



- (51) 국제특허분류:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/004455
- (22) 국제출원일: 2013년 5월 21일 (21.05.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0053868 2012년 5월 21일 (21.05.2012) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 정우진 (JEONG, Woo Jin); 120-827 서울시 서대문구 연희동 151-20 골든빌 501호, Seoul (KR). 심현보 (SHIM, Hyun Bo); 135-789 서울시 강남구 압구정동 현대아파트 210동 702호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-973 서울시 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), Seoul (KR).

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

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

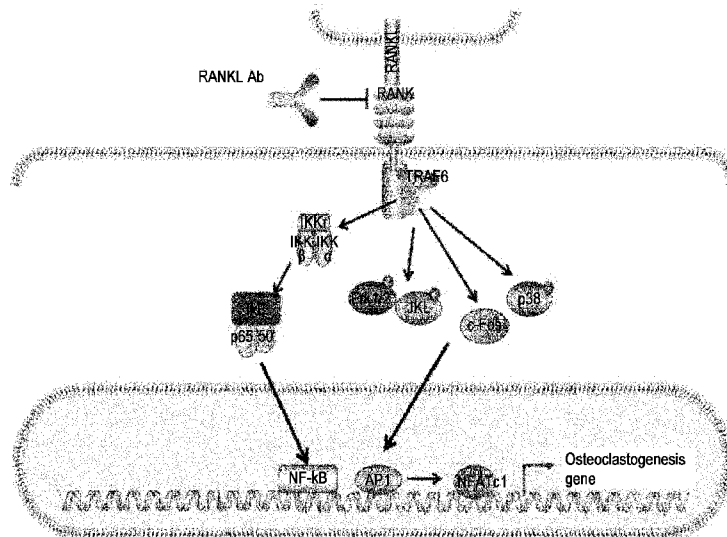
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTIBODY ABLE TO SUPPRESS OSTEOCLAST DIFFERENTIATION

(54) 발명의 명칭 : 파골세포분화를 억제할 수 있는 항체



(57) Abstract: The present invention relates to: a RANKL (receptor activator of NF-κB ligand) -specific antibody able to suppress RANKL-induced osteoclast differentiation; a polynucleotide coding for the antibody; an expression vector comprising the polynucleotide; a transformant into which the expression vector has been introduced; a method for producing the RANKL-specific antibody by using the transformant; a composition for preventing or treating a bone disease, comprising the RANKL-specific antibody as an active ingredient; a method for preventing or treating a bone disease by using the composition; a composition for suppressing osteoclast differentiation, comprising the RANKL-specific antibody as an active ingredient; and a method for suppressing differentiation into osteoclasts by using the composition.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)-유도성 파골세포분화를 억제할 수 있는 RANKL-특이적 항체, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 RANKL-특이적 항체를 제조하는 방법, 상기 RANKL-특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물, 상기 조성물을 이용하여 골 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법, 상기 RANKL-특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 파골세포 분화 억제용 조성물 및 상기 조성물을 이용하여 파골세포로의 분화를 억제하는 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 파골세포분화를 억제할 수 있는 항체

기술분야

- [1] 본 발명은 파골세포분화를 억제할 수 있는 항체에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)-유도성 파골세포분화를 억제할 수 있는 RANKL-특이적 항체, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 RANKL-특이적 항체를 제조하는 방법, 상기 RANKL-특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물, 상기 조성물을 이용하여 골 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법, 상기 RANKL-특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 파골세포 분화 억제용 조성물 및 상기 조성물을 이용하여 파골세포로의 분화를 억제하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 골의 재형성은 기계적 스트레스와 호르몬 조절에 반응하여 골을 유지하도록 살아가면서 지속적으로 발생한다. 통상적인 골량을 유지하기 위하여, 밀접하게 결합된 과정을 통해 골은 파골세포에 의하여 재흡수되고 새로운 골기질이 조골세포에 의해 축적된다.
- [4] 많은 일반적인 골 질환에서 보듯이, 이러한 과정에서의 불균형은 파골세포에 의한 과다한 골 재흡수 및 골의 연약성의 증가를 유도할 수 있다. RANKL은 조골세포, 활성화된 T세포 및 기질세포에서 생성되고, M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)와 함께 파골세포의 형태변화, 생존 및 골 흡수를 활성화시킨다. RANKL이 수용체인 RANK에 결합되면, RANK의 세포질 도메인으로 TRAF6(TNF receptor-associated factor 6)가 모여들고, 이에 따라 NF- κ B와 JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38(p38 MAP kinase), 및 ERK(extracellular signal-regulated kinase)를 포함하는 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로가 활성화된다. 활성화된 NF- κ B는 하류에 있는 c-Fos와 NFATc1의 발현을 유도하는데, 이들은 RANKL에 의한 파골세포 분화에서 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.
- [5] 상기과 같이, RANK-RANKL 시스템이 파골세포분화에 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 알려짐에 따라, RANKL에 특이적으로 결합하는 항체를 제작하여 골 관련 질환을 치료하려는 시도가 있어 왔다. 그러나, 마우스를 통해 유용한 효과를 나타내는 항체가 개발되어도 인간 질환의 예방, 진단 및 치료를 위한 단클론항체, 다클론 항체 및 재조합 항체의 임상적용은 추가적인 검증이 필요하다. 이러한 관점에서, 전임상 및 임상 연구를 위해, 마우스 및 인간

RANKL에 특이적으로 결합하는 인간 항체 개발이 절실히 요구되고 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명자들은 인간 및 마우스의 RANKL에 특이적으로 결합하며, 마우스의 BMM(bone marrow-driven macrophages)의 RANKL-유도성 파골세포분화를 억제하는 활성을 나타내어, 인간의 RANKL-유도성 파골세포분화를 억제하는 활성을 나타낼 것으로 기대되는 항체를 제조하여, 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 하나의 목적은 RANKL-특이적 항체를 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 상기 RANKL-특이적 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 상기 RANKL-특이적 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 RANKL-특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 골 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 RANKL-특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 파골세포 분화 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 파골세포의 분화를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

[18]

발명의 효과

[19] 본 발명의 RANKL-특이적 항체는 인간 및 마우스의 RANKL에 특이적으로 결합하는 항체로서, 마우스 및 인간 RANKL에 대한 교차특이성을 가지는 특성에 의해, RANKL에 대한 항원인식을 유용하게 사용할 수 있는 임의의 적용에서 사용될 수 있으며, 전임상 및 임상 연구에 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 파골세포의 분화를 촉진하는 RANKL의 활성을 억제하여, 파골세포분화를 저해함으로써, 파골세포의 불균형에 의하여 유발되는 골 관련 질환을 치료할 수 있으므로, 골 관련 질환의 치료제 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1a는 마우스의 RANKL가 처리된 파골세포의 전구체 세포(BMMs)의 분화에 미치는 본 발명의 ScFv 형태의 항체의 효과를 나타내는 사진이다.
- [22] 도 1b는 사람의 RANKL가 처리된 파골세포의 전구체 세포(BMMs)의 분화에 미치는 본 발명의 ScFv 형태의 항체의 효과를 나타내는 사진이다.
- [23] 도 1c는 마우스 또는 사람의 RANKL가 처리되고, 본 발명의 ScFv 형태의 항체가 처리된 파골세포의 전구체 세포(BMMs)로부터 분화된 세포의 수를 나타내는 그래프이다.
- [24] 도 1d는 파골세포의 전구체 세포(BMMs)에, 마우스의 RANKL와 본 발명의 ScFv 형태의 서열번호 2 및 5의 항체를 서로 다른 비율로 처리한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.
- [25] 도 1e는 파골세포의 전구체 세포(BMMs)에, 사람의 RANKL와 본 발명의 ScFv 형태의 서열번호 2 및 5의 항체를 서로 다른 비율로 처리한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.
- [26] 도 1f는 파골세포의 전구체 세포(BMMs)에, 마우스의 RANKL와 본 발명의 서열번호 2를 포함하는 IgG 형태의 항체를 서로 다른 비율로 처리한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.
- [27] 도 2a는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 NF- κ B 활성화의 억제를 나타내는 사진이다.
- [28] 도 2b는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 NF- κ B 활성화의 억제를 나타내는 그래프이다.
- [29] 도 3a는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 MAPK 활성화의 억제를 나타내는 사진이다.
- [30] 도 3b는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 MAPK 활성화의 억제를 나타내는 그래프이다.
- [31] 도 4a는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 c-Fos의 발현의 억제를 나타내는 사진이다.
- [32] 도 4b는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 NFATc1의 발현의 억제를 나타내는 사진이다.
- [33] 도 5는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 액틴 링의 형성억제를 나타내는 현미경 사진이다.

[34] 도 6은 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 골 재흡수의 억제를 나타내는 현미경 사진 및 그래프이다.

[35] 도 7은 RANKL-유도성 파골세포분화에 대한 RANKL-특이적 항체의 효과와 신호전달 경로를 나타내는 개략도이다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[37]

[38] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 RANKL 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.

[39]

[40] 본 발명자들은 마우스 또는 인간 RANKL에 특이적으로 결합하는 인간 항체를 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, scFv에 주목하게 되었다. 상기 scFv는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 갖는 최소 항체 단편을 의미하는데, 항체로서 기능을 수행하기 위한 최소한의 필수구성요소만을 포함하고, 고정도메인을 포함하지 않아 낮은 면역원성을 나타내기 때문에, 마우스 및 인간 RANKL에 특이적으로 결합하는 인간 항체를 개발하기에 용이하고, 목적하는 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 투여할 경우, 생체내로 분배가 용이하고, 조직 침투성이 우수하다는 장점이 있다. 이에, 본 발명자들은 인간 및 마우스의 RANKL에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 제작하였고, 상기 항체가 마우스의 BMM(bone marrow-driven macrophages)의 RANKL-유도성 파골세포분화를 억제하는 활성을 나타내어, 인간의 RANKL-유도성 파골세포분화를 억제하는 활성을 나타냄을 확인하였다. 뿐만 아니라, 상기 항체의 인간의 RANKL-유도성 파골세포분화를 억제하는 활성에 근거하여, 상기 항체를 다양한 골 관련 질환을 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있음을 확인하였다.

[41]

[42] 본 발명의 용어 "항체"란, 당해 분야에서 공지된 용어로서, 특정 항원 또는 그의 에피토프 부위와 특이적으로 반응하여 결합할 수 있는 특이적인 단백질 분자를 의미하는데, 항원과 결합능력을 가지는 면역글로불린 분자(예를 들어, 단일클론 항체, 다클론 항체 등), 상기 면역글로불린 분자의 단편(예를 들면, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, 단일 사슬 Fv 단편(scFv) 등) 등을 포함한다. 특히, 상기 면역글로불린 분자는 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 부위 및 가변 부위 (상기 부위는 "도메인"으로 또한 알려져 있음)를 포함하고, 상기 경쇄 및 중쇄의 가변 부위는, 항원의 에피토프(epitope)에 결합할 수 있는, 3개의 다변가능한 영역인 "상보성 결정 영역(complementarity-determining resion, CDR)"; 및 4개의 "구조 영역(framework region, FR)"을 포함한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로

불리우고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.

[43]

[44] 본 발명의 용어, "RANKL 단백질에 특이적으로 결합하는 항체"란 RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)과 결합하여 RANKL과 RANK의 결합을 억제함으로써, RANKL의 신호전달 경로를 억제할 수 있는 항체를 의미한다.

[45]

[46] 본 발명에 있어서, 상기 RANKL 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 상기 항체가 인식하는 항원, 상기 항체의 형태, 상기 항체를 구성하는 경쇄 및 중쇄, 상기 항체에 포함된 경쇄 및 중쇄를 구성하는 CDR 등의 다양한 측면에서 규명할 수 있다.

