



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0167589
(43) 공개일자 2024년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0064576
(22) 출원일자 2024년05월17일
심사청구일자 2024년05월17일
(30) 우선권주장
1020230064672 2023년05월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
박석인
서울특별시 성북구 성북로10길 41, 401호
김중승
서울특별시 성북구 종암로23길 35 (종암동, 래미
안세레니티) 205동 901호
(74) 대리인
특허법인(유)화우
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 19 항

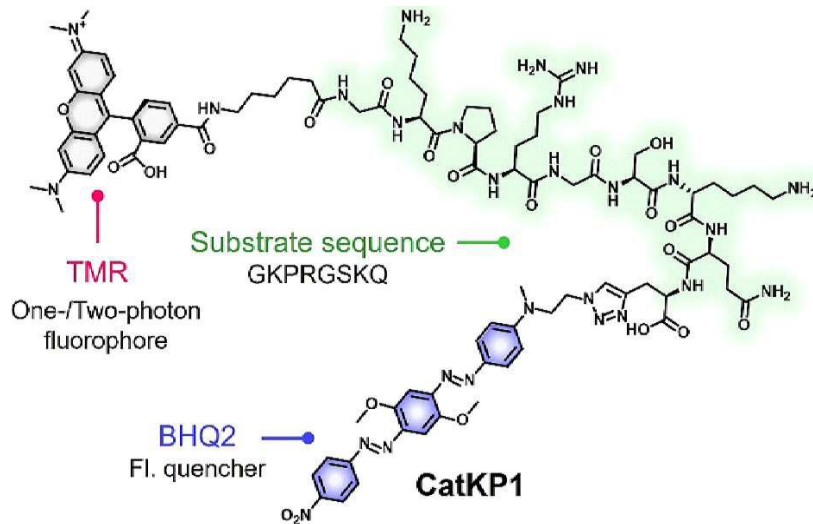
(54) 발명의 명칭 카텡신 K 활성 측정용 프로브 및 이를 포함하는 골 질환 진단용 조성물

(57) 요약

본 발명은 카텡신 K(cathepsin K) 활성 측정용 프로브, 상기 프로브를 포함하는 파골세포 활성 측정용 조성물, 상기 프로브를 포함하는 골 질환 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 파골세포 활성 측정용 키트, 골 질환 진단용 키트, 카텡신 K 활성 측정 방법, 파골세포 활성 측정 방법, 골 질환 진단방법, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝용 조성물 및 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의하면 파골세포에서 특이적으로 발현되는 카텡신 K의 활성을 측정하는 프로브를 설계하여 진단의 신속성 및 정확성을 높일 수 있는 바, 골 질환 진단 및 카텡신 K 활성 억제 약물 스크리닝에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2500/04 (2013.01)

G01N 2800/10 (2013.01)

(72) 발명자

구세영

서울특별시 마포구 마포대로 195 마포래미안푸르지
오 404동 2901호

이은정

경기도 남양주시 송산로307번길 16 별내하우스토리
5313동 1004호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711182967

과제번호 2020R1A2C101296614

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구(유형1-1)

연구과제명 유방암 골전이의 초기 진행 과정에서 암세포-조골세포-골수세포 상호 작용 규명

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 중심으로, 상기 폴리펩티드 양 말단에 형광체 및 소광체가 각각 접합되어 있는, 카텡신 K(cathepsin K) 활성 측정용 프로브.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형광체는 TAMRA(Carboxy tetramethylrhodamine), 플루오레세인(fluorescein), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(Oregon green), 텍사스 레드(Texas red), Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, 인도카르보사이아닌(indocarbocyanine), 로다민(rhodamine), 옥사카르보사이아닌(oxacarbocyanine), 티아카르보사이아닌(thiacarbocyanine), 메로사이아닌(merocyanine) 및 피코에리트린(phycoerythrin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 카텡신 K 활성 측정용 프로브.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 소광체는 BHQ2(black hole quencher 2), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher) 및 아이오와 블랙(Iowa black)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 카텡신 K 활성 측정용 프로브.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 프로브는 파골세포에서 특이적으로 발현되어 활성화되는 카텡신 K 효소에 의해 분해되어 형광이 복원되는 것인, 카텡신 K 활성 측정용 프로브.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 카텡신 K와 결합하여 절단되는 절단부위인 RG 서열을 포함하는 것인, 카텡신 K 활성 측정용 프로브.

청구항 6

제1항의 프로브를 포함하는, 파골세포 활성 측정용 조성물.

청구항 7

제1항의 프로브를 포함하는, 골 질환 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 류마티스성 골 질환, 골관절염, 치주질환, 염증성 골 질환, 골전이암(metastatic cancer) 및 파제트병(paget disease)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 골 질환 진단용 조성물.

청구항 9

제6항의 조성물을 포함하는, 파골세포 활성 측정용 키트.

청구항 10

제7항의 조성물을 포함하는, 골 질환 진단용 키트.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 류마티스성 골 질환, 골관절염, 치주질환, 염증성 골 질환, 골전이암(metastatic cancer) 및 파제트병(paget disease)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 골 질환 진단용 키트.

청구항 12

제1항에 따른 카텝신 K 활성 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 처리하는 단계; 및

상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 카텝신 K 활성 측정 방법.

청구항 13

제1항에 따른 카텝신 K 활성 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 투여하는 단계; 및

상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 파골세포 활성 측정 방법.

청구항 14

제1항에 따른 카텝신 K 활성 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 투여하는 단계; 및

상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 골 질환 진단 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 프로브는 파골세포에서 특이적으로 발현되어 활성화되는 카텝신 K 효소에 의해 분해되어 형광이 복원되는 것인, 골 질환 진단방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 류마티스성 골 질환, 골관절염, 치주질환, 염증성 골 질환, 골전이암(metastatic cancer) 및 파제트병(paget disease)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 골 질환 진단방법.

청구항 17

제1항의 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 유효성분으로 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝용 조성물.

청구항 18

다음의 단계를 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝 방법:

- (a) 카텡신 K 활성을 가진 시료에 후보물질을 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 후보물질이 처리된 시료에 대해, 제1항의 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 이용하여 카텡신 K 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 후보물질 처리 후 측정된 카텡신 K 활성이 감소하는 경우, 상기 후보물질을 카텡신 K 활성 억제용 약물로 판별하는 단계를 더 포함하는, 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 카텡신 K(cathepsin K) 활성 측정용 프로브, 상기 프로브를 포함하는 파골세포 활성 측정용 조성물, 상기 프로브를 포함하는 골 질환 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 파골세포 활성 측정용 키트, 골 질환 진단용 키트, 카텡신 K 활성 측정 방법, 파골세포 활성 측정 방법, 골 질환 진단방법, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝용 조성물 및 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 뼈(골)는 골형성(bone formation)을 담당하는 조골세포(osteoblast)와 골흡수(bone resorption)를 담당하는 파골세포(osteoclast)의 균형에 의해 동적 평형상태를 유지한다. 골다공증, 류마티스성 골 질환, 골관절염, 치주 질환, 염증성 골질환, 암의 골전이(cancer bone metastasis) 등의 여러 골질환에서는 골흡수가 골형성보다 압도적으로 우세하여 광범위한 골파괴(osteolysis)가 일어나게 되며, 이는 파골세포의 과형성, 과활성에 의해 일어나게 된다. 따라서, 파골세포를 억제하는 약물이 상기 골질환의 치료 전략으로 활용되며, 현재도 많은 신규 약물개발이 이루어지고 있다.

[0004] 파골세포는 여러 단핵구 전구세포의 융합으로 형성된 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 양성 다핵세포로서 뼈의 재흡수를 담당하며, 오래되거나 약해진 뼈를 제거하거나 혈중 미네랄의 항상성을 유지한다. 파골세포의 분화는 두 개의 사이토카인인 M-CSF(macrophage colony stimulating factor)와 RANKL(receptor activator of nuclear factor- κ (NF- κ) ligand)에 의해 조절된다. 면역세포/조골세포에서 생성되는 M-CSF는 파골세포 전구세포에서 RANK 발현 및 파골세포의 생존 신호를 유도하며, 조골세포/활성 T 세포에 의해 분비되는 RANKL는 파

골세포의 수용체 RANK와 결합하여 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 및 NFATc1의 활성화를 유도한다. 상기 NFATc1은 파골세포 형성의 핵심 전사 인자로서 TRAP, cathepsin K, DC-STAMP(dendritic cell-specific transmembrane protein)와 같은 파골세포 분화 및 활성화 인자의 발현을 조절한다.

[0005] 현재까지 파골세포의 과형성, 과활성화를 측정하기 위해 개발된 프로브들은 민감도가 낮고 신호 대 배경비율(signal-to-background)이 높아 대부분 *in vitro* 실험법에 사용되었고, *in vivo* 실험은 마우스, 랫트 등 동물 모델에서 파골세포의 과형성, 과활성화 등을 부검 뼈 조직을 염색하여 측정하는 방법으로 수행되고 있어, *in vivo*에서도 사용이 가능한 프로브를 개발하여 보다 정확한 측정방법의 연구가 절실한 실정이다.

[0006] 한편, 카텡신 K(cathepsin K, CatK)는 골 파괴 과정에서 파골세포에 특이적으로 발현되는 효소로, 배양 파골세포에서 카텡신 K의 활성을 분자 영상 이미지로 확인하거나 동물모델의 파골세포에서 분비되는 카텡신 K를 측정 및 관찰함으로써 파골세포의 활성도를 측정할 수 있다.

[0007] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 카텡신 K의 활성을 빠르고 정확하게 측정할 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 카텡신 K의 분해 표적 아미노산을 선정하고 양 말단에 형광체 및 소광체를 연결하여 카텡신 K 특이적 프로브를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2017-0001479호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 일 예시적 목적은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 중심으로, 상기 폴리펩티드 양 말단에 형광체 및 소광체가 각각 접합되어 있는, 카텡신 K(cathepsin K) 활성 측정용 프로브를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 프로브를 포함하는 파골세포 활성 측정용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 프로브를 포함하는 골 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 조성물을 포함하는 파골세포 활성 측정용 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 조성물을 포함하는 골 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 예시적 목적은 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 처리하는 단계; 및 상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 카텡신 K 활성 측정 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 투여하는 단계; 및

[0017] 상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 파골세포 활성 측정 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 투여하는 단계; 및

[0019] 상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 골 질환 진단방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 유효성분으로 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝용 조성물을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 다음의 단계를 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

- [0022] (a) 카텡신 K 활성을 가진 시료에 후보물질을 처리하는 단계; 및
- [0023] (b) 상기 후보물질이 처리된 시료에 대해, 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 이용하여 카텡신 K 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝 방법.
- [0024] 본 명세서에 개시된 발명의 기술적 사상에 따라 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 문제점을 해결하기 위한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제는 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0026] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0027] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 중심으로, 상기 폴리펩티드 양 말단에 형광체 및 소광체가 각각 접합되어 있는, 카텡신 K(cathepsin K) 활성 측정용 프로브를 제공한다.
- [0028] [서열번호 1]
- [0029] GKPRGSKQ
- [0030] 본 발명의 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.
- [0031] 대표적인 아미노산과 각각의 약어는, 알라닌(Ala, A), 이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 프롤린(Pro, P), 트립토판(Trp, W), 발린(Val, V), 아스파라긴(Asn, N), 시스테인(Cys, C), 글루타민(Gln, Q), 글리신(Gly, G), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 티로신(Try, Y), 아스파르트 산(Asp, D), 글루탐산(Glu, E), 아르기닌(Arg, R), 히스티딘(His, H), 리신(Lys, K)과 같다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩티드는 파골세포에서 특이적으로 발현되는 카텡신 K에 의해 잘리도록 설계된 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩티드는 카텡신 K와 결합하여 절단되는 절단부위인 RG 서열을 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩티드는 카텡신 K에 의해 효과적으로 분해되거나, 합성을 용이하게 하거나, 형광을 더 잘 발현할 수 있도록, 서열번호 1의 아미노산 서열 양 말단에 추가적인 아미노산 잔기를 더 포함할 수 있다. 형광-소광의 원리를 이용하여 검출이 가능한 범위 내에서는, 추가할 수 있는 아미노산 잔기의 수는 크게 제한되지 아니한다. 일 예시로, 전체 폴리펩티드의 서열은 20개 내외일 수 있다. 본 발명에 있어서, 형광체와 소광체가 1 내지 10 nm 이내에 함께 존재하는 경우, 형광-소광의 원리를 이용하여 검출이 가능하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩티드의 양 말단에 형광체 및 소광체가 각각 접합되어 있으며, 일 예로 상기 폴리펩티드의 N 말단에 형광체가, C 말단에 소광체가 접합되어 있을 수 있으며, 일 예로 상기 폴리펩티드의 N 말단에 소광체가, C 말단에 형광체가 접합되어 있을 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩티드 및 소광체 사이에 합성을 용이하게 하기 위한 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 상기 아미노산은 합성 아미노산인 프로파길글리신(propargylglycine, pra)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 용어 "카텡신 K(cathepsin K, CatK)"는 골 파괴 과정에서 파골세포에 특이적으로 발현되는 효소로, 배양 파골세포에서 카텡신 K의 활성을 분자 영상 이미지로 확인하거나 동물모델의 파골세포에서 분비되는 카텡신 K를 측정 및 관찰함으로써 파골세포의 활성도를 측정할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 파골세포에서 특이적으로 발현되어 활성화되는 카텡신 K 효소에 의해 분해되어 형광이 복원되는 것일 수 있다.
- [0039] 구체적으로, 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브는 소광체에 의해 형광이 소실되어 있으나, 카텡신 K 효소에 의

해 아미노산 펩티드가 절단되어 형광체와 소광체가 분리되어 거리가 멀어지면 소광효과가 사라지면서 형광체에 의해 형광을 발현하는 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 원리를 이용하여 카텡신 K를 검출한다.

- [0040] 본 발명의 카텡신 K 활성 측정용 프로브는 세포 내에 침투하여 활성화된 카텡신 K 효소만을 특이적으로 검출할 수 있기 때문에, 정확하고 민감한 측정이 가능하다. 따라서, 종래 카텡신 K의 활성을 측정하기 위해 사용되던 침습적 분석방법들에 비해 민감도가 높고 단시간 내 높은 효율로 카텡신 K 검출이 가능하여, 파골세포 과활성화와 연관된 여러 골 질환을 진단할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 형광체는 TAMRA(TMR, Carboxy tetramethylrhodamine), 플루오레세인(fluorescein), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(Oregon green), 텍사스 레드(Texas red), Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, 인도카르보사이아닌(indocarbocyanine), 로다민(rhodamine), 옥사카르보사이아닌(oxacarbocyanine), 티아카르보사이아닌(thiacarbocyanine), 메로사이아닌(merocyanine) 및 피코에리트린(phycoerythrin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 일 예로 TAMRA(TMR, Carboxy tetramethylrhodamine)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 일 예로, 상기 TAMRA는 여기(excited)시 750 내지 1000 nm의 파장을 흡수하고, 이에 따라 564 내지 585 nm 파장대의 형광을 나타낸다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 TAMRA는 작용기가 상이한 여러 유도체를 포함하는 것일 수 있으며, 예시적으로, 5(6)-TAMRA, 5-TAMRA, 6-TAMRA, 5-TAMRA-PEO3-amine, 5(6)-TAMRA-SE, 5-TAMRA SE, 6-TAMRA SE, 5-TAMRA-X SE, 5-TAMRA-PEO8 SE, 5-TAMRA-PEO12 SE, 5(6)-TAMRA-C5-maleimide 또는 TAMRA-MTS일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 소광체는 BHQ2(black hole quencher 2), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher) 및 아이오와 블랙(Iowa black)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 구체적으로 BHQ2일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 예시적으로 나열된 형광체 또는 소광체는 특정 파장대의 형광을 나타내거나 흡수하는 것으로 알려져 있어, 검출 대상이 되는 분자나 환경에 따라 적절한 형광체의 종류 및 소광체의 종류를 선택할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 일 예로, 상기 BHQ1은 480 내지 580 nm, BHQ2는 550 내지 650 nm, BHQ3는 620 내지 730 nm 파장대의 형광을 매우 효율적으로 흡수한다. 따라서, 형광체로 TAMRA를 사용할 경우, 상기 형광을 흡수할 수 있도록 BHQ2 소광체를 선택하는 것이 바람직하다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예로, 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브는 도 1의 구조식으로 표시되는 것일 수 있다.
- [0048] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는 골전이암 마우스 모델, 파골세포 과형성 마우스 모델 및 골다공증 마우스 모델에 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 도입하여 카텡신 K의 활성을 측정함으로써 과형성된 파골세포를 확인하였다.
- [0049] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 포함하는, 파골세포 활성 측정용 조성물을 제공한다.
- [0050] 상기 "카텡신 K" 및 "프로브"는 전술한 바와 같다.
- [0051] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 포함하는, 골 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0052] 상기 "카텡신 K" 및 "프로브"는 전술한 바와 같다.
- [0053] 본 발명의 용어 "골 질환"은 질환은 골다공증, 류마티스성 골 질환, 골관절염, 치주질환, 염증성 골 질환, 골전이암(metastatic cancer) 및 파제트병(paget disease)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 "진단"은 단순히 질환의 발병 유무를 판단하는 것 뿐만 아니라, 질환의 진행 정도를 모니터링 하거나 본격적인 발병 이전의 경미한 증상의 감지를 포함한다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할

수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0056] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 과골세포 활성화 측정용 조성물을 포함하는, 과골세포 활성화 측정용 키트를 제공한다.
- [0057] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 골 질환 진단용 조성물을 포함하는, 골 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0058] 상기 "골 질환"은 전술한 바와 같다.
- [0059] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 상기 카텝신 K 활성화 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 처리하는 단계; 및
- [0060] 상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 카텝신 K 활성화 측정 방법을 제공한다.
- [0061] 상기 "카텝신 K" 및 "프로브"는 전술한 바와 같다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 개체는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 생체로부터 유래된 시료, 일 예로, 생체로부터 분리되거나 또는 유전공학적으로 또는 조직공학적으로 얻어진 세포 또는 세포의 집합체, 조직 배양체 또는 바이오프린팅 기술 등을 통해 얻어진 각종 인공 생체 모델을 포함한다.
- [0064] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 카텝신 K 활성화 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 투여하는 단계; 및
- [0065] 상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 과골세포 활성화 측정 방법을 제공한다.
- [0066] 상기 "카텝신 K", "개체" 및 "시료"는 전술한 바와 같다.
- [0067] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 카텝신 K 활성화 측정용 프로브를 개체 또는 시료에 투여하는 단계; 및
- [0068] 상기 개체 또는 시료로부터 상기 프로브에 의한 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 골 질환 진단방법을 제공한다.
- [0069] 상기 "카텝신 K", "프로브", "골 질환", "진단", "개체" 및 "시료"는 전술한 바와 같다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 프로브의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 투여량은 성인 기준 1일 0.0001 mg/kg 내지 100 mg/kg, 구체적으로 0.001 mg/kg 내지 60 mg/kg일 수 있다.
- [0072] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 투여는 1일 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며, 시간의 간격을 두어 형광 배출 후 투여할 수 있고, 개체의 나이, 성별, 체중, 대사 작용, 현재 복용중인 다른 약물에 따라 적절히 증감하여 투여될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 카텝신 K 활성화 측정용 프로브는 유효량의 범위를 고려하여 제조하도록 하며, 제형화된 제제는 필요에 따라 약제의 투여를 감독하거나 관리하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법 및 제제법을 사용하거나 일정시간 간격으로 수 회 투여할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 투여는 상기 개체에 다양한 경로로, 예를 들면 경구 또는 복강내, 비강내, 직강내, 정맥내, 근육내, 피하, 뇌혈관내로 주사 등에 의해 투여될 수 있다.

