



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0116848
(43) 공개일자 2016년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0045182
(22) 출원일자 2015년03월31일
심사청구일자 2015년03월31일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이수영
서울특별시 강남구 언주로 107, 200동 308호 (개포동, 현대2차아파트)
런징징
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 종합과학관 씨동 3-8 (대현동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

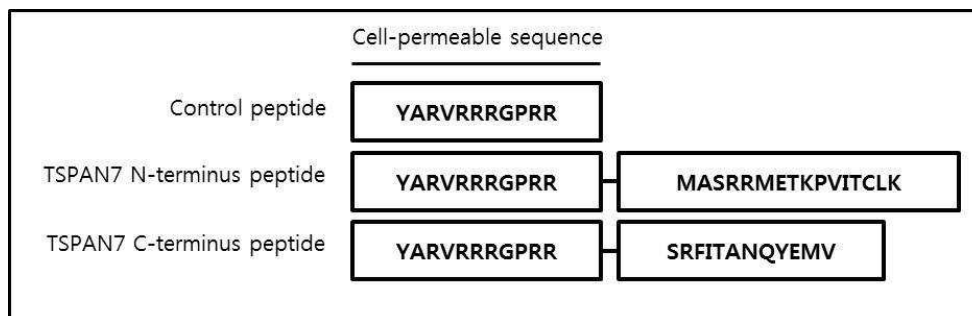
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 TSPAN7 억제제를 포함하는 파골세포 형성 억제 또는 골 질환의 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 TSPAN7(Tetraspanin 7)의 발현 또는 활성을 억제함으로써, 파골세포 형성과 골흡수 작용을 억제하고, 종국적으로는 골 질환을 예방, 개선 및/또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23L 1/3053 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

(72) 발명자

박두리

서울특별시 은평구 수색로 217, 101동 901호 (수색동, 디엠씨 자이1단지 (DMC 자이1))

임찬미

경기도 부천시 오정구 소사로 835, 3동 402호 (원종동, 동문아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A2A1A05005153

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-중견연구자지원사업-도약연구자지원사업-후속연구지원(도전)

연구과제명 RANK-EEIG1axis에의한골격계기능제어연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

TSPAN7(Tetraspanin 7)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는,
골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 골 질환은 골다공증, 골대사성 질환, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 치주질환, 뼈진 이암, 원발성 뼈종양, 다발성 골수종, 염증성 뼈 흡수 질환, 염증성 치조골 흡수 질환 또는 파게트 질병 (Paget's disease)인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 TSPAN7 의 발현을 억제하는 물질은 TSPAN7에 특이적인siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산을 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 TSPAN7 의 활성을 억제하는 물질은 TSPAN7에 특이적인항체, 압타머, TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드, 또는 TSPAN7의 세포외 영역 및 Fc을 포함하는 단백질인, 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드는, 서열번호 1의 1 번째 내지 16 번째 아미노산의 서열에서 선택되는 연속되는 5 내지 16개의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드 또는 서열번호 1의 238번째 내지 249번째 아미노산의 서열에서 선택되는 연속되는 5 내지 12개의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 포함하는 펩타이드인, 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 또는 서열번호 6의 아미노산으로 이루어진 펩타이드인, 약학 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 TSPAN7의 세포외 영역 및 Fc를 포함하는 단백질은 서열번호 7의 아미노산으로 이루어진 단백질인, 약학 조성물.

청구항 8

TSPAN7(Tetraspanin 7)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는,

골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 골 질환은 골다공증, 골대사성 질환, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 치주질환, 뼈전이암, 원발성 뼈종양, 다발성 골수종, 염증성 뼈 흡수 질환, 염증성 치조골 흡수 질환 또는 파게트 질병(Paget's disease)인, 식품 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 TSPAN7의 발현을 억제하는 물질은 TSPAN7에 특이적인 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산을 포함하는 것인, 식품 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 TSPAN7의 활성을 억제하는 물질은 TSPAN7에 특이적인 항체, 압타머, TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드, 또는 TSPAN7의 세포외 영역 및 Fc를 포함하는 단백질인, 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드는, 서열번호 1의 1 번째 내지 16 번째 아미노산의 서열에서 선택되는 연속되는 5 내지 16개의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드 또는 서열번호 1의 238번째 내지 249번째 아미노산의 서열에서 선택되는 연속되는 5 내지 12개의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드를 포함하는 펩타이드인, 식품 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 또는 서열번호 6의 아미노산으로 이루어진 펩타이드인, 식품 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 TSPAN7의 세포외 영역 및 Fc를 포함하는 단백질은 서열번호 7의 아미노산으로 이루어진 단백질인, 식품 조성물.

청구항 15

TSPAN7(Tetraspanin 7)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 파골세포 형성 억제용 배지 조성물.

청구항 16

서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진, 파골세포 형성 억제 활성을 나타내는 펩타이드.

청구항 17

서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진, 파골세포 형성 억제 및 골흡수 억제 활성을 나타내는 단백질.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 TSPAN7(Tetraspanin 7)의 발현 또는 활성을 억제함으로써, 다핵의 성숙된 파골세포 형성을 억제하고, 종국적으로는 골 질환을 예방, 개선 및/또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 뼈는 인체 내 여러 기관들을 보호하고 조혈 작용을 하며 칼슘과 같은 체내 필요한 물질들을 보관하는 저장소로서의 기능을 담당하고 있다. 뼈의 항상성은 뼈를 생성하는 조골세포와 뼈를 분해하는 파골세포 간의 균형적인 활동을 통해 유지된다. 이들 두 세포의 불균형, 특히 파골세포의 과도한 형성이나 활성화에 의한 지나친 뼈의 분해는 골다공증을 포함한 각종 골 질환의 주요 원인이 된다.
- [0003] 파골세포 형성(osteoclastogenesis)은 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)와 RANKL(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)과 같은 사이토카인(cytokine)의 자극에 의해 파골 전구세포들이 서로 융합하여 다핵을 가진 파골세포가 형성되는 과정이다. 성숙된 파골세포들은 세포 골격화 과정을 일으키며, 세포 골격화는 파골세포가 뼈에 부착함과 동시에 세포 외 공간과 뼈를 흡수하는 공간을 구분하게 위해 파골세포의 액틴(actin)이 하나의 큰 고리(ring)으로 조직화되어 뼈를 흡수하게 되는 과정을 말한다.
- [0004] 따라서, 파골세포의 분화나 성숙 또는 활성을 저해함으로써 뼈의 흡수 작용을 억제하는 것은 다양한 골 질환 치료제 개발의 효과적인 방법이 될 수 있다.
- [0005] 현재까지 여러 물질이 골 질환 치료제로 개발되었다. 그 중 골다공증 치료제로 가장 많이 사용되는 에스트로젠은 그 실제적인 효능이 아직 검증되지 않은 상태이며 생애 동안 계속 복용해야 하는 단점이 있고, 장기간 투여하는 경우 유방암이나 자궁암이 증가하는 부작용이 있다. 비스포스포네이트 계열의 약물인 알렌드로네이트는 그 효능이 명확하지 않고 소화관에서의 흡수가 더디며 위장과 식도점막에 염증을 유발하는 문제가 있다. 칼슘 제제는 부작용이 적으면서도 효과가 우수한 것으로 알려져 있지만 치료제라기보다는 예방제에 해당한다. 또한, 칼시토닌과 같은 비타민 D 제제가 알려져 있으나 아직 효능 및 부작용에 대한 연구가 충분히 되어있지 않은 상태이다.
- [0006] 따라서, 부작용이 적고 효과가 우수한 새로운 대사성 골 질환 치료제의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국특허등록 제0595735호(2006.06.30 공고)
(특허문헌 0002) 한국특허등록 제1191733호(2012.10.10 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 TSPAN7(Tetraspanin 7)의 발현 또는 활성을 억제함으로써, 다핵의 성숙된 파골세포 형성과 골흡수 기능을 억제하고, 종국적으로는 골 질환을 예방, 개선 및/또는 치료할 수 있는 조성물 및/또는 방법에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 TSPAN7의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 TSPAN7의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 골 질환의 예방 또는 개선

