

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.<sup>7</sup>  
C07K 14/715

(45) 공고일자 2005년06월21일  
(11) 등록번호 10-0496063  
(24) 등록일자 2005년06월09일

(21) 출원번호	10-2003-7009671(분할)	(65) 공개번호	10-2004-0004509
(22) 출원일자	2003년07월22일	(43) 공개일자	2004년01월13일
(62) 원출원	특허10-1998-0710194 원출원일자 : 1998년12월12일	심사청구일자	2000년01월12일
번역문 제출일자	2003년07월22일	(87) 국제공개번호	WO 1998/46644
(86) 국제출원번호	PCT/JP1998/001728	국제공개일자	1998년10월22일
국제출원일자	1998년04월15일		

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 오스트레일리아, 캐나다, 중국, 헝가리, 이스라엘, 일본, 대한민국, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드,

EA 유라시아특허 : 러시아,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드,

(30) 우선권주장

JP-P-1997-00097808	1997년04월15일	일본(JP)
JP-P-1997-00151434	1997년06월09일	일본(JP)
JP-P-1997-00217897	1997년08월12일	일본(JP)
JP-P-1997-00224803	1997년08월21일	일본(JP)
JP-P-1997-00332241	1997년12월02일	일본(JP)

(73) 특허권자

산료 가부시키가이샤  
일본 도쿄도 주오구 니혼바시 혼쵸 3초메 5반 1고

(72) 발명자

야마구찌교지  
일본국사이타마오미야시시마쵸702-12라이온즈가든히가시오미야1-524

야수다히사타카  
일본국토찌기카와찌군미나미카와찌마찌미도리2-3293-46

나카가와노부아키  
일본국토찌기시모쓰가군이시바시마찌이시바시578-15니시우라하이츠2-4

시마노부유키  
일본국토찌기카와찌군미나미카와찌마찌미도리4-17-28

키노사키마시히코  
일본국토찌기카와찌군카미노카와마찌유키가오카53-8

쓰다에이수케  
일본국토찌기카와찌군미나미카와찌마찌기온2-13-1다이아팔레스지찌이다이5바켄407

고토마사키  
일본국토찌기시모쓰가군이시바시마찌시모코야마456-1

야노카주키  
일본국토찌기시모쓰가군이시바시마찌이시바시578-15니슈라하이츠3-1

토모야수아키히로  
일본국토찌기시모쓰가군이시바시마찌오마쓰야마1-3-3이에스케이-맨  
션

코바야시푸미에  
일본국토찌기카와찌군카와찌마찌시모카모토3777-4

와시다나오히로  
일본국토찌기시모쓰가군이시바시마찌하나노키3-4-12

타카하시켄  
일본국토찌기시모쓰가군이시바시마찌이시바시578-15니슈라하이츠1-  
4

모리나가토모노리  
일본국토찌기시모쓰가군미부마찌사이와이쵸3쵸메11-12

히가시오칸지  
일본국사이타마카와고에시야마다1769-10

(74) 대리인 이주기

심사관 : 박정웅

## (54) 신규단백질 및 그 제조방법

### 요약

본 발명은 파골세포형성억제인자(osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF)에 결합하는 신규한 단백질(OCIF 결합분자; OBM).

이 단백질을 코딩하는 DNA, 이 DNA에 의해 코딩되는 아미노산서열을 가지는 단백질, 이 단백질을 유전자공학적으로 제조하는 방법 및 이 단백질을 함유하는 의약조성물.

이 단백질 및 그 DNA를 이용하고, 이 단백질의 발현을 조절하는 물질, 이 단백질의 생물활성을 저해 또는 수식하는 물질, 혹은 이 단백질과 결합하여 그 작용을 전달하는 리셉터의 스크리닝 방법, 이에 의해 얻어진 물질 및 얻어진 물질을 함유하는 의약조성물.

이 단백질에 대한 항체, 그 제조방법, 그것을 이용한 이 단백질의 측정방법 및 항체를 함유하는 의약.

### 대표도

도 3

### 색인어

파골세포형성억제인자, 골다공증, 골대사이상

### 명세서

### 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명 실시예 3의 마우스 OBM 단백질의 SDS-PAGE의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

(A) : 레인(lane) 1 : 분자량마커

레인 2 : 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 텍사메사존 존재하에서 배양한 ST2세포로부터의 부분정제표품{Gly-HCl(pH2.0)용출분획분}

레인 3 : 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 텍사메사존 비존재하에서 배양한 ST2세포로부터의 부분정제표품{Gly-HCl(pH2.0)용출분획분}

(B) : 레인 1 : 분자량마커

레인 2 : 역상고속액체 크로마토그래피에서 정제한 본 발명 마우스 OBM 단백질(실시예 3)

도 2는 실시예 4의 <sup>125</sup>I로 표지한 OCIF의 골아세포상 스트로머세포 ST2로의 결합시험의 결과를 나타낸다.

도 3은 실시예 5(1)의 계대수가 다른 골아세포상 스트로머세포 ST2에 의한 파골세포형성 지지능을 나타낸다.

[부호의 설명]

1 : 계대수 약 10대의 ST2세포의 파골세포형성 지지능

2 : 계대수 약 40대의 ST2세포의 파골세포형성 지지능

도 4는 실시예 5(2)의 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 및 텍사메사존 존재하에서 배양에서의 골아세포상 스트로머세포막 위의 본 발명 단백질 발현의 경시변화를 나타낸다.

도 5는 실시예 5(2)의 공배양계에서의 파골세포형성의 경시변화를 나타낸다.

도 6은 실시예 5(3)의 공배양기간에 있어서, 여러 가지 배양기간만 OCIF처리한 경우의 파골세포형성 억제효과를 나타낸다.

도 7은 실시예 6의 <sup>125</sup>I표지 OCIF와 본 발명 단백질과의 크로스링킹 시험의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 : <sup>125</sup>I표지 OCIF-CDD1

레인 2 : <sup>125</sup>I표지 OCIF-CDD1과 ST2 세포를 크로스링크 시킨 것

레인 3 : 400배 농도의 미표지 OCIF를 첨가하여 크로스링크 시킨 것

도 8은 실시예 9에서 SDS-PAGE의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 : pOBM291를 트랜스펙트한 COS-7 세포의 단백질을 OCIF 무첨가로 면역 침강시킨 것

레인 2 : pOBM291를 트랜스펙트한 COS-7 세포의 단백질을 OCIF를 첨가하여 면역 침강시킨 것

도 9는 실시예 10에서, <sup>125</sup>I로 표지한 OCIF의 pOBM291를 트랜스펙트한 COS-7 세포로의 결합시험의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 및 2 : <sup>125</sup>I 표지한 OCIF의 pOBM291를 트랜스펙트한 COS-7 세포로의 결합량

레인 3 및 4 : <sup>125</sup>I 표지한 OCIF의 pOBM291를 트랜스펙트한 COS-7 세포로의 결합량(400배 농도의 미표지 OCIF 첨가시)

도 10은 실시예 11에서, <sup>125</sup>I로 표지한 OCIF를 이용한 크로스링킹 시험의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 : <sup>125</sup>I표지 OCIF

레인 2 :  $^{125}$ I표지 OCIF와 pOBM291를 트랜스펙트한 COS-7 세포를 크로스링크 시킨 것

레인 3 : 400배 농도의 미표지 OCIF 존재하에서  $^{125}$ I표지 OCIF와 pOBM291를 트랜스펙트한 COS-7 세포를 크로스링크 시킨 것

도 11은 실시예 12에서, 노잔블로트(Northern Blot)의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 : 비타민 D 및 텍사메사존 무첨가 해서 배양한 ST2 세포유래 RNA

레인 2 : 비타민 D 및 텍사메사존을 첨가해 배양한 ST2 세포유래 RNA

도 12는 실시예 13-(2)에서, OCIF농도를 바꾼때의 배양 상청중 단백질의 OCIF 결합능을 나타낸다.

[부호의 설명]

○ : pCEP4

● : pCEP sOBM

도 13은 실시예 13-(2)에서, 배양 상청의 비율을 바꾼때의 배양 상청중 단백질의 OCIF 결합능을 나타낸다.

[부호의 설명]

○ : pCEP4

● : pCEP sOBM

도 14는 실시예 14-(2)에서, 대장균에서 발현시킨 티오레독신과 마우스 OBM의 융합단백질의 SDS-PAGE의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 : 분자량 마커

레인 2 : GI724/pTrxFus 유래 가용성 단백질 분획분

레인 3 : GI724/pTrxOBM25 유래 가용성 단백질 분획분

도 15는 실시예 14-(3)에서, 가용성 단백질 분획분의 비율을 바꾼때의 OCIF 결합능을 나타낸다.

[부호의 설명]

□ : GI724/pTrxFus

○ : GI724/pTrxOBM25

도 16은 실시예 14-(3)에서, OCIF농도를 바꾼때의 가용성 단백질 분획분(1%)의 OCIF 결합능을 나타낸다.

[부호의 설명]

□ : GI724/pTrxFus

○ : GI724/pTrxOBM25

도 17은 본 발명의 마우스 OBM cDNA에 의해 발현되어 정제하여 얻어지는 단백질 마우스 OBM, 및 천연형의 정제 OCIF 결합단백질과 OCIF의 특이적 결합능의, 토끼 항 마우스 OBM항체에 의한 저해결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

1 : 항체에서 처리한 cDNA에 의해 발현되어 정제하여 얻어지는 단백질, OBM +  $^{125}\text{I}$ -OCIF

2 : 항체에서 처리한 천연형의 단백질 +  $^{125}\text{I}$ -OCIF

3 : 항체 미처리의 cDNA에 의해 발현되어 얻어지는 단백질, 마우스 OBM +  $^{125}\text{I}$ -OCIF

4 : 항체 미처리의 천연형 단백질 +  $^{125}\text{I}$ -OCIF

5 : 3 + 비표지 OCIF( $^{125}\text{I}$ -OCIF의 400배 양)

6 : 4 + 비표지 OCIF( $^{125}\text{I}$ -OCIF의 400배 양)

도 18은 본 발명의 cDNA에 의해 발현되는 단백질, 사람 OBM의 SDS-PAGE의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 : 분자량 마커

레인 2 : 본 발명의 cDNA를 함유하는 발현벡터, phOBM을 트랜스펙트한 COS-7 세포의 단백질을 OCIF 무첨가로 토끼 항 OCIF 폴리클로날 항체로 면역 침강시킨 것

레인 3 : 본 발명의 cDNA를 함유하는 발현벡터, phOBM을 트랜스펙트한 COS-7 세포의 단백질을 OCIF 첨가로 토끼 항 OCIF 폴리클로날 항체로 면역 침강시킨 것

도 19는 본 발명 cDNA를 함유하는 발현벡터, phOBM을 트랜스펙트한 COS-7 세포로의 OCIF의 결합시험의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 : phOBM을 트랜스펙트한 COS-7 세포에  $^{125}\text{I}$ -OCIF를 첨가한 것

레인 2 : phOBM을 트랜스펙트한 COS-7 세포에  $^{125}\text{I}$ -OCIF를 첨가하고, 게다가 400배량의 비표지 OCIF를 가한 것

도 20은 본 발명 cDNA에서 코드되는 단백질, 사람 OBM과  $^{125}\text{I}$ -OCIF(모노머 형)와의 크로스링킹 시험의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 :  $^{125}\text{I}$ -OCIF

레인 2 :  $^{125}\text{I}$ -OCIF와 phOBM을 트랜스펙트한 COS-7 세포막상의 단백질과를 크로스링크 시킨 것

레인 3 : 400배 농도의 비표지 OCIF 존재하에서,  $^{125}\text{I}$ -OCIF와 phOBM을 트랜스펙트한 COS-7 세포막상의 단백질과를 크로스링크 시킨 것

도 21은 실시예 23-(2)에서, OCIF 농도를 바꾼때의 배양액 상청중 단백질(분비형 hOBM)의 OCIF 결합능을 나타낸다.

[부호의 설명]

○ : 분비형 사람 OBM을 코드하는 cDNA를 포함하지 않는 벡터만의 pCEP4를 트랜스펙트한 293-EBNA세포의 배양액

● : 분비형 사람 OBM을 코드하는 cDNA를 함유하는 발현벡터의 pCEPshOB M을 트랜스펙트한 293-EBNA세포의 배양액

도 22은 실시예 23-(2)에서, OCIF 농도를 일정하게 하고, 첨가하는 배양액량을 바꾼때의 배양액 상청중 단백질(분비형 사람 OBM)의 OCIF 결합능을 나타낸다.

[부호의 설명]

○ : 분비형 사람 OBM을 코드하는 cDNA를 포함하지 않는 벡터만의 pCEP4를 트랜스펙트한 293-EBNA세포의 배양액

● : 분비형 사람 OBM을 코드하는 cDNA를 함유하는 발현벡터의 pCEPshOB M을 트랜스펙트한 293-EBNA세포의 배양액

도 23은 대장균에서 발현시킨 티오레독신과 사람 OBM의 융합 단백질의 SDS-PAGE의 결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

레인 1 : 분자량 마커

레인 2 : 대장균 GI724/pTrxFus 유래 가용성 단백질 분획분

레인 3 : 대장균 GI724/pTrxhOBM 유래 가용성 단백질 분획분

도 24는 실시예 24-(3)에서, 티오레독신과 사람 OBM의 융합단백질을 함유하는 대장균유래 가용성 단백질 분획분의 첨가 비율을 바꾼때의 융합단백질과, OCIF와의 결합능을 나타낸다.

[부호의 설명]

○ : 대장균 GI724/pTrxFus 유래 가용성 단백질 분획분

● : 대장균 GI724/pTrxshOBM 유래 가용성 단백질 분획분

도 25는 실시예 24-(3)에서, OCIF 농도를 바꾼때의 대장균유래 가용성 단백질 분획분중의 티오레독신과 사람 OBM의 융합단백질과, OCIF와의 결합능을 나타낸다.

[부호의 설명]

○ : 대장균 GI724/pTrxFus 유래 가용성 단백질 분획분

● : 대장균 GI724/pTrxshOBM 유래 가용성 단백질 분획분

도 26은 본 발명의 토끼 항 사람 OBM/sOBM 폴리크로날 항체를 이용한 샌드위치 ELISA에 의해 사람 OBM 및 sOBM의 측정결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

□ : 사람 OBM

● : 사람 sOBM

도 27은 본 발명의 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체를 이용한 샌드위치 ELISA에 의해 사람 OBM 및 sOBM의 측정결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

□ : 사람 OBM

● : 사람 sOBM

도 28은 본 발명의 마우스 OBM 및 sOBM에도 교차성을 가지는 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체를 이용한 샌드위치 ELISA에 의해 마우스 OBM 및 sOBM의 측정결과를 나타낸다.

[부호의 설명]

□ : 마우스 OBM

● : 마우스 sOBM

도 29는 티오레독신과 마우스 OBM의 융합단백질에 의한 사람 파골세포상 세포형성의 촉진활성을 나타낸다.

도 30은 비타민 D<sub>3</sub> 자극에 의해 골흡수활성의 항 OBM/sOBM항체에 의한 억제를 나타낸다.

도 31은 프로스타그란딘 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)자극에 의한 골흡수활성의 항 OBM/sOBM항체에 의한 억제를 나타낸다.

도 32는 부갑상선 호르몬(PTH)자극에 의한 골흡수활성의 항 OBM/sOBM항체에 의한 억제를 나타낸다.

도 33은 인터로이킨 1α(IL-1)자극에 의한 골흡수활성의 항 OBM/sOBM항체에 의한 억제를 나타낸다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 파골(破骨)세포형성억제인자(osteoclastogenesis inhibitory factor; 이하, OCIF라 칭한 것도 있음)에 결합하는 신규한 단백질(OCIF 결합분자; 이하, OBM이라 한 것도 있음) 및 그 제조방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 이 단백질을 코딩하는 DNA, 이 DNA에 의해 코딩(code)된 아미노산서열을 가지는 단백질, 이 단백질을 유전자공학적으로 제조하는 방법 및 이 단백질을 함유하는 의약조성물에 관한 것이다.

게다가, 본 발명은 이 단백질 및 그 DNA를 이용하고, 이 단백질의 발현을 조절하는 물질, 이 단백질의 생물활성을 저해 또는 수식하는 물질, 혹은 이 단백질과 결합해 그 작용을 전달하는 리셉터(receptor)의 스크리닝(screening)방법, 이에 의해 얻은 물질 및 얻은 물질을 함유하는 의약조성물에 관한 것이다.

더구나, 본 발명은 이 단백질에 대한 항체, 그 제조방법, 그를 이용한 이 단백질의 측정방법 및 항체를 함유하는 의약에 관한 것이다.

골대사는 골형성을 담당하는 골아세포(osteoblast)와 골흡수를 담당하는 파골세포(osteoclast)의 총칭된 활성화에 의존하고 있다. 골대사 이상은 골형성과 골흡수의 균형이 무너지짐에 의해 발생한다고 생각되고 있다. 골대사의 이상을 수반하는 질환으로서 골조송증(골다공증; osteoporosis), 고칼슘혈증, 골파제트(paget)병, 신성골이영양증, 만성관절류마티즘 및 변형성관절염 등이 알려져 있다. 이들 골대사 이상질환의 대표로서 골조송증이 열거된다. 이 질환은 파골세포에 의한 골흡수가 골아세포에 의한 골형성을 상회함에 의해 발생하는 질환이고, 골의 석회질과 골기질이 동등하게 감소하는 것을 특징으로 한다. 이 질환의 발생 메카니즘에 대해서는 아직 완전히는 해명되지 않았지만, 골의 통증이 발생하고, 골의 취약화에 의해 골절이 일어나는 질환이다. 고령인구의 증가에 따라 골절에 의해 병상을 보존하는 노인의 수가 증가하는 원인으로 되고, 이 질환은 사회문제제로 되어 있고, 그 치료약의 개발이 시급한 것으로 되어 있다. 이러한 골대사 이상에 의한 골량감소증은 골형성의 촉진, 골흡수의 억제 혹은 이들 균형의 개선에 의해 치료할 수 있는 것이 기대된다. 즉, 골형성은 골형성을 담당하는 골아세포의 증식, 분화, 기능을 촉진하는 것, 파골세포 전구세포에서의 파골세포로의 분화, 성숙을 억제하는 것 혹은 파골세포의 골흡수 활성 등의 기능을 억제함에 의해 촉진되는 것으로 기대된다. 이러한 활성을 가지는 호르몬, 저분자물질 혹은 생리활성 단백질에 대하여 현재 정력적인 탐색 및 개발연구가 진행되고 있다.

이미, 골에 관한 질환의 치료 및 치료기간의 단축을 도모하는 의약품으로서 칼시토닌제제(calcitonin agent), 활성형 비타민 D<sub>3</sub>제제, 에스트라디올(estradiol)을 함유하는 호르몬제제, 이프리프라본(ipriflavon), 비타민K<sub>2</sub>, 비스포스포네이트(bisphosphonate)계 화합물등이 있고, 게다가, 보다 부작용이 작고 유효성이 뛰어난 치료약의 개발을 목표로 하여 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 유도체, 에스트라디올유도체, 제 2세대 또는 제 3세대의 비스포스포네이트계 화합물 등의 임상실험이 실시되고 있다.

그러나, 이들 약제를 사용한 치료법은 그 효과 및 치료결과에 있어서 반듯이 만족할 수 있는 것은 아니고, 보다 안전하고도 유효성이 높은 새로운 치료약의 개발이 기대되고 있다. 또한, 골대사질환의 치료에 사용되고 있는 약제중에는 그 부작용에 의해 치료가능한 질환이 한정되고 있는 것도 있다. 게다가 현재, 골조송증 등의 골대사질환의 치료에는 복수의 약제를 동시에 사용하는 다제병용요법(多劑併用療法)이 주류로 되어 오고 있다. 이러한 관점에서 종래의 의약품과는 다른 작용 메카니즘을 갖고 게다가 보다 유효성이 높고도 부작용이 작은 의약품의 개발이 기대되고 있다.

상술한 바와 같이 골대사를 담당하는 세포는 골아세포와 파골세포이다. 이들 세포는 서로 밀접하게 상호작용하고 있는 것이 알려져 있고, 이 현상은 커플링이라고 불려지고 있다. 즉, 파골세포의 분화, 성숙에는 골아세포상 스트로머세포가 분비하는 싸이토카인류, 인터로이킨1(IL-1), 3(IL-3), 6(IL-6), 11(IL-11), 과립구마크로파지콜로니 자극인자(GM-CSF), 마크로파지콜로니 자극인자(M-CSF) 인터페론감마(IFN-γ), 종양괴사인자α(TNF-α), 트랜스포밍증식인자β(TGF-β)등이 촉진적 또는 제어적으로 작용함이 보고되고 있다(Raisz: Disorders of Bone and Mineral Metabolism, 287~311, 1992; Suda et al.: Principles of Bone Biology, 87~102, 1996; Suda et al.: Endocrine Reviews, 4, 266~270, 1983; Lacey et al.: Endocrinology, 136, 2369~2376, 1995). 골아세포상 스트로머세포는 미숙한 파골세포 전구세포와 파골세포와의 세포간 접촉에 의해 각각 파골세포의 분화, 성숙과 성숙파골세포에 의한 골흡수 등의 기능발현에 중요한 역할을 가지고 있는 것이 알려져 있다. 이 세포간 접촉에 의한 파골세포형성에 관여하는 인자로서는 골아세포상 스트로머세포의 막위에 발현되는 파골세포 분화유도인자(osteoclast differentiation factor, ODF) (Suda et al.: Endocrine Rev. 13, 66~80, 1992; Suda et al.: Bone 17, 87S~91S, 1995)라고 하는 분자가 가설되고 있고, 이 가설에 의하면 파골세포의 전구세포에 ODF의 리셉터가 존재하고 있다. 그러나, ODF 및 리셉터 공히 아직 정제 및 동정되지 않고, 이들의 성질·작용기능 및 구조에 관한 보고도 없다. 이렇게, 파골세포의 분화·성숙의 메카니즘은 아직 충분히 해명되어 있지 않고, 이 메카니즘의 해명은 기초의학 영역에 대단히 큰 공헌을 할 뿐만 아니라 새로운 작용메카니즘에 기한 신규한 골대사이상증 치료약의 개발에도 공헌할 것이 기대된다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제



본 발명자는 이러한 상황을 감안하여 예의 탐색을 진행한 결과 사람 태아 폐선유아세포, IMR-90(ATCC기탁번호: CCL186)의 배양액중에 파골세포형성억제인자(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)을 발견했다(WO96/26217호).

게다가, 본 발명자들은 OCIF의 DNA크로닝, 동물세포를 이용한 유전자조환형OCIF의 생산, 유전자조환형OCIF에 의한 생체내(in vivo)약효(골대사 개선효과)의 확인 등에 성공했다. OCIF는 종래의 의약품보다도 유효성이 높고도 부작용이 작아 골대사이상에 관련하는 질환의 예방 및 치료제로서 기대되고 있다.

본 발명자들은 파골세포형성억제인자OCIF를 사용하고, 그 결합단백질의 존재를 예의 탐색한 결과, OCIF결합단백질이 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 부갑상선호르몬(parathyroid hormone, PTH) 등의 골흡수촉진 인자의 존재하에서 배양한 골아세포상 스트로머세포 위에 특이적으로 발현되는 것을 찾아냈다. 게다가, 이 OCIF결합단백질의 성질 및 그 생리적 기능을 조사했던 바 이 단백질은 미숙한 파골세포 전구세포에서 파골세포로의 분화·성숙에 관여하는 소위 파골세포분화·성숙을 지지 또는 촉진하는 인자로서의 생물활성을 가지고 있는 것을 찾아내고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 게다가, 본 발명 단백질에 대한 연구를 반복하였던 결과, 이 신규한 막단백질은 골아세포상 스트로머 세포와 비장세포와의 공배양계(共培養系)에 있어서 골아세포상 스트로머세포에 의해 미숙한 파골세포 전구세포에서 파골세포로의 분화·성숙을 담당하는 중요한 단백질인 것을 명확히 하였다. 본 발명에서 파골세포의 분화·성숙을 지지 또는 촉진하는 인자로서의 단백질의 동정 및 그 분리정제(單離精製)의 성공에 의해 본 발명 단백질을 이용한 생체의 골대사기구에 기한 신규한 골대사이상증 치료약의 스크리닝을 가능하게 했다.

따라서, 본 발명은 파골세포형성억제인자OCIF에 결합하는 신규한 단백질(OCIF결합분자; OBM) 및 그 제조방법을 제공하는 것을 과제로 한다. 또한 본 발명은 이 단백질을 코드하는 DNA, 이 DNA에 의해 코드되는 아미노산서열을 가지는 단백질, 이 단백질을 유전자공학적으로 제조하는 방법 및 이 단백질을 함유하는 의약조성물을 제공함을 과제로 한다. 또한, 이 단백질을 함유하는 골대사이상증 예방 및/또는 치료제를 제공함을 과제로 한다. 게다가 본 발명은 이 단백질을 및 그 DNA를 이용하고 이 단백질의 발현을 조절하는 물질, 이 단백질이 생물활성을 저해 또는 수식하는 물질 혹은 이 단백질과 결합하고 그 작용을 전달하는 리셉터의 스크리닝방법, 이에 의해 얻은물질 및 얻은물질을 함유하는 의약조성물을 제공함을 과제로 한다. 더구나, 본 발명은 이 단백질에 대한 항체, 그 제조방법, 그를 이용한 이 단백질의 측정방법 및 항체를 함유하는 의약을 제공함을 과제로 한다.

#### 발명의 구성 및 작용

본 발명 단백질은 이하의 물리화학적 성질 및 생물활성을 나타낸다.

즉,

a. 친화성: 파골세포형성억제인자(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)에 특이적으로 결합하고 높은 친화성(세포막 위에서의 해리정수 Kd값이  $10^{-9}$ M이하)을 갖는다.

b. 분자량: 비환원조건하에서 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동에 의한 분자량측정으로 약 30,000~40,000의 분자량을 나타내고, 또 모노머타입의 OCIF와 크로싱링크시킨 경우 외관상의 분자량은 약 90,000~110,000을 나타낸다.

c. 생물활성: 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 및 부갑상선호르몬(PTH) 등의 골흡수 촉진인자의 존재하에서의 마우스골아세포상 스트로머세포와 마우스비장세포 공배양에서의 파골세포의 분화·성숙을 지지 또는 촉진하는 활성을 가진다.

파골세포형성의 대표적인 인비트로(in vitro) 배양계로서 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 혹은 PTH 존재하에서의 마우스유래 골아세포상 스트로머세포주 ST2와 마우스비장세포와의 공배양계가 잘 알려져 있다. 본 발명 단백질의 발현세포는 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 존재 혹은 비존재하에서 각각 배양한 마우스골아세포상 스트로머세포 혹은 마우스비장세포로의 OCIF의 결합성을 시험함에 의해 조사할 수 있었다. 본 발명 단백질은 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 PTH와 같은 골흡수촉진인자의 존재하에서 배양한 골아세포상 스트로머세포위에 특이적으로 유도되는 단백질로서 특정된다. 또한, 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 존재하의 상기 공배양계에 OCIF를 첨가함에 의해 1~40ng/ml의 범위에서 용량 의존적으로 파골세포의 형성이 저해되는 것, 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 존재하에서 ST2세포위에 유도되는 본 발명 단백질 발현의 경시변화와 파골세포형성의 경시변화가 잘 상관하는 것, 또, ST2세포에 발현되는 본 발명 단백질의 다과(多寡)와 ST2세포에 의한 파골세포형성지능의 강약이 일치하고, ST2세포 위의 본 발명 단백질에 OCIF가 결합함에 의해 파골세포형성이 완전히 억제되는 것으로부터 본 발명 단백질은 파골세포의 분화·성숙을 지지 또는 촉진하는 생물활성(작용)을 가지는 단백질로서 특정된다.

본 발명 단백질의 OCIF에 대한 친화성은 OCIF를 표지하고, 그 표지체의 동물세포막 표면으로의 결합성을 시험함에 의해 평가할 수 있다. OCIF는 방사성 동위원소에 의한 표지와 형광표지등과 같은 통상의 단백질표지법을 사용함에 의해 표지할 수 있다. 예를들어, OCIF의 방사성 동위원소에 의한 표지로서는 티록신잔기의 <sup>125</sup>I표지가 열거되고, 요오드젠법, 크로라민 T법 및 효소법 등의 표지법을 이용할 수 있다. 이렇게 해서 얻은 표지OCIF를 이용해서 OCIF의 동물세포막 표면으로의 결합성 시험을 통상법에 따라 실시할 수 있고, 또 결합성 시험에 이용하는 배지에 표지OCIF의 100배~400배농도 미표지 OCIF를 첨가함에 의해 비특이적인 결합량을 측정할 수 있다. OCIF의 특이적 결합량은 표지OCIF의 총결합량에서 비특이적인 결합량을 빼어냄에 의해 산출된다. 세포막위에 발현된 본 발명 단백질의 친화성은 표지OCIF의 첨가량을 바꾸어 시험을 행하고, 특이적 결합량을 스캐처드플로트(Scatchard plot)로 해석함에 의해 평가한다. 이렇게 하여 구한 본 발명 단백질의 OCIF에 대한 친화력은 약 100~500pM이고, 본 발명 단백질은 이렇게 파골세포형성억제인자OCIF에 높은 친화성(세포막위에서의 해리정수 Kd값이  $10^{-9}$ M이하)을 가지는 단백질로서 특정된다. OBM의 분자량은 겔여과 크로마토그래피와 SDS-PAGE 등을 사용하여 측정한다. 보다 정확히 분자량을 측정하기 위해서는 SDS-PAGE를 사용하는 것이 좋고, OBM은 환원조건하에서 약 40,000(40,000±4,000)의 분자량을 가지는 단백질로서 특정된다.



본 발명 단백질은 마우스골아세포상 스트로마세포주 ST2, 마우스 전(前)지방세포주 PA6, 기타 사람 골아세포상 세포주 혹은 사람, 마우스, 랫트 등의 포유동물에서 채취해 농축한 골아세포상 세포등에서 얻을 수 있다. 또한, 이들 세포에 본 발명 단백질을 발현시키기 위해 필요한 유도물질로서는 활성형 비타민 D<sub>3</sub>(Calcitriol), 부갑상선호르몬(PTH), 인테로이킨(IL)-1, IL-6, IL-11, 온코스타틴M(oncostatin M) 및 백혈병 세포증식 억제인자(LIF) 등의 골흡수촉진인자가 열거된다. 또한, 이들 유도물질의 첨가농도로서는 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 PTH에서는 10<sup>-8</sup>M, IL-11과 온코스타틴M에서는 각각 10ng/ml 및 1ng/ml, IL-6에서는 20ng/ml의 IL-6과 500ng/ml의 IL-6가용성리셉터를 사용하는 것이 소망스럽다. 종기로는 마우스 골아세포상 스트로마세포주 ST2를 사용하고 10<sup>-8</sup>M 활성형 비타민 D<sub>3</sub>, 10<sup>-7</sup> M 덱사메사손(Dexamethasone) 및 10% 소 태아혈청을 첨가한  $\alpha$ -MEM중에서 일주간 이상 배양하여 컨플루언트(confluent)한 세포를 사용하면 좋다. 이렇게 하여 배양한 세포는 셀 스크레이퍼(cell scraper) 등을 이용하여 박리시켜 회수하면 좋다. 또한, 회수한 세포는 사용할 때까지 사이에 -80℃로 보존해둘 수 있다.

본 발명 단백질은 이렇게 하여 회수한 세포의 막분획분에서 정제하면 효율 좋게 정제할 수 있다. 막분획분의 정제는 세포 내 기관의 분획에 이용되는 통상의 방법에 따라 행할 수 있다. 막분획분의 조제에 사용하는 완충액에는 종기로는 각종 프로테아제 저해제를 첨가하면 좋다. 첨가하는 프로테아제 저해제로서는, 예컨대 PMSF, APMSF, EDTA, O-페난트롤린, 로이펍틴, 펩스타틴A, 아프로티닌, 대두트립신인히비터 등의 세린프로테아제 저해제, 티올프로테아제 저해제 및 메타프로테아제 저해제 등이 열거된다. 세포의 파쇄에는 던스(Daunce) 호모게나이저, 폴리트론호모게나이저, 조음과 파쇄장치 등을 사용할 수 있다. 파쇄한 세포는 0.5M 슈크로오스를 가한 완충액에 현탁시켜 600×g에서 10분간 원심분리함에 의해 세포 핵과 미파쇄의 세포를 침전 분획분으로 분리할 수 있다. 원심분리로 얻은 상청을 150,000×g에서 90분간 원심분리함에 의해 침전 분획분으로서 막분획분을 얻을 수 있다. 이렇게 하여 얻은 막분획분을 각종의 계면활성제로 처리함에 의해 세포막에 존재하는 본 발명 단백질을 효율 좋게 가용화하고, 추출할 수 있다. 가용화에 이용하는 계면활성제로서는 세포막 단백질의 가용화에 일반적으로 사용되고 있는 각종 계면활성제, 예컨대 CHAPS{3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate}, 트리톤(Triton) X-100, 니콜(Nikkol), n-옥틸글리코사이드 등을 이용할 수 있다. 종기로는 0.5% CHAPS를 첨가하여 4℃에서 2시간 교반하고 본 발명 단백질을 가용화하는 것이 좋다. 이렇게 하여 제조한 샘플을 150,000×g에서 60분간 원심분리하고 그 상청을 가용화 막분획분으로 얻을 수 있다.

이렇게 하여 얻은 가용화 막분획분에서의 본 발명 단백질의 정제는 OCIF를 고정화한 컬럼, 겔, 수지 등을 사용하여 효율 좋게 정제할 수 있다. 고정화에 사용하는 OCIF로서는 WO96/26217호 공보 기재의 방법에 따라서 사람태아 폐선 유아세포주 IMR-90의 배양액에서 단리한 것, 혹은 유전자 공학적 수법에 의해 얻은 것(rOCIF)을 사용할 수 있다. 이들의 rOCIF는 사람, 랫트 혹은 마우스의 cDNA를 통상법에 따라 발현 벡터에 짜넣고, CHO세포, BHK세포, 나말와(Namalwa)세포 등의 동물세포 혹은 곤충세포등으로 발현시켜 정제함에 의해 얻을 수 있다. 이렇게 하여 얻은 OCIF는 분자량 약 60kDa(모노머형)와 120kDa(다이머형)의 분자량을 나타내지만, 고정화에 사용하는 OCIF로서는 종기로는 다이머형 OCIF를 사용한다. OCIF를 고정화하기 위한 겔, 수지로서는 ECH세포로스4B, EAH세포로스4B, 티오포필세포로스6B, CNBr-활성화세포로스4B, 활성화CH세포로스4B, 에폭시활성화세포로스6B, 활성화티올세포로스4B(이상, 팔마시아社), TSK 겔 AF-에폭시 토요팔 650, TSK 겔 AF-아미노토요팔 650, TSK 겔 AF-포틸토요팔 650, TSK 겔 AF-카르복시토요팔 650, TSK 겔 AF-트레일토요팔 650(이상, 토오소오社), 아미노셀룰로오스, 카르복시셀룰로오스, FMP활성화 셀룰로오스, 포밀셀룰로오스(이상, 生化學工業社), 아피겔10, 아피겔15, 아피펫트10(이상, 바이로레드社) 등을 사용할 수 있다. 또한, OCIF를 고정화하기 위한 컬럼으로서의 하이트랩(HiTrap) NHS-활성화컬럼(팔마시아社), TSK 겔 Tresyl-5PW(토오소오社) 등을 사용할 수 있다. 하이트랩(HiTrap) NHS-활성화컬럼(1ml, 팔마시아社)을 이용한 OCIF의 고정화법으로서 구체적으로는 아래의 방법을 열거할 수 있다. 즉, OCIF 13.0mg을 포함하는 0.2M NaHCO<sub>3</sub>/0.5M NaCl(pH 8.3) 용액 1ml를 컬럼에 첨가하고 실온에서 30분간 커플링반응시켰다. 이어서, 0.5M 에탄올아민/0.5M NaCl(pH 8.3)과 0.1M 초산/0.5M NaCl(pH 4.0)을 흘리고, 다시 0.5M 에탄올아민/0.5M NaCl(pH 8.3)으로 치환하고 실온에서 1시간 방치하여 과잉한 활성기를 불활성화 한다. 그 후 0.5M 에탄올아민/0.5M NaCl(pH 8.3)과 0.1M 초산/0.5M NaCl(pH 4.0)으로 두 번 세정하고, 50mM 트리스/1M NaCl/0.1% CHAPS완충액(pH 7.5)으로 치환함에 의해 OCIF고정화컬럼을 제작할 수 있다. 이렇게 하여 제작한 OCIF고정화컬럼과 OCIF고정화겔 혹은 수지 등을 사용하여 본 발명 단백질을 효율 좋게 정제할 수 있었다. 본 발명 단백질의 분해를 억제하기 위해 정제에 사용하는 완충액에도 상기 각종 프로테아제 저해제를 첨가하면 좋다. 본 발명 단백질은 상기 가용화 막분획분을 OCIF고정화컬럼에 부하하고, 혹은 OCIF고정화겔, 수지등과 섞어서 교반함에 의해 흡착시켜 산, 각종 단백질변성제, 카코디레이트(cacodylate)버퍼 등에 의해 OCIF고정화컬럼, 겔 혹은 수지등에서 용출할 수 있다. 종기로는 본 발명 단백질의 변성을 최소한으로 억제하기 위해 산을 이용하여 용출한 직후에 중화하면 좋다. 용출에 사용하는 산성완충액으로서의 예컨대 0.1M 글리신-염산완충액(pH 3.0), 0.1M 글리신-염산완충액(pH 2.0) 및 0.1M 구연산나트륨완충액(pH 2.0) 등을 사용할 수 있다.