- [0075] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 유효성분으로 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [0076] 본 발명의 일 구현예로, 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브는 골 질환을 수반하는 개체의 과형성된 파골세포에서 활성화된 카텡신 K 효소의 존재 유무, 활성, 활성 억제 등을 판별해낼 수 있어, 카텡신 K의 활성을 억제하는 약물의 스크리닝 목적으로 사용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 일 구현예로, 상기 약물 스크리닝 조성물은 생체 내(*in vivo*), 생체 외(*in vitro*) 모두에 적용이 가능하며, 신약 개발에 필요한 고성능 스크리닝(*high-throughput screening*) 방법 및 조기 질병 진단 등의 다양한 용도로 사용이 가능하다.
- [0078] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0079] (a) 카텡신 K 활성을 가진 시료에 후보물질을 처리하는 단계; 및
- [0080] (b) 상기 후보물질이 처리된 시료에 대해, 상기 카텡신 K 활성 측정용 프로브를 이용하여 카텡신 K 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 카텡신 K 활성을 억제하는 약물 스크리닝 방법.
- [0081] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 생체로부터 유래된 시료, 일 예로, 생체로부터 분리되거나 또는 유전공학적 또는 조직공학적으로 얻어진 세포 또는 세포의 집합체, 조직 배양체 또는 바이오프린팅 기술 등을 통해 얻어진 각종 인공 생체 모델을 포함한다.
- [0082] 본 발명에 있어서, 상기 후보물질 처리 후 측정된 카텡신 K 활성이 감소하는 경우, 상기 후보물질을 카텡신 K 활성 억제용 약물로 판별할 수 있다.
- [0083] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

발명의 효과

- [0085] 본 발명에 의하면 파골세포에서 특이적으로 발현되는 카텡신 K의 활성을 측정하는 프로브를 설계하여 진단의 신속성 및 정확성을 높일 수 있는 바, 골 질환 진단 및 카텡신 K 활성 억제 약물 스크리닝에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0087] 도 1은 본 발명의 카텡신 K 활성 측정용 프로브의 구조식을 나타낸 것이다.
- 도 2은 카텡신 K 활성 측정용 프로브의 제작과정(a) 및 그 구조식(b)을 개략적으로 나타낸 것이다 .
- 도 3는 카텡신 K 활성 측정용 프로브의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 4는 카텡신 K 활성 측정용 프로브의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 나타낸 것이다(a : CatKP1, b : CatKP2, c : CatKP3).
- 도 5는 마우스의 경골 파골세포를 이광자 현미경을 사용하여 관찰하는 과정(a) 및 카텡신 K로 프로브가 절단되는 과정(b)을 간략하게 나타낸 것이다.
- 도 6은 CatKP1의 카텡신 K와 배양에 따른 UV-vis 흡수(a, b)/방출(c) 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 7은 CatKP2 또는 CatKP3의 카텡신 K와 배양에 따른 UV-vis 흡수(a 및 b)/방출(c 및 d) 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 8은 카텡신 K 유무에 따른 CatKP1, CatKP2 또는 CatKP3의 형광 강도(a) 및 초기 속도(b)를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 9은 CatKP1, CatKP2 및 CatKP3의 분자 도킹 시뮬레이션에 따른 결합 자세(a 내지 c) 및 각 물리적 파라미터

값을 나타낸 것이다.

도 10은 카텡신 K 농도에 따른 CatKP1의 형광 강도를 선형 그래프로 나타낸 것이다.

도 11은 CatKP1의 Michaelis-Menten 그래프를 나타낸 것이다.

도 12는 카텡신 K의 농도별로 CatKP1의 형광 강도를 나타낸 것이다 .

도 13은 CatKP1의 카텡신 K와 반응 전후의 HPLC(a) 및 ESI-MS(b 및 c) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 ODN 농도에 따른 CatKP1의 형광 강도를 그래프로 나타낸 것이다.

도 15는 CatKP1의 파골세포에 대한 세포 독성을 확인한 것이다.

도 16는 배양 파골세포에서 형광 현미경을 통해 카텡신 K 활성을 확인한 결과이다(a: 카텡신 K가 발현되지 않는 경우 프로브 형광이 관찰되지 않은 모습, b: 카텡신 K가 발현되어 프로브의 형광이 관찰된 모습).

도 17은 배양 파골세포에서 CatKP1를 이용해 카텡신 K 활성을 확인한 결과이다.

도 18은 세포 유형에 따른 CatKP1의 형광 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 19는 텐틴 슬라이스에서 배양된 파골세포에 카텡신 K 항체(a) 또는 CatKP1 (b) 처리에 따른 공초점 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 20은 텐틴 슬라이스에서 분화된 파골세포 내에 CatKP1 처리에 따른 형광의 세포 내 공간적 위치를 공초점 이미지(a 및 c) 및 z-투영 이미지(Z-projection image)(b 및 d)를 나타낸 것이다.

도 21은 골전이암 마우스 모델의 경골(a) 및 근육(b)에 CatKP1 처리하는 과정을 간략하게 나타낸 것이고, 경골(c) 및 근육(d)에서 파골세포를 이광자 현미경 이미지로 확인한 결과이다.

도 22a는 골전이암 마우스 모델에서 종양이 없는 경골의 이광자 현미경 이미지를 나타낸 것이고, 도 22b는 Csf1r-EGFP 형질전환 마우스에 CatKP1 처리 후의 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 23은 파골세포 과형성 마우스 모델의 제조과정을 간략하게 나타낸 것이다.

도 24a는 파골세포 과형성 마우스 모델에 CatKP1 처리 후의 마우스 장기 사진을 나타낸 것이고, 도 24b는 각 장기의 횡단면 z-stack 이미지를 나타낸 것이다.

도 25는 다광자 현미경으로 카텡신 K 유무에 따른 형광을 모니터링한 결과이다.

도 26a는 CatKP1 처리 후 시간(40, 60, 80, 100 및 120분)에 따른 골단(1) 및 소주골(2)에서 이광자 현미경 이미지를 관찰한 것이고, 도 26b는 소주골에서 형광강도를 그래프로 나타낸 것이고, 도 26c는 CatKP1 처리 후 24 시간 및 재처리 후의 생체 내 이광자 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 27은 파골세포 과형성 마우스 모델에서 H&E 염색에 따른 현미경 이미지 및 BV(뼈 부피)/TV(조직 부피)를 그래프로 나타낸 것이다.

도 28a는 골다공증 마우스 모델의 자궁 이미지 및 측정된 자궁의 무게를 나타낸 것이고, 도 28b는 골다공증 마우스 모델의 경골 현미경 이미지 및 BV(뼈 부피)/TV(조직 부피)를 그래프로 나타낸 것이다.

도 29a는 골다공증 마우스 모델의 제조과정을 간략하게 나타낸 것이고, 도 29b는 OVX 시행 후(4, 6 및 8 주)에 과형성된 파골세포를 확인한 결과이고, 도 29c는 ZA 처리에 따른 파골세포의 감소를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0090] 실시예 1: 카텡신 K 특이적 프로브 제조

[0091] 1.1. TMR-pep 준비

[0092] 카텡신 K 프로브(CatKP1, CatKP2 및 CatKP3)의 제조 과정은 도 2a에 개략적으로 나타내었다. 카텡신 K(CatK)를

검출하기 위한 이광자 FRET 기반 프로브를 개발하기 위해, TAMRA(TMR) 형광체 및 BHQ-2를 FRET 쌍으로 선택하였다. TMR은 750~1000nm 범위의 이광자에 의해 자극될 때 탁월한 밝기를 가지며, BHQ-2는 TMR 형광을 효율적으로 소광시킨다. 폴리펩티드 서열은 카텡신 K에 대한 선택성과 반응성을 고려하여 후보 서열을 선별한 후, 카텡신 K 민감 펩티드 서열을 KPRGSKQ 및 HPGGPQ로 선택하였다.

[0093] 이후, 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 폴리펩타이드(pep1, pep2 및 pep3)의 N-말단 부분에 TAMRA(TMR) 형광체 (Fluorophore)가 탄소사슬로 연결되고 C-말단 부분에 합성아미노산(unnatural amino acid)인 프로파질 글라이신 (Propargylglycine, Pra)이 도입된 TMR-pep1, TMR-pep2 및 TMR-pep3를 설계한 후, (주)바이오닉스에 의뢰하여 구입하였다. 상기 프로파질 글라이신과 서열번호 1 및 서열번호 3의 N-말단의 글리신은 펩타이드 서열의 구조적 유연성과 다양성을 향상시키기 위해 도입하였다.

[0094] [서열번호 1]

[0095] GKPRGSKQ

[0096] [서열번호 2]

[0097] KPRGSKQ

[0098] [서열번호 3]

[0099] GHPGGPQ

[0101] 1.2. BHQ-2 준비

[0102] 소광체인 BHQ-2-azide는 두 단계 반응을 통해 합성되었다.

[0103] 1) 2-(N-Methylanilino)ethanol을 dry TEA 첨가 하에 Mesyl chloride(MsCl)와 상온에서 1시간 반응시켰다. Brine과 DCM 용매로 washing하여 불순물을 Brine으로 제거하고 DCM 용액을 모아 증발기(evaporator)를 통해 용매를 제거하였다. 얻어진 반응 중간체와 NaN_3 를 고온에서 5시간동안 반응시키고 용매 제거 후 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 얻었다. 고정상으로 실리카겔 60(70-230 메쉬)을 사용하였다. 분석용 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography)는 60 실리카겔(0.25mm 두께의 pre-coated sheet)을 사용하였다.

[0104] 2) 상기 1) 단계에서 합성된 아닐린 구조와 Fast Black K salt를 NaOAc buffer:ACN=1:1 조건에서 반응시키고 생성된 침전물을 필터로 정제하여 생성물(N3-BHQ2)을 얻었다.

[0106] 1.3. 카텡신 K 특이적 프로브(CatKP1, CatKP2 및 CatKP3) 제조

[0107] CatKP1의 제조과정은 아래와 같다. 상기 1.1과 1.2에서 제조된 TMR-pep1(0.01mmol)과 N3-BHQ2(0.03mmol)를 1mL의 DMSO에 용해시켰다. 아스코르브산나트륨(Sodium ascorbate, 0.02mmol)과 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01mmol)를 각각 0.1mL의 탈이온수에 별도로 용해시켰다. 각 용액을 Ar 가스로 10분 동안 퍼지(purge)하고, 모든 용액을 함께 혼합한 후 주위 온도에서 5시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 Strata C18-E(55mm, 70 Å)를 사용하여 여과하고 crude product를 C18 컬럼(5 µm, 250 x 20 mm)을 고정상으로 사용하여 HPLC로 정제하였다. 용매 A(0.1% TFA를 함유한 아세토니트릴) 및 용매 B(0.1% TFA를 함유한 탈이온수)를 이동상으로 사용하였다. CatKP1은 21.4분에 용출되었다(용출 조건: 용매 A 를 20분 동안 20-45%로 처리하고, 5분 동안 45-100%로 처리하고, 5분 동안 100-20%로 처리).

[0109] CatKP2의 제조과정은 TMR-pep1 대신 TMR-pep2를 사용한다는 점을 제외하고 상기 CatKP1 제조과정과 동일한 절차에 따라 합성되었다. 생성된 혼합물을 Strata C18-E(55mm, 70 Å)를 사용하여 여과하고 crude product를 C18 컬럼(5 µm, 250 x 20mm)을 고정상으로 사용하여 HPLC로 정제하였다. 용매 A(0.1% TFA를 함유한 아세토니트릴)와 용매 B(0.1% TFA를 함유한 탈이온수)를 이동상으로 사용하였다. CatKP2는 25.2분에 용출되었다(용출 조건: 용매 A 를 27분 동안 30 내지 38%로 처리하고, 3분 동안 38 내지 100%로 처리하고, 5분 동안 100%로 처리하고, 2분 동안 100-30%로 처리).

- [0111] CatKP3 제조과정은 TMR-pep1 대신 TMR-pep3을 사용한다는 점을 제외하고 CatKP1 제조과정과 동일한 절차에 따라 합성되었다. 생성된 혼합물을 Strata C18-E(55mm, 70Å)를 사용하여 여과하고 crude product를 C18 컬럼(5μm, 250 x 20mm)을 고정상으로 사용하여 HPLC로 정제하였다. 용매 A(0.1% TFA를 함유한 아세토니트릴) 및 용매 B(0.1% TFA를 함유한 탈이온수)를 이동상으로 사용하였다. CatKP3은 29.1분에 용출되었다(용출 조건: 용매 A를 30분 동안 30 내지 45%로 처리하고, 3분 동안 45-100%로 처리하고, 9분 동안 100%로 처리하고, 3분동안 100-30%로 처리).
- [0112] 제조된 카텡신 K 프로브의 구조식을 도 2(b)에 간략하게 나타내었다. 서열번호 1, 2 및 3을 포함하는 프로브는 각각 CatKP1, CatKP 및 CatKP3으로 표시하였다.
- [0114] **실시예 2. 제조된 카텡신 K 프로브의 특성 분석**
- [0115] **2.1. 제조된 카텡신 K 프로브의 성분 분석**
- [0116] 실시예 1에서 제조된 카텡신 K 프로브(CatKP1, CatKP 및 CatKP3)들을 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, YL9100, Dr. Maish GmbH ReproSil 100 C 18, 5μm(250 X 20mm) 컬럼 사용) 및 MALDI-TOF/MS(MALDI-TOF/TOF제 5800 시스템(AB SCIEX), 한국기초과학지원연구원, Seoul, Korea)를 이용하여 그 성분을 분석하였다. 데이터는 평균 ± SEM로 표시하였고, GraphPad Prism제 버전 10.0을 사용하여 통계 분석을 수행하였고, 통계적 유의성은 Tukey의 사후 분석을 사용한 일원 분산 분석에 의해 결정되었다. 이는 하기 실시예에서 모두 공통된다.
- [0117] 구체적으로, 각각의 카텡신 K 프로브의 HPLC 크로마토그래피는 550nm에서 측정되었고, 각 샘플은 1% DMSO(디메틸설폭사이드) 수용액으로 준비한 후 분당 1mL의 유속으로 용출시켰다. 용매 A(0.1% TFA를 함유한 acetonitrile) 및 용매 B(0.1% TFA를 함유한 탈이온수)를 이용하여 이동상 그라디언트 방식에 따라, 용매 A를 15분 동안 30%에서 45%까지 증가시키고, 5분 동안 45%에서 100%까지 증가시키고, 5분 동안 100%로 유지시켰다. 그 결과는 도 3에 나타내었다. 그 결과, CatKP1 및 CatKP2는 13.3 min, CatKP3는 17.0min 에서 용출됨을 확인하였다. 또한, 세개의 프로브 모두 정제가 잘 되었음을 HPLC 크로마토그래피로 확인하였다. 이와 관련하여, CatKP1, CatKP2는 펩타이드 서열이 유사하고 친수성 아미노산(특히, 양전하 아미노산 3개)이 여러개 포함된 반면, CatKP3는 펩타이드 서열이 상이하고 친수성 아미노산(특히, 양전하 아미노산 1개)이 적은 바, 펩타이드 서열 상이성에 따라 전체 분자의 친수성 정도가 달라질 수 있음을 HPLC 용출시간의 차이를 통해 예상되었다.
- [0118] MALDI-TOF/MS 스펙트럼은 한국기초과학지원연구원(Seoul, Korea)의 MALDI-TOF/TOF제 5800 시스템(AB SCIEX)을 이용하여 분석하였다. 스펙트럼은 양이온 모드에서 얻어졌다.
- [0119] 그 결과는 도 4(a: CatKP1, b: CatKP2 및 c: CatKP3)에 표시하였다. CatKP1의 MALDI-TOF MS를 통해 얻은 m/z 계산값은 $C_{94}H_{124}N_{27}O_{21}+$ 의 경우 1967.95이고, 실제 찾은 값은 1967.9623였다. CatKP2의 MALDI-TOF MS를 통해 얻은 m/z 계산값은 $C_{92}H_{121}N_{26}O_{20}+$ 의 경우 1909.9250이고, 실제 찾은 값은 1909.9366였다. CatKP3의 MALDI-TOF MS를 통해 얻은 m/z 계산값은 $C_{86}H_{100}N_{23}O_{19}+$ 의 경우 1758.7566이고, 실제 찾은 값은 1758.6851였다. 즉, 각각의 카텡신 K 프로브(CatKP1, CatKP 및 CatKP3)은 모두 예측한 m/z(질량/전하)와 일치함을 확인하였다.
- [0121] **2.2. 카텡신 K 프로브의 효소학적 특성 분석**
- [0122] FRET의 효율성은 형광체와 소광체 사이의 공간적 근접성에 따라 달라진다. 따라서, 카텡신 K에 의한 카텡신 K 프로브의 가수분해로 형광체와 소광체 사이의 공간적 접근성이 멀어짐에 따라 형광체가 형광을 회복할 것으로 예상되었다. 즉, 본 발명자들은 제조된 프로브는 소광체(BHQ2)에 의해 형광이 소실되어 있으나, 카텡신 K에 의해 기질 아미노산 펩티드가 절단되면 TMR(TAMRA) 형광체의 형광이 나타나 카텡신 K 효소 활성도를 측정할 수 있을 것으로 예측하였다. 도 5a에 생체 내에서 마우스의 경골(tibia, 정강이 뼈) 파골세포를 이광자 현미경(intravital two-photon microscopy)을 사용하여 관찰하는 과정을 개략적으로 표시하였고, 도 5b에 카텡신 K 프로브의 화학적 구조 및 카텡신 K로 프로브가 절단되는 과정을 개략적으로 표시하였다. 이를 확인하기 위해 하기 실험을 진행하였다.

