



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월26일
 (11) 등록번호 10-1526613
 (24) 등록일자 2015년06월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2009-7017346
 (22) 출원일자(국제) 2008년02월01일
 심사청구일자 2013년01월30일
 (85) 번역문제출일자 2009년08월20일
 (65) 공개번호 10-2009-0104874
 (43) 공개일자 2009년10월06일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2008/001429
 (87) 국제공개번호 WO 2008/094708
 국제공개일자 2008년08월07일
 (30) 우선권주장
 60/899,070 2007년02월01일 미국(US)
 61/000,540 2007년10월25일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2007062188 A2
 WO2006012627 A2
- (73) 특허권자
악셀레론 파마 인코포레이티드
 미국 02139 메사추세츠주 캠프리지 시드니 스트리트 128
- (72) 발명자
크노페, 존
 미국, 메사추세츠 01741, 칼리슬레, 로빈스 드라이브 147
씨에라, 자스비르
 미국, 메사추세츠 02421-6818, 렉싱턴, 린콜린 테라세 3
쿠마르, 라빈드라
 미국, 메사추세츠 01720, 악톤, 알링턴 스트리트 421
- (74) 대리인
강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 62 항

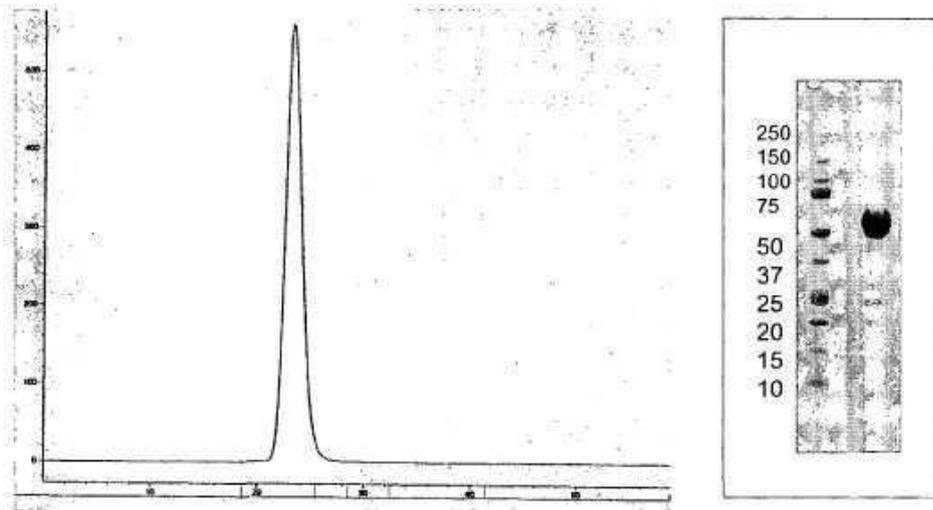
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **액티빈-AC T R II A 길항제 및 유방암을 치료 또는 예방하기 위한 이들의 용도**

(57) 요약

특정 측면에서, 본 발명에서는 인간에서 유방암을 치료 또는 예방하기 위한 조성물과 방법을 제시한다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

ActRIIa-Fc 융합 단백질(fusion protein)의 효과량을 포함하고, 치료를 요하는 인간 환자에서 유방암 또는 유방암 관련된 골 손실(bone loss)을 치료 또는 예방용 약학 조제물(pharmaceutical preparation).

청구항 2

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은

- a) SEQ ID NO:2에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- b) SEQ ID NO:3에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 또는
- c) SEQ ID NO: 2의 최소한 50개의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 아래의 특징 중에서 하나 이상을 보유하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물:

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

청구항 4

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모어티(lipid moiety)에 공동된 아미노산, 또는 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 공동된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 14

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:12의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 15

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:12의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 16

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:12의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 17

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 2개의 폴리펩티드로 형성된 이합체(dimer)이고, 각 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 ActRIIa-Fc 융합 단백질은 3개 또는 그 이상의 시알산 모이어티(sialic acid moiety)를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 19

청구항 17에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 20

청구항 17에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 21

청구항 17에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 22

청구항 17에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 3개 내지 5개의 시알산 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 23

청구항 17에 있어서, 환자의 골격근 크기(skeletal muscle mass)에서 10% 이하의 증가를 유도하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 24

청구항 17에 있어서, 약학 조제물은 환자에서 최소한 0.2 mg/kg의 혈청 농도(serum concentration)에 도달하도록 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 25

청구항 17에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 정상적인 건강한 인간에서 15일 내지 40일의 혈청 반감기(serum half-life)를 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 26

청구항 17에 있어서, 약학 조제물은 주1회의 빈도로 환자에 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 27

청구항 17에 있어서, 약학 조제물은 월1회의 빈도로 환자에 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 28

청구항 17에 있어서, 약학 조제물은 3개월마다 1회의 빈도로 환자에 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 29

청구항 1에 있어서, 환자는 골 항-재흡수 요법(bone anti-resorptive therapy)을 받고 있거나, 또는 약학 조제물의 투여에 앞서 1년 이내에 골 항-재흡수 요법을 받은 적이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 항-재흡수제(anti-resorptive agent)는 비스포스포네이트 작용제(bisphosphonate agent), RANK 리간드 길항제와 오스테오프로테그린(osteoprotegrin) 길항제로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 31

청구항 1에 있어서, 약학 조제물은 인간 환자에 방사선 요법, 호르몬 요법 또는 세포독성제와 복합 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 32

청구항 1에 있어서, 인간 환자는 유방암에 대한 한 가지 이상의 위험 인자(risk factor)를 갖는 여성인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 33

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 액티빈 및/또는 GDF11에 결합하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 34

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 액티빈 A에 결합하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 35

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 액티빈 B에 결합하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 36

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 GDF11에 결합하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 37

청구항 1에 있어서, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 액티빈 A, 액티빈 B 및 GDF11에 결합하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 38

청구항 1에 있어서, 유방암은 전이성 유방암인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 39

청구항 1에 있어서, 유방암은 에스트로겐-수용체 음성 유방암인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 40

액티빈-ActRIIa 길항제의 효과량을 포함하며, 치료를 요하는 개체에서 유방암 또는 유방암 관련된 골 손실을 치료 또는 예방용 약학 조제물.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 액티빈-ActRIIa 길항제는 ActRIIa 길항제 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 42

청구항 40에 있어서, 액티빈-ActRIIa 길항제는 a. 항-액티빈 항체; 또는 b. 항-ActRIIa 항체에서 선택되는 항체인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 약학 조제물의 투여는 유방암의 발병에서 지연을 유도하거나, 유방암의 진행을 저해하거나, 전이의 발생을 지연시키거나, 또는 종양 크기를 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 44

청구항 40에 있어서, 개체는 인간인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 인간은 유방암에 대한 한 가지 이상의 위험 인자(risk factor)를 갖는 여성인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 46

청구항 40에 있어서, 약학 조제물은 개체에 방사선 요법, 호르몬 요법 또는 세포독성제와 함께 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 47

청구항 40에 있어서, 유방암은 전이성 유방암인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 48

청구항 40에 있어서, 유방암은 에스트로겐-수용체 음성 유방암인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 49

유방암을 치료 또는 예방하는 작용제를 확인하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) ActRIIa 리간드와 경쟁적으로, ActRIIa 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인(ligand-binding domain)에 결합하는 검사 작용제(test agent)를 확인하는 단계; 그리고
- b) 유방암 세포 증식 또는 생존에 대한 상기 작용제의 효과를 평가하는 단계.

청구항 50

액티빈-ActRIIa 길항제의 효과량을 포함하고, 유방암을 앓는 인간 환자에서 액티빈-매개된 신호전달(activin-mediated signaling) 저해용 약학 조제물.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 액티빈-ActRIIa 길항제는 ActRIIa 길항제 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 52

청구항 50에 있어서, 액티빈-ActRIIa 길항제는 a. 항-액티빈 항체; 또는 b. 항-ActRIIa 항체에서 선택되는 항체인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 53

청구항 51에 있어서, 액티빈-ActRIIa 길항제 폴리펩티드는

- a) SEQ ID NO:2에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;
- b) SEQ ID NO:3에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 또는
- c) SEQ ID NO: 2에서 선택되는 최소한 50개의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 상기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 55

청구항 53에 있어서, 상기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열에 최소한 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 56

청구항 53에 있어서, 상기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 57

청구항 53에 있어서, 액티빈-ActRIIa 길항 폴리펩티드는 아래의 특징 중에서 하나 이상을 보유하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물:

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

청구항 58

청구항 53에 있어서, 액티빈-ActRIIa 길항제 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드 도메인 이외에, 생체내 안정성

(in vivo stability), 생체내 반감기(in vivo half life), 흡수/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 또는 정제 중에서 하나 이상을 강화시키는 하나 이상의 폴리펩티드 부분을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 융합 단백질은 면역글로블린 Fc 도메인 또는 혈청 알부민에서 선택되는 폴리펩티드 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 60

청구항 53에 있어서, 액티빈-ActRIIa 길항제 폴리펩티드는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모이어티에 공동된 아미노산, 또는 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 공동된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 61

청구항 50에 있어서, 유방암은 전이성 유방암인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

청구항 62

청구항 50에 있어서, 유방암은 에스트로겐-수용체 음성 유방암인 것을 특징으로 하는 약학 조제물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2007년 2월 1일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/899,070 및 2007년 10월 25일자 제출된 U.S. 가출원 No. 61/000,540에 우선권을 주장한다. 이들 출원의 모든 교시는 본 명세서에서 참조로서 편입된다.

[0003] 본 발명의 기술 분야

[0004] 특정 측면에서, 본 발명에서는 인간에서 유방암을 치료 또는 예방하기 위한 조성물과 방법을 제시한다.

배경 기술

[0005] 유방암은 서구 국가의 여성에서 가장 빈번한 유형의 암이며, 매년 미국에서 180,000명 이상의 여성에게 악영향을 주고 있다. 상기 질환은 유선(mammary gland)에서 발생하는데, 유선은 분지관 체계(branching duct system)로 구성된다. 유방의 각 유선은 로브(lobe)로 불리는 15개 내지 20개의 구획(section)을 보유하고, 각 로브는 유두(nipple)로 방수하는 일련의 분지관을 보유한다. 각 관에 정렬되어 있는 상피 세포(epithelial cell)는 모유 생산을 담당한다. 침습성 유방암은 일련의 증가하는 비정상적 증식 병소를 통하여 종말관유소엽단위(terminal duct/lobular unit)의 정상적인 상피세포로부터 기원하는 것으로 생각된다. 종양이 전이 능력을 획득하게 되면, 유방암 세포는 다른 기관으로 확산되고, 치료를 더욱 어렵게 만든다. 가장 일반적인 유방암 전이 부위는 폐, 간, 그리고 뼈이다. 뼈로의 전이는 통상적으로, 심각한 통증, 골 손실(bone loss), 그리고 증가된 골절 위험과 연관된다. 유방암의 치료에 이용되는 대부분의 항-에스트로겐 요법(anti-estrogenic therapy) 역시 가속화된 골 손실과 연관된다.

[0006] 유방암으로 진단된 환자는 전형적으로, 원발성 종양(primary tumor)을 치료하기 위한 수술 및/또는 방사선요법, 이후 원거리로 확산된 임의의 암 세포를 치료하기 위한 보조 요법(adjvant therapy)을 받는다. 보조 요법은 세포독성 화학요법(cytotoxic chemotherapy) 및/또는 호르몬 요법(endocrine therapy)으로 구성된다. 화학요법이 다양한 유형의 악성을 치료하는데 효과적이긴 하지만, 대부분의 항-신생물성 화합물(anti-neoplastic compound)은 바람직하지 않은 부작용을 유발한다. 부가적으로, 대부분의 종양은 화학요법과 호르몬 요법에 반응하지 않거나 내성을 나타낸다. 보조 요법이 유방암 환자에서 사망률(mortality rate)을 향상시킨지 하지만, 가장 일반적인 조직병리학적 유형의 침습성 유방암을 앓는 환자의 10년 생존율(survival rate)은 여전히 35-50%에 불과하다(Weigelt et al. 2005 Nat. Rev. Cancer 5: 591-602). 게다가, 불량한 예후 기준(prognosis criteria)으로

인하여, 국소 치료만으로도 치유될 수 있는 많은 여성이 불필요하게 보조 요법을 받고 있다.

[0007] 결과적으로, 유방암에 대한 더욱 효율적이고 효과적인 분자 표적(molecular target)이 요구된다. 화학요법과 호르몬 요법보다 독성이 덜하고 및/또는 더욱 효과적인 대안적 요법은 치료 섭생(treatment regimen)을 향상시키고 생존을 증가시킬 것이다. 더 나아가, 침습성 또는 전이성 유방암의 발병 위험이 있는 환자에 대한 예방적 치료제(preventative treatment)로서 이용될 수 있는 작용제는 임상에서 유용할 것이다. 이런 이유로, 본 발명의 목적은 환자에서 유방암을 치료하거나, 또는 유방암의 진행을 저해하거나 예방하기 위한 대안적 조성물과 방법을 제시하는 것이다.

[0008] 본 발명의 요약

[0009] 부분적으로, 본 발명은 유방암 또는 유방암과 연관된 골 손실을 치료하거나 예방하기 위한 액티빈(activin) 길항제와 ActRIIa 길항제의 용도에 관계한다. 특히, 본 발명은 액티빈의 저해물질로서 기능하는 ActRIIa의 가용성 형태를 이용하여 유방암을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제시한다. 가용성 ActRIIa가 액티빈 길항(antagonism) 이외의 기전을 통하여 암 세포 성장 또는 생존에 영향을 줄 수도 하지만, 그럼에도 불구하고, 바람직한 치료제가 액티빈 길항 또는 ActRIIa 길항, 또는 둘 모두에 기초하여 선택될 수 있다. 이들 작용제는 액티빈-ActRIIa 길항제로서 총칭된다. 이런 이유로, 특정 구체예에서, 본 발명에서는 병든 환자에서 유방암을 치료 또는 예방하기 위하여, 예로써, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드, 항-액티빈 항체, 항-ActRIIa 항체, 액티빈 - 또는 ActRIIa-표적된 소형 분자, 압타머(aptamer) 등을 비롯한 액티빈-ActRIIa 길항제 및 액티빈과 ActRIIa의 발현을 감소시키는 핵산을 이용하는 방법을 제시한다. 본 명세서에 참조로서 편입되는 미국 특허 출원 11/603,485에서 기술된 바와 같이, 액티빈-ActRIIa 길항제는 골 성장을 촉진하고 골 밀도를 증가시키는데 이용될 수 있다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 이들 작용제는 유방암, 골로의 유방암 전이, 그리고 유방암과 연관된 골 손실을 치료 또는 예방하는 데에도 이용될 수 있다.

[0010] 특정 측면에서, 본 발명에서는 액티빈에 결합하는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 이용하여 유방암을 치료 또는 예방하는 방법을 제시한다. ActRIIa 폴리펩티드는 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 제약학적 조성물로서 제제화된다. 적절하게는, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 1 이하 마이크로몰(micromolar), 또는 100, 10 또는 1 이하 나노몰(nanomolar)의 K_D 로 액티빈에 결합한다. 선택적으로, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 GDF11 및/또는 GDF8에 비하여 액티빈에 선택적으로 결합한다, 바람직하게는, GDF11 및/또는 GDF8에 비하여 액티빈에 최소한 10-배, 20-배 또는 50-배 낮은 K_D 로 결합한다. 특정 작용 기전에 한정됨 없이, GDF11/GDF8 저해에 비하여 액티빈 저해에 대한 이러한 선택성은 근육에 대한 지속적으로 측정가능한 효과를 유발하지 않으면서 골, 또는 종양 생존이나 성장에 선택적인 효과를 설명할 것으로 기대된다. 많은 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 암 세포에 대한 바람직한 효과를 달성하는 용량으로, 근육에서 15% 이하, 10% 이하 또는 5% 이하의 증가를 유발하도록 선택될 것이다. 적절하게는, 조성물은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 평가에서, 다른 폴리펩티드 성분과 관련하여 최소한 95% 순수하다, 더욱 바람직하게는, 조성물은 최소한 98% 순수하다. 이런 조성물에 이용되는 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 본 명세서에 기술된 임의의 폴리펩티드, 예를 들면, SEQ ID NO: 2, 3, 7 또는 12에서 선택되는 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 또는 13에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에는 자연 ActRIIa 폴리펩티드의 기능성 단편, 예를 들면, SEQ ID NO: 1-3에서 선택되는 서열, 또는 C-말단의 10개 내지 15개 아미노산("꼬리")이 부재하는 SEQ ID NO: 2의 서열의 최소한 10개, 20개, 30개, 50개, 90개, 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는 기능성 단편이 포함된다.

[0011] 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열(가령, 리간드-결합 도메인)에서 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 변형된 ActRIIa 폴리펩티드의 실례는 WO 2006/012627, pp. 59-60에서 제공된다. 아미노산 서열에서 변형은 예로써, 자연 발생 ActRIIa 폴리펩티드와 비교하여 포유동물, 곤충 또는 다른 진핵생물 세포에서 생산되는 폴리펩티드의 글리코실화(glycosylation)를 변화시키거나, 또는 폴리펩티드의 단백질 분해 절단(proteolytic cleavage)을 변화시킨다.

[0012] 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드는 한 도메인으로서 ActRIIa 폴리펩티드(가령, ActRIIa의 리간드-결합 부분) 및 향상된 약물동력학(pharmacokinetics), 더욱 용이한 정제, 특정 조직으로 강화된 표적화 등과 같은 바람직한 특성을 제공하는 하나 이상의 다른 도메인을 포함하는 융합 단백질일 수 있다. 가령, 융합 단백질의 도메인은 생체내 안정성, 생체내 반감기, 흡수/투여, 조직 국지화 또는 분포, 단백질 복합체의 형성, 융합 단백질의 다중화(multimerization) 및/또는 정제 중에서 하나 이상을 강화시킨다. 액티빈-결합 ActRIIa 융합 단백질은 면역글로

불린 Fc 도메인(야생형 또는 변이체), 혈청 알부민, 또는 향상된 약물동력학, 향상된 용해도(solubility) 또는 향상된 안정성과 같은 바람직한 특성을 제공하는 다른 폴리펩티드 부분을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRIIa-Fc 융합은 Fc 도메인과 세포의 ActRIIa 도메인 사이에 위치하는 상대적으로 비구조적 링커를 포함한다. 이러한 비구조적 링커는 ActRIIa의 세포의 도메인의 C-말단 단부("꼬리")에서 대략 15개의 아미노산 비구조적 영역에 상응하거나, 또는 상기 비구조적 링커는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 아미노산, 또는 이차 구조가 상대적으로 부재하는 5개 내지 15개, 20개, 30개, 50개 또는 그 이상의 아미노산, 또는 양쪽의 혼합물의 인공 서열일 수 있다. 링커는 글리신(glycine)과 프롤린(proline) 잔기가 풍부하고, 예로써, 트레오닌(threonine)/세린(serine)과 글리신(glycine)의 단일 서열 또는 트레오닌/세린과 글리신의 반복 서열(가령, TG₄ 또는 SG₄ 단일항(singlet) 또는 반복)을 포함한다. 융합 단백질은 정제 부분서열(suqsequence), 예를 들면, 에피토프 태그(epitope tag), FLAG 태그, 폴리히스티딘(polyhistidine) 서열, GST 융합체를 포함할 수 있다. 임의적으로, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 글리코실화된 아미노산, PEG화된 아미노산, 파르네실화된 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 비오틴화된 아미노산, 지질 모이어티에 공동된 아미노산, 또는 유기 유도체화제(organic derivatizing agent)에 공동된 아미노산에서 선택되는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함한다. 제약학적 조성물은 또한, 하나 이상의 부가적인 화합물, 예를 들면, 골 질환을 치료하는데 이용되는 화합물을 포함한다. 적절하게는, 제약학적 조성물은 발열원(pyrogen)이 실질적으로 부재한다. 일반적으로, ActRIIa 단백질은 환자에서 부정적인 면역 반응(immune response)의 가능성을 최소화시키기 위하여 ActRIIa 단백질의 적절한 자연적 글리코실화를 매개하는 포유동물 세포주에서 발현시키는 것이 바람직하다. 인간과 CHO 세포주가 성공적으로 이용되고 있고, 다른 통상적인 포유동물 발현 시스템이 유용할 것으로 기대된다. 부가적으로, 효모와 기타 세포 유형은 글리코실화를 촉진하는 포유동물 효소를 발현하도록 유전자 조작되고, 따라서 이들 비-포유동물 세포에서 발현되는 단백질 상에서 엄격하게 통제된 포유동물-유사 글리코실화의 발생을 가능하게 한다. 이들 재조합 세포주 역시 본 명세서에 기술된 단백질을 발현하는데 이용될 수 있다.

