

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020 년 12 월 10 일 (10.12.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2020/246760 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/007086

(22) 국제출원일:

2020 년 6 월 1 일 (01.06.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0066154 2019 년 6 월 4 일 (04.06.2019) KR

10-2020-0064933 2020 년 5 월 29 일 (29.05.2020) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (Ewha University - Industry Collaboration Foundation) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52(대현동, 이화여자대학교), Seoul (KR).

(72) 발명자: 이수영 (LEE, Soo Young); 06305 서울시 강남구 언주로 105, 200동 308호(개포동, 현대2차아파트), Seoul

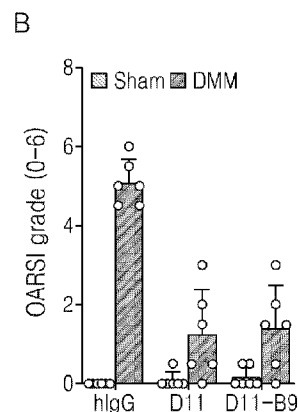
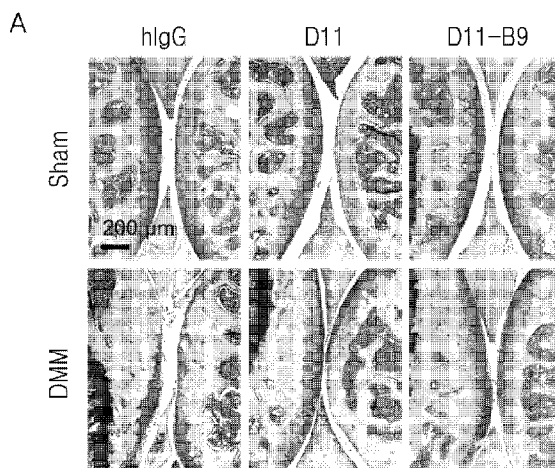
(KR). 심현보 (SHIM, Hyunbo); 06005 서울시 강남구 압구정로29길 23, 210동 702호(압구정동, 현대아파트), Seoul (KR). 박두리 (PARK, Du-ri); 03504 서울시 은평구 수색로 217, 102동 901호(수색동, 디앰씨 자이1단지), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 엠에이피에스 (MAPS INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06239 서울시 강남구 테헤란로8길 37, 8층 (역삼동, 한동빌딩), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: ANTI-OSCAR ANTIBODY FOR PREVENTING OR TREATING OSTEOARTHRITIS

(54) 발명의 명칭: 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 항-OSCAR 항체



(57) Abstract: The present application relates to a composition for preventing or treating osteoarthritis, comprising an osteoclast-associated Ig-like receptor (OSCAR) protein inhibitor, a polynucleotide encoding an anti-OSCAR antibody or fragments thereof, and an OSCAR protein inhibitor screening method. According to embodiments of the present application, the anti-osteoclast-associated Ig-like receptor (OSCAR) antibody or fragments thereof of the present application can prevent or treat osteoarthritis through a mechanism for inhibiting the OSCAR-collagen interaction in chondrocytes, and by using the OSCAR protein inhibitor screening method of the present application, an OSCAR protein inhibitor having an excellent effect of inhibiting the OSCAR-collagen interaction can be screened.

(57) 요약서: 본원은, 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질 저해제를 포함하는 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물, 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본원의 구현예들에 따르면, 본원의 항-오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 항체 또는 이의 단편은 연골세포에서 오스카-콜라겐 상호결합을 억제하는 기전을 통해 퇴행성관절염을 예방 또는 치료할 수 있으며, 본원의 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법을 이용하여 우수한 오스카-콜라겐 상호결합 억제 효과를 갖는 오스카 단백질 저해제를 스크리닝 할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 항-OSCAR 항체 기술분야

- [1] 본원은, 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질 저해제를 포함하는 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물, 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 관절연골의 손상 및 퇴행에 의해 국소적 염증 및 통증을 수반하는 퇴행성관절염 (osteoarthritis; OA)은 노년층 삶의 질과 정상적 사회활동을 저하시키는 주요 질환으로서 보통 남자보다 여자에서 발병율이 높으며, 60세 이상 인구의 30%에서 발병된다. 환자의 수는 노령 인구의 증가에 따라 크게 증가하는 추세에 있으며 LEK 보고서에 따르면 2014~2028년 미국 내 퇴행성관절염 환자의 발생도는 매년 2.8%의 증가세를 보일 것으로 예상하고 있다. 최근에는 외상 스트레스나 여성의 경우 높은 굽 등으로 인한 젊은 연령층에서도 늘어나는 추세이다.
- [3] 퇴행성관절염의 기존 치료법은 정확한 치료제가 없으며 현재까지 비약물적인 치료가 약물적인 치료보다 큰 비중을 이루고 있다. 약물로는 염증과 통증 등의 증상을 완화시키는 NSAID 계열의 진통소염제나 스테로이드 제제, 글루코사민 등이 있고 관절내 주사로 윤활작용을 통해 관절을 보호하는 히알루론산 등의 치료법이 주를 이루고 있다.
- [4] 퇴행성관절염 증세가 심한 경우 비약물적 치료인 인공관절대체술 같은 수술요법을 시행하나 재합기간이 필요하고 대체관절의 수명이 제한적 (10년 이내)이며 비용 및 치환물의 부식에 의한 염증, 2차 감염등의 부작용의 이유로 임상적 측면에서 가능한 수술을 최대한 지연시키는 치료법이 요구되고 있으며, 기존 치료법의 효능 및 부작용을 고려할 때, 안전하고 관절마모 방어에 효과적인 새로운 치료제의 개발이 필요한 실정이다.
- [5] 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR)는 백혈구(leukocyte) 수용체 복합체에 속하는 2개의 면역글로블린 (immunoglobulin; Ig) 도메인을 가지는 세포 표면 수용체이다. 처음 발견 시, 파골세포 특이적 발현을 통해 파골세포의 분화를 조절하는 기능이 보고되었다(J Exp Med. 2002, 21;195(2):201-9.). 오스카 수용체는 리간드를 인식하는 두 개의 Ig 도메인을 가지나, 세포 내 신호전달을 매개하는 세포질내 꼬리 영역 (cytoplasmic tail domain)이 결여되어 있다. 이러한 수용체들은 ITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)을 가지는 또 다른 수용체와 결합하여 신호전달을 매개한다. 오스카와 결합하여 세포 내로 신호전달을 매개하는 수용체로는

FcR γ 가 확인되었다.

- [6] 파골세포의 분화는 파골세포와 조골세포의 상호작용을 통해서 조절된다. 이 과정 중에 조골세포는 세포 외부에 콜라겐을 분비하고, 분비된 콜라겐이 오스카의 리간드로 기능함이 보고된 바 있다. 최근, 오스카 수용체에 의해서 콜라겐을 인지하여 결합하는 분자 기전이 X-선 회절분석에 의한 구조로 해석되었다. 또한, 단핵구(monocytes) 세포에서 오스카와 콜라겐의 결합에 의해서 염증성 사이토카인 분비가 촉진된다는 결과로부터 오스카 단백질이 류마티스성 관절염에 기여할 가능성이 제시된 바 있다.

- [7] 현재까지, 오스카 단백질에 의해 유발되는 직접적인 질병으로 보고된 것은 없다. 또한, 오스카와 콜라겐의 결합을 저해하는 방법이나 오스카 단백질-콜라겐 결합을 저해하는 물질의 탐색시스템이 알려진 바도 없다. 콜라겐과 오스카의 상호 결합을 저해하는 활성을 가지는 물질 (항체, 저분자화합물 등)은 오스카의 기능(활성)을 억제할 것으로 기대할 수 있다. 따라서, 이러한 물질은 콜라겐-오스카 결합에 의해 유발되는 질병의 억제물질로 활용 가능성이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본원은, 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질 저해제를 포함하는 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물, 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [9] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 본원의 제 1 측면은, 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질 저해제를 포함하는, 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [11] 본원의 제 2 측면은, 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질에 결합하는 분리된 항체 또는 이의 단편을 제공한다.
- [12] 본원 제 3 측면은, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [13] 본원 제 4 측면은, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [14] 본원 제 5 측면은, 상기 발현벡터를 포함하는 인간을 제외한 형질전환체를 제공한다.
- [15] 본원 제 6 측면은, 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 항-오스카 항체 또는 이의 단편의 제조방법을 제공한다.
- [16] 본원 제 7 측면은, (a) 분리된 연골세포를 배양하고, 상기 배양된 연골세포에

오스카 단백질 저해제 후보물질을 처리하는 것; (b) 상기 배양된 연골세포에 콜라겐을 처리하는 것; 및 (c) 상기 연골세포에서의 퇴행성관절염 마커의 발현수준을 측정하는 것을 포함하는, 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법을 제공한다.

[17] 본원의 제8측면은, 본원의 퇴행성관절염 치료 또는 예방용 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 퇴행성관절염 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[18] 본원의 제 9 측면은, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편을 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 골 관련 질환은 골다공증 또는 골감소증인 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[19] 본원의 구현예들에 따르면, 본원의 항-오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 항체 또는 이의 단편은 연골세포에서 오스카-콜라겐 상호결합을 억제하는 기전을 통해 퇴행성관절염을 예방 또는 치료할 수 있으며, 본원의 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법을 이용하여 우수한 오스카-콜라겐 상호결합 억제 효과를 갖는 오스카 단백질 저해제를 스크리닝 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은, 항체 라이브러리의 패닝으로부터 발굴한 신규한 7종의 scFv의 인간 및 마우스 OSCAR에 대한 결합력을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[21] 도 2는, 항체 라이브러리의 패닝으로부터 개발한 신규한 7종의 scFv를 hIgG1 항체로 전환한 후 해당 항체들의 OSCAR-콜라겐 상호작용 저해 능력을 측정 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[22] 도 3은, 마우스 유래 연골세포를 이용한 신규한 항-OSCAR 항체 스크리닝 방법으로 항-OSCAR 항체 선별 및 길항적 효능 결과를 나타낸 도면이다.

[23] 도 4는, 인간 유래 연골세포를 이용한 신규한 항-OSCAR 항체 스크리닝 방법으로 항-OSCAR 항체 선별 및 길항적 효능 결과를 나타낸 도면이다.

[24] 도 5는, 퇴행성관절염 질병 모델에서 항-OSCAR 항체의 조직학적 효능 분석 결과를 나타낸 도면이다.

[25] 도 6은, 퇴행성관절염 질병 모델에서 항-OSCAR 항체의 정량적 효능 분석 결과를 나타낸 도면이다.

[26] 도 7의 A는 D11 클론의 CDR-H3 무작위화 및 focused library를 제작하는 과정을 나타내는 도면이고, B는 D11-H3-1~6 라이브러리의 패닝 결과를 나타낸 도면이다.

[27] 도 8은 D11의 친화도 성숙 과정을 거친 클론들의 IgG 정제 및 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.

[28] 도 9는 D11의 친화도 성숙 과정으로부터 도출된 7종의 클론들의 연속 희석 ELISA 및 4-모수 로지스틱 곡선 적합치 결과를 나타낸 도면이다.

- [29] 도 10은 D11 항체 및 친화도가 개선된 D11-B9 항체의 옥텟(Octet) 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- [30] 도 11은 D11 항체 및 D11-B9 항체의 퇴행성관절염 동물모델에서의 효능을 조직학적 분석(A) 및 정량적 분석(B)으로 나타낸 도면이다.
- [31] 도 12는 D11 항체 및 D11-B9 항체 처리에 따른 퇴행성관절염 동물모델에서의 연골하골 두께를 조직학적 분석(A), 정량적 분석(B) 및 HC/CC 분포에 대한 정량적 분석(C)을 나타낸 도면이다.
- [32] 도 13은 D11 항체 및 D11-B9 항체 처리에 따른 퇴행성관절염 동물모델에서의 OSCAR 단백질 신호전달 저해 효능의 조직학적 분석(A) 및 정량적 분석(B 및 C)을 나타낸 도면이다.
- [33] 도 14는 D11 항체 및 D11-B9 항체 처리에 따른 퇴행성관절염 동물모델에서의 연골세포 사멸 억제 효능의 조직학적 분석(A) 및 정량적 분석(B)을 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [34] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질"은 백혈구(leukocyte) 수용체 복합체에 속하는 2개의 면역글로블린 (immunoglobulin; Ig) 도메인을 가지는 세포 표면 수용체로서, 오스카 단백질은 콜라겐과 결합할 수 있으며, 상기 결합에 의해 질병이 유발될 수 있다고 알려져 있다. 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 오스카 단백질 또는 이의 단편은 인간 또는 마우스로부터 유래된 것일 수 있다. 상기 인간 또는 마우스 유래 오스카 단백질의 아미노산 서열, 이를 암호화하는 염기서열 등의 유전적 정보는 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 미국 국립생물정보센터 (National Center for Biotechnology Information; NCBI)의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "오스카 단백질-콜라겐 상호작용 저해제"는 오스카 단백질과 콜라겐의 상호작용 또는 결합을 저해하는 효과를 가지는 모든 물질을 의미하며, 구체적으로 오스카 단백질의 콜라겐 인식 부위에 결합하여 오스카 단백질과 콜라겐의 결합을 저해하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [36] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "콜라겐(collagen)"은 단백질의 일종으로서 결합 조직의 주성분이며, 뼈와 피부에 주로 있지만, 관절, 각 장기의 막, 머리카락 등 우리 몸 전체에 분포되어 있는 성분으로서, 총 28종류의 콜라겐이 알려져 있으며, 오스카 단백질과 상호결합 할 수 있다면, 어떠한 종류의 콜라겐이라도 제한되지 않는다.
- [37] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "항체"는 IgA, IgE, IgM, IgD, IgY, IgNAR, heavy chain antibody 및 IgG로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역글로블린으로, 목표 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 항체는 경쇄(light chain)와

중쇄(heavy chain) 각각 2개씩 모여 이루어지며, 각각의 사슬은 아미노산 서열이 가변적인 가변영역(variable domain)과 일정한 서열을 가지는 고정영역(constant domain)으로 이루어져 있다. 상기 항체는 가변영역의 3차원구조 말단에 항원이 결합하는 부위가 위치하며, 이 부위는 경쇄와 중쇄에 각각 3개씩 존재하는 상보성결정부위 (complementarity determining region)들이 모여서 형성된다. 상기 상보성결정부위는 가변영역 중에서도 아미노산 서열의 가변성이 특히 높은 부분이며, 이러한 높은 가변성에 의해 다양한 항원에 대해 특이적 항체가 찾아질 수 있다. 본원의 범위에는 완전한 항체 형태뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.

