

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0053987 (43) 공개일자 2009년05월29일
(51) Int. Cl. <i>C07K 19/00</i> (2006.01)	(21) 출원번호 10-2007-0120616 (22) 출원일자 2007년11월26일 심사청구일자 2007년11월26일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내 (72) 발명자 전태훈 서울시 송파구 방이동 89 올림픽 아파트 236동 1802호 조규원 서울시 관악구 신림5동 1429-23 (74) 대리인 이문섭

전체 청구항 수 : 총 13 항

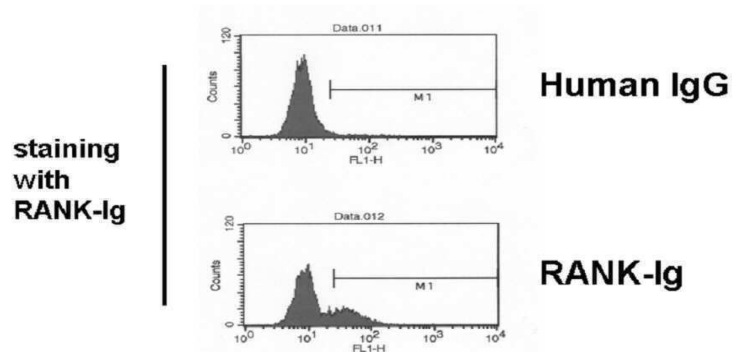
(54) 유세포 분석기를 이용한 신규한 RANK와 RANK리간드의 결합 분석방법

(57) 요약

본 발명은 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질, 그 융합 단백질의 유전자가 삽입된 재조합 벡터, 및 그 재조합 벡터로 형질전환된 동물세포에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 이용하여 랭크(RANK) 단백질과 랭클(RANKL) 단백질의 상호작용을 분석하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 사용하여 랭크 단백질과 랭클 단백질의 상호작용에 관하여 유세포 분석기를 통하여 간단하게 분석할 수 있다. 또한, 상기 분석방법을 이용하여 골흡수억제, 골형성증진, 골다공증, 골관절염, 다발성골수종, 과칼슘혈증 등 각종 골대사 이상으로 인한 질환의 치료제 개발에 있어서, 간단한 assay 를 통해 screening 을 수행할 수 있다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0603083

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술개발사업

연구과제명 이중이식장기 세포성 면역관용 유도 기술 개발

주관기관 생명자원연구소

연구기간 2007년 04월 01일 ~ 2008년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 N' 말단에 리더 펩타이드가 연결되고, 상기 랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 C' 부위에 인간 이뮤노글루블린 G 1 불변영역부위 (human Ig G1 Fc region) 가 연결된 것을 특징으로 하는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 랭크-이뮤노글루블린 (RANK-Ig) 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질.

청구항 4

제1항의 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 동물세포 발현 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 코딩하는 DNA는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 동물세포 발현 벡터.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 동물세포 발현벡터는 도 6의 개열지도를 갖는 재조합벡터(RANK-Ig/pLNCX2)인 것을 특징으로 하는 동물세포 발현벡터.

청구항 7

제4항에 따른 동물세포 발현벡터로 형질전환된 동물세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 동물세포는 CHO 세포인 것을 특징으로 하는 형질 전환된 동물세포.

청구항 9

서열번호 4의 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 도 2의 개열지도를 갖는 재조합 벡터.

청구항 10

제9항에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 CHO 세포.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 랭크 단백질과 랭클 단백질의 상호작용을 분석하는 방법:

- (a) 제10항에 따른 랭클 단백질을 발현하는 동물세포를 준비하는 단계;
- (b) 제1항에 따른 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질에 형광신호를 표지하는 단계;
- (c) 상기 (a)단계의 랭클 단백질을 발현하는 동물세포와 상기 (b)의 형광신호로 표지된 랭크-이뮤노글루블린 (RANK-Ig) 융합 단백질을 결합시키는 단계; 및

(d) 상기 (c)의 결합에 의한 형광 강도를 유세포 분석기로 측정하는 단계.

청구항 12

다음의 단계를 포함하는 랭크 단백질과 랭클 단백질의 상호작용 저해제의 분석방법:

- (a) 랭클 단백질을 과발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계;
- (b) 상기 동물세포에 제1항의 방법으로 생산되고, FITC로 표지된 유전자 재조합 랭크 단백질을 처리하는 단계; 및
- (c) 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 유세포 분석의 형광 강도가 감소하였는지를 측정하여 랭클 단백질과 상호작용이 감소되었는지 여부를 결정하는 단계.

청구항 13

다음의 단계를 포함하는 랭크 단백질과 랭클 단백질의 상호작용 촉진제의 분석방법:

- (a) 랭클 단백질을 과발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계;
- (b) 상기 동물세포에 제1항의 방법으로 생산되고, FITC로 표지된 유전자 재조합 랭크 단백질을 처리하는 단계; 및
- (c) 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 유세포 분석의 형광 강도가 증가하였는지를 측정하여 랭클 단백질과 상호작용이 증가하였는지 여부를 결정하는 단계.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 유세포 분석기를 이용한 새로운 RANK와 RANK 리간드의 결합 분석 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 N' 말단에 리더 펩타이드가 연결되고, 상기 랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 C' 부위에 인간 이뮤노글로불린 G 1 불변영역부위 (human Ig G1 Fc region) 가 연결된 것을 특징으로 하는 랭크-이뮤노글로불린(RANK-Ig) 융합 단백질과 이를 이용한 랭크(RANK) 단백질과 랭클(RANKL) 단백질의 상호작용을 분석하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 뼈의 항상성(Bone homeostasis)을 위해서는 파골세포(osteoclast)를 통한 뼈의 재흡수(bone resorption)와 조골세포(osteoblast)를 통한 뼈생성(bone formation) 간의 균형이 유지되어야 한다(Manolagas, 2000). Bone remodeling이라고 불리는 이러한 생리학적 과정은 다양한 분자적 신호들에 의해 매우 엄격하게 조절되는데, 만약 이러한 균형이 무너져서 파골세포의 활성이 조골세포의 활성보다 더 커지게 되면 자가면역질환인 골다공증 등으로 발전된다(Pacifici, 1996). 노령화사회에서는 이러한 뼈 관련 질병이 큰 사회적 문제로 대두되고 있다.
- <3> *뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 멈추지 않고 죽는 날 까지 오래된 뼈를 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 매우 역동적, 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 된다. 이를 골재형성(bone remodeling) 이라고 한다 (Yamaguchi A. et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso., 50(6Suppl), pp.664-669, 2005). 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 뼈의 순환(turnover)은 성장과 스트레스에 의해서 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 적절히 뼈의 기능을 유지하는데 필수적이다(Cohen-Solal M. et al., Therapie., 58(5), pp.391-393, 2003). 골재형성에는 크게 두 종류의 세포가 관여하는 것으로 알려져 있다. 두 세포 중 하나는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)이고, 다른 하나는 뼈를 파괴하는 파골세포 (osteoclast)이다. 조골세포는 RANKL(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)와 이것의 유도 수용체(decoy receptor)인 OPG(osteoprotegerin)을 생성한다. RANKL이 파골

