대한 IPSS는 초기 진단시 평가받는 환자에게 적용 할 수 있으며, 생존에 대한 아래 5가지 독립적인 생존 예측 인자를 이용한다: 연령 >65 세 이상, 헤모글로빈 <10 g/dL, 백혈구 수 $>25 \times 10^9/L$, 순환 블라스트(circulating blasts) $\geq 1\%$, 및 전신 증상의 유무. 0, 1, 2, 및 ≥ 3 불리한 요인의 존재는 각각 낮은, 중간-1, 중간-2 및 고위험 질환을 정의한다. 상응하는 중간 생존율은 각각 11.3, 7.9, 4, 2.3 년이었다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 IPSS에 따라 저위험, 중간-1, 중간-2, 또는 고-위험 골수섬유증을 갖는 환자에서 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 방법 및 ActRIIB 길항제의 사용에 관계한다. 일부 구체예들에서, 본원은 IPSS에 따른 골수섬유증 질환의 진행을 예방 또는 지연시키는 ActRIIB 길항제의 방법 및 용도에 관한 것이다 (가령, IPSS에 따라 저위험에서 중간-1 위험으로, 중간-1에서 중간-2 위험으로, 및 중간-2 위험에서 고-위험으로의 진행을 예방 또는 지연시킨다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 IPSS에 따라 골수섬유증 위험 퇴행을 촉진 또는 증가시키기 위하여 (가령, IPSS에 따라 고위험으로부터 중간-2 위험으로, 중간-2로부터 중간-1 위험으로, 및 중간-1 위험에서 저위험으로의 퇴행을 촉진 또는 증가시킨다) ActRIIB 길항제의 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0292] IWG-MRT는 IPSS에서 사용된 것과 동일한 예후 변수를 사용하지만, 질병 과정 중 언제든지 적용될 수 있는 역동적인 예후 모형 (역학적 국제 예후 평가 시스템 [DIPSS])을 개발했다 [Passamonti F 등, (2010) 혈액. 115:1703-1708]. DIPSS는 헤모글로빈 <10 g / dL에 대해 불리한 점 1 대신에 2 점을 할당하고, 위험 분류는 그에 따라 수정된다: 저위험 (0 불리한점), 중간-1 (1 또는 2 점), 중간-2 (3 또는 4 점), 및 고위험 (5 또는 6 점). 상응하는 중간 생존율은 14.2, 4, 및 1.5 년에 도달되지 못하였다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 DIPSS에 따라 저위험, 중간-1, 중간-2, 또는 고-위험 골수섬유증을 갖는 환자에서 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 방법 및 ActRIIB 길항제의 사용에 관계한다. 일부 구체예들에서, 본원은 DIPSS에 따른 골수섬유증 질환의 진행을 예방 또는 지연시키는 ActRIIB 길항제의 방법 및 용도에 관한 것이다 (가령, DIPSS에 따라 저위험에서 중간-1 위험으로, 중간-1에서 중간-2 위험으로, 및 중간-2 위험에서 고-위험으로의 진행을 예방 또는 지연시킨다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 DIPSS에 따라 골수섬유증 위험 퇴행을 촉진 또는 증가시키기 위하여 (가령, DIPSS에 따라 고위험으로부터 중간-2 위험으로, 중간-2로부터 중간-1 위험으로, 및 중간-1 위험에서 저위험으로의 퇴행을 촉진 또는 증가시킨다) ActRIIB 길항제의 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0293] 결과적으로, 골수섬유증에서 생존율에 대한 IPSS 및 DIPSS와 독립적 위험 인자가 확인되었고, 바람직하지 않은 핵형 (가령, 복합체 핵형 또는 $+8,-7/7q-$, $i(17q)$, $inv(3)$, $-5/5q-$, $12p-$, 또는 $11q23$ 재배열) [Hussein 등, (2010) Blood. 115:496-499], 적세포 투입 필요성 [Tefferi 등, (2009) Am J Hematol. 85:14-17], 및 혈소판 수 $<100 \times 10^9/L$ [Patnaik 등, (2010) Eur J Haematol. 84:105-108]을 포함하는 유일한 또는 두 가지 비정상을 포함한다. 따라서, DIPSS는 세 가지 추가 DIPSS 독립적인 위험 인자의 통합에 의해 DIPSS-플러스로 변형되었다: 혈소판 수 $<100 \times 10^9/L$, 적세포 투입 필요성, 및 바람직하지 못한 핵형. 앞서 언급한 8 가지 위험 요소를 기반으로 한 4 가지 DIPSS-플러스 위험 범주는 차례로 15.4, 6.5, 2.9, 및 1.3 년의 중간 생존을 갖는, 저위험 (위험 인자 없음), 중간-1 위험 (하나의 위험 인자), 중간-2 위험 (2 또는 3개의 위험 인자), 및 고위험 (4 또는 그이상의 위험 인자)이다. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 DIPSS-플러스에 따라 저위험, 중간-1, 중간-2, 또는 고-위험 골수섬유증을 갖는 환자에서 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 방법 및 ActRIIB 길항제의 사용에 관계한다. 일부 구체예들에서, 본원은 DIPSS-플러스에 따른 골수섬유증 질환의 진행을 예방 또는 지연시키는 ActRIIB 길항제의 방법 및 용도에 관한 것이다 (가령,

DIPSS-플러스에 따라 저위험에서 중간-1 위험으로, 중간-1에서 중간-2 위험으로, 및 중간-2 위험에서 고-위험으로의 진행을 예방 또는 지연시킨다). 일부 구체예들에서, 본 명세서는 DIPSS-플러스에 따라 골수섬유증 위험 퇴행을 촉진 또는 증가시키기 위하여 (가령, DIPSS-플러스에 따라 고위험으로부터 중간-2 위험으로, 중간-2로부터 중간-1 위험으로, 및 중간-1 위험에서 저위험으로의 퇴행을 촉진 또는 증가시킨다) ActRIIB 길항제의 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0294] DIPSS-플러스가 발표 된 이래로 추가 예후 정보를 제안하는 여러 연구가 발표되었다. 예를 들면, 골수섬유증에서 >80% 2-년 사망은 일염색체 핵형, inv(3)/i(17q) 비정상, 또는 순환 블라스트 >9%, 백혈구 $\geq 40 \times 10^9/L$ 또는 기타 바람직하지 못한 핵형중 임의의 2개에 의해 예측된다 [Tefferi 등, (2011) *Blood*. 118:4595-4598.]. 유사하게, 골수섬유증의 하위 생존은 JAK2 46/1 일배체형에 대한 무접합성(nullizygoty), 낮은 JAK2V617F 대립형질 부하, 또는 IDH, EZH2, SRSF2, 또는 ASXL1 돌연변이의 존재와 연관되어 있다 [Tefferi, Ayalew (2014) *Am. J. Hematol.* 89:916-925]. 대조적으로, JAK2V617F, MPL, 또는 TET2 돌연변이의 존재 또는 부재는 생존에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 골수섬유증에서의 생존은 혈청 IL-8 및 IL-2R 수준뿐만 아니라, DIPSS 플러스와 무관한 무-혈청 경색 수준에 의해 영향을 받았다. 가장 최근, Tefferi 등은 골수섬유증이 있는 254명의 환자를 연구하고, JAK2에 대해서 58%, 25% CALR, 8% MPL, 및 3가지 모든 돌연변이에 대한 야생형(가령, 삼중-음성)은 9% 라고 보고하였다 [Tefferi 등, (2014) *Leukemia*. DOI 10.1038/leu.2014.3 사전공개]. JAK2/MPL-돌연변이안된 경우에서 CALR 돌연변이 빈도는 74 %였다. CALR 돌연변이는 젊은 연령, 높은 혈소판 수, 낮은 DIPSS-플러스 점수와 관련이 있다. CALR-돌연변이 환자는 빈혈, 수혈의 필요, 또는 백혈구증가를 보이는 경향이 낮았다. 스플라이스좀(Spliceosome) 돌연변이는 CALR 돌연변이 환자에서 드물었다. 570 명의 환자를 대상으로 한 후속 국제 연구에서 저자들은 CALR + ASXL1-환자에서 가장 긴 생존율 (중간 10.4 년)을 보였으며 CALR-ASXL1+ 환자에서 가장 짧았다(중간 2.3 년)고 보고하였다[Tefferi 등, (2014) *Leukemia*. prepublished as DOI 10.1038/leu.2014.57]. CALR+ ASXL1+ 및 CALR-ASXL1-환자는 비슷한 생존율을 보였고, 중간 위험 범주(중간 생존 5.8 년)에서 함께 모여있었다. 전반적인 생존에서 분명해지는 것처럼, IDH 및 SRSF2를 포함한 특정 돌연변이를 지닌 환자에서 백혈병없는 생존율이 크게 저하된다[Tefferi 등, (2012) *Leukemia*. 26:475-480; Lasho 등, (2012) *혈액*. 120:4168-4171]. 또한, LNK와 THPO의 돌연변이는 골수섬유증과 관련이 있다.

[0295] Janus 키나제 2 (JAK2) 획득-기능 돌연변이, JAK2V617F의 발견은 골수섬유증 치료에 대한 FDA의 승인을 받은 최초의 약물 인 JAK2 억제제인 루소리티니브의 개발 뿐만 아니라 골수 섬유증의 근본적인 생물학에 대한 이해를 크게 향상시켰다 [Baxter 등, (2005) *Lancet* 365:1054-1061; James C. 등, (2005) *Nature* 434:1144-1148; Kralovics 등, (2005) *N Engl J Med.* 352:1779-1790; 그리고 Levine 등, (2005) *Cancer Cell* 7:387-397]. 키나아제 수용체 티로신의 Janus 키나제 패밀리 키나아제에는 네 가지 단백질 (JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2)이 포함되어 있으며, 이 패밀리 단백질은 골수 및 림프 세포의 성장 및 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히, 그들은 사이토킨 수용체로부터 세포 내 상호 작용을 중재하여, 전사의 신호 변환 활성화 인자 (STAT)의 활성화 및 세포 증식과 분화를 조절하는 유전자의 하류 진전을 초래한다 [Quintas-Cardama 등, (2011) *Nat Rev Drug Discov* 10:127-140]. JAK2V617F 돌연변이는 JAK2의 구성적 활성화로 이어지고, 따라서 골수성 세포 증식 및 분화를 촉진한다. 임상 시험중인 다른 Janus 키나제 억제제로는 예를 들면, 페드라티니브 (SAR302503), 모노에로티니브 (CYT387), 파크리티니브, 레스타우르티니브, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019, 및 AT-9283이 포함된다.

[0296] 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 다음중 하나 또는 그 이상을 갖는 환자에서 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 방법 및 ActRIIB 길항제의 용도에 관계한다: 일염색체 핵형, inv(3)/i(17q) 비정상, 순환 블라스트 >9% 및/또는 백혈구 $\geq 40 \times 10^9/L$, JAK2 46/1 일배체형의 무접합성, JAK2V617F 돌연변이, IDH1 돌연변이, IDH2 돌연변이, EZH2 돌연변이, SRSF2 돌연변이, ASXL1 돌연변이, 증가된 혈청 IL-8 수준, 증가된 혈청 IL-2R 수준, 증가된 유리(free) 경색 수준, JAK1 돌연변이, JAK2 돌연변이, JAK3 돌연변이, TYK2 돌연변이, MPL 돌연변이, CALR 돌연변이, CALR+ASXL1-, CALR-ASKL1+, CALR+ASKL1+, CALR-ASKL1-, TET2 돌연변이, THPO 돌연변이, 및 LNK 돌연변이.

[0297] 빈혈 관리는 골수섬유증 환자 치료의 가장 어려운 측면 중 하나일 수 있다 [Tefferi A. (2011) *Blood* 117(13):3949-3504; Barosi 등 (2011) *Expert Opin Pharmacother* 12(10):1597-1611]. 혈액 수혈 (전혈 또는 적혈구 수혈)은 증상이 있는 빈혈 골수섬유증 환자를 위한 표준 요법이다. 수혈 외에도, 이 환자들에서 빈혈을 치료하는 데 사용되는 다양한 전통적 약제가 있다. 예를 들면, 적혈구생성-자극 물질 [가령, ESAs 이를 테면 에리트로포에틴 (EPO) 및 이의 유도체], 안드로겐 (가령, 테스토스테론 에난테이트 및 플루옥시메스테론), 프레디니손, 다나졸, 탈리도미드, 프레디니손, 및 레날리도미드는 골수섬유증 환자에서 흔히 빈혈 치료에 이용된다.

일반적으로, ESAs는 중등도, 수혈 의존성 빈혈 및 혈청 에리트로 포이 에틴 수준이 낮은 환자에게 사용된다. 응답 속도는 일반적인 재조합 에리트로포에틴에 비해 다르베포 에틴-알파에 대한 명확한 뒷받침 없이, 20-60 %에서 변화된다. ESAs 응답은 보통 수명이 짧다 (약 1 년). ESA가 효과가 없거나 효능이 좋지 않은 경우, 일반적으로 다나졸 또는 안드로겐 제제를 사용하여 빈혈 환자를 20 % 내외의 반응률로 치료한다. 테이퍼형 프레드니손과 관련하여, 저용량 탈리도마이드는 약 20-40 %의 환자에서 빈혈에서 반응을 나타냈다 [Thapaliya 등, (2011) *Am J Hematol* 86(1):86-98]. 그러나, 탈리도마이드 치료는 말초 신경 병증, 변비 및 대부분의 환자에서 약물 중단 원인이 되는 졸음으로 대개 용인되지 않는다. del(5q31)-연합된 빈혈이 있는 골수섬유증 환자에서, 레날리도미드는 제 1선 요법으로 권장되는데, 그 이유는 빈혈의 호전과 함께 상당히 개선되고, 때로 분자 반응(remission)이 입증되기 때문이다 [Tefferi 등, (2007) *Leukemia* 21(8):1827-1828]. 특정 양태들에 있어서, 본 명세서는 빈혈이 있는 환자에서 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 방법 및 ActRIIB 길항제의 사용에 관계한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 골수섬유증 환자에서 빈혈의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 방법 및 ActRIIB 길항제의 사용에 관계한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 필요한 환자에서 골수섬유증의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법에 관계하는데, 이 방법은 적혈구생성-자극 물질[가령, ESAs 이를 테면 에리트로포에틴 (EPO) 및 이의 유도체], 및 안드로겐 (가령, 테스토스테론 에난테이트 및 플루옥시메스테론), 프레디니손, 다나졸, 탈리도미드, 프레디니손, 및 레날리도미드로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 추가 활성물질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 골수섬유증 환자에서 빈혈의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법에 관계하는데, 이 방법은 적혈구생성-자극 물질[가령, ESAs 이를 테면 에리트로포에틴 (EPO) 및 이의 유도체], 및 안드로겐 (가령, 테스토스테론 에난테이트 및 플루옥시메스테론), 프레디니손, 다나졸, 탈리도미드, 프레디니손, 및 레날리도미드로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 추가 활성물질을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 수혈 (전체 혈액 또는 적혈구 투입)과 함께, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 골수섬유증 환자에서 빈혈의 진행 속도 및/또는 중증도를 치료, 예방 또는 감소시키는 방법에 관계한다.