[0124] **2.2.1. 카텡신 K 유무에 따른 카텡신 K 프로브의 형광 확인**

[0125] 먼저, 카텡신 K 존재 하에서 UV/Vis 흡수 및 방출 스펙트럼 및 형광 스펙트럼을 관찰하였다. UV/Vis 흡수 및 방출 스펙트럼은 Jasco V-750 분광 광도계(spectrophotometer)를 이용하였고, 형광 스펙트럼은 Jasco FP-8500 분광 형광계를 이용하여 측정하였다. UV/Vis 및 형광 측정을 위해 CatKP의 2.5mM DMSO 스톱 용액을 구성하고 각 용액상 분석에 적합한 농도로 희석하였다. 50mM MES 완충액(pH 5.5, 5mM DTT, 2.5mM EDTA 포함)에서 CatKP1(2.5 μ M)의 스펙트럼은 카텡신 K(50 nM)를 처리하고 2시간 동안 배양하였고, CatKP2(2 μ M) 및 CatKP3(2 μ M)의 스펙트럼은 카텡신 K(20 nM)를 처리하고 4시간 동안 배양하였다. 프로(pro)-카텡신 K(Enzo Life Sciences #ALX-201-239-C010)는 실험 직전에 권장 프로토콜에 따라 활성화시켰다. 활성(active)-카텡신 K와 반응시 카텡신 K 프로브를 590nm에서의 형광 강도를 마이크로플레이트 판독기(Hidex Sense)를 사용하여 시간 함수(λ_{ex} : 544nm, Excitation 및 emission 조리개 1mm)로 기록하였다. Prism 소프트웨어를 사용하여 초기 속도 테이터로부터 운동 매개변수를 추출하였다. 아울러, Two-photon excitation system을 이용한 형광 측정을 위해 100nm의 활성-카텡신 K(SRP6561, Sigma)와 2시간 동안 반응시켰을 때 CatKP1(2.5 μ M)의 400 내지 800nm에서의 형광 강도를 microplate readers(Hidex Sense)로 관찰하였다.

[0126] 그 결과, CatKP1은 450 내지 600nm 범위의 넓은 흡수 밴드가 나타났고, 37°C에서 카텡신 K와 함께 배양한 후 흡수 스펙트럼의 최대값은 554nm이고 숄더(shoulder)는 약 520nm인 새로운 패턴이 나타났다(도 6a). 이는 TMR-pep1과 N3-BHQ2 스펙트럼의 단순 중첩과 매우 유사하여, CatKP1 구조 내에 TMR-pep과 N3-BHQ2 흡수단이 포함됨을 확인하였다(도 6b). 또한, 초기에는 CatKP1의 형광이 거의 감지되지 않았지만, 카텡신 K에 노출된 경우 585nm에서 약 73의 꺼짐/켜짐(off/on) 비율로 상당한 형광 향상이 발생하였다(도 6c). 반면에, CatKP2은 CatKP1과 유사한 패턴을 보였으나(도 7a 및 도 7c), CatKP3은 카텡신 K에 대해 비교적으로 반응이 제한적으로 나타남을 확인하였다(도 7b 및 도 7d).

[0127] 추가적으로, 카텡신 K(20nM)의 유무에 따른 CatKP1, CatKP2 또는 CatKP3의 형광 강도를 관찰하였다. 그 결과, 카텡신 K가 존재하지 않는 경우 CatKP1, CatKP2 및 CatKP3는 모두 형광이 거의 증가하지 않았다(도 8a의 카텡신 K가 존재하지 않는 경우에는 CatKP1, CatKP2 및 CatKP3의 그래프가 중첩되어 CatKP1의 그래프만이 표시됨). CatKP3의 형광 강도가 가장 낮게 측정되어 CatKP1 또는 CatKP2보다 활성화 가능성이 현저히 낮다는 것이 관찰되었다(도 8a). 또한 카텡신 K의 처리에 따른 형광 활성화의 초기 속도가 CatKP2 및 CatKP3는 CatKP1보다 현저히 낮은 것으로 관찰되었다(도 8b).

[0129] **2.2.2. 카텡신 K 프로브의 분자 도킹 시뮬레이션**

[0130] CatKP1, CatKP2 및 CatKP3의 분자 도킹 시뮬레이션을 수행하였다. Autodock Vina로 카텡신 K(5TDI)의 활성 부위에서 CatKP1(도 9a), CatKP2(도 9b) 및 CatKP3(도 9c)의 결합 자세(pose)를 예측하였다. 또한, 물리적 매개변수 및 계산된 결합 에너지를 나타냈다(도 9d). 구체적으로, CatKP의 화학적 3D 구조 Chem 3D에 의해 얻었고, Human CTSK의 결정 구조는 PDB 은행(PDB entry: 5TDI)에서 얻었다. 최적화된 구조(리간드)는 Autodock Vina를 통해 표적 효소(수용체)에 도킹되었다. Autodock Vina 방법의 경우 격자 크기는 70.7716 X 85.3822 X 60.8986(center = 7.016-2.683-18.896)으로 설정되었다. PyMOL 2.5.4에 의한 결합 모델 분석을 위해 최상의 리간드 자세가 선택되었다. CatKP의 LogD 값은 Chemaxon의 Marvin 23.16.0을 사용하여 계산하였다.

[0131] 분자 도킹 시뮬레이션 결과로부터, CatKP1과 CatKP2는 단 하나의 글리신 잔기만이 다르다는 점을 감안할 때 펩타이드 결합의 절단을 위한 촉매 부위에서 기질의 최적 방향에 대한 약간의 교란으로 인해 상기 CatKP1에서 가장 높은 효소 반응이 발생한 것으로 사료되었다(도 9a 및 도 9b). 또한, CatKP3은 CatKP1과 뚜렷하게 다른 펩타이드 서열을 가지고 있고, 더 적은 수의 양전하된 아미노산(positively charged AA) 및 더 높은 LogD 값의 물리적 특성의 차이를 가지고 있으므로, 이로 인해 카텡신 K 촉매 부위에 대한 친화도에 큰 영향을 미친 것이 확인되었다. 또한, CatKP3는 카텡신 K에 대한 가장 낮은 결합 에너지(Binding energy)를 나타내어 CatKP3의 가장 낮은 효소 반응을 뒷받침하는 증거를 제공한다(도 9c).

[0132] 즉, 상기 실시예로부터, 펩타이드의 서열 뿐만 아니라 펩타이드 서열의 끝에 접합된 염료의 구조가 카텡신 K 프로브의 활성화 동역학에 영향을 미침을 확인하였다. 따라서, 이하에서는 제작된 카텡신 K 프로브 중 카텡신 K에 대한 효소 활성이 가장 우수한 CatKP1만을 본 발명의 카텡신 K 특이적 프로브로 선택하여 카텡신 K 활성화 측정에 대한 실험을 수행하였다.

[0134] **2.2.3. 카텡신 K에 따른 카텡신 K 프로브의 형광 강도 측정**

[0135] 추가적으로, 카텡신 K 농도에 따른 CatKP1(2.5 μM)의 형광 강도와 카텡신 K 수준 사이의 선형 관계를 도 10에 그래프로 나타내었다. 초기 시점의 590 nm에서 CatKP1의 형광 강도는 0-10 nM 범위에서 카텡신 K의 농도와 우수한 선형 상관 관계($r^2 = 0.99$)를 나타냈으며 CatK의 검출 한계(LOD)는 0.26 nM로 결정되었다.

[0137] **2.2.4. 카텡신 K 프로브의 효소 동력학적 특성 확인**

[0138] CatKP1의 효소 동력학적 특성을 나타내기 위하여, CatK(2.5 nM)에서 CatKP1의 농도에 따른 속도를 도 11에 Michaelis-Menten 그래프로 표시하였다. 50mM MES 완충액(pH 5.5, 5mM DTT, 2.5mM EDTA 포함)을 이용하여 수행하였다. 데이터는 microplate readers(Hidex Sense)를 사용하여 시간 함수로 수집되었고, λ_{ex} 는 544nm, 1mm 크기의 Excitation 및 emission 조리개를 사용하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SD(표준편차)로 나타내고, 세번의 반복 측정의 결과에 기반하여 나타났다.

[0139] 그 결과, 효소 동역학 매개 변수 Km은 2.5 μM, kcat은 0.19 s⁻¹, kcat/Km은 76000 M⁻¹s⁻¹으로 결정되었다(도 11).

[0141] **실시예 3. 카텡신 K에 따른 카텡신 K 특이적 프로브의 반응 확인**

[0142] **3.1. 카텡신 K 처리에 따른 카텡신 K 특이적 프로브 활성 확인**

[0143] 다양한 농도의 카텡신 K(CatK)의 존재 하에서 CatKP1(2 μM)의 형광 강도를 590 nm에서 측정하였다.

[0144] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, CatKP1의 반응 강도는 카텡신 K의 농도와 양의 상관 관계가 있음이 확인되었다.

[0145] 아울러, 충분한 양의 카텡신 K가 존재하는 경우 CatKP1의 완전히 소비되는지 여부를 관찰하기 위해, HPLC 및 ESI(Electrospray ionization)-MS 분석을 수행하였다. 구체적으로, 50mM MES 완충액(pH 5.5, 5mM DTT, 2.5mM EDTA 포함)에서 CatKP1을 카텡신 K와 함께(CatKP1+CatK) 또는 카텡신 K 없이(CatKP1) 3시간 동안 배양하여 샘플을 준비하고, 이원구배로 구성된 이동상(용매 A: 0.1% TFA를 함유한 아세토니트릴, 용매 B: 0.1% TFA를 함유한 탈이온수)을 사용하여 HPLC로 분석하였다. 용매 A를 20분 동안 20-45%의 처리하고, 5분 동안 45-100%로 처리하고, 10분 동안 100%로 처리하고, 용출된 용액을 ESI-MS로 분석하였다. HPLC(도 13a)는 실시예 1과 동일하게 수행하였고, CatKP1의 HPLC 스펙트럼은 카텡신 K와 반응 전(파란색) 및 후(빨간색)에 550 nm에서 측정하였다. ESI-MS 스펙트럼은 Shimadzu LC/MS-2020을 사용하여 측정하였다.

[0146] 그 결과, CatKP1만이 포함된 용액은 27.4분, CatKP1+CatK 용액은 17.8 내지 18.3분에 용출된 피크가 관찰되었다(도 13a). CatKP1에 대해 예측된 m/z에 해당하는 984.50 m/z의 주요 피크는 CatKP1만이 포함된 용액에서 검출되었지만(도 13b), CatKP1+CatK 용액에서는 검출되지 않아 CatKP1의 완전한 소비가 확인되었다(도 13c). 즉, 충분한 양의 카텡신 K가 존재하는 경우 CatKP1의 완전히 소비되는 것이 관찰되었다.

[0148] **3.2. 카텡신 K 억제제 투여에 따른 카텡신 K 특이적 프로브의 가수분해 여부 확인**

[0149] 선택적 카텡신 K 억제제인 오다나카티브(odanacatib, ODN)을 다양한 농도의 존재 하에 590 nm에서 CatK(20 nM)을 처리한 CatKP1(2.5 μM)의 형광 강도를 측정하였다. 형광 강도 측정은 실시예 2와 동일하게 수행하였다.

[0150] 그 결과, CatKP1의 효소 가수분해는 오다나카티브의 투여로 완전히 억제된 것을 확인하였다(도 14). 따라서, 카텡신 K 특이적 프로브는 카텡신 K의 존재에 유무에 따라 가수분해되는 것임이 확인되었다.

[0152] **실시예 4: 카텡신 K 특이적 프로브를 이용한 파골세포 내 카텡신 K 검출**

[0153] **4.1. 카텡신 K 특이적 프로브의 세포 독성 평가**

[0154] CatKP1의 파골세포에 대한 세포 독성을 평가하였다. 먼저, 골수 유래 단핵구(BMM)에 M-CSF(30ng/mL) 및

RANKL(50ng/mL)을 처리하고 총 5일 동안 배양하여 성숙한 파골세포를 생성하였다. 파골세포 생성 3일째에 CatKP1를 농도별(0 내지 10 μ M)로 BMM에 투여하고, 추가로 2일 동안 배양하였다. 5일차에 세포를 PBS에 포함된 4% PFA로 고정시키고, TRAP 키트(Sigma-Aldrich)를 사용하여 염색하였다. TRAP 양성 다핵 세포(핵 ≥ 3)를 파골세포로 간주하였다. TRAP 염색의 시각적 이미지는 위상차 현미경(EVOS XL Cell Imaging System, Invitrogen™)을 사용하여 얻었다.

[0155] 그 결과, CatKP1 처리군에서 분화된 파골세포의 수는 모든 농도에서 대조군과 일관되게 유지되어, 파골세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다(도 15).

[0157] 4.2. 카텡신 K 특이적 프로브를 이용한 파골세포 내 카텡신 K 검출

[0158] 배양 파골세포에서 형광 현미경을 통해 카텡신 K 형광체를 확인하였다. 구체적으로, 6 내지 8주령 정상마우스(C57BL/6 마우스, 오리엔트에서 구입)의 뒷다리에서 골수세포를 수확하여, 60mm culture dish 1개당 대략 5×10^7 개의 세포를 5mL 배지(10% FBS 및 1X 페니실린/스트렙토마이신 항생제가 포함된 alpha MEM 배지)에 풀어 밤새(37°C, 5% CO₂) 인큐베이터에 배양하였다. 다음날 세포부유물의 상층액만 천천히 걸어서 세포 수를 측정하였다.

① 30 g/mL ouse recombinant M-CSF만 넣어준 배지, 또는 ② 30g/mL mouse recombinant M-CSF와 50 ng/mL mouse recombinant RANKL를 함께 첨가한 배지를 각각 1mL당 1×10^6 개의 세포 수가 되도록 풀어주었다. 배양접시 또는 덴틴 슬라이스에 용량에 맞게 계산된 세포부유물을 넣어주었다(예: 96well culture plate에는 배지 용량이 200uL이므로 2×10^5 개의 세포를 첨가). 이후 인큐베이터에 2일 동안 배양하고, 새로 제조한 ① 30 g/mL mouse recombinant M-CSF만 넣어준 배지와 ② 30g/mL ouse recombinant M-CSF와 50ng/mL mouse recombinant RANKL를 함께 첨가한 배지로 배양접시의 용량에 맞게 배지를 교체하였다. 다시 인큐베이터에 2일 동안 계속 배양하고 실시예 1에서 제조한 프로브(CatKP1) 2uM를 넣어준 뒤, 1시간 동안 인큐베이터에 배양하였다. 프로브를 넣지 않은 대조군도 함께 준비하였다. 이후 배양접시의 파골세포 분화 여부를 형광현미경의 Brightfield 채널과 RFP 채널(방출 파장 574-626nm)로 이미지를 촬영하여 확인하였다. 형광 이미지는 형광 또는 공초점 현미경(EVOS FL Auto2 Cell Imaging System, Invitrogen™ 또는 LSM900, Zeiss)을 사용하여 얻었다. 파골세포에서 프로브 신호를 보정하기 위해 deconvolution wizard를 사용하여 Huygens Professional 22.10 소프트웨어(Scientific Volume Imaging B.V.)에서 공초점 3차원 투영 이미지를 조정하였다.

[0159] 그 결과, M-CSF만 넣어준 배지를 이용하여 대식세포로 분화시킨 후 프로브를 투입하여 관찰한 경우 카텡신 K가 발현하지 않아 프로브의 형광이 관찰되지 않았다(도 16a). 반면, M-CSF 및 RANKL 둘 다 넣어준 배지를 이용하여 파골세포로 분화시킨 뒤 프로브를 투입하여 관찰한 경우 brightfield 이미지를 통해 다핵세포로 분화된 파골세포임을 확인하였으며, 파골세포에서 카텡신 K가 발현되어 프로브의 형광이 관찰되었다(도 16b).

