



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0031865
(43) 공개일자 2011년03월29일

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0089294

(22) 출원일자 2009년09월21일

심사청구일자 2010년03월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

전대훈

서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트

236동 1802호

손영준

경기도 고양시 일산서구 탄현동 큰마을대림현대아

파트 126동 1403호

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 12 항

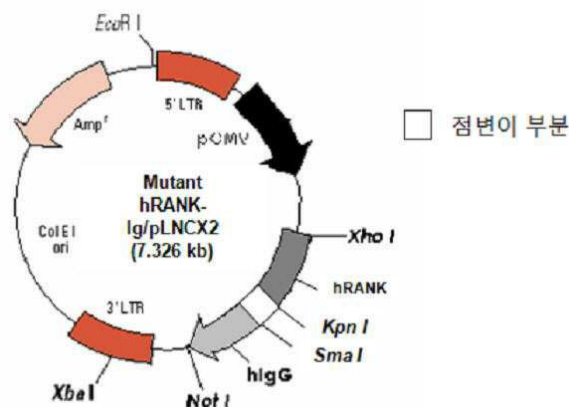
(54) 점변이 이용한 수용성 재조합 인간 RANK의 효능 향상 및 골 질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인간 랭클(hRANKL)과 wild type 인간 랭크(hRANK)간의 상호작용을 차단하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)의 효능 향상 및 이를 이용한 골 질환 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 랭크(RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 N'말단에 리더 펩타이드(reader peptide)가 연결되고, 상기 결합부위의 C'말단에 인간 이뮤노글루블린 G1 불변 영역부위(human Ig G1 Fc region)가 연결되고 상기 랭클(RANKL) 결합부위의 97번의 아미노산 글루탐산(glutamic acid)이 아스파르트산(aspartic acid)으로 치환(E97D)된 돌연변이 랭크(mutant RANK) 단백질을 코딩하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)를 이용하여 인간 랭클(hRANKL)과의 상호작용을 상기 랭크(RANK) 유전자의 E97D 치환에 의해 2배, E97D + C99F 치환에 의해 4배 증가시킬 수 있다. 따라서, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)를 이용하여 골흡수억제, 골형성증진, 골다공증, 골관절염, 다발성골수종, 파골세포증 등 각종 골대사 이상으로 인한 골 질환의 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

랭크(RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 N'말단에 리더 펩타이드(reader peptide)가 연결되고, 상기 결합부위의 C'말단에 인간 이뮤노글루블린 G1 불변 영역부위(human Ig G1 Fc region)가 연결되고 상기 랭클(RANKL) 결합부위의 97번의 아미노산 글루탐산(glutamic acid)이 아스파르트산(aspartic acid)으로 치환(E97D)된 돌연변이 랭크(mutant RANK) 단백질을 코딩하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 랭클(RANKL) 결합부위는 95번 아미노산 아스파르트산(aspartic acid)이 글루탐산(glutamic acid)으로 치환(D95E)되거나, 99번 아미노산 시스테인(cysteine)이 페닐알라닌(phenylalanine)으로 치환(C99F)된 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자는 서열번호 4 내지 10 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자에 의해 코딩되는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질은 서열번호 11 내지 17 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질은 인간 랭클(hRANKL)에 높은 친화성을 나타내어 파골세포 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질.

청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 8

제 7항에 있어서, 도 4의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 9

제 7항의 재조합 벡터로 형질전환된 동물세포.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 동물세포는 CHO 세포인 것을 특징으로 하는 형질전환된 동물세포.