이렇게 하여 정제한 본 발명 단백질은 생물시료에서 단백질의 정제에 범용되는 통상의 방법을 사용하여 본 발명 단백질의 물리화학적성질을 이용한 각종 정제조작에 의해 보다 더 정제할 수 있다. 본 발명 단백질 용액의 농축에는 한외여과, 동결건조 및 염석등, 통상 단백질의 정제과정에서 사용되는 수법이 열거된다. 종기로는 센트리콘-10(Centricon-10; BioRad社) 등을 사용한 원심에 의해 한외여과를 사용하는 것이 좋다. 또한, 정제수단으로서의 이온교환 크로마토그래피, 겔여과 크로마토그래피, 소수 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 조제용 전기영동 등을 이용한 통상 단백질의 정제에 이용되는 각종 수단을 조합하여 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는 슈퍼로즈12 컬럼(Superose12 column; 팔마시아社) 등을 사용한 겔여과 크로마토그래피와 역상 크로마토그래피를 조합시켜 사용함에 의해 본 발명 단백질을 순화(純化)할 수 있다. 또한, 정제과정중의 본 발명 단백질의 동정은 고정화OCIF와의 결합활성 혹은 OCIF와의 결합물을 항 OCIF항체에 의해 면역침강후, SDS-폴리아크릴아미드 전기영동(SDS-PAGE)으로 분석함에 의해 검출할 수 있다. 이렇게 하여 얻은 본 발명 단백질은 그 활성으로부터 골대사이상증, 예컨대 대리석병 등의 치료제로서의 의약 혹은 연구·진단용 시약으로서 유용하다.

또한, 본 발명은 파골세포형성억제인자 OCIF에 결합하는 신규한 단백질(OCIF결합분자; OBM)을 코드하는 DNA, 그 DNA에 의해 코드된 아미노산서열을 갖는 단백질, 그를 사용하여 OCIF에 특이적으로 결합하는 단백질을 유전자공학적으로 제조하는 방법 및 이 단백질을 함유하는 골대사 치료제에 관한 것이다. 더구나 본 발명은 OBM의 발현을 조절하는 물질의 스크리닝방법, OBM과 결합하여 그 작용을 저해 또는 수식하는 물질의 스크리닝방법, OBM과 결합하고 OBM의 작용을 전달하는 리셉터의 스크리닝방법, 이들 스크리닝의 결과 얻어진 물질을 함유하는 의약조성물에 관한 것이다.

본 발명의 DNA에 의해 코드된 신규 단백질 OBM은 아래의 물리화학적 성질 및 생물활성을 나타낸다.

즉,

a. 파골세포형성억제인자(OCIF)에 특이적으로 결합한다.

b. 환원조건하에서 SDS-PAGE에 의한 분자량 측정에서 약 40,000( $\pm 4,000$ )의 분자량을 나타낸다. 또한, 모노머 타입의 OCIF와 크로싱크 시킨 경우의 외관상의 분자량은 약 90,000~110,000이다.

c. 파골세포의 분화, 성숙을 지지·촉진하는 활성을 가진다.

는 것이다.

본 발명의 OCIF결합분자, OBM을 코드하는 DNA를 동정하고, OBM의 성질을 평가하기 위한 탐침자(probe)로서 사용하는 사람 파골세포형성억제인자(OCIF)는 WO96/26217호에 따라 사람태아성 선유아세포주IMR-90의 배양액에서 단리할 수 있다. OBM의 DNA의 단리·동정에는 유전자조환형 사람OCIF, 유전자조환형 마우스OCIF, 유전자조환형 랫트OCIF 등을 이용할 수도 있다. 이들 유전자조환형 OCIF는 각각의 DNA를 통상법에 따라서 발현벡터로 짜넣어 CHO세포, BHK세포, 나말와세포 등의 동물세포 혹은 곤충세포등으로 발현시켜 정제함에 의해 얻을 수 있다.

목적의 단백질을 코드하는 cDNA를 분리하는(cDNA 크로닝) 방법으로서 그 단백질의 부분 아미노산서열을 결정하고 그에 대응하는 염기서열을 기초로 하이브리다이제이션(Hybridization)법에 의해 목적하는 cDNA를 단리하는 방법외에, 단백질의 아미노산서열이 불명하여도 발현벡터중에 cDNA라이브러리(library)를 구축하고, 이들을 세포중으로 도입하고, 목적하는 단백질의 발현의 유무를 스크리닝함에 의해 목적의 cDNA를 단리하는 방법(발현크로닝법)이 있다(D' Andrea et al.: Cell 57, 277~285, 1989; Fukunaga et al.: Cell 61, 341~350, 1990). 발현 크로닝법에서는 숙주세포로서 세균·효모·동물세포등이 목적에 따라 나누어 사용되어 지고 있다. 본 발명과 같이 동물세포의 막표면에 존재한다고 생각되어지는 단백질을 코드하는 cDNA를 크로닝할 때에는 동물세포를 숙주세포하는 경우가 많다. 또한 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 이러한 특징을 갖는 세포중 하나가 본 발명에서 이용된 원숭이 신장세포 COS-7세포이다. COS-7세포에서는 SV40 라지T안티겐(large T antigen)이 발현하고 있으므로 SV40의 복제개시점을 갖는 플라스미드는 세포중에서 다수 카피(copy)의 에피솜(episome)으로 존재하도록 되고, 통상보다 고 발현이 기대될 수 있다. 또한, DNA를 도입한 시점에서 수일중에 최고의 발현수준에 도달함으로써 신속한 스크리닝에 적합하다. 이 숙주세포에 고발현 가능한 플라스미드를 조합시킴에 의해 지극히 높은 수준의 유전자발현이 가능하게 된다. 플라스미드 위에 유전자의 발현양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이고, 고발현용의 프로모터로서 SRα프로모터와 사이토메가로바이러스(cytomegalovirus) 유래 프로모터등이 좋게 사용된다. 발현 크로닝에 의해 막단백질의 cDNA를 크로닝 하려고 할 때의 스크리닝법으로서 바인딩법(binding법), 페닝법(panning법), 필름에멀션법(film emulsion 법)등이 고안되고 있다.

본 발명은 발현 크로닝법과 바인딩법을 조합시킴에 의해 얻은 OCIF에 특이적으로 결합하는 단백질(OBM)을 코드하는 DNA 및 발현단백질, 및 DNA 또는 발현단백질을 이용한 생리활성물질의 스크리닝에 관한 것이다. 본 발명의 DNA가 코드하는 OBM은 OCIF를 표지하고, 그 표지체의 동물세포막 표면으로의 결합성을 시험함에 의해 검출할 수 있다. OCIF의 표지법으로서의 방사성동위원소에 의한 표지와 형광표지등, 일반적인 단백질의 표지법을 이용할 수 있다. 예를들어, OCIF의 방사성동위원소에 의한 표지로서는 티록신잔기의  $^{125}\text{I}$ 가 열거되고, 구체적 표지법으로서 요오드젠법, 클로라민T법 및 효소법등이 있다. OCIF의 동물세포막 표면으로의 결합성은 이렇게 하여 얻은 표지 OCIF를 사용하고, 통상법에 따른 방법으로 시험할 수 있다. 또한, 결합성 시험에 이용하는 배지에 표지 OCIF의 100배~400배 농도의 미표지 OCIF를 첨가함에 의해 비특이적인 결합량을 측정할 수 있다. OCIF의 특이적 결합량을 표지 OCIF의 총결합량에서 비특이적인 결합량을 빼어냄에 의해 산출된다.

본 발명자들은 파골세포의 분화에 관여하는 인자는 OCIF와 상호작용한다는 가정에 기초하여 유전자조환형 OCIF를 사용하고, OCIF가 결합하는 단백질을 분리하기 위해 마우스 골아세포상 스트로마세포주 ST2의 mRNA에서 제작한 발현 라이브러리를 이하에 기술하는 방법으로 스크리닝했다. ST2 mRNA를 근간으로 합성한 DNA를 동물세포용 발현벡터에 삽입하고, 이들을 원숭이 신장세포 COS-7세포에 유전자 도입했다.  $^{125}\text{I}$ 표지한 OCIF를 탐침자(probe)로서 사용하여 COS-7 세포 위에 발현한 목적하는 단백질을 스크리닝했다. 그 결과, OCIF와 특이적으로 결합하는 단백질을 코드하는 DNA를 분리하기에 이르르고, 이 OCIF결합분자(OCIF결합분자; OBM)를 코드하는 DNA의 염기서열을 결정했다. 또한, 이 DNA에 코드되는 OBM은 세포막 위에서 OCIF와 강하게 혹은 특이적으로 결합함을 알아냈다.

본 발명에서 말하는 비교적 온화한 조건에서의 DNA하이브리다이제이션이란 예컨대 통상법에 따라 나일론멤브레인(nylon membrane)에 DNA를 트랜스퍼(transefer)하고 고정화한 후, 하이브리다이제이션용 버퍼(buffer)중에서 방사선 표지한 탐침자의 DNA와 40~70℃, 2시간~1일밤 정도 하이브리다이제이션 시켜 0.5×SSC(0.075M 염화나트륨 및 0.0075M 구연산나트륨)에서 45℃ 10분 세정하는 조건을 말한다. 구체적으로는 통상법에 따라 나일론멤브레인에 하이본드N(high bond; 어머샴社)을 사용하고, DNA를 트랜스퍼하고 고정화한 후, 빠른 하이브리다이제이션 버퍼(Rapid Hybridization Buffer; 어머샴社)중에서  $^{32}\text{P}$ 표지한 탐침자의 DNA와 65℃ 2시간 하이브리다이제이션 시켜서 0.5×SSC(0.075M 염화나트륨 및 0.0075M 구연산나트륨)에서 45℃ 10분 세정하는 조건을 말한다.

파골세포형성의 대표적인 인비트로 배양계로서 활성형 비타민  $\text{D}_3$  혹은 PTH의 존재하에서 마우스 유래 골아세포상 스트로마세포주 ST2와 마우스 비장세포와의 공배양계가 잘 알려져 있다. 본 발명의 OBM은 활성형 비타민  $\text{D}_3$ 와 PTH와 같은 골흡수촉진인자의 존재하에서 배양한 골아세포상 스트로마세포 위에 특이적으로 유도되는 단백질을 특정된다. 더구나, 활성형 비타민  $\text{D}_3$  혹은 PTH 비존재하에서도 마우스 비장세포의 배양계에 본 발명의 DNA에 의해 코드되는 단백질을 첨가함에 의해 파골세포의 형성이 촉진되는 것으로부터, 본 발명의 DNA에 의해 코드되는 OBM은 파골세포의 분화·성숙에 관여하고 있다고 생각된다.

본 발명의 DNA를 발현벡터에 삽입하여 OBM 발현 플라스미드를 제작하고, 이를 각종 세포 또는 세균에 도입하여 발현시킴에 의해 조작형 OBM을 제조할 수 있다. 발현시킬 때의 포유동물 세포의 숙주로서 COS-7, CHO, 나말와(Namalwa)등 또는 세균의 숙주로서 대장균 등을 사용할 수 있다. 이때, DNA의 전장을 사용하여 막결합형 단백질로서 발현시키고, 혹은 막결합 부위를 코드하는 부분을 제거함에 의해 분비형, 가용화형으로 해도 발현시킬 수 있다. 이렇게 하여 제조된 조작형 OBM은 통상 사용되는 단백질정제법, 예컨대 OCIF 고정화컬럼을 사용한 어피니티(affinity) 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 혹은 겔여과 크로마토그래피 등을 조합시킴에 의해 효율 좋게 정제할 수 있다. 이렇게 하여 얻은 본 발명 단백질은 그 활성에서 골대사이상증, 예컨대 대리석병 등의 치료제로서의 의약 혹은 연구·진단용 시약으로서 유용하다.

본 발명의 DNA에 코드되는 단백질 OBM을 이용하여 (1) OBM의 발현을 조절하는 물질의 스크리닝, (2) OBM에 특이적으로 결합하고, OBM의 생물활성을 저해 혹은 수식하는 물질의 스크리닝 및 (3) 파골세포 전구세포에 존재하고, OBM의 생물활성을 전달하는 단백질(OBM 리셉터)의 스크리닝, 게다가 이 OBM 리셉터를 이용한 안타고니스트(antagonist)와 아고니스트(agonist)의 개발이 가능하다. 상술한 OBM 혹은 OBM 리셉터를 이용한 콤비네토리얼케미스트리(combinatorial chemistry)에 있어서 안타고니스트 혹은 아고니스트의 탐색에 필요한 펩티드라이브러리는 구체적으로는 아래의 방법으로 제작할 수 있다. 그 하나로 스피트(split)법이 있다(Lam et al.; Nature 354, 82~84, 1991). 이 방법은 합성담체(비즈; beads)에 각각의 아미노산(유닛)을 결합시킨 것을 각 유닛과 따로따로 합성한다. 이 합성된 담체를 한꺼번에 모두 섞고, 이어서 유닛의 수로 등분하고, 다음 유닛을 또 각각 결합시킨다. 이 조작을  $n$ 회 반복함에 의해 담체에  $n$ 개의 유닛이 결합된 라이브러리가 제작된다. 이렇게 합성을 하면 1개의 담체군에는 1종류의 서열밖에 합성되지 않으므로, 본 발명의 단백질을 이용한 상기 스크리닝법에서 양성을 나타낸 담체군을 뽑아내고, 그 아미노산서열을 결정하면 특이적으로 결합하는 펩티드를 동정할 수 있다. 또 다른 방법으로서의 파지디스플레이(phage display)법을 이용할 수도 있다. 이 방법은 랜덤한 펩티드를 코드하는 합성유전자를 파지로 발현시키는 것으로, 상기 합성라이브러리에 비해 라이브러리의 분자수를 많게 할 수 있다는 이점이 있지만, 파지가 표현할 수 없는 서열은 라이브러리에 존재할 수 없다는 것 등이 있고, 분자수당 다양성이 낮다는 결점이 있다. 파지디스플레이법에서도 동일하게 본 발명의 단백질을 이용한 스크리닝계를 이용하고, 그에 특이적으로 결합하는 파지를 파닝(panning)에 의해 농축하고, 얻은 특이적 결합성을 가지는 파지를 대장균에서 증폭하고, 그 펩티드를 코드하는 염기서열을 결정하면 좋다. 게다가, 상기 (2) 및 (3)의 스크리닝계를 사용하고, 펩티드라이브러리에서 OBM 혹은 OBM 리셉터에 특이적이고, 또 고친화성의 펩티드를 스크리닝하고 싶은 경우, 스크리닝시에 각각 OCIF와 OBM을 공존시켜 각각의 농도를 높이면서 양성을 나타낸 담체 혹은 파지를 스크리닝 함에 의해 특이적이고도 극히 고친화성의 펩티드를 얻을 수 있다. 예를 들면, 모두 조혈호르몬인 에리스로포에틴(erythropoietin; EPO)의 리셉터를 사용하고, 다양성이 풍부한 펩티드라이브러리에서 EPO상 활성을 가지는 저분자 펩티드아고니스트의 스크리닝 및 그 입체구조해석 게다가 그 입체구조에 기한 유기합성전개에 의한 EPO활성을 가지는 저분자 물질(아고니스트)의 창제에 성공했다(Nicholas et al.; Science, 273, 458~463, 1996).

또한, 본 발명자들은 파골세포형성억제인자OCIF를 사용하고, 그 결합 단백질이 활성형 비타민  $D_3$ 와 부갑상선호르몬(parathyroid hormone, PTH) 등의 골흡수인자의 존재하에서 배양한 골아세포상 스트로마세포주 ST2의 세포위에 특이적으로 발현하는 것을 모두 알아냈다. 게다가, 이 단백질은 미숙한 파골세포 전구세포에서 파골세포로의 분화·성숙에 관여하는, 소위 파골세포 분화·성숙을 지지 또는 촉진하는 인자로서의 생물활성을 가지고 있는 것을 알아내고, 이 단백질을 정제함에 의해 그 물리화학적 제성질 및 그 생물활성을 밝혔다. 본 발명자들은 본 발명의 DNA에 의해 발현되는 유전자조환형 단백질 OBM과 모두 상기 OCIF와 특이적으로 결합하는 정제 천연형 단백질과의 이동을 명확하게 하기 위해 물리화학적 성질 및 생물활성을 비교했다. 그 결과, 양 단백질 공히 ① 막결합 단백질이고 특이적으로 OCIF와 결합하고, ② SDS-PAGE에서의 분자량은 약 40,000, ③ 모노머 타입의 OCIF와 크로스링크 시킨 경우 외관의 분자량은 약 90,000~110,000 이고, 물리화학적 제성질이 좋게 일치하고 있는 것, 또 생물활성에 있어서도 양 단백질은 파골세포의 분화·성숙을 지지 또는 촉진하는 활성을 가지고 있는 것으로부터, 양 단백질은 동일하다는 가능성이 시준되었다. 더구나, 본 발명 DNA를 이용하여 유전자공학적으로 발현시켜 정제한 단백질(유전자조환형 OBM)에서 제작한 토끼 항OBM 폴리클로날항체는 상기 방법에서 얻은 정제 천연형 단백질에 교차성을 가지고, OBM과 OCIF의 특이적 결합을 저해하는 것도 동일하고, 상기 정제 천연형 단백질과 OCIF의 특이적 결합을 저해했다. 이들 결합에서 본 발명의 DNA에 의해 발현되는 유전자조환형 단백질 OBM은 상기 OCIF에 특이적으로 결합하는 천연형 단백질과 동일한 것이 밝혀졌다.

게다가, 본 발명자들은 OCIF에 특이적으로 결합하고, 천연형 혹은 유전자조환형 마우스 OBM과 동일하게 마우스 비장세포에서 파골세포의 분화·성숙을 지지·촉진하는 활성을 가지는 사람유래 OCIF결합 단백질(이하 사람 OBM이라 한다)를 코드하는 유전자(cDNA)를 단리하기 위해, 상술한 바와같이 마우스 OBM cDNA에서 제작한 프라이머를 사용하고 사람 인 파질 유래 cDNA를 주형으로 하여 폴리머라제 체인리액션(polymerase chain reaction; PCR)을 하고, 얻은 사람 OBM cDNA 단편을 탐침자로서 상기 cDNA 라이브러리를 스크리닝했다. 그 결과, OCIF와 특이적으로 결합하는 사람 유래 단백질을 코드하는 cDNA를 분리함에 성공하고, 이 사람 유래 OCIF결합 단백질, 즉 사람 OBM을 코드하는 cDNA의 염기서열을 결정했다. 이 cDNA에 코드되는 사람 OBM은 마우스 OBM과 동일하게 세포막 위에서 OCIF와 강하고도 특이적으로 결합하는 특성을 가지고, 또 마우스 비장세포에서 파골세포의 분화·성숙을 지지·촉진하는 생물활성을 가지는 것을 알아냈다. 즉, 본 발명은 파골세포형성억제인자 OCIF에 결합하는 신규한 사람 유래 단백질인 사람 OBM을 코드하는 DNA, 그 DNA에 의해 코드되는 아미노산서열을 가지는 단백질, 그 DNA를 이용하여 OCIF에 특이적으로 결합하는 성질을 가지고, 마우스 비장세포에서 파골세포의 분화·성숙을 지지·촉진하는 활성을 가지는 단백질을 유전자공학적으로 제조하는 방법 및 이 단백질을 함유하는 골대사이상증 치료제의 제공, 게다가 사람 OBM의 발현을 조절하는 물질의 스크리닝방법, 사람 OBM과 결합하여 그 작용을 저해 또는 수식하는 물질의 스크리닝방법, 사람 OBM과 결합하여 그 작용을 전달하는 리셉터의 스크리닝방법 및 이들 스크리닝의 결과 얻은 물질을 함유하는 의약조성물을 제공하는 것을 과제로 한다.

본 발명은 OCIF에 특이적으로 결합하는 특성을 가지고, 또 파골세포의 분화·성숙을 지지·촉진하는 생물활성을 가지는 신규한 사람 단백질인 사람 OBM을 코드하는 DNA, 그 DNA에 의해 코드되는 아미노산서열을 가지는 단백질, 그 DNA를 이용하여 OCIF에 특이적으로 결합하는 특성을 가지고, 또한 파골세포의 분화·성숙을 지지·촉진하는 생물활성을 가지는 단백질을 유전자공학적으로 제조하는 방법 및 이 단백질을 함유하는 골대사이상증 치료제에 관한 것이다. 게다가, 본 발명은 사람 OBM의 발현을 조절하는 물질의 스크리닝방법, 사람 OBM과 결합하여 그 작용을 저해 또는 수식하는 물질의 스크리닝방법, 사람 OBM과 결합하여 OBM의 생물활성을 전달하는 리셉터의 스크리닝방법 및 이들 스크리닝의 결과 얻은 물질을 함유하는 의약조성물, 게다가 사람 유래 OCIF결합단백질에 대한 항체 및 그 항체를 이용한 골대사이상증의 예방 및/또는 치료약에 관한 것이다.

본 발명의 DNA에 의해 코딩되는 신규 사람 유래 OCIF결합 단백질, 즉 사람 OBM은 아래의 물리화학적 성질 및 생물활성을 나타낸다.

- 즉,
- a. 파골세포형성억제인자(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF) (WO 96/26217호)에 특이적으로 결합한다.
  - b. 환원조건하에서 SDS-PAGE에 의한 분자량 측정에서 약 40,000( $\pm 5,000$ )의 분자량을 나타낸다. 또한, 모노머 타입의 OCIF와 크로소링크 시킨 경우의 외관상의 분자량은 약 90,000~110,000이다.
  - c. 파골세포의 분화, 성숙을 지지·촉진하는 생물활성을 가진다.
- 는 것이다.

본 발명이 사람 OBM을 코딩하는 cDNA를 분리 동정하기 위한 탐침자로서 사용하는 마우스 유래 OCIF결합 단백질인 마우스 OBM cDNA는 상술한 방법에 따라서 마우스 골아세포상 스트로마세포주 ST2의 cDNA 라이브러리에서 분리할 수 있다. 또한, 사람 OBM cDNA를 발현함에 의해 얻어지는 단백질의 특성 및 그 생물활성을 평가하기 위해 필요한 사람 파골세포형성억제인자 OCIF는 WO96/26217호 기재의 방법에 따라서, 사람 전유아세포주 IMR-90의 배양액에서 분리 혹은 그 DNA를 이용하여 유전자공학적으로 제조할 수 있다. 사람 OBM의 특성과 생물활성의 평가에는 유전자조환 사람 OCIF, 유전자조환 마우스 OCIF, 유전자조환 랫트 OCIF 등을 이용할 수도 있다. 이들 유전자조환형 OCIF는 각각의 cDNA를 통상법에 따라 발현벡터에 짜넣어 CHO세포, BHK세포, 나말와세포 등의 동물세포 혹은 곤충세포등에서 발현시켜 정제함에 의해 얻을 수 있다.

목적하는 단백질을 코딩하는 사람형의 cDNA를 분리하는(cDNA크로닝) 방법으로는 ① 그 단백질을 정제하고, 그 부분 아미노산서열을 결정하고, 그에 대응하는 염기서열을 가지는 DNA를 탐침자로서 이용하여 하이브리다이제이션법에 의해 목적하는 cDNA를 분리하는 방법, ② 목적하는 단백질의 아미노산서열이 불명하여도 발현벡터중에 cDNA라이브러리를 구축하고, 그들을 세포중에 도입하고, 목적 단백질 발현의 유무를 스크리닝함에 의해 목적하는 cDNA를 분리하는 방법(발현 크로닝법), 및 ③ 사람유래의 목적 단백질과 같은 특성 및 생물활성을 가지는 사람 이외의 포유동물 유래의 단백질을 코딩하는 유전자, cDNA가 크로닝하려고 하는 사람유래의 목적 단백질의 cDNA와 높은 호모로지(homology)를 가진다고 상정하고, 전자의 cDNA를 탐침자로 하고 사람 세포 혹은 조직에서 구축한 cDNA 라이브러리에서 하이브리다이제이션법과 폴리머라제 체인 리액션(PCR)법에 의해 목적하는 사람 단백질을 코딩하는 cDNA를 분리하는 방법이 있다.

사람 OBM cDNA는 상기 마우스 OBM cDNA와 높은 상동성을 가진다는 상정하에 사람 OBM 생산세포 혹은 조직은 후자의 cDNA를 탐침자로 하여 노란(Northern)하이브리다이제이션법에 의해 조사할 수 있다. 사람 OBM cDNA는 마우스 OBM cDNA에서 제작한 마우스 OBM 라이브러리를 이용하고, 상기과 같이 하여 동정한 사람 OBM 생산조직, 예컨대 사람 인과 절등에서 구축한 cDNA를 주형으로 하여 PCR에 의해 사람 OBM cDNA 단편을 얻어 이 사람 OBM cDNA 단편을 탐침자로 하고, 상기과 같이 동정한 사람 OBM 생산세포 혹은 조직의 cDNA 라이브러리를 스크리닝함에 의해 얻을 수 있다. 본 발명은 이렇게 하여 얻은 OCIF에 특이적으로 결합하는 성질을 가지고, 또 파골세포의 분화·성숙을 지지·촉진하는 생물활성을 가지는 사람유래 단백질, 즉 사람 OBM을 코딩하는 DNA에 관한 것이다. 본 발명의 DNA가 코딩하는 사람 OBM은 막 관통영역을 가지는 막 결합형 단백질을 코딩하는 것으로부터 OCIF를 표지하고, 본 발명의 cDNA를 발현한 동물세포 표면으로 OCIF 표지체의 결합에 의해 검출할 수 있다. OCIF의 표지법으로는 상술한 바와같이 방사성 동위원소에 의한 표지와 형광표지 등 일반적인 단백질의 표지법을 이용할 수 있다.

본 발명의 사람 OBM cDNA에 의해 발현되는 단백질의 분자량은 겔여과 크로마토그래피와 SDS-PAGE 등을 이용하여 측정된다. 보다 정확하게 분자량을 측정하기 위해서는 SDS-PAGE를 이용하는 것이 좋고, 사람 OBM은 환원조건하에서 약 40,000( $40,000 \pm 5,000$ )의 분자량을 가지는 단백질로서 특정된다.

본 발명에서 말하는 비교적 온화한 조건에서의 DNA 하이브리다이제이션이란, 예컨대 통상법에 따라 나일론멤브레인에 DNA를 트랜스퍼하고, 고정화한 후, 하이브리다이제이션용 버퍼중에서 방사선 표지한 탐침자의 C:W와 40~70°C 2시간에서 하룻밤 정도 하이브리다이제이션 시켜 0.5×SSC(0.075M 염화나트륨 및 0.0075M 구연산나트륨)에서 45°C 10분간 세정하는 조건을 말한다. 보다 구체적으로는 통상법에 따라 나일론멤브란에 하이브리드N(아머샴社)을 이용하고 DNA를 트랜스퍼하고, 고정화한 후, 래피드 하이브리다이제이션 버퍼(아머샴社)중에서 <sup>32</sup>P 표지한 탐침자의 DNA와 65°C 2시간 하이브리다이제이션 시켜서 상기 0.5×SSC에서 45°C 10분간 세정하는 조건을 말한다.

파골세포형성의 대표적인 인비트로 배양계로서 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 혹은 PTH 존재하에서 마우스 유래 골아세포상 스트로마세포주 ST2와 마우스 비장세포와의 공배양계가 잘 알려져 있다. 이 인비트로 배양계에서의 파골세포형성에는 골아세포상 스트로마세포와 비장세포간의 접촉에 의한 상호작용 및 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 PTH 등의 골흡수촉진 인자의 존재가 불가결하다. 이 인비트로 배양계에 있어서, 골흡수촉진 인자 비존재하에서 혹은 파골세포형성 지지능이 없는 원숭이 신장세포주인 COS세포에 본 발명의 cDNA를 발현시킨 유전자조환형 COS세포주는 골아세포상 스트로마세포주 ST2와 동일하게 비장세포에서 파골세포형성 지지능을 획득한다. 또한 본 발명의 cDNA와 막결합형 단백질을 코딩하는 것에서 이 막결합 부위를 코딩하는 부분을 제거함에 의해 분비형, 가용형으로서 발현시킬 수도 있다. 골흡수촉진 인자 비존재하의 상기 인비트로 배양계에 이 분비형 사람 OBM을 첨가한 것만으로 파골세포의 형성의 일어나는 것도 확인되었다. 이들 결과로부터 본 발명의 cDNA에 의해 코딩되는 사람 OBM은 파골세포의 분화·성숙에 관여하는 인자로서 특정된다.

본 발명의 cDNA를 발현벡터에 삽입하여 사람 OBM 발현 플라스미드를 제작하고, 이들 각종 세포 또는 균주에 도입하여 발현시킬 때에 의해 조환형 사람 OBM을 제조할 수 있다. 발현시킬 때의 포유동물 세포 숙주로서 COS-7, CHO, 나말와 세포 등을, 또는 세균의 숙주로서 대장균 등을 이용할 수 있다. 이때, cDNA의 전장을 이용하여 막결합형 단백질로서 발현시킬

수 있고, 또 막결합 부위를 코드하는 부분을 제거함에 의해 분비형, 가용화형으로서도 발현시킬 수 있다. 이렇게 하여 제조된 조환형 사람 OBM은 통상 이용되는 단백질정제법, 예컨대 OCIF 고정화컬럼을 사용한 어피니티 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피와 겔여과 크로마토그래피 등을 조합시킴에 의해 효율 좋게 정제할 수 있다. 이렇게 하여 얻은 본 발명 사람 OBM은 그 활성에 의해 골대사이상증, 예컨대 대리석병 등의 치료제로서의 의약 혹은 연구·진단용 시약으로서 유용하다.

본 발명의 cDNA에 코드되는 단백질, 사람 OBM을 이용함에 의해 ① 사람 OBM의 발현을 조절하는 물질의 스크리닝, ② 사람 OBM에 특이적으로 결합하고, 그 생물활성을 저해 혹은 수식하는 물질의 스크리닝, 및 ③ 사람 파골세포 전구세포에 존재하고, 사람 OBM의 생물활성을 전달하는 사람 단백질(사람 OBM 리셉터)의 스크리닝, 게다가 이 사람 OBM 리셉터를 이용한 안타고니스트와 아고니스트의 개발이 가능하다. 상술한 사람 OBM 혹은 사람 OBM 리셉터를 이용한 콤비네토리얼 케미스트리에 있어서, 안타고니스트 혹은 아고니스트의 탐색에 필요한 펩티드 라이브러리는 마우스 OBM을 이용한 스크리닝의 방법과 동일한 방법으로 제작할 수 있고, 마우스 OBM 대신에 사람 OBM을 이용하여 펩티드 라이브러리를 동일하게 스크리닝함에 의해 특이적이고도 극히 고친화성의 펩티드를 얻을 수 있다.

더더욱, 상술한 바와같이 OBM은 유용성이 높은 단백질이지만, 이 단백질의 측정을 행하기에는 OBM을 특이적으로 인식하는 항체와 그 항체를 이용한 효소면역측정법의 구축이 필수적이다. 그렇지만, 지금까지 OBM의 측정에 유용한 항체는 얻어지지 않았다. 게다가, OBM 혹은 sOBM의 생물활성을 중화하는 OBM/sOBM 항체는 OBM 혹은 sOBM의 작용, 즉 파골세포형성의 촉진작용을 억제함이 상정되고, 골대사이상증의 치료약으로서의 개발이 기대되지만, 이러한 항체도 아직 얻어지지 않고 있다.

상술한 상황을 감안하여 본 발명자들은 예의 연구의 결과, 파골세포형성억제인자(OCIF)에 특이적으로 결합하는 막결합 단백질(OCIF 결합분자; OBM) 및 막결합 부위를 결손한 가용성 OBM(sOBM)의 양 항원을 인식하는 항체(항 OBM/sOBM 항체)를 찾아내기에 이르렀다. 따라서, 본 발명은 파골세포형성억제인자OCIF에 특이적으로 결합하는 막결합 단백질 OBM 및 막결합 부위를 결손한 가용성 OBM(sOBM)의 양 항원을 인식하는 항체(항 OBM/sOBM 항체), 그 제조방법, 이 항체를 이용한 OBM 및 sOBM의 측정방법, 게다가 이 항체를 유효성분으로 하는 골대사이상증 예방 및/또는 치료제를 제공하는 것을 과제로 한다.

본 발명은 파골세포형성억제인자(Osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF)에 특이적으로 결합하는 막결합 단백질(OCIF binding molecule; OBM) 및 막결합 부위를 결손한 가용성 OBM(sOBM)의 양 항원을 인식하는 항체(항 OBM/sOBM 항체), 그 제조방법, 이 항체를 이용한 OBM 및 sOBM의 측정방법, 게다가 이 항체를 유효성분으로 하는 의약, 특히 골대사이상증 예방 및/또는 치료제에 관한 것이다.

본 발명의 항체는 OBM 및 sOBM의 생물활성인 파골세포형성 촉진활성을 중화하는 활성을 가지고, 아래의 성질을 갖는 항체로부터 구성된다.

즉,

- a) 마우스 OBM 및 마우스 sOBM의 양 항원을 인식하는 폴리클로날 항체(항 마우스 OBM/sOBM 폴리클로날 항체)
- b) 사람 OBM 및 사람 sOBM의 양 항원을 인식하는 폴리클로날 항체(항 사람 OBM/sOBM 폴리클로날 항체)
- c) 마우스 OBM 및 마우스 sOBM의 양 항원을 인식하는 모노클로날 항체(항 마우스 OBM/sOBM 모노클로날 항체)
- d) 사람 OBM 및 사람 sOBM의 양 항원을 인식하는 모노클로날 항체(항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체)
- e) 마우스 OBM 및 마우스 sOBM의 양 항원에 교차성을 가지는 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체, 로서 구성된다.

마우스 OBM 및 마우스 sOBM의 양 항원을 인식하는 폴리클로날 항체(이하 항 마우스 OBM/sOBM 폴리클로날 항체라 칭함) 및 사람 OBM 및 사람 sOBM의 양 항원을 인식하는 폴리클로날 항체(이하 항 사람 OBM/sOBM 폴리클로날 항체라 칭함)는 아래의 수단에 의해 얻을 수 있다. 면역용 항원으로서의 정제 마우스 OBM은 상술한 방법에 따라 얻을 수 있다. 즉, 마우스 골아세포상 스트로마세균주 ST2를 활성 비타민 D<sub>3</sub> 처리하고, 그 세균막 위의 OBM을 OCIF 고정화컬럼 및 겔여과 크로마토그래피에 의해 정제함에 의해 천연형 마우스 OBM(native OBM)을 얻을 수 있다. 또한, 상술한 마우스 OBM cDNA(서열번호 15) 또는 사람 OBM cDNA(서열번호 12)를 통상법에 의해 발현벡터에 짜넣어 CHO세포, BHK세포, 나말와, COS-7세포 등의 동물세포, 곤충세포 혹은 대장균등으로 발현시켜 상기와 동일한 방법으로 정제함에 의해 유전자조환형 마우스 OBM(서열번호 1) 또는 사람 OBM(서열번호 11)을 얻을 수 있고, 이를 면역용 항체로서 사용해도 좋다. 이때, 막결합 단백질인 마우스 OBM 혹은 사람 OBM을 대량이고도 고도로 정제하기에는 다대한 노력을 요한다. 한편, 막결합 단백질인 OBM과 그 막결합 부위를 결손시켜 얻는 가용화 단백질인 가용화 OBM(sOBM)과는 상술한 바와같이 파골세포의 분화·성숙 촉진활성에 있어서 차이가 없는 것이 확인되어 있다. 따라서, 마우스 sOBM 및 사람 sOBM 발현 및 그 고도 정제가 비교적 용이한 것으로부터 이들 가용화 단백질인 sOBM을 면역용 항원으로서 사용해도 좋다. 마우스 sOBM(서열번호 16) 및 사람 sOBM(서열번호 17)은 마우스 sOBM cDNA(서열번호 18) 또는 사람 sOBM cDNA(서열번호 19)의 5'말단의 상류측에 다른 분비 단백질 유래 기지의 시그널서열을 코드하는 염기서열을 부가하고, 상기와 동일하게 유전자공학적으로 수법에 의해 발현벡터에 짜넣어 각종 동물세포, 곤충세포 혹은 대장균 등을 숙주화하여 발현하고, 정제함에 의해 각각 얻을 수 있다. 이렇게 하여 얻은 면역용 항원을 인산염완충 생리식염수(PBS)에 용해하고, 필요에 따라 같은 용량의 프로인드(Freund)완전 아쥘벤트(adjuvant)로 혼합하여 유화한 후, 동물에 약 1주간 간격으로 피하 투여하고, 수회 면역한다. 항체를 측정하고 최고의 항체가에 달한 시점에서 부스터(booster) 투여하고, 투여 10일 후에 모두 채혈을 한다. 얻은 항 혈청을 황산암모늄 분획 침전하고, 글로브린 분획을 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하던가, 혹은 항 혈청을 바인딩버퍼(binding buffer; Biorad社)로 2배 희석하고, 그 희석 항 혈청을 프로테인A 또는 프로테인G 세파로스컬럼 크로마토그래피에 의해 정제함에 의해 목적으로 하는 항 마우스 또는 항 사람 OBM/sOBM 폴리클로날형 항체를 얻을 수 있다.