[0160] 아울러, M-CSF 및 RANKL 둘 다 넣어준 배지를 이용하여 파골세포로 분화시킨 배양접시(culture plate) 및 덴틴 슬라이스(dentin slice)를 팔로이딘(phalloidin)으로 염색하여 각각 형광 현미경 및 공초점 현미경으로 관찰하였다. 덴틴 슬라이스는 인간의 뼈 조직과 동일한 제1형 콜라겐, 칼슘, 인산염 구성을 가져, 생물학적으로 뼈의 재의 대체재 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0161] 구체적으로, M-CSF 및 RANKL 둘 다 넣어준 배지를 이용하여 파골세포로 분화시킨 배양접시 및 덴틴 슬라이스에 PBS를 첨가하여 세포를 세척한 뒤, 4% 파라포름알데하이드를 넣고 빛 차단 후 밤새 4°C로 유지시켰다. PBS로 세포를 세척한 뒤, PBS에 0.1% triton X-100를 넣은 용액을 빛 차단 상태로 상온에 15분동안 넣어주어 세포막 투과성을 높였다. 다시 PBS로 세포를 세척한 뒤, PBS에 1% BSA와 0.25% phalloidin(팔로이딘) stock solution을 넣은 용액을 빛 차단 상태로 상온에서 1시간 동안 첨가하였다. 다시 PBS로 세포를 세척한 뒤, PBS에 2% Hoechst33342를 넣어 용액을 빛 차단 상태로 상온에 5분 동안 첨가하였다. 다시 PBS로 세포를 세척한 뒤, 염색이 끝난 세포에 마운팅 솔루션을 넣어주었다. phalloidin은 세포의 근골격을 염색하며 Alexa Fluor 647 형광 염료가 붙어 있어 해당 채널(방출 파장 660-680nm)로 세포의 형태를 보여주며(녹색), Hoechst33342는 DNA에 결합하여 형광을 방출하여 해당 채널(방출 파장 450-500nm)로 세포의 핵을 보여준다(청색). 비교군으로 카텡신 K 저해제인 오다나카티브(odanacatib, ODN)을 30 nM 농도로 분화 3일차에 첨가한 군을 준비하였다.

[0162] 그 결과, 프로브를 첨가한 군(CatKP1)에서는 다핵을 이루는 파골세포에서 프로브의 형광이 관찰되었으나(적색), 프로브를 첨가하지 않은 군(None)과 프로브 및 오다나카티브를 첨가한 군(CatKP1+ODN)에서는 적색 형광이 관찰되지 않아, 실시예 1에서 제조한 본 발명의 프로브(CatKP1)가 카텡신 K에 대한 특이적인 민감도가 있음을 확인하

였다(도 17). 또한, 배양 접시 및 덴틴 슬라이스에서의 형광 패턴은 뼈 흡수 동안 덴틴 슬라이스에서 배양된 파골세포에 의한 단단한 액틴 고리 형성으로 인해 형광 패턴의 불일치가 발생함을 확인하였으나, ODN을 사용하여 처리한 경우에는 두 가지 형광 패턴을 완전히 억제하여 CatKP1이 카텡신 K 의존 방식으로 기능성 파골세포의 시각화를 가능하게 했음을 확인하였다.

[0164] 4.3. 파골세포에 대한 카텡신 K 특이적 프로브의 특이성 확인

[0165] 카텡신 K 특이적 프로브의 파골세포에 대한 특이성을 확인하기 위하여, 파골세포를 포함한 다양한 세포에서 CatKP1의 형광 현미경 이미지를 관찰하였다. 시험관 내 배양된 2×10^5 개의 파골세포(BMM-derived osteoclasts), E0771 유방 종양 세포(breast tumor cells), RAW264.7 대식세포 및 NIH3T3 섬유아세포(fibroblast)를 12 웰 플레이트에 배치하고, CatKP1(2 μ M, red)을 주입하고, 1시간 이상 배양한 후 형광 현미경 이미지를 관찰하였다.

[0166] 그 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 파골세포에서는 CatKP1 처리에 따라 강한 형광 신호를 보였으나, 다른 세포 유형에서는 유의미한 세포 반응이 관찰되지 않았다. 즉, 카텡신 K 특이적 프로브의 파골세포에 대한 특이성을 확인하였다.

[0168] 4.4. 카텡신 K 특이적 프로브의 파골세포 내 위치 확인

[0169] 파골세포에서 CatKP1 세포내 위치를 z-적층 3차원 공초점 현미경 이미지를 통해 추가로 확인하였다. 골수 유래 단핵구(BMM)를 배지에서 M-CSF(30ng/mL) 및 RANKL(50ng/mL)과 함께 3일(도 19) 또는 9일(도 20) 동안 배양하였다. 3일째에 세포를 PBS 내에 포함된 4% PFA로 고정하였다. 도 19a에서는 세포 고정 후 카텡신 K Ab(카텡신 K 항체, 빨간색), LAMP2A(리소좀 막, 녹색) 및 Hoechst 33342(핵, 파란색)로 염색하였고, 도 19b에서는 관찰 1시간 전에 CatKP1(2 μ M, 빨간색)을 투여하고 세포 고정 후 LAMP2A(리소좀 막, 녹색) 및 Hoechst 33342(핵, 파란색)로 염색하였다.

[0170] 도 20도 도 19와 마찬가지로, 파골세포를 네 개의 위치에서 슬라이스(slice 1 내지 4)하고, CatKP1(2 μ M, 빨간색)는 관찰 1시간 전에 투여하고 세포 고정 후 LAMP2A(리소좀 막, 보라색), 팔로이딘(F-액틴, 초록색) 및 Hoechst 33342(핵, 파란색)로 염색하였다. 카텡신 K Ab(카텡신 K 항체, 빨간색)는 세포 고정 후 LAMP2A(리소좀 막, 보라색), 팔로이딘(F-액틴, 초록색) 및 Hoechst 33342(핵, 파란색)와 동시 염색하였다.

[0171] 그 결과, 파골세포에서 CatKP1 형광은 주로 세포 내 리소좀 내에 국한되어 있음을 확인하였다(도 19). 또한, 파골세포가 뼈 흡수를 위해 덴틴 슬라이스로 활성형(active형) CatK를 분비하는 것을 특징으로 하는 완전히 분화된 단계로 성숙함에 따라, CatKP1 신호는 주로 액틴 고리 아래, 특히 흡수성 열공(resorption lacunae)에 집중되어 있음을 확인하였다(도 20c 및 도 20d). 이와 달리, 카텡신 K의 pro형과 active형을 모두 검출 가능한 카텡신 K 항체는 파골세포의 세포질을 전체적으로 염색하였다(도 20a 및 도 20b). 이로부터, 뼈를 흡수하는 파골세포에서 활성형 카텡신 K를 향한 CatKP1의 선택성과 세포 내 위치를 확인하였다.

[0173] 실시예 5: 카텡신 K 특이적 프로브를 이용한 동물 모델에서의 카텡신 K 검출

[0174] 5.1. 골전이암 마우스 모델에서의 카텡신 K 검출

[0175] 하기의 모든 동물 실험은 고려대학교 의료원 동물기관관리위원회(KOREA-2023-0110)와 Garvan과 St Vincent's Animal Ethics committee(ARA21_17)의 승인을 받았다.

[0176] 유방암 세포인 E0771 murine breast cancer cell line(Vanderbilt University 제공) 5,000개(20 μ L, Hank's 균형 염 용액)를 2% isoflurane(아이소플루레인)을 이용하여 마우스(C57BL/6 마우스, 오리엔트 사) 오른쪽 근위 경골(tibia bone)(도 21a) 및 근육(도 21b)에 전신 마취하에 주사하였다. 반대편 왼쪽 뼈와 종양을 주사한 근육은 음성 대조군으로 사용되었다. 이광자 현미경은 아래의 단계에 따라 수행되었다. 마우스에 꼬리 정맥을 통해 CatKP1(50 μ M)을 주사한 후 Avertin(200mg/kg, i.p.)을 사용하여 전신 마취하였다. 경골의 근위 내측 표면을 노출시키기 위해 작은 피부 절개(무릎 관절 높이 아래 약 1.5-2cm)하였다. 마우스를 옆으로 기댄 자세로 두고 관심 영역 위에 커버 유리를 배치하였다. 오른쪽 경골의 시상 단면(sagittal section) 이미지는 10X 대물 렌즈가 장착된 $1099 \times 1099 \mu\text{m}^2$ 의 이미징 시야와 920nm로 조정된 레이저를 제공하는 이광자 현미경(IVIM-MS3, IVIM

Technology)을 사용하여 수행하였다(Seoul, Korea). 동시에, 유사한 장비, 특히 이미지 획득을 위한 20배 대물 렌즈를 갖춘 IVIM-CMS3(공초점 현미경, IVIM Technology가 통합된 이광자 현미경)를 활용하여 보완적인 실험을 수행하였다(Daejeon, Korea). 근위 경골에 적용된 평균 레이저 출력은 50mW로 조정되었다. 소주골(trabecular bone)의 내부 표면을 시각화하기 위해 2,8-DHA 결정의 SHG(second harmonics generation) 신호를 380-420nm로 설정된 대역통과 필터를 사용하여 감지하였다. 또한 RFP 채널의 신호는 574-626 nm로 설정된 대역 통과 필터를 사용하여 감지하였다. 이광자 현미경의 SHG 채널(방출 파장 380-420nm)은 비선형 광학 신호를 측정하여 콜라겐이 많이 함유되어 있는 뼈 조직을 촬영하고 이를 파란색으로 나타내며, RFP 채널(방출 파장 574-626nm)은 프로브의 형광 신호를 측정하여 빨간색으로 나타낸다. 소주골의 내부 표면의 깊이 약 100 μ m까지 관찰 가능하였다. ImageJ 소프트웨어는 RFP 채널에서 얻은 z-스택에서 2차원 투영 이미지로 컴파일된 이미지를 분석하여 CatKP1 신호의 강도를 정량화하는 데 사용되었다. 이광자 현미경 검사 후, 2주째에 마우스를 안락사하였다. 안락사 후, 뒷다리를 절제하고 PBS에 용해된 4% PFA로 4 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 고정한 후, 14% EDTA로 4 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 석회질을 제거하였다. 파라핀이 포매된 샘플을 4 μ m 두께의 섹션으로 절단하고 플록신 B(phloxine B)와 Orange G 염료가 포함된 변형된 헤마톡실린-에오신(H&E) 염색 방법을 사용하여 염색하였다. BV/TV 매개변수는 ImageJ 소프트웨어 및 H&E 이미지를 사용하여 growth plate 아래 3개의 정사각형 프레임(각각 0.5 x 0.5mm 측정)의 측정값을 평균하여 평가하였다.

[0177] 그 결과, 정맥 주사 후 CatKP1은 오른쪽 경골에서 특히 밝은 형광을 나타냈지만 반대쪽 뼈에서는 비활성 상태를 유지하였다(도 21a 및 도 21c). 또한 다리 근육에 이식된 종양에서는 형광이 검출되지 않았다(도 21b 및 도 21d). 경골 뼈 조직의 조직학적 염색 결과, 암 세포가 소주 뼈(trabecular bone)에 심하게 침윤되었고, 종양 덩어리 내에서 파골세포 침입을 확인하였다(도 21c). 이러한 결과는 종양을 지닌 뼈에서 CatKP1 형광의 현저한 증가가 암세포 자체에서 비롯된 것이 아닌, 종양 미세 환경 내의 비정상적인 파골세포 활성화로 인한 것임을 나타낸다.

[0178] 추가적으로, 현미경 설정에서 생체 외 뼈 조직에서 이광자 이미징 결과를 검증하고, 냉동 보관 표본에서 CatKP1의 안정성을 평가하였다. 경골 내 뼈 전이가 있는 마우스는 안락사 전에 CatKP1(50 μ M)을 투여하였다. 종양이 없는 경골(반대쪽)을 절제하고 -80 $^{\circ}$ C 에서 빠르게 냉동하였다. 그 후, 냉동 뼈 샘플을 Stellaris 8 Dive 다광자 현미경을 사용하여 뼈(SHG, 갈색), CatKP1(RFP, 빨간색) 및 파골세포(EGFP, 녹색)를 관찰하였다. 다광자 현미경은 Leica NDD 4Tune HyD 검출기, Leica HC FLUPTAR L 25x/0.95 W VISIR 0.17 목표 렌즈와 Spectra Physics Insight X3 단일 및 Mai Tai eHP Deep See 레이저를 장착하였다. 이미지는 512 X 512 픽셀, 465 X 465x64 μ m, 스텝 크기는 1 μ m 였다. 획득된 이미지를 Leica Microsystems의 LAS X 소프트웨어와 Bitplane의 Imaris 9를 사용하여 분석하였다.

[0179] 그 결과, 뼈 전이 마우스 모델의 비종양 지지 뒷다리(hindlimb, 반대측 경골)의 이광자 현미경 이미지. CatKP1 신호(빨간색)는 흡수 구덩이(resorption pit)에 위치한 파골세포에서 상당히 증폭되어 명확하게 표시되었다(도 22a)

[0180] 또한, 파골세포에 대한 CatKP1의 특이성을 확인하기 위해 파골세포에서 EGFP를 특이적으로 발현하는 Csf1r-EGFP 형질전환 마우스에 CatKP1(50 μ M)을 정맥 주사한 후 생체 외 샘플링을 하고 현미경으로 관찰하기 전까지 -80 $^{\circ}$ C 에서 보관하였다. Csf1r(Colony Stimulating Factor 1 Receptor)는 파골세포와 같은 골수 기원의 세포들의 표면에서 발견되는 수용체로서, 파골세포의 형성과 기능을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0181] 그 결과, CatKP1 신호(빨간색)는 Csf1r+파골세포(녹색)와 동일 위치에 있음을 확인하여, Csf1r-EGFP 형질전환 쥐의 경골의 이광자 현미경 이미지는 EGFP와 CatKP1(빨간색) 신호의 공동 위치를 보여주었다(도 22b).

[0183] 5.2. 파골세포 과형성 마우스 모델에서의 카텝신 K 검출

[0184] 파골세포 과형성 마우스 모델의 제작과정은 도 23에 간략하게 나타내었다. 구체적으로, 8주령 암컷 C57BL/6 마우스를 과량의 RANKL을 주사(0.5 mg/kg, PeproTech)를 PBS에 녹여 100 μ L용량으로 3일 동안 매일 복강내 투여)하여 유도한 파골세포 과형성 마우스 모델을 제조하고, 무작위로 세 그룹으로 나눴다. RANKL 주사 첫날, 마우스에게 경구 위관 투여법(oral gavage)을 통해 한 그룹에는 vehicle(Veh, 옥수수유 내에 포함된 10% DMSO)을 투여하고, 다른 그룹에는 오다나카팁(ODN, 3.6mg/kg, Selleckchem)을 투여하였다. 이광자 현미경을 이용한 이미징 후 4일째에 마우스를 안락사시켰다. 나머지 그룹은 대조군(Control)으로 설정하였다.

[0185] 먼저, RANKL 유발 뼈 손실 마우스의 여러 장기에서 CatKP1의 생체 외 분포를 확인하였다. CatKP1을 정맥 주사한

지 2시간 후에 마우스의 장기(간, 심장, 폐 및 신장)를 해부하였다. 생체 외 조직 샘플의 이광자 이미징을 위해 3일 동안 매일 RANKL(0.5mg/kg, PeproTech)로 처리한 마우스에 CatKP1(50 μ M, IV)을 투여한 것과 CatKP1을 투여하지 않은 음성대조군을 준비하였다.

[0186] CatKP1의 정맥 주사 2시간 후, 각각의 쥐로부터 각 장기(간, 심장, 폐 및 신장)를 적출하고, 근위 경골 촬영과 동일한 조건에서 이광자 현미경을 이용하여 장기의 시상 단면 영상을 촬영하였다. 도 24a는 각 마우스의 장기 사진 및 도 24b는 이광자 현미경을 사용하여 관찰한 각 장기의 시상 단면의 z-stack 이미지를 나타낸 것이다. 위쪽은 CatKP1을 투여하지 않은 음성 대조군이고, 아래는 투여한 군이다. 뼈(SHG, 파란색) 및 CatKP1(RFP, 빨간색)으로 관찰 가능하였다.

[0187] 그 결과, 골단이나 다른 기관에서는 형광이 검출되지 않아 활성 파골세포가 존재하는 조직에서 CatKP1의 선택적 활성화가 확인되었다(도 24).

[0188] 또한, 다광자 현미경(multiphoton microscope, λ_{ex} : 920 nm, STELLARIS 8 DIVE, Leica Microsystems)을 사용하여 모니터링 한 결과, CatK에 의한 CatKP1의 명확한 형광 활성화 반응이 확인되었다(도 25).

[0189] 이후, CatKP1을 주사한 후 40분 내지 120분 동안 마우스의 근위 경골에서 실시간으로 생체 내 이광자 현미경 이미지를 관찰하였다. 도 26a 1)은 골단(epiphysis)이고, 도 26a 2)는 소주골을 관찰한 것이고, 도 26b는 소주골에서의 형광 강도를 그래프로 나타낸 것이고, 도 26c는 CatKP1 주입 후 24시간 경과 및 CatKP1 재주입 후 이광자 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

[0190] 그 결과, 40분 이내에 경골 근위부에 밝은 형광 반점이 관찰되었으며, 적어도 2시간 동안 지속되었다. 아울러, 경골의 CatKP1 형광은 주입 후 24시간 후에 사라졌는데(도 26c), 이러한 생체 내 제거로 인해 경골에서 파골세포 활성을 반복적으로 평가할 수 있음을 확인하였다.