[0013] 본 명세서에 기술된 바와 같이, ActRIIa-Fc(ActRIIa 일부분과 Fc 일부분 사이에 최소 링커를 보유하는 형태)로 명명된 ActRIIa 단백질은 GDF8 및/또는 GDF11에 비하여 액티빈에 대한 선택성 결합, 높은 친화성 리간드 결합, 동물 모형에서 2주 이상의 혈청 반감기를 비롯한 바람직한 특성을 보유한다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa-Fc 폴리펩티드 및 이런 폴리펩티드와 제약학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 제약학적 조성물을 이용하여 유방암을 치료 또는 예방하는 방법을 제시한다.

[0014] 특정 측면에서, 본 발명에서는 가용성 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 이용하여 유방암을 치료 또는 예방하는 방법을 제시한다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 앞서 기술된 바와 같은 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 가령, 분리된 핵산은 ActRIIa의 세포의 도메인(가령, 리간드-결합 도메인)을 코딩하는 서열 및 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 내에 위치하거나 세포의 도메인과 막통과 도메인 또는 세포질 도메인 사이에 위치하는 종결 코돈(stop codon)을 제외하고 ActRIIa의 막통과 도메인 및/또는 세포질 도메인의 일부 또는 전체를 코딩하는 서열을 포함한다. 가령, 분리된 폴리뉴클레오티드는 전장 ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들면, SEQ ID NO: 4 또는 5, 또는 부분적으로 절두된 이형을 포함하는데, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 3'-말단에서 최소한 600개 뉴클레오티드 앞에, 또는 이러한 폴리뉴클레오티드의 번역이 전장 ActRIIa의 절두된 부분에 임의적으로 융합된 세포의 도메인을 산출하도록 달리 배치된 전사 종결 코돈(transcription termination codon)을 더욱 포함한다. 선호되는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 14이다. 본 발명에 개시된 방법에 유용한 핵산은 발현을 위하여 프로모터에 작동가능하게 연결되는데, 본 발명에서는 이런 재조합 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 세포를 제시한다. 적절하게는, 세포는 포유동물 세포, 예를 들면, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포이다.

[0015] 특정 측면에서, 본 발명에서는 유방암을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있는 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제시한다. 이런 방법은 적절한 세포, 예를 들면, CHO 세포에서 본 명세서에 기술된 임의의 핵산(가령, SEQ ID NO: 4, 5 또는 14)을 발현하는 단계를 포함한다. 이런 방법은 a) 가용성 ActRIIa 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 세포를 배양하는 단계, 여기서 상기 세포는 가용성 ActRIIa 발현 구조체로 형질전환된다; b) 이렇게 발현된 가용성 ActRIIa 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드는 정제되지 않거나, 부분적으로 정제되거나, 또는 고도로 정제된 분획물(fraction)로서 회수된다. 정제는 예로써, 임의의 순서로 아래 중에서 한 가지, 두 가지 또는 세 가지 이상을 비롯한 일련의 정제 단계로 달성될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피(가령, Q 세파로오스), 소수성 상호작용 크로마토그래피(가령, 페닐세파로오스), 크기 배제 크로마토그래피, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피.

[0016] 특정 측면에서, 본 명세서에 기술된 액티빈-ActRIIa 길항제, 예를 들면, 가용성, 액티빈-결합 ActRIIa 폴리펩티

드는 예로써, 유방암의 발병을 지연시키거나, 유방암의 진행을 저해하거나, 종양 크기(tumor size)를 감소시키거나, 종양 성장을 예방하거나, 전이의 발생을 지연시키거나, 또는 뼈로의 전이를 비롯한 전이를 예방하는 방법을 비롯한, 개체에서 유방암을 치료, 예방 또는 저해하는 방법에 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명에서는 병든 환자에서 유방암 세포의 성장 또는 생존을 감소시키거나 저해하는 방법을 제시한다. 한 가지 방법은 액티빈-ActRIIa 길항제의 효과량을 병든 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명에서는 본 명세서에 기술된 바와 같이, 유방암의 치료 또는 예방을 위한 약제를 제조하기 위한 액티빈-ActRIIa 길항제의 용도를 제시한다. 본 발명은 또한, 액티빈-ActRIIa 길항제와 방사선 요법, 화학요법(가령, 세포독성제) 및/또는 호르몬 요법을 포함하는 복합 요법(combination therapy)에 관계한다. 길항제는 ActRIIa-Fc 융합 단백질일 수 있는데, 여기서 ActRIIa-Fc 융합 단백질은 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 대안으로, 길항제는 ActRIIa-Fc 융합 단백질일 수 있는데, 여기서 ActRIIa-Fc 융합 단백질은 2개의 폴리펩티드로 형성된 이합체(dimer)이고, 각 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열에 최소한 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 ActRIIa-Fc 융합 단백질은 3개 또는 그 이상의 시알산 모이어티(sialic acid moiety)를 포함한다. 적절하게는, ActRIIa-Fc 융합 단백질은 3개 내지 5개의 시알산 모이어티를 포함한다.

[0017] 다른 구체예에서, 본 발명은 한 가지 이상의 유방암 위험 인자(risk factor)를 갖는 환자에서 유방암의 발병을 예방하거나 지연시키는 방법에 관계한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 원발성 유방 종양(primary breast tumor) 또는 유방의 증식성 병소(proliferative lesion)로 이미 진단된 환자에서 전이성 질환의 발병을 예방 또는 지연시키는 방법에 관계한다. 인간 환자에서 유방암의 발병을 예방 또는 지연시키는 방법은 a) 서열 SEQ ID NO:2에 최소한 90% 동일한 아미노산을 포함하는 폴리펩티드; b) 서열 SEQ ID NO:3에 최소한 90% 동일한 아미노산을 포함하는 폴리펩티드; c) SEQ ID NO: 2에서 선택되는 최소한 50개의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드로 구성된 군에서 선택되는 폴리펩티드의 효과량을 필요한 인간 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0018] 본 발명의 다른 구체예는 유방암을 앓는 인간 환자에서 액티빈-매개된 신호전달(activin-mediated signaling)을 저해하는 방법에 관계한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 액티빈-ActRIIa 길항제의 효과량을 인간 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 길항제는 a) 서열 SEQ ID NO:2에 최소한 90% 동일한 아미노산을 포함하는 폴리펩티드; b) 서열 SEQ ID NO:3에 최소한 90% 동일한 아미노산을 포함하는 폴리펩티드; c) SEQ ID NO: 2에서 선택되는 최소한 50개의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드로 구성된 군에서 선택되는 폴리펩티드이다.

[0019] 특정 측면에서, 본 발명에서는 암 세포(가령, 유방암 세포)의 성장 또는 생존을 저해하는 작용제(agent)를 확인하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 a) 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 리간드-결합 도메인에 결합하는 검사 작용제를 확인하는 단계; b) 암 세포의 증식, 생존 또는 아포토시스(apoptosis)에 대한 작용제의 효과를 평가하는 단계를 포함한다.

발명의 상세한 설명

[0023] 1. 개요

[0024] 전환 성장 인자(transforming growth factor)-베타(TGF-beta) 대과(superfamily)는 공통의 서열 요소(sequence element)와 구조 모티프(structural motif)를 공유하는 다양한 성장 인자를 포함한다. 이들 단백질은 척추동물과 무척추동물 모두에서 다양한 세포 유형에 대한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 대과의 구성원은 배 발생(embryonic development) 동안 패턴 형성(pattern formation)과 조직 특정화(tissue specification)에서 중요한 기능을 수행하고, 지방생성(adipogenesis), 근육발생(myogenesis), 연골형성(chondrogenesis), 심형성(cardiogenesis), 혈액생성(hematopoiesis), 신경생성(neurogenesis), 그리고 상피 세포 분화(differentiation)를 비롯한 다양한 분화 과정(differentiation process)에 영향을 줄 수 있다. 이러한 집단은 2가지 분과: BMP/GDF와 TGF-베타/액티빈/BMP10 분과로 분류되는데, 이들의 구성원은 다양하고, 종종 상보적인 효과를 나타낸다. TGF-베타 과의 구성원의 활성을 조종함으로써, 생물체 내에서 현저한 생리학적 변화를 유도하는 것이 종종 가능하다. 가령, 산록(piedmont)과 벨기에 블루 소(Belgian Blue cattle) 품종은 GDF8 (일명, 미오스타틴(myostatin)) 유전자에서 기능 상실 돌연변이(loss-of-function mutation)를 보유하는데, 이는 근육량(muscle mass)에서 눈에 띄는 증가를 유도한다(Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4). 더 나아가, 인간에서, GDF8의 비활성 대립형질(allele)은 증가된 근육량과 보고된 바에 의하면, 특별한 체력(exceptional strength)에 연관된다(Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8).

[0025] 액티빈(activin)은 TGF-베타 대과에 속하는 이합체(dimeric) 폴리펩티드 성장 인자이다. 2개의 밀접하게 관련된 β 아단위(subunit)의 동종이합체(homodimer)/이종이합체(heterodimer)(각각, β_Aβ_A, β_Bβ_B와 β_Aβ_B)인 3가지

주요 액티빈 형태(A, B와 AB)가 존재한다. 인간 계통은 또한, 액티빈 C와 액티빈 E를 인코딩하는데, 이들은 간에서 주로 발현되고, β_c 또는 β_E 를 보유하는 이종이합체(heterodimeric) 형태 역시 공지되어 있다. TGF-베타 대과에서, 액티빈은 난소와 태반 세포에서 호르몬 생산을 촉진하고, 신경 세포 생존을 뒷받침하고, 세포 유형(cell type)에 따라 세포-주기 진행에 긍정적인 또는 부정적인 영향을 주고, 최소한 양서류 배(amphibian embryo)에서 중배엽 분화(mesodermal differentiation)를 유도할 수 있는 독특한 다중기능성 인자이다(DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). 게다가, 액티빈 B는 생쥐에서 유방 상피 세포 분화의 조절에 관여하는 것으로 밝혀졌다(Robinson and Hennighausen, 1997 Development 124:2701-2708). 여러 조직에서, 액티빈 신호 전달은 관련된 동종이합체, 인히빈(inhibin)에 의해 길항된다. 가령, 뇌하수체(pituitary)로부터 여포-자극 호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH)의 방출 동안, 액티빈은 FSH 분비와 합성을 촉진하는 반면, 인히빈은 FSH 분비와 합성을 예방한다. 액티빈 생물활성(bioactivity)을 조절하고 및/또는 액티빈에 결합하는 다른 단백질에는 폴리스타틴(follistatin, FS), 폴리스타틴-관련된 단백질(follistatin-related protein, FSRP)과 α_2 -마크로글로불린(macroglobulin)이 포함된다.

[0026]

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

[0027]

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

[0028]

본 명세서에서 증명된 바와 같이, 다른 TGF-베타 집단 구성원, 예를 들면, GDF8 또는 GDF11에 대비하여, 액티빈 A에 실질적으로 우선적인 결합을 보이는 가용성 ActRIIa 폴리펩티드(sActRIIa)는 암, 특히, 유방암을 치료 또는 예방하는데 효과적이다. 특정 기전에 한정됨 없이, sActRIIa의 이러한 효과는 이들 연구에서 이용된 특정 sActRIIa 구조체(construct)에 의해 나타나는 매우 강한 액티빈 결합(피코몰(picomolar) 해리 상수(dissociation constant))을 고려할 때, 액티빈 길항제 효과에 의해 주로 유도될 것으로 기대된다. 액티빈-ActRIIa 길항제에는 예로써, 액티빈-결합 가용성 ActRIIa 폴리펩티드; 액티빈(특히, β_A 또는 β_B 로 지칭되는 액티빈 A 또는 B 아단위)에 결합하고 ActRIIa 결합을 교란시키는 항체; ActRIIa에 결합하고 액티빈 결합을 교란시키는 항체; 액티빈 또는 ActRIIb 결합에 대하여 선택된 비-항체 단백질(이들 단백질의 실례와 이들의 설계와 선택 방법은 WO/2002/088171, WO/2006/055689와 WO/2002/032925를 참조한다); 액티빈 또는 ActRIIa 결합을 위하여 선택되고 Fc 도메인에 종종 부착되는 무작위화 펩티드(randomized peptide) 등이 포함된다. 액티빈 또는 ActRIIa 결합 활성을 갖는 2개의 상이한 단백질(또는 다른 모이어티(moiety)), 특히, I형(가령, 가용성 I형 액티빈 수용체)과 II형(가령, 가용성 II형 액티빈 수용체) 결합 부위를 각각 차단하는 액티빈 접합제(binder)는 이중기능성(bifunctional) 결합 분자를 산출하기 위하여 서로 연결될 수 있다. 핵산 압타머, 소형 분자와 액티빈-ActRIIa 신호전달 축을 저해하는 다른 작용제 역시 이용될 수 있다. 인히빈(즉, 인히빈 알파 아단위; 하지만, 인히빈이 모든 조직에서 액티빈을 보편적으로 길항하는 것은 아니다), 폴리스타틴(follistatin)(가령, 폴리스타틴-288과 폴리스타틴-315), FSRP, 액티빈 C, 알파(2)-마크로글로불린, 그리고 M 108 A(108번 위치에서 메티오닌(methionine)에서 알라닌(alanine)으로 변화) 돌연변이체 액티빈 A를 비롯한 다양한 단백질이 액티빈-ActRIIa 길항제 활성을 갖는다. 일반적으로, 액티빈의 대안적 형태, 특히, I형 수용체 결합 도메인에서 변형을 보유하는 형태는 II형 수용체에 결합할 수 있지만 활성 3원 복합체(ternary complex)를 형성할 수 없기 때문에, 길항제로서 기능한다. 부가적으로, 안티센스(antisense) 분자, siRNA, 또는 액티빈 A, B, C 또는 E, 특히, ActRIIa 발현을 저해하는 리보자임(ribozyme)과 같은 핵산이 액티빈-ActRIIa 길항제로서 이용될 수 있다. 이용되는 이러한 액티빈-ActRIIa 길항제는 TGF-베타 과의 다른 구성원, 특히, GDF8과 GDF11에 대비하여, 액티빈-매

개된 신호전달을 저해하는데 선택성을 나타낼 수 있다. 가용성 ActRIIb 단백질은 액티빈에 결합하지만, 이러한 야생형 단백질은 GDF8/11에 대비하여, 액티빈에 대한 결합에서 유의한 선택성을 나타내지 않는다. 그럼에도 불구하고, 이들 ActRIIb 폴리펩티드와 상이한 결합 특성을 갖는 ActRIIb의 변형된 형태(참조: WO 2006/012627, pp. 55-59)는 암 세포에 대한 바람직한 효과를 달성할 수 있다. 고유 또는 변형된 ActRIIb는 두 번째의 액티빈-선택적 결합제와 결합함으로써 액티빈에 대한 추가된 선택성이 제공될 수도 있다.

[0029] 본 명세서에 이용되는 용어는 일반적으로, 본 발명의 배경 내에서 각 용어가 이용되는 특정 상황에서, 당분야의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본 발명의 조성물과 방법, 그리고 이들을 만들고 이용하는 방법을 기술함에 있어 실시자(practitioner)에게 부가적인 보도(guidance)를 제공하기 위하여 하기에 또는 본 명세서의 다른 곳에서 논의된다. 이용되는 용어의 범위 또는 의미는 이러한 용어가 이용되는 특정 상황으로부터 명백할 것이다.

[0030] 일반적으로, "대략"은 측정의 특성 또는 정확도를 고려할 때, 측정된 양에 대한 허용 오차(acceptable degree of error)를 의미한다. 전형적으로, 예시적인 허용 오차는 일정한 수치 또는 수치 범위의 20 퍼센트(%) 이내, 바람직하게는, 10% 이내, 더욱 바람직하게는, 5% 이내로 존재한다.

[0031] 대안으로, 특히, 생물학적 시스템에서, "대략"은 일정한 수치의 1 크기 자릿수(order of magnitude) 이내, 바람직하게는, 5-배 이내, 더욱 바람직하게는, 2-배 이내의 수치를 의미한다. 본 명세서에 제공된 수치량(numerical quantity)은 달리 명시되지 않는 경우에 근사치(approximate)인데, 이는 "대략"이 명시되지 않는 경우에, 유추될 수 있음을 의미한다.

[0032] 본 발명의 방법은 서열을 서로 비교하는 단계, 예를 들면, 야생형 서열을 하나 이상의 돌연변이체(서열 변이체)와 비교하는 단계를 포함한다. 전형적으로, 이런 비교는 예로써, 당분야에 널리 공지된 서열 정렬 프로그램 및/또는 알고리즘(가령, BLAST, FASTA와 MEGALIGN)을 이용한 고분자 서열의 정렬을 포함한다. 당업자는 이런 정렬에서, 돌연변이가 잔기 삽입 또는 결실을 내포하는 경우에, 서열 정렬이 삽입되거나 결실된 잔기를 보유하지 않는 고분자 서열 내에 "갭(gap)"(전형적으로, 대시(dash), 또는 "A"로 표시됨)을 도입할 것임을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

[0033] "상동한(homologous)"은 모든 문법적 형태와 변화된 스펠링에서, 동일한 종의 생물체에서 대과로부터 단백질과 상이한 종의 생물체로부터 상동한 단백질을 비롯한, "공통의 진화적 기원(common evolutionary origin)"을 공유하는 두 단백질 사이의 상관관계를 지칭한다. 이들 단백질(또는 이들의 인코딩 핵산)은 동일성 비율(percent identity)의 관점에서, 또는 특정 잔기 또는 모티프와 보존된 위치의 존재에 의해, 그들의 서열 유사성(sequence similarity)에 의해 반영되는 서열 상동성(sequence homology)을 갖는다.

[0034] "서열 유사성"은 모든 문법적 형태에서, 공통의 진화적 기원을 공유하거나 공유하지 않는 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 동일성 또는 일치성의 정도를 지칭한다.