본 발명의 모노크로날 항체를 아래의 방법에 의해 얻을 수 있다. 즉, 모노크로날 항체의 제작에 필요한 면역용 항원으로서는 폴리크로날 항체일 때와 동일하게 천연형 마우스 OBM(native OBM), 유전자조환 마우스형 또는 사람 OBM, 유전자조환 마우스형 또는 사람형 sOBM을 이용할 수 있다. 각각의 항원에 의해 포유동물을 면역하던가, 혹은 인비트로법에 의해 면역한 임파구세포를 골수종 세포주(미에로머)등과 융합시켜 통상법에 의해 하이브리도마(hybridoma)를 제작한다. 이 하이브리도마 배양액에 대하여 고도로 정제된 각각의 항원을 사용하여 솔리드페이스(solid phase) ELISA에 의해 각각의 항원을 인식하는 항체생산 하이브리도마를 선택한다. 얻은 하이브리도마를 크로닝하고, 수립(樹立)한 안정한 항체생산 하이브리도마를 각각 배양함에 의해 목적으로 하는 항체가 얻어진다. 하이브리도마의 제작에 있어서는 포유동물을 사용하는 경우, 마우스와 랫트 등의 작은 동물을 사용하는 것이 일반적이다. 면역은 항원을 적당한 용매, 예컨대 생리식염수등에서 적당한 농도로 희석하고, 이 용액을 정맥내나 복강내에 투여하고, 이의 필요에 따라 프로인드 완전자주변트를 병용 투여하고, 동물에 1~2주간 간격으로 3~4회 정도 투여하는 방법이 일반적이다. 이렇게 하여 면역된 동물을 최종 면역후 3일째에 해부하고, 적절한 비장에서 얻은 비장세포를 면역세포로서 사용한다. 면역세포와 세포융합하는 마우스 유래의 미에로마로서는, 예컨대 p3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP-2/0, F0, P3x63 Ag8, 653 및 S194등이 열거된다. 또한, 랫트 유래의 세포로서는 R-210 등의 세포주가 열거된다. 사람형의 항체를 생산하는 경우에는 사람 B임파구를 인비트로로 면역하고, 사람 미에로머 세포와 EB바이러스에 의해 형질 전환한 세포주와 세포융합 시킴에 의해 사람형의 항체를 생산할 수 있다. 면역된 세포와 미에로머 세포주와의 융합은 공지의 방법, 예컨대 코흘러(Koehler)와 밀스테인(Milstein)의 방법(Koehler et al.: Nature 256, 495~497, 1975)이 일반적으로 사용되지만, 전기펄스를 이용한 전기펄스법 등이라도 좋다. 면역 임파구와 미에로머 세포주는 통상 행해지고 있는 세포수의 비율로 혼합하고, 일반적으로 사용되는 소 태아혈청(FCS) 불함류 세포배양용 배지에 폴리에틸렌글리콜을 첨가하여 융합처리를 하고, FCS첨가 HAT선택배지로 배양을 하여 융합세포(하이브리도마)를 선별한다. 이어서, 항체를 생산하는 하이브리도마를 ELISA, 프라그(plaque)법, 옥타로니(ouchterlony)법, 응집법등 통상 이용되는 항체의 검출방법에 의해 선택하고, 안정한 하이브리도마를 수립한다. 이렇게 하여 수립된 하이브리도마를 통상의 배양방법에 의해 계대배양 가능하고, 필요에 따라 동결보존할 수 있다. 하이브리도마를 통상법에 의해 배양하여 그 배양액 또는 포유동물의 복강내로 이식함에 의해 복수(腹水)에서 항체를 회수할 수 있다. 배양액 혹은 복수중의 항체는 염석법, 이온교환 및 겔여과 크로마토그라피, 단백질A 또는 단백질G 어피니티 크로마토그라피 등 통상 사용되는 방법에 의해 정제할 수 있다. 이러한 방법에 의해 항원으로서 sOBM을 이용하여 얻은 모노크로날 항체의 거의 모두는 sOBM 뿐만 아니라 OBM에서도 특이적으로 인식할 수 있는 항체(항 OBM/sOBM 모노크로날 항체라 칭함)이다. 이들 항체는 OBM 및 sOBM 각각의 측정에 이용할 수 있다. 이들 항체는 방사성 아이소토프(radioisotope)나 효소 라벨함에 의해 라디오이뮤노어세이(radioimmunoassay; RIA)와 엔자임이뮤노어세이(enzymeimmunoassay; EIA)로 알려져 있는 측정계에서 이용됨에 의해 OBM량 및 sOBM량을 측정할 수 있다. 이들 측정계를 이용함에 의해 혈청·노 등의 생체 시료중 sOBM량을 용이하고도 고감도로 측정할 수 있다. 또한, 이들 항체를 이용함에 의해 조직과 세포표면에 결합한 OBM량을 바인딩어세이 등에 의해 용이하고도 고감도로 측정할 수 있다.

얻은 항체를 사람에 대한 의약으로 이용하는 경우, 항원성의 문제에서 사람형 항 사람 OBM/sOBM항체를 제작하는 것이 소망스럽다. 사람형 항 사람 OBM/sOBM항체의 제작은 아래에 기술한 바와같은 방법에 의해 얻을 수 있다. 즉, ① 사람 말초혈 혹은 비장에서 채취한 사람임파구를 인비트로(in vitro)에서 IL-4존제하 항원인 사람 OBM 혹은 사람 sOBM에서 감각(感作)하고, 감각한 사람임파구를 마우스와 사람과의 헤테로하이브리도마인  $K_6H_6/B_5$ (HTCC CRL1823)와 세포융합 시킴에 의해 목적하는 항체 생산 하이브리도마를 스크리닝한다. 얻은 항체생산 하이브리도마가 생산하는 항체는 사람형 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체이다. 이들 항체의 안에서 OBM/sOBM의 활성을 중화하는 항체를 선별한다. 그렇지만, 이렇게 사람임파구를 인비트로로 감각하는 방법에서는 일반적으로 항원에 대하여 고친화성의 항체를 얻기에는 곤란하다. 따라서, 사람 OBM 및 sOBM에 고친화성의 모노크로날 항체를 얻기에는 상기와 같이 하여 얻은 저친화성 사람형 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체를 고친화할 필요가 있다. 이에 상기와 같이 하여 얻은 중화항체인 것의 저친화성인 사람형 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체의 CDR영역(특히 CDR-3)에 랜덤(random)변이를 도입하고, 이를 파지(噬)로 발현시켜 사람 OBM/sOBM을 고상화한 플레이트를 이용하여 파지 디스플레이법에 의해 항원인 사람 OBM/sOBM에 강력하게 결합하는 파지를 선택하고, 이 파지를 대장균에서 증식하고, 그 염기서열에서 고친화성을 가지는 CDR의 아미노산서열을 결정하면 좋다. 이렇게 하여 얻은 사람형 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체를 코드하는 유전자를 일반적으로 사용되고 있는 포유동물 세포용 발현벡터에 짜넣어 발현시킴에 의해 사람형 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체가 얻어진다. 이들중에서 사람 OBM/sOBM의 생물활성을 중화하고, 또 고친화성인 목적하는 사람형 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체를 선별할 수 있다. 또한, ② Balb/c 마우스를 이용하여 본 발명과 같은 방법으로 통상법(Koehler et al.: Nature 256, 495~497, 1975)에 의해 마우스형 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체를 제작하고, 사람 OBM/sOBM의 생물활성을 중화하고, 또 고친화성을 가지는 모노크로날 항체를 선별한다. 이 고친화성 마우스형 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체의 CDR-영역(CDR-1, 2 및 3)을 사람 IgG의 CDR영역에 이식하는 CDR그라프팅(CDR-grafting; Winter and Milstein: Nature 349, 293~299, 1991)의 수법을 구사함에 의해 사람형화가 가능하다. 상기에 더하여, 더구나 ③ 사람 말초혈 임파구를 밀결합 면역결핍(Severe combined immune deficiency; SCID) 마우스에 이식하고, 이 이식된 SCID마우스는 사람형 항체를 생산하는(Mosier D. E. et al.: Nature 335, 256~259, 1988; Duchosal M. A. et al.: Nature 355, 258~262, 1992) 것으로, 항원으로서 사람 OBM 혹은 sOBM을 항원으로서 감각하고, 스크리닝함에 의해 사람 OBM/sOBM에 특이적인 사람형 모노크로날 항체를 생산하는 임파구를 그 마우스에서 채취할 수 있다. 얻은 임파구를 상술한 사람형 항체의 제작법 ①과 동일하게, 마우스와 사람의 헤테로하이브리도마인  $K_6H_6/B_5$ (ATCC CRL1823)와 세포융합시켜 얻어진 하이브리도마를 스크리닝함에 의해 목적하는 사람형 모노크로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 얻을 수 있다. 이렇게 하여 얻은 하이브리도마를 배양함에 의해 목적하는 사람형 모노크로날 항체를 대량으로 제작할 수 있고, 상술한 방법과 동일하게 정제함에 의해 정제품을 얻을 수 있다. 또한, 목적하는 사람형 모노크로날 항체를 생산하는 하이브리도마에서 cDNA 라이브러리를 구축하고, 목적하는 사람형 모노크로날 항체를 코드하는 유전자(cDNA)를 크로닝하고, 이 유전자를 유전자공학적 수법에 의해 적당한 발현벡터에 짜넣어 각종 동물세포, 곤충세포 혹은 대장균 등을 숙주로 하여 발현시킴에 의해 유전자조환 사람형 모노크로날 항체를 대량으로 제조할 수 있다. 얻은 배양액에서 상술한 방법과 같은 방법에 의해 정제함에 의해 정제된 사람형 모노크로날 항체를 대량으로 얻을 수 있다.

게다가, 상술한 방법에서 얻은 항 OBM/sOBM 모노크로날 항체중에서 OBM/sOBM의 생물활성을 중화하는 항체가 얻어질 수 있다. 이들 OBM/sOBM의 생물활성을 중화하는 항체는 항체내에서 OBM/sOBM의 생물작용, 즉 파골세포형성 촉진작용을 블록함으로써 의약으로서 특히 골대사이상증의 예방 및/또는 치료제로서 기대된다. 항 OBM/sOBM항체에 의한 OBM 또는 sOBM의 생물활성의 중화활성은 인비트로에서의 파골세포형성계에서 파골세포형성의 억제활성으로 측정할 수 있다. 인비트로 어세이계로서 아래 세가지 방법이 있다. 즉, 파골세포형성(osteoclastogenesis)의 인비트로 배양계로서 ① 활성형 비타민  $D_3$ 와 텍사메사존의 존재하에서 마우스 골아세포상 스트로마세포주 ST2세포와 마우스 비장세포와의 공배양계, ② 원숭이 신장세포주 COS-7세포위에 OBM을 발현시켜 포름알데히드에 의해 고정화하고, M-CSF존재하에서

그 세포위에서 마우스 비장세포를 배양하는 공배양계, ③ 유전자조환 OBM 및 M-CSF 존재하에서 마우스 비장세포를 배양하는 계등이 열거된다. 이들 배양계에 여러 가지 농도로 항 OBM/sOBM항체를 첨가하고, 파골세포 형성에 미치는 영향을 조사함에 의해 항 OBM/sOBM항체에 의한 파골세포형성 억제활성을 측정할 수 있다. 또한, 인비오에서의 실험동물에 이용한 골흡수 억제활성에 의한 항 OBM/sOBM항체의 파골세포형성 억제활성을 평가할 수 있다. 즉, 파골세포형성이 항진하고 있는 동물 모델로 하여 난과적출 모델이 있다. 이 중의 실험동물에 항 OBM/sOBM항체를 투여하고, 골흡수 억제활성(골밀도의 증감활성)을 측정함에 의해 항 OBM/sOBM항체에 의한 파골세포형성 억제활성을 측정할 수 있다.

이렇게 하여 얻은 OBM/sOBM의 생물활성을 증화하는 항체는 의약으로서 특히 골대사이상증의 예방 및/또는 치료를 목적으로 한 의약조성물로서, 혹은 이러한 질환의 면역학적 진단을 위한 항체로서 이용된다. 본 발명 항체는 제제화하여 경구적 혹은 비경구적으로 투여할 수 있다. 본 발명 항체를 포함하는 제제는 OBM 및/또는 sOBM을 인식하는 항체를 유효성분으로서 함유하는 의약조성물로 하여 사람 혹은 동물에 대해 안전하게 투여되는 것이다. 의약조성물의 형태로서는 점액을 포함하는 주사제, 좌제, 경구제, 설하제, 경피흡수제 등이 권장된다. 모노클로날 항체를 고분자 단백질인 것에서 바이알 병(vial 瓶) 등의 유리용기와 주사통 등으로의 흡착이 현저할 뿐만 아니라 불안정하고, 여러 가지 물리화학적 인자, 예컨대 열, pH 및 습도 등에 의해 용이하게 실활(失活)한다. 따라서 안정한 형태로 제제화하기 위해 안정화제, pH조정제, 완충제, 가용화제, 계면활성제 등을 첨가한다. 안정화제로서는 글리신, 알라닌 등의 아미노산류, 텍스트란 40 및 만노우스 등의 당류, 솔비톨, 만니톨, 크실톨 등의 당알콜류가 열거되고, 또한 이들의 2종 이상을 병용해도 좋다. 이들 안정화제의 첨가량은 항체의 중량에 대하여 0.01~100배, 특히 0.1~10배 첨가하는 것이 좋다. 이들 안정화제를 가함에 의해 액상제 또는 동결건조제제의 보존안정성을 향상할 수 있다. 완충제로서는 예컨대 인산버퍼, 구연산버퍼 등이 열거된다. 완충제는 액상제 또는 동결건조제제의 재용해 후 수용액의 pH를 조정하고, 항체의 안정성, 용해성에 기여한다. 완충제의 첨가량으로서는 예컨대 액상제 또는 동결건조제제를 재용해 한 후의 수량에 대해 1~10mM로 하는 것이 좋다. 계면활성제로서는 좋기로는 폴리솔베이트 20, 프루로닉(pulluronic)F-68, 폴리에틸렌글리콜 등, 특히 좋기로는 폴리솔베이트 80이 열거되고, 또 이들의 2종 이상을 병용해도 좋다. 항체와 같은 고분자 단백질은 용기의 재질인 유리나 수지 등에 흡착하기 쉽다. 따라서 계면활성제를 첨가하는 것에 의해 액상제 또는 동결건조제제의 재용해 후 항체의 용기로의 흡착을 방지할 수 있다. 계면활성제의 첨가량으로서는 액상제 또는 동결건조제제의 재용해 후 물중량에 대해 0.001~1.0% 첨가함이 좋다. 이상과 같은 안정화제, 완충제 혹은 흡착방지제를 가하여 본 발명 항체의 제제를 조제할 수 있지만, 특히 의료용 또는 동물약용 주사제로서 이용하는 경우는 삼투압비로서 허용되는 삼투압비는 1~2가 좋다. 삼투압비는 약제화시에 염화나트륨의 증감에 의해 조제할 수 있다. 조제중의 항체 함량은 적용질환 적용투여경로 등에 따라 적절히 조정할 수 있고, 사람에 대한 사람형화 항체의 투여량은 항체의 사람 OBM/sOBM에 대한 친화성, 즉 사람 OBM/sOBM에 대한 해리정수(Kd값)에 의존하고, 친화성이 높음(Kd값이 낮음) 만큼 사람에 대한 투여량을 적게해도 약효를 발현할 수 있다. 또한, 사람형 항체는 사람피중에서의 반감기가 약 20일간으로 길므로, 예컨대 사람에 대하여 투여할 시에는 약 0.1~100mg/kg을 1~30일간에 1회 이상 투여하면 좋다.

#### [실시에]

이하의 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 이들은 단순히 예시하는 것만이고 본 발명은 이들에 의해 어떠한 한정도 되는 것은 아니다.

#### [실시예 1]

##### 본 발명 단백질의 제조

##### (1) ST2 세포의 대량 배양

마우스 골아세포상 스트로마세포주 ST2(RIKEN CELL BANK, RCB0224)는 10% 소 태아혈청을 함유하는  $\alpha$ -MEM 배지를 이용하여 배양했다. 부착세포용 225cm<sup>2</sup> T플라스크에서 컨플루언트로 될 때까지 배양한 ST2세포를, 트립신 처리하여 T플라스크로부터 벗겨서 세정한 후, 5매의 225cm<sup>2</sup> T플라스크에 옮기고, 10<sup>-8</sup>M 활성형 비타민 D<sub>3</sub>(Calcitriol), 10<sup>-7</sup>M 텍사메사존 및 10% 소 태아혈청을 첨가한  $\alpha$ -MEM배지 각각 60ml를 가하여 CO<sub>2</sub> 인큐베이터 중에서 7~10일간 배양했다. 배양한 ST2 세포는 셀스크레이퍼를 이용하여 회수하고, 사용하기까지 -80℃로 보존했다.

##### (2) 막분획분의 제조와 막결합단백질의 가용화

225cm<sup>2</sup>의 T플라스크 80매를 이용하여 배양한 실시예 1-(1) 기재의 ST2세포(용량 약 12ml)에 프로테아제 저해제(2mM APMSFP, 2mM EDTA, 2mM o-phenanthroline, 1mM leupeptin, 1 $\mu$ g/ml pepstatin A 및 100 units/ml aprotinin)를 함유하는 10mM 트리스 염산완충액(pH7.2)를 3배 용량(36ml) 가했다. 볼텍스믹서(vortex mixer)를 이용하여 30초간 이 세포를 격렬히 교반한 후, 얼음중에서 10분간 방치했다. 호모지나이저(DOUNCE TISSUE GRINDER, A syringe, WHEATON SCIENTIFIC 社)를 이용하여 세포를 파쇄했다. 이 세포파쇄액에 상기 프로테아제 저해제, 0.5M 슈크로스, 0.1M 염화칼륨, 10mM 염화마그네슘, 및 2mM 염화칼슘을 가한 10mM 트리스 염산완충액(pH7.2)의 등량(48ml)을 가해 교반한 후, 4℃, 600 $\times$ g으로 10분간 원심분리했다. 이 원심분리에 의해, 세포핵과 미파쇄의 세포를 침전분획분으로 분리했다. 원심분리로 얻은 상청을 4℃, 150,000 $\times$ g으로 90분간 원심분리하고, 침전분획분으로서 ST2 세포의 막분획분을 얻었다. 이 막분획분에, 상기 프로테아제 저해제, 150mM 염화나트륨, 및 0.1M 슈크로스를 함유하는 10mM 트리스 염산완충액(pH7.2) 8ml를 가한 후, 20% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate, Sigma 社) 200 $\mu$ l를 가해 4℃로 2시간 교반했다. 이 액을 4℃, 150,000 $\times$ g으로 60분간 원심분리하고, 그 상청을 가용화 막분획분으로서 얻었다.

#### [실시예 2]

##### 본 발명 단백질의 정제

##### (1) OCIF 고정화 어피니티컬럼의 조제



하이트랩 NHS-활성(HiTrap NHS-activated)컬럼(1ml, 팔마시아社)내의 이소프로판올을 1ml 염산으로 치환한 후, WO96/26217호 공보기재의 방법으로 조제한 유전자조환형 OCIF 13.0mg을 함유하는 0.2M NaHCO<sub>3</sub>/0.5M NaCl(pH 8.3)용액 1ml를 시린지(5ml, 테루모社)를 이용하는 컬럼에 첨가했다. 실온에서 30분간 커플링반응 시킨 후, 과잉한 활성기를 불활성화하기 위해 0.5M 에탄올아민/0.5M NaCl(pH 8.3)과 0.1M 초산/0.5M NaCl(pH 4.0)를 3ml씩 교대로 3회 흘리고, 다시 0.5M 에탄올아민/0.5M NaCl(pH 8.3)으로 치환하여 실온에서 1시간 방치했다. 그 후, 0.5M 에탄올아민/0.5M NaCl(pH 8.3)과 0.1M 초산/0.5M NaCl(pH 4.0)에서 두 번 세정하고, 50mM 트리스/1M NaCl/0.1% CHAPS 완충액(pH 7.5)으로 치환했다.

## (2) OCIF고정화 어피니티컬럼에 의한 본 발명 단백질의 정제

OCIF결합단백질의 정제는 특별히 언급하지 않는한 4℃에서 행했다. 상술한 OCIF고정화 어피니티컬럼을 실시예 1-(2) 기재의 프로테아제 저해제, 0.15M 염화나트륨 및 0.5% CHAPS를 가한 10mM 트리스-염산완충액(pH 7.2)으로 평형화했다. 이 컬럼에 실시예 1-(2)항 기재의 가용화 막분획분 약 8ml를 유속 0.01ml/분 으로 부하했다. 이 컬럼에 상기 프로테아제 저해제, 0.15M 염화나트륨 및 0.5% CHAPS를 가한 10mM 트리스-염산완충액(pH 7.2)을 유속 0.5ml/분 으로 100분간 흘려 컬럼을 세정했다. 이어서, 프로테아제 저해제, 0.2M 염화나트륨 및 0.5% CHAPS를 가한 0.1M 글리신-염산완충액(pH 3.3)을 유속 0.1ml/분 으로 50분간 흘리고, 컬럼에 흡착한 단백질을 용출했다. 동일하게, 프로테아제 저해제, 0.2M 염화나트륨 및 0.5% CHAPS를 가한 0.1M 구연산나트륨완충액(pH 2.0)을 유속 0.1ml/분 으로 50분간 흘리고, 컬럼에 흡착한 단백질을 용출했다. 용출액은 0.5ml/플렉션으로 분취(分取)했다. 분취한 분획분에는 2M 트리스용액을 가해 즉시 중화했다. 각 완충액에서 용출한 플렉션(용출용액 1.0~5.0ml)의 각각을 센트리콘-10(Centricon-10, Amicon, USA)을 이용하여 50~100μl로 농축했다. 농축한 각 플렉션의 일부를 분취하고, 각각에 OCIF를 첨가후, OCIF 폴리크로날 항체로 면역 침전시켰다. 그 침전분획분을 SDS화 한 후, SDS-PAGE에 걸어서 OCIF에 특이적인 결합능을 가지는 단백질의 밴드가 출현하는 플렉션(Fr. No. 3~10)을 본 발명 단백질 분획분으로 했다.

## (3) 겔여과에 의한 본 발명 단백질의 정제

실시예 2-(2) 기재의 방법으로 정제하고, 농축한 OCIF 결합단백질(0.1M 글리신-염산완충액, pH 3.3 및 0.1M 구연산나트륨완충액, pH 2.0 용출분획분)을 10mM 트리스-HCl, 0.5M NaCl, 0.5% CHAPS(pH 7.0)로 평형화한 슈퍼로즈 12 HR10/30컬럼(팔마시아社, 1.0x 30cm)에 걸어 평형화 완충액을 이동상으로서 사용하여 유속 0.5ml/min로 전개시켜 0.5ml씩 분획분을 모았다. 상기과 동일하게 하여 본 발명 단백질 분획분(Fr. No. 27~32)을 동정하고, 각각의 플렉션을 센트리콘-10(Amicon)으로 농축했다.

## (4) 역상고속액체 크로마토그래피에 의한 정제

상술한 겔여과에서 정제한 OCIF결합단백질을 0.1% 트리플루오루초산(TFA), 30% 아세토니트릴로 평형화한 C<sub>4</sub>컬럼(2.1×250mm, Vydac, USA)에 부하했다. 최초 50분간에서 아세토니트릴 농축을 30%에서 55%로, 다음 10분간에서 아세토니트릴 농축을 80%로 하는 기울기로 유속 0.2ml/min로 용출을 하고, 용출된 단백질의 피크를 215nm에서 검출했다. 용출된 각 피크의 단백질을 분취하고 본 발명 단백질의 피크를 동정함에 의해 고도로 정제된 본 발명 단백질을 얻었다.

### [실시예 3]

#### 정제된 본 발명 단백질의 SDS-PAGE

먼저, 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 존재하 혹은 비존재하에서 배양한 ST2세포에서 조제한 막가용화 분획분을 상기과 같이 OCIF 고정화 어피니티컬럼에서 정제하고, 그 정제표품을 SDS-PAGE에 걸었다. 도 1(A)에 도시한 바와같이, 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 존재하에서 배양한 ST2세포에서의 정제표품만에 약 30,000~40,000의 주 단백질밴드가 검출되고, OCIF 고정화 어피니티컬럼에 의해 OCIF에 특이적으로 결합하는 단백질, 즉 본 발명 단백질이 선택적으로 농축·정제됨이 명확해졌다. 그렇지만, 본 발명 단백질 이외에 OCIF 고정화컬럼의 담체와 스페이서(spacer) 등에 비특이적으로 결합한 수종의 단백질밴드가 양 정제샘플중에 공통으로 검출되었다. 이들 본 발명 단백질 이외의 단백질을 상기과 같이 겔여과 및 C<sub>4</sub>역상 크로마토그래피로 제거하고, 얻은 고도정제 본 발명 단백질의 SDS-PAGE를 도 1(B)에 나타냈다. 고도정제 본 발명 단백질은 전기영동적으로 균일하고, 그 분자량은 약 30,000~40,000이었다.

### [실시예 4]

#### OCIF의 골아세포로의 결합시험

##### (1) <sup>125</sup>I표지 OCIF의 조제

OCIF는 요오드젠(Iodogen)법에 의해 <sup>125</sup>I표지했다. 즉, 2.5mg/ml 요오드젠-크로로포름용액 20μl를 1.5ml 에펜도르프튜브(eppendorf tube)에 옮기고, 40℃에서 크로로포름을 증발시켜 요오드젠 도포한 튜브를 조제했다. 이 튜브를 0.5M 인산나트륨완충액(Na-Pi, pH 7.0) 400μl로 3회 세정한 후, 0.5M Na-Pi pH 7.0, 5μl를 가했다. 이 튜브에 Na-<sup>125</sup>I용액(Amersham社, NEZ-033H20) 1.3μl(18.5MBq)를 가한 후, 즉시 1mg/ml rOCIF용액(모노머형 혹은 다이머형) 10μl를 가해 볼텍스믹서로 교반한 후, 실온에서 30초간 방치했다. 이 용액을 미리 10mg/ml요오드화칼륨 0.5M Na-Pi pH 7.0용액 80μl와 5% 소혈청알부민의 인산염완충 생리식염수 5μl를 첨가해둔 튜브로 옮겨 교반했다. 이 용액을 0.25% 소혈청알부민의 인산염완충 생리식염수용액으로 평형화 해둔 스핀컬럼(1ml, G-25 fine, 팔마시아社)에 부하하고, 2,000rpm으로 5분간 원심 분리했다. 컬럼에서 용출한 분획분에 0.25% 소혈청알부민의 인산염완충 생리식염수용액 400μl를 가해 교반한

후, 2 $\mu$ l를 취해 그 방사능을 감마카운터로 측정했다. 이렇게 하여 조제한  $^{125}$ I표지 OCIF용액의 방사화학순도는 10% TCA에 의해 침전하는 분획분의 방사능을 측정함에 의해 구했다. 또한,  $^{125}$ I표지 OCIF용액의 OCIF생물활성은 WO96/26217호 공보기재의 방법에 따라 측정했다. 또,  $^{125}$ I표지 OCIF농도는 아래와 같이 ELISA에 의해 측정했다.

### (2) $^{125}$ I표지 OCIF농도의 ELISA에 의한 측정

WO96/26217호 공보기재의 항OCIF토끼 폴리크로날 항체를 2 $\mu$ g/ml로 되도록 용해시킨 50mM NaHCO<sub>3</sub>(pH 9.6) 100 $\mu$ l씩을 96웰 이뮤노플레이트(MaxiSorp<sup>TM</sup>, Nunc社)의 각 웰에 가하여 4℃에서 하룻밤 방치했다. 이 액을 흡취한 후, 블록에이스(Block Ace; 雪印乳業)/인산염완충 생리식염수용액(25/75) 300 $\mu$ l씩을 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 액을 흡취한 후, 각 웰을 0.01% 폴리솔베이트 80을 포함하는 인산염완충 생리식염수(P-PBS)로 3회 세정하고, 이어서  $^{125}$ I표지 OCIF샘플 혹은 OCIF표준품을 첨가한 블록에이스/인산염완충 생리식염수용액(25/75) 300 $\mu$ l씩을 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 액을 흡취한 후, P-PBS 200 $\mu$ l로 각 웰을 6회 세정했다. 퍼옥시다아제 표지한 토끼 항OCIF 폴리크로날 항체를 포함하는 블록에이스(雪印乳業)/인산염완충 생리식염수용액(25/75) 100 $\mu$ l씩을 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 액을 흡취한 후, P-PBS 200 $\mu$ l로 각 웰을 6회 세정했다. TMB용액(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytec社) 100 $\mu$ l씩을 각 웰에 가해 실온에서 2~3분 방치한 후, 정지액(Stopping Reagent, Scytec社) 100 $\mu$ l씩을 각 웰에 가했다. 각 웰의 490nm에 걸쳐 흡광도를 마이크로플레이트리더(microplate reader)로 측정했다. OCIF표준품을 이용하여 제작한 검량선으로  $^{125}$ I표지 OCIF의 농도를 구했다.

### (3) OCIF의 골아세포 혹은 비장세포로의 결합시험

마우스 골아세포상 스트로마세포주 ST2 혹은 비장세포를 각각 4 X 10<sup>4</sup>셀(cell)/ml 및 2 X 10<sup>6</sup>셀/ml의 농도로 되도록 10<sup>-8</sup>M 활성형 비타민 D<sub>3</sub>(Calcitriol) 및 10<sup>-7</sup>M 텍사메사존 첨가 혹은 무첨가의 10% 소 태아혈청(FBS)을 포함하는  $\alpha$ -MEM배지에 현탁시켜 이 배지 1ml씩을 24웰 마이크로플레이트에 파종했다. 세포를 CO<sub>2</sub> 인큐베이터중에서 4일간 배양하고  $\alpha$ -MEM배지에서 세정한 후 상기  $^{125}$ I표지 OCIF(모노머형 또는 다이머형) 20ng/ml를 가한 결합시험용 배지(0.2% 소혈청알부민, 20mM Hepes완충액, 0.2% NaN<sub>3</sub>을 가한  $\alpha$ -MEM배지) 200 $\mu$ l를 각 웰에 가했다. 또한, 다른 웰에는 8 $\mu$ g/ml rOCIF(400배 농도)를 이어서 첨가한 결합시험용 배지를 200 $\mu$ g/ml가해 비특이적 흡착량측정에 공하였다. CO<sub>2</sub> 인큐베이터중에서 1시간 배양한 후, 1ml의 인산염완충 생리식염수 1ml로 3회 세정했다. 이때, 비장세포는 부유세포이므로 24웰 플레이트를 원심 분리하면서 각 웰의 세포를 세정했다. 세정 후, 0.1N NaOH용액 500 $\mu$ l를 각 웰에 가해 실온에서 10분간 방치함에 의해 세포를 용해시켜 세포에 결합한 RI량을 감마카운터로 측정했다.

$^{125}$ I표지 OCIF는 배양한 비장세포에는 결합하지 않고, 도 2에 도시한 바와같이, 활성형 비타민 D<sub>3</sub>에서 배양한 골아세포상 스트로마세포에만 특이적으로 결합했다. 이것으로부터 본 발명 단백질은 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 텍사메사존에 의해 골아세포상 스트로마세포위에 유도되는 막결합 단백질인 것이 밝혀지게 되었다.

### [실시예 5]

#### 본 발명 단백질의 생물활성

##### (1) 골아세포상 스트로마세포의 파골세포형성 지지능

골아세포의 파골세포형성 지지능은 형성되는 파골세포의 주석산내성 산성포스파타아제활성(tartaric acid resistant acid phosphatase activity; TRAP활성)을 측정함에 의해 평가했다. 즉, ddy마우스(8~12주령)의 비장세포(2×10<sup>5</sup>cells/100 $\mu$ l/well)와 마우스 골아세포상 스트로마세포 ST2(5×10<sup>3</sup>cells/100 $\mu$ l/well)를 10<sup>-8</sup>M 활성형 비타민 D<sub>3</sub>, 10<sup>-7</sup>M 텍사메사존 및 10% 소 태아(胎仔)혈청을 가한  $\alpha$ -MEM배지에 현탁시켜 96웰 플레이트에 파종했다. CO<sub>2</sub> 인큐베이터중에서 1주간 배양한 후, 각 웰을 인산염완충 생리식염수로 세정하고, 이어서 100 $\mu$ l의 에탄올/아세톤(1:1)을 가하여 실온에서 1분간 고정했다. 고정 후, 5.5mM p-니트로페놀포스페이트와 10mM 주석산나트륨을 함유하는 50mM 구연산완충액 pH 4.5 100 $\mu$ l를 각 웰에 가해 실온에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 0.1N NaOH용액을 각 웰에 첨가하고 405nm의 흡광도를 마이크로플레이트리더로 측정했다. 리켄셀뱅크(RIKEN CELL BANK)에서 구입한 후의 계대수 약 10대의 ST2세포와 계대수 약 40대의 ST2세포의 파골세포형성 지지능을 시험한 결과를 도 3에 도시했다. 이 결과에서 계대수가 많은 ST2세포는 파골세포형성 지지능이 높은 것이 판명되었다.

##### (2) 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 및 텍사메사존 존재하에서의 배양에서 골아세포상 스트로마세포막 위의 본 발명 단백질 발현의 경시변화와 공배양계에서 파골세포형성의 경시변화

실시예 4-(3)과 동일하게, 골아세포상 스트로마세포주 ST2를 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 및 텍사메사존 존재하에서 7일간 배양했다. OCIF결합시험은 실시예 4-(1)에 기재한  $^{125}$ I표지 OCIF(모노머 타입)를 이용하여 했다. 비특이적결합은 400배 농도의 비표지 OCIF를 이용하여  $^{125}$ I표지 OCIF의 ST2세포로의 결합을 경합시험에 의해 측정했다. 그 결과, 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 텍사메사존에 의해 배양일수의 경과와 함께  $^{125}$ I표지 OCIF의 특이적 결합량이 상승했다. 즉, 도 4 및 도 5에 도시한 바와같이 본 발명 단백질은 활성형 비타민 D<sub>3</sub>에 의해 ST2세포의 표면에 배양일수와 함께 발현하고, 그 발현은 배양 4일째에 최대에 달했다. 한편, 마우스 비장세포와 ST2세포의 공배양을 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 존재하에서 함에 의해 파골세포상의 세포

가 형성된다. 파골세포의 마커효소인 TRAP양성의 단핵 전파골세포상 세포는 배양 3, 4일째에는 형성되고, 더욱 분화·성숙한 TRAP양성의 다핵세포는 배양 5, 6일째에 형성된다. 본 발명 단백질 발현의 경시변화와 파골세포형성의 그것과는 관계 상관하고 있는 것이 밝혀졌다.

### (3) 공배양기간에 있어서 여러 가지 배양기간만 OCIF처리한 경우의 파골세포 형성억제효과

본 발명 단백질이 파골세포형성에 관여하는 인자인 것을 보다 명확히 하기 위해 상술한 실시예 5-(2)에서 6일간의 공배양기간에 있어서, 여러 가지 배양기간(각 2일간, 단 5일째만 1일간)의 세포를 100ng/ml의 OCIF로 처리했다. 그 결과, 도 6에 도시한 바와같이, ST2세포위에 최고로 본 발명 단백질이 발현되는 배양 48~96시간째에서의 OCIF처리가 가장 효과적으로 파골세포의 형성을 억제했다. 즉, OCIF는 본 발명 단백질을 매개하여 ST2세포에 결합함에 의해 파골세포형성을 억제하는 것이 밝혀지게 되었다.

이상의 결과에서 본 발명 단백질은 활성형 비타민 D<sub>3</sub>와 텍사메사존에 의해 골아세포상 스트로마세포막 위에 유도되고, 파골세포의 분화·성숙을 지지 또는 촉진하는 인자로서의 생물활성(작용)을 가지는 것이 밝혀지게 되었다.

#### [실시예 6]

##### <sup>125</sup>I표지 OCIF와 본 발명 단백질과의 크로스링킹 시험

본 발명 단백질의 존재를 더욱 확인하기 위해 <sup>125</sup>I표지 OCIF와 본 발명 단백질과의 크로스링킹을 했다. 실시예 4-(3)과 동일하게 마우스 골아세포상 세포주 ST2를 활성형 비타민 D<sub>3</sub> 및 텍사메사존 존재하 및 비존재하에서 4일간 배양했다. 세포를 인산염완충 생리식염수 1ml로 세정한 후 상기 <sup>125</sup>I표지 OCIF(모노머형) 25ng/ml, 또는 WO96/26217호 공보에 있는 서열번호 76기재의 단백질을 동물세포에서 발현시켜 상기 방법으로 표지함에 의해 얻은 <sup>125</sup>I표지 OCIF-CDD1 40ng/ml를 가한 결합시험용 배지(0.2% 소혈청알부민, 20mM Hepes완충액, 0.2% NaN<sub>3</sub> 및 100μg/ml 헤파린을 가한 α-MEM배지) 200μl를 첨가했다. 또한 다른 웰에는 400배 농도의 OCIF를 더 첨가한 결합시험용 배지를 첨가하고, 비특이적 흡착시험에 공했다. CO<sub>2</sub>인큐베이터중에서 1시간 배양한 후, 100μg/ml 헤파린을 가한 인산염완충 생리식염수 1ml로 3회 세정했다. 이들 웰에 100μg/ml의 크로스링킹제 DSS(Disuccinimidyl suberate, Pierce社)를 용해시킨 인산염완충 생리식염수 500μl를 가해 0℃에서 10분간 반응시켰다. 이들 웰의 세포를 0℃에서 냉각한 인산염완충 생리식염수 1ml로 2회 세정한 후, 1% 트리톤X-100(Triton X-100), 2mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 10μM 펩스타틴(pepstatin), 10μM 류펩틴(leupeptin), 10μM 안티페인(antipain) 및 2mM EDTA를 가한 20mM Hepes완충액 100μl를 각 웰에 가해 실온에서 30분간 방치하여 세포를 용해시켰다. 이들 샘플 15μl를 통상법에 의해 비환원 조건하에서 SDS화한 후, SDS-폴리아크릴아미드 전기영동용 겔(4~20% 폴리아크릴아미드 글라디엔트, 第一化學社)을 이용하여 영동시켰다. 영동 후, 겔을 건조시켜 바이오맥스 MS(BioMax MS)필름(코닥社)과 바이오맥스 MS 증감 스크린(코닥社)을 이용하여 -80℃에서 24시간 감광시켰다. 감광시킨 필름을 통상법에 의해 현상했다. <sup>125</sup>I표지 OCIF (모노머형, 60kDa)를 이용한 경우에는 분자량 약 90,000~110,000의 크로스링크된 단백질이 검출되었다. 또한, <sup>125</sup>I표지 OCIF-CDD1(31kDa)을 이용한 경우 도 7에 도시한 바와같이 약 70~80kDa(평균 78kDa)의 크로스링크된 단백질이 검출되었다.