- [38] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “항체 단편”은 항체의 임의의 일부분을 의미하는 것으로서, scFv, dsFv, Fab, Fab', F(ab')₂, sdAb 및 나노바디(nanobody) 등 및 이들의 조합이 항체 단편에 해당될 수 있으며, 상기 항체 단편은 항원인식 부위를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중디설파이드 Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고, 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다. 또한, 상기 sdAb 및 나노바디는 단일 가변 도메인 항체단편으로, 예를 들어 자연적으로 발생하는 단일 가변 도메인(VH)과 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 포함하는 중쇄(heavy chain) 항체 중 그 가변 도메인을 단백질 가수분해 혹은 유전자 재조합 기술을 통하여 제작한 항체단편 및 항체 경쇄 혹은 중쇄 가변 도메인을 인공적으로 변형하여 제작한 단일 도메인 항체단편을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [39] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “항원인식 부분”은 항체의 항원-결합 활성을 보유하는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 지칭하는 것으로서, “항원 결합 단편” 및 “펩타이드의 결합 단편” 등과 호환적으로 사용된다.

- [40] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “항체 Fc 영역”은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변 영역, 중쇄 불변영역 1(CH₁)과 경쇄 불변영역(CL₁)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH₂) 및 중쇄 불변영역 3(CH₃)부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 상기 항체 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는

생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분을 제거함으로써 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다. 상기 항체의 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [41] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [42] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [43] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [44] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현에 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현에 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [45] 본원의 제 1 측면은, 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질 저해제를 포함하는, 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [46] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 오스카 단백질 저해제는 오스카 단백질의 발현수준 또는 활성을 저해 또는 억제하는 물질로서, 오스카 단백질의 활성 부위 또는 결합 부위를 불활성화시키는 것일 수 있으며, 구체적으로 오스카 단백질의 콜라겐 결합 부위를 불활성화시켜 오스카 단백질과 콜라겐의 결합 및 상호작용을 저해 또는 억제하는 것일 수 있다.
- [47] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 오스카 단백질 저해제는 오스카 단백질-콜라겐 상호작용을 저해하는 것일 수 있다.
- [48] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물은 오스카 단백질-콜라겐 상호작용 저해제를 포함하는 것일 수 있다.
- [49] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 오스카 단백질-콜라겐 상호작용 저해제는 오스카 단백질과 콜라겐 결합을 저해하는 항-오스카 항체, 항-오스카 항체 단편, 단백질, 올리고펩타이드, 소형 유기분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드, 화합물 또는 이들의 조합일 수 있으며, 상기 저해제는 천연 물질뿐만 아니라 합성

물질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [50] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 오스카 단백질-콜라겐 상호작용 저해제는 항-오스카 항체 또는 이의 단편일 수 있다.
- [51] 본원의 일 구현예에 따른 항-오스카 항체 또는 이의 단편은, 오스카 단백질의 일부 영역에 결합하는 것일 수 있고, 구체적으로 오스카 단백질에서 콜라겐에 결합하는 부위에 결합하여 오스카 단백질과 콜라겐의 결합을 저해하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 오스카 단백질 저해제는 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것일 수 있다.
- [53] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 오스카 단백질 저해제는 연골세포에서 발현되는 오스카 단백질의 활성을 저해하는 것일 수 있다.
- [54] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 항-오스카 항체 또는 이의 단편은 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 것으로서, 1) 서열번호 6으로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 7로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 항-오스카 항체 또는 이의 단편; 2) 서열번호 14로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 15로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 항-오스카 항체 또는 이의 단편; 및 3) 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 23으로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 항-오스카 항체 또는 이의 단편으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.
- [55] 본원의 일 실시예에 있어서, 본원의 항-오스카 항체 B4는 서열번호 6으로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 7로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 것이고, 항-오스카 항체 D11은 서열번호 14로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 15로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 것으로서, 상기 항체들은 인간 및 마우스의 오스카 단백질에 결합하여 오스카 단백질과 콜라겐의 상호 결합을 저해할 수 있음을 확인하였다(도 2). 또한, 상기 항체들을 처리한 경우 퇴행성관절염 마커의 발현수준이 감소되고(도 4), 퇴행성관절염 동물 모델에서 증상이 완화되는 것을 확인하였는 바(도 5), 본원의 항-오스카 항체 B4 및 D11은 퇴행성관절염 치료제로서 이용할 수 있음을 알 수 있다.
- [56] 또한, 상기 항-오스카 항체 D11을 개량하여, 중쇄 가변영역의 페닐알라닌-트레오닌-글라이신(FTG)를 이소류신-프롤린(IP)로 변형시킨 D11-B9항체의 경우(서열번호 6의 아미노산 서열에서 100번째, 101번째 및 102번째 아미노산인 페닐알라닌-트레오닌-글라이신을 이소류신-프롤린으로 치환), D11보다 우수한 효과가 있음을 확인하였다(도 10 내지 14). 상기 항-오스카 항체 D11-B9은 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 23으로 구성된 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [57] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 항-오스카 항체는 IgG 항체일 수 있으며, 1) 서열번호 8로 구성된 중쇄 및 서열번호 9로 구성된 경쇄를 포함하는 항체(B4); 2) 서열번호 16으로 구성된 중쇄 및 서열번호 17로 구성된 경쇄를 포함하는

- 항체(D11); 및 3) 서열번호 24로 구성된 중쇄 및 서열번호 25로 구성된 경쇄를 포함하는 항체(D11-B9)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.
- [58] 본원의 일 구현예에 따른 펩타이드들은 각각의 펩타이드들과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 한, 기재된 서열번호뿐만 아니라, 상기 아미노산 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 상동성을 나타내는 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [59] 상기 서열과 상동성을 가지는 서열로서 실질적으로 기재된 서열번호의 펩타이드와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가지는 경우도 역시 본 출원의 범주에 포함됨은 자명하다.
- [60] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "상동성"은 주어진 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건(stringent condition)하에서 켜는 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법[예컨대, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York]으로 결정될 수 있다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오타이드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 예를 들어, 이러한 조건은 문헌[예컨대, J. Sambrook et al., 상동]에 구체적으로 기재되어 있다.
- [61] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "퇴행성관절염(degenerative arthritis)"은 관절을 보호하고 있는 연골의 손상이나 퇴행성 변화로 인해 관절을 이루는 뼈와 인대 등에 손상이 생겨 염증과 통증이 발생하는 질환으로서, 골관절염(osteoarthritis)이라고도 불린다. 일차성(특발성) 퇴행성 관절염의 확실한 원인은 밝혀져 있지 않으나 나이, 성별, 유전적 요소, 비만, 특정 관절 부위 등이 영향을 주는 것으로 생각되고 있으며, 이차성(속발성) 퇴행성 관절염은 관절 연골에 손상을 줄 수 있는 외상, 질병 및 기형이 원인이 될 수 있다. 가장 흔하고 초기에 호소하는 증상은 관절염이 발생한 관절 부위의 국소적인 통증이며 대개 전신적인 증상은 없는 것이 류마티스 관절염과의 차이점 중 하나이다. 퇴행성관절염은 관절 연골의 퇴행성 변화에 의해 발생되므로 이를 완전히 정지시킬 수 있는 확실한 방법은 아직까지 알려진 바

없으며, 본 질환의 치료 목적도 환자로 하여금 질병의 성질을 이해하도록 하여 정신적인 안정을 마련해 주면서, 통증을 경감시켜 주고, 관절의 기능을 유지시키며, 변형을 방지하는데 있다. 그러나 변형이 이미 발생한 경우에는 이를 수술적으로 교정하고 재활 치료를 시행하여 관절의 손상이 빨리 진행되는 것을 예방하고, 환자가 동통을 느끼지 않는 운동 범위를 증가시킴으로써 환자의 일상 생활에 도움을 주는데 목적이 있다.

[62] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "치료"는, 본원의 조성물의 투여에 의해 퇴행성관절염 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[63] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "예방"은, 본원의 조성물의 투여에 의해 퇴행성관절염 질환 또는 질환의 발병 가능성이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미한다.

[64] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본원의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 계면활성제를 포함할 수 있다. 이러한 계면활성제는 스테로이드에서 유도된 것이거나 N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTMA) 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트, 포스파티딜 글리세롤 등의 각종 화합물 등이 있다.

[65] 본원의 제 2 측면은, 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질에 결합하는 분리된 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 본원의 제1측면과 중복되는 내용은 본원의 제2측면의 분리된 항체 또는 이의 단편에도 공히 적용된다.

[66] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편은 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 것으로서, 1) 서열번호 6으로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 7로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편 (B4); 2) 서열번호 14로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 15로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편 (D11); 및 3) 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 23으로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편 (D11-B9)로 구성된 군에서 선택된 하나

이상인 것일 수 있다.

- [67] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역은 상기 서열번호 14로 구성된 중쇄 가변영역의 100번째, 101번째 및 102번째 아미노산인 페닐알라닌-트레오닌-글라이신이 이소류신-프롤린으로 치환된 것일 수 있다.
- [68] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 항-오스카 항체는 IgG 항체일 수 있으며, 1) 서열번호 8로 구성된 중쇄 및 서열번호 9로 구성된 경쇄를 포함하는 항체; 2) 서열번호 16으로 구성된 중쇄 및 서열번호 17로 구성된 경쇄를 포함하는 항체; 및 3) 서열번호 24로 구성된 중쇄 및 서열번호 25로 구성된 경쇄를 포함하는 항체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.
- [69] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 24로 구성된 중쇄는 상기 서열번호 16으로 구성된 중쇄의 100번째, 101번째 및 102번째 아미노산인 페닐알라닌-트레오닌-글라이신이 이소류신-프롤린으로 치환된 것일 수 있다.
- [70] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편은 오스카 단백질 또는 이의 단편에 결합하여, 오스카 단백질과 콜라겐의 결합을 저해함으로써, 오스카 단백질-콜라겐 상호작용, 이에 따른 신호전달 및 이의 효과를 저해하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 분리된 항체 또는 이의 단편은 오스카 단백질 또는 이의 단편의 콜라겐 인식 또는 결합 부위에 결합하는 것일 수 있다.
- [71] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편은 퇴행성관절염을 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 이용될 수 있다.
- [72] 본원의 제 3 측면은, 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본원의 제1측면 내지 제2측면과 중복되는 내용은 본원의 제3측면의 폴리뉴클레오타이드에도 공히 적용된다.
- [73] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “폴리뉴클레오타이드”란, 뉴클레오타이드가 결합한 고분자 물질로서, 유전 정보를 코딩하고 있는 DNA를 의미한다.
- [74] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 1) 서열번호 6으로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 7로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편; 2) 서열번호 14로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 15로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편; 및 3) 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 23으로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [75] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 1) 서열번호 10 및 서열번호 11을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; 2) 서열번호 18 및 서열번호 19를 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; 및 3) 서열번호 26 및 서열번호 27을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는

- 폴리뉴클레오타이드로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.
- [76] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 1) 서열번호 8로 구성된 중쇄 및 서열번호 9로 구성된 경쇄를 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편; 2) 서열번호 16으로 구성된 중쇄 및 서열번호 17로 구성된 경쇄를 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편; 및 3) 서열번호 24로 구성된 중쇄 및 서열번호 25로 구성된 경쇄를 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [77] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드는 1) 서열번호 12 및 서열번호 13을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; 2) 서열번호 20 및 서열번호 21을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드; 및 3) 서열번호 28 및 서열번호 29를 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.
- [78] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 염기서열은 각 서열번호로 기재한 아미노산을 코딩하는 염기서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 상기 각 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 단백질을 코딩하는 염기서열이라면 제한 없이 포함한다. 또한 상기 서열과 상동성을 가지는 서열로서 실질적으로 기재된 서열번호의 결합체 단백질과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가지는 경우도 역시 본 발명의 범주에 포함됨은 자명하다.
- [79] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편은 상기 각각의 단백질과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 가지는 한, 기재된 서열번호의 아미노산 서열 또는 상기 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 단백질들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 상기 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 따라서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 각 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열이면 제한 없이 포함될 수 있다. 또한, 공지의 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 상기 분리된 항체 또는 이의 단편의 활성을 가지는 단백질을 암호화하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

- [80] 본원 명세서에서 사용되는 용어 “엄격한 조건”이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (예컨대, Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성이 높은 유전자끼리, 40% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1XSSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68°C, 0.1XSSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [81] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치 (mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 폴리뉴클레오티드가 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, “상보적”은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 폴리뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 폴리뉴클레오티드 단편을 포함할 수 있다.
- [82] 구체적으로, 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 °C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60 °C, 63 °C 또는 65 °C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., *supra*, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [83] 본원의 제 4 측면은, 본원의 제 3 측면에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다. 본원의 제1측면 내지 제3측면과 중복되는 내용은 본원의 제4측면의 발현벡터에도 공히 적용된다.
- [84] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “발현벡터”는, 적당한 숙주세포에 도입되어 목적 단백질을 발현할 수 있는 제조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [85] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “작동가능하게 연결된(operably linked)”는, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 제조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 제조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다.
- [86] 본원의 적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화

시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 면역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있고, 원핵 세포의 경우에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터, 진핵세포의 경우에는 원숭이 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들어 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 폴로니 바이러스, 시토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 로우스 사코마 바이러스(RSV) 프로모터뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터 등이 있지만, 이에 제한되지 않는다.