[0298] 인간에서 헤모글로빈 및/또는 헤마토크릿 수준을 모니터링할 때, 개별 변수들을 고려하더라도, 적절한 연령과 성별 범주에 대한 정상 수준보다 낮은 수준이 빈혈을 나타낼 수 있다. 요법 측면에서 더 낮은 목표 수준이 더 적은 심혈관 부작용을 야기할 수 있지만, 예를 들면, 10-12.5 g/dl의 헤모글로빈 수준, 전형적으로 약 11.0 g/dl은 건강한 성인의 정상 범위로 간주된다. 가령, Jacobs 등, (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19 참고. 대안으로, 헤마토크릿 수준 (세포가 차지하는 혈액 시료의 부피 비율)은 빈혈의 척도로 사용될 수 있다. 건강한 사람의 헤마토크릿 수준은 성인 남성의 경우 약 41-51 %이고, 성인 여성의 경우 35-45 %이다. 특정 구체예들에서, 환자의 적혈구, 헤모글로빈 및/또는 헤마토크릿의 목표 수준으로 회복시키거나, 적혈구, 헤모글로빈 및/또는 헤마토크릿의 수용가능한 수준은 유지시키면서, 적혈구 수혈의 감소 또는 제거(수혈 부담 감소)를 허용하는 투약 요법으로 환자를 치료할 수 있다. 헤모글로빈 및 헤마토크릿 수준은 사람마다 다르기 때문에, 임의 선택적으로, 각 환자에 대한 헤모글로빈 및/또는 헤마토크릿 수준을 개별화시킬 수 있다.

[0299] 전체 혈액 또는 적혈구의 빈번한 수혈을 받은 환자들에서, 철 항상성의 정상적인 기전이 압도되어, 결국 심장, 간, 내분비선과 같은 생명 조직에서 철의 독성이 있는, 잠재적으로 치명적인 축적을 초래할 수 있다. 정기적인 적혈구 수혈은 다양한 기증자 혈액에 노출되어야 하므로 동중면역(alloimmunization)의 위험이 높아진다. 혈관 접근에 어려움, 철 킬레이션의 가용성 및 순응도, 및 높은 비용은 적혈구 수혈 횟수를 제한하는 것이 유익할 수 있는 일부 이유가 된다.

[0300] 특정 양태들에 있어서, 임의선택적으로 EPO 수용체 활성제와 복합된, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제는 소변 및/또는 대변에서 철 배설을 촉진시키기 위해 하나 이상의 철-킬레이트 분자와 조합하여 사용될 수 있고, 이로 인하여 골수섬유증 환자에서 조직 철분 과다를 역전시킬 수 있다. 효과적인 철 킬레이트제는 산화된 형태의 비-트랜스페린 결합 철이 히드록시 래디칼 및 산화 생성물의 촉매 생성을 통해 대부분의 철 독성을 설명하는, 제2철에 선택적으로 결합하고, 중화시킬 수 있어야 한다 [가령, Esposito 등, (2003) *Blood* 102:2670-2677 참고]. 이들 물질은 구조적으로 다양하지만, 그러나, 이들 모두 1 : 1 (헥사덴테이트 물질), 2 : 1 (트리덴테이트) 또는 3 : 1 (비덴테이트)의 화학량에서 개별 철 원자와 중화 8 면체 배위 착물을 형성할 수 있는 산소 또는 질소 공여체 원자를 가지고 있다[Kalinowski 등, (2005) *Pharmacol Rev* 57:547-583]. 일반적으로, 효과적인 철-킬레이트 화제는 또한 상대적으로 저 분자량(예 : 700 달톤 미만)이며, 물 및 지질 모두에 용해되어 영향을 받는 조직에 접근할 수 있다. 철-킬레이트 분자의 특정 예로는 매일 비경구 투여가 요구되는 박테리아 기원의 헥사덴테이트 제제인, 데헤록사민 및 구강 활성 합성 제제인, 데헤리프론(deferiprone) (비덴테이트) 및 데헤라시록스 (트리덴테이트)가 있다. 두 가지 철 킬레이트제의 당일 투여로 구성된 병용 요법은 킬레이션 단독 요

법에 반응이 없는 환자에게도 효과가 있으며, 디 로렉스아민만으로는 환자의 순응도가 떨어지는 문제를 극복하는 데에도 도움이 된다 [Cao 등, (2011) *Pediatr Rep* 3(2):e17; 그리고 Galanello 등, (2010) *Ann NY Acad Sci* 1202:79-86].

[0301] 본 명세서의 하나 또는 그이상의 ActRIIB 길항제는 적혈구 증가, 특히, 저투여량 범위에서의 EPO 수용체 활성화제와의 조합으로 사용될 수 있다. 이것은 고용량의 EPO 수용체 활성화제와 관련된 공지 된 오프-겟 효과 및 위험을 감소 시키는데 유익할 수 있다. ESA의 주요 부작용으로는 예를 들어, 헤마토크릿이나 헤모글로빈 수치의 과도한 증가와 적혈구 증가증이 있다. 상승된 헤마토크릿 수준은 고혈압 (특히 고혈압의 악화)을 유발될 수 있다. 보고된 ESA의 다른 부작용으로는 혈전증, 고혈압성 뇌증, 적혈구 혈액 세포 무형성으로 인한 두통, 인플루엔자-유사 증후군, 혈전증, 고혈압 뇌증 및 적혈구 혈액 증식증으로 인한 선트 폐쇄, 심근 경색 및 뇌 경련이 있고, 이들중 일부는 고혈압과 관련이 있다. 가령, Singibarti (1994) *J. Clin Investig* 72(suppl 6), S36-S43; Horl 등, (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15(suppl 4), 51-56; Delanty 등, (1997) *Neurology* 49, 686-689; 그리고 Bunn (2002) *N Engl J Med* 346(7), 522-523) 참고. 특정 구체예들에서, 본 명세서는 골수섬유증 환자에게 치료요법적 효과량의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제 및 EPO 수용체 활성화제를 투여함으로써, 이 환자에게 빈혈을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 특정 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제는 ESA의 부작용에 취약한 환자에서 이들 활성화제의 필요한 투여량을 감소시키기 위해 EPO 수용체 활성화제와 함께 사용될 수 있다. 이들 방법은 환자의 치료 및 예방 치료에 사용될 수 있다.

[0302] 본 명세서의 ActRIIB 길항제가 ESAs와 다른 기전으로 작용한다면, 이러한 길항제는 ESAs 또는 다른 EPO 수용체 활성화제에 잘 반응하지 않는 환자에서 적혈구 및 헤모글로빈 수치를 증가 시키는데 유용할 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 ActRIIB 길항제는 증가된 (> 300 IU/kg/주) 투여량의 ESA 투여가 목표 수준까지 헤모글로빈 수준의 증가를 초래하지 않는 환자에게 유익할 수 있다. ESAs에 대한 부적절한 반응은 구성적이거나 (ESA를 사용한 첫 번째 치료시 관찰됨) 또는 획득된 것일 수 있다 (ESA 반복 투여시 관찰 됨).

[0303] 세포감소성(Cytoreductive) 물질은 증상이 있는 비장비대증 환자의 대부분에게 선택 치료가 된다. 히드록시카르바미드(히드록시우레아, HC)는 가장 일반적으로 사용되는 세포감소성 물질이며, 보통 더 높은 용량에서 보통의 반응을 일으킨다. 그러나, HC는 종종 혈구감소를 악화시킬 수 있으며, 따라서 대개 용인되지 않는다. HC 치료를 받은 환자의 최대 35%에서 비장 크기는 25%-50%로 감소되었다는 보고가 있다 [Martinez-Trillos 등, (2010) *Ann Hematol.* 89(12):1233-1237]. HC에 반응하지 않는 환자의 경우, 특히 노인 환자의 경우 부술판 또는 멜팔란이 사용될 수 있는데, 왜냐하면 이러한 약제가 백혈병 전이의 빈도를 증가시킬 수 있다는 증거가 있기 때문이다. 저용량 탈리도마이드로 비장 반응이 낮다(<20%). 그러나, 레날리도미드는 탈리도마이드 치료에 실패한 일부 환자를 포함하는 연구에서 33 %의 반응률을 나타냈다. 대규모 난치성 비장비대증의 경우, 매달 정맥 내 클라드리빈 경로가 최대 50 %의 반응을 나타내었으며, 극심하지만 가역적인 혈구 감소증이 주요 독성으로 나타났다 [Faoro 등, (2005) *Eur J Haematol* 74(2):117-120]. 루쏘리티니브는 최근 연구에서 HC보다 우수한 것으로 입증되어, 증상이 있거나 진행성 비장비대증을 조절하는 제 1 선 약물이 되었다. 유감스럽게도, 루쏘리티니브의 일반적인 부작용은 골수섬유증 환자의 빈혈의 발생 또는 악화다. 따라서, JAK 저해제는 비장비대증 치료에 유용할 수 있지만, 실제로 골수섬유증의 다른 합병증, 특히 빈혈 및 빈혈 관련 질환을 악화시킬 수 있다.

[0304] JAK2 억제에 추가적으로, 골수증식성 장애 치료용으로 연구중인 몇 가지 다른 치료 전략이 있는데, 면역조절 약물 (가령, 포말리도미드), mTOR 경로의 포유류 포크 억제제(가령, 라파마이신, 시롤리무스, 데포로리무스, 에베로리무스, 템시롤리무스, NVP-BEZ235, BGT226, SF1126, PK1-587, INK128, AZD8055, 및 AZD2014), 및 후생적 인자 조절물질 (가령, 히스톤 탈아세틸라제 억제제 이를 테면 기비노스타트 (ITF2357), 파노비노스타트 (LBH589) 및 프라시노스타트)가 포함된다 [Mascarenhas 등, (2013) *Haematologica* 98(10):1499-1509].

[0305] 본 명세서는 또한 본원에 기술된 환자의 치료에서 하나 또는 이상의 다른 치료 양상과 조합된 ActRIIB 길항제의 사용을 고려한다. 예를 들면, ActRIIB 길항제는 세포독소, 면역억제제, 방사선독성 제 및/또는 치료용 항체와 함께 투여될 수 있다. 본 발명에 의해 고려되는 특정 공동-요법은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 스테로이드 (가령, 코르티코스테로이드, 이를 테면 프레디니손), 면역-억제 및/또는 항-염증성 물질 (가령, 감마-인터페론, 시클로포스파미드, 아자티오프린, 메토타렉세이트, 페니실라민, 시클로스포린, 콜치신, 항흉선세포성 글로블린, 미코페놀레이트 모웨틸, 및 히드록시클로로퀸), 세포독성 약물, 칼슘 채널 차단제 (가령, 니헤디핀), 앙지오텐신 전환 효소 억제제 (ACE) 억제제, 파라-아미노벤조산 (PABA), 디메틸 술폰, 형질전환 성장 인자 베타 (TGFβ) 억제제, 인터루킨-5 (IL-5) 억제제, 및 판 카스파제 억제제. ActRIIB 길항제와 조합하여 사용될 수 있는 추가의 제제는 렉틴(예를 들면, U.S. 특허 번호.: 7,026,283에서 설명됨, 이의 전문은 본 명세서의 참

고자료에 편입됨), 뿐만 아니라 Wynn 등, (2007, J Clin Invest 117:524-529)에서 기술된 항-섬유성 물질을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 예를 들면, 추가 항-섬유성 물질 및 요법은 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 다양한 항-염증/면역억제성/세포독성 약물 (콜치신, 아자티오프린, 시클로포스파미드, 프레디니손, 탈리도미드, 펜톡시필린 및 테오필린), TGFβ 신호생성 변형제 (레락신, SMAD7, HGF, 및 BMP7, 뿐만 아니라 TGFβ 1, TβRI, TβRII, EGR-I, 및 CTGF 억제제), 사이토킨 및 사이토킨 수용체 길항제 (IL-1β, IL-5, IL-6, IL-13, IL-21, IL-4R, IL-13Rα1, GM-CSF, TNF-α, 온코스타틴 M, WISP-I, 및 PDGFs의 억제제), 사이토킨 및 케모킨(IFN-γ, IFN-α/β, IL-12, IL-10, HGF, CXCL10, 및 CXCL11), 케모킨 길항제 (CXCL1, CXCL2, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL6, CCL17, 및 CCL18의 억제제), 케모킨 수용체 길항제 (CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2, 및 CXCR4의 억제제), TLR 길항제 (TLR3, TLR4, 및 TLR9의 억제제), 혈관신생 길항제 (VEGF-특이적 항체 및 아데노신 데아미나제 대체 요법), 항고혈압성 약물 (ANG 11, ACE, 및 알도스테론의 베타 차단제 및 억제제), 혈관활성 물질 (ET-1 수용체 길항제 및 보세탄), 콜라겐을 합성하고 가공하는 효소 억제제 (프롤일 히드록실화제의 억제제), B 세포 길항제 (리투스마브), 인테그린/에드헤신 분자 길항제 (α1β1 및 αvβ6 인테그린을 차단시키는 분자, 뿐만 아니라 인테그린-연계된 키나제의 억제제, 및 ICAM-I 및 VCAM-I에 특이적 항체), 근육섬유모세포, MMP 억제제 (MMP2, MMP9, 및 MMP12의 억제제), 및 TIMP 억제제 (TIMP-1 에 특이적인 항체)를 표적으로 하는 프로아포포틱 약물.

[0306] 특정 구체예들에서, 본 명세서의 ActRIIB 길항제를 단독으로 사용하여 이를 필요로 하는 환자를 치료할 수 있다. 대안으로, 상기 ActRIIB 길항제는 본원에 기술된 증식성 질환의 치료 또는 예방에 관한 통상적인 치료 방법과 조합하여 사용될 수 있는데, 예를 들면, 수술(가령, 체장절제술), 세포독성 물질, 방사선 치료 관련 방사능 또는 방사능활성 물질의 투여, 화학요법제, 항-호르몬제, 성장 억제 물질, 항-신생물 조성물, 및 본원에 열거되고, 당분야에서 공지된 항-암제를 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0307] 일반적으로, 세포 독성제는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고, 및/또는 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 방사능활성 동위원소(가령, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 및 Lu의 방사능활성 동위원소), 화학요법제 가령, 메토티렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜파란, 미토마이신 C, 클로람부칠, 다우로루비신 또는 다른 삽입 물질, 효소 및 이의 단편들, 이를 테면 핵산 분해 효소, 항생제, 및 독소 이를 테면, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소, 이의 단편 및/또는 변이체 포함, 그리고 하기에서 개시하는 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함한다. 다른 세포 독성 제제는 하기에 기재되어 있다. 종양파괴성 물질은 종양 세포의 파괴를 일으키는 원인이 된다.

