



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0095269  
(43) 공개일자 2008년10월28일

- (51) Int. Cl.  
*A61K 38/16* (2006.01) *A61P 19/08* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01) *C12Q 1/48* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2008-7021261  
(22) 출원일자 2008년08월29일  
심사청구일자 없음  
번역문제출일자 2008년08월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2007/004510  
국제출원일자 2007년02월16일
- (87) 국제공개번호 WO 2007/098198  
국제공개일자 2007년08월30일
- (30) 우선권주장  
60/774,534 2006년02월17일 미국(US)  
60/844,239 2006년09월13일 미국(US)
- (71) 출원인  
**와이어쓰**  
미합중국 뉴저지 매디슨 파이프 지랄다-팜즈 (우  
편번호 07940-0874)
- (72) 발명자  
**빌리어드 줄리아**  
미국 펜실베니아주 칼리지 노쓰 그린지 애비뉴 50  
**리우 안**  
미국 펜실베니아주 칼리지빌 건과우더 코트 600
- (74) 대리인  
**김성기, 김진희**

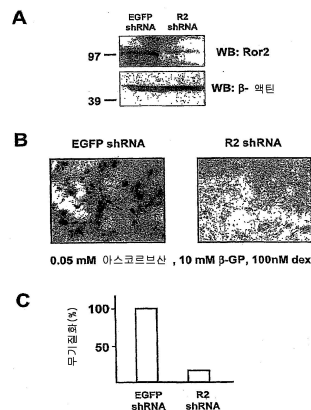
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 골 형성 조절

(57) 요약

본 발명은 골 형성 또는 흡수에 영향을 미치는 Ror 활성화(예컨대, Ror2 단백질 활성화) 및/또는 14-3-3 $\beta$ 를 조절하는 것에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 예로서, 골다공증 및 골절과 같은 골 관련 질병에 대한 치료법을 스크리닝, 진단 및 개발하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. Ror2 단백질에 대한 항체 및 항체 단편은 특히 Ror2 단백질을 이합체화시켜 Ror2를 활성화시키는 데 유용하다.

대표도 - 도1



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

골 관련 질병을 앓는 대상자에게 Ror2 단백질을 활성화시킬 수 있는 제제를 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 골 관련 질병을 치료 또는 예방하는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 골 관련 질병이 골 손실과 관련된 것인 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 질병이 골다공증, 골암, 관절염, 구루병, 골절, 치주 질환, 분절성 골 결손, 골용해성 골 질환, 원발성 및 속발성 부갑상선기능항진증, 파제트병, 골연화증, 및 과골증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 대상자가 인간인 방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질의 이합체화를 유발하는 것인 방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 제제가 소분자인 방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 제제가 단백질인 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질에 대한 항체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질에 대한 단일 클론 항체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 제제가 Ror2에 대한 인간 또는 인간화된 단일 클론 항체인 방법.

**청구항 11**

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 IgG 이소타입 항체인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질에 대한 항체 단편을 포함하는 것인 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질에 대한 F<sub>ab</sub> 단편을 포함하는 것인 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질에 대한 항체 단편을 2개 이상 포함하고, 상기 항체 단편은 서로 공유 결합되어 있는 것인 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 상기 제제를 비경구 투여하는 것인 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 상기 제제를 정맥내로 투여하는 것인 방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 상기 제제를 경구 투여하는 것인 방법.

**청구항 18**

Ror2를 발현하는 세포를, Ror2를 활성화시킬 수 있는 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 조골세포 분화를 증가시키는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 제제가 단백질인 방법.

**청구항 20**

제18항에 있어서, 상기 제제가 소분자인 방법.

**청구항 21**

제18항에 있어서, 상기 제제가 항체인 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질에 대한 항체인 방법.

**청구항 23**

제18항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질의 이합체화를 유발하는 것인 방법.

**청구항 24**

제18항에 있어서, 상기 제제가 Ror2 단백질에 의한 14-3-3 $\beta$ 의 인산화를 증가시키는 것인 방법.

**청구항 25**

제18항에 있어서, 상기 세포가 인간 세포인 방법.

**청구항 26**

제18항에 있어서, 상기 세포가 줄기 세포인 방법.

**청구항 27**

제18항에 있어서, 상기 세포가 중간엽 줄기 세포인 방법.

**청구항 28**

제18항에 있어서, 상기 접촉 단계를 생체외에서 수행하는 것인 방법.

**청구항 29**

제18항에 있어서, 상기 접촉 단계를 생체내에서 수행하는 것인 방법.

**청구항 30**

세포를, Ror2 단백질의 발현 또는 활성을 증가시키는 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 지방 생성 분화

(adipogenic differentiation)를 억제하는 방법.

**청구항 31**

Ror2 단백질을 발현하는 세포를 시험 제제와 접촉시키는 단계; 및 Ror2 활성이 증가되었는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, Ror2 활성을 증가시키는 제제를 스크리닝하는 방법.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 상기 Ror2가 Ror2의 세포 도메인인 방법.

**청구항 33**

제31항에 있어서, 상기 Ror2가 Ror2의 키나제 도메인인 방법.

**청구항 34**

제31항에 있어서, 상기 측정 단계가 Ror2 단백질의 키나제 활성을 평가하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 상기 Ror2 단백질의 키나제 활성을 평가하는 단계가 Ror2 단백질의 인산화 상태를 평가하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 36**

제31항에 있어서, 상기 측정 단계가 Ror2 단백질 또는 폴리뉴클레오티드의 발현 수준을 평가하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 37**

제31항에 있어서, 상기 측정 단계가 14-3-3 $\beta$  단백질의 인산화 상태를 평가하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 38**

제31항에 있어서, 상기 측정 단계가 무기질화된 기질 형성 수준을 측정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 39**

제31항의 방법에 의해 동정된 제제.

**청구항 40**

Ror2 단백질의 활성화를 유발하는, Ror2에 대한 항체.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 상기 항체가 Ror2 단백질의 이합체화를 유발하는 것인 항체.

**청구항 42**

제40항에 있어서, 상기 항체가 다중 클론 항체인 항체.

**청구항 43**

제40항에 있어서, 상기 항체가 단일 클론 항체인 항체.

**청구항 44**

제40항에 있어서, 상기 항체가 인간 항체인 항체.

**청구항 45**

제40항에 있어서, 상기 항체가 인간화된 항체인 항체.

**청구항 46**

제40항에 있어서, 상기 항체가 IgG 이소타입 항체인 항체.

**청구항 47**

제40항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편을 포함하는 것인 항체.

**청구항 48**

제40항에 있어서, 상기 항체 단편이 Fab 단편인 항체.

**청구항 49**

제40항에 있어서, 상기 항체가 Ror2 단백질에 대한 결합 부위를 2개 이상 갖는 것인 항체.

**청구항 50**

제40항에 있어서, 상기 항체가 Ror2 단백질에 대한 결합 부위를 정확히 2개 갖는 것인 항체.

**청구항 51**

골 관련 질병을 앓는 대상자에게 14-3-3 $\beta$  활성을 억제시킬 수 있는 제제를 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 골 관련 질병을 치료 또는 예방하는 방법.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 상기 제제가 14-3-3 $\beta$  발현을 하향 조절하는 것인 방법.

**청구항 53**

제51항에 있어서, 상기 제제가 14-3-3 $\beta$  특이적 siRNA 또는 shRNA인 방법.

**청구항 54**

Ror2의 세포외 도메인 및 TrkB의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 발현하는 세포를 제공하는 단계로서, 상기 세포는 cAMP 반응 요소(CRE) 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자 작제물을 포함하는 것인 단계;

상기 세포를 시험 제제와 접촉시키는 단계; 및

상기 세포에서의 상기 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계

를 포함하는, Ror2 단백질의 이합체화를 촉진하는 제제를 동정하는 방법.

**청구항 55**

제54항에 있어서, 상기 리포터 유전자가 루시페라제인 방법.

**청구항 56**

제54항에 있어서, 상기 세포가 CRE 프로모터에 작동 가능하게 연결된 루시페라제 코딩 유전자를 포함하는 플라스미드를 포함하는 것인 방법.

청구항 57

아미노산 서열:

MARGSALPRRPLL CIPAVWAAAALLLSVSR TSGEVEVLD PNDPLGPLD  
 GQDGIPTLKG YFLNFLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPNVRWLK  
 NDAPVVQEP RRIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYYQCVATNGMKTITA  
 TGVLFVRLGPTHSPNHNFQDDYHEDGFCQPYRGIACARFIGNRTIYVD  
 SLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLS DQCSQFAIPSFCHFVFPLCDARSR  
 APKPRELCRDECEVLES DLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPE  
 SPDAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSGMDYRGTASTTKSGHQCPW  
 ALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHA YCRNPGGQMEGPWCFTQNK NVRM  
 ELCDVPSCSPRDS SKMGILYlsvyavvviasvvgfllvmlflklarhskfgmkgpasvisn  
 ddsasp lhhisngsntpssegpdaviigmtkipvienpqyfgitnsq lkpdtfvqhikrhnivlkrelge  
 gafgkvflaecynlcp eqdkilvavktlkdasdnarkdfhreaelltnlqhehivkfygvcveg dplimvfe  
 ymkhgdlnkflrahgpdav lmaegnpteltqsqmlhiaqiaagmvylasqhfvhrdlatrnc lvgenll  
 vkigdfgmsrdvystdyrv gghtmlpirwmppesimyrkfttesdvwslgvvlweiftygkqpwyqls  
 nnevicitqgrvlqrprtcpqevyelmlgcwqreph  
 mrknikgihllqlakaspv yldilg (서열 번호: 4); 또는

서열 번호: 4와 90% 이상 상동성인 아미노산 서열의 단백질.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 아미노산 서열이

MARGSALPRRPLL CIPAVWAAAALLLSVSR TSGEVEVLD PNDPLGPLD  
 GQDGIPTLKG YFLNFLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPNVRWLK  
 NDAPVVQEP RRIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYYQCVATNGMKTITA  
 TGVLFVRLGPTHSPNHNFQDDYHEDGFCQPYRGIACARFIGNRTIYVD  
 SLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLS DQCSQFAIPSFCHFVFPLCDARSR  
 APKPRELCRDECEVLES DLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPE  
 SPDAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSGMDYRGTASTTKSGHQCPW  
 ALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHA YCRNPGGQMEGPWCFTQNK NVRM  
 ELCDVPSCSPRDS SKMGILYlsvyavvviasvvgfllvmlflklarhskfgmkgpasvisn  
 ddsasp lhhisngsntpssegpdaviigmtkipvienpqyfgitnsq lkpdtfvqhikrhnivlkrelge  
 gafgkvflaecynlcp eqdkilvavktlkdasdnarkdfhreaelltnlqhehivkfygvcveg dplimvfe  
 ymkhgdlnkflrahgpdav lmaegnpteltqsqmlhiaqiaagmvylasqhfvhrdlatrnc lvgenll  
 vkigdfgmsrdvystdyrv gghtmlpirwmppesimyrkfttesdvwslgvvlweiftygkqpwyqls  
 nnevicitqgrvlqrprtcpqevyelmlgcwqreph  
 mrknikgihllqlakaspv yldilg (서열 번호: 4); 또는

서열 번호: 4와 95% 이상 상동성인 아미노산 서열인 단백질.

청구항 59

제57항에 있어서, 상기 아미노산 서열이

MARGSALPRRPLLCPAVWAAAALLLSVSRTSGEVEVLDPNPLGPLD  
 GQDGPITLKGYFLNFLEPVNNITIVQGQTALHCKVAGNPPPNVRWLK  
 NDAPVVQEPRIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYYQCVATNGMKTITA  
 TGVLFVRLGPTHSPNHNFDYHEDGFCQPYRGIACARFIGNRTIYVD  
 SLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSFCHFVFPLCDARSR  
 APKPRELCRDECEVLESIDLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPE  
 SPDAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSGMDYRGTASTTKSGHQCPW  
 ALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHA YCRNPGGQMEGPWCFTQNKNVRM  
 ELCDVPSCSPRDSKMGILYlsvyavvviasvvgfllvmlflklarhskfgmkgpasvisn  
 dddsasplhshnsntpssegpdaviigmtkipvienpqyfgitnsqllkpdftvqhikrhnivlkrelge  
 gfgkvflaecynlcpdqkivavktlkdasdnarkdfhreaelltnlqhehivkfygvcvegplimvfe  
 ymkhgdlnkflrahgpdavlmagnppteitqsqmlhiaqiaagmvylasqhfvrhdlatrncnlvgenll  
 vkigdfgmsrdvystdyrvvgghtmlpirwmpsesimyrkfttesdvwslgvvlweiftygkqpwyqls  
 nnevicitqgrvlqrptcpqevyelmlgcwqreph  
 mrknikgihllqlnakaspyldilg (서열 번호: 4)

인 단백질.

명세서

기술분야

관련 출원

- <1>
- <2> 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에 2006년 2월 17일 출원된 미국 가특허 출원 USSN 60/774,534 및 2006년 9월 13일 출원된 USSN 60/844,239(본원에서 참고로 인용된다)에 대한 우선권을 주장한다.

배경기술

- <3> 지난 몇년간 골 관련 질병 및 질환에 관한 화제는 상당한 관심을 받았다. 골 관련 질병은 골 흡수와 골 형성 사이의 불균형으로부터 유발된 골 손실을 특징으로 한다. 평생 동안 골격골은 지속적으로 리모델링된다. 이러한 리모델링 과정에는 파골세포에 의한 골 흡수와 조골세포에 의한 골 형성 사이에 미묘한 균형이 존재한다. 연골 내 및 막내 골화, 둘 모두에 관여하는 조골세포는 기질 단백질을 제조하여 새로운 골을 형성시키는 골 조직 내의 분화된 세포이다. 골 형성, 즉, 골발생은 골격에서 골량을 유지시키는데 필수적이다. 조골세포와 달리, 파골세포는 골 흡수 및 제거와 관련된다. 정상적인 골에서 조골세포 매개 골 형성과 파골세포 매개 골 흡수 사이의 균형은 복합적인 조절 상호작용을 통해 유지된다.
- <4> 골격계와 관련된 결핍증, 질환, 및 질병이 다수 존재한다. 몇몇 예로는 골다공증, 골암, 관절염, 구루병, 골절, 치주 질환, 분절성 골 결손, 골용해성 골 질환, 원발성 및 속발성 부갑상선기능항진증, 파제트병, 골연화증, 파골증, 및 골화석증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 골발생 분화에 관여하는 기전 및 재생 과정을 확인하는 것은 골 생리 및 예로서, 골다공증과 같은 골격 질병을 이해하는데 중요하다. 이러한 질병은 추정 조골세포 전구세포의 결손성 성숙에 기인한 결핍성 골 형성을 포함할 수 있다.
- <5> 골 흡수 및 형성과 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법, 골 형성을 촉진하는 방법, 골 형성을 조절하는(증가 또는 감소시키는) 제제를 동정하는 방법, 골 흡수를 조절하는(증가 또는 감소시키는) 제제를 동정하는 방법, 및 골 관련 질병과 관련된 유전자 또는 그의 단백질 산물을 동정하는 방법의 개발에 관한 필요성이 요구되고 있다.
- <6> 골 형성 및 골 흡수에 관여하는 기전을 동정하는 것은 골 생리 및 예로서, 골다공증과 같은 골격 질병을 이해하는데 중요하다. 골 관련 질병과 관련된 유전자 또는 그의 단백질 산물은 골 형성, 골 흡수의 분자 기전을 해명하는데, 새로운 약물의 스크리닝 및 개발에, 골 발생 및 골 손실 질병의 진단, 예후, 예방, 및 치료에, 및 골다공증과 같은 골 관련 질병에 대한 치료법의 평가에 사용될 수 있다. 동정된 유전자 및 단백질은 또한 골 형성을

조절하는 약제학적 제제에 대한 검색에서 유용할 수 있다. 그러한 단백질로서, 최근 동정된 것이 Ror2 단백질이다. Ror2 유전자 발현을 하향 조절하는 것은 인간 중간엽 줄기 세포의 텍사메사손-유도성 골발생 분화를 억제하는 반면(도 1), Ror2 과발현은 이들 세포의 골발생 분화를 촉진한다(2004년 4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard *et al.*)(본원에서 참고로 인용된다)). 그러므로, Ror2와 Ror2 경로가 골 형성을 조절하는데 적합한 표적이 된다.

**발명의 상세한 설명**

**발명의 개요**

<7>

<8> 본 발명은 골 형성을 조절하는 시스템을 제공한다. 상기 시스템은 조골세포 분화에서 Ror2의 역할에 관한 발견에 기초한다. 특히, Ror2 단백질의 활성화가 무기질화된 골 형성을 일으킨다. 중간엽 줄기 세포의 골발생 분화에서 Ror2 발현이 중요한 것으로 밝혀졌다. Ror2 과발현 또한 중간엽 줄기 세포가 지방 세포로 분화되는 것을 억제하는 것으로 밝혀졌다. Ror2 단백질의 활성화가 14-3-3β를 인산화시키는 것도 밝혀졌다. 14-3-3β의 하향 조절이 인간 중간엽 줄기 세포에서 무기질화된 기질 형성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. Ror2 단백질, 그의 14-3-3β 단백질과의 상호작용, 및 14-3-3β의 하향 조절에 관한 상기 발견들이 골 형성을 조절하는 신규한 제제에 대한 검색에 있어서 Ror2, 14-3-3β 및 기타 하류 신호 전달 생체분자를 가장 중요한 표적이 되게 한다. Ror2 단백질을 활성화시키거나, 14-3-3β 단백질을 억제하거나, 하류에 있는 기타 표적을 조절하는 제제는 골 관련 질병, 특히, 골 손실과 관련된 질병의 치료 및 예방에 유용하다. 이러한 제제는 또한 조골세포 분화를 촉진하는데, 그리고, 무기질화된 기질 형성을 촉진하는데 유용하다. 별법으로, 이러한 제제는 또한 줄기 세포가 지방 세포로 분화되는 것을 억제하는데 사용될 수 있고, 비만, 대사 질병, 또는 당뇨병 치료에 유용할 수 있다.

<9> 본 발명은 Ror2 단백질을 활성화시키는 제제를 제공한다. 특정 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질을 이합체화시킴으로써 Ror2를 활성화시킨다. Ror2 단백질의 이합체화는 키나제 활성을 증가시키고, 이어서, 14-3-3β 단백질을 비롯한 Ror2의 결합 파트너를 인산화시킨다. 제제는 또한 골 성장을 촉진한다.

<10> 또다른 측면에서, 본 발명은 14-3-3 활성화, 특히, 14-3-3β 또는 14-3-3γ를 억제하거나 하향 조절하는 제제를 제공한다. 이러한 제제는 DNA 또는 단백질 수준에서 세포내 14-3-3 활성을 감소시키는 작용을 할 수 있다. 특정 실시태양에서, 제제는 조골세포, 중간엽 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 태아 줄기 세포, 골 전구세포, 전-조골세포, 성숙한 조골세포, 또는 조골세포 계통의 임의의 다른 세포와 같이 골 형성에 관여하는 세포를 표적으로 한다. 다른 실시태양에서, 제제는 지방 세포 형성에 관여하는 세포를 표적으로 한다. 예를 들면, 제제는 골을 표적으로 하는 비스포스포네이트 부분에 접합될 수 있다. 14-3-3β의 하향 조절이 무기질화된 기질 형성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 14-3-3 또는 14-3-3의 특정 이소폼을 표적으로 하는 제제는 Ror2 단백질을 활성화시키는 제제(예컨대, Ror2 단백질의 이합체화를 유발하는 제제)와 함께 사용될 수 있다. 그러한 조합이 골 형성을 촉진하는데 시너지 효과를 가져올 수 있다.

<11> 추가의 다른 측면에서, 본 발명은 골 형성을 조절하는데 있어 중요하다고 밝혀진 Ror2/14-3-3β 경로의 기타 하류 요소를 조절하는 제제를 제공한다. 이러한 제제는 단독으로, 또는 본원에 기술된 기타 제제와 함께 사용될 수 있다.

<12> 본 발명의 제제로 단백질, 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 및 소분자가 바람직하기는 하나, 임의 유형의 화학 화합물일 수 있다. 특정 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질의 이합체화를 촉진하는 항체 또는 그의 단편이다. 항체는 다중 클론 또는 단일 클론일 수 있지만; 인간 대상자 치료를 위해서는 인간화된 단일 클론 항체가 전형적으로 바람직하다. 항체 또는 그의 단편은 임의의 이소타입에 속할 수 있지만; 일반적으로는 IgG 이소타입이 바람직하다. 특정 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질에 대한 2가 또는 다가 항체 단편이다. 다른 실시태양에서, 제제는 14-3-3β 특이 RNAi, siRNA, 또는 shRNA 작제물이다.

<13> 하나의 측면에서, Ror2 단백질을 활성화시키거나, 14-3-3β 활성을 억제하는 제제는 대상자에게 투여되어 골 형성을 촉진한다. 특정 실시태양에서, Ror2 단백질을 활성화시키는 제제와 14-3-3β 활성을 억제하는 제제의 조합물이 대상자에게 투여된다. 특히, 제제의 투여로 조골세포 분화는 촉진되고/거나 무기질화된 기질 형성은 증가된다. 대상자는 골다공증, 골암, 관절염, 구루병, 골절, 치주 질환, 분절성 골 결손, 골용해성 골 질환, 원발성 및 속발성 부갑상선기능항진증, 파제트병, 골연화증, 및 과골증을 비롯한, 임의의 골 관련 질병을 앓고 있거나, 그에 대한 위험에 있을 수 있다. 제제는 특히 골 손실과 관련된 질환의 치료에 유용하다. 하나의 측면에서, 제제는 Ror2 단백질의 이합체화를 촉진하여 Ror2 단백질을 활성화시킨다. 제제는 임의 유형의 화학 화합물일 수 있지만; 소분자, 폴리뉴클레오티드, 단백질, 및 펩티드가 특히 유용하다. 특정 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백

질에 대한 항체 또는 항체 단편이다. 예를 들어, 크론병 및 다발성 경화증과 같은 인간 질환의 치료에서 인간화된 단일 클론 항체를 사용하는 것이 성공적이라면, 일반적으로 인간화된 단일 클론이 바람직하다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 발현, 특히, 14-3-3 $\beta$  또는 14-3-3 $\gamma$  발현을 하향 조절한다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 $\beta$  특이적 RNAi, shRNA, 또는 siRNA이다. 본 발명의 제제는 또한 지방 세포 분화를 희생시켜 조골세포 분화를 촉진함으로써 비만, 대사 질병, 또는 당뇨병 치료에 사용될 수 있다.

<14> 또다른 측면에서, Ror2 단백질을 활성화시키거나, 14-3-3 $\beta$  활성을 억제하는 제제와 세포를 접촉시켜 조골세포 분화 또는 골발생 분화를 촉진한다. 접촉된 세포는 전형적으로 Ror2 단백질 또는 14-3-3 $\beta$  단백질을 발현하고, 조골세포 표현형으로 분화될 수 있다. 특정 실시태양에서, 세포는 예를 들어, 중간엽 줄기 세포와 같은 줄기 세포이다. 상기 세포를 생체내 또는 시험관내에서 제제와 접촉시킬 수 있다. 또한 상기 세포를 생체외에서 제제와 접촉시킨 후, 그를 필요로 하는 대상자(예컨대, 골 관련 질병, 특히, 골 손실과 관련된 질병을 앓고 있는 대상자) 내로 도입시킬 수 있다.

<15> Ror2 과발현 및 14-3-3 $\beta$  억제는 또한 지방 생성 분화(지방 세포 분화) (adipogenic differentiation)를 억제한다는 것이 밝혀졌다. 그러므로, Ror2 단백질을 활성화시키거나, 14-3-3 $\beta$  활성을 억제하는 제제는 또한 지방 생성 분화를 억제하는데 유용하다. 그러므로, 본 발명의 제제는 예컨대, 중간엽 줄기 세포와 같은 줄기 세포의 지방 생성 분화를 억제하는데 특히 유용하다. 이러한 발견에 기초하여, Ror2 활성제 또는 14-3-3 $\beta$  하향 조절제가 비만, 대사 질병, 또는 당뇨병 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

<16> 본 발명은 또한 Ror2 활성 또는 발현을 조절하거나, 14-3-3 $\beta$  단백질의 인산화를 조절하는 제제를 동정하는 시스템을 포함한다. 스크리닝 시스템은 Ror2 단백질을 제제와 접촉시키고, 제제가 Ror2 활성 또는 발현에 미치는 효과를 검출하는 것을 포함한다. Ror2 활성 또는 발현이 증가한 것으로 검출되면, 이는 제제가 골 형성을 촉진하는데, 조골세포 분화를 촉진하는데, 또는 지방 생성 분화를 억제하는데 유용하다는 것을 지시한다. 특정 실시태양에서, Ror2 단백질의 활성은 Ror2 단백질의 이합체화 정도를 측정함으로써 평가된다. 다른 실시태양에서, Ror2 활성은 Ror2 단백질 그 자체 또는 14-3-3 $\beta$ 의 인산화 상태를 측정함으로써 평가된다. 다른 실시태양에서, Ror2 키나제 활성은 예를 들어, <sup>32</sup>P  $\gamma$  ATP, 또는 항-포스포티로신 항체를 사용하는 면역침전을 사용하여 측정된다. 특정 실시태양에서, 본 분석법은 Ror2 단백질을 발현하는 세포를 사용하는 세포 기초 분석법이다. 다른 실시태양에서, 본 분석법은 무세포성이고, 정제되거나 반-정제된 Ror2 단백질이 사용된다. 본 발명의 스크리닝 방법을 사용하여 동정된 제제 및 그의 억제학적 조성물은 본원에 기술된 본 발명의 치료 방법에서 특히 유용하다.

<17> 본 발명은 또한 Ror2 단백질의 이합체화를 촉진하는 제제를 동정하는 분석법을 제공한다. 상기 분석법은 특히 다수의 유망한 화합물을 스크리닝하는 고처리량 기법을 잘 따를 수 있다. Ror2 단백질의 세포외 도메인으로 구성된 키메라 수용체는 TrkB의 세포내 도메인에 융합된다. 세포외 Ror2 도메인을 이합체화시키는 제제는 TrkB 신호 전달 경로를 활성화시켜 CRE 프로모터 활성을 증가시킨다. CRE 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자, 예로서, 루시페라제는 이어서 Ror2를 이합체화시키는 화합물을 동정하는데 사용될 수 있다. Ror2-TrkB 키메라 분석법은 앞서 Ror2를 이합체화시키는 것으로 제시된 항-Ror2 항체를 사용함으로써 입증되었다. 비특이적 IgG로 처리된 세포와 비교할 때 Ror2 특이적 항체는 관찰되었던 루시페라제 활성을 용량에 의존하는 방식으로 증가시킨다(도 12 참조). 분석법은 Ror2를 활성화시키는 제제를 동정하는 것으로서, 신속한 고처리량의 고감도 분석법을 제공한다. 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, TrkB 이외의 기타 세포내 도메인을 사용하여 키메라를 제조할 수 있다. 그럴 경우, 본 분석법에서는 리포터 유전자에 작동 가능하게 연결된 다른 프로모터를 필요로 할 수 있다. 본 발명의 분석법에 의해 Ror2의 활성제 또는 이합체화제로서 동정된 제제 또한 본 발명의 일부로서 간주된다.