[47]

먼저, 항체가 인식하는 항원의 측면에서 볼 때, 상기 항체는 인간 및 마우스의 RANKL에 특이적으로 결합하는 항체가 될 수 있고, 바람직하게는 인간 RANKL의 단편인 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 마우스 RANKL의 단편인 서열번호 11의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체가 될 수 있다.

[48]

다음으로, 항체의 형태적인 측면에서 볼 때, 상기 항체는 바람직하게는 상기 항원에 특이적인 IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, IgT, IgY, 단일쇄 항체 등의 천연형 항체; 상기 천연형 항체의 일부를 포함하도록 구성된 재조합 항체; 항원에 대한 항체의 해리 상수값을 저하시키거나, 체내에서 항체에 대한 거부반응을 감소시키거나 또는 항체의 안정성을 증대시키기 위하여 천연형 항체의 일부를 변이시킨 형태의 변이항체 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 IgG 등의 천연항체, 항원에 대한 항체의 해리 상수값을 저하시키도록 변이된 변이항체, 항원과 직접적으로 결합하는 상보성 결정영역(CDR, complementarity determining region)을 포함하는 재조합 항체 또는 이들의 단편이 될 수 있다.

[49]

천연 항체의 경우, IgG 형태의 항체가 될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 서열번호 63의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 중쇄와 서열번호 64의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경쇄를 포함하는 IgG 형태의 항체가 될 수 있다. 아울러, 재조합 항체의 경우, scFv 형태의 항체가 될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 서열번호 2 내지 9의 아미노산 서열 중의 어느 하나를 포함하는 scFv 형태의 항체가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 서열번호 2, 4, 5 및 6의 아미노산 서열 중의 어느 하나를 포함하는 scFv 형태의 항체가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 2 또는 5의 아미노산 서열을 포함하는 scFv 형태의 항체가 될 수 있다.

[50]

또한, 항체를 구성하는 경쇄 및 중쇄의 측면에서 볼 때, 상기 항체는 서열번호 14의 경쇄 아미노산 서열 및 서열번호 23의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체; 서열번호 16의 경쇄 아미노산 서열 및 서열번호 25의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체; 서열번호 17의 경쇄 아미노산 서열 및 서열번호 26의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체; 서열번호 18의 경쇄 아미노산 서열 및

서열번호 27의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체 등이 될 수 있다.

- [51] 끝으로, 항체에 포함된 경쇄 및 중쇄를 구성하는 CDR의 측면에서 볼 때, 상기 항체는 (a) 서열번호 31의 경쇄 CDR1, 서열번호 35의 경쇄 CDR2 및 서열번호 39의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변부위; 및, 서열번호 43의 중쇄 CDR1, 서열번호 47의 중쇄 CDR2 및 서열번호 51의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변부위를 포함하는 항체, (b) 서열번호 32의 경쇄 CDR1, 서열번호 36의 경쇄 CDR2 및 서열번호 40의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변부위; 및, 서열번호 44의 중쇄 CDR1, 서열번호 48의 중쇄 CDR2 및 서열번호 52의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변부위를 포함하는 항체, (c) 서열번호 33의 경쇄 CDR1, 서열번호 37의 경쇄 CDR2 및 서열번호 41의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변부위; 및, 서열번호 45의 중쇄 CDR1, 서열번호 49의 중쇄 CDR2 및 서열번호 53의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변부위를 포함하는 항체, (d) 서열번호 34의 경쇄 CDR1, 서열번호 38의 경쇄 CDR2 및 서열번호 42의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변부위; 및, 서열번호 46의 중쇄 CDR1, 서열번호 50의 중쇄 CDR2 및 서열번호 54의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변부위를 포함하는 항체 등이 될 수 있다.

[52]

- [53] 본 발명의 용어 "단일 사슬 Fv 단편(scFv)"이란, 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 갖는 최소 항체 단편을 의미하는데, 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 부위가 폴리펩티드성 링커로 연결되거나 또는 연결되지 않은 것이 될 수 있고, 전통적인 하이브리도마 또는 파지 디스플레이 기술에 의하여 생산될 수 있다.

[54]

- [55] 본 발명의 용어, "폴리펩티드성 링커(linker)"란, 두개의 서로 다른 융합 파트너(예를 들어, 항체의 중쇄가변부위 및 경쇄가변부위 등)를 펩티드 결합 등을 이용하여 연결할 수 있는 연결체를 의미하는데, 단순히 각각의 융합 파트너를 연결하는 역할 이외에도, 융합파트너 사이에 일정한 크기의 간격을 부여하는 역할을 수행하거나 또는 융합체에 유연성 또는 강직성을 제공하는 힌지의 역할을 수행할 수도 있다. 또한, 생리학적 조건 또는 다른 표준 펩타이드 조건(예를 들면, 펩타이드 정제 조건, 펩타이드 저장 조건)하에서 적어도 하나의 이황화 결합에 참여할 수 있는 적어도 하나의 시스테인을 가질 수 있다.

- [56] 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩티드성 링커는 특별히 이에 제한되지 않으나, 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성된 링커가 1 내지 5개 반복된 형태의 폴리펩티드가 될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성된 링커가 3개 반복된 형태의 폴리펩티드가 될 수 있다.

[57]

- [58] 한편, 본 발명에서 제공하는 항체는, RANKL에 특이적으로 결합할 수 있는 한, 상기 아미노산 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에

변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다.

- [59] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신 및 히스티딘; 알라닌, 글라이신 및 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [60] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스 (hydropathic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스타인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5). 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [61] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트(+3.0 $\pm$ 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 $\pm$ 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4). 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에서 치환을 수행할 수 있다.
- [62] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York (1979)). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe,

Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Gln/Glu 간의 교환이다.

- [63] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다.
- [64] 본 발명의 용어 "실질적인 동일성"이란, 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 병렬하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 병렬된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 온라인(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html)을 통해 확인할 수 있다.
- [65]
- [66] 상술한 본 발명의 항체는 파골세포분화를 억제하는 효과를 나타낼 수 있다.
- [67] 본 발명의 용어 "파골세포(osteoclast)"란, 파골세포 전구체(osteoclast precursor)로부터 분화되는 세포로서 파골세포 전구세포들은 M-CSF 및 RANKL 존재 하에서 파골세포로 분화되며, 융합을 통해 다핵 파골세포(multinucleated osteoclast)를 형성한다. 파골세포는 $\alpha\beta3$ 인테그린(integrin) 등을 통해 골(bone)에 결합하며 산성 환경을 조성하는 한편 각종 콜라게네이즈(collagenase) 및 프로테아제(protease)를 분비하여 골 흡수(bone resorption)를 일으킨다. 파골세포는 완전히 분화된 세포로 증식하지 않으며 약 2주간의 수명이 다하면 세포 사멸(apoptosis)을 일으킨다.
- [68]
- [69] 본 발명의 일실시예에 의하면, 본 발명자들은 RANKL 특이항체로 1차 스크리닝된 항체 중에서 서열번호 2 및 5의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체 뿐만 아니라 IgG 형태의 항체가 마우스와 인간의 RANKL-유도성 BMMs의 파골세포분화를 용량 의존적으로 억제함을 확인하였다(도 1a 내지 1f).
- [70] 또한, RANKL-유도성 파골세포분화에 중요한 NF- κ B 신호전달 경로에서,

I κ B가 인산화되어 유비퀴틴 의존적인 방식으로 분해되는 바, 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체가 RANKL-유도성 I κ B α 의 인산화와 분해를 억제한다는 것을 확인하였다(도 2).

[71] 아울러, MAPK는 AP-1 활성화의 조절을 통해 RANK 신호전달에서 중요한 역할을 수행하는데, 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체가 MAPKs인 JNK, ERK 및 p38의 RANK-유도성 인산화를 유의하게 억제함을 확인하였다(도 3).

[72] 뿐만 아니라, RANKL은 c-Fos의 발현을 통해 AP-1을 활성화 시키고, NF- κ B/c-Fos 의존적인 NFATc1의 발현을 유도하여, BMMs의 파골세포로의 분화를 조절하는데, 본 발명의 일 실시예에서는, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체가 RANKL-유도성 c-Fos 및 NFATc1의 발현을 억제함을 확인하였다(도 4).

[73] 끝으로, 본 발명의 일 실시예에서, M-CSF 존재하에서 BMMs에 RANKL을 처리하면 액틴 링의 형성이 유도되고(도 5), 상기 RANKL이 처리된 BMMs를 dentine disc에서 배양할 경우 골 재흡수가 유도된다(도 6). 그러나, 상기 RANKL과 함께 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체를 처리하면 상기 RANKL에 의해 유도되는 액틴 링 형성과 골재흡수가 억제됨을 확인하였다.

[74] 이러한 결과를 통하여, 본 발명의 RANKL 항체는 골 재흡수-관련 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[75]

[76] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 RANKL-특이적 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[77]

[78] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 상기 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 경쇄를 암호화하는 서열번호 55의 폴리뉴클레오티드 서열 및 중쇄를 암호화하는 서열번호 56의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 경쇄를 암호화하는 서열번호 57의 폴리뉴클레오티드 서열 및 중쇄를 암호화하는 서열번호 58의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 경쇄를 암호화하는 서열번호 59의 폴리뉴클레오티드 서열 및 중쇄를 암호화하는 서열번호 60의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 경쇄를 암호화하는 서열번호 61의 폴리뉴클레오티드 서열 및 중쇄를 암호화하는 서열번호 62의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 등이 될 수 있다.

[79]

[80] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[81]

[82] 본 발명에서 제공하는 상기 RANKL-특이적 항체를 암호화하는

폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 바람직하게는 숙주세포에서 상기 폴리뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있으며, 보다 바람직하게는 파아지, 플라스미드, 코스미드, 미니-염색체, 바이러스, 레트로바이러스 벡터 등에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 형태가 될 수 있다.

[83]

[84] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 발현벡터가 도입되어 상기 RANKL-특이적 항체를 발현할 수 있는 형질전환체를 제공한다.

[85]

[86] 본 발명에서 제공하는 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현벡터가 도입되어 형질전환된 *E. coli*, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있고, 바람직하게는 포유류 동물 세포가 될 수 있다.

[87]

[88] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 RANKL-특이적 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[89]

[90] 본 발명의 RANKL-특이적 항체를 제조하는 방법은 (a) 상기 RANKL-특이적 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계; (b) 상기 수득한 폴리뉴클레오티드를 클로닝하여 발현벡터를 수득하는 단계; (c) 상기 수득한 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및, (d) 상기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 RANKL-특이적 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 수득한 폴리뉴클레오티드를 항체 불변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 결합하여 발현시킬 수도 있다.

[91]

RANKL-특이적 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위하여, 파지 디스플레이 기술을 이용한 항체 라이브러리로부터 수득할 수 있다. 파지 디스플레이 기술은 하이브리도마를 제작하지 않고 바로 B 림프구로부터 항체 유전자를 얻어 파지(phage) 표면에 항체를 발현시키는 방법이다. 파지 디스플레이 기술을 이용하면 B-세포 불멸화 (immortalization)에 의해 단일클론항체를 생성하는데 관련된 기존의 많은 어려움이 극복될 수 있다. 일반적인 파지 디스플레이 기술은 1) 파지의 외피 단백질(coat protein) pIII N-말단에 해당하는 유전자 부위에 무작위 서열의

올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 또는 유전자 라이브러리를 삽입하는 단계; 2) 천연형의 외피 단백질 일부와 상기 무작위 서열의 올리고뉴클레오티드 또는 유전자 라이브러리에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 융합 단백질을 발현시키는 단계; 3) 상기 올리고뉴클레오티드 또는 유전자 라이브러리에 의해 코딩된 폴리펩티드와 결합할 수 있는 수용체 물질을 처리하는 단계; 4) 수용체에 결합된 파아지 입자들을 낮은 pH나 결합 경쟁력 있는 분자를 이용하여 용출시키는 단계; 5) 패닝(panning)에 의하여 용출된 파아지를 숙주 세포 내에서 증폭시키는 단계; 6) 원하는 양을 얻기 위해 상기 방법을 반복하는 단계; 및 7) 패닝에 의해 선별된 파지 클론들의 DNA 서열로부터 활성이 있는 펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열을 결정하는 단계로 구성될 수 있다. 본 발명자의 이전 출원인 공개특허공보 제10-2009-0109193호에 기재된 항체 라이브러리를 이용할 수도 있다.