#### [실시예 7]

##### ST2세포위에 발현하는 본 발명 단백질의 스케처드플로트(Scatchard Plot)에 의한 해석

상기 <sup>125</sup>I표지 OCIF(모노머형)를 1,000pM이 되도록 가한 결합시험용 배지(0.2% 소혈청알부민, 20mM Hepes완충액, 0.2% NaN<sub>3</sub>를 가한 α-MEM배지)를 조제하고, 결합시험용배지를 이용하여 1/2회석배율로 단계적으로 희석했다. 또한, 비특이적인 결합을 구하기 위해 이들 용액에 더욱 400배 농도의 비표지 모노머형 OCIF를 첨가한 용액을 조제했다. 조제한 이들 용액 200μl를 10<sup>-8</sup>M 활성형 비타민 D<sub>3</sub>(Calcitriol)와 10<sup>-7</sup>M 텍사메사존 존재하에서 4일간 배양한 상기 ST2세포(약 10계대째)의 웰에 가해 실시예 4-(3)과 동일한 방법으로 <sup>125</sup>I표지 OCIF의 결합을 시험했다. 얻은 결과를 통상법에 따라 스케처드플로트하고, OCIF와 OCIF결합단백질의 해리정수와 ST2세포당의 OCIF결합단백질의 개수(사이트수)를 구했다. 그 결과, OCIF와 본 발명 단백질의 해리정수를 280pM ST2세포당의 OCIF결합단백질의 사이트수는 약 33,000개/세포 이었다. 또한, 실시예 5-(1)에서 기재한 바와같이, 약 40계대에 배양한 ST2세포는 파골세포형성 지지능이 10계대 배양한 ST2세포 보다도 높았기 때문에 전자인 ST2세포위에 발현한 본 발명 단백질의 사이트수를 측정했던 바 사이트수가 58,000개/세포 이고, 분명히 10계대 배양한 ST2세포보다도 많고, 본 발명 단백질 발현양의 다가가 ST2세포에 의해 파골세포형성 지지능의 강약에 연결되어 있는 것이 명백해졌다. 이것은 본 발명 단백질은 파골세포의 분화·성숙을 지지 또는 촉진하는 인자인 것을 나타낸다.

#### [실시예 8]

##### OBM cDNA의 클로닝

##### (1) 마우스 ST2세포에서 RNA의 추출

마우스 골아세포상 스트로마세포주 ST2(RIKEN CELL BANK, RCB0224)는, 10% 소태아혈청을 함유하는 α-MEM배지(기브코 BRL社)를 이용하여 배양했다. 부착세포용 225cm<sup>2</sup> T-플라스크에서 컨플루언트로 될 때까지 배양한 ST2세포를, 트립신 처리하여 T-플라스크로부터 벗겨서 세정한 후, 5매의 225cm<sup>2</sup> T플라스크에 옮기고, 10<sup>-8</sup>M 활성화 비타민 D<sub>3</sub>(Calcitriol, 和光純藥社), 10<sup>-7</sup>M 텍사메사존 및 10% 소 태아혈청을 첨가한 α-MEM배지를 각각 60ml씩 가하여 CO<sub>2</sub>인

큐배이터 중에서 5일간 배양했다. 배양한 ST2 세포에서 이소젠(ISOGEN 和光純藥社)을 이용하여 총 RNA를 추출했다. 총 RNA 약 600 $\mu$ g에서 올리고(dT)-셀룰로우스 컬럼(5'-3' Prime社)을 이용하여 폴리 A<sup>+</sup> RNA를 조제했다. 약 8 $\mu$ g의 폴리 A<sup>+</sup> RNA를 얻었다.

## (2) 발현라이브러리의 구축

실시에 8-(1)에서 얻은 폴리 A<sup>+</sup> RNA 2 $\mu$ g에서 그레이트랜스 cDNA 신서시스 키트(Great Lengths cDNA Synthesis kit: Clontech社)를 이용하고, 그 설명서에 따라 2분쇄 cDNA를 합성했다. 즉, 폴리 A<sup>+</sup> RNA 2 $\mu$ g과 올리고(dT)<sub>25</sub>(dN) 프라이머를 혼합하고 증류수를 가해 최종용량을 6.25 $\mu$ l로 하고, 70℃에서 3분간 보온 후, 얼음중에서 2분 냉각했다. 이 용액에 증류수 2.2 $\mu$ l, 5X 제 1스트랜드 버퍼(First-strand buffer) 2.5 $\mu$ l, 100mM DTT(디티오스레이틀) 0.25 $\mu$ l, 플라이 RNase 억제제(PRIME RNase Inhibitor :1U/ml)(5'-3' Prime社) 0.5 $\mu$ l, 5배 희석한 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP(머머샴社, 3,000Ci/mmol, 2 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l, dNTP(각 20mM) 0.65 $\mu$ l, MMLV(RNaseH<sup>-</sup>) 역전사효소 1.25 $\mu$ l(250 유닛)를 가해 42℃에서 90분 보온했다. 게다가, 증류수를 62.25 $\mu$ l, 5X 제 2스트랜드 버퍼(second-strand buffer) 20 $\mu$ l, dNTP(각 20mM) 0.75 $\mu$ l, 제 2스트랜드 엔자임 콕테일(second-strand enzyme cocktail) 5 $\mu$ l를 첨가하고, 16℃에서 2시간 보온했다. 이 반응액에 T4DNA 폴리머라아제(polymerase) 7.5 유닛을 가해 16℃에서 다시 30분 보온 후 0.2M EDTA 5 $\mu$ l첨가하여 반응을 정지하고, 페놀-크로로포름 처리 후, 에탄올 침전을 했다. 이 2분쇄 cDNA의 말단에 EcoRI-SalI-NotI 린커(Clontech社)를 부가하는 말단을 인산화했다. 사이즈 프락셔네이션(size fractionation)용 컬럼에 의해 500bp이상의 cDNA를 분리하고, 에탄올 침전을 행했다. 침전한 DNA를 물에 용해하고, 미리 제한효소 EcoRI(寶酒造社)절단 및 CIAP(소 소장알칼리포스퍼타아제, 寶酒造社) 처리하여 조제한 pcDL-SR  $\alpha$ 296 (Molecular and Cellular Biology, Vol. 8, pp466~472, 1998)에 삽입했다.

## (3) OCIF와의 결합을 지표로한 발현 라이브러리의 스크리닝

실시에 8-(2)에서 얻은 DNA를 이용하는 대장균 XL2 Blue MRF'(東洋紡社)를 형질전환하고, 1웰당 약 100콜로니로 되도록 세포배양용 24웰 플라스틱 플레이트에 조제한 L카베니실린 한천배지(1% 트립톤, 0.5% 이스트엑스, 1% NaCl, 60 $\mu$ g/ml 카베니실린, 1.5% 한천) 위에 증식시켰다. 각 웰중의 형질전환주를 3ml의 텔리픽브로스(Terrific Broth) 암피실린 배지(1.2% 트립톤, 2.4% 이스트엑스, 0.4% 글리세롤, 0.017M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.072M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 $\mu$ g/ml 암피실린)에 현탁하고, 37℃에서 하룻밤 진탕 배양했다. 원심 분리에 의해 집균하고 QIAwell kit(QIAGEN社)를 사용하여 프라스미드 DNA를 조제했다. 260nm에서 흡광도에 의해 DNA함량을 측정하고, 에탄올 침전에 의해 농축하고, 200ng/ $\mu$ l로 되도록 증류수로 용해했다. 이렇게 하여 각각 약 100개의 콜로니에서 유래하는 DNA풀(Pool)을 500 $\mu$ l 제조하고, COS-7세포(RIKEN CELL BANK, RCB0539)로의 트랜스펙션에 이용했다. COS-7세포를 24웰 플레이트에 8 $\times$ 10<sup>4</sup>세포/ 웰로 되도록 파종하고, 10% 소 태아혈청을 함유하는 DMEM배지를 이용하여 CO<sub>2</sub> 인큐베이터중에서 37℃에서 하룻밤 배양했다. 익일 배지를 제거한 후, 무혈청 DMEM배지에서 세포를 세정했다. 트랜스펙션용 시약 리포펙트아민(기브코 BRL社)첨부의 프로토콜(Protocol)에 따르고, 미리 OPTI-MEM배지(기브코 BRL社)를 이용하여 희석해둔 상기 프라스미드 DNA와 리포펙트아민(기브코 BRL社)을 혼합하고, 15분후 이 혼합액을 각 웰의 세포에 가했다. 사용된 DNA 및 리포펙트아민의 양을 각각 1 $\mu$ g 및 4 $\mu$ l로 했다. 5시간 후 배지를 제거하고, 1ml의 10% 소 태아혈청을 포함하는 DMEM배지(기브코 BRL社)를 첨가하고, CO<sub>2</sub> 인큐베이터중(5% CO<sub>2</sub>) 37℃에서 2~3일 배양했다. 상기와 같이 트랜스펙트 하고 2~3일 배양한 COS-7세포를 무혈청 DMEM배지에서 세정한 후, <sup>125</sup>I표지한 OCIF 20ng/ml를 가한 결합시험용 배지(0.2% 소혈청알부민, 20mM Hepes완충액, 0.1mg/ml 헤파린 및 0.02% Na<sub>3</sub>를 가한 무혈청 DMEM배지) 200 $\mu$ l를 각 웰에 가했다. CO<sub>2</sub> 인큐베이터중(5% CO<sub>2</sub>)에서 37℃ 1시간 배양한 후, 세포를 0.1mg/ml 헤파린을 포함하는 인산염완충 생리식염수 500 $\mu$ l에서 2회 세정했다. 세정 후, 0.1N NaOH용액 500 $\mu$ l를 각 웰에 가해 실온에 10분간 방치함에 의해 세포를 용해시켜 각 웰중의 <sup>125</sup>I의 양을 감마카운터(팩커社)로 측정했다. 합계 500 $\mu$ l를 스كري닝함에 의해 OCIF와 특이적으로 결합하는 단백질을 코드하는 cDNA를 포함하는 DNA풀 한 개를 분리했다. 게다가 본 발명의 cDNA를 포함하는 DNA풀을 세분화하고, 상기와 같이 트랜스펙션과 스크리닝 조작을 반복함에 의해 OCIF와 결합하는 단백질을 코드하는 cDNA를 단리했다. 이 cDNA를 포함하는 프라스미드를 pOBM291로 이름 붙였다. 이 프라스미드를 포함하는 대장균은 pOBM291로서 일본 통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소에 기탁번호 FERM BP-5953으로서 평성 9년 5월 23일에 기탁되어있다. OCIF의 <sup>125</sup>I표지 및 ELISA에 의한 <sup>125</sup>I표지 OCIF의 정량법을 이하에 나타낸다. OCIF는 요오드젠(Iodogen)법에 의해 <sup>125</sup>I표지했다. 2.5mg/ml 요오드젠-크로로포름용액 20 $\mu$ l를 1.5ml 에펜도루프튜브로 옮기고, 40℃에서 크로로포름을 증발시켜 요오드젠 코드한 튜브를 조제했다. 이 튜브를 0.5M 인산나트륨완충액(Na-Pi, pH 7.0) 400 $\mu$ l로 3회 세정한 후, 0.5M Na-Pi, pH 7.0 5 $\mu$ l를 가했다. 이 튜브에 Na-<sup>125</sup>I용액(Amersham社, MEZ-033H2O) 1.3 $\mu$ l(18.5MBq)를 가한 후, 즉시 1mg/ml OCIF용액(모노모형 또는 다이머형) 10 $\mu$ l를 가해 볼텍스믹서로 교반한 후, 실온에서 30초간 방치했다. 이 용액을 미리 10mg/ml 요오드화칼륨, 0.5M Na-Pi, pH 7.0용액 80 $\mu$ l와 5% 소혈청알부민을 포함하는 인산염완충 생리식염수(BSA-PBS) 5 $\mu$ l를 첨가해둔 튜브에 옮겨 교반했다. 이 용액을 BSA-PBS에서 평형화 해둔 스핀컬럼(1ml, G-25 fine, 팔마시아社)에 부하하고, 2,000rpm에서 5분간 원심 분리했다. 컬럼에서 용출한 분획분에 BSA-PBS를 400 $\mu$ l가해 교반한 후, 2 $\mu$ l를 취하고, 그 방사능을 감마카운터로 측정했다. 이렇게 하여 조제한 <sup>125</sup>I표지 OCIF용액의 방사화확순도는 10% TCA에 의해 침전하는 분획분의 방사능을 측정함에 의해 구했다. 또한, <sup>125</sup>I표지 OCIF 용액의 OCIF생물활성은 WO96/26217호 공보기재의 방법에 따라 측정했다. 또한, <sup>125</sup>I표지 OCIF농도는 아래와 같이 ELISA에 의해 측정했다. 즉, WO96/26217호 공보기재의 토끼 항 OCIF 폴리크로날 항체를 2 $\mu$ g/ml로 되도록 용해시킨 50mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6을 100 $\mu$ l씩 96웰 이뮤노플레이트(Nunc, MaxiSorp<sup>TM</sup>)의 각 웰에 가하여 4℃에서 하룻밤 방치했다. 이 액을 흡취한 후, 블록에이스(雪印乳業)와 인산염완충 생리식염의 혼합수용액(혼합비 25:75) (B-PBS)을 200 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 액을 흡취한 후, 각 웰을 0.01% 폴리소르베이트80(Polysorbate 80)을 포함하는 인산염완충 생리식염수(P-PBS)로 3회 세정하고, 이어서 <sup>125</sup>I표지 OCIF 샘플 혹은 OCIF표준품을 첨가한 B-PBS를 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 액을 흡취한 후 P-PBS 200 $\mu$ l로 각 웰을 6회 세정했다. 퍼옥시다아제 표지한 토끼 항 OCIF 폴리크로날 항체를 B-PBS로 희석한 용액을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 액을 흡취한 후 P-PBS 200 $\mu$ l로 각 웰을 6회 세정했다. TMB용액(TMB Soluble

Reagent, High Sensitivity, Scytek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2~3분방치한 후, 정지액(Stopping Reagen, Scytek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가했다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더로 측정했다. OCIF표준품을 이용하여 제작한 검량선에서 <sup>125</sup>I표지 OCIF농도를 구했다.

#### (4) OBM의 모든 아미노산 서열을 코드하는 cDNA의 염기서열의 결정

실시에 8-(3)에서 얻은 OBM cDNA 염기서열을, 타크 다이 데옥시터미네이터 사이클시퀀싱 키트(파킹엘머社)를 사용하여 결정했다. 즉, pOBM291를 주형으로 하고, 직접 삽입단편의 염기서열을 결정했다. 또한, pOBM291를 제한효소 EcoRI로 절단하여 얻은 약 1.0kb 및 약 0.7kb의 단편을 프라스미드 pUC19(寶酒造社)의 EcoRI부위에 삽입하고, 이들 단편의 염기서열도 결정했다. 사용한 프라이머는 pcDL-SR a296의 삽입단편 DNA의 염기서열을 결정하기 위한 프라이머 SRR2, 프라스미드pUC19의 삽입단편 DNA의 염기서열을 결정하기 위한 프라이머 M13프라이머M3, M13프라이머RV(모두 寶酒造社) 및 OBM cDNA의 염기서열에 기하여 설계된 합성 프라이머 OBM #8이다. 이들 프라이머의 서열을 서열번호 3~6에 나타낸다.

또한, 결정된 OBM cDNA의 염기서열을 서열번호 2에 그 서열에서 추정되는 아미노산서열을 서열번호 1에 각각 나타낸다.

#### [실시에 9]

##### 본 발명 cDNA에 코드되는 단백질의 발현

프라스미드 pOBM291을 6웰 플레이트의 각 웰중에서 COS-7세포에 리포펙트아민을 이용하여 트랜스펙션하고, 10% 소 태아혈청을 함유하는 DMEM 배지중에서 2일간 배양했다. 5% 투석 소 태아혈청을 첨가하고, 시스테인·메티오닌 불포함 DMEM(大日本製藥社)에 배지 교환하여(800 $\mu$ l/웰) 15분 배양한 후, 고속 단백질 레벨링믹스(Express Protein Labeling Mix ;NEN社, 10mCi/ml)를 14 $\mu$ l 첨가했다. 4시간 배양 후, 10% 소 태아혈청을 함유하는 DMEM 배지를 200 $\mu$ l 가하여 1시간 배양했다. 세포를 PBS에서 2회 세정 후, 1% 트리톤X-100, 1% 보빈 헤모그로빈(bovine hemoglobin), 10 $\mu$ g/ml 류펩틴(leupeptin), 0.2TIU/ml 아프로티닌(aprotinin), 1mM PMSF를 함유하는 TSA 버퍼{0.14M NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>를 함유하는 10mM 트리스-HCl(pH 8.0)}를 0.5ml 가하여 얼음 위에서 1시간 정치했다. 피펫팅(Pipetting)에 의해 세포를 파쇄한 후, 4℃에서 3,000×g 10분간 원심 분리하여 상청을 얻었다. 이 상청 100 $\mu$ l에 200 $\mu$ l의 희석버퍼{0.1% 트리톤X-100, 0.1% 보빈 헤모그로빈(bovine hemoglobin), 10 $\mu$ g/ml 류펩틴(leupeptin), 0.2TIU/ml 아프로티닌(aprotinin), 1mM PMSF를 함유하는 TSA 버퍼}를 가해 단백질 A 세파로즈(Protein A Sepharose, 50 $\mu$ l)와 함께 4℃에 1시간 진동시킨 후, 4℃에서 1500×g로 1분간 원심분리하여 상청을 회수함에 의해, 단백질 A 세파로즈에 비특이적으로 흡착하는 분획을 제거했다. 이 상청에 OCIF(1 $\mu$ g)을 가해 4℃에서 1시간 진동시키면서 OBM과 OCIF를 결합시킨 후, 항OCIF 폴리클로날 항체(50 $\mu$ g)를 가하여 4℃에 1시간 진동시켰다. 이에 단백질 A 세파로즈(10 $\mu$ l)를 가하고 계다가 4℃에서 1시간 진동시켰다. 4℃에서 1500×g로 1분간 원심분리하여 침전분획분을 회수했다. 4℃ 1500×g에서 1분간의 원심분리에 의한 침전의 세정을 희석버퍼로 2회, 보빈 헤모글로빈을 함유하지 않는 희석버퍼로 2회, TSA버퍼로 1회, 50mM 트리스-HCl(pH 6.5)로 1회 행했다. 세정 후, 침전에 10% β알칼로이드탄올을 함유하는 SDS버퍼(0.125M 트리스-HCl, 4% 도데실황산나트륨, 20% 글리세롤, 0.002% 브로모페놀블루, pH 6.8)를 가해 100℃에서 5분 가열 후 SDS-PAGE(12.5% 폴리아크릴아미드겔, 第一化學社)를 행했다. 통상법에 의해 겔을 고정화한 후, 앰플리파이(Amplify; 어머샴社)에 의해, 아이소토프의 시그널을 증강한 후, 바이오 맥스 MR필름(코닥社)을 이용해서 -80℃에서 감광시켰다. 결과를 도 8에 나타낸다. 본 발명 cDNA에 코드되는 단백질의 분자량은 약 40,000인 것이 나타났다.

#### [실시에 10]

##### 본 발명 cDNA에 코드되는 단백질과 OCIF의 결합

프라스미드 pOBM291을 24웰 플레이트의 각 웰중에서 COS세포에 리포펙트아민을 이용하여 트랜스펙트하고, 그 세포를 2~3일 배양하던중 무혈청 DMEM배지에서 세정하고, 이에 <sup>125</sup>I표지한 OCIF 20ng/ml을 가한 결합시험용 배지(0.2% 소혈청알부민, 20mM Hepes완충액, 0.1mg/ml 헤파린(Heparin), 0.2% NaN<sub>3</sub>을 첨가한 무혈청DMEM배지) 200 $\mu$ l를 가했다. 또한 다른 웰에는 <sup>125</sup>I표지한 OCIF 20ng/ml에 가하여 8 $\mu$ g/ml의 비표지 OCIF를 더 첨가한 결합시험용 배지를 200 $\mu$ l가하여 실험을 행했다. CO<sub>2</sub> 인큐베이터중(5% CO<sub>2</sub>)에서 37℃에 1시간 배양한 후, 세포를 0.1mg/ml의 헤파린을 포함한 인산완충 생리식염수 500 $\mu$ l로 2회 세정했다. 세정 후, 0.1N NaOH용액 500 $\mu$ l를 각 웰에 가해 실온에서 10분간 방치함에 의해 세포를 용해시켜 웰중 <sup>125</sup>I의 양을 감마카운터로 측정했다. 그 결과, 도 9에 도시한 바와같이 프라스미드 pOBM291을 트랜스펙트한 세포에만 <sup>125</sup>I표지한 OCIF가 결합하는 것이 확인되었다. 또한, 그 결과는 400배 농도의 OCIF를 첨가하는 것으로 현저히 저해되는 것이 확인되었다. 이상의 결과에서 프라스미드 pOBM291위의 cDNA에 코드되는 단백질 OBM은 COS-7세포표면에서 OCIF와 특이적으로 결합하는 것이 밝혀지게 되었다.

#### [실시에 11]

##### <sup>125</sup>I표지한 OCIF와 본 발명 cDNA에 코드되는 단백질과의 크로스링킹시험

본 발명 cDNA에 코드되는 단백질의 성질을 보다 상세히 해석하기 위해, <sup>125</sup>I표지한 모노머형 OCIF와 본 발명 cDNA에 코드되는 단백질과의 크로스링킹을 행했다. 실시에 8-(3)에 기재한 방법에 따라 프라스미드 pOBM291을 COS-7세포에 트랜스펙트한 후, 상기 <sup>125</sup>I표지한 OCIF(25ng/ml)을 가한 결합시험용 배지 200 $\mu$ l를 첨가했다. 또한, 다른 웰에는 <sup>125</sup>I표지한 OCIF에 가해 400배 농도의 비표지 OCIF를 더 첨가한 결합시험용 배지를 가했다. CO<sub>2</sub> 인큐베이터중(5% CO<sub>2</sub>)에서 37℃ 1시간 배양한 후, 세포를 0.1mg/ml 헤파린을 함유하는 인산염완충 생리식염수 500 $\mu$ l로 2회 세정했다. 이 세포에 100 $\mu$ g/ml의 크로스링킹제, DSS(Disuccinimidyl suberate, Pierce社)를 용해시킨 인산염완충 생리식염수 500 $\mu$ l를 가해, 0℃

에서 10분간 반응시켰다. 이들 웰의 세포를 0°C에서 냉각시킨 인산완충 생리식염수 1ml로 2회 세정한 후, 이 세포에 1% 트립톤X-100(和光純藥社), 2mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride, 시그마社), 10μM 펩스타틴(pepstatin, 和光純藥社), 10μM 류베프틴(leupeptin, 和光純藥社), 10μM 안티페인(antipain, 和光純藥社) 및 2mM EDTA(和光純藥社)를 포함하는 20mM Hepes완충액 100μl를 가해 실온에서 30분간 방치하여 세포를 용해시켰다. 이들 샘플 15μl를 통상법에 의한 환원조건하에서 SDS화한 후, SDS-전기영동용 겔(4~20% 폴리아크릴아미드그라디엔트, 第一化學社)을 이용하여 영동했다. 영동 후, 겔을 건조시켜 바이오맥스 MS필름(코닥社)과 바이오맥스 MS증감스크린(코닥社)을 이용하여 -80°C에서 24시간 감광시켰다. 감광시킨 필름을 통상법에 의해 현상했다. 이 결과, <sup>125</sup>I표지 모노머형 OCIF와 본 발명 cDNA에 의해 코딩되는 단백질을 크로스링크시킴에 의해 도 10에 도시한 바와같이 분자량 90,000~110,000밴드가 검출되었다.

#### [실시예 12]

##### 노잔블로트(Northern Blot)에 의한 해석

부착세포용 25cm<sup>2</sup> T플라스크로 컨플루언트로 될 때까지 배양한 ST2세포를 트립신 처리하여 T플라스크에서 벗겨서 세정한 후 1매의 225cm<sup>2</sup> T플라스크에 파종하고, 10<sup>-8</sup>M 활성화 비타민 D<sub>3</sub>, 10<sup>-7</sup>M 텍사메사존 및 10% 소 태아혈청을 첨가한 α-MEM배지 각각 60ml를 가하여 CO<sub>2</sub> 인큐베이터중에서 4일간 배양했다. 배양한 ST2세포에서 아이소젠(和光純藥社)을 이용하여 총 RNA를 추출했다. 또한, 활성화 비타민 D<sub>3</sub>와 텍사메사존 비존재하에서 배양한 ST2세포에서도 상기 방법으로 총 RNA를 추출했다. 각 총 RNA 20μg(4.5μl)에 각각 2.0μl의 5X겔영동완충액(0.2M 모르폴리노프로판술폰산, pH 7.0, 50mM 초산나트륨, 5mM EDTA), 3.5μl의 포름알데히드 및 10.0μl의 포름아미드를 가해 55°C에서 15분 보온 후, 전기영동에 공했다. 전기영동용의 겔은 1.0% 아가로스, 2.2M 탈이온화 포름알데히드, 40mM 모르폴리노프로판술폰산 pH 7.0, 10mM 초산나트륨, 1mM EDTA의 조성으로 조제했다. 또한, 전기영동은 40mM 모르폴리노프로판술폰산, pH 7.0, 10mM 초산나트륨, 1mM EDTA의 완충액중에서 행했다. 전기영동 후, RNA를 나일론메μβ레인에 트랜스퍼했다. pOBM291을 제한효소 EcoRI로 절단하여 얻은 약 1.0kb의 DNA단편을 메가플라임DNA 라벨링 키트(어머샴社) 및 α-<sup>32</sup>P-dCTP(어머샴社)를 이용하여 표지한 것을 탐침자로 하여 하이브리다이제이션을 했다. 그 결과, 도 11에 도시한 바와같이, ST2세포에서는 활성화 비타민 D<sub>3</sub>와 텍사메사존의 존재하에서 배양한 경우에 본 발명 cDNA에 코딩되는 단백질(OBM)의 유전자 발현이 강하게 유도되고 있는 것이 밝혀졌다.

#### [실시예 13]

##### 본 발명 cDNA에 코딩되는 단백질의 과골세포형성 지지능

실시예 8-(3)에 기재한 방법으로 COS세포에 pOBM291을 트랜스펙트했다. 3일 후 트립시나이즈한 세포를 인산완충 생리식염수에서 1회 원심 세정하던 중 1% 파라포름알데히드를 포함하는 PBS에 세포를 서스펜드하면서 실온에서 5분간 고정하고, PBS에서 6회 원심 세정했다. 10<sup>-8</sup>M 활성화 비타민 D<sub>3</sub>, 10<sup>-7</sup>M 텍사메사존, 10% 소 태아혈청을 포함하는 α-MEM배지에서 조제한 1×10<sup>6</sup>개/ml의 마우스 비장세포 및 4×10<sup>4</sup>개/ml의 ST2세포를 24웰 플레이트에 각각 700μl, 350μl 첨가하던중 TC인서트(Nunc社)를 각 웰에 세트했다. 상기 배지에서 단계 희석한 고정화 COS세포(350μl) 및 OCIF(50μl)를 TC인서트중에 첨가하여 37°C에서 6일간 배양했다. 이 결과, OCIF에 의한 과골세포형성 저해활성이 본 발명 cDNA에 코딩되는 단백질에 의해 억제되는 것이 밝혀지게 되었다.

#### [실시예 14]

##### 분비형 OBM의 발현

##### (1) 분비형 OBM 발현 플라스미드의 구축

OBM HF(서열번호 7)와 OBM XR(서열번호 8)을 프라이머 pOBM291을 주형으로 하여 PCR반응을 행했다. 이 생성물을 아가로스 겔전기영동으로 정제한 후, 제한효소 HindIII, EcoRI 로 절단하고, 게다가 아가로스 겔전기영동으로 정제했다. 이 정제단편(0.6kb), pSec TagA(인히드로젠社)의 HindIII/EcoRV 단편(5.2kb)와 OBM cDNA의 EcoRI/PmaCI 단편(0.32kb)과 함께 라이게이션 키트 ver. 2(寶酒造社)를 이용하여 라이게이션을 행하고, 그 반응생성물을 이용하여 대장균 DH5α를 형질 전환했다. 얻은 암피실린내성주에서 알카리SDS법에 의해 플라스미드를 정제하고, 제한효소로 절단함에 의해 pSec TagA에 0.6kb와 0.32kb의 단편이 삽입된 플라스미드를 뽑아내었다. 게다가 이 플라스미드에 붙여 다이 터미네이터 사이클 시퀀싱FS 키트(파킹엘머社)를 이용하여 시퀀싱을 행하고, 이 플라스미드가 분비형 OBM을 코딩하는 서열(염기서열: 서열번호 2의 338~1355번, 아미노산서열: 서열번호 1의 72~316번)을 갖고 있는 것을 확인했다. 이 플라스미드를 제한효소 NheI, XhoI로 절단한 후, 분비형 OBM cDNA에 상당하는 절편(1.0kb)을 아가로스 겔전기영동으로 회수했다. 이 단편을 라이게이션 키트를 이용하여 발현벡터 pCEP4(인히드로젠社)의 NheI/XhoI단편(10.4kb)에 삽입하고, 그 반응생성물을 이용하여 대장균 DH5α를 형질 전환했다. 얻은 암피실린내성주에서 알카리SDS법에 의해 플라스미드를 정제하고, 제한효소로 절단하여 해석함에 의해 목적하는 구조를 갖는 분비형 OBM 발현 플라스미드(pCEP sOBM)를 갖는 대장균주를 뽑아냈다. pCEP sOBM을 갖는 대장균주를 배양하고, 키아 필터 플라스미드 미디 키트(키아젠社)를 이용하여 pCEP sOBM을 정제했다.

##### (2) 분비형 OBM의 발현

293-EBNA세포를 10% FCS를 함유하는 IMDM(IMDM-10% FCS)에 현탁하고, 콜라겐 코팅한 24웰 플레이트(住友베크 라이트社)에 2×10<sup>5</sup>개/2ml/웰로 되도록 파종하고, 하룻밤 배양했다. 이 세포에 1μg의 pCEP sOBM 또는 pCEP4를 리포펙타민(기브코社) 4μl을 이용하여 형질도입하고, 0.5ml의 무혈청 IMDM 또는 IMDM-10% FCS중에서 다시 2일간 배양하고, 이 배양상청을 회수했다. 분비형 OBM의 배양상청중에서의 발현은, 아래와 같이하여 확인했다. 배양상청에 최종농도 0.1M되도록 탄산수소나트륨을 가한 후, 배양액을 96웰 플레이트에 첨가하고 4°C에서 하룻밤 방치하고 배양상청중의



OBM을 96웰 플레이트로 고상화했다. 이 플레이트를 PBS로 4배 희석한 블록에이스(Block Ace; 雲印乳業社)용액(B-PBS)으로 실온에 2시간 방치하여 블로킹한 후, B-PBS로 희석한 3~100ng/ml의 OCIF를 각 웰에 100 $\mu$ l씩 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치했다. 0.05% 트윈(Tween)20을 함유하는 PBS(PBS-T)로 플레이트를 세정한 후, B-PBS로 희석한 WO96/26217호 기재의 퍼옥시다아제 표지 토끼 항 OCIF 폴리클로날 항체를 각 웰에 100 $\mu$ l씩 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치했다. PBS-T에서 각 웰을 6회 세정한 후, TMB용액(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가하고, 실온에서 약 10분 방치한 후, 정지액(Stopping Reagent, Scytek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가했다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더로 측정했다. 결과를 도 12에 나타냈다. pCEP sOBM을 형질도입한 세포의 배양상청을 고상화한 플레이트에서는, 첨가한 OCIF의 농도에 의존하여 450nm의 흡수가 증가하였지만, 벡터 pCEP4를 형질도입한 세포의 배양상청을 고상화한 경우에는 흡수의 증가는 보이지 않았다. 또한, 고정화에 이용하는 배양상청의 비율은 5~90%의 범위에서 여러 가지 변화시켜 일정농도의 OCIF(50ng/ml)를 첨가한 때의 실험 결과를 도 13에 나타낸다. pCEP sOBM을 형질도입한 세포의 배양상청을 고상화한 플레이트에서는, 배양상청의 비율이 높아지는 만큼 450nm의 흡수가 증가했지만, 벡터 pCEP4를 형질도입한 세포의 배양상청을 고상화한 플레이트에서는, 흡수의 증가는 볼 수 없었다. 이상의 결과에서 분비형 OBM이 pCEP sOBM을 형질도입한 세포의 배양상청중에 생산되고 있는 것이 확인되었다.

## [실시예 15]

### 티오레독신 OBM융합단백질(Trx-OBM)의 발현

#### (1) 티오레독신 OBM융합단백질(Trx-OBM)발현 벡터의 구축

10 $\mu$ l의 10X ExTaq버퍼(寶酒造社), 8 $\mu$ l의 10mM dNTP(寶酒造社), 77.5 $\mu$ l의 멸균증류수 2 $\mu$ l의 pOBM291 수용액(10ng/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l의 프라이머 OBM3(100pmol/ $\mu$ l, 서열번호 9), 1 $\mu$ l의 프라이머 OBMSa1R2(100pmol/ $\mu$ l, 서열번호 10), 0.5 $\mu$ l의 ExTaq(5u/ $\mu$ l)(寶酒造社)를 혼합하고 마이크로 원심관중에 PCR반응을 행했다. 95 $^{\circ}$ C 5분, 50 $^{\circ}$ C 1초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 74 $^{\circ}$ C 1초, 72 $^{\circ}$ C 5분의 반응 후, 96 $^{\circ}$ C 1분, 50 $^{\circ}$ C 1초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 74 $^{\circ}$ C 1초, 72 $^{\circ}$ C 3분의 반응을 25사이클 행했다. 1% 아가로스겔 전기영동에 의해, 반응액전량에서 약 750bp의 DNA단편을 QIAEX II 겔 추출키트(extraction kit; QIAGEN社)를 이용해서 정제했다. 정제한 DNA단편 전량을 제한효소 Sall, EcoRI(寶酒造社)로 절단한 후, 1.5% 아가로스겔 전기영동을 행하여 약 160bp의 DNA단편(단편 1)을 정제하고, 20 $\mu$ l의 멸균증류수에 용해했다. 동일하게, 4 $\mu$ g의 pOBM291을 제한효소 BamHI, EcoRI(寶酒造社)로 절단해 얻어진 약 580bp의 DNA단편(단편 2), 및 2 $\mu$ g의 pTrxFus(인비트로젠社)를 제한효소 BamHI, Sall(寶酒造社)로 절단해 얻은 약 3.6kb의 DNA단편(단편 3)을 각각 정제하고, 각각을 20 $\mu$ l의 멸균증류수에 용해했다. DNA단편의 정제에는 QIAEX II 겔 추출키트를 이용했다. 단편 1, 단편 2, 단편 3을 DNA 라이게이션 키트(ligation kit) ver. 2(寶酒造社)를 이용하고, 16 $^{\circ}$ C에서 2시간 30분 보온함에 의해 결합시켰다. 라이게이션 반응액을 이용한 대장균 GI724주(인비트로젠社)를 티오피전 익스프레스 시스템(ThioFusion Expression System; 인비트로젠社) 첨부 시방서에 기재한 방법으로 형질 전환했다. 수득한 암피실린내성 형질전환주의 중에서 제한효소 절단에 의해 얻은 DNA 단편지도의 해석 및 DNA서열의 결정에 의해, OBM cDNA단편(염기서열: 서열번호 2의 350~1111, 아미노산서열: 서열번호 1의 76~316)이 티오레독신 유전자에 같은 읽음 틀로서 결합하고 있는 프라스미드를 갖는 균주를 선출했다. 얻어진 균주를 GI724/pTrxOBM25로 이름 붙였다.

#### (2) 대장균에서의 OBM의 발현

GI724/pTrxOBM25주 및 pTrxFus를 갖는 GI724주(GI724/pTrxFus) 각각을 2ml의 RMG-Amp배지{0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 1.2% 카자미노산(Difco社), 1% 글리세롤, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ g/ml 암피실린(시그마社) pH 7.4}에서 30 $^{\circ}$ C로 6시간 진탕배양했다. 균액 0.5ml를 50ml의 도입(Induction)배지(0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 0.2% 카자미노산, 0.5% 글루코스, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ g/ml 암피실린 pH 7.4)에 첨가하고, 30 $^{\circ}$ C에서 진탕배양했다. OD<sub>600nm</sub>에서의 값이 약 0.5로 된 시점에서 최종농도가 0.1mg/ml로 되도록 L-토립토판을 첨가하고, 다시 30 $^{\circ}$ C에서 진탕배양을 6시간 계속했다. 균액을 3,000 $\times$ g에서 원심분리하여 균체를 모으고 12.5ml의 PBS(10mM 인산버퍼, 0.15M NaCl, pH 7.4)에 현탁했다. 현탁액을 초음파 발생장치(Ultrasonics社)에 걸어 균체를 파쇄하고, 7,000 $\times$ g에서 30분 원심분리하여 상청을 모아 가용성 단백질 분획분액으로 했다. 이 가용성 단백질 분획분액 10 $\mu$ l씩을 환원조건하에서 SDS폴리아크릴아미드(10%) 전기영동에 제공했다. 그 결과, GI724 /pTrxOBM25의 가용성 단백질 분획분액에는 GI724/pTrxFus의 가용성 단백질 분획분액에는 보이지 않는 분자량 약 40kDa의 밴드가 검출되었다(도 14). 따라서, 티오레독신과 OBM의 융합단백질(Trx-OBM)이 대장균중에서 발현하고 있는 것이 확인되었다.