- [87] 또한, 상기 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다. 또한, 벡터가 복제가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다.
- [88] 외래 유전자를 삽입하기 위한 재조합 발현 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 제한되지 않지만, 구체적으로 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 이용될 수 있다.
- [89] 본원의 따른 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 발현시키기 위하여, 다양한 숙주와 벡터의 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 이에 제한되지 않지만, SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adenoassociated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열 등이 포함될 수 있다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터로는 이에 제한되지 않지만, pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC 벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 또는 이들의 유도체 등을 포함하는 대장균(*Escherichia coli*)에서 얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ gt10, λ gt11 또는 NM989 등의 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지 등이 포함될 수 있다. 효모 세포에는 2°C 플라스미드 또는 그의 유도체 등이 사용될 수 있으며, 곤충 세포에는 pVL941 등이 사용될 수 있다.

- [90] 본원의 제 5측면은, 본원의 제4 측면에 따른 발현벡터를 포함하는 인간을 제외한 형질전환체를 제공한다. 본원의 제1측면 내지 제4측면과 중복되는 내용은 본원의 제5측면의 형질전환체에도 공히 적용된다.
- [91] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "형질전환체"는, 상기 발현 벡터가 도입될 수 있는 숙주의 세포일 수 있다. 구체적으로, 본원의 형질전환체는 인간을 제외한 형질전환체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [92] 상기 벡터의 도입에 적합한 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 또는 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등 진핵 세포, 식물 또는 곤충의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포일 수 있다. 또한, 포유동물의 세포일 수 있으며, 구체적으로 원숭이 신장 세포 7(COS7: monkey kidney cells) 세포, NSO 세포, SP2/0, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO: chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 또는 HEK293 세포 등을 이용할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [93] 본원의 형질전환 방법은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함하며, 당 분야에서 공지된 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 전기충격유전자전달법 (electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.
- [94] 본원의 제 6측면은, 본원의 제5 측면에 따른 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 항-오스카 항체 또는 이의 단편의 제조방법을 제공한다. 본원의 제1측면 내지 제5측면과 중복되는 내용은 본원의 제6측면의 제조방법에도 공히 적용된다.
- [95] 상기 항-오스카 항체 또는 이의 단편의 제조방법은 본원의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하며, 구체적으로 상기 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 벡터에 삽입하여 발현벡터를 제조하는 단계; 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 배양된 형질전환체로부터 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 분리 및 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [96] 더욱 구체적으로, 상기 형질전환체를 영양배지에서 배양함으로써 결합체를 대량으로 생산할 수 있으며, 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을

적당히 선택 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다.

- [97] 상기와 같이 재조합적으로 생산된 펩타이드 또는 단백질은 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있다. 막 결합형인 경우, 적합한 계면활성제 용액(예, 트리톤-X 100)을 사용하거나 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 유리될 수 있다. 항-오스카 항체 또는 이의 단편 발현에 사용된 세포는 동결-해동 순화, 음파처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리, 정제가 가능하다(Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)). 전기영동, 원심분리, 겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등), 등전점 포커싱 및 이의 다양한 변화 및 복합 방법 등이 이용 가능하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [98] 본원의 제 7측면은, (a) 분리된 연골세포를 배양하고, 상기 배양된 연골세포에 오스카 단백질 저해제 후보물질을 처리하는 것; (b) 상기 배양된 연골세포에 콜라겐을 처리하는 것; 및 (c) 상기 연골세포에서의 퇴행성관절염 마커의 발현수준을 측정하는 것을 포함하는, 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법을 제공한다. 본원의 제1측면 내지 제6측면과 중복되는 내용은 본원의 제7측면의 스크리닝 방법에도 공히 적용된다.
- [99] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 퇴행성관절염 마커는 HIF-2a (Hypoxia-inducible factors-2a), MMP3 (matrix metalloproteinase 3), MMP13 (matrix metalloproteinase 13) 및 ADAMTS5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [100] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 분리된 연골세포는 마우스 유래 연골세포 또는 인간 유래 연골세포일 수 있다.
- [101] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "후보물질"은 오스카 단백질의 활성을 저해할 수 있을 것으로 예상되는 모든 물질을 의미하며, 구체적으로 오스카 단백질의 콜라겐 인식 부위에 결합하여 오스카 단백질-콜라겐 결합을 저해하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 후보물질은, 오스카 단백질과 콜라겐의 결합을 저해할 것으로 예상되는 항-오스카 항체, 항-오스카 항체 단편, 단백질, 올리고펩타이드, 소형 유기분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드, 화합물 등의 분자 또는 이들의 조합일 수 있으며, 상기 후보물질은 천연 물질뿐만 아니라 합성 물질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [102] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 오스카 단백질 저해제 후보물질은 항-오스카 항체 또는 이의 단편일 수 있다.

- [103] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 퇴행성관절염 마커의 발현수준이 감소된 경우 상기 후보물질을 오스카 단백질 저해제, 항-오스카 항체 또는 이의 단편으로 판단하는 것을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [104] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 항-오스카 항체 또는 이의 단편 스크리닝 방법일 수 있다.
- [105] 본원의 일 구현예에 따르는 다른 측면은, 분리된 연골세포 및 콜라겐을 포함하는 오스카 단백질 저해제 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [106] 본원의 제 8측면은, 본원의 퇴행성관절염 치료 또는 예방용 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 퇴행성관절염 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 본원의 제1측면 내지 제7측면과 중복되는 내용은 본원의 제8측면의 방법에도 공히 적용된다.
- [107] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 예방 또는 치료 방법은 상기 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 투여하는 것일 수 있다.
- [108] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 예방 또는 치료 방법은 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [109] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 퇴행성관절염 질환을 치료 또는 억제하기 위하여 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 퇴행성관절염의 진행 정도, 환자의 연령, 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 투여 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본원의 조성물은 상기한 약리학적 또는 생리학적 성분을 함께 투여하거나 순차적으로 투여할 수 있으며, 또한 추가의 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 이러한 투여는 단일 또는 다중 투여일 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [110] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "개체"란, 본원의 조성물을 투여하여 퇴행성관절염 질환이 경감, 억제 또는 치료될 수 있는 상태; 또는 퇴행성관절염 질환을 앓고 있거나 그러한 위험이 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다.
- [111] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본원의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 그러나 경구 투여시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[112] 본원의 제 9 측면은, 본원의 제 2 측면에 따른 분리된 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 또한, 이의 다른 구현예로서, 본원의 골 관련 질환 치료 또는 예방용 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 골 관련 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 본원의 제1측면 내지 제8측면과 중복되는 내용은 본원의 제9측면의 조성물 또는 방법에도 공히 적용된다.

[113] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 골 관련 질환은 골다공증 (osteoporosis), 또는 골감소증 (osteopenia)일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[114] 이하, 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원은 이에 제한되지 않을 수 있다.

[115] [실시예]

[116] 실시예 1. 항-OSCAR 항체의 선별

[117] 실시예 1-1. scFv 항체 라이브러리의 패닝

[118] 항-OSCAR 항체의 제작 및 선별을 위하여, 기존의 공지된 문헌[Mol. Cells, 2009, 27, 225-235 및 PLoS ONE 2015, 10(10):e0141045]에 기재된 방법에 따라 구축한 2종의 scFv 라이브러리를 사용하였다. 이하의 실시예에서 카르베니실린은 암피실린과 동일한 베타락탐계열의 항생제로서, 암피실린으로 대체가 가능하다.

[119] 먼저, ER2537 혹은 TG1 대장균 균주 형태로 보관된 scFv 라이브러리를 카르베니실린을 함유하는 SB(Super broth) 배지 400 mL에 배양하고, 600 nm에서의 흡광도(OD600)가 0.5가 되었을 때 10^{12} CFU (colony forming units)의 VCSM13 보조파아지를 가하여 80 rpm에서 교반하며 1시간동안 37°C에서 감염시켰다. 여기에 최종 70 ug/mL의 카나마이신 항생제를 넣고 30°C, 200 rpm에서 교반하며 밤새 배양하여 scFv가 표면제시된 파지를 생산하였다. 다음날 아침에 배양액을 원심분리하고, 배양액 속의 파지를 4%의 폴리에틸렌글리콜-8000과 3%의 염화소듐을 가하여 침전시킨 후, 침전된 파지를 50 mL의 PBS 완충용액에 녹이고, 위와 같은 방식으로 재차 침전하여 최종적으로 2 mL의 PBS 완충용액에 녹였다. 이를 원심분리하여 이물질을 제거함으로써 파지 scFv 라이브러리를 얻었으며 일반적으로 최종 파지 라이브러리에는 10^{13} CFU/mL 이상의 파지 입자가 포함된다.

[120] 다음으로, PBS에 5 µg/ml 농도로 희석한 1 mL OSCAR-Fc를 면역시험관(immunotube)에 첨가하여 1시간동안 시험관 표면에 단백질을 흡착시킨 후, 분말우유 3% 용액을 시험관에 첨가하여 OSCAR-Fc가 흡착되지 않은 표면을 보호하였다. 시험관을 비운 후, 여기에 분말우유 3% 용액에 분산된 10^{13} CFU의 항체파지 라이브러리 1mL 을 넣어 항원과 결합시켰다. 비특이적으로 결합한 파지를 PBST (phosphate buffered saline - tween20) 용액으로 3회 씻어낸

후, 남아있는 항원 특이적 파지 항체를 100 mM 트리에틸아민 용액 1 mL을 이용하여 용리하였다.

- [121] 다음으로, 상기 용리된 파지를 1.0M 농도의 Tris-HCl 버퍼 (pH 7.0) 0.5 mL로 중화시킨 후 OD600 = 0.5의 TG1 대장균 8.5 mL에 37°C에서 1시간 감염시키고, 감염된 대장균을 카르베니실린을 함유하는 LB(Luria-Bertani) 한천배지에 도포하여 37°C에서 배양하였다. 이 때 0.1 및 0.01 μ L의 대장균을 각각 100 mm 지름 페트리 접시 한천배지에 도포하여 콜로니 개수로부터 용리된 파지 입자의 수(cfu)를 계산하는 데 사용하고, 나머지 대장균을 원심분리하여 소량의 LB 배지에 현탁한 후 150 mm 지름 페트리접시 한천배지에 도포하였다. 다음날 150 mm 페트리접시에 배양된 대장균을 5 mL의 SB (super broth) - 카르베니실린 배양액에 현탁하고 최종 15% 농도가 되도록 글리세롤을 첨가하여 일부는 -80°C에 보관하고, 나머지 중 50 μ L를 20 mL의 SB-카르베니실린-2% 포도당 용액에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 배양액의 OD600 = 0.5가 되면 원심분리하여 박테리아만을 분리하고, 이를 다시 20 mL의 SB-카르베니실린 배양액에 현탁 한 후, 10¹¹ PFU (플라크 형성단위)의 VCSM13 보조파지를 넣고 서서히 교반하며 37°C에서 배양하였다.

- [122] 배양 1시간 후, 카나마이신 70ug/ml을 첨가하고 30°C에서 빠르게 교반하며 (250 rpm) 밤새 배양하였다. 다음날 배양액을 원심분리한 후, 파지 입자를 포함하는 상층액 1 mL을 라이브러리로 사용하여 상기의 패닝 과정을 반복함으로써 항원특이적 클론을 농축시켰다. 패닝 과정은 총 5회를 반복하였으며, 1회, 3회 및 5회차에는 마우스 OSCAR-Fc를 항원으로 사용하였으며 2회 및 4회차에는 인간 OSCAR-Fc를 항원으로 사용함으로써 인간 및 마우스 OSCAR에 중간 교차특이성을 가지는 scFv를 선별하였다. 1회 및 2회에는 5 μ g의 항원을 사용하였고 그 이후에는 1 μ g의 항원을 사용하였다.

- [123] 실시예 1-2. ELISA 스크리닝을 통한 항-OSCAR 항체의 선별

- [124] ELISA 스크리닝을 통해 항-OSCAR 항체를 선별하기 위해, 먼저 96웰 마이크로플레이트의 각 웰에 200 μ L의 SB-카르베니실린을 가하고, 여기에 3차 및 4차 패닝으로부터 얻어진 대장균 콜로니를 37°C에서 2시간동안 교반 배양하였다. 플레이트 복제 핀 도구 (pin tool)를 이용하여 배양된 클론들을 새 마이크로플레이트에 복제해 두고, 대장균이 배양된 각 웰에 IPTG를 최종 1 mM 농도가 되도록 가하고 30°C에서 16시간 교반 배양하였다. 그 후 마이크로플레이트를 원심분리하여 상층액을 버리고, 침전된 대장균을 웰 당 40 μ L의 얼음으로 냉각한 1X TES (20% 수크로즈, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁하였다. 여기에 다시 웰 당 60 μ L의 차가운 0.2X TES를 가하여 잘 혼합한 후 얼음 위에 30분간 방치하고, 마이크로플레이트를 원심분리하여 페리플라즈م 추출액을 얻었다.

- [125] 다음으로, ELISA 용 96웰 플레이트의 각 웰에 인간 및 마우스 OSCAR-Fc 및 인간 IgG를 각각 2 ug/ml으로 PBS에 희석하여 25 μ L씩 가하고 37°C에서 1시간

방치하여 항원을 웰 표면에 흡착시켰고, 항원이 흡착되지 않은 표면은 분말우유 3% 용액을 가한 후 1시간 방치하여 표면을 보호하였고, 분말우유 용액을 제거하였다. 웰 당 25 μ L의 페리플라즈 추출액을 가하고 상온에서 1시간 방치하여 항원-항체 결합이 이루어지도록 하였고, 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척 후, 분말우유 3% 용액에 1:3,000으로 희석된 HRP (horseradish peroxidase) 접합 항-HRP 항체를 웰 당 25 μ L씩 가하고 상온에서 1시간 방치하였다. 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척한 후, TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine)를 웰 당 25 μ L씩 가하여 발색반응을 유도하였다. 뚜렷한 청색이 발색한 후 다시 웰 당 25 μ L의 1N 황산 수용액을 가하여 반응을 멈추고, 색변화 신호를 450 nm 파장의 흡광도를 통해 측정하였다. 인간 IgG는 Fc 부위에 결합하는 클론을 확인하기 위한 컨트롤 항원으로 사용하였으며, ELISA 신호를 분석하여 인간 및 마우스 OSCAR-Fc에 결합하면서 인간 IgG에는 결합하지 않는 클론들을 선별하였다.