[92] 또한, 공지된 폴리뉴클레오티드 합성방법을 이용하여, 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 수득할 수도 있다.

[93]

[94] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 RANKL-특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 파골세포 분화 억제용 조성물 또는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[95]

[96] 상술한 바와 같이, RANKL에 의해 파골세포 전구체(osteoclast precursor)로부터 분화되는 파골세포는 생체내에서 과다하게 존재할 경우, 골 관련 질환을 유발시킬 수 있으므로, 본 발명에서 제공하는 항체를 이용하여 상기 파골세포의 분화를 유도하는 RANKL의 수준을 감소시키면, 파골세포의 과다한 분화를 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 이로 인하여 발생될 수 있는 골 관련 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 항체는 파골세포 분화 억제용 조성물 또는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있다.

[97]

[98] 파골세포(osteoclast)"란, 파골세포 전구체(osteoclast precursor)로부터 분화되는 세포로서 파골세포 전구세포들은 M-CSF 및 RANKL 존재 하에서 파골세포로 분화되며, 융합을 통해 다핵 파골세포(multinucleated osteoclast)를 형성한다. 파골세포는 $\alpha\beta 3$ 인테그린(integrin) 등을 통해 골(bone)에 결합하며 산성 환경을 조성하는 한편 각종 콜라게네이즈(collagenase) 및 프로테아제(protease)를 분비하여 골 흡수(bone resorption)를 일으킨다. 파골세포는 완전히 분화된 세포로 증식하지 않으며 약 2주간의 수명이 다하면 세포 사멸(apoptosis)을 일으킨다.

[99]

[100] 본 발명의 용어 "골 관련 질환"이란, 조골세포 및 파골세포의 불균형으로 인해 유발되어 골조직의 장애를 초래하거나 또는 골조직을 파괴하는 질환을

의미하는데, 상기 골 관련 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease), 전이성 골암(metastatic bone cancers) 등이 될 수 있다.

[101] 본 발명의 용어 "골다공증"이란, 남아 있는 뼈에는 구조상으로 아무런 이상이 없으면서 뼈를 형성하는 무기질과 기질의 양이 과도하게 감소되어 뼈에 스펀지 처럼 작은 구멍이 많이 나서 무르고 쉽게 부러지는 증상을 나타내는 질환을 의미하는데, 골조소증 또는 골소공증이라고도 한다.

[102] 본 발명의 용어 "골 관련 질환 치료"란 상기 골 관련 질환에 의한 증세를 호전하거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미하는데, 골 질환 증상의 감소, 개선, 그 증상의 고통 경감, 골 질환 발생을 감소 또는 치료결과를 증가시키는 환자의 어떠한 다른 변화를 모두 포함한다.

[103] 아울러, 본 발명의 골 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 적소두 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[104]

[105] 본 발명의 일 실시예에 따른 약학 조성물에 포함된 상기 RANKL-특이적 항체의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 1 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.

[106]

[107] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[108]

[109] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 상기 RANKL-특이적 항체를 포함하는 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 1 내지 20 mg/kg, 보다 바람직하게는 1 내지 10 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[110]

[111] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 RANKL-특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 골 관련 질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파골세포 분화를 억제하는 방법 또는 골 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[112]

[113] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 항체는 파골세포 분화 억제용 조성물 또는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있으므로, 상기 조성물은 파골세포 분화를 억제하거나 또는 골 관련 질환을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[114]

- [115] 본 발명에서 용어 "개체"란 골 관련 질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물을 제한 없이 포함한다.
- [116] 본 발명의 골 관련 질환을 치료하는 방법에 있어서, 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다. 그러나 경구 투여시, 상기 RANKL-특이적 항체를 구성하는 펩타이드가 소화되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[117]

발명의 실시를 위한 형태

[118]

- [119] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[120]

- [121] **실시예 1: RANKL-특이적 항체의 RANKL-유도성 파골세포분화억제 효과**

[122]

- [123] **실시예 1-1: 파골세포의 전구체 세포의 제작**

[124]

- [125] 파골세포의 전구체 세포인 BMMs를 4 내지 8주령의 C57BL/6 수컷 생쥐의 대퇴골과 경골로부터 분리하였다. 10% FBS, 100 units/ml 페니실린 및 100g/ml 스트렙토 마이신을 포함하는 α -최소배지(α -MEM)로 골수강으로부터 추출한 골수세포는 상온에서 1000rpm으로 원심분리하여 수득하고, 상기 세포는 동일한 배지에 현탁시켰다. 하루동안 방치한 다음, 부착되지 않은 세포를 수득하고, 10% FBS, 100 units/ml 페니실린, 100g/ml 스트렙토 마이신 및 20 ng/ml 재조합 인간의 M-CSF을 포함하는 α -최소배지에서 배양하였다. 삼일 후에, 부착된 세포를 파골세포의 전구체 세포로서 사용하였다.

[126]

- [127] **실시예 1-2: ScFv(Single Chain Fragment variable) 형태의 RANKL-특이적 항체의 파골세포 분화 억제 효과**

[128]

- [129] 먼저, 인간의 RANKL은 PeproTech Inc.에서 입수하였다. 상기 인간의 RANKL을 이용하여 공지된 방법에 따라 항체 파지 표면제시 라이브러리를 제조하고(대한민국특허등록 제961392호; Molecules and Cells, 2009, 27, 225-235),

서열번호 10 및 서열번호 11의 항원성 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 스크리닝하여, 서열번호 2 내지 9의 아미노산 서열을 가지는 ScFv(Single Chain Fragment variable) 형태의 항체를 각각 제조하였다.

[130]

[131] 그런 다음, 파골세포의 분화는 상기 파골세포의 전구체 세포인 BMMs를, 10% FBS 및 20 ng/ml M-CSF를 포함하는 α -MEM에 100ng/ml RANKL가 포함된 용액으로 지정된 시간동안 처리하여 수행하였다. 파골세포 분화 후, 48웰 플레이트에 있는 세포를 1X PBS로 2회 세척하고, 4% 포르말린을 사용하여 10분동안 고정하였으며, 사용자 매뉴얼에 따라, leukocyte acid phosphatase cytochemistry kit를 이용하여 염색하였다. 세개 이상의 핵을 포함하는 TRAP-양성 다핵세포(TRAP + MNCs)를 광학 현미경으로 관찰하고, 파골세포를 계수하였다.

[132] 이어, 대조군(FLG5, 서열번호 1) 또는 ScFv 형태의 RANKL 항체의 존재하에서, BMMs를 50ng/ml M-CSF를 포함하는 α -MEM 배지에 포함된 100ng/ml의 마우스(a) 또는 사람(b)의 RANKL로 5일동안 처리하였다. 상기 세포를 고정하고, TRAP 염색법을 수행하였으며, 광학 현미경으로 관찰하였다. 각 데이터는 세번의 독립적 실험결과를 나타낸다(도 1a 및 1b). 또한, 상기 a 및 b에서 3개 이상의 핵을 포함하는 TRAP-양성 다핵성 세포(TRAP+MNCs)의 수를 계수하였다(도 1c). 표시된 바와 같이 RANKL에 대한 다양한 비율의 ScFv 형태의 RANKL 항체의 존재하에서 BMMs를 50ng/ml M-CSF를 포함하는 α -MEM 배지에서 100ng/ml의 마우스(도 1d) 또는 사람(도 1e)의 RANKL로 5일동안 처리한 다음, 각 세포를 TRAP 용액으로 염색하고(상단 패널), 3개 이상의 핵을 포함하는 양성 다핵성 세포(TRAP+MNCs)를 계수하였다(하단 패널). 이때, 모든 값은 평균 $\pm$ SD로 표시하였다(도 1d 및 e).

[133] 도 1a는 마우스의 RANKL가 처리된 파골세포의 전구체 세포(BMMs)의 분화에 미치는 본 발명의 ScFv 형태의 항체의 효과를 나타내는 사진이고; 도 1b는 사람의 RANKL가 처리된 파골세포의 전구체 세포(BMMs)의 분화에 미치는 본 발명의 ScFv 형태의 항체의 효과를 나타내는 사진이며; 도 1c는 마우스 또는 사람의 RANKL가 처리되고, 본 발명의 ScFv 형태의 항체가 처리된 파골세포의 전구체 세포(BMMs)로부터 분화된 세포의 수를 나타내는 그래프이고; 도 1d는 파골세포의 전구체 세포(BMMs)에, 마우스의 RANKL와 본 발명의 ScFv 형태의 서열번호 2 및 5의 항체를 서로 다른 비율로 처리한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이며; 도 1e는 파골세포의 전구체 세포(BMMs)에, 사람의 RANKL와 본 발명의 ScFv 형태의 서열번호 2 및 5의 항체를 서로 다른 비율로 처리한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

[134]

[135] 상기 도 1a 내지 1e에서 보듯이, 대조군 항체인 FLG5는 마우스와 인간의 RANKL 모두에 의해 유도된 BMMs의 TRAP-양성 다핵성 파골세포분화에 영향을 주지 않았다(도 1a 내지 1c). 이에 비하여, 4개의 RANKL-특이적 항체인

서열번호 2, 4, 5 및 6의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체는 마우스와 인간의 RANKL 모두에 의해 유도된 BMMs의 파골세포분화를 유의하게 억제하였다(도 1a 내지 1c). 이들 중에서, 각각 서열번호 2 및 5의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체는 RANKL-유도성 파골세포분화에 대하여 지속적이고 용량의존적인 억제 효과를 나타내었다(도 1d 및 1e).

[136]

[137] 실시예 1-3: IgG 형태의 RANKL-특이적 항체의 파골세포 분화 억제 효과

[138]

[139] 상기 실시예 1-2에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 scFv 형태의 항체가 RANKL-유도성 파골세포분화에 대하여 지속적이고 용량의존적인 억제 효과를 나타내었으므로, 동일한 서열을 가지는 IgG 형태의 항체도 유사한 효과를 나타내는지 확인하고자 하였다.

[140] 먼저, 대조군(서열번호 1) 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 각각의 IgG 형태의 항체를 제작하였다. 이때, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 IgG 형태의 항체는 서열번호 63의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 중쇄와 서열번호 64의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경쇄를 포함한다.

[141] 그런 다음, BMMs에 50ng/ml M-CSF를 포함하는 α -MEM 배지를 가하고, 상기 배지에, 100ng/ml의 마우스 RANKL 및 상기 마우스 RANKL 대비 1:1, 1:5 및 1:10의 상기 각 IgG 형태의 항체를 처리한 다음, 4일 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 상기 BMMs를 고정시키고, TRAP 염색법을 수행하였으며, 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한, 상기 염색된 BMMs 중에서 3개 이상의 핵을 포함하는 TRAP-양성 다핵성 세포(TRAP+MNCs)의 수를 계수하였다(도 1f). 이때, 모든 값은 평균 $\pm$ SD로 표시하였다.