#### (3) Trx-OBM의 OCIF와의 결합능

발현시킨 Trx-OBM이 OCIF와 결합하는 것을 이하의 실험으로 확인했다. 즉, 96웰 플레이트(Nunc社)의 각 웰에 10mM 탄산수소나트륨 수용액으로 5000배로 희석한 항 티오레독신 항체(인비트로젠社)를 100 $\mu$ l씩 첨가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치했다. 각 웰중의 액을 버린 후, 블록에이스(雪印乳業社)를 PBS로 2배 희석한 용액(BA-PBS)을 각 웰에 200 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 1시간 방치했다. 액을 버린 후, 각 웰에 BA-PBS로 단계 희석한 상기 GI724/pTrxOBM25유래 및 GI724/pTrxFus유래 가용성 단백질 분획분액을 100 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 2시간 방치했다. PBS-T로 각 웰을 3회 세정한 후, BA-PBS로 희석한 OCIF(100ng/ml)를 각 웰에 100 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 2시간 방치했다. PBS-T로 각 웰을 3회 세정한 후, BA-PBS로 2000배 희석한 WO96/26217호 기재의 퍼옥시다아제 표지 토끼 항 OCIF 폴리클로날 항체를 각 웰에 100 $\mu$ l씩 첨가하고, 2시간 실온에서 방치했다. PBS-T로 각 웰을 6회 세정한 후, TMB 용액(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가하여 실온에서 약 10분 방치한 후, 정지액(Stopping Reagent, Scytek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가했다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더로 측정했다. 결과를 도 15에 나타낸다. GI724/pTrxFus유래 가용성 단백질 분획분액을 첨가한 것에서는 첨가하지 않는 것과 비하여 흡광도의 차는 확인되지 않았지만, GI724 /pTrxOBM25유래 가용성 단백질 분획분액을 첨가한 것에서는 그 첨가농도의 증가에 의존하여 흡광도가 상승했다. 또한, 첨가하는 가용성 분획분액의 희석 비율을 일정(1%)으로 하고, BA-PBS로 단계 희석한 OCIF(0~100ng/ml)를 첨가한 경우의 실험결과를 도 16에 나타낸다. GI724/pTrxFus유래 가용성 단백질 분획분액을 이용한 것에서는 OCIF농도에 관계 없이 흡광도는 낮은체 있었지만, GI724/pTrxOBM25유래 가용성 단백질 분획분액을 이용한 것에서는 첨가한 OCIF농도에 의존하여 흡광도가 상승했다. 이 결과에서, GI724/pTrxOBM25에서 생산되는 Trx-OBM은 OCIF와 결합하는 능력이 있는 것이 확인되었다.



(4) Trx-OBM을 생산하는 대장균의 대량배양

GI724/pTrxOBM25를 RMG-Amp 한천배지(0.6%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% NaCl, 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2% 카자미노산, 1% 글리세롤, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  암피실린, 1.5% 한천, pH 7.4)에 백금으로 도말하고, 30℃에서 하룻밤 배양했다. 균을 10ml의 도입배지에 현탁하고, 5ml씩을 500ml의 도입배지가 들어있는 2L용 삼각플라스크에 2세트에 첨가하고, 30℃에서 진탕배양했다. OD<sub>600nm</sub>에서의 값이 약 0.5로 된 시점에서 최종농도가 0.1mg/ml로 되도록 L-트립토판을 첨가하고, 다시 30℃에서 진탕배양을 6시간 계속했다. 균액을 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 모으고 균체를 160ml의 PBS에 현탁했다. 현탁액을 초음파발생장치(Ultrasonics社)에 걸어 균체를 파쇄하고, 7,000×g에서 30분간 원심분리하여 상청을 모아 가용성 단백질 분획분으로 했다.

(5) OCIF고정화 어피니티컬럼의 제조

TSK겔 AF-토레실토요팔 650(토우소社) 2g과 WO96/26217호 기재한 방법으로 조제한 유전자조환형 OCIF 35.0mg을 함유하는 1.0M 인산칼륨완충액(pH 7.5) 40ml와를 혼합하여 4℃로 하룻밤 충분히 진탕하여 커플링반응을 행했다. 과잉한 활성기를 불활성화하기 위해, 원심분리에 의해 상청을 제거한 후, 40ml의 0.1M 트리스염산완충액(pH 7.5)을 침전한 담체에 가해 실온에서 1시간 조용히 진탕했다. 0.01% 폴리솔베이트 80과 0.2M NaCl을 함유한 0.1M 글리신-염산완충액(pH 3.3) 및 0.01% 폴리솔베이트 80과 0.2M NaCl을 함유한 0.1M 구연산나트륨완충액(pH 2.0)을 통액하여 컬럼을 세정한 후, 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유한 10mM 인산나트륨완충액(pH 7.4)으로 2번 세정하고, 평형화했다.

(6) COIF고정화 어피니티컬럼에 의한 Trx-OBM의 정제

Trx-OBM의 정제는 특히 언급하지 않은 4℃에서 행했다. 상기의 OCIF고정화 어피니티담체(10ml)와 상기 실시예 15-(4)기재의 가용성 단백질 분획분액(120ml)을 혼합 후, 50ml 원심관(4 분)중에서, 로터를 이용하여 4℃에서 하룻밤 천천히 진탕했다. 이 혼합액중의 담체를 에코노컬럼(바이오랏드社, 내경 1.5cm, 길이 15cm)에 충전했다. 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유한 PBS 300ml, 0.01% 폴리솔베이트 80과 2M NaCl을 함유한 10mM 인산나트륨완충액(pH 7.0) 100ml, 및 0.01% 폴리솔베이트 80과 0.2M NaCl을 함유한 0.1M 글리신-염산완충액(pH 3.3) 100ml를 순차통액하여 컬럼을 세정했다. 이어서, 0.01% 폴리솔베이트 80과 0.2M NaCl을 함유하는 0.1M 구연산나트륨완충액(pH 2.0)을 통액하고, 컬럼에 흡착한 단백질을 용출했다. 용출액을 5ml씩 분취했다. 분취한 분획분에는 10% 용량의 2M 트리스용액(pH 8.0)을 가해 즉시 중화했다. 용출액 각 분획분중의 Trx-OBM의 유무를 상기 실시예 15-(3)기재의 방법(OCIF와의 결합능)에 의해 조사했다. Trx-OBM을 함유하는 분획분을 모아 더욱 정제했다.

(7) 겔여과에 의한 Trx-OBM의 정제

상기 실시예 15-(6)의 Trx-OBM 플렉션 약 25ml를 센트리플러스(Centriplus 10 및 센트리콘(Centricon) 10(amicon社)을 이용하여 약 0.5ml로 원심 농축했다. 이 샘플을 미리 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유하는 PBS로 평형화한 슈퍼코즈 12 HR 10/30 컬럼(1.0 × 30cm, 팔마시아社)에 걸었다. 분리에는 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유하는 PBS를 이동상으로 하여 이용하고, 유속 0.25ml/min로 전개했다. 컬럼에서의 용출액은 0.25ml씩 분취했다. 분취한 분획분의 Trx-OBM은 실시예 15-(3) 기재의 방법 및 패스트 시스템(Phast system; 팔마시아社)을 이용한 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동(10~15% 폴리아크릴아미드겔, 팔마시아社)과 은염색으로 검출했다. 순화된 Trx-OBM을 함유하는 플렉션(Fr. 20~23)을 모으고, Trx-OBM의 단백질농도를 측정했다. 단백질농도의 측정은 소 혈청 알부민을 표준품으로 하여 이용하는 DC-프로테인 어세이 키트(DC-protein assay kit; 바이오랏드社)로 행했다.

[실시예 16]

OBM의 파골세포형성 유도활성

pOBM291 및 pcDL-SR α296을 리포펙트아민(기브코社)을 이용하여 COS-7세포에 각각 트랜스펙트했다. 각각의 세포를 10% FCS를 함유하는 DMEM으로 1일 배양 후 트립신 처리하고, 커버글라스(15mm 환형, 마쯔나미社)를 격설한 24웰 플레이트에 1웰당  $5 \times 10^4$ 개의 세포를 파종하고, 게다가 2일간 배양했다. 배양 플레이트를 PBS에서 1회 세정한 후 1% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS를 가하여 실온에서 8분간 인큐베이션하고, 세포를 고정했다. 세포를 고정한 플레이트를 PBS에서 6회 세정한 후  $10^{-8}\text{M}$  활성형 비타민  $\text{D}_3$ ,  $10^{-7}\text{M}$  텍사메사존, 10% 소 태아혈청을 함유하는 α-MEM에서  $1 \times 10^6$ 개/ml로 현탁한 마우스 비장세포를 1웰당 700 $\mu\text{l}$  첨가했다. 각 웰위에 밀리셀(Millicell) PCF(미리포아社)를 세트하고, 상기 배지에  $4 \times 10^4$ 개/ml로 현탁한 ST2세포를 밀리셀 PCF중에서 700 $\mu\text{l}$  첨가하여 37℃, 6일간 배양했다. 배양종료 후, 밀리셀 PCF를 제거하고, 플레이트를 PBS로 1회 세정 후, 아세톤-에탄올용액(50:50)으로 1분간 세포를 고정한 후, 류코사이트 에시드 포스파타아제 키트(LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE KIT; 시그마社)를 이용하여 파골세포 특이적 마커인 주석산내성 산성포스파타아제활성(TRAP 활성)을 나타내는 세포만을 염색했다. 현미경 관찰의 결과, pcDL-SR α296을 트랜스펙트한 COS-7세포를 고정한 웰중에는 TRAP활성을 나타내는 세포는 전혀 나타나지 않았음에 대하여 pOBM291을 트랜스펙트한 세포를 고정한 웰중에는  $45 \pm 18$ 개(평균 ± 표준편차, n=3)의 TRAP양성세포가 관찰되었다. 또한, 이들의 TRAP양성세포에 칼시토닌(calcitonin)이 결합하는 것도 확인되었다. 이로부터 OBM에는 파골세포형성을 유도하는 활성이 있는 것이 명확하게 되었다.

[실시예 17]

Trx-OBM 및 분비형 OBM에 의한 파골세포형성 유도활성

마우스 비장세포를  $10^{-8}$ M 활성형 비타민  $D_3$ ,  $10^{-7}$ M 텍사메사존, 10% 소 태아혈청을 함유하는  $\alpha$ -MEM에  $2 \times 10^6$ 개/ml로 되도록 현탁하고, 이 현탁액을 24웰 플레이트에 1웰당  $350\mu\text{l}$  첨가했다. 정제된 Trx-OBM을 상기 배지에서 희석한 용액( $40\text{ng/ml}$ ), pCEP sOBM 또는 pCEP4를 형질도입한 293-EBNA세포를 IMDM-10% FCS로 배양한 배양상청을 상기 배지에서 10배 희석한 용액, 또는 상기 배지만을 각각  $350\mu\text{l}$  상기의 웰에 첨가한 후, 밀리셀 PCF(미리포아社)를 각 웰에 세트하고, 상기 배지에서 현탁한  $4 \times 10^4$ 개/ml의 ST2세포를 밀리셀 PCF에  $600\mu\text{l}$  첨가했다. 6일간 배양한 후, 밀리셀 PCF를 제거하고, 플레이트를 PBS로 1회 세정 후, 아세톤-에탄올 용액(50:50)으로 1분간 세포를 고정화하던 중 류코사이트에시드 포스페이트 키트(시그마社)를 이용하여 주석산내성 산성포스파타아제활성(TRAP 활성)을 나타내는 세포만을 염색했다. 현미경 관찰의 결과, Trx-OBM을 첨가하지 않은 웰중에는 TRAP활성을 나타내는 세포는 전혀 검출되지 않았음에 대해, Trx-OBM을 첨가한 웰에는  $106 \pm 21$ 개(평균  $\pm$  표준편차,  $n=3$ )의 TRAP양성세포가 관찰되었다. 동일하게 pCEP4로 형질도입된 293-EBNA의 배양상청을 첨가한 웰중에는 TRAP활성을 나타내는 세포는 전혀 검출되지 않았음에 대해, pCEP sOBM으로 형질도입된 293-EBNA의 배양상청을 첨가한 웰에는  $120 \pm 31$ 개(평균  $\pm$  표준편차,  $n=3$ )의 TRAP양성세포가 관찰되었다. 또한, 이들 TRAP양성세포에 칼시토닌이 결합하는 것도 확인되었다. 이에 의해 Trx-OBM 및 분비형 OBM에는 파골세포형성을 유도하는 활성이 있는 것이 밝혀지게 되었다.

[실시예 18]

#### 본 발명의 cDNA에 의해 발현되는 단백질 OBM과 본 발명의 천연형의 OCIF결합단백질과의 동일성

##### (1) 토끼 항 OBM 폴리클로날 항체의 제작

암컷 일본백색토끼(체중 2.5~3.0kg, 키타야마라베스社로부터 입수) 3마리에 실시예 14-(6) 및 (7) 기재한 방법에 의해 얻은 정제 OBM(티오레독신-OBM융합단백질)  $200\mu\text{g/ml}$ 를 프로인트 완전 아조벤드(DIFCO社)와 등량혼합하여 에멀션으로 한 것을 1회  $1\text{ml}$ 씩 피하면역했다. 면역은 1주간 간격으로 함께 6회 행하고, 최종면역 후 10일째에 체혈을 행했다. 분리한 혈청에서 항체를 아래처럼 정제했다. 즉, PBS에서 2배 희석한 항혈청에 최종농도가 40%(w/v)로 되도록 황산암모늄을 첨가하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 1시간 방치 후,  $8,000 \times g$ 에서 20분간 원심 분리를 하고, 침전을 얻었다. 침전을 소량의 PBS에 용해하고, PBS에 대하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 투석한 후, 프로테인 G-세파로즈 컬럼(팔마시아社 製)에 부하했다. PBS로 세정 후,  $0.1\text{M}$  글리신-염산완충액(pH 3.0)으로 흡착한 면역글로브린G를 용출하고, 즉시  $1.5\text{M}$  트리스-염산완충액(pH 8.7)으로 중성 pH로 했다. 용출단백질 분획분을 PBS에 대하여 투석 후,  $280\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하고, 그 농도를 결정했다( $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  13.5). 서양고추냉이(horseradish; 와사비) 퍼옥시다아제 표지한 항 OBM항체는 말레이미드 활성화 퍼옥시다아제 키트(피아스社)를 이용하여 제작했다. 즉,  $1\text{mg}$ 의 정제항체에  $80\mu\text{g}$ 의 N-석신이미드-S-아세틸티오초산을 첨가하고, 실온에서 30분간 반응시켰다. 이에  $5\text{mg}$ 의 히드록실아민을 첨가하여 탈아세틸화한 후, 수식된 항체를 폴리아크릴아미드 탈염컬럼에서 분획했다. 단백질 분획분을  $1\text{mg}$ 의 말레이미드 활성화 퍼옥시다아제와 혼합하고, 실온에서 1시간 반응시켜 효소표지항체를 얻었다.

##### (2) 토끼 항 OBM 폴리클로날 항체에 의한 본 발명의 cDNA에 의해 발현되는 단백질(OBM) 혹은 본 발명의 천연형 단백질과 OCIF와의 특이적결합능의 저해

실시예 15-(6) 및 (7) 기재한 방법에서 얻은 정제 OBM(티오레독신-OBM융합단백질) 및 실시예 2-(4)의 천연형 정제 OCIF결합단백질을 각각  $0.1\text{M}$  탄산수소나트륨에  $2\mu\text{g/ml}$ 로 되도록 용해하고, 각각의 용액  $100\mu\text{l}$ 씩을 96웰 이뮤노플레이트(Nunc社 製)의 각 웰에 가해  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 방치했다. 각 웰에 50% 농도의 블로케이스를  $200\mu\text{l}$ 씩 가해 실온에서 1시간 방치했다. 각 웰을  $0.1\%$  폴리솔베이트를 함유하는 PBS(P20-PBS)로 3회 세정한 후, P20-PBS로 희석한 25%농도의 블로케이스에 토끼 항 OBM항체를  $200\mu\text{g/ml}$ 로 되도록 용해하고, 그 항체용액 혹은 항체를 포함하지 않는 25%농도의 블로케이스 용액을  $100\mu\text{l}$ 씩 각 웰에 첨가하고,  $37^\circ\text{C}$  1시간 인큐베이트했다. 각 웰을 P20-PBS로 3회 세정한 후, 실시예 8-(3) 기재의  $^{125}\text{I}$ 표지한 OCIF  $20\text{ng/ml}$ 를 가한 결합시험용액( $0.2\%$  소 혈청 알부민,  $20\text{mM}$  HEPES,  $0.1\text{mg/ml}$  헤파린을 가한 P20-PBS)을  $100\mu\text{l}$ 씩 각 웰에 첨가했다. 또한, 다른 웰에는  $^{125}\text{I}$ 표지한 OCIF  $20\text{ng/ml}$ 에 가하여  $8\mu\text{g/ml}$ 의 비표지 OCIF를 함유하는 결합시험용액을  $100\mu\text{l}$  가하여 실험을 행했다. 그 이뮤노 플레이트를  $37^\circ\text{C}$ , 1시간 인큐베이트한 후, 각 웰을 P20-PBS로 6회 세정했다. 각 웰중의  $^{125}\text{I}$ 의 양을 감마카운터로 측정했다. 결과를 도 17에 나타낸다. 도에 도시한 바와같이, 본 발명 cDNA에 의해 발현되어 정제하여 얻어지는 OBM 및 본 발명의 천연형 OCIF에 특이적으로 결합하는 단백질은 토끼 항 OBM 폴리클로날 항체로 처리함에 의해  $^{125}\text{I}$ 표지한 OCIF와의 결합은 전혀 일어나지 않았다. 한편, 항체처리하지 않은 양 단백질에는,  $^{125}\text{I}$ 표지 OCIF가 결합하는 것이 확인되었다. 또한, 이들 결합은  $400$ 배 농도의 비표지 OCIF( $8\mu\text{g/ml}$ )를 첨가함에 의해 현저히 저해되기 때문에 양 단백질의 OCIF로의 결합은 특이적결합임이 명백해졌다. 이상의 결과에서 토끼 항 OBM 폴리클로날 항체는, 본 발명 cDNA에 의해 발현되는 단백질인 OBM 및 본 발명의 천연형 OCIF결합단백질을 함께 인식하고, 양 단백질과 OCIF의 특이적결합을 저해하는 것이 명백해졌다.

[실시예 19]

#### 사람 OBM cDNA 크로닝

##### (1) 마우스 OBM 프라이머의 조제

사람 OBM cDNA의 스크리닝에는, 상기 실시예의 방법에 따라 조제한 마우스 OBM 프라이머, OBM#3 및 OBM#8을 사용했다. 각각의 서열을 서열번호 9 및 6에 나타낸다.

##### (2) PCR에 의한 사람 OBM cDNA단편의 취득

사람 임파절유래 cDNA 라이브러리로서 사람 임파절 마라톤 레디(Human Lymph Node Marathon ready) cDNA(크론탭社)를 주형으로하여 상기 (1)에서 조제한 마우스 OBM cDNA 프라이머를 이용하여 PCR을 행하여 사람 OBM cDNA 단편을 취득했다.

아래에 이용한 PCR의 조건을 나타낸다.

10×EX Taq 버퍼(寶酒造社) 2 $\mu$ l

2.5mM dNTP 1.6 $\mu$ l

cDNA용액 1 $\mu$ l

EX Taq(寶酒造社) 0.2 $\mu$ l

증류수 14.8 $\mu$ l

40 $\mu$ M 프라이머 OBM#3 0.2 $\mu$ l

40 $\mu$ M 프라이머 OBM#8 0.2 $\mu$ l

상기 용액을 마이크로튜브중에서 혼합 후, 아래의 조건으로 PCR을 행했다. 95℃에서 2분간 처리하고, 95℃ 30초, 57℃ 30초 및 72℃ 2분 30초간의 3단계의 반응을 40회 반복한 후, 72℃에서 5분간 보온했다. 반응액의 일부를 아가로스 전기영동에 제공했던 바 상기 마우스 OBM cDNA 프라이머에서 증폭되는 약 690bp의 DNA단편이 검출되었다.

### (3) PCR에 의해 증폭된 사람 OBM cDNA단편의 정제와 염기서열의 결정

실시에 19-(2)에서 얻은 사람 OBM cDNA단편을 아가로스 전기영동에 의해 분리하고, 게다가 QIAEX 겔 엑스트랙션 키트(키아젠社)를 이용하여 정제했다. 이 정제된 사람 OBM cDNA단편을 주형으로 하여 다시 상기 마우스 OBM cDNA 프라이머를 이용하여 PCR을 행하고, 이 사람 OBM cDNA단편을 대량으로 조제하고, 동일하게 QIAEX 겔 엑스트랙션 키트에 의해 정제했다. 정제된 사람 OBM cDNA단편의 염기서열을 OBM#3 및 OBM#8(서열표 9 및 6)을 프라이머로 하여 타크 다이 데옥시터미네이터 사이클시퀀싱 FS 키트(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit; 파킨엘머社)를 이용하여 결정했다. 이 사람 OBM cDNA단편의 염기서열은 마우스 OBM cDNA에 상당하는 영역과 비교했던 결과, 80.7%의 상동성을 나타냈다.

### (4) 약 690bp의 사람 OBM cDNA단편을 탐침자로한 하이브리다이제이션법에 의해 전장 사람 OBM cDNA의 스크리닝

실시에 19-(3)에서 정제된 약 690bp의 사람 OBM cDNA단편을 메가플라임 DNA 라벨링 키트(어머샴社)를 이용하여 [ $\alpha^{32}$ P] dCTP로 표지하고, 전장의 사람 OBM cDNA를 스크리닝했다. 스크리닝의 대상으로서는 사람 임파절 5'-스트레치 플러스(Human Lymph Node 5'-STRETCH PLUS) cDNA 라이브러리(크론탭社, USA)를 사용했다. 동사의 프로토콜에 따라 조환파지를 37℃에서 15분간 대장균C600Hf1에 감염시킨 후, 그 대장균을 45℃로 가온한 LB한천배지(1% 트립톤, 0.5% 이스트엑스, 1% NaCl, 0.7%한천)에 첨가하고, 1.5% 한천을 함유하는 LB한천배지 플레이트 위에 흘려 넣었다. 37℃에서 하룻밤 배양 후, 플러그가 생긴 플레이트 위에 하이본드N(어머샴社) 약 3분간 밀착시켰다. 이 필터를 통상법에 따라 알칼리 변성처리한 후, 중화하고, 2×SSC용액에 침적한 후, UV 크로스린커(스트라타진社)에 의해 DNA를 필터에 고정했다. 얻은 필터를 Rapid-hyb버퍼(어머샴社)에 침적하고, 65℃에서 15분간 전처리한 후, 열변성한 상기 사람 OBM cDNA단편(약 690bp, 5×10<sup>5</sup>cpm/ml)을 첨가한 상기 버퍼에 옮기고, 65℃에서 하룻밤 하이브리다이제이션시켰다. 반응 후, 필터를 각각 0.1% SDS를 함유하는 2×SSC, 1×SSC 및 0.1×SSC로 순차로 1회씩 65℃로 15분간 세정했다. 얻은 몇 개인가의 양성 클론(clone)을 다시 2회 스크리닝을 반복함에 의해 순화했다. 이들 중에서 약 2.2kb의 인서트를 갖는 클론을 선택하고, 이하의 실험에 이용했다. 이 순화한 파지를  $\lambda$  hOBM이라 명명했다. 순화한  $\lambda$  hOBM에서 QIAGEN 람다(Lambda) 키트(키아젠社)의 프로토콜에 따라 약 10 $\mu$ g의 DNA를 얻었다. 이 DNA를 제한효소 Sall로 소화한 후, 아가로스 전기영동에 의해 약 2.2kb의 hOBM 인서트 cDNA를 분리했다. QIAEX 겔 엑스트랙션 키트(키아젠社)를 이용하여 정제한 이 DNA단편을 미리 제한효소 Sall로 절단하고, 탈인산화해둔 프라스미드 pUC19(MBI社)에 DNA 라이게이션 키트 ver. 2(寶酒造社)를 이용하여 삽입했다. 얻은 DNA단편을 함유하는 pUC19로 대장균 DH 5 $\alpha$ (기브코BRL社)를 형질전환시켰다. 얻은 형질전환주는 pUC19hOBM이라 명명하고, 이를 증식시켜 약 2.2kb의 사람 OBM cDNA가 삽입된 프라스미드를 통상법에 의해 정제했다.

### (5) 사람 OBM의 모든 아미노산서열을 코드하는 cDNA의 염기서열의 결정

실시에 19-(4)로 얻은 사람 OBM cDNA의 염기서열을 타크 다이 데옥시터미네이터 사이클시퀀싱 FS키트(파킨엘머社)를 이용하여 결정했다. 즉, pUC19hOBM을 주형으로 하고, 삽입단편의 염기서열을 결정했다. 프라이머로서 pU19의 삽입단편 DNA의 염기서열을 결정하기 위해 프라이머, M13프라이머M3 및 M13 프라이머 RV(모두 寶酒造社) 및 사람 OBM cDNA단편(약 690bp)의 염기서열에 기하여 설계한 합성 프라이머 사람 OBM#8을 이용했다. 이용한 프라이머, M13프라이머M3 및 M13 프라이머 RV의 서열을 각각 서열번호 4 및 5로 나타냈다. 이에 의해 결정된 사람 OBM cDNA의 염기서열에서 추정되는 사람 OBM의 아미노산서열을 서열번호 11 또 사람 OBM cDNA의 염기서열을 서열번호 12로 각각 나타냈다.

얻은 사람 OBM cDNA를 함유하는 플라스미드, pUC19hOB으로 형질전환한 대장균은 일본통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소에 수탁번호 FERM BP-6058로서 평정 9년 8월 13일에 기탁되어있다.

[실시예 20]

#### OCIF의 $^{125}$ I표지 및 ELISA에 의한 $^{125}$ I표지 OCIF의 정량

OCIF는 요오드젠(Iodogen)법에 의해  $^{125}$ I표지 했다. 2.5mg/ml 요오드젠-크로로포름용액 20 $\mu$ l를 1.5ml 에펜도르프튜브에 옮기고, 40℃에서 크로로포름을 증발시켜 요오드젠코딩한 튜브를 조제했다. 이 튜브를 0.5M 인산나트륨완충액(Na-Pi, pH 7.0) 400 $\mu$ l로 3회 세정한 후, 5 $\mu$ l의 0.5M Na-Pi, pH 7.0을 가했다. 이 튜브에 Na- $^{125}$ I용액(어머샴社, NEZ-033H) 1.3 $\mu$ l(18.5MBq)를 가한 후, 즉시 1mg/ml OCIF용액(모노머형 혹은 다이머형) 10 $\mu$ l를 가해 볼텍스믹서로 교반한 후, 실온에서 30초간 방치했다. 이 용액을 미리 10mg/ml 요오드화 칼륨 함유하는 0.5M Na-Pi(pH 7.0)용액 80 $\mu$ l와 5% 소혈청알부민을 함유하는 인산완충 생리식염수(BSA-PBS) 5 $\mu$ l를 첨가해둔 튜브에 옮겨 교반했다. 이 용액을 BSA-PBS로 평형화한 스핀컬럼(1ml, G-25 Sephadex fine, 팔마시아社)에 부하하고, 2,000rpm으로 5분간 원심분리했다. 컬럼에서 용출된 분획분에 BSA-PBS를 400 $\mu$ l 가해 교반한 후, 2 $\mu$ l를 취하고, 그 방사능을 감마카운터로 측정했다. 이렇게 하여 조제한  $^{125}$ I표지 OCIF용액의 방사화확순도는 10% 트리크로로초산(TCA)에 의해 침전하는 분획분의 방사능을 측정함에 의해 구했다.

$^{125}$ I표지 OCIF의 OCIF생물활성은 WO96/26217호 기재의 방법에 따라 측정했다. 또한,  $^{125}$ I표지 OCIF 농도는 아래와 같이 ELISA에 의해 측정했다. 즉, WO96/26217호 공보 기재의 토끼 항 OCIF 폴리클로날 항체를 2 $\mu$ g/ml로 되도록 용해한 50mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6을 100 $\mu$ l씩 96웰 이뮤노플레이트(Nunc社, MaxiSorp<sup>TM</sup>)의 각 웰에 가하여 4℃ 하룻밤 방치했다. 이 용액을 버린 후, 블록에이스(雪印乳業社)와 인산염완충 생리식염수와의 혼합수용액(혼합비 25:75)(B-PBS)을 200 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 액을 버린 후, 각 웰을 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유한 인산염완충 생리식염수(P-PBS)로 3회 세정하고, 이어서  $^{125}$ I표지 OCIF샘플 혹은 OCIF표준품을 첨가한 B-PBS를 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 액을 버린 후, P-PBS 200 $\mu$ l씩 각 웰을 6회 세정했다. 퍼옥시다아제 표지한 토끼 항 OCIF 폴리클로날 항체를 B-PBS로 희석한 용액을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치했다. 이 용액을 버린 후, P-PBS 200 $\mu$ l로 각 웰을 6회 세정했다. TMB 용액(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scyteck社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2~3분간 방치한 후, 정지액(Stopping Reagent, Scyteck社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가했다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더로 측정했다. OCIF표준품을 이용하여 작성한 검량선에서  $^{125}$ I표지 OCIF의 농도를 구했다.

[실시예 21]

#### 본 발명 cDNA에 코드되는 단백질의 발현

##### (1) 동물세포용 hOBM 발현벡터의 구축

pUChOBM을 제한효소 SalI로 절단하고, 약 2.2kb의 DNA단편을 1% 아가로스 전기영동에 의해 정제하고, DNA 블런팅 키트(寶酒造社)에 의해 말단을 평활화했다(평활화 hOBM cDNA단편). 발현 플라스미드 pcDL-SR  $\alpha$ 296{Molecular and Cellular Biology, Vol 8, pp466~472(1998)}을 제한효소 EcoRI로 절단하고, 블런팅 키트에 의해 말단을 평활화한 것과, 평활화한 hOBM cDNA단편과 라이게이션 키트 ver. 2에 의해 결합시켰다. 라이게이션 반응액을 이용하여 대장균 DH $\alpha$ 를 형질전환했다. 얻은 암피실린내성 형질전환주에서 제한효소 절단에 의해 얻어진 DNA단편 지도의 해석 및 DNA서열의 결정에 의해 SR $\alpha$ 프로모터(promotor)에 의해 전사방향이 대하여 hOBM cDNA의 전사방향이 순향으로 삽입되어 있는 플라스미드, phOBM을 갖는 균주를 뽑아내고, DH5  $\alpha$ /phOBM이라 명명했다.

##### (2) COS-7세포에서의 사람 OBM의 발현

대장균 DH5  $\alpha$ /phOBM을 배양하고, 키아필터 플라스미드 미디키트(키아젠社)를 이용하여 플라스미드 phOBM을 정제했다. phOBM을 6웰 플레이트의 각 웰중에서 COS-7세포에 리포펙토아민을 이용하여 트랜스펙션하고, 10% 소 태아혈청을 함유하는 DMEM중에서 2일간 배양했다. 5% 투석 소 태아혈청을 첨가한 시스테인-메티오닌 불포함 DMEM(大日本製藥社)에 배지교환하여(88 $\mu$ l/웰) 15분간 배양한 후, 고속 단백질 레벨링 믹스(Express Protein Labeling Mix; NEN社, 10mCi/ml)를 14 $\mu$ l 첨가했다. 4시간 배양 후, 10% 소 태아혈청을 함유하는 DMEM을 200 $\mu$ l 가해 1시간 배양했다. 세포를 PBS로 2회 세정 후, 1% 트리톤 X-100, 1% 소 헤모글로빈, 10 $\mu$ g/ml 류펩틴(leupeptin), 0.2TIU/ml 아프로티닌(aprotinin) 및 1mM PMSF를 함유하는 TSA버퍼(0.14M NaCl, 0.025% NaN<sub>3</sub>를 함유하는 10mM 트리스-염산, pH 8.0)를 0.5ml 가해 얼음 위에서 1시간 정치했다. 피펫팅에 의해 세포를 파쇄한 후, 4℃, 3,000 $\times$ g, 10분간 원심분리하여 상청을 얻었다. 이 상청 100 $\mu$ l에 200 $\mu$ l의 희석버퍼(0.1% 트리톤 X-100, 0.1% 소 헤모글로빈, 10 $\mu$ g/ml 로이펩틴, 0.2TIU/ml 아프로티닌 및 1mM PMSF를 함유하는 TSA버퍼)를 가하고, 단백질 A 세파로즈(50 $\mu$ l)와 함께 4℃에서 1시간 진탕시킨 후, 4℃, 1,500 $\times$ g로 1분간 원심분리하여 상청을 회수함에 의해 : 단백질 A 세파로즈에 비특이적으로 흡착하는 단백질을 제거했다. 이 상청에 OCIF(1 $\mu$ g)를 가해 4℃에서 1시간 진탕시키면서 사람 OBM과 OCIF를 결합시킨 후, 토끼 항 OCIF 폴리클로날 항체(50 $\mu$ g)를 가하여 4℃에서 1시간 진탕했다. 이 용액에 단백질 A 세파로즈(10 $\mu$ l)를 가하고, 게다가 4℃에서 1시간 진탕했다. 4℃, 1,500 $\times$ g로 1분간 원심분리하여 침전분획분을 회수했다. 4℃, 1,500 $\times$ g로 1분간 원심분리하여 얻어진 침전을 희석버퍼로 2회, 소 헤모글로빈을 포함하지 않는 희석버퍼로 2회, TSA버퍼로 1회, 50mM 트리스-염산(pH 6.5)로 1회, 각각 세정 후, 침전에 10%  $\beta$ 멜캅토에탄올을 함유하는 SDS버퍼(0.125M 트리스-염산, 4% 도데실황산나트륨, 20% 글리세롤, 0.002% 브로모페놀 블루, pH 6.8)를 가해 100℃에서 5분간 가열 후, SDS-PAGE(12.5% 폴리아크릴아미드겔, 第一化學社)에 걸었다. 통상법에 의해 겔을 고정·건조시켜 앰플리파이(Amplify; 어머샴社)에 의해 아이소토프(isotope)의 시그널을 증강시킨 후, 바이오맥스 MR필름(코닥社)을 이용하여 -80℃에서 감광시켰다. 결과를 도 18로 나타낸다. 이 결과, 본 발명의 cDNA에 코드되는 단백질의 분자량은 약 40,000인 것이 밝혀졌다.

## [실시예 22]

본 발명 cDNA에 코드되는 단백질과 OCIF와의 결합

실시예 21-(2)와 동일하게 정제된 phOBM을 24웰 플레이트의 각 웰중에서 COS-7세포에 리포펙트아민을 이용하여 트랜스펙트하고, 이 세포를 2~3일간 배양한 후, 무혈청 DMEM으로 세정하고, 이에  $^{125}$ I표지한 OCIF 20ng/ml를 가한 결합 시험배지(0.2% 소 혈청 알부민, 20mM Hepes완충액, 0.1mg/ml 헤파린, 0.2%  $\text{NaN}_3$ 를 가한 무혈청 DMEM) 200 $\mu$ l를 가했다. 또 다른 웰에는  $^{125}$ I표지한 OCIF 20ng/ml에 가하여 게다가 8 $\mu$ g/ml의 비표지 OCIF를 첨가한 결합시험배지를 200 $\mu$ l가 하여 실험을 행했다.  $\text{CO}_2$  인큐베이터중(5%  $\text{CO}_2$ ), 37℃에서 1시간 배양한 후, 세포를 0.1mg/ml의 헤파린을 포함하는 인산염완충 생리식염수 500 $\mu$ l로 2회 세정했다. 세정 후, 0.1N NaOH용액 500 $\mu$ l를 각 웰에 가해 실온에서 10분간 방치함에 의해 세포를 용해시켜 웰중의  $^{125}$ I의 양을 감마카운터로 측정했다. 이 결과, 도 19에 도시한 바와같이, phOBM을 트랜스펙트한 세포에만  $^{125}$ I표지한 OCIF가 결합하는 것이 확인되었다. 또한, 그 결합은 400배 농도의 비표지 OCIF(8 $\mu$ g/ml)를 첨가함에 의해 현저히 저해됨이 확인되었다. 이상의 결과에서 phOBM위의 cDNA에 코드되는 단백질 사람 OBM은 COS-7세포 표면에서 OCIF에 특이적으로 결합함이 밝혀졌다.

## [실시예 23]

 $^{125}$ I표지한 OCIF와 본 발명 cDNA에 코드되는 단백질과의 크로스링킹 시험

본 발명 cDNA에 코드되는 단백질의 성질을 보다 상세히 해석하기 위해  $^{125}$ I표지한 모노머형 OCIF와 본 발명 cDNA에 코드되는 단백질과의 크로스링킹을 행했다. 즉, 실시예 21-(1) 및 (2)에 기재한 방법에 따라 각각 발현벡터를 phOBM을 구축하고, COS-7세포에 트랜스펙트한 후, 상기  $^{125}$ I표지한 OCIF(25ng/ml)를 가한 결합시험용 배지를 200 $\mu$ l씩 각 웰에 첨가했다. 또한, 다른 웰에는  $^{125}$ I표지한 OCIF에 가해 400배 농도의 비표지 OCIF를 다시 첨가한 결합시험용 배지를 가했다.  $\text{CO}_2$  인큐베이터중(5%  $\text{CO}_2$ ), 37℃에서 1시간 배양한 후, 세포를 0.1mg/ml의 헤파린을 포함하는 인산염완충 생리식염수 500 $\mu$ l로 2회 세정했다. 이 세포에 100 $\mu$ g/ml의 크로스링킹제, DSS(Disuccinimidyl suberate, Pierce社)를 용해시킨 인산염완충 생리식염수 500 $\mu$ l를 가해 0℃에서 10분간 반응시켰다. 이들 웰의 세포를 0℃로 냉각한 인산염완충 생리식염수 1ml로 2회 세정한 후, 이 세포에 1% 트리톤 X-100(和光純藥社), 2mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, 시그마社), 10 $\mu$ M 펩스타틴(和光純藥社), 10 $\mu$ M 로이펩틴(和光純藥社), 10 $\mu$ M 안티페인(antipain; 和光純藥社) 및 2mM EDTA(和光純藥社)를 함유하는 20mM Hepes완충액 100 $\mu$ l를 가해 실온에서 30분간 방치하여 세포를 용해시켰다. 이들 샘플 15 $\mu$ l를 통상법에 의한 환원조건하에서 SDS화한 후, SDS-전기영동용 겔(4~20% 폴리아크릴아미드 글라디엔트, 第一化學社)을 이용하여 영동했다. 영동 후, 겔을 건조시켜 바이오맥스 MS필름(코닥社)과 바이오맥스 MS 증감 스크린(코닥社)을 이용하여 -80℃에서 24시간 감광시켰다. 감광시킨 필름을 통상법에 의해 현상했다. 이 결과,  $^{125}$ I표지 모노머형 OCIF와 본 발명 cDNA에 의해 코드되는 단백질을 크로스링킹시험에 의해 도 20에 도시한 바와같이 분자량 약 90,000~110,000의 단백질밴드가 검출되었다.