[0308] 일반적으로, 화학 요법 제는 암 치료에 유용한 화합물이다. 화학요법제의 예로는 다음을 포함한다: 알킬화제, 이를 테면 티오테파 및 CYTOXAN® 시클로포스파미드; 알킬 술포네이트, 이를 테면 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘 이를 테면 벤조도파, 카르보퀘온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌포스포라미드 및 트리메틸롤로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 아세토게닌 (구체적으로 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라히드로카나비놀 (드로나비놀, MARINOL®); 베타-라파촌; 라파촌; 콜치신; 베티리닌산; 캄포테신 (토포테칸의 합성 유사체 포함 (HYCAMTIN®), CPT-11 (이리노테칸, CAMPTOSAR®), 아세틸캄포테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄포테신); 브리요스타틴; 갈리스태틴; CC-1065 (이의 아도제레신, 카르케레신 및 비제레신 합성 유사체); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토포신 (구체적으로 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 도라스테틴; 두오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CBI-TMI를 포함); 에레우테로빈; 판크라스테틴; 사르코덕틴; 스펀기스타틴; 질소 무스타르드, 이를 테면 클로람부칠, 클로르나파진, 시클로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로에타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜파란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 무스타르드; 니트로소우레아, 이를 테면 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제, 이를 테면 에네디인 항생제 (가령, 칼리케아미친, 구체적으로 칼리케아미친 감마11 및 칼리케아미친 오메가11 (가령, Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); 디네미친 A를 포함하는 디네미친; 에스페라미친; 뿐만 아니라 네오카르지노스테틴 발색단 및 관련된 색단백질 에네딘 항생제 발색단), 아클라치노미신, 약티노미친, 아우트라미친, 아자세린, 블레오미신, 각티노미신, 카라미친, 카르미노미친, 카르지노필린, 클로로미치니스, 닥티노미친, 다우노루비친, 데토루비친, 6-디아조-5-옥소-L-노르루신, ADRIAMYCIN® 독소루비친 (모르포르노-독소루비친, 시아노모르포르노-독소루비친, 2-피롤리노-독소루비친 및 테옥시독소루비친을 포함), 에피루비친, 에소루비친, 이다루비친, 마르셀로마이신, 미토마이신, 이를 테면 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 퀘라마이신, 로도루비친,

스트레프토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스테틴, 조루비친; 항-대사물질, 이를 테면 메토티렉세이트 및 5-플로오르우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 이를 테면 데노프테린, 메토티렉세이트, 프테로프테린, 트레메트렉세이트; 퓨린 유사체, 이를 테면 플루다라빈, 6-멸캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 이를 테면 안시타빈, 아자시티빈, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록시우리딘; 안드로겐, 이를 테면 칼루스테론, 드로모스타노론 프로피오네이트, 에피도스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-아드레날, 이를 테면 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충물, 이를 테면 플린산; 아세갈톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부칠; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데메콜친; 디아지퀸; 엘포르니틴; 엘리프니눔 아세테이트; 에포티론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 메이탄시노이드, 이를 테면 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스테틴; 펜아메트; 피라루비친; 로소산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 다당류 복합체 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 라조산; 리조신; 시조피란; 스피로게르마니움; 테누존산; 트리아지퀴온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (구체적으로 T-2 특신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안퀴딘); 우레탄; 빈데신 (ELDISINE®, FILDESIN®); 다카르바진; 마노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테과; 탁소이드, 가령, TAXOL® 파클리탁셀 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ Cremophor-free, 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), 및 TAXOTERE® 독세탁셀 (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부칠; 겐시타빈 (GEMZAR®); 6-티오구라닌; 멸캅토피린; 메토티렉세이트; 백금 유사체, 이를 테면 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (VELBAN®); 플라티늄; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토산트론 빈크리스틴 (ONCOVIN®); 옥사플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (NAVELBINE®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프레틴; 이반드로네이트; 토포이소페라제 억제제 RFS 2000; 디플로로메틸오르니틴 (DMYELOFIBROSIS 0); 레티노이드, 이를 테면 레티논산; 카페시타빈 (XELODA®); 상기중 임의의 것의 약학적으로 수용가능한 염, 산 또는 이의 유도체; 뿐만 아니라 상기중 2개 또는 그 이상의 조합, 이를 테면 CHOP, 사이클로포스파미드, 독소루비친, 빈크리스틴, 및 프레디니솔론의 복합 요법의 약어, 그리고 FOLFOX, 5-FU 및 류코보빈과 복합된옥살리플라틴 (ELOXATIN™)의 치료 요법의 약어.

[0309] 또한, 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 영향을 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 항-호르몬 제제이며, 종종 전신 또는 전신 치료의 형태로 사용된다. 이들 자체가 호르몬일 수 있다. 예로는 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERMs), 예를 들면, 탐옥시펜 (NOLVADEX® 탐옥시펜 포함), EVISTA® 랄옥시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시탐옥시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY1 17018, 오나프리스톤, 및 FARESTON® 토레미펜; 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절물질(ERDs); 난소를 억제 또는 차단시키는 기능을 하는 물질, 예를 들면, 황체형성 호르몬-방출 호르몬(LHRH) 작용제, 이를 테면 LUPRON® 및 ELIGARD® 루프롤리드 아세테이트, 고세레린 아세테이트, 부세레린 아세테이트 및 트리프테린; 기타 항-안드로겐, 이를 테면 플루타미드, 니루타미드 및 비칼루타미드; 그리고 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 아로마타제 효소를 억제하는 아로마타제 억제제이를 테면, 예를 들면, 4(5)-이미다졸, 아미노그루테티미드, MEGASE® 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN® 엑세메스탄, 포르메스탄, 화드로졸, RIVIS OR® 보로졸, FEMARA® 레트로졸, 및 ARIMIDEX® 아나스트로졸을 포함한다. 추가적으로, 화학요법제의 이러한 정의에는 다음을 포함한다: 비스포스포네이트, 이를 테면 클로드로네이트 (예를 들면, BONEFOS® 또는 OSTAC®), DIDROC AL® 에티드로네이트, NE-58095, ZOMET A® 조레드론산/조레드로네이트, FOSAMAX® 알레드로네이트, AREDIA® 파미드로네이트, SKELID® 티루드로네이트, 또는 ACTONEL® 리세드로네이트; 뿐만 아니라 트록사타빈(1,3-디옥살란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 구체적으로 비정상적인 세포 증식에 연루된 신호생성 경로에서 유전자 발현을 억제하는 것들, 이를 테면, 예를 들면, PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 상피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신 이를 테면 THERATOPE® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들면, ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN® 백신, 및 VAXID® 백신; LURTOTECAN® 토포이소메라제 I 억제제; ABARELIX® rmRH; 라파니니브 디토실레이트 (ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소-분자 억제제, 또한 GW572016으로도 공지됨); 그리고 상기 중 임의의 것의 약학적으로 수용가능한 염, 산 또는 유도체.

[0310] 성장 억제제는 일반적으로 시험관내 또는 생체 내에서 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S 상 세포의 비율을 상당히 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 G1 정지 및 M-상 정지를 유도하는 제제와 같은 세포주기 진행을 차단하는 제제 (S 상 이외의 장소에서)를 포함한다. 전통적인 M-상 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산, 및 토포이소메라제 II 억제제, 이를 테면 독소루비친, 에피루비친, 다우노루비친, 에토포시드, 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 붙잡아두는 이들 물질은 S-상 억제로 퍼질 수 있는데, 예를 들면, DNA 알킬화제, 이를 테면 탐옥시펜, 프레디니손, 카다르바진, 메클로에

타민, 시스플라틴, 메토틱세이트, 5-플로오르우라실, 및 ara-C. 추가 정보는 The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn 및 Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antiantineoplastic drugs" by Murakami 등, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 구체적으로 p. 13에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀과 도세탁셀)은 모두 주목 나무에서 추출한 항암제다. 유럽 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)은 파클리탁셀의 합성 유사체(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)다. 파클리탁셀과 도세탁셀은 튜블린 이합체 (tubulin dimer)로부터 미세소관 조립을 촉진하고, 해중합 (depolymerization)을 방지하여 미세소관을 안정화시켜 세포의 유사 분열을 억제한다.

[0311] ActRIIB 길항제 및 추가의 활성화제 (예를 들어, 공동-치료제)는 동일한 제제 또는 별도로 투여될 수 있다. 별도의 투여의 경우, ActRIIB 길항제는 추가 활성화제의 전후, 또는 동시에 투여될 수 있다. 하나의 물질이 몇 분에서 수주의 간격으로 다른 물질의 투여에 선행하거나, 그 후 투여될 수 있다. 2 종 이상의 상이한 종류의 치료제가 환자에게 개별적으로 적용되는 실시 양태에서, 일반적으로 각 배달 시간 사이에 상당한 시간이 경과하지 않도록 하고, 이들 상이한 종류의 약제는 여전히 표적 조직 또는 세포에 유리하게 결합된 효과를 발휘할 수 있다.

[0312] 특정 구체예들에서, 본 명세서는 환자의 하나 또는 이상의 혈액학적 매개변수를 측정함으로써, 본 개시물의 하나 또는 이상의 하나 이상의 ActRIIB 길항제로 치료되거나 치료될 후보 물질을 관리하는 방법을 제공한다. 혈액학적 매개변수는 본 개시물의 길항제로 치료될 후보인 환자에 대한 적절한 투약을 평가하고, 치료 동안 혈액학적 매개변수를 모니터링하고, 하나 또는 이상의 길항제로 투약하는 동안 투약량을 조절할지 여부를 평가하기 위해 사용될 수 있거나, 및/또는 본 개시물의 하나 이상의 길항제의 적절한 유지 투여량을 평가할 수 있다. 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수가 정상 수준을 벗어나면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제의 투여는 감소, 지연 또는 종료될 수 있다.

[0313] 본원에서 제공된 방법에 따라 측정될 수 있는 혈액학적 매개변수는 예를 들어 적혈구 수준, 혈압, 철 저장 및 당업계에서 인정된 방법을 사용하여 증가된 적혈구 수준과 상호 관련이 있는 체액에서 발견되는 다른 약제를 포함한다. 이러한 매개변수는 환자의 혈액 시료를 사용하여 결정될 수 있다. 적혈구 수치, 헤모글로빈 수치 및/또는 적혈구 용적률 수치가 증가하면 혈압이 상승할 수 있다.

[0314] 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제로 치료될 후보인 환자에서 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수가 정상 범위를 벗어나거나 정상의 상측에 있는 경우, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투여 개시는 혈액 매개변수가 자연적으로 또는 치료 적 중재를 통해 정상 또는 허용 수준으로 되돌아 올 때까지 지연될 수 있다. 예를 들면, 후보 환자가 고혈압 또는 전-고혈압 환자인 경우, 환자의 혈압을 낮추기 위해 혈압 강하제로 치료할 수 있다. 개별 환자의 상태에 적합한 임의의 혈압 강하제, 예를 들면, 이뇨제, 아드레날린 억제제 (알파 차단제 및 베타 차단제), 혈관확장제, 칼슘 채널 차단제, 앙지오텐신-전환 효소(ACE) 억제제, 또는 앙지오텐신 II 수용체 차단제가 이용될 수 있다. 혈압은 대안으로 식이 요법과 운동 요법으로 치료될 수 있다. 유사하게, 후보 환자가 정상보다 낮은 철 저장 또는 정상보다 낮은 철 저장을 보유한다면, 환자의 철 저장이 정상 수준 또는 수용 가능한 수준으로 회복 될 때까지 환자는 적절한 식이 요법 및/또는 철 보충제를 사용하여 치료할 수 있다. 적혈구 수치가 정상보다 높거나 헤모글로빈 수치가 높은 환자의 경우, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투여는 또는 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 지연될 수 있다.

[0315] 특정 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제로 치료될 후보인 환자에서 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수가 정상 범위를 벗어나거나 정상의 상측에 있는 경우, 상기 투여 개시는 지연되지 않을 수 있다. 그러나, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 길항제를 투여하는 투약량 또는 투여 빈도는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투여시 발생하는 혈액학적 매개변수의 허용할 수 없는 증가의 위험을 감소시키는 양으로 설정할 수 있다. 대안으로, 상기 환자를 위하여 바람직하지 않은 수준의 혈액학적 매개변수를 다루는 치료제와 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제를 결합시킨 치료 요법이 개발될 수 있다. 예를 들면, 환자가 고혈압을 갖는 경우, 혈압 강하제와 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제의 투여를 포함하는 치료 요법이 설계될 수 있다. 바람직한 철 저장보다 낮은 수준의 환자의 경우, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제 및 철 보충제가 관련된 치료요법이 개발될 수 있다.

[0316] 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수에 대한 기저 수준 매개변수(들)은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제로 치료를 받게 될 후보 환자에 대해 확립될 수 있으며, 상기 기저수준 값(들)에 근거하여 환자에 대한 적절한 투약 요법이 확립될 수 있다. 대안으로, 환자의 병력에 근거하여 확립된 기저수준 매개변수를 사용하여 환자에 대한 적절한 약물 투약 요법을 알릴 수 있다. 예를 들면, 건강한 환자는 정의

된 정상 범위 이상인 확립된 기저수준 혈압을 보유한 다면, 상기 환자의 혈압을 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제로 치료하기에 앞서, 일반 집단의 경우 정상으로 간주되는 범위로 가져갈 필요는 없다. 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제로 치료하기 앞서, 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수에 대한 환자의 기저 수준 값은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제로 치료하는 동안 혈액학적 매개변수로의 임의의 변화를 모니터링하기 위한 관련 비교 값으로도 또한 이용될 수 있다.

[0317] 특정 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수는 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제로 치료될 환자에서 측정된다. 상기 혈액학적 매개변수는 치료하는 동안 상기 환자를 모니터링하는데 이용할 수 있고, 그리고 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투약의 조정 또는 종료, 또는 다른 치료제의 추가 투여의 조정 또는 종료하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제의 투여로 혈압, 적혈구 수준, 또는 헤모글로빈 수준의 증가, 또는 철 저장의 감소가 초래된다면, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제는 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수에 대한 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 효과를 감소시키기 위하여 그 양 또는 빈도를 줄일 수 있다. 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제의 투여로 인하여 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수가 상기 환자에게 불리하게 변화된다면, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제는 상기 혈액학적 매개변수(들)이 수용가능한 수준으로 회복될 때까지 일시적으로 종료될 수 있거나, 또는 영구적으로 종료될 수 있다. 유사하게, 하나 또는 그 이상의 혈액학적 매개변수가 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투여량 또는 빈도의 감소후 수용가능한 범위내에 있지 않는 경우, 상기 투여는 종료될 수 있다. 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투여량 감소 또는 종료에 대체로 또는 추가로, 상기 환자에게 예를 들어, 혈압 강하제 또는 철 보충제와 같은 혈액학적 매개변수(들)의 바람직하지 않은 수준을 다루는 추가의 치료제를 투여할 수 있다. 예를 들면, 만일 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제로 치료될 환자가 고혈압이 있다면, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투약은 동일한 수준으로 지속될 수 있고, 혈액-압력-강하제는 치료 섭생에 추가되며, 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투약이 감소되거나 (가령, 양 및/또는 빈도), 그리고 혈액-압력-강하제는 상기 치료 섭생이 추가되거나, 또는 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 길항제의 투약은 종료될 수 있고, 상기 환자는 혈액-압력-강하제로 치료될 수 있다.

[0318] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "복합하여", "의 조합" 또는 "공동(conjoint)" 투여는 추가 요법(가령, 제2, 제3, 제 4 등)이 여전히 신체에서 효과적으로 투여하는 임의의 형태를 의미한다 (예를 들어, 다수 화합물이 환자에서 동시에 효과적이며, 이들 화합물의 공조상승효과를 포함할 수 있음). 유효성은 혈액, 혈청 또는 혈장에서 측정가능한 약물 농도와 관련이 없을 수도 있다. 예를 들면, 상이한 치료 화합물은 동일한 제형 또는 별도 제형으로, 동시, 순차적 또는 상이한 일정에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 그러한 치료를 받는 개인은 다른 치료법의 결합된 효과로부터 이익을 얻을 수 있다. 하나 또는 그 이상의 본 명세서의 ActRIIB 길항제 또는 이러한 폴리펩티드의 조합은 하나 또는 그 이상의 다른 추가적인 물질들 또는 보조 요법과 동시에, 이보다 앞서, 또는 후속적으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 각각의 치료제는 특정 약제에 대해 결정된 투여량 및/또는 일정으로 투여될 것이다. 요법에서 사용하는 특정 조합은 본 명세서의 길항제와 치료 및/또는 바람직한 치료 효과의 양립 가능성을 고려할 것이다.

[0319] **5. 약학 조성물**

[0320] 본원에 기술된 치료제 (예를 들어, ActRIIB 길항제)는 약학 조성물로 제제화될 수 있다. 본 발명에 사용하기 위한 약학 조성물은 하나 또는 그 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 사용하여 통상적인 방식으로 제제화될 수 있다. 이러한 제형은 일반적으로 대부분의 규제 요구 사항을 준수하여 실질적으로 발열성이 없다.