청구항 11

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자 또는 그 발현 재조합 단백질을 함유하는 골 질환 치료용 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자는 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 골 질환 치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 랭클(hRANKL)과 wild type 인간 랭크(hRANK)간의 상호작용을 차단하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)의 효능 향상 및 이를 이용한 골 질환 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 랭크(RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위의 N'말단에 리더 펩타이드(reader peptide)가 연결되고, 상기 결합부위의 C'말단에 인간 이뮤노글로불린 G1 불변 영역부위(human Ig G1 Fc region)가 연결되고 상기 랭클(RANKL) 결합부위의 97번의 아미노산 글루탐산(glutamic acid)이 아스파르트산(aspartic acid)으로 치환(E97D)된 돌연변이 랭크(mutant RANK) 단백질을 코딩하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부 기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 예컨대, 인 또는 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 멈추지 않고 죽는 날 까지 오래된 뼈를 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 매우 역동적, 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 된다. 이를 골재형성(bone remodeling) 이라고 한다 [Manolagas, 2000]. 골재형성이라 불리는 이러한 생리학적 과정은 다양한 분자적 신호들에 의해 매우 엄격하게 조절되는데, 만약 이러한 균형이 무너져서 파골세포(osteoclast)의 활성이 조골세포(osteoblast)의 활성보다 더 커지게 되면 골다공증(osteoporosis) 등으로 발전된다 [Pacifici, 1996]. 노령화사회에서는 이러한 뼈 관련 질병이 큰 사회적 문제로 대두되고 있다.

[0003] 골재형성에는 크게 두 종류의 세포가 관여하는 것으로 알려져 있다. 두 세포 중 하나는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)이고, 다른 하나는 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)이다. 조골세포는 RANK 리간드(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; RANKL)와 이것의 유도 수용체(decoy receptor)인 OPG(osteoprotegerin)를 생성한다. 파골세포는 뼈의 표층에서 자라는 다핵거대세포이며 단핵구(monocyte)-대식세포(macrophage) 계통의 조혈모세포에서 기원하여 여러 호르몬, 성장조절인자, 사이토카인의 영향을 받아 전구

세포(precursor cell)들의 융합(fusion)에 의해 생성된다 [Hsu et al., 1999]. 파골세포 생성에 중요한 분자적 신호에는 상기 랭클(RANKL)과 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)가 있다. 이러한 단백질들은 주위의 기질세포, 조골세포 및 활성화된 면역세포들로부터 제시되며 파골세포 전구체로 하여금 성숙한 파골세포로 분화하도록 촉진한다 [Anderson et al., 1997; Boyce and Xing, 2008].

[0004] RANK(receptor activator of nuclear factor kB)는 종양괴사인자 수용체족(tumor necrosis factor receptor(TNFR) superfamily)의 일원이다. TNFR은 염증 반응 및 면역 반응과 관련하여 세포 증식, 분화 및 세포사멸(apoptosis)에 관여한다. 상기 TNFR에는 제1형 및 제2형 TNF 수용체(TNFR1 및 TNFR2), Fas, CD27, 4-1BB 및 CD30과 같은 세포-표면 수용체 그룹이 포함된다. TNFR의 시그널링은 수용체와 리간드의 결합에 의해 개시된다 [Baker and Reddy, Oncogene, 17, 3261-3270, 1998].

[0005] RANK 리간드(receptor activator of nuclear factor-kB ligand; RANKL)는 종양괴사인자(tumor necrosis factor;TNF) 계열의 한 구성원으로서 파골세포생성(osteoclastogenesis)에 필수적인 요소이다 [Teitelbaum, 2007]. 이러한 랭클(RANKL)은 TRANCE(TNF-related activation-induced cytokine), OPGL(osteoprotegerin ligand), ODF(osteoclast differentiation factor)로 알려져 있으며 골 대사에 중요한 인자이다. 랭클(RANKL) 유전자가 제거된 쥐는 파골세포가 결핍되어 있으며, 골화석증(osteopetrosis) 및 치아맹출(tooth eruption) 장애 등의 형질을 나타낸다 [Guo et al., 1998]. 랭클(RANKL)의 과생산은 골 질환의 다양한 퇴행성 질환(rheumatoid arthritis and osteomyelitis)과 관계가 있으며, 랭클(RANKL)은 dendritic cell 성숙과 T helper cells에 의해 표현되어지는 곳의 면역 시스템(immune system)의 기능을 가지고 있다. 이 단백질은 수지상 세포의 생존이나 T cell-dependent immune response을 조절하고, SRC kinase와 TRAF 6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)을 포함하는 복합 시그널을 통하여 antiapoptotic kinase인 AKT/PKB을 활성화시켜 세포사멸을 조절한다 [Khosla, 2001].

