(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0061033
(43) 공개일자 2022년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
G01N 33/573 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2021-0150585
(22) 출원일자 2021년11월04일
심사청구일자 2021년11월04일
(30) 우선권주장
1020200146788 2020년11월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
이진우
서울특별시 서초구 방배로26길 Elle Ville 402호
박광환
서울특별시 서초구 반포대로 310-6, 반포센트럴자이 102동 1001호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인유한회사

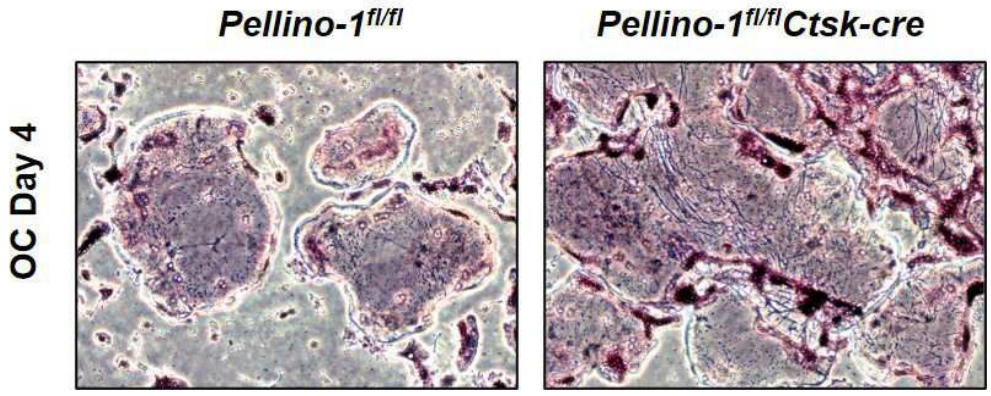
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **파골 세포 분화 조절용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 파골 세포의 분화 조절용 조성물에 관한 것으로, 골 대사 특히는 골수 세포의 파골 세포로의 분화를 조절을 통하여 골 항상성을 효과적으로 유지함으로써 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 38/43 (2013.01)
A61P 19/00 (2018.01)
A61P 19/10 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/573 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/10 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자
이경미
경기도 고양시 일산동구 노루목로 80, 315동 402호

정수진
경기도 고양시 덕양구 백양로 8, 옥빛마을 1708동 1704호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345320550
과제번호	2020R1I1A1A01054892
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	염증반응 억제 화합물을 이용한 이중작용성 골다공증 치료제의 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

Pellino-1(Protein pellino homolog 1)의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 골 관련 질환의 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 Pellino-1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 Pellino-1 유전자는 서열번호 2로 표시되는 핵산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA (peptide nucleic acid) 및 앱타머 (aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함하는, 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 골 관련 질환은 골다공증(osteoporosis), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골화석증(osteopetrosis), 골위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 페이젯병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 거대세포종 (giant cell tumor), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 암(cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절(fracture), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis), 및 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 종 이상인, 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 골 관련 질환은 골수 세포의 파골 세포로의 분화 조절 이상으로 발생하는 것인, 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 골 관련 질환의 진단용 키트.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드 (rapid) 키트 또는 MRM

(Multiple reaction monitoring) 키트인, 키트.

청구항 10

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, Pellino-1(Protein pellino homolog 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 골 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 생물학적 시료에서 측정된 Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 높을 경우, 상기 목적하는 개체에게 파골 세포의 분화 억제로 인한 골 관련 질환이 있는 것으로 예측하는 것인, 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 생물학적 시료에서 측정된 Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮을 경우, 상기 목적하는 개체에게 파골 세포의 과분화로 인한 골 관련 질환이 있는 것으로 예측하는 것인, 방법.

청구항 13

(a) 목적하는 개체로부터 얻어진 생물학적 시료에 대하여 Pellino-1(Protein pellino homolog 1)의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 측정부; 및

(b) 상기 측정부에서 측정된 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준으로부터 상기 목적하는 개체의 골 관련 질환의 발병 또는 발병 가능성 여부를 출력하는 검출부;를 포함하는 골 관련 질환의 진단기기.

청구항 14

Pellino-1(Protein pellino homolog 1)의 단백질; Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자; 및 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터;로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는, 파골 세포 분화 억제용 조성물.

청구항 15

Pellino-1(Protein pellino homolog 1)의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 포함하는, 파골 세포 분화 유도용 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 발현 수준을 감소시키는 제제는 단백질 활성 억제제 또는 유전자 발현 억제제인, 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 단백질 활성 억제제는 Pellino-1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앱타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 18

제 16항에 있어서,

상기 유전자 발현 억제제는 Pellino-1 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 19

Pellino-1(Protein pellino homolog 1)의 단백질; Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자; 및 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터;로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하는, 골 관련 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서,

상기 골 관련 질환은 골다공증(osteoporosis), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 페이젯병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 거대세포종 (giant cell tumor), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 암(cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절(fracture), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis), 및 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 종 이상인, 조성물.

청구항 21

제 19항에 있어서,

상기 골 관련 질환은 골수 세포의 파골 세포로의 과분화로 인한 것인, 조성물.

청구항 22

Pellino-1(Protein pellino homolog 1)의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 포함하는, 골 관련 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 골 관련 질환은 골화석증(osteopetrosis)인, 조성물.

청구항 24

제 22항에 있어서,

상기 골 관련 질환은 골수 세포의 파골 세포로의 분화 억제로 인한 것인, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 파골 세포 분화 조절용 조성물과 그의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대표적인 골 관련 질환인 골다공증은, 뼈를 흡수하는 파골 세포와 뼈를 형성하는 조골 세포의 골 항상성 조절 불균형으로 인해 발생하는 질환으로, 골절 위험성이 증가될 수 있는 약해진 골 강도를 특징으로 하는 골격 장애를 말한다(미국 국립보건원 정의 NIH, 2000).

[0003] 상기 골 항상성 조절의 불균형은 노화, 전신질환, 폐경 등의 원인으로 인하여 발생할 수 있으며, 골 밀도가 감소하고 골 조직의 미세구조가 퇴화해 골절 위험 증가를 보이는 전신 질환에 해당한다. 즉, 낡은 뼈의 소멸과 새로운 뼈의 생성이 균형 있게 유지되면서 골 밀도가 유지되는데 노화, 폐경 등으로 새로운 뼈의 대체가 원활히 이루어지지 않아 뼈가 엉성해지고 이런 과정이 반복되면서 뼈가 얇아지고 부러지거나 부서질 위험성이 커지게 되는 것이다.

[0004] 골다공증은 정상적인 활동을 유지하는데 뼈의 칼슘량이 줄어드는 등 필요한 골량이 감소되어, 즉, 골밀도가 감소되어 가벼운 충격에도 쉽게 골절이 유발되는 질환이다. 상기 골다공증으로 진행되기 전 상태를 골 감소증이라고 하며, 뼈의 두께 등이 계속 얇아지고 가벼워지면서 구멍이 뚫리기 전까지의 상태를 의미한다. 또한, 골연화증은 비타민 D가 부족하거나 칼슘을 대량으로 배설하는 신장 질환이 있는 경우 뼈에 칼슘이 섞이지 않아 물렁뼈

가 생겨버리는 상태로 뼈가 구부러지는 증상을 의미한다. 또한, 골 위축은 뼈의 퇴행 축소, 즉, 이미 완성된 골 조직의 골량이 줄어드는 증상을 의미한다.

[0005] 인체 내 뼈의 양은 조골세포와 파골세포의 균형에 의해 골 항상성 조절을 통해 유지되므로 이들 세포에서 중요한 역할을 하는 분자들을 표적으로 한 치료제 개발이 중요하다. 즉, 뼈를 형성하는 조골세포의 활성이 감소하고 뼈를 흡수하는 파골세포의 활성이 증가하게 되면, 뼈의 분해가 촉진, 뼈가 얇아지고 쉽게 부러지는 골다공증과 같은 질병이 일어나게 되므로, 조골 세포 및 파골 세포의 활성을 조절할 수 있는 단백질들이 골 질환의 치료제로서 연구되고 있다(Gregory R. Mundy, Journal of Bone and Mineral Metabolism (1996) 14:59-64; Chad Deal, nature clinical practice RHEUMATOLOGY (2009) vol 5 no 1; Kalervo Vaananen, Advanced Drug Delivery Reviews 57 (2005) 959-971). 건강한 뼈를 유지하기 위한 전반적인 메커니즘을 제어할 수 있고, 장시간 복용해도 효과가 있으며, 부작용이 없는 골 질환 관련 치료제 약물 개발이 절실한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 골 관련 질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 골 관련 질환의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 골 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 골 관련 질환을 진단하는 기기를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 파골 세포 분화 조절하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 골 관련 질환을 치료하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0014] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 골 관련 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0017] 본 발명에서 상기 진단용 조성물은 Pellino-1 (Protein pellino homolog 1)의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 상기 Pellino-1 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 제제는 Pellino-1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA (peptide nucleic acid) 및 앱타머 (aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 상기 "항체"는 Pellino-1 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미하며, 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않지만 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면, 항체의 일부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의

특수 항체가 포함될 수 있고, 상기 항체는 2 개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 뿐 만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab') 2, Fv 등이 해당될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에서 상기 "올리고펩타이드"는 펩타이드로 2 내지 20 개의 아미노산으로 구성되며 디 펩티드, 트리 펩티드, 테트라 펩티드 및 펜타 펩티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명에 상기 "PNA (Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991 년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.

[0022] 본 발명의 상기 "앱타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, Pellino-1 단백질에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앱타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3 차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앱타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 앱타머는 RNA, DNA, 변형된 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상일 수 있다.