[142] 도 1f는 파골세포의 전구체 세포(BMMs)에, 마우스의 RANKL와 본 발명의 서열번호 2를 포함하는 IgG 형태의 항체를 서로 다른 비율로 처리한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 1f에서 보듯이, 대조군 항체를 처리한 경우에는, 마우스 RANKL에 의해 유도된 BMMs의 TRAP-양성 다핵성 파골세포분화에 영향을 주지 않았으나, RANKL-특이적인 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 IgG 형태의 항체는 scFv 형태의 항체와 마찬가지로 마우스 RANKL에 의해 유도된 BMMs의 파골세포분화를 유의적이고 용량의존적으로 억제함을 알 수 있었다.

[143]

[144] 실시예 2: RANKL 특이적 항체인 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 RANKL-유도성 NF- κ B 활성억제 효과

[145]

[146] 상기 RANKL에 대한 항체가 RANKL-유도성 NF- κ B 활성화를 억제하는지의 여부를 확인하기 위하여, BMM 세포에서 RANKL-유도성 NF- κ B 활성화에 대한 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 효과를 조사하고자

하였다. 이를 위하여, RANKL로 자극된 BMMs에서 I κ B α 의 인산화 및 분해에 대한 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 효과를 평가하였다.

[147] 구체적으로, BMMs를 일정시간 동안 대조군 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 존재하에서 RANKL(100 ng/ml) 및 M-CSF(20 ng/ml)에 노출시킨 다음, 상기 세포 파쇄물을 phospho-I κ B α , I κ B α 또는 β -액틴에 대한 항체를 이용한 면역블롯 분석에 적용하였다(도 2a). 또한, phospho-I κ B α 및 I κ B α 를 위한 화학적 발광신호를 정량하고, β -액틴의 것을 사용하여 정량화시켰다(도 2b). 이때, M-CSF는 R&D systems에서 입수하고, β -액틴에 대한 항체(#AB-6276)는 abcam에서 구입하였으며, phospho-I κ B α (#2859)는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)로부터 입수하고, I κ B α (#sc-371 AC)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc(Santa Cruz, CA, USA)에서 입수하였다.

[148] 도 2a는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 NF- κ B 활성화의 억제를 나타내는 사진이고; 도 2b는 본 발명의 구체적 실시예의 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 RANKL 항체에 의한 RANKL-유도성 NF- κ B 활성화의 억제를 나타내는 그래프이다. 도 2a 및 2b에서 보듯이, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체는 대조군 항체인 FLG5에 비하여 I κ B α 의 세린의 인산화 정도를 현저하게 감소시켰고, 이러한 효과는 I κ B α 분해속도의 감소를 수반함을 확인하였다. 이로부터, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체가 RANK 신호전달을 차단함에 의하여 RANKL-유도성 NF- κ B 활성화를 억제함을 알 수 있었다.

[149]

[150] 실시예 3: RANKL 특이적 항체인 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 RANKL-유도성 MAPK 활성화억제 효과

[151]

[152] 상기 RANKL 특이적 항체에 의해 MAPK의 RANKL-유도성 활성화가 영향을 받는지의 여부를 확인하였다.

[153] 구체적으로, BMMs를 일정시간 동안 대조군 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 존재하에서 RANKL(100 ng/ml) 및 M-CSF(20 ng/ml)에 노출시켰다. 그런 다음, 세포 파쇄물을 phospho-JNK, JNK1, phospho-p38, p38, phospho-ERK 또는 ERK2에 대한 항체를 이용한 면역블롯 분석에 적용하였다(도 3a). 또한, phospho-JNK, phospho-p38 및 phospho-ERK에 상응하는 화학적 발광신호를 정량하고, 각각 JNK, p38 및 ERK의 것을 사용하여 정량하였다(도 3b). 이때, phospho-JNK(#9251) 및 phospho-ERK(#9101)는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)로부터 입수하고, JNK1(#sc-474), ERK2(#sc-1647) 및 p38(#sc-7149)은 Santa Cruz Biotechnology, Inc(Santa Cruz, CA, USA)에서 입수하였다.

[154] 도 3a는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체에 의한 RANKL-유도성 MAPK 활성화의 억제를 나타내는 사진이고; 도 3b는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체에 의한 RANKL-유도성 MAPK 활성화의 억제를 나타내는 그래프이다. 도 3a 및 3b에서 보듯이, JNK, p38 및 ERK의 RANKL-유도성 인산화의 정도가 대조군 항체(FLG5)로 처리된 BMMs에 비하여 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체로 처리된 BMMs에서 유의하게 감소함을 알 수 있었다.

[155]

[156] 실시예 4: RANKL 특이적 항체인 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 RANKL-유도성 c-Fos와 NFATc1의 발현억제 효과

[157]

[158] RANKL은 파골세포분화에 핵심적인 역할을 하는 c-Fos와 NFATc1의 발현을 유도하므로, RANKL에 의해 자극된 BMMs에서 c-Fos 및 NFATc1의 발현에 대한 상기 RANKL 특이적 항체의 효과를 평가하였다.

[159] 먼저, BMMs를 일정시간 동안 대조군(FLG5) 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 존재하에서 M-CSF(20 ng/ml) 및 RANKL(100 ng/ml)과 반응시켰다. 세포 lysates에서 c-Fos(a) 및 NFATc1(b)의 함량은 이들에 대한 특이적인 항체를 사용한 면역블롯 분석을 이용하여 결정하였다(도 4a 및 4b). 이때, c-Fos(#sc-7202) 및 NFATc1(#sc-7294)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc(Santa Cruz, CA, USA)에서 입수하고, 면역블롯 분석은 다음과 같이 수행하였다: BMMs를 M-CSF의 존재하에서 RANKL(100 ng/ml)로 지정된 시간동안 자극하고, 대조군 또는 RANKL-특이적 항체로 처리하였다. 세포용해 완충액(150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, proteinase inhibitors(1mM AEBSF, 10g/ml of leupeptin 및 10g/ml aprotinin), phosphatase inhibitors(5mM NaF, 1mM Na3VO4 및 20mM 2-glyderolphosphate) 및 20 mM Tris-HCl, pH 7.5)에서 전체 세포 파쇄물을 수득하고, 이를 얼음에서 10분 동안 방치하였다. 10분 동안 원심분리하여 수득한 상층액을 SDS-PAGE에 적용하고, 0.45m NC 멤브렌(Whatman 10401196)으로 이동시킨 다음, 특이적인 항체로 면역블롯분석을 수행하였다.

[160] 도 4a는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체에 의한 c-Fos의 RANKL-유도성 발현의 억제를 나타내는 사진이다. 도 4a에서 보듯이, RANKL에 의한 c-Fos의 발현은 대조군 항체(FLG5)로 처리된 세포에 비하여 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체로 처리된 세포에서 유의하게 감소되었다.

[161] 또한, 도 4b는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체에 의한 NFATc1의 RANKL-유도성 발현의 억제를 나타내는 사진이다. 도 4b에서 보듯이, NFATc1의 발현은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체로 처리된 BMMs에서 매우 감소하여 거의 검출되지 않았다.

[162]

[163] 실시예 5: RANKL 특이적 항체인 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 RANKL-유도성 액틴 링 형성효과

[164]

[165] 성숙한 파골세포는 골 재흡수에 필요한 섬유성 액틴 링으로 구성된 청정여백(clear margin)을 포함하는 봉합영역(sealing zone)을 갖고 있으므로, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체가 액틴 링 형성과 골 재흡수를 억제할 수 있는지 확인하고자 하였다.

[166] 구체적으로, 대조군 항체(FLG5) 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체 존재하에서, RANKL(100 ng/ml) 및 M-CSF(20 ng/ml)로 BMMs를 5일동안 반응시켰다. 이어, 상기 세포를 PBS에 용해된 3.7% 포르말린으로 고정시키고, 0.1% Triton X-100로 투과시킨 다음, 20분 동안 Alexa Fluor 488-phalloidin으로 처리하였다. 그런 다음, PBS로 세척하고, 세포를 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 2분동안 처리한 후, 형광 현미경으로 영상을 촬영하였다(도 5).

[167] 도 5는 RANKL-자극된 BMMs에서 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체에 의한 액틴 링의 형성억제를 나타내는 현미경 사진이다. 도 5에서 보듯이, RANKL-유도성 파골세포는 대조군 항체(FLG5)의 존재하에서 청정여백을 가지는 액틴 링을 형성하는 반면, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 존재하에서는 상기 액틴 링의 형성이 거의 관찰되지 않음을 확인하였다.

[168]

[169] 실시예 6: RANKL 특이적 항체인 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 골 재흡수 억제효과

[170]

[171] 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체에 의한 액틴 링 형성의 억제가 파골세포의 재흡수 능력에 영향을 미치는지의 여부를 조사하기 위하여, 대조군 항체(FLG5) 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체 존재하에 BMMs를 M-CSF와 RANKL로 처리하여 dentine disc 상에서 파골세포로 분화시켰다.

[172]

[173] 구체적으로, 96웰 플레이트 내의 dentine disc(Immunodiagnostic Systems Ltd. Cat. AE-8050) 상에서 BMMs를 7일동안 대조군 항체(FLG5) 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체 존재하에 M-CSF(50 ng/ml) 및 RANKL(100 ng/ml)로 반응시켰다. 이어, 상기 세포를 면봉으로 긁어서 상기 dentine disc로부터 완전히 제거하고, 상기 dentine disc를 헤마톡실린 용액으로 염색한 다음, 광학현미경으로 40X의 배율로 사진을 촬영하고, 골 재흡수 피트의 영역을 Image-Pro Plus 4.5(Media Cybernetics)를 사용하여 분석하였다(도 6의

상단). 이때, 골 재흡수 피트의 영역은 Image-Pro Plus 4.5(Media Cybernetics)를 이용하여 측정하고, 측정된 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시하였다(도 6의 하단).

- [174] 도 6은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체에 의한 RANKL-유도성 골 재흡수의 억제를 나타내는 현미경 사진 및 그래프이다. 도 6에서 보듯이, 액틴 링 형성에서 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체의 억제효과에 부합하여, 골 재흡수 피트의 형성은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체에 의해 현저하게 억제되었다. 이러한 결과로부터 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 scFv 형태의 항체가 액틴 링의 형성 및 파골세포의 골 재흡수를 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

[175]