[0006] 랭클(RANKL)은 파골세포 표면에 존재하며 골 흡수에 작용한다. 랭클(RANKL)은 파골세포 표면의 랭크(RANK)와 결합하여 NF-kB(nuclear factor-kB)와 NFATc1(nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1)을 활성화 시킨다 [Bekker et al., 2004]. 좀 더 자세히 설명하면, 랭클(RANKL)이 랭크(RANK)에 결합하여 MAP(mitogen-activated protein) 키나아제의 활성을 촉진하고, 이로 인해 NF-kB(nuclear factor-kB)라는 전사 인자가 핵 내로 들어가서 파골세포 분화와 관련된 트랩(TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase), MMP-9(matrix metalloproteinase-9), c-Src 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 등의 발현을 증가시킴으로 인해 파골세포가 분화되며, 증가된 파골세포로 인해 골다공증 등의 골 질환이 유발된다 [Boyle WJ et al., Nature, 2003 May 15; 423(6937)]. 즉, 랭클(RANKL)과 랭크(RANK)간의 상호작용은 파골세포생성을 조절하는 중요한 기전이며, 골다공증을 치료하기 위한 의학적 전략에 있어 매우 중요한 의미를 지닌다. 따라서, 랭클(RANKL)과 랭크(RANK)간의 상호작용을 차단하면 골다공증 등의 골 질환을 억제할 수 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 인간 랭크(hRANK) 유전자에 점변이(site directed mutagenesis)를 유도하여 인간 랭클(hRANKL)과의 상호작용을 측정하는 경우, 상기 점변이가 유도된 돌연변이 랭크(mutant hRANK)가 인간 랭클(hRANKL)에 대해 높은 친화력(affinity)을 나타냄으로써 상기 인간 랭클(hRANKL)과 wild type 인간 랭크(hRANK)간의 상호작용을 효과적으로 차단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 점변이(site directed mutagenesis)를 이용한 돌연변이 수용성 재조합 인간 RANK(mutant hRANK)를 제조하여 인간 RANK 리간드(hRANKL)와 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)간의 친화성을 높임으로써, 인간 랭클(hRANKL)과 wild type 인간 랭크(hRANK)간의 상호작용을 효율적으로 차단함으로써 파골세포의 형성을 억제하여 골 질환의 예방 및 치료적 가능성을 확인하고, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭클(mutant hRANK)을 이용한 골 질환 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 랭크(RANK, receptor activator of NF-kB) 단백질의 랭클(RANKL, receptor activator of NF-kB ligand) 결합부위의 N'말단에 리더 펩타이드(reader peptide)가 연결되고, 상기

결합부위의 C'말단에 인간 이뮤노글루블린 G1 불변 영역부위(human Ig G1 Fc region)가 연결되고 상기 랭클(RANKL) 결합부위의 97번의 아미노산 글루탐산(glutamic acid)이 아스파르트산(aspartic acid)으로 치환(E97D)된 돌연변이 랭크(mutant RANK) 단백질을 코딩하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자를 제공한다. 상기 랭크(RANK) 유전자의 E97D 치환에 의해 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK)와 인간 랭클(hRANKL)간의 친화력이 2배 증가하며, E97D + C99F 치환에 의해 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK)와 인간 랭클(hRANKL)간의 친화력이 4배 증가함으로써, 인간 랭클(hRANKL)과 wild type 인간 랭크(hRANK)간의 상호작용을 차단한다.