## [실시예 24]

분비형 사람 OBM의 발현(1) 분비형 사람 OBM 발현 프라스미드의 구축

사람 OBM SF(서열번호 13)와 마우스 OBM #8(서열번호 6)을 프라이머, pUC19hOBM을 주형으로 하여 PCR 반응을 행했다. 이 생성물을 아가로스겔 전기영동으로 정제한 후, 제한효소 SphI, HindIII으로 절단하고, 게다가 아가로스겔 전기영동으로 정제하여 0.27kb의 단편을 얻었다. 사람 OBM cDNA를 제한효소 DraI로 부분소화하고, 1개소 절단한 단편을 아가로스 전기영동으로 정제하고, 그 정제 단편을 다시 제한효소 HindIII로 절단했다. 0.53kb의 DraI/HindIII단편을 아가로스 전기영동으로 정제하고, 이 정제 단편과 상기 PCR 생성물의 SphI, HindIII단편(0.27kb)을 pSec Tag A(인비트로젠社)의 SphI/EcoRV단편(5.2kb)와 함께 라이게이션 키트 ver. 2(寶酒造社)를 이용하여 라이게이션을 하고, 그 반응생성물을 이용하여 대장균 DH5  $\alpha$ 를 형질전환했다. 얻은 암피실린 내성주에서 알칼리 SDS법에 의해 플라스미드를 정제하고, 제한효소로 절단함에 의해 pSec Tag A에 0.27kb와 0.53kb의 단편이 삽입된 프라스미드를 뽑아내었다. 게다가, 이 프라스미드를 타크 다이 테옥시터미네이터 사이클시퀀싱 FS 키트(퍼킨엘머社)를 이용하여 시퀀스를 하고, 이 프라스미드가 분비형 사람 OBM을 코드하는 서열을 갖고 있는 것을 확인하였다. 이 프라스미드를 제한효소 NheI, XhoI로 절단한 후, 분비형 사람 OBM cDNA에 상당하는 단편(0.8kb)을 아가로스겔 전기영동으로 회수했다. 이 단편을 라이게이션 키트를 이용하여 발현 벡터 pCEP4(인비트로젠社)의 NheI/XhoI단편(10.4kb)에 삽입하고, 그 반응생성물을 이용하여 대장균 DH5 $\alpha$ 를 형질전환했다. 얻은 암피실린 내성주에서 알칼리SDS법에 의해 프라스미드를 정제하고, 제한효소로 절단함에 의해 목적하는 구조를 가진 분비형 사람 OBM 발현 프라스미드(pCEP shOBM)를 갖는 대장균주를 선택했다. pCEP shOBM을 갖는 대장균주를 배양하고, 키아필터 프라스미드 미디키트(키아젠社)를 이용하여 pCEP shOBM을 정제했다.

(2) 분비형 OBM의 발현

293-EBNA세포를 10% FCS를 함유하는 IMDM(IMDM-10% FCS)에 현탁하고, 콜라겐 코드한 24웰 플레이트(住友베이크라이트社)에  $2 \times 10^5$ 세포/2ml/웰로 되도록 파종하고, 하룻밤 배양했다. 이 세포에 1 $\mu$ g의 pCEP shOBM 및 pCEP4의 각각을 리포펙트아민(기브코社) 4 $\mu$ l를 이용하여 형질도입하고, 0.5ml의 무혈청 IMDM 또는 IMDM-10% FCS중에서 다시 2일간 배양하고, 그 배양상청을 회수했다. 분비형 사람 OBM의 배양상청중에서의 발현은 아래와 같이 하여 확인했다. 즉, 배양상청에 최종농도가 0.1M로 되도록 탄산수소나트륨을 가하여 4℃에서 하룻밤 방치하고, 배양상청중에 사람 OBM을 96웰 플레이트에 고상화했다. 이 플레이트를 PBS로 4배 희석한 블록에이스(雪印乳業社)용액(B-PBS)으로 실온에 2시간

방치하여 블록킹한 후, B-PBS로 희석한 3~100ng/ml의 OCIF를 가하여 37℃로 2시간 방치했다. 0.05% 폴리솔베이트 20을 함유하는 PBS(P-PBS)로 플레이트를 세정한 후, B-PCS로 희석한 WO96/26217호 기재의 퍼옥시다아제 표지 항 OCIF항체를 각 웰에 100 $\mu$ l씩 첨가하고, 37℃에서 2시간 방치했다. P-PBS로 각 웰을 6회 세정한 후, TMB 용액(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 약 10분간 방치한 후, 정지액(Stoppong Reagent, Scytek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가했다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더로 측정했다. 결과를 도 21에 나타낸다. pCEP shOBM을 형질도입한 세포의 배양상청을 고상화한 플레이트에서는, 첨가한 OCIF의 농도에 의존하여 450nm의 흡광도가 증가했다. 한편, 벡터만의 pCEP4를 형질도입한 세포의 배양상청을 고상화한 경우에는, 그 흡광도의 증가는 볼 수 없었다. 또한, 고상화에 이용하는 배양상청 양의 비율은 5~90%의 범위에서 여러 가지 변화시켜 일정농도의 OCIF(50ng/ml)를 첨가한 때의 결과를 도 22에 나타낸다. pCEP shOBM을 형질도입한 세포의 배양상청을 고상화한 플레이트에서는 첨가한 배양상청 양의 증가에 따라 450nm에서 흡광도가 증가했지만, 벡터 pCEP4를 형질도입한 세포의 배양상청을 고상화한 플레이트에서는 흡광도의 증가는 볼 수 없었다. 이들 결과에 의해 분비형 사람 OBM이 pCEP shOBM을 형질도입한 세포의 배양상청중에 발현하고 있는 것이 확인되었다.

## [실시예 25]

### 티오레독신-사람 OBM융합단백질(Trx-hOBM)의 발현

#### (1) 티오레독신-사람 OBM융합단백질(Trx-hOBM) 발현벡터의 구축

10 $\mu$ l의 10×ExTaq버퍼(寶酒造社), 8 $\mu$ l의 10mM dNTP(寶酒造社), 77.5 $\mu$ l의 멸균증류수, 2 $\mu$ l의 pUC19hOBM 수용액(10ng/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l의 프라이머 마우스 OBM #3(서열번호 9)(100pmol/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l의 프라이머 hOBM SalR2(서열번호 14)(100pmol/ $\mu$ l), 0.5 $\mu$ l의 ExTaq(5u/ $\mu$ l)(寶酒造社)를 혼합하여 마이크로원심관중에서 PCR반응을 행했다. 95℃ 5분, 50℃ 1초, 55℃ 1분, 74℃ 1초, 72℃ 5분의 반응 후, 96℃ 1분, 50℃ 1초, 55℃ 1분, 74℃ 1초, 72℃ 3분의 반응을 25사이클을 행했다. 반응액전량에서 약 750bp의 DNA단편을 정제했다. 정제한 DNA단편(전량)을 제한효소 SalI(寶酒造社) 및 BspHI(뉴잉글랜드 바이올라브스社)로 절단한 후, 1% 아가로스 전기영동을 행하고, 약 320bp의 DNA단편(단편 1)을 정제하여 20 $\mu$ l의 멸균증류수에 용해했다. 동일하게, 실시예 19-(3) 기재의 pUC19hOBM 4 $\mu$ g을 제한효소 BamHI, BspHI(寶酒造社)로 절단하여 얻은 약 450bp의 DNA단편(단편 2), 및 2 $\mu$ g의 pTrxFus(인히드로젠社)를 제한효소 BamHI, SalI(寶酒造社)로 절단하여 얻은 약 3.6kb의 DNA단편(단편 3)을 각각 정제하고, 각각을 20 $\mu$ l의 멸균증류수에 용해했다. DNA단편의 정제에는 QIAEX II 겔 익스트랙션 키트(gel extraction kit)를 이용했다. 단편 1, 단편 2, 및 단편 3을 DNA 라이게이션 키트(ligation kit) ver. 2(寶酒造社)를 이용하여 16℃에서 2시간 30분 보온함에 의해 결합되었다. 라이게이션 반응액을 이용하여 대장균GI724주(인히드로젠社)를 티오폐전 고속시스템(ThioFusion Expression System; 인히드로젠社) 첨부의 시방서에 기재한 방법으로 형질전환했다. 얻은 암피실린내성 형질전환주 중에서 제한효소 절단에 의해 얻는 DNA단편지도의 해석 및 DNA서열의 결정에 의해 hOBM cDNA단편이 티오레독신 유전자에 같은 읽음틀로 결합하고 있는 플라스미드를 갖는 균주를 선택했다. 얻은 균주는 GI724/pTrxhOBM이라 명명했다.

#### (2) 대장균에서의 Trx-hOBM의 발현

GI724/pTrxhOBM주 및 pTrxFus를 갖는 GI724주(GI724/pTrxFus)를 각각 2ml의 RMG-Amp배지(0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 2% 카자미노산, 1% 글리세롤, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ g/ml 암피실린, pH 7.4)중에서 37℃에서 6시간 진탕배양했다. 균액 0.5ml를 50ml의 도입배지(0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 0.2% 카자미노산, 0.5% 글루코오스, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ g/ml 암피실린, pH 7.4)에 첨가하고, 30℃에서 진탕배양했다. OD<sub>600nm</sub>에서 값이 약 0.5로된 시점에서 최종농도가 0.1mg/ml로 되도록 L-트립토판을 첨가하고, 이어서 30℃에서 6시간 진탕배양했다. 균액을 3,000×g로 원심분리하여 균체를 모으고, 12.5ml의 PBS로 현탁했다. 현탁액을 초음파발생장치(Ultrasonics社)에 걸어 균체를 파쇄하고, 7,000×g로 30분간 원심분리하여 상청을 모아서 가용성 단백질분획분으로 했다. 이들 분획분 용액 10 $\mu$ l씩을 환원조건하에서 SDS-PAGE(10% 폴리아크릴아미드)에 제공했다. 이 결과, 도 23에 도시한 바와같이, GI724/pTrxhOBM의 가용성 단백질 분획분에는 GI724/pTrxFus의 가용성 단백질 분획분에는 볼 수 없는 분자량 약 40,000의 단백질 밴드가 검출되었다. 이상의 결과에서, 티오레독신과 사람 OBM의 융합단백질(Trx-hOBM)이 대장균중에서 발견되고 있음이 확인되었다.

#### (3) Trx-hOBM의 OCIF와의 결합능

발현시킨 Trx-hOBM이 OCIF와 결합하는 것을 아래의 실험으로 확인했다. 즉, 96웰 이뮤노플레이트(Nunc社)의 각 웰에 10mM 탄산수소나트륨 수용액으로 5000배로 희석한 항 티오레독신 항체(인히드로젠社)를 100 $\mu$ l씩 첨가하여 4℃로 하룻밤 방치했다. 각 웰중의 액을 버린 후, 블록에이스(雪印乳業社)를 PBS로 2배 희석한 용액(BA-PBS)을 각 웰에 200 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 1시간 방치했다. 액을 버린 후, 각 웰을 P-PBS로 3회 세정했다. 각 웰에 BA-PBS로 단계 희석한 상기 GI724/pTrxhOBM 유래 및 GI724/pTrxFus 유래 가용성 단백질 분획분 용액을 100 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 2시간 방치했다. P-PBS로 각 웰을 3회 세정한 후, BA-PBS로 희석한 OCIF(100ng/ml)를 각 웰에 100 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에 2시간 방치했다. P-PBS로 각 웰을 3회 세정한 후, BA-PBS로 2000배로 희석한 WO96/26217호 기재의 퍼옥시다아제 표지 항 OCIF항체를 각 웰에 100 $\mu$ l씩 첨가하고, 실온에서 2시간 방치했다. P-PBS로 각 웰을 6회 세정한 후, TMB용액을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 약 10분간 방치한 후, 정지액(Stopping Reagent)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가했다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더로 측정했다. 결과를 도 24에 나타낸다. GI724/pTrxFus유래 가용성 단백질 분획분 용액을 첨가한 것, 첨가하지 않은 것 간에 흡광도에는 차이는 볼 수 없었지만, GI724/pTrxhOBM유래 가용성 단백질 분획분 용액을 첨가한 것에서는 그 첨가농도가 증가함에 따라 흡광도가 상승했다. 또한, 첨가하는 가용성 단백질 분획분 용액의 희석비율을 일정(1% 농도)으로 하고, BA-PBS로 계단희석한 OCIF(0~100ng/ml)를 첨가한 경우의 실험결과를 도 25에 나타낸다. GI724/pTrxFus유래 가용성 단백질 분획분 용액을 이용한 것에서는 OCIF의 농도에 관계없이 흡광도는 낮은 값이었지만, GI724/pTrxhOBM유래 가용성 단백질 분획분 용액을 첨가한 것에서는 OCIF 농도가 증가함에 따라 흡광도가 증가했다. 이들 결과에서, GI724/pTrxhOBM으로 생산되는 Trx-hOBM에는, OCIF로 결합하는 능력이 있는 것이 확인되었다.

(4) Trx-hOBM을 생산하는 대장균의 대량배양

GI724/pTrxhOBM을 RMG-Amp 한천배지(0.6%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{NaCl}$ , 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2% 카자미노산, 1.5% 한천, pH 7.4)에 백금으로 도말하고, 30℃에서 하룻밤 배양했다. 균체를 10ml의 도입배지에 현탁하고, 5ml씩을 500ml의 도입배지에 넣은 2ℓ용 삼각플라스크 계2대에 첨가하고, 30℃에서 진탕배양했다.  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 에서의 흡광도가 약 0.5로 된 시점에서 최종농도가 0.1mg/ml로 되도록 L-트립토판을 첨가하고, 이어서 30℃에서 6시간 진탕배양했다. 균액을 3,000×g로 20분간 원심분리하여 균체를 모으고, 균체를 160ml의 PBS에 현탁했다. 현탁액을 초음파발생장치(Ultrasonics社)에 걸어 균체를 과쇄하고, 7,000×g으로 30분간 원심분리하여 상청을 모아 가용성 단백질 분획분으로 했다.

(5) OCIF고정화 어피니티컬럼의 조제

TSK 젤 AF-토레실토요팔 650(토우소우社) 2g과, WO96/26217호 공보에 기재한 방법으로 제조한 유전자조환형 OCIF 35.0mg을 함유하는 1.0M 인산칼륨완충액(pH 7.5) 40ml를 혼합하고, 4℃에서 하룻밤 완만히 진탕함에 의해 커플링반응을 행했다. 과잉한 활성기를 불활성화하기 위해 원심분리에 의해 상청을 제거한 후, 40ml의 0.1M 트리스-염산완충액(pH 7.5)을 침전한 담체에 가해 실온에서 1시간 조용하게 진탕했다. 0.01% 폴리솔베이트 80과 0.2M NaCl를 함유하는 0.1M 글리신-염산완충액(pH 3.3) 및 0.01% 폴리솔베이트 80과 0.2M NaCl를 함유하는 0.1M 구연산나트륨완충액(pH 2.0)을 통액하여 컬럼을 세정한 후, 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유하는 10mM 인산나트륨완충액(pH 7.4)로 2회 세정하여 컬럼을 평형화했다.

(6) OCIF고정화 어피니티컬럼에 의한 Trx-hOBM의 정제

Trx-hOBM의 정제는 특히 단정하지 않는한 4℃에서 행했다. 상기 OCIF고정화 어피니티 담체(10ml)와 상기 실시예 25-(4) 기재의 가용성 단백질 분획분용액(120ml)을 혼합 후, 50ml 원심관(4 본)중에서 로터(rotor)를 이용하여 4℃에서 하룻밤 조용하게 진탕했다. 이 혼합액중의 담체를 에코노컬럼(내경 1.5cm, 길이 15cm, 바이오랏드社)에 충전했다. 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유하는 PBS 300ml, 0.01% 폴리솔베이트 80 및 2.0M NaCl를 함유하는 10mM 인산완충액(pH 7.0) 100ml, 0.01% 폴리솔베이트 80 및 0.2M NaCl를 함유하는 0.1M 글리신-염산완충액(pH 3.3) 100ml를 순차통액하여 컬럼을 세정했다. 이어서, 0.01% 폴리솔베이트 80 및 0.2M NaCl를 함유하는 0.1M 구연산나트륨완충액(pH 2.0)을 통액하고, 컬럼에 흡착한 단백질을 용출했다. 용출액은 5ml씩 분취했다. 분취한 분획분에는 10% 용량의 2M 트리스용액(pH 8.0)을 가하여 즉시 중화했다. 용출액 각 분획분중의 Trx-hOBM의 유무를 실시예 25-(3) 기재한 방법에 의해 조사했다. 또한, Trx-hOBM을 함유하는 분획분을 모으고, 이어서 정제를 진행했다.

(7) 겔여과에 의한 Trx-hOBM의 정제

상기 실시예 25-(6) 기재의 Trx-hOBM 프렉션(fraction) 약 25ml를 센트리플러스 10 및 센트리콘 10(아미콘社)을 이용하여 약 0.5ml로 원심농축했다. 이 농축 샘플을 미리 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유하는 PBS에서 평형화한 수퍼로즈 12 HR 10/30컬럼(1.0×30cm, 팔마시아社)에 부하했다. 이동상으로서 0.01% 폴리솔베이트 80을 함유하는 PBS를 이용하고, 유속 0.25ml/min으로 컬럼을 전개했다. 컬럼에서의 용출액은 0.25ml씩 분취했다. 분취한 분획분의 Trx-hOBM은 실시예 25-(3) 기재의 방법 및 SDS-PAGE에 의해 검출했다. 순화된 Trx-hOBM을 함유하는 프렉션을 모으고, Trx-hOBM의 단백질 농도를 측정했다. 단백질 농도는 소 혈청 알부민을 표준품으로 하여 이용하고, DC-단백질 어셈블리 키트(바이오랏드社)로 측정했다.

[실시예 26]

hOBM의 파골세포형성 유도활성

phOBM 및 pcDL-SR α296을 리포펙트아민(기브코社)을 이용하여 COS-7세포에 각각 트랜스펙트했다. 각각의 세포를 10% FCS를 함유하는 DMEM으로 1일간 배양 후 트립신 처리하고, 커버글라스(15mm 환형, 마쯔나미社)를 격설한 24웰 플레이트에 1웰당  $5 \times 10^4$ 개의 세포를 파종하고, 게다가 2일간 배양했다. 배양 플레이트를 PBS로 1회 세정한 후, 1% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS를 가하여 실온에서 8분간 인큐베이트하여 세포를 커버글라스 위에 고정화했다. 세포를 고정화한 플레이트를 PBS로 6회 세정한 후,  $10^{-8}\text{M}$  활성화 비타민  $\text{D}_3$ ,  $10^{-7}\text{M}$  텍사메사존, 10% 소 태아혈청을 함유하는 α-MEM에서  $1 \times 10^6$ 개/ml로 되도록 현탁한 마우스 비장세포를 1웰당 700μl씩 첨가했다. 각 웰 위에 밀리셀 PCF(미리포아社)를 세트하고, 상기 배지에서  $4 \times 10^4$ 개/ml로 현탁한 ST2세포를 밀리셀 PCF중에 700μl씩 첨가하고, 37℃에서 6일간 배양했다. 배양종료 후, 밀리셀 PCF를 제거하고, 플레이트를 PBS로 1회 세정한 후, 아세톤-에탄올용액(50:50)으로 1분간 세포를 고정화한 후, 류코사이트 에시드 포스파타아제 키트(시그마社)를 이용하여 파골세포 특이적마커인 주석산대성 산성 포스파타아제 활성(TRAP 활성)을 나타내는 세포만을 염색했다. 현미경관찰의 결과, 사람 OBM cDNA를 함유하지 않는 벡터만의 pcDL-SR α296을 트랜스펙트한 COS-7세포를 고정화한 웰중에는 TRAP활성을 나타내는 세포는 전혀 검출되지 않았음에 대하여, phOBM을 트랜스펙트한 세포를 고정화한 웰중에는  $65 \pm 18$ 개( $n=3$ , 평균값±표준편차)의 TRAP양성 세포가 관찰되었다. 또한, 이들 TRAP양성세포는  $^{125}\text{I}$ 표지 연어칼시토닌(어머삼社)과 특이적결합을 나타낸 것으로부터 칼시토닌 리셉터를 발현하고 있는 것이 확인되었다. 이들 결과에서, 본 발명 cDNA에 의해 코드되는 단백질인 사람 OBM은 파골세포형성을 유도하는 활성이 있는 것이 밝혀졌다.

[실시예 27]

Trx-hOBM 및 분비형 사람 OBM에 의한 파골세포형성 유도활성



마우스 비장세포를  $10^{-8}$ M 활성형 비타민 D<sub>3</sub>,  $10^{-7}$ M 텍사메사존, 10% 소 태아혈청을 함유하는  $\alpha$ -MEM에  $2 \times 10^6$ 개/ml로 되도록 현탁하고, 24웰 플레이트에 1웰당  $350\mu\text{l}$  첨가했다. 정제한 Trx-hOBM을 상기 배지로 희석한 용액( $40\text{ng/ml}$ ), pCEP shOBM 또는 pCEP4를 형질도입한 293-EBNA세포를 IMDM-10% FBS로 배양한 배양상청을 상기 배지에서 10배 희석한 용액 또는 상기 배지만을 각각  $350\mu\text{l}$  첨가한 후, 밀리셀 PCF(미리포아社)를 각 웰에 세트하고, 상기 배지에서 현탁한  $4 \times 10^4$ 개/ml의 ST2세포를 밀리셀 PCF에  $600\mu\text{l}$  첨가했다. 6일간 배양한 후, 밀리셀 PCF를 제거하고, 플레이트를 PBS에서 1회 세정 후, 아세톤-에탄올 용액(50:50)으로 1분간 세포를 고정한 후, 류코사이트 에시드 포스파타아제 키트(시그마社)를 이용하여 주석산 내성산성 포스파타아제활성(TRAP 활성)을 나타내는 세포만을 염색했다. 현미경 관찰의 결과, Trx-hOBM을 첨가하지 않은 웰중에는 TRAP활성을 나타내는 세포는 전혀 검출되지 않았음에 대해, Trx-hOBM을 첨가한 웰에는  $115 \pm 19$ 개( $n=3$ , 평균값 $\pm$ 표준편차)의 TRAP양성세포가 관찰되었다. 동일하게, pCEP4로 형질도입된 293-EBNA의 배양상청을 첨가한 웰중에는 TRAP활성을 나타내는 세포는 전혀 검출되지 않았음에 대해, pCEP shOBM으로 형질도입된 293-EBNA의 배양상청을 첨가한 웰에는  $125 \pm 23$ 개( $n=3$ , 평균값 $\pm$ 표준편차)의 TRAP양성세포가 관찰되었다. 또한, 이들 TRAP양성세포는 <sup>125</sup>I표지한 연어칼시토닌(어머사社)과 특이적결합을 나타내는 것으로부터, 칼시토닌 리셉터를 발현하고 있는 것이 확인되었다. 이들 결과에서, Trx-hOBM 및 분비형 OBM에는 파골세포형성을 유도하는 활성이 있는 것이 밝혀지게 되었다.

[실시예 28]

#### 폴리크로날 항체의 제작

면역항원으로 이용하는 마우스 sOBM 또는 사람 sOBM은 상기 방법에 따라 얻었다. 즉 마우스 sOBM cDNA{마우스 OBM의 N말단에서 72번째 까지의 아미노산을 결손시킨 막결합부위를 갖지 않는 마우스 sOBM(서열번호 16)을 코딩하는 cDNA, 서열번호 18} 또는 사람 OBM cDNA{사람 OBM의 N말단에서 71번째까지의 아미노산을 결손시킨 막결합부위를 갖지 않는 사람 sOBM(서열번호 17)을 코딩하는 cDNA, 서열번호 19}를 이뮤노글로불린 k-체인인 시그널펩티드를 코딩하는 염기서열을 함유하는 발현벡터 pSec Tag A(인비트로젠社)의 HindIII/EcoR V 단편(5.2kb)과, OBM cDNA의 EcoRI/PmaCI 단편(0.32kb)과 함께 라이게이션 키트 ver. 2(寶酒造社)를 이용하여 라이게이션을 행하고, 그 반응생성물을 이용하여 대장균 DH5  $\alpha$ 를 형질전환했다. 얻은 암피실린 내성주에서 알카리SDS법에 의해 플라스미드를 정제하고, 제한효소로 절단함에 의해 pSec Tag A에 0.6kb와 0.32kb의 단편이 삽입된 프라스미드를 뽑아내었다. 이 프라스미드를 다이 터미네이터 사이클시퀀싱 FS 키트(파킹엘머社)를 이용하여 시퀀스를 확인한 결과, 이 프라스미드가 마우스 또는 사람 sOBM을 코딩하는 서열을 갖고 있는 것을 확인하였다. 이 프라스미드를 제한효소 NheI, XhoI로 절단한 후, 분비형 OBM cDNA에 상응하는 단편(1.0kb)을 아가로스겔 전기영동으로 회수했다. 이 단편을 라이게이션 키트를 이용하여 발현벡터 pCEP4(인비트로젠社)의 NheI/XhoI 단편(10.4kb)에 삽입하고, 그 반응생성물을 이용하여 대장균 DH5 $\alpha$ 를 형질전환했다. 얻은 암피실린 내성주에서 알카리SDS법에 의해 프라스미드를 정제하고, 제한효소로 절단하여 해석함에 의해 목적하는 구조를 갖는 분비형 OBM 발현 프라스미드(pCEP sOBM)를 갖는 대장균주를 뽑아냈다. pCEP sOBM을 갖는 대장균주를 배양하고, 키아필터 프라스미드 미디키트(키아젠社)를 이용하여 pCEP sOBM을 정제했다. 다음에, 293-EBNA세포를 10% FCS를 함유하는 IMDM (IMDM-10% FCS)에 현탁하고, 콜라겐 코팅한 24웰 플레이트(住友베이크라이트社)에  $2 \times 10^5$ 개/2ml/웰로 되도록 파종하고, 하룻밤 배양했다. 이 세포에  $1\mu\text{g}$ 의 pCEP sOBM 또는 pCEP4를 리포펙트아민(기브코社)  $4\mu\text{l}$ 를 이용하여 형질도입하고,  $0.5\text{ml}$ 의 무혈청 IMDM 또는 IMDM-10% FCS중에서 다시 2일간 배양하고, 그 배양상청을 회수했다. 유전자조환 마우스 가용성 OBM(msOBM) 혹은 사람 가용성 OBM(hsOBM)의 고생산세포주를 아래와 같이 스크리닝했다. msOBM 혹은 hsOBM을 포함하는 것으로 보여지는 배양상청에 최종농도가  $0.1\text{M}$ 로 되도록 탄산수소나트륨을 첨가 후, 각각의 배양상청을  $100\mu\text{l}$ 씩 96웰 이뮤노플레이트(Nunc社)의 각 웰에 첨가하고,  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 방치하여 배양상청중의 msOBM 혹은 hsOBM을 각 웰에 고상화했다. 이 플레이트의 각 웰에 PBS로 4배 희석한 블록에이스(雪印乳業社)용액(B-PBS)을  $200\mu\text{l}$  가해 실온에서 2시간 방치했다.  $0.1\%$  폴리솔베이트 20을 함유하는 PBS(P-PBS)로 3회 세정 후, B-PBS에서 단계적으로 희석한 유전자조환형 OCIF(rOCIF)용액( $3 \sim 100\text{ng/ml}$ )을  $100\mu\text{l}$ 씩 각 웰에 첨가하고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 2시간 방치했다. 그 플레이트를 PBS에서 3회 세정한 후, B-PBS에서 희석한 퍼옥시다아제 표지 항 OCIF 폴리크로날 항체(WO96/26217호)를  $100\mu\text{l}$ 씩 각 웰에 첨가하고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 2시간 방치했다. P-PBS로 각 웰을 6회 세정한 후, TMB 용액(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社)을  $100\mu\text{l}$ 씩 각 웰에 가해 실온에서 약 10분간 방치한 후, 정지액(Stoppong Reagent, Scytek社)을  $100\mu\text{l}$ 씩 각 웰에 가했다. 각 웰의  $450\text{nm}$ 에서 흡광도를 마이크로플레이트리더로 측정했다. msOBM 혹은 hsOBM의 생산세포주의 배양상청을 고상화한 플레이트에서는 OCIF의 첨가농도에 비례하여 흡광도가 현저히 증가했다. msOBM 혹은 hsOBM의 생산세포주에 대해서 그 흡광도의 증가 비율이 높은 생산주들 각각 고 생산주로 하여 선택했다. 이렇게 선택된 msOBM 또는 hsOBM 고생산주 293-EBNA세포를 각각 5% FCS를 함유하는 IMDM을 배지로서 이용하고, T-플라스크(T-225)를 25매 사용하여 대량 배양했다. 컨플루언트에 달한 후, 신선한 배지를 T-225 플라스크 1매당  $100\text{ml}$ 씩 가해 3~4일간 배양하여 배양상청을 회수했다. 이 조작을 4회 반복하여 msOBM 혹은 hsOBM을 함유하는 배양상청을 각각 10 $\mu\text{l}$  얻었다. 실시예 25-(6) 및 (7) 기재의 방법에 따라 rOCIF고정화 컬럼을 이용한 어피니티 크로마토그래피 및 겔여과 크로마토그래피에 의해 정제함에 의해 이들 배양상청에서 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동적으로 균일한(분자량 32kDa) 정제 msOBM 및 hsOBM을 각각 약 10mg 및 12mg 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 정제 표품을 각각 면역항원으로 이용했다. 얻은 각 항원을 인산염산완충 생리식염수(PBS)에  $200\mu\text{g/ml}$ 로 되도록 용해하고, 같은 용량의 프로인드 완전 아주벤트와 혼합하여 유화 후, 일본 백색토끼 각 3마리에 약 1주간 간격으로  $1\text{ml}$ 를 피하투여하여 면역했다. 항체가를 측정하고, 항체가가 최고에 도달한 시점에서 부스터 투여하고, 투여 10일 후에 모두 채혈했다. 항혈청을 단백질 A 세파로즈 크로마토그래피용 바인딩버퍼(BioRad社)로 2배 희석하고, 같은 버퍼로 평형화한 단백질 A 컬럼에 부하했다. 같은 버퍼로 컬럼을 충분히 세정 후, 컬럼에 흡착한 항 sOBM항체를 에루선버퍼(BioRad社) 혹은  $0.1\text{M}$  글리신-HCl 버퍼, pH 2.9~3.0으로 용출했다. 항체용출액을 즉시 중화할 목적으로  $1.0\text{M}$  트리스-HCl, pH 8.0을 소량함유하는 시험관을 이용하여 용출용액을 분획했다. 항체용출액을 PBS에 대하여  $4^\circ\text{C}$  하룻밤 투석했다. 항체용액의 단백질을 소 IgG를 기준으로 하여 로울리(Lowry)법에 의해 측정했다. 이렇게 하여 본 발명의 폴리크로날 항체를 함유하는 정제 이뮤노 글로브린(IgG)이 토끼 항혈청  $1\text{ml}$ 당 약 10mg 얻어졌다.

[실시예 29]

#### 폴리크로날 항체를 이용한 ELISA에 의한 OBM 및 sOBM의 측정

실시에 28에서 얻은 토기향 사람 sOBM 폴리크로날 항체를 고상항체 및 효소표지항체로 한 샌드위치 ELISA를 구축했다. 효소표지는 이시카와 등의 방법(Ishikawa et al. : J. Immunoassay, Vol. 4, 209~327, 1983)에 따라 퍼옥시다아제(POD) 표지했다. 실시예 28에서 얻은 항 사람 sOBM 폴리크로날 항체를 2 $\mu$ g/ml로 되도록 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 용액에 용해하고, 96웰 이뮤노플레이트(Nunc社)의 각 웰에 100 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 하룻밤 방치했다. 이어서, 각 웰에 200 $\mu$ l씩 50% 블록에이스(雪印乳業社)를 가해 실온에서 1시간 방치하고, 각 웰을 0.1% 폴리솔베이트 20을 함유하는 PBS(세정버퍼)로 3회 세정했다. 실시예 26의 방법과 동일하게 사람 OBM을 발현하여 실시예 2의 방법으로 정제함에 의해 얻은 정제 사람 OBM 및 실시예 28에서 얻은 정제 사람 sOBM을 각각 1차 반응용버퍼(40% 블록에이스, 0.1% 폴리솔베이트 20을 함유하는 0.2M 트리스-HCl버퍼, pH 7.2)로 단계 희석한 용액을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가했다. 실온에서 2시간 방치 후 각 웰을 상기 세정 버퍼로 3회 세정했다. 실시예 26의 방법과 동일하게 사람 OBM을 발현하여 실시예 2의 방법으로 정제함에 의해 얻은 정제 사람 OBM 및 실시예 28에서 얻은 정제 사람 sOBM을 각각 1차 반응용버퍼(40% 블록에이스, 0.1% 폴리솔베이트 20을 함유하는 0.2M 트리스-HCl버퍼, pH 7.2)로 단계 희석한 용액을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가했다. 실온에서 2시간 방치 후 각 웰을 상기 세정 버퍼로 3회 세정했다. 2차 반응용버퍼(25% 블록에이스, 0.1% 폴리솔베이트 20을 함유하는 0.1M 트리스-HCl버퍼, pH 7.2)로 1000배 희석한 POD 표지 항 사람 sOBM 폴리크로날 항체를 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2시간 방치한 후 각 웰을 3회 세정버퍼로 세정했다. 각 웰에 효소기질용액(TMB, ScyTek社)을 100 $\mu$ l씩 첨가하고, 실온에서 10분간 방치한 후 반응정지액(Stopping reagent, ScyTek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가하여 효소반응을 정지시켰다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더를 이용하여 측정했다. 결과를 도 26에 나타낸다. 토기향 사람 sOBM 폴리크로날 항체를 이용한 샌드위치 ELISA는 사람 sOBM(분자량 약 32kDa) 및 사람 OBM(분자량 약 40kDa)을 거의 동등하게 인식하고, 각각의 측정감도는 약 12.5 $\times 10^{-3}$  pmol/ml(사람 OBM으로 약 500pg/ml, 사람 sOBM으로 약 400pg/ml)이었다. 실시예 28에서 얻은 토기향 마우스 sOBM 폴리크로날 항체를 이용한 ELISA에 의해 마우스 sOBM 및 마우스 OBM의 측정은 상기과 같이 실시할 수 있고, 각각의 측정감도도 같은 정도로 극히 미량의 마우스 sOBM 혹은 마우스 OBM을 측정할 수 있는 것이 밝혀지게 되었다.

이상과 같이, 실시예 28에서 얻은 본 발명 항 사람 sOBM 폴리크로날 항체는 사람 sOBM 및 사람 OBM의 양항원을 동등하게 인식하기 때문에, 항 사람 OBM/ sOBM 폴리크로날 항체라 명명했다. 또한, 실시예 28에서 얻은 항 마우스 sOBM 폴리크로날 항체는 동일하게 마우스 sOBM 및 마우스 OBM의 양항원을 동등하게 인식하기 때문에, 항 마우스 OBM/sOBM 폴리크로날 항체라 명명했다.

#### [실시예 30]

##### 모노크로날 항체의 제작

면역용 항원에는 실시예 28에서 얻은 정제 사람 sOBM을 이용했다. 정제 사람 sOBM을 10 $\mu$ g/ml로 되도록 생리식염수에 용해했다. 이렇게 하여 조제한 사람 sOBM용액에 같은 용량의 프로인드용 완전 아주벤트를 가해 잘 유향한 후, 각각의 항원을 Balb/c 마우스 1마리당 복강내에 200 $\mu$ l씩 1주간 간격으로 3회 투여하고, 마우스를 면역했다. 다음에, 사람 OBM을 5 $\mu$ g/ml 함유하는 생리식염수에 같은 용량의 프로인드 불완전아주벤트를 첨가하고, 충분히 유향한 것을 상기 Balb/c 마우스 1마리당 200 $\mu$ l씩 1주간 간격으로 4회 추가 면역했다. 4회째 추가면역의 1주간 후 브스터로서 사람 sOBM을 10 $\mu$ g/ml 함유하는 생리식염수를 Balb/c 마우스 1마리당 100 $\mu$ l씩 정맥내로 투여했다. 최종면역후 3일째에 비장을 적출하여 비장세포를 분리하고, 마우스 미에로머세포 p3x63-AG8.653와를 공지 방법(Koeheler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495(1975))에 따라 세포융합했다. 융합종료후 세포현탁액을 하이포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)을 포함하는 HAT 배지중에서 10일간 배양했다. 미에로머세포가 사멸하고, 하이브리도마가 출현한 후 HAT 배지에서 아미노프테린을 제거한 HT배지에 배지교환하고, 배양을 계속했다.