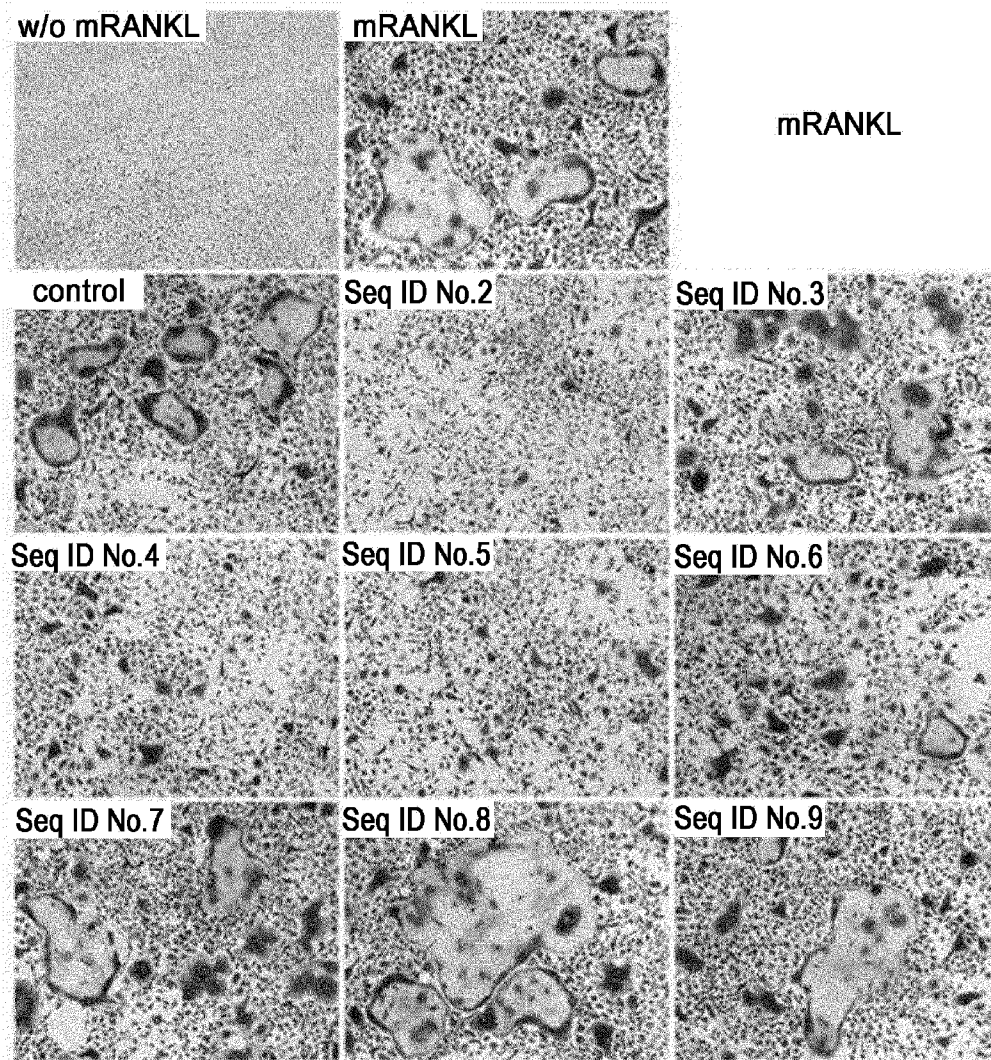
청구범위

- [청구항 1] RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 RANKL은 서열번호 10 또는 11의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
서열번호 14, 16, 17 및 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄와, 서열번호 23, 25, 26 및 27로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 것인 항체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 항체는, 서열번호 14의 경쇄 아미노산 서열 및 서열번호 23의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체, 서열번호 16의 경쇄 아미노산 서열 및 서열번호 25의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체, 서열번호 17의 경쇄 아미노산 서열 및 서열번호 26의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체 및 서열번호 18의 경쇄 아미노산 서열 및 서열번호 27의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 항체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 항체는, (a) 서열번호 31의 경쇄 CDR1, 서열번호 35의 경쇄 CDR2 및 서열번호 39의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변부위; 및, 서열번호 43의 중쇄 CDR1, 서열번호 47의 중쇄 CDR2 및 서열번호 51의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변부위를 포함하는 항체, (b) 서열번호 32의 경쇄 CDR1, 서열번호 36의 경쇄 CDR2 및 서열번호 40의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변부위; 및, 서열번호 44의 중쇄 CDR1, 서열번호 48의 중쇄 CDR2 및 서열번호 52의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변부위를 포함하는 항체, (c) 서열번호 33의 경쇄 CDR1, 서열번호 37의 경쇄 CDR2 및 서열번호 41의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변부위; 및, 서열번호 45의 중쇄 CDR1, 서열번호 49의 중쇄 CDR2 및 서열번호 53의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변부위를 포함하는 항체, 및 (d) 서열번호 34의 경쇄 CDR1, 서열번호 38의 경쇄 CDR2 및 서열번호 42의 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변부위; 및, 서열번호 46의 중쇄 CDR1, 서열번호 50의 중쇄 CDR2 및 서열번호 54의 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변부위를 포함하는 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 항체.

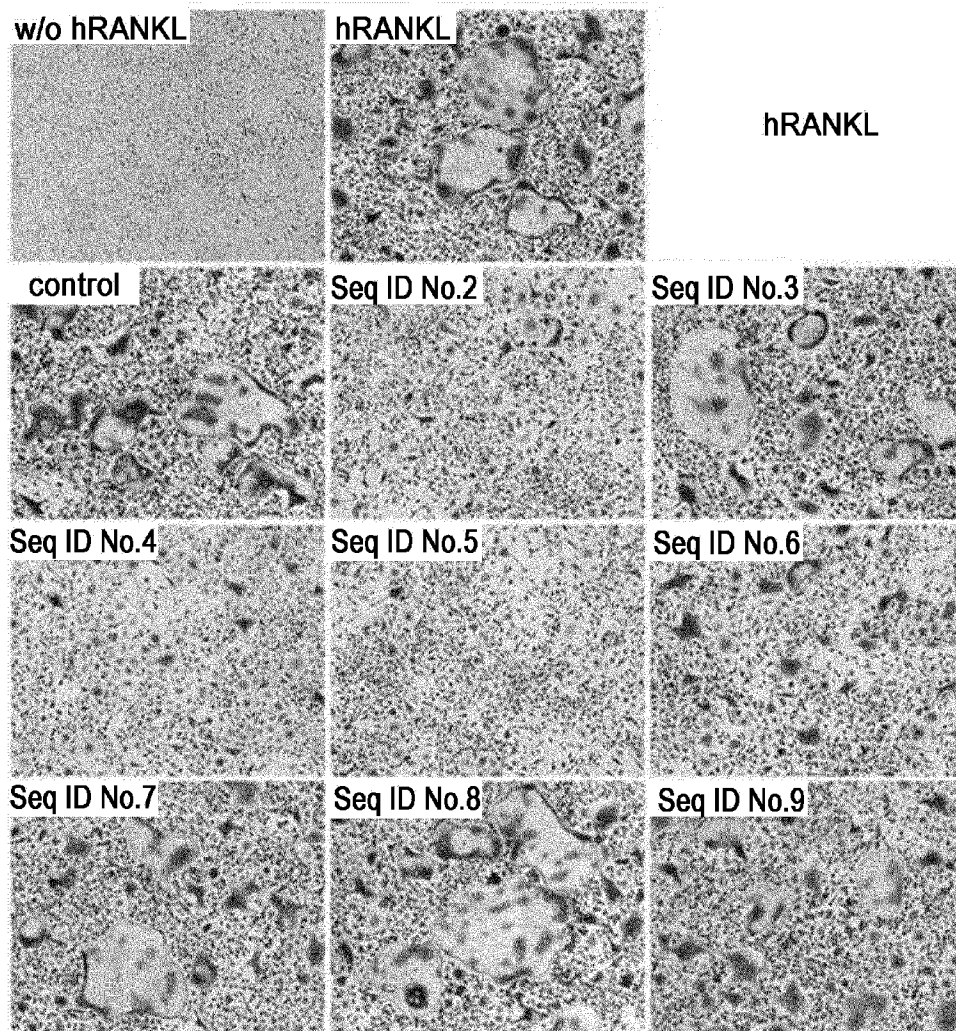
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 2 및 4 내지 6으로 구성된 군으로부터
선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항체는 IgG, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fab 단편, Fv 단편, rIgG
단편 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)의 형태인 것인 항체.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 IgG는 서열번호 63의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는
중쇄와 서열번호 64의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 경쇄를
포함하는 것인 항체.
- [청구항 9] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항체는 파골세포분화를 억제하는 것인 항체.
- [청구항 10] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체를 암호화하는
폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 55의 경쇄를 암호화하는
폴리뉴클레오티드 서열 및 서열번호 56의 중쇄를 암호화하는
폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 서열번호
57의 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열번호 58의
중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는
폴리뉴클레오티드, 서열번호 59의 경쇄를 암호화하는
폴리뉴클레오티드 서열 및 서열번호 60의 중쇄를 암호화하는
폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및
서열번호 61의 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열 및
서열번호 62의 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을
포함하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택되는 것인
폴리뉴클레오티드.
- [청구항 12] 제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.
- [청구항 13] 제12항의 발현벡터가 도입된 형질전환체.
- [청구항 14] (a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는
폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계;
(b) 상기 수득한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를
수득하는 단계;
(c) 상기 수득한 발현벡터를 숙주세포에 도입한 형질전환체를
수득하는 단계; 및
(d) 상기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 항체를 회수하는
단계를 포함하는, 항체의 제조방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,

- 상기 항체는 서열번호 2, 4, 5 및 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [청구항 16] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체를 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 골 관련 질환은 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 조성물.
- [청구항 18] 제16항의 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 골 관련 질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 19] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체를 유효성분으로 포함하는 파골세포 분화 억제용 조성물.
- [청구항 20] 제19항의 조성물을 파골세포 전구체(osteoclast precursor)에 처리하는 단계를 포함하는 파골세포의 분화를 억제하는 방법.

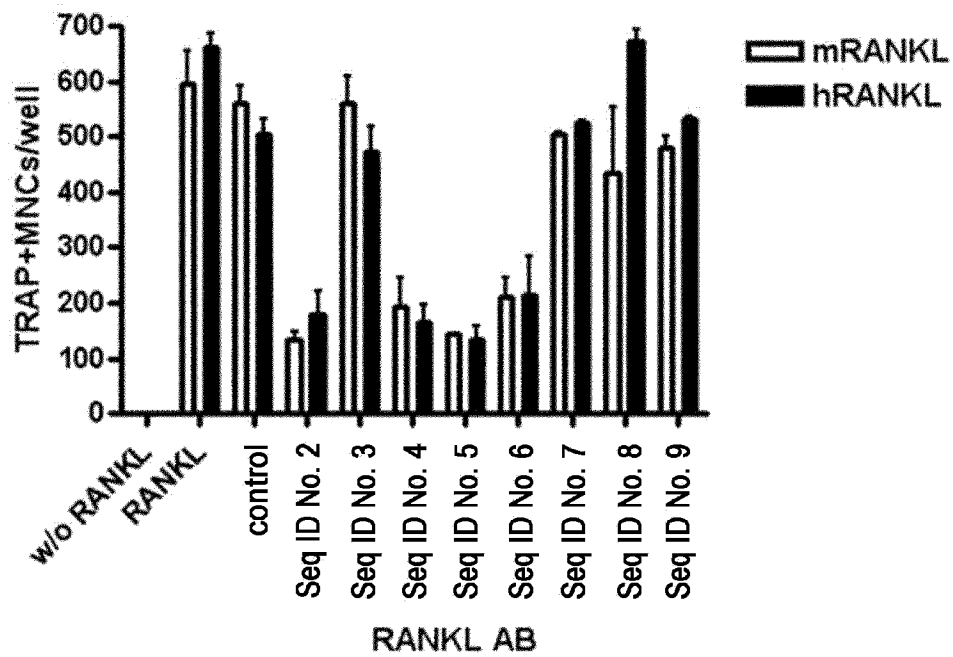
[Fig. 1a]