[0035] 하지만, 통상적인 관례와 본 출원에서, "고도로"와 같은 부사로 수식될 때 "상동한"은 서열 유사성을 지칭하고, 공통의 진화적 기원에 관련되거나 관련되지 않는다.

[0036] "유방암"은 예로써, 양성 병소, 전-악성과 악성 병소, 고형 종양(solid tumor), 그리고 전이성 질환(국소 전이성, 예를 들면, III 단계 및 더욱 폭넓은 전이성, 예를 들면, IV 단계)을 비롯한 유방의 증식성 병소 또는 증식성 비정상성을 지칭한다. 유방암에는 선암종(adenocarcinoma), 소엽성(소형 세포) 암종[lobular(small cell) carcinoma], 선관내 암종(intraductal carcinoma), 수질성 유방암(medullary breast cancer), 점액성 유방암(mucinous breast cancer), 관모양 유방암(tubular breast cancer), 유두 유방암(papillary breast cancer), 파제트병(Paget's disease), 그리고 염증성 유방암이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 유방암은 또한, 유방 내에서 전이성 병소로부터 기원하는 폐, 간과 뼈와 같은 다른 기관에서 질환을 지칭한다. 유방암은 또한, 호르몬-반응성과 호르몬-독립성 암을 둘 모두 포함한다. 일반적으로, 호르몬-독립성 유방암은 에스트로겐(estrogen) 및/또는 프로게스테론(progesterone) 수용체의 부재 또는 감소된 수준으로 특징되는데, 이들 암은 전형적으로, 항-호르몬(특히, 항-에스트로겐) 요법으로 치료에 반응하지 않는다. 유방암은 또한, Her2 발현에 기초하여 분류되는데, Her2⁺ 종양이 Her2⁻ 종양보다 예후가 훨씬 불량하다.

[0037] 2. ActRIIa 폴리펩티드

[0038] 특정 측면에서, 본 발명은 ActRIIa 폴리펩티드를 이용하여 유방암을 치료 또는 예방하는 방법에 관계한다. 본

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

[0039] "ActRIIa 폴리펩티드"에는 ActRIIa 집단 구성원의 임의의 자연 발생 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 및 유용한 활성을 유지하는 이들의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체, 펩티드유사 형태(peptidomimetic form) 포함)가 포함된다(참조: WO/2006/012627). 가령, ActRIIa 폴리펩티드에는 ActRIIa 폴리펩티드 서열에 최소한 80% 동일한, 바람직하게는, 최소한 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 그 이상 동일한 서열을 보유하는, 임의의 공지된 ActRIIa의 서열로부터 유래된 폴리펩티드가 포함된다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 단백질 및/또는 액티빈에 결합하고 이들의 기능을 저해한다. 적절하게는, ActRIIa 폴리펩티드는 생체내에서 암 세포 증식 또는 생존을 저해하는 활성에 대하여 선택될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드의 실례에는 인간 ActRIIa 전구체 폴리펩티드(SEQ ID NO: 1) 및 가용성 인간 ActRIIa 폴리펩티드(가령, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12)가 포함된다.

[0040] 인간 ActRIIa 전구체 단백질 서열은 아래와 같다:

```
MGAAAKLAFVFLISCSSGAILGRSETQECLEFFNANWEKDRTNQTGVEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFFEMEVTTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPL
MLIAGIVICAFVWYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLE
VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
ILQFIGAEKRGTSVDVLDLWLTAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
TMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGL
ALKFEAGKSAGDTHGQVGRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL
VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEEIGQHPSEDMQEVVHKKRPVL
RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
TEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL (SEQ ID NO: 1)
```

[0041]

[0042] 신호 펩티드는 단일선으로 표시된다; 세포의 도메인은 굵게 표시되고, 잠재적인 N-연결된 글리코실화 부위는 이중선으로 표시된다.

[0043] 인간 ActRIIa 가용성(세포외), 가공된 폴리펩티드 서열은 아래와 같다:

```
ILGRSETQECLEFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)
```

[0044]

[0045] "ILG..."로 시작하는 N-말단 서열은 실험적으로 결정되었고, 기존 문헌에서 제안되는 "AIL..." N-말단 서열과 상이하다. 세포의 도메인의 C-말단 "꼬리"는 밑줄로 표시된다. "꼬리" 결실된 서열($\Delta 15$ 서열)은 아래와 같다:

```
ILGRSETQECLEFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EM (SEQ ID NO:3)
```

[0046]

[0047] 인간 ActRIIa 전구체 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다(Genbank entry NM_001616의 뉴클레오티드 164-1705):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGCTTTCTTATCTCCTGTCTTCAGGTGC
TATACCTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
ACAGAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT
TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTG
GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG
AAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCATTACAA
CATCCTGCTCTATTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT
TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGACTTGTTCACCTCAAGAC
CCAGGACCACCCCACTTCTCCATTACTAGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT
GAAAGCAAGGGGAAGATTGGTGTGTCTGGAAGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG
CTGTCAAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTAC
AGTTTGCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGG
CACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTCATGAAAAGGGTTCACAT
CAGACTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAAATGAACTGTGCATATTGCAGAAACC
ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA
ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA
CAGCTTGCATGTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC
GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGATTAGAGGGTGC
TATAAACTTCCAAGGGATGCATTTTGGAGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC
TATGGGAAGTGGCTTCTCGCTGTACTGTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG
CCATTTGAGGAGGAAATGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTGTGTGT
GCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA
TGCTCTGTGAAACCATTTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT
GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAAATATTATTACCACAGA
GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTCTCCCAAAGATCTA
GTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

[0048]

[0049]

인간 ActRIIa 수용성(세포외) 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 아래와 같다:

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA
CAGAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT
GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTG
CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA
AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAG
AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID
NO: 5)

[0050]

[0051]

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

[0052]

ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 활성 단편은 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 상응하는 단편으로부터 재조합 방식으로 생산된 폴리펩티드를 선별함으로써 획득될 수 있다. 이에 더하여, 단편은 당분야에 공지된 기술, 예를 들면, 통상적인 Merrifield 고체상(solid phase) f-Moc 또는 t-Boc 화학을 이용하여 화학적으로 합성될

수 있다. 이들 단편은 생산하고(재조합 방식으로 또는 화학적 합성으로) 검사하여, ActRIIa 단백질, 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항제(저해물질)로서 기능할 수 있는 펩티드 단편을 확인할 수 있다.

[0053] ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 활성 변이체는 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 상응하는 돌연변이된 핵산으로부터 재조합 방식으로 생산된 변형된 폴리펩티드의 라이브러리(library)를 선별함으로써 획득될 수 있다. 이들 변이체는 생산하고 검사하여, ActRIIa 단백질, 또는 액티빈에 의해 매개된 신호전달의 길항제(저해물질)로서 기능할 수 있는 변이체를 확인할 수 있다. 특정 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 사례에서, 기능적 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 3에서 선택되는 아미노산 서열에 최소한 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0054] 기능적 변이체는 치료 효능(therapeutic efficacy), 또는 안정성(가령, 탈체 반감기 및 생체내 단백질 분해 변성에 대한 내성)의 강화와 같은 목적을 위하여 ActRIIa 폴리펩티드의 구조를 변형함으로써 산출된다. 액티빈 결합을 유지하도록 선택되는 이런 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 자연-발생 ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 등가물(functional equivalent)로 간주된다. 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 예로써, 아미노산 치환, 결실, 또는 부가에 의해 산출될 수도 있다. 가령, 루이신(leucine)의 이소루이신(isoleucine) 또는 발린(valine)으로의 고립된 치환, 아스파라긴산염(aspartate)의 글루타민산염(glutamate)으로의 고립된 치환, 트레오닌(threonine)의 세린(serine)으로의 고립된 치환, 또는 구조적으로 관련된 아미노산으로 아미노산의 유사 치환(가령, 보존성 돌연변이(conservative mutations))이 생성 분자의 생물학적 활성에 별다른 영향을 주지 않을 것으로 기대하는 것은 합당하다. 보존성 치환(conservative replacement)은 측쇄(side chain)에서 관련된 아미노산 집단 내에서 발생하는 치환이다. ActRIIa 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화가 기능성 동족체(functional homolog)를 결과하는지의 여부는 야생형 ActRIIa 폴리펩티드에서와 유사한 방식으로 세포내 반응을 산출하는 변이체 ActRIIa 폴리펩티드의 능력을 평가함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0055] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 폴리펩티드의 글리코실화를 변화시키는 특이적인 돌연변이를 보유하는 ActRIIa 폴리펩티드를 이용하여 유방암을 치료 또는 예방하는 방법을 고려한다. 이런 돌연변이는 하나 이상의 글리코실화 부위, 예를 들면, O-연결된 또는 N-연결된 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하기 위하여 선택된다. 아스파라긴-연결된 글리코실화 인식 부위는 일반적으로, 적절한 세포 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트리펩티드(tripeptide) 서열, 아스파라긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린(여기서, "X"는 임의의 아미노산이다)을 포함한다. 이러한 변형은 야생형 ActRIIa 폴리펩티드의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기(O-연결된 글리코실화 부위의 경우)의 추가 또는 이런 잔기에 의한 치환에 의해 달성될 수도 있다. 글리코실화 인식 부위의 첫 번째 또는 세 번째 아미노산 위치의 한쪽 또는 양쪽에서 다양한 아미노산 치환 또는 결실(및/또는 두 번째 위치에서 아미노산 결실)은 변형된 트리펩티드 서열에서 비-글리코실화를 유발한다. ActRIIa 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 총수를 증가시키는 다른 수단은 ActRIIa 폴리펩티드에 글리코시드(glycoside)의 화학적 또는 효소적 결합이다. 이용된 결합 양식(coupling mode)에 따라, 당은 (a) 아르기닌(arginine)과 히스티딘(histidine); (b) 유리 카르복실 기(free carboxyl group); (c) 유리 설프이드릴 기(free sulfhydryl group), 예를 들면, 시스테인; (d) 유리 하이드록실 기(free hydroxyl group), 예를 들면, 세린, 트레오닌, 또는 하이드록시프롤린(hydroxyproline); (e) 방향족 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌(phenylalanine), 티로신(tyrosine), 또는 트립토판(tryptophan); 또는 (f) 글루타민(glutamine)의 아마이드 기(amide group)에 부착될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드 상에 존재하는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 및/또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화(deglycosylation)는 예로써, 화합물 트리플루오르메탄설폰산(trifluoromethanesulfonic acid), 또는 등가의 화합물에 ActRIIa 폴리펩티드의 노출을 수반한다. 이러한 처리는 아미노산 서열을 본래 상태로 유지하면서, 연결 당(linking sugar)(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 전체 당의 절단을 결과한다. ActRIIa 폴리펩티드 상에서 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350에 기술된 바와 같이, 다양한 엔도-와 엑소-글리코시다아제의 이용으로 달성될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드의 서열은 포유동물, 효모, 곤충과 식물 세포 모두 상기 펩티드의 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 수 있는 상이한 글리코실화 패턴을 도입하기 때문에, 이용된 발현 시스템의 타입에 따라, 적절히 조정될 수 있다. 일반적으로, 인간에 이용되는 ActRIIa 단백질은 다른 포유동물 발현 세포주 유용할 것으로 기대되긴 하지만, 적절한 글리코실화를 제공하는 포유동물 세포주, 예를 들면, HEK293 또는 CHO 세포주에서 발현된다.

[0056] 본 발명에서는 돌연변이체, 특히, ActRIIa 폴리펩티드의 조합 돌연변이체(combinatorial mutant) 세트 및 절두 돌연변이체(truncation mutant)를 산출하는 방법을 더욱 고려한다; 조합 돌연변이체의 집합은 기능적 변이체 서

열을 확인하는데 특히 유용하다. 이런 조합 라이브러리(combinatorial library)를 선별하는 목적은 액티빈 또는 다른 리간드에 결합하는 ActRIIa 폴리펩티드 변이체를 산출하는 것이다. 다양한 선별 검사법(screening assay)이 아래에 제공되는데, 이들 검사법은 변이체를 평가하는데 이용될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 변이체는 ActRIIa 리간드에 결합하거나, ActRIIa 폴리펩티드에 ActRIIa 리간드의 결합을 예방하거나, 또는 ActRIIa 리간드에 의해 유발된 신호전달을 간섭하는 능력에 대하여 선별될 수 있다.

[0057]

ActRIIa 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 활성은 세포-기초된 또는 생체내 검사법으로 조사될 수도 있다. 가령, 암 세포의 증식 또는 생존에 대한 ActRIIa 폴리펩티드 변이체의 효과가 평가된다. 암 세포는 생존 개체 내에서 고형 종양을 구성하는 세포, 또는 생존 개체 내에서 다른 부위로 확산된 종양으로부터 기원하는 세포(즉, 전이성 세포)를 지칭한다. 부가적으로, 암 세포는 종양 또는 암 성장으로부터 획득되거나 유래되고, 시험관내에서 배양되는 세포를 지칭한다. 암 세포에는 또한, 시험관내에서 배양되거나, 또는 예로써, 동물 이종이식편 연구에 이용되는 세포주가 포함된다. 암 세포는 또한, 전이 이후에 세포 분열(cell division)을 통하여 전이성 세포로부터 유래된 세포를 지칭한다. 이들 세포는 호르몬-반응성(가령, 에스트로겐 수용체 양성)이거나, 또는 호르몬-독립성(가령, 에스트로겐 수용체 음성)이다. 암 세포 증식 또는 생존은 하나 이상의 재조합 ActRIIa 리간드 단백질(가령, 액티빈)의 존재에서 평가되고, 세포는 ActRIIa 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체, 그리고 선택적으로, ActRIIa 리간드를 산출하기 위하여 형질감염된다. 유사하게, ActRIIa 폴리펩티드는 생쥐 또는 다른 동물에 투여되고, 대조(control)와 비교하여 하나 이상의 척도, 예를 들면, 종양 크기, 또는 세포 증식 또는 아포토시스의 속도가 평가된다.

[0058]

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

[0059]

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

[0060]

잠재적인 동족체(homolog)의 라이브러리가 축중 올리고뉴클레오티드 서열로부터 산출될 수 있는 많은 방법이 존재한다. 축중 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기 내에서 수행될 수 있고, 합성 유전자는 이후, 발현을 위한 적절한 벡터 내로 결합될 수 있다. 축중 올리고뉴클레오티드의 합성은 당분야에 널리 공지되어 있다(참조: Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). 이들 기술은 다른 단백질의 지향된 진화(directed evolution)에 이용되고 있다(참조: Scott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; U.S. Patent No: 5,223,409, 5,198,346, 5,096,815).

[0061]

대안으로, 조합 라이브러리를 산출하기 위하여 다른 형태의 돌연변이유발이 이용될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 변이체는 예로써, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발(alanine scanning mutagenesis) 등(Ruf et al., (1994) Biochemistry 33: 1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085); 링커 스캐닝 돌연변이유발(linker scanning mutagenesis)(Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); 포화 돌연변이유발(saturation mutagenesis)(Meyers et al., (1986) Science 232:613); PCR 돌연변이유발(Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19); 또는 화학적 돌연변이 등

을 비롯한 무작위 돌연변이유발(random mutagenesis)(Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)을 이용한 선별에 의해 라이브러리로부터 산출되고 분리될 수 있다. 특히 조합 세팅(combinatorial setting)에서 링커 스캐닝 돌연변이유발(linker scanning mutagenesis)은 절두된(생물활성) 형태의 ActRIIa 폴리펩티드를 확인하기 위한 매력적인 방법이다.

[0062] 점 돌연변이(point mutation)와 절두(truncation)에 의해 산출된 조합 라이브러리의 유전자 산물을 선별하고, 특히, 특정 특성을 보유하는 유전자 산물에 대한 cDNA 라이브러리를 선별하기 위한 다양한 기술이 당분야에 공지되어 있다. 이런 기술은 일반적으로, ActRIIa 폴리펩티드의 조합 돌연변이유발(combinatorial mutagenesis)에 의해 산출된 유전자 라이브러리의 신속한 선별에 적용된다. 대형 유전자 라이브러리를 선별하는데 가장 널리 이용되는 기술은 전형적으로, 이러한 유전자 라이브러리를 복제가능 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 생성된 벡터 라이브러리로 적절한 세포를 형질전환하는 단계; 원하는 활성의 검출이 산물이 검출된 유전자를 인코딩하는 벡터의 상대적으로 용이한 분리를 가능하게 하는 조건 하에 이들 조합 유전자(combinatorial gene)를 발현하는 단계를 포함한다. 바람직한 검사법에는 액티빈 결합 검사법 및 액티빈-매개된 세포 신호전달 검사법이 포함된다.

[0063] 특정 구체예에서, 본 발명에 개시된 방법에 유용한 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드 내에 자연적으로 존재하는 변형 이외에 번역후 변형을 추가로 포함한다. 이런 변형에는 아세틸화(acetylation), 카르복실화(carboxylation), 글리코실화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 지질화(lipidation), 아실화(acylation) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 결과적으로, 변형된 ActRIIa 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 지질(lipid), 폴리- 또는 모노-사카라이드, 인산염을 포함한다. ActRIIa 폴리펩티드의 기능성에 대한 이런 비-아미노산 요소의 효과는 다른 ActRIIa 폴리펩티드 변이체에 대하여 본 명세서에 기술된 바와 같이 검사될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드가 ActRIIa 폴리펩티드의 초기 형태(nascent form)를 절단함으로써 세포 내에서 생산될 때, 번역후 가공(post-translational processing) 역시 상기 단백질의 정확한 접힘(folding) 및/또는 기능에 중요하다. 상이한 세포(가령, CHO, HeLa, MDCK, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이런 번역후 활성을 위한 특이적인 세포 조직(cellular machinery)과 특징적인 기전을 보유하고, ActRIIa 폴리펩티드의 정확한 변형과 가공을 담보하도록 선택된다.

[0064] 특정 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드의 기능적 변이체 또는 변형된 형태에는 ActRIIa 폴리펩티드의 최소한 일부 분 및 하나 이상의 융합 도메인을 보유하는 융합 단백질이 포함된다. 이런 융합 도메인의 널리 공지된 실례에는 폴리히스티딘(polyhistidine), Glu-Glu, 글루타티온 S 전달효소(glutathione S transferase, GST), 티오레독신(thioredoxin), 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토오스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 융합 도메인은 원하는 특성을 공여하도록 선택될 수 있다. 가령, 일부 융합 도메인은 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 분리에 특히 유용하다. 친화성 정제를 위하여, 친화성 크로마토그래피에 적합한 매트릭스(matrix), 예를 들면, 글루타티온-, 아밀라아제-, 그리고 니켈- 또는 코발트-공동수 수지가 이용된다. 대부분의 이들 매트릭스는 "키트" 형태, 예를 들면, Pharmacia GST 정제 시스템 및 (HIS₆) 융합 파트너와 함께 이용되는 QIAexpress™ 시스템(Qiagen)으로 유용하다. 다른 실례로서, 융합 도메인은 ActRIIa 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 선택된다. 이런 검출 도메인의 실례에는 다양한 형광 단백질(가령, GFP) 및 특이적인 항체가 가용한 일반적으로 짧은 펩티드 서열인 "에피토프 태그(epitope tag)"가 포함된다. 특이적인 단클론 항체가 용이하게 가용한 널리 공지된 에피토프 태그에는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(influenza virus haemagglutinin, HA), c-myc 태그 등이 포함된다. 일부 사례에서, 융합 도메인은 관련된 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 절단하여 이로부터 재조합 단백질을 유리할 수 있도록 하는 프로테아제 절단 부위, 예를 들면, 인자 Xa 또는 트롬빈(thrombin)에 대한 절단 부위를 보유한다. 유리된 단백질은 이후, 차후의 크로마토그래피 분리(chromatographic separation)에 의해 융합 도메인으로부터 분리될 수 있다. 바람직한 특정 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 생체내에서 ActRIIa 폴리펩티드를 안정화시키는 도메인("안정제" 도메인)과 융합된다. "안정화"는 이러한 안정화가 감소된 파괴, 신장에 의한 감소된 제거, 또는 다른 약물동력학적 효과에 기인하는 지에 상관없이, 혈청 반감기를 증가시키는 무언가를 의미한다. 면역글로불린의 Fc 부분과의 융합은 광범위한 단백질에 바람직한 약물동력학적 특성을 공여하는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인간 혈청 알부민에 융합이 바람직한 특성을 공여할 수 있다. 선택될 수 있는 다른 유형의 융합 도메인에는 다합체화(가령, 이합체화, 사합체화) 도메인 및 기능적 도메인(부가적인 생물학적 기능을 공여한다)이 포함된다.