전구세포(osteoclast progenitor cells) 표면에 있는 수용체인 RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B)에 결합하면 파골 전구 세포가 파골세포로 성숙화(maturation)되어 골 흡수(resorption)가 일어난다. 그러나 OPG가 RANKL과 결합하면 RANKL과 RANK간 결합이 차단되어 파골세포의 형성이 억제되고 필요 이상의 골 흡수가 일어나지 않게 된다(Theill LE. et al., Annu Rev Immunol., 20, pp.795-823, 2002; Wagner EF. et al., Curr Opin Genet Dev., 11, pp.527-532, 2001). 오래된 뼈의 흡수 또는 파괴는 혈액세포(조혈모세포)에서 생기는 파골세포에 의해 이루어지며 이는 뼈에 구멍을 내어 적은 양의 칼슘이 혈류로 방출되어 신체기능을 유지하는데 사용된다(William J. et al., Nature., 423, pp.337-342, 2003). 한편 뼈세포에서 생성된 조골세포는 교원질로 구멍을 채우고 칼슘과 인의 침착물(hydroxyapatite)을 덮어서 단단한 새로운 뼈를 만들어 골격을 재건한다(Stains JP. et al., Birth Defects Res C Embryo Today., 75(1), pp.72-80, 2005). 뼈가 파괴되기 시작하여 다시 새로운 뼈로 재형성되기까지는 약 100일 정도 걸린다(Schwarz EM. et al., Curr Opin Orthop., 11, pp.329-335, 2000). 유아에서는 1년 내에 뼈의 칼슘이 100% 바뀌지만 성인에서는 매년 골격의 약 10-30%가 이런 과정을 통하여 재형성되며, 파골속도와 조골속도의 활성이 동일해야 전과 같은 골밀도를 유지할 수 있다.

<4> 파골세포는 뼈의 표층에서 자라는 단핵세포/대식세포 계열의 조혈모세포에서 기원하여 여러 호르몬, 성장조절인자, 사이토카인의 영향을받아 전구세포들의 융합(fusion)에 의해 분화하는 것으로 알려져 있으나 그 기전은 아직 명확히 규명되지 않았다. 다만, 시험관내에서 혼합된 골수세포, 말초혈액의 단핵세포 및 비장세포는 모두 분화하여 파골세포로 분화될 수 있다고 알려져 있으며, 파골세포 발달을 촉진하는 대표적인 물질로는 $1\alpha, 25$ -디하이드록시 비타민 D3 [$1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃; $1, 25$ -(OH)₂D₃]가 알려져 있다. 또한, 기저세포/조골세포로부터 기인한 어떤 인자가 파골세포를 닮은 다핵세포를 형성하기 위한 전구세포의 융합유도에 필수적임이 보고되었다. 파골세포 생성에 중요한 분자적 신호에는 RANK ligand (receptor activator of nuclear factor κ B)와 M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)가 있다. 이러한 단백질들은 주위의 기질세포, 조골세포 및 활성화된 면역세포들로부터 제시되며 파골세포 전구체로 하여금 성숙한 파골세포로 분화하도록 촉진한다(Anderson et al., 1997).

<5> RANK(Receptor activator of nuclear factor κ B)는 종양괴사인자 수용체족[tumor necrosis factor receptor(TNFR) superfamily]의 일원이다. TNFR은 염증 반응 및 면역 반응과 관련하여 세포 증식, 분화 및 세포자살(apoptosis)에 관여한다. 상기 TNFR에는 제1형 및 제2형 TNF 수용체(TNFR1 및 TNFR2), Fas, CD27, 4-1BB 및 CD30과 같은 세포-표면 수용체 그룹이 포함된다. TNFR의 시그널링은 수용체와 리간드의 결합에 의해 개시된다(Baker and Reddy, Oncogene, 17, 3261-3270 (1998)).

<6> RANK-L는 종양괴사인자(TNF : tumor necrosis factor) 계열의 한 구성원으로서 세포생성(osteoclastogenesis)에 필수적인 요소이다(Guo et al., 1998). RANK-L 유전자가 제거된 쥐는 파골세포가 결핍되어 있으며, 골화석증(osteopetrosis) 및 치아맹출(tooth eruption) 장애등의 형질을 나타낸다(Guo et al., 1998). 또한 RANK-L는 파골세포 표면의 RANK와 결합하여 NF- κ B (nuclear factor- κ B)와 NFATc1 (nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1)를 활성화시킨다(Bekker et al., 2004). 즉, RANK-L와 RANK간의 상호작용은 파골세포생성을 조절하는 주요한 기작이며, 골다공증을 치료하기 위한 의학적 전략에 있어 매우 중요한 의미를 지닌다.

<7> TRAP(Tartrate resistant acid phosphatase)은 포유류에서 발견되는 glycosylated monomeric metalloenzyme으로서 파골세포에 매우 높게 발현되고, 세포의 ruffled border area, lysosomes, Golgi cisternae 및 vesicles 안에 위치한다(Jimi et al., 1999). TRAP은 골다공증 환자에게서도 높게 발현되며, 파골세포의 표지인자로 알려져 있고, 성숙한 파골세포로의 분화 및 성장에 필요하다. TRAP assay는 단핵구로부터 파골세포로의 분화 시킨 후, TRAP을 염색시켜서 파골세포의 수를 측정하는 방법이다(Lacey et al., 1995).

<8> 파골세포를 통한 뼈의 재흡수(bone resorption)과정에서 cathepsin K는 ruffled border로부터 resorptive pit로 분비된다(Matsuzaki et al., 1998). cathepsin K는 type I collagen과 다른 noncollagenous 단백질들을 분해하는 단백질 분해효소이다(Teitelbaum, 2007). 이때 resorptive pit는 산성 환경을 제공해주어 이러한 단백질들을 탈염(demineralization)시킨다(Teitelbaum, 2007). 이는 결국 TRAP으로 하여금 ROS를 생성시켜 bone resorption products를 분해하게 만든다. 즉, Pit formation은 파골세포가 뼈를 파괴하는 과정에서 생기는 주요한 특징이다. Pit formation assay는 단핵구로부터 파골세포로의 분화 시킨 후 pit가 얼마나 형성되었는지를 측정하는 방법이다(Fuller et al., 1998).