<18> **정의**

<19> 본원에서 사용되는 용어 및 약어에 대한 전반적 이해를 위해 하기 정의를 제공한다.

<20> 본원 및 첨부하는 청구의 범위에서 사용되는 바, 단수 형태 "하나," "한" 및 "그"는 문맥상 달리 분명하게 명시하지 않는 한, 복수형에 대한 언급도 포함한다. 따라서, 예를 들면, "하나의 세포"에 대하여 언급하는 것은 상기 세포 여러 개를 포함하고, "하나의 항체"에 대하여 언급하는 것은 하나 이상의 항체 및 당업자에게 공지되어 있는 그의 등가물 등에 대하여 언급하는 것이다.

<21> 본 명세서에서 약어는 하기와 같이 측정법, 기법, 성질 또는 화합물의 단위에 상응한다: "g"은 그램(들)을 의미하고, "mg"은 밀리그램(들)을 의미하고, "ng"은 나노그램(들)을 의미하고, "kDa"은 킬로달톤(들)을 의미하고, "°C"는 섭씨도(들)를 의미하고, "cm"는 센티미터(들)를 의미하고, "s"는 초(들)를 의미하고, "분(min)"은 분

(들)을 의미하고, "h"는 시간(들)을 의미하고, "l"는 리터(들)를 의미하고, "ml"는 밀리리터(들)을 의미하고, "μl"는 마이크로리터(들)을 의미하고, "pl"은 피코리터(들)을 의미하고, "M"은 몰랄을 의미하고, "mM"은 밀리몰랄을 의미하고, "mmole"은 밀리몰(들)을 의미하고, "kb"는 킬로베이스(들)를 의미하고, "bp"는 염기쌍(들)을 의미하고, "RT"는 실온을 의미한다.

- <22> "고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography)"는 HPLC로 약칭된다.
- <23> "오픈 리딩 프레임(open reading frame)"은 ORF로 약칭된다.
- <24> "질량 분광법(Mass-spectroscopy)"은 MS로 약칭된다.
- <25> "직렬 질량 분광법(Tandem mass-spectroscopy)"은 MS/MS로 약칭된다.
- <26> "폴리아크릴아미드 겔 전기영동(Polyacrylamide gel electrophoresis)"은 PAGE로 약칭된다.
- <27> "중합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction)"은 PCR로 약칭된다.
- <28> "역전사효소 중합효소 연쇄 반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction)"은 RT-PCR로 약칭된다.
- <29> "나트륨 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate)"는 SDS로 약칭된다.
- <30> "나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)"은 SDS-PAGE로 약칭된다.
- <31> "아데닌 뉴클레오티드 트랜스로케이터 2(adenine nucleotide translocator)"는 ADP/ATP 캐리어 단백질로 약칭된다.
- <32> "골 무기질 밀도(Bone Mineral Density)"는 BMD로 약칭된다.
- <33> "리보솜 RNA(Ribosomal RNA)"는 rRNA로 약칭된다.
- <34> "비번역 영역(Untranslated region)"은 UTR로 약칭된다.
- <35> 본 개시 내용과 관련하여 다수의 용어가 사용되어야 한다. 본원에서 사용되는 바, Ror은 수용체 티로신 키나제-유사 오르판 수용체 계열을 지칭한다. "Ror 분자"는 Ror 폴리펩티드, Ror 단백질, Ror 펩티드, 그의 단편, 변이체, 및 돌연변이체 뿐만 아니라, Ror 폴리펩티드, Ror 단백질, Ror 펩티드 및 그의 단편 또는 변이체 또는 돌연변이체를 코딩하는 핵산도 지칭한다. "Ror 분자"는 또한 Ror 폴리뉴클레오티드, 유전자 및 그의 변이체 및 돌연변이체도 지칭한다. "Ror 분자" 및 "Ror"은 Ror1 및 Ror2 분자, 둘 모두를 지칭한다.
- <36> "표적 Ror 분자"는 그의 활성이 본 발명의 제제에 의해 조절되는 Ror 분자를 지칭한다. 표적 Ror 분자는 Ror 폴리펩티드, 상동체, 유도체 또는 그의 단편 또는 변이체 또는 돌연변이체일 수 있다. 관심의 대상이 되는 Ror 분자는 또한 핵산(RNA 또는 DNA의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드)일 수 있다. 예를 들어, Ror 유전자의 단백질이 실험에서 관심의 대상이 되는 경우, 표적 Ror 분자는 상기 단백질이 될 것이다. 표적 Ror 분자라는 용어는 전장의 분자 및 그의 단편, 변이체, 및 돌연변이체, 예로서, 단백질의 에피토프, 둘 모두를 지칭하는 것임을 이해하여야 한다. 표적 Ror 분자는 Ror1 분자 또는 Ror2 분자중 어느 하나 또는 둘 모두일 수 있다. 특정 실시태양에서, 표적 Ror 분자는 Ror2 단백질이다.
- <37> "14-3-3"이라는 용어는 신호 전달에 관여하는 단백질 계열을 지칭한다. 14-3-3 단백질은 다수의 결합 파트너를 갖고, 많은 다양한 세포 과정 군에 관여한다. 14-3-3 단백질은 그의 표적에 결합하고, (1) 입체구조적 변화; (2) 서열 특이적 또는 구조적 단백질 특성의 물리적 폐색; 및/또는 (3) 스캐폴딩을 일으킴으로써 그의 효과를 발휘한다. 14-3-3 단백질의 구조 및 기능에 관한 수개의 리뷰 논문은 ([Bridges and Moorhead, "14-3-3 Proteins: A Number of Functions for a Numbered Protein," *Sci. STKE* re10, 2004]; [Mackintosh, "Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes," *Biochem. J.* 381:329-42, 2004](이들 각각은 본원에서 참고로 인용된다))이다. "14-3-3"은 14-3-3 폴리펩티드, 14-3-3 단백질, 14-3-3 펩티드, 그의 14-3-3 단편, 14-3-3 변이체, 및 14-3-3 돌연변이체 뿐만 아니라, 14-3-3 폴리펩티드, 14-3-3 단백질, 14-3-3 펩티드 및 그의 14-3-3 단편 또는 14-3-3 변이체 또는 14-3-3 돌연변이체를 코딩하는 핵산을 지칭할 수 있다. β, ε, η, γ, τ, ζ, 및 σ를 비롯한 수개의 14-3-3 이소폼이 동정되었다. Ror2 단백질의 활성화가 이소폼 14-3-3를 인산화시키는 것으로 밝혀졌다. 14-3-3β 및 14-3-3γ, 둘 모두는 Ror2와 상호작용하는 것으로 밝혀졌다. 특정 경우에 있어서는, 구체적으로 14-3-3β를 지칭한다. 특정 경우에 있어서는, 구체적으로 14-3-3γ를 지칭한다.

- <38> "핵산 분자"라는 용어는 단일 가닥 형태, 또는 이중 가닥 나선의 리보뉴클레오티드(RNA 분자) 또는 데옥시리보뉴클레오티드(DNA 분자)의 포스페이트 에스테르 형태, 또는 임의의 포스포디에스테르 유사체를 지칭한다. 이중 가닥 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 나선이 가능하다. 핵산 분자, 및 특히, DNA 또는 RNA 분자라는 용어는 상기 분자의 1차 및 2차 구조를 지칭하며, 그를 임의의 특정 3차 형태로 제한하지 않는다. 따라서, 이러한 용어는 특히, 선형(예컨대, 제한 단편) 또는 환형 DNA 분자, 플라스미드, 및 염색체로 발견되는 DNA 분자, 플라스미드, 및 염색체를 포함한다. 특정 이중 가닥 DNA 분자의 구조를 논의할 때, 서열은 DNA의 비전사 가닥(즉, mRNA와 상동성인 서열을 갖는 가닥)을 따라 5'→3' 방향의 서열만을 제공하는 정규 규정에 따라 기술될 수 있다.
- <39> "재조합 핵산 분자"는 분자 생물학적으로 조작된 핵산 분자, 즉, 비천연적으로 발생된 핵산 분자 또는 유전조작된 핵산 분자이다. 추가로, "재조합 DNA 분자"라는 용어는 천연적으로 발생되지 않았거나, 또는 2개의 다른 분리된 핵산 서열 세그먼트의 인공 조합에 의해, 즉, 정상적으로는 연속적이지 않은 DNA 조각을 함께 결합시킴으로써 제조될 수 있는 핵산 서열을 지칭한다. 종종 화학적 합성 수단에 의해, 또는 예컨대, 제한 효소, 리가제를 사용하는 유전공학 기법, 및 예를 들어, ([Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N.Y.; (1989)], 또는 [Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols (1989), and DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (ed. D. N. Glover) IREL Press, Oxford, (1985)](이들 각각은 본원에서 참고로 인용된다))에 기재되어 있는 유사한 재조합 기법에 의한 분리된 핵산 세그먼트의 인공 조작에 의해 달성되는 인공 조합은 "재조합적으로 생산되는 것"을 의미한다.
- <40> 전형적으로는 서열 인식 부위를 도입하거나 제거하면서, 하나의 코돈을 동일한 아미노산 또는 보존적 아미노산을 코딩하는 중복 코돈으로 대체하기 위해 상기와 같은 조작이 수행될 수 있다. 별법으로, 통상 천연 형태로는 발견되지 않는 원하는 기능 조합을 포함하는 단일 유전자 실체를 생성하기 위하여 원하는 기능을 갖는 핵산 세그먼트를 함께 결합시킬 수 있다. 제한 효소 인식 부위는 종종 그러한 인공 조작의 표적이 되지만, 다른 부위 특이적 표적, 예컨대, 프로모터, DNA 복제 부위, 조절 서열, 제어 서열, 오픈 리딩 프레임, 또는 다른 유용한 특징이 디자인에 의해 혼입될 수 있다. 재조합 핵산 분자의 일례로는 재조합 벡터, 예로서, 5' → 3'(센스) 배향으로 또는 3' → 5'(안티센스) 배향으로 Ror 계열 단백질 또는 면역글로불린 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 함유하는 클로닝 또는 발현 벡터를 포함한다.
- <41> "폴리뉴클레오티드," "뉴클레오티드 서열," "핵산," "핵산 분자," "핵산 서열," 및 "올리고뉴클레오티드"는 DNA 및 RNA에서 일련의 뉴클레오티드 염기("뉴클레오티드"로도 명명됨)를 지칭하며, 2개 이상의 뉴클레오티드의 임의의 쇄를 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 또는 이중 가닥의 키메라 혼합물 또는 유도체, 또는 그의 변형된 버전일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 분자의 안전성, 그의 혼성화 파라미터 등을 개선시키기 위해 골격에서 변형될 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 히포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카복시히드록시메틸) 우라실, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실케오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실케오신, 5'-메톡시카복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 위부톡소신, 슈도우라실, 케오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산, 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카복시프로필) 우라실, 및 2,6-디아미노퓨린을 포함하나, 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택되는 변형된 염기 부분을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 전형적으로 단백질 및 효소를 제조하는 세포 기구에 의해 사용되는 정보를 비롯한, 유전 정보를 수반한다. 이러한 용어는 더블 또는 단일 가닥 게놈 및 cDNA, RNA, 임의의 합성 및 유전적으로 조작된 폴리뉴클레오티드, 및 센스 및 안티센스 폴리뉴클레오티드 둘 모두를 포함한다. 이는 단일 및 이중 가닥 분자, 즉, DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 하이브리드 뿐만 아니라, 아미노산 골격에 염기를 접합시킴으로써 형성된 "단백질 핵산"(PNA: protein nucleic acid)을 포함한다. 이는 또한 변형된 염기, 예를 들어, 티오-우라실, 티오-구아닌, 및 플루오로-우라실을 함유하거나, 당질, 또는 지질을 함유하는 핵산을 포함한다.
- <42> 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 당업계에 공지된 표준 방법, 예를 들어, 자동 DNA 합성기(예컨대, Biosearch, Applied Biosystems 등으로부터 시판되는 기기)를 이용하여 합성할 수 있다. 예시한 바와 같이, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 [Stein *et al.*, Nucl. Acids Res., 16, 3209, (1988)]에 기재된 방법에 의해 합성될 수 있으며, 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오티드는 기공이 조절되는 유리 중합체 지지체 등의 사용으로 제조될 수 있다[Sarin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 7448-7451, (1988)]. 안티센스 DNA 또는 RNA

를 세포로 전달하는 다수의 방법이 개발되었고, 예를 들면, 안티센스 분자는 조직 부위로 직접 주입될 수 있거나, 원하는 세포를 표적하도록 디자인된 변형된 안티센스 분자(특히, 표적 세포 표면 상에서 발현되는 수용체 또는 항원에 결합하는 펩티드 또는 항체에 연결된 안티센스)는 전신 투여될 수 있다. 별법으로, RNA 분자는 안티센스 RNA 분자를 코딩하는 DNA 서열의 시험관내 및 생체내 전사에 의해 생성될 수 있다. 그러한 DNA 서열은 적합한 RNA 중합효소 프로모터, 예컨대, T7 또는 SP6 중합효소 프로모터가 혼입된 매우 다양한 벡터에 혼입될 수 있다. 별법으로, 안티센스 RNA를 구성적으로 또는 유도적으로 합성하는 안티센스 cDNA 작제물은 사용되는 프로모터에 따라 세포주에 안정하게 도입될 수 있다. 그러나, 내인성 mRNA의 번역을 억제하기에 충분한 안티센스의 세포내 농도를 달성하기 어려운 경우도 있다. 그러므로, 바람직한 접근법은 안티센스 올리고뉴클레오티드가 강한 프로모터하에 제어되는 재조합 DNA 작제물을 사용한다. 환자에서 표적 세포를 형질감염시키는 상기와 같은 작제물의 사용으로 내인성 표적 유전자의 전사체와 함께 상보적인 염기쌍을 형성하게 되는 단일 가닥 RNA가 충분한 양으로 전사될 것이며, 이로써 표적 유전자 mRNA는 번역되지 못할 것이다. 예를 들어, 그러한 벡터는 생체내에 도입되면 세포에 의해 흡수되어 안티센스 RNA의 전사를 지시할 수 있다. 그러한 벡터는 전사되어 원하는 안티센스 RNA를 생산할 수 있는 한, 예피솜에 잔류하거나 염색체에 통합될 수 있다. 그러한 벡터는 당업계의 표준 재조합 DNA 기술 방법에 의해 작제될 수 있다. 벡터는 포유동물 세포에서의 복제 및 발현에 사용되는 플라스미드, 바이러스, 또는 당업계에 공지된 기타의 것일 수 있다. 안티센스 RNA를 코딩하는 서열은 포유동물, 바람직하게, 인간 세포에서 작용하는 것으로서 당업계에 공지되어 있는 임의의 프로모터에 의해 발현될 수 있다. 그러한 프로모터는 유도성 또는 구성성일 수 있다. 그러한 프로모터는 SV40 초기 프로모터 영역[Bernoist and Chambon, Nature, 290, 304-310, (1981)], 로우스 육종 바이러스의 3' 말단의 긴 반복서열에 함유된 프로모터[Yamamoto et al., Cell, 22, 787-797, (1980)], 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터[Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1441-1445, (1981)], 금속티오네인 유전자의 조절 서열[Brinster et al., Nature 296, 39-42, (1982)] 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 조직 부위로 직접 도입될 수 있는 재조합 DNA 작제물을 제조하기 위하여 임의 유형의 플라스미드, 코스미드, 효모 인공 염색체 또는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 별법으로, 원하는 조직을 선택적으로 감염시키는 바이러스 벡터가 사용될 수 있는데, 이러한 경우, 투여는 또다른 경로(예컨대, 전신 투여)에 의해 수행될 수 있다.

<43> 폴리뉴클레오티드는 천연 조절(발현 제어) 서열 측면에 위치할 수 있거나, 프로모터, 내부 리보솜 진입 부위(IRES: internal ribosome entry site) 및 기타 리보솜 결합 부위 서열, 인핸서, 반응 요소, 억제자, 신호 서열, 폴리아데닐화 서열, 인트론, 5'- 및 3'-비코딩 영역 등을 비롯한, 이종 서열과 결합될 수 있다. 핵산은 또한 당업계에 공지된 다수의 수단에 의해 변형될 수 있다. 그러한 변형의 비제한적 일례로는 메틸화, "캡", 하나 이상의 천연적으로 발생된 뉴클레오티드를 유사체로 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예로서, 전하를 띠지 않는 결합(예컨대, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등)을 갖는 것 및 전하를 띠는 결합(예컨대, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 것을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 단백질(예컨대, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-라이신 등), 인터칼레이터(예컨대, 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예컨대, 금속, 방사능 금속, 철, 산화성 금속 등) 및 알킬화제와 같이 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 부위를 함유할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 메틸 또는 에틸 포스포트리에스테르 또는 알킬 포스포아미데이트 결합의 형성에 의해 유도체화될 수 있다. 추가로, 본원의 폴리뉴클레오티드는 직접적으로든 또는 간접적으로든 검출가능한 신호를 제공할 수 있는 표지로 변형될 수 있다. 표지의 예로는 방사능 동위원소, 형광성 분자, 비오틴 등이 포함된다.

<44> "RNA 전사체"는 RNA 중합효소에 의해 촉진된 DNA 서열의 전사로부터 생성된 산물을 지칭한다. RNA 전사체가 DNA 서열의 상보적인 복사체일 경우, 이는 1차 전사체로서 지칭되고, 또는 상기 1차 전사체의 전사후 프로세싱으로부터 유도된 RNA 서열일 수 있으며, 이는 성숙한 RNA로 지칭된다. "전령 RNA(mRNA)"는 인트론이 없고, 세포에 의해 폴리펩티드로 번역될 수 있는 RNA를 지칭한다. "cRNA"는 재조합 cDNA 주형으로부터 전사된 상보성 RNA를 지칭한다. "cDNA"는 mRNA 주형에 상호성이고, 그로부터 유도된 DNA를 지칭한다. cDNA는 단일 가닥일 수 있거나, 예를 들면, DNA 중합효소 I의 클레노우(Klenow) 단편에 의해 이중 가닥 형태로 전환될 수 있다.

<45> RNA의 일부분에 "상보성인" 서열은 RNA와 혼성화하여 안정적인 이분쇄를 형성할 수 있을 정도의 충분한 상보성을 지닌 서열을 지칭하며; 이중 가닥 안티센스 핵산의 경우에는, 이로써 이분쇄 DNA의 단일 가닥이 시험될 수 있거나, 삼분쇄 형성에 대해 분석될 수 있다. 혼성화 능력은 안티센스 핵산의 상보성 정도와 그의 길이, 둘 모두에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 혼성화하는 핵산이 길수록 더욱 많은 염기가 RNA와 불일치하고, 이는 안정적인 안정적인 이분쇄(경우에 따라 삼분쇄)를 함유하고 이를 형성할 수 있다. 당업자는 혼성화된 복합체의 용점을 측정하는 표준 방법의 사용으로 허용할 수 있는 불일치도를 확인할 수 있다.

- <46> "핵산" 또는 "핵산 서열," "핵산 분자," "핵산 단편," 또는 "폴리뉴클레오티드" 용어는 "유전자," "유전자에 의해 코딩되는 RNA" 및 "cDNA"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- <47> "폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드"라는 용어는 오직 코딩 서열만을 포함할 수 있는 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라, 추가의 코딩 또는 비코딩 서열을 포함할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.
- <48> 적절한 온도 및 용액 이온 강도 조건하에 핵산 분자의 단일 가닥 형태가 다른 핵산 분자에 어닐링할 수 있을 때, 핵산 분자는 또다른 핵산 분자, 예로서, cDNA, 게놈 DNA, 또는 RNA에 "혼성화할 수 있는 것이다"[Sambrook, J. et al. eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6)]. 온도 및 이온 강도 조건이 혼성화의 "엄격도"를 결정한다. 상동성 핵산에 관한 예비 스크리닝의 경우, 55°C의  $T_m$ 에 상응하는 낮은 엄격도 혼성화 조건은 사용될 수 있는데, 예컨대, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.25% 밀크, 및 포름아미드 미함유; 또는 30% 포름아미드, 5x SSC, 0.5% SDS를 포함한다. 중간 정도의 엄격도 혼성화 조건은 보다 높은  $T_m$ , 예컨대, 5x 또는 6x SSC와 함께 40% 포름아미드에 상응한다. 고도의 엄격도 혼성화 조건은 가장 높은  $T_m$ , 예컨대, 50% 포름아미드, 5x 또는 6x SSC에 상응한다. 혼성화의 엄격도에 따라 염기 사이가 불일치할 수 있지만, 혼성화를 위해서는 2개의 핵산이 상보성 서열을 함유하여야 한다. 혼성화하는 핵산의 적절한 엄격도는 당업계에 잘 알려져 있는 변수인 핵산 길이 및 상보성 정도에 따라 달라진다. 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 유사성 또는 상동성 정도가 클수록, 상기 서열이 갖는 핵산 하이브리드에 대한  $T_m$  값은 크다. 핵산 혼성화의 상대적인 안정도(보다 높은  $T_m$ 에 상응)는 하기 순서대로 감소한다: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. 길이가 100 초과인 뉴클레오티드의 하이브리드에 대한  $T_m$ 을 계산하는 식이 유도되었다[Sambrook et al. eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6), 9.50-9.51]]. 보다 짧은 핵산, 즉, 올리고뉴클레오티드와의 혼성화에 있어서, 불일치 위치가 보다 중요하고, 올리고뉴클레오티드의 길이가 그의 특이성을 결정한다[Sambrook et al. eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6), 11.7-11.8)].
- <49> "상보성"이라는 용어는 서로서로 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 설명하기 위하여 사용된다. 예를 들면, DNA와 관련하여, 아데노신은 티민과 상보성이고, 시토신은 구아닌과 상보성이다.
- <50> 당업계에 공지되어 있는 "동일성"과 "유사성"이란, 서열을 비교함으로써 측정되는 2개 이상의 폴리펩티드 서열 또는 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 관계이다. 또한, 당업계에서 동일성이란 서열들을 일렬로 매치 시킴으로써 결정될 수 있는, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열들 사이의 서열 관련 정도를 의미한다. 동일성과 유사성, 둘 모두는 예로서, ([Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988]; [Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993]; [Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994]; 및 [Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991])에 기재되어 있는 것과 같은 공지 방법에 의해 용이하게 계산될 수 있다. 서열 간의 동일성 및 유사성을 측정하는데 보편적으로 사용되는 방법으로는 [Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988)]에 개시되어 있는 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 동일성 및 유사성을 측정하는 방법은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 프로그램으로 만들어져 있다. 2개의 서열 사이의 동일성 및 유사성을 측정하기에 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법에는 GCG 프로그램 패키지[Devereux, J., et al. 1984], BLASTP, BLASTN 및 FASTA [Atschul, S. F. et al., J Molec. Biol., 215, 403 (1990)]를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- <51> "상동성"이라는 것은 2개의 중합체(즉, 폴리펩티드 분자 또는 핵산 분자) 사이의 서열 유사성 정도를 지칭한다. 본원에서 나타낸 상동성 퍼센트 수치는 2개의 중합체 사이의 가능한 최대 상동성, 즉, 일치하는(상동성인) 위치의 갯수가 최대가 되도록 2개의 중합체를 정렬하였을 때의 상동성 퍼센트를 반영한다.
- <52> "상동성 퍼센트(%)"라는 용어는 폴리펩티드 사이의 아미노산 서열 동일성 정도를 지칭한다. 2개의 폴리펩티드 사이의 상동성은 어느 한쪽 서열 중 소정 위치의 매치되는 아미노산의 총 갯수의 직접 함수이며, 예컨대, 어느 한쪽 서열내 아미노산 총 갯수의 절반이 동일하다면, 이 경우, 2개의 서열은 50% 상동성을 보인다고 언급될 수 있다.

- <53> 폴리펩티드에 관하여 언급할 때, "단편," "유사체," 및 "유도체"는 본질적으로 원래의 폴리펩티드와 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 유지할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 따라서, 유사체는 전구체 단백질 일부의 절단에 의해 활성화되어 활성인 성숙한 폴리펩티드를 생산할 수 있는 전구체 단백질을 포함한다. 폴리펩티드의 단편, 유사체, 또는 유도체는, 하나 이상의 아미노산이 보존적 또는 비보존적 아미노산 잔기로 치환되어 있는데, 상기 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 코딩되는 것이거나 코딩되는 것이 아닐 수 있는 것, 또는 하나 이상의 아미노산이 치환기를 포함하는 것, 또는 폴리펩티드의 반감기를 증가시키기 위해 폴리펩티드가 화합물, 예로서, 폴리에틸렌 글리콜에 용해되어 있는 것, 또는 추가의 아미노산이 폴리펩티드 예로서, 신호 펩티드, 또는 폴리펩티드 또는 전구체 단백질의 정제에 사용되는 예로서, 폴리히스티딘 태그와 같은 서열에 용해되어 있는 것일 수 있다. 그러한 단편, 유사체, 또는 유도체는 본 발명의 범주내 포함되는 것으로 간주된다.
- <54> "폴리뉴클레오티드 서열의 보존적 잔기"는 비교되는 2개 이상의 관련 서열의 동일 위치에 있는, 변경되지 않는 잔기이다. 상대적으로 보존적인 잔기는 서열내 다른 장소에서 출현하는 잔기보다 더 관련이 있는 서열들 중에서 보존적인 것이다.
- <55> 관련이 있는 폴리뉴클레오티드는 상당 비율로 동일한 잔기를 공유하는 폴리뉴클레오티드이다.
- <56> 상이한 폴리뉴클레오티드는, 하나가 궁극적으로 또다른 하나로부터 유도된 것이라면, 서로 "상응한다." 예를 들면, 전령 RNA는 그가 전사된 유전자에 상응한다. cDNA는 그가 이로부터 예로서, 역전사 반응에 의해, 또는 RNA 서열 지식에 기초한 화학적인 DNA 합성에 의해 생산되는 RNA에 상응한다. cDNA는 또한 RNA를 코딩하는 유전자에도 상응한다. 폴리뉴클레오티드는 또한 비교되는 상이한 종, 계, 또는 변종에서 관련이 있는 폴리펩티드를 코딩하는 것과 같은 유사한 기능을 한다면, 이는 서로 "상응하는 것이다."
- <57> DNA, RNA 또는 폴리뉴클레오티드의 "유사체"는 형태 및/또는 기능(예컨대, 상보성 폴리뉴클레오티드 서열상의 염기쌍과의 서열 특이성 수소 결합에 관여할 수 있는 능력)에 있어서 천연적으로 발생된 폴리뉴클레오티드와 유사하지만, 예를 들면, 드문 또는 비천연 염기 또는 변경된 골격을 소지한다는 점에서 DNA 또는 RNA와 상이한 분자를 지칭한다. 예를 들어, [Uhlmann et al., Chemical Reviews 90, 543-584, (1990)]을 참조할 수 있다.
- <58> "코딩 서열" 또는 발현 산물, 예로서, RNA, 폴리펩티드, 또는 단백질을 "코딩하는" 서열은 발현시에 상기 RNA, 폴리펩티드, 또는 단백질(예컨대, 효소)을 생산하는 뉴클레오티드 서열이며, 즉, 뉴클레오티드 서열은 상기 폴리펩티드 또는 단백질에 대한 아미노산 서열을 코딩한다.
- <59> 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 "상당 부분"은 당업자에 의한 서열의 수동 평가에 의해, 또는 알고리즘, 예로서, BLAST(Basic Local Alignment Search Tool; [Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1993)]; 또한 [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)로 참조)를 사용하는 컴퓨터 자동 서열 비교 및 동정에 의해 폴리펩티드 또는 유전자를 추정적으로 동정하기에 충분할 정도로 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 부분이다.
- <60> 그러므로, 뉴클레오티드 서열의 "상당 부분"은 특히 서열을 포함하는 핵산 단편을 동정 및/또는 단리시키기 위해 충분한 정도로 서열을 포함한다. 본원에 보고된 서열의 이익을 얻을 수 있는 당업자는 이에 당업자가 알고 있는 목적을 위해 개시된 서열 모두 또는 상당 부분을 사용할 수 있다.
- <61> "합성 유전자"는 당업자가 알고 있는 방법을 사용하여 화학적으로 합성되는 올리고뉴클레오티드 구성 블록으로부터 조립할 수 있다. 이러한 구성 블록을 결합시키고 어닐링하여 유전자 세그먼트를 형성한 후, 효소적으로 조립하여 전체 유전자를 작제한다. DNA 서열과 관련하여, "화학적으로 합성된"이라는 것은 뉴클레오티드 성분이 시험관내에서 조립되었다는 것을 의미한다. 잘 알려져 있는 방법을 사용하여 수동적인 DNA의 화학적 합성을 수행할 수 있거나, 다수의 상업적으로 이용 가능한 기계들 중 하나를 사용함으로써 자동으로 화학적 합성을 실시할 수 있다. 그러므로, 유전자는 숙주 세포의 코돈 사용 편향성(bias)을 반영하는 뉴클레오티드 서열의 최적화에 기초하여 최적의 유전자 발현을 위해 적합화될 수 있다. 코돈 사용이 숙주가 선호하는 코돈으로 편향되어 있다면, 성공적으로 유전자가 발현될 수 있다는 가능성을 당업자는 이해할 것이다. 바람직한 코돈을 결정하는 것은 서열 정보가 이용 가능한 숙주 세포로부터 유래된 유전자 검사에 기초할 수 있다.
- <62> "유전자"는 코딩 서열 앞(5' 비코딩 서열) 및 뒤(3' 비코딩 서열)의 조절 서열을 비롯한, 특히 단백질을 발현하는 핵산 단편을 지칭한다. "천연 유전자"는 그 자신의 조절 서열과 함께 자연 상태하에서 발견되는 유전자를 지칭한다. "키메라 유전자" 또는 "키메라 작제물"이란 자연 상태하에서는 함께 발견되지 않는 조절 서열과 코딩 서열을 포함하는, 천연 유전자를 제외한 임의의 유전자 또는 작제물을 지칭한다. 따라서, 키메라 유전자 또는 키메라 작제물은 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 코딩 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되었

지만, 자연 상태에서 발견되는 것과는 상이한 방식으로 배열된 조절 서열 및 코딩 서열을 포함할 수 있다. "내인성 유전자"는 유기체의 게놈내 그의 본래의 위치에 있는 천연 유전자를 지칭한다. "외래" 유전자는 정상적으로는 숙주 유기체에서 발견되지 않지만, 유전자 전달에 의해 숙주 유기체 내로 도입되는 유전자를 지칭한다. 외래 유전자는 비천연 유기체 내로 삽입된 천연 유전자, 또는 키메라 유전자를 포함할 수 있다. "이종 유전자"는 형질전환 방법에 의해 게놈 내로 도입된 유전자이다.