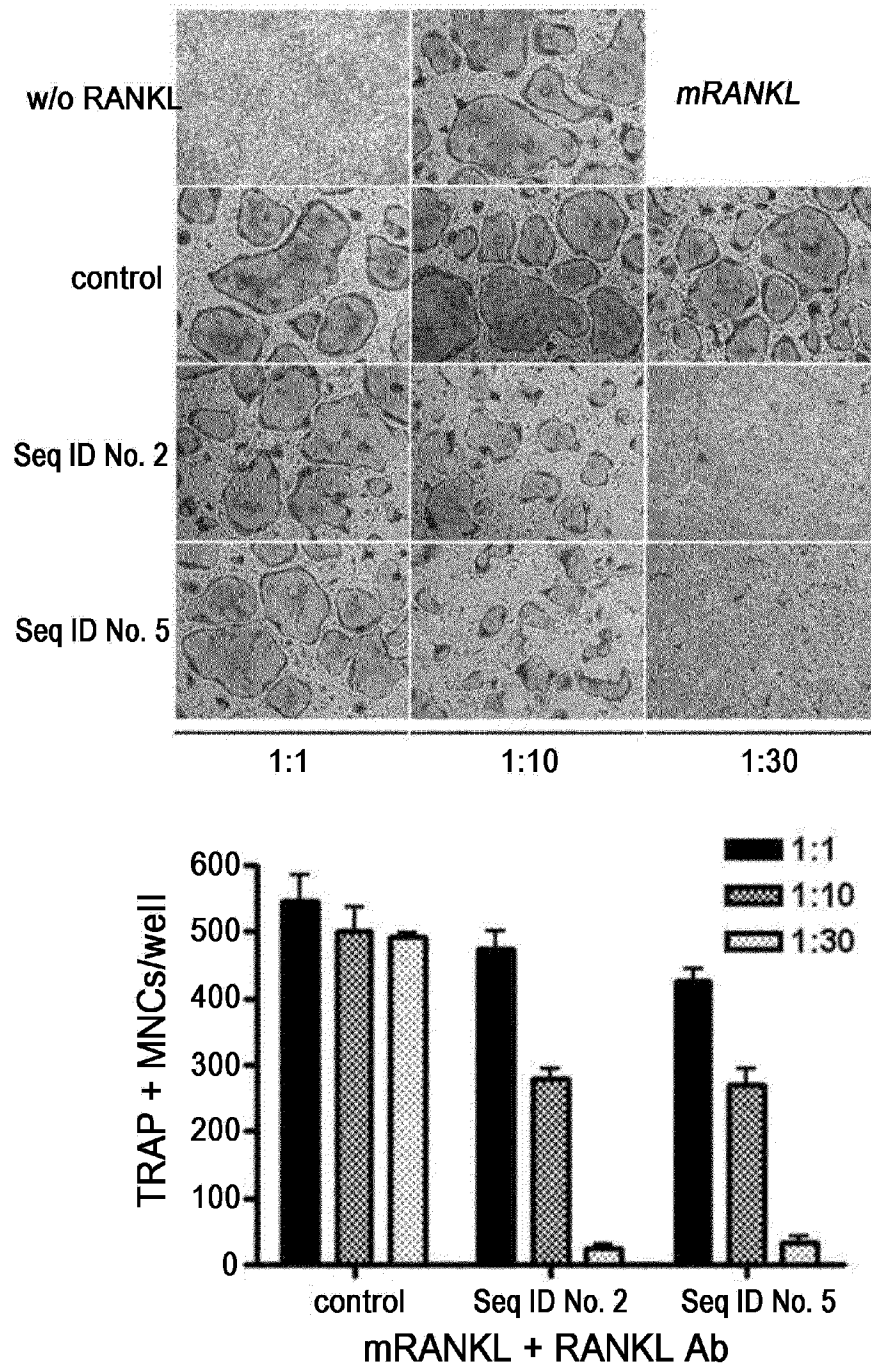
[Fig. 1b]



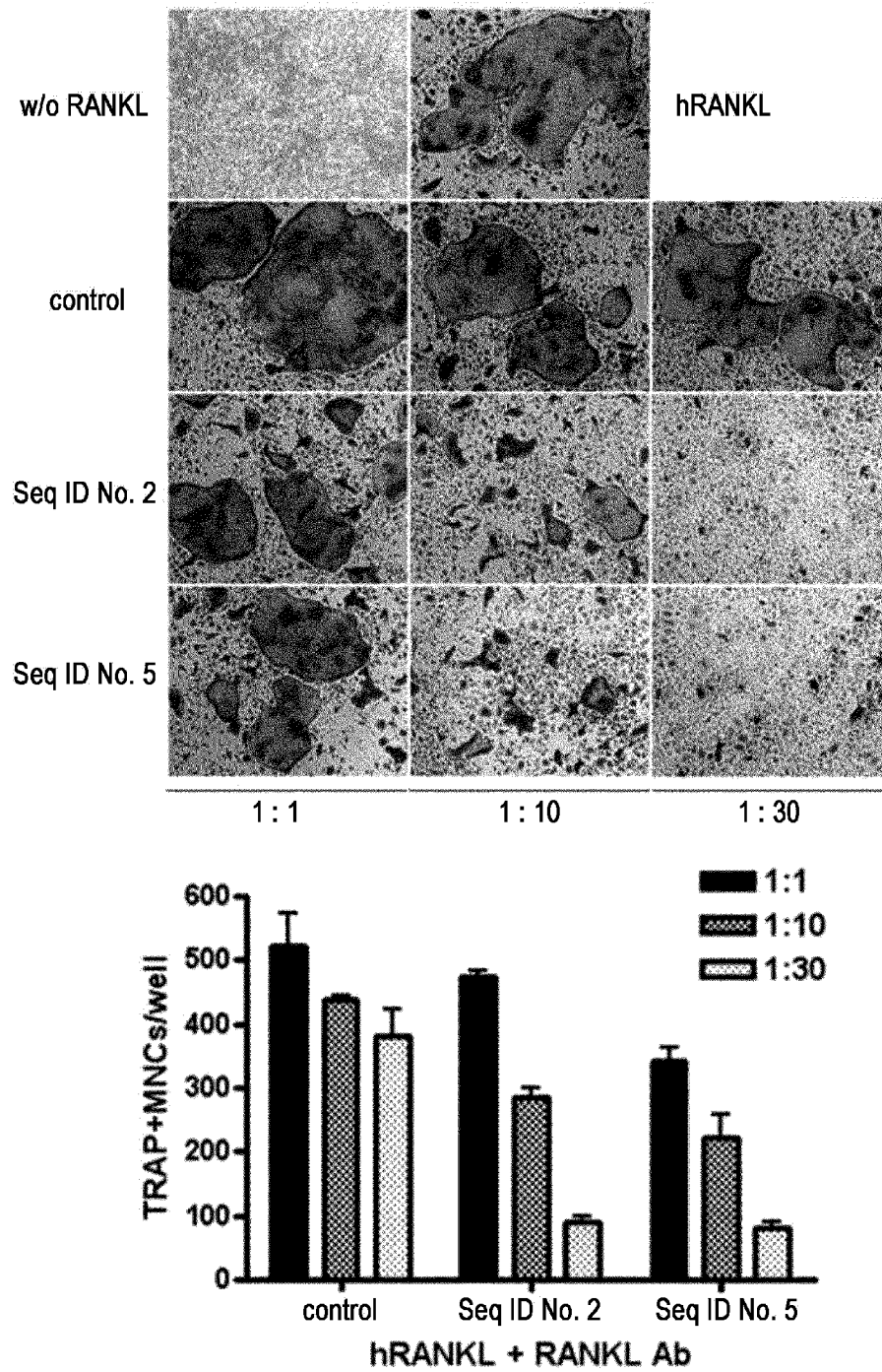
[Fig. 1c]



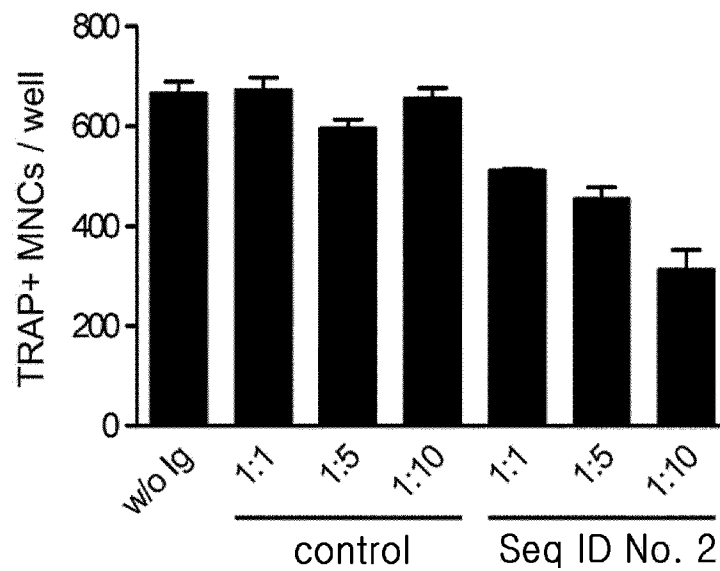
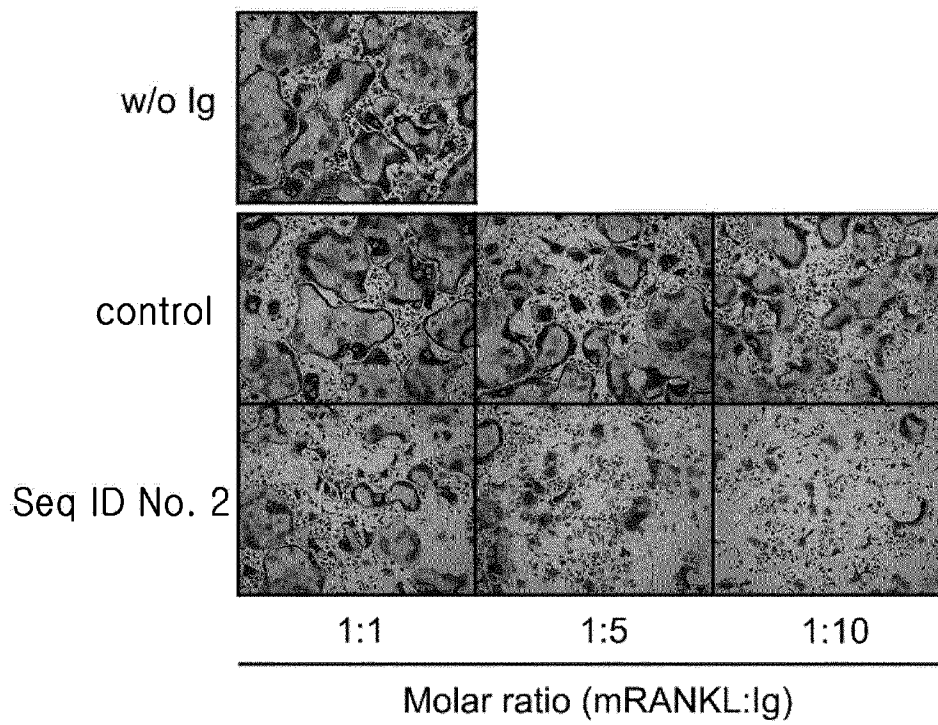
[Fig. 1d]



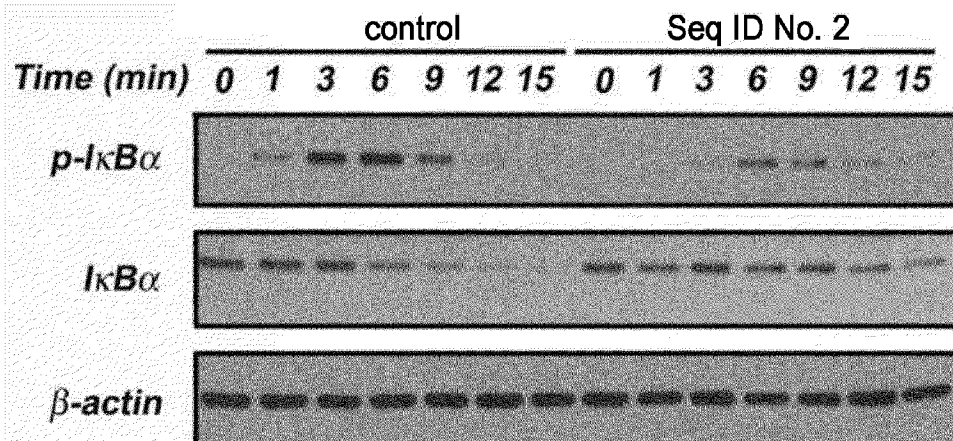
[Fig. 1e]