<9> TRAP assay나 Pit formation assay는 골 대사 관련인자 또는 그들의 작용에 의한 표현형의 변화를 관찰할 수 있는 직접적인 분석방법으로 현재 임상에서 널리 사용되고 있으나, 이들 assay를 사용하여 골 대사 관련 질환의

진단에 이용하는 경우 여러 단계의 과정을 거치게 되어 최소한 3, 4주의 오랜 기간이 소요된다. 또한 TRAP assay 나 Pit formation assay는 단핵구로부터 파골세포로의 분화과정을 거치므로, 상기 분화과정에 필요한 M-CSF 와 soluble RANK-L 와 같은 싸이토카인이나 시약을 많이 필요로 하여 경제적인 문제점을 야기한다.

<10>

<11>

이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질과 이를 이용하여 랭크(RANK) 단백질과 랭클(RANKL) 단백질의 상호작용을 유세포 분석기로 분석하는 경우, 간단하게 RANK와 RANKL의 친화도를 측정 할 수 있고, 더 나아가서 각종 골대사 이상으로 인한 질환의 치료제 개발에 있어서, 간단한 assay를 통해 screening 을 수행할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<12>

따라서, 본 발명의 주된 목적은 기존의 TRAP assay 나 Pit formation assay에 비해 간단하고 신속하게 유세포 분석기를 통하여 RANK와 RANKL의 친화도를 측정 할 수 있는 장점을 갖는 신규한 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질과 이를 이용한 랭크(RANK) 단백질과 랭클(RANKL) 단백질의 상호작용을 분석하는 방법을 제공하는 데 있다.

<13>

본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 RANK와 RANK 리간드의 결합 분석방법을 이용하여 간단하게 랭크(RANK)와 랭클(RANKL)의 친화도를 측정 할 수 있으며, 더 나아가서 각종 골대사 이상으로 인한 질환의 치료제 개발에 있어서, 간단한 assay를 통해 screening 을 수행할 수 있다.

과제 해결수단

<14>

본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 N' 말단에 리더 펩타이드가 연결되고, 상기 랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 C' 부위에 인간 이뮤노글루블린 G 1 불변영역부위 (human Ig G1 Fc region) 가 연결된 것을 특징으로 하는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 제공한다(도 6).

<15>

본 발명의 상기 '리더 펩타이드'는 분비성 단백질 전구체의 N-말단에 존재하고, 또한 천연 성숙 단백질에는 존재하지 않는 서열을 나타내며, '리더 펩타이드'는 단백질 전구체로부터 절단된 펩타이드를 나타낸다. 일반적으로 리더 서열은 세포 외로의 분비에 따라 프로테아제(일반적으로 시그날 펩티다제라고 호칭된다)에 의해 절단된다. 이러한 리더 펩타이드는 생물종을 초월하여 일정한 공통된 서열상의 특징을 갖지만 어떤 생물종으로 분비기능을 나타내는 리더 펩타이드가 다른 생물종에서도 반드시 분비기능을 발휘한다는 것은 아니다. 프리프로 단백질 또는 프리 단백질에서, 당해 리더 펩타이드는 상이한 단백질 유래일 수 있거나, 목적 단백질에 천연으로 존재하는 리더 펩타이드일 수 있고, 사용하는 숙주의 분비형 단백질 유래가 바람직하다. 또는 사용하는 숙주의 코돈 사용 빈도에 따라 최적의 코돈을 갖도록 변형할 수 있다. 또한 본 발명의 목적에 사용할 수 있는 리더 펩타이드는 이로부터 유래하는 천연 성숙 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 일부 함유할 수 있다. 본 발명에서는 구체적으로 "MAPRRRRRPLFALLLLCALLARLQVAL"의 아미노산 서열을 갖는 리더 펩타이드를 사용하였다. 본 발명의 상기 '랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위'는 랭크 단백질에서 랭클 단백질과 결합하는 도메인의 특정 부위를 말하며, 상기 '이뮤노글루블린 G 1 불변영역부위'는 항체의 불변 부위를 코딩하는 도메인 부위이다. 본 발명의 상기 도메인 부위들은 이의 정상형의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 변이체를 포함한다. 단백질의 변이체란 야생형의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자적 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).

<16>

본 발명의 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질에서, 상기 랭크 (RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클 (RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위는 랭클과 결합할 수 있는 야생형 아미노산 서열 및 이들의 변이체를 포함하나, 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열인 것이 좋다. 또한, 본 발명의 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질에서, 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질은 발현

되어 세포 외로 분비될 수 있고, 랭클과 결합할 수 있으며, 유세포 분석기를 이용한 분석이 용이하게 Fc 도메인을 갖는 어떠한 융합 단백질도 될 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열인 것이 좋다. 본 발명의 실시예 4에서는 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 유전자 조작기법을 사용하여 생산하였다.

- <17> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 동물세포 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 발현벡터는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. “작동 가능하게 연결 (operably linked)” 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. 상기 “발현 조절 서열(expression control sequence)” 이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 플라스미드의 예로는 대장균 유래 플라스미드 (pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119, pET-22b(+)), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드 (pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드 (YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 있으며 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스와 같은 곤충 바이러스가 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 숙주세포에 도입시키는데 적합한 벡터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 발현 벡터 pLNCX2 벡터(Clontech사)에 삽입하여 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 위한 재조합 플라스미드(RANK-Ig/pLNCX2)를 제작하였다(도 6). 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 위한 재조합 플라스미드(RANK-Ig/pLNCX2)는 리더 펩타이드를 포함하는 랭크 단백질의 랭클 결합부위를 코딩하는 DNA를 벡터에 클로닝하는 단계 및 상기 (a)단계에서 생성된 재조합 벡터에 인간 이뮤노글루블린 G 1 불변영역부위를 코딩하는 DNA를 랭크 단백질의 랭클 결합부위를 코딩하는 DNA의 3' 쪽에 위치하도록 도입하는 단계에 의해 제작할 수 있다(실시예 4).
- <18> 본 발명의 동물세포 발현 벡터에서, 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 코딩하는 DNA는 발현되어 세포 외로 분비될 수 있고, 랭클과 결합할 수 있으며, 유세포 분석기를 이용한 분석이 용이하게 Fc 도메인을 갖는 어떠한 융합 단백질을 코딩하는 DNA도 될 수 있으나 서열번호 3의 염기서열인 것이 바람직하다.
- <19> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 동물세포 발현 벡터로 형질전환된 동물세포를 제공한다. 본 발명의 동물세포는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 발현하여 분비할 수 있는 어떤 동물세포도 사용가능하나, CHO 세포, COS-7 (Monkey, African green) 세포, NIH/3T3 (Mouse fibroblast) 세포, BHK-21 (Baby Hamster Kidney, Syrian golden) 세포, Hela (Human carcinoma) 세포, Vero (Monkey kidney, African green) 세포, 및 C127 (Mouse) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이 바람직하며, CHO 세포를 사용하는 것이 높은 형질전환율로 인하여 더욱 바람직하다.
- <20> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 단백질을 코딩하는 서열번호 4의 DNA를 포함하는 도 2의 개열지도도를 갖는 재조합 벡터(RANK-L/pLNCX2)를 제공한다.
- <21> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 단백질을 코딩하는 DNA를 갖는 재조합 벡터로 형질전환된 CHO 세포를 제공한다. 상기 동물세포는 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 단백질을 발현할 수 있는 어떤 동물세포도 사용가능하나, CHO 세포를 사용하는 것이 높은 형질전환율로 인하여 더욱 바람직하다.
- <22> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 랭크 단백질과 랭클 단백질의 상호작용을 분석하는 방법을 제공한다:
- <23> (a) 제10항에 따른 랭클 단백질을 발현하는 동물세포를 준비하는 단계;
- <24> (b) 제1항에 따른 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질에 형광신호를 표지하는 단계;
- <25> (c) 상기 (a)단계의 랭클 단백질을 발현하는 동물세포와 상기 (b)의 형광신호로 표지된 랭크-이뮤노글루블린