용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

- [0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 TSPAN7 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 성숙된 파골세포 형성 및/또는 골흡수 기능 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 성숙된 파골세포 형성 및/또는 골흡수 기능 억제 활성을 나타내는 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 하나의 목적은 TSPAN7 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 골 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 하나의 목적은 TSPAN7 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 성숙된 파골세포 형성 및/또는 골흡수 기능을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 파골세포의 분화, 성숙 및/또는 활성을 저해함으로써 뼈의 흡수 작용을 억제하는 것은 골다공증을 비롯한 다양한 골 질환 치료제 개발의 효과적인 방법이 될 수 있다. 본 발명에서는 파골세포의 성숙이나 활성화 과정의 새로운 매개 단백질 탐색을 위하여, gene chip 분석을 통하여, 파골세포 분화 및 성숙의 후기 단계에서 과발현되는 유전자들을 동정하였다. 그 결과, 후보 유전자 가운데 TSPAN7(도 1)이 파골 전구세포에 대한 RANKL 처리에 의해서 파골세포가 분화 및 성숙되는 후기 단계에서 발현됨을 확인하였다(도 2). 또한, TSPAN7를 타겟으로 하여 이의 활성을 억제하는 세포투과성 펩타이드들을 제조(도 3)하여 파골세포 분화 과정에 처리한 결과, TSPAN7의 억제에 의하여 성숙된 파골세포의 형성이 유의적으로 억제됨을 확인하였다(도 4 및 도 5). 또한, TSPAN7의 세포 외 고리(extracellular loop, 도 1의 EC2 부위) 부위를 항체 Fc에 융합하여 TSPAN7-Fc 융합단백질을 발현 및 정제하였고(도 6), 파골세포 형성(도 7 및 도 8)과 TRAP 효소 활성(도 9) 그리고 골흡수(도 10 및 도 11)에 미치는 효과를 분석하였다. 그 결과, TSPAN7-Fc 단백질은 성숙된 파골세포의 형성과 골흡수 작용을 효과적으로 억제함을 확인하였다.
- [0016] 따라서, 본 발명은 TSPAN7를 표적으로 하는 물질을 이용하여, 이의 발현 또는 활성을 억제함으로써, 성숙된 파골세포 형성과 골흡수 작용을 억제하고, 종국적으로는 골 질환을 예방, 개선 및/또는 치료할 수 있는 조성물 및/또는 방법을 제공한다.
- [0017] 이에, 일례로, 본 발명은 TSPAN7 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 다른 예로, 본 발명은 TSPAN7 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 다른 예로, 본 발명은 TSPAN7 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 파골세포 형성 및/또는 골흡수 억제용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 다른 예로, 본 발명은 TSPAN7 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 골 질환의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0021] 다른 예로, 본 발명은 TSPAN7 의 발현 또는 활성을 억제하는 물질의 유효량을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 파골세포 형성과 골흡수를 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0022] 다른 예로, 본 발명은 파골세포 형성 억제 활성을 나타내는 펩타이드에 관한것이다. 일구현예로, 본 발명은 서열번호 5 및 서열번호 6 으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열로 이루어진, 파골세포 형성 억제 활성을 나타내는 펩타이드에 관한 것이다.
- [0023] 다른 예로, 본 발명은 파골세포 형성과 골흡수 억제 활성을 나타내는 Fc 융합 단백질에 관한 것이다. 일구현예로, 본 발명은 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진, 파골세포 형성과 골흡수 억제 활성을 나타내는 단백질에 관한 것이다.
- [0024] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0025] 본원에서, 골 질환은 파골세포의 비정상적인 분화, 성숙 또는 활성으로 인하여 유발되는 다양한 골 질환을 포함

한다. 예를 들어, 골다공증, 골대사성 질환, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 치주질환, 뼈전이암, 원발성 뼈종양, 다발성 골수종, 염증성 뼈 흡수 질환, 염증성 치조골 흡수 질환 또는 파게트 질병(Paget's disease) 등을 예시할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] TSPAN7은 테트라스판닌(tetraspanin)계 단백질의 구성원으로써, 세포막의 TEM(tetraspanin-enriched microdomains)에서 많은 파트너 단백질들과 연관되어 있는 막 단백질이다. TSPAN7은 세포막을 네 번 가로지르는 구조를 가지며, 세포막 안쪽에 N-말단 및 C-말단의 짧은 세포질 꼬리(cytoplasmic tail)와, 세포막 밖에 짧은 세포외 고리(loop)인 EC1과 긴 세포외 고리인 EC2로 구성되어 있다(도 1). 본 발명에서, TSPAN7 를 코딩하는 유전자의 mRNA 또는 단백질은 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 TSPAN7 의 mRNA의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_004615 에서, 이에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열은 Genbank 등록번호 NP_004606 에서 확인할 수 있다. 상기 아미노산 서열을 서열번호 1로 나타내었다.

[0027] 종래 TSPAN7는 뇌에서 PICK1(protein interacting with C kinase 1)의 PDZ 도메인과의 직접적인 결합을 통해 AMPA 수용체를 통하여 시냅스의 성숙을 조절하는 것으로 밝혀진 바 있다. 그러나, 뇌 이외의 다른 곳에서 TSPAN7의 기능에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 발명에서는 실험을 통해 TSPAN7이 뼈의 파골 과정에서 성숙된 파골세포의 형성과 골흡수 활성을 조절하는 단백질이라는 것과, TSPAN7이 새로운 골 질환 치료제 개발의 타겟이 될 수 있다는 것을 밝혔다.

[0028] 본 발명에서, TSPAN7 의 발현을 억제하는 물질은, TSPAN7 의 mRNA 에 특이적으로 결합할 수 있는 siRNA, shRNA, 또는 안티센스 핵산을 포함한다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어, "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. siRNA 는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자 치료의 방법으로 제공될 수 있다.