[0065] 특정 실례로서, 본 발명에서는 Fc 도메인에 융합된 ActRIIa의 가용성 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질(가

령, SEQ ID NO: 6)을 이용하여 유방암을 치료 또는 예방하는 방법을 제시한다.

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV(A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVPKEKTKISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN(A) HYTQKSLSLSPGK*

[0066]

[0067]

임의적으로, Fc 도메인은 Asp-265, 리신 322, Asn-434와 같은 잔기에서 하나 이상의 돌연변이를 보유한다. 특정 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나 이상(가령, Asp-265 돌연변이)을 보유하는 변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 Fc γ 수용체에 대한 결합 능력이 감소한다. 다른 사례에서, 이들 돌연변이 중에서 하나 이상(가령, Asn-434 돌연변이)을 보유하는 변이 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 MHC 클래스 I-관련된 Fc-수용체(FcRn)에 대한 결합 능력이 증가한다. 일반적으로, Fc 도메인은 생성되는 "Fc 도메인"이 이황화 연쇄를 통하여 공유 이합화되는 능력을 유지하고 상대적으로 안정한 가용성 단백질을 형성한다면, 면역글로불린의 불변 영역의 더욱 작은 또는 더욱 큰 부분을 포함할 수 있다.

[0068]

이들 융합 단백질의 상이한 요소는 원하는 기능성(functionality)과 일치하는 방식으로 정렬될 수 있다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드가 이중성 도메인에서 C-말단에 위치하거나, 또는 대안으로, 이중성 도메인이 ActRIIa 폴리펩티드에서 C-말단에 위치한다. ActRIIa 폴리펩티드 도메인 및 이중성 도메인은 융합 단백질 내에서 반드시 인접할 필요가 없고, 부가적인 도메인 또는 아미노산 서열이 한쪽 도메인에서 C- 또는 N-말단, 또는 이들 도메인 사이에 포함된다.

[0069]

특정 구체예에서, 본 발명에 개시된 방법에 유용한 ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있는 하나 이상의 변형을 포함한다. 가령, 이런 변형은 ActRIIa 폴리펩티드의 시험관내 반감기를 강화시키거나, ActRIIa 폴리펩티드의 순환 반감기(circulatory half-life)를 강화시키거나, 또는 ActRIIa 폴리펩티드의 단백질 분해 변성을 감소시킨다. 이런 안정화 변형에는 융합 단백질(가령, ActRIIa 폴리펩티드와 안정제 도메인을 포함하는 융합 단백질), 글리코실화 부위의 변형(가령, ActRIIa 폴리펩티드에 글리코실화 부위의 추가), 탄수화물 모이어티(carbohydrate moiety)의 변형(가령, ActRIIa 폴리펩티드로부터 탄수화물 모이어티의 제거) 등이 포함된다. 본 명세서에서, "안정제 도메인"은 융합 단백질의 경우에서처럼 융합 도메인(가령, Fc)을 지칭할 뿐만 아니라, 탄수화물 모이어티와 같은 비-단백질성 변형, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 비-단백질성 모이어티를 포함한다.

[0070]

특정 구체예에서, 본 발명에 개시된 방법에서는 ActRIIa 폴리펩티드의 분리된 및/또는 정제된 형태를 이용하는 데, 이들은 다른 단백질로부터 분리되거나, 또는 다른 단백질이 실질적으로 부재한다. ActRIIa 폴리펩티드는 일반적으로, 재조합 핵산으로부터 발현으로 생산된다.

[0071]

3. ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산

[0072]

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

[0073]

특정 측면에서, ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 본 발명의 핵산에는 SEQ ID NO: 4 또는 5의 변이체 핵산 역시 포함된다. 변이체 뉴클레오티드 서열에는 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 구별되는 서열, 예를 들면, 대립형질 변이체가 포함된다.

[0074]

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

[0075]

다른 구체예에서, 본 발명에 개시된 방법에 유용한 핵산에는 높은 엄밀도 조건(stringent condition) 하에 SEQ

ID NO: 4 또는 5에 열거된 뉴클레오티드 서열에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열, SEQ ID NO: 4 또는 5의 보체 서열, 또는 이들의 단편이 포함된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, DNA 혼성화를 촉진하는 적절한 염밀도 조건은 변화될 수 있다. 가령, 대략 45°C에서 6.0 x 염화나트륨(sodium chloride)/시트르산나트륨(sodium citrate)(SSC)에서 혼성화, 이후 50°C에서 2.0 x SSC의 세척을 수행할 수 있다. 가령, 세척 단계에서 염 농도는 50°C에서 대략 2.0 x SSC의 낮은 염밀도 내지 50°C에서 대략 0.2 x SSC의 높은 염밀도에서 선택될 수 있다. 이에 더하여, 세척 단계에서 온도는 실온(대략 22°C)에서 낮은 염밀도 조건에서 대략 65°C에서 높은 염밀도 조건으로 증가될 수 있다. 온도와 염 모두 변화되거나, 또는 다른 변수가 변하는 반면에 온도 또는 염 농도는 일정하게 유지될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명에 개시된 방법에서는 실온에서 6 x SSC의 낮은 염밀도 조건하에 혼성화되고, 이후 실온에서 2 x SSC에서 세척되는 핵산을 이용한다.

[0076]

유전자 코드에서 축퇴로 인하여 SEQ ID NO: 4 또는 5에 열거된 핵산과 차별되는 분리된 핵산 역시 본 발명에 개시된 방법에 따라서 이용이 고려된다. 가령, 다수의 아미노산이 하나 이상의 삼중항(triplet)에 의해 지정된다. 동일한 아미노산을 명기하는 코돈, 또는 동종이명(synonym)(가령, CAU와 CAC는 히스티딘의 동종이명(synonym)이다)은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 "침묵" 돌연변이를 유도한다. 하지만, 본 발명의 단백질의 아미노산 서열에서 변화를 유발하는 DNA 서열 다형성(polymorphism)이 포유동물 세포 사이에 존재할 것으로 예상된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특정 단백질을 인코딩하는 핵산의 하나 이상의 뉴클레오티드에서 이들 변이(뉴클레오티드의 최대 3-5%)가 자연적인 대립형질 변이로 인하여 특정한 종의 개체 사이에 존재할 수 있다. 이와 같은 뉴클레오티드 변이 및 결과의 아미노산 다형성은 본 발명의 범위 내에 속한다.

[0077]

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

[0078]

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

[0079]

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

- [0080] 일부 포유동물 발현 벡터는 세균 내에서 벡터의 증식을 용이하게 하는 원핵동물 서열 및 진핵동물 세포에서 발현되는 하나 이상의 진핵동물 전사 단위(transcription unit)를 모두 포함한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo와 pHyg 유래된 벡터는 진핵동물 세포의 형질감염(transfection)에 적합한 포유동물 발현 벡터의 실례이다. 이들 벡터 중에서 일부는 원핵동물과 진핵동물 세포 둘 모두에서 복제와 내약성(drug resistance) 선별을 용이하게 하는 세균 플라스미드, 예를 들면, pBR322로부터 서열로 변형된다. 대안으로, 소 파필로마 바이러스(bovine papilloma virus)(BPV-1), 또는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus)(pHEBo, pREP-유래된, p205)와 같은 바이러스의 유도체가 진핵동물 세포에서 단백질의 일시적인 발현에 이용될 수 있다. 다른 바이러스(레트로바이러스 포함) 발현 시스템의 실례는 하기, 유전자 치료 전달 시스템의 설명에서 확인할 수 있다. 플라스미드의 제조 및 숙주 생물체의 형질전환에 이용되는 다양한 방법이 당분야에 널리 공지되어 있다. 원핵동물과 진핵동물 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템 및 전반적인 재조합 절차는 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001을 참조한다. 일부 사례에서, 바쿨로바이러스 발현 시스템의 이용으로 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직하다. 이런 바쿨로바이러스 발현 시스템의 실례에는 pVL-유래된 벡터(가령, pVL1392, pVL1393과 pVL941), pAcUW-유래된 벡터(가령, pAcUW1), pBlueBac-유래된 벡터(가령, β -gal 보유 pBlueBac III) 등이 포함된다.
- [0081] 바람직한 구체예에서, CHO 세포에서 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드의 생산을 위한 벡터, 예를 들면, Pcmv-Script vector(Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4 벡터(Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 및 pCI-neo 벡터(Promega, Madison, Wise)가 설계된다. 확인되는 바와 같이, 본 발명의 유전자 구조체는 예로써, 정제를 위한, 융합 단백질 또는 변이체 단백질을 비롯한 단백질을 생산하기 위하여 배양액 내에서 증식된 세포에서 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드의 발현을 유도하는데 이용될 수 있다.
- [0082] 본 발명은 또한, 하나 이상의 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드에 대한 코딩 서열(가령, SEQ ID NO: 4 또는 5)을 비롯한 재조합 유전자로 형질감염된 숙주 세포에 관계한다. 숙주 세포는 임의의 원핵동물 또는 진핵동물 세포이다. 가령, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 세균 세포(가령, 대장균(*E. coli*)), 곤충 세포(가령, 바쿨로바이러스 발현 시스템 이용), 효모, 또는 포유동물 세포에서 발현된다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다.
- [0083] 본 발명은 또한, 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드를 생산하는 방법에 관계한다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포는 ActRIIa 폴리펩티드의 발현이 진행되도록 하는 적절한 조건 하에 배양될 수 있다. ActRIIa 폴리펩티드는 ActRIIa 폴리펩티드를 포함하는 세포와 배지의 혼합물로부터 분리되고 분리될 수 있다. 대안으로, ActRIIa 폴리펩티드는 세포질에 또는 막 분획(membrane fraction) 내에 유지되고, 세포는 수거되고 용해되며, 상기 단백질이 분리된다. 세포 배양액은 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 함유한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당분야에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 ActRIIa 폴리펩티드는 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과(ultrafiltration), 전기영동(electrophoresis), ActRIIa 폴리펩티드의 특정 에피토프에 특이적인 항체를 이용한 면역친화성(immunoaffinity) 정제 및 ActRIIa 폴리펩티드에 융합된 도메인에 결합하는 작용제(가령, ActRIIa-Fc 융합체를 정제하는데 단백질 A 칼럼이 이용될 수 있다)를 이용한 친화성 정제를 비롯한 단백질을 정제하기 위한 당분야에 공지된 기술을 이용하여, 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 둘 모두로부터 분리될 수 있다. 바람직한 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하는 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 바람직한 구체예에서, 정제는 가령, 임의의 순서로 아래 중에서 3가지 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계로 달성된다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. 본 명세서에서 증명된 바와 같이, ActRIIa-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 결정에서 >98% 및 SDS PAGE에 의한 결정에서 >95%의 순도로 정제되었다. 이러한 수준의 순도는 생쥐, 쥐와 비-인간 영장류에서 바람직한 결과를 달성하는데 충분하였다.
- [0084] 다른 구체예에서, 재조합 ActRIIa 폴리펩티드의 원하는 부분의 N-말단에서 정제 리더 서열, 예를 들면, 폴리-(His)/엔테로키나아제(enterokinase) 절단 부위 서열을 코딩하는 융합 유전자는 Ni²⁺ 금속 수지(metal resin)를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 가능하게 할 수 있다. 정제 리더 서열은 이후, 정제된 ActRIIa 폴리펩티드를 제공하기 위하여 엔테로키나아제 처리에 의해 차후에 제거될 수 있다(참조: Hochuli et al., (1987) J Chromatography 411:177; Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

[0085] 융합 유전자를 만드는 기술은 널리 공지되어 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합은 통상적인 기술에 따라, 결합을 위한 평활-말단(blunt-ended termini) 또는 갈지자-말단(stagger-ended termini), 적절한 말단을 제공하는 제한 효소 절단(restriction enzyme digestion), 점착 말단(cohesive end)의 채움(filling-in), 원치 않는 결합을 차단하는 알칼리성 포스파타아제(alkaline phosphatase) 처리 및 효소 결합(enzymatic ligation)을 이용하여 수행된다. 다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성장치를 비롯한 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 2개의 연속하는 유전자 단편 사이에 상보성 오버행(overhang)을 산출하는 앵커 프라이머(anchor primer)를 이용하여 수행될 수 있는데, 이들 유전자 단편은 차후에 어닐링되어 키메라 유전자 서열을 산출할 수 있다(참조: Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

[0086] 4. 대안적 액티빈과 ActRIIa 길항제

[0087] 본 발명은 액티빈-ActRIIa 신호전달의 길항제를 이용하여 유방암을 치료 또는 예방하는 방법에 관계한다. 가용성 ActRIIa 폴리펩티드, 특히, ActRIIa-Fc가 선호되는 길항제이고, 이런 길항제가 액티빈 길항작용(antagonism) 이외의 기전(가령, 액티빈 저해는 아마도, TGF-beta 대과의 다른 구성원을 비롯한 광범위한 분자의 활성을 저해하는 작용제의 주세의 지표이고, 이런 집단적인 저해는 유방암 세포 성장 또는 생존에 대한 바람직한 효과를 유도한다)을 통하여 유방암 세포 성장 또는 생존에 영향을 줄 수 있긴 하지만, 항-액티빈(가령, 액티빈 β_A , β_B , β_C 와 β_E) 항체, 항-ActRIIa 항체, 안티센스, ActRIIa의 생산을 저해하는 RNAi 또는 리보자임 핵산, 그리고 액티빈 또는 ActRIIa의 다른 저해물질, 특히, 액티빈-ActRIIa 결합을 파괴하는 저해물질을 비롯한, 다른 유형의 액티빈-ActRIIa 길항제 역시 유용할 것으로 기대된다.

[0088] ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 폴리펩티드와 경쟁적으로 리간드에 결합하거나, 또는 ActRIIa-매개된 신호전달을 저해하는 항체는 ActRIIa 폴리펩티드 활성의 길항제로서 이용될 수 있다. 유사하게, 액티빈 β_A , β_B , β_C 또는 β_E 폴리펩티드, 또는 이들의 이종이합체와 특이적으로 반응하고, ActRIIa 결합을 파괴하는 항체가 길항제로서 이용될 수 있다.

[0089] ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드로부터 유래된 면역원(immunogen)을 이용함으로써, 항-단백질/항-펩티드 항혈청(antisera) 또는 단클론 항체가 표준 프로토콜(standard protocol)에 의해 제조될 수 있다(참조: Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). 포유동물, 예를 들면, 생쥐, 햄스터 또는 토끼는 액티빈, ActRIIa 폴리펩티드의 면역원성 형태(immunogenic form), 항체 반응(antibody response)을 유도할 수 있는 항원 단편, 또는 융합 단백질로 면역될 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성(immunogenicity)을 공여하는 기술에는 담체(carrier)에 공동(conjugation) 또는 당분야에 널리 공지된 다른 기술이 포함된다. ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드의 면역원성 부분이 어쥬번트(adjutant)의 존재 하에 투여될 수 있다. 면역화의 진행은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가(antibody titer)의 검출에 의해 모니터링될 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역분석은 상기 면역원을 항원으로 하여 항체 수준을 평가하는데 이용될 수 있다.

[0090] ActRIIa 폴리펩티드의 항원성 조합제로 동물의 면역이후, 항혈청이 수득될 수 있고, 원하는 경우에, 단클론 항체가 혈청으로부터 분리될 수 있다. 단클론 항체를 생산하기 위하여, 항체-생산 세포(립프구)를 면역된 동물로부터 수거하고 표준 체세포 융합 절차에 의해 영속 세포(immortalizing cell), 예를 들면, 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마(hybridoma) 세포를 산출할 수 있다. 이런 기술은 당분야에 널리 공지되어 있는데, 여기에는 예로써, 하이브리도마 기술(Kohler와 Milstein에 의해 최초로 개발됨((1975) Nature, 256: 495-497)), 인간 B 세포 하이브리도마 기술(Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72), 인간 단클론 항체를 생산하는 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and 암 Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96) 등이 포함된다. 하이브리도마 세포는 ActRIIa 폴리펩티드와 특이적으로 반응하는 항체 및 이런 하이브리도마 세포를 포함하는 배양액으로부터 분리된 단클론 항체의 생산을 위하여 면역화학적으로 선별될 수 있다. 항체는 또한, 선택된 항원(가령, 액티빈 또는 ActRIIa)에 결합하는 접합체를 확인하기 위한 항체 가변 도메인 또는 Fab 단편의 라이브러리(가령, 파지 전사 라이브러리)를 선별함으로써 산출될 수도 있다. 이러한 시험관내 접근법은 종종, 포유동물, 특히, 생쥐와 인간 사이에 고도로 보존된 단백질과 함께 이용된다.

[0091] 본 명세서에서, "항체"는 예로써, 임의의 아이소타입(IgG, IgA, IgM, IgE 등)의 완전 항체(whole antibody)를 의미하고, 선택된 항원과 반응하는 면역글로불린의 단편 또는 도메인을 포괄한다. 항체는 통상적인 기술을 이용

하여 단편화될 수 있고, 이들 단편은 유용성 및/또는 목적하는 특정 에피토프와의 상호작용에 대하여 선별될 수 있다. 따라서 상기 용어는 특정 단백질과 선택적으로 반응할 수 있는 항체 분자의 단백질해-절단된 또는 재조합-제조된 일부분의 단편을 포괄한다. 이런 단백질해 및/또는 재조합 단편의 무-제한적 실례에는 Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, 그리고 펩티드 링커에 의해 연결된 V[L] 및/또는 V[H] 도메인을 보유하는 단일 사슬 항체(scFv)가 포함된다. scFv는 공유 또는 비-공유 연결되어 2개 또는 그 이상의 결합 부위를 보유하는 항체를 형성할 수 있다. 항체는 또한, 항체와 재조합 항체의 다클론, 단클론, 또는 다른 정제된 조합체를 포괄한다. "재조합 항체"는 분자 생물학 기술을 이용하여 작제된 핵산으로부터 발현된 항체, 또는 면역글로불린의 항원 결합 도메인, 예를 들면, 인간화 항체(humanized antibody), 또는 단일 사슬 항체로부터 발생된 완전 인간 항체(human antibody)를 의미한다. 단일 도메인과 단일 사슬 항체 역시 "재조합 항체"에 포함된다.