[126] 실시예 1-3. scFv 항체 서열 분석

[127] scFv 항체의 서열을 분석하기 위해, 복제된 마이크로플레이트로부터 ELISA 신호를 강하게 보이는 scFv 유전자를 PCR을 통해 증폭하고, DNA 염기서열을 분석하였다. PCR은 pC3X-f(서열번호 1) 및 pC3X-b(서열번호 2) 프라이머를 이용하였으며 서열분석은 ompseq (서열번호 3)을 사용하였다.

[128] [표1]

서열이름	염기서열(5'- 3')	서열번호
pC3X-f	GCA CGA CAG GTT TCC CGA C	1
pC3X-b	AAC CAT CGA TAG CAG CAC CG	2
ompseq	AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G	3

[129] 분석된 scFv 서열들 중 중복되는 서열을 제외하고, 총 7개의 인간 및 마우스 OSCAR에 중간 교차특이성을 가지는 고유서열 (A1, B4, B12, C11, D2, D11, H10)을 확인하였다. 이 클론들은 다시 3 mL의 SB-카르베니실린에서 상기한 방법으로 발현하고 페리플라즈 추출액을 획득하여 인간 및 마우스 OSCAR에 대한 결합력을 재확인하였다 (도 1).

[130] 실시예 2. 항-OSCAR 항체의 발현 및 정제

[131] 실시예 2-1. 항-OSCAR scFv의 정제

[132] 항-OSCAR scFv를 정제하기 위해, 20 mL의 SB-카르베니실린 배지에 scFv 대장균 클론을 OD600 = 0.5가 될 때까지 37°C에서 교반배양하고, 여기에 IPTG가 최종 1 mM 이 되도록 가하여 다시 30°C에서 16시간 교반배양하였다. 다음으로, 배양액을 원심분리하고 침전된 세포를 1 mL의 차가운 1X TES에 잘 분산한 후, 여기에 다시 1.5 mL의 차가운 0.2X TES를 가하고 얼음에 30분간 방치하였다. 이를 원심분리하여 상층액을 획득하고 황산화 마그네슘을 최종 5 mM이 되도록

가하였다. 이 추출액에 100 μ L의 Ni-NTA agarose beads를 가하고 30분간 회전 배양한 후, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 다음으로, Ni-NTA agarose beads를 5 mM의 이미다졸이 함유된 PBS 1 mL로 2회 세척하고, 300 mM의 이미다졸이 함유된 PBS 200 μ L로 3-5회에 걸쳐 결합된 scFv를 용리하였다. 정제된 scFv는 280 nm의 흡광도로 농도를 측정하고, SDS-PAGE 기법으로 순도를 분석하였다.

[133] 실시예 2-2. 항-OSCAR IgG의 정제

[134] 항-OSCAR IgG를 정제하기 위해, scFv의 중쇄 가변부위(VH) 및 경쇄 가변부위(VL) 유전자를 PCR로 증폭하여 pcIW3.3-HC 및 pcIW3.3-LC 벡터에 각각 클로닝하였다. pcIW3.3 벡터에 대한 정보는 이화여자대학교 대학원 석사학위논문(김민정, 2018, UCI 식별코드 I804:11048-000000148254)에 기재되어 있다. 중쇄 가변부위는 AfeI/NheI 제한효소를 사용하여 클로닝하였으며, 람다 경쇄는 AfeI/AvrII 제한효소를 사용하여 클로닝하였다. 중쇄 및 경쇄 가변부위 유전자가 클로닝된 pcIW3.3 발현벡터는 ExpiCHO-S 세포주에 함께 트랜스펙션하였으며 8~10일간의 배양을 통해 배양액으로 IgG 항체가 분비되게 하였다.

[135] 배양을 완료한 후 원심분리를 통해 분비된 IgG 항체가 함유된 상층액을 획득하였으며, Protein G agarose를 이용한 컬럼 크로마토그래피를 통해 IgG 항체를 정제하였다. 정제된 항체는 280 nm의 흡광도로부터 농도를 측정하였고, SDS-PAGE 기법으로 순도를 분석하였다.

[136] 실시예 3. 항-OSCAR 항체의 OSCAR-콜라겐 상호작용 저해능의 평가

[137] 본원에서 제조된 항-OSCAR 항체가 OSCAR-콜라겐의 상호작용을 저해하는 지 확인하기 위하여, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로, 콜라겐(collagen type I from rat tail)을 PBS에 2 μ g/mL 농도로 희석하여 ELISA 플레이트에 25 μ L씩 가하고 4°C에 밤새 방치하여 흡착시켰다. 콜라겐이 흡착되지 않은 표면을 분말우유 3% 용액으로 보호하였다. 다음으로, 정제된 항-OSCAR IgG 항체와 인간 또는 마우스 OSCAR-Fc[인간 및 마우스에서 유래된 오스카 단백질의 엑토도메인(ectodomain)을 인간 면역글로불린 감마 1 (human IgG1)의 Fc 도메인에 융합][인간 유래: hOSCAR-Fc(서열번호 4), 마우스 유래: mOSCAR-Fc(서열번호 5)]를 각각 2 μ g/mL 및 1 μ g/mL 농도가 되도록 혼합하여 1.5시간동안 결합하도록 한 후, 분말우유 용액을 제거한 콜라겐 흡착 ELISA 플레이트에 웰당 25 μ L씩 가하여 상온에서 1.5시간 방치하였다. 이후 PBST로 플레이트를 3회 세척하여 반응하지 않은 항체 및 OSCAR-Fc를 제거하고, 콜라겐과 결합된 OSCAR-Fc를 검출하기 위해 1:3,000으로 희석한 HRP-접합 항 인간 IgG 항체를 웰당 25 μ L씩 가하여 상온에서 1시간 방치하여, PBST로 플레이트를 3회 세척한 후 TMB 기질을 웰당 25 μ L씩 가하여 청색 발색반응을 유도하고, 적절한 시점에 웰당 25 μ L의 1 N 황산 수용액을 가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm의 흡광도를 측정하여 OSCAR-콜라겐 결합정도를

분석하였다 (도 2).

[138] 그 결과, 본원에서 개발한 신규 항-OSCAR IgG 항체가 OSCAR 단백질과 결합하여 OSCAR 단백질과 콜라겐의 상호결합을 효율적으로 억제하는 것을 알 수 있다.

[139] 실시예 4. 신규한 항-OSCAR 항체 스크리닝 방법

[140] 실시예 4-1. 연골세포를 이용한 새로운 항-OSCAR 항체 스크리닝 바이오어세이 개발

[141] 본원에서는 OSCAR가 연골세포에서 발현되며, 퇴행성 관절염 유도 마우스 모델에서 HIF-2a(Hypoxia-inducible factors-2a), MMP3(matrix metalloproteinase 3), MMP13(matrix metalloproteinase 13), ADAMTS5(A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5) 등 퇴행성관절염 마커들의 발현수준이 연골조직의 연골세포에서 변화된다는 사실을 근거로, 콜라겐 결합을 저해하는 항-OSCAR 항체를 스크리닝 하기 위한 새로운 교차-결합 바이오어세이(Cross-linking bioassay) 방법을 개발하였다.

[142] 구체적으로, 세포배양 플레이트에 연골세포(마우스 유래 연골세포 ATDC5 또는 인간 유래 연골세포 C28/I2)를 도포한 뒤 1일뒤 Fc 단백질 및 항-OSCAR 후보 항체를 30분 전처리 한 후 콜라겐을 처리하여 1일 배양하였으며, 배양한 세포는 mRNA를 정제하여 정량적 PCR 방법으로 OSCAR, MMP3 및 MMP13의 발현 수준을 분석하였다. 상기 어세이의 효능 검증을 위해서, OSCAR-콜라겐 상호결합을 차단한다고 알려진 마우스 OSCAR-Fc 및 인간 OSCAR-Fc을 표준물질로 사용하였다.

[143] 인간 OSCAR-Fc(hOSCAR-Fc 융합 단백질)의 경우 인간 IgG1의 Fc 부위가 복제된 pVITRO1-Fc 벡터(vector)에 인간 OSCAR의 세포 밖 영역(아미노산19-233)을 삽입하여 hOSCAR-Fc 융합DNA를 만든 후, 상기 융합 DNA를 포유류 세포(예, COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0 세포- 293F 세포 사용)에 감염시키고, 6일동안 배양하였다. 상기 배양한 세포 배지는 Protein G sepharose beads에 통과시켜 내리고 100 mM glycine (PH 2.0)을 사용하여 세포에서 분리된 단백질을 정제하였으며, 이때 정제 될 튜브에 1 M Tris-HCl (PH 7.0)을 넣어두어 용출된 단백질이 즉시 중화되도록 하였다. 튜브에 모인 단백질은 PBS에서 투석하여 용해된 용액을 바뀔주고 농축시켜 -80°C 저온냉동 상태로 보관하였다. 마우스 OSCAR-Fc의 생산 또한 상기 인간 OSCAR-Fc 생산 방법을 준용하여 수행하였다.

[144] 실시예 4-2. 바이오어세이를 통한 유효 항체의 스크리닝

[145] 항-OSCAR 항체의 효능 검증을 위한 표준물질로서 상기 실시예 4-1에서 제작한 인간 OSCAR-Fc(hOSCAR-Fc) 단백질을 정제하여 사용하였다. 실시예 4-1에서 개발한 신규 교차-결합 바이오어세이를 이용하여 마우스 유래 연골세포 ATDC5에서 콜라겐에 의해 발현이 유도되는 마커들이 본원에서 개발된 7개의 항-OSCAR 항체에 의해 억제되는 변화를 확인하였다 (도 3). 또한, 이 결과를

토대로 선별된 항-OSCAR 항체인 B4, D2, D11은 인간 유래 연골세포인 C28/I2에서도 OSCAR-콜라겐 유도마커의 발현에 길항제로 작용하는 것을 확인하였다(도 4).

- [146] 상기 결과를 토대로, 본원의 신규한 항-OSCAR 항체가 연골세포에서 OSCAR-콜라겐 상호결합을 저해함으로써, OSCAR 단백질 신호전달에 의해 유발되는 퇴행성관절염을 치료 및 예방할 수 있음을 알 수 있다.
- [147] 실시예 5. 항-OSCAR 항체의 마우스 퇴행성관절염 모델에서의 효능 검증
- [148] 본원에서 개발한 신규 항-OSCAR 항체의 마우스 퇴행성관절염 모델에서의 치료 효과를 확인하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, 항체연골내측 반월판 절개수술 (destabilization of the medial meniscus, DMM)을 수행하여, 마우스 퇴행성관절염 모델을 제조하였다. 구체적으로, 수술 전 2.5% avertin을 복강주사하여 마취시킨 10주된 수컷 마우스의 오른쪽 무릎의 연골 내측 반월판을 미세 수술용 칼이나 #11 칼날로 절개하였다. 수술은 37°C 열패드 위에서 진행하여 마우스의 체온 저하를 막았다. 왼쪽 무릎에는 대조군으로 허위수술(Sham)을 하였으며, 수술 부위는 수술용 실로 봉합하였다.
- [149] 상기와 같이 DMM 수술모델을 통하여 퇴행성관절염 질환을 유도한 뒤, 수술 후 3-4일 정도 회복기를 가진 후, 주 2회로 8주 동안 본원에서 개발한 항-OSCAR 항체 또는 비교군으로서 인간 유래 OSCAR-Fc 단백질을 수술한 오른쪽 무릎 사이에 관절강내 주사(intra-articular injection)로 관절주사하였다. 허위수술을 한 왼쪽 무릎에는 대조군으로 PBS를 주사하였다.
- [150] 약물 투여 완료 후, 조직학적 분석을 수행하기 위해, 마우스를 희생시켜 무릎뼈를 채집하였으며, 채집한 무릎뼈는 10% 포름알데하이드에서 고정하고 pH 7.4의 0.5M EDTA 용액을 사용하여 탈석회화를 한 뒤 파라핀 블록을 만들어 5-6 μ m 두께로 잘라 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E), 사프란인-O(safranin-O) 및 패스트그린(fastgreen)으로 염색하였다. 염색된 조직은 국제 골관절염 학회(Osteoarthritis Research Society International, OARSI) 점수방법에 따라 골관절염 정도를 측정하였다. 상기에서 사용된 항-OSCAR 항체는 B4, D2, D11 중 정제율이 높은 B4 및 D11을 사용하였다.
- [151] 실험 결과, 항-OSCAR 항체 B4를 주사한 마우스의 연골은 OSCAR-Fc를 주사한 마우스의 연골과 비교하였을 때 높은 농도 (2 mg/kg)의 군에서 비슷한 억제 효과를 보였으며, 항-OSCAR 항체 D11를 주사한 마우스 연골은 낮은 농도 (0.4 mg/kg)의 군에서도 OSCAR-Fc와 비슷한 효과를 보였으며, 고농도에서는 퇴행성관절염 발병 정도가 현저히 낮게 나타나는 것으로 보임으로써, B4와 D11 항체는 퇴행성 관절염 마우스 모델에서 퇴행성 관절염 발병을 억제하는 것을 조직학적으로 확인할 수 있었으며(도 5), 이는 OARSI 측정법에 따른 정량으로도 확인할 수 있었다(도 6).
- [152] 상기 결과를 토대로, 본원에서 개발한 신규 항-OSCAR 항체, 특히 B4 및 D11 클론 항체는 OSCAR-콜라겐 상호작용을 억제할 수 있으며, 상기 기전을 통해

퇴행성관절염을 치료 또는 예방할 수 있음을 알 수 있다.