[0030] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 또한 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA 일반의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스텝 루프형 구조일 수도 있다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들어 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 용어, "shRNA" 는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어, "안티센스 핵산"이란 특정 mRNA 의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 서열은 TSPAN7의 mRNA에 상보적이고 이의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, TSPAN7의 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내

지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다.

- [0034] 안티센스 RNA의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나, 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 RNA를 합성하는 한 예는 RNA 폴리머라제 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 TSPAN7에 특이적인 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산 중 1종 이상을 포함하는 외에, siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산 분자의 유입을 촉진시키는 제제, 예를 들어 리포솜을 이용하거나 콜레스테롤, 콜레이트 및 데옥시콜산을 비롯한 다수의 스테롤류 중 1종의 친유성 담체와 함께 배합할 수도 있다. 또한 안티센스 핵산은 세포에 의해 흡수되는 펩타이드에 접합시킬 수도 있다. 유용한 펩타이드의 예로는 펩타이드 호르몬, 항원 또는 항체 및 펩타이드 독소 등이 있다.
- [0036] 본 발명에서, TSPAN7의 활성을 억제하는 물질은, TSPAN7의 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 아타머를 포함한다.
- [0037] 이러한 항체는 단일클론항체 및 이에 대한 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 TSPAN7에 특이적으로 결합하는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0038] 아타머는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표전 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 단일 가닥의(single-stranded) 핵산(RNA, DNA 또는 변형핵산)을 말한다.
- [0039] 또한, 본 발명에서, TSPAN7의 활성을 억제하는 물질은, TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드를 포함한다.
- [0040] 상술한 바와 같이, TSPAN7은 네 개의 막을 관통하는 도메인을 포함하고 있으며, 세포막 밖에 짧은 세포외 고리인 EC1과 긴 세포외 고리인 EC2, 그리고 세포막 안쪽에 짧은 N-말단과 C-말단을 갖고 있는 구조이다. 또한, EC2는 EC2의 접합구조에 중요한 이황화 결합을 형성하게 하는 Cys-Cys-Gly 아미노산의 잘 보존된 서열을 갖고 있으며, 다른 단백질들과 다양한 결합을 하는 부분으로 알려져 있다. N-말단과 C-말단은 TSPAN7 고유의 서열을 갖고 있는 부분인데, 이들은 짧은 길이임에도 불구하고 세포 골격화 단백질들과 세포 신호 단백질들과의 연결고리 역할과 같은 특정한 기능을 갖는 것으로 알려져 있다.
- [0041] 이에, 본 발명에서는 TSPAN7의 세포막 안쪽에 존재하는 N-말단 및 C-말단 꼬리 부분과 경쟁적 저해를 통하여 세포 골격화 단백질 또는 세포 신호 단백질들과의 상호작용을 억제시키기 위하여, TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드를 디자인하였고, 이들의 세포 투과를 용이하게 하기 위하여 세포 투과 서열을 융합시켰다.
- [0042] TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편은 TSPAN7의 세포막 안쪽에 존재 N-말단 및 C-말단 꼬리의 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, TSPAN7의 N-말단 단편은, TSPAN7 아미노산 서열(서열번호 1)의 1 번째 내지 16 번째 아미노산의 서열에서 선택되는 연속되는 5 내지 16개의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드일 수 있다. 또한, TSPAN7의 C-말단 단편은, 238번째 내지 249번째 아미노산의 서열에서 선택되는 연속되는 5 내지 12개의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드일 수 있다. 예를 들어, TSPAN7의 N-말단 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드(MASRRMETKPVITCLK)일 수 있고, TSPAN7의 C-말단 단편은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드(SRFITANQYEMV)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편은, 이들의 세포 투과를 용이하게 하기 위하여 상기 단편의 N-말단 또는 C-말단에 세포 투과 서열이 융합될 수 있다.
- [0044] 세포 투과 서열(cell-permeable sequence)은 특별한 수용체의 도움 없이 그 자체로 인지질 이중막인 세포막을 통과하여 세포 내로 이동 가능한 펩타이드 서열을 의미한다. 상기 세포 투과 서열로는 종래 알려진 서열들을 이용할 수 있다. 예를 들어, 이에 제한되지는 않으나, 인간 유래의 펩타이드인 Hph-1(서열번호 4, YARVRRRGPRR), Sim-2(서열번호 8, AKAARQAAR), R7(서열번호 9, RRRRRRR), Pep-1(서열번호 10, LETWWETWWTEWSQPKKKRKV), Pep-2(서열번호 11, KETWFETWTEWSQPKKKRKV), kFGF(서열번호 12, AAVALLPAVLLALLAP), HIV(human immunodeficiency

virus)의 Tat(서열번호 13, YGRKKRRQRRR), HSV(Herpes simplex virus)의 VP22(서열번호 14, DAATATGRSAASRPTRPRAPARSASAPRRPVE) 또는 초파리의 Antp(서열번호 15, RQIKIWFQNRRMKWKK) 등을 예시할 수 있다.

[0045] 또한, 상기 세포 투과 서열 및 이에 융합된 TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드는, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 또는 서열번호 6의 아미노산으로 이루어진 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 또한, 본 발명에서, TSPAN7의 활성을 억제하는 물질은, TSPAN7의 세포외 영역 및 Fc를 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

[0047] TSPAN7의 세포외 영역은, 세포막 밖에 존재하는 짧은 세포외 고리(loop)인 EC1, 긴 세포외 고리인 EC2 또는 이의 단편일 수 있다. 예를 들어, TSPAN7의 아미노산 서열(서열번호 1)의 113 번째 내지 214 번째 아미노산의 서열에서 선택되는 연속되는 50 내지 102개의 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드일 수 있다.

[0048] 본 발명에서 상기 TSPAN7의 세포외 영역을 포함하는 단편은 생체 내 안정성을 높이기 위하여 N-말단 또는 C-말단에 면역글로불린의 Fc 영역을 추가로 포함할 수 있다. Fc 영역은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게 CH2와 CH3 불변 도메인 전체 또는 일부를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 상기 TSPAN7-Fc의 예로는, 서열번호 7의 아미노산으로 이루어진 단백질을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] TSPAN7의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 세포에 주입하는 방법으로는 리포솜이나 유전공학적 기술인 벡터 시스템을 이용하는 방법 등 다양한 형태로 구현될 수 있다. 또는, 약제의 제제 형태로 제조하여 통상적인 방식으로 체내에 투여하는 방법이 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명의 조성물이 약학 조성물로 사용될 경우, 상기 조성물 내의 유효성분의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50중량%인 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0052] 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0053] 상기 약학 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함될 수 있다.

[0054] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg으로 하는 것이 좋으나 이에 제한되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 사용될 경우, 유효성분의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 식품이 음료인 경우에는 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명에서 식품은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게

는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기 식품 조성물은 식품 학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0057] 본 발명에 따른 조성물은 TSPAN7의 발현 또는 활성 억제로 인해 뼈의 성숙된 파골세포 형성과 골흡수 작용을 억제시킴으로써 뼈가 비정상적으로 분해되는 각종 골 질환을 예방, 치료 및/또는 개선하는 데 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 TSPAN7의 개략적인 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 골수에서 분리한 전구세포에 RANKL을 처리하여 파골세포로의 분화를 유도한 경우 Gene chip 분석을 통하여 TSPAN7의 mRNA 발현의 변화를 확인한 결과를 상대적 값으로 나타낸 것이다.