[0023] 본 발명의 상기 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당 업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA (peptide nucleic acid), LNA (locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 "LNA (Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오티드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오티드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적 서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA 올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오티드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 Pellino-1 단백질이나, 이들을 암호화하는 유전자의 정보는 공지되어 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

[0029] 본 발명의 상기 진단용 조성물은, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 Pellino-1 단백질 또

는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 대조군과 비교하여 그 발현 수준의 증감 여부를 확인함으로써, 골 관련 질환을 진단할 수 있다.

[0030] 본 발명의 상기 Pellino-1 단백질은 Wing, FHA 도메인 및 RING 유사 도메인을 포함하는 효소를 말하며, IRAK1 및 TBK1을 유비퀴틴화하는 것으로도 알려져 있다. 유비퀴틴화는 다양한 단백질의 활성을 조절하는 번역 후 변형 과정 중의 하나이며, 유비퀴틴 접합 캐스케이드는 유비퀴틴 활성화 효소 (E1), 유비퀴틴-접합 효소 (E2) 및 유비퀴틴-단백질 리가아제 (E3)의 세 가지 효소 구성 요소의 도움으로 진행된다. Pellino-1은 주로 키나제 수용체-상호 작용 단백질 1 (kinase receptor-interacting protein 1; RIP1), IRAK 및 NF-κB (nuclear factor-κB)의 유비퀴틴화를 촉진함으로써 Toll- 유사 수용체 (TLR) 및 인터류킨-1 수용체 (IL-1R) 신호 전달 경로에서 신호 복합체 형성을 촉진하는 것으로 잘 알려져 있다. 또한, 유형 I 인터페론 (type 1 interferons; IFNs)의 TRIF 의존 유도를 매개한다. 전염증성 사이토카인은 파골 세포 분화를 유도하고 조골 세포 성숙을 억제한다. 상기 Pellino-1의 아미노산 서열 및 이를 암호화하는 핵산 염기 서열은 각각 서열번호 1과 서열번호 2로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서 상기 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 보다 상세하게는 골 관련 질환을 판정하는 것으로서, 특히는 골수 세포의 파골 세포로의 분화 조절 이상으로 발생하는 질환을 판정하는 것을 말한다.

[0032] 본 발명에서 상기 골 관련 질환은 신체 내에서 뼈를 생성하는 역할을 하는 조골 세포 (osteoblast)와 뼈를 파괴하는 역할을 하는 파골 세포 (osteoclast) 간의 활성에 조화가 깨어지게 되면서 초래될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 상기 파골 세포 (osteoclast)는 뼈가 성장하는 과정에서 불필요하게 된 뼈조직을 파괴 또는 흡수하는 대형의 다핵 세포이며, 성숙된 파골 세포는 다핵 세포이며 조혈모세포를 기원으로 분화되어 형성된다. 또한, 중간엽 간세포에서 분화된 조골세포는 약 34 개월간 생존하여 활성화된 파골 세포가 낡은 뼈를 분해시킨 자리에서 새로운 뼈를 형성하고, 수많은 조골 세포가 골 기질을 만들어 기질이 무기질화되는 과정을 통하여 골 형성이 완성된다. 이와 같은 골 형성이 완성된 후 조골세포의 약 70 % 이상은 사멸되고 일부는 골세포 (osteocyte) 및 골 표면 세포 (bone lining cell)로 분화되어 생존하는데, 이와 같은 항상성이 지속적으로 불균형을 이루는 경우에 골 관련 질환이 발생할 수 있다.

[0034] 본 발명의 목적상 상기 골 관련 질환의 진단용 조성물은 기존에 보고된 것과는 달리 파골 세포의 분화와 관련한 새로운 표적으로 Pellino-1을 타겟으로 함으로써, 파골 세포의 분화 조절과 관련한 골 관련 질환의 진단에 더욱 효과적이다.

[0035] 본 발명에서 상기 골 관련 질환은 골다공증 (osteoporosis), 골연화증 (osteomalacia), 골감소증 (osteopenia), 골화석증 (osteopetrosis), 골위축 (bone atrophy), 섬유성골이형성증 (fibrous dysplasia), 페이젯병 (Paget's disease), 고칼슘혈증 (hypercalcemia), 거대세포종 (giant cell tumor), 뼈의 종양성 파괴 (neoplastic destruction), 암 (cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절 (fracture), 골용해 (osteolysis), 골관절염 (osteoarthritis), 및 류머티스 관절염 (rheumatoid arthritis)으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에서 상기 골다공증은 노화에 의한 원발성 골다공증, 폐경에 의한 원발성 골다공증, 및 난소 적출술에 의한 원발성 골다공증, 글루코코르티코이드 유발성 골다공증, 갑상선 기능 항진성 골다공증, 고정 유발성 골다공증, 헤파린 유발성 골다공증, 면역 억제 유발성 골다공증, 신부전에 따른 골다공증, 염증성 골다공증, 쿠싱 증후군에 따른 골다공증, 류마티스성 골다공증, 및 에스트로젠 합성 억제제에 의한 골다공증으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 상기 조성물을 포함하는 골 관련 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.

[0039] 본 발명의 상기 키트는 본 발명의 상기 조성물을 사용하여 목적하는 개체에서 대조군에 비하여 Pellino-1의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 높거나 낮은 수준으로 존재하는 경우, 골 관련 질환이 있는 것으로 예측할 수 있다. 바람직하게는, Pellino-1의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 높거나 낮은 수준으로 존재하는 경우에 골수 세포의 파골 세포로의 분화 조절에 이상이 있는 것으로 예측할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 상기 "대조군"은 정상 대조군일 수 있으며, 보다 구체적으로 골 관련 질환이 없는 것으로 확인된 환자의 혈청 샘플로부터 수득된 것일 수 있고, 골 밀도 검사, 초음파 및 CT를 실시하고 골 관련 질환이 없는 것으로 최종적으로 확인된 환자의 Pellino-1의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준의 평균 내지 중간 값일 수 있다. 대조군에서의 마커 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현량과 분석 대상이 되는 골 관련 질환 발병 환자 유래의 생물학적 시료에서의 마커 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현량을 비교할 수 있으며, 상기 발현량의 유의한 변화 여부를 판단하여 골 관련 질환을 진단할 수 있다.

[0041] 본 발명의 상기 키트는 본 발명의 상기 조성물을 사용하여 목적하는 개체에서 Pellino-1의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군보다 높은 경우, 상기 목적하는 개체가 파골 세포의 분화 억제로 인한 골 관련 질환이 있는 것으로 예측할 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명의 상기 키트는 본 발명의 상기 조성물을 사용하여 목적하는 개체에서 Pellino-1의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군보다 낮은 경우, 상기 목적하는 개체가 파골 세포의 과분화로 인한 골 관련 질환이 있는 것으로 예측할 수 있다.

[0043] 본 발명의 상기 진단용 키트에서, Pellino-1의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 골 관련 질환 등에 관한 기재는 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0044] 본 발명의 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드 (Rapid) 키트 또는 MRM (Multiple reaction monitoring) 키트 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산 서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오티드로써, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수 (DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한, ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2 차 항체, 발색단 (chromophores), 효소 (예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명의 진단용 키트에서 항원-항체 결합반응을 위한 고정체로는 니트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐 (polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌 (polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트 (Well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 또한, 본 발명의 진단용 키트에서 2 차 항체의 표지체는 발색 반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP (horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소 (alkaline phosphatase), 콜로이드 골드 (coloid gold), FITC (폴리 L-라이신-플루오르세인 아이소티오시아네이트), RITC (로다민-B-아이소티오시아네이트) 등의 형광 물질 (fluorescein) 및 색소 (dye) 등의 표지체가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 또한, 본 발명의 진단용 키트에서 발색을 유도하기 위한 발색 기질은 발색 반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB (3,3',5,5'-테트라메틸 베지딘), ABTS [2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)], OPD (o-페닐렌다이아민) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충 용액 (0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색 기질은 이차 항체 접합체의 표지체로 사용된 HRP에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고, 이 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 상기 마커 단

백질들의 존재 유무를 검출한다.

[0051] 본 발명의 진단용 키트에서 세척액은 인산염 완충 용액, NaCl 및 트윈 20 (Tween 20)을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충 용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05 % 트윈 20으로 구성된 완충 용액 (PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합 반응 후 항원-항체 결합체에 2 차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 첨가하여 3 내지 6 회 세척한다. 반응 정지 용액은 황산 용액 (H_2SO_4)이 바람직하게 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 골 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0054] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, Pellino-1 (Protein pellino homolog 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.

[0055] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 골 관련 질환의 유무를 선별하기 위한 것일 수 있다.