[0092]

특정 구체예에서, 본 발명에 개시된 방법에서는 항체, 예를 들면, 단클론 항체를 이용한다. 본 발명은 또한, 신규한 항체를 산출하는 방법을 제시한다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 산출하는 방법은 검출가능한 면역 반응을 자극하는데 효과적인 항원 폴리펩티드를 함유하는 면역 조성물(immunogenic composition)의 일정량을 생쥐에 투여하는 단계, 생쥐로부터 항체-생산 세포(가령, 비장으로부터 유래된 세포)를 수득하는 단계, 항체-생산 세포를 골수종 세포와 융합하여 항체-생산 하이브리도마를 수득하는 단계, 그리고 항체-생산 하이브리도마를 검사하여 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하는 단계를 포함한다. 일단 수득된 하이브리도마는 임의적으로, 하이브리도마-유래된 세포가 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 생산하는 배양 조건 하에 세포 배양액에서 증식될 수 있다. 단클론 항체는 세포 배양액으로부터 정제될 수 있다.

[0093]

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

[0094]

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

[0095]

액티빈 또는 ActRIIa 길항제인 핵산 화합물 종류의 실례에는 안티센스 핵산, RNAi 구조체와 촉매 핵산 구조체가 포함된다. 핵산 화합물은 단일 또는 이중 가닥이다. 이중 가닥 화합물은 오버행 또는 비-상보성 영역 역시 포함할 수 있는데, 여기서 이들 가닥의 한쪽 또는 다른 쪽은 단일 가닥이다. 단일 가닥 화합물은 자기-상보성(self-complementarity) 영역을 포함할 수 있는데, 이는 상기 화합물이 이중 나선 구조의 영역을 포함하는 소위, "헤어핀(hairpin)" 또는 "스텝-루프(stem-loop)" 구조를 형성한다는 것을 의미한다. 핵산 화합물은 전장 ActRIIa 핵산 서열 또는 액티빈 β_A , β_B , β_C 또는 β_E 핵산 서열의 1000개 이하, 500개 이하, 250개 이하, 100개 이하, 또는 50개, 35개, 25개, 22개, 20개, 18개 또는 15개 이하의 뉴클레오티드로 구성되는 영역에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상보성 영역은 적절하게는, 최소한 8개 뉴클레오티드, 임의적으로, 대략 18개 내지 35개 뉴클레오티드이다. 상보성 영역은 표적 전사체(target transcript)의 인트론(intron), 코딩 서열 또는 비-코딩 서열, 예를 들면, 코딩 서열 부분 내에 존재한다. 일반적으로, 핵산 화합물은 대략 8개 내지 대략 50개 뉴클레오티드 또는 염기쌍 길이를 갖는데, 임의적으로, 상기 길이는 대략 14개 내지 대략 50개 뉴클레오티드이다. 핵산은 DNA(특히, 안티센스로서 이용됨), RNA 또는 RNA:DNA 하이브리드이다. 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함한다. 유사하게, 이중 가닥 화합물은 DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA이고, 임의의 한 가닥은 DNA와 RNA의 혼합물, 그리고 DNA 또는 RNA로 용이하게 분류될 수 없는 변형된 형태를 포함한다. 핵산 화합물은 골격(뉴클레오티드간 연쇄(internucleotide linkage)를

비롯한, 자연 핵산에서 당-인산염 부분) 또는 염기 부분(자연 핵산의 퓨린 또는 피리미딘 부분)에 하나 이상의 변형을 비롯한 임의의 다양한 변형을 포함한다. 안티센스 핵산 화합물은 바람직하게는, 대략 15개 내지 대략 30개의 뉴클레오티드 길이를 갖고, 혈청에서, 세포에서, 또는 화합물이 전달될 가능성이 높은 위치, 예를 들면, 경구 전달된 화합물의 경우에 위와 흡입된 화합물의 경우에 폐에서 안정성과 같은 특성을 향상시키는 하나 이상의 변형을 종종 포함한다. RNAi 구조체의 경우에, 표적 전사체에 상보적인 가닥은 일반적으로, RNA 또는 이의 변형이다. 다른 가닥은 RNA, DNA 또는 임의의 다른 변형일 수 있다. 이중 가닥 또는 단일 가닥 "헤어핀" RNAi 구조체의 이중나선 부분은 일반적으로, 18개 내지 40개 뉴클레오티드 길이, 임의적으로, 대략 21개 내지 23개 뉴클레오티드 길이를 갖는데, 여기서 이는 Dicer 기질(substrate)로서 기능한다. 촉매 또는 효소 핵산은 리보자임 또는 DNA 효소이고, 변형된 형태 역시 포함된다. 핵산 화합물은 생리 조건하에 난센스(nonsense) 또는 센스(sense) 제어가 거의 또는 전혀 영향을 주지 않는 농도에서 세포와 접촉할 때, 대략 50%, 75%, 90% 또는 그 이상으로 표적의 발현을 저해한다. 핵산 화합물의 효과를 검사하는데 선호되는 농도는 1, 5와 10 마이크로몰(micromolar)이다. 또한, 핵산 화합물은 예로써, 유방암 세포 또는 유방 종양의 증식 또는 생존에 대한 효과에 대하여 검사될 수 있다.

5. 선별 검사

특정 측면에서, 본 발명은 액티빈-ActRIIa 신호전달 경로의 항진제 또는 길항제인 화합물(작용제)을 확인하기 위한 ActRIIa 폴리펩티드(가령, 가용성 ActRIIa 폴리펩티드)와 액티빈 폴리펩티드의 용도에 관계한다. 이러한 선별을 통하여 확인된 화합물은 생체내에서 또는 시험관내에서 암 세포, 특히, 유방암 세포의 성장 또는 생존을 조절하는 능력을 평가할 수 있다. 이들 화합물은 예로써, 동물 모형, 예를 들면, 생쥐 이중이식편 모형에서 검사될 수 있다. 한 가지 유용한 동물 모형은 무린 MDA-MB231 유방암 모형이다; MDA-MB231 세포는 호르몬-독립적이고, 빠르게 전이되기 쉽다. 유방암의 다른 동물 모형은 예로써, Drebin et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9129-9133 (1986)에서 기술된 바와 같이, 쥐 신경모세포종(neuroblastoma) 세포(이로부터 neu 종양유전자(oncogene)가 최초로 분리되었다), 또는 neu-형질전환된 N1H-3T3 세포를 누드 생쥐 내로 이식함으로써 산출될 수 있다.

액티빈과 ActRIIa 신호전달을 표적함으로써 유방암을 치료 또는 예방하는 치료제의 선별을 위한 다수의 접근법이 존재한다. 특정 구체예에서, 화합물의 고속 선별(high-throughput screening)은 선택된 세포주에 대한 액티빈 또는 ActRII-매개된 효과를 교란시키는 작용제를 확인하기 위하여 수행될 수 있다. 특정 구체예에서, 이러한 검사는 액티빈에 대한 ActRIIa 폴리펩티드의 결합을 특이적으로 저해하거나 감소시키는 화합물을 선별하고 확인하기 위하여 수행된다. 대안으로, 상기 검사는 액티빈에 대한 ActRIIa 폴리펩티드의 결합을 강화시키는 화합물을 확인하는데 이용될 수 있다. 다른 구체예에서, 화합물은 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드와 상호작용하는 능력으로 확인될 수 있다.

다양한 검사 양식(assay format)이 만족스럽지만, 그럼에도 불구하고, 본 발명의 개시에 비추어, 본 명세서에서 명시되지 않은 것들 역시 당업자에 의해 이해될 것이다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 본 발명의 검사 화합물(작용제)은 임의의 조합 화학 방법(combinatorial chemical method)으로 산출될 수 있다. 대안으로, 본 발명의 화합물은 생체내에서 또는 시험관내에서 합성된 자연 발생 생물분자이다. 조직 성장의 조절인자(modulator)로서 기능하는 능력에 대하여 검사되는 화합물(작용제)은 예로써, 세균, 효모, 식물 또는 다른 생물체에 의해 생산되거나(가령, 자연 산물), 화학적으로 생산되거나(가령, 펩티드모방체(peptidomimetic)를 비롯한 소형 분자), 또는 재조합 방식으로 생산될 수 있다. 본 발명에서 고려되는 검사 화합물에는 비-펩티딜 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드모방체, 당, 호르몬, 핵산 분자 등이 포함된다. 특정 구체예에서, 검사 작용제는 대략 2,000 달톤(dalton) 이하의 분자량(molecular weight)을 갖는 소형 유기 분자이다.

본 발명의 검사 화합물은 단일의 구별된 존재로서 제공되거나, 또는 예로써, 조합 화학(combinatorial chemistry)으로 만들어진 더욱 복잡한 라이브러리에 담겨 제공될 수 있다. 이들 라이브러리는 예로써, 알코올, 알킬 할라이드, 아민, 아마이드, 에스테르, 알데히드, 에테르 및 다른 종류의 유기 화합물을 포함할 수 있다. 검사 시스템에 검사 화합물의 제공은 특히, 최초 선별 단계에서 분리된 형태로 또는 화합물의 혼합물로서 달성될 수 있다. 임의적으로, 화합물은 다른 화합물로 임의적으로 유도체화되고, 화합물의 분리를 용이하게 하는 유도체화 기(derivatizing group)를 보유한다. 유도체화 기의 무제한적 실례에는 비오틴(biotin), 플루오레세인(fluorescein), 디곡시제닌(digoxigenin), 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein), 동위원소(isotope), 폴리히스티딘(polyhistidine), 자성 비드(magnetic beads), 글루타티온 S 전달효소(glutathione S

transferase, GST), 광활성화가능 가교제(photoactivatable crosslinker) 또는 이들의 조합이 포함된다.

- [0101] 화합물과 천연 추출물의 라이브러리를 검사하는 많은 약물 선별 프로그램에서, 정해진 기간 내에 조사되는 화합물의 수를 극대화시키기 위하여 고속 분석법이 바람직하다. 정제된 또는 반-정제된 단백질로 유도된 것과 같은 세포-없는 시스템에서 수행되는 분석법은 종종, "일차" 스크린으로서 선호되는데, 그 이유는 이들이 검사 화합물에 의해 매개되는 분자 표적(molecular target) 내에서 변형의 신속한 발생과 상대적으로 용이한 검출을 가능하도록 산출될 수 있기 때문이다. 게다가, 검사 화합물의 세포 독성 또는 생체이용효율(bioavailability)의 효과는 시험관내 시스템에서 일반적으로 무시될 수 있는데, 이러한 분석법은 그 대신에, ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 결합 친화성의 변형으로 확인되는, 분자 표적에 대한 약제의 효과에 일차적으로 집중한다.
- [0102] 예로써, 전형적인 선별 검사에서, 목적 화합물은 액티빈에 통상적으로 결합할 수 있는 분리되고 정제된 ActRIIa 폴리펩티드와 접촉한다. 이후, 상기 화합물과 ActRIIa 폴리펩티드의 혼합물에 ActRIIa 리간드를 함유하는 조성물이 첨가된다. ActRIIa/액티빈 복합체의 검출과 정량은 ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 복합체 형성을 저해하는(또는 강화하는) 화합물의 효능을 결정하는 수단을 제공한다. 화합물의 효능은 다양한 농도의 검사 화합물을 이용하여 획득된 데이터로부터 용량 반응 곡선(dose response curve)을 산출함으로써 평가할 수 있다. 게다가, 비교를 위한 기준선(baseline)을 제공하기 위하여 대조 분석(control assay)을 또한 수행될 수 있다. 가령, 대조 분석에서, 분리되고 정제된 액티빈이 ActRIIa 폴리펩티드를 함유하는 조성물에 첨가되고, ActRIIa/액티빈 복합체의 형성이 검사 화합물의 부재 하에 정량된다. 일반적으로, 반응물이 혼합되는 순서는 변경될 수 있고, 동시에 혼합될 수 있다. 게다가, 적절한 세포-없는 분석 시스템을 제공하기 위하여 정제된 단백질 대신에, 세포 추출물과 용해물(lysate)이 이용될 수도 있다.
- [0103] ActRIIa 폴리펩티드와 액티빈 사이에 복합체 형성은 다양한 기술로 검출될 수 있다. 가령, 복합체 형성의 조절은 예로써, 검출가능하게 표지된 단백질, 예를 들면, 방사성표지된(가령, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C 또는 ³H), 형광 표지된(가령, FITC), 또는 효소 표지된 ActRIIa 폴리펩티드 또는 액티빈을 이용하여, 면역분석(immunoassay)에 의해, 또는 크로마토그래피 검출(chromatographic detection)에 의해 정량될 수 있다.
- [0104] 특정 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이에 상호작용 정도를 직접적으로 또는 간접적으로 측정하기 위하여 형광 편광(fluorescence polarization) 분석 및 형광 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 분석이 이용될 수 있다. 다른 적절한 검출 양식에는 예로써, 광도파(optical waveguide)(PCT Publication WO 96/26432; U.S. Pat. No. 5,677,196), 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR), 표면 전하 센서(surface charge sensor), 그리고 표면 포스 센서(surface force sensor)가 포함된다.
- [0105] 또한, ActRIIa 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 상호작용을 파괴하거나 강화시키는 작용제를 확인하기 위하여, "이중 하이브리드 분석(two hybrid assay)"으로 알려져 있는 상호작용 트랩 분석(interaction trap assay)이 이용될 수도 있다(참조: U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). 특정 구체예에서, ActRIIa 폴리펩티드와 이의 결합 단백질 사이의 상호작용을 분리시키는 화합물(가령, 소형 분자 또는 펩티드)을 확인하는 역 이중 하이브리드 시스템(reverse two hybrid system)이 이용된다(참조: Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; U.S. Pat. No. 5,525,490; 5,955,280; 5,965,368).
- [0106] 특정 구체예에서, 본 발명의 화합물은 본 발명의 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드와 상호작용하는 능력으로 확인된다. 상기 화합물과 ActRIIa 또는 액티빈 폴리펩티드 사이에 상호작용은 공유 또는 비-공유이다. 가령, 이런 상호작용은 광-가교연결(photo-crosslinking), 방사성표지된 리간드 결합, 그리고 친화성 크로마토그래피를 비롯한 시험관내 생화학적 방법을 이용하여 단백질 수준에서 확인될 수 있다(Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). 특정 사례에서, 이들 화합물은 기전 기초된 분석(mechanism based assay), 예를 들면, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 검출하는 분석에서 선별된다. 이는 고체상(solid phase) 또는 액체상(fluid phase) 결합 현상을 포함할 수 있다. 대안으로, 액티빈 또는 ActRIIa 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자는 리포터 시스템(가령, β-갈락토시다아제, 루시페라제, 또는 녹색 형광 단백질)으로 세포 내로 형질감염되고, 임의적으로 고속 선별에 의해 라이브러리에 대하여 또는 상기 라이브러리의 개별 구성원으로 선별된다. 다른 기전 기초된 결합 분석, 예를 들면, 자유 에너지(free energy)에서 변화를 검출하는 결합 분석이 이용될 수도 있다. 결합 분석은 웰, 비드 또는 칩에 고정되거나, 고정된 항체에 의해 포획되거나, 또는 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)에 의해 분해된 표적으로 수행될 수 있다. 결합된 화합물은 통상적으로, 비색

(colorimetric) 또는 형광 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 검출된다.

[0107]

6. 전형적인 치료 용도

[0108]

특정 구체예에서, 본 발명에서는 액티빈-ActRIIa 길항제, 예를 들면, ActRIIa 폴리펩티드의 치료 효과량을 개체에 투여함으로써 병든 개체에서 유방암을 치료 또는 예방하는 방법을 제시한다. 이들 방법은 유방암의 발병 위험이 높은 인간, 특히, 여성의 치료적 처리와 예방적 처리에 이용된다. 모든 여성이 유방암의 발병 위험에 노출되어 있기 하지만, 유방암의 발병 위험이 높은 여성은 전체 개체군 또는 특정 연령대의 여성 개체군과 비교하여 유방암의 더욱 높은 발병 가능성을 나타낸다. 전형적인 위험 인자(risk factor)에는 연령(age), 가족력(family history)이나 유전자 구성(genetic makeup), 생활 습관(lifestyle habit), 예를 들면, 운동과 식이, 방사선이나 기타 암-유발 작인에 노출, 첫 번째 아이가 태어난 시점에서 연령, 유전자 변화, 그리고 폐경(menopause)후 체중 증가가 포함된다.

[0109]

본 명세서에서, 질환이나 이상을 "예방"하는 치료제는 통계학적 표본(statistical sample)에서, 처리되지 않은 대조 표본과 비교하여 처리된 표본에서 질환이나 이상의 발생률(occurrence)을 감소시키거나, 또는 처리되지 않은 대조 표본과 비교하여 이러한 질환이나 이상의 한 가지 이상의 증상이나 특징의 발생을 지연시키는 화합물을 지칭한다. 가령, 유방암 예방은 치료 이후에 새로운 병소의 부재, 또는 전이성 질환의 부재 또는 지연을 지칭한다.

[0110]

"유방암 치료"는 처리되지 않은 대조와 비교하여 또는 치료 이전에 유방암의 심각도(severity)와 비교하여 유방암의 한 가지 이상의 증상 또는 특징의 향상을 지칭한다. 상기 용어는 치료를 받는 환자가 회복되거나, 또는 유방암이 환자로부터 완전히 제거되어야 한다는 것을 반드시 의미하지는 않는다. 유방암을 치료하는 작용제는 유방암의 한 가지 이상의 증상 또는 특징의 심각도를 감소시키는 작용제일 수도 있다. 종양 성장과 진행은 세포 주기 진행(cell cycle progression)과 세포분열(cell division)의 매개인자(mediator)와 세포 사멸(cell death) 또는 아포토시스(apoptosis)의 조절인자(regulator)를 비롯한 다양한 인자에 의해 영향을 받는다. 따라서 유방암 치료는 암 세포 증식에서 감소, 또는 세포 분열의 속도에서 감소를 수반한다. 대안으로 또는 부가적으로, 유방암 치료는 암 세포 생존에서 감소, 아포토시스 증가, 또는 전이성 유방암, 특히, 뼈의 전이성 유방암의 감소된 발생률 또는 심각도를 수반한다. 따라서, 특정 구체예에서, 유방암 치료는 세포 분열에서 감소와 세포 사멸에서 증가를 둘 모두 수반한다. 기전에 상관없이, 유방암 치료에서 작용제의 효능은 관찰가능 측정규준(observable metric), 예를 들면, 대조와 비교하여 더욱 적은 수의 암 세포(감소된 증식, 증가된 아포토시스, 또는 둘 모두에 기인함), 또는 대조와 비교하여 종양 크기에서 감소에 의해 결정된다. 이런 이유로, 유방암 치료, 또는 종양 또는 암 세포 성장 저해는 이런 변화가 발생하는 기전에 대하여 중립적인 것으로 의도된다. 예방과 치료 둘 모두 의사 또는 다른 건강 관리 제공자에 의해 제공되는 진단과 치료제 투여의 의도된 결과의 분석에서 판별될 수 있다.