도 3은 세포 투과 서열로 구성된 펩타이드(control), 세포 투과 서열 C-말단에 TSPAN7의 N-말단 단편을 연결한 펩타이드(TSPAN7-N-terminus), 및 세포 투과 서열 C-말단에 TSPAN7의 C-말단 단편을 연결한 펩타이드(TSPAN7-C-terminus)의 구조체를 나타낸다.

도 4는 골수에서 분리한 전구세포가 파골세포로 분화되는 과정에서, M-CSF 30ng/ml 및 RANKL 100ng/ml와 함께, 세포 투과 서열로 구성된 펩타이드(control), 세포 투과 서열 C-말단에 TSPAN7의 N-말단 단편을 연결한 펩타이드(TSPAN7-N-terminus), 및 세포 투과 서열 C-말단에 TSPAN7의 C-말단 단편을 연결한 펩타이드(TSPAN7-C-terminus)를 각각 농도 별로 처리했을 때, 성숙된 파골세포의 형성을 억제하는 활성을 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 도 4의 결과에서 10개 이상 다핵을 갖는 성숙된 파골세포의 수를 정량화한 그래프를 나타낸다.

도 6은 TSPAN-Fc 단백질의 정제 결과를 나타낸다. 레인 1~3은 각각 BSA(bovine serum albumin) 0.5 μg, 1 μg, 2 μg에 대한 정제 결과를, 레인 4~6은 TSPAN-Fc 단백질의 정제 결과를 나타낸다.

도 7은 골수에서 분리한 전구세포가 파골세포로 분화, 성숙되는 과정에서, M-CSF 30ng/ml 및 RANKL 100ng/ml와 함께 TSPAN-Fc 단백질을 농도 별로 처리했을 때 성숙된 파골세포의 형성을 억제하는 활성을 TRAP 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸다. M-CSF는 M-CS(30ng/ml) 만 처리한 경우를, RANKL은 M-CSF와 RANKL(100ng/ml) 만 처리한 경우를, hIgG 는 M-CSF+RANKL에 인간 IgG(2.5 μg/ml)를 처리한 경우를 나타낸다.

도 8은 도 7의 결과에서 10개 이상 다핵을 갖는 파골세포의 수를 정량화한 그래프를 나타낸다. R은 M-CSF와 RANKL(100ng/ml)만 처리한 경우를, hIgG 는 M-CSF+RANKL에 인간 IgG(2.5 μg/ml)를 처리한 경우를 나타낸다.

도 9는 도 7의 결과에서 TRAP 효소 활성도 assay를 통하여 TRAP 활성도를 확인한 결과를 나타낸다. M은 M-CS(30ng/ml) 만 처리한 경우를, R은 M-CSF와 RANKL(100ng/ml)만 처리한 경우를, hIgG 는 M-CSF+RANKL에 인간 IgG(2.5 μg/ml)를 처리한 경우를 나타낸다.

도 10은 상아질 절편(dentin slice) 위에 M-CSF 및 RANKL 를 처리하여 파골세포 성숙과 골흡수를 유도하는 과정에서, hIgG(음성 대조군) 또는 TSPAN-Fc 를 처리한 경우 뼈의 흡수 정도를 헤마톡실린(hematoxylin) 염색으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 11은 도 10의 결과에서 상대적인 뼈 흡수 영역 비율을 정량화한 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0060] 실시예 1. 파골세포로의 분화·성숙 과정에서 TSPAN7 의 발현량 변화 확인

[0061] 4~5주된 C57BL/6 생쥐(이화여자대학교 실험동물유전체연구센터로부터 분양)의 다리뼈를 분리하였다. 무릎 뼈에서 떼어낸 대퇴골과 경골에 1ml 주사기를 이용하여 골수 내로부터 세포를 채취하였다. 채취한 골수 세포에 M-

CSF 30ng/ml를 처리하여 3일 후, 골수 유래 전구세포를 분리하였다. 분리한 전구세포를 3cm dish에 5×10^5 cells/well로 분주하고, M-CSF 30ng/ml 및 RANKL 100ng/ml을 처리 한 뒤, RANKL 처리 시간을 달리하여 세포를 수확하여 총 RNA를 분리하였다. 550ng 총 RNA를 이용하여 Ambion Illumina RNA Amplification Kit를 써서 cDNA를 합성하였고 Illumina에서 공급하는 Gene chip을 마이크로젠에 의뢰하여 분석하였다.

[0062] 위 Gene chip 의 결과로부터 TSPAN7 유전자는 세포분화인자 RANKL 처리 2일 째 부터 발현이 소량 증가하여, 3일 째에는 약 17.43배 과발현되는 것으로 확인할 수 있었다(도 2).

[0063] 실시예 2. TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드의 합성

[0064] TSPAN7 의 활성을 억제하기 위하여, TSPAN7의 N-말단과 C-말단의 아미노산 서열을 이용하여 TSPAN7 단편을 포함하는 펩타이드를 합성하였다. 실험에 사용한 펩타이드는 세포 투과를 용이하게 하기 위해 세포 투과 펩타이드 서열(서열번호 4)을 사용하였고, 그 C-말단에 TSPAN7의 N-말단 단편(서열번호 2) 또는 C-말단 단편(서열번호 3)을 연결하여, 결과적으로 각각 서열번호 5 및 서열번호 6의 펩타이드를 생성하였다. 도 3은 상기 펩타이드의 구조를 나타낸다.

[0065] 상기 펩타이드는 한국 대전에 위치한 펩트론에 의뢰하여 제작하였고, 상기 제조된 펩타이드는 아미노산 조성 분석(HPLC)과 질량 분석 스펙트럼에 의해 순수 분리되어 95% 이상의 순수성을 얻었다.

[0066] 실시예 3. TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드의 파골세포 형성 억제 효과 확인

[0067] 상기 실시예 2에서 제조된, TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드를 사용하여 파골세포의 형성이 억제되는 것을 확인해보았다.

[0068] 파골세포는 분화가 진행되면서 다핵의 전파골세포를 형성하지만 세포가 융합되면 다핵의 성숙 파골세포를 형성하게 되고 이는 뼈 표면에 부착하여 뼈를 흡수하는 작용을 한다. 또한, 파골세포는 TRAP 과 칼시토닌 수용체를 가지므로, TRAP 는 파골세포의 표지인자로 널리 사용되고 있다. 따라서, 본 발명에서는 TRAP 염색을 통하여 다핵의 파골세포의 정량을 통하여 파골세포의 분화 정도를 측정해보았다.