- <63> "조절 서열"은 코딩 서열 상류(5' 비코딩 서열)에, 코딩 서열 내에, 또는 코딩 서열의 하류(3' 비코딩 서열)에 위치하며, 결합된 코딩 서열의 전사, RNA 프로세싱 또는 안정성, 또는 번역에 영향을 미치는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 조절 서열은 프로모터, 번역 리더 서열, 인트론, 및 폴리아데닐화 인식 서열을 포함할 수 있다.
- <64> "유전자 제어 서열"은 유전자 전사를 개시하는데 필요한 DNA 서열과, 개시가 일어날 때의 속도를 조절하는데 필요한 것을 지칭한다. 따라서, 유전자 제어 서열은 일반 전사 인자와 중합효소가 조립되는 곳인 프로모터와, 프로모터에서의 상기 조립 과정 속도를 제어하는 것으로, 유전자 조절 단백질이 결합하는 모든 조절 서열로 구성될 수 있다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 제어 서열은 프로모터, 임의로는 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함할 수 있다. 진핵 세포는 프로모터, 인핸서, 및/또는 폴리아데닐화 신호를 사용할 수 있다.
- <65> "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능성 RNA의 발현을 제어할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일반적으로, 코딩 서열은 프로모터 서열에 대해 3' 방향에 위치한다. 프로모터 서열은 인접한 상류 요소와 보다 말단에 위치하는 상류 요소로 구성되는데, 후자의 요소는 종종 인핸서로 지칭된다. 따라서, "인핸서는 프로모터 활성을 자극시킬 수 있고, 프로모터의 선천적인 요소이거나, 프로모터의 발현 수준 또는 조직 특이성을 증진시키기 위하여 삽입된 이종 요소일 수 있는 뉴클레오티드 서열이다. 프로모터는 완전히 천연 유전자로부터 유래될 수 있거나, 자연 상태에서 발견되는 상이한 프로모터로부터 유래된 상이한 유전자로 구성될 수 있거나, 심지어는 합성 뉴클레오티드 세그먼트를 포함할 수 있다. 상이한 프로모터는 상이한 프로모터가 상이한 조직 또는 세포 유형에서, 또는 상이한 발생 단계에서, 또는 상이한 환경 조건하의 반응에서 유전자 발현을 지시할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.
- <66> "3' 비코딩 서열"은 코딩 서열 하류에 위치하는 뉴클레오티드 서열을 지칭하고, 폴리아데닐화 인식 서열, 및 mRNA 프로세싱 또는 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있는 조절 신호를 코딩하는 기타 서열을 포함한다. 폴리아데닐화 신호는 일반적으로 mRNA 전구체의 3' 말단에 폴리아데닐산 트랙을 첨가하는 것에 영향을 미치는 것을 특징으로 한다.
- <67> "번역 리더 서열"은 유전자의 프로모터 서열과 코딩 서열 사이에 위치하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 번역 리더 서열은 번역 개시 서열 상류의, 완전히 프로세싱된 mRNA에 존재한다. 번역 리더 서열은 mRNA로의 1차 전사체의 프로세싱, mRNA 안정성 또는 번역 효율성에 영향을 줄 수 있다.
- <68> "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는 하나의 기능이 나머지 하나에 의해 영향을 받도록 단일 핵산 단편 상에 있는 2개 이상의 핵산 단편의 회합을 지칭한다. 예를 들면, 프로모터가 코딩 서열의 발현에 영향을 줄 수 있을 때(즉, 코딩 서열이 프로모터의 전사 제어하에 있을 때), 프로모터가 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되어 있다고 한다. 코딩 서열은 센스 또는 안티센스 배향으로 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. "골 세포에서 작동가능한 프로모터"라는 용어는 골 세포의 RNA 중합효소에 의해 인식되는 프로모터를 지칭한다.
- <69> "RNA 전사체"는 DNA 서열의 RNA 중합효소 촉진 전사로부터 생성된 산물을 지칭한다. RNA 전사체가 DNA 서열의 완전한 상보적인 복사체일 경우, 이는 1차 전사체로 지칭되거나, 또는 상기 1차 전사체의 전사후 프로세싱으로부터 유도된 RNA 서열일 수 있으며, 이는 성숙한 RNA로 지칭된다. "전령 RNA(mRNA)"는 인트론이 없고, 폴리펩티드로 번역될 수 있는 RNA를 지칭한다. "cDNA"는 mRNA에 상호성이고, 그로부터 유도된 이중 가닥 DNA를 지칭한다. "센스" RNA는 mRNA를 포함하고, 이로써 세포에 의해 폴리펩티드로 번역될 수 있는 RNA 전사체를 지칭한다. "안티센스 RNA"는 표적 1차 전사체 또는 mRNA 모두에 또는 그 일부분에 상보성이고, 표적 유전자의 발현을 차단하는 RNA 전사체를 지칭한다(미국 특허 번호 제5,107,065호(이는 본원에서 참고로 인용된다)를 참조한다). 안티센스 RNA의 상보성은 특이적인 뉴클레오티드 서열의 임의 부분, 즉, 5' 비코딩 서열, 3' 비코딩 서열, 인트론, 또는 코딩 서열에서 존재할 수 있다. "기능성 RNA"는 센스 RNA, 안티센스 RNA, 리보자임 RNA, 또는 번역될 수는 없지만, 세포 과정에 영향을 미치는 기타 RNA를 지칭한다.
- <70> "발현"이라는 용어는 본 발명의 핵산 단편으로부터 유도된 센스(mRNA) 또는 안티센스 RNA의 전사 및 안정적인 축적을 지칭한다. 발현은 또한 mRNA가 폴리펩티드로 번역되는 것을 지칭할 수 있다. "안티센스 억제"라는 것은 표적 단백질의 발현을 억제시킬 수 있는 안티센스 RNA 전사체의 생산을 지칭한다.

- <71> "과발현"이라는 것은 정상 또는 비형질전환된 유기체에서의 생산 수준을 초과하는, 유기체내 유전자 산물의 생산을 지칭한다. "억제"라는 것은 외래 또는 내인성 유전자 또는 RNA 전사체의 발현을 억제시키는 것을 지칭한다.
- <72> "수준 변경"은 정상 또는 비형질전환된 유기체에서의 것과 상이한 양 또는 비율로 유기체에서 유전자 산물(들)이 생산되는 것을 지칭한다. 원하는 발생 단계하에 원하는 조직에서 유전자 또는 작제물의 발현을 지시할 수 있는 프로모터에 코딩 영역이 작동 가능하게 연결되어 있는 키메라 유전자 또는 키메라 작제물을 먼저 작제함으로써 본 발명의 폴리펩티드의 과발현을 수행할 수 있다. 편의를 위해 키메라 유전자 또는 키메라 작제물은 동일 유전자로부터 유래한 프로모터 서열 및 번역 리더 서열을 포함할 수 있다. 전사 종결 신호를 코딩하는 3' 비코딩 서열도 제공될 수 있다. 본 키메라 유전자 또는 키메라 작제물은 또한 유전자 발현을 촉진하기 위하여 하나 이상의 인트론을 포함할 수 있다. 이어서, 본 키메라 유전자 또는 키메라 작제물을 포함하는 플라스미드 벡터를 작제할 수 있다. 숙주 세포를 형질전환시키기 위하여 사용되는 방법에 따라 플라스미드 벡터의 선택은 달라진다. 키메라 유전자 또는 키메라 작제물을 함유하는 숙주 세포를 성공적으로 형질전환시키고, 선별하고, 증식시키기 위해 플라스미드 벡터 상에 존재하여야 하는 유전 요소에 관해 당업자는 잘 알고 있다. 또한 상이한 독립적인 형질전환 이벤트가 상이한 수준과 패턴의 발현을 일으킬 것이며([Jones et al., EMBO J., 4, 2411-2418, (1985)]; [De Almeida et al., Mol. Gen. Genetics, 218, 78-86, (1989)]), 이로써, 원하는 발현 수준 및 패턴을 디스플레이하는 계열을 획득하기 위해서는 다수의 이벤트가 스크리닝되어야 한다는 것도 당업자는 인지할 것이다. 그러한 스크리닝은 DNA 썬던 분석, mRNA 발현 노던 분석, 단백질 발현의 웨스턴 또는 면역세포화학적 분석, 또는 표현형 분석에 의해 수행될 수 있다.
- <73> "변이체" 또는 "변이체들"이라는 용어는 Ror 분자의 핵산 또는 아미노산 서열의 변형물을 지칭한다. Ror 분자의 뉴클레오티드 및 아미노산 치환, 첨가, 또는 결실이 "변이체(들)"내 포함된다. 또한, 화학적으로 변형된 천연 및 합성 Ror 분자는 "변이체(들)"이라는 용어내 포함된다. 예를 들면, 변이체는 참고 폴리펩티드와는 상이한 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 일반적으로, 아미노산 서열이 참고 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드와, 참고 폴리펩티드 사이의 차이는, 참고와 변이체의 아미노산 서열이 전반적으로 매우 유사하고, 몇몇 영역에서는 동일하도록 제한된다. 변이체 및 참고 폴리펩티드는, 보존적이거나, 비보존적일 수 있고, 임의 조합으로 존재할 수 있는 하나 이상의 치환, 결실, 첨가, 융합 및 절단에 의해서 아미노산 서열이 상이할 수 있다. 예를 들면, 변이체는 수개, 예를 들어, 50개 내지 30개, 30개 내지 20개, 20개 내지 10개, 10개 내지 5개, 5개 내지 3개, 3개 내지 2개, 2개 내지 1개, 또는 1개의 아미노산이 임의 조합으로 삽입, 치환, 또는 결실되어 있는 것일 수 있다. 추가로, 변이체는 예로서, 말단 또는 내부 결실에 의해 참고 서열보다 짧기 때문에 참고 폴리펩티드 서열과 상이한 본 발명의 폴리펩티드의 단편일 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 변이체는 또한 상기 폴리펩티드와 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 본질적으로 보유하는 폴리펩티드, 예컨대, 전구체 일부의 절단으로 인하여 활성화됨으로써 활성인 성숙한 폴리펩티드를 생산할 수 있는 전구체 단백질을 포함한다. 이러한 변이체는 단백질을 코딩하는 구조 유전자의 뉴클레오티드 서열 상의 차이를 특징으로 하는 대립 변이일 수 있거나, 차별적 스플라이싱 또는 번역후 변형을 포함할 수 있다. 변이체는 또한 실질적으로 동일한 생물학적 활성을 갖지만, 상이한 종으로부터 획득된 것인 관련 단백질을 포함한다. 당업자는 단일 또는 다중의 아미노산 치환, 결실, 첨가, 또는 대체를 갖는 변이체를 생산할 수 있다. 이러한 변이체로는 특히 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존적 또는 비보존적 아미노산 잔기(바람직하게는, 보존적 아미노산 잔기)로 치환되고, 상기 치환된 아미노산 잔기는 상기 유전자 코드에 의해 코딩된 것이거나 코딩된 것이 아닐 수 있는 것, 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산이 펩티드 또는 단백질로부터 결실되어 있는 것, 또는 (iii) 하나 이상의 아미노산이 폴리펩티드 또는 단백질에 첨가되어 있는 것, 또는 (iv) 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환기를 포함하는 것, 또는 (v) 성숙한 폴리펩티드가 또다른 화합물, 예로서, 폴리펩티드의 반감기를 증가시키는 화합물(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜)에 융합되어 있는 것, 또는 (vi) 추가의 아미노산이 성숙한 폴리펩티드 예로서, 리더 또는 분비 서열, 또는 성숙한 폴리펩티드 또는 전구체 단백질 서열의 정제에 사용되는 서열에 융합되어 있는 것을 포함할 수 있다. 폴리펩티드의 변이체는 또한 천연적으로 발생된 변이체, 예로서, 천연적으로 발생된 대립 변이체일 수 있거나, 천연적으로 발생하는 것으로 알려진 것이 아닌 변이체일 수 있다. 상기에 정의되어 있는 상기와 같은 변이체 모두 당업계의 교시 범위에 포함되는 것으로 간주된다.
- <74> 본 발명의 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 단리된 형태로 제공되고, 균질성을 띠도록 정제될 수 있다. 특정 경우에, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드의 순도는 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상이다.
- <75> "단리된"이라는 용어는 물질을 그의 원래의 또는 천연 환경(예컨대, 천연적으로 발생된 경우라면, 자연 환경)으

로부터 떼어낸다는 것을 의미한다. 그러므로, 살아있는 동물내 존재하는 천연적으로 발생된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된 것이 아니지만, 인간의 개입으로 자연계내 공존하는 물질중 일부 또는 모두로부터 분리되어진 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 단리된 것이다. 예를 들면, "단리된 핵산 단편"은 임의로 합성, 비천연 또는 변경된 뉴클레오티드 염기를 함유하는, 단일 또는 이중 가닥인 RNA 또는 DNA의 중합체이다. DNA 중합체 형태의 단리된 핵산 단편은 하나 이상의 cDNA, 게놈 DNA 또는 합성 DNA 세그먼트로 구성될 수 있고, 당질, 지질, 단백질 또는 기타 물질과 조합될 수 있다. 그러한 폴리뉴클레오티드는 백터의 일부일 수 있고/거나, 그러한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 조성물의 일부가 될 수 있으며, 상기 백터 또는 조성물은 사실상 발견되는 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 단리된 것이다. 유사하게, "실질적으로 정제된"이라는 용어는 사실상 그가 발생하는 당해 화학적 환경으로부터 인간의 개입을 통해 분리되거나, 또는 다르게는 떼어진 물질을 지칭한다. 실질적으로 정제된 폴리펩티드 또는 핵산은 본 분야에 일반적으로 공지되어 있는 다수의 기법과 방법들 중 임의의 것에 의해 수득되거나 생산될 수 있다.

<76> "정제"라는 용어는 샘플내 특정 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 특정 활성 또는 농도를 증가시키는 것을 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 특정 활성은 표적 폴리펩티드의 활성과 샘플내 총 폴리펩티드의 농도 사이의 비로서 표시된다. 또다른 실시태양에서, 특정 활성은 표적 폴리펩티드의 농도와 총 폴리펩티드의 농도 사이의 비로서 표시된다. 정제 방법으로는 당업자에게 잘 알려져 있는 방법인, 투석, 원심분리, 및 칼럼 크로마토그래피 기법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, [Young *et al.*, 1997, "Production of biopharmaceutical proteins in the milk of transgenic dairy animals," *BioPharm* 10(6): 34-38]을 참조한다.

<77> "실질적으로 순수한" 및 "단리된"이라는 용어는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 사실상 회합되어 있지 않은 물질, 및 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 혼합물을 제외시키고자 하는 것은 아니다.

<78> "세포," "세포주," 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어 모두 그의 자손도 포함하며, 이는 임의 및 모든 후대 세대이다. 고의성 또는 우발성 돌연변이로 인하여 모든 자손이 동일할 수는 없다는 것을 이해할 것이다. 이종 핵산 서열을 발현하는 것과 관련하여, "숙주 세포"는 시험관내 또는 생체내 위치하든 간에, 원핵 또는 진핵 세포(예컨대, 세균 세포, 예로서, 이. 콜라이(*E. coli*), 효모 세포, 포유동물 세포, 조류 세포, 양서류 세포, 식물 세포, 어류 세포, 및 곤충 세포)를 지칭한다. 예를 들면, 숙주는 형질전환 동물내 위치할 수 있는 세포를 복제할 수 있는 임의의 형질전환 가능한 유기체를 포함할 수 있다. 숙주 세포는 백터에 대한 수혜자로서 사용될 수 있고/거나, 백터에 의해 코딩되는 이종 핵산을 발현시킬 수 있다.

<79> 포유동물 세포 시스템에 의해 생산되는 외래 단백질을 발현시키고 회수하는 일반적인 방법은 예를 들면, [Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), pages 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996)]에 의해 제공된다. 세균 시스템에 의해 생산된 단백질을 회수하는 표준 기법은 예를 들면, [Grisshammer *et al.*, "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells," in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2nd Edition, Glover *et al.* (eds.), pages 59-92 (Oxford University Press 1995)]에 의해 제공된다. 곤충 세포의 형질전환 및 그 안의 외래 폴리펩티드의 생산은 US5162222(Guarino *et al.*) 및 WIPO 공보 W094/06463에 개시되어 있다. 베칼로 바이러스(Baculovirus) 시스템으로부터 재조합 단백질을 단리시키는 방법은 또한 [Richardson (ed.), "Baculovirus Expression Protocols" (The Humana Press, Inc. 1995)]에 기재되어 있다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 베칼로바이러스 발현 시스템을 사용하여 발현될 수 있다([Luckow *et al.*, *Bio/Technology*, 1988, 6, 47, "Baculovirus Expression Vectors: a Laboratory Manual", O'Rielly *et al.* (Eds.), W. H. Freeman and Company, New York, 1992], US4,879,236(이들 각각의 전문이 본원에서 참고로 인용된다)을 참고한다). 추가로, 예를 들면, MAXBAC.TM. 완전 베칼로바이러스 발현 시스템(Invitrogen)이 곤충 세포에서의 생산을 위해 사용될 수 있다.

<80> 본 발명의 폴리펩티드는 또한 특정 성질을 이용함으로써 단리될 수 있다. 예를 들면, 고정 금속 이온 흡착(IMAC: immobilized metal ion adsorption) 크로마토그래피는 폴리히스티딘 태그를 포함하는 것을 비롯한, 히스티딘이 풍부한 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있다. 요약하면, 먼저 겔을 2가 금속 이온으로 하전시켜 길레이트를 형성한다[Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3:1 (1985)]. 히스티딘이 풍부한 단백질은 사용되는 금속 이온에 따라 다른 친화도로 상기 매트릭스에 흡착될 것이며, 경쟁 용출에 의해, pH를 강하함으로써, 또는 강한 길레이트제의 사용으로 용출될 것이다. 기타 정제 방법으로는 렉틴 친화성 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피에 의한 당화된 단백질의 정제를 포함한다[M. Deutscher, (ed.), *Meth. Enzymol.* 182:529 (1990)]. 본 발명의 추가의 실시태양 내에서 관심의 대상이 되는 폴리펩티드와 친화성 태그(예컨대, 말토스 결합 단백질, 면

역글로불린 도메인)의 용합물은 정제를 촉진하기 위해서 작제될 수 있다.

- <81> 세포를 적합한 배양 배지에서 배양하고, 당업계에 공지되어 있는 정제 방법, 예컨대, 면역친화성 크로마토그래피, 수용체 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 렉틴 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 여과, 양이온 또는 음이온 교환 크로마토그래피, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC: high pressure liquid chromatography), 역상 HPLC 등을 비롯한 통상의 크로마토그래피 방법에 의해 원하는 폴리펩티드 산물을 세포, 또는 상기 세포가 배양된 배지로부터 단리시키는 대규모 Ror 폴리펩티드 생산 방법에 본 발명의 숙주 세포를 사용할 수 있다. 기타 정제 방법으로는 특정 결합 파트너 또는 물질에 의해 인식되는 특정 태그, 표지, 또는 킬레이트 부분을 갖는 용합 단백질로서 원하는 단백질을 발현시키고 정제하는 방법을 포함한다. 정제된 단백질을 절단하여 원하는 단백질을 수득할 수 있거나, 무손상 용합 단백질로서 그대로 남겨둘 수 있다. 용합물 성분을 절단함으로써 절단 과정의 결과로서 추가의 아미노산 잔기를 갖는 원하는 단백질 형태를 생산할 수 있다.
- <82> "시험관내"라는 용어는 인공 환경, 및 인공 환경 내에서 발생하는 반응 또는 과정을 지칭한다. 시험관내 환경으로는 시험관 및 세포 배양물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. "생체내"라는 용어는 천연 환경(예컨대, 동물 또는 세포), 및 천연 환경 내에서 발생하는 과정 또는 반응을 지칭한다.
- <83> 본 발명의 방법은 세포(배양된 세포), 및 핵 추출물을 비롯한 세포 분해물을 사용하여 시험관내에서 실시될 수 있다. 골 형성을 조절하는 제제를 동정하는데 고려되는 세포의 예로는 두개골 세포, 조골세포, 파골세포, 연골세포, 및 다분화능 전구체 세포, 예로서, 다분화능 골수 간질 세포를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 조골세포 및 조골세포 전구체 세포주의 특정 일례로는 ATCC로부터의 카탈로그에서 제공되는 MC3T3-E1, C2C12, MG-63 세포, U2OS 세포, UMR106 세포, ROS 17/2.8 세포, SaOS-2 세포 등(WO 01/19855) 뿐만 아니라, ([Bodine PV, Vernon SK, Komm BS., Endocrinology, 137, 4592-4604, (1996)], [Bodine PVN5 TrailSmith M, Komm BS., J Bone Min Res, 11, 806-819, (1996)], [Bodine PV, Green J, Harris HA, Bhat RA, Stein GS, Lian JB, Komm BS., J Cell Biochem, 65, 368-387, (1997)], [Bodine PV, Komm BS., Bone, 25, 535-43 (1999)], [Bodine PVN, Harris HA, Komm BS., Endocrinology, 140, 2439-2451, (1999)], [Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, Bodine PV, Komm BS, J Cell Biochem, 80, 424-40, (2001)])에 기재된 HOB 세포주를 포함한다. 본 발명의 방법은 또한 무세포 시스템을 사용하여 실시될 수 있다.
- <84> "발현 시스템"은 예컨대, 벡터에 의해 운반되고 숙주 세포 내로 도입된 외래 DNA에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 위해 적합한 조건하에서 숙주 세포 및 상용성 벡터를 지칭한다. 일반 발현 시스템으로는 이. 콜라이 숙주 세포 및 플라스미드 벡터, 곤충 숙주 세포 및 벡탈로바이러스 벡터, 및 포유동물 숙주 세포 및 벡터를 포함한다.
- <85> "형질전환"은 핵산 단편을 숙주 유기체의 게놈 내로 전달하여 유전적으로 안정적이게 유전시키는 것을 지칭한다. 형질전환된 핵산 단편을 함유하는 숙주 유기체를 "형질전환" 유기체로 지칭한다.
- <86> "분화한다"라는 용어는 원래의 조직 또는 세포 유형으로부터 상이한 특징 또는 기능을 갖는 것을 지칭한다. 따라서, "분화"는 분화하는 과정 또는 행위이다.
- <87> "조골세포 분화"라는 용어는 조골세포로 성숙화되는 동안 세포가 분화된 기능을 발생시키는 과정을 지칭한다. 조골세포 분화는 전-조골세포, 초기 및 성숙한 조골세포, 전-골세포 및 성숙한 골세포 단계를 포함할 수 있다 ([Bodine et al, Vitamins and Hormones 65, 101-151 (2002)], [Stein et al. Endocrine Reviews 14, 424-442 (1993), and Lian et al. Vitamins and Hormones 55, 443-509 (1999)]).
- <88> "증식"이라는 용어는 유사한 세포들의 성장과 생산을 지칭한다.
- <89> "표현형"이라는 용어는 세포 또는 유기체의 관찰 가능한 특징을 지칭한다. 그러한 관찰 가능한 특징으로는 물리적인 외관 뿐만 아니라, 세포 또는 유기체내 존재하는 특정 생리학적 조성물의 수준을 포함할 수 있다. 조골세포 표현형으로는 수개의 마커 단백질, 예로서, 골 특이적 전사 인자 Cbfa1; 제I형 콜라겐; 알칼리성 포스파타제, 오스테오칼신; 및 골 사이알로단백질의 발현을 포함한다.
- <90> 본원에서 사용되는 바, "결합 파트너" 또는 "상호작용 단백질"이라는 용어는 예를 들면, 항원 및 항원 특이적 항체 또는 효소 및 그의 억제제와 같이 특이성을 갖고 또다른 분자와 결합할 수 있는 분자를 지칭한다. 결합 파트너는 예를 들면, 비오틴 및 아비딘 또는 스트렙타비딘, IgG 및 단백질 A, 수용체-리간드 커플, 단백질-단백질 상호작용, 및 상보성 폴리뉴클레오티드 가닥을 포함할 수 있다. "결합 파트너"라는 용어는 또한 세포에서 키나제에 결합하는 폴리펩티드, 지질, 소분자, 또는 핵산을 지칭할 수 있다. 키나제와 결합 파트너 사이의 상호작용의 변화는 상호작용을 형성할 수 있는 가능성의 증가 또는 감소, 또는 키나제 결합 파트너 복합체 농도의 증

가 또는 감소 그 자체로서 나타날 수 있다. 예를 들면, Ror1 또는 Ror 2 단백질은 또다른 단백질 또는 폴리펩티드와 결합하여 복합체를 형성함으로써 Ror1 또는 Ror 2 단백질 활성을 조절할 수 있다.