[0191] 또한, 실험군으로 RANKL을 주사하지 않은 마우스에 프로브를 도입한 군(No RANKL Control), 파골세포 과형성 모델에 프로브를 도입한 군(RANKL+Veh), 파골세포 과형성 모델에 카텝신 K 저해제인 오다나카티브(Odanacatib)을 투여(RANKL 주입 전, 마우스 무게 1 kg 당 3.6 mg의 오다나카티브를 10% DMSO가 함유된 옥수수유에 녹여 100 μ L 용량으로 1회 경구 투여)한 후 프로브를 도입한 군(RANKL+ODN)으로 총 3개 군을 준비하였다. 4일째에 각각의 마우스 꼬리 정맥을 통해 CatKP1(50 μ M)을 주사하였다.

[0192] 그 결과, 도 26d에 나타난 바와 같이, RANKL을 투여한 파골세포 과형성 마우스 모델에 프로브를 도입한 군에서 파골세포 활성이 관찰되었으며, 파골세포 과형성 모델에 프로브를 도입한 군에 비해 오다나카티브를 투여한 군의 경우 형광의 세기가 감소함을 확인하였다. 이는 골 흡수 활성의 감소를 나타낸다.

[0193] 이러한 결과는, 변형된 H&E 염색의 현미경 이미지 및 소주골 파괴 분율(뼈 파괴(BV) 대 조직 파괴(TV) 비율을 정량화한 조직형태학적 분석 결과의 도 27의 결과와 일치한다.

[0195] 5.3. 골다공증 마우스 모델에서의 카텝신 K 검출

[0196] 난소 절제술을 통해 유도한 골다공증 마우스 모델에서 과형성된 파골세포를 실시예 1에서 제조한 프로브(CatKP1)를 이용하여 이광자 현미경으로 관찰하였다.

[0197] 구체적으로, 난소절제술(OVX) 유발 골다공증 마우스 모델은 2% 이소플루란을 사용하여 전신 마취 하에 등 정중선 절개를 통해 8주령 암컷 C57BL/6 마우스에서 한 쌍의 난소를 외과적으로 제거하였다. 외과용 수술도구로 피부를 절개하여 복강을 절개하고, 양쪽의 난소를 노출시켜 각각 보비 전기 수술기로 난관과 난소의 연결 부분을 절개하였다. 출혈은 전기소작으로 조절하였고, 수술용 클립을 사용하여 상처를 봉합하였다. 가짜 수술을 받은 대조 마우스(Sham)는 난소 제거 없이 동일한 수술 절차를 거쳤다. 4주 후, OVX 마우스를 두 그룹(n=9/그룹)으로 무작위화하여 vehicle(PBS) 또는 졸레드로네이트(zoledronate, ZA, 120 μ g/kg, Sigma-Aldrich)를 꼬리 정맥을 통해 일주일에 한 번 투여하였다. 이광자 영상을 촬영 후 8주째에 마우스를 안락사하였다.

[0198] 먼저, 골다공증 마우스 모델이 성공적으로 제작되었음을 확인하기 위해, 수술 8주 후 관찰된 자궁 이미지 및 자궁 무게를 그래프로 나타냈고(도 28a), H&E 염색 현미경 이미지 및 감소된 자궁 무게와 BV(뼈 파괴)/TV(조직 파괴) 측정하여 그래프(도 28b)로 나타내었다. 이를 통해, 골다공증 마우스 모델이 성공적으로 제작되었음을 확인되었다.

[0199] 양 모델을 준비한 뒤 4주, 6주 및 8주에 실시예 1에서 제조한 프로브(CatKP1)를 도입하였으며, 카텝신 K의 활성

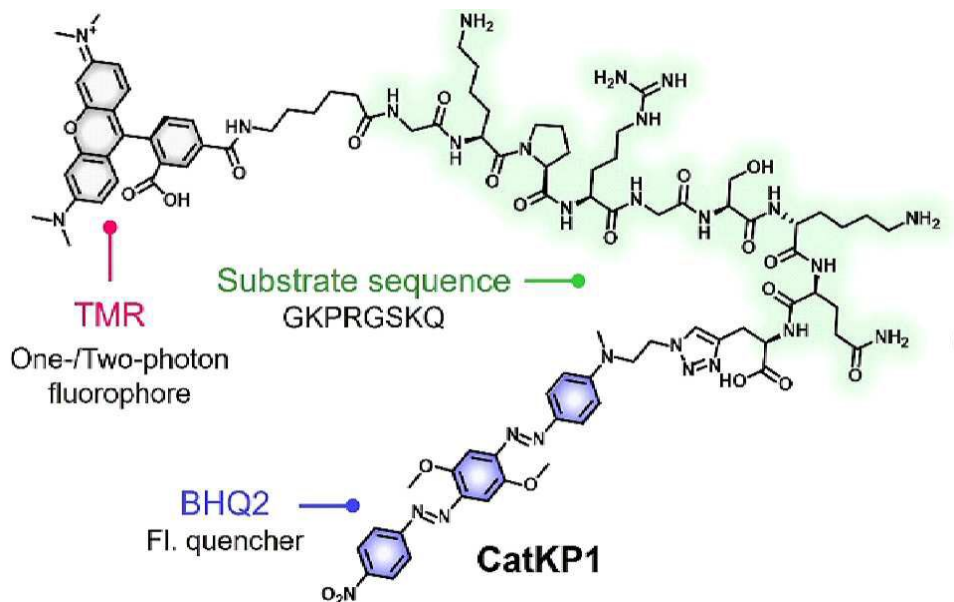
을 억제하는 골다공증 치료제인 졸레드로네이트(zoledronate, ZA)를 4주에서 8주까지 매주 투여(주 1회 마우스 무게 1 kg당 120 ug의 졸레드로네이트를 PBS에 녹여 100 uL 용량으로 정맥 투여)하고 파골세포를 형광으로 관찰하였다.

[0200] 그 결과, CatKP1의 형광은 OVX 수술 후 시간이 지남에 따라 증가하였다(도 29b). 또한, OVX 수술 후 8주째에 형광 신호는 일반 마우스 모델(Sham)에 비해 약 8.2배 크게 향상되었다(도 29c). 특히, ZA 처리 마우스의 CatKP1 신호는 일반 마우스 모델(Sham)에서 관찰된 수준으로 크게 감소하여 CatKP1이 골다공증 모델에서 뼈 손실이 진행되는 동안 파골세포 활성을 측정하는 것에 활용할 수 있음을 보여주었다.

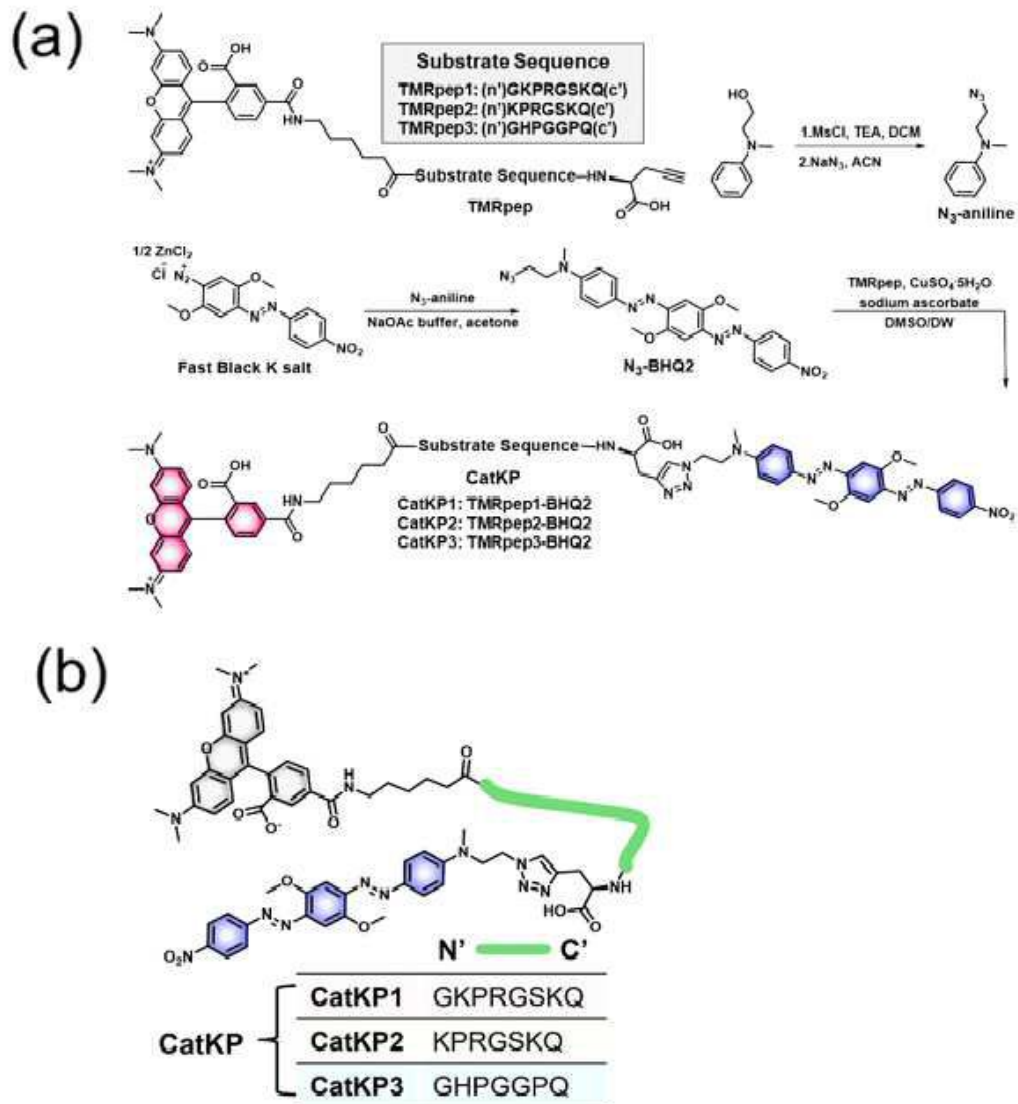
[0201] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