- [153] 상기 항-OSCAR 항체 B4의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열은 서열번호 6 및 7에, 항-OSCAR 항체 D11의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열은 서열번호 14 및 15에 기재하였다.

[154] 실시예 6. 항-OSCAR 항체의 최적화

[155] 실시예 6-1. 친화도가 개선된 항-OSCAR 항체 개발

- [156] 상기 실시예 등을 통하여, 생화학적 및 세포기반 분석과 동물모델 실험을 통하여 OSCAR의 활성을 효과적으로 중화하면서 퇴행성관절염 치료 효과가 있는 것으로 확인된 2종의 클론(B4, D11)중 효능이 좋은 D11에 대한 친화도 개선 연구를 수행하였다. D11은 VH3-23(DP47) 중쇄 가변부위와 VL1g(IGVL1-47) 랍다 경쇄 가변부위를 스캐폴드로 가지고 있다.

- [157] 구체적으로, D11 클론의 CDR-H3의 무작위적 돌연변이를 통하여 최적화 항체를 찾는 연구를 수행하였다. D11 클론의 CDR-H3는 12개의 아미노산으로 이루어지며, 이들 중 N 말단 쪽의 Ala-Lys(AK)와 C 말단 쪽의 Phe-Asp-Ile(FDI)는 많은 항체의 CDR-H3에서 일반적으로 발견되는 서열이므로, 무작위화하지 않고 중간의 7개 아미노산에 대해서만 돌연변이를 도입하였다.

- [158] 먼저, NNK 코돈(N=A/T/G/C, K=G/T)을 이용하여 두 개의 연속된 아미노산 위치에 무작위적 돌연변이를 도입한 6개의 focused library들을 제작하였고, 이들 라이브러리를 각각 D11-H3-1부터 6으로 명명하였다(도 7A). 다음으로, 상기 라이브러리로부터 친화도가 향상된 항체를 선별하기 위해, 낮은 항원농도, 높은 선택압 (세척 회수 및 시간의 증가) 조건하에서 3회에 걸쳐 패닝하였다. 1차 및 2차 패닝에서는 1 μ g/mL의 hOSCAR-Fc를, 3차에서는 0.2 μ g/mL의 hOSCAR-Fc를 코팅하였고, Fc 결합 클론의 제거를 위하여 허셉틴(Herceptin)을 100 μ g/mL 농도로 라이브러리와 혼합하였다. 또한, 1차 및 2차는 PBST로 5회 세척, 3차는 PBST로 8회 세척 후 다시 PBST를 30분동안 가하여 2회 세척하였다. 그 결과, 3차 패닝에서 output이 대체로 줄어드는 경향을 보였으며, 이는 3차 패닝에서의 항원 농도 및 세척 조건이 엄밀화되었기 때문으로 판단된다. 또한, D11-H3-3 라이브러리의 경우에는 3차에서 output titer가 매우 낮게 나왔으며, 해당 라이브러리에서 무작위화된 아미노산 위치가 결합에 중요한 역할을 하는 것과 연관이 있을 가능성이 있는 것으로 보인다(도 7B).

- [159] 다음으로, Output 클론들을 ELISA를 통하여 스크리닝하고 백그라운드 (허셉틴, Fc 대조군) 대비 결합신호가 높은 클론들 위주로 서열 분석을 실시하였다. 그 결과, 다수의 서열들이 D11과 무관하게 이전의 패닝에서 찾아진 클론의 오염으로 나타났으며, D11-H3-4 라이브러리로부터 하나의 클론(D11-B9)이 D11의 CDR-H3 변이체로 확인되었다. 이외에 추가적인 ELISA 스크리닝을 통해 D11-H3-3에서 4클론, D11-H3-4에서 1클론, D11-H3-5에서 1클론, D11-H3-6에서 1클론이 각각 추가로 발견되었다.

- [160] 실시예 6-2. 최적화된 항-OSCAR 항체의 발현 정제 및 친화도 평가

- [161] 상기의 D11의 친화도 성숙(affinity maturation)으로부터 확인한 클론들 중 5종을 IgG로 전환하여 ExpiCHO-S 세포주로부터 발현, 정제하였다. 이들은 D11과 동일한 경쇄를 가지며 중쇄의 CDR-H3 서열에서만 차이가 나는 항체들이므로 중쇄 가변부위만 pcIW3.3-HC 벡터로 클로닝하고, 경쇄의 발현벡터는 D11과 동일한 것을 사용하였다 (도 8).
- [162] 다음으로, 상기 클론들의 EC_{50} 값을 연속 희석(serial dilution) ELISA로부터 4-모수 로지스틱 곡선 적합치(4-parameter logistic curve fit)으로 계산하였다. 그 결과, D11-B9의 친화도(affinity)가 가장 우수한 것으로 나타났으며, D11, D11-B2, D11-B9, D11-C10, D11-F2, D11-F8, D11-F9의 EC_{50} 값은 각각 520 nM, 80 nM, 1.5 nM, 70 nM, 1 μ M, 250 nM로 계산된 것을 확인하였다(도 9).
- [163] 따라서, D11으로부터 친화도 성숙된 항체들의 ELISA 신호 강도, 발현량, 안정성, 활성 등을 토대로 D11-B9을 선별하였으며, OSCAR에 대한 상대적 친화도를 연속 희석으로 다시 평가하였다. 구체적으로, D11-B9의 hOSCAR 및 mOSCAR에 대한 EC_{50} 값은 각각 36.8 nM로 평가되었으며, 보다 정확한 해리상수를 측정하기 위하여 옥텟(Octet) 장비를 통하여 bio-layer interferometry (BLI) 신호 측정을 통해 분석을 수행하였다. 그 결과, D11 과 친화도 성숙된 클론인 D11-B9을 비교할 때, D11-B9의 경우 hOSCAR 및 mOSCAR에 대해 10배 이상의 친화도 향상을 보였으며, D11-B9은 hOSCAR에 대해 0.4 nM, mOSCAR에 대해 0.2 nM의 해리상수를 나타내었다. 연속 희석 ELISA의 경우와 마찬가지로 D11은 hOSCAR에 대해 낮은 친화도를 가지는 것으로 보이며, 해리상수는 5.6 nM 수준으로 나타났으나 응답 신호(response signal)가 낮게 측정되는 경향을 보였다 (도 10).
- [164] 상기 결과를 토대로, D11로부터 친화도 성숙된 D11-B9 클론의 경우 OSCAR에 대한 우수한 친화도를 갖는 것을 확인하였으며, 최종 후보 물질로 선정된 D11-B9 및 모-클론인 D11은 IgG 형태로 생산, 정제되어 in vivo 효능 분석에 사용하였다.
- [165] 또한, 상기 항-OSCAR 항체 D11-B9 의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열은 서열번호 22 및 23에 기재하였다.
- [166] 실시예 6-3. 최적화된 항-OSCAR 항체의 마우스 퇴행성관절염 모델에서의 효능 검증
- [167] 상기 실시예 5에서 수행한 방법과 마찬가지로 DMM 수술모델을 통하여 퇴행성관절염 질환을 유도한 뒤, 수술 후 3-4일 정도 회복기를 가진 후, 주 2회로 8주 동안 D11 및 D11-B9항-OSCAR 항체(2 mg/kg)를 수술한 오른쪽 무릎 사이에 관절강내 주사(intra-articular injection)로 관절주사하고 허위수술(Sham)을 한 왼쪽 무릎에는 대조군으로 PBS를 주사하였다. 8주 경과 후 조직은 선행연구에서 쓰인 방법으로 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E), 사프라닌-O(safranin-O) 및 패스트그린(fastgreen)으로 염색하여 골관절염 정도를 측정, 비교하였다. 그 결과, D11를 주사한 마우스의 연골은 퇴행성관절염 발병

정도가 현저히 낮게 나타나는 것을 확인하였고, D11-B9 또한 D11과 마찬가지로 퇴행성관절염 발병 정도를 현저하게 억제하는 것을 확인하였다. 상기 결과부터 실시예 5의 B4에 비해 D11 항체 및 이의 친화도 성숙을 거친 D11-B9가 항체가 상대적으로 억제효능이 유효함을 확인하였다(도 11A). 또한, 상기 결과는 국제 골관절염 학회(Osteoarthritis Research Society International, OARSI) 점수방법에 따른 등급 분류상의 정량 분석에 의해서도 확인되었다(도 11B).

- [168] 일반적으로, 퇴행성관절염 진행 중에는 연골 하골(subchondral bone)의 리모델링이 일어나면서 조직학적으로 연골 하골판의 두께가 증가한다. 또한 정상인 경우, 관절 연골(articular cartilage)은 유리질 연골(hyaline cartilage, HC)이 석회화 연골(calcified cartilage, CC)보다 더 넓게 분포하는데 반해, 퇴행성관절염 발병 시에는 석회화 연골 부위가 더 크게 분포하게 된다. 따라서, D11 및 D11-B9 항체의 퇴행성관절염 치료 효능을 확인하기 위해, 연골 하골 구조 분석을 수행하였다. 그 결과, D11을 주사한 퇴행성관절염 모델 마우스의 연골 하골판의 두께는 대조군(hIgG)과 비교하였을 때 증가하지 않는 것을 확인하였으며, D11과 비교하여 D11-B9의 효과가 보다 우수한 것을 확인하였다(도 12A 및 B). 또한, HC/CC 분포도를 살펴보면, D11 및 D11-B9를 주사한 경우 대조군을 주사한 경우에 비해 HC/CC가 높은 것이 확인되는 바, D11 항체 및 D11-B9 항체는 퇴행성관절염 발병에 의한 HC 두께 감소를 억제하는 것을 알 수 있다. 또한, D11-B9가 D11보다 HC 두께 감소 억제효능이 보다 우수함을 확인하였다(도 12C).

[169] 실시예 7. 항-OSCAR 항체의 작용 메커니즘 확인

- [170] 본원에서 제작한 항-OSCAR 항체의 퇴행성관절염 치료 메커니즘(Mode-of-Action, MOA)를 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 6에서 수행한 방법과 같이, DMM 수술모델을 통하여 퇴행성관절염 질환을 유도한 뒤, 수술 후 3-4일 정도 회복기를 가진 후, 주 2회로 8주 동안 D11 및 D11-B9항-OSCAR 항체(2 mg/kg)를 수술한 오른쪽 무릎 사이에 관절강내 주사(intra-articular injection)로 관절주사하고 허위수술(Sham)을 한 왼쪽 무릎에는 대조군으로 PBS를 주사하고, 세포사멸 저해 여부를 면역조직화학염색법으로 확인하였다. 그 결과, D11 항체, 및 D11-B9 항체 모두 세포사멸을 유도하는 것으로 알려진 TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand) 단백질의 발현을 감소시키는 반면, OPG(Osteoprotegerin) 단백질의 발현은 증가되는 것을 확인하였는 바(도 13), D11 및 D11-B9 모두 세포사멸 관련 신호전달을 억제하는 것을 알 수 있으며, 특히, D11과 비교하여 D11-B9의 세포사멸 신호 억제 효능이 더 우수한 것을 알 수 있다.

- [171] 다음으로, 세포사멸(apoptosis)를 확인하는 실험 방법으로 알려진 TUNEL 염색 어세이를 통해 항-OSCAR 항체에 의한 연골세포사멸 변화를 비교 분석하였다. 그 결과, D11 및 D11-B9 모두 세포사멸을 감소시키는 것을 확인하였으며, 특히, D11과 비교하여 D11-B9의 세포사멸 감소 효능이 보다 우수한 것을

확인하였다(도 14).

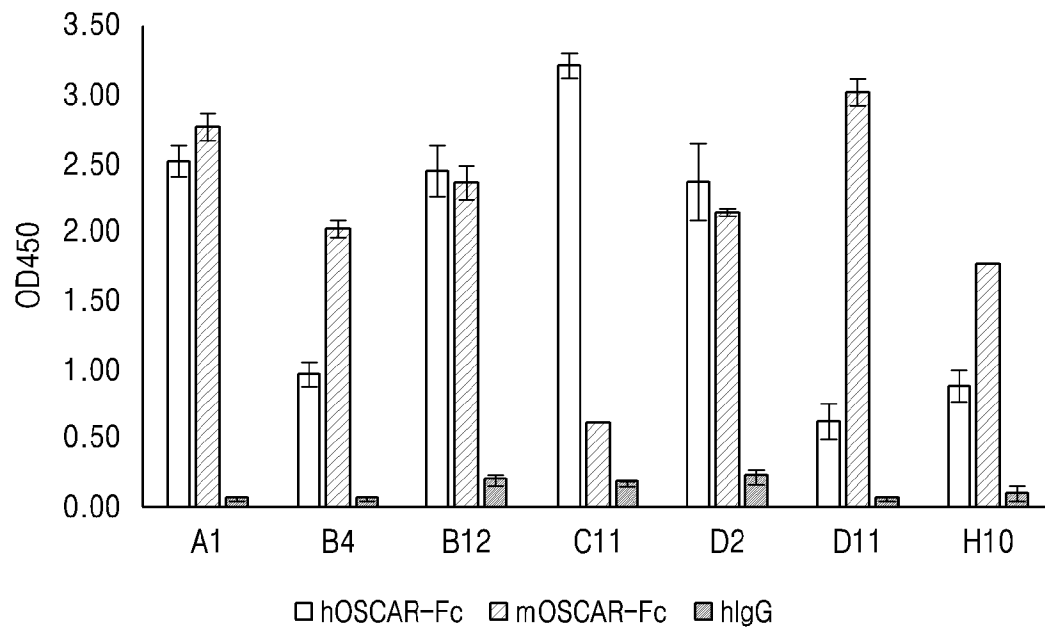
- [172] 상기 결과를 토대로, 항-OSCAR 항체로서 D11 및 D11-B9은 연골세포의 사멸을 저해하는 효능이 있는 것을 확인하였는 바, 퇴행성관절염 치료제로서 이를 활용할 수 있을 것으로 판단된다.
- [173] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [174] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