(RANK-Ig) 융합 단백질을 결합시키는 단계; 및

<26> (d) 상기 (c)의 결합에 의한 형광 강도를 유세포 분석기로 측정하는 단계.

<27> 상기 (b)단계의 형광신호는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 인지 가능케 하는 당업계에서 공지된 어떠한 형광물질을 사용하여 표시할 수 있으나, 바람직하게는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질이 이뮤노글루블린의 불변부위를 포함하므로, 불변부위를 인식하여 결합하고 형광신호를 표시하는 2차 항체를 사용하여 표시하는 것이 바람직하다. 본 발명의 실시예 6에서는 FITC로 표시된 2차 항체(FITC anti-human IgG, BD pharmingen)를 사용하여 랭크 단백질과 랭글 단백질의 상호작용을 분석하였다. 본 발명의 유세포 분석기를 이용한 랭크 단백질과 랭글 단백질의 상호작용 분석은 기존의 TRAP assay 또는 Pit formation assay를 사용하여 파골세포의 활성을 관찰한 결과와 동일한 결과를 갖는데, 이는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 동물세포에 처리하고, 각각 본 발명의 방법과 TRAP assay 또는 Pit formation assay를 수행한 결과 모든 경우에 파골 세포의 수치 감소, 및 골 흡수의 저해현상을 관찰할 수 있기 때문이다(도 8, 도 9).

<28> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 랭크 단백질과 랭글 단백질의 상호작용 저해제 또는 촉진제의 분석방법을 제공한다:

<29> (a) 랭글 단백질을 과발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계;

<30> (b) 상기 동물세포에 제1항의 방법으로 생산되고, FITC로 표시된 유전자 재조합 랭크 단백질을 처리하는 단계; 및

<31> (c) 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 유세포 분석의 형광 강도가 감소 또는 증가하였는지를 측정하여 랭글 단백질과 상호작용의 감소 또는 증가 여부를 결정하는 단계.

<32> 상기 (a) 단계에서, 상기 동물세포는 의도적으로 랭글 단백질을 과발현하는 재조합벡터(실시예 1 참조)로 트랜스펙션 시킬 수도 있다. 상기 (c) 단계에서, 랭글 단백질과 상호작용이 감소 또는 증가하는지 여부는 유세포 분석의 형광 강도가 감소 또는 증가하였는지를 관찰하여 측정할 수 있다. 형광 강도가 감소하는 경우 랭글 단백질과 상호작용이 감소하는 것이고, 형광 강도가 증가하는 경우 랭글 단백질과 상호작용이 증가하는 것이다. 본 발명에서 상기 분석 방법에 의해 스크린한 랭크 단백질과 랭글 단백질의 상호작용 저해제는 인체내에서 파골세포의 분화를 억제할 수 있기 때문에 골흡수억제, 골형성증진, 골다공증, 골관절염, 다발성골수종, 과칼슘혈증의 치료 또는 예방제의 용도로 사용될 수 있다. 또한 본 발명에서 상기 분석 방법에 의해 스크린한 랭크 단백질과 랭글 단백질의 상호작용 촉진제는 인체내에서 파골세포의 분화를 촉진할 수 있기 때문에 골석화증, 치아맹출의 치료 또는 예방제의 용도로 사용될 수 있다.

<33> 이하, 본 발명의 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질과 이를 이용한 랭크(RANK) 단백질과 랭글(RANKL) 단백질의 상호작용을 분석하는 방법을 단계별로 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<34> 실시예 1. 랭글(RANK 리간드)을 코딩하는 재조합 벡터의 구축

<35> 1) PCR 반응 수행에 의한 랭글(랭크 리간드) 유전자의 cDNA 생산

<36> 사람 PBMC (peripheral blood mononuclear cells)에 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1ml당 200 μ l의 chloroform (Sigma)을 넣어 mRNA를 채취하였고, 추출한 2 μ g의 mRNA를 주형으로 Random hexamer (Invitrogen, Cat.No.51709)와 역전사 효소인 SuperscriptIII (Invitrogen)를 사용하여 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 복제하였다. 상기 cDNA를 주형으로 PCR 프라이머(정방향 프라이머 : 5'- GCC AGC AGA GAC TAC ACC AAG TAC CT -3' , 역방향 프라이머 : 5'- GGG CTC AAT CTA TAT CTC GAA CTT T -3')를 사용하여, TC-312 (Barloworld Scientific Ltd., UK)기기에서 PCR 반응(Denaturation : 95 $^{\circ}$ C 3 min; 35 cycle : 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 60 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 1 min; Final extension : 72 $^{\circ}$ C 10 min)을 수행하였다.

<37> 2) 재조합 벡터의 구축

<38> 증폭된 cDNA를 pGEM[®] T Easy Vector(회사 : Promega, USA)에 T4 리가아제를 사용하여 도입하였다(도 1). pGEM[®] T Easy Vector의 MCS (Multiple cloning site)에 존재하는 NotI 제한효소자리를 이용하여, 5' 과 3' 양쪽에

NotI 제한효소자리를 포함하는 RANK 리간드 유전자의 cDNA를 pLNCX2 벡터의 NotI 제한효소자리에 T4 리가아제를 사용하여 도입하였다(도 2).

<39> **실시예 2. 형질전환 및 RANK 리간드 단백질의 발현**

<40> 실시예 1에서 생성된 RANK 리간드 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 virus packaging cell line인 293GPG에 Lipofectamine (Invitrogen) 을 사용하여 도입하였다. 여기서 나온 virus를 CHO cell trasnduction 하여 neomycin으로 selection 하였다. 일반적으로 리포솜을 이용한 트랜스펙션은 유전자의 발현 기간이 일시적(transient)인 반면 293GPG 세포를 거쳐 형질전환하면 더욱 안정적으로 발현이 유지되고, 타겟 세포에 독성을 거의 주지 않는 장점이 있기때문에 293GPG 세포를 거쳐 CHO cell로 형질전환을 시켰다. 293GPG 세포와 CHO cell 세포를 배양시 DMEM (10% FBS, 5% penicillin/streptomycin) 배지에서 37℃, 5% CO2 조건으로 배양하였다.