[0111]

인간에서 유방암 진행에 대한 본 발명의 길항제의 효과를 관찰할 때, 효과는 측정가능 질환의 감소 또는 소멸 및/또는 새로운 병소의 부재 또는 전이의 예방에 의해 평가될 수 있다. 가령, 액티빈-ActRIIa 길항제는 비-침습성 유방암 환자와 침습성 유방암 환자 둘 모두에서 유방암 진행을 현저하게 감소시키거나 지연시킨다. 이에 더하여, 이들 길항제는 유방암의 위험 인자를 갖는 건강한 여성에서 유방암 발병 위험을 예방하거나 감소시킨다. 이들 길항제는 또한, 유방암 전력이 있는 환자에서 유방암 재발 위험을 감소시킨다.

[0112]

따라서 액티빈-ActRIIa 길항제는 유방암 발병의 위험이 있는 것으로 간주되는 개체에서 유방암의 발병을 예방하거나 지연시키는데 이용되고, 이들 길항제는 선택된 환자 개체군에 이용된다. 적합한 환자 개체군의 실례에는 유방암과 난소암의 가족력이 있는 환자, 예를 들면, 모친 또는 자매가 유방암으로 진단된 적이 있는 여성 환자가 포함된다. BRCA 1/2 유전자, 또는 여성을 유방암과 난소암에 걸리기 쉽도록 만드는 것으로 밝혀진 다른 유전자에서 돌연변이를 갖는 환자 역시 포함된다. 한 구체예에서, 유방암 발병 위험이 높은 것으로 간주되지만 유방암으로 진단되지 않은 환자가 액티빈-ActRIIa 길항제로 치료된다. 이런 치료는 환자의 연령이 30세, 35세, 또는 40세 도달할 때, 또는 여성 환자가 임신을 시도하지 않거나(즉, 환자가 아기를 양육할 계획이 없거나) 폐경기에 도달할 때 시작된다. 특히, 본 명세서에 제공된 데이터는 액티빈-ActRIIa 길항제가 전체 순환계(general circulation) 내로 도입된 유방암 세포주의 전이성 확산을 저해함을 증명하고, 또한 이들 길항제가 유방 종양의 전이를 예방하는데 유용함을 증명한다. 이들 화합물은 유방암으로 진단되었거나, 또는 유방암에 걸린 것으로 의심되는 환자를 치료하는데 유용할 것이다. 부가적으로, 유방 종양의 증가된 발병 위험으로 인하여 예방적 또는 선택적 유방 절제(mastectomy)를 고려하고 있는 환자는 그 대신에 또는 추가적으로, 검출되지 않은 종양의 전이

성 확산 위험을 감소시키기 위하여 액티빈-ActRIIa 길항제 복용을 선택할 수 있다.

[0113] 본 발명에서 개시된 액티빈-ActRIIa 길항제, 특히, ActRIIa-Fc 단백질은 고형 종양 환자와 전이성 암 환자를 비롯한 환자에서 유방암을 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 액티빈-ActRIIa 길항제는 또한, 유방의 전암성 또는 양성 병소, 또는 정형 증식증(typical hyperplasia), 비정형 증식증(atypical hyperplasia), 그리고 비침습성 또는 in situ 암중(carcinoma)을 비롯한 비정상적인 증식성 병소를 갖는 인간 개체에 투여될 수 있다. 본 발명의 길항제는 또한, 호르몬-의존성 또는 호르몬-반응성 암(가령, 에스트로겐 수용체 양성 암)과 호르몬-독립성 암(가령, 에스트로겐 수용체 음성 또는 에스트로겐 수용체 변이 암) 둘 모두의 치료 또는 예방에 유용하다. 액티빈-ActRIIa 길항제는 또한, 성장 인자 또는 종양유전자가 활성화되는 암(가령, *c-erbB-2*(일명, *HER-2/Neu*) 티로신 키나아제(tyrosine kinase)가 발현되는 유방암)에 대한 치료제로서 유용하다. 액티빈-ActRIIa 길항제는 상승된(정상적인 유방 조직-유래된 세포와 비교하여) 수준의 액티빈(가령, A, AB 또는 B) 또는 상승된 수준의 ActRIIa 또는 ActRIIb를 발현하는 종양에서 특히 유용한 것으로 증명된다.

[0114] 본 발명에서는 전통적인 암 요법(가령, 화학요법, 방사선요법, 광선요법(phototherapy), 면역요법(immunotherapy), 그리고 수술)의 효능이 본 발명의 길항제의 이용으로 강화될 수 있음을 인식한다. 따라서 액티빈-ActRIIa 길항제는 유방암의 치료, 예방, 또는 관리를 위한 복합 요법에 이용된다. 이들 길항제는 방사선 및/또는 외과적 치료와 공동하여, 그리고 세포독성 화학요법 및/또는 호르몬 요법과 공동하여 환자에 투여될 수 있다. 이들 복합 치료는 상승적으로 작용하고, 각 개별 치료의 용량 감소를 가능하게 하여 더욱 높은 용량에서 각 치료에서 발생하는 유해한 부작용을 감소시킨다. 다른 사례에서, 치료에 불응하는 악성이 2가지 이상의 상이한 치료의 복합 요법에 반응할 수 있다. 따라서 본 발명은 항-신생물제(anti-neoplastic agent)의 치료 효과를 강화시키기 위하여, 또는 이런 항-신생물제에 대한 세포 내성(cellular resistance)을 극복하기 위하여, 동시에 또는 순차적으로, 다른 전통적인 항-신생물제와 공동하여 액티빈-ActRIIa 길항제의 투여에 관계한다.

[0115] 복합 항-종양 요법에 이용될 수 있는 제약학적 화합물에는 예로써, 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 암사크린(amsacrine), 아나스트로졸(anastrozole), 아스파라기나아제(asparaginase), 베그(beg), 비칼루타마이드(bicalutamide), 블레오마이신(bleomycin), 부세렐린(buserelin), 부설판(busulfan), 캄포테신(camptothecin), 카페시타빈(capecitabine), 카르보플라틴(carboplatin), 카르무스틴(carmustine), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 클라드리빈(cladribine), 클로드르네이트(clodronate), 콜히친(colchicine), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 시프로테론(cyproterone), 시타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 디에네스트롤(dienestrol), 디에틸stil베스트롤(diethylstilbestrol), 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 에스트라디올(estradiol), 에스트라무스틴(estramustine), 에토포시드(etoposide), 엑세메스탄(exemestane), 필그라스티움(filgrastim), 플루다라빈(fludarabine), 플루드로코르티손(fludrocortisone), 플루오로우라실(fluorouracil), 플루옥시메스테론(flouxymesterone), 플루타마이드(flutamide), 겐시타빈(gemcitabine), 제니스테인(genistein), 고세렐린(goserelin), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이다루비신(idarubicin), 이포스파마이드(ifosfamide), 이마티닙(imatinib), 인터페론(interferon), 이리노테칸(irinotecan), 이로노테칸(ironotecan), 레트로졸(letrozole), 루코보린(leucovorin), 레우프로리드(leuprolide), 레바미솔(levamisole), 로무스틴(lomustine), 메클로레타민(mechlorethamine), 메드록시프로게스테론(medroxyprogesterone), 메게스트롤(megestrol), 멜팔란(melphalan), 메르캅토푸린(mercaptapurine), 메스나(mesna), 메토티렉세이트(methotrexate), 미토마이신(mitomycin), 미토탄(mitotane), 미톡산트론(mitoxantrone), 닐루타마이드(nilutamide), 노코다졸(nocodazole), 옥트레오티드(octreotide), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel), 파미드로네이트(pamidronate), 펜토스타틴(pentostatin), 플리카마이신(plicamycin), 포르피메르(porfimer), 프로카르바진(procarbazine), 랄티트렉세드(raltitrexed), 리투시맵(rituximab), 스트렙토조신(streptozocin), 수라민(suramin), 타목시펜(tamoxifen), 테모졸로미드(temozolomide), 테니포시드(teniposide), 테스토스테론(testosterone), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 티타노센 디클로라이드(titanocene dichloride), 토포테칸(topotecan), 트라스투주맵(trastuzumab), 트레티노인(tretinoin), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 그리고 비노렐빈(vinorelbine)이 포함된다.

[0116] 이들 화학치료 항-종양 화합물은 그들의 작용 기전에 의해 아래의 군으로 분류될 수 있다: 항-대사물질(anti-metabolite)/항암(anti-cancer) 작용제, 예를 들면, 피리미딘 유사체(pyrimidine analog)(5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 플록수리딘(floxuridine), 카페시타빈(capecitabine), 겐시타빈(gemcitabine)과 시타라빈(cytarabine))와 퓨린 유사체(purine analog), 엽산염 길항제(folate antagonist)와 관련 저해물질(메르캅토푸

린(mercaptapurine), 티오구아닌(thioguanine), 펜토스타틴(pentostatin)과 2-클로로데옥시아데노신(2-chlorodeoxyadenosine)(cladribine)); 자연 산물, 예를 들면, 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid)(빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine)과 비노렐빈(vinorelbine)), 미세소관 교란물질(microtubule disruptor), 예를 들면, 탁산(taxane)(파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel)), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 노코다졸(nocodazole), 에포틸론(epothilone)과 나벨빈(navelbine), 에피도포도필로톡신(epididodophyllotoxin)(에토포시드(etoposide), 테니포시드(teniposide)), DNA 파괴제(악티노마이신(actinomycin), 암사크린(amsacrine), 안트라사이클린(anthracycline), 블레오마이신(bleomycin), 부설판(busulfan), 캄토테신(camptothecin), 카르보플라틴(carboplatin), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 시톡산(Cytoxan), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 헥사메틸멜라민옥살리플라틴(hexamethylmelamineoxaliplatin), 이포스파마이드(iphosphamide), 멜팔란(melphalan), 메르클로레타민(merchlorehtamine), 미토마이신(mitomycin), 미톡산트론(mitoxantrone), 니트로소우레아(nitrosourea), 플리카마이신(plicamycin), 프로카르바진(procarbazine), 탁솔(taxol), 탁소테레(taxotere), 테니포시드(teniposide), 트리에틸렌티오포스포르아마이드(triethylenethiophosphoramid)와 에토포시드(etoposide)(VP 16))를 비롯한 항-증식성(anti-proliferative)/항유사분열성(antimitotic) 작용제; 항생제, 예를 들면, 닥티노마이신(dactinomycin)(actinomycin D), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin)(adriamycin), 이다루비신(idarubicin), 안트라사이클린(anthracycline), 미톡산트론(mitoxantrone), 블레오마이신(bleomycin), 플리카마이신(plicamycin)(mithramycin)과 미토마이신(mitomycin); 효소(L-아스파라긴을 전신적으로 물질 대사하고 아스파라긴을 자체적으로 합성하는 능력이 없는 세포를 소멸시키는 L-아스파라기나아제); 항혈소판제(antiplatelet agent); 항증식성/항유사분열성 알킬화제(alkylating agent), 예를 들면, 질소 겨자(nitrogen mustard)(메클로레타민(mechlorethamine), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide)와 유사체, 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil)), 에틸렌이민(ethylenimine)과 메틸멜라민(methylmelamine)(헥사메틸멜라민(hexamethylmelamine)과 티오테파(thiotepa)), 알킬 설포네이트-부설판(alkyl sulfonates-busulfan), 니트로소우레아(nitrosoureas)(carmustine(BCNU)와 유사체, 스트렙토조신(streptozocin)), 트라젠(trazene) - 다카르바진(dacarbazine)(DTIC); 항증식성/항유사분열성 항대사물질, 예를 들면, 엽산(folic acid) 유사체(methotrexate); 백금 배위 착화물(platinum coordination complexe)(시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin)), 프로카르바진(procarbazine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 미토탄(mitotane), 아미노글루테티미드(aminoglutethimide); 호르몬, 호르몬 유사체(에스트로겐(estrogen), 타목시펜(tamoxifen), 고세렐린(goserelin), 비칼루타마이드(bicalutamide), 닐루타마이드(nilutamide))와 아로마타아제 저해물질(aromatase inhibitor)(레트로졸(letrozole), 아나스트로졸(anastrozole)); 항응고제(anticoagulant)(헤파린(heparin), 합성 헤파린 염과 트롬빈(thrombin)의 다른 저해물질); 섬유소 용해제(fibrinolytic agent)(가령, 조직 플라스미노젠 활성화인자(tissue plasminogen activator), 스트렙토키나아제(streptokinase)와 우로키나아제(urokinase)), 아스피린(aspirin), 디피리다몰(dipyridamole), 티클로피딘(ticlopidine), 클로피도그렐(clopidogrel), 압식시맙(abciximab); 이동억제제(antimigratory agent); 분비억제제(antisecretory agent)(브레벨딘(breveldin)); 면역억제제(사이클로스포린(cyclosporine), 타크롤리무스(tacrolimus)(FK-506), 시롤리무스(sirolimus)(라파마이신(rapamycin)), 아자티오프린(azathioprine), 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil)); 항-혈관신생 화합물(anti-angiogenic compound)(TNP-470, 제니스테인(genistein))과 성장 인자 저해물질(growth factor inhibitor)(혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 저해물질, 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor, FGF) 저해물질); 안지오텐신 수용체 차단제(angiotensin receptor blocker); 산화질소 공여체(nitric oxide donor); 안티-센스 올리고뉴클레오티드(anti-sense oligonucleotide); 항체(트라스투주맙(trastuzumab)); 세포 주기 저해물질(cell cycle inhibitor)과 분화 유도 인자(differentiation inducer)(트레티노인(tretinoin)); mTOR 저해물질, 국소이성화효소(topoisomerase) 저해물질(독소루비신(doxorubicin)(adriamycin), 암사크린(amsacrine), 캄토테신(camptothecin), 다우노루비신(daunorubicin), 닥티노마이신(dactinomycin), 에니포시드(eniposide), 에피루비신(epirubicin), 에토포시드(etoposide), 이다루비신(idarubicin)과 미톡산트론(mitoxantrone), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 코르티코스테로이드(corticosteroid)(코르티손(cortisone), 덱사메타손(dexamethasone), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 메틸페드니솔론(methylprednisolone), 프레드니손(prednisone)과 프레니솔론(prednisolone)); 성장 인자 신호 전달 키나아제(growth factor signal transduction kinase) 저해물질; 미토콘드리아 기능장애 유도인자(mitochondrial dysfunction inducer)와 카스파제 활성화인자(caspase activator); 그리고 크로마틴(chromatin) 교란물질.

- [0117] 특정 구체예에서, 복합 요법에 이용될 수 있는 제약학적 화합물에는 신생혈관형성 억제제(anti-angiogenesis agent), 예를 들면, (1) bFGF(basic fibroblast growth factor)와 같은 "혈관신생 분자"의 방출 저해물질; (2) 항- β bFGF 항체와 같은 혈관신생 분자의 중화물질(neutralizer); (3) 콜라게나아제 저해물질(collagenase inhibitor), 기저막 반전(basement membrane turnover) 저해물질, 혈관억제 스테로이드(angiostatic steroid), 혈관신생 저해물질, 혈소판 인자(platelet factor) 4, 트롬보스폰딘(thrombospondin), 관절염 약물(arthritis drug)(가령, D-페니실라민(penicillamine)과 골드 티오말레이트(gold thiomalate)), 비타민 D3 유사체, 알파-인터페론(alpha-interferon) 등을 비롯한, 혈관신생 자극(angiogenic stimuli)에 대한 내피 세포 반응의 저해 물질이 포함된다. 혈관신생의 다른 제안된 저해물질에 관하여, Blood et al., Bioch. Biophys. Acta., 1032:89-1 18 (1990), Moses et al., Science, 248: 1408-1410 (1990), Ingber et al., Lab. Invest., 59:44-51 (1988), 그리고 U.S. Pat. No. 5,092,885, 5,112,946, 5,192,744, 5,202,352와 6573256을 참조한다. 이에 더하여, 혈관신생을 저해하는데 이용될 수 있는 다양한 화합물, 예를 들면, VEGF-매개된 혈관신생 경로를 차단하는 펩티드 또는 작용제, 엔도스타틴(endostatin) 단백질 또는 유도체, 안지오스타틴(angiostatin)의 리신 결합 단편, 멜라닌(melanin) 또는 멜라닌-축진 화합물, 플라스미노겐 단편(가령, 플라스미노겐의 Kringles 1-3), 트로포인 아단위(tropoin subunit), 비트로넥틴(vitronectin) $\alpha\beta$ 3의 길항제, 사포신(Saposin) B로부터 유래된 펩티드, 항생제 또는 유사체(가령, 테트라사이클린(tetracycline), 또는 네오마이신(neomycin)), 디에노제스트(dienogest)-포함 조성물, 펩티드에 결합된 MetAP-2 저해 코어(inhibitory core)를 포함하는 화합물, 화합물 EM-138, 찰콘(chalcone)과 유사체, 그리고 naaladase 저해물질이 존재한다(참조: U.S. Pat. No. 6,395,718, 6,462,075, 6,465,431, 6,475,784, 6,482,802, 6,482,810, 6,500,431, 6,500,924, 6,518,298, 6,521,439, 6,525,019, 6,538,103, 6,544,758, 6,544,947, 6,548,477, 6,559,126, 6,569,845).
- [0118] 본 발명은 또한, 환자에 골 항-재흡수 요법(bone anti-resorptive therapy)과 공동하여 액티빈-ActRIIa 길항제의 동시적 또는 순차적 투여에 관계하는데, 여기서 환자는 골 항-재흡수 요법(bone anti-resorptive therapy)을 받고 있거나, 또는 ActRIIa-Fc 융합 단백질의 투여에 앞서 1년 이내에 골 항-재흡수 요법을 받은 적이 있다. 골 항-재흡수 요법에 이용될 수 있는 제약학적 화합물에는 예로써, 비스포스포네이트 작용제(bisphosphonate agent), RANK 리간드 길항제, 오스테오프로테그린(osteoprotegerin) 길항제 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- [0119] 복합 요법의 특성에 따라, 본 발명의 치료 길항제의 투여는 다른 요법이 투여되는 동안 및/또는 투여 이후에 지속될 수 있다. 본 발명에 개시된 길항제의 투여는 단일 용량, 또는 복수 용량으로 달성될 수 있다. 일부 사례에서, 이들 길항제의 투여는 전통적인 요법보다 최소한 수일 이전에 시작되고, 다른 사례에서, 투여는 전통적인 요법의 투여 직전에 또는 투여 시점에 시작된다.
- [0120] 7. 제약학적 조성물
- [0121] 특정 구체예에서, 본 발명의 액티빈-ActRIIa 길항제는 제약학적으로 허용되는 담체로 제제화된다. 가령, ActRIIa 폴리펩티드는 단독으로, 또는 제약학적 제형(치료 조성물)의 한 성분으로서 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 의학 또는 수의학에 이용하기 편리한 방식으로 투여를 위하여 제제화된다.
- [0122] 특정 구체예에서, 본 발명에 개시된 유방암을 치료 또는 예방하는 방법은 이식물(implant) 또는 장치로서 전신적으로 또는 국소적으로 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 투여될 때, 본 발명에 이용되는 치료 조성물은 당연히, 발열원-없는, 생리학적으로 허용되는 형태를 취한다. 앞서 기술된 바와 같은 조성물에 임의적으로 포함되는, 액티빈-ActRIIa 길항제 이외의 치료제는 본 발명의 방법에서, 본 발명의 화합물과 동시에 또는 순차적으로 투여된다.
- [0123] 전형적으로, 액티빈-ActRIIa 길항제는 비경구(parental) 투여된다. 비경구 투여에 적합한 제약학적 조성물은 하나 이상의 제약으로 허용되는 무균 등장성 수용액이나 비-수용액, 분산액(dispersion), 현탁액(suspension)이나 에멀전(emulsion), 또는 사용 직전에 무균 주사가능 용액이나 분산액으로 재구성되는 무균 분말(sterile powder)과의 조합으로 하나 이상의 ActRIIa 폴리펩티드를 함유하고, 항산화제(antioxidant), 완충제(buffer), 정균제(bacteriostat), 의도된 수용자의 혈액과 제형이 등장성이 되도록 하는 용매, 현탁제, 또는 농후제(thickening agent)를 포함할 수 있다. 본 발명의 제약학적 조성물에 이용될 수 있는 적절한 수성과 비-수성 담체의 실례에는 물, 에탄올, 폴리올(가령, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)과 이들의 적절한 혼합물, 식물성 오일(vegetable oil)(가령, 올리브 오일(olive oil)), 그리고 주사가능 유기 에스테르(injectable organic ester)(가령, 올레인산에틸(ethyl oleate))가 포함된다. 적절한 유동성(fluidity)은 예로

써, 레시틴(lecithin)과 같은 코팅 물질의 이용에 의하여, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의하여, 그리고 계면활성제의 이용에 의하여 유지될 수 있다.