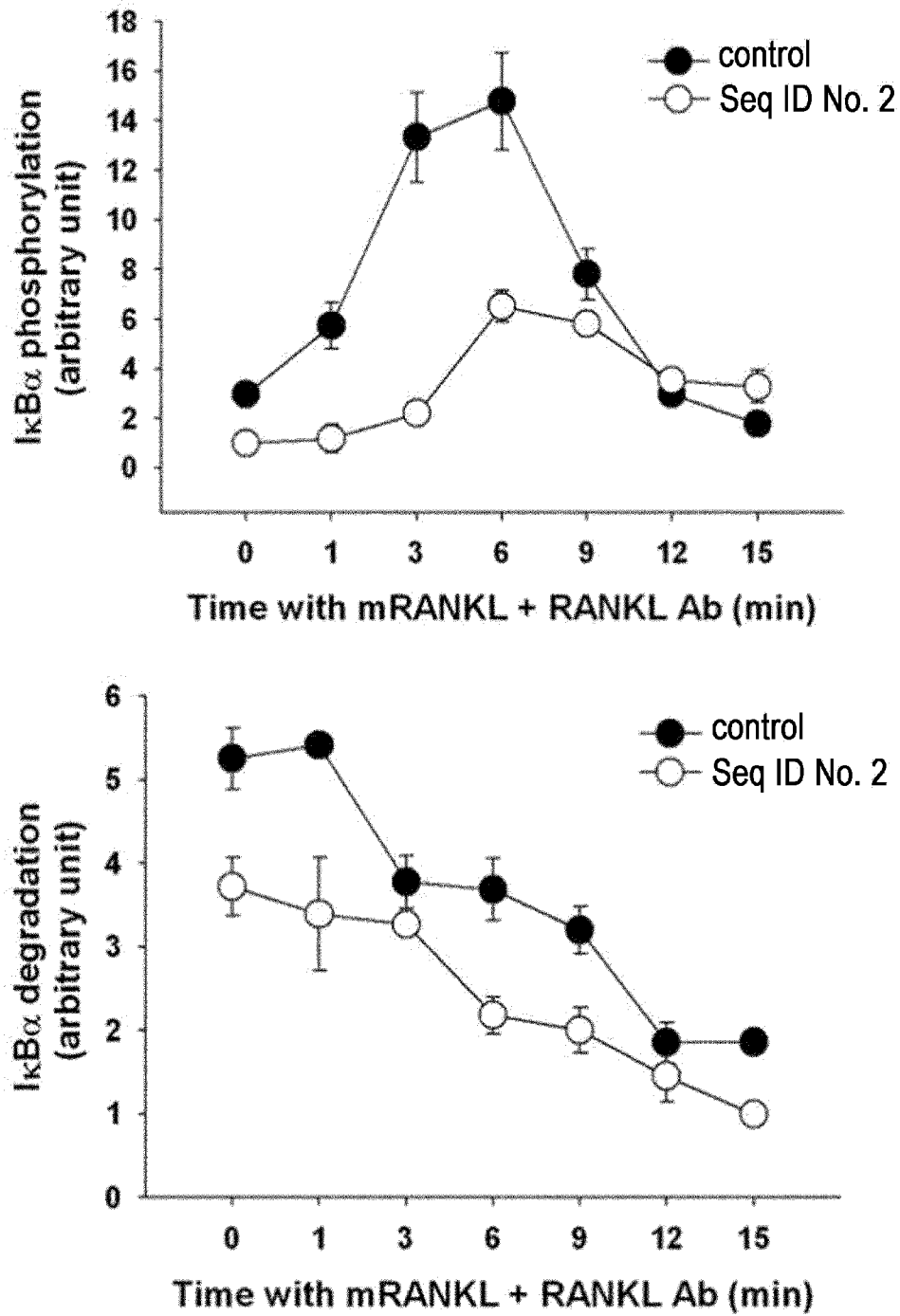
[Fig. 1f]



[Fig. 2a]



[Fig. 2b]



[Fig. 3a]

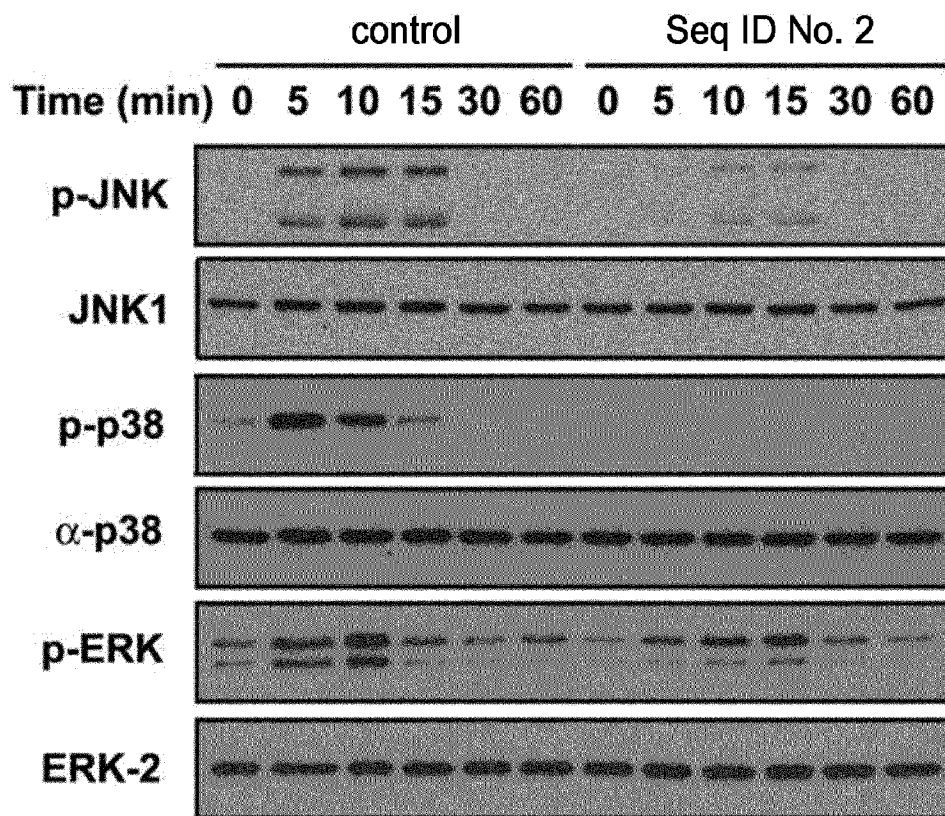
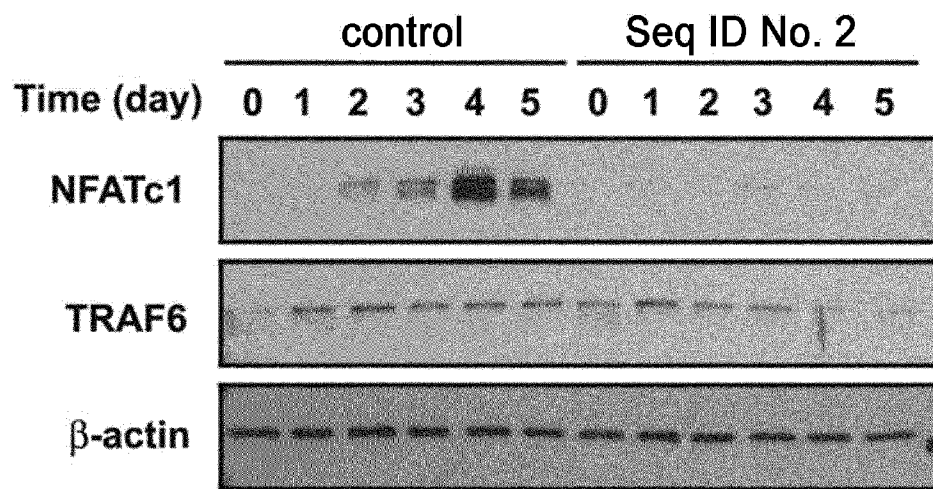


Figure 2 is a line graph showing ERK phosphorylation (arbitrary unit) on the y-axis (ranging from 0 to 8) versus Time with mRANKL + RANKL Ab (min) on the x-axis (ranging from 0 to 60 minutes). Two data series are plotted: control (filled circles) and Seq ID No. 2 (open circles). The control group shows a peak in ERK phosphorylation at 5 minutes, while Seq ID No. 2 shows a lower peak at 15 minutes.

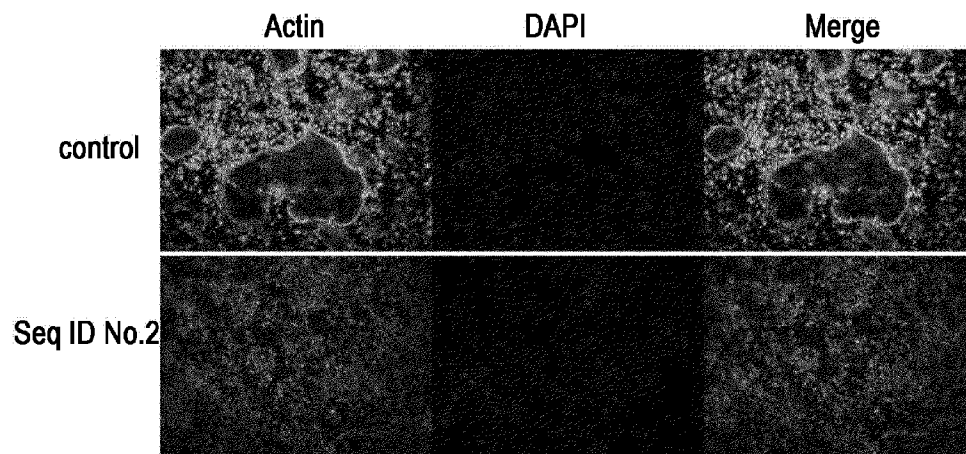
Time (min)	Control (ERK phosphorylation)	Seq ID No. 2 (ERK phosphorylation)
0	~2.5	~1.5
5	~7.0	~2.3
10	~6.0	~3.5
15	~3.2	~3.8
30	~2.0	~1.8
60	~2.5	~1.0

	control					Seq ID No. 2				
Time (hr)	0	4	8	12	24	0	4	8	12	24
α -c-Fos										
β -actin										