[0056] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명에서 상기 "인간"은 골 관련 질환이 발생하였거나 그 발생이 의심되는 자로, 파골 세포 분화 조절 이상에 따라 골 관련 질환의 적절한 치료가 필요하거나 예상되는 환자를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명의 상기 "생물학적 시료"는 골 관련 질환이 발생한 환자이거나 골 관련 질환의 발생이 의심되어 파골 세포 분화 조절 이상이 의심되는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈 (whole blood), 백혈구 (leukocytes), 말초혈액 단핵 세포 (peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층 (buffy coat), 혈장 (plasma) 및 혈청 (serum)을 포함하는 혈액, 객담 (sputum), 눈물 (tears), 점액 (mucus), 세비액 (nasal washes), 비강 흡인물 (nasal aspirate), 호흡 (breath), 소변 (urine), 정액 (semen), 침 (saliva), 복강 세척액 (peritoneal washings), 골반 내 유체액 (pelvic fluids), 낭종액 (cystic fluid), 뇌척수막 액 (meningeal fluid), 양수 (amniotic fluid), 선액 (glandular fluid), 췌장액 (pancreatic fluid), 림프액 (lymph fluid), 흉수 (pleural fluid), 유두 흡인물 (nipple aspirate), 기관지 흡인물 (bronchial aspirate), 활액 (synovial fluid), 관절 흡인물 (joint aspirate), 기관 분비물 (organ secretions), 세포 (cell), 세포 추출물 (cell extract) 또는 뇌척수액 (cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명의 상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계는 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 단백질 칩 분석, 면역 측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF (Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석 (liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS (liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA (enzyme linked immunosorbentassay)에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 역전사 중합효소반응 (RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응 (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection assay; RPA), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 또는 DNA 칩에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명의 상기 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에서, Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 발현 수준을 측정하는 제제, 골 관련 질환 등에 대한 기재는 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0062] 본 발명의 상기 방법은 상기 생물학적 시료에서 측정된 Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 높거나 낮을 경우 상기 목적하는 개체에게 골 관련 질환이 있는 것으로 예측할 수

있다. 보다 바람직하게는, Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군보다 높거나 낮은 경우에 파골 세포의 분화 조절 이상으로 인한 골 관련 질환이 있는 것으로 예측할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명의 상기 방법은 상기 생물학적 시료에서 측정된 Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 높을 경우 파골 세포의 분화 억제로 인한 골 관련 질환이 있는 것으로 예측할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명의 상기 방법은 상기 생물학적 시료에서 측정된 Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮을 경우 파골 세포의 과분화로 인한 골 관련 질환이 있는 것으로 예측할 수 있다.

[0065] 본 발명에서 상기 골 관련 질환은 골다공증 (osteoporosis), 골연화증 (osteomalacia), 골감소증 (osteopenia), 골화석증 (osteopetrosis), 골위축 (bone atrophy), 섬유성골이형성증 (fibrous dysplasia), 페이젯병 (Paget's disease), 고칼슘혈증 (hypercalcemia), 거대세포종 (giant cell tumor), 뼈의 종양성 파괴 (neoplastic destruction), 암 (cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절 (fracture), 골용해 (osteolysis), 골관절염 (osteoarthritis), 및 류머티스 관절염 (rheumatoid arthritis)으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 파골 세포의 분화 억제로 인한 골 관련 질환의 예시로는 골화석증 (osteopetrosis)을 포함할 수 있고, 파골 세포의 과분화로 인한 골 관련 질환의 예시로는 골다공증 (osteoporosis), 골연화증 (osteomalacia), 골감소증 (osteopenia), 골위축 (bone atrophy), 섬유성골이형성증 (fibrous dysplasia), 페이젯병 (Paget's disease), 고칼슘혈증 (hypercalcemia), 거대세포종 (giant cell tumor), 뼈의 종양성 파괴 (neoplastic destruction), 암 (cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절 (fracture), 골용해 (osteolysis), 골관절염 (osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염 (rheumatoid arthritis)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 골 관련 진단을 위한 진단기기에 관한 것이다.

[0068] 본 발명의 상기 진단기기의 측정부는 목적하는 개체로부터 얻어진 생물학적 시료에 대하여 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 이용하여 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있다.

[0069] 본 발명에서 상기 목적하는 개체는, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명에서 상기 생물학적 시료는 전혈 (whole blood), 백혈구 (leukocytes), 말초혈액 단핵 세포 (peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층 (buffy coat), 혈장 (plasma), 혈청 (serum), 객담 (sputum), 눈물 (tears), 점액 (mucus), 세비액 (nasal washes), 비강 흡인물 (nasal aspirate), 호흡 (breath), 소변 (urine), 정액 (semen), 침 (saliva), 복강 세척액 (peritoneal washings), 복수 (ascites), 낭종액 (cystic fluid), 뇌척수막 액 (meningeal fluid), 양수 (amniotic fluid), 선액 (glandular fluid), 췌장액 (pancreatic fluid), 림프액 (lymph fluid), 흉수 (pleural fluid), 유두 흡인물 (nipple aspirate), 기관지 흡인물 (bronchial aspirate), 활액 (synovial fluid), 관절 흡인물 (joint aspirate), 기관 분비물 (organ secretions), 세포 (cell), 세포 추출물 (cell extract) 및 뇌척수액 (cerebrospinal fluid) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 본 발명의 상기 진단기기의 측정부에서 이용하는 제제는 Pellino-1 (Protein pellino homolog 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA (peptide nucleic acid) 및 앱타머 (aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함할 수 있으며, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상을 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명의 상기 진단기기의 측정부에서 상기 제제를 이용하여 상기 단백질 또는 유전자의 발현 정도를 확인함으로써 골 관련 질환, 보다 바람직하게는 골수세포에서 파골 세포로의 분화 조절에 이상이 생겨 발생한 골 관련 질환 유무를 예측할 수 있다.

[0073] 본 발명의 골 관련 질환의 진단기기는, 상기 측정부에서 얻어진 상기 단백질 또는 유전자의 발현 정도로부터 상기 목적하는 개체의 골 관련 질환 유무를 예측하여 출력하는 검출부를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명에서 상기 검출부는, 상기 측정부에서 얻어진 상기 단백질 또는 유전자의 발현 정도가 대조군에서 측정된 Pellion-1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준보다 높은 경우 파골 세포의 분화 억제로 인한 골 관련 질환이 발병하였거나 발병할 가능성이 높은 것으로 정보를 생성하여 분류함으로써 골 관련 질환을 진단할 수 있다.

[0075] 또한, 본 발명에서 상기 검출부는, 상기 측정부에서 얻어진 상기 단백질 또는 유전자의 발현 정도가 대조군에서 측정된 Pellion-1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준보다 낮은 경우 파골 세포의 과분화로 인한 골 관련 질환이 발병하였거나 발병할 가능성이 높은 것으로 정보를 생성하여 분류함으로써 골 관련 질환을 진단할 수 있다.

[0076] 본 발명의 진단기기에서 진단의 대상이 되는 골 관련 질환은 골다공증 (osteoporosis), 골연화증 (osteomalacia), 골감소증 (osteopenia), 골화석증 (osteopetrosis), 골위축 (bone atrophy), 섬유성골이형성증 (fibrous dysplasia), 페이젯병 (Paget's disease), 고칼슘혈증 (hypercalcemia), 거대세포종 (giant cell tumor), 뼈의 종양성 파괴 (neoplastic destruction), 암 (cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절 (fracture), 골용해 (osteolysis), 골관절염 (osteoarthritis), 및 류머티스 관절염 (rheumatoid arthritis)으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기서, 파골 세포의 분화 억제로 인한 골 관련 질환의 예시로는 골화석증 (osteopetrosis)을 포함할 수 있고, 파골 세포의 과분화로 인한 골 관련 질환의 예시로는 골다공증 (osteoporosis), 골연화증 (osteomalacia), 골감소증 (osteopenia), 골위축 (bone atrophy), 섬유성골이형성증 (fibrous dysplasia), 페이젯병 (Paget's disease), 고칼슘혈증 (hypercalcemia), 거대세포종 (giant cell tumor), 뼈의 종양성 파괴 (neoplastic destruction), 암 (cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절 (fracture), 골용해 (osteolysis), 골관절염 (osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염 (rheumatoid arthritis)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0078] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 파골 세포의 분화를 억제하는 파골 세포 분화 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0079] 본 발명의 상기 조성물은 Pellino-1 단백질; Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자; 및 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터;로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0080] 본 발명에서 상기 Pellino-1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 것일 수 있으며, 상기 단백질과 기능적으로 동등한 특성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0081] 본 발명의 상기 약학 조성물에서 기능적으로 동등한 특성을 갖는 단백질이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과로서 상기 Pellino-1 단백질의 아미노산 서열과 적어도 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 상기 단백질과 실질적으로 동등한 생리활성을 가지는 단백질을 말한다. 비제한적인 예시로써, 상기 Pellino-1 단백질의 아미노산 서열과 99 % 이상 내지 100 % 미만, 95 % 이상 내지 99 % 미만, 90 % 이상 내지 95 % 미만, 85 % 이상 내지 90 % 미만, 또는 80 % 이상 내지 85 % 미만의 상동성을 가지는 경우일 수 있으며, 당해 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 목적하는 효과를 발휘한다는 것이 자명한 범위 내에서 이에 제한 없이 모두 포함할 수 있다.

[0082] 본 발명의 상기 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자 자체로서 포함될 수 있고, 바람직하게는 재조합 발현 벡터에 포함되는 형태로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 본 발명에서 상기 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것일 수 있으며, 유전자 치료 등에 사용되기 위하여 세포 내에서 상기 유전자를 발현하는 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 상기 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 주입시킴으로써 상기 유전자의 발현 수준을 증가시킬 수 있다.

[0084] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터는 목적하는 숙주 세포에서 목적하는 단백질 또는 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시 코돈, 종결 코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임 (In frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성 프로모터일 수 있다.

[0085] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터는 프로모터와 본 발명의 상기 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자를 이루는 염기서열 즉, 폴리 뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수 있다. 본 발명의 상기 '작동 가능하게 연결 (operably linked)'이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결 (functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 폴리 뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 발현 벡터와의 작동 가능하게 연결되는 것은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등이 사용될 수 있다.

[0086] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터의 백본 (Backbone)으로 사용할 수 있는 벡터는 본 발명의 상기 단백질을 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지는 않으나, 예를 들면, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA, 상업적으로 개발된 플라스미드 (pGEM® T 벡터, pET22b, pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드 (pYG601BR322, pGEX-4T-1, pET, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드 (pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드 (YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA (Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, AAAAAλgt11, λZAP 등), 동물 바이러스 벡터 (레트로바이러스 (Retrovirus), 아데노바이러스 (Adenovirus), 백시니아 바이러스 (Vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터 (배큘로바이러스 (Baculovirus) 등)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0087] 본 발명의 상기 숙주 세포에는 폴리 펩타이드 삽입물의 편입을 위한 벡터(들)의 수령자(recipient)일 수 있거나 또는 수령자였던 개별적인 세포 또는 세포배양물이 포함된다. 숙주 세포에는 단일 숙주 세포의 자손이 포함되고, 상기 자손은 자연적인, 우발적인 또는 고의의 돌연변이 때문에 반드시 원래 모세포와 완전히 동일(형태학상 또는 게놈 DNA 보완체에서)하지 않을 수 있다. 숙주 세포에는 본원의 폴리펩타이드(들)로 체내에서 형질주입된 세포가 포함된다.