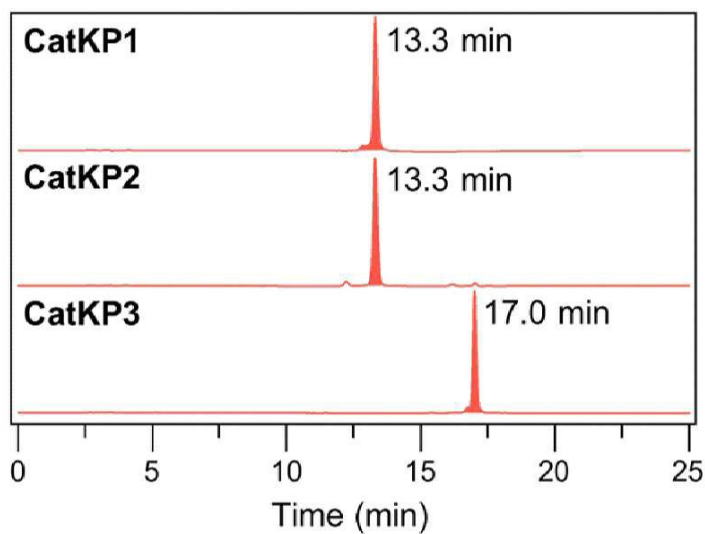
도면1



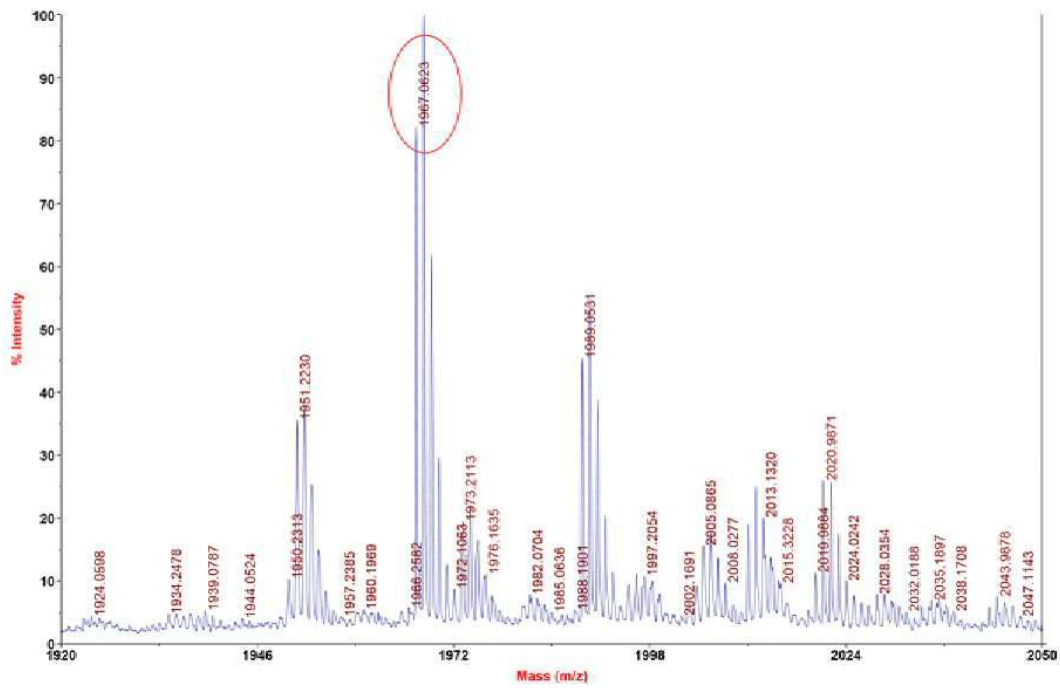
도면2



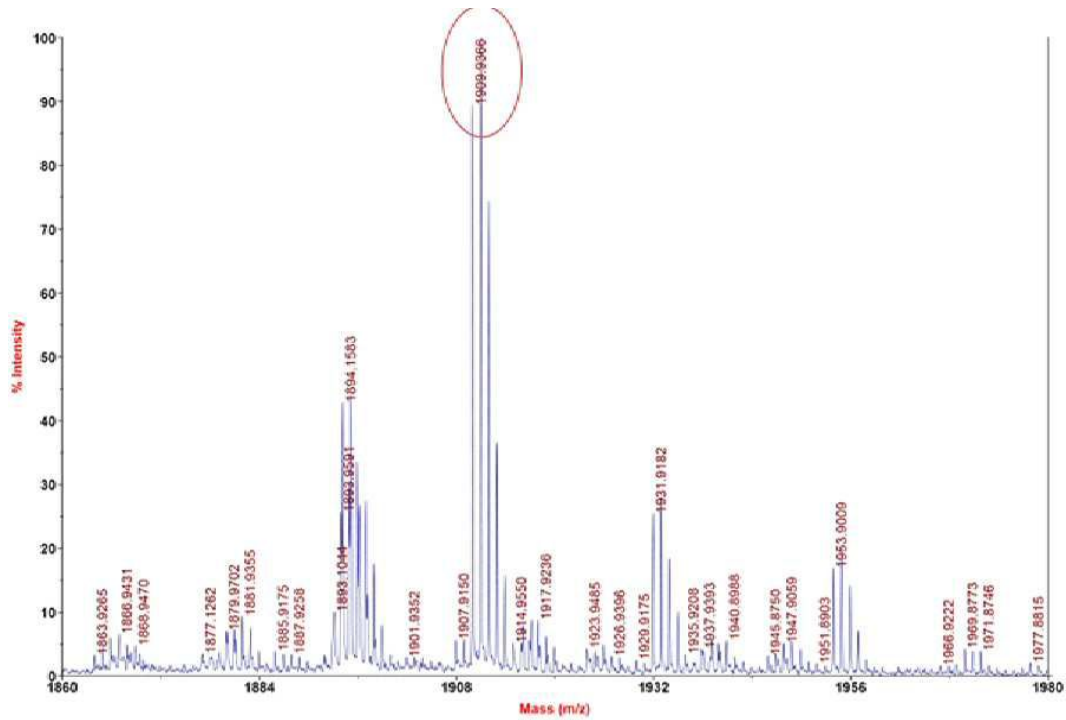
도면3



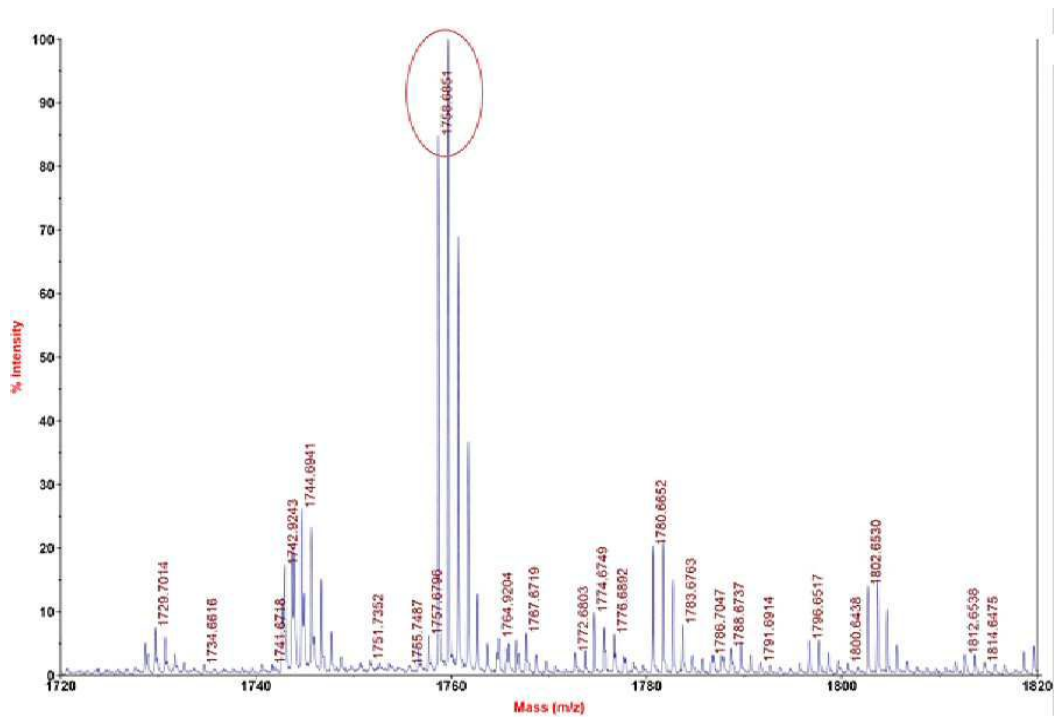
도면4a



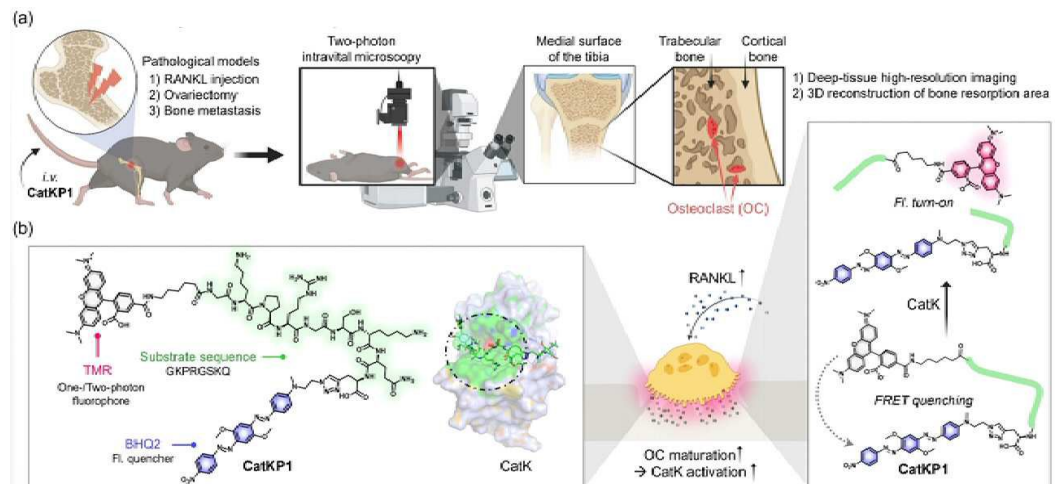
도면4b



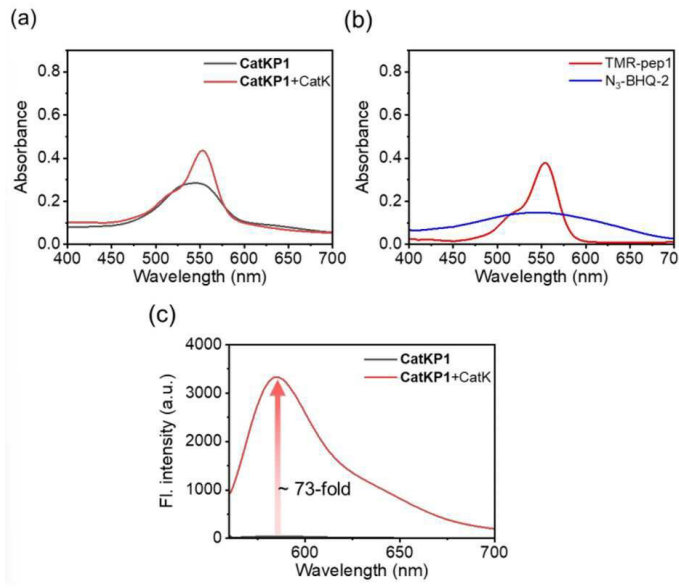
도면4c



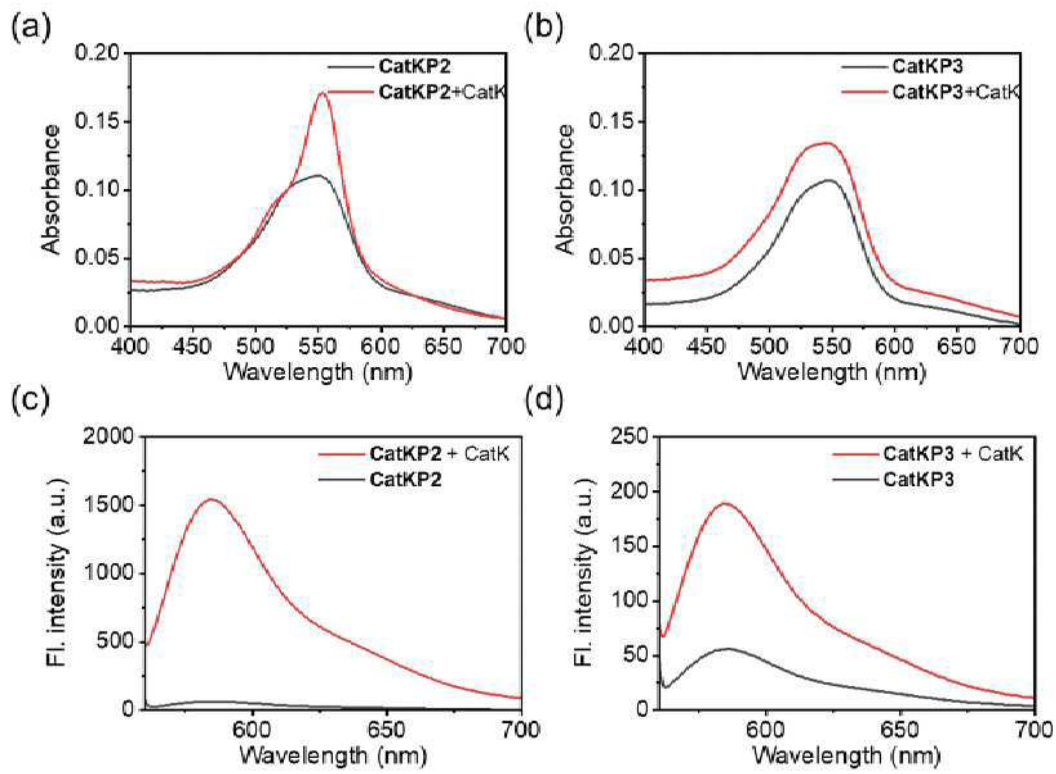
도면5



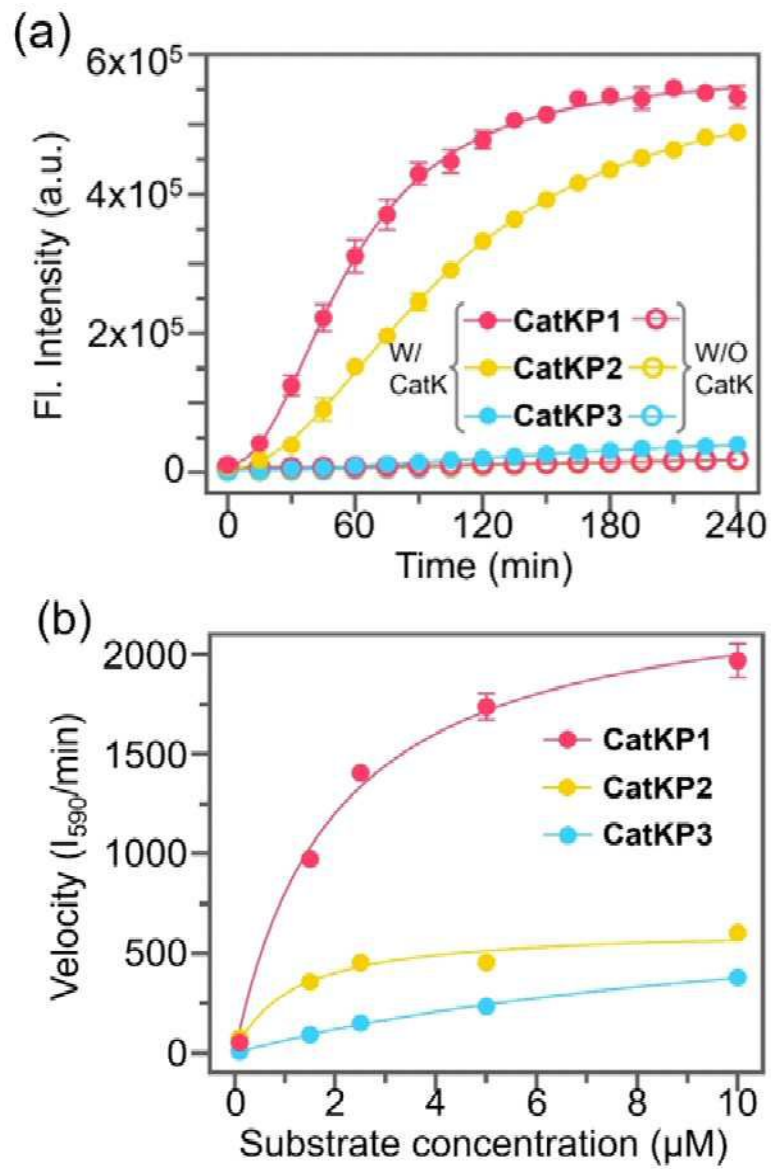
도면6



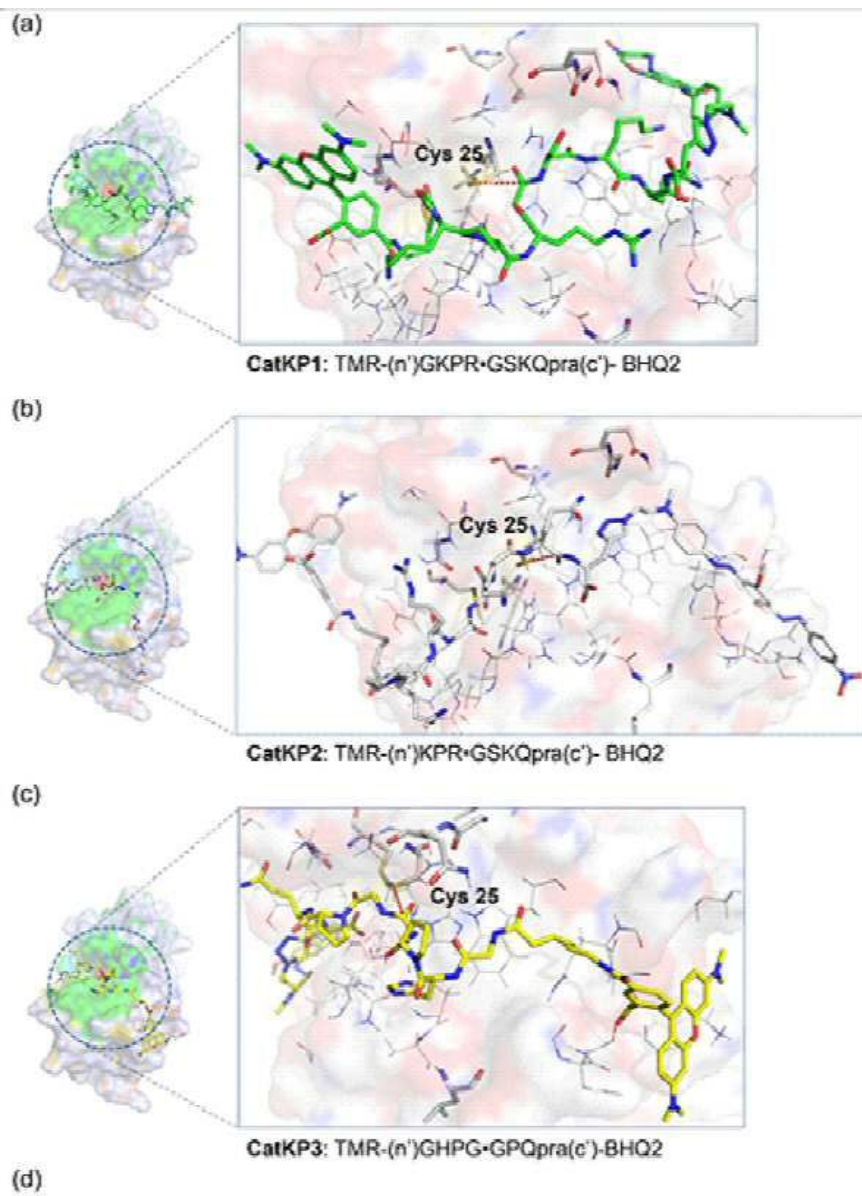
도면7



도면8

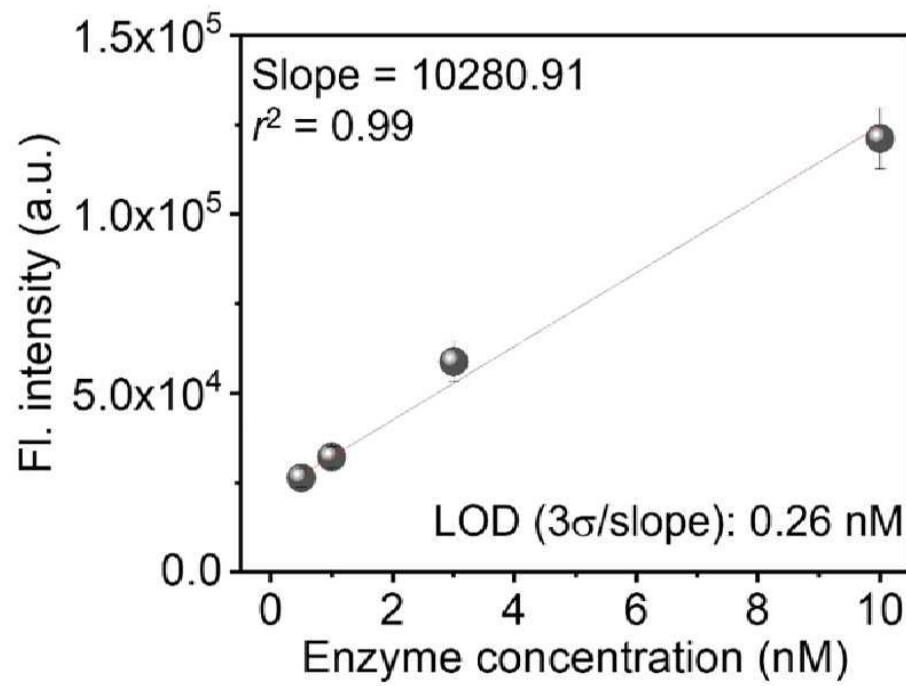


도면9

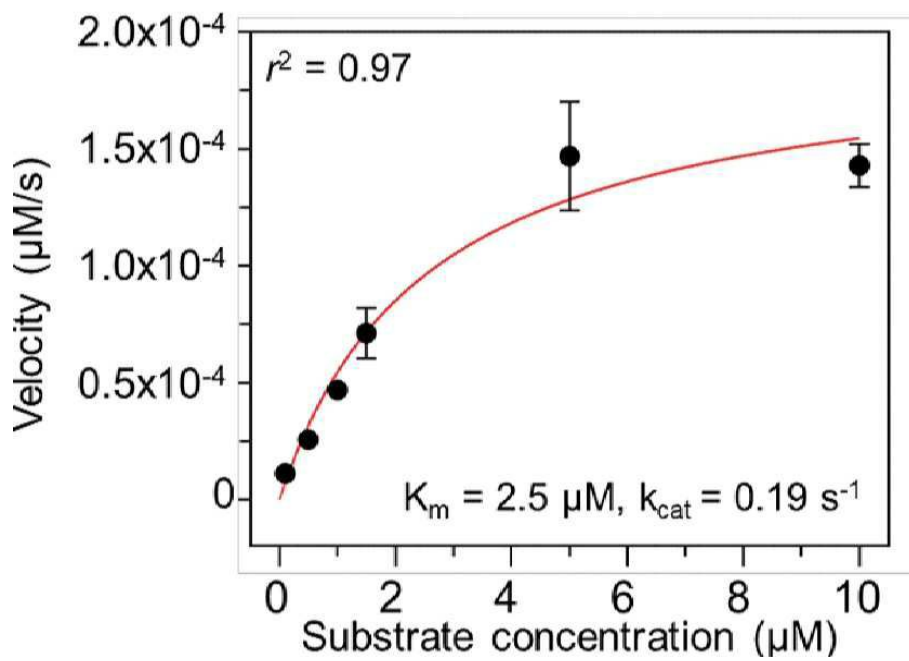


Probe	Peptide sequence	# of positively charged AA	Log D	Binding energy
CatKP1	GKPRGSKQ	3	-11.20	-8.6 kcal/mol
CatKP2	KPRGSKQ	3	-10.12	-8.0 kcal/mol
CatKP3	GHPGGPQ	1	-3.50	-7.3 kcal/mol