[0010] 본 발명의 상기 용어 “리더 펩타이드(reader peptide)”는 분비성 단백질 전구체의 N-말단에 존재하고, 또한 천연 성숙 단백질에는 존재하지 않는 서열을 나타내며, 리더 펩타이드는 단백질 전구체로부터 절단되는 펩타이드를 나타낸다. 일반적으로 리더 서열은 세포 외로의 분비에 따라 프로테아제(또는 시그널 펩타이드)에 의해 절단된다. 이러한 리더 펩타이드는 생물종을 초월하여 일정한 공통된 서열상의 특징을 갖지만 어떤 생물종으로 분비기능을 나타내는 리더 펩타이드가 다른 생물종에서도 반드시 분비기능을 발휘한다는 것은 아니다. 프리프로 단백질 또는 프리 단백질에서, 당해 리더 펩타이드는 상이한 단백질 유래일 수 있거나, 목적 단백질에 천연으로 존재하는 리더 펩타이드일 수 있고, 사용하는 숙주의 분비형 단백질 유래가 바람직하다. 또는 사용하는 숙주의 코돈 사용 빈도에 따라 최적인 코돈을 갖도록 변형할 수 있다. 또한 본 발명의 목적에 사용할 수 있는 리더 펩타이드는 이로부터 유래하는 천연 성숙 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 일부 함유할 수 있다. 본 발명에서는 구체적으로 “MAPRRRRRPLFALLLLCALLARLQVAL” 또는 “PLEMETDTLLLVLLLVPGSTGD”의 아미노산 서열을 갖는 리더 펩타이드를 사용하였다. 본 발명의 상기 “랭크(RANK, receptor activator of NF- κ B) 단백질의 랭클(RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand) 결합부위”는 상기 랭크 단백질에서 부위에 존재하는 랭클 단백질과 결합하는 도메인의 특정 부위(서열번호 1)를 말하며, 상기 “인간 이뮤노글루블린 G1 불변 영역부위(human Ig G1 Fc region)”는 항체의 불변 부위를 코딩하는 도메인 부위이다.

[0011] 상기 인간 랭크(hRANK)는 일종의 막 단백질이나, 본 발명에서는 이것의 transmembrane domain과 cytoplasmic tail을 제거하고 대신 human Ig G1 Fc region을 연결함으로써 수용성으로 만들 수 있다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 랭클(RANKL) 결합부위는 E97D 치환 이외에 랭클에 결합할 수 있는 어떠한 아미노산 부위도 치환될 수 있으나, 바람직하게는 95번 아미노산 아스파르트산(aspartic acid)이 글루탐산(glutamic acid)으로 치환(D95E)되거나, 99번 아미노산 시스테인(cysteine)이 페닐알라닌(phenylalanine)으로 치환(C99F)되는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK) 유전자인 것이다. 본 발명의 실시예 4에서는 점변이(site directed mutagenesis)를 이용하여 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자를 생산하였다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자는 서열번호 4 내지 10 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자인 것이 바람직하다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 본 발명에 따른 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질을 제공한다. 상기 단백질은 리더 펩타이드를 포함하는 단백질 전구체뿐만 아니라 리더 서열이 절단된 성숙 단백질도 포함한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질은 서열번호 11 내지 17 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질을 제공한다.

[0016] 본 발명의 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질은 인간 랭클(hRANKL)에 높은 친화성(affinity)을 나타내어 파골세포 생성을 억제하는 것을 특징으로 한다. 즉, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질은 인간 랭클(hRANKL)과 높은 친화성을 가지므로 인체내에서 wild type 인간 랭크(hRANK)와 인간 랭클(hRANKL) 간의 상호작용을 경쟁적으로 차단함으로써 파골세포의 생성을 억제할 수 있으며, 상기 파골세포의 억제로 골 질환의 발병을 예방할 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 본 발명에 따른 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 유전자는 서열번호 11 내지 17 중 어느 하나의 아미노산을 코딩하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자인 것이 바람직하다.

[0018] 본 발명의 재조합 벡터는 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레

오티드 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 “작동 가능하게 연결(operably linked)” 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. 상기 “발현 조절 서열(expression control sequence)” 이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 플라스미드의 예로는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118, pUC119 및 pET-22b(+)), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 등이 있으며, 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아테노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스와 같은 곤충 바이러스가 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입시키는데 적합한 벡터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 도 4에 나타낸 것과 같이 포유류의 발현벡터 pLNCX2 벡터(Clontech)에 삽입하여 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)를 위한 재조합 플라스미드(mutant hRANK-Ig/pLNCX2)를 제작하였다. 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)를 위한 재조합 플라스미드(mutant hRANK-Ig/pLNCX2)는 리더 펩타이드를 포함하는 인간 랭크(hRANK) 단백질의 인간 랭클(hRANKL) 결합부위를 코딩하는 DNA를 벡터에 클로닝 하는 단계 및 상기 단계에서 생성된 재조합 벡터에 인간 이뮤노글로불린 G1 불변 영역부위를 코딩하는 DNA를 인간 랭크(hRANK) 단백질의 인간 랭클(hRANKL) 결합부위를 코딩하는 DNA의 3'쪽에 위치하도록 도입하는 단계에 의해 제작할 수 있다 (실시예 4).