- <91> "신호 전달 경로"라는 용어는 세포막을 통과해 세포의 신호를 전파시켜 세포내 신호가 되도록 하는 분자를 지칭한다. 이러한 신호는 이어서 세포 반응을 자극시킬 수 있다. 신호 전달 과정에 관여하는 폴리펩티드 분자는 수용체 및 비-수용체 단백질 티로신 키나제일 수 있다.
- <92> "수용체"는 일반적으로 특정 물질에 선택적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 세포 또는 세포 표면 상의 분자 구조를 지칭한다. 예시적인 수용체로는 펩티드 호르몬, 신경전달물질, 항원, 보체 단편 및 면역글로불린에 대한 세포-표면 수용체 뿐만 아니라, 스테로이드 호르몬에 대한 세포질 수용체로 포함한다.
- <93> "조절하다"라는 용어는 기능을 억제, 증진 또는 유도하는 것을 지칭한다. 예를 들면, 유전자 발현의 "조절(modulation)" 또는 "조절(regulation)"은 유전자 활성을 변화시키는 것을 지칭한다. 발현 조절은 유전자 활성 및 유전자 억압을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. "조절하다(modulate)" 또는 "조절하다(regulate)"는 또한 단백질, 효소, 억제제, 신호 전달자, 수용체, 전사 활성화자, 보조인자 등의 생물학적 활성을 증가 또는 감소시키는 방법, 조건, 또는 체제를 지칭한다. 이러한 활성 변화는 mRNA 번역, DNA 전사, 및/또는 mRNA 또는 단백질 분해의 증가 또는 감소일 수 있는데, 이는 결국 생물학적 활성의 증가 또는 감소에 상응하는 것일 수 있다. 그러한 증진 또는 억제는 특정 이벤트의 발생, 예로서, 신호 전달 경로의 활성화를 조건으로 할 수 있고/거나, 오직 특별한 세포 유형에서 나타날 수 있다.
- <94> "조절되는 활성"이라는 것은 생물학적으로 활성인 형태의 단백질에 의해 조절되는 임의의 활성, 증상, 질환 또는 표현형을 지칭한다. 조절은 생물학적으로 활성인 단백질의 농도에 영향을 줌으로써, 예컨대, 발현 또는 분해를 조절함으로써, 또는 예를 들면, 억제, 활성화, 결합 또는 기질의 유리, 화학적 또는 구조적인 변형을 통한 것과 같은 직접적인 효현 효과 또는 길항 효과에 의해, 또는 추가의 인자를 포함할 수 있는 직접 또는 간접적인 상호작용에 의해 작용할 수 있다.
- <95> "조절제"는 특정 활성의 발현, 예로서, 골 형성 또는 Ror 분자 발현을 변경시키는 임의의 체제를 지칭한다. 예를 들면, 골 형성을 조절하는 체제는 골 형성을 변경 또는 변화시킨다(증가시키거나 감소시킨다). 조절제로 임의의 화합물, 예컨대, 예컨대, 항체, 소분자, 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질을 포함시키고자 한다.
- <96> "형질 세포"는 항체(면역글로불린) 생산을 위해 분화된 성숙한 B 림프구를 지칭한다. 형질 세포는 말초 혈액에서는 거의 발견되지 않는다. 이는 0.2% 내지 2.8%의 골수 백혈구수를 포함한다. 성숙한 형질 세포는 종종 타원형 또는 부채꼴 형상을 띠며, 8-15  $\mu\text{m}$ 인 것으로 측정된다. 핵은 편심형 및 타원 형상을 띤다.
- <97> "소분자"라는 용어는 합성 또는 천연적으로 발생된 화학 화합물, 예를 들면, 임의로 유도체화될 수 있는 펩티드 또는 올리고뉴클레오티드, 천연 산물 또는 천연 또는 합성 기원의 임의의 다른 저분자량(전형적으로 약 5 킬로달톤 미만)의 유기, 생물무기, 또는 무기 화합물을 지칭한다. 그러한 소분자는 치료학적으로 전달가능한 물질일 수 있거나, 전달을 촉진하기 위하여 추가로 유도체화될 수 있다.
- <98> 본원에서 사용되는 바, "유도제"라는 용어는 특정 활성, 예로서, 골 형성, 또는 Ror 분자 발현을 유도, 증진, 촉진 또는 증가시키는 임의 체제를 지칭한다.
- <99> 본원에서 사용되는 바, "억제제" 또는 "억제제"라는 용어는 특정 활성, 예로서, 골 형성, 또는 Ror 분자 발현을 억제, 억제, 억압 또는 감소시키는 임의 체제를 지칭한다.
- <100> 본원에서 사용되는 바, "체제" 또는 "시험 체제"는 시험하고자 하는 임의 화합물 또는 분자를 지칭한다. 본 발명의 체제의 일례로는 펩티드, 소분자, 및 항체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 체제는 무작위로 선택될 수 있고, 합리적으로 선택되거나 디자인될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 체제와 표적 화합물 또는 부위 사이의 특이적인 상호작용을 고려하지 않은 채 체제를 무작위적으로 선택하였다면, 이는 체제가 "무작위적으로 선택된 것"이라고 말할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 체제와 표적 화합물 또는 부위 사이의 특이적인 상호작용 및/또는 체제의 작용과 관련된 입체형태를 고려하여 체제를 비무작위인 것을 기초로 하여 선택하였다면, 이는 체제를 "합리적으로 선택하였거나 디자인한 것"이라고 말할 수 있다.
- <101> 본원에서 사용되는 바, "항체"라는 용어는 면역글로불린 분자 또는 면역학적으로 활성인 그의 일부(예컨대, 항원 결합 부분)를 지칭한다. 항체는 천연적으로 생산되거나, 전체적으로 또는 부분적으로 합성적으로 생산될 수 있다. 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 일부의 예로는 항체를 효소, 예로서, 펩신으로 절단함으로써

생성될 수 있는 F(ab), Fv, 및 F(ab') 단편을 포함한다. 특이적인 결합능을 보유하는 그의 모든 유도체 또한 본 용어에 포함된다. 본 용어는 또한 면역글로불린 결합 도메인과 상동성이거나, 대부분이 상동성인 결합 도메인을 갖는 임의 단백질을 포함한다. 이러한 단백질을 천연 공급원으로부터 유래할 수 있거나, 부분적으로 또는 전체적으로 합성으로 생산할 수 있다. 항체는 단일 클론 또는 다중 클론일 수 있다. 항체는 인간의 부류인 IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 중 임의의 것을 비롯한 임의의 면역글로불린 부류의 일원일 수 있다. 그러나, IgG 부류의 유도체가 본 발명에서 일반적으로 바람직하다.

- <102> "항체 단편"은 전장의 것보다 작은 임의의 항체 유도체를 지칭한다. 바람직하게, 항체 단편은 적어도 전장 항체의 특이적인 결합능을 상당부 보유한다. 항체 단편의 일례로는 Fab, Fab' F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv 디아바디, 및 Fd 단편을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 항체 단편은 임의 수단에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면, 항체 단편은 무손상 항체의 단편화에 의해 효소적으로 또는 화학적으로 생산될 수 있거나, 부분적인 항체 서열을 코딩하는 유전자로부터 재조합적으로 생산될 수 있다. 방법으로, 항체 단편은 전체적으로 또는 부분적으로 합성으로 생산될 수 있다. 항체 단편은 임의의 단일쇄 항체 단편일 수 있다. 방법으로, 단편은 예를 들면, 이황화 결합 또는 보다 안정적인 다른 결합에 의해 함께 연결된 다중 쇄를 포함할 수 있다. 단편은 또한 임의로 다중분자 복합체일 수 있다. 기능성 항체 단편은 전형적으로 50개 이상의 아미노산을 포함할 것이며, 더욱 전형적으로는 200개 이상의 아미노산을 포함할 것이다. 특정 실시태양에서, 항체 단편은 2개 이상의 항원 결합 부위를 갖는다. 특정의 바람직한 실시태양에서, 항체 단편은 정확하게 2, 3, 4, 또는 5개의 항원 결합 부위를 갖는다. 2개의 항원 결합 부위를 갖는 단편이 본 발명에서 특히 유용하다. 그러한 제제는 다합체 복합체를 형성하지 않고도 Ror2를 이합체화시킨다.
- <103> 단일쇄 Fv(scFv)는 폴리펩티드 링커에 의해 서로 공유 결합으로 연결된, 가변 경쇄(V<sub>L</sub>) 및 가변 중쇄(V<sub>H</sub>)로만 구성되어진 재조합 항체 단편이다. V<sub>L</sub> 또는 V<sub>H</sub>는 NH<sub>2</sub>-말단 도메인일 수 있다. 폴리펩티드 링커는 심각한 입체 간섭 없이 2개의 가변 도메인이 연결되는 한, 다양한 길이와 조성으로 이루어질 수 있다. 전형적으로, 링커는 주로 글리신 및 세린 잔기 스트래치로 구성되고, 일부 글루탐산 또는 리신 잔기가 용해도를 위해 산재한다.
- <104> 디아바디는 이합체 scFv이다. 디아바디의 성분들은 전형적으로 대부분의 scFv보다 더 짧은 펩티드 링커를 갖고, 이합체로서의 회합을 선호하는 것으로 보인다.
- <105> Fv 단편은 비공유 상호작용에 의해 결합되어진, 하나의 V<sub>H</sub>와 하나의 V<sub>L</sub>로 구성된 항체 단편이다. 본원에서 dsFv 라는 용어는 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 쌍을 안정시키기 위해 조작된 분자내 이황화 결합을 갖는 Fv를 지칭하는 것으로 사용된다.
- <106> F(ab')<sub>2</sub> 단편은 pH 4.0-4.5에서 효소 펩신에 의한 분해에 의해 면역글로불린(전형적으로 IgG)으로부터 수득된 것과 본질적으로 등가인 항체 단편이다. 본 단편은 재조합적으로 생산될 수 있다.
- <107> Fab 단편은 F(ab')<sub>2</sub>내 2개의 중쇄 조각을 연결하는 이황화 결합 또는 결합들의 환원에 의해 수득된 것과 본질적으로 등가인 항체 단편이다. Fab' 단편은 재조합적으로 생산될 수 있다.
- <108> Fab 단편은 면역글로불린(전형적으로 IgG)의 효소 파파인에 의한 분해에 의해 수득된 것과 본질적으로 등가인 항체 단편이다. Fab 단편은 재조합적으로 생산될 수 있다. Fab 단편의 중쇄 세그먼트는 Fc 조각이다.
- <109> 본원에서 사용되는 바, "리포터 유전자"라는 용어는 그의 표현형 발현이 모니터하기 쉬운 임의의 유전자를 지칭한다. 리포터 유전자는 어떤 시험 제제가 신호 전달 경로를 활성화시키는지 결정하는 스크리닝에서 특히 유용하다. 리포터 유전자는 프로모터 또는 신호 전달 경로에 의해 제어되는 다른 조절 요소에 작동 가능하게 연결된다. 특정 실시태양에서, 리포터 유전자가 프로모터 영역 또는 특히 관심의 대상이 되는 다른 조절 영역에 기능적으로 결합되어 있는 재조합 DNA 작제물을 제조하고, 작제물을 세포 또는 유기체 내로 형질감염한다. 보편적으로 사용되는 리포터 유전자의 일례로는 루시페라제(LUC), 녹색 형광 단백질(GFP: green fluorescent protein), β-갈락토시다제(GAL), β-글루쿠코니다제(GUS), 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT: chloramphenicol acetyltransferase)를 포함한다.
- <110> 본원에서 사용되는 바, "치료," "치료하는," 및 "요법"이라는 용어는 치료학적 치료 및 예방하는, 또는 예방적인 처치, 또는 골 세포 분화 또는 골 형성을 자극시키거나, 골 질병 증상의 발병을 연기시키고/거나, 골 질병의 중증도 및/또는 골 질병으로 발병될 것으로 예측될 또는 예측되는 상기 증상을 감소시키는 처치를 지칭한다. 상기 용어는 추가로 존재하는 골 질병 증상을 호전시키거나, 추가의 증상을 예방하거나, 증상의 근원적인 대사 원인을 호전시키거나 예방하거나, 증상의 대사 원인을 예방하거나 역전시키거나, 골 성장을 예방하거나 촉진하는

것을 포함한다. 따라서, 상기 용어는 유익한 결과가 골 질병을 앓거나, 상기 질병이 발병될 가능성을 갖고 있는 대상자에게 부여된다는 것을 의미한다. 추가로, "치료"라는 용어는 질환, 질환 증상, 또는 질환에 걸릴 소질을 고치거나, 치유하거나, 경감시키거나, 완화시키거나, 변경시키거나, 구제하거나, 호전시키거나, 개선시키거나, 영향을 주기 위한 목적으로 질환, 질환 증상, 또는 질환에 걸릴 소질을 갖는 대상자, 또는 대상자로부터 단리된 조직 또는 세포주에 제제(예컨대, 치료제 또는 치료학적 조성물)를 적용시키거나 투여하는 것으로서 정의된다. 본원에서 사용되는 바, "치료제"는 질환 치료에 도움을 주는, 예컨대, 골 형성 활성을 조절하거나 새로운 골 형성을 유도하는 임의의 물질 또는 물질의 조합물을 지칭한다. 따라서, 치료제는 소분자, 펩티드, 항체, 리보자임 및 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

- <111> 치료제 또는 치료학적 조성물 또한 특정 질환의 증상을 예방하고/거나 감소시키는, 약제학적으로 허용 가능한 형태의 화합물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 치료학적 조성물은 골 관련 질병의 증상을 예방하고/거나 감소시키는 약제학적 조성물일 수 있다. 본 발명의 치료학적 조성물은 임의의 적합한 형태로 제공될 것이 고려된다. 치료학적 조성물의 형태는 투여 방식을 비롯한, 다수의 인자에 의해 달라질 것이다. 치료학적 조성물은 다른 성분들 중 희석제, 애주번트 및 부형제를 함유할 수 있다.
- <112> 골 강도는 골 밀도( $gr(\text{무기질})/cm^3(\text{부피})$ ) 및 골의 질(무기질화, 골 구조, 골 교체, 미세골절)에 의해 측정될 수 있다. 골 강도의 측정치로서는 보통 골 무기질 밀도(BMD)가 사용된다. 예를 들어, 골의 BMD가 어린 백인 성인 여성의 평균 BMD 이하로 2.5의 표준 편차를 초과한다면 골은 골다공성이라고 선언받을 수 있다[World Health Organization, 1994, Assessment of Fracture Risk and it's Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis. Technical Report Series 843. Geneva: World health Organization].
- <113> "골 조직"은 석회화 조직(예컨대, 두개골, 경골, 대퇴골, 척추, 치아), 골주, 골주 이외의 강인 골수강, 골주 및 골수강의 바깥 주변을 덮고 있는 피질골 등을 지칭한다. 골 조직은 또한 일반적으로 무기질화된 콜라겐 기질 내에 위치하는 골 세포; 골 세포에 영양을 제공하는 혈관; 골수 흡인물; 관절액; 골 조직으로부터 유래된 골 세포를 지칭하고, 지방 골수를 포함할 수 있다. 골 조직은 골 산물, 예로서, 전체 골, 전체 골의 절편, 골 세편, 뼈 가루, 골 조직 생검, 콜라겐 시료, 또는 그의 혼합물을 포함한다. 본 발명의 목적을 위해 "골 조직"이라는 용어는 달리 언급되지 않는 한, 인간이든지 또는 동물이든지 간에, 상기 언급한 골 조직 및 산물 모두를 포함하기 위해 사용된다.
- <114> 본원에서 사용되는 바, "골 관련 활성"으로는 골 형성 활성 및 골 재흡수 활성을 포함한다. 골 형성 활성은 조골세포 활성, 골전구세포 세포로부터의 조골세포 분화, 및 조골세포 증식을 증가시킴으로써, 조골세포 아포토시스를 감소시킴으로써, 및 그의 임의의 조합에 의해 유도될 수 있다. 추가로, 골 재흡수 활성은 파골세포 활성, 파골세포 분화 및 증식을 감소시킴으로써, 파골세포 아포토시스를 증가시킴으로써, 및 그의 임의의 조합에 의해 억제시킬 수 있다. 골 형성 활성은 다양한 골 조직 또는 세포에서 유도될 수 있다.
- <115> 본원에서 사용되는 바, "골 형성을 조절하는"이라는 어구는 골 형성의 증가 또는 감소를 지칭한다. "증가된 골 형성"이라는 것은 조골세포 또는 조골세포 전구체를 골 부위로 동원하여 세포를 성숙한 조골세포로 분화시키고, 골 물질로 무기질화하고 해당 부위의 골량을 증가시키는 콜라겐 기질을 분비하는 것을 의미한다. 상기 용어는 또한 성숙한 조골세포의 콜라겐 기질의 증가된 생산 및 분비를 포함한다. 증가된 골 형성은 골절 속도의 감소, 면적의 골 밀도 증가, 부피 무기질 골 밀도 증가, 소주골의 연결 증가, 소주골 밀도 증가, 피질 밀도 또는 두께 증가, 골 직경 증가, 및 무기 골 함량 증가 중 하나 이상을 통해 측정될 수 있다. 증가된 골 형성은 골 세포, 예컨대, 조골세포의 부착, 증식, 생존 및/또는 분자의 증가, 이어서, 골 무기질화로부터 발생할 수 있다.
- <116> "골 관련 질병"으로는 골 형성 및 골 흡수 질병을 포함한다. 이러한 질환 및 용태로는 구루병, 골연화증, 골감소증, 골경화증, 신장성 골형성장애, 골다공증(노인성 및 폐경후 골다공증 포함), 파제트병, 골 전이, 고칼슘혈증, 부갑상선기능항진증, 골화석증, 치주염, 및 류마티스 관절염 및 골관절염을 수반할 수 있는 골 대사의 비정상적인 변화를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 질환 중 일부는 불충분한 골 형성 또는 골 손실을 특징으로 하는 반면, 나머지는 골 조직의 비정상적인 비후화 또는 경화를 포함한다. 비정상적인 골 비후화를 억제하는 것이 이익이 되는 질환의 예로는 골화석증 및 골경화증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <117> "골 관련 제제"는 골 형성 또는 골 흡수에 영향을 미치는 제제를 지칭한다. "골 관련 제제"는 동화 또는 이화 효과를 유도할 수 있거나, 골 흡수를 억제하여 골 무기질 밀도를 증가시킬 수 있거나, 골 형성을 증가시킬 수 있거나, 골 형성과 골 흡수 사이의 균형을 유지시킬 수 있다.
- <118> "화합물" 또는 "제제"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 대상자(인간 또는 동물)에 투여되었

을 때, 국소 및/또는 전신 작용에 의해 원하는 약물학적 및/또는 생리학적 효과를 유도하는 화합물 또는 화합물 들 또는 물질의 조성물을 지칭한다.

<119> "대상자"라는 용어는 인간, 또는 인간을 제외한 대상자를 비롯한, 임의의 포유동물을 지칭한다. 인간을 제외한 대상자로는 실험용, 시험용, 농업용, 오락용 또는 반려 동물을 포함할 수 있다. 대상자는 인간일 수 있다. 대상자는 가축용 동물, 예로서, 개, 고양이, 소, 염소, 양, 돼지 등일 수 있다. 대상자는 실험용 동물, 예로서, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이 등일 수 있다.

<120> "생물학적 샘플"이라는 용어는 임의의 세포, 조직, 생물학적 유체, 기관, 다세포 유기체 등을 포함하며 광범위 하게 정의된다. 생물학적 샘플은 예를 들면, 시험관내 세포 또는 조직 배양물로부터 유래될 수 있다. 별법으로, 생물학적 샘플은 살아있는 유기체로부터, 또는 단세포 유기체 군집으로부터 유래될 수 있다. 생물학적 샘플은 생 조직, 예로서, 생 골일 수 있다. "생물학적 샘플"이라는 용어로는 또한 예로서, 대상자로부터 단리된 세포, 조직 또는 생물학적 유체와 같은 샘플 뿐만 아니라, 대상자내 존재하는 샘플을 포함하고자 한다. 즉, 시험관내 뿐만 아니라 생체내에서 생물학적 샘플 중 Ror mRNA, 단백질, 게놈 DNA, 또는 활성을 검출하기 위하여 본 발명 의 검출 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, Ror mRNA를 검출하기 위한 시험관내 기법으로는 택맨(TaqMan) 분석, 노던 혼성화, 및 계내 혼성화를 포함한다. Ror 단백질을 검출하기 위한 시험관내 기법으로는 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA: enzyme linked immunoabsorbent assay), 웨스턴 블롯, 면역침전 및 면역형광을 포함한다. Ror 게놈 DNA를 검출하기 위한 시험관내 기법으로는 써던 혼성화를 포함한다.

<121> **도면의 간단한 설명**

<122> 본 발명은 본 출원의 일부를 형성하는 하기의 상세한 설명과 첨부 도면으로부터 보다 충분히 이해될 수 있다.

<123> 도 1은 Ror2 발현을 하향 조절하는 것이 인간 중간엽 줄기 세포(hMSC: human mesenchymal stem cell)의 dex-유 도된 골발생 분화를 억제한다는 것을 나타낸다. 인간 MSC를, Ror2 특이적 shRNA 또는 EGFP 특이적 shRNA(대조군)를 함유하는 아데노바이러스 발현 벡터로 감염시키고, 0.05 mM 아스코르브산, 10 mM β-글리세로 포스페이트(β-GP: β-glycerophosphate) 및 100 nM 텍사메사손(dex)으로 보충된 MSC 성장 배지(MSCGM: MSC growth medium)에서 인큐베이션시켰다. 9일 동안 인큐베이션시킨 후, 전체 세포 단백질 추출물(50 μg/레인)을 내인성 Ror2 단백질 또는 로딩 대조군으로서 β-액틴에 대하여 웨스턴 면역블롯팅시켰다(A). 11일 동안 인큐베 이션시킨 후, 알리자린 레드-S 염색을 실시하고(B), 측량하여(C) 무기질화된 기질 형성 정도를 평가하였다. C에 서, EGFP shRNA의 존재하에 혼입된 알리자린 레드-S의 양을 100%로 설정하였다. B 및 C에서의 결과는 3개의 독 립적인 실험을 나타낸다(도 1은 실시예 1을 참조한다).

<124> 도 2는 Ror2 과발현이 hMSC의 지방 생성 분화를 억제한다는 것을 나타낸다. A. 인간 MSC를 β-갈락토시다제(β-gal), Ror2, 또는 Ror2KD로 감염시키고, 지방 생성 각테일로 보충된 MSCGM에서 8일 동안 인큐베이션시켰다. 전 체 세포 RNA를 단리시키고, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)로부터 구입한 프라이머와 프로브를 사용하여 지방 생성 전사 인자 C/EBP α 및 PPAR γ에 대한 실시간 RT-PCR 분석을 실시하였다. mRNA 수준을 각 샘 플내 사이클로필린 B의 발현으로 정규화시키고, β-gal-감염된 세포에서 상대적인 mRNA 발현을 100%로 설정하였 다. B. 인간 MSC를 β-gal, Ror2, 또는 Ror2KD로 감염시키고, 지방 생성 각테일로 보충된 MSCGM에서 21일 동안 인큐베이션시키고, 오일 레드 O 염색시켰다(도 2는 실시예 2를 참조한다).

<125> 도 3은 Ror2 단백질의 과발현이 신생 마우스 두개골에서 전체 골 면적은 증가시키지만, 조골세포의 수는 증가시 키지 않는다는 것을 나타낸다. 4일된 마우스 한배 새끼의 두개골을 감염시키지 않고 그대로 남겨 두거나(대조군), β-갈락토시다제(β) 또는 인간 Ror2(R2)를 코딩하는 아데노바이러스로 감염시켰다. 아데노바 이러스 존재하에 7일 동안 인큐베이션시킨 후, 두개골을 헤마톡실린 및 예오신으로 염색한 후, 전체 골 면적과 조골세포 갯수를 평가하였다. 감염시키지 않는 배양물로부터 수득한 값을 100%로 설정하였다. 결과는 각 조건당 4-5개의 두개골의 평균 ± SE이다(\*- β-갈락토시다제 감염과 비교하여 P < 0.01). 이 그래프는 3개의 독립적인 실험을 나타낸다(도 3은 실시예 3을 참조한다).

<126> 도 4는 Ror2 단백질이 14-3-3β에 결합하고, 티로신(들) 상의 것을 인산화시킨다는 것을 입증한다. U2OS 세포를 β-gal(β), Ror2(R2), 또는 Ror2KD(KD) 아데노바이러스로 감염시키고, 24-48h 후에, 전체 세포 용해물을 제조 하고, 항-플래그(A), 항-14-3-3β(B), 또는 항-포스포티로신(C) 항체로 면역침전시켰다. 면역침전물은 지시된 항체를 사용하는 면역블롯팅에 의해 분석하였다(도 4는 실시예 4를 참조한다).

<127> 도 5는 내인성 Ror2 단백질이 생체내 14-3-3β 인산화를 매개한다는 것을 나타낸다. U2OS 세포를 Ror2 siRNA 또 는 비특이적 siRNA로 일시적으로 감염시키고, 48h 후에 전체 세포 단백질 추출물은 라인당 50 μg의 추출물을 사

용하여 내인성 Ror2 단백질 또는 β-액틴(로딩 대조군)에 대하여 웨스턴 면역블롯팅시켰다(A). 동일 용해물을 직접(20 μg/래인) 또는 항-포스포티로신 항체로 면역침전시킨 후에 14-3-3β 항체에 의해 분석하였다(B)(도 5는 실시예 4를 참조한다).

<128> 도 6은 Ror2 단백질의 세포질 도메인이 시험관내에서 14-3-3β에 결합하고, 직접 인산화시킨다는 것을 나타낸다. A. Ror2의 GST 태깅 세포질 도메인(GST-R2c) 또는 GST만을 글루타티온 세파로스 비드에 부착시키고, 시험관내에서 번역된 14-3-3β와 함께 4°C에서 4h 동안 인큐베이션시켰다. 결합된 물질을 항-14-3-3β 항체에 대하여 분석하였다. B. "일반적인 방법"에 기술되어 있는 바와 같이 Ror2 단백질(GST-R2c, Invitrogen)의 정제된 재조합 세포질 도메인 및 정제된 재조합 GST-14-3-3β(Biomol, Inc.)를 사용하여 시험관내 키나제 분석법을 실시하였다(도 6은 실시예 4를 참조한다).