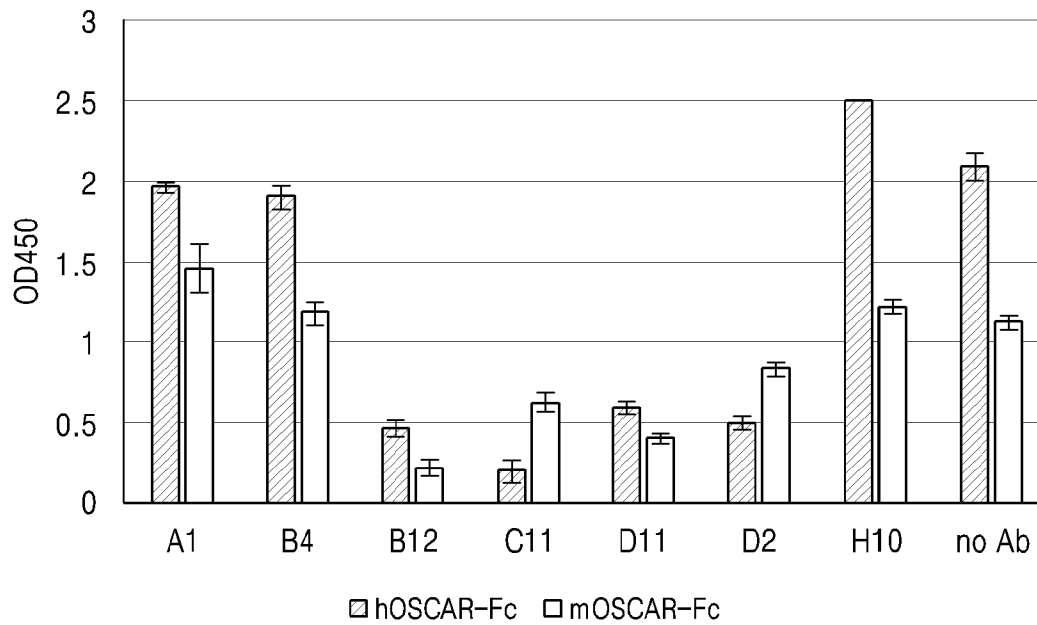
- [청구항 1] 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질 저해제를 포함하는, 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 오스카 단백질 저해제는 오스카 단백질-콜라겐 상호작용을 저해하는 것인, 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 오스카 단백질 저해제는 연골세포에서 발현되는 오스카 단백질의 활성을 저해하는 것인, 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 오스카 단백질 저해제는 항-오스카 항체 또는 이의 단편을 포함하는 것인, 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 항-오스카 항체 또는 이의 단편은 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 것으로서,
1) 서열번호 6으로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 7로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 항-오스카 항체 또는 이의 단편;
2) 서열번호 14로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 15로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 항-오스카 항체 또는 이의 단편; 및
3) 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 23으로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 항-오스카 항체 또는 이의 단편
으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 6] 오스카(Osteoclast-associated Ig-like receptor, OSCAR) 단백질에 결합하는 분리된 항체 또는 이의 단편으로서,
상기 항체 또는 이의 단편은 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 것으로서,
1) 서열번호 6으로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 7로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편;
2) 서열번호 14로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 15로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편; 및
3) 서열번호 22로 구성된 중쇄 가변영역 및 서열번호 23으로 구성된 경쇄 가변영역을 포함하는 분리된 항체 또는 이의 단편
으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 분리된 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 7] 제 6항의 분리된 항체 또는 이의 단편을 암호화하는,
폴리뉴클레오타이드.

- [청구항 8] 제 6항의 분리된 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서,
상기 골 관련 질환은 골다공증 (osteoporosis), 또는 골감소증 (osteopenia)인 것인, 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물
- [청구항 9] (a) 분리된 연골세포를 배양하고, 상기 배양된 연골세포에 오스카 단백질 저해제 후보물질을 처리하는 것;
(b) 상기 배양된 연골세포에 콜라겐을 처리하는 것; 및
(c) 상기 연골세포에서의 퇴행성관절염 마커의 발현수준을 측정하는 것을 포함하는,
오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서,
상기 퇴행성관절염 마커는 HIF-2a (Hypoxia-inducible factors-2a), MMP3 (matrix metalloproteinase 3), MMP13 (matrix metalloproteinase 13) 및 ADAMTS5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법.
- [청구항 11] 제 9 항에 있어서,
상기 분리된 연골세포는 마우스 유래 연골세포 또는 인간 유래 연골세포인 것인, 오스카 단백질 저해제 스크리닝 방법.
- [청구항 12] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 퇴행성관절염 예방 또는 치료 방법.

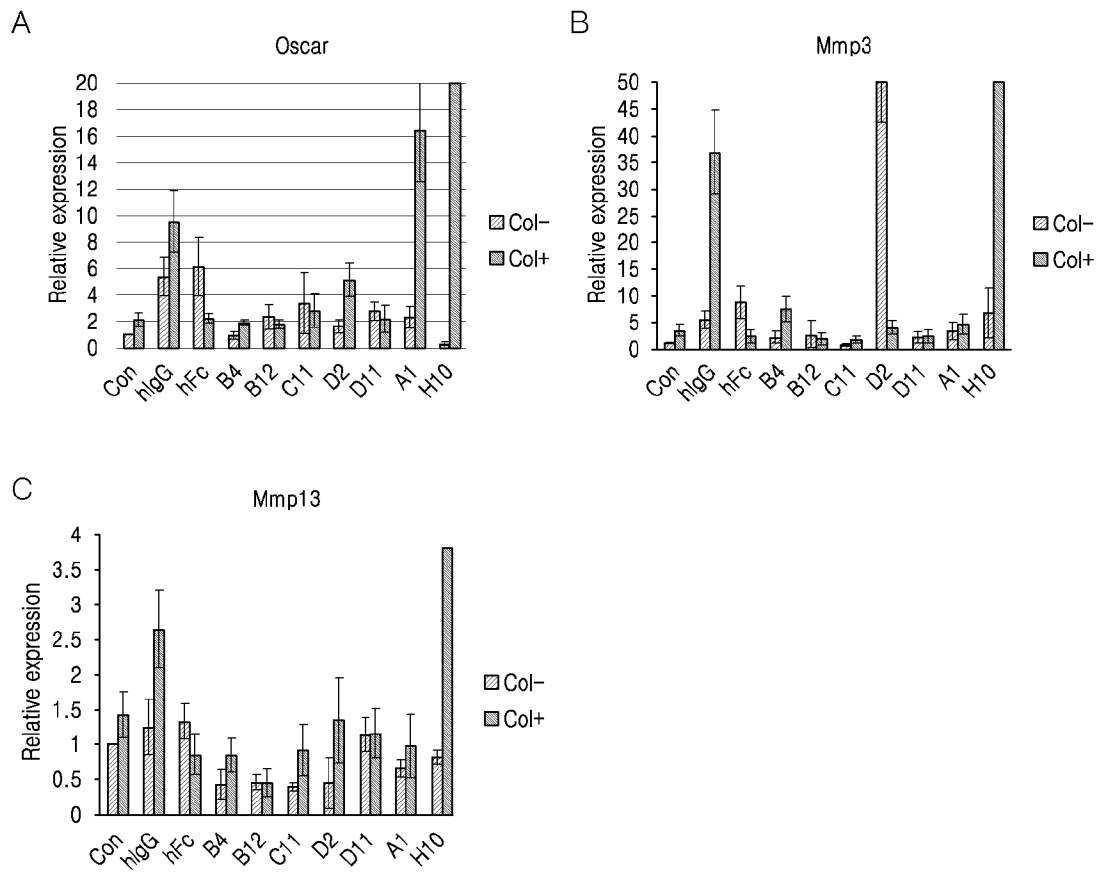
[도1]



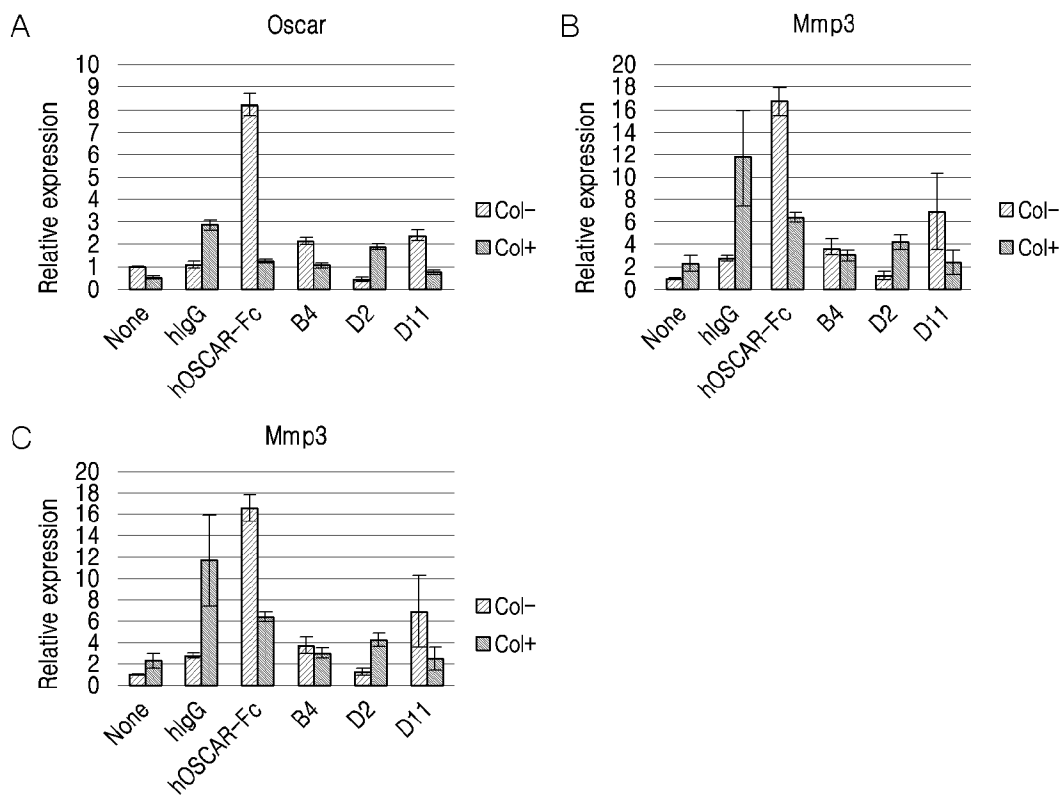
[도2]



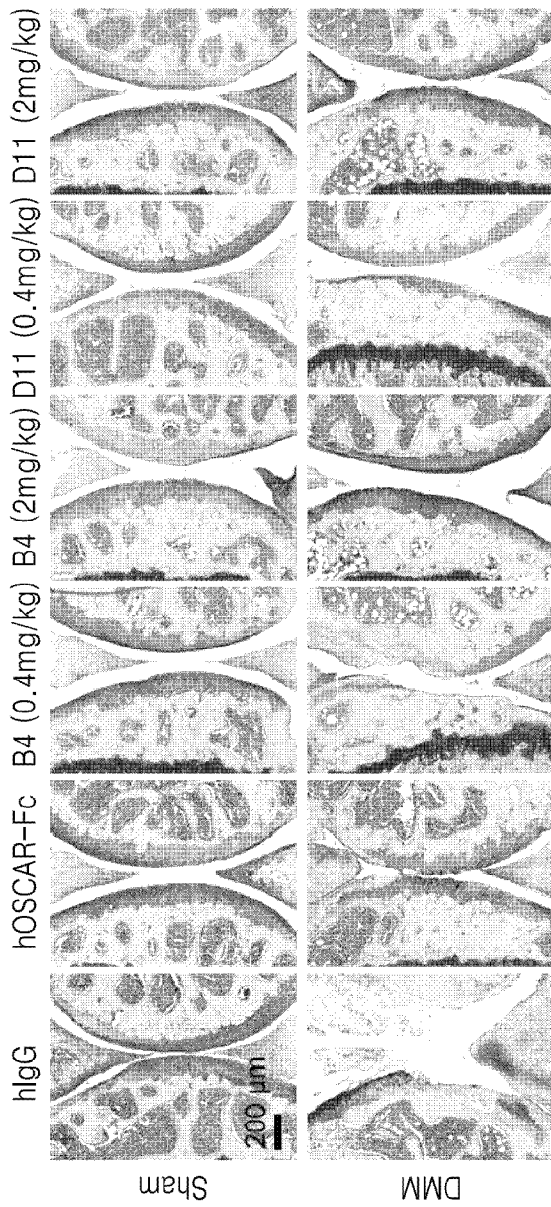
[도3]



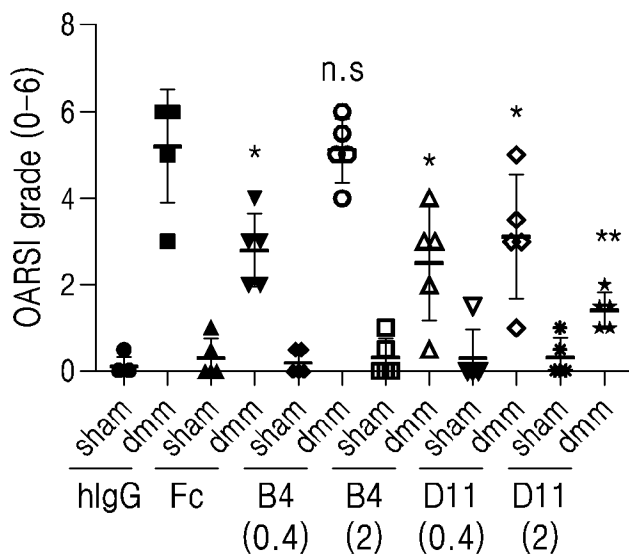
[도4]



[도5]