[0321] 특정 구체예들에서, 본 명세서의 치료 방법은 상기 조성물을 전신 투여하거나, 또는 임플란트 또는 장치로부터 국소적으로 투여하는 것을 포함한다. 투여 될 때, 본원에서 사용하기 위한 치료용 조성물은 발열 원이 없고 생리학적으로 허용가능한 형태이다. 전술한 바와 같이 조성물에 임의로 포함될 수 있는 ActRIIB 신호 전달 길항제 이외의 치료학적으로 유용한 제제는 본원에 개시된 방법에서 대상 화합물 (예: ActRIIB 폴리펩티드)과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0322] Typically, 본원에 개시된 단백질 치료제는 비경구적으로, 특히 정맥내 또는 피하로 투여될 것이다. 비경구 투여에 적합한 약학 조성물들은 본 명세서의 하나 또는 그 이상의 ActRIIB 길항제와 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액, 또는 사용 직전에 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말을 포함할 수 있고, 여기에는 항산화제, 완충제, 정균제, 그리고 의도된 수령인의 혈액에 등장성인 제제를 제공하는 용지, 또는 현탁 또는 농후제가 포함될 수 있다. 본 발

명의 약학 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 이와 유사한 것들), 그리고 이의 적절한 혼합물, 식물성 오일, 가령 올리브 오일, 그리고 주사가능한 유기 에스테르, 가령, 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅 물질, 가령, 레시틴의 사용, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지 그리고 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0323] 조성물 및 제제는, 원한다면, 활성 성분을 함유하는 하나 또는 그 이상의 단위 투여형을 함유할 수 있는 팩 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 팩은 예를 들어, 블리스터 팩과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치에는 관리 지침이 수반될 수 있다.

[0324] 또한, 상기 조성물은 표적 조직 부위에 운반하기 위한 형태에 포집되거나 또는 주입될 수 있다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 표적 조직 부위에 하나 또는 그 이상의 치료 화합물 (예를 들어, ActRIIB 폴리펩티드)을 전달할 수 있는 매트릭스를 포함할 수 있고, 발달중인 조직을 위한 구조를 제공하고, 신체 내로 최적으로 재흡수될 수 있다. 예를 들면, 상기 매트릭스는 상기 ActRIIB 길항제의 지연 방출을 제공할 수 있다. 이러한 매트릭스는 다른 이식된 의학 용도에 현재 사용되는 재질로 형성될 수 있다.

[0325] 매트릭스 재질은 생체적합성, 생분해성, 기계적 성질, 미용적 외관 및 경계면 성질에 의해 기초한다. 해당 조성물의 특정 용도가 적절한 제형을 규정할 것이다. 상기 조성물에 대한 잠재적 매트릭스는 생분해가능하며, 화학적으로 황산칼슘, 인산삼 칼슘, 히드록시아파타이트, 폴리락트산 및 폴리안하이드리드로 규정될 수 있다. 다른 잠재적 물질은 예를 들면, 뼈 또는 피부 콜라겐을 포함하는 생분해가능하며, 생물학적으로 잘 규정된 물질이다. 또한 매트릭스는 순수 단백질 또는 세포의 매트릭스 성분들로 구성된다. 다른 잠재적 매트릭스는 비-생분해성이며, 화학적으로 예를 들면, 소결(sintered) 히드록시아파타이트, 바이오글라스, 알루미네이트 또는 기타 세라믹을 포함한 비-생분해성이며, 화학적으로 규정된다. 매트릭스는 예를 들면, 폴리락트산 및 히드록시아파타이트 또는 콜라겐 및 인산삼 칼슘을 포함하는 전술한 유형의 물질의 조합을 포함할 수도 있다. 바이오 세라믹은 공극 크기, 입자 크기, 입자 형태 및 생분해성을 변경시키기 위하여 조성물, 이를 테면, 칼슘-알루미네이트-포스페이트 및 공정이 변경될 수 있다.

[0326] 특정 구체예들에 있어서, 본 명세서의 방법은 예를 들면, 캡슐, 카시에(cachets), 알약, 테블릿, 로젠지(풍미제 베이스, 보통, 슈크로스 및 아카시아 또는 트라가탄 이용), 분말, 과립, 또는 수성 또는 비-수성 액체에 용액 또는 현탁액, 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 에멀션, 또는 엘릭시르(elixir) 또는 시럽, 또는 파스티렐스(pastilles) (비활성 베이스, 이를 테면 젤라틴 및 글리세린, 또는 슈크로스 및 아카시아 이용), 및/또는 구강 세척제 및 이와 유사한 것의 형태로 경구 투여될 수 있는데, 이들 각각은 활성 성분으로써, 사전 결정된 양의 화합물을 함유한다. 물질은 볼루스(bolus), 연질약(electuary), 또는 페이스트로 또한 투여될 수 있다.

[0327] 경구 투여용 고체 투여 제형 (캡슐, 테블릿, 알약, 당의정, 분말, 과립제 및 이와 유사한 것들)에서, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 치료 화합물은 하나 또는 그 이상의 약학적으로 수용가능한 담체, 이를 테면 구연산 나트륨 또는 인산 이칼슘, 및/또는 다음중 임의의 것과 혼합될 수 있다: (1) 충전제 또는 연장제, 이를 테면 전분, 락토즈, 슈크로스, 포도당, 만니톨, 및/또는 규산; (2) 결합제, 이를 테면, 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로스, 및/또는 아카시아; (3) 습윤제, 이를 테면 글리세롤; (4) 분해제, 이를 테면 한천-한천, 탄산 칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 및 탄산 나트륨; (5) 용액 지체제, 이를 테면 과라핀; (6) 흡수 가속화제, 이를 테면 4급 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 이를 테면, 예를 들면, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 이를 테면 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 이를 테면, 활석, 스테아레이트 칼슘, 스테아레이트 마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 술페이트 나트륨, 및 이의 혼합물; 그리고 (10) 발색제. 캡슐, 테블릿 및 알약의 경우, 상기 약학 조성물은 완충 물질을 또한 포함할 수 있다. 유사한 형태의 고체 조성물은 가령, 락토스 또는 유당과 같은 부형제, 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 및 이와 유사한 것을 이용하여 연질 및 경질 충전된 젤라틴 캡슐 안에 충전물로 이용될 수 있다.

[0328] 경구 투여를 위한 액체 투약형은 약학으로 수용가능한 에멀션, 마이크로에멀션, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함할 수 있다. 활성 성분에 추가하여, 액체 투약형은 당분야에서 통상적으로 이용하는 비활성 희석액, 예를 들면, 물 또는 기타 용매, 가용화 물질 및/또는 유화제, 가령, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (가령, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 검, 올리브, 피마자, 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌

글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 불활성 희석제 외에도, 경구 조성물은 이를 테면, 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 향료, 착색제, 향료 및 방부제와 같은 보조제를 포함할 수 있다.

[0329] 현탁액은 활성 화합물 이외에, 예를 들어 에톡시화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로즈, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천-한천, 그리고 트라가탄 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0330] 본 발명의 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유 할 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 파라벤, 클로로부탄올 및 페놀 소르브산 및 이와 유사한 것들과 같은 다양한 항박테리아 및 항진균제를 포함시킴으로써 확보될 수 있다. 조성물에 설탕, 염화나트륨 등의 등장화제를 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 추가적으로, 예를 들어, 모노스테아르산 알루미늄 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 물질을 포함시킴으로써 주사가능한 약형의 연장된 흡수가 이루어질 수 있다.

[0331] 투여 섭생은 본 발명의 대상 화합물(가령, TβRII 폴리펩티드)의 작용을 변형시키는 다양한 인자를 고려하는 주치의에 의해 결정될 것이다. 다양한 요인에는 환자의 연령, 성별,식이, 중증도, 투여 시간 및 기타 임상 인자가 포함되지만, 이에 국한되지는 않는다. 임의선택적으로, 투여량은 재구성에 사용 된 매트릭스의 유형 및 조성물 중의 화합물의 유형에 따라 다를 수 있다. 최종 조성물에 기타 공지의 성장 인자들을 추가하면 이 약형에 또한 영향을 줄 수 있다. 진행은 골 성장 및/또는 수복 (예 : X-선 (DEXA 포함)), 조직 형태 측정 및 테트라 사이클린 라벨링의 주기적 평가를 통해 모니터링 할 수 있다.

[0332] 특정 구체예들에서, 본 발명은 ActRIIB 길항제의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 또한 제공한다. 그러한 치료는 상기 나열된 바와 같은 하나 이상의 장애를 갖는 세포 또는 조직내로 ActRIIB 폴리뉴클레오티드 서열을 도입함으로써 그의 치료 효과를 얻을 수 있다. ActRIIB 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 예를 들어, 키메라 바이러스 또는 콜로이드성 분산 시스템과 같은 재조합 발현 벡터를 사용하여 달성될 수 있다. ActRIIB 폴리뉴클레오티드서열의 바람직한 치료 전달은 표적화된 리포솜을 사용하는 것이다.

[0333] 본 명세서에서 교시된 바와 같이, 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 유두종, 또는 RNA 바이러스, 가령, 레트로바이러스를 포함한다. 바람직하게는, 레트로바이러스 벡터는 무린 또는 조류 레트로바이러스의 유도체다. 단일 외부 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 예로는 다음을 포함하나, 이에 국한되지 않는다: 모로니 무린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), 하베이 무린 육종 바이러스 (HaMuSV), 무린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 및 라우스 육종 바이러스 (RSV). 다수의 추가 레트로바이러스 벡터가 다중 유전자를 혼입할 수 있다. 이들 모든 벡터는 선택가능한 표지의 유전자를 전달 또는 혼입하여, 형질유도된 세포를 동정 및 생성할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예를 들면, 당, 당지질, 또는 단백질을 부착시킴으로써, 표적-특이적으로 만들어질 수 있다. 항체를 이용한 바람직한 표적화가 이루어진다. 당업자는 특이적 폴리뉴클레오티드 서열을 레트로바이러스 계통 안에 삽입시키거나 또는 바이러스 외피에 부착시켜, 상기 ActRIIB 폴리뉴클레오티드를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적 운반이 가능하다는 것을 인지할 것이다. 바람직한 실시 양태에서, 벡터는 뼈 또는 연골을 표적으로 한다.

[0334] 대안으로, 조직 배양 세포는 통상적인 인산칼슘 형질감염에 의해 레트로바이러스 구조 유전자 gag, pol, 및 env 를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포는 관심 대상의 유전자를 함유하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성 세포는 레트로바이러스 벡터를 배양 배지로 방출한다.

[0335] ActRIIB 길항제 폴리뉴클레오티드에 대한 또다른 표적화된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 그리고 수중유 에멀션, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 본 명세서의 바람직한 콜로이드 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 인공 막 소포로, 시험관 및 생체내 운반 비이클로 유용하다. RNA, DNA, 및 고유 비리온은 수성 내부에 포집되고, 생물학적 활성 형태로 세포로 운반된다 [Fraleley, 외. (1981) Trends Biochem. Sci., 6:77 참고. 리포솜 비이클을 이용한 효과적인 유전자 전달 방법은 당분야에 공지되어 있다, 가령, Mannino, 외. (1988) Biotechniques, 6:682, 1988 참고. 리포솜의 조성물은 통상 인지질의 조합으로, 스테로이드, 구체적으로, 콜레스테롤과 통상적으로 복합된다. 다른 인지질 또는 다른 지질도 사용될 수 있다. 리포솜의 물리적 성질은 pH, 이온 강도 그리고 이가양이온 존재에 따라 달라진다.

[0336] 리포솜 생산에 유용한 지질의 예는 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜 세린, 포스파티딜 에탄올아민, 스프링 고리피드, 세레브로시드 및 강글리오사이드와 같은 포스파티딜 화합물을 포함한다. 예시적인 인지

질은 난 포스파티딜콜린, 디팔미토일 포스파티딜콜린 및 디스테아로일포스파티딜콜린을 포함한다. 리포솜의 표적화는 예를 들면, 장기(organ)-특이성, 세포-특이성, 및 소기관-특이성에 기반을 두고, 당분야에 공지되어 있다.

[0337] 본 명세서는 pH를 조정하기 위해 산 및 염기를 포함하도록 다양할 수 있는 제제를 제공하고; pH를 좁은 범위로 유지하는 완충제를 포함한다.

[0339] **구체예**

[0340] 지금부터 본 발명이 일반적으로 기술되며, 단지 본 발명의 특정 구체예 및 실시 양태는 예시하기 위한 목적으로 포함되는 것으로, 이에 본 발명을 제한하려는 의도는 아니며, 하기 실시 예를 참조함으로써 보다 용이하게 이해 될 것이다.

[0341] 실시예 1. ActRIIB-Fc 융합 단백질의 생성

[0342] 출원인은 인간 또는 마우스 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIB의 세포외 도메인과 그 사이에 최소 링커 (3개의 글리신 아미노산)를 갖는 가용성 ActRIIB 융합 단백질을 작제하였다. 이 구조체는 차례로 ActRIIB-hFc 및 ActRIIB-Fc로 지칭된다.

[0343] ActRIIB-hFc는 하기에 나타낸 바와 같이, CHO 세포주로부터 정제된다 (서열 번호: 24):

[0344] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

[0345] 상기 ActRIIB-hFc 및 ActRIIB-Fc 단백질은 CHO 세포주에서 발현된다. 3개의 상이한 리더 서열이 고려된다: (i) 벌꿀 멜리틴 (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (서열 번호: 21), ii) 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (서열 번호: 22), 및 (iii) 공유의: MGAALKLAFVFLISCSGA (서열 번호: 23).

[0346] 선택된 형태는 TPA 리더를 이용하고, 다음의 가공안된 아미노산 서열을 갖는다 (서열 번호: 25):

[0347] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

[0348] 이 폴리펩티드는 다음의 핵산 서열 (서열 번호: 26)에 의해 인코딩된다:

[0349] A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG
AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG GCTAGATGAC TTCAACTGCT
ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
ATTTGCCAGA GGCTGGGGG CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA
AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA
CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTGTGCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTCTCCTC TATAGCAAGC
TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

[0350] CHO-세포-생산된 물질의 N-말단 서열화에서-GRGEAE (서열 번호: 27)의 주요 서열이 드러났다. 특히, 문헌에 보고된 다른 구조물은-SGR ... 서열로 시작한다.

[0351] 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다:

단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.