<41> **실시예 3. Anti-RANK 리간드 antibody를 사용한 RANK 리간드를 발현 여부**

<42> 실시예 2에서 생산한 RANK 리간드를 발현하는 CHO 세포를 FITC로 표지된 anti-RANK 리간드 antibody(eBioscience)로 염색하였고, 유세포분석법(FACS Calibur, BD bioscience)을 통해 형광강도(Fluorescence intensity)를 측정하였다(도 3). 실험결과를 통해 RANK 리간드가 CHO 세포에 효과적으로 발현한다는 것을 알 수 있었다.

<43> **실시예 4. 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 코딩하는 재조합 벡터의 구축**

<44> 사람 PBMC (peripheral blood mononuclear cells)에 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1ml당 200μl의 chloroform (Sigma)을 넣어 mRNA를 채취하였고, 추출한 2μg의 mRNA를 주형으로 Random hexamer (Invitrogen, Cat.No.51709)와 역전사 효소인 SuperscriptIII (Invitrogen)를 사용하여 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 복제하였다. 상기 cDNA를 주형으로 PCR 프라이머(정방향 프라이머 : 5'- TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT A -3', 역방향 프라이머 : 5'- CCA CAA GCC TCA TTG ATC CAG T -3')를 사용하여, TC-312 (Barloworld Scientific Ltd., UK)기지에서 PCR 반응(Denaturation : 95℃ 3 min; 35 cycle : 95℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min; Final extension : 72℃ 10 min)을 수행하였다. PCR 반응 결과 RANK 유전자의 랭클 결합부위를 코딩하는 DNA 절편을 생산하였다. 상기 DNA 절편을 pGEM[®] T Easy Vector(Promega, USA)의 제한효소 부위에 cloning하였다. 상기 생산된 RANK/T-easy construct를 template로 하여 PCR 반응을 3회 수행하였다. 첫 번째 PCR 반응시 5' 프라이머로 [5'-GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC CAG ATC GCT CCT CCA-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG CAA GTA AAC ATG GGG TT-3']을 사용하였고, 두 번째 PCR 반응시 5' 프라이머로 [5'-CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG CAA GTA AAC ATG GGG TT-3']을 사용하였으며, 세 번째 PCR 반응시 5' 프라이머로 [5'-CCG CTC GAG ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG CAA GTA AAC ATG GGG TT-3']을 사용하였다(도 4). 이와 같은 3회 PCR 반응을 수행한 결과 리더펩타이드 서열을 코딩하는 DNA와 RANK 유전자의 랭클 결합부위를 코딩하는 DNA로 이루어진 DNA 단편을 생산하였다. 상기 5' 프라이머는 IgkB leader peptide를 코딩하는 유전자 부위와 Xho I site를 포함하도록 합성하였고, 3' 프라이머는 Sma I site를 포함하도록 합성하였다. 상기 프라이머 세트르 PCR 반응을 수행한 최종 결과물을 pBluescript II KS vector(stratagene 사)의 Xho I 및 Sma I 제한효소 부위에 삽입하였다.

<45> 인간 면역 글루블린 G1 불변부위 부분(Human IgG1 Fc region)을 클로닝 하기 위해 Human IgG1 cDNA를 주형으로 5' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG GAG CCC AAA TCT TGT GAC-3'] 및 3' 프라이머로 [5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTC ATT TAC CCG GGG ACA G-3']을 사용하였다. 5' 프라이머는 Sma I site를 포함하도록 합성하였고(Xho I site 포함), 3' 프라이머는 Not I site를 포함하도록 합성하였다. 생성된 PCR 산물을 Sma I 및 Not I 제한효소로 처리하여 IκB-RANK가 들어있는 pBluescript II KS vector에 삽입하였다(도 5).

<46> 상기 Leader-RANK-Human IgG1 Fc region이 들어있는 pBluescript II KS vector를 Xho I / Not I으로 enzyme digestion 한 후, insert를 pLNCX2 retroviral vector에 삽입하여 RANK-Ig/pLNCX2 벡터를 구축하였다(도 6).

<47> **실시예 5. 형질전환 및 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질의 발현**

<48> 실시예 4에서 생성된 RANK 리간드 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터(RANK-Ig/pLNCX2)를 실시예 2와 같은 방법으로 virus packaging cell line인 293GPG에 transfection 하였고, 여기서 나온 virus를 CHO cell로 trasnduction 하여 neomycin으로 selection 하였다.

<49> 실시예 6. 유세포 분석기를 이용한 RANK-Ig의 RANK-L 결합 확인

<50> RANK 리간드를 발현시킨 실시예 2의 CHO 세포에 실시예 5의 형질전환된 CHO cell에 의해 생산된 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 처리하였다. 상기 처리된 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 표지하기 위하여 형광표지를 발생하는 FITC로 표지한 항체인 FITC anti-human IgG(BD pharmingen, Cat.No. 555786)로 처리하였다. 상기 처리과정을 거친 CHO 세포를 유세포 분석기로 분석하였다(도 7). 실험결과를 통해 RANK-Ig가 CHO 세포에 발현된 RANK 리간드에 효과적으로 결합한다는 것을 알 수 있었다. 본 발명의 유세포 분석기를 이용한 랭크 단백질과 랭클 단백질의 상호작용 분석은 기존의 TRAP assay 또는 Pit formation assay를 사용하여 파골세포의 활성을 관찰한 결과와 동일한 결과를 갖는데, 이는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 동물 세포에 처리하고, 각각 본 발명의 방법과 TRAP assay(도 8) 또는 Pit formation assay(도 9)를 수행한 결과 모두 파골 세포의 수치 감소 또는 골 흡수의 저해현상을 관찰할 수 있었기 때문이다.

<51> 실시예 7. TRAP assay와 유세포 분석기를 이용한 실험결과의 상관관계

<52> 사람의 PBMC로부터 단핵구를 분리하여 6 well plate에 2×10^6 cell/ml의 농도로 분주하고 파골세포로의 분화 및 성장에 필요한 사람 M-CSF 와 soluble RANK-L를 처리해주었다. 이와 동시에 실시예 5의 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질과 control-Ig를 처리하고 2-3주 동안 배양하였다. 이후 Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit(Sigma-Aldrich, Cat.No.: 386A)를 사용하여, TRAP 염색을 하였다. TRAP 양성인 파골세포의 수를 측정하였다. RANK-Ig를 처리한 실험군이 대조군에 비해 TRAP 양성 파골세포의 수가 매우 감소함을 관찰하였다(도 8). 이것은 TRAP assay와 유세포 분석기를 이용한 실험결과가 밀접한 상관관계가 있음을 보여준다.