[0124] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 표적 조직 부위(가령, 유방 상피)로의 전달을 위한 형태로 내포되거나 주입될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 치료 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)을 표적 조직 부위(유방 상피)로 전달할 수 있는 기반(matrix)을 포함하는데, 이는 발달중인 조직에 대한 구조물을 제공하고 최적으로, 체내 재흡수될 수 있다. 가령, 기반은 ActRIIa 폴리펩티드의 느린 방출(slow release)을 제공한다. 이런 기반은 다른 이식된 의학 적용에 현재 이용되고 있는 물질로 형성될 수 있다.

[0125] 기반 물질의 선택은 생체적합성(biocompatibility), 생물분해성(biodegradability), 기계적 특성, 미용적 외관(cosmetic appearance) 및 접촉면 특성(interface property)에 기초한다. 본 발명의 조성물의 특정 적용은 적절한 제형을 정의할 것이다. 이들 조성물에 적합한 잠재적인 기반은 생물분해가능하고 화학적으로 정의된 황산칼슘(calcium sulfate), 트리칼슘포스페이트(tricalciumphosphate), 수산화인회석(hydroxyapatite), 폴리락트산(polylactic acid)과 폴리안하이드라이드(polyanhydride)이다. 다른 잠재적인 물질은 생물분해가능하고 생물학적으로 충분히 정의된 물질, 예를 들면, 꿀 또는 피부 콜라겐이다. 추가의 기반은 순수한 단백질 또는 세포의 기반 성분으로 구성된다. 다른 잠재적인 기반은 생물분해가능하고 화학적으로 정의된 물질, 예를 들면, 소결된 수산화인회석(sintered hydroxyapatite), 생체유리(bioglass), 알루미늄산염(aluminate), 또는 다른 세라믹이다. 기반은 앞서 언급된 유형의 물질의 조합, 예를 들면, 폴리락트산과 수산화인회석, 또는 콜라겐과 트리칼슘포스페이트로 구성될 수도 있다. 생체세라믹(bioceramic)은 칼슘-알루미늄산염-인산염(calcium-aluminate-phosphate)에서처럼 조성(composition), 그리고 구멍 크기, 입자 크기, 입자 형태와 생물분해성(biodegradability)을 변경하는 가공(processing)에서 변화될 수 있다.

[0126] 특정 구체예에서, 본 발명의 길항제는 예로써, 캡슐, 교감(cachet), 알약(pill), 정제(tablet), 마름모꼴 정제(lozenge)(방향성 기부(flavored basis), 통상적으로, 수크로오스(sucrose)와 아카시아(acacia) 또는 트래거캔스(tragacanth) 이용), 분말, 과립, 또는 수용성이나 비-수용성 액체에 녹인 용액이나 현탁액, 또는 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 액상 에멀전, 또는 엘릭시르 또는 시럽, 또는 향정(pastille)(불활성 기부(inert base), 예를 들면, 젤라틴(gelatin)과 글리세린(glycerin), 또는 수크로오스와 아카시아 이용) 및/또는 구강세정제(mouth wash) 등의 형태로 경구 투여될 수 있는데, 이들 각각은 미리 결정된 양의 작용제를 활성 성분으로 함유한다. 작용제는 거환약(bolus), 연질약(electuary) 또는 페이스트(paste)로 투여될 수도 있다.

[0127] 경구 투여용 고형 약형(캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 본 발명의 하나 이상의 치료 길항제는 한 가지 이상의 제약학적으로 허용되는 담체, 예를 들면, 구연산나트륨 또는 이인산칼슘 및/또는 (1) 충전제 또는 증량제, 예를 들면, 전분, 락토오스, 수크로오스, 글루코오스, 만니톨, 또는 규산; (2) 접합제, 예를 들면, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로오스, 또는 아카시아; (3) 습윤제, 예를 들면, 글리세롤; (4) 붕해제, 예를 들면, 아가-아가, 탄산칼슘, 감자나 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 또는 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예를 들면, 과립; (6) 흡수 가속화제, 예를 들면, 4급 암모늄 화합물; (7) 보습제, 예를 들면, 세틸 알코올과 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예를 들면, 고령토와 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예를 들면, 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 소디움라우릴 설페이트, 또는 이들의 혼합물; (10) 착색제와 혼합된다. 캡슐, 정제와 알약의 경우에, 제약학적 조성물은 완충제를 함유할 수도 있다. 유사한 유형의 고형 조성물은 또한, 락토오스 또는 유당과 같은 부형제 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용한 연성과 경성-충진된 젤라틴 캡슐에서 충전제(filler)로 사용될 수 있다.

[0128] 경구 투여용 액상 제형에는 제약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽과 엘릭시르가 포함된다. 활성 성분 이외에, 액상 제형은 당분야에 통상적으로 이용되는 불활성 희석제, 예를 들면, 물 또는 다른 용매, 용해제(solubilizing agent)와 유화제(emulsifier), 예를 들면, 에틸 알코올(ethyl alcohol), 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 에틸 카보네이트(ethyl carbonate), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 벤질 알코올(benzyl alcohol), 벤질 벤조에이트(benzyl benzoate), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 점(germ), 올리브, 피마자과 참깨 기름), 글리세롤(glycerol), 테트라하이드로퓨릴 알코올(tetrahydrofuryl alcohol), 소르비탄의 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 지방산 에스테르(fatty acid ester), 또는 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 습윤제, 유화제와 현탁제, 감미료, 조미료, 착색제, 방향제, 보존제 등과 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다.

- [0129] 현탁액은 활성 화합물 이외에, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올(ethoxylated isostearyl alcohol), 폴리옥시에틸렌 소르비톨(polyoxyethylene sorbitol)과 소르비탄 에스테르(sorbitan ester), 미세결정성 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 알루미늄 메타하이드록시드(aluminum metahydroxide), 벤토나이트(bentonite), 아가-아가(agar-agar)와 트래거칸스(tragacanth), 이들의 혼합물 등과 같은 현탁제를 함유할 수 있다.
- [0130] 본 발명에 개시된 방법에 유용한 조성물은 또한, 보존제, 습윤제, 유화제와 분산제(dispersing agent)와 같은 어쥬번트를 함유할 수 있다. 미생물의 작용 예방은 다양한 항균제와 항진균제, 예를 들면, 파라벤(paraben), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀 소르빈산(phenol sorbic acid) 등의 내포에 의해 담보될 수 있다. 또한, 등장성제(isotonic agent), 예를 들면, 당, 염화나트륨 등을 조성물 내로 포함시키는 것이 바람직하다. 이에 더하여, 주사가능 제약학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면, 스테아린산알루미늄(aluminum monostearate)과 젤라틴의 내포로 달성될 수 있다.
- [0131] 유방암을 치료 또는 예방하는데 적합한 투약 섭생(dosage regimen)은 본 발명의 화합물(가령, ActRIIa 폴리펩티드)의 작용을 변화시키는 다양한 인자를 고려하여 담당 의사에 의해 결정될 것이다. 다양한 인자에는 환자의 연령, 성별과 식이, 질환의 심각도, 투여 기간, 그리고 다른 임상 인자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 최종 조성물에 다른 공지된 성장 인자의 첨가 역시 용량에 영향을 줄 수 있다. 진행은 종양 크기, 단계 또는 조직학적 등급, 에스트로겐 또는 프로게스테론 수용체 상태, 혈관침습(angioinvasion), 그리고 국지적 림프절 전이(lymph node metastasis)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다양한 인자의 주기적인 평가에 의해 모니터링될 수 있다. 임상에는 또한, 단백질 uPA/PAI1의 수준 - 높은 수준의 uPA와 PAI1은 높은 전이위험과 연관된다 - 그리고 전이와 연관되는 Her-2 유전자 증폭 및/또는 단백질 발현과 같은 마커를 모니터링할 수도 있다(Weigelt et al. 2005 Nat. Rev. Cancer 5: 591-602). 유전자 발현 프로파일링(gene expression profiling) 역시 질병 진행(disease progression)을 모니터링하는데 유용하다(van 't Veer et al. 2002 Nature 415: 530-536; van de Vijver et al. 2002 N. Engl. J. Med. 347: 1999-2009).
- [0132] 특정 구체예에서, 본 발명에서는 ActRIIa 폴리펩티드의 생체내 생산을 위한 유전자 요법을 수반하는, 유방암을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제시한다. 이런 요법은 앞서 유방암에 관련된 세포 또는 조직, 예를 들면, 유방 상피 세포 내로 ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 도입에 의해 치료 효과를 달성하게 된다. ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 키메라 바이러스와 같은 재조합 발현 벡터 또는 콜로이드성 분산 시스템을 이용하여 달성될 수 있다. ActRIIa 폴리뉴클레오티드 서열의 치료적 전달(therapeutic delivery)에는 표적된 리포솜(liposome)의 이용이 바람직하다.
- [0133] 본 명세서에 개시된 바와 같이 유전자 요법에 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터에는 아데노바이러스(adenovirus), 포진 바이러스(herpes virus), 우두(vaccinia), 또는 레트로바이러스(retrovirus)와 같은 RNA 바이러스가 포함된다. 레트로바이러스 벡터는 뮤린 또는 조류 레트로바이러스의 유도체다. 단일 외래 유전자가 삽입될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 실례에는 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV), Harvey 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스(MuMTV), 그리고 Rous 육종 바이러스(RSV)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다수의 부가적인 레트로바이러스 벡터는 복수 유전자를 통합할 수 있다. 이들 모든 벡터는 형질도입된 세포가 확인되고 산출될 수 있도록 선택가능 마커에 대한 유전자를 전달하거나 통합할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 예로써, 당, 당지질(glycolipid), 또는 단백질을 부착함으로써 표적-특이적으로 만들어질 수 있다. 바람직한 표적화는 항체를 이용함으로써 달성된다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특이적인 폴리뉴클레오티드 서열은 레트로바이러스 게놈 내로 삽입되거나, 또는 ActRIIa 폴리뉴클레오티드를 포함하는 레트로바이러스 벡터의 표적 특이적인 전달을 가능하게 하는 바이러스 외피(viral envelope)에 부착될 수 있다.
- [0134] 대안으로, 조직 배양 세포는 전통적인 인산칼슘(calcium phosphate) 형질감염(transfection)에 의해, 레트로바이러스 구조 유전자 gag, pol과 env를 인코딩하는 플라스미드로 직접적으로 형질감염될 수 있다. 이들 세포는 이후, 목적 유전자를 포함하는 벡터 플라스미드로 형질감염된다. 생성된 세포는 배양 배지 내로 레트로바이러스 벡터를 방출한다.
- [0135] ActRIIa 폴리뉴클레오티드에 대한 다른 표적된 전달 시스템은 콜로이드성 분산 시스템이다. 콜로이드성 분산 시스템에는 거대분자 복합체, 나노캡슐(nanocapsule), 마이크로캡슐(microsphere), 비드(bead), 그리고 지질-기초된 시스템(가령, 수중유 에멀전, 미셀(micell), 혼합된 미셀, 리포솜 등)이 포함된다. 본 발명에서 바람직한 콜로이드성 시스템은 리포솜이다. 리포솜은 시험관내와 생체내에서 전달 운반체(delivery vehicle)로서 유용한 인공 막 소포(membrane vesicle)이다. RNA, DNA와 원형 비리온(virion)은 수성 내부에 내포될 수 있고, 생물학적 활성 형태로 세포에 전달될 수 있다(참조: Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). 리포솜 소포

를 이용한 효율적인 유전자 전달 방법은 당분야에 공지되어 있다(참조: Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988). 리포솜의 조성은 통상적으로, 스테로이드(steroid), 특히, 콜레스테롤(cholesterol)과 조합된 인지질(phospholipid)의 조합이다. 다른 인지질 또는 다른 지질 역시 이용될 수 있다. 리포솜의 물리적 특징은 pH, 이온 강도(ionic strength)와 이가 양이온(divalent cation)의 존재에 좌우된다.

[0136] 리포솜 생산에 유용한 지질의 실례에는 포스파티딜(phosphatidyl) 화합물, 예를 들면, 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol), 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 스펅고지질(sphingolipid), 세레브로시드(cerebroside) 및 강글리오시드(ganglioside)가 포함된다. 예시적인 인지질에는 난 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine), 그리고 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine)이 포함된다. 또한, 리포솜의 표적화는 예로써, 장기-특이성(organ-specificity), 세포-특이성(cell-specificity), 그리고 세포소기관-특이성(organelle-specificity)의 기초에서 가능하고, 당분야에 공지되어 있다.

실시예

[0137] 본 발명은 앞서 전반적으로 기술되었고, 아래의 실시예를 참조하면 더욱 용이하게 이해될 수 있는데, 이들 실시예에는 본 발명의 특정 측면과 구체예를 예시하는 목적으로 포함되고 본 발명을 한정하지 않는다.

[0138] 실시예 1: ActRIIa-Fc 융합 단백질

[0139] 출원인은 인간 또는 생쥐 Fc 도메인에 융합된 인간 ActRIIa의 세포의 도메인을 포함하고 이들 사이에 최소 링커(minimal linker)가 존재하는 가용성 ActRIIa 융합 단백질을 작제하였다. 이들 구조체는 각각, ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc로 지칭된다.

[0140] 아래에 도시된 ActRIIa-hFc는 CHO 세포주로부터 정제된다(SEQ ID NO: 7):

```
ILGRSETQECLFFNANWEKDRNTQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK
```

[0142] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 CHO 세포주에서 발현되었다. 3가지 상이한 리더 서열(leader sequence)이 고려되었다:

[0143] (i) 꿀벌 멜리틴(mellitin)(HBML): MKFLVNVLFVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)

[0144] (ii) 조직 플라스미노겐 활성화인자(TPA): MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)

[0145] (iii) 고유: MGAALKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).

[0146] 선택된 형태는 TPA 리더를 이용하고 아래의 가공되지 않은 아미노산 서열을 보유한다:

```
MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRNTQTGVEPCY
GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEG
NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPVEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)
```

[0147]

[0148] 상기 폴리펩티드는 아래의 핵산 서열에 의해 인코딩된다:

```

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
TCGTTTCGCCCGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT
TTTAATGCTAATTTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGT
ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
TTCCATTGAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
GGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
CCCACCTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGTGGTGAAGTCAACACAT
GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGTCCCCATCGAAAA
ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC

```

[0149]

```

CCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGTCTTCTTCTCTCT
ATAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

```

[0150]

[0151] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 둘 모두 재조합 발현에 상당히 용이하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 단백질은 단백질의 단일한 충분히-정의된 피크로서 정제되었다. N-말단 염기서열분석(sequencing)에서 -ILGRSETQE의 단일 서열(SEQ ID NO: 11)이 확인되었다. 정제는 예로써, 임의의 순서로 아래 중에서 3가지 이상을 비롯한 일련의 칼럼 크로마토그래피 단계로 달성될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과(viral filtration)와 완충액 교환(buffer exchange)으로 완결될 수 있다. ActRIIa-hFc 단백질은 크기 배제 크로마토그래피에 의한 결정에서 >98% 및 SDS PAGE에 의한 결정에서 >95%의 순도로 정제되었다.

[0152] ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc는 리간드, 특히, 액티빈 A에 대한 높은 친화성을 보였다. GDF-11 또는 액티빈 A("ActA")는 표준 아민 결합 절차를 이용하여 Biacore CM5 칩 상에 고정시켰다. ActRIIa-hFc와 ActRIIa-mFc 단백질은 상기 시스템으로 적하하고, 결합을 측정하였다. ActRIIa-hFc는 5×10^{-12} 의 해리 상수(K_D)로 액티빈에 결합하고, 상기 단백질은 9.96×10^{-9} 의 K_D 로 GDF11에 결합하였다(도 2 참조). ActRIIa-mFc는 유사하게 작용하였다.

[0153] ActRIIa-hFc는 약물동력학 연구에서 매우 안정하였다. 쥐는 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg의 ActRIIa-hFc 단백질을 투약하고, 24시간, 48시간, 72시간, 144시간과 168시간 시점에서 상기 단백질의 혈장 수준을 측정하였다. 별개의 연구에서, 쥐는 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg을 투약하였다. 쥐에서, ActRIIa-hFc는 11-14일 혈청 반감기를 보였고, 상기 약물의 순환 수준(circulating level)은 2주후 매우 높았다(1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 최초 투여에서, 각각 11 $\mu\text{g/ml}$, 110 $\mu\text{g/ml}$ 또는 304 $\mu\text{g/ml}$). 필리핀 원숭이(cynomolgus monkey)에서, 상기 약물의 혈장 반감기는 14일보다 훨씬 크고, 순환 수준은 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 최초 투여에서, 각각 25 $\mu\text{g/ml}$, 304 $\mu\text{g/ml}$ 또는 1440 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

[0154] 실시예 2: ActRIIa-hFc 단백질의 특성화

[0155] ActRIIa-hFc 융합 단백질은 SEQ ID NO:9의 조직 플라스미노겐 리더 서열(tissue plasminogen leader sequence)을 이용하여, pAID4 벡터(SV40 ori/인헨서, CMV 프로모터)로부터 안정적으로 형질감염된 CHO-DUKX BII 세포에서 발현시켰다. 실시예 1에서 앞서 기술된 바와 같이 정제된 상기 단백질은 SEQ ID NO:7의 서열을 보유하고 있다. Fc 부분은 SEQ ID NO:7에 도시된 바와 같이 인간 IgG1 Fc 서열이다. 시알산 분석(sialic acid analysis)에서, 상기 단백질은 평균적으로, ActRIIa-hFc 융합 단백질 분자당 대략 1.5 내지 2.5 몰의 시알산(sialic acid)을 포함하였다.