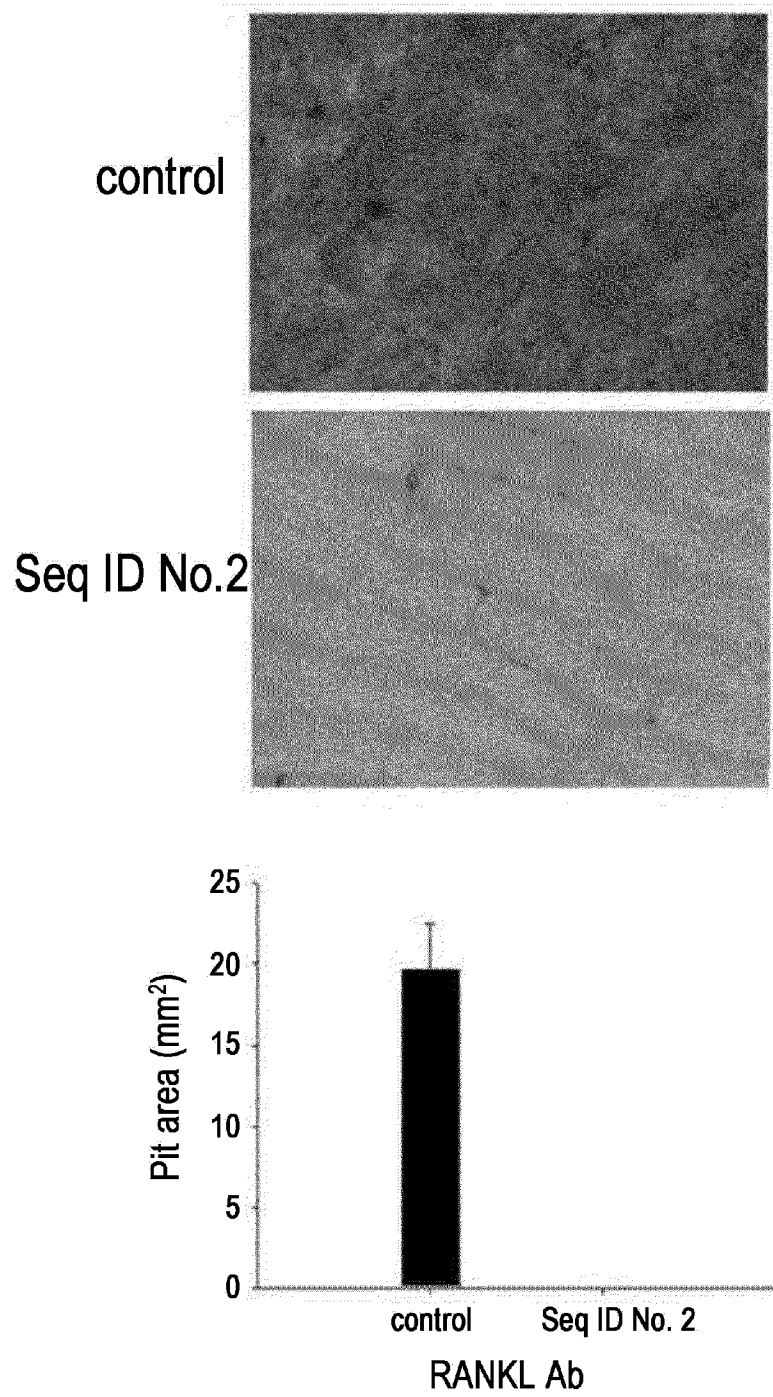
[Fig. 4b]



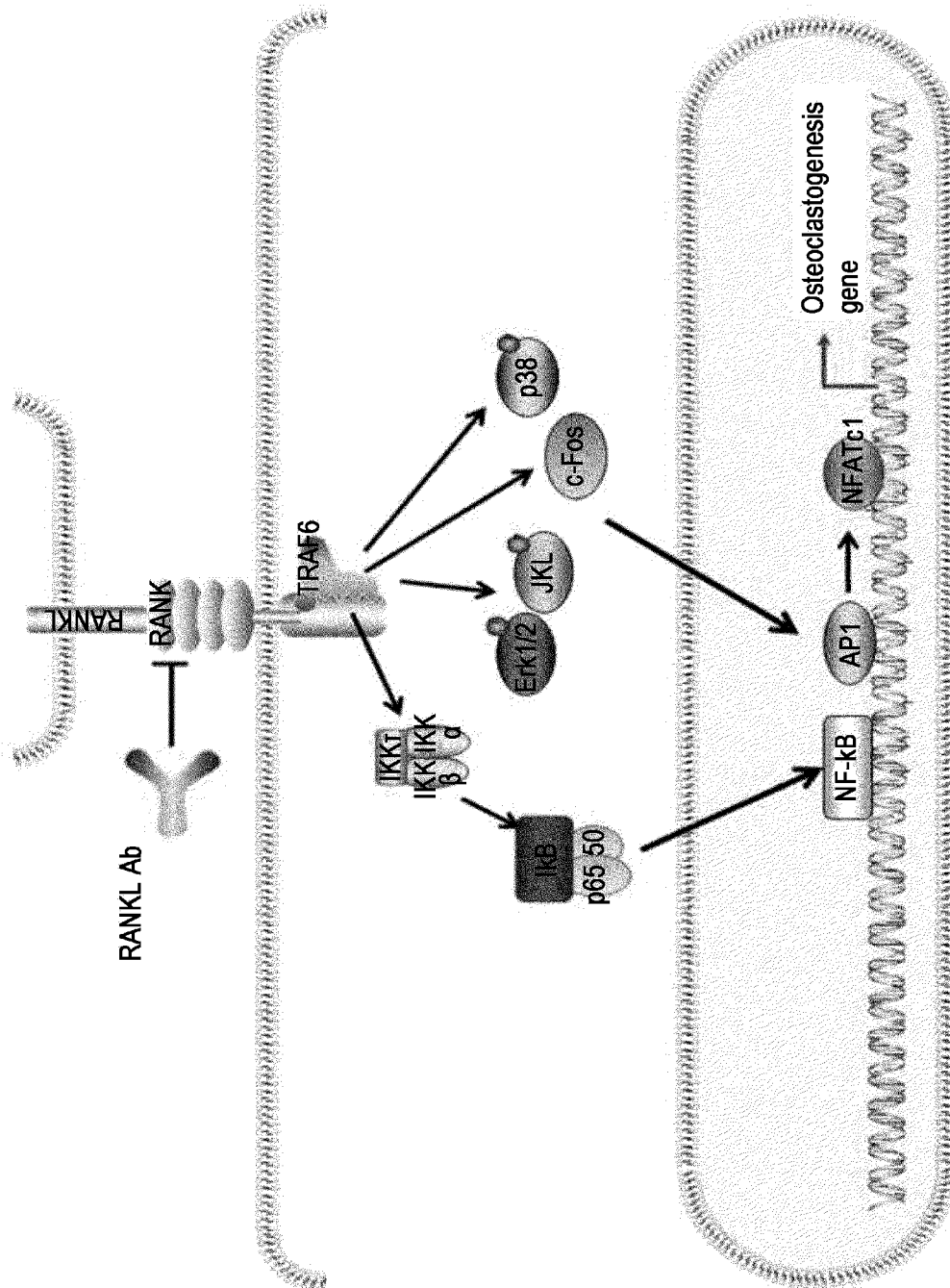
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004455**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 16/28(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 19/08(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 9/00; A61K 39/385; A61K; C12N 15/13; A61P 19/10; A61P 19/08

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: RANKL, receptor activator of NF-κB ligand, antibody, osteoclast, osteoclasts

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012-0114665 A1 (MARTIN, Joel H. et al.) 10 May 2012 See abstract; paragraphs [0003]-[0004] and [0029]; claims 1, 5, 8-10, 12, 17, 18-21 and 23-25.	1,7,9,10,12-14,16 ,17,19
A		2-6,8,11,15
X	US 7128911 B2 (BACHMANN, Martin F. et al.) 31 October 2006 See abstract; columns 4, 11 and 65; claims 1 and 10-13; sequence 83.	1,2,7,9,10,12-14 ,16,17,19
A		3-6,8,11,15
X	WO 2011-017294 A1 (SCHERING CORPORATION et al.) 10 February 2011 See abstract; claims 1, 9-11, 14, 18, 31-33, 45 and 53.	1,7,9,10,12-14,16 ,17,19
A		2-6,8,11,15
X	WO 02-092016 A2 (IMMUNEX CORPORATION) 21 November 2002 See abstract; pages 5-6; claim 1.	1,7,9,10,12-14,16 ,17,19
A		2-6,8,11,15
A	KR 10-2009-0077042 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 14 July 2009 See abstract; claims 1-2 and 5-6.	1-17,19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 SEPTEMBER 2013 (16.09.2013)

Date of mailing of the international search report

17 SEPTEMBER 2013 (17.09.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004455

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **18, 20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18 and 20 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

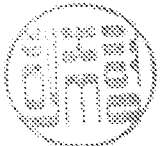
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/004455

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2012-0114665 A1	10/05/2012	AR 073072 A1 TW 201019959 A US 8414890 B2 UY 32061 A WO 2010-022120 A1	13/10/2010 01/06/2010 09/04/2013 26/03/2010 25/02/2010
US 7128911 B2	31/10/2006	US 2004-0033211 A1 US 2007-0117129 A1 US 7785873 B2	19/02/2004 24/05/2007 31/08/2010
WO 2011-017294 A1	10/02/2011	AR 077709 A1	14/09/2011
WO 02-092016 A2	21/11/2002	CA 2447518 A1 DE 02726901 T1 EP 1399175 A2 EP 1399175 A4 ES 2212930 T1 JP 2004-536056 A MX PA03010531 A US 2003-0017151 A1 WO 02-092016 A3	21/11/2002 15/07/2004 24/03/2004 30/11/2005 16/08/2004 02/12/2004 01/07/2004 23/01/2003 03/04/2003
KR 10-2009-0077042 A	14/07/2009	KR 10-1145337 B1	09/07/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/28(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 19/08(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 9/00; A61K 39/385; A61K ; C12N 15/13; A61P 19/10; A61P 19/08 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: RANKL, receptor activator of NF-κB ligand, 항체, 파골세포, osteoclasts		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	US 2012-0114665 A1 (MARTIN, JOEL H. 외 2명) 2012.05.10 요약; 문단 [0003]-[0004] 및 [0029]; 청구항 1, 5, 8-10, 12, 17, 18-21 및 23-25 참조.	1,7,9,10,12-14,16,17,19 2-6,8,11,15
X A	US 7128911 B2 (BACHMANN, MARTIN F. 외 2명) 2006.10.31 요약; 컬럼 4, 11 및 65; 청구항 1 및 10-13; 서열번호 83 참조.	1,2,7,9,10,12-14,16,17,19 3-6,8,11,15
X A	WO 2011-017294 A1 (SCHERING CORPORATION 외 1명) 2011.02.10 요약; 청구항 1, 9-11, 14, 18, 31-33, 45 및 53 참조.	1,7,9,10,12-14,16,17,19 2-6,8,11,15
X A	WO 02-092016 A2 (IMMUNEX CORPORATION) 2002.11.21 요약; 페이지 5-6; 청구항 1 참조.	1,7,9,10,12-14,16,17,19 2-6,8,11,15
A	KR 10-2009-0077042 A (재단법인서울대학교산학협력재단) 2009.07.14 요약; 청구항 1-2 및 5-6 참조.	1-17,19
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 09월 16일 (16.09.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 09월 17일 (17.09.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐ 서면

☒ 전자적 형태

b. 제출시기

☒ 출원시 국제출원에 포함

☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

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

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

1. ☒ 청구항: 18, 20
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제18항 및 제20항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 중속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0114665 A1	2012/05/10	AR 073072 A1 TW 201019959 A US 8414890 B2 UY 32061 A WO 2010-022120 A1	2010/10/13 2010/06/01 2013/04/09 2010/03/26 2010/02/25
US 7128911 B2	2006/10/31	US 2004-0033211 A1 US 2007-0117129 A1 US 7785873 B2	2004/02/19 2007/05/24 2010/08/31
WO 2011-017294 A1	2011/02/10	AR 077709 A1	2011/09/14
WO 02-092016 A2	2002/11/21	CA 2447518 A1 DE 02726901 T1 EP 1399175 A2 EP 1399175 A4 ES 2212930 T1 JP 2004-536056 A MX PA03010531 A US 2003-0017151 A1 WO 02-092016 A3	2002/11/21 2004/07/15 2004/03/24 2005/11/30 2004/08/16 2004/12/02 2004/07/01 2003/01/23 2003/04/03
KR 10-2009-0077042 A	2009/07/14	KR 10-1145337 B1	2012/07/09