<53> 실시예 8. Pit formation assay와 유세포 분석기를 이용한 실험결과의 상관관계

<54> 실시예 3과 같은 방법으로 파골세포를 분화시켰을 때 실시예 5의 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 처리한 실험군이 대조군에 비해 Pit 생성 정도가 매우 낮음을 관찰하였다(도 9). 이것은 Pit formation assay와 유세포 분석기를 이용한 실험결과가 밀접한 상관관계가 있음을 보여준다.

<55> [참고문헌]

Anderson DM, Maraskovsky B, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L 1997 A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 390:175-179

Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM 2004 A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. J Bone Miner Res 19:1059-1066

Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ 1998 TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. J Exp Med 188:997-1001

Guo J, Delaney J, Boyle WJ 1998 Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93:165-176

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ 1999 Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci U S A 96:3540-3545

Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T 1999 Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. J Immunol 163:434-442

<56>

Lacey DL, Timms B, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Manolagas SC, Jilka RL 1995 Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332:305-311

Manolagas SC 2000 Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21:115-137

Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, Morinaga T, Toyama Y, Yabe Y, Higashio K, Suda T 1998 Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 246:199-204

Pacifici R 1996 Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 11:1043-1051

Teitelbaum SL 2007 Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 170:427-435

<57>

산업이용 가능성

<58>

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질, 그 융합 단백질의 유전자가 삽입된 재조합 벡터, 및 그 재조합 벡터로 형질전환된 동물세포를 생산할 수 있다. 또한 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 이용하여 랭크(RANK) 단백질과 랭클(RANKL) 단백질의 상호작용을 분석할 수 있다.

<59>

본 발명에 따르면, 상기 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 사용하여 랭크 단백질과 랭클 단백질의 상호작용에 관하여 유세포 분석기를 통하여 간단하게 분석할 수 있다. 또한, 상기 분석방법을 이용하여 골흡수 억제, 골형성증진, 골다공증, 골관절염, 다발성골수종, 과갈습혈증 등 각종 골대사 이상으로 인한 질환의 치료제 개발에 있어서, 간단한 assay 를 통해 screening 을 수행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<60>

도 1은 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 벡터(RANK-1/T-easy)의 개열지도이다.

<61>

도 2는 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 벡터(RANK-1/pLNCX2)의 개열지도이다.

<62>

도 3은 랭클(RANK-L) 단백질이 CHO 세포에 발현됨을 나타내는 도면이다.

<63>

도 4는 Leader-RANK 유전자의 랭클 결합부위를 코딩하는 DNA 절편을 합성하기 위한 PCR 과정과 그 프라이머를 나타낸다.

<64>

도 5는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 PBS II KS 벡터에 도입하여 생성시킨 재조합 벡터의 개열지도이다.

<65>

도 6은 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질을 pLNCX2 벡터에 도입하여 생성시킨 재조합 벡터의 개열지도이다.

<66>

도 7은 유세포 분석기를 이용하여 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질과 랭클(RANK-L) 단백질이 결합함을 나타내는 도면이다.

<67>

도 8은 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질 처리 후, TRAP assay를 실시하여 파골세포의 수를 측정한 결과이다.

<68>

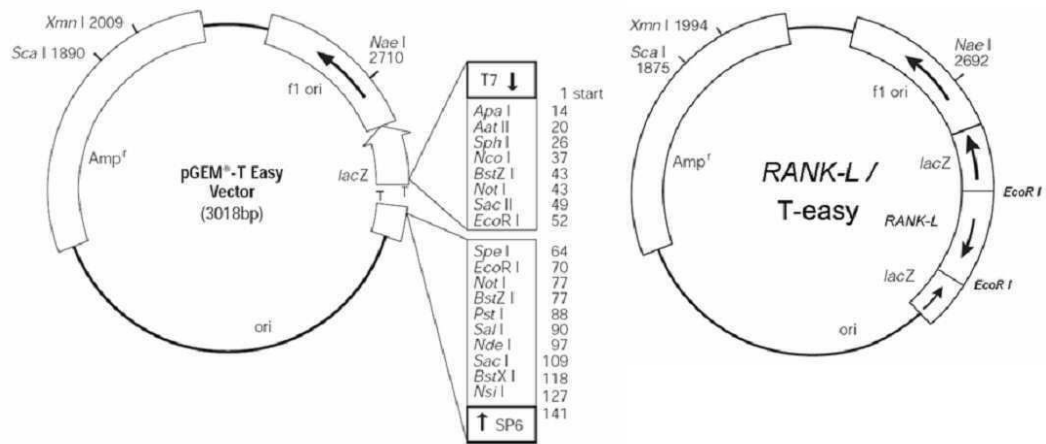
도 9는 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질 처리 후, Pit formation assay를 실시하여 파골세포의 수를 측정한 결과이다.

<69>

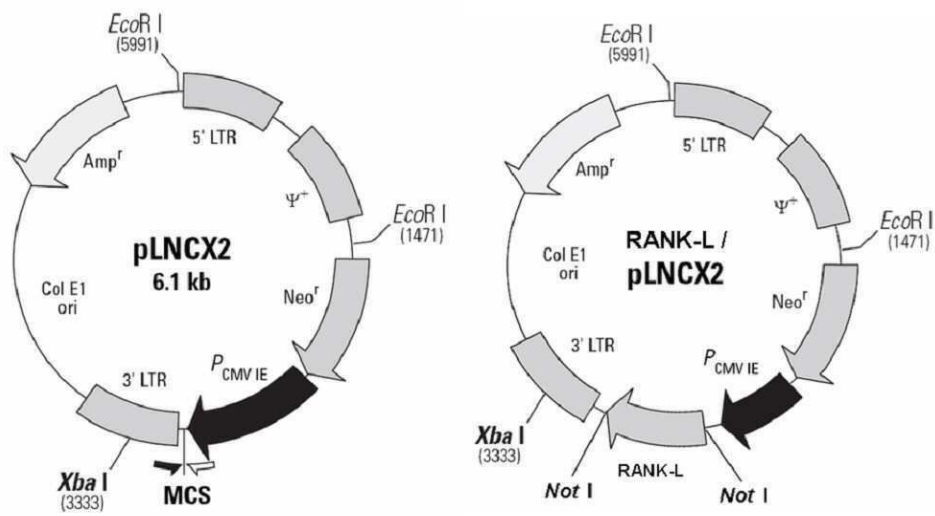
도 10은 랭크-이뮤노글루블린(RANK-Ig) 융합 단백질의 모식도를 나타낸다.