[0019] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 동물세포 발현벡터로 형질전환된 동물세포를 제공한다.

[0020] 본 발명의 동물세포는 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질을 발현하여 분비할 수 있는 어떤 동물세포도 사용 가능하나, 바람직하게는 CHO 세포, COS-7(Monkey, African green) 세포, NIH/3T3(Mouse fibroblast) 세포, BHK-21(Baby Hamster kidney, Syrian golden) 세포, Hela(Human Carcinoma) 세포, Vero(Monkey kidney, African green) 세포, 및 C127(Mouse) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 세포를 사용하는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 CHO 세포를 사용하는 것이 높은 형질전환율로 인하여 좋다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 본 발명에 따른 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자 또는 그 발현 단백질을 함유하는 골 질환 치료용 조성물을 제공한다. 상기 유전자는 서열번호 11 내지 17 중 어느 하나의 아미노산을 코딩하는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자인 것이 바람직하다.

[0022] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 돌연변이 수용성 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자는 발현벡터에 삽입되어 있는 것이 바람직하다.

[0023] 본 발명의 골 질환 치료용 조성물은 치료용 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 치료용 약제의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.1 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0026] 실시예 1. Wild type 인간 랭크(hRANK) 유전자와 인간 랭크 리간드(hRANKL) 유전자의 클로닝.

[0027] 연쇄중합반응(PCR)을 이용하여 wild type 인간 랭크(RANK) 유전자와 랭크 리간드(RANKL, 랭클) 유전자의 클로닝을 수행하였다.

[0028] 1-1. Wild type 인간 랭크(hRANK) 유전자의 클로닝

[0029] 인간 말초혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)에서 백혈구(leukocyte)를 분리하여 트리졸(trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μ l의 클로로포름(chloroform, Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였다. 추출된 mRNA 2 μ g을 주형으로 역전사 연쇄중합반응(RT-PCR)에 의해 cDNA를 복제한 후, 상기 cDNA를 주형으로하여 유전자 데이터베이스(database)에서 얻은 유사한 유전자의 염기서열에 따라 프라이머를 제작하였다. 이후 연쇄중합반응(PCR)(MJ Research Inc, USA)(95 $^{\circ}$ C 3분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분, final extension 72 $^{\circ}$ C 10분, 35 cycle)을 수행한 후, 627 bp에 달하는 인간 랭크 유전자(wild type)를 얻었다. 이때, 하기의 프라이머를 사용하였다. PCR 반응 결과, 랭크 유전자의 랭클 결합부위를 코딩하는 DNA 절편을 생산하였다.

[0030] 랭크 클로닝 프라이머

[0031] Forward : 5' TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT A 3'

[0032] Reverse : 5' CCA CAA GCC TCA TTG ATC CAG T 3'

[0033] 상기 PCR 반응으로 얻은 인간 랭크 유전자(wild type)는 pGEM-T Easy Vector(Promega, USA)에 클로닝 하였다. 상기 생산된 RANK/T-easy construct를 주형으로 하여 도 1에 나타난 것과 같이 PCR 반응을 3회 수행하였다. 첫 번째 PCR 반응시, 5' 프라이머로 [5'-GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC CAG ATC GCT CCT CCA-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG CAA GTA AAC ATG GGG TT-3']을 사용하였고, 두 번째 PCR 반응시, 5' 프라이머로 [5'-CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG CAA GTA AAC ATG GGG TT-3']을 사용하였고, 세 번째 PCR 반응시, 5' 프라이머로 [5'-CCG CTC GAG ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG CAA GTA AAC ATG GGG TT-3']을 사용하였다. 이와같이 3회 PCR 반응을 수행한 결과, 리더 펩타이드(leader peptide) 서열을 코딩하는 DNA와 랭크 유전자의 랭클 결합부위를 코딩하는 DNA로 이루어진 DNA 단편을 생산하였다. 이후, 5' 말단에 Igk chain leader peptide로 연결하여 수용성 단백질이 잘 생성되게 하였다. 또한 3' 말단에는 인간 면역 글로블린 G1 불변부위 부분(Human IgG1 Fc region)을 클로닝 하기 위해, 인간 IgG1 cDNA를 주형으로 하기의 프라이머를 이용하여 인간 IgG1 Fc region을 연결하였다.