[0069] 이를 위하여, 4-5주된 C57BL/6 생쥐(이화여자대학교 실험동물유전체연구센터로부터 분양)의 다리뼈를 분리하였다. 무릎 뼈에서 떼어낸 대퇴골과 경골에 1ml 주사기를 이용하여 골수 내로부터 세포를 채취하였다. 채취한 골수 세포에 M-CSF 30ng/ml를 처리하여 3일 후, 골수 유래 전구세포를 분리하였다.

[0070] 전구세포를 48 well에 1.5×10^4 cells/well로 깔고, MCSF 30ng/ml, RANKL 100ng/ml와 함께 실시예 2에서 제조한 펩타이드를 각각 1.1, 3.3, 10, 30 μ M의 농도로 3일간 처리하였다. 배양액은 10% FBS(fetal bovine serum)의 α -MEM(α -minimum essential medium; HyClone, Logan, UT)을 사용하였다. 실험에 하기 전에 펩타이드는 PBS(phosphate buffered saline)에 1mM의 농도로 용해시켰다. 파골세포의 분화, 성숙 정도를 측정하기 위하여 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 염색을 하였고, TRAP 염색은 SIGMA에서 나온 키트(Acid Phosphatase, Leukocyt (TRAP) Kit)를 사용하였으며 15-20분 정도 염색하였다. TRAP 염색에서 핑크색을 나타내는 다핵세포의 수를 정량화하기 위하여, 염색 후 일정 면적 안에 존재하는 TRAP 양성이고 10개 이상의 핵을 포함하는 세포를 측정하였고, 이를 통하여 파골세포의 분화, 성숙 정도를 정량하였다.

[0071] 그 결과, 핑크색을 나타내는 다핵 파골세포의 수는, 양성대조군(세포 투과 서열로만 구성된 펩타이드)에 비하여, 실시예 2에서 제조한, TSPAN7의 N-말단 또는 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드를 처리했을 때 확연히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 4 및 도 5). 이러한 결과를 통하여, TSPAN7를 타겟으로 하는 펩타이드가 10개 이상의 핵을 포함하는 다핵을 갖는 성숙 파골세포의 형성을 억제함을 알 수 있었다.

[0072] 실시예 4. TSPAN7-Fc 의 합성

[0073] TSPAN7 의 활성을 억제하기 위하여, TSPAN7-Fc를 합성하였다. TSPAN7-Fc는 TSPAN7의 EC2 도메인의 서열(서열번호 1의 아미노산 서열에서 113번째부터 214번째 서열)을 사용하였다. TSPAN7 를 코딩하는 유전자의 염기서열에서 EC 도메인 부분을 클로닝하기 위해 제한효소 SalI과 SfiI을 사용하였고, 여기에 Fc 서열을 연결하였다.

TSPAN-Fc 의 아미노산 서열을 서열번호 7로 나타내었다.

[0074] TSPAN-Fc 단백질의 정제를 위하여, TSPAN-Fc DNA를 293F cell(invitrogen)에 트랜스펙션한 후 배양액에 녹아있는 단백질을 정제하였다. 293F cell의 배양액은 무혈청 배지(Serum Free media)인 GIBCO 1233801(㈜ 서린바이오사이언스)을 사용하였다. 보다 상세하게, 293F suspension cell을 5×10^5 cells/ml로 1L culture flask(CORNING, 431147 1L)에 뿌린 후, 다음날 1×10^6 cells/ml이 되면 100ml당 TSPAN-Fc DNA 200 μ g, PEI(polyethylenimine) 130 μ g 으로 DNA를 트랜스펙션하였다. 6일 정도 37°C, 8% CO₂ shaking 배양 후에 원심분리하여 cell은 버리고 배양액만 취하였다. 배양액은 protein G Agarose(pierce, #20399)을 통과시켜서 단백질이 비드에 붙도록 한 뒤 100mM Glycine buffer로 정제하였다.

[0075] 정제한 단백질은 비교군으로 BSA와 함께 10% SDS gel에 내려서 Coomassie blue 염색하였다. 레인 1~3은 BSA 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 레인 4~6은 BSA와 동량의 TSPAN-Fc 정제 단백질을 전기영동한 결과이다(도 6), 그 결과 TSPAN-Fc 단백질은 48 kDa 크기에서 전기영동된 것을 확인할 수 있었다.

[0076] 실시예 5. TSPAN7-Fc 의 성숙 파골세포 형성 억제 효과 확인

[0077] 상기 실시예 4에서 제조된, TSPAN7-Fc 를 사용하여 파골세포의 형성이 억제되는 것을 확인해보았다. 이를 위하여, 4~5주된 C57BL/6생쥐의 다리뼈를 분리하였다. 골수에서 분리한 전구세포(bone marrow macrophage)를 48 well에 2×10^4 cells/well로 깔고 M-CSF 30ng/ml 및 RANKL 100ng/ml을 3일 처리하면 파골세포가 분화, 성숙된다. 배양액은 10% FBS(fetal bovine serum)의 α -MEM(α -minimum essential medium; HyClone, Logan, UT)을 사용하였다. 음성대조군으로 hIgG(2.5 μ g/ml)을 처리하고 TSPAN-Fc 단백질은 농도를 다르게 희석하여(1, 0.3, 0.1 μ M의 농도) RANKL과 함께 3일간 처리하였다. 파골세포의 분화, 성숙도를 측정하기 위하여 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 염색을 하였고, TRAP 염색은 SIGMA에서 나온 키트(Acid Phosphatase, Leukocyt (TRAP) Kit)를 사용하였으며 15~20분 정도 염색하였다. TRAP 염색에서 핑크색을 나타내는 다핵세포의 수를 정량화하기 위하여, 염색 후 일정 면적 안에 존재하는 TRAP 양성이고 10개 이상의 핵을 포함하는 세포를 측정하였고, 이를 통하여 파골세포의 분화, 성숙 정도를 정량하였다. 또한 TRAP 양성반응을 나타내는 전체 세포수를 정량화 하기 위해 SIGMA에서 나온 tablet(4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, N2765-50TAB)으로 405nm에서 흡광도를 측정하여 TRAP 효소활성도 assay를 하였다.

[0078] TRAP 염색 결과, TSPAN-Fc 단백질의 처리 농도가 높을수록, 10개 이상의 핵을 포함하는 다핵을 갖는 성숙 파골세포의 수가 크게 감소함을 알 수 있었다(도 7 및 도 8). 또한 TRAP 효소활성도 assay를 통하여 전체 세포의 TRAP 양성 반응은 큰 차이가 없음을 알 수 있었다(도 9). TRAP 효소 활성도는 파골세포 분화의 표지인자로 범용되고 있는 것으로, TRAP 효소 활성도의 차이는 파골세포 분화의 차이를 나타낸다고 할 수 있다. 그러나 파골세포의 분화에는 차이 없이 다핵의 성숙된 파골세포의 수에 차이를 가져오는 경우가 있다. 본 발명의 TSPAN-Fc 단백질의 경우, 파골세포의 초기 분화에는 영향을 미치지 않아 TRAP의 효소 활성도에는 영향을 미치지 않으나, 성숙된 파골세포 형성을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있다.