도면

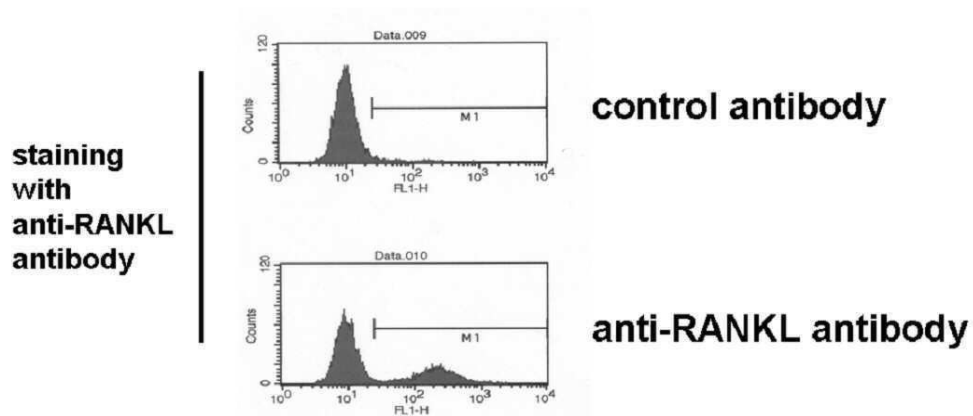
도면1



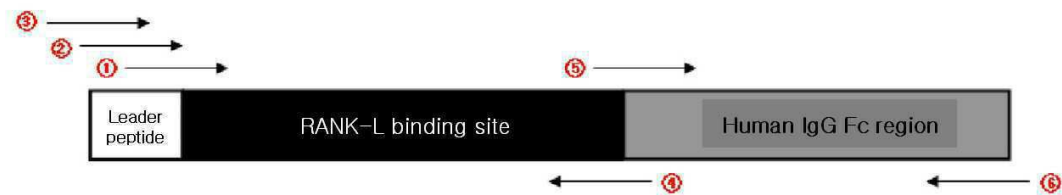
도면2



도면3

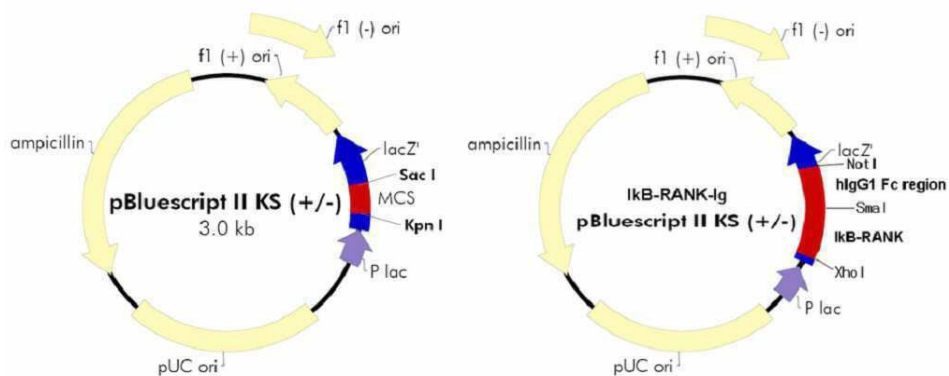


도면4

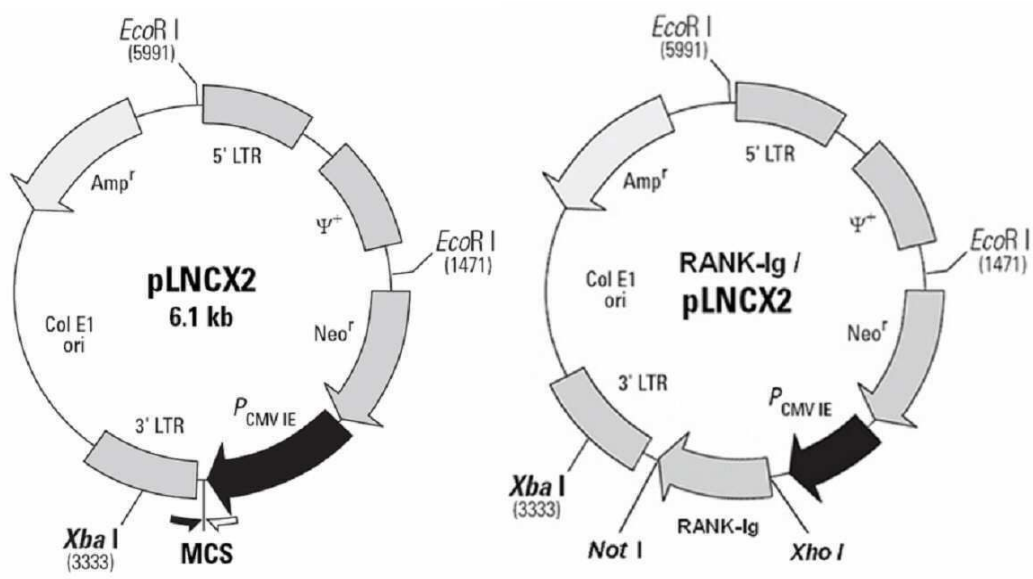


- ① hRANK-IkB Forward 1 : 5'-GTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGATCGCTCCTCCA-3'
 ② IkB unit Forward 1 : 5'-CTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC-3'
 ③ IkB unit Forward 2 : 5'-CCGCTCGAGATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTA-3'
 ④ RANK Reverse (Sma I) : 5'-TCCCCCGGGCAAGTAAACATGGGGTT-3'
 ⑤ hIgG Forward (Sma I) : 5'-TCCCCCGGGGAGCCCAAATCTTGTGAC-3'
 ⑥ hIgG Reverse (Not I) : 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTACCCGGGGACAG-3'