[0088] 본 발명에 있어서, 상기 숙주 세포로는 포유동물, 식물, 곤충, 균류 또는 세포성 기원의 세포를 포함할 수 있고, 예를 들면 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포, 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO (중국 햄스터 난소 세포, Chinese hamster ovary cells), SP2/0 (생쥐 골수종), 인간 림프아구 (Human lymphoblastoid), COS, NSO (생쥐 골 수종), 293T, 보우 멜라노마 세포, HT-1080, BHK (베이비 햄스터 신장세포, Baby Hamster Kidney cells), HEK (인간 배아신장 세포, Human Embryonic Kidney cells) 또는 PERC.6 (인간 망막 세포)의 동물 세포; 또는 식물 세포일 수 있고, 바람직하게는 인간 배양 세포주, 예를 들면, HEK 세포주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당업자에게 알려진 숙주 세포로 사용 가능한 세포는 모두 이용 가능하다.

[0089] 본 발명의 상기 조성물은 상기 Pellino-1 단백질, 상기 단백질을 암호화하는 유전자 자체, 그 유전자를 포함하는 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 증식 및 활성화시켜 환자에 투여함으로써 골수 세포의 파골 세포로의 분화를 억제하여 파골 세포의 분화 조절 이상이 예견되는 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 적용할 수 있다.

[0090] 본 발명의 상기 파골 세포 분화 조절용 약학 조성물에서 Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 골 관련 질환 등에 대한 기재는 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0092] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 파골 세포의 분화를 촉진하는 파골 세포 분화 유도용 조성물에 관한 것이다.

[0093] 본 발명의 상기 조성물은 Pellino-1 단백질의 활성을 억제시키는 제제 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 포함하는 것일 수 있다.

[0094] 본 발명의 상기 Pellino-1 단백질의 활성을 억제시키는 제제는 Pellino-1에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앱타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 Pellino-1 유전자의 발현을 감소시키는 제제는 Pellino-1 유전자, 바람직하게는 상기 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA (short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA) 및 리보자임 (ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 표적 단백질 또는 유전자인 Pellino-1에 직간접적으로 작용하여 그의 활성 또는 발현이 저

해되는 효과를 도출하는 수단에 해당하는 것으로 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법으로 공지된 기술에 의하여 용이하게 도출 가능한 것이라면 이에 제한되지 아니하고 모두 포함할 수 있다.

[0095] 본 발명에서 상기 "펩티드 미메틱스 (Peptide Minetics)"는 Pellino-1의 활성 억제를 이끄는 Pellino-1 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β-턴 디펩티드 코어 (Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류 (Ewenson et al. J Med chem 29:295, 1986; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th AmeriCan Peptide Symposium) Pierce chemiCal co. Rockland, IL, 1985), 아제핀 (Huffman et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., EScOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조디아제핀 (Freidinger et al. in Peptides; chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., EScOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β-아미노알콜 (Gordon et al. Biochem Biophys Res commun 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환 (Garvey et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshell ed., EScOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.

[0096] 본 발명에서 상기 "앱타머 (Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산 (DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앱타머는 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 앱타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후(Ellington, AD and Szostak, JW., Nature 346:818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 앱타머들이 계속해서 발굴되었다. 앱타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.

[0097] 본 발명에서 상기 "항체"는 Pellino-1 단백질 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.

[0098] 여기서, 상기 다클론 항체는 상기 Pellino-1 단백질을 동물에 주사하고, 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 만들어질 수 있다.

[0099] 또한, 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포주 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다.

[0100] 또한, 상기 Pellino-1 단백질에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')2 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')2 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다.

[0101] 본 발명에서 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질 (solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.

[0102] 본 발명에서 상기 활성을 억제시키는 제제는 Pellino-1 단백질의 서열번호 1로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 바람직하게는 본 발명의 약학 조성물은 상기 Pellino-1 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있으며, 여기서, 상기 항체는 서열번호 1로 표시되는 에피토프에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0103] 본 발명에서 상기 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다. 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포주흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될

수 있다.

[0104] 본 발명에서 상기 "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 (knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀 (hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이서 (dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 Pellino-1을 암호화하는 유전자에 특이적으로 작용하여 Pellino-1의 유전자(예; mRNA 분자)를 절단하여 RNA 간섭 (RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 Pellino-1의 발현을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조 방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내 (in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내 (in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0105] 본 발명에서 상기 "리보자임 (ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, Pellino-1 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지의 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.

[0106] 본 발명의 상기 조성물은 골수 세포의 파골 세포로의 분화를 촉진함으로써 파골 세포의 분화 조절 이상이 예견되는 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 적용할 수 있다.

[0107] 본 발명의 상기 파골 세포 분화 유도용 조성물에서 Pellino-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 골 관련 질환 등에 대한 기재는 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0109] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 파골 세포의 분화를 억제하는 골 관련 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0110] 본 발명의 상기 약학 조성물은 Pellino-1 단백질; Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자; 및 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터;로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0111] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 상기 Pellino-1 단백질, 상기 단백질을 암호화하는 유전자 자체, 그 유전자를 포함하는 발현 벡터 또는 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 증식 및 활성화시켜 환자에 투여함으로써 파골 세포의 분화를 억제시켜 골 관련 질환을 치료 또는 예방할 수 있다.

[0112] 본 발명의 상기 약학 조성물은 골수 세포의 파골 세포로의 분화를 억제하여 골 관련 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 기능이 있으며, 상기 골 관련 질환은 파골 세포의 과분화로 인한 골 관련 질환으로 골다공증 (osteoporosis), 골연화증 (osteomalacia), 골감소증 (osteopenia), 골위축 (bone atrophy), 섬유성골이형성증 (fibrous dysplasia), 페이젯병 (Paget's disease), 고칼슘혈증 (hypercalcemia), 거대세포종 (giant cell tumor), 뼈의 종양성 파괴 (neoplastic destruction), 암(cancer) 관련 골재흡수 질병, 골절 (fracture), 골용해 (osteolysis), 골관절염 (osteoarthritis), 및 류머티스 관절염 (rheumatoid arthritis)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 종 일 수 있으며, 바람직하게는 골다공증일 수 있다.

[0113] 또한, 상기 약학 조성물은 골수 세포의 파골 세포로의 분화를 조절함으로써 궁극적으로 파골 세포의 분화 조절 이상이 예견되는 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 적용할 수 있다.

[0114] 본 발명에서 상기 "예방"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 골 관련 질환에 의해 기인된 증상을 차단하거나, 골 관절 질환으로의 진행을 억제 또는 지연시킬 수 있는 모든 행위라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0115] 본 발명에서 상기 "치료"란, 목적하는 질병의 완화 또는 개선을 위해 수행되는 일련의 활동을 의미한다. 본 발명의 목적상 치료는 골 관련 질환을 억제 또는 지연시키는 활동을 포함하며, 골 관련 질환으로 인해 발생한 증

상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0116] 본 발명의 상기 골 관련 질환 치료용 약학 조성물에서 Pellino-1 단백질 또는 Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자, Pellino-1 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터, 골 관련 질환 등에 대한 기재는 진단용 조성물 및 분화 조절용 약학 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0117] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0118] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서 (Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0119] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0120] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0121] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0122] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1 일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

[0124] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 파골 세포의 분화를 유도하는 골 관련 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0125] 본 발명의 상기 약학 조성물은 Pellino-1 단백질의 활성을 억제시키는 제제 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 포함하는 것일 수 있다.

[0126] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 상기 Pellino-1 단백질의 활성을 억제시키는 제제 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제를 환자에 투여함으로써 파골 세포의 분화를 유도하여 골 관련 질환을 치료 또는 예방할 수 있다.

[0127] 본 발명의 상기 약학 조성물은 골수 세포의 파골 세포로의 분화를 유도하여 골 관련 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 기능이 있으며, 상기 골 관련 질환은 파골 세포의 분화 억제로 인한 골 관련 질환으로 골화석증

(osteopetrosis)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0128] 또한, 상기 약학 조성물은 골수 세포의 파골 세포로의 분화를 조절함으로써 궁극적으로 파골 세포의 분화 조절 이상이 예견되는 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 적용할 수 있다.

[0129] 본 발명의 상기 골 관련 질환 치료용 약학 조성물에서 Pellino-1 단백질의 활성을 억제시키는 제제 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 감소시키는 제제, 골 관련 질환 등에 대한 기재는 진단용 조성물 및 분화 조절용 약학 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

발명의 효과

[0130] 본 발명에서는 골 대사, 특히는 골수 세포의 파골 세포로의 분화를 조절함으로써 골 항상성을 효과적으로 유지할 수 있어 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0131] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 마우스 골수 유래 대식세포 (mice bone marrow derived macrophage; mBMM)의 파골 세포 분화 기간 중 Pellino-1, Pellino-2, Pellino-3의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2a 및 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 인 비트로 상에서 HEK293T에 pellino-1 (Protein pellino homolog 1)을 과발현 또는 넉다운 시켜 NFATc1 프로모터의 활성 변화를 확인한 도이다.