#### [실시예 31]

##### 하이브리도마의 선택 및 크로닝

실시예 30의 세포융합 및 배양을 개시하여 10일 후에 하이브리도마의 출현을 인식했으므로, 아래에 기재한 개량 솔리드 페이즈(solid phase) ELISA에 의해 사람 sOBM을 인식하는 고친화성 항체 및 그 항체를 생산하는 하이브리도마의 선택을 행했다. 또한, 사람 sOBM과 마우스 sOBM 양쪽을 인식하는 항 OBM 모노크로날 항체를 선택하기 위해, 솔리드페이즈 ELISA용 항체로서, 사람 sOBM 이외에 실시예 27에서 얻은 마우스 sOBM도 사용했다. 사람 sOBM 및 마우스 sOBM을 각각 5 $\mu$ g/ml로 되도록 0.1M 탄산수소나트륨용액에 용해하고, 각각의 항원용액을 50 $\mu$ l씩 96웰 이뮤노플레이트(Nunc社)의 각 웰에 가해 4℃에서 하룻밤 방치하여 각각의 항원을 고상화했다. 각 웰중의 항원용액을 버리고 각 웰에 50% 블록에이스(雪印乳業社)를 200 $\mu$ l씩 가해 실온에서 1시간 방치하여 블록킹했다. 각 웰을 0.1% 폴리솔베이트 20을 함유하는 인산염완충 생리식염수(PBS-P)로 세정하고, 각 웰에 40 $\mu$ l의 소 혈청(하이크론社)을 가했다. 다음에, 각 웰에 10 $\mu$ l의 하이브리도마 배양상청을 가해 80% 혈청농도하 실온에서 2시간 반응시켰다. 80% 혈청중제하에서의 솔리드페이즈 ELISA의 목적은 고농도의 단백질 및 혈청유래의 면역반응 방해물질 등의 존재중에서도 미량의 사람 sOBM 마우스 sOBM과 결합할 수 있는 항체, 즉 사람 sOBM 혹은 마우스 sOBM에 대하여 고친화성의 항체생산 하이브리도마를 선택하기 위한 것이다. 실온에서 2시간 반응 후, 플레이트를 PBS-P로 세정하고, 25% 블록에이스를 함유하는 생리식염수로 1/5000로 희석한 퍼옥시다아제 표지 항 마우스 IgG(KPL社)를 각 웰에 50 $\mu$ l 가해 실온에서 2시간 반응시켰다. 플레이트를 PBS-P로 3회 세정한 후, 각 웰에 50 $\mu$ l의 효소기질용액(TMB, ScyTek社)을 가해 실온에서 5분간 반응시켰다. 다음에, 반응정지액(stopping reagent, ScyTek社) 50 $\mu$ l를 가하여 효소반응을 정지시켰다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더(이뮤노리더 NJ2000, 일본인터멧社)를 이용하여 측정하고, 사람 sOBM 혹은 마우스 sOBM을 인식하는 항체생산 하이브리도마를 선택했다. 특히 높은 흡광도(OD<sub>450nm</sub>)를 나타내는 각각의 항체생산 하이브리도마를 선택하고, 이들을 한계희석법에 의해 3~5회 크로닝을 반복함에 의해, 안정한 항체생산 하이브리도마를 수립했다. 얻은 항체생산주 중에서 보다 항체의 생산성이 높은 하이브리도마주를 선별했다.

#### [실시예 32]

##### 모노크로날 항체의 생산 및 정제

실시에 31에서 얻은 항체, 즉 고친화성으로 사람 sOBM을 인식하는 항체생산 하이브리도마 및 마우스 sOBM에도 교차성을 가지는 항체를 생산하는 하이브리도마를 각각 배양하고, 마우스 1마리당 각각의 하이브리도마를  $1 \times 10^6$ 세포씩, 약 1주 간 전에 프리스탄(알드릿치케미칼社)을 투여해둔 Balb/c계 마우스의 복강내에 이식했다. 약 2~3주간 후, 축적한 복수를 채취하고, 본 발명의 사람 sOBM 혹은 사람 sOBM 및 마우스 sOBM을 인식하는 모노클로날 항체를 함유하는 복수를 얻었다. 실시예 28에 기재한 단백질 A 컬럼에 의해 항 OBM/sOBM 폴리클로날 항체의 정제법에 준거하여, 단백질 A 컬럼(팔마시社) 크로마토그래피에 의해 복수에서 정제 모노클로날 항체를 얻었다.

[실시예 33]

#### 모노클로날 항체의 항원특이성

사람 sOBM을 특이적으로 인식하는 모노클로날 항체 또한 사람 sOBM 및 마우스 sOBM에도 교차성을 가지는 모노클로날 항체에 대하여, 사람 sOBM, 막결합부위를 가지는 온전한 사람 OBM, 마우스 sOBM 및 막결합부위를 가지는 온전한 마우스 OBM을 항원으로 한 때의 항원특이성에 대하여 조사했다. 30가지 종류의 모노클로날 항체를 얻었지만, 이들중 대표적 모노클로날 항체에 대해서 결과를 표 1에 나타낸다. 이 결과, 사람 sOBM을 특이적으로 인식하는 항 사람 sOBM 모노클로날 항체의 거의 모두는 막결합부위를 가지는 온전한 사람 OBM도 인식하지만, 마우스 sOBM 및 막결합부위를 가지는 온전한 마우스 OBM은 인식하지 않음이 밝혀졌다.

한편, 사람 sOBM 및 마우스 sOBM도 인식하는 모노클로날 항체도 얻어졌지만, 그 수는 극히 적고, 이들 항체는 사람 OBM 또한 마우스 OBM에도 교차성을 가지고 있는 것이 이해되었다. 이들 결과는 사람 OBM과 마우스 OBM에는 공통한 항원인식부위, 즉 에피토프가 존재하고 있는 것을 나타내는 것이다. 사람 sOBM을 면역항원으로 제작한 항 사람 sOBM 모노클로날 항체는 막결합부위의 온전한 단백질인 사람 OBM도 동등하게 인식하기 때문에 항 사람 sOBM 모노클로날 항체를 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체로 명명했다.

<표 1>

항체명	항원			
	hsOBM	hOBM	msOBM	mOBM
H-OBM 1	+	+	-	-
H-OBM 2	+	+	-	-
H-OBM 3	+	+	-	-
H-OBM 4	+	+	-	-
H-OBM 5	+	+	-	-
H-OBM 6	+	+	-	-
H-OBM 7	+	+	-	-
H-OBM 8	+	+	-	-
H-OBM 9	+	+	+	+
H-OBM 10	+	+	-	-
H-OBM 11	+	+	-	-
H-OBM 12	+	+	-	-
H-OBM 13	+	+	+	+
H-OBM 14	+	+	-	-

(hsOBM : 사람 가용성OBM, hOBM : 사람 막결합형OBM,

msOBM : 마우스 가용성OBM, mOBM : 마우스 막결합형 OBM)

[실시예 34]

#### 모노클로날 항체의 클래스 및 서브클래스의 검정

본 발명의 모노클로날 항체의 클래스(Class) 및 서브클래스(Sub-class)를 이뮤노글로브린 클래스 및 서브클래스 분석키트(어머샴社)를 이용하여 검정했다. 검정한 키트에 지시되어 있는 프로토콜에 따라 실시했다. 대표적인 모노클로날 항체에 대하여 결과를 표 2에 나타낸다. 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체의 대다수는 IgG<sub>1</sub> 이고, 기타 IgG<sub>2a</sub> 및 IgG<sub>2b</sub>도 존재하고 있었다. 또한, 어느 항체도 라이트 체인은 κ쇄 이었다.

<표 2>

항체명	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2b</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgA	κ
H-OBM 8	-	+	-	-	-	+

H-OBM 9	+	-	-	-	-	+
H-OBM 10	+	-	-	-	-	+
H-OBM 11	+	-	-	-	-	+
H-OBM 12	-	-	+	-	-	+
H-OBM 13	+	-	-	-	-	+
H-OBM 14	+	-	-	-	-	+

[실시예 35]

#### 모노크로날 항체의 해리정수( $K_D$ 값)의 측정

공지의 방법(Betrand Friguet et al. : Journal of Immunological Methods, 77, 305~319, 1986)에 따라 모노크로날 항체의 해리정수를 측정했다. 즉, 실시예 32에서 얻은 정제항체를 5ng/ml에 40% 블록에이스, 0.1% 폴리솔베이트 20을 함유하는 0.4M 트리스-HCl pH 7.4(1차 버퍼)로 희석하고, 이에 실시예 28에서 얻은 정제 사람 가용성 OBM(hsOBM)을 6.25ng/ml ~ 10 $\mu$ g/ml로 되도록 1차 버퍼로 희석한 것을 등용량 섞어서, 4℃에서 15시간 정치함에 의해 hsOBM과 모노크로날 항체를 결합시켰다. 15시간 후, hsOBM과 미결합한 항체를 hsOBM(10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ l/웰)을 고상화한 솔리드페이즈 ELISA에서 측정함에 의해 모노크로날 항체의 hsOBM에 대한 해리정수를 산정했다. 또한, hsOBM에 대한 모노크로날 항체이면서, 마우스 가용성 OBM(msOBM)에도 교차하는 항체의 msOBM에 대한 친화성에 대해서도, 상기 hsOBM 대신에 msOBM을 사용함에 의해 동일하게 측정했다. 특히, 각 항원에 높은 친화성을 나타내고, 효소면역측정법과 기타 바인딩 어레이 등에 유용한 항체에 대해서 결과를 표 3에 나타낸다.

<표 3>

항체명	서브크래스	항원	해리정수 $K_D$ (M)
H-OBM 1	IgG <sub>1</sub> ( $\kappa$ )	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < K_D < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 4	IgG <sub>1</sub> ( $\kappa$ )	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < K_D < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 9	IgG <sub>1</sub> ( $\kappa$ )	hsOBM	$1 \times 10^{-9} < K_D < 1 \times 10^{-8}$
H-OBM 9	IgG <sub>1</sub> ( $\kappa$ )	msOBM	$1 \times 10^{-8} < K_D < 1 \times 10^{-7}$

이 결과, 사람 가용성 OBM(hsOBM)에 특이적인 항체인 H-OBM 1 및 H-OBM 4는 해리정수( $K_D$ )가  $10^{-11}$ M 오더(order)이고, hsOBM에 극히 높은 친화성을 가지고 있는 것이 밝혀지게 되었다. 한편, hsOBM 및 마우스 가용성 OBM(msOBM) 양쪽을 인지하는 항체, H-OBM 9의  $K_D$ 값은 msOBM에 대해서는  $10^{-8}$ M 오더이고, hsOBM에 대해서는  $10^{-9}$ M 오더이었다. 또한, 표 1에 기재한 양항원을 인식하는 다른 항체, H-OBM 13의 양항원에 대한 해리정수는 H-OBM 9와 차이는 없고, 양항체는 서브크래스도 일치하고 있으므로 같은 에피토프를 인식하는 동일항체일 가능성이 시준되었다.

[실시예 36]

#### 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체를 이용한 샌드위치 ELISA에 의한 사람 OBM 및 sOBM의 측정방법

실시예 35에서 얻은 2종류의 고친화성 모노크로날 항체, H-OBM 1 및 H-OBM 4를 각각 고상항체와 효소표지항체로 하여, 샌드위치 ELISA를 구축했다. 항체의 표지는 말레이미드 활성화 퍼옥시다아제 키트(피아스社)를 이용하여 행했다. H-OBM 1항체를 10 $\mu$ g/ml로 되도록 0.1M 탄산수소나트륨용액에 용해하고, 100 $\mu$ l씩 96웰 이뮤노플레이트(Nunc社)의 각 웰에 가해 4℃에서 하룻밤 방치하여 고상화했다. 각 웰의 용액을 버려 50%농도의 블록에이스 300 $\mu$ l를 가해 실온에서 2시간 정치하여 블럭킹했다. 블럭킹 후, 플레이트를 0.1% 폴리솔베이트 20을 함유하는 인산염완충 생리식염수(PBS-P)로 세정했다. 사람 가용성 sOBM 및 사람 OBM을 각각 40% 블록에이스(雪印乳業社) 및 0.1% 폴리솔베이트 20(和光純藥社)을 함유하는 0.4M 트리스-HCl(pH 7.4)(1차 반응 버퍼)에 용해, 희석하고, 여러 가지 농도의 피험용액을 조제했다. 여러 가지 농도로 조제한 각각의 피험용액을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가해 실온에서 2시간 반응시켰다. 2시간 후, 플레이트를 PBS-P로 세정하고, 25% 블록에이스 및 0.1% 폴리솔베이트 20을 함유하는 0.2M 트리스-HCl(pH 7.4)(2차 반응 버퍼)로 희석한 POD표지 H-OBM 4항체를 각 웰에 100 $\mu$ l씩 가해 실온에서 2시간 반응시켰다. 플레이트를 PBS-P로 세정한 후, 각 웰에 100 $\mu$ l의 효소기질용액(TMB, ScyTeK社)을 가하여 발색시킨 후, 반응정지액(stopping reagent, ScyTek社)을 100 $\mu$ l씩 각 웰에 가하여 효소반응을 정지했다. 각 웰의 450nm에서 흡광도를 마이크로플레이트리더를 이용하여 측정했다. 결과로도 27에 나타낸다.

이 결과, 실시예 35에서 얻은 2종류의 고친화성 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체, H-OBM 1 및 H-OBM 4를 이용하여 구축한 샌드위치 ELISA는 사람 OBM 및 사람 sOBM을 동등하게 인식하고, 그 측정감도는 약  $1.25 \sim 2.5 \times 10^{-3}$  pmol/ml(분자량 약 40kDa의 사람 OBM에서는 약 50~100pg/ml, 분자량 약 32kDa의 사람 sOBM에서는 약 40~80pg/ml)로 극히 미량의 사람 OBM 및 사람 sOBM을 측정할 수 있음이 밝혀지게 되었다. 통상, 이들 2종류의 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체, H-OBM 1 및 H-OBM 4를 생산하는 하이브리도마를 H-OBM 1 및 H-OBM 4로 명명하고, 또 마우스 OBM 및 마우스 sOBM도 인식하고, 파골세포형성 억제활성을 발휘하는 항 사람 OBM/sOBM 모노크로날 항체, H-OBM 9를 생산하는 하이브리도마를 H-OBM 9로 명명했다. 이들 하이브리도마는 일본 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소에 수탁번호 FERM BP-6264(H-OBM1), FERM BP-6265(H-OBM4), 및 FERM BP-6266(H-OBM9)로서 평성 9년 11월 5일에 각각 기탁되어 있다.

[실시예 37]

마우스 OBM 및 마우스 sOBM을 인식하는 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체를 이용한 마우스 OBM 및 마우스 sOBM의 측정

실시예 33 및 35에서 얻은 마우스 OBM 및 마우스 sOBM도 인식하는 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체, H-OBM9를 고상항체로 하고, 실시예 28에서 얻은 항 마우스 OBM/sOBM 폴리클로날 항체를 효소표지항체로 하는 샌드위치 ELISA를 구축했다. 마우스 OBM 및 마우스 sOBM을 각각 실시예 35와 동일하게 1차 반응용 버퍼로 단계적으로 희석하고, 실시예 36과 동일한 방법에 의해 마우스 OBM 및 마우스 sOBM을 측정했다. 결과를 도 28에 나타낸다. 이 결과, 본 발명의 마우스 OBM 및 마우스 sOBM도 인식하는 본 발명의 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체, H-OBM 9를 사용함에 의해 마우스 OBM 및 마우스 sOBM을 동일하게 측정할 수 있음이 확인되었다. 실시예 35의 결과로 나타난 바와같이 이 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체, H-OBM9는 마우스 sOBM에 대한 해리정수가 높고, 즉 마우스 sOBM에 대한 친화성이 비교적 낮기 때문에, 본 ELISA에 의한 마우스 OBM(분자량 약 40kDa) 및 마우스 sOBM(분자량 약 32kDa)의 측정감도는 약  $25 \times 10^{-3}$  pmol/ml(마우스 OBM에서는 약 1ng/ml, 마우스 sOBM에서는 약 0.8ng/ml) 정도이었다.

[실시예 38]

항 OBM/sOBM항체에 의한 파골세포형성 억제활성 시험

마우스 비장세포와 ST2세포(마우스 골수유래 간질세포)와의 공배양(co-culture)으로 파골세포 유사세포(osteoclast-like cell; OCL)가 유도됨이 알려져 있다{Endocrinology, 125, 1805~1813(1989)}. 그래서, OBM/sOBM항체를 공배양에 첨가한 때, OCL유도를 억제하는가 아닌가를 검토했다. 이 공배양계에서는 마우스 OBM이 발현하고 있으므로, 실시예에 사용하는 항체는 마우스 OBM을 인식하는 토끼 항 마우스 OBM/sOBM 폴리클로날 항체, 및 사람 OBM 및 마우스 OBM의 양항원을 인식하는 사람 항 OBM/sOBM 모노클로날 항체, H-OBM 9를 이용했다. 10% FCS를 함유하는  $\alpha$ MEM에서 단계 희석한 각각의 OBM 항체를 24웰 플레이트(Nunc社)에 700 $\mu$ l/웰, 상기 배지에서 현탁한 수컷 마우스 비장세포( $2 \times 10^6$ /ml)를 350 $\mu$ l/웰 첨가했다. 이어서 트립시나이즈한 ST2세포를  $4 \times 10^{-8}$ M 비타민 D<sub>3</sub> 및  $4 \times 10^{-7}$ M 텍사메사존을 함유하는 상기 배지에 현탁하여( $8 \times 10^4$ 셀/ml) 350 $\mu$ l/웰 첨가하고, 37℃에서 6일간 배양했다. 배양 플레이트를 PBS에서 1회 세정하던 중 50% 에탄올, 50% 아세톤의 혼합액에서 실온에서 1분간 고정했다. 플레이트를 바람으로 말린 후, 류코사이트 에시드 포스파타아제 키트(시그마社)의 프로토콜에 따라 기질액을 500 $\mu$ l/웰 첨가하고, 37℃에서 55분간 반응시켰다. 이 반응에 의해 파골세포 특이적마커인 주석산 내성산성 포스파타아제 활성(TRAP 활성)을 나타내는 세포만이 염색된다. 플레이트를 증류수에서 1회 세정한 후, 바람으로 말려서 TRAP양성세포수를 세었다. 결과를 표 4에 나타낸다. 이 결과, 토끼 항 마우스 OBM/sOBM 폴리클로날 항체 및 마우스 OBM을 인식하는 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체, H-OBM 9와도 항체농도에 의존하여 OCL유도를 저해하는 것을 알게되었다. 이들 항체는 파골세포형성인자, OCIF/OPG와 동일하게 파골세포형성 억제활성을 가지고 골대사이상증 치료약으로서 유망함이 밝혀지게 되었다.

<표 4>

항체첨가량 (ng/ml)	TRAP양성다핵세포수	
	토끼 항 마우스 OBM/sOBM 폴리클로날 항체	마우스 항 사람 OBM/sOBM 모노클로날 항체 (H-OBM 9)
0	1155 $\pm$ 53	1050 $\pm$ 45
10	510 $\pm$ 24	650 $\pm$ 25
100	10 $\pm$ 3	15 $\pm$ 4

(평균 $\pm$ 표준편차, n=3)

[실시예 39]

Trx-OBM의 사람 파골세포형성 유도활성

성인 건강한보통사람으로 부터 정맥 채혈한 모든 피에서 히스토패큐(Histopaque; 시그마社)를 이용하여 침부 프로토콜에 따라 덴시티그라디언트(density gradient)법에 의해 단핵세포를 조제했다. 단핵세포를  $10^{-7}$ M 텍사메사존, 200ng/ml 마크로파지콜로니 자극인자(미도리十字社), 10% 소 태아혈청 및 실시예 15에서 얻은 정제된 Trx-OBM(0~100ng/ml)을 함유하는  $\alpha$ -MEM에  $1.3 \times 10^6$ /ml가 되도록 현탁하고, 이 현탁액을 48웰 플레이트에 1웰당 300 $\mu$ l 첨가하여 3일간 37℃로 배양했다. 배양액을 상기 배지에서 교환 후, 다시 4일간 37℃로 배양했다. 배양한 세포를 실시예 5에 나타난 방법으로 주석산 내성산성 포스파타아제 활성(TRAP 활성)을 나타내는 세포를 선택적으로 염색하고, 염색된 다핵세포의 수를 현미경 관찰에 의해 측정했다. 결과를 도 29에 나타낸다. 이 결과, Trx-OBM을 첨가하지 않았던 웰중에는 TRAP활성을 나타내는 세포는 전혀 검출되지 않았음에 대하여, Trx-OBM을 첨가하면 농도 의존적으로 TRAP양성다핵세포가 출현했다. 또한, 이들 TRAP양성다핵세포는 파골세포의 마커인 히드로복틴리셉터도 양성이었다. 게다가, 동일한 배양을 48웰 플레이트에 정지한 상아질 절편 위에서 행하면, Trx-OBM존재하에서만 상아질 절편 위에 흡수 와(窩)가 형성되었다. 이에 의해, Trx-OBM에는 사람 파골세포형성을 유도하는 활성이 있음도 밝혀졌다.

[실시예 40]

항 OBM/sOBM항체에 의해 골흡수억제활성

임신 15일째의 ddy 마우스(일본SLC社)에 [ $^{45}\text{Ca}$ ]- $\text{CaCl}_2$ 용액(어머삼社)을 1마리당  $25\mu\text{Ci}$ 피하주사하고, 태자(胎仔)의 골을  $^{45}\text{Ca}$ 로 라벨했다. 다음날 마우스를 도살해 계복하여 자궁에서 태자를 취출했다. 태자에서 전지(前肢)를 적출하여 피부 및 근육을 깎아내어 장관골(長管骨)을 적출하고, 게다가 연골을 제거하여 장관골의 골간부만으로 했다. 골간부는 24구멍 플레이트에 0.5ml의 배양액(0.2% 소 혈청알부민; 시그마社)을 함유하는 BGJb 미디움(medium; 기브코 BRL社)에 1개씩 띄우고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  존재하에서 24시간 배양했다. 전(前)배양종료 후, 각종 골흡수인자(비타민  $\text{D}_3$ , 프로스타글란딘  $\text{E}_2$ , 부갑상선호르몬, 인터로이킨 1 $\alpha$ ) 및 정상 토끼 IgG( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 대조로 하여) 또는 실시예 28에서 얻은 토끼 항 OBM/sOBM 폴리클로날 항체를 함유하는 새로운 배양액(0.5ml)에 장관골을 옮기고, 다시 72시간 배양했다. 배양종료 후, 장관골은 0.5ml의 5% 트리크로로초산 수용액(和光純藥社)에 넣어, 실온에서 3시간 이상처리 하여 재를 제거(脫灰)했다. 배양액 및 트리크로로초산 추출액(공히 0.5ml)에 신티레이터(AQUASOL-2, PACKARD社) 5ml를 가해  $^{45}\text{Ca}$ 의 방사활성을 측정하고, 골흡수에 의해 배양액중에 유리한  $^{45}\text{Ca}$ 의 비율을 산출했다. 결과를 도 30~33에 각각 나타낸다. 이 결과, 비타민  $\text{D}_3$ ( $10^{-8}\text{M}$ )는 골흡수활성을 상승시켰지만 토끼 항 OBM/sOBM 폴리클로날 항체를 가함에 의해 농도 의존적으로 비타민  $\text{D}_3$ 에 의해 골흡수를 억제하고,  $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 완전히 억제했다(도 30). 또한, 프로스타글란딘  $\text{E}_2$ ( $10^{-6}\text{M}$ ) 혹은 부갑상선호르몬( $100\text{ng}/\text{ml}$ )은 골흡수활성을 상승시켰지만, 토끼 항 OBM/sOBM 폴리클로날 항체의 첨가( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 의해 프로스타글란딘  $\text{E}_2$  및 부갑상선호르몬에 의해 골흡수를 거의 완전히 억제했다(도 31 및 도 32). 한편, 양성 대조로서 이용한 정상 토끼 IgG( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )는 프로스타글란딘  $\text{E}_2$  및 부갑상선호르몬에 의해 골흡수에 대하여 영향받지 않았다. 또한, 인터로이킨 1 $\alpha$ ( $10\text{ng}/\text{ml}$ )에 의해서도 골흡수가 유발되었지만, 토끼 항 OBM/sOBM 폴리클로날 항체( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 의해 현저히 억제되었다(도 23). 이들 결과로부터 본 발명 항체는 골흡수억제물질로서 우월한 것임이 밝혀지게 되었다. 마우스 항 사람 OBM/sOBM항체인 H-OBM 9에 대해서도 동일한 실험을 했던 결과, 토끼 항 OBM/sOBM 폴리클로날 항체와 거의 동등한 골흡수억제활성이 있음이 확인되었다.

**발명의 효과**

본 발명에 의해 파골세포형성억제인자(Osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF)에 결합하는 신규한 단백질, 그 제조방법, 그 단백질을 이용하여 이 단백질의 발현을 조절하는 물질의 스크리닝 방법, 이 단백질의 작용을 저해 또는 수식하는 물질의 스크리닝 방법, 단백질과 결합하여 그 작용을 전달하는 리셉터의 스크리닝 방법 및 이들 스크리닝 방법에 의해 얻은 물질을 함유하는 의약조성물, 이 단백질에 대한 항체 및 그 항체를 이용한 골대사이상 치료제가 제공된다.

또한, 본 발명에 의해 파골세포형성억제인자 OCIF에 결합하는 신규한 단백질(OCIF 결합분자)를 코딩하는 DNA, 그 DNA에 의해 코딩된 아미노산서열을 가지는 단백질, 그 DNA를 이용하여 OCIF에 특이적으로 결합하는 단백질을 유전자공학적으로 제조하는 방법 및 이 단백질을 함유하는 골대사이상증 치료제가 제공된다. 게다가, OCIF결합분자의 발현을 조절하는 스크리닝 방법, OCIF결합분자를 결합하여 그 작용을 저해 또는 수식하는 물질의 스크리닝 방법, OCIF결합분자와 결합하여 그 작용을 전달하는 리셉터의 스크리닝 방법, 이들 스크리닝의 결과 얻은 물질을 함유하는 의약조성물이 제공된다.

더구나, 파골세포형성억제인자 OCIF에 결합하는 신규한 사람 단백질(사람유래 OCIF 결합분자, 사람 OBM)을 코딩하는 DNA, 그 DNA에 의해 코딩되는 아미노산서열을 가지는 단백질, 그 DNA를 이용하여 OCIF에 특이적으로 결합하는 성질을 가지고 파골세포의 분화·성숙을 지지·촉진하는 생물활성을 가지는 단백질을 유전자공학적으로 제조하는 방법 및 단백질을 함유하는 골대사이상증 치료제가 제공된다. OCIF결합분자의 발현을 조절하는 물질의 스크리닝 방법, OCIF결합분자와 결합하여 그 작용을 저해 또는 수식하는 물질의 스크리닝 방법, OCIF결합분자와 결합하여 그 생물작용을 전달하는 리셉터의 스크리닝 방법 및 이들 스크리닝의 결과 얻은 물질을 함유하는 의약조성물, 게다가 사람유래 OCIF결합 단백질에 대한 항체 및 그 항체를 이용한 골대사이상증의 예방 및/또는 치료약이 제공된다.

더군다나, 본 발명에 의해 OCIF에 특이적으로 결합하는 막결합분자(OCIF binding molecule; OBM)단백질 및 막결합부위를 결손한 가용성 OBM(sOBM)의 양향원을 인식하는 항체(항 OBM/sOBM항체), 그 제조방법, 그 항체를 이용한 OBM 및 sOBM의 측정방법, 더구나 이 항체를 유효성분으로 하는 골대사이상증 예방 및/또는 치료제가 제공된다.

본 발명에 의해 얻은 단백질 혹은 항체는 의약 혹은 연구 또는 시험용시약으로서 유용하다.

기탁된 미생물의 언급

(1) 미생물을 기탁한 기탁기관의 명칭 및 주소 성명;

일본 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소

일본국 이바라키켄 쥬꾸마시 히가시 1쥬메 1반 3고(우편번호 305)

기탁기관에 기탁한 일자

평성 9년 5월 23일

기탁기관에 기탁에 있어서 불린 수탁번호

FERM BP-5953

(2) 미생물을 기탁한 기탁기관의 명칭 및 주소 성명;

일본 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소

일본국 이바라키켄 쥬꾸마시 히가시 1쵸메 1만 3고(우편번호 305)

기탁기관에 기탁한 일자

평성 9년 8월 13일

기탁기관에 기탁에 있어서 불힌 수탁번호

FERM BP-6058

(3) 미생물을 기탁한 기탁기관의 명칭 및 주소 성명;

일본 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소

일본국 이바라키켄 쥬꾸마시 히가시 1쵸메 1만 3고(우편번호 305)

기탁기관에 기탁한 일자 (원기탁일)

평성 9년 11월 5일

기탁기관에 기탁에 있어서 불힌 수탁번호

FERM BP-6264

(4) 미생물을 기탁한 기탁기관의 명칭 및 주소 성명;

일본 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소

일본국 이바라키켄 쥬꾸마시 히가시 1쵸메 1만 3고(우편번호 305)

기탁기관에 기탁한 일자

평성 9년 11월 5일

기탁기관에 기탁에 있어서 불힌 수탁번호

FERM BP-6265

(5) 미생물을 기탁한 기탁기관의 명칭 및 주소 성명;

일본 통상산업성 공업기술원 생명공학공업기술연구소

일본국 이바라키켄 쥬꾸마시 히가시 1쵸메 1만 3고(우편번호 305)

기탁기관에 기탁한 일자

평성 9년 11월 5일

기탁기관에 기탁에 있어서 불힌 수탁번호

FERM BP-6266

서 열 표

서열번호 : 1

서열길이 : 316



서열형 : 아미노산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

서열 :

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser

1 5 10 15

Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu

20 25 30

His Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Ala Ala

35 40 45

Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln

50 55 60

Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met

65 70 75

Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg

80 85 90

Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr Leu

95 100 105

Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln

110 115 120

Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly

125 130 135

Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp

140 145 150

Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala

155 160 165

His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys

170 175 180

Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile

185 190 195

Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp

200 205 210

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu

215 220 225

Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr

230 235 240

Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met

245 250 255

Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His

260 265 270

Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly

275 280 285

Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro

290 295 300

Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile

305 310 315

Asp

316

서열번호 : 2

서열길이 : 1538

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : cDNA to mRNA

서열 :

```

GCCAGGACCT CTGTGAACCG GTCGGGGCGG GGGCCGCCTG GCCGGGAGTC TGCTCGGCGG 60
TGGGTGGCCG AGGAAGGGAG AGAACGATCG CGGAGCAGGG CGCCCGAACT CCGGGCGCCG 120
CGCCATGCGC CGGGCCAGCC GAGACTACGG CAAGTACCTG CGCAGCTCGG AGGAGATGGG 180
CAGCGGCCCC GCGGTCCCAC ACGAGGGTCC GCTGCACCCC GCGCCTTCTG CACCGGCTCC 240
GGCGCCGCCA CCCGCCGCCT CCCGCTCCAT GTTCCTGGCC CTCCTGGGGC TGGGACTGGG 300
CCAGGTGGTC TGCAGCATCG CTCTGTTCTT GTACTTTTGA GCGCAGATGG ATCCTAACAG 360
AATATCAGAA GACAGCACTC ACTGCTTTTA TAGAATCCTG AGACTCCATG AAAACGCAGG 420
TTTGCAGGAC TCGACTCTGG AGAGTGAAGA CACACTACCT GACTCCTGCA GGAGGATGAA 480
ACAAGCCTTT CAGGGGGCCG TGCAGAAGGA ACTGCAACAC ATTGTGGGGC CACAGCGCTT 540
CTCAGGAGCT CCAGCTATGA TGAAGGCTC ATGGTTGGAT GTGGCCAGC GAGGCAAGCC 600

TGAGGCCCAG CCATTTGCAC ACCTCACCAT CAATGCTGCC AGCATCCCAT CGGGTTCCCA 660
TAAAGTCACT CTGTCCTCTT GGTACCACGA TCGAGGCTGG GCCAAGATCT CTAACATGAC 720
GTTAAGCAAC GGAAACTAA GGGTTAACCA AGATGGCTTC TATTACCTGT ACGCCAACAT 780
TTGCTTTTCG CATCATGAAA CATCGGAAG CGTACCTACA GACTATCTTC AGCTGATGGT 840
GTATGTCGTT AAAACCAGCA TCAAAATCCC AAGTTCTCAT AACCTGATGA AAGGAGGGAG 900
CACGAAAAAC TGTCGGGCA ATTCTGAATT CCACTTTTAT TCCATAAATG TTGGGGGATT 960
TTTCAAGCTC CGAGCTGGTG AAGAAATTAG CATTCAAGTG TCCAACCCTT CCCTGCTGGA 1020
TCCGGATCAA GATCGGACGT ACTTTGGGGC TTTCAAAGTT CAGGACATAG ACTGAGACTC 1080
ATTTTCGTGA ACATTAGCAT GGATGTCCTA GATGTTTGA AACTTCTTAA AAAATGGATG 1140
ATGTCTATAC ATGTGTAAGA CTAATAAGAG ACATGGCCCA CGGTGTATGA AACTCACAGC 1200
CCTCTCTCTT GAGCCTGTAC AGGTTGTGTA TATGTAAAGT CCATAGGTGA TGTTAGATTC 1260
ATGGTGATTA CACAACGGTT TTACAATTTT GTAATGATTT CCTAGAATTG AACCAGATTG 1320
GGAGAGGTAT TCCGATGCTT ATGAAAAACT TACACGTGAG CTATGGAAGG GGCTCACAGT 1380
CTCTGGGTCT AACCCTGGA CATGTGCCAC TGAGAACCTT GAAATTAAGA GGATGCCATG 1440
TCATTGCAAA GAAATGATAG TGTGAAGGT TAAGTTCTTT TGAATTGTTA CATTGCGCTG 1500
GGACCTGCAA ATAAGTTCTT TTTTCTAAT GAGGAGAG 1538

```

서열번호 : 3

서열길이 : 21

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

AAACGCAAAA AACCAGAAAG G 21

서열번호 : 4

서열길이 : 17

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

GTAAAACGAC GGCCAGT 17

서열번호 : 5

서열길이 : 17

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

CAGGAAACAG CTATGAC 17

서열번호 : 6

서열길이 : 22

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

AAGCCCCAAA GTACGTCGCA TC 22

서열번호 : 7

서열길이 : 26

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

CGAAGCTTTC GAGCGCAGAT GGATCC 26

서열번호 : 8

서열길이 : 27

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

CCTCTAGAGT CTATGTCCTG AAGTTTG 27

서열번호 : 9

서열길이 : 20

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

ATCAGAAGAC AGCACTCACT 20

서열번호 : 10

서열길이 : 33

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

GGGGTCGACC TAGGACATCC ATGCTAATGT TCC 33

서열번호 : 11

서열길이 : 317

서열형 : 아미노산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

서열 :

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu

5 10 15

Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala

20 25 30

Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met

35 40 45

Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val

50 55 60

Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser

65 70 75 80

Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn

85 90 95

Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile

100 105 110

Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln

115 120 125

Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys

130 135 140

Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu

145 150 155 160

Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro

165 170 175

Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly

180 185 190

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val

195 200 205

Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His

210 215 220

His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val

225 230 235 240

Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met

245 250 255



Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe

260 265 270

Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu

275 280 285

Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp

290 295 300

Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp

305 310 315

서열번호 : 12

서열길이 : 954

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : cDNA to mRNA

서열 :

```

ATGCCGCCGCG CCAGCAGAGA CTACACCAAG TACCTGCCGTG GCTCGGAGGA GATGGGCGGC   60
GGCCCCGGAG CCCCGCACGA GGGCCCCCTG CACGCCCCGC CGCCGCCTGC GCCGCACCAG   120
CCCCCTGCCG CCTCCCGCTC CATGTTCGTG GCCCTCCTGG GGCTGGGGCT GGGCCAGGTT   180
GTCTGCAGCG TCGCCCTGTT CTTCTATTTT AGAGCGCAGA TGGATCCTAA TAGAATATCA   240
GAAGATGGCA CTCACTGCAT TTATAGAATT TTGAGACTCC ATGAAAATGC AGATTTTCAA   300
GACACAATC TGGAGAGTCA AGATACAAAA TTAATACCTG ATTCATGTAG GAGAATTAAA   360
CAGGCCTTTC AAGGAGCTGT GCAAAAGGAA TTACAACATA TCGTTGGATC ACAGCACATC   420
AGAGCAGAGA AAGCGATGGT GGATGGCTCA TGGTTAGATC TGGCCAAGAG GAGCAAGCTT   480
GAAGCTCAGC CTTTGTCTCA TCTCACTATT AATGCCACCG ACATCCCATC TGGTTCCCAT   540
AAAGTGAGTC TGTCCTCTTG GTACCATGAT CGGGGTGGG CCAAGATCTC CAACATGACT   600
TTTAGCAATG GAAAACTAAT AGTTAATCAG GATGGCTTTT ATTACCTGTA TGCCAACATT   660
TGCTTTCGAC ATCATGAAAC TTCAGGAGAC CTAGCTACAG AGTATCTTCA ACTAATGGTG   720
TACGTCACTA AAACCAGCAT CAAAATCCCA AGTTCTCATA CCCTGATGAA AGGAGGAAGC   780
ACCAAGTATT GGTGAGGAA TTCTGAATTC CATTTTATT CCATAAACGT TGGTGGATT   840
TTTAAGTTAC GGTCTGGAGA GGAATCAGC ATCGAGGTCT CCAACCCCTC CTTACTGGAT   900
CCGGATCAGG ATGCAACATA CTTTGGGGCT TTAAAGTTC GAGATATAGA TTGA           954

```

서열번호 : 13

서열길이 : 27

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

GGCGTACGCA GAGCGCAGAT GGATCCT 27

서열번호 : 14

서열길이 : 34

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 다른 핵산(합성DNA)

서열 :