- [0352] ActRIIB-Fc 융합 단백질은 또한 HEK293 세포 및 COS 세포에서 발현되었다. 모든 세포주의 물질 및 적당한 배양 조건이 생체 내에서 근육 형성 활성을 갖는 단백질을 제공하였지만, 아마도 세포주 선별 및 /또는 배양 조건과 관련하여 역가의 가변성이 관찰되었다.
- [0353] 출원인은 ActRIIB의 세포의 도메인에서 일련의 돌연변이를 생성하고, 이러한 돌연변이 단백질을 세포의 ActRIIB와 Fc 도메인 사이의 가용성 융합 단백질로서 생산하였다. 배경 ActRIIB-Fc 융합체는 서열 번호: 24의 서열을 갖는다.
- [0354] N-및 C-말단 절두를 포함하는 다양한 돌연변이가 배경 ActRIIB-Fc 단백질 안으로 도입되었다. 본원에 제시된 데이터에 기초하여, TPA 리더와 함께 발현된 경우, 이들 구조체는 N-말단 세린이 결핍될 것으로 예상된다. 돌연변이는 PCR 돌연변이 유발에 의해 ActRIIB 세포의 도메인에서 생성되었다. PCR 후, 단편을 Qiagen 컬럼으로 정제하고, SfoI 및 AgeI로 분해하고 겔 정제 하였다. 이러한 단편은 발현 벡터 pAID4 (WO2006/012627 참조)에 결합시켜, 결합될 때, 인간 IgG1과 융합 키메라를 생성되었다. E. coli DH5 알파로의 형질 전환시, 콜로니를 채취하고 DNAs를 단리하였다. 뮤린 구조물 (mFc)의 경우, 뮤린 IgG2a가 인간 IgG1로 치환되었다. 모든 돌연변이체의 서열이 확인되었다.
- [0355] 모든 돌연변이체는 일시적인 형질 감염에 의해 HEK293T 세포에서 생산되었다. 요약하면, 500ml 스피너에서 HEK293T 세포는 250ml 부피의 Freestyle (Invitrogen) 배지에서 6×10^5 세포/ml로 셋업하고, 하룻밤 동안 성장시켰다. 다음날, 이들 세포를 0.5ug/ml의 최종 DNA 농도에서 DNA : PEI (1 : 1) 복합체로 처리하였다. 4 시간 후, 250 ml 배지를 첨가하고, 세포를 7 일 동안 성장시켰다. 세포를 회전시켜 가라앉힘으로써, 농축된 배지를 수확하고 농축시켰다.
- [0356] 돌연변이체는 예를 들어, 단백질 A 컬럼을 포함하는 다양한 기술을 사용하여 정제되었고, 낮은 pH (3.0) 글리신 완충액으로 용리되었다. 중화시킨 후, PBS로 이들을 투석하였다.
- [0357] 돌연변이체도 유사한 방법으로 CHO 세포에서 생산되었다. 돌연변이체는 본원에 참고로 인용된 WO 2008/097541 및 WO 2006/012627호에 기재된 결합 분석법 및/또는 생물 검정법으로 시험하였다. 일부의 경우, 정제된 단백질 보다는 조건화된 배지를 사용하여 분석을 수행하였다. ActRIIB의 추가적인 변형은 미국 특허 제 7,842,663 호에 기재되어있다.
- [0358] 출원인은 ActRIIB(25-131)-hFc 융합 단백질을 만들었고, 이 단백질은 N-말단 및 C-말단 절두된 인간 ActRIIB 세포의 도메인을 포함하고(고유의 단백질 서열 번호: 1의 잔기 25-131), 이 단백질은 고유의 ActRIIB 리더를 대체하는 TPA 리더 서열을 갖는 N-말단에 융합되고, 최소 링커 (3개의 글리신 잔기)를 통하여 인간 Fc 도메인에 융합된다(도 12). 이 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 도 13에 나타낸다. 출원인은 코돈을 변형시키고, 초기 형질전환체의 발현 수준을 실질적으로 개선시키는 ActRIIB (25-131)-hFc 단백질을 코딩하는 변이 핵산을 발견 하였다(도 14).
- [0359] 성숙 단백질은 다음과 같은 아미노산 서열을 갖는다 (N 말단은 N-말단 서열 분석에 의해 확인됨)(서열 번호: 28):
- [0360] ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
- [0361] KGCWLDDFNC YDROECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
- [0362] TYEPPPTGGG THTCPAPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
- [0363] VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
- [0364] WLNKKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYVTLPSREEMTKNQ
- [0365] VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
- [0366] DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTEKLSLS LSPGK
- [0367] 아미노산 1-107은 ActRIIB로부터 유래된다.
- [0368] 발현된 분자는 예를 들어, 다음 중 3 개 이상을 임의의 순서로 포함하는, 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계를

사용하여 정제되었다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로즈 크로마토그래피, 페닐세파로즈 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다.

[0369] ActRIIB (25-131)-hFc 및 그의 전장-대응물인 ActRIIB (20-134)-hFc에 대한 몇몇 리간드의 친화성을 Biacore™ 장치로 시험관내에서 평가하였고, 그 결과를 하기 표에 요약하였다. 복합체의 매우 빠른 결합과 해리는 k_{on} 과 k_{off} 의 정확한 결정을 방해하는데, 이로 인해 정상-상태 친화성 적용에 의해 Kd 값을 얻었다. ActRIIB(25-131)-hFc는 높은 친화력으로 액티빈 A, 액티빈 B, 및 GDF11에 결합하였다.

[0370] ActRIIB-hFc 형태의 리간드 친화력:

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

[0371]

[0372] 실시예 2: GDF 트랩 생성

[0373] 출원인은 다음과 같이 GDF 트랩을 만들었다. ActRIIB (L79D 치환을 갖는 서열 번호: 1의 아미노산 20-134)의 변형된 세포의 도메인을 보유하는 폴리펩티드는 GDF11 및/또는 미오스타틴 (서열 번호:1의 위치 79에서 류신이 아스파르테이트 치환된 콘센션스 서열로써)과 비교하여 액티빈 A 결합이 상당히 감소되었으며, 이 폴리펩티드는 최소 링커 (3개의 글리신 아미노산)를 사이에 두고 인간 또는 마우스 Fc 도메인에 융합되었다. 이 구조체들은 차례로 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc 및 ActRIIB(L79D 20-134)-Fc로 지칭되었다. 위치 79에서 아스파르테이트보다는 글루타메이트 (glutamate)를 갖는 다른 형태도 유사하게 수행되었다 (L79E). 하기 서열 번호: 44에 대하여 226 번 위치의 발린이 아닌 알라닌을 갖는 다른 형태도 생성되어, 시험된 모든 측면에서 동등하게 수행되었다. 위치 79에서의 아스파르테이트 (서열 번호: 1과 비교하여, 또는 서열 번호: 29과 비교하여 위치 60)는 아래에 이중 밑줄로 표시되어있다. 서열 번호: 29에 대하여 위치 226의 발린 또한 하기에서 이중 밑줄로 또한 표시된다 .

[0374] GDF 트랩 ActRIIB(L79D 20-134)-hFc는 하기에 나타난 바와 같이, CHO 세포주로부터 정제된다(서열 번호: 29).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

[0375]

[0376] GDF 트랩의 ActRIIB 유도 부분은 아래에 기재된 아미노산 서열 (서열 번호 30)을 가지며, 이 부분은 단량체, 또는 단량체, 이량체, 또는 더 큰 차수의 형태로써 비 Fc 융합 단백질로 이용될 수 있다.

[0377] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (서열 번호: 30)

[0378] 상기 GDF 트랩 단백질은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3개의 상이한 리더 서열이 고려되었다:

[0379] (i) 풀벌 멜리틴 (HBML), (ii) 조직 플라스미노겐 활성화제 (TPA), 및 (iii) 고유의.

[0380] 선택된 형태는 TPA 리더를 이용하고, 다음의 가공안된 아미노산 서열을 갖는다:

[0381] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEEN
PQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 31)

[0382] 이 폴리펩티드는 다음의 핵산 서열 (서열 번호: 32)에 의해 인코딩된다:

[0383] A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG
 AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT
 ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
 CAGCACTGA ACTCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA
 AGCCGCGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA
 CCTGCCCC ATCCGGGAG GAGATGACCA AGAACAGGT CAGCCTGACC TGCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC TATAGCAAGC
 TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GAAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGT AAATGA

[0384] 정제는 다음중 3개 또는 그 이상이 임의의 순서로 포함된 일련의 컬럼 크로마토그래피에 의해 실행될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로스 크로마토그래피, 페닐세파로스 크로마토그래피, 크기 압출 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 상기 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완성될 수 있다. 정제 방법의 예에서, 세포 배양 배지를 단백질 A 칼럼을 통과시키고, 그 다음 150 mM Tris/NaCl (pH 8.0)에서 세척한 다음 50 mM Tris/NaCl (pH 8.0)에서 세척하고, 0.1 M 글리신, pH 3.0로 용리시켰다. 낮은 pH 용출물은 바이러스 제거 단계로써, 실온에서 30 분간 유지한다. 상기 용출물을 중성화시키고, Q-세파로스 이온-교환 컬럼으로 옮기고, 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl로 세척하고, 150 mM과 300 mM 사이의 NaCl 농도를 갖는 50 mM Tris pH 8.0에서 용리시켰다. 그 다음 용출물을 50 mM Tris pH 8.0, 1.1 M 황산 암모늄으로 교환하고, 페닐 세파로스 컬럼을 통과시켜 세척하고, 그리고 150 mM과 300 mM 사이의 황산 암모늄으로 50 mM Tris pH 8.0에서 용리시켰다. 용출물은 투석되고, 여과되어 사용된다.

[0385] 추가의 GDF 트랩 (미오스타틴 또는 GDF11 결합과 비교하여, 액티빈 A 결합의 비율을 감소 시키도록 변형된 ActRIIB-Fc 융합 단백질)은 WO 2008/097541 및 WO 2006/012627에 기술되어있으며, 이들 문헌은 본 명세서의 참고자료에 편입된다.

[0386] 실시예 3: GDF-11-및 액티빈-중재된 신호생성에 대한 생물학적 검증

[0387] GDF-11 및 액티빈 A에 의한 신호 생성에 대한 ActRIIB-Fc 단백질 및 GDF 트랩의 효과를 평가하기 위해, A-204 리포터 유전자 분석을 사용하였다. 세포주: 인간 횡문근육종 (근육으로부터 유도됨). 리포터 벡터: pGL3(CAGA)12 (Denmler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100에서 설명됨). CAGA12 모티프는 TGFβ-반응성 유전자 (예를 들면, PAI-1 유전자)에 존재하며, 이 벡터는 SMAD2 및 SMAD3을 통한 신호생성 인자에 일반적으로 사용된다.

[0388] 1일차: 48-웰 플레이트에 A-204 세포를 분열시킨다.

[0389] 2일차: A-204 세포는 10 ug pGL3(CAGA)12 또는 pGL3(CAGA)12(10 ug)+pRLCMV (1 ug) 및 Fugene로 형질감염시킨다.

[0390] 3일차: 인자들을 추가한다 (배지+0.1% BSA로 희석됨). 억제제는 세포에 추가하기 전, 약 1 시간 동안 인자들로 사전 배양될 필요가 있다. 6시간 후, 세포는 PBS로 헹구고, 그리고 용해된다.

[0391] 루시퍼라제 분석에 의해 뒤따른다. 임의의 억제제 없이, 액티빈 A는 리포터 유전자 발현의 10-배 자극 및 ED50 ~ 2 ng/ml을 나타낸다. GDF-11: 16 배 자극, ED50: ~ 1.5 ng/ml.

[0392] ActRIIB(20-134)는 이 분석에서 액티빈 A, GDF-8, 및 GDF-11 활성의 강력한 억제제이다. 하기 기술된 바와 같이, ActRIIB 변이체 또한 이 분석에서 시험하였다.

[0393] 실시예 4: ActRIIB-Fc 변이체, 세포-기반 활성

[0394] ActRIIB-Fc 단백질 및 GDF 트랩의 활성을 전술한 바와 같은 세포-기반 검증법으로 시험하였다. 결과는 아래 표에 요약되어 있다. 일부 변이체는 다른 C-말단 절두 구조체로 시험하였다. 전술한 바와 같이, 5 개 또는 15 개의 아미노산이 절두되면 활성이 감소되었다. GDF 트랩 (L79D 및 L79E 변이체)은 액티빈 A 억제제의 실질적인

손실을 나타내지만, GDF-11의 야생형 억제는 거의 유지한다.

[0395] GDF11 및 액티빈 A에 가용성 ActRIIB-Fc 결합:

ActRIIB-Fc 변이	ActRIIB의 일부분 (서열 번호:1의 아미노산에 상응)	GDF11 억제 활성	액티빈 억제 활성
R64	20-134	+++ (대략적으로 10^{-8} M K_i)	+++ (대략적으로 10^{-8} M K_i)
A64	20-134	+ (대략적으로 10^{-6} M K_i)	+ (대략적으로 10^{-6} M K_i)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

- + 빈약한 활성 (대략 1×10^{-6} K_i)
- ++ 보통 활성 (대략 1×10^{-7} K_i)
- +++ 양호한 (야생형) 활성 (대략 1×10^{-8} K_i)
- ++++ 야생형 활성보다 더 큼

[0396]

[0397] 랫(rat)의 혈청 반감기에 대한 몇 가지 변종이 평가되었다. ActRIIB (20-134)-Fc의 혈청 반감기는 약 70 시간이다. ActRIIB (A24N 20-134)-Fc는 혈청 반감기가 약 100-150 시간이다. 상기에서 테스트된 임의의 변이체는 GDF 트랩 분자와 복합될 수 있다.

[0398] 실시예 5: GDF-11 및 액티빈 A 결합.

[0399] 리간드에 대한 특정 ActRIIB-Fc 단백질 및 GDF 트랩의 결합을 Biacore™ 분석에서 시험하였다.

[0400] ActRIIB-Fc 변이체 또는 야생형 단백질을 항-hFc 항체를 사용하여 시스템 상에 포획하였다. 리간드들을 주입하였고, 포집된 수용체 단백질 위로 흐르도록 하였다. 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

[0401] 리간드-결합 특이성 IIB 변이체.

GDF11			
단백질	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1.21e-6	6.35e-5	5.19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.77e-5	2.41e-5	3.56e-11
GDF8			
단백질	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2.25e-5	4.71e-5	2.1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11
액티빈 A			
단백질	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			Low 결합
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			Low 결합
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7.46e6	6.28e-4	8.41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11

[0402]

[0403] 무-세포 분석에서 얻어진 이들 데이터에서 세포-기반 분석 데이터를 확인하는데, 이는 A24N 변이체가 ActRIIB (20-134)-hFc 분자의 것과 유사한 리간드-결합 활성을 보유함을 입증하고, L79D 또는 L79E 분자는 미오스타틴 및 GDF11 결합을 보유하지만, 액티 빈 A에 대하여 현저하게 감소된 (정량화 불가능) 결합을 나타내는 것으로 나타났다.

[0404]

WO2006/012627 (전문이 본 명세서에 참고자료에 편입됨)에 보고 된 바와 같이, 다른 변이체가 생성되고 시험되었다. 장치에 커플링된 리간드 및 커플링된 리간드 위에 유동(flowing) 수용체를 사용, 예컨대 59-60 페이지를 참조. 특히, K74Y, K74F, K74I (및 K74에서 다른 소수성 치환, 이를 테면 K74L), 및 D80I는 야생형 K74 분자와 비교하였을 때, GDF11 결합에 대한 액티 빈 A (ActA) 결합 비율 감소를 야기한다. 이러한 변종과 관련한 데이터 표는 다음과 같다:

[0405] GDF11 및 액티빈 A에 가용성 ActRIIB-Fc 변이체 결합 (Biacore™ 분석)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8.6e-8M (+++)
+15 꼬리	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M +++++	KD=5.3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

- * 관찰된 결합 없음
- < 1/5 WT 결합
- ~ 1/2 WT 결합
- + WT
- ++ < 2x 증가된 결합
- +++ ~5x 증가된 결합
- ++++ ~10x 증가된 결합
- +++++ ~ 40x 증가된 결합

[0406] 실시예 6: 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 갖는 GDF 트랩 생성

[0408] ActRIIB(L79D 20-134)-hFc로 지칭되는 GDF 트랩은 류신-아스파르테이트 치환 (서열 번호:1의 잔기 79에서)을 갖는 ActRIIB 세포의 도메인(서열 번호:1에서 잔기 20-134)에 TPA 리더를 N-말단 융합시키고, 최소 링커 (3개의 글리신 잔기)와 함께 C-말단에 인간 Fc 도메인을 융합하여 만들어진다 (도 3). 이 융합 단백질에 상응하는 뉴클레오티드 서열을 도 4에 나타낸다.