[0034] 인간 IgG1 Fc region 클로닝 프라이머

[0035] Forward : 5' GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT 3'

[0036] Reverse : 5' TCA TTT ACC CGG AGA CAG G 3'

[0037] 1-2. 인간 랭크 리간드(RANKL, 랭클) 유전자의 클로닝

[0038] 상기 실시예 1-1의 연쇄중합반응(PCR) 방법과 동일한 방법으로 인간 PBMC의 cDNA에서 750 bp의 랭크 리간드(RANKL, 랭클)유전자를 얻었다. 이때 사용한 랭크 리간드 클로닝 프라이머는 하기와 같다.

[0039] 랭클 클로닝 프라이머

[0040] Forward : 5' ATG TTC GTG GCC CTC CTG GGG C 3'

[0041] Reverse : 5' GCC CCA GGA GGG CCA CGA ACA T 3'

[0042] 상기 PCR 반응으로 얻은 인간 랭크 리간드 유전자는 pGEM-T Easy Vector(Promega, USA)에 클로닝 하였다. 상기 생산된 RANKL/T-easy construct를 주형으로 하여 도 2에 나타난 것과 같이 PCR 반응을 3회 수행하였다. 첫 번째 PCR 반응시, 5' 프라이머로 [5'-GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC TTC TAT TTC AGA GCG-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG ATC TAT ATC TCG AAC TT-3']을 사용하였고, 두 번째 PCR 반응시, 5' 프라이머로 [5'-CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG ATC TAT ATC TCG AAC TT-3']을 사용하였고, 세 번째 PCR 반응시, 5' 프라이머로 [5'-CCG CTC GAG ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA-3'], 3' 프라이머로 [5'-TCC CCC GGG ATC TAT ATC TCG AAC TT-3']을 사용하였다. 이와같이 3회 PCR

반응을 수행한 결과, 리더 펩타이드(leader peptide) 서열을 코딩하는 DNA와 랭클 유전자의 랭클 결합부위를 코딩하는 DNA로 이루어진 DNA 단편을 생산하였다. 이후, 5' 말단에 Igk chain leader peptide로 연결하여 수용성 단백질이 잘 생성되게 하였다. 또한 3' 말단에는 인간 면역 글로불린 G1 불변부위 부분(Human IgG1 Fc region)을 클로닝 하기 위해, 인간 IgG1 cDNA를 주형으로 하기의 프라이머를 이용하여 인간 IgG1 Fc region을 연결하였다.

[0043] 인간 IgG1 Fc region 클로닝 프라이머

[0044] Forward : 5' GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT 3'

[0045] Reverse : 5' TCA TTT ACC CGG AGA CAG G 3'

[0046] 실시예 2. Wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK) 유전자와 인간 랭클(hRANKL) 유전자의 염기서열과 아미노산 서열 분석.

[0047] 상기 실시예 1에서 얻은 유전자의 염기서열은 자동 DNA서열 분석기(Applied Biosystem 373A, USA)를 사용하여 생어 디데옥시 방법(Sanger dideoxy procedure)으로 DNA 염기서열을 결정하였다. 이때, 모든 서열은 유전자의 양쪽 방향으로 분석되었다. 서열번호 2는 wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK)의 DNA 염기서열을 나타낸 것이고, 서열번호 3은 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)의 DNA 염기서열을 나타낸 것이다.

[0048] 실시예 3. Wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK)와 인간 랭클(hRANKL) 단백질 발현 플라스미드 제조.

[0049] 상기 실시예 1에서와 같이, wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK)와 인간 랭