[0079] 실시예 6. TSPAN7-Fc 의 뼈 흡수 억제 효과 확인

[0080] 골흡수 실험(Bone resorption assay)은 파골세포가 뼈 표면에 부착하여 뼈를 갉아먹는 정도(즉, 뼈를 흡수하는 작용)를 측정함으로써 세포의 활성도를 정량하는 실험이다.

[0081] TSPAN7-Fc 단백질에 의해 뼈의 파골 과정이 일어난 후 뼈의 소실의 정도를 측정하기 위해, 상아질 절편(dentin slice)(Immunodiagnostic Systems Ltd) 위에 파골세포를 8~9일 정도 분화, 성숙 시킨 후 뼈 흡수 정도를 측정하였다. 먼저 골수에서 분리한 전구세포(bone marrow macrophage)를 3cm dish에 1×10^5 cells/well로 깔고, M-CSF 30ng/ml 및 RANKL 100ng/ml을 처리하여 파골세포를 2~3일 정도 분화, 성숙 시켰다. 뼈의 손상 정도를 측정하기 위해 96 well에 상아질 절편(dentin slice)을 깔고 그 위에 분화된 파골세포(pre-osteoclast)를 2×10^4 cells/well로 깔고, M-CSF 30ng/ml 및 RANKL 100ng/ml과 음성대조군으로 hIgG(2.5 μ g/ml) 또는 TSPAN-F (1 μ g/ml)을 처리하여 파골세포를 5~6일 정도 더 분화 시켰다. 9일 뒤 dentin slice는 헤마톡실린(hematoxylin)으로 손상되어 파인 부분을 염색하여 파여진 홈의 면적을 측정하였다. 현미경으로 사진을 찍어서 대조군과 비교하

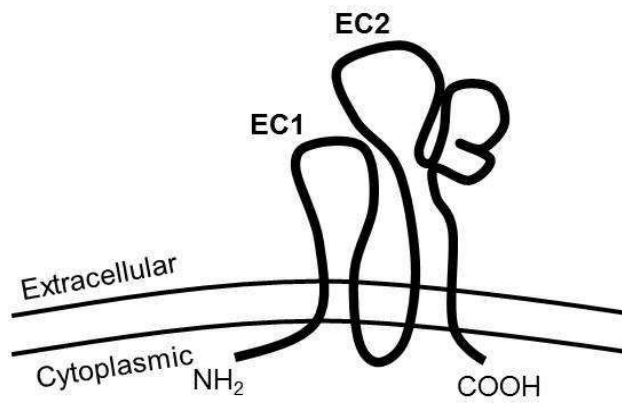
여 상대적 면적의 비율을 계산하였다.

[0082]

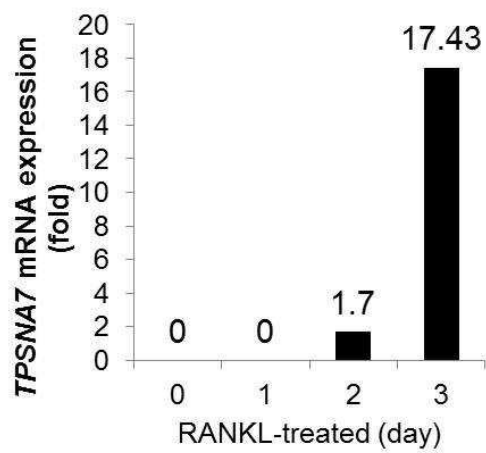
그 결과, 음성대조군인 RANKL 과 hIgG를 처리한 dentin slice의 뼈흡수 영역을 100%라 했을 때 TSPAN-Fc 단백질은 뼈의 흡수 활성도를 현저하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(도 10 및 도 11).