[0409] ActRIIB(L79D 25-131)-hFc로 지칭되는, 절두된 ActRIIB 세포의 도메인을 갖는 GDF 트랩은 류신-아스파르테이트 치환 (서열 번호:1의 잔기 79에서)을 갖는 절두된 세포의 도메인(서열 번호:1에서 잔기 25-131)에 TPA 리더를 N-말단 융합시키고, 최소 링커 (3개의 글리신 잔기)와 함께 C-말단에 인간 Fc 도메인을 융합하여 만들어진다 (도 5, 서열번호: 50). 이 융합 단백질을 인코딩하는 하나의 뉴클레오티드 서열은 도 6 (서열 번호: 51)에 나타내고, 동일한 융합 단백질을 정확하게 인코딩하는 대체 뉴클레오티드 서열은 도 9 (서열 번호: 55)에 나타낸다.

다.

[0410] 실시예 7: 이중-절두된 ActRIIB 세포외 도메인을 갖는 GDF 트랩에 의한 선택성 리간드 결합

[0411] 몇몇 리간드에 대한 GDF 트랩 및 다른 ActRIIB-hFc 단백질의 친화력을 Biacore™ 장비로 시험관내에서 평가하였다. 결과는 아래 표에 요약되어 있다. 복합체의 매우 빠른 결합과 해리는 k_{on} 과 k_{off} 의 정확한 결정을 방해하는데, 이로 인해 정상-상태 친화성 적용에 의해 Kd 값을 얻었다.

[0412] ActRIIB-hFc 변이체의 리간드 선택성:

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

[0413]

[0414] 절두된 세포외 도메인, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc의 GDF 트랩은 더 긴 변이체, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc에 의해 나타나는 리간드 선택성과 동일하거나 또는 증가하며, L79D 치환이 없는 ActRIIB-hFc 대응부와 비교하였을 때, 액티빈 A 결합은 확연하게 상실되고, 액티빈 B 결합은 부분적으로 상실되며, 그리고 거의 완전하게 GDF11 결합을 유지한다. 절두만의 경우 (L79D 치환 없이) 여기에서 나타나는 리간드간의 선택성을 변경시키지 않았다 [ActRIIB(L79 25-131)-hFc 와 ActRIIB(L79 20-134)-hFc의 비교]. ActRIIB (L79D 25-131)-hFc는 또한 Smad2/3 신호생성 리간드 GDF8 및 Smad1/5/8 리간드 BMP6 및 BMP10에 대하여 강한 결합에서 중간 결합으로 유지한다.

[0415] 실시예 8: ActRIIB5로부터 유도된 GDF 트랩

[0416] 다른 연구자들은 ActRIIB (ActRIIB5로 명명)의 대체 가용성 형태를 보고했는데, 이때, 상기 ActRIIB 막경유 도메인을 포함하는 엑손 4는 상이한 C-말단 서열로 대체된다 (가령, WO 2007/053775 참고).

[0417] 리더가 없는 고유의 인간 ActRIIB5의 순서는 다음과 같다:

[0418] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

[0419] KGCW~~L~~DDFN~~C~~YDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

[0420] TIPSGGPEATAAAGDQGS~~GA~~LWLCLEGAHE (서열 번호: 33)

[0421] 류신에서-아스파르트레이트 치환, 또는 기타 산성 치환은 변이체 ActRIIB5(L79D)를 작제하는 것에서 설명된 바와 같이, 고유의 위치 79(밀줄)에서 실행되었으며, 다음 서열을 갖는다:

[0422] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

[0423] KGCW~~D~~DDFN~~C~~YDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST

[0424] TIPSGGPEATAAAGDQGS~~GA~~LWLCLEGAHE (서열 번호: 34)

[0425] 이 변이체는 다음 서열을 갖는 인간 ActRIIB5(L79D)-hFc 융합 단백질을 만들기 위하여, TGGG 링커 (단일 밀줄)로 인간 Fc (이중 밀줄)에 연결될 수 있다:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
 KGCW~~D~~DDFN~~C~~YDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
 TIPSGGPEATAAAGDQGS~~GA~~LWLCLEGAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYITLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 35).

[0426]

- [0427] 이 구조체는 CHO 세포에서 발현될 수 있다.
- [0428] **실시예 9: *JAK2V617F* 동물 모델에서 GDF 트랩의 효과**
- [0429] 유전자삽입 *JAK2V617F* 돌연변이체 마우스[Xing 등, (2008) *Blood* 111: 5109-5117에서 설명된 A 라인]를 이용하여, 골수섬유증에서 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc의 효과를 이해하였다.
- [0430] 골수섬유증 질환의 개시 및 진행을 이해하기 위하여, *JAK2V617F* 마우스의 완전한 혈구수 및 섬유증 정도를 여러 연령대에서 대조군(연령-일치되는 야생형 마우스) 동물로부터 수득한 데이터와 비교 하였다. 적혈구 (RBC)와 혈소판 수치는 야생형과 비교하여 모든 연령대의 *AK2V617F*마우스에서 증가했고, 2 ~ 5 월령의 돌연변이 동물에서 증가된 수준, 그리고 8-12 월령 사이에서 점진적으로 감소되는 경향이 있다. 섬유증은 *JAK2V617F* 마우스의 골수에서 5 개월 쯤부터 발견되었으며, 나이가 들수록 악화되었다. *JAK2V617F* 마우스도 3 개월에서 4 개월 부터 비장 비대를 보였고, 이 또한 나이가 들수록 악화되었다.
- [0431] GDF 트랩 연구의 경우, 12 개월에 치료가 시작되는데, 이때는 후기 단계의 골수섬유증에 해당된다. 마우스를 다음 두 그룹 중 하나에 넣었다: i) *JAK2V617F* 마우스는 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc로 10 mg/kg으로 주당 2회의 투약 일정으로 치료; 그리고 ii) *JAK2V617F* 마우스는 비이클(TBS)로 주당 2회 치료 (가령, 대조군 동물). 10 주 후에, ActRIIB (L79D 25-131)-Fc 처리된 동물은 대조군 동물과 비교하여, 비장 크기가 감소하였다 (-12.5 %). 이 관찰과 일치하게, 조직 병리학에서 대조군 동물에 비해 ActRIIB (L79D 25-131)-Fc 처리된 마우스의 비장에서 수외조혈 감소가 나타났다. 조직 병리학에서 또한 ActRIIB (L79D 25-131)-Fc 처리된 마우스에서 대조 동물에 비해 골수섬유증의 감소가 나타났다.
- [0432] 따라서, GDF 트랩을 이용한 치료는 *JAK2V617F* 모델에서, 구체적으로 다양한 골수섬유증의 합병증, 구체적으로 비장비대증, 수외조혈, 및 섬유증의 개선에 효과적이었다. 따라서, 이 데이터는 ActRIIB 길항제가 골수섬유증 치료에 사용될 수 있음을 나타낸다. 예를 들면, ActRIIB 길항제는 예를 들면, 비장비대증 감소, 수외조혈 감소, 적혈구 수준 증가, 및/또는 섬유증 (가령, 골수 섬유증) 감소를 포함하는, 다양한 골수섬유증의 합병증 치료에 특히 유용할 수 있다.
- [0433]
- [0434] **실시예 10: 루쏘리티니브 처리된 동물에서 GDF 효과**
- [0435] 루쏘리티니브는 중간 또는 고-위험 골수섬유증 치료에 승인된 Janus 키나제 억제제다. 특히, 루쏘리티니브는 골수섬유증 환자에서 비장비대증과 연관된 비장 크기 감소 및 개선에 상당한 효과를 나타낸다. 그러나, 특소비티닙 치료를 받는 환자에게 다양한 혈액학적 부작용, 예를 들어, 빈혈이 관찰되었다. 루쏘리티니브로 치료된 마우스에서 다양한 혈액학적 매개변수에 대한 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc 치료 효과를 이해하기 위하여 9월령의 C57BL/6 마우스를 사용하였다.
- [0436] 이 연구에서 치료는 6-7 개월에 시작되었다. 마우스를 다음 4 그룹 중 하나에 넣었다: i) *JAK2V617F* 마우스는 ActRIIB(L79D 25-131)-Fc로 10 mg/kg으로 주당 2회의 투약 일정으로 치료; ii) 루쏘리티니브를 10 mg/kg으로 주당 2회의 투약 일정으로 치료; iii) ActRIIB(L79D 25-131)-Fc를 10 mg/kg으로 주당 2회 일정으로, 그리고 루쏘리티니브를 60 mg/kg 으로 일일 2회 일정으로 치료; 그리고 iv) 비이클(TBS)로 주당 2회 치료 (가령, 대조군 동물). 4주 치료 후, ActRIIB(L79D 25-131)-Fc 마우스는 대조군 (TBS 처리) 마우스에 비해 적혈구 (~ 15 %)와 헤모글로빈 (~ 13 %) 수치가 증가하는 것으로 관찰되었으며, ActRIIB(L79D 25-131)-Fc는 C57BL/6 마우스에서 적혈구 생성을 증가시킨다. 대조적으로, 루쏘리티니브 처리는 대조군 동물에 비해, 적혈구 (~ 4 %)와 헤모글로빈 (~ 4 %) 수준의 감소를 가져왔다. ActRIIB(L79D 25-131)-Fc 및 루쏘리티니브 병용 투여한 마우스는 대조군 동물에 비해 적혈구 (~ 8 %)와 헤모글로빈 (~ 5 %)의 수치가 증가했다.
- [0437] 이 데이터는 ActRIIB (L79D 25-131)-Fc가 정상적이고, 건강한 마우스에서 루쏘리티니브-유발성 빈혈을 역전시킬 수 있음을 보여준다. 따라서, ActRIIB 길항제는 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 Janus 키나아제 억제제로 치료 받았던 또는 치료중인 골수 섬유증 환자를 비롯한 다양한 환자 집단에서 Janus 키나제 억제제-유도된 빈혈을 경감 시키는데 유용할 수 있는 것으로 이 데이터에서 암시한다. 따라서, ActRIIB 길항제는 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 Janus 키나제 억제제로 치료를 받았거나, 또는 치료중인 골수섬유증 환자, 특히 빈혈이 있는 다양한 환자 집단을 치료하기 위하여 Janus 키나제 억제제와의 공동 치료의 일부로서 유용할 수 있다.
- [0438] **참고자료에 통합**
- [0439] 여기에 언급된 모든 간행물 및 특허는 각각의 개별 간행물 또는 특허가 구체적으로 개별적으로 참조로 포함되

도록 지시 된 것처럼 본원에 참고로 인용된다.

[0440]

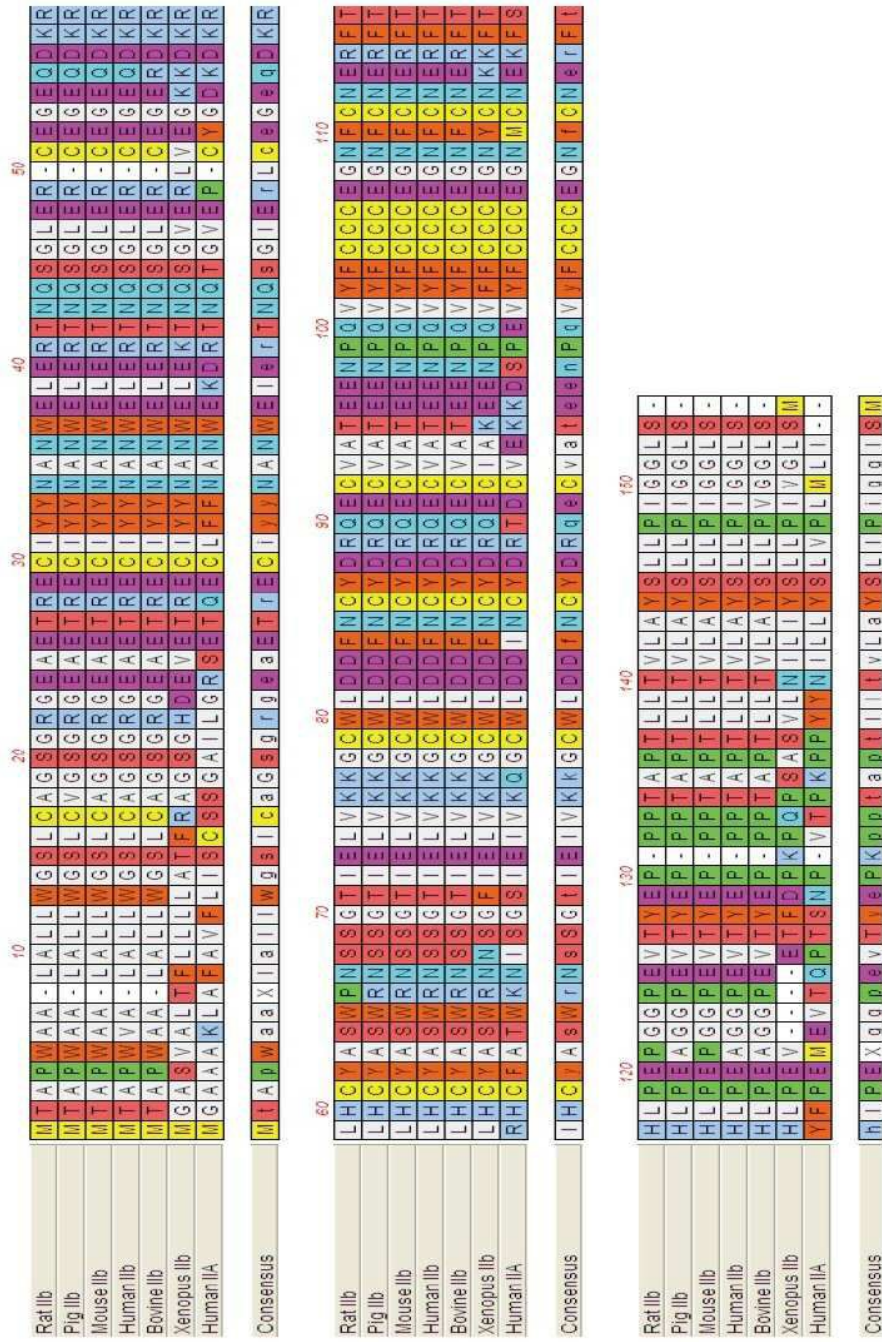
주제의 특정 실시 예들이 논의되었지만, 상기 명세서는 예시적이고, 이에 한정되지 않는다. 본 명세서 및 청구 범위를 검토하면 많은 변형이 당업자에게 명백해질 것이다. 본 발명의 전체 범위는 그 균등 물의 전체 범위 및 명세서와 함께 청구항을 참조하여 그러한 변형과 함께 결정되어야 한다.