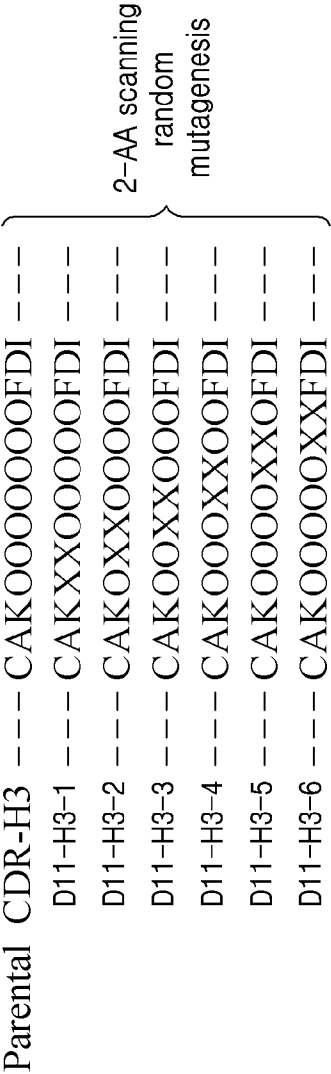


[도6]



[도7]

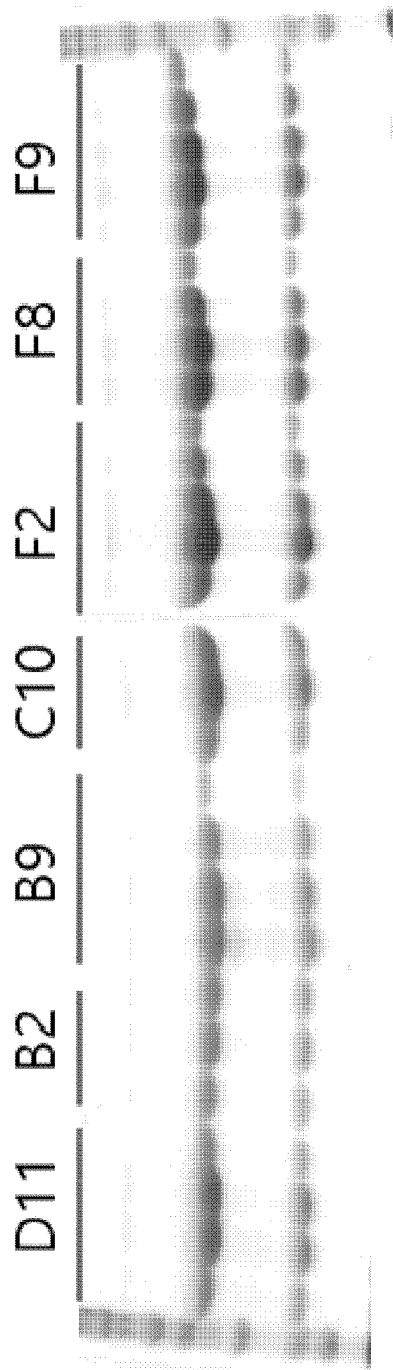
(A)



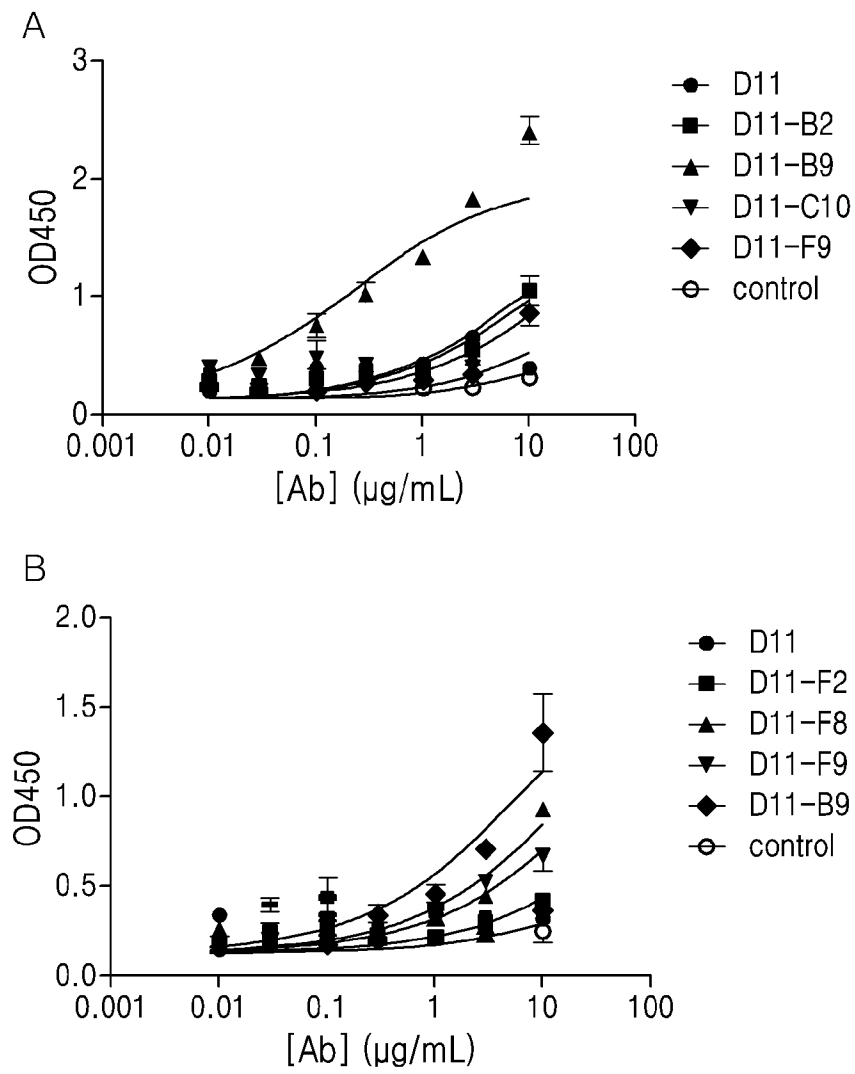
(B)

lib	D11-H3-1		D11-H3-2		D11-H3-3		D11-H3-4		D11-H3-5		D11-H3-6	
	input	output	input	output	input	output	input	output	input	output	input	output
1st	3.2e10	0	1.5e10	0	5.6e10	7.0e4	1.8e10	3.0e4	1.9e10	2.0e4	7.0e10	4.0e4
2nd	5.0e10	1.6e6	1.6e11	6.2e6	3.9e11	3.1e7	1.9e11	2.6e7	2.6e11	2.0e7	5.1e11	1.2e7
3rd	1.5e12	1.4e7	3.0e11	2.4e7	2.7e17	0	4.0e11	3.8e6	4.6e11	2.0e6	2.3e11	2.0e5

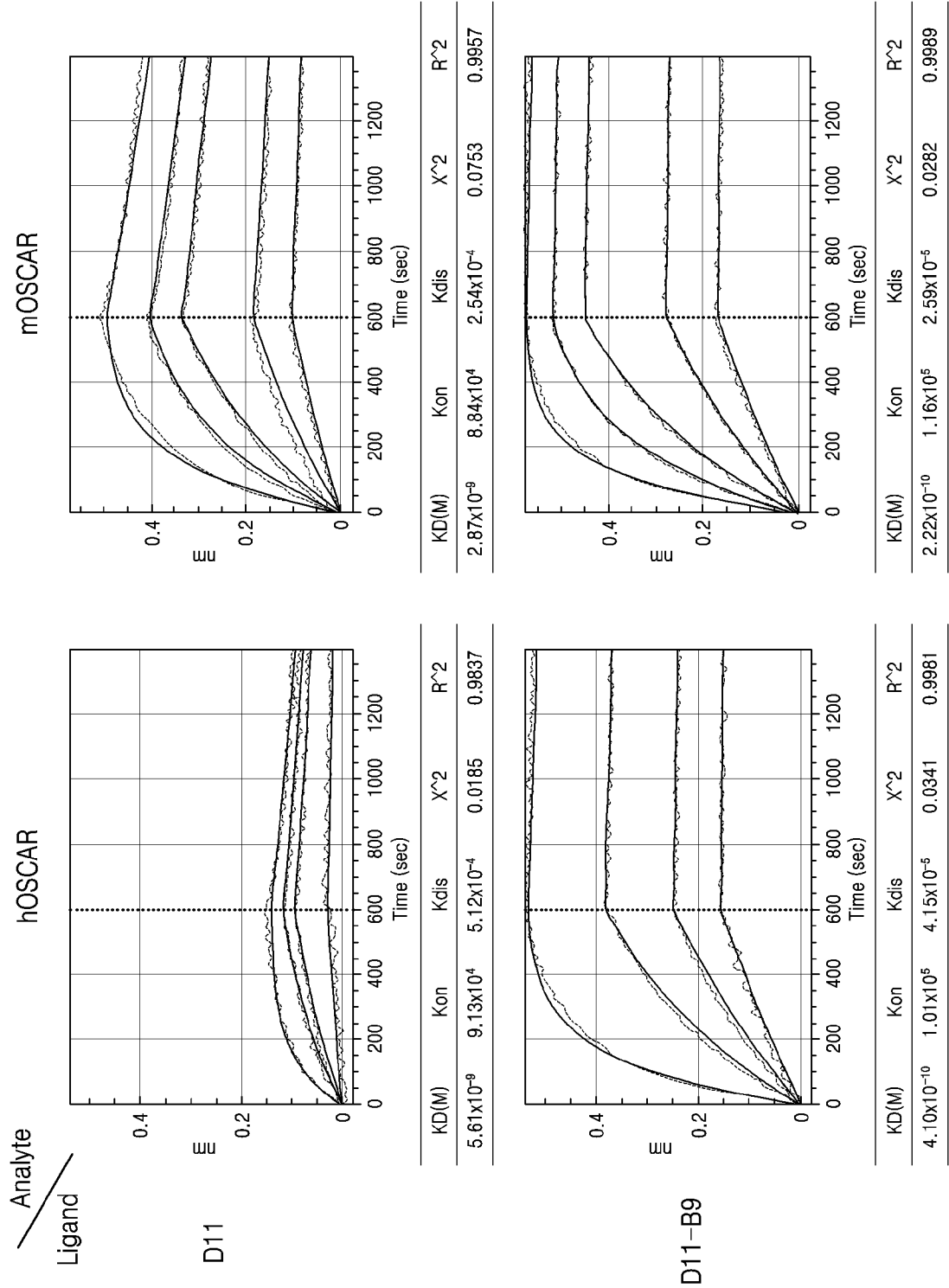
[도8]



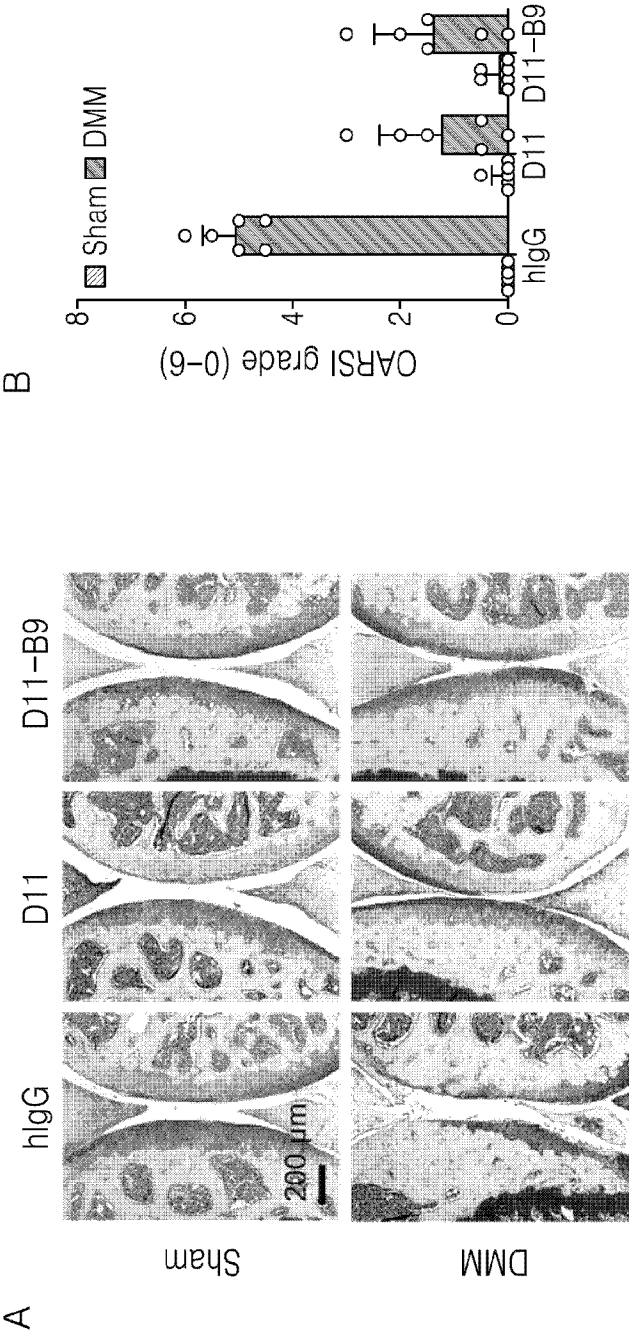
[도9]