GGGGTCGACC ATCCAGGAAA TATCATAACA CTCC 34

서열번호 : 15

서열길이 : 951

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : cDNA to mRNA

서열 :

```

ATGCGCCGGG CCAGCCGAGA CTACGGCAAG TACCTGCGCA GCTCGGAGGA GATGGGCAGC   60
GGCCCCGGCG TCCCACACGA GGGTCCGCTG CACCCCGCGC CTTCTGCACC GGCTCCGGCG  120
CCGCCACCCG CCGCCTCCCG CTCCATGTTC CTGGCCCTCC TGGGGCTGGG ACTGGGCCAG  180
GTGGTCTGCA GCATCGCTCT GTTCCTGTAC TTTCGAGCGC AGATGGATCC TAACAGAATA  240
TCAGAAGACA GCACTCACTG CTTTATAGA ATCCTGAGAC TCCATGAAA CGCAGGTTTG  300
CAGGACTCGA CTCTGGAGAG TGAAGACACA CTACCTGACT CCTGCAGGAG GATGAAACAA  360
GCCTTTCAGG GGGCCGTGCA GAAGGAATG CAACACATTG TGGGGCCACA GCGCTTCTCA  420
GGAGCTCCAG CTATGATGGA AGCCTCATGG TTGGATGTGG CCCAGCGAGG CAAGCCTGAG  480
GCCCAGCCAT TTGCACACCT CACCATCAAT GCTGCCAGCA TCCCATCGGG TTCCCATAAA  540
GTCACCTCTGT CCTCTTGTA CCACGATCGA GGCTGGGCCA AGATCTCTAA CATGACGTTA  600
AGCAACGGAA AACTAAGGGT TAACCAAGAT GGCTTCTATT ACCTGTACGC CAACATTTGC  660
TTTCGGCATC ATGAAACATC GGAAGCGTA CCTACAGACT ATCTTCAGCT GATGGTGTAT  720
GTCGTTAAAA CCAGCATCAA AATCCCAAGT TCTCATAACC TGATGAAAGG AGGGAGCACG  780
AAAAACTGCT CGGCAATTC TGAATTCCAC TTTTATTCCA TAAATGTTGG GGGATTTTTC  840
AAGCTCCGAG CTGGTGAAGA AATTAGCATT CAGGTGTCCA ACCCTTCCCT GCTGGATCCG  900
GATCAAGATG CGACGTACTT TGGGGCTTTC AAAGTTCAGG ACATAGACTG A           951

```

서열번호 : 16

서열길이 : 244

서열형 : 아미노산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

서열 :

Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe

1 5 10 15

Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr

20 25 30

Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln

35 40 45

Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro

50 55 60

Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp

65 70 75 80

Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr

85 90 95

Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser

100 105 110

Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu

115 120 125

Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr

130 135 140

Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr

145 150 155 160

Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile

165 170 175

Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser

180 185 190

Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Try Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe

195 200 205

Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser

210 215 220

Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val

225 230 235 240

Gln Asp Ile Asp

서열번호 : 17

서열길이 : 246

서열형 : 아미노산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

서열 :

Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Gly Thr His Cys Ile

1 5 10 15

Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr

20 25 30

Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile

35 40 45

Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val

50 55 60

Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp

65 70 75 80

Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His

85 90 95

Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser

100 105 110

Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met

115 120 125

Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr

130 135 140

Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu

145 150 155 160

Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile

165 170 175

Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr

180 185 190

Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly

195 200 205

Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn

210 215 220

Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe

225 230 235 240

Lys Val Arg Asp Ile Asp

245

서열번호 : 18

서열길이 : 735

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : cDNA to mRNA

서열 :

```
GCGCAGATGG ATCCTAACAG AATATCAGAA GACAGCACTC ACTGCTTTTA TAGAATCCTG   60
AGACTCCATG AAAACGCAGG TTTGCAGGAC TCGACTCTGG AGAGTGAAGA CACACTACCT  120
GACTCCTGCA GGAGGATGAA ACAAGCCTTT CAGGGGGCCG TGCAGAAGGA ACTGCAACAC  180
ATTGTGGGGC CACAGCGCTT CTCAGGAGCT CCAGCTATGA TGGAAGGCTC ATGGTTGGAT  240
GTGGCCCGAG GAGGCAAGCC TGAGGCCAG CCATTTCAC ACCTCACCAT CAATGCTGCC  300
AGCATCCCAT CGGGTTCCCA TAAAGTCACT CTGTCCTCTT GGTACCACGA TCGAGGCTGG  360
GCCAAGATCT CTAACATGAC GTTAAGCAAC GGAAACTAA GGGTTAACCA AGATGGCTTC  420
TATTACCTGT ACGCCAACAT TTGCTTTCGG CATCATGAAA CATCGGGAAG CGTACCTACA  480
GACTATCTTC AGCTGATGGT GTATGTCGTT AAAACCAGCA TCAAAATCCC AAGTTCTCAT  540
AACCTGATGA AAGGAGGGAG CACGAAAAAC TGGTCGGGCA ATTCTGAATT CCACTTTTAT  600
TCCATAAATG TTGGGGGATT TTTCAAGCTC CGAGCTGGTG AAGAAATTAG CATTGAGGTG  660
TCCAACCTT CCCTGCTGGA TCCGGATCAA GATGCGACGT ACTTTGGGGC TTTCAAAGTT  720
CAGGACATAG ACTGA                                     735
```

서열번호 : 19

서열길이 : 741

서열형 : 핵산

쇄의 수 : 1

토폴로지 : 직쇄상

서열의 종류 : cDNA to mRNA

서열 :

```
GCGCAGATGG ATCCTAATAG AATATCAGAA GATGGCACTC ACTGCATTTA TAGAATTTTG   60
AGACTCCATG AAAATGCAGA TTTTCAAGAC ACAACTCTGG AGAGTCAAGA TACAAAATTA  120
```



ATACCTGATT CATGTAGGAG AATTAAACAG GCCTTTCAAG GAGCTGTGCA AAAGGAATTA 180  
 CAACATATCG TTGGATCACA GCACATCAGA GCAGAGAAAG CGATGGTGGA TGGCTCATGG 240  
 TTAGATCTGG CCAAGAGGAG CAAGCTTGAA GCTCAGCCTT TTGCTCATCT CACTATTAAT 300  
 GCCACCGACA TCCCATCTGG TTCCATAAA GTGAGTCTGT CCTCTTGGTA CCATGATCGG 360  
 GGTGGGGCCA AGATCTCCAA CATGACTTTT AGCAATGGAA AACTAATAGT TAATCAGGAT 420  
 GGCTTTTATT ACCTGTATGC CAACATTTGC TTTCGACATC ATGAAACTTC AGGAGACCTA 480  
 GCTACAGAGT ATCTTCAACT AATGGTGAC GTCATAAAA CCAGCATCAA AATCCCAAGT 540  
 TCTCATACCC TGATGAAAGG AGGAAGCACC AAGTATTGGT CAGGGAATTC TGAATTCCAT 600  
 TTTTATTCCA TAAACGTTGG TGGATTTTTT AAGTTACGGT CTGGAGAGGA AATCAGCATC 660  
 GAGGTCTCCA ACCCCTCCTT ACTGGATCCG GATCAGGATG CAACATACTT TGGGGCTTTT 720  
 AAAGTTCGAG ATATAGATTG A 741

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1. 삭제

### 청구항 2. 삭제

### 청구항 3. 삭제

### 청구항 4. 삭제

### 청구항 5. 삭제

### 청구항 6.

파골세포형성억제인자(OCIF)에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 또는 서열번호 11의 막결합단백질분자(OBM) 또는 그 막결합부위를 결손한 서열번호 16 또는 서열번호 17의 가용성 막결합단백질분자(sOBM)를 인식하고, 하기 (1)-(3)의 기재 중 어느 하나의 중화활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항체.

(1)골흡수억제활성

(2)파골세포형성억제활성, 및

(3)OCIF와 서열번호 1, 11의 OBM의 결합을 저해하는 활성.

### 청구항 7. 삭제

### 청구항 8.

100ng/ml의 농도에서 파골세포형성억제활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 청구범위 제6항 기재의 항체.

### 청구항 9.

10ng/ml의 농도에서 파골세포형성억제활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 청구범위 제8항 기재의 항체.

#### 청구항 10.

서열번호 11의 사람 OBM 또는 서열번호 17의 사람 sOBM을 인식하고, 서열번호 1의 마우스 OBM 및 서열번호 16의 마우스 sOBM의 비인식성을 특징으로 하는 청구범위 제6항 기재의 항체.

#### 청구항 11. 삭제

#### 청구항 12.

서열번호 1, 11의 OBM 또는 서열번호 16, 17의 sOBM과의 괴리정수가  $10^{-11}M \sim 10^{-7}M$  인 것을 특징으로 하는 청구범위 제6항 기재의 항체.

#### 청구항 13.

서열번호 1의 마우스 OBM 또는 서열번호 16의 마우스 sOBM을 인식하는 것을 특징으로 하는 청구범위 제6항 기재의 항체.

#### 청구항 14.

서열번호 11의 사람 OBM 또는 서열번호 17의 사람 sOBM을 인식하는 것을 특징으로 하는 청구범위 제6항 기재의 항체.

#### 청구항 15.

폴리크로날 항체인 청구범위 제6항 기재의 항체.

#### 청구항 16.

모노크로날 항체인 청구범위 제6항 기재의 항체.

#### 청구항 17.

서열번호 11의 사람 OBM 또는 서열번호 17의 사람 sOBM 및 서열번호 1의 마우스 OBM 또는 서열번호 16의 마우스 sOBM에 교차성을 가지는 청구범위 제16항 기재의 모노크로날 항체.

#### 청구항 18.

다음 성질을 가지는 청구범위 제16항 기재의 모노크로날 항체.

a) 서브크레스 : IgG<sub>1</sub> 또는 IgG<sub>2</sub>

b) 라이트체인 : κ쇄

#### 청구항 19.

서열번호 1, 11의 마우스 또는 사람의 OBM 또는 서열번호 16, 17의 마우스 또는 사람의 sOBM으로 동물을 면역하고, 그 동물의 혈액을 정제하는 것을 특징으로 하는 폴리크로날 항체의 제조방법.

## 청구항 20.

청구범위 제16항 내지 제18항중 어느 하나의 항의 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마.

## 청구항 21.

청구범위 제6항, 제8항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항중 어느 하나의 항의 항체를 함유하여 이용하는 서열번호 1, 11의 OBM의 측정용 키트.

## 청구항 22.

청구범위 제6항, 제8항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항중 어느 하나의 항의 항체를 함유하여 이용하는 서열번호 16, 17의 sOBM의 측정용 키트.

## 청구항 23.

청구범위 제6항, 제8항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항중 어느 하나의 항의 항체를 고상항체 및 효소표지항체로 이용하여 함유하는 것을 특징으로 하는 서열번호 1, 11의 OBM 또는 서열번호 16, 17의 sOBM의 측정용 키트.

## 청구항 24.

삭제

## 청구항 25.

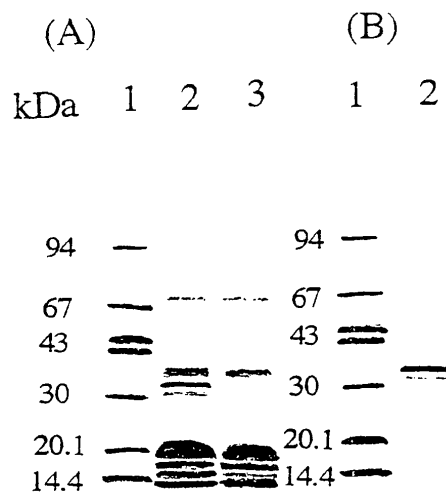
삭제

## 청구항 26.

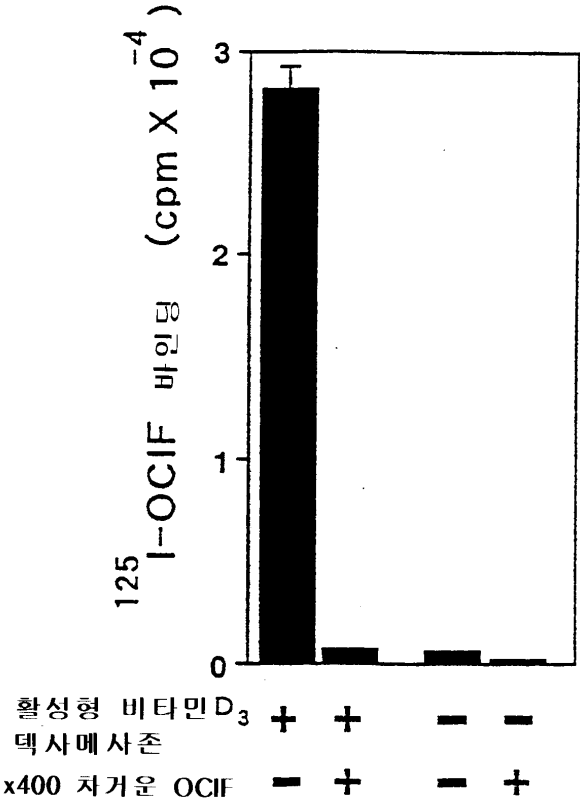
청구범위 제6항, 제8항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항중 어느 하나의 항의 항체를 유효성분으로 하는 골대사이상 증은, 골조송증, 고칼슘혈증, 골파제트(paget)병, 신성골이영양증, 만성관절류마티즘 및 변형성관절염으로 구성되는 군으로부터 적어도 하나 선택되는 것을 특징으로 하는 골대사이상증 예방 또는 치료제.

도면

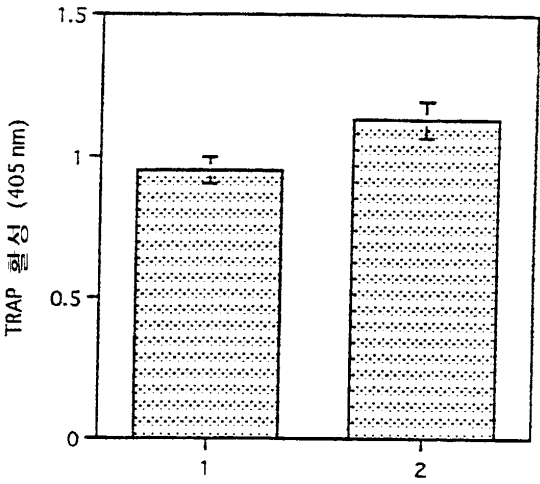
도면1



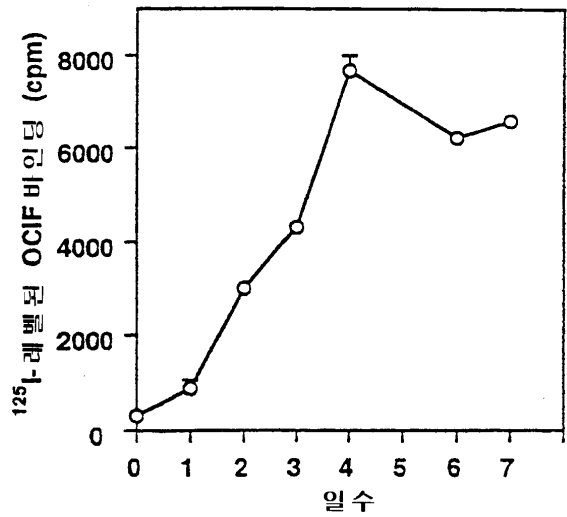
도면2



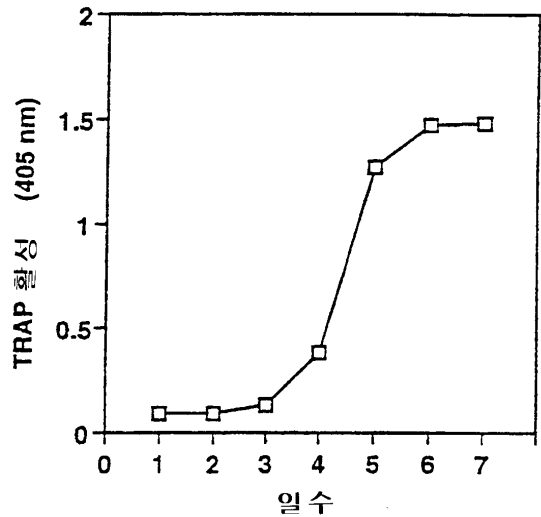
도면3



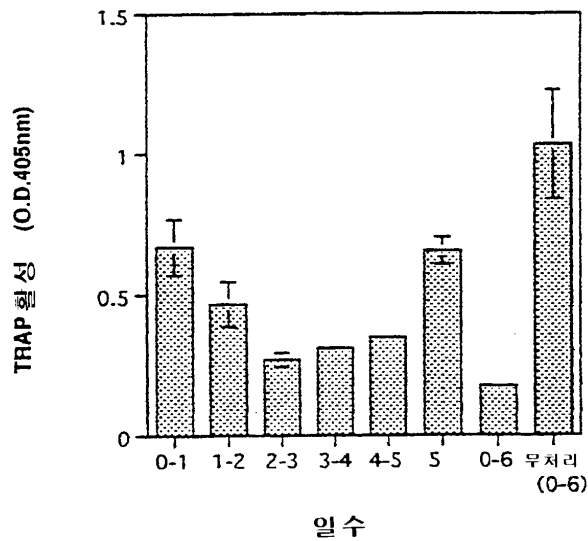
도면4



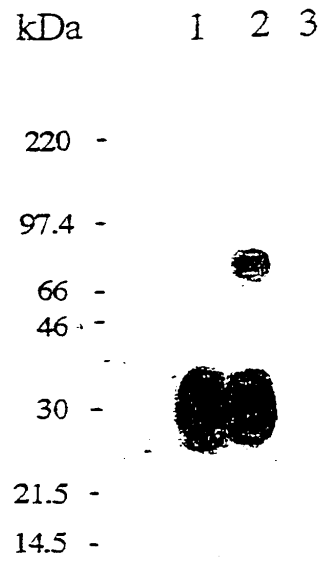
도면5



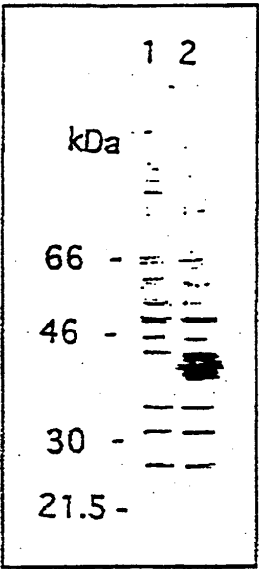
도면6



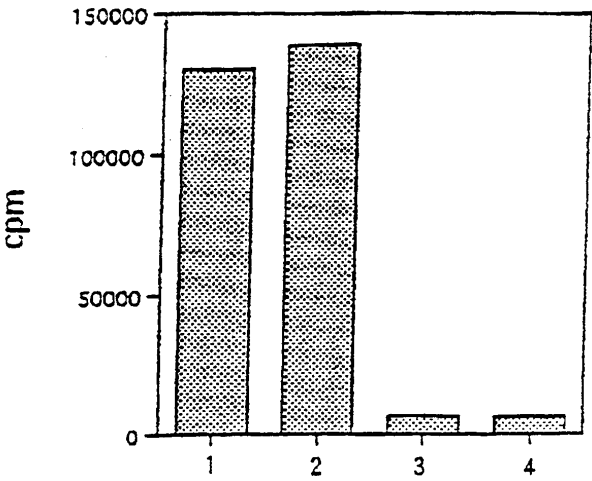
도면7



도면8

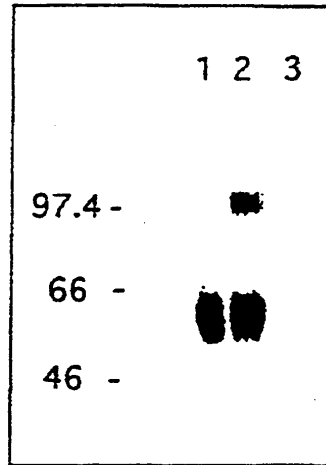


도면9

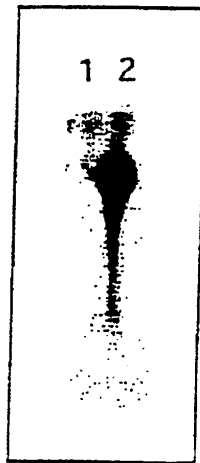




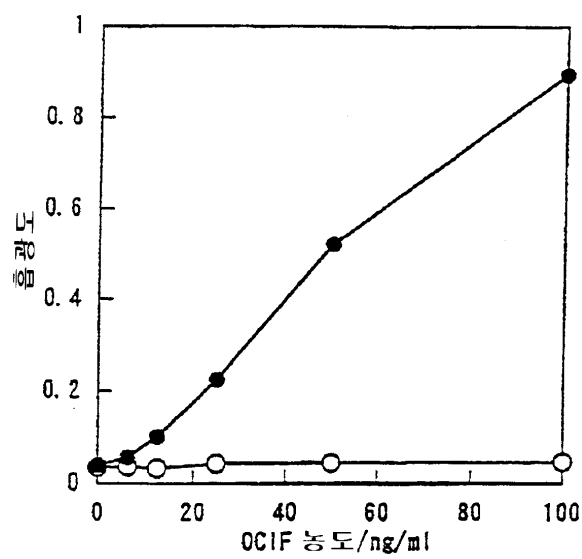
도면10



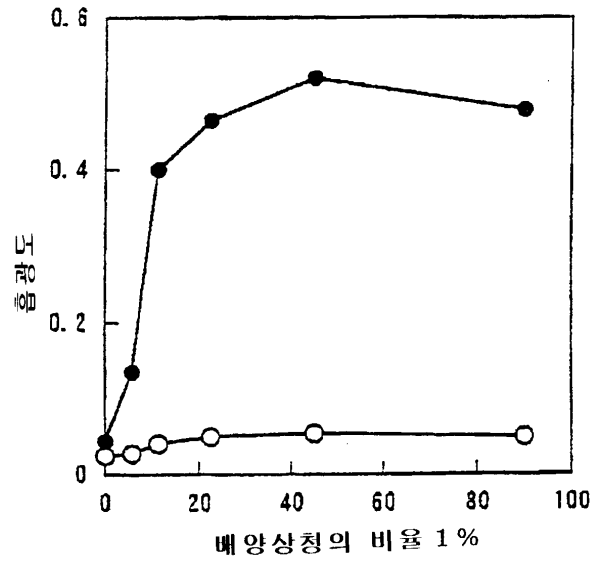
도면11



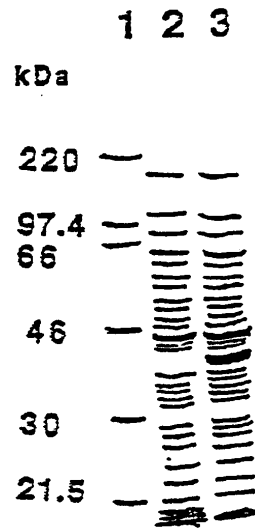
도면12



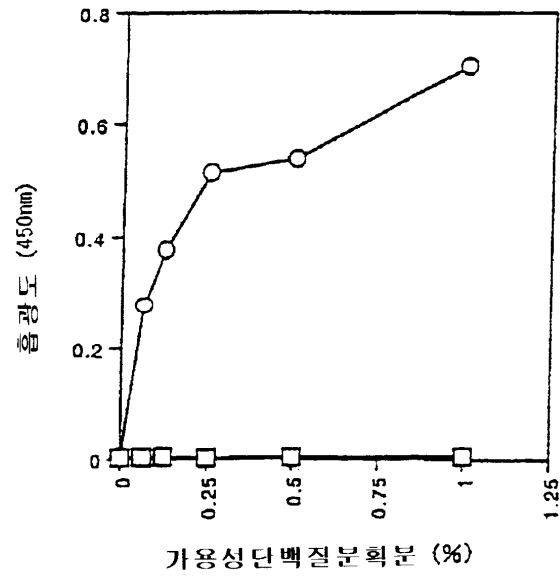
도면13



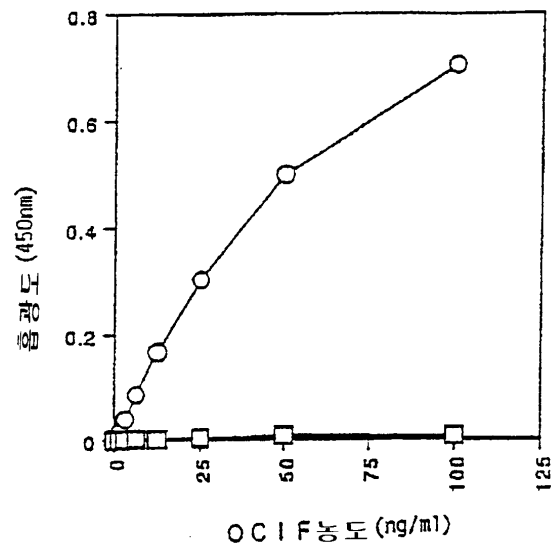
도면14



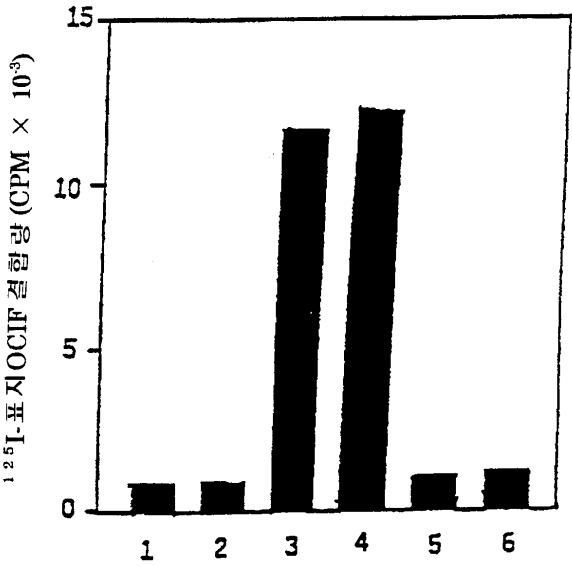
도면15



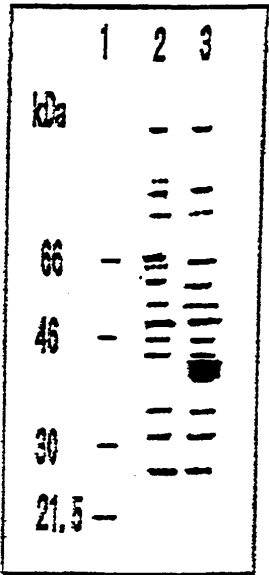
도면16



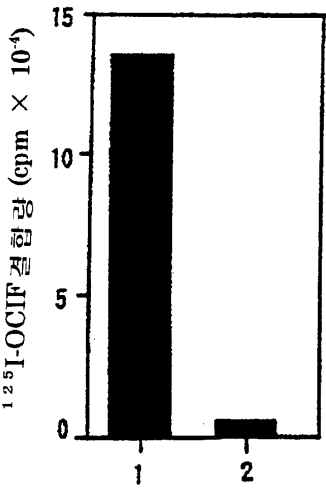
도면17



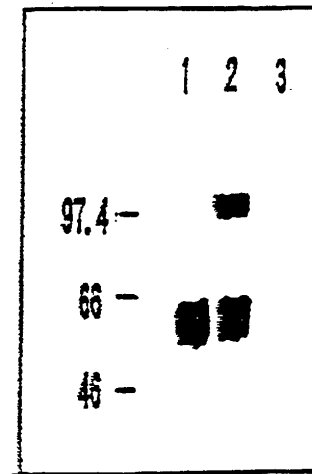
도면18



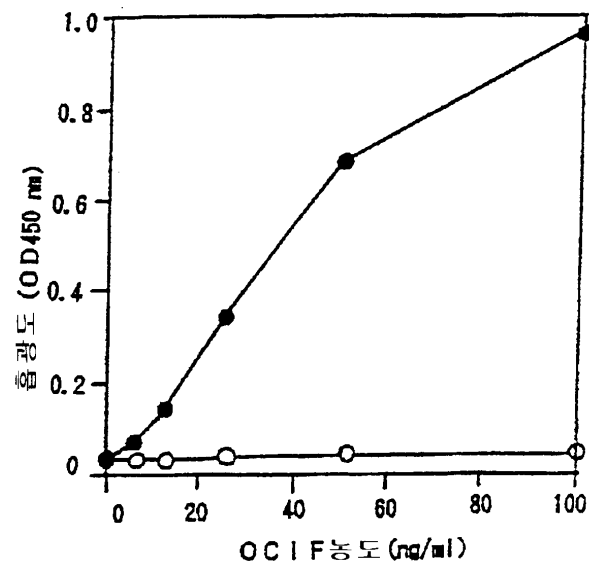
도면19



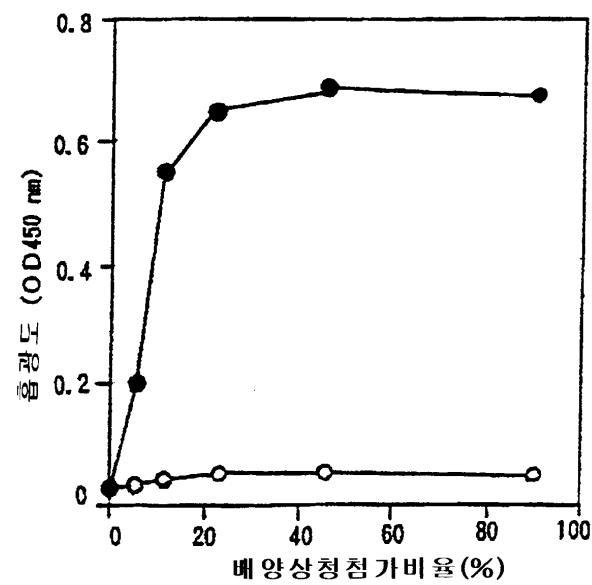
도면20



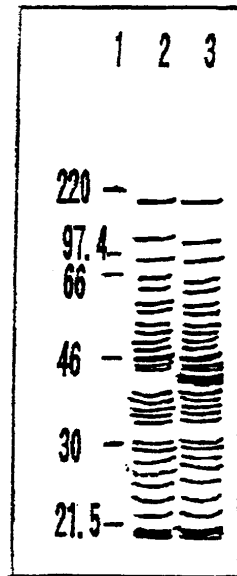
도면21



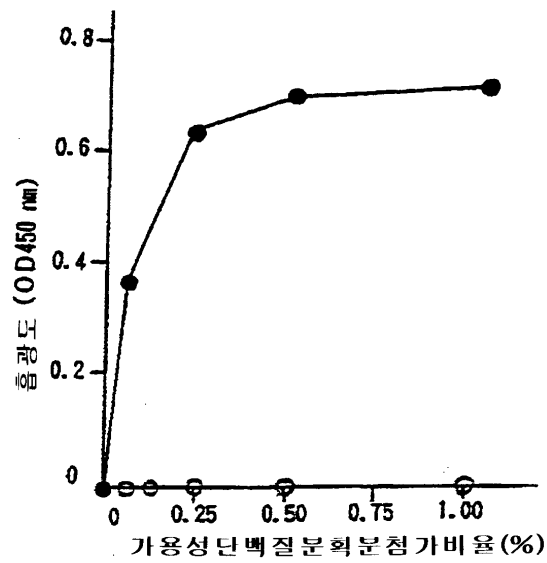
도면22



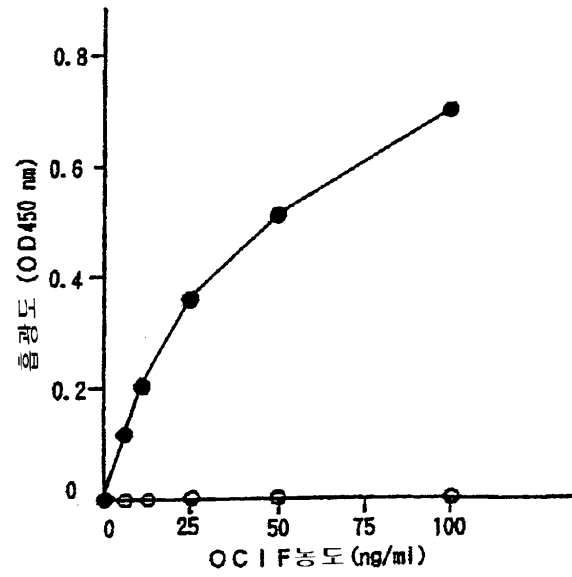
도면23



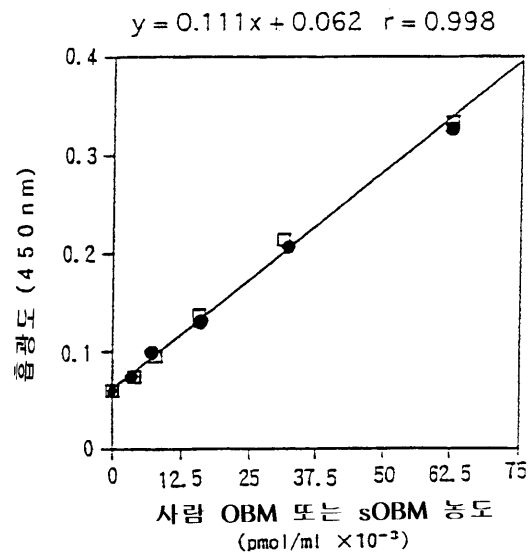
도면24



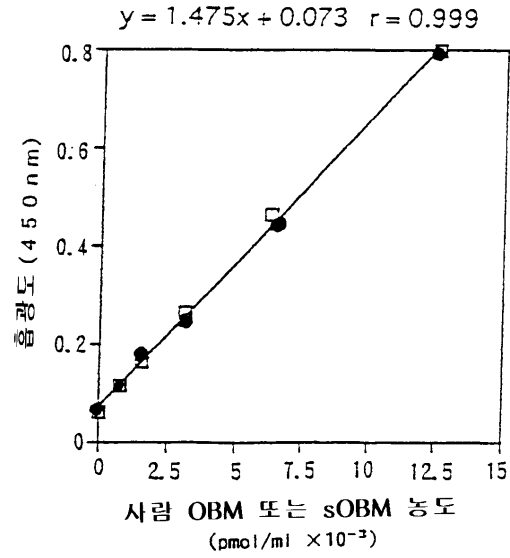
도면25



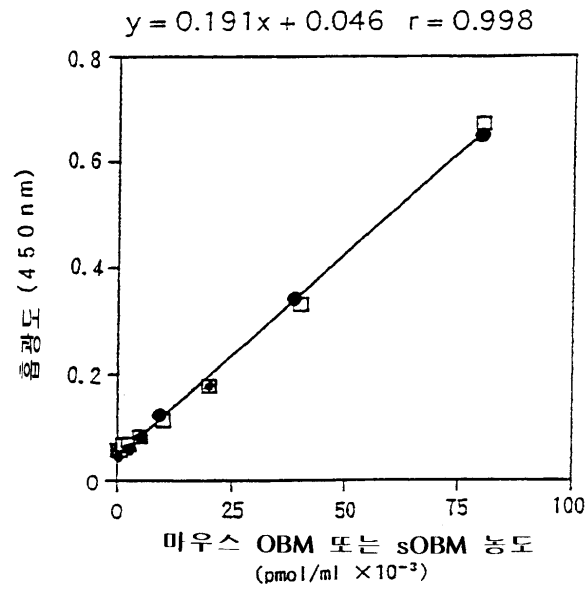
도면26



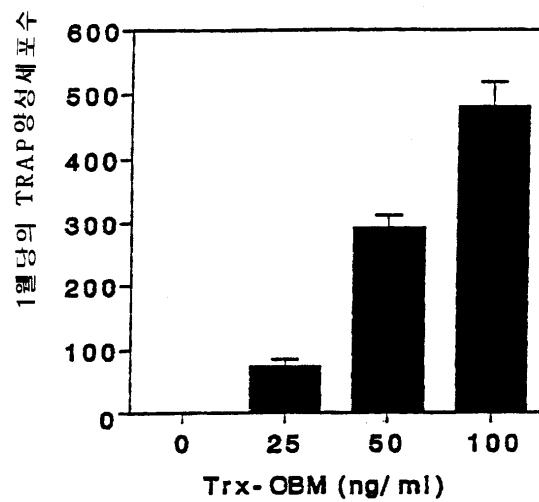
도면27



도면28

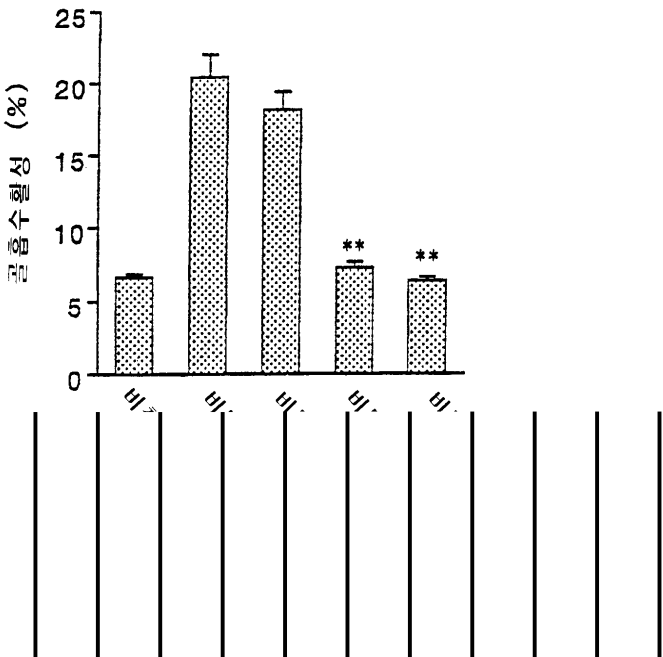


도면29

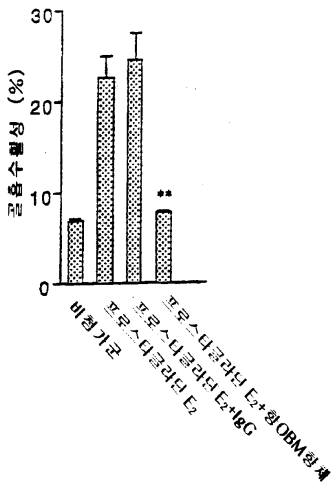




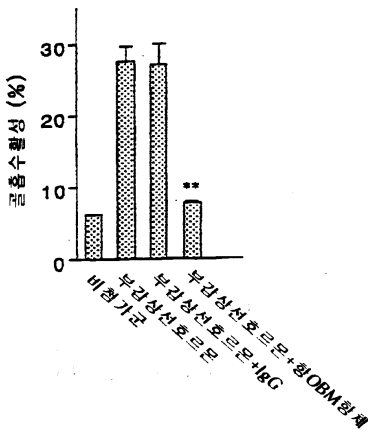
도면30



도면31



도면32



도면33