<129> 도 7은 Ror2 특이적 항체가 Ror2 수용체의 이합체화와 활성화를 유발한다는 것을 입증한다. A. 이합체화를 입증하기 위해 COOH 말단이 플래그(R2-F) 또는 His(R2-H) 에피토프 태그로 태깅된 Ror2 발현 플라스미드로 U2OS 세포를 감염시켰다. 24시간 후에 세포를 Ror2 특이적 염소 다중 클론 IgG 또는 비특이적 염소 IgG로 1h 동안 37°C에서 처리하고, 전체 세포 단백질을 추출물을 제조하고, 항-플래그 친화성 아가로스 상에서 면역침전시켰다. 침전물을 항-His 항체로 면역블롯팅하여 분석하였다(상단 패널). 하단 패널은 침전 수준 대조군을 위해 항-플래그 항체로 다시 프로빙된 동일 막을 나타낸다. B. 활성화를 입증하기 위하여 형질감염되지 않은 U2OS 세포를 A의 Ror2 특이적 항체 또는 대조군 IgG로 처리하고, 전체 세포 단백질을 추출물을 항-포스포티로신 항체 상에서 침전시키고, Ror2 또는 14-3-3β 항체로 분석하였다(도 7은 실시예 5를 참조한다).

<130> 도 8은 Ror2 항체가 hMSC에서 무기질화된 기질 형성을 유발한다는 것을 나타낸다. 인간 MSC를, 비특이적 염소 IgG, Ror1 특이적 염소 IgG(각각 50 μg/ml), 또는 농도를 증가시키면서 Ror2 특이적 염소 IgG로 보충되고, 0.05 mM 아스코르브산, 10 mM β-GP 및 100 nM dex를 함유하는 MSCGM에서 인큐베이션시켰다. 9일 동안 인큐베이션시킨 후, 알리자린 레드-S 염색에 의해 기질 무기질화 정도를 평가하였다(도 8은 실시예 6을 참조한다).

<131> 도 9는 Ror2 항체에 의해 유도된 hMSC 무기질화가 Ror2를 통해 매개된다는 것을 입증한다. A. Ror2 또는 EGFP(대조군)에 대해 특이적인 shRNA를 함유하는 아데노바이러스 발현 벡터로 hMSC를 감염시키고, 0.05 mM 아스코르브산, 10 mM β-GP 및 100 nM dex로 보충된 MSCGM에서 인큐베이션시켰다. 9일 동안 인큐베이션시킨 후, 알리자린 레드-S 염색에 의해 기질 무기질화 정도를 평가하였다. B. 인간 MSC를 24h 동안 Ror2 아데노바이러스로 감염시키고, 0.05 mM 아스코르브산, 10 mM β-GP, 및 Ror2 특이적 염소 IgG 또는 비특이적 염소 IgG를 함유하는 MSCGM에서 19일 동안 인큐베이션시킨 후, 알리자린 레드-S 염색으로 염색하였다(도 9는 실시예 6을 참조한다).

<132> 도 10은 14-3-3β를 하향 조절하는 것이 hMSC에서 무기질화된 기질 형성을 증진시킨다는 것을 입증한다. 인간 MSC를, 스크램블드 shRNA; 14-3-3β 특이적 shRNA; β-갈락토시다제(β-gal) 과발현 카세트; 또는 Ror2 과발현 카세트를 함유하는 아데노바이러스 발현 벡터로 감염시키고, 0.05 mM 아스코르브산, 10 mM β-GP 및 100 nM dex로 보충된 MSCGM에서 인큐베이션시켰다. 9일 동안 인큐베이션시킨 후, 50 mg의 전체 세포 단백질을 내인성 14-3-3β 단백질에 대하여 웨스턴 면역블롯팅시켰다(A). 12일 동안 인큐베이션시킨 후, 알리자린 레드-S 염색을 실시하여(B) 무기질화된 기질 형성 정도를 평가하였다(도 10은 실시예 7을 참조한다).

<133> 도 11은 Ror2 항체 처리 및 14-3-3β 하향 조절이 생체외의 새로운 골 형성을 촉진한다는 것을 입증한다. 마우스의 두개골을, 스크램블드 shRNA(scr) 또는 14-3-3β에 특이적인 shRNA를 함유하는 아데노바이러스로 감염시키고; 48h 후, 칼세인의 존재하에 12 mg/ml의 항-Ror2 항체 또는 비특이적 IgG로 처리하였다. 아데노바이러스 및 항체와 함께 7일 동안 인큐베이션시킨 후, 두개골을 헤마톡실린-에오신으로 염색하고, 전체 골 면적(흰색 막대(open bars)) 및 조골세포 갯수(검은색 막대(solid bars))를 측정하였다. 스크램블드 shRNA-감염 및 IgG-처리 배양물에서 수득한 값을 100%로 설정하였다. 결과는 각 조건당 4개의 두개골의 평균 ± SE이다(\* - p < 0.05)(도 11은 실시예 8을 참조한다).

<134> 도 12는 Ror2 활성화에 대한 고처리량의 고감도 분석법 생성을 도시한다. A. TrkB 수용체의 신호 전달 경로를 사용하는 분석법에 대한 개략도. 표적 유전자의 프로모터에서 Erk의 인산화 및 cAMP 반응 요소(CRE: cAMP response element)의 자극을 유발하는 리간드-유도된 동형-이합체화에 의해 TrkB 수용체가 활성화된다. 본 발명자들은 막 관통 및 TrkB의 세포내 도메인(aa 432-822)에 융합된 Ror2의 세포외 도메인(aa 1-407)으로 구성된 키메라 수용체를 생성하였다. 이러한 키메라를 사용할 때, Ror2 이합체화시키는 제제는 TrkB 신호 전달 경로를 활성화시키고, 이러한 활성화가 CRE 프로모터-루시퍼라제 리포터 분석법에 의해 평가할 수 있다. B. HEK293 세포를 Ror2-TrkB 키메라 및 CRE-루시퍼라제 플라스미드로 안정적으로 형질감염시키고, 지정량의 항-Ror2 항체 또는 비특이적 IgG로 24시간 동안 처리하고, 루시퍼라제 활성을 평가하였다. 비특이적 IgG로 처리하였을 때 관찰된

루시퍼라제 활성을 1로 설정하였다. 결과는 독립적인 3개의 실험을 나타낸다(평균 $\pm$ SE; n=4; \* - p < 0.05)(도 12는 실시예 9를 참조한다).

<135> **본 발명의 특정 바람직한 실시태양에 관한 상세한 설명**

<136> 본 발명은 골 대사, 특히, 조골세포 분화에서 Ror 계열 및 그의 하류 신호 전달 생체분자의 역할에 관한 발견으로부터 유래한다. 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998, 60/463,364, 및 60/501,340(그들 각각은 본원에서 참고로 인용된다)을 참조한다. 출원인들은 Ror2 발현을 하향 조절하는 것이 인간 중간엽 줄기 세포의 텍사메사손-유도된 골발생 분화를 억제한다는 것을 발견하였다(도 1). 반대로, Ror2의 과발현은 인간 중간엽 줄기 세포의 지방 생성 분화를 억제하였다(도 2). 출원인들은 또한 14-3-3 $\beta$  발현을 하향 조절하는 것이 인간 중간엽 줄기 세포에서 무기질화된 기질 형성을 증진시킨다는 것을 밝혀냈다(도 10). 추가로, Ror2 과발현 및 14-3-3 $\beta$  억제는 단독인 경우에서 보다도 더 많은 기질 무기질화를 유도한다(도 10). 이러한 발견에 기초하여, 단백질 수준에서 Ror2 활성을 조절하거나, 14-3-3 $\beta$  활성을 조절하는 제제, 또는 그의 약제학적 조성물이 골 질환 및/또는 대사 질병, 예로서, 비만 또는 당뇨병을 치료하는데 유용하다. 실제로, Ror2 단백질의 활성을 증가시키는 제제는 조골세포 분화를 촉진할 것이며, 이로써, 무기질화된 골 형성을 증가시킬 것이다(도 8 및 9). 또한, 14-3-3 $\beta$ 의 활성을 억제하는 제제는 조골세포 분화를 촉진할 것이며, 이로써, 무기질화된 골 형성을 증가시킬 것이다(도 10).

<137> 하나의 측면에서, 본 발명은 Ror2 단백질의 활성을 조절(증가 또는 감소)하는 제제를 제공한다. 특정 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질의 활성을 증가시킨다. 다른 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질의 활성을 감소시킨다. 전형적으로, 이러한 제제는 단백질 수준에서 Ror2 단백질의 활성을 증가시키거나 감소시킴으로써 작용한다. 본원에서 논의되는 바와 같이, Ror2 활성을 증가시키는 제제는 무기질화된 골 형성 및 골발생 분화를 촉진하는데 유용하다. 이러한 제제는 또한 지방 생성 분화를 억제함으로써 비만 치료에 유용할 수 있다(도 2). 임의의 특정 이론으로 제한되는 것을 원치않으면서, 증가된 Ror2 활성은 골발생 분화를 촉진하면서, 지방 생성 분화는 억제하는 것으로 보인다.

<138> Ror2 단백질의 활성을 조절하는 이러한 제제는 소분자, 폴리뉴클레오티드, 단백질, 펩티드 등을 비롯한, 임의 유형의 화학 화합물일 수 있다. 특정 실시태양에서, 제제는 단백질이다. 다른 실시태양에서, 제제는 펩티드이다. 추가의 다른 실시태양에서, 제제는 폴리뉴클레오티드이다. 추가의 다른 실시태양에서, 제제는 소분자(예컨대, 분자량이 1500 g/mol 미만인 것)이다. 바람직하게, 제제는 Ror2 단백질에 특이적이고, 다른 생체 분자에는 결합하지 않는다. 특히, 특정 실시태양에서, 제제는 Ror 계열의 다른 일원에는 결합하지 않는다. 다른 실시태양에서, 다른 생체분자 또는 Ror 계열의 일원과의 교차-반응이 존재할 수 있지만; 이들 다른 분자에 대한 제제의 친화성은 Ror2 단백질에 대한 것보다 작다.

<139> 특정 실시태양에서, 제제는 2개의 Ror2 단백질을 이합체화시킴으로써 작용한다. Ror2 단백질의 이합체화가 Ror2 수용체를 활성화시킨다고 여겨진다. Ror2 키나제 활성의 활성화가 14-3-3 $\beta$  단백질을 비롯한 그의 결합 파트너를 인산화시킨다. 다른 Ror2 결합 파트너로는 ADP/ATP 캐리어 단백질, UDP-글루코스세라미이드 글루코실트랜스퍼라제 유사 1, 14-3-3 단백질 감마, 리보포린 I, 아르기닌 N-메틸트랜스퍼라제 1, 세포 아포토시스 감수성 단백질, NOTCH2 단백질, 및 인간 골격근 LIM-단백질 3을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다(2004년 4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard *et al.*)). 제제는 전형적으로 Ror2 단백질에 대한 2개 이상의 결합 도메인을 포함한다. 특정 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질에 대해, 정확히 2개의 결합 도메인을 포함하며, 즉, 제제는 2가이다. 다가인 다른 제제 또한 본 발명에서 유용하다. 특정 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질의 이합체화를 촉진하는 소분자 또는 폴리뉴클레오티드이다. 다른 실시태양에서, 제제는 단백질 또는 펩티드이다.

<140> 특정 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질에 대한 항체 또는 항체 단편(예컨대, 디아바디)이다. 항체 또는 항체 단편은 Ror2 단백질의 임의 영역에 대한 것일 수 있지만, 항원 결합 부위는 바람직하게 Ror2의 생물학적 활성(예컨대, 키나제 활성)을 방해할 수 있거나, 단백질 2개의 이합체화를 방해할 수 있는 영역에 대한 것은 아니다. 항체 또는 항체 단편에 의한 단백질 2개의 결합은 Ror2 단백질의 이합체화를 촉진하고, 이로써 그의 활성화를 촉진한다. 항체는 다중 클론 또는 단일 클론일 수 있다. 항체는 임의의 이소타입에 속할 수 있지만; IgG 이소타입이 일반적으로 바람직하다. 항체는 임의 종으로부터 유래할 수 있지만, 인간용의 항체는 전형적으로 인간 기원이거나, 인간화된 것이다. 항체를 다른 종에서 사용하고자 할 경우, 항체는 해당 종에 적합화될 수 있다. 특정 실시태양에서, 항체는 인간화된 단일 클론 항체이다. 다른 실시태양에서, 항체는 전적으로 인간 항체이다. 특정의 구체적인 실시태양에서, 항체는 전적으로 인간 단일 클론 항체이다.

- <141> 특정 실시태양에서, 포유동물, 예로서, 토끼 또는 다른 설치류를 Ror2 단백질로부터 유래된 정제된 인간 Ror2 단백질 또는 펩티드로 면역화시켜 Ror2 단백질에 대한 항체를 제조한다. 면역화시킨 후, 항체를 생산하는 세포, 예로서, B-세포 또는 형질 세포를 수집하고, 이를 사용하여, 이후에 Ror2 단백질에 대한 항체 생산에 대하여 스크리닝되는 하이브리도마를 제조한다. 특정 실시태양에서, 항체를 Ror2 단백질을 이합체화하고/거나 활성화시킬 수 있는 그의 능력에 대하여 스크리닝한다. 일단 원하는 항체를 생산하는 B-세포를 동정하고 나면, B-세포를 무한증식시킬 수 있다. 이어서, 생성된 하이브리도마를 사용하여 원하는 단일 클론 항체를 생산할 수 있다. 하이브리도마에 의해 생산된 항체를 추가로 특장화하고 변형시킬 수 있다. 예를 들면, 특정 실시태양에서, 항체를 인간화시켜 본 항체를 인간 대상자에게 투여하였을 때 부작용을 일으키지 않도록 할 수 있는데, 상기 부작용의 범위는 치료학적 항체의 제거 증가부터 치명적인 아나필락시스까지 일 수 있다. 특정 실시태양에서, Ror2 단백질을 인식하는 항체의 영역(즉, 상보성 결정 영역)을 사용하여 특이성이 상이한 인간 항체의 CDRs를 대체한다. 항체를 조작하고 제조하는 기법은 당업계에 공지되어 있고, 이는 1989년 3월 28일 발행된 미국 특허 번호 제 4,816,567호; 1992년 1월 7일 발행된 미국 특허 번호 제5,078,998호; 1992년 2월 25일 발행된 미국 특허 번호 제5,091,513호; 1993년 7월 6일 발행된 미국 특허 번호 제5,225,539호; 1996년 12월 17일 발행된 미국 특허 번호 제5,585,089호; 1997년 12월 2일 발행된 미국 특허 번호 제5,693,761호; 1997년 12월 2일 발행된 미국 특허 번호 제5,693,761호; 1991년 발행된 미국 특허 번호 제5,869,619호; 2001년 1월 30일 발행된 미국 특허 번호 제6,180,370호; 2003년 4월 15일 발행된 미국 특허 번호 제6,548,640호; 2005년 4월 19일 발행된 미국 특허 번호 제6,881,557호; 2006년 1월 3일 발행된 미국 특허 번호 제6,982,321호(이들은 본원에서 참고로 인용된다)에 기재되어 있다. 다른 실시태양에서, 항체는 Ror2 단백질에 대한 보다 고도의 특이성 및/또는 친화성을 갖는 항체를 얻기 위해 진화되고/거나 변형된다.
- <142> 다른 실시태양에서, 제제는 Ror2 단백질에 대한 항체 단편을 포함한다. 하나 이상의 Ror2 단백질에 대한 항체 단편이 사용될 수 있다. 단편은 전형적으로 Ror2 단백질의 항체 친화성의 원인이 되는 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region)을 포함한다. Ror2 단백질을 이합체화시키기 위해서는 Ror2 단백질에 대해 2개 이상의 결합 부위가 필요하다; 그러므로, 제제는 서로 연결된 2개의 항체 단편일 수 있다. 단편은 서로 공유 또는 비공유 결합될 수 있다. 예를 들면, 제제는 서로 공유 결합된 2개의 F<sub>ab</sub> 단편일 수 있다. 제제는 또한 디아바디일 수 있다. 특정 실시태양에서, 제제는 2개 초과 항체 단편을 포함할 수 있다. 예를 들면, 제제는 Ror2 단백질에 대한 항원 결합 부위를 3, 4, 5, 또는 6개 포함할 수 있다.
- <143> 특정의 다른 실시태양에서, 제제는 Ror 단백질, 예로서, Ror2 단백질에 대한 항체의 항원 결합 부위를 모사하는 단백질, 펩티드, 또는 소분자일 수 있다. 이들 제제는 Ror2 단백질에 대한 항체의 항원 결합 부위의 구조에 기초하여 컴퓨터가상실험(in silico)에서 디자인되거나 동정될 수 있다. 이어서, 제제는 Ror2 단백질을 이합체화하고/거나 활성화시키는 제제의 능력에 대하여 평가하는 다양한 시험관내 분석법에서 시험될 수 있다. 제제는 또한 소분자, 펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 라이브러리를 사용하는 고처리량 스크리닝 방법을 사용하여 동정될 수 있다.
- <144> 또다른 측면에서, 본 발명은 Ror 활성 조절시 본 발명의 제제를 사용하는 방법을 제공한다. Ror 단백질, 특히, Ror2 단백질의 활성을 조절하는 제제는 골 관련 활성 조절에 유용하다. 이러한 제제는 또한 비만, 당뇨병, 또는 기타 대사 질병 치료에서 지방 세포 분화를 조절하는데도 유용할 수 있다. 골 관련 활성의 조절, 예컨대, 골 형성 증진을 필요로 하는 것을 특징으로 하는 질환 및 용태가 다수 존재한다. 골 성장을 자극시키고, 골 수복을 촉진하고 완료시키는 것이 바람직할 수 있는 골결의 경우가 가장 명백하다. 예를 들면, 골 형성을 증진시키는 제제는 얼굴재건술 또는 정형외과술에서도 잠재적으로 유용할 수 있다. 기타 골 결핍 용태로는 분절성 골 결손, 치주 질환, 전이성 골 질환, 골용해성 골 질환, 및 결합 조직 수복, 예로서, 연골 결손의 치유 또는 재생이 이루어질 수 있는 용태를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 연령 관련 골다공증 및 폐경후 호르몬 상태와 관련된 골다공증을 비롯한, 골다공증의 증상 또한 매우 중요한 것이다. 골 성장을 필요로 하는 것을 특징으로 하는 기타 용태로는 원발성 및 속발성 부갑상선기능항진증, 당뇨병 관련 골다공증, 무용성 골다공증, 및 글루코코르티코이드 관련 골다공증을 포함한다.
- <145> Ror2 활성을 증가시키는 제제는 무기질화된 골 형성을 촉진하는데 사용될 수 있다. 이러한 제제는 또한 조골세포 분화를 촉진하는데 사용될 수 있다. 지방 생성 분화를 희생시킴으로써 조골세포 분화를 촉진할 수 있다. 제제는 또한 무기질화된 기질 형성을 촉진하는데 사용될 수 있다.
- <146> 또다른 측면에서, 본 발명은 14-3-3(예컨대, 14-3-3β, 14-3-3γ 등)의 활성을 조절(증가 또는 감소)하는 제제를 제공한다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3의 활성을 억제한다. 다른 실시태양에서, 제제는 14-3-3의 활성

을 증가시킨다. 제제는 핵산 또는 단백질 수준으로 작용할 수 있다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 $\beta$ 의 발현을 증가시킨다. 본원에서 논의되는 바, 14-3-3 $\beta$  활성을 억제하는 제제는 무기질화된 골 형성 및 골발생 분화를 촉진하는데 유용하다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 $\gamma$ 의 발현을 감소시킨다. 이러한 제제는 또한 지방 생성 분화를 억제함으로써 비만, 당뇨병, 또는 기타 대사 질병을 치료하는데에도 유용할 수 있다. 임의의 특정 이론으로 제한되는 것을 원치않으면서, 14-3-3 발현, 특히, 14-3-3 $\beta$ 를 하향 조절하는 것이 골발생 분화를 촉진 하면서, 지방 생성 분화는 억제하는 것으로 보인다.

<147> 14-3-3 활성을 조절하는 이들 제제는 소분자, 폴리뉴클레오티드, 단백질, 펩티드 등을 비롯한, 임의 유형의 화학 화합물일 수 있다. 특정 실시태양에서, 제제는 단백질이다. 다른 실시태양에서, 제제는 펩티드이다. 추가의 다른 실시태양에서, 제제는 폴리뉴클레오티드이다. 추가의 다른 실시태양에서, 제제는 소분자이다. 특정 실시태양에서, 제제는 폴리뉴클레오티드이다. 특정 실시태양에서, 제제는 DNA이다. 다른 실시태양에서, 제제는 RNA이다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 특이적 RNAi이다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 $\beta$  특이적 RNAi이다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 특이적 siRNA이다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 $\beta$  특이적 siRNA이다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 특이적 shRNA이다. 특정 실시태양에서, 제제는 14-3-3 $\beta$  특이적 shRNA이다. 다른 실시태양에서, 제제는 14-3-3 $\gamma$ 에 특이적이다. 특히, 특정 실시태양에서, 제제는 특히 중간엽 줄기 세포 또는 골 세포, 예로서, 조골세포에서 발견되는 14-3-3을 표적한다. 예를 들면, 특정 실시태양에서, 제제는 표적 부분을 포함한다. 특정 실시태양에서, 표적화제는 비스포스포네이트 또는 기타 골 기관 표적화제이다.

<148> 또다른 측면에서, 본 발명은 14-3-3 활성 조절시 본 발명의 제제를 사용하는 방법을 제공한다. 14-3-3, 특히, 14-3-3 $\beta$ 의 활성을 조절하는 제제는 골 관련 활성 조절에 유용하다. 이들 제제는 또한 비만, 당뇨병, 또는 기타 대사 질병 치료에서 지방 세포 분화를 조절하는데에도 유용할 수 있다. 골 관련 활성의 조절, 예컨대, 골 형성 증진을 필요로 하는 것을 특징으로 하는 질환 및 용태가 다수 존재한다. 골 성장을 자극시키고, 골 수복을 촉진 하고 완료시키는 것이 바람직할 수 있는 골결의 경우가 가장 명백하다. 예를 들면, 골 형성을 증진시키는 제제는 얼굴재건술 또는 정형외과술에서도 잠재적으로 유용할 수 있다. 기타 골 결핍 용태로는 분절성 골 결손, 치주 질환, 전이성 골 질환, 골용해성 골 질환, 및 결합 조직 수복, 예로서, 연골 결손의 치유 또는 재생이 이룰 수 있는 용태를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 연령 관련 골다공증 및 폐경후 호르몬 상태와 관련된 골다공증을 비롯한, 골다공증의 증상 또한 매우 중요한 것이다. 골 성장을 필요로 하는 것을 특징으로 하는 기타 용태로는 원발성 및 속발성 부갑상선기능항진증, 당뇨병 관련 골다공증, 무용성 골다공증, 및 글루코코르티코이드 관련 골다공증을 포함한다.

<149> 14-3-3 활성을 감소시키는 제제는 무기질화된 골 형성을 촉진하는데 사용될 수 있다. 이들 제제는 또한 조골세포 분화를 촉진하는데 사용될 수 있다. 지방 생성 분화를 희생시킴으로써 조골세포 분화를 촉진할 수 있다. 제제는 또한 무기질화된 기질 형성을 촉진하는데 사용될 수 있다.

<150> 본 발명의 방법에 사용하기 위한 제제는 대상자에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물 내로 혼입될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 제제는 Ror 분자(예컨대, Ror2 단백질) 활성 또는 14-3-3 활성(예컨대, 14-3-3 $\beta$ , 14-3-3 $\gamma$ )을 조절하는 임의의 동정된 화합물(예컨대, 경구적으로 활성인 유기 소분자; 단백질; 면역글로불린; 면역글로불린 단편; 펩티드)일 수 있다. 그러한 조성물은 전형적으로 화합물 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 본 발명의 조성물은 골 관련 활성을 조절하는 것으로 공지된 하나 이상의 제제와 조합되는 하나 이상의 제제를 함유할 수 있다. 예를 들면, Ror 활성을 촉진하거나, 14-3-3 활성을 억제하는 제제는 에스트로겐, 비스포스포네이트, 또는 조직 선택성 에스트로겐(즉, 선택성 에스트로겐 수용체 조절제(SERM: selective estrogen receptor modulator))과 같이 골 흡수를 억제하는 제제와 함께 조합될 수 있다. 본 발명의 제제는 골 형성을 촉진하는 기타 제제와 조합될 수 있다.

<151> 하나 이상의 제제는 치료학적으로 유효한 용량으로 사용된다. 치료학적으로 유효한 용량은 유익성(예컨대, 치료하고자 하는 질병, 질환, 또는 용태와 관련된 징후 및/또는 증상의 감소)을 나타내기에 충분한 제제의 양을 지칭한다. 본 용어가 단독으로 투여되는 개별 성분에 적용되는 경우에는, 단독의 당해 성분을 지칭한다. 조합물에 적용되는 경우에 본 용어는 배합물로 투여되든지, 연속적으로 투여되든지, 또는 동시에 투여되든지 간에, 이익이 되는 성분들의 배합량을 지칭한다. 예를 들면, 치료학적 용도를 위해 유효한 양은 골결 수복 치유 속도를 임상적으로 상당 증가시키거나; 골다공증 대상자에서 골 손실을 역전시키고 골결을 예방하거나; 연골 결손 또는 질병을 역전시키거나; 골다공증의 발병을 예방 또는 지연시키거나; 골다공증과 관련된 추가의 골 손실을 예방하거나; 골결 불유합 및 골 신장술에서 골 형성을 자극 및/또는 억제하거나; 보철 장치로의 골 성장을 증가/또는 감소시키거나; 치아 결손을 수복시키는 제제 등을 포함하는 조성물의 양이다. 그러한 유효량은 통상의 최적화

기법을 사용함으로써 측정될 것이며, 치료하고자 하는 특정 증상, 환자의 상태, 투여 경로, 제형, 및 의사의 판단, 및 당업자에게 명백한 다른 인자에 따라 달라진다. 본 발명의 화합물에 대해 요구되는 투여량(예를 들면, 골 형성의 증가를 필요로 하는 골다공증에서)은 처리군과 대조군 사이의 골량을 통계학적으로 현저하게 차이가 나도록 하는 투여량이다. 골량의 이러한 차이는 예를 들면, 처리군에서의 골량이 5-20% 이상 증가된 것으로 보일 수 있다. 치유가 임상적으로 현저히 증가하였음을 측정하는 기타 측정법으로는 예를 들면, 강도 및 장력 파괴 시험, 강도 및 염전 파괴 시험, 4-지점 굽힘 시험, 골 생검에서 연결성 증가 시험, 및 당업자에게 잘 알려져 있는 기타 생역학적 시험을 포함할 수 있다. 치료 요법에 대한 일반 가이드는 관심의 대상이 되는 질환을 앓는 동물 모델에서 수행된 실험으로부터 수득할 수 있다.