도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따라 인 비트로 상에서 HEK293T에 pellino-1을 점진적으로 억제할 시 NFATc1 프로모터의 활성 변화를 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 Pellino-1$^{fl/fl}$ 및 Pellino-1$^{fl/fl}$Ctsk 마우스에서 분리된 골수 유래 대식세포 (BMM)를 타트레이트 저항성 산성 인산분해효소 (tartrate resistant acid phosphatase; TRAP) 용액으로 염색하여 전자 현미경으로 관찰한 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 Pellino-1$^{fl/fl}$ 및 Pellino-1$^{fl/fl}$Ctsk 마우스에서 분리된 골수 유래 대식세포 (BMM)의 TRAP 활성을 측정하여 나타낸 도이다.

도 5a 내지 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른 대조군과 Pellino-1 결손 마우스의 체중 및 골격의 변화를 확인한 도이다.

도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따른 대조군과 Pellino-1 결손 마우스의 대퇴골 (femur)를 컴퓨터 단층촬영기 (micro-CT)로 분석한 도이다.

도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 대조군과 Pellino-1 결손 마우스의 해면골 체적비 (BV/TV), 골 밀도 (BMD), 골 표면적 (BS/BV), 골 잔 기둥 두께 (Tb.Th), 골 잔 기둥 수 (Tb.N) 및 골 잔 기둥간 거리 (Tb.Sp)를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 대조군과 Pellino-1 결손 마우스의 혈청 골 흡수 지표 (serum bone resorption index)인 CTX-1의 발현 정도를 확인한 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 인 비트로 상에서 raw cell에 Pellino-1을 과발현 시킨 후 NFATc1의 mRNA 발현 정도를 비교 확인한 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 인 비트로 상에서 raw cell에 Pellino-1 1을 과발현 시킨 후 TRAP 용액으로 염색하여 전자 현미경으로 관찰한 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 인 비트로 상에서 raw cell에 Pellino-1 1을 과발현 시킨 후 TRAP 활성을 측정하여 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0134] **준비예 1: 마우스의 제조**

[0135] 본 발명의 발명자들은 연세대학교 보건시스템 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았으며, 연세대학교 의과대학 동물실험 윤리위원회 (허가 번호: 2013-0401, 2014-0033)의 승인을 받아 모든 실험을 수행하였다. Pellino-1$^{fl/fl}$ 마우스와 Pellino-1 flox/+, Cathepin K-Cre 마우스를 교배하여 Pellino-1$^{fl/fl}$ Ctsk 마우스를 제조하였다. Pellino-1 flox/+ 마우스는 한국으로부터, Cathepsin K-cre 마우스는 미국으로부터 수득하였으며, 모든 마우스는 C57BL/6 계통을 사용하였다.

[0137] **준비예 2: 마우스에서 분리된 골수 유래 대식세포(mice bone marrow derived macrophage; mBMMS)의 분리**

[0138] 6 주령 수컷 Pellino-1$^{fl/fl}$ 및 Pellino-1 Ctsk 마우스의 마우스 골수 세포를 27 게이지 바늘 (27 gauge needles)로 골수를 세척하여 대퇴골 (femur)과 경골 (tibia)에서 분리하고 70 μm 세포 스트레이너 (Falcon, 미국)로 필터하여, 세포를 1,500 rpm에서 10 분 동안 원심 분리하고 10 % FBS, 1 % 페니실린 50 unit/ml를 함유하는 α-MEM 배지에 재현탁하였다. 세포는 75T 플라스크 배양 접시에 접종되었으며, 72 시간 후, 상층액을 수득하여 새로운 10 cm^2 배양 접시에 재접종하였다. 상층액을 다시 수집하여 1,500 rpm에서 10 분 동안 원심 분리하였고, 마우스 골수 유래 대식세포 (BMM)는 10 % 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 α- 최소 필수 배지 (α-MEM)에서 1 % 항생제 항진균제 용액과 함께 37 ℃, 5 % CO_2에서 배양하여 최종적으로 수득하였다.

[0140] **실시예 1: 파골 세포 형성 과정에서 Pellino-1 발현 수준 측정**

[0141] 본 발명의 발명자들은 Pellino-1이 파골 세포 형성 과정에서 역할을 하는지를 평가하기 위해 ICR 마우스에서 1 차 파골 세포 전구 세포를 분리하고 M-CSF와 RANKL에 의해 시험관 내에서 파골 세포 분화를 유도하였다. 이 때, BMM은 Detachin ™ (Genlantis, San Diego, CA, USA)을 사용하여 분리하고 1 x 10^5 세포를 파골 세포 형성을 위해 12 웰 플레이트에 접종하였으며, BMM은 10 ng/ml M-CSF 및 10 ng/ml RANKL을 포함하는 성장 배지에서 배양되어 파골 세포 형성을 유도하고 격일로 교체해주는 방식으로 수행하였다.

[0142] 상기와 같은 방식으로 준비예 2에서 수득한 mBMM을 10 ng/ml의 M-CSF 및 RANKL과 함께 배양하고 지정된 날(유도 직후 및 유도 이후 1 내지 3 일차)에 수확하였다. 각 지정된 날의 파골 세포 마커 유전자의 발현 정도를 qRT-PCR에 의해 분석하였다. 총 RNA는 AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit (Bioneer)의 제조업체의 지침으로 사용하였고, qRT-PCR을 수행하여 그룹 간의 mRNA 발현 변화를 측정하였다. 이 때 사용된 프라이머 세트는 아래의 표 1과 같다.

표 1

[0143]

유전자	프라이머 시퀀스(5'→3')
Pellino-1	F: TGTGGGAACGTCTTCAGTCTGC R: CAGCAAGGTTGCACCACAAAGG
Pellino-2	F: GTGTGACAGGAACGAGCCATAC R: AGGACACCGTTGGTAGTGAGTC
Pellino-3	F: CTGCTGGCTTTGATGCCTCTAG R: GCAGAGTCCTCGGAGAAGCCA
β-ACTIN	F: CTTCTACAATGAGCTGCGTG R: TCATGAGGTAGTCTGTCAGG

[0144] 파골 세포 분화 과정에서 Pellino 패밀리의 발현 변화를 확인하였으며, Pellino 패밀리에 해당하는 Pellino-1, Pellino-2, Pellino-3가 감소하였으나, Pellino-1의 mRNA 발현 수준에서 현저한 감소를 보이는 것으로 확인되었다(도 1 참조). 상기와 같은 결과에 비추어, Pellino 패밀리 중 Pellino-1이 mBMM에서 파골 세포 분화 과정동안 부정적인 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0146] **실시예 2: Pellino-1 조절에 따른 파골 세포 분화 효능 검증**

[0147] Pellino-1 조절이 파골 세포 분화 효능을 활성화하는 데 필요하다는 것을 검증하기 위하여, Pellino-1의 발현 조절과 파골 세포의 분화와의 상관 관계를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 통상적으로 파골 세포 분화에 가장 중요한 전사 인자로 알려진 Pellino-1 발현 조절에 따른 NFATc1 (nuclear factor of activated T cell)의 전사 활성을 확인하였다.

[0148] 인 비트로 (in vitro) 상에서 HEK293T 세포주에 Pellino-1을 과발현, 넉다운, 점진적 억제시킨 뒤, 파골세포 분화 마커인 NFATc1의 전사 활성을 확인한 결과를 도 2a 내지 도 2c에 나타내었다. Pellino-1을 과발현시킨 경우 NFATc1의 전사 활성이 감소한 반면, Pellino-1 넉다운시킨 경우 NFATc1의 전사 활성이 증가하는 것을 확인하였다(도 2a 및 도 2b 참조). 또한, Pellino-1의 점진적으로 넉다운 시키는 경우 그 패턴은 NFATc1의 전사 활성이 점진적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 2c 참조). NFATc1는 파골 세포 분화 과정에서 칼슘 신호 활성화에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있고, NFATc1 전자 인자가 활성화가 될 경우 파골 세포의 분화가 유도된다. 이에 비추어, Pellino-1를 억제시키는 경우 NFATc1는 활성화가 발생하고 파골 세포 분화가 가속화되는 것으로 볼 수 있다.

[0149] 즉, 파골 세포의 마스터 조절자인 NFATc1을 활성화할 수 있다는 것을 통하여 골다공증을 비롯한 골 관절 질환의 치료에 적용될 수 있는 새로운 표적으로 삼을 수 있는 약물로 이용될 수 있음을 시사한다.

[0151] **실시예 3: Pellino-1의 결실 시 파골 세포 형성에 미치는 영향**

[0152] **3.1 TRAP 염색 및 활성도 측정**

[0153] Pellino-1의 결실 시 파골 세포 분화 (osteoclastogenesis) 과정에서 어떠한 역할을 하는지를 보기 위하여, 준비예에서 제조한 마우스를 이용하여 추가 실험을 수행하여 파골 세포 발달에서 Pellino-1 결실의 효과를 확인하였다. 100 μl의 파골 세포 배양에서 얻어진 상층액을 아세테이트 용액 (Sigma-Aldrich), 1 M 타르타르산 나트륨 및 포스파타제 기질 (Sigma-Aldrich)을 함유하는 기질 혼합물과 함께 37 ℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 3 N HCl을 첨가하여 반응을 중단시켰으며, TRAP 활성은 405 nm의 흡광도 파장에서 측정되었다. 이때, 제조사의 지침에 따라 Acid Phosphatase, Leukocyte kit (Sigma-Aldrich)를 사용하여 TRAP 염색을 수행하였으며, 세포를 고정액으로 고정하고 37 ℃에서 1 시간 동안 염색하였다.