도면

도면1

<p>ActRIIa</p> <p>ActRIIb</p>	<p>ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGWEPG YGDKDKRRHC FATWKNISGS</p> <p>GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGIERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT</p> <p>IEIVKQGQWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPDM</p> <p>IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA</p> <p>EVTQPTSNPV TPKPP</p> <p>GGPEVTYEPP PTAPT</p>
---	---

도면2



도면3

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE
 101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151 PAPELLGGPS VLFPPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (서열 번호: 45)

도면4a

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTGTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGGC CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCCG GGAGACCCGC ACCCTCCGA CTCTGTGCC
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
 TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG
 151 GGCCTGGAGC GGTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
 CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCCG TTGCGCGACG TGACGATGCG
 201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 GAGGACCGCG TTGTGAGAGC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA
 251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 CCTACTACT GAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGAATC
 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT
 351 GGCCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCGGGAAGTC ACGTACGAGC
 CGCGAAGTGA GTAACCGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG
 401 CACCCCGGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCCTGC
 GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGG
 451 CCAGCACTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCTCTT TCCCCCAA
 GGTCTGTGAC TTGAGGACCC CCTGGCAGT CAGAAGSAGA AGGGGGGTTT
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCTGAGGTG ACATGCGTGG
 TGGGTTCTGT TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC
 551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTC
 ACCACCTGCA CTCGGTGTCT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC
 601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAGACA AAGCCCGGGG AGGAGCAGTA
 CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCTCTGTCAT
 651 CAACAGCAGC TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTTG CACCAGGACT
 GTTGTCTGTC ATGGCACACC AGTGGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTTGA
 701 GGCTGAAATG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAAACA AGCCCTCCCA
 CCGACTTACC GTTCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTGTTT TCGGGAGGGT
 751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGSCAGC CCGGAGAAC
 CGGGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCC GGGCTCTTGG

도면4b

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 TGTCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT COTCTACTGG TTCTTGGTCC

851 TCAGCCTGAC CTGCCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
 AGTCGGACTG GACGGACCAG TTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGGGGCAC

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCAAGCCTCC
 CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
 GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACTCTT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 TGTCTCTGTC CACCGTCTGC CCGTTGCGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCGCCGGG
 CTCGGAGACG TGTTGGTGAT GTGCCTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCCC

1101 TAAATGA (서열 번호: 48)
 ATTTACT (서열 번호: 49)

도면5

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC

51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV

101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG

151 PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA

201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS

251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP

301 ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT

351 QKSLSLSPGK (서열 번호: 50)

도면6a

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGAGC ACACACCTCG

                               E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGGG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGACTCTG TGCCCTCAGC TAGATGATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ACGCCAAGTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TCGCGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGAGC

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GRAGGCGAGC ASGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
   CTTCCGCTCG TCCTGTTGCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

S G T I E L V K K G C W D D D F
201 CTGTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
   GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCGT CTAAGTGAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
   TGACGATGCT ATCCGTCTCT ACACACCCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATT
   ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

P E A G G P E V T Y E P P P T
351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
   CGGTCTCGGA CCCCCGGGCG TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGTGTGACAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCGAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCGCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCCRAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCAGTGTGA CGCACACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATRAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGAAC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG
    
```

도면6b

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCTTGCAAC AGGACTGGGT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
 TTTCCGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCARAG
 GGCCTCCTCC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTGGC

901 GAGAACAAC ACAAAGCCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
 CTCTTGTGTA TCTTCTGCTG CCGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAR

951 CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTGTGCACAA CCACTACAGG
 TGCAGAAAGAG TAGGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCGGGTAAA TGA (서열 번호: 51)
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (서열 번호: 52)

도면7

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV

101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTTPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ

251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTV

301 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (서열 번호: 53)

도면8

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT

101 HLPEAGGPEV TYEPPPT (서열 번호: 54)

도면9a

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTGGTT TCGCCCGGGC CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCGTTTG GCGGCTTACA TAAATAATGT

101 ATCCTAAATG GGACTCGAA CCGACCAACC ATCCGGGCT CCAACGGTGT
TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GOTTGCCACA

151 GAGGGGAAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCCCTCT GAGGAACTC
CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

201 CTCCGGGAGC ATTGAACTGG TCAAGAAAGG CTGCTGGGAC GAGGATTTCA
GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCTCG CTGCTAAAGT

251 ATCGTTATGA CCGCGAGGAA TGTGTCCCA CCGAAGAGAA TCCCGAGGTC
TAACAATACT GCGGCTCCTT ACACAGGCT GCCTTCTCTT AGGCGTCCAG

301 TATTTCTGTT GTTGCAGGG GAATTTCTGT ATGAAAGGT TACCCACCT
ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAARGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

351 CCCGAAGGC GGGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CCGACCGGTG
GGGCTTCCG CCGCCCGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGC GGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT COTGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAARACC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGTCACTT GCCTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAGACC
GGCCTGGGGA CTCCAGTGTG CGCACACCA COTGCACTCG GTGCTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCG
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCA CATTATACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
TTCTGTTTTG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

도면9b

```

701   GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
      CGTTCAGAG  GTTGTTCGG  GAGGGTCGGG  GGTAGCTCTT  TTGGTAGAGG

751   AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGRACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCACC
      TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801   CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
      GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGAOCTGGAG GACCAGTTTC

851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCGTGGAST GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGGTGTAG CGGCACCTCA CCGTCTCGTT ACCCGTCCGG

901   GAGAACAAC AACAAGACCAC GCGTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTGTA TGTCTGTGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951   CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCTT

1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCGTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCGGGTAAA TGA (서열 번호: 55)
      GTCTTCTGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (서열 번호: 56)
    
```

도면10

```

GAAAC CCGGGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC
AATCCGGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTGGT
GGAGGAACTC CTCGGGACG ATTGAAGCTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA
AATGTTATGA CCGCAGGAA TGTGTGCGGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGT C TATTTCTGTT
GTTGCAGGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCACCT CCCGGAAGCC GC CGGGCCCG
AGGTGACCTA TGAACCCCG CCACC (서열 번호: 57)
    
```

도면11

```

IgG1  -----IHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 53
IgG4  ---ESKYGPPCPSPAPEFLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 57
IgG2  -----VECPPCPAPPVAG-PSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 51
IgG3  EPKSCDIPPCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 60
      * * * * * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , *

IgG1  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
IgG4  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117
IgG2  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111
IgG3  KNYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120
      ; * * * * * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , *

IgG1  ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP 173
IgG4  ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP 177
IgG2  ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP 171
IgG3  ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTP 180
      * * * * * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , *

IgG1  PVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225
IgG4  PVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 229
IgG2  PMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 223
IgG3  PMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK 232
      * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , * * * * * , *
    
```

도면12

1 MDAMKRGLCC VLLLOGAVFV SPGAA TREC IYNNANWELE RTNQSGLERC
 51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNICYDRQE CVATEENPQV
 101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPPT PGGGTHTCP BCPAPPELLGG
 151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
 201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
 251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTRKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
 301 ENNYKTTTPV LQSDGSPFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSQSV MHEALHNHYT
 351 QKSLSLSPGK (서열 번호: 58)

도면13a

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGGC A E T R E C I Y Y
 CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCACTCTG TGCCCTCAGC TAGATGATGT
 101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 ACGCCAACTG GAGACTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
 TCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG
 151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
 GAAGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCTCCTT GCGCAACAG
 CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGGTTGTC
 201 S G T I E L V K K G C W L D D F
 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
 GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCGAT CTACTGAGT
 251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG
 TGACGATGCT ATCGTCTCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC
 301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACCTTCTG AACGAGCGCT TCACTCATT
 ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAA
 351 P E A G G P E V T Y E P P P T
 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACTGA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
 CCGTCTCCGA CCCCAGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GCGTGTCCAC
 401 GTGGAACTCA CACTGCCCCA CCGTGGCCAG CACCTGAAC TCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGAACCCCTT
 451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
 501 CCGGACCCCT GAGGTCACTT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCTTGGGGA CTCCAGTGTG GGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG
 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATRAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACTTGC GGCACCTCCA CGTATTACGG
 601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGIGGTCAG
 TTCTGTTTCC GCGCCCTCCT GGTCACTGTT TCGTGCATGG CACACCGAGC
 651 CGTCCCTACC GTCCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA
 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTTTGG GAGGGTGGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG
 751 AAAGCCAAAG GCGAGCCCGG AGRACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
 TTTCCGTTTC CCGTCCGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG

도면13b

801 CCGGGAGGAG ATGACCAARG ACCAGGTCAG COTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGAOTGGACG GAACAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC AARAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTGA TGTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAR

951 CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTGCTCCACC GTGGTCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCIGCACAA CCACTACAGG
TGCAAGAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCGGGTAAA TGA (서열 번호: 59)
GTCTTCTCGG ABAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (서열 번호: 60)

도면14a

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACCTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGGG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCGGCTTG GCGCGTTACA TAAATAATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
ATGCTAATIG GGAACTCGA CCGACGARCC AATCCGGGCT CGAACGGTGT
TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCTGCTTGG TTAGGCCGA GCTTGCCACA

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
GAAGGGGAA CAGGATAACG CTTCCATGTC TATGCTCGT GAGGAACTC
CTCCCCCTG TCTATTGTC GAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

201 S G T I E L V K K G C W L D D F
CTCCGGGACG ATTGAACCTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GACGATTTCA
GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCGAC CTGCTAAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
ATTGTTATGA CCGCCAGGA TGTGTCCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
TAACAACTACT GCGGGTCCCT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
TATTTCTGTT CTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACTGG TTACCCACCT
ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T
CCCAGAGCC GGGCGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCGACCCGGT
GGGCTTTCG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGTGGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACCT CCTGGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTCT

451 CCGTCAGTCT TCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGAAGTGAGC CACGAAGACC
GGCTTGGGGA CTCCAGTSTA CCGACCAACA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CCGACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGCAAAAGC CCGGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
TTCTGTTTTG GCGCCCTCCT CGTCAATGTT TCGTGCATGG CACACCACTC

651 CGTCTCACC GTCTTGACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CGTTCACAGG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCAAG GTGTACACC TGCCCCATC
TTGGGTTTT CCGTCGGGGC TTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG

도면14b

```

801  CCGGGAGSAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG COTGACCTGC CTGGTCARRG
    GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851  GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
    CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCGTCTGTT ACCCGTGGGC

901  GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
    CTCTTGTGA TGTTCCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951  CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
    GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTGTTCCACC GTCGTCCCTT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAGC
    TGCAGAAAGG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCGGGGTAAA TGA (서열 번호: 61)
    GTCTTCTGGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (서열 번호: 62)
    
```

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING MYELOFIBROSIS

<130> 1848179-0002-111-W01

<140> PCT/US2017/043967

<141> 2017-07-26

<150> 62/367,289

<151> 2016-07-27

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr

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

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

 275 280 285
 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300
 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg

305 310 315 320
 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro

 340 345 350
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu

 405 410 415
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu

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

 <210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Ala Pro Thr

 115

<210> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
 Leu Pro Glu Ala
 100
 <210> 4
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

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

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

 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190

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

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

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

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

 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro

435 440 445
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser Ser

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

100 105 110

Ala Pro Thr

115

<210> 6

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Leu Pro Glu Ala

 100

<210> 7

<211> 1536

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtgcbc cggctctggg 60

cgtagggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120

accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180

gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat 240

gatttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaacct ccagggttac 300

ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gaacgttca ctcatttgc agaggctggg 360

ggcccggaag tcacgtacga gccacccccg acagccccc cctgctcac ggtgctggcc 420

tactactgc tgccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480

cggcacgca agcccccta cggatcatgt gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540

ccatccctc tggtagggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc 600

tttgctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
 ctccaggaca agcagctcgtg gcagagtgaa cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
 cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagegag gctccaacct cgaagtagag 780
 ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac 840
 atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900

ctgcatgagg atgtgccctg gtgccctggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg 960
 gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
 ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc 1080
 acgagacggt acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
 ttcttgcga ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtgc 1200
 aaggctcgag acggaccgt ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag 1260
 cacccttctg tggaggagct gcaggagggtg gtggtgcaca agaagatgag gcccaccatt 1320

aaagatcact ggttgaaaaa cccgggcctg gccagcttt gtgtgacat cgaggagtgc 1380
 tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
 attcggaggc cggtaaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500
 accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatc 1536

<210> 8

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gggcgtgggg aggctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag 60
 cgcaccaacc agagcggcct ggagcgtgc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc 120

tacgctcct ggcgcaacag ctctggcacc atcgagctcg tgaagaagg ctgctggcta 180
 gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccagggtg 240
 tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgaacgt tcaactcatt gccagaggct 300
 gggggcccg aagtcacgta cgagccacc ccgacagccc ccacc 345

<210> 9

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 35 40 45
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 100 105 110
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220
 Lys
 225
 <210> 10

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

 50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser

65 70 75 80

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

 85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

 100 105 110

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

 165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

 180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

 195 200 205

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

 210 215 220

<210> 11

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala

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

 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val

 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro

 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

 165 170 175
 Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe

 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 12
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 20 25 30
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
 50 55 60
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 65 70 75 80
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 85 90 95
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp
 100 105 110
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 115 120 125
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 130 135 140
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 145 150 155 160
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 165 170 175
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

180 185 190
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 195 200 205
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn

 210 215 220
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
 245 250 255
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
 260 265 270
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275

<210> 13

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

Gly Gly Gly

1

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Thr Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 17

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 18

Thr Gly Gly Gly

1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 19

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 21

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> 22

<211> 22

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Tissue plasminogen activator (TPA) sequence

<400> 22

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> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Native leader sequence

<400> 23

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> 24

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 130 135 140
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 145 150 155 160
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 165 170 175
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 180 185 190

 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220
 Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 225 230 235 240
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 245 250 255

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

 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340
 <210> 25
 <211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 25

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn

35 40 45

Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His

50 55 60

Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

290 295 300

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

305 310 315 320

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

325 330 335

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

340 345 350

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

355 360 365

<210> 26

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 26

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60

tcgcccggcg cctctggggc tggggaggct gagacacggg agtgcaccta ctacaacgcc 120

aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac 180

aagcggctgc actgctacgc ctctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240

aagggtgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300
 gagaaccccc aggtgtactt ctgtgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttact 360
 catttgccag aggtggggg cccggaagtc acgtacgagc ccccccgac agccccacc 420
 ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctcccgac cctgaggtc 540
 acatgcgtgg tggggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 660
 taccgtgtgg tcagctcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720
 aagtgaagg tctccaaca agcctccca gtccccatcg agaaaacat ctccaagcc 780
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccggga ggagatgacc 840
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct atcccagcga catgcccgtg 900
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
 tccgacgct ctttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080
 agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 27

Gly Arg Gly Glu Ala Glu

1 5

<210> 28

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 28

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg

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

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

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

 195 200 205
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 210 215 220
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 225 230 235 240
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

290 295 300

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

<210> 29

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 115 120 125

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

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

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

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 180 185 190

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 30

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 30

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

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

<210> 31

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 31

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

Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
 35 40 45
 Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
 50 55 60

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

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

 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 195 200 205
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 210 215 220
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 225 230 235 240
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 245 250 255

 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 260 265 270
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

275	280	285	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
290	295	300	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
305	310	315	320
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
325	330	335	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
340	345	350	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
355	360	365	

<210> 32

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 32

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccgcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcattca ctacaacgcc	120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcttgagc gctgcgaagg cgagcaggac	180
aagcggtgc actgctacgc ctctggcgc aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag	240
aagggctgct gggacgatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag	300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttact	360
catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc caccctcgac agccccacc	420
ggtggtgaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	480
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc	540
acatgcgtgg tggaggactg gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtactgt	600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgggg aggagcagta caacagcacg	660
taccgtggtg tcagctcct caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	720
aagtgaagg tctccaaca agccctccca gtcccatcg agaaaacat ctccaagcc	780

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 840
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 900
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
 tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080
 agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107

<210> 33

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

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

130 135 140

<210> 34

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 34

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

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

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

 35 40 45

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

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

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

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Gly Pro Trp Ala Ser Thr Thr Ile

 100 105 110

Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser
 115 120 125

Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu
 130 135 140

<210> 35

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 35

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

1 5 10 15

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

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

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

 195 200 205
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 210 215 220
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 245 250 255
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

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> 37

<211> 150

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 37

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

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

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

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 38

<211> 150

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 38

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser

145 150

<210> 39

<211> 150

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 39

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

1 5 10 15

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

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

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

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 40

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150
 <210> 41
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 41
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

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

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

<400> 43

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
 1 5 10 15

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

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

Val Pro Leu Met Leu Ile
 145 150

<210> 44

<211> 154

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Thr, Ala or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (121)..(121)

<223> Pro, Ala, Val or Met

<400> 44

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Xaa Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu
 1 5 10 15
 Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 20 25 30
 Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
 35 40 45
 Arg Leu Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
 50 55 60
 Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
 65 70 75 80
 Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu
 85 90 95
 Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn
 100 105 110
 Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Xaa Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr
 115 120 125
 Glu Pro Lys Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr
 130 135 140
 Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Met
 145 150

<210> 45

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 45

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

	20		25		30										
Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn
	35		40		45										
Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His
	50		55		60										
Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys
65			70		75		80								
Lys	Gly	Cys	Trp	Asp	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys
			85		90		95								
Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly
	100		105		110										
Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro
	115		120		125										
Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr
	130		135		140										
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
145			150		155		160								
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
	165		170		175										
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
	180		185		190										
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	195		200		205										
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	210		215		220										
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
225			230		235		240								
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
	245		250		255										
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
	260		265		270										

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 275 280 285

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 290 295 300

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 305 310 315 320

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 325 330 335

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 340 345 350

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

<210> 46

<400> 46

000

<210> 47

<400> 47

000

<210> 48

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 48

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
 tcgcccgcg cctctgggct tggggaggct gagacacggg agtgcaccta ctacaacgcc 120
 aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180
 aagcggctgc actgctacgc ctctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240

aagggtgct gggatgatga cttcaactgc tacgatagc aggagtgtgt ggccactgag 300
 gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360
 catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc caccgccgac agccccacc 420

ggtgggtgaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac cctgaggtc 540
 acatgcgtgg tgggtggact gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagcccgggg aggagcagta caacagcacg 660

 taccgtgtgg tcagctctc caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720
 aagtgcagg tctccaaca agcctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 780
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccggga ggagatgacc 840
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagca catcgccgtg 900
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
 tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020
 gggaactct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1080

 agcctctccc tgtccccggg taaatga 1107
 <210> 49
 <211> 1107
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 49
 tcatttacc ggggacagg agaggtctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaccctcatg 60
 catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccactg ctcttgtcca cggtagctt 120
 gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct ttagttgtt 180
 ctccggctgc ccattgctct cccaactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240

 caggcaggtc agctgacct ggttcttggc catctctcc cgggatgggg gcagggtgta 300
 cacctgtggt tctcggggct gccctttggc ttggagatg gttttctcga tggggctgg 360
 gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctcttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420
 gacggtagg acctgacca cacggtacgt gctgtgttac tgcctctccc gcggctttgt 480
 ctggcatta tgcacctca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc 540
 gtggctcac tccaccaca cgcatgtgac ctcaggggtc cgggagatca tgagggtgac 600
 cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttcag gtgctgggca 660

 cggtagggcat gtgtgagttc caccaccgtt gggggctgtc gggggtggct cgtacgtgac 720

ttccggggccc ccagcctctg gcaaatgagt gaagcgctcg ttgcagaagt tgccttcaca 780
 gcagcagaag tacacctggg ggttctctc agtggccaca cactcctgcc tatcgtagca 840
 gttgaagtca tcatcccagc agcccttctt cactgagctcg atggtgccag agctgttgcg 900
 ccaggaggcg tagcagtga gccgcttgic ctgctcgct tgcagcgcct ccaggccgct 960
 ctggttggtg cgctccagct cccagttggc gttgtagtag atgcactccc gtgtctcagc 1020
 ctccccagc ccagaggcgc cgggcgaaac gaagactgct ccacacagca gcagcacaca 1080

gcagagccct ctcttcattg catccat 1107

<210> 50

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 50

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 165 170 175
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 180 185 190
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 195 200 205
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 210 215 220
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 245 250 255
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 260 265 270
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 275 280 285
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 290 295 300
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

<210> 51

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 51

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt      60
tcgcccggcg ccgctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag      120
cgcaccaacc agagcggcct ggagcgtctc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc      180
tacgcctcct ggcgcaacac ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctgggac      240
gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccaggtg      300

tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgagcgtc tcaactcattt gccagaggct      360
gggggcccgg aagtacagta cgagccaccc ccgacaggtg gtggaactca cacatgccca      420
ccgtgccagc cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc      480
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc      540
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc      600
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc      660
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaagcc      720

ctcccagccc ceatgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag      780
gtgtacacc  tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc      840
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg      900
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctat      960
agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg     1020
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa     1080
tga                                                                                   1083