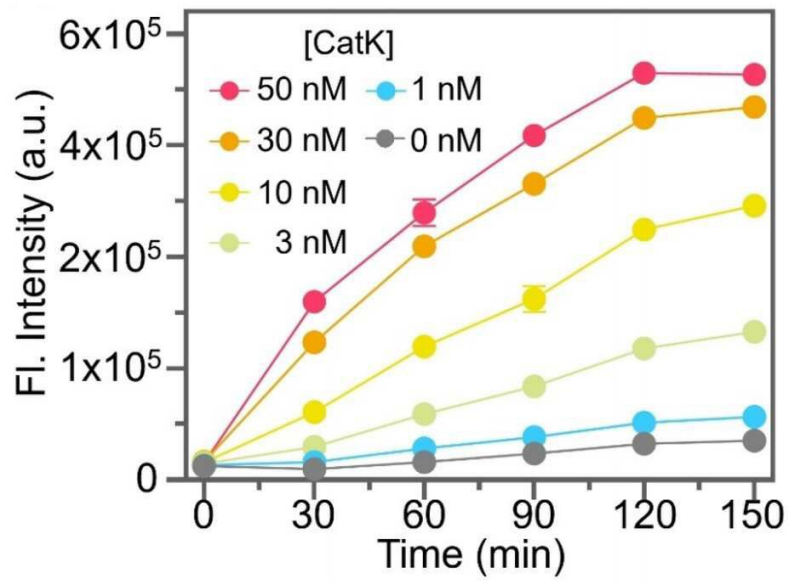
도면10



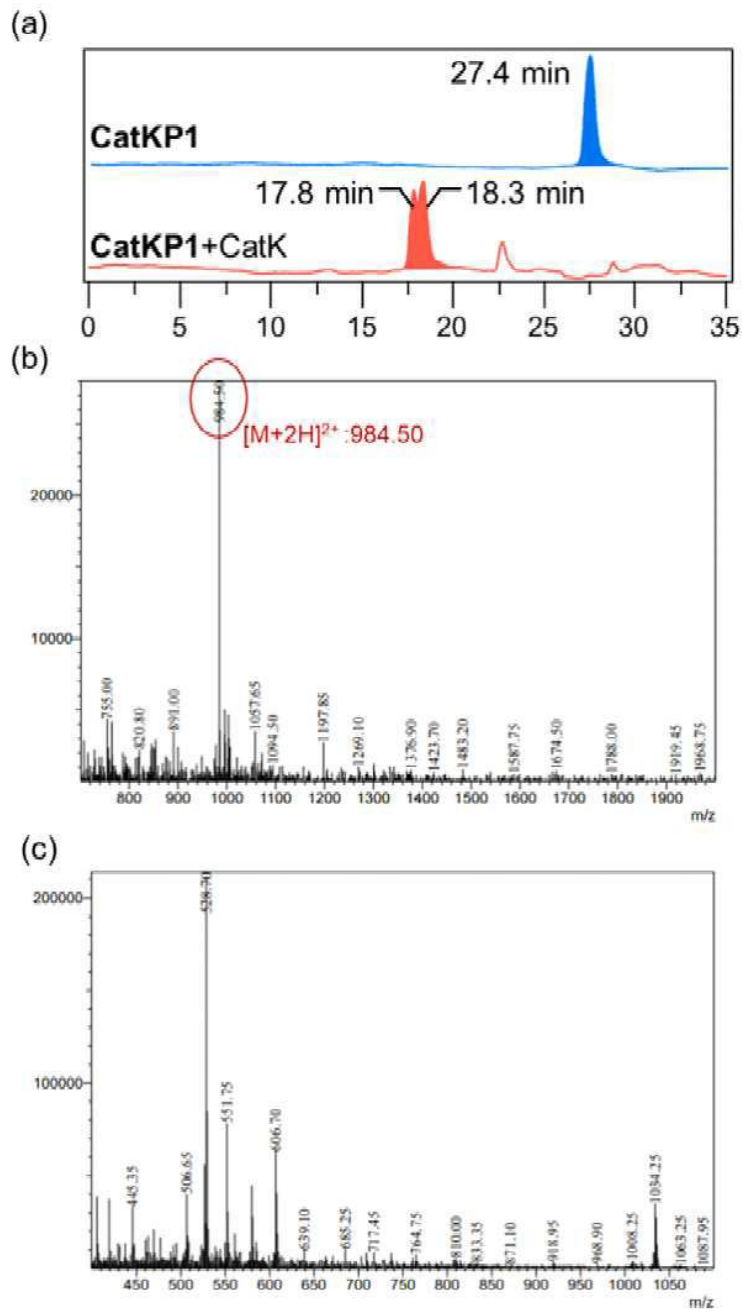
도면11



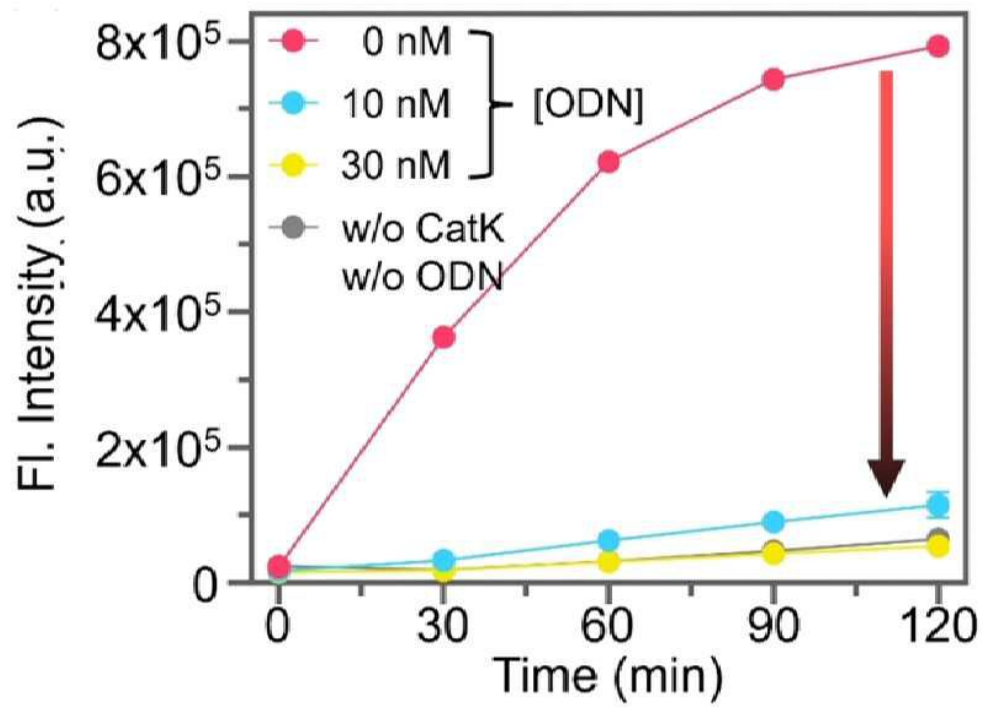
도면12



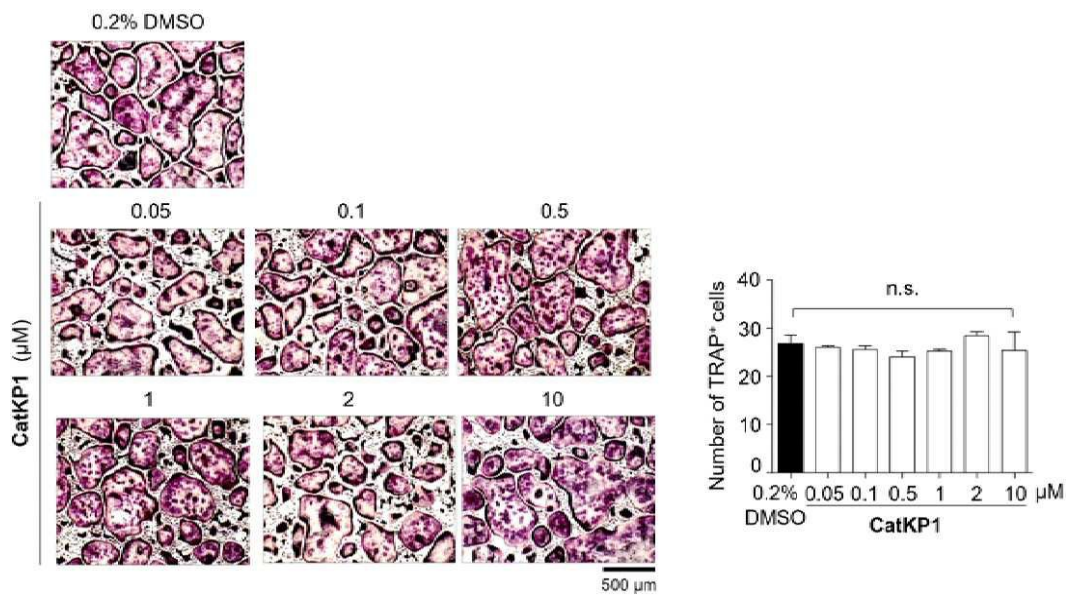
도면13



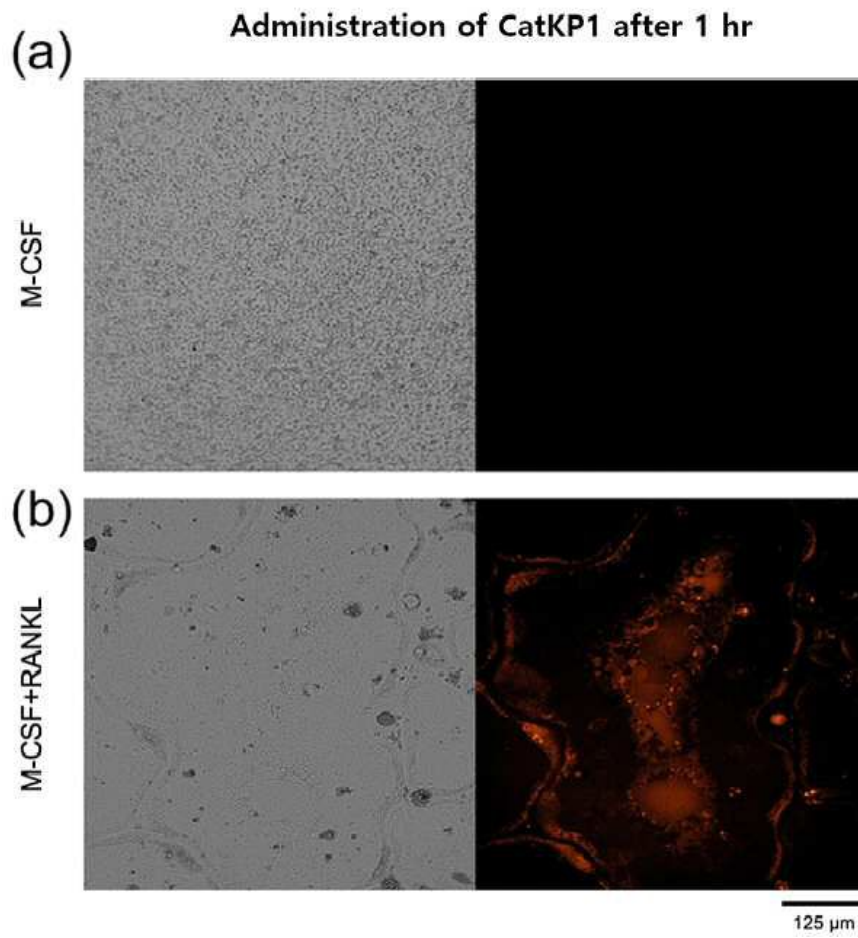
도면14



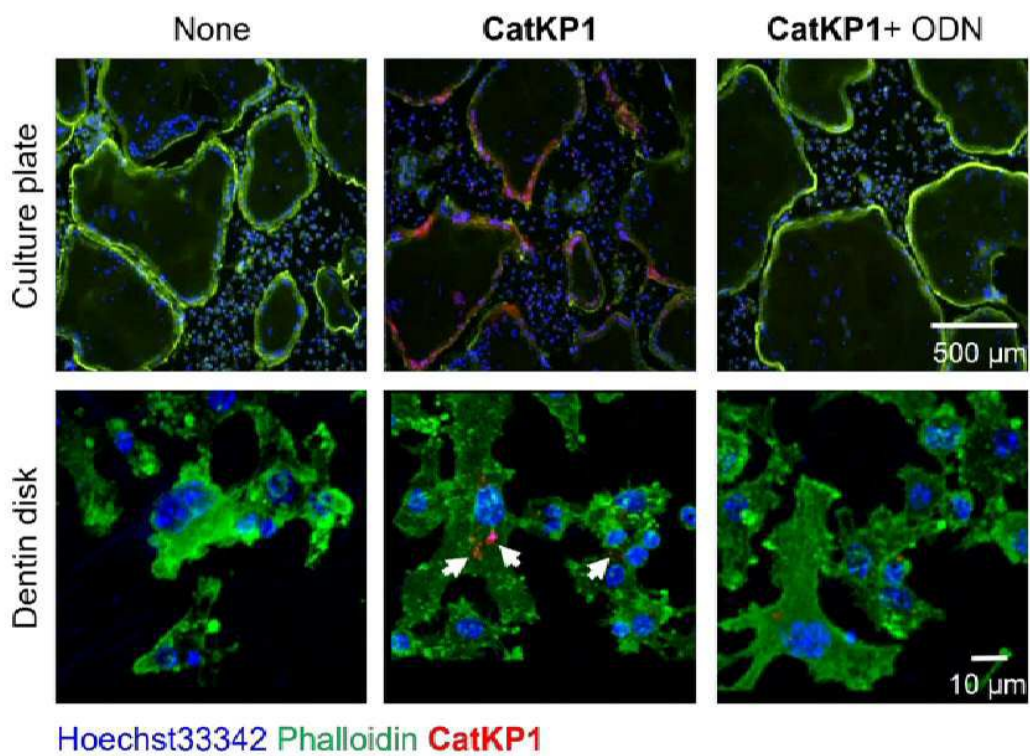
도면15



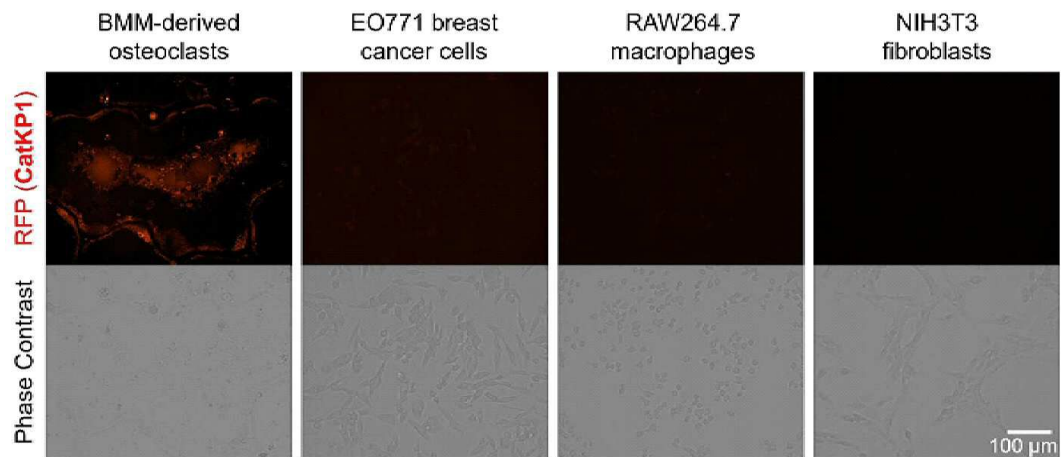
도면16



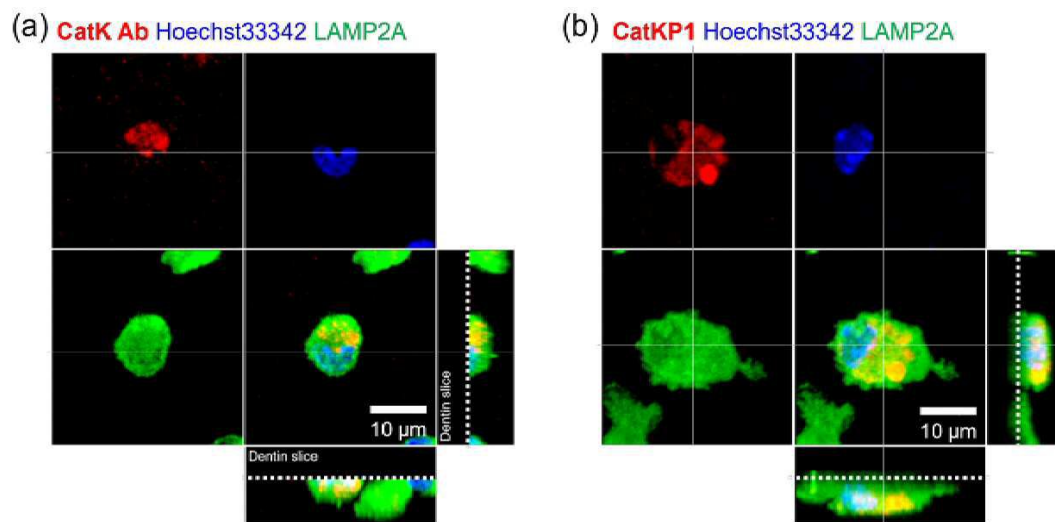
도면17



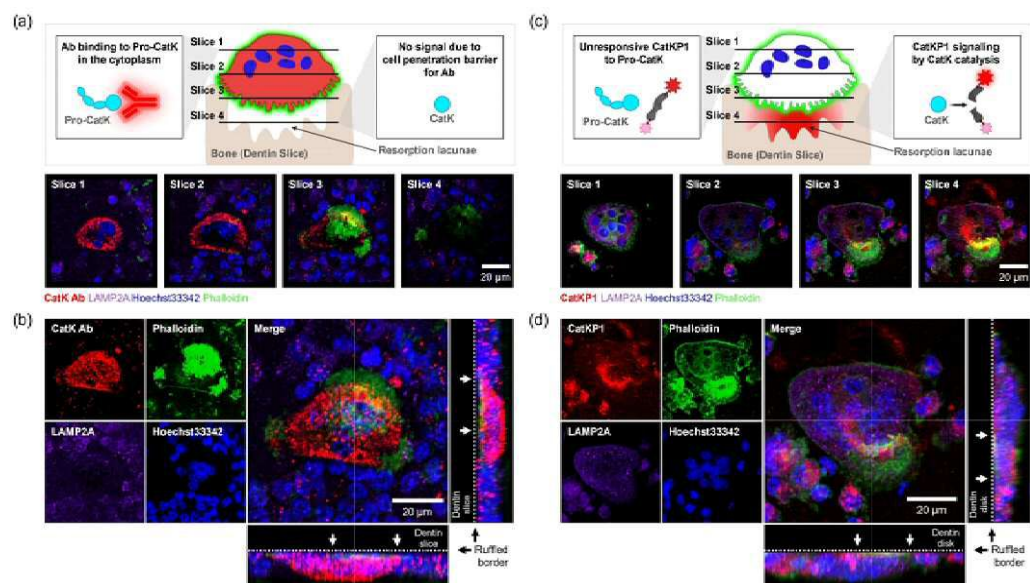
도면18



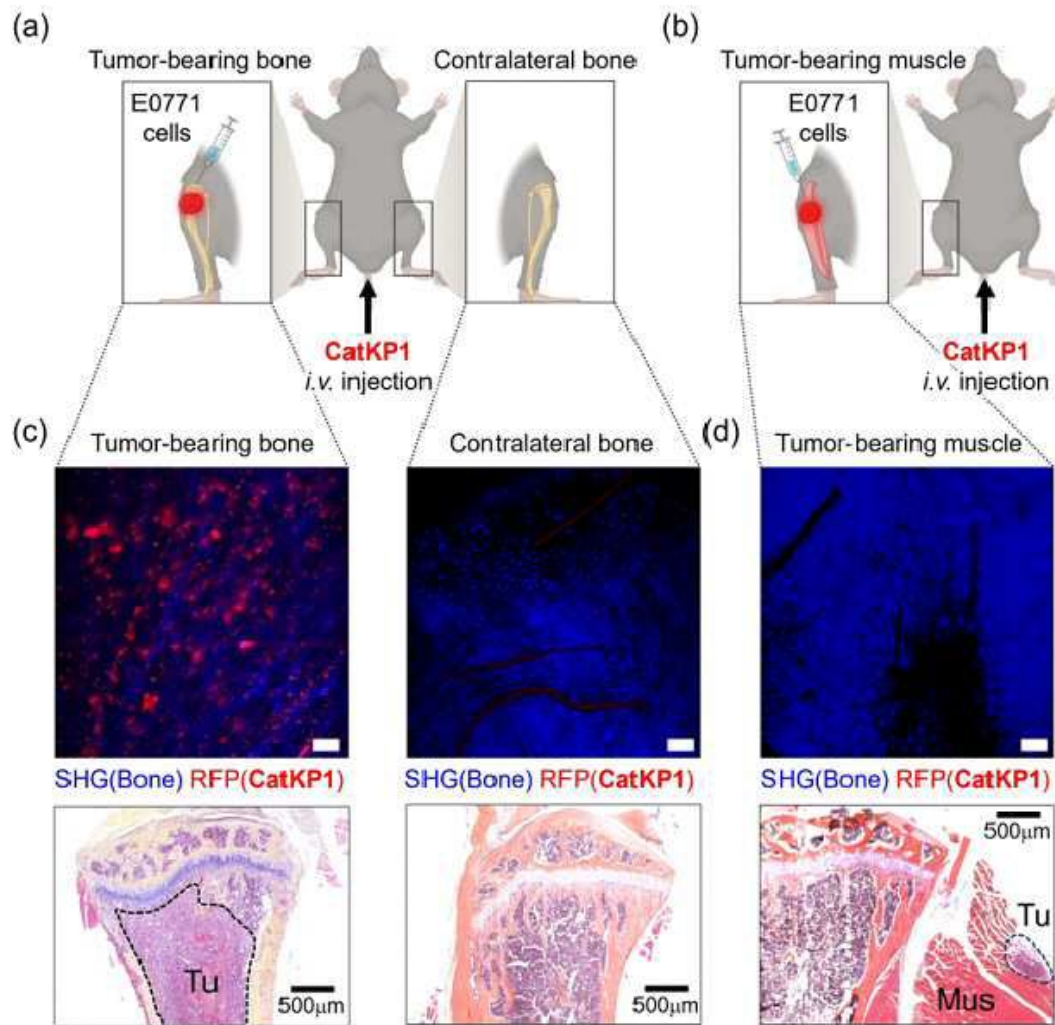