[0154] 보다 구체적으로 Pellino-1$^{fl/fl}$ 및 Pellino-1 Ctsk 마우스에서 분리된 BMM에 파골세포의 분화를 유도하기 위하여 10 ng/ml M-CSF 및 10 ng/ml RANKL로 처리하였고, 파골 세포 분화는 도 3의 TRAP 염색 결과에서 보듯이 Pellino-1$^{fl/fl}$ BMM에 비해 Pellino-1 Ctsk BMM에서 증가한 것을 확인하였다. 또한, TRAP 활성도 Pellino-1$^{fl/fl}$ BMM에 비해 Pellino-1 Ctsk BMM에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0156] **3.2 Pellino-1의 생체 내 기능 확인 (체중 및 골격 변화의 확인)**

[0157] 파골 세포에서 Pellino-1의 생체 내 기능을 확인하기 위해 준비예 2의 마우스로 출생 시부터 12 주에 걸쳐 실험을 수행하였다. 마이크로 CT (μCT) 분석을 위해 대퇴골 검체를 70 % 에탄올에 24 시간 동안 실온에서 고정하였으며, 고정된 샘플은 고해상도 μCT (Skyscan-1173, Skyscan, Kontich, Belgium)를 사용하여 분석하였다. μCT 영상 재구성 및 분석은 재구성 소프트웨어 Nrecon (v1.7.0.4, Bruker-CT)을 사용하여 수행되었고, 단면 이미지는 DataViewer (v1.5.1.2, Bruker-CT)로, 측정에는 SkyScan1173 제어 소프트웨어 (v1.6, Bruker-CT)를 사용하였다.

[0158] 6 주령의 마우스의 대퇴골을 Pellino-1 Ctsk는 생존 및 생식 능력에 영향을 미치지 않았으며, 5 주차에 해당되는 날부터 Pellino-1 Ctsk의 체중은 Pellino-1$^{fl/fl}$보다 낮았고, 6 주차에는 Pellino-1 Ctsk의 크기가 Pellino-1$^{fl/fl}$보다 작게 나타나는 것으로 확인되었다. 또한, 대퇴골 크기도 Pellino-1$^{fl/fl}$ 마우스에 비해 Pellino-1 Ctsk에서 더 작은 것으로 확인되었다(도 5a 내지 도 5c 참조). 그러나 신생아 생쥐에서는 차이가 없었으며, 이는 Pellino-1에 의한 파골 세포 활성 조절이 출생 후 발달 과정에서 수행되었음을 시사한다.

[0159] 6 주령 Pellino-1 Ctsk 마우스의 해면골 체적비 (BV/TV), 골 밀도 (BMD), 골 표면적 (BS/BV), 골 잔 기둥 두께 (Tb.Th), 골 잔 기둥 수 (Tb.N) 및 골 잔 기둥간 거리 (Tb.Sp)를 측정하였다. 대퇴골은 대조군과 비교하여 골

부피가 현저하게 감소하였고, 뼈에서 Pellino-1$^{fl/fl}$ 마우스와 비교하여 Pellino-1 Ctsk 마우스는 해면골 체적비, 골 밀도, 골 잔 기둥 두께, 골 잔 기둥 수 및 골 잔 기둥간 거리를 현저하게 감소시키는 특징이 있는 것으로 확인되었다(도 6b 참조). 이러한 결과는 파골 세포에서 Pellino-1 결실이 과도한 골 흡수를 유도함을 시사한다.

[0161] **3.3 골 흡수 수준의 측정**

[0162] 파골 세포 발달에서 Pellino-1 결실의 효과를 확인하기 위해 Pellino-1 Ctsk 군에서 골 흡수 마커인 CTX (collage type I)의 c-terminal telopeptides의 혈청 수준 측정을 수행하였다. 마우스의 희생 직후에 6 주령 수컷 Pellino-1$^{fl/fl}$ 및 Pellino-1 Ctsk 마우스로부터 혈액을 수득하고, 혈청 분리기 튜브를 사용하여 혈청을 분리하여 제조사의 지침에 따라 각 ELISA 키트를 사용하여 혈청 골 흡수 지수로 CTX (IDS)의 혈청 수준을 측정하였다.

[0163] Pellino-1의 넉아웃은 골 흡수를 증가시키는 것으로 확인되었다(도 7 참조). 골 흡수 진단 마커인 CTX-1의 증가된 혈청 수준은 Pellino-1 결실 마우스 그룹에서 증가하여 골 흡수를 증가시킨 것으로 확인되었고, 이러한 결과는 Pellino-1의 하향 조절이 파골 세포 분화에 중요한 과정임을 시사한다.

[0165] **3.4 통계학적 분석**

[0166] 본 발명에서의 모든 통계학적 분석은 분산 분석 (ANOVA) 또는 GraphPad Prism6 소프트웨어를 사용한 Student's t-test를 적용하였으며, 각 데이터는 평균 ± 표준 편차로 계산되었다. P - 값 (p - value)이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0168] **실시예 4: Pellino-1의 과발현 시 파골 세포 형성에 미치는 영향**

[0169] **4.1 NFATc1의 mRNA 발현 정도 측정**

[0170] Pellino-1의 과발현 시 파골 세포 분화 (osteoclastogenesis) 과정에서 어떠한 역할을 하는지를 보기 위하여, 인 비트로 상에서 추가 실험을 수행하여 파골 세포 발달에서 Pellino-1 과발현의 효과를 확인하였다. 구체적으로, 렌티바이러스 벡터를 사용하여 RAW 264.7 세포에 Pellino-1을 과발현 시킨 뒤 4 일 동안 파골 세포의 분화를 유도하였으며, 분화 4 일차에 RT-PCR을 수행하여 파골 세포 분화에 가장 중요한 전사 인자로 알려진 NFATc1의 mRNA 발현 정도를 비교 분석하였다.

[0171] 실험 결과, Pellino-1이 과발현된 군에서 대조군에 비하여 NFATc1의 mRNA 발현 수준이 저해된 것을 확인하였다(도 8 참조). 이를 통하여 Pellino-1이 과발현된 군에서 NFATc1 전자 인자가 발현 감소되는 것을 통해 파골 세포의 분화가 억제될 것임을 알 수 있다.

[0173] **4.2 TRAP 염색 및 활성도 측정**

[0174] Pellino-1의 과발현 시 파골 세포 분화 (osteoclastogenesis) 억제의 효과를 확인하고자, 상기 4.1에서 제조한 RAW 264.7 세포를 이용하여 실시예 3에서의 방법으로 추가 실험을 수행하였다. 구체적으로, 100 μl의 세포 배양에서 얻어진 상층액을 아세테이트 용액 (Sigma-Aldrich), 1 M 타르타르산 나트륨 및 포스파타제 기질 (Sigma-Aldrich)을 함유하는 기질 혼합물과 함께 37 ℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 3 N HCl을 첨가하여 반응을 중단시켰으며, TRAP 활성은 405 nm의 흡광도 파장에서 측정되었다. 이때, 제조사의 지침에 따라 Acid Phosphatase, Leukocyte kit (Sigma-Aldrich)를 사용하여 TRAP 염색을 수행하였으며, 세포를 고정액으로 고정하고 37 ℃에서 1 시간 동안 염색하였다.

[0175] 실험 결과, 파골 세포 분화는 도 9의 TRAP 염색 결과에서 보듯이 Pellino-1 과발현된 군에서 TRAP (+) 세포 비율이 감소한 것을 확인하였고, 도 10에서와 같이 TRAP 활성이 감소한 것을 통해 분화능이 저해된 것을 확인할 수 있었다. 이는 곧 Pellino-1 과발현이 미치는 영향을 확인함으로써, 파골 세포 분화의 음성 조절자임을 다시금 확인할 수 있었다.

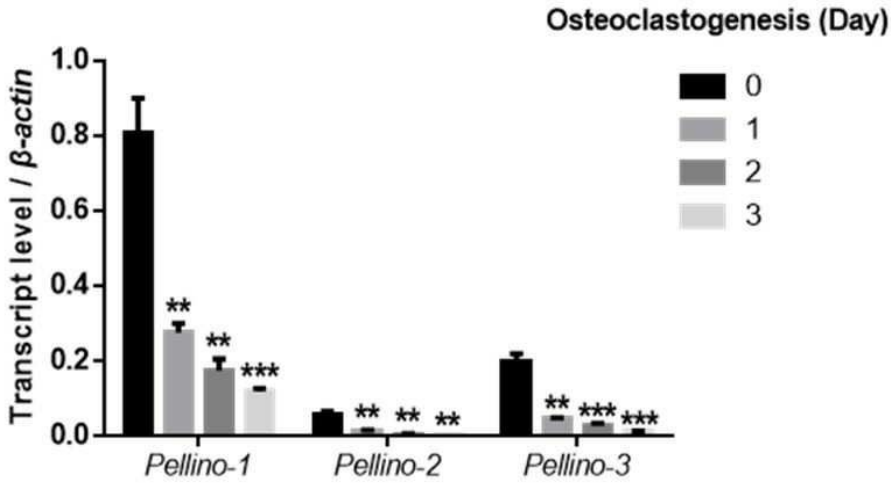
[0176] 상기 내용을 종합하면, Pellino-1의 결실 시 파골 세포 분화를 촉진하고, Pellino-1의 과발현 시 파골 세포의

분화를 억제하는 것을 확인할 수 있다. 이를 통하여 Pellino-1을 파골 세포의 분화 조절하는 양성/음성 조절자로 이용하여 파골 세포의 분화 조절 이상으로 발생하는 골 관련 질환을 치료할 수 있음을 시사한다. 따라서, Pellino-1은 골 관련의 진단을 넘어 골 관련 질환의 새로운 치료 표적이 될 수 있을 것으로 기대된다.