<152> 제제의 독성 및 치료학적 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물에서 예컨대, LD<sub>50</sub>(군집 50%를 사망시키는 치사량) 및 ED<sub>50</sub>(군집 50%에서 치료학적으로 유효한 유효량)을 측정하는 표준 약제학적 방법에 의해 측정될 수 있다. 독성과 치료학적 효과 사이의 용량비가 치료 지표이며, 이는 LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> 비로 표시할 수 있다. 치료 지표가 큰 제제 또는 화합물들이 바람직하다. 세포 배양물 분석법 및 동물 연구로부터 수득한 데이터를 사용하여 인간에 사용하기 위한 투여량 범위를 제형화할 수 있다. 제제 또는 화합물들의 투여량은 독성이 거의 없거나 전혀 없이, ED<sub>50</sub>을 포함하는 순환 농도 범위내 존재할 수 있다. 투여량은 사용되는 제형 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에 존재할 수 있다.

<153> 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 제제의 경우, 치료학적 유효량은 초기에 세포 배양물 분석법으로부터 예측될 수 있다. 예를 들면, 동물 모델에서 세포 배양물 또는 동물 연구에서 측정된 ED<sub>50</sub>을 포함하는 순환 혈장 농도 범위에 도달하게 하는 용량(즉, Ror2 단백질 최대 이합체화의 절반에 도달하게 하는 시험 화합물의 농도)을 제형화할 수 있다. 그러한 정보를 사용하여 인간에서 유효한 용량을 보다 정확하게 결정할 수 있다. 혈장내 수준은 예를 들면, HPLC에 의해 측정할 수 있다. 환자 상태를 고려하여 개개의 의사에 의해 투여량은 선택될 수 있다. 주치의는 투여를 종결하거나, 중단하거나, 조정하는 방법과 시기에 관해 알 것이다. 반대로, 주치의는 또한 임상적 반응이 적절치 못하다면(독성 제외) 보다 고수준으로 처리하도록 조절하는 것에 대해 알 것이다. 관심의 대상이 되는 질병을 관리하는데 있어서 투여되는 용량의 크기는 치료하고자 하는 증상의 중증도에 따라 달라질 것이다. 증상의 중증도는 예를 들면, 표준 진단 평가 방법에 의해 부분적으로 평가될 수 있다. 추가로, 용량 및 가능하게는 투여 빈도 또한 개개 환자의 연령, 체중, 및 반응에 따라 달라질 것이다. 상기 논의된 것과 유사한 프로그램이 수의학에도 사용될 수 있다.

<154> 특정 상황하에 적절한 투여량을 결정하는 것은 당업계의 기술내 존재한다. 일반적으로, 화합물의 최적 투여량보다 적은 보다 소량의 투여량으로 사용하여 치료를 개시한다. 이후, 상기 환경하에 최적의 효과에 도달할 때까지 소량씩 증가시키면서 투여량을 증가시킬 수 있다. 예를 들면, 총 1일 투여량은 분할될 수 있고, 원하는 경우, 당일 동안 부분적으로 투여될 수 있다. 1일 투여량은 2, 3, 또는 4회분으로 분할될 수 있고, 이들 각각은 24시간의 기간 동안 투여된다.

<155> 제제로서 항체 또는 항체 단편이 투여되는 경우, 제제는 전형적으로 정맥 주입을 통해 투여된다. 투여량 범위는 매 1-6주마다 1-25 mg/kg일 수 있다. 특정 실시태양에서, 투여량 범위는 매 1-6주마다 1-10 mg/kg일 수 있다. 특정 실시태양에서, 1-10 mg/kg의 제제는 매 3-5주마다 정맥 주입에 의해 전달된다. 다른 실시태양에서는, 3-6 mg/kg의 제제가 매 4주마다 정맥 주입에 의해 전달된다.

<156> 치료하고자 하는 특정 증상에 따라, 제제는 제형화되고, 전신 또는 국소 투여될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 그의 의도하는 투여 경로와 상용성이 되도록 제형화된다. 제형화 및 투여 기법은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990)]에서 찾아볼 수 있다. 적합한 경로로서 단지 몇개만 예를 들자면, 경구, 직장, 질내, 경피, 경점막, 또는 장내 투여; 근육내, 피하, 및 골수내 주사를 비롯한, 비경구 전달; 뿐만 아니라, 경막내, 직접 심실내, 정맥내, 복강내, 비강내, 또는 안내 주사를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 몇몇 전달 방법으로는 리포솜내 캡슐화, 보철 장치 내로의 혼입, 레트로바이러스 벡터에 의한 형질도입, 및 생체외에서의 세포 형질감염 이후 형질감염된 세포의 재삽입 또는 투여를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<157> 조성물이 약제학적으로 사용될 때, 이는 진단용 및 치료용의 "약제학적으로 허용 가능한 담체"와 배합된다. 상기 조성물의 제법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가 제제를 포함할 수 있고, 바람직하게는 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

<158> 적합한, 약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제로는 임의의, 그리고 모든 통상의 용매, 분산 매질, 충

진제, 고체 담체, 수용액, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. "약제학적으로 허용 가능한 담체"라는 용어는 그가 투여되는 환자에서 알레르기 반응 또는 기타 원치않는 효과를 유발하지 않는 담체를 지칭한다. 적합한 약제학적으로 허용 가능한 담체로는 예를 들면, 물, 염수, 인산염 완충처리된 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 뿐만 아니라, 그의 조합물중 하나 이상을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는, 조성물 중 하나 이상의 제제의 저장 수명 또는 효능을 증진시키는, 최소량의 보조 물질, 예로서, 습윤제 또는 유화제, 방부제, 또는 완충제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 물질에 대한 상기 매질 및 제제를 사용하는 것은 당업계에 잘 알려져 있다.

<159> 비경구, 진피내 또는 피하 적용을 위해 사용되는 액제 또는 현탁제는 하기 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제 예로서, 주사용수, 염수 용액, 불휘발성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 항균제, 예로서, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예로서, 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이트화제, 예로서, 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충액, 예로서, 아세트산염, 구연산염 또는 인산염; 및 강장 조절제, 예로서, 염화나트륨 또는 텍스트로스. pH는 산이나 염기, 예로서, 염산 또는 수산화나트륨으로 조절할 수 있다. 비경구 투여용 제제는 유리나 플라스틱으로 제조된 앰플, 1회용 주사기 또는 다회 투여용 바이알 내에 봉입시킬 수 있다. 주사용으로 적합한 약제학적 조성물은 멸균 주사 용액 또는 분산액을 즉석에서 제조하는데 사용되는, 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체로서는 생리 식염수, 정균수, 크레모포(Cremophor) EL™(뉴저지주 파시퍼니에 소재하는 BASF) 또는 인산염 완충처리된 염수를 포함한다. 상기 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 분산 매질 또는 용매일 수 있다. 예를 들어, 코팅물, 예를 들어, 레시틴을 사용한다든지, 분산에 필요한 입도를 유지시킨다든지, 그리고 계면 활성제를 사용한다든지 하여 유동성을 적당히 유지시킬 수 있다. 미생물 작용은 각종 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 및 티메로살 등을 사용하여 방지할 수 있다. 다수의 경우, 조성물 중 등장제, 예를 들어, 당 또는 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사용 조성물의 흡수 시간은 이 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아르산알루미늄 및 젤라틴을 포함시킴으로써 연장될 수 있다.

<160> 추가로, 본 발명에 의해 동정된, 질환 및 용태를 치료하는 제제는 또한 치료하고자 하는 용태에 대한 특정의 유용성에 관하여 선택된 기타 치료제와 함께 공-투여될 수 있다. 예를 들면, 제제는 에스트로겐 또는 에스트로겐계의 화합물들 또는 기타 골 흡수 억제제와 함께 조합될 수 있다. 에스트로겐 화합물들로는 접합된 에스트로겐, 에스트라디올, 및 그의 유사체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 기타 골 관련 치료학적 화합물들로는 비스포스포네이트 및 계열 화합물들(예로서, 미국 특허 번호 제5,312,814호에 기재되어 있는 것), 칼슘 보충제 [Prince, R. L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 325, 1189, (1991)], 비타민 D 보충제 [Chapuy M. C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 327, 1637, (1992)], 불소화나트륨 [Riggs, B. L. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 327, 620, (1992)], 안드로겐 [Nagent de Deuxchaisnes, C., in *Osteoporosis, a Multi-Disciplinary Problem*, Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series No. 55, Academic Press, London, p. 291, (1983)], 및 칼시토닌 [Christiansen, C., *Bone* 13 (Suppl. 1):S35, (1992)]을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<161> 또다른 측면에서, 본 발명은 Ror 단백질을 활성화시키는 제제를 동정하는 시스템을 제공한다. 제제가 Ror 단백질의 활성을 변경시키는지 여부를 측정하는 방법으로는 당업자에게 잘 알려져 있는 실험 분석 및 분석법을 포함한다. 예를 들면, 조직화학적 분석, 웨스턴 블롯 분석, ELISA, 효소 분석법(예컨대, 키나제 분석법), 및 예를 들면, Ror 또는 14-3-3β 인산화(더 높은 활성을 반영하는 더 높은 상태의 인산화)의 정도 측정을 비롯한, 기능 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 실시태양에서, Ror, 특히, Ror2 단백질의 활성은 Ror2 단백질에 결합하고, Ror2 단백질에 의해 인산화된 것으로 보이는 14-3-3β의 인산화 상태를 측정함으로써 평가된다. 14-3-3β 단백질의 인산화는 당업계에 공지된 임의 기법을 사용하여 분석될 수 있다. 특히, 항-포스포티로신 항체를 사용하는 면역침전을 사용하여 14-3-3β 단백질의 인산화를 주시할 수 있다. 별법으로, 인 방사능 동위원소(예컨대, <sup>32</sup>P-γ-ATP)가 사용될 수 있다.

<162> 본 발명은 또한 골 관련 활성을 조절하는 제제를 동정하는 방법을 제공하며, 여기서, Ror 분자(예컨대, Ror2 단백질) 활성의 증가 또는 감소는 제제가 골 관련 활성을 조절한다는 것을 지시한다.

<163> 특정 실시태양에서, 본 발명은 Ror2의 이합체화에 의해 조절되는 리포터 유전자, 예로서, 루시페라제와 키메라 수용체(예컨대, Ror2/TrkB)를 사용하여 Ror2의 이합체화를 촉진하는 제제를 동정하는 분석 방법을 제공한다. 특

정 실시태양에서, TrkB의 세포내 도메인에 융합된 Ror2의 세포외 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 발현하는 세포를 본 발명의 분석법에서 사용한다. 특정 실시태양에서, Ror2 단백질의 세포외 도메인인 아미노산 1-407을 막 관통 및 TrkB의 세포내 도메인(아미노산 432-822)에 융합시킨다. 다른 실시태양에서, 키메라 작제에 상이한 세포내 도메인을 사용한다. 예를 들면, 이합체화될 때 활성화되는 임의의 세포내 도메인을 TrkB 도메인 대신 사용할 수 있다. 바람직하게, 세포내 도메인은 단일 스펠 막 관통 수용체로부터 유래되고, 신호 전달 경로는 공지되어 있다. 키메라 수용체 제조에 사용될 수 있는 기타 도메인에 대한 비제한적인 일례로 TrkA, TrkC, EGFR, PDGFR, 및 FGFR의 세포내 도메인을 포함한다. 세포내 도메인은 세포외 도메인이 이합체화될 때 활성화되고, 신호 전달 일련 반응을 작동시켜 결국에는 리포터 유전자를 상향 조절시킨다. Ror2/TrkB 키메라의 경우, 키메라 수용체의 세포외 Ror2 도메인을 이합체화시키는 제제는 Ror2/TrkB 키메라를 활성화시킨다. TrkB 신호 전달 경로 활성화는 cAMP 반응 요소(CRE) 프로모터-리포터 유전자 시스템을 사용함으로써 평가된다. 또다른 신호 전달 경로, 예로서, EGFR의 활성화는 또다른 리포터 유전자 시스템, 예로서, STAT 결합 요소에 기초한 것으로 EGFR 경로에 의해 작동되는 것을 필요로 할 것이다. TrkB 경로의 활성화는 CRE 프로모터를 자극시켜 결국에는 그의 제어하에 임의의 리포터 유전자의 발현을 증가시킨다. 용이하게 분석되는 리포터, 예로서, 루시페라제(LUC), 녹색 형광 단백질(GFP), β-갈락토시다제(GAL), β-글루쿠로니다제(GUS), 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT) 등이 CRE 프로모터의 제어하에 배치될 수 있으며, 본 발명의 분석법에 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 루시페라제가 리포터 유전자로서 사용된다. 다른 실시태양에서, 녹색 형광 단백질이 리포터 유전자로서 사용된다. 특정 실시태양에서, 키메라 수용체를 발현하는 세포 내로 플라스미드 상의 CRE 프로모터-리포터 작제물을 형질감염시킨다. 다른 실시태양에서, 작제물은 세포 게놈의 일부이다. 특정 실시태양에서, 작제물은 세포 내로 안정적으로 형질감염된다. 본원에서 Ror2를 이합체화시키는 것으로 제시된 Ror2 특이적 항체를 사용하여 Ror2/TrkB 키메라에 기초한 본 발명의 분석 시스템을 확인하였다. Ror2 특이적 항체는 관찰되는 리포터(즉, 루시페라제) 활성을 용량에 의존하는 방식으로 증가시킨다. 도 12를 참조한다.

<164> 본 발명의 키메라 수용체 분석 시스템은 상응하는 프로모터 시스템과 쌍을 이룬 상이한 세포내 도메인을 사용하여 변형시킬 수 있다. 다른 세포내 도메인의 예로는 TrkA, TrkC, EGFR, PDGFR, 및 FGFR의 세포내 도메인을 포함한다. 이어서, 세포내 도메인에 의해 조절되는 상응하는 프로모터가 리포터 시스템에서 사용될 것이다. 예를 들면, STAT 결합 요소는 EGFR 세포내 도메인과 함께 키메라 수용체를 사용하는 시스템에서 사용될 수 있다.

<165> 본 발명은 본 발명의 키메라 수용체 분석법을 실시하는 키트를 포함한다. 이러한 키트는 본 발명의 분석법을 사용하여 시험 제제를 스크리닝하는데 필요한 성분들 중 일부 또는 그 모두를 포함한다. 특정 실시태양에서, 연구원이 편리하게 사용할 수 있도록 키트 성분들은 패키징된다. 키트는 하기 중 임의의 것 또는 그 모두를 포함할 수 있다: DNA 작제물, 세포주, 완충액, 효소, 다중 웰 플레이트, 양성 및 음성 대조군, 배지, 항생제, 뉴클레오티드, 설명서 등. 특정 실시태양에서, 키트는 Ror2/TrkB 키메라 수용체를 발현하는 세포주를 포함한다. 다른 실시태양에서, 키트는 Ror2/TrkB 키메라 수용체를 코딩하는 DNA 작제물을 포함한다. 다른 실시태양에서, 키트는 CRE 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다. 특정 실시태양에서, 키트는 CRE 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다. 리포터 유전자/CRE 프로모터 작제물은 플라스미드일 수 있다.

<166> 본 발명은 상기 기술된 본 발명의 분석법에 사용되는 세포외 Ror2 도메인을 포함하는 키메라 수용체를 포함한다. 키메라 Ror2/TrkB 수용체의 예시적인 아미노산 서열을 하기와 같다. Ror2 단백질로부터 유래된 아미노산 서열은 대문자로 표시되어 있고; TrkB 단백질로부터 유래된 아미노산 서열은 소문자로 표시되어 있다.

```
MARGSALPRRPLLCIPAVWAAAALLSVSRSTSGEVEVLDPNDPLGPLD
GQDGPITLKGYFLNLFLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPNVRWLK
NDAPVVQEPRIIRKTEYGSRLRIQDLDTDTGYYQCVATNGMKTITA
TGVLFVRLGPTHSPNHNFDYHEDGFCQPYRGIACARFIGNRITIVD
SLQMQGEIENRITAFAFMIGTSTHLSQCSQFAIPSFCHFVFLCDARSR
APKPRELCRDECEVLESDLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEALPMPE
SPDAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSGMDYRGTA STTKSGHQCPW
ALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNPGQMEGPWCFTQNKNVRM
ELCDVPSCSPRDSKMGILYlsvyavvviasvvgfcllvmfllklarhskfgmkgpasvisn
dddsasplhhisnsgntpsseggpdaviigmtkipvienpqyfgitnsqkpdftvqhkrhnlvklrelge
gafgkvflaacyncpeqdkilvavtkldasdnarkdffreaellnlqehivkfygvcvegdlmvfe
ymkhgdlnkflrahgpdavlmagnppteitqsqmlhiaqiaagmvyllasqhfvrhrlatrnclvgenll
vkigdfmsrdvystdyrvvghtmlpirwmpesimyrkftesdvsvglvweifygkqpwyqls
nnevicitqgrvlqrprtepqevyelmlgcwqrephmrknkigihlqlnakaspyvldiig
```

(서열 번호: 4)

<167> 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 본 발명으로부터 벗어나지 않으면서 본 발명의 키메라 단백질은 다양하게

돌연변이화, 결실, 치환 등이 될 수 있다. 특정 실시태양에서, 키메라 단백질은 상기 아미노산 서열과 99% 이상, 98% 이상, 95% 이상, 90% 이상, 80% 이상, 또는 70% 이상 상동성이다. 특정 실시태양에서, 키메라 수용체는 이합체화될 때 신호 전달 경로, 예로서, TrkB 경로를 활성화시키는데, 이는 키메라 수용체의 세포의 Ror2 도메인의 이합체화에 의해 유발되는 것이다. 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 수용체의 활성을 변화시키지 않으면서 상기 단백질 서열은 다양하게 변화될 수 있다. 키메라 수용체의 이러한 변이체가 본 발명의 범주내 포함되는 것으로 간주된다. 본 발명은 또한 키메라 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그의 변이체를 포함한다. 코딩 서열은 임의로 키메라 단백질의 발현 및/또는 번역을 조절하는 프로모터, 인핸서, 조절 요소 등에 작동 가능하게 연결된다. 본 발명은 또한 키메라 수용체를 코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 세포를 포함한다.

<169> 본 발명의 방법은 고처리량 분석법을 비롯한, 임의의 이용 가능한 포맷으로 변형되거나 실시될 수 있다. 고처리량 분석법은 지정된 기간 동안 다수의 시험 체제를 스크리닝하는데 유용하다. 또다른 실시태양에서, 세포 기초 스크리닝을 사용하는 분석법을 실시한다. 2000년 8월 15일 발행된 미국 특허 번호 제6,103,479호(본원에서 참고로 인용된다)는 세포 기초 스크리닝을 위한 소형 세포 어레이 방법 및 기기를 개시한다. 다른 적용, 예를 들면, 광화학 내성 포도리소그래피용의, 세포의 균일한 미세-패턴형 어레이를 제작하는 방법이 기재되어 있다[Mrksich and Whitesides, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 25, 55-78, (1996)]. 2000년 8월 1일 발행된 미국 특허 번호 제6,096,509호(본원에서 참고로 인용된다)는 검출 대역을 통과하도록 지정된, 일련의 세포 유형들 각 일원의 동종 현탁액을 특정 농도의 시험 화합물과 배합하고, 시험 혼합물 중 세포가 검출 대역을 통해 유동함에 따라 생 세포의 세포 반응을 실시간으로 측정하는 것인, 유동 세포 현탁액 상에서 시험 체제에 대한 세포 반응을 실시간으로 측정하는 기기 및 방법을 제공한다. 상기 특허는 시험 체제(예컨대, 소분자) 라이브러리의 자동 스크리닝상기 기기의 용도에 대해 개시한다. 이들 미국 특허들에 개시된 방법을 변형하여 세포, 예로서, 조골세포(1차 조골세포, 인간 조골세포, 예로서, TE-85, U2OS, SaOS-2 또는 HOB, 래트 조골세포, 예로서, UMR 106 또는 ROS 17/2.8, 마우스 조골세포 예로서, MC3T3, 또는 기타), 비-조골세포(COS-7 및 기타), 줄기 세포(중간엽 줄기 세포, 배아 줄기 세포), 전구세포 세포, 또는 Ror 뉴클레오티드 서열을 사용하는 조작된 세포를 사용함으로써 시험 체제가 Ror 분자의 발현 또는 활성을 조절하는지 여부를 측정할 수 있다. 추가의 다른 실시태양에서, 효소 분석법에 기초한 분석법(예컨대, 키나제 분석법)이 실시된다.

<170> 이어서, Ror 단백질의 활성을 조절하는데 유용한 것으로 동정된 시험 체제를 추가로 시험할 수 있다. 특정 실시태양에서, 체제를 기타 세포 기초 분석법 또는 비-세포 기초 분석법으로 시험한다. 화합물들은 각종 골 질환 및 질병의 동물 모델을 비롯한, 각종 질환의 동물 모델에서 시험될 수 있다. 예를 들면, 체제는 골절, 골다공증, 골암, 골 손실 등의 동물 모델에서 시험될 수 있다.

<171> 본 발명은 분자 생물학 및 세포 생물학 분야에 잘 알려져 있는 참고 방법 및 기법을 통합한다. 이들 기법으로는 하기 간행물: ([Old, R. W. & S. B. Primrose, *Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering* (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4)], [Sambrook, J. et al. eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6)], [Miller, J. H. & M. P. Calos eds., *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (1987) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 169 pp. (ISBN 0-87969-198-0)])에 기재되어 있는 기법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

### 실시예

<172> 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 정의되며, 달리 언급되지 않는 한, 하기 실시예에서 모든 부분과 퍼센트는 중량에 의하며, 온도는 섭씨에 의해 정의된다. 이들 실시예는 본 발명의 바람직한 실시태양을 지지하면서, 단지 일례로서 제공되는 것임을 이해하여야 한다. 상기 논의, 실시태양, 및 이들 일례로부터, 당업자는 실질적으로 본 발명의 신규한 교시로부터 벗어나지 않으면서, 그리고, 그의 정신 및 범주로부터 벗어나지 않으면서, 예시적인 실시태양이 다수 변형될 수 있다는 것을 용이하게 이해할 수 있을 것이다. 추가로, 다양한 용법과 조건으로 본 발명을 적합화시키기 위해 본 발명은 다양하게 변화 및 수정될 수 있다. 따라서, 모든 그러한 수정을 하기 청구의 범위에서 정의되는 것과 같은 본 발명의 범주 내에 포함시키고자 한다.

<173> 본원에서 언급되는 특허, 출원, 시험 방법 및 간행물은 그의 전문이 본원에서 참고로 인용된다.

<174> **일반적인 방법들**

<175> **재료 및 조직 배양**

- <176> 달리 언급된 경우를 제외하고는, 조직 배양 시약은 인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corporation)(캘리포니아주 칼스배드 소재)으로부터 구입하고; 다른 시약은 시그마 케미칼 코포레이션(Sigma Chemical Co.)(미주리주 세인트루이스 소재) 또는 인비트로젠으로부터 구입하였다. 재조합 인간 Ror2의 GST 태깅 세포질 도메인을 인비트로젠으로부터 구입하고, GST 태깅 재조합 인간 14-3-3 $\beta$ 를 바이오몰 인터내셔널, LP(Biomol International, LP)(펜실베이니아주 플리머스 미팅 소재)로부터 구입하였다. 항-플래그 M2 마우스 단일 클론 항체, 항-플래그 M2 친화성 아가로스, 및 항- $\beta$ 액틴 마우스 단일 클론 항체를 시그마로부터 구입하고; 항-인간 Ror2 염소 다중 클론 항체를 R&D 시스템즈(R&D Systems)(미네소타주 미니애폴리스 소재)로부터 구입하고; 항-14-3-3 $\beta$  및 항-His 토끼 다중 클론 항체를 산타 크루즈 바이오테크놀러지, 인코포레이티드(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)(캘리포니아주 산타 크루즈 소재)로부터 구입하였다. 접합되지 않은 항-포스포티로신 항체 및 아가로스 접합 항-포스포티로신 항체(4G10)는 업스테이트 셀 시그널링 솔루션즈(Upstate Cell Signaling Solutions)(버지니아주 샬로츠빌 소재)로부터 구입하고; 고정된 포스포티로신 항체 P-Tyr-100은 셀 시그널링 테크놀러지(Cell Signaling Technologies)(매사추세츠주 비벌리 소재)로부터 구입하고; 단백질 A 세파로스 및 글루타틴은 세파로스는 아머삼 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences)(영국 버킹엄셔 소재)로부터 구입하였다. 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP: horseradish peroxidase) 접합 2차 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀러지, 인코포레이티드로부터 입수하였다.
- <177> 인간 중간엽 줄기 세포(hMSC)는 캄브렉스 인코포레이티드(Cambrex, Inc.)(메릴랜드주 볼티모어 소재)로부터 구입하고, hMSC 성장 배지(MSCGM, Cambrex)를 사용하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub>-95% 습윤 대기 인큐베이터에 유지시켰다.
- <178> U2OS 인간 골육종 세포를 37°C에서 10% 열 불활성화된 우태아 혈청(FBS: fetal bovine serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신, 및 2 mM glutaMAX-I을 함유하는, 맥코이 5A 변형 배지(McCoy' 5A Modified Medium)에 유지시켰다.
- <179> 플라스미드 및 아데노바이러스
- <180> 인간 Ror2-플래그 발현 플라스미드의 생성에 대해서는 앞서 기재된 바 있다(2004년 4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard and Bodine); [Billiard *et al.* Mol Endo 19, 90-101, 2005]). Ror2-플래그 COOH 말단의 플래그 에피토프 태그를 6 히스티딘을 코딩하는 서열로 대체하여 Ror2-His 작제물을 생성하였다. pGEX-4T-2 벡터(Amersham)중 프레임내에 인간 Ror2의 세포내 도메인(아미노산 428-944 코딩)을 삽입한 후, 이어서 GST 태그를 삽입하여 Ror2의 세포질 도메인의 GST 융합물(GST-Ror2c)을 수득하였다.
- <181> 전장의 인간 14-3-3 $\beta$  cDNA는 오픈 바이오시스템즈(Open Biosystems)(앨라배마주 헌츠빌 소재)로부터 구입하고, pET28a 세균 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 인간 콕사키 아데노바이러스 수용체(hCAR: human coxsackie adenovirus receptor), Ror2 특이적 shRNA 및 EGFP 특이적 shRNA를 함유하는 아데노바이러스는 갈라파고스 인코포레이티드(Galapagos, Inc.)(벨기에 메헬렌 소재)로부터 입수하였다. Ror2, Ror2KD 및  $\beta$ -갈락토시다제( $\beta$ -gal) 아데노바이러스의 생성에 대해서는 앞서 기재된 바 있다(2004년 4월 14일 출원된 미국 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard and Bodine)(본원에서 참고로 인용된다)).
- <182> 두개골 기관 배양 및 감염
- <183> 두개골을 4일된 마우스 한배 새끼로부터 절개하고, 시상 봉합을 따라 절단하고, 0.1% BSA를 함유하는 무혈청 BGJ 배지에서 24h 동안 인큐베이션시켰다. 두개골 절반 각각을 12웰 플레이트의 웰 중 스테인리스 스틸 그리드(플로리다주 마이애미에 소재하는 Small Parts Inc.) 상에 오목한 표면이 아래로 향하게 놓았다. 각 웰은 1% FBS를 포함하고,  $\beta$ -gal 또는 Ror2 아데노바이러스(3.75 mln 바이러스 입자/웰)를 포함하거나 포함하지 않는 1 ml의 BGJ 배지를 함유하였다. 두개골을 5% CO<sub>2</sub>-95% 습윤 대기 인큐베이터에서 인큐베이션시키고, 4일 후에 배지와 아데노바이러스를 교체하였다.
- <184> 아데노바이러스 존재하에 7일 동안 인큐베이션시킨 후, 72시간 동안 RT하에 10% 중성 인산염 완충처리된 포름알데히드에서 두개골을 고정시킨 후, PBS중 10% EDTA에서 6시간 동안 석회질을 제거하였다. 각 균의 두개골을 동일한 파라핀 블록내 평행하게 포매하고, 4  $\mu$ m 절편을 헤마톡실린-에오신으로 염색하였다. 조직형태 계측학적 분석을 위해 일정한 골 범위(전두 봉합으로부터 200  $\mu$ m 떨어져 있는 부위)를 선택하였다. 간략하면, 200  $\mu$ m 사각 그리드를 각각의 두개골 상에 놓고, 오스테오메쥬 시스템(Osteomeasure System)(조지아주 애틀랜타 소재의 Osteometrics Inc.)을 사용하여 조골세포의 갯수와 전체 골 면적을 측정하였다. 골 표면 상의 모든 세포를 조골 세포로서 계수하였다. 칼슘 다이아그노스틱스 키트(Calcium Diagnostics Kit)(Sigma)를 사용하여 제조사의 프로

토콜에 따라 배지의 칼슘을 측정하였다.