도면5

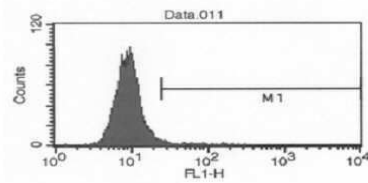


도면6

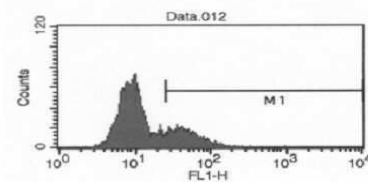


도면7

staining
with
RANK-Ig

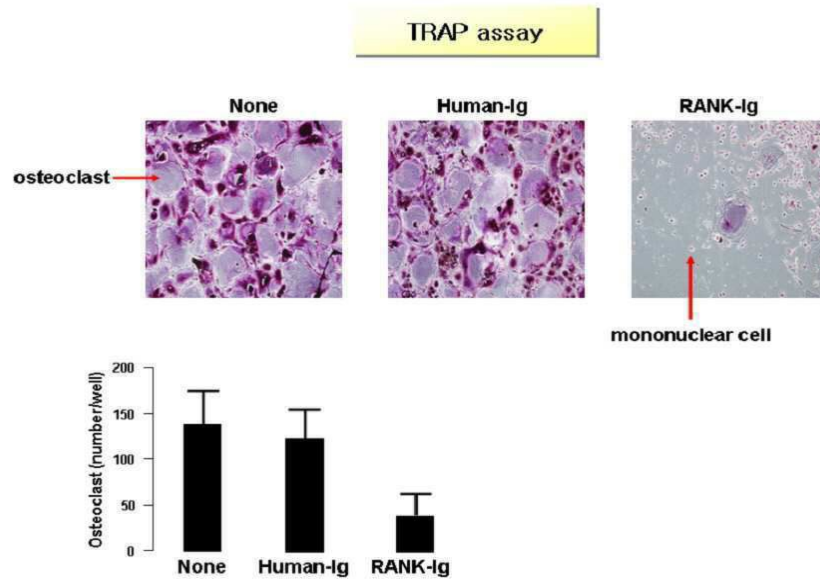


Human IgG

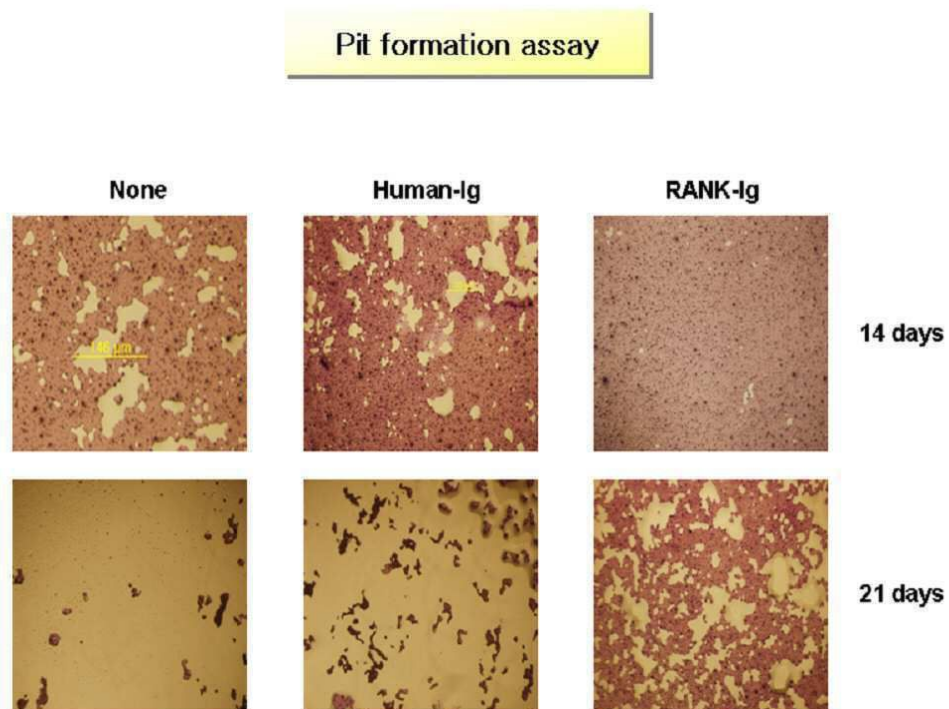


RANK-Ig

도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> Korea University Industry Academy Cooperation Foundation
 <120> Analytic method for the binding of RANK-RANKL using flow cytometry

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence for RANK-Ig

<400> 1

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Cys Ala Leu Leu Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro
 20 25 30

Pro Cys Thr Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn
 35 40 45

Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser
 50 55 60

Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp
 65 70 75 80

Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys
 85 90 95

Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys
100 105 110

Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg
115 120 125

Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser
145 150 155 160

Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr
165 170 175

Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala
180 185 190

Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His
195 200 205

Val Tyr Leu Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 2
<211> 185
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequence for RANKL binding site

<400> 2
Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly
1 5 10 15

Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys
20 25 30

Thr Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr
35 40 45

Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys

50 55 60
 Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr
 65 70 75 80
 Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys
 85 90 95
 Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln
 100 105 110
 His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala
 115 120 125
 Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp
 130 135 140
 Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro
 165 170 175
 Asn Glu Pro His Val Tyr Leu Pro Gly
 180 185

<210> 3
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA sequence for RANK-Ig

<400> 3
 atggccccgc ggcgccggcg gcgcgcccg ctgttcgcgc tgctgctgct ctgcgcgctg 60
 ctgcgccggc tgcaggtggc ttgcagatc gctcctccat gtaccagtga gaagcattat 120
 gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc 180

actactacct ctgacagtgt atgtctgccc tgtggcccgg atgaatactt ggatagctgg	240
aatgaagaag ataatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggtggcc	300
gtggtcgccg gcaacagcac gacccccgg cgctgcgcgt gcacggctgg gtaccactgg	360
agccaggact gcgagtgtg cgcgcgaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag	420
caccgttgc agctcaaca ggacacagtg tgcaaacctt gccttgagg ctacttctct	480
gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga ccttgacca actgtacctt ccttgaaag	540
agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagttcttc tctgccagt	600
agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttccccgtg agcccaaac ttgtgacaaa	660
actcacacat gccacccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc	720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtcaag	960
gtctccaaca aagccctccc agcccccac gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tcctttcttc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtccccgg gtaaatga	1338

<210> 4
 <211> 954
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgcgcgcgc ccagcagaga ctacaccaag tacctgcgtg gctcggagga gatggcggcg 60
 ggccccggag cccgcacga gggccccctg cacgccccgc cgccgcctgc gccgcaccag 120
 cccccgcgc cctcccgtc catgttcgtg gccctcctgg ggctggggct gggccaggtt 180
 gtctgcagcg tcgccctgtt cttctatttc agagcgcaga tggatcctaa tagaatatca 240
 gaagatggca ctactgcat ttatagaatt ttgagactcc atgaaaatgc agattttcaa 300
 gacacaactc tggagagtca agatacaaaa ttaatacctg attcatgtag gagaattaaa 360
 caggcctttc aaggagctgt gcaaaaggaa ttacaacata tcgttggatc acagcacatc 420
 agagcagaga aagcgaagggt ggatggctca tggttagatc tggccaagag gagcaagctt 480
 gaagctcagc cttttgctca tctcactatt aatgccaccg acatcccacg tggttcccat 540
 aaagtgagtc tgcctcttg gtacatgat cggggttggg ccaagatctc caacatgact 600
 tttagcaatg gaaaactaat agttaatcag gatggctttt attacctgta tgccaacatt 660
 tgctttcgac atcatgaaac ttcaggagac ctactacag agtatcttca actaatggtg 720
 tacgtcacta aaaccagcat caaaatccca agttctcata ccctgatgaa aggaggaagc 780
 accaagtatt ggtcaggga tctgaattc catTTTTATT ccataaacgt tgggtgattt 840
 ttttaagttac ggtctggaga ggaaatcagc atcgaggtct ccaacccctc ctactggat 900
 ccgatcagg atgcaacata ctttggggct tttaaagttc gagatataga ttga 954