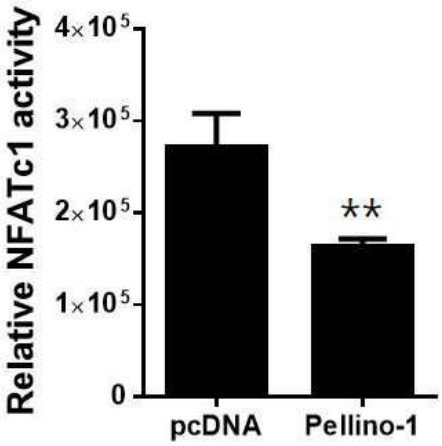
[0178] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

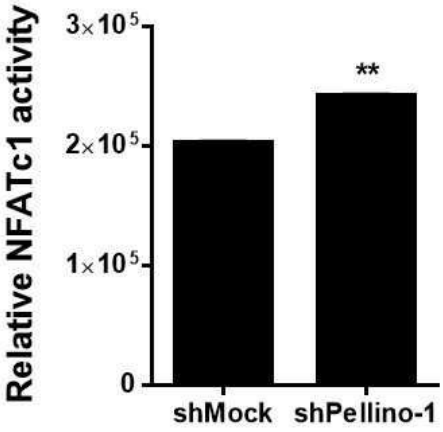
도면1



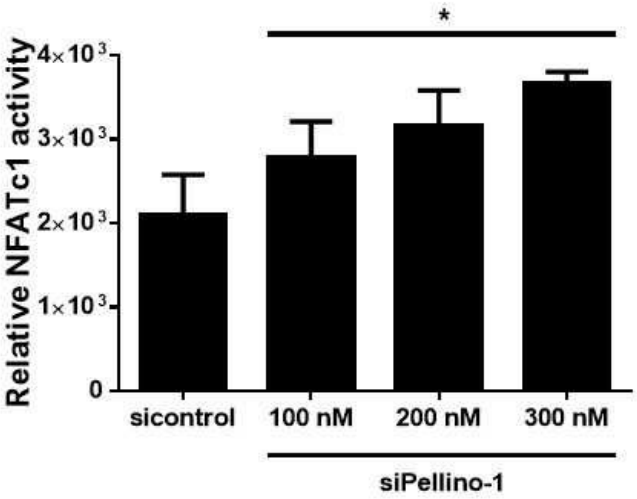
도면2a



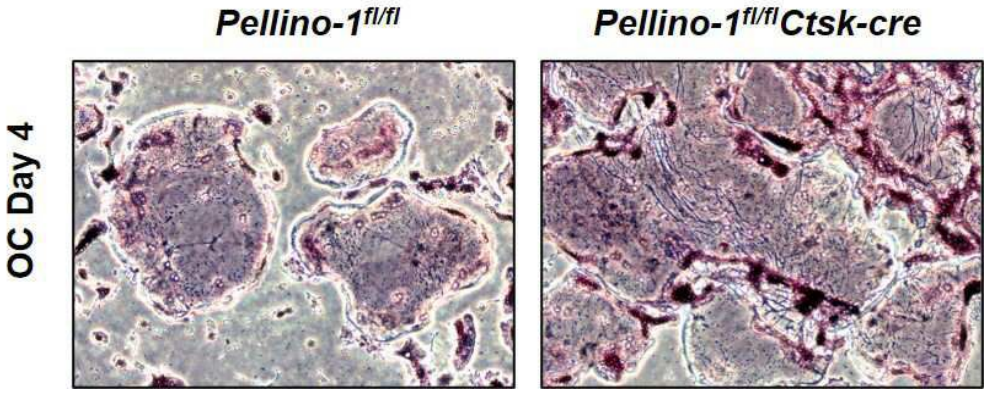
도면2b



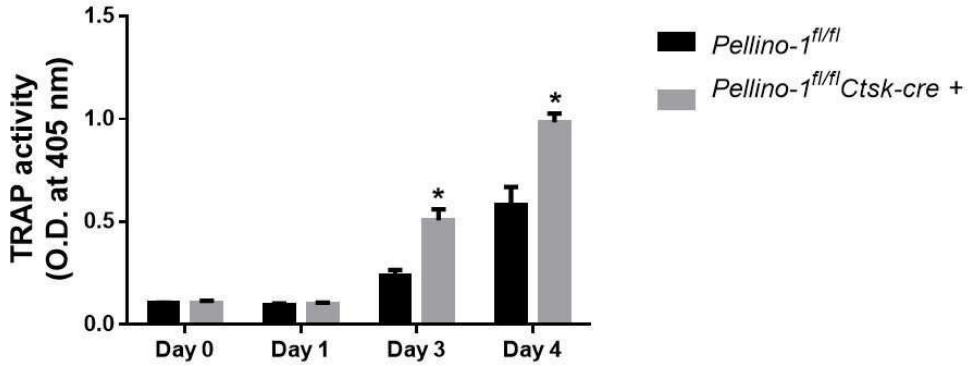
도면2c



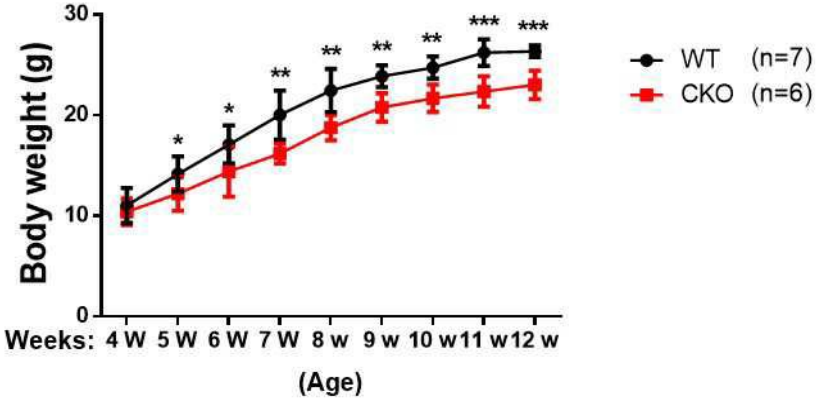
도면3



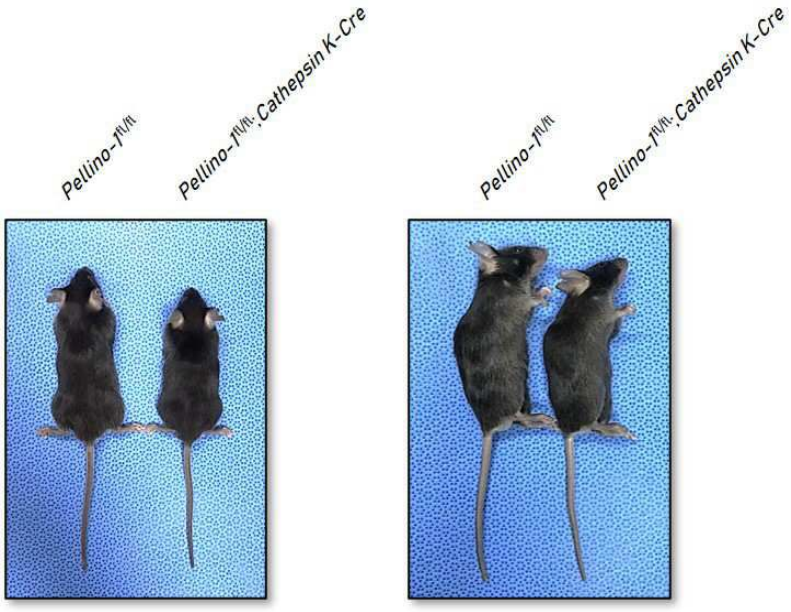
도면4



도면5a



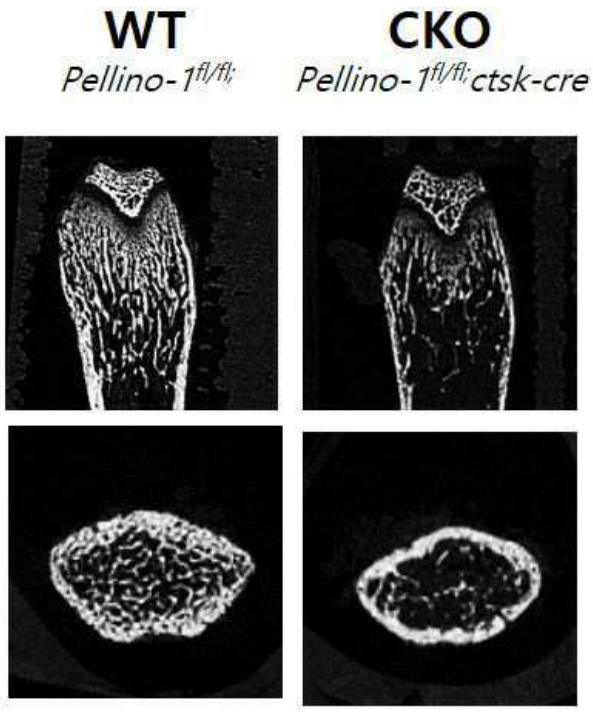
도면5b



도면5c

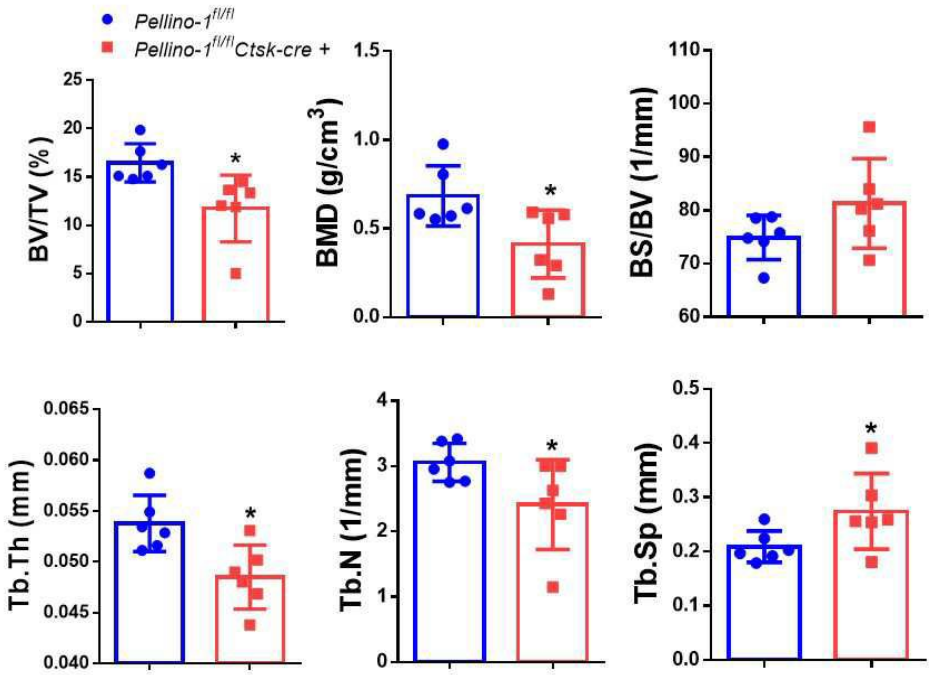
6 weeks mice femurs

도면6a

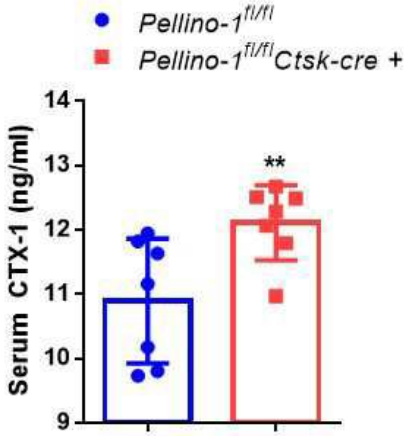


6 weeks

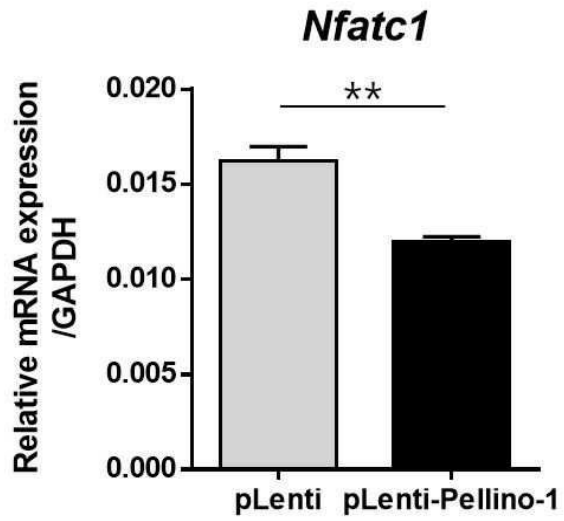
도면6b


Pellino-1fl/fl
Pellino-1fl/flCtsk-cre +
BV/TV (%)
BMD (g/cm3)
BS/BV (1/mm)
Tb.Th (mm)
Tb.N (1/mm)
Tb.Sp (mm)

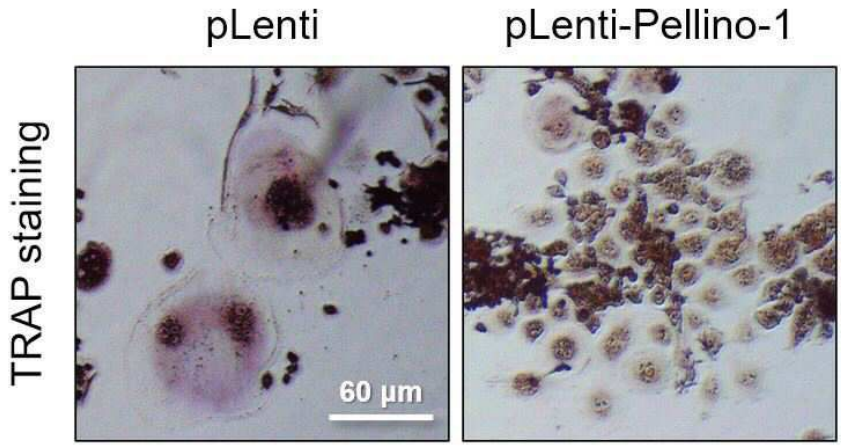
도면7


Pellino-1fl/fl
Pellino-1fl/flCtsk-cre +
Serum CTX-1 (ng/ml)

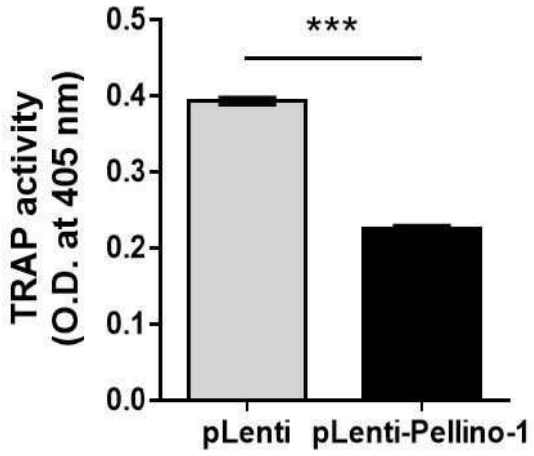
도면8


Nfatc1
Relative mRNA expression /GAPDH
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
**
pLenti
pLenti-Pellino-1

도면9


pLenti
pLenti-Pellino-1
TRAP staining
60 μm

도면10



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> A composition for regulating osteoclast differentiation and uses

<130> PDPB204243k01

<150> KR 10-2020-0146788

<151> 2020-11-05

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 418

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Phe Ser Pro Asp Gln Glu Asn His Pro Ser Lys Ala Pro Val Lys
1 5 10 15

Tyr Gly Glu Leu Ile Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Leu Pro Asn Gly
20 25 30

Asp Arg Gly Arg Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Phe Lys Arg Pro Lys
35 40 45

Ala Asn Gly Val Lys Pro Ser Thr Val His Ile Ala Cys Thr Pro Gln
50 55 60

Ala Ala Lys Ala Ile Ser Asn Lys Asp Gln His Ser Ile Ser Tyr Thr

65 70 75 80

Leu Ser Arg Ala Gln Thr Val Val Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asn

85 90 95

Thr Asp Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe

100 105 110

Val Val Thr Asp Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln

115 120 125

Ser Val Gln Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu

130 135 140

Arg Asn Pro Pro Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser

145 150 155 160

Ser Lys Asn Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser

165 170 175

Asp Gly Gln Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His

180 185 190

Pro Arg Asn Gly Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu

195 200 205

Ile Ser Val Cys Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala

210 215 220