도면19



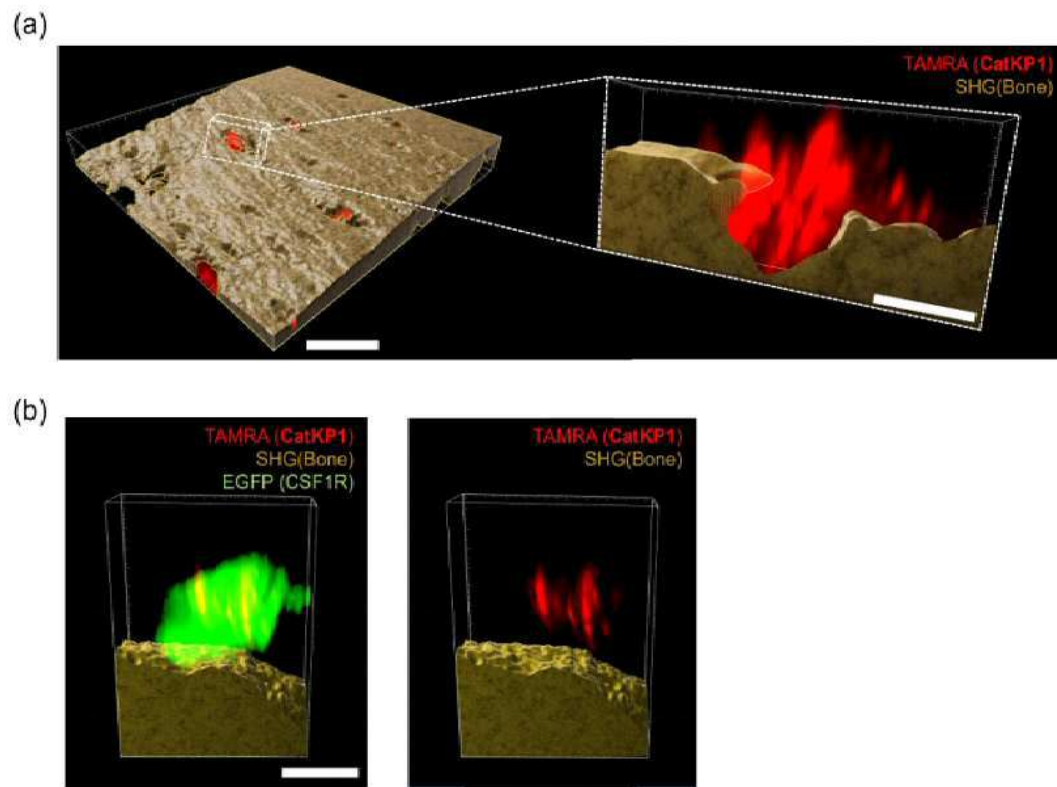
도면20



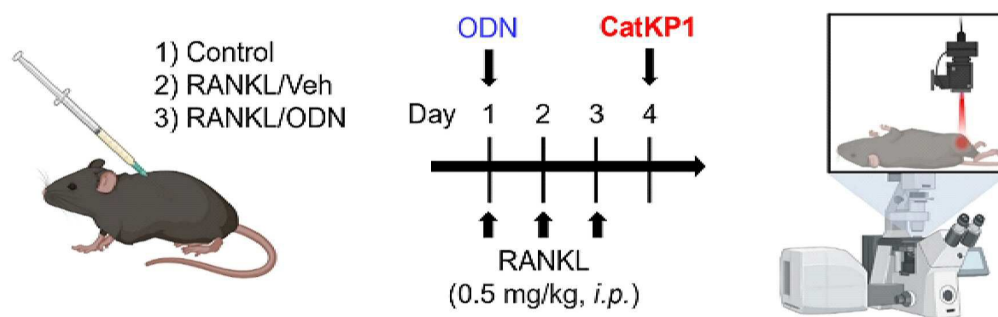
도면21



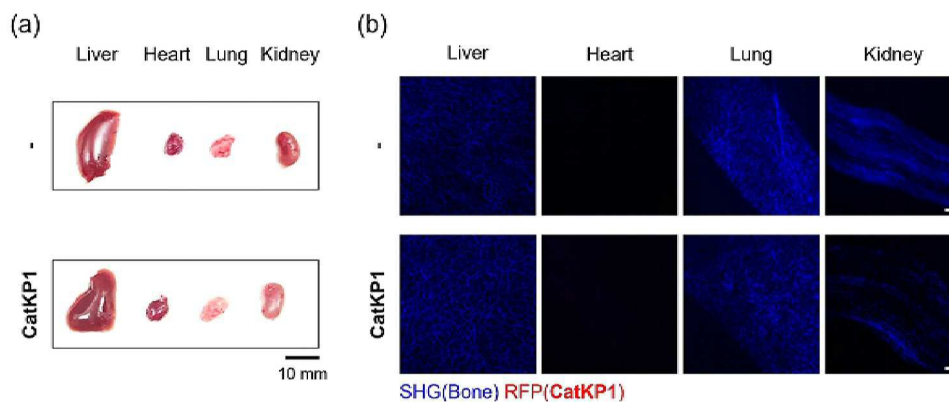
도면22



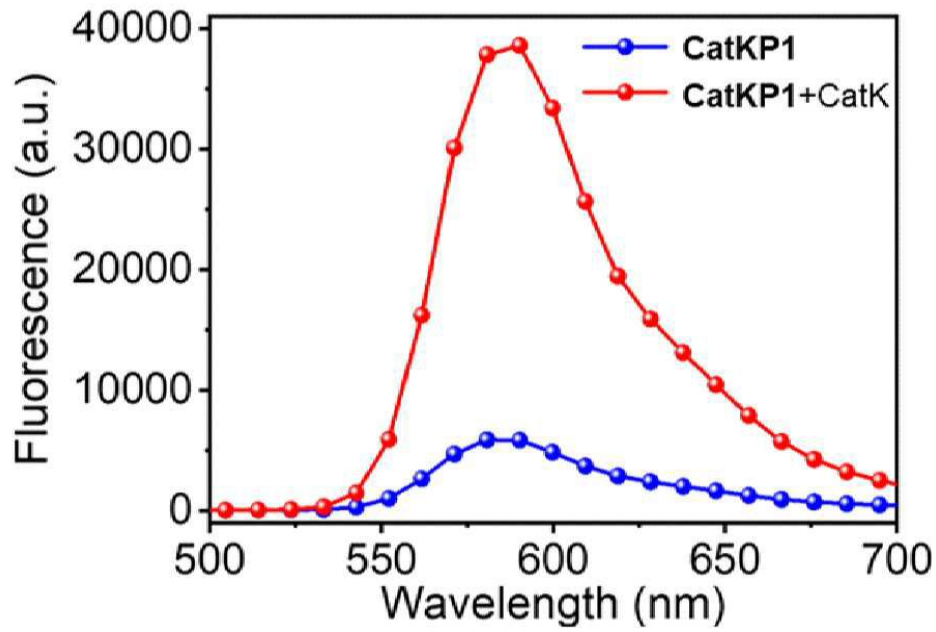
도면23



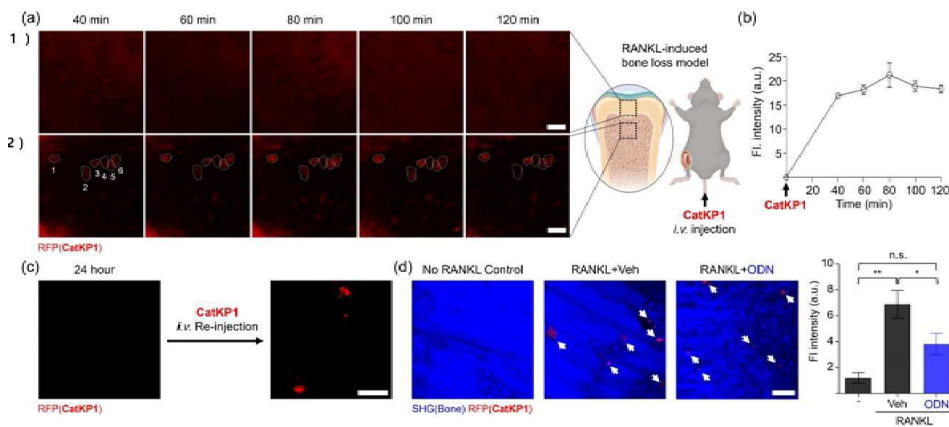
도면24



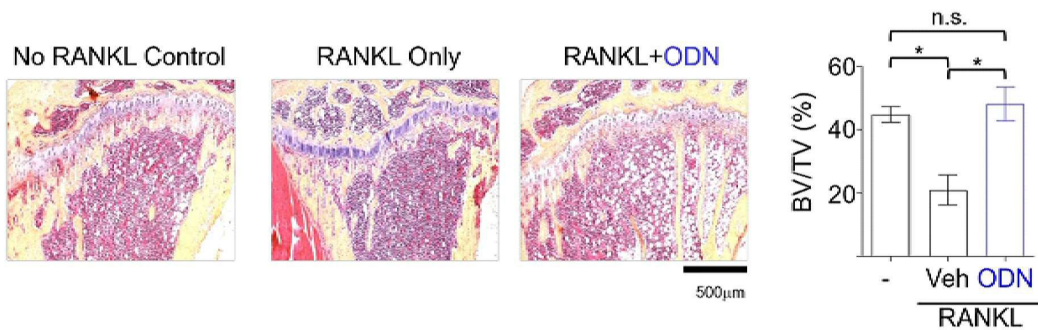
도면25



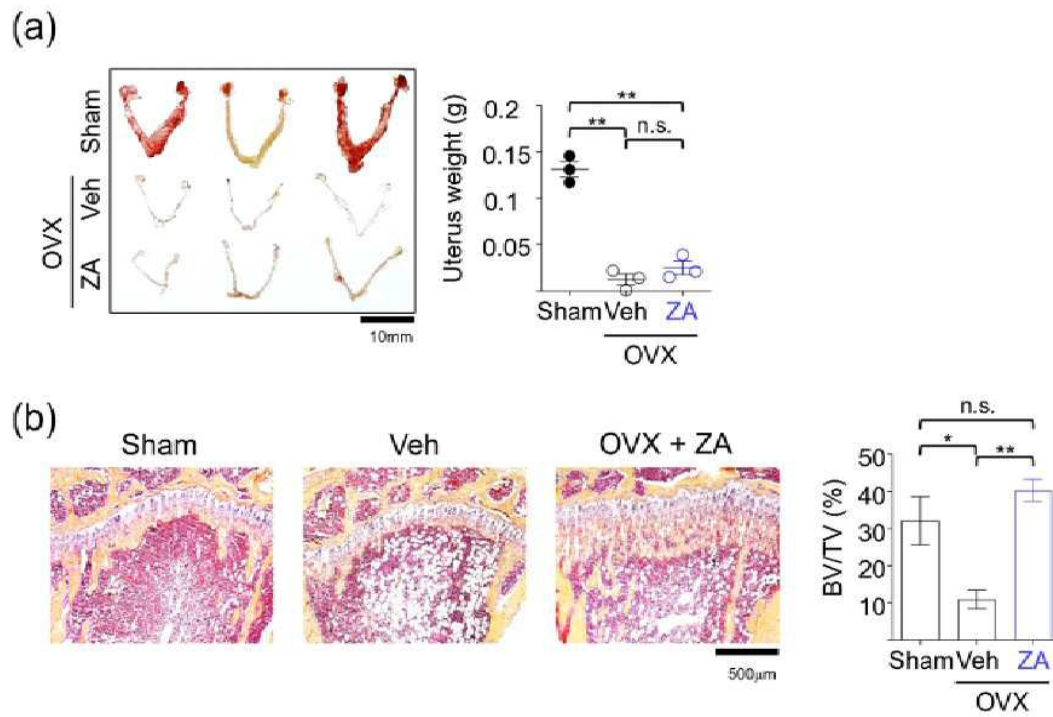
도면26



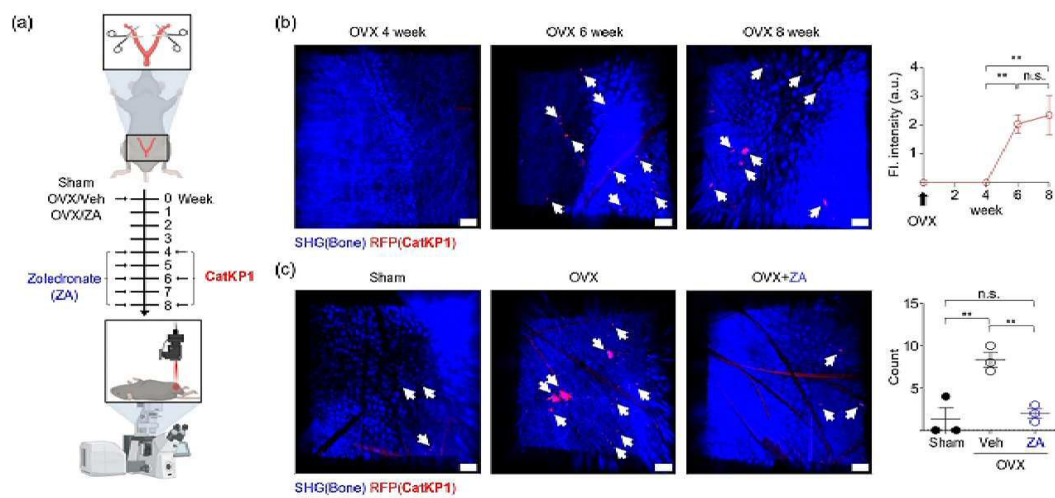
도면27



도면28



도면29



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.