<185> 바이러스 감염

<186> 인간 MSC를 12웰, 또는 6웰 플레이트에 6,000/cm<sup>2</sup>로 시딩하고, 부착시키고, 밤새도록 증식시켰다. 감염물을 개선시키기 위해서 hCAR의 존재하에(MOI=750) 다중 감염도(MOI: multiplicity of infection)=750으로 Ror2, Ror2KD, 또는 β-gal 아데노바이러스를 사용하여 0.4 ml/cm<sup>2</sup> MSCGM에 24h 동안 세포를 감염시켰다. 24h 후에 세포를 PBS에서 1회 세척하고, MSCGM, 0.05 mM 아스코르브산 및 10 mM β-글리세로포스페이트로 보충된 MSCGM, 또는 지방 생성 보충제(PT-3004, Cambrex)를 함유하는 MSCGM을 가하였다. 지시될 경우, 100 nM 텍사메사손(dex) 및/또는 지시된 항체를 배지에 가하였다. shRNA 감염을 위해, 세포를 12웰 또는 6웰 플레이트에 6,000/cm<sup>2</sup>로 시딩하고, 부착시키고, 3일 동안 증식시켰다. hCAR의 존재하에(MOI=750) 세포당 4,000개의 바이러스 입자로(원래의 시딩 밀도에 기초하여) Ror2 특이적 shRNA 또는 EGFP 특이적 shRNA를 코딩하는 아데노바이러스를 사용하여 0.4 ml/cm<sup>2</sup> MSCGM에 72h 동안 세포를 감염시켰다. 72h 후에 세포를 PBS에서 1회 세척하고, MSCGM 또는 0.05 mM 아스코르브산 및 10 mM β-글리세로포스페이트로 보충된 MSCGM을 가하였다. 지시될 경우, 100 nM dex 및/또는 특정 항체를 가하였다. 매 5일마다 배지 전체를 또는 배지의 1/2을 새로운 배지로 교체하였다.

<187> U2OS 세포를 6웰 플레이트에 75,000/cm<sup>2</sup>로 시딩하고, 24h 후에 MOI=100으로 Ror2, Ror2KD, 또는 β-gal 아데노바이러스를 사용하여 감염시켰다. 24h 동안 감염이 진행될 수 있도록 하고, 다시 24h 후에 세포 추출물을 수집하였다.

<188> 알리자린 레드-S 조직화학적 염색

<189> 알리자린 레드-S 조직화학적 염색에 의해 12웰 플레이트 상에서 hMSC에 의한 무기질화된 결절의 형성을 측정하였다. 세포와 기질을 1h 동안 RT에서 70%(v/v) 에탄올을 사용하여 고정시키고, 탈이온수로 세척하고, 10분 동안 RT에서 40 mM 알리자린 레드-S(pH 4.2)를 사용하여 염색하였다. 염색된 기질을 탈이온수로 세척하고, 사진촬영하였다. 알리자린 레드-S 염색 수준을 측정하기 위하여 염료를 1 ml/웰의 10%(w/v) 염화세틸피리디늄염 용출시켰다. 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 562 nm에서 용출된 샘플내 알리자린 레드-S를 측정하였다(0-800 μM 염료에 대한 표준 곡선 대비).

<190> 오일 레드 O 조직화학적 염색

<191> 오일 레드 O 조직화학적 염색에 의해 12웰 플레이트 상에서 hMSC에서의 지방 생성을 모니터하였다. 세포를 2h 동안 RT에서 10% 중성 완충처리된 포르말린을 사용하여 고정시키고, PBS로 세척하고, 10분 동안 RT에서 60% 이소프로판올(pH 7) 중 18 mg/mL 오일 레드 O로 염색하였다. 염색된 세포를 PBS로 세척하고, 사진촬영하였다.

<192> RNA 단리 및 실시간 PCR 분석

<193> RNeasy 키트(RNeasy Kit)(캘리포니아주 발렌시아에 소재하는 Qiagen)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 전체 세포 RNA를 단리시키고, ABI PRISM 7700 시퀀스 디텍션 시스템(ABI PRISM 7700 Sequence Detection System)(캘리포니아주 포스터 시티에 소재하는 Applied Biosystems)를 사용하여 실시간 RT-PCR 분석을 실시하였다. 모든 mRNA 수준을 하우스키핑 유전자인 사이클로필린 B의 수준으로 정규화시켰다. 인간 C/EBPα 및 PPARγ에 대한 프라이머 및 프로브를 어플라이드 바이오시스템즈로부터 구입하였다; 인간 사이클로필린 B에 대한 프라이머 및 프로브는 하기와 같았다: 5'-CACCAACGGCTCCAGTT-3'(정방향 프라이머, 438-455, 서열 번호: 1), 5'-AACACCACATGCTTGCCATCT-3'(역방향 프라이머, 486-506, 서열 번호: 2), 및 5'-TTCATCAGCAGTCAAGACAGCCTGG-3'(프로브, 457-483, 서열 번호: 3).

<194> 일시적 형질감염

<195> Ror2 플라스미드 형질감염을 위해, U2OS 세포를 ~80%의 용합 밀도로 시딩하고, 24h 후에 퓨진6(Fugene6) 형질감염 시약(인디애나주 인디애나폴리스에 소재하는 Roche Applied Science)을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 19.6 cm<sup>2</sup>당 11 μg의 전체 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. siRNA 형질감염을 위해 U2OS 세포를 52,000개의 세포/cm<sup>2</sup>로 6웰 플레이트 상에 플레이팅하고, 24h 후에 10 μl의 리포펙타민 2000 시약을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 25 nM의 Ror2 siRNA 또는 비특이적 siRNA(둘 모두를 콜로라도주 라피엣에 소재하는 Dharmacon Inc.로부터 입수)로 형질감염시켰다.

<196> 면역침전 및 웨스턴 면역블롯팅

<197> 프로테아제 및 포스파타제 억제제 각테일(Sigma)로 보충된 용해 완충액(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Triton X100)에 세포를 가용화시키고, 4°C에서 10분 동안 10,000xg으로 원심분리하여 추출물을 정화시켰다. 플래그 면역침전을 위해 1 mg의 전체 세포 용해물을 1시간 동안 30  $\mu$ l의 M2 플래그 친화성 아가로스(Sigma)와 함께 4°C에서 회전시키면서 인큐베이션시켰다. 원심분리하여 비드를 수집하고, 350 mM NaCl을 함유하는 용해 완충액에서 3회, 및 용해 완충액에서 3회 세척하였다. 14-3-3 $\beta$  침전을 위해, 15  $\mu$ l의 14-3-3 $\beta$  항체를 4°C에서 밤새도록 1 ml의 용해 완충액 중 30  $\mu$ l의 단백질 A 세파로스와 함께 인큐베이션시키고, 원심분리하여 비드를 수집하고, 용해 완충액에서 세척한 후, 1 mg의 전체 세포 용해물을 가하였다. 가볍게 회전시키면서 2h 동안 4°C에서 결합 반응을 수행하고, 비드를 수집하고, 플래그 침전을 위해 세척하였다. 포스포티로신 침전을 위해, 1 mg(과발현된 단백질 검출을 위해) 또는 1.5 mg(내인성 단백질 검출을 위해)의 세포 추출물을 100  $\mu$ l의 G410 비드에 가하고, 3h 동안 4°C에서 부착될 수 있도록 하였다. 이때, P-Tyr-100 고정된 항체(100  $\mu$ l)를 추가의 3h 동안 믹스에 가하였다. 원심분리하여 모든 비드를 수집하고, 플래그 침전을 위해 세척하였다. 모든 면역침전 반응의 종결시에, 환원제(Invitrogen)를 포함하는 30-50  $\mu$ l의 2xLDS-PAGE 완충액에서 비드를 비등시키고, 가용화된 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. 겔을 0.45  $\mu$ m 니트로셀룰로스 막 상으로 이동시킨 후, 각각의 특이적인 항체로 검출하였다.

<198> 침전이 없는 면역블롯팅을 위해, 지시량의 전체 세포 용해물을 변성 및 환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 분해한 후, 0.45  $\mu$ m 니트로셀룰로스 막 상으로 이동시킨 후, 각각의 특이적인 항체로 검출하였다.

<199> GST 풀-다운 및 시험관내 키나제 분석법

<200> 50  $\mu$ l의 반응물에서 익스프레스웨이(Expressway)<sup>TM</sup> 시험관내 단백질 합성 시스템(Invitrogen)을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 14-3-3 $\beta$ -pET28a로부터 14-3-3 $\beta$ 를 시험관내에서 번역시켰다. pGEX-4T-2 중 GST-Ror2c 또는 pGEX-4T-2(GST만을 단독으로 코딩)를 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) BL21(DE3) 균주로 형질전환시켰다. 0.7의 A<sub>600</sub>까지 배양물을 배양하고, 이소프로필-1-티오- $\beta$ -D-갈락토피라노시드(Sigma; 최종 농도 1 mM)를 가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고, 4h 동안 인큐베이션시켰다. 원심분리하여 세균 펠릿을 수확하고, PBS에서 세척하고, 프로테아제 및 포스파타제 억제제 각테일(Sigma)로 보충된 30 ml의 PBS에 재현탁시켰다. 세포를 2회에 걸쳐 16,000 p.s.i.로 프렌치 프레스 셀 프레스(French Pressure Cell Press)(뉴욕주 로체스터에 소재하는 Spectronic Instruments)를 통해 통과시킴으로써 용해시키고, 원심분리하여 세균 파편을 제거하였다. 생산된 GST-Ror2c 또는 GST 단백질을 4°C에서 4h 동안 글루타티온 세파로스와 함께 인큐베이션시켰다. 비드를 세척하고, 1 ml PBS에 재현탁시키고, 전체 50  $\mu$ l의 14-3-3 $\beta$  시험관내 번역 반응물을 4°C에서 4h 동안 가하였다. 인큐베이션 종결시, 비드를 PBS에서 3회에 걸쳐 세척하고, 환원제(Invitrogen)와 함께 2xLDS-PAGE 완충액에서 비등시키고, 가용화된 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. 겔을 0.45  $\mu$ m 니트로셀룰로스 막 상으로 이동시킨 후, 각각의 특이적인 항체로 검출하였다.

<201> 시험관내 키나제 분석법을 위해, 6.5  $\mu$ g의 정제된 재조합 인간 GST-14-3-3 $\beta$ (Biomol)를, 0.9  $\mu$ g의 정제된 재조합 인간 GST-R2c(Invitrogen)가 첨가되거나 첨가되지 않는 25  $\mu$ l의 키나제 반응 완충액(10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM 디티오텐트리올(DTT: dithiotriethol), 1 mM ATP)에 재현탁시켰다. 37°C에서 30분 동안 키나제 반응이 진행될 수 있도록 하고, 환원제(Invitrogen)와 함께 1xLDS 완충액에서 비등시켜 상기 반응을 종결시켰다. 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분해하고, 0.45  $\mu$ m 니트로셀룰로스 막 상으로 이동시키고, 포스포티로신 항체로 검출하였다. 이어서, 막을 박리시키고, 14-3-3 $\beta$  항체로 다시 프로빙하여 동등한 로딩을 확인하였다.

<202> 통계학적 분석

<203> 데이터를 평균 $\pm$ SE로 제시한다. 통계학적 유의성은 일원 ANOVA 또는 스튜던트 t 검정을 사용하여 측정하였다. 결과는 P < 0.05일 때 통계학적으로 상이한 것으로 간주하였다.

<204> 실시예 1

<205> 내인성 Ror2가 hMSC 분화에서 중요한 역할을 한다

<206> 본 발명자들은 hMSC의 골발생 분화시에 Ror2 발현이 증가한다고 앞서 나타낸 바 있다(4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard et al); [Billiard et al. Mol Endo 19, 90-101, 2005](이들 각각은 본원에서 참고로 인용된다)). hMSC 분화시에 Ror2 발현의 증가가 조골세포 형성에 중요한지를 평가하기 위하여 본 발명자들은 Ror2 발현을 억제시켰을 때 dex-유도 분화를 실시하였다. 이를 위해, Ror2 특이적 shRNA를 함유

하는 아데노바이러스로 hMSC를 감염시켰는데, 이는 EGFP 특이적 대조군 shRNA와 비교하였을 때, 실제로 dex-유도된 Ror2 단백질 발현 증가를 강력하게 억제시켰다(도 1A). Ror2 shRNA로 감염시킨 경우에는 기질 무기질화를 유도하는 dex의 능력을 완전히 소거시켰는데(도 1B 및 C), 이는 Ror2의 증가가 적어도 부분적으로는 hMSC의 dex-유도된 조골세포 분화를 매개한다는 것을 제안한다.

<207> 실시예 2

<208> Ror2 과발현이 hMSC의 지방 생성 분화를 억제한다

<209> 본 발명자들은 또한, Ror2 과발현이 MSC의 조골세포 계통으로의 위임을 개시할 뿐만 아니라, 조골세포 형성 초기 및 후기의 분화를 촉진한다고 앞서 나타낸 바 있다(4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard *et al.*)(이는 본원에서 참고로 인용된다)). 본 발명자들은 이에 인도메타신 및 IBMX 함유 지방 생성 각테일에서 인큐베이션시킴으로써 유도된 hMSC의 대체 운명인 지방 생성에 Ror2가 미치는 효과를 평가하였다. 각각 COOH-말단 플라그 에피토프를 함유하는 야생형 Ror2 또는 키나제 도메인 돌연변이체(Ror2KD)를 코딩하는 아데노바이러스로 인간 MSC를 감염시켰다. Ror2KD에서는, 504번(추정 ATP 결합 도메인 중), 507번, 및 509번 위치에 있는 3개의 리신을 이소루신으로 대체하여 티로신 키나제 활성을 현저히 감소시켰다([Hikasa *et al.* Development 129, 5227-5239, 2002]; 4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard *et al.*); [Billiard *et al.* Mol Endo 19, 90-101, 2005]). 대조군의 경우, 동일한 아데노바이러스 배경하에  $\beta$ -갈락토시다제( $\beta$ -gal) 발현 카세트로 hMSC를 감염시켰다. Ror2 및 Ror2KD 돌연변이체, 둘 모두 주요 지방 생성 전사 인자인 CCAAT/인핸서 결합 단백질  $\alpha$ (C/EBP  $\alpha$ : CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ ) 및 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체  $\gamma$ (PPAR  $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )의 발현을 억제시키고(도 2A), 오일 레드 O-양성 기질 생산 지방 세포를 형성할 수 있는 hMSC의 능력을 현저하게 감소시켰다(도 2B). 본 발명자의 이전 결과와 함께(4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard *et al.*)(이는 본원에서 참고로 인용된다)), 상기 데이터는 Ror2가 전사 인자의 균형을 이동시켜 조골세포 형성을 유리하게 함으로써 세포의 운명을 변경시킨다는 것을 시사한다.

<210> 실시예 3

<211> Ror2는 마우스 두개골의 전체 골 면적을 증가시킨다

<212> 이어서 본 발명자들은 Ror2가 hMSC 분화에 미치는 시험관내 효과가 생체의 기관 배양물에서 증가된 골 형성으로 해석될 수 있는지 여부에 대하여 시험하였다. 4일된 마우스 한배 새끼의 두개골을 감염시키지 않고 그대로 남겨 두거나,  $\beta$ -gal 또는 Ror2 아데노바이러스로 감염시켰다. 아데노바이러스 존재하에 7일 동안 배양한 후, 상기 골을 헤마톡실린-에오신으로 염색하고, 오스테오메췌 시스템을 사용하여  $200 \mu\text{m}^2$  절편(전두 봉합으로부터  $200 \mu\text{m}$  떨어져 있는 부위)을 조직형태 계층학적 분석에 사용하였다. 대조군인 감염시키지 않은 조건하의  $200 \mu\text{m}^2$ 의 두개골 절편은  $5171 \pm 235 \mu\text{m}^2$ 의 골 면적 및  $84 \pm 6.5$ 개의 조골세포를 함유하였다. Ror2 바이러스로 감염시킨 경우, 조골세포 갯수에는 영향을 미치지 않으면서 전체 골 면적은 50% 증가시켰는데, 이는 Ror2가 조골세포를 활성화시켜 보다 많은 골 기질을 생산할 수 있도록 한다는 것을 시사한다(도 3).

<213> 실시예 4

<214> 14-3-3 $\beta$ 가 가장 먼저 동정된 Ror2 키나제의 기질이다

<215> 본 발명자들은 질량 분광법에 의해 U2OS 골육종 세포내 9개의 잠재 Ror2 결합 인자를 동정한 것에 관해 앞서 보고한 바 있다(4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard *et al.*)(이는 본원에서 참고로 인용된다)). 이 중, 14-3-3 단백질이 세포 주기 진행 및 분화에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났고 [Mackintosh, Biochem J 381, 329-342, 2004], 본 발명자들은 후속 연구를 위해 14-3-3 $\beta$ 를 선택하였다. 본 발명자들은 먼저 면역침전 기법을 사용하여 질량 분광법에 의해 관찰된 상호작용을 확인하였다.

<216> U2OS 세포를  $\beta$ -gal, Ror2, 또는 Ror2KD 아데노바이러스로 감염시키고, 전체 세포 단백질을 단리시키고, 항-플래그 친화성 아가로스 상에서 면역침전시키고, 항-14-3-3 $\beta$  항체로 면역블롯팅시켰다(도 4A, 상단 패널). 대조군 조건( $\beta$ -gal-감염된 세포)하에서는 극소량의 14-3-3 $\beta$ 가 침전되었지만, Ror2 과발현시에 상당량이 공침전되었다. Ror2KD 돌연변이체와 더욱더 강력하게 복합체를 형성하였는데, 이는 키나제 활성이 복합체를 해리시킨다는 것을 시사한다. 동등한 수준의 침전은 항-플래그 항체를 사용한 면역블롯팅에 의해 확인하였다(도 4A, 하단 패널). 14-3-3 $\beta$  특이적 항체 상에서 14-3-3 $\beta$ 를 침전시키고, 항-플래그 면역블롯팅에 의해 복합체내 Ror2의 존

제를 확인함으로써 14-3-3β와 Ror2 사이의 상호작용을 추가로 확인하였다(도 4B).

<217> Ror2가 14-3-3β를 인산화시키는지 여부를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 도 4A의 블롯을 항-포스포티로신 항체로 다시 프로빙시켰다. 이러한 항체를 통해 14-3-3β와 동일한 분자량으로 이동하고, 야생형 Ror2는 발현하지 않지만, β-gal 또는 키나제-불활성 돌연변이체는 발현하지 않는 세포에만 존재하는, 인산화된 단백질을 동정하였다(도 4A, 중간 패널). 이는 Ror2가 티로신 잔기(들) 상의 14-3-3β를 직접 또는 간접적으로 인산화시킨다는 것을 제안한다. U2OS 추출물 중 모든 티로신 인산화된 단백질을 항-포스포티로신 항체 상에서 면역침전시키고, Ror2 과발현시 포스포-14-3-3β의 양이 현저히 증가되었음을 관찰함으로써 상기 가설을 확인하였다(도 4C).

<218> 내인성 Ror2가 도 4C에서 관찰된 14-3-3β의 배경 인산화를 매개하는지 여부를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 Ror2 특이적 siRNA에 의해 U2OS 세포에서의 Ror2 발현을 억제시켰다. 도 5A에 나타난 바와 같이, Ror2 특이적 siRNA로 형질감염시킨 것이 스크램블 대조군 siRNA와 비교하였을 때 Ror2 단백질 발현을 거의 완전하게 억제시켰다. Ror2 발현의 감소는 U2OS 세포에서 14-3-3β 단백질의 양에는 어떤 효과도 나타내지 않았지만, 그의 티로신 인산화를 현저하게 하향 조절시켰다(도 5B). 도 4C와 비교하였을 때, 14-3-3β의 배경 인산화 정도가 뚜렷이 증가한 것은 여기서 사용된 노출 시간이 보다 길었기 때문이다.

<219> 14-3-3β에 대한 Ror2의 결합 및 14-3-3β의 인산화가 직접적인지 여부를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 재조합 정제된 단백질을 사용하여 시험관내 실험을 실시하였다. 결합 실험을 위해 인간 Ror2의 세포질 도메인의 GST 융합물(GST-Ror2c)을 세균 세포에서 발현시키고, 글루타티온 세파로스 상에서 면역침전시키고, 시험관내에서 번역된 14-3-3β와 함께 인큐베이션시켰다. 도 6A에 나타난 바와 같이, 14-3-3β는 GST-Ror2c에는 결합하였지만, GST 단독인 것에는 결합하지 않았고, 이는 14-3-3β가 Ror2의 세포질 도메인에 직접 결합한다는 것을 시사한다. 시험관내에서 번역된 14-3-3β는 키나제 분석법과는 비상용성인 익스프레스웨이™ 단백질 합성 완충액을 함유하기 때문에 본 발명자들은 정제된 재조합 GST 태깅 14-3-3β를 구입하고, 정제된 재조합 GST-Ror2c(Invitrogen)를 사용하여 시험관내 키나제 분석법을 실시하였다. 도 6B에 나타난 바와 같이, Ror2c는 14-3-3β와 그 자체, 둘 모두를 인산화시키는데, 이는 14-3-3β가 Ror2 티로신 키나제에 대한 직접적인 기질이라는 것을 확인시켜 준다.

<220> 실시예 5

<221> Ror2 특이적 항체는 Ror2 수용체를 이합체화시키고 활성화시킨다

<222> 수개의 수용체 티로신 키나제는 항체에 의해 이합체화되고 활성화되는 것으로 나타났다([Spaargaren et al. J. Biol. Chem. 266, 1733-1739, 1991]; [Fuh et al. Science 256, 1677-1680, 1992](이들 각각은 본원에서 참고로 인용된다)). 그러므로, 본 발명자들은 Ror2 수용체 티로신 키나제를 이합체화시키고 활성화시키는 그의 능력에 관하여, 인간 Ror2의 전체 세포의 도메인에 대해 발생된 Ror2 특이적 항체를 시험하였다. 이합체화를 평가하기 위하여 플래그 태깅 및 His 태깅 Ror2 수용체 작제물을 U2OS 세포에서 발현시키고, 세포를 1h 동안 37°C에서 Ror2 특이적 염소 다중 클론 IgG(인간 Ror2의 세포의 도메인에 대해 발생, R&D Systems, AF2064) 또는 비특이적 염소 IgG 대조군(R&D Systems)으로 처리하였다. 인큐베이션시, 전체 세포 단백질을 추출하고, 항-플래그 친화성 아가로스 상에서 면역침전시키고, 항-His 항체를 사용하여 면역블롯팅시켰다. 도 7A의 상단 패널에 나타난 바와 같이, 비특이적 IgG 처리의 대조군 조건하에서는 His 태깅 및 플래그 태깅 Ror2 수용체 사이에 일부가 회합되었는데, 이는 U2OS 세포에서 과발현시 Ror2가 동종이합체를 형성한다는 것을 시사한다. 이러한 동종이합체 형성은 Ror2 항체로 처리할 경우, 강력하게 증진되었고, 이는 항체가 Ror2 수용체를 이합체화시킬 수 있다는 것을 확인시켜 준다. 이러한 실험 디자인은, 항-플래그 항체가 Ror2-플래그의 부재하에서는 항-플래그 항체를 면역침전시키지 못했고, 항-His 항체가 Ror2-플래그 단백질을 인식하지 못했다는 사실에 의해 입증되었다(도 7A, 상단 패널). Ror2-플래그 침전의 동등한 수준은 항-플래그 항체를 사용한 면역블롯팅에 의해 입증되었다(도 7A, 하단 패널).

<223> 항체가 Ror2 티로신 키나제를 활성화시키는지 여부를 다루기 위해 본 발명자들은 1h 동안 37°C에서 Ror2 특이적 항체 또는 IgG 대조군으로 U2OS 세포를 처리하고, 전체 세포 단백질 추출물을 단리시키고, 포스포티로신 항체 상에서 모든 티로신 인산화된 단백질을 침전시켰다. 도 7B는 항-Ror2 항체 처리로 Ror2 키나제의 현저한 자가인산화 뿐만 아니라, 그의 기질인 14-3-3β 단백질의 인산화가 일어났음을 도시한다. 이러한 결과는 항-Ror2 항체가 Ror2 티로신 키나제 수용체를 이합체화시키고 활성화시킨다는 강력한 증거를 제공한다.

<224> 실시예 6

<225> Ror2 특이적 활성화 항체가 hMSC 무기질화를 촉진한다

<226> 본 발명자들은 이어서 Ror2의 항체 유도성 이합체화 및 활성화가 hMSC의 골발생 분화에 대한 기능적 결과를 야기하는지 여부에 관해 의문을 가졌다. 골발생 표현형으로 분화되지 않는다면 hMSC는 Ror2를 발현시키지 않기 때문에(4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard *et al*); [Billiard *et al*. Mol Endo 19, 90-101, 2005](이들 각각은 본원에서 참고로 인용된다)), 본 발명자들은 골발생 각테일(0.05 mM 아스코르브산, 10 mM  $\beta$ -글리세로포스페이트, 및 100 nM dex로 보충된 MSCGM)로 처리하여 Ror2 발현을 유도하고, Ror2 특이적 염소 IgG 또는 비특이적 염소 IgG는 양을 증가시키면서 가하였다. 9일 동안 인큐베이션시킨 후, 알리자린 레드-S 조직화학적 염색을 사용하여 무기질화된 기질 형성 정도를 평가하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, 항-Ror2 항체는 용량에 의존하는 방식으로 hMSC내 석회화된 기질 형성 정도를 증가시켰다. 비특이적 염소 IgG는 시험된 모든 농도에서 기질 무기질화에 어떤 영향도 미치지 않았는데, 단, 예외적으로, 100  $\mu$ g/ml의 최고 용량에서는 미세하게 억제시킨 것이 관찰되었다. 명확하게 하기 위해 오직 1개 용량의 비특이적 IgG(50  $\mu$ g/ml)만을 도 8에 나타낸다. 인간 Ror1(R&D Systems, AF2000)의 전체 세포의 도메인에 대하여 발생된 염소 다중 클론 항체 또한 어떤 효과도 나타내지 않았다(도 8). hMSC에서 Ror2 발현이 Ror2 특이적 shRNA에 의해 억제될 때, 항-Ror2 항체 효과가 소멸되기 때문에 항-Ror2 항체 효과는 Ror2 수용체를 통해 매개되었다(도 9A). 추가로, 아데노바이러스 감염을 통해 Ror2를 발현하도록 세포가 유도되었다면 dex의 부재하에서도 항-Ror2 항체는 석회화된 기질 형성을 유도하였다(도 9B). 따라서, Ror2 특이적 항체는 Ror2 수용체를 이합체화시키고 활성화시킬 수 있으며, 중간엽 줄기 세포에서 Ror2-매개 석회화된 기질 형성을 촉진할 수 있는데, 이는 Ror2 항체를 활성화시키는 것이 골다공증 및 기타 골 질환에 대한 효과적인 요법을 제공할 수 있다는 것을 제안한다.