도면

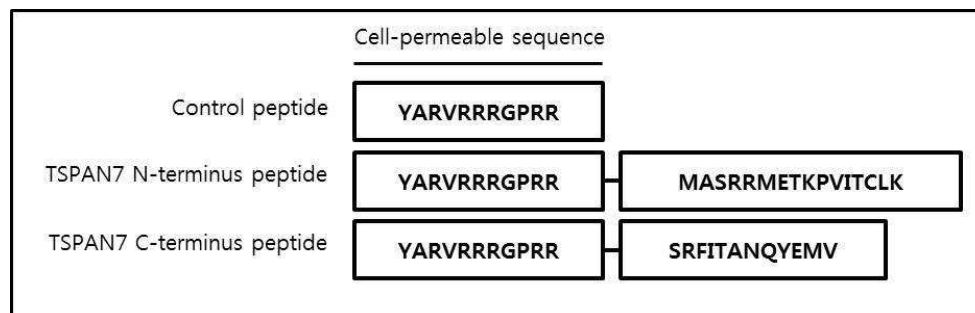
도면1



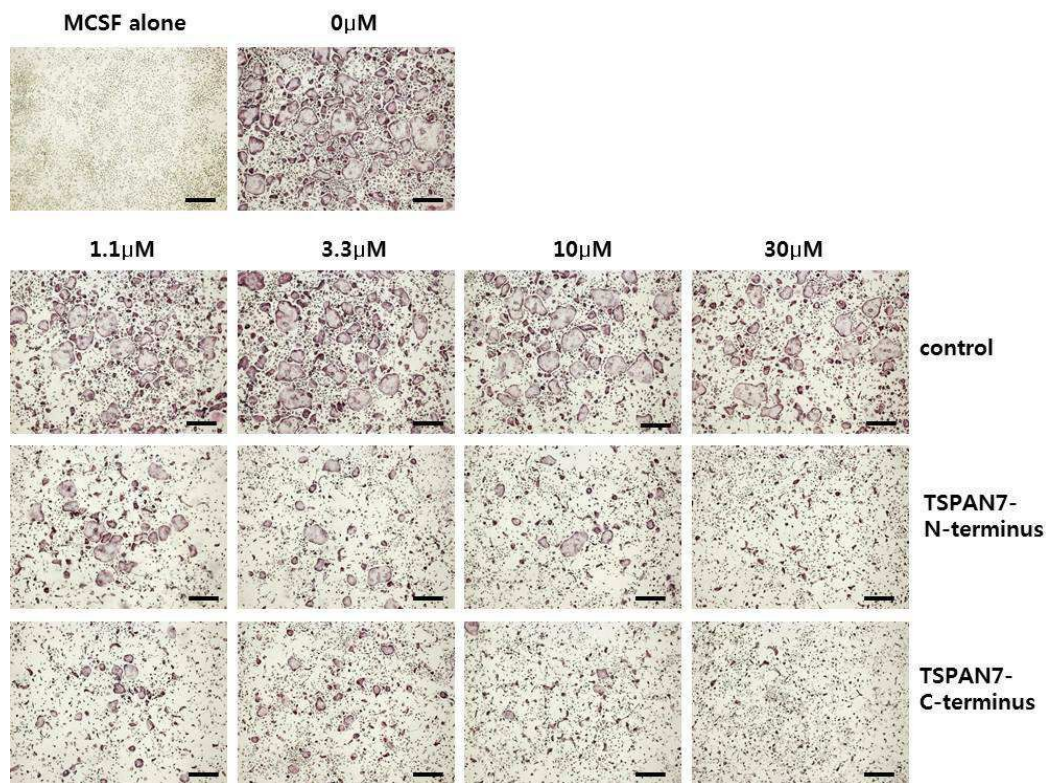
도면2



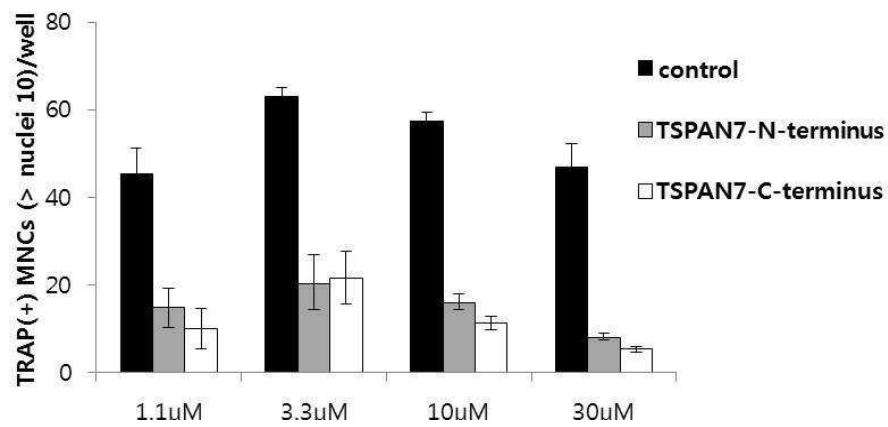
도면3



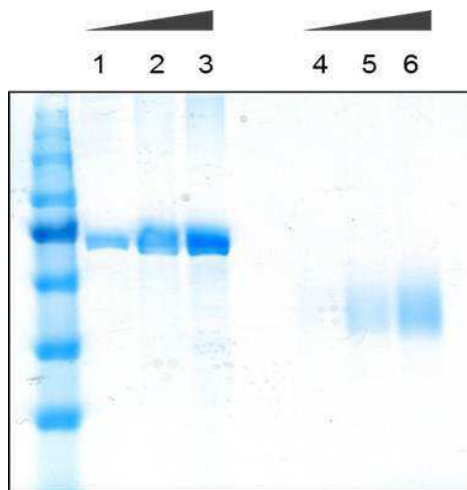
도면4



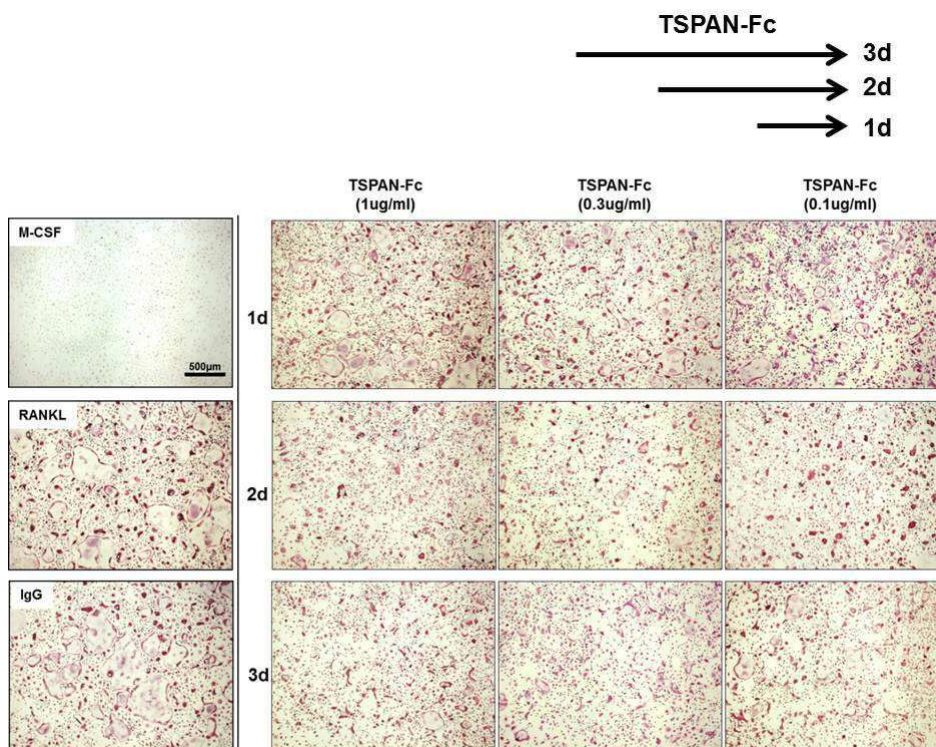
도면5



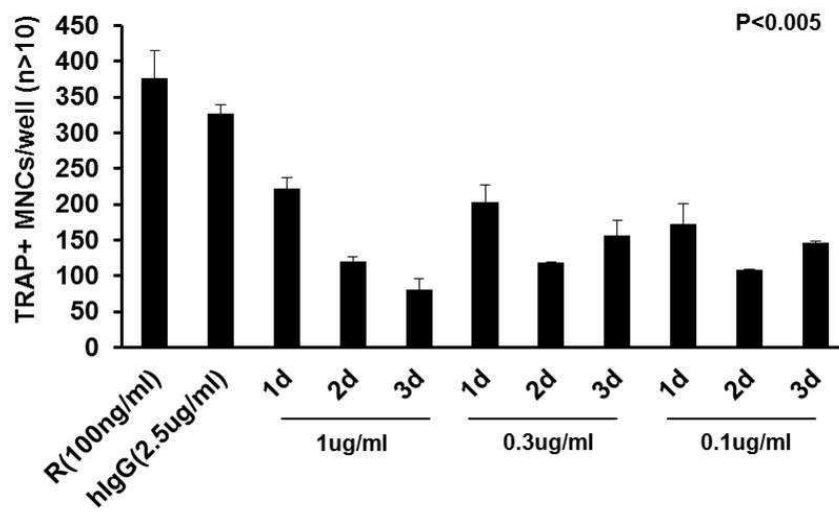
도면6



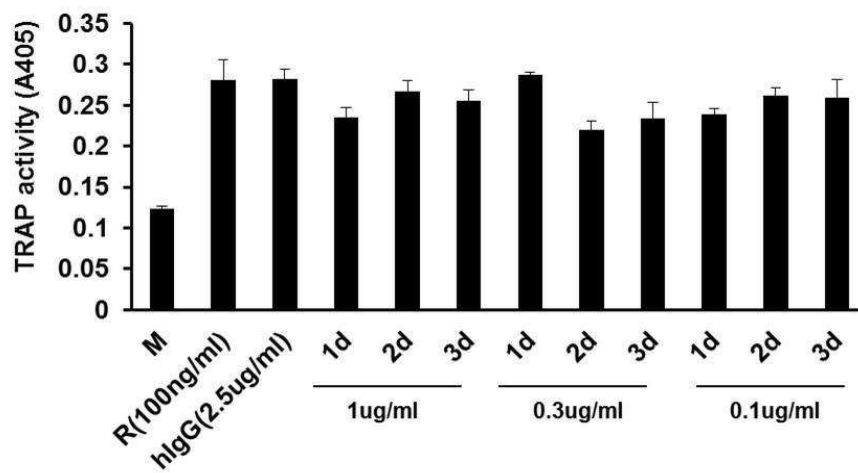
도면7



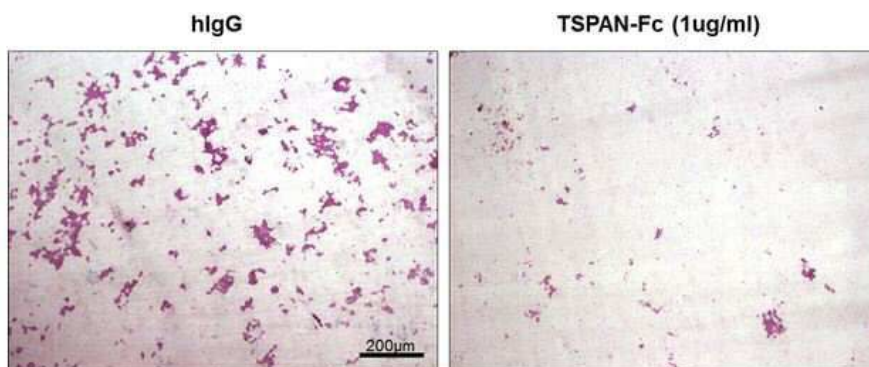
도면8



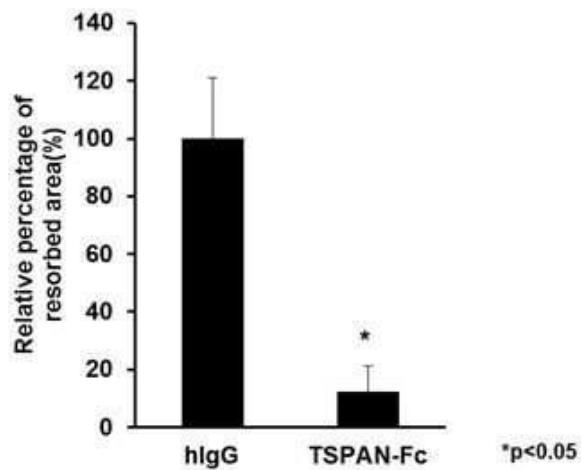
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Composition for treating bone diseases or inhibiting osteoclast formation comprising TSPAN7 inhibitor
- <130> DPP20151045KR
- <160> 15
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 249
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220><221> PEPTIDE
- <222> (1)..(249)
- <223> amino acid sequence of TSPAN7
- <400> 1

Met Ala Ser Arg Arg Met Glu Thr Lys Pro Val Ile Thr Cys Leu Lys
 1 5 10 15

Thr Leu Leu Ile Ile Tyr Ser Phe Val Phe Trp Ile Thr Gly Val Ile
 20 25 30

Leu Leu Ala Val His Val Trp Gly Lys Leu Thr Leu Gly Thr Tyr Ile
 35 40 45

Ser Leu Ile Ala Glu Asn Ser Thr Asn Ala Pro Tyr Val Leu Ile Gly
 50 55 60

Thr Gly Thr Thr Ile Val Val Phe Gly Leu Phe Gly Cys Phe Ala Thr
 65 70 75 80
 Cys Arg Gly Ser Pro Trp Met Leu Lys Leu Tyr Ala Met Phe Leu Ser

85 90 95
 Leu Val Phe Leu Ala Glu Leu Val Ala Gly Ile Ser Gly Phe Val Phe
 100 105 110
 Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg Thr Tyr Thr Asp Ala Met
 115 120 125
 Gln Asn Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val
 130 135 140
 Gln Arg Ser Leu Ser Cys Cys Gly Val Gln Asn Tyr Thr Asn Trp Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Pro Tyr Phe Leu Asp His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met
 165 170 175
 Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Leu Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala
 180 185 190
 Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys Tyr Asp Leu Val Thr Ser Phe
 195 200 205
 Met Glu Thr Asn Met Gly Ile Ile Ala Gly Val Ala Phe Gly Ile Ala
 210 215 220
 Phe Ser Gln Leu Ile Gly Met Leu Leu Ala Cys Cys Leu Ser Arg Phe

225 230 235 240
 Ile Thr Ala Asn Gln Thr Glu Met Val
 245

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-terminal fragment of TSPAN7

<400> 2

Met Ala Ser Arg Arg Met Glu Thr Lys Pro Val Ile Thr Cys Leu Lys
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C-terminal fragment of TSPAN7

<400> 3
 Ser Arg Phe Ile Thr Ala Asn Gln Tyr Glu Met Val