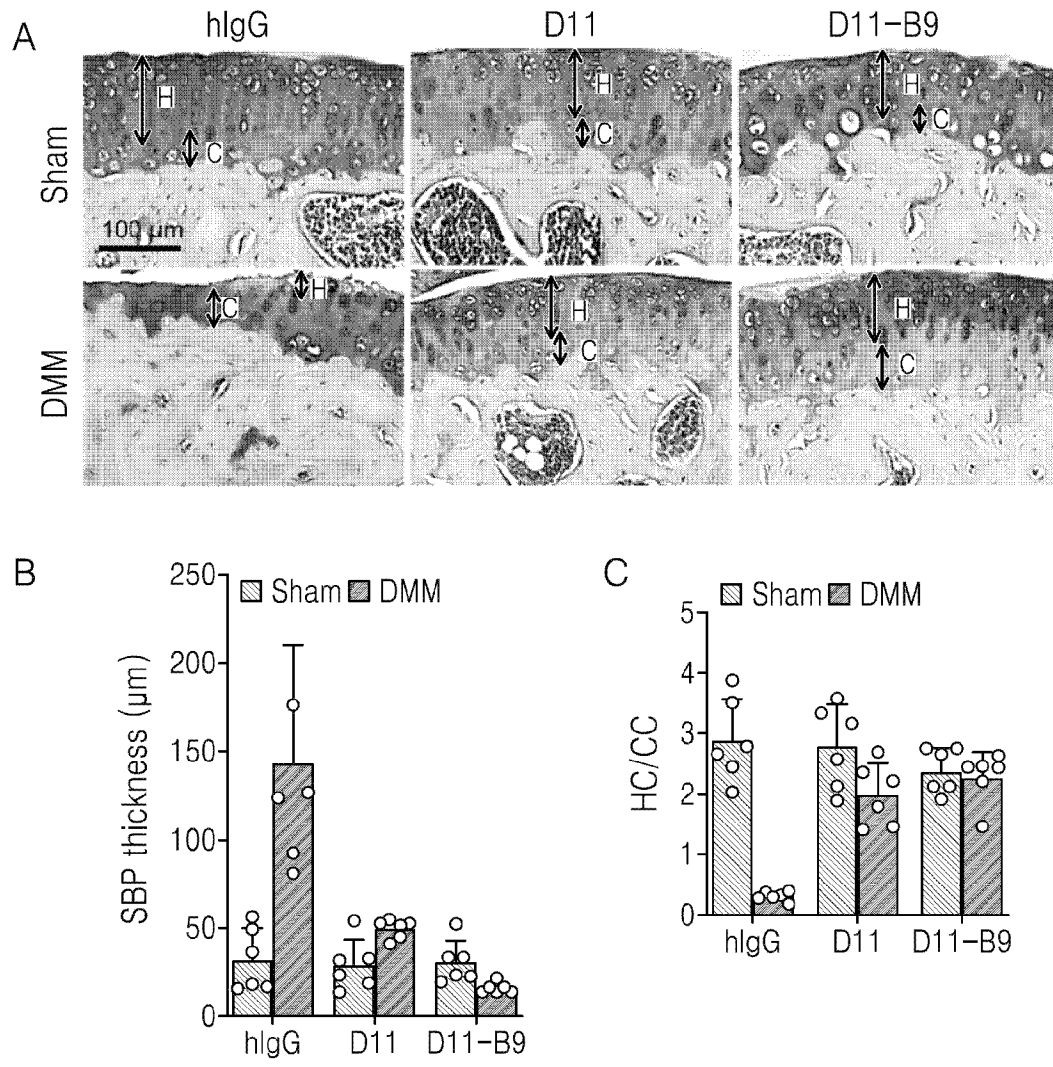
[도10]



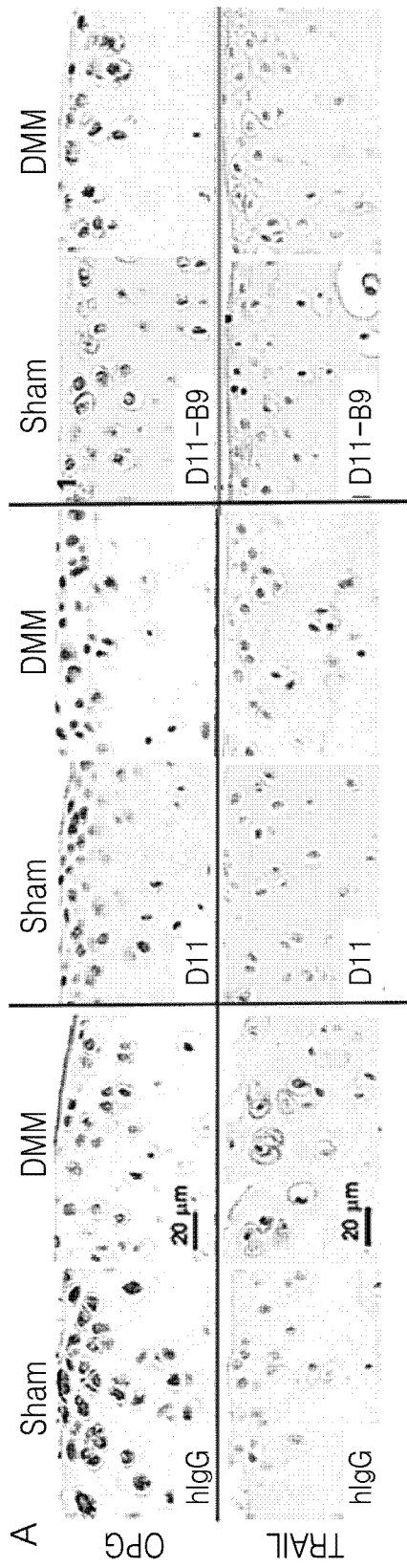
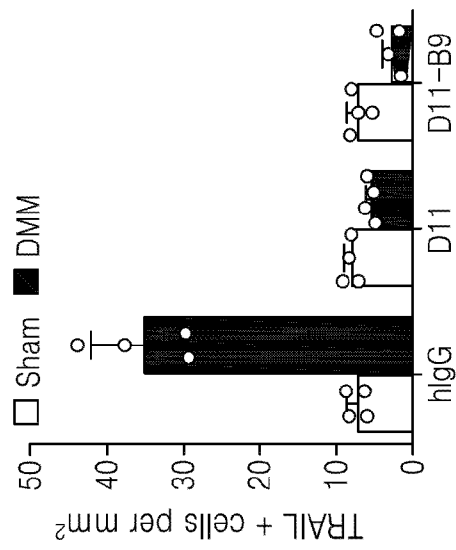
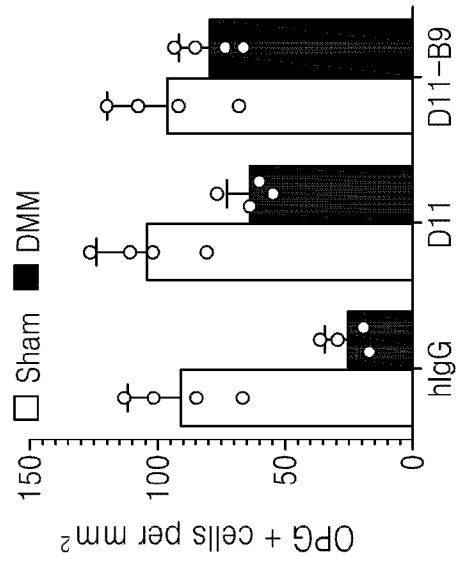
[도11]



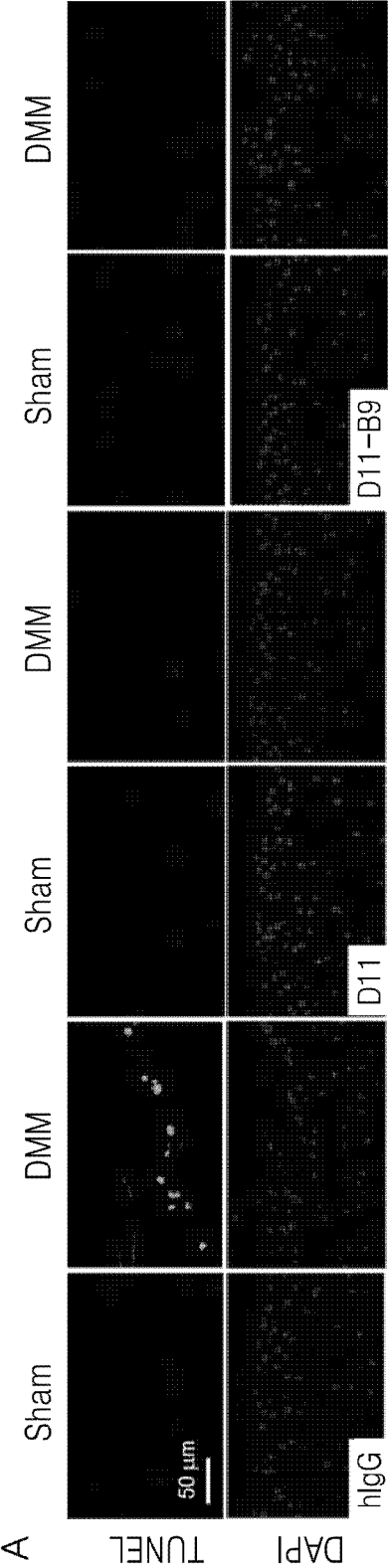
[도 12]



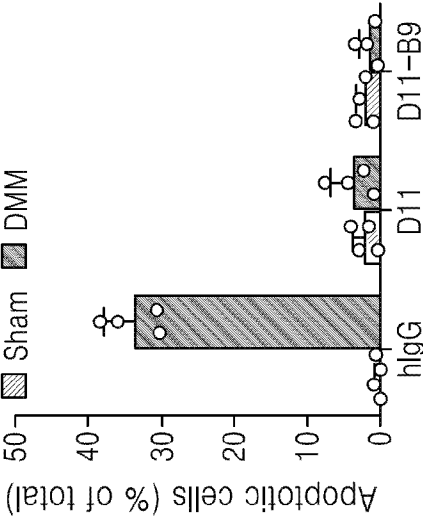
[도13]

**B****C**

[도14]



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/007086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28; A61K 39/395; C07K 16/18; C07K 19/00; C12N 15/62; G01N 33/68; A61P 19/02; G01N 33/50; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: osteoarthritis, anti-OSCAR antibody, collagen interaction, drug screening

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014-0056918 A1 (NOVO NORDISK A/S.) 27 February 2014 See paragraphs [0043], [0068], [0079], [0096], [0154]-[0157] and [0179]; and claim 1.	1-4
Y		9-11
A		5-8
Y	US 2017-0030925 A1 (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI) 02 February 2017 See paragraphs [0066]-[0069].	9-11
X	WO 2013-011063 A1 (NOVO NORDISK A/S.) 24 January 2013 See pages 4 and 17; and claims 1 and 5.	1-4
A	SCHULTZ, Heidi S. et al. OSCAR-collagen signaling in monocytes plays a proinflammatory role and may contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. European Journal of Immunology. 2016, vol. 46, pages 952-963 See abstract; and pages 959-960.	1-11
A	WO 2017-123642 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA et al.) 20 July 2017 See abstract; and claims 1-2.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 SEPTEMBER 2020 (04.09.2020)

Date of mailing of the international search report

04 SEPTEMBER 2020 (04.09.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/007086

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 12 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/007086

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2014-0056918 A1	27/02/2014	WO 2013-011059 A1	24/01/2013
US 2017-0030925 A1	02/02/2017	AU 2011-222558 A1	18/10/2012
		AU 2011-222558 B2	02/07/2015
		AU 2015-224468 A1	01/10/2015
		AU 2015-224468 B2	22/06/2017
		CA 2792163 A1	09/09/2011
		EP 2542701 A1	09/01/2013
		EP 2542701 A4	21/08/2013
		EP 3202919 A1	09/08/2017
		JP 2013-521505 A	10/06/2013
		JP 2015-079000 A	23/04/2015
		JP 5877799 B2	08/03/2016
		JP 5980299 B2	31/08/2016
		US 2011-0218116 A1	08/09/2011
		US 2014-0155499 A1	05/06/2014
		US 9488646 B2	08/11/2016
		US 9733257 B2	15/08/2017
		WO 2011-109738 A1	09/09/2011
WO 2013-011063 A1	24/01/2013	WO 2013-011061 A1	24/01/2013
WO 2017-123642 A1	20/07/2017	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28; A61K 39/395; C07K 16/18; C07K 19/00; C12N 15/62; G01N 33/68; A61P 19/02; G01N 33/50; A61K 39/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 퇴행성관절염osteoarthritis, 항-오스카 항체(anti-OSCAR antibody), 콜라겐 상호작용(collagen interaction), 약물 스크리닝(drug screening)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2014-0056918 A1 (NOVO NORDISK A/S) 2014.02.27 단락 [0043], [0068], [0079], [0096], [0154]-[0157], [0179]; 및 청구항 1 참조.	1-4
Y		9-11
A		5-8
Y	US 2017-0030925 A1 (THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI) 2017.02.02 단락 [0066]-[0069] 참조.	9-11
X	WO 2013-011063 A1 (NOVO NORDISK A/S) 2013.01.24 페이지 4, 17; 및 청구항 1, 5 참조.	1-4
A	SCHULTZ, HEIDI S. 등, "OSCAR-collagen signaling in monocytes plays a proinflammatory role and may contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis", European Journal of Immunology, 2016, 46권, 페이지 952-963 요약; 및 페이지 959-960 참조.	1-11
A	WO 2017-123642 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA 등) 2017.07.20 요약; 및 청구항 1-2 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 09월 04일 (04.09.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 09월 04일 (04.09.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 12
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다 (PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0056918 A1	2014/02/27	WO 2013-011059 A1	2013/01/24
US 2017-0030925 A1	2017/02/02	AU 2011-222558 A1	2012/10/18
		AU 2011-222558 B2	2015/07/02
		AU 2015-224468 A1	2015/10/01
		AU 2015-224468 B2	2017/06/22
		CA 2792163 A1	2011/09/09
		EP 2542701 A1	2013/01/09
		EP 2542701 A4	2013/08/21
		EP 3202919 A1	2017/08/09
		JP 2013-521505 A	2013/06/10
		JP 2015-079000 A	2015/04/23
		JP 5877799 B2	2016/03/08
		JP 5980299 B2	2016/08/31
		US 2011-0218116 A1	2011/09/08
		US 2014-0155499 A1	2014/06/05
		US 9488646 B2	2016/11/08
		US 9733257 B2	2017/08/15
		WO 2011-109738 A1	2011/09/09
WO 2013-011063 A1	2013/01/24	WO 2013-011061 A1	2013/01/24
WO 2017-123642 A1	2017/07/20	없음	