```

<210> 52

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 52

```

tcatttaccg ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaccctcatg      60
catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccactg ctcttgtcca cggtagctt      120

```

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggctgtgtct ttagttgtt 180
 ctccggctgc ccattgtctt cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240
 caggcaggtc aggctgacct ggttcttggc catctctccc cgggatgggg gcagggtgta 300

cacctgtggt tctcggggct gccctttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360
 gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctctttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420
 gacggtgagg acgtgacca cacggtacgt gctgttgtac tgctctccc gcggctttgt 480
 ctggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aactgacct cagggtcttc 540
 gtggctcagc tccaccacca cgcatgtgac ctgagggttc cgggagatca tgagggtgtc 600
 ctgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttagc gtgctgggca 660
 cgggtgggcat gtgtgagttc caccacctgt cgggggtggc tcgtacgtga cttccgggcc 720

cccagcctct ggcaaatgag tgaagcgtc gttgcagaag ttgccttcac agcagcagaa 780
 gtacacctgg gggttctct cagtggccac aactcctgc ctatcgtagc agttgaagtc 840
 atcgtcccag cagcccttct tcacgagctc gatggtgcca gagctgttgc gccaggagge 900
 gtagcagtgc agccgttgt cctgetcgc ttcgcagcgc tccagccgc tetggttggc 960
 gcgtccagc tcccagttgg cgtttagta gatgactcc cgtgtctcag cggcgccggg 1020
 cgaaacgaag actgtccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080
 cat 1083

<210> 53

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 53

Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu

35 40 45

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln

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

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

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

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

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

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

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 54

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

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

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

Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
 50 55 60

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

Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly
 85 90 95

Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105

<210> 55

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 55

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60

tcgcccggcg ccgccgaaac ccgcaatgt atttattaca atgctaattg ggaactcgaa 120

cggacgaacc aatccgggct cgaacgggtg gagggggaac aggataaacg cctccattgc 180

tatgcgtcgt ggaggaactc ctccgggacg attgaactgg tcaagaaagg gtgctgggac 240

gacgatttca atigtatga ccgccaggaa tgtgtcgcga ccgaagagaa tccgcaggtc 300

tatttctgtt gttgcgaggg gaatttctgt aatgaacggg ttaccacct ccccgaagcc 360

ggcgggcccc aggtgaccta tgaacccccg cccaccgggt gtggaactca cacatgcca 420

ccgtgccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc 480

aaggacacc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 540

cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 600

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 660

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 720

ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 780

gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 840

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 900

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctat 960

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1020

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctcctgtc cccgggtaaa 1080

tga 1083

<210> 56

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 56

tcatttacc ggggacagg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gaccctcatg 60

catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccactg ctcttgtcca cggtagctt 120

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct ttagttgtt 180

ctccggctgc ccattgctct cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240

caggcaggtc aggtgacct ggttcttggg catctctcc cgggatgggg gcagggtgta 300

cacctgtggt tctcgggct gccctttggc ttggagatg gttttctcga tggggctgg 360

gagggtttg ttggagacct tgcacttgta ctcccttgcca ttcagccagt cctgggtcag 420
 gacggtgagg acgctgacca cacggtacgt gctgtgttac tgctcctccc gcggctttgt 480
 cttagcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagttg aacttgacct cagggtcttc 540

gtggctcacg tccaccacca cgcatgtgac ctccaggggtc cgggagatca tgagggtgtc 600
 cttaggtttt ggggggaaga ggaagactga cggccccccc aggagtccag gtgctgggca 660
 cgggtgggcat gtgtgagttc caccaccggt gggcgggggt tcataggtca cctcgggccc 720
 gccggcttcg gggaggtggg taaaccgttc attacagaaa tcccctcgc aacaacagaa 780
 atagacctgc ggattctctt cggtcgac acattcctgg cggtcataac aattgaaatc 840
 gtgctcccag cacccttctt tgaccagttc aatcgctccg gaggagtcc tccacgacgc 900
 atagcaatgg aggcgtttat cctgttcccc ctcacaccgt tcgagcccgg attggttcgt 960

ccgttcgagt tccaattag cattgtaata aatacattcg cgggtttcgg cggcgcggg 1020
 cgaaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080
 cat 1083

<210> 57

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 57

gaaaccgcg aatgtattta ttacaatgct aattgggaac tcgaaccgac gaaccaatcc 60
 gggctcgaac ggtgtgagg ggaacaggat aaagcctcc attgctatgc gtcgtggagg 120

aactcctccg ggacgattga actggtcaag aaaggtgct gggacgacga tttcaattgt 180
 tatgaccgcc aggaatgtgt cgcgaccgaa gagaatccgc aggtctatct ctgttgttgc 240
 gaggggaatt tctgtaatga acggtttacc cacctccccg aagccggcgg gcccgaggtg 300
 acctatgaac cccgcccac c 321

<210> 58

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 58

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

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

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

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

195 200 205
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 210 215 220
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 305 310 315 320

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

<210> 59

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 59

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
 tcgcccgcg ccgctgagac acgggagtgc atctactaca acgccaactg ggagctggag 120

cgcaccaacc agagcggcct ggagcgtgc gaaggcgagc aggacaagcg gctgcactgc 180
 tacgcctcct ggcgcaacac ctctggcacc atcgagctcg tgaagaaggg ctgctggcta 240
 gatgacttca actgctacga taggcaggag tgtgtggcca ctgaggagaa cccccaggtg 300
 tacttctgct gctgtgaagg caacttctgc aacgagcgt tcaactcattt gccagaggct 360
 gggggcccg aagtcacgta cgagccacc cgcacaggtg gtggaactca cacatgccca 420
 ccgtgccag cactgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctttccc cccaaaacc 480

aaggacaccc tcattgatctc ccggaccctc gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 540

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 600

aagacaaage cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc 660

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 720

ctcccagccc ccactgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 780

gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 840

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc 900

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctat 960

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1020

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc tctcctgtc cccgggtaaa 1080

tga 1083

<210> 60

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 60

tcatttacc ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gagcctcatg 60

catcacggag catgagaaga cgttcccctg ctgccacctg ctcttgtcca cggtagctt 120

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggctt ttagttgtt 180

ctccggctgc ccattgctct cccaactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240

caggcaggtc aggctgacct ggttcttggc catctctcc cgggatgggg gcagggtgta 300

cacctgtggt tctcgggct gccctttggc ttgggatag gttttctga tgggggctgg 360

gagggtttg ttggagacct tgcaattgta ctctttgcca ttcagccagt cctggtgcag 420

gacggtgagg acgtgacca cacggtacgt gctgtgttac tgctcctccc gcggctttgt 480

cttggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagtgt aacttgacct cagggtcttc 540

gtggctcacg tccaccacca cgcatgtgac ctcaggggtc cgggagatca tgagggtgtc 600

cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cggcccccc aggagttcag gtgctgggca 660

cgggtggcat gtgtgagttc caccacctgt cgggggtggc tcgtactgta ctccgggccc 720

cccagcctct ggcaaatgag tgaagcgtc gttgcagaag ttgccttcac agcagcagaa 780

gtacacctgg gggttctcct cagtggccac aactcctgc ctatcgtagc agttgaagtc 840
atctagccag cagcccttct tcacgagctc gatggtgcca gagctgttgc gccaggaggc 900
gtagcagtgc agccgcttgt cctgctcgcc ttcgcagcgc tccaggccgc tctggttgg 960

gcgctccagc tcccagttgg cgtttagta gatgactcc cgtgtctcag cggcgccggg 1020
cgaaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080
cat 1083

<210> 61
<211> 1083
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 61
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg ccgccgaaac ccgcaaatgt atttattaca atgctaattg ggaactcgaa 120

cggacgaacc aatccgggct cgaacggtgt gagggggaac aggataaac cctccattgc 180
tatgctgctg ggaggaactc ctccgggacg attgaaactgg tcaagaaagg gtgctggctg 240
gacgatttca attgttatga ccgccaggaa tgtgtcgcga ccgaagagaa tccgaggtc 300
tatttctggt gttgagagg gaatttctgt aatgaacggt ttaccacct ccccgaagcc 360
ggcgggcccc aggtgaccta tgaacccccg ccaccgggtg gtggaactca cacatgcca 420
ccgtgccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc 480
aaggacacc tcattgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 540

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 600
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 660
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 720
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 780
gtgtacacc tgecccatc cggggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 840
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcgagccg 900
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctat 960

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1020
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctcctgtc cccgggtaaa 1080

tga 1083

<210> 62

<211> 1083

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

tcaattacc ggggacaggg agaggctctt ctgcgtgtag tggttgtgca gacccatg 60
 catcacggag catgagaaga cggtcccctg ctgccacctg ctctgtcca cggtagctt 120

gctatagagg aagaaggagc cgtcggagtc cagcacggga ggcgtggtct ttagttggt 180
 ctccggctgc ccattgctct cccactccac ggcgatgtcg ctgggataga agcctttgac 240
 caggcaggtc aggctgacct ggttcttggc catctcctcc cgggatgggg gcagggtgta 300
 cacctgtggt tctcggggct gccctttggc tttggagatg gttttctcga tgggggctgg 360
 gagggctttg ttggagacct tgcacttgta ctcccttcca ttcagccagt cctgggtgag 420
 gacggtgagg acgctgacca cacggtacgt gctggtgtac tgctcctccc gcggctttgt 480
 ctggcatta tgcacctcca cgccgtccac gtaccagtig aacttgacct cagggtcttc 540

gtggctcacg tccaccacca cgcatgtgac ctcaggggtc cgggagatca tgagggtgct 600
 cttgggtttt ggggggaaga ggaagactga cgtcccccc aggagttag gtgctgggca 660
 cggtagggcat gtgtgagttc caccaccggt gggcgggggt tcataggtca cctcgggccc 720
 gccggcttcg gggaggtggg taaaccgttc attacagaaa ttcccctcgc aacaacagaa 780
 atagacctgc ggattctctt cggctcgcac acattcctgg cggtcataac aattgaaatc 840
 gtccagccag caccctttct tgaccagttc aatcgtcccg gaggagtcc tccacgacgc 900
 atagcaatgg aggcgtttat cctgttcccc ctcacaccgt tcgagcccgg attggttcgt 960

ccgttcgagt tccaattag cattgtaata aatacttcg cgggtttcgg cggcgcgggg 1020
 cgaaacgaag actgctccac acagcagcag cacacagcag agccctctct tcattgcatc 1080
 cat 1083

<210> 63

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

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>

65

<211> 63

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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> 66
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66

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> 67
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67

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> 68
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68

Met Arg Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Trp Pro Leu Pro Trp Gly Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Trp Ala Val Gly Phe Val Ser Ser Met Gly Ser Gly Asn Pro
 20 25 30
 Ala Pro Gly Gly Val Cys Trp Leu Gln Gln Gly Gln Glu Ala Thr Cys
 35 40 45

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

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

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

 Gly Ser Cys Ala Gly Thr Pro Glu Glu Pro Pro Gly Gly Glu Ser Ala
 245 250 255
 Glu Glu Glu Glu Asn Phe Val

260

<210> 69

<211> 225

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

 195 200 205

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

Lys
 225
 <210> 70
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 70

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 71
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

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

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

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

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

<210> 72

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

 165 170 175
 Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 73

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 73

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

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

Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr

100

105

<210> 74

<211

> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

6xHis tag

<400> 74

His His His His His His

1

5