Gln Gln Arg Gly Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp

225 230 235 240

Gly Ser Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala

245 250 255

Glu Gly Leu Ser His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg

260 265 270

Gln Glu Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr

275 280 285

Leu Ala Phe Pro Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln

290 295 300

Pro Trp Val Tyr Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp

305 310 315 320

Gly Asn Lys Glu Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys
325 330 335
Arg Ser Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly
340 345 350
Phe Tyr Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly
355 360 365
His Val Cys Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu
370 375 380

Pro His Gly Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His
385 390 395 400
Gln Leu Ala Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro
405 410 415
Leu Asp

<210> 2
<211> 1257
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
atgttttctc ctgatcaaga aaatcatcca tctaaagcac cagtaaaata tggtgaactc 60
attgtcttag ggtataatgg gtctctccca aatggcgata gaggaaggag gaaaagtagg 120

tttgctttgt ttaaaagacc taaggcaaat ggggtgaagc ccagcactgt gcatattgct 180
tgtactcctc aggctgcaaa ggcaataagc aacaaagacc agcatagcat atcatatact 240
ttatctcggg cccagactgt ggtggttgaa tatactcatg acagcaacac cgatatgttt 300
cagattggcc ggtcgactga aagccccatt gattttgtag taactgacac ggttcctgga 360
agtcaaagta attctgatac acagtcagta caaagcacta tatcaagatt tgcctgcaga 420
atcatatgtg aacggaatcc tccctttaca gcacggattt atgctgcagg atttgactca 480
tcaaaaaaca tctttcttgg ggagaaggct gccaaatgga agacatcaga tggacagatg 540

gatggcttga ccactaatgg tgttcttgtg atgcatccac gcaatgggtt cacagaagac 600
tccaagcctg gaatatggag agaaatatcg gtgtgtggaa atgtatttag cctacgtgaa 660
accagatcgg ctcagcagag aggaaaaatg gtggaaattg aaaccaatca gttacaagat 720
ggctcgttaa ttgacctctg tggtgcaaca ttgttatggc gtactgcaga aggcctttcc 780

cacactccta ccgtgaagca tttagaagct ttaagacagg aaatcaatgc agcacgacct 840

cagtgccctg tagggttcaa cacactagca tttcctagta tgaagaggaa agacgttgta 900

gatgaaaaac aaccatgggt atatctaaac tgcggccatg tacatggcta tcataactgg 960

ggaaacaaag aagaacgtga tggaaaagat cgtgaatgtc ctatgtgtag gtctgttggt 1020

ccctatgttc ctctgtggct tggatgtgaa gctggatttt atgtggacgc cggccctcca 1080

acccatgcgt ttagcccgtg tgggcatgtg tgttcagaaa agacaactgc ctattggtcc 1140

cagatcccac ttcctcatgg tactcatact tttcatgcag cctgtccctt ttgtgcacat 1200

cagttggctg gtgaacaagg ctacatcaga cttatttttc aaggacctct agactaa 1257