[0156] 이러한 정제된 단백질은 인간 환자에서 25-32일의 반감기를 비롯하여, 조사된 모든 동물에서 현저하게 긴 혈청

반감기(serum half-life)를 보였다(하기 실시예 3 참조). CHO 세포 발현된 물질은 인간 293 세포에서 발현된 ActRIIa-hFc 융합 단백질에서 보고된 것보다 액티빈 B 리간드에 대한 더욱 높은 친화성(affinity)을 갖는다(De Re et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51): 53126-35.). 부가적으로, tPa 리더 서열의 이용은 다른 리더 서열보다 더욱 많은 생산을 제공하고, 고유 리더로 발현된 ActRIIa-Fc와 달리, 고도로 순수한 N-말단 서열을 제공하였다. 이러한 고유 리더 서열의 이용은 2가지 주요 종류의 ActRIIa-Fc를 발생시켰는데, 이들은 각각 상이한 N-말단 서열을 보유하고 있다.

[0157] 실시예 3: 인간 임상 시험

[0158] 실시예 2에 기술된 단백질은 일차적으로, 건강한 폐경후 여성에서 상기 단백질의 안정성을 평가하기 위하여 수행된 무작위 이중-맹검 위약-대조 연구(randomized, double-blind, placebo-controlled study)에서 인간 환자에 투여하였다. 48명의 피험자는 ActRIIa-hFc 또는 위약의 단일 용량을 복용하는 6개 무리(5 작용제: 1 위약)에 무작위화시켰다. 용량 수준은 정맥내(IV)의 경우에 0.01 내지 3.0 mg/kg, 그리고 피하(SC)의 경우에 0.03 내지 0.1 mg/kg이었다. 모든 피험자는 120일 동안 추적하였다. 연구 참가후 6개월 이내에 골 물질대사(bone metabolism)에 영향을 주는 약제를 복용한 피험자는 연구 참가로부터 제외시켰다. 각 무리를 추적한 이후에 안정성 평가를 수행하여 용량 증가(dose escalation)를 결정하였다. 약동학(PK) 분석 이외에, ActRIIa-hFc의 생물학적 활성을 골 형성과 재흡수의 생화학적 마커(biochemical marker), 그리고 FSH 수준의 측정으로 평가하였다.

[0159] 본 연구에서 심각한 부작용은 보고되지 않았다. 부작용(AE)은 전반적으로, 경미하고 일시적이었다. AE의 예비 분석에는 두통(headache), 상승된 실험 수치, 감기 증상(cold symptom), 구토(emesis), 정맥내 침습(intravenous infiltration), 그리고 주사 부위에서 혈종(hematoma)이 포함되었다.

[0160] ActRIIa-hFc의 PK 분석에서, 용량에 따른 선형 프로파일(linear profile), 그리고 대략 25-32일의 평균 반감기가 밝혀졌다. ActRIIa-hFc에 대한 곡선 아래 영역(area-under-curve, AUC)은 용량에 선형 비례하고, SC 투약후 흡수는 본질적으로 완전하였다. 이들 데이터는 SC가 투약을 위한 바람직한 접근법을 지지하는데, 그 이유는 SC 투약이 IV 투약의 첫 며칠 동안 발생하는 약물의 혈청 농도(serum concentration)에서 스파이크(spike)를 예방하면서 상기 약물에 대한 동등한 생체이용효율(bioavailability)과 혈청 반감기를 제공하기 때문이다. ActRIIa-hFc는 동화촉진 골 성장(anabolic bone growth)의 마커인 골-특이적 알칼리성 인산분해효소(bone-specific alkaline phosphatase, BAP)의 혈청 수준에서 급속하고 지속적인 용량-의존성 증가, 그리고 골 재흡수(bone resorption)의 마커인 C-말단 1형 콜라겐 텔로펩티드(collagen telopeptide)와 주석산염 저항성 인산분해효소(tartrate-resistant acid phosphatase) 5b 수준에서 용량-의존성 감소를 유도하였다. 다른 마커, 예를 들면, PINP는 결정적이지 못한 결과를 보였다. BAP 수준은 약물의 최대 용량에서 포화 효과(saturating effect)에 근접한 결과를 보였는데, 이는 이러한 동화촉진 골 생물마커(anabolic bone biomarker)에 대한 반-극대 효과(half-maximal effect)가 0.3 mg/kg의 용량에서 달성되고, 최대 3 mg/kg까지 증가할 수 있음을 지지한다. 약물에 대한 AUC에 약역학적 효과(pharmacodynamic effect)의 상관관계로서 계산된 EC₅₀은 51,465(day*ng/ml)이었다. 이들 골 생물마커 변화는 조사된 최대 용량 수준에서 대략 120일 동안 지속되었다. 또한, 액티빈의 저해와 일치하는, 혈청 FSH 수준에서 용량-의존성 감소가 관찰되었다.

[0161] 건강한 폐경후 여성에게 제공된 ActRIIa-hFc의 단일 용량은 안전하고, 조사된 용량 수준 범위에서 충분히 관용되었다. 연장된 PK와 약역학적 효과는 간헐적 투약(intermittent dosing)이 장래 연구에 적합할 것임을 암시한다. 가령, 혈청 반감기에 기초한 투약은 매월 간격으로, 또는 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주 간격으로 수행될 수 있다. 부가적으로, 이러한 약역학적 효과가 약물의 혈청 잔류(serum residence)를 훨씬 초과하여 연장되기 때문에, 투약은 약역학적 효과에 기초하여 수행될 수도 있는데, 이는 3개월 간격으로, 또는 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 심지어 12개월 간격으로 투약이 환자에서 원하는 효과를 산출하는데 효과적임을 의미한다. 본 임상 시험은 인간에서 ActRIIa-hFc가 골 형성에서 증가와 골 재흡수에서 감소의 생물학적 증거에 의해 뒷받침되는 골 성장 촉진제(osteoblastic agent)임을 증명한다.

[0162] 실시예 4: ActRIIa-Fc는 유방암 전이에 의해 유발된 골 손실을 완화하거나 예방한다.

[0163] 유방암의 65% 내지 75%가 뼈로 전이되어, 골 구조(bone structure)에 실질적인 손상을 유발하고, 골절 위험을 증가시키며, 통증과 기타 부작용을 유발하는 것으로 추정된다. 본 실시예에서는 뼈에 전이된 유방암의 생쥐 모형에서 ActRIIa-Fc의 효과를 조사하였다.

[0164] 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231(클론 2287, Kang et al. Cancer Cell 2003, vol 3:537-549)의 하위계통(subline)은 시험관내에서 배양하고, 세포는 5 x 10⁶ 세포/ml의 밀도에서 수거하였다. MDA-MB-231은 골 내로 접

종과 골 전이에 의해 유발되는 것과 유사한 골 손상을 유발하는데 매우 적합한 세포주이다. 10 μ l의 세포를 연구 0일에 6주령(week old) 암컷 무흉선(athymic) 누드 생쥐의 경골(tibia) 내로 주입하였다. 연구 0일에, 10마리 생쥐에 ActRIIa-mFc(10 mg/kg/주2회/피하)(n=8) 또는 PBS 운반제(n=7)를 투여하였다. 질환 진행은 주 간격으로, 이중 에너지 방사선 흡수 측정법(dual energy x-ray absorptiometry, PIXIMus)을 이용하여 골 무기질 밀도(bone mineral density)에서 변화로 평가하였다. 생쥐는 ActRIIa-mFc로 4주 동안 치료하고, 이후 희생시키고, 각 동물로부터 경골(종양 주입된 경골과 종양 주입되지 않은 경골 둘 모두)을 수거하였다. 그 다음, 경골을 처리하고 미세단층촬영술(microcomputed tomography, microCT)과 조직학적 분석(histological analysis)을 위하여 준비하였다.

[0165] 무흉선 누드 생쥐 내로 MDA-MB-231 세포의 경골내(intratibial) 주사는 반대측 다리와 비교하여 주입된 경골 내에서 골용해성 골 병소(osteolytic bone lesion)의 발생을 촉진하였다. 근위 경골(proximal tibia)의 MicroCT 분석은 PBS 운반제 치료된 생쥐에서 종양 주입되지 않은 경골과 비교하여 MDA-MB-231 보유 경골에서 망상조직 골 체적(cancellous bone volume)의 62% 감소를 증명하였다. ActRIIa-mFc 치료는 운반제와 비교하여, 고유 경골 또는 종양 보유 경골에서 각각, 70% 또는 147%의 증가를 결과하였다(양쪽 모두에서 $P < 0.01$). ActRIIa-mFc 치료된 생쥐의 종양 보유 경골은 VEH 치료된 생쥐의 고유 경골과 유사한 망상조직 골 밀도를 보였다($p = 0.39$).

[0166] 따라서 ActRIIa-mFc는 뼈 내에서 유방 종양 세포의 존재와 연관된 골 손상을 제거할 수 있다.

[0167] 실시예 5: ActRIIa-Fc Reduces 유방암 전이 and Promotes Survival

[0168] 전이성 질환의 모형으로서, MDA-MB-231 세포는 심장내 주입에 의해 생쥐 내로 도입될 수 있다. 좌심실(left ventricle) 내로 주입된 세포는 혈류(bloodstream)를 통하여 이동하고 원위 부위에서 전이성 병소를 형성할 것이다. 파생 세포주 MDA-MB-231-luc-D3H2LN(Caliper Life Sciences)은 바이오포토닉 영상 기술(biophotonic imaging technology)(Caliper Life Sciences)을 이용한, 전이성 종양 형성의 비-침습성 모니터링(monitoring)을 가능하게 하는 루시페라제(luciferase) 발현 세포주이다. 상기 모형은 전이성 유방암 병소의 형성을 감소시키는 ActRIIa-mFc의 잠재력을 평가하는데 이용되었다.

[0169] MDA-MB-231-luc-D3H2LN 세포는 심장내 주입에 의해 26마리의 무흉선 누드 생쥐 내로 도입하였다. 종양 투입으로부터 2주 전에 시작하여 전체 연구 과정 동안, 이들 생쥐 중에서 14마리는 운반제(인산염 완충된 염수-PBS)로 치료하고, 12마리는 ActRIIa-mFc(10 mg/kg, 주2회, 피하 주사)로 치료하였다. 추가로 9마리 생쥐는 세포를 가성 주입하고 ActRIIa-mFc로 치료하였다. 생쥐는 주기적으로 마취시키고 생체발광(bioluminescent emission)을 시각화하여 전이성 진행의 형성을 검출하였다.

[0170] ActRIIa-mFc 치료군 전이성 병소의 현저하게 감소된 발달을 보였다. 5주 시점에, 14마리의 운반제 치료된 생쥐 중에서 12마리가 전이성 확산을 지시하는 복수의 강한 형광 신호를 보이는 반면, 12마리의 ActRIIa-mFc 치료된 생쥐 중에서 4마리만 유사한 병소를 보였다(도 3). 형광 강도(fluorescence intensity)의 정량에서, 이들 치료된 생쥐에서 형광 신호(fluorescence signal)의 거의 10배 감소가 확인되었다.

[0171] 게다가, ActRIIa-mFc 치료는 생쥐의 생존을 현저하게 증가시켰다. 연구 40일 시점에, 운반제 치료된 생쥐 모두(14/14) 폐사하거나 안락사(연구 동물의 인도적 처리를 위한 표준 절차에 따라서)된 반면, ActRIIa-mFc 치료된 생쥐 중에서 2마리(2/12)만 폐사하거나 안락사되었다. 45일 시점에, ActRIIa-mFc 치료된 생쥐 중에서 3/12가 폐사하거나 안락사되었고, 가성 주입된 생쥐는 한 마리도 폐사하지 않았다.

[0172] 이런 이유로, ActRIIa-mFc 치료는 이러한 전이성 유방암 모형에서, 전이성 병소 형성의 실질적인 감소를 유도하고 생존을 촉진한다. 이들 데이터는 ActRIIa-Fc가 특히, 원발성 종양(primary tumor)을 표적하는 요법, 예를 들면, 수술, 호르몬 요법, 또는 전통적인 화학요법과 공동하여, 인간 환자에서 유방암을 치료하는데 이용될 수 있음을 지시한다.

[0173] 실시예 6: 대안적 ActRIIa-Fc 단백질

[0174] 본 발명에 개시된 방법에 따라 이용될 수 있는 다양한 ActRIIa 변이체(variant)는 International Patent Application W02006/012627(가령, pp. 55-58)에서 기술되는데, 상기 문헌은 본 명세서에 순전히 참조로서 편입된다. 대안적 구체에는 ActRIIa의 세포외 도메인의 C-말단 꼬리(최종 15개 아미노산)의 결실을 포함한다. 이런 구조체에 대한 서열은 아래에 제시된다(Fc 부분은 밑줄로 표시됨)(SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMTGGGTHCPPCPA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0175]

[0176]

참조로서 편입

[0177]

본 명세서에 언급된 모든 간행물과 특허는 순전히 참조로서 편입된다. 충돌되는 경우에, 명세서에 기재된 정의를 비롯한 본 출원이 우선한다.

[0178]

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

도면의 간단한 설명

[0020]

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

[0021]

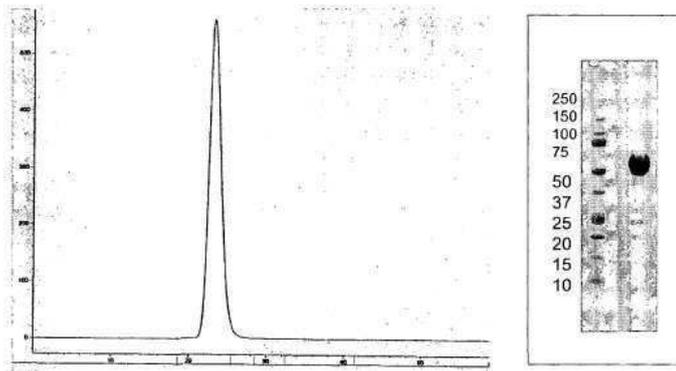
도 2에서는 BiaCore™ 분석법에 의한 측정에서, 액티빈과 GDF-11에 ActRIIa-hFc의 결합을 도시한다.

[0022]

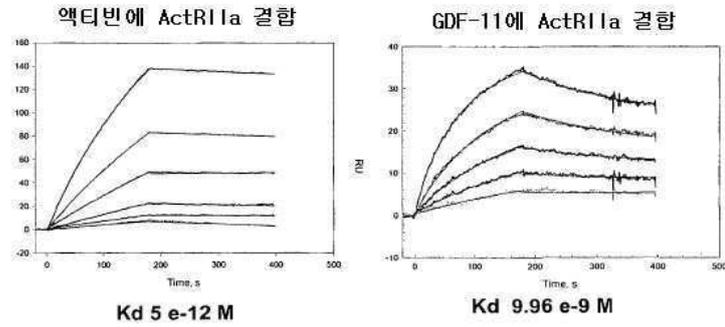
도 3에서는 ActRIIa-mFc 치료가 전이성 유방암의 생쥐 모형에서 전이성 병소의 형성을 현저하게 감소시킨다는 것을 보여준다. 생쥐는 MDA-MB-231 유방암 세포를 발현하는 루시페라제의 심장내(intracardiac) 주입후 5주 시점에 비-침습성(마취됨, 형광 영상(fluorescent imaging))으로 시각화되었다. 운반제 치료된 생쥐 중에서는 12/14 마리가 가시적인 전이성 병소를 보이는 반면, ActRIIa-mFc 치료된 생쥐에서는 4/12 마리만 가시적인 병소를 보인다.

도면

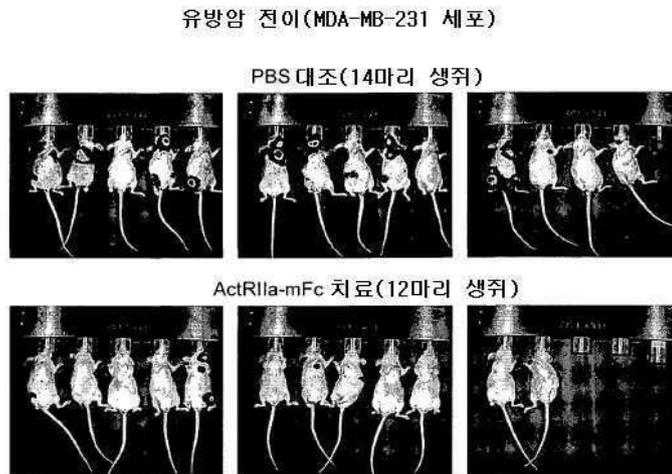
도면1



도면2



도면3



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> ACTIVIN-ACTRIIA ANTAGONISTS AND USES FOR TREATING OR PREVENTING BREAST CANCER

<130> PHPH-PWO-018

<140> PCT/US2008/001429

<141> 2008-02-01

<150> 60/899,070

<151> 2007-02-01

<150> 61/000,540

<151> 2007-10-25

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His
 435 440 445

Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His
 450 455 460

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

Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
 485 490 495

Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
 500 505 510

Leu

<210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15

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

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

Phe Pro Glu Met
 100

<210> 4
 <211> 1542
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgggagctg ctgcaaagt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60
 atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120
 agaaccaatc aaactgggtg tgaacctgtg tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180
 tttgctacct ggaagaatat ttctgggtcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtcgt 240
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300
 tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacctatta caacatcctg 420

 ctctattcct tgggtccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480
 tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttgttc caactcaaga cccaggacca 540
 cccccactt ctcattact agggttgaaa cactgcagtt tattagaagt gaaagcaagg 600
 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660
 tttccaatac aggacaaaca gtcattggca aatgaatcag aagtctacag tttgcctgga 720
 atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780
 gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840

 gctaattggt tctcttgtaa tgaactgtgt catattgcag aaacatggc tagaggattg 900
 gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaacctgc catatctcac 960
 agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac 1020
 tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagictgcag gcgatacca tggacaggtt 1080
 ggtacccgga ggtacatggc tccagaggtg ttagagggtg ctataaactt ccaaagggat 1140
 gcatttttga ggatagatat gtatgccatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200
 tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260

 cagcatccat ctctgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320
 ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380
 tgttgggatc acgacgcaga agccaggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500
 gtgacaaatg ttgactttcc tcccagaaga tctagtctat ga 1542

<210> 5
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
 agaaccaatc aaactgggtg tgaacctgtg tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120

tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttgctg 180
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
gaagtacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccc 345

<210> 6
<211> 225
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (43)
<223> Asp or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (100)
<223> Lys or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (212)
<223> Asn or Ala

<400> 6
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
50 55 60

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95

Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
165 170 175

Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
195 200 205

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

Lys
225

<210> 7
<211> 344
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Apis mellifera

<400> 8
 Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
 20

<210> 9
 <211> 22
 <212> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Tissue
Plasminogen Activator Peptide

<400> 9

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Native Peptide

<400> 10

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

Ser Ser Gly Ala
20

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu
1 5

<210> 12

<211> 329
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 12
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Phe Pro Glu Met Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205

Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

- <210> 13
- <211> 369
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

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

- <400> 13
- Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
225 230 235 240

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
245 250 255

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
260 265 270

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 14

<211> 1114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
construct

<400> 14

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg cgcgtatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120

```

attgggaaaa agacagaacc aatcaaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata 180
aacggcgcca ttgttttctg acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240
aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300
cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360
ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccac 420

cggtggtgga actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
agtcttctc ttecccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt 540
cacatgctg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gteaagtca actggtacgt 600
ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtctaatg gcaaggagta 720
caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtcccctc gagaaaacca tctccaaagc 780
caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840

caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 900
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgaga attc 1114

```

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 15
 Thr Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 16
 Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 17
His His His His His His
1 5
Page 1