<227> 실시예 7

<228> 14-3-3 $\beta$ 의 억제제가 hMSC 무기질화를 증진시킨다

<229> 14-3-3 $\beta$ 가 골발생 분화에서 중요한 역할을 하는지 여부를 시험하기 위하여 본 발명자들은 Ror2 과발현의 부재 및 존재하에 14-3-3 $\beta$  발현을 억제시켰다. 이를 위해, hMSC를 14-3-3 $\beta$  특이적 shRNA로 감염시켰는데, 이는 스크램블드 대조군 shRNA와 비교하였을 때, 실제로 내인성 단백질 발현을 강력하게 하향 조절시켰다(도 10A). 스크램블드 shRNA 및  $\beta$ -갈락토시다제를 함유하는 2개의 대조군 바이러스로 hMSC를 감염시켰을 때, 본 발명자들은 낮은 정도의 기질 무기질화를 관찰하였는데(도 10B), 이는 자기 스스로의 이중 감염이 hMSC 배양물에서 가벼운 골발생을 매개한다는 것을 제안한다. 앞서 관찰된 바와 같이(4월 14일 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 10/823,998(Billiard *et al*))(이는 본원에서 참고로 인용된다)), Ror2 아데노바이러스로 감염시킬 경우, 무기질화된 기질의 형성은 강력하게 촉진되었다. 놀랍게도, 14-3-3 $\beta$ 를 하향 조절하는 것이 무기질화 정도를 현저히 증가시켰다(도 10B). 종합해서, Ror2 과발현 및 14-3-3 $\beta$  억제는 어느 하나의 단독으로 수행되는 경우보다 더욱 더 강력한 기질 무기질화를 유도하였다(도 10B). 이는 14-3-3 $\beta$  스캐폴드 단백질이 hMSC의 골발생 분화에 대하여 억제 효과를 발휘한다는 것을 제안하는 첫번째 증거이다.

<230> 실시예 8

<231> 항체 유도 Ror2 활성화 및 14-3-3 $\beta$  억제가 생체의 두개골 배양물에서 새로운 골 형성을 촉진한다

<232> 본 발명자들은 이어서 Ror2 활성화 및 14-3-3 $\beta$  억제의 시험관내 효과가 생체의 기관 배양물내에서 증가된 골 형성으로 해석될 수 있는지 여부에 대하여 시험하였다.  $5 \times 10^7$ 개의 바이러스 입자/ml로 스크램블드 shRNA 또는 14-3-3 $\beta$  특이적 shRNA를 함유하는 아데노바이러스를 사용하여 4일된 마우스 한배 새끼의 두개골을 감염시켰다. 48h 후에 15 mg/ml 칼세인의 존재하에 12 mg/ml의 항-Ror2 항체 또는 비특이적 IgG로 처리하였다. 아데노바이러스 및 항체와 함께 7일 동안 배양한 후, 골을 헤마톡실린-에오신으로 염색하고, 일정한 300  $\mu$ m 범위(전두 봉합으로부터 450  $\mu$ m 떨어져 있는 부위)를 Bioquant-NOVA MR 5.50.8(테네시주 내슈빌 소재)을 사용하여 조직형태 계측학적으로 분석하였다. 스크램블드 shRNA 감염 및 IgG 처리라는 대조군 조건하에, 600  $\mu$ m 길이의 두개골은  $9394 \pm 1333 \mu\text{m}^2$ 의 골 면적 및  $39.5 \pm 7.4$ 개의 조골세포를 함유하였다. 특이적인 shRNA에 의한 14-3-3 $\beta$ 의 억제는 전체 골 면적을 60% 증가시켰고, 조골세포의 갯수를 50% 증가시켰는데, 이는 14-3-3 $\beta$  단백질이 조골세포 계수 및/또는 활성을 억제한다는 것을 시사한다(도 11). 두개골을 항-Ror2 항체로 처리한 결과, 조골세포 갯수는 85% 증가하였고, 총 골 면적은 50% 증가하였는데, 이는 Ror2 항체를 활성화시키는 것이 골다공증 및 다른 골 질환에 효과적인 요법을 제공할 수 있다는 것을 다시 한번 제안하는 것이다. 그러나, 14-3-3 $\beta$  shRNA 감염과 Ror2 항체 처리의 조합은 부가적인 효과를 가져오지 못했고, 어느 하나의 단독 처리와 비교하였을 때 심지어 미세하게는 더욱 작은 반응을 일으키게 하였다(도 11). 본 발명자들의 경험상 50-80% 증가한 것으로 관찰된 것은 본 분석

시스템에서 포화 상태로 도달하지 않은 것이기 때문에 Ror2 및 14-3-3 $\beta$ , 둘 모두가 조골세포 분화 및/또는 기능을 제어하는 동일 경로 상에 존재하는지 추측해 볼 만한 관심의 대상이 된다.

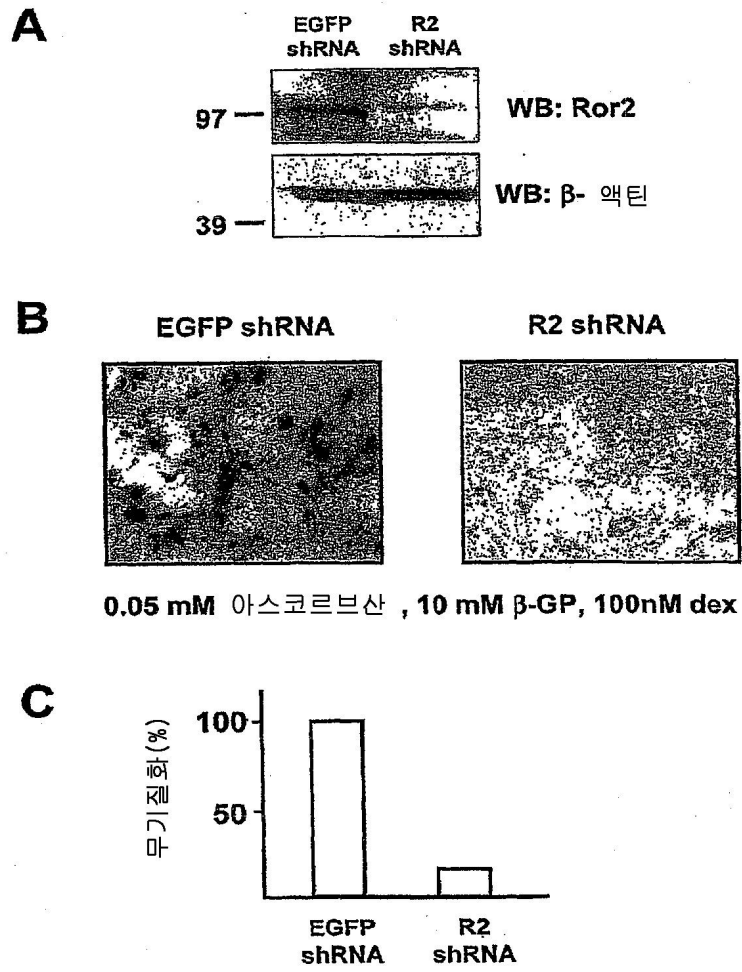
<233> 실시예 9

<234> Ror2 활성화에 대한 고처리량의 고감도 분석법 개발

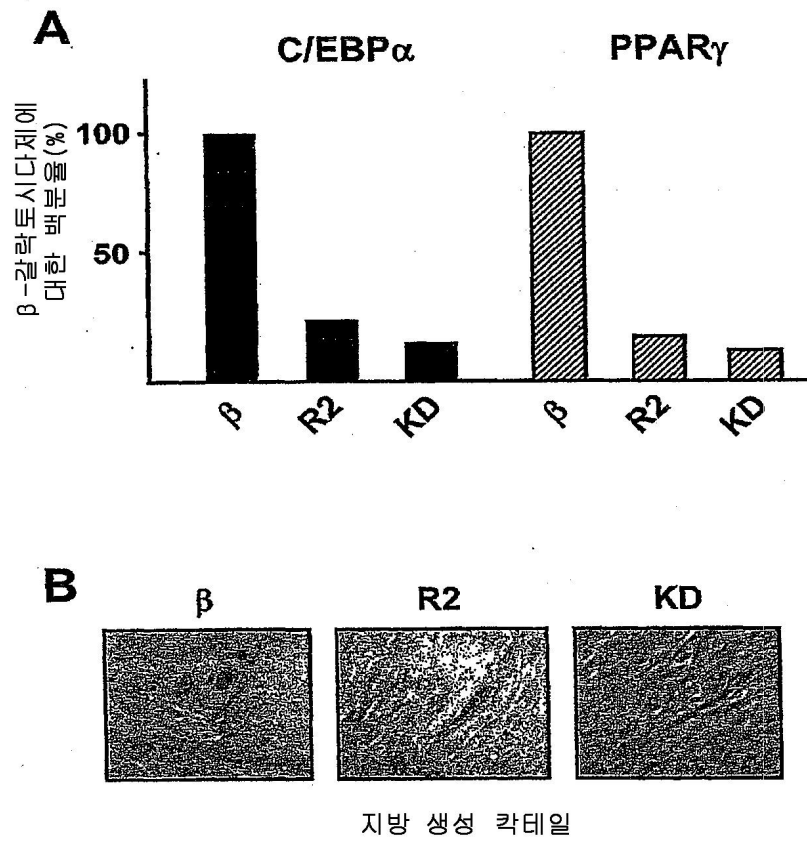
<235> 도 12A에 나타난 바와 같이, 분석법은 잘 특징화된 TrkB 수용체 신호 전달 경로를 사용한다. TrkB 수용체는 표적 유전자의 프로모터에서 Erk의 인산화 및 cAMP 반응 요소(CRE)의 자극을 유발하는 리간드 유도된 동형 이합체화에 의해 TrkB 수용체가 활성화된다. 본 발명자들은 막 관통 및 TrkB의 세포내 도메인(aa 432-822)에 융합된 Ror2의 세포외 도메인(aa 1-407)으로 구성된 키메라 수용체를 생성하였다. 이러한 키메라를 사용할 때, Ror2를 이합체화시키는 제제는 TrkB 신호 전달 경로를 활성화시켜 CRE 프로모터 활성을 증가시킬 것이라고 본 발명자들은 가정하였다. 이러한 가설을 시험하기 위하여 (Dr. Seongeun Cho)(뉴저지주 프린스턴에 소재하는 Wyeth Research)로부터 입수한, CRE-루시페라제 플라스미드(HEK-CRE)를 과발현하는 HEK293A 세포 내로 키메라 수용체를 안정적으로 형질감염시켰다. ECM 600 전기천공장치(캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 BTX)를 사용하여 pcDNA3.1(+)-하이그로 중 Ror2-TrkB 키메라를 HEK-CRE 세포 내로 전기천공시키고, 단리된 하이그로마이신 내성 세포 콜로니가 형성될 때까지 세포를 350 mg/ml 하이그로마이신과 함께 배양하였다. 콜로니를 트립신으로 처리하고, 96웰 플레이트 상의 각 웰당 하나씩 옮겨 놓았다. 콜로니를 350 mg/ml 하이그로마이신과 함께 37°C에서 배양하고, Ror2-TrkB 발현 수준을 웨스턴 면역블롯팅 및 면역세포화학법에 의해 평가하였다. 앞서 Ror2를 이합체화시키는 것으로 나타난(실시예 5 참조) 항-Ror2 항체로 Ror2-TrkB 키메라를 발현하는 HEK-CRE 세포를 처리하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, 비특이적 IgG로 처리된 세포와 비교할 때, Ror2 특이적 항체는 관찰된 루시페라제 활성을 강력하게 용량에 의존하는 방식으로 증가시켰다. 따라서, 본 발명자들은 Ror2 이합체화 및 활성화를 유도할 수 있는 제제(소분자, 펩티드, 단백질, 또는 항체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다)의 능력을 측정하는 것으로서, 신속한 고처리량의 고감도 분석법을 개발하게 되었다.

도면

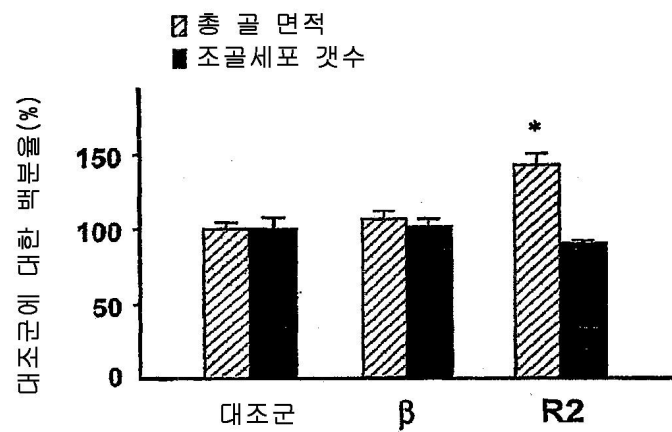
도면1



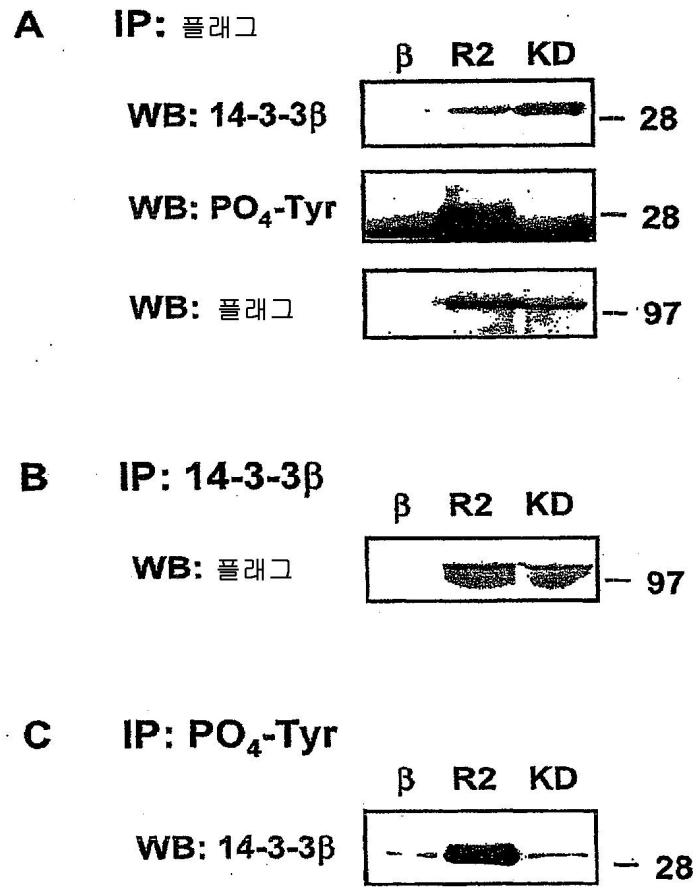
도면2



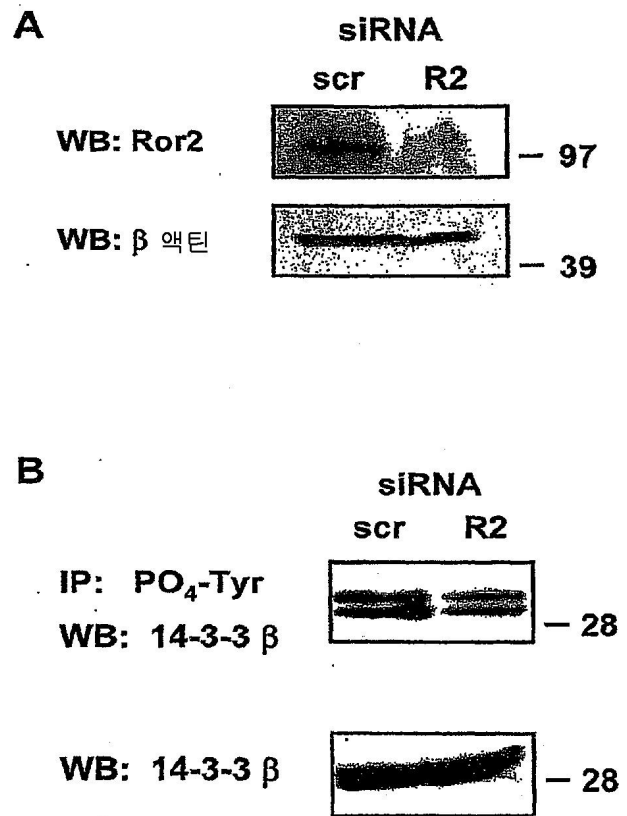
도면3



도면4



도면5

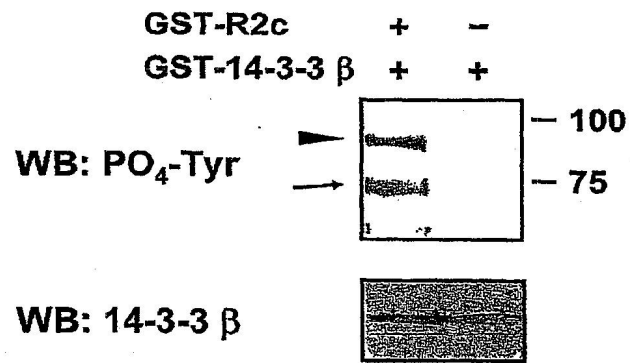


도면6

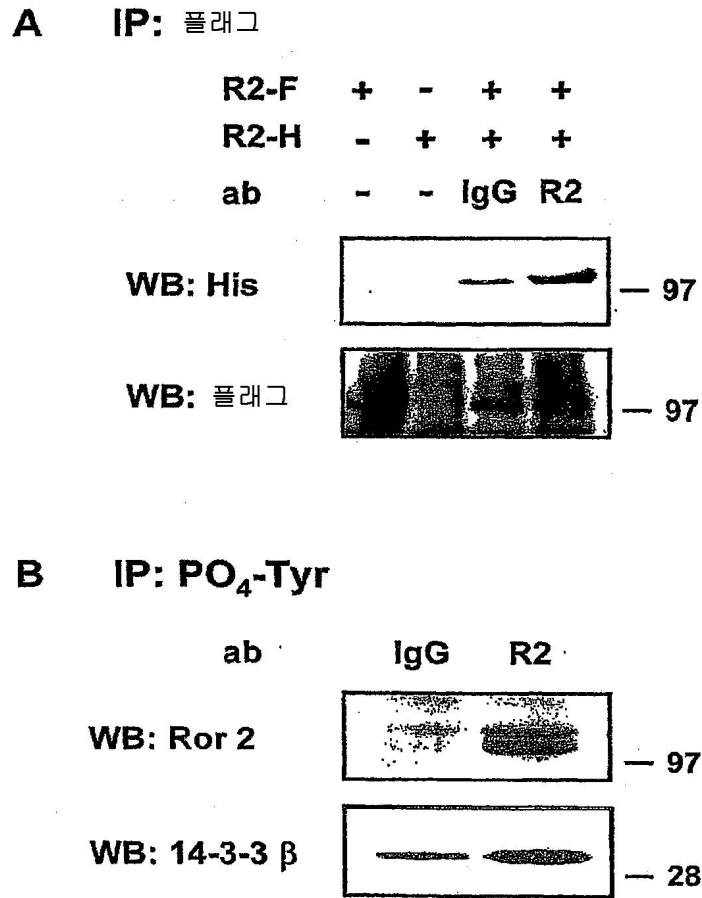
**A** GST 플-다운



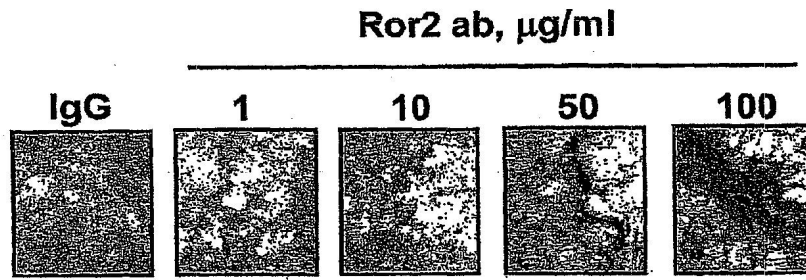
**B** 시험관내 키나제 분석법



도면7



도면8



0.05 mM 아스코르브산, 10 mM  $\beta$ -GP, 100nM dex

**Ror1 ab**  
50  $\mu\text{g/ml}$

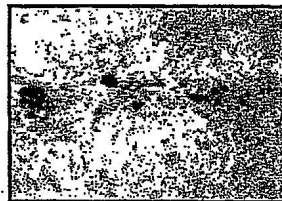


도면9

**A**

**EGFP shRNA**

**Ror2 shRNA**

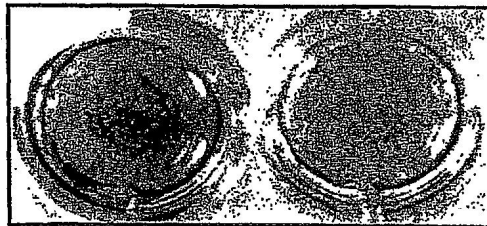


0.05 mM 아스코르브산, 10 mM  $\beta$ -GP, 100nM dex, Ror2 ab

**B**

**Ror2 ab**

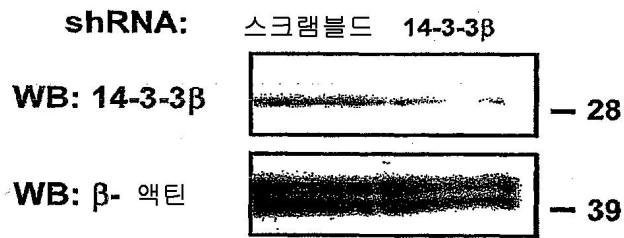
**IgG**



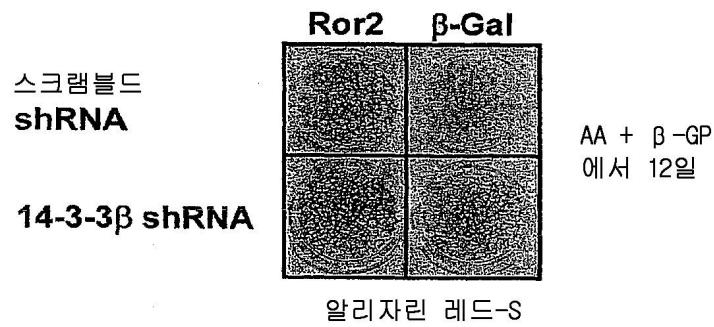
0.05 mM 아스코르브산, 10 mM  $\beta$ -GP

도면10

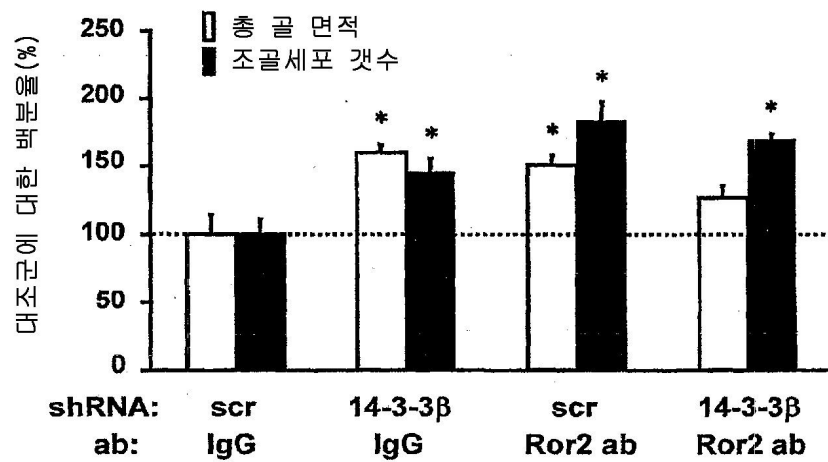
**A**



**B**

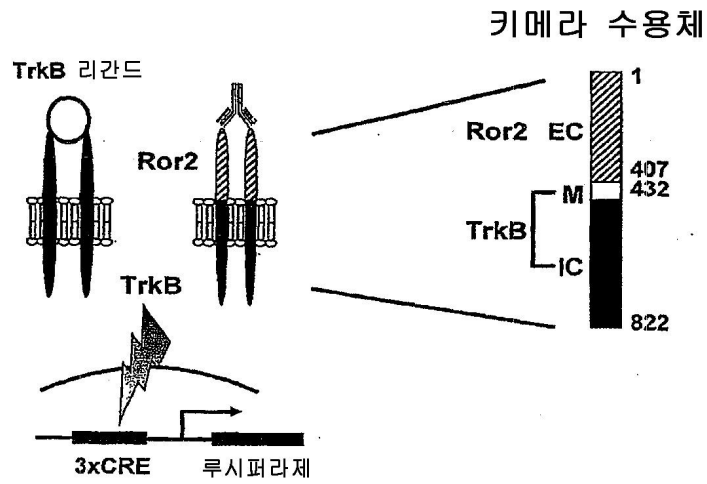


도면11

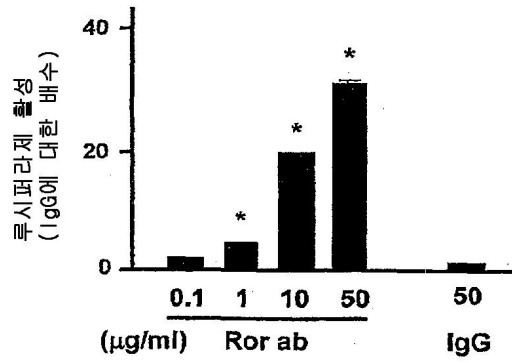


도면12

**A**



**B**



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> Modulation of Bone Formation

<130> AM102248

<140> PCT/US2007/004510

<141> 2007-02-16

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 18

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Forward primer for human cyclophilin B

<400> 1  
 caccaacggc tcccagtt 18

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Reverse primer for human cyclophilin B

<400> 2  
 aacaccacat gcttgccatc t 21

<210> 3  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Probe for human cyclophilin B

<400> 3  
 ttcatcacga cagtcaagac agcctgg 27

<210> 4  
 <211> 798  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Ror2/Trk B chimeric receptor

<400> 4

Met Ala Arg Gly Ser Ala Leu Pro Arg Arg Pro Leu Leu Cys Ile Pro

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





Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His  
 595 600 605

Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu  
 610 615 620

Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met  
 625 630 635 640

Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg  
 645 650 655

Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly  
 660 665 670

Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His  
 675 680 685

Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg  
 690 695 700

Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp  
 705 710 715 720

Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn  
 725 730 735

Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg  
 740 745 750

Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg  
 755 760 765

Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln  
 770 775 780