 1 5 10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell-permeable sequence Hph-1

<400> 4
 Tyr Ala Arg Val Arg Arg Arg Gly Pro Arg Arg
 1 5 10

<210> 5
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N-terminal fragment of TSPAN7 fused with Cell-permeable sequence

<400> 5
 Tyr Ala Arg Val Arg Arg Arg Gly Pro Arg Arg Met Ala Ser Arg Arg

1 5 10 15
 Met Glu Thr Lys Pro Val Ile Thr Cys Leu Lys
 20 25

<210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C-terminal fragment of TSPAN7 fused with Cell-permeable sequence

<400> 6
 Tyr Ala Arg Val Arg Arg Arg Gly Pro Arg Arg Ser Arg Phe Ile Thr

1 5 10 15
Ala Asn Gln Tyr Glu Met Val
20

<210

> 7

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSPAN-Fc

<400> 7

Arg His Glu Ile Lys Asp Thr Phe Leu Arg Thr Tyr Thr Asp Ala Met

1 5 10 15
Gln Asn Tyr Asn Gly Asn Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Asp His Val

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

35 40 45
Ser Ser Pro Tyr Phe Leu Asp His Gly Ile Pro Pro Ser Cys Cys Met

50 55 60
Asn Glu Thr Asp Cys Asn Pro Leu Asp Leu His Asn Leu Thr Val Ala

65 70 75 80
Ala Thr Lys Val Asn Gln Lys Gly Cys Tyr Asp Leu Val Thr Ser Phe

85 90 95
Met Glu Thr Asn Met Gly

100

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell-permeable sequence Sim-2

<400> 8

Ala Lys Ala Ala Arg Gln Ala Ala Arg

1 5

<210> 9

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell-permeable sequence R7
 <400> 9

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 10
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell-permeable sequence Pep-1
 <400> 10

Leu Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Lys Val
 20

<210> 11
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell-permeable sequence Pep-2
 <400> 11

Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Lys Val
 20

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cell-permeable sequence kFGF
 <400> 12

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell-permeable sequence Tat

<400> 13

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 14

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell-permeable sequence VP22

<400> 14

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr

1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Ala Pro Arg Arg Pro

20 25 30

Val Glu

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cell-permeable sequence Antp

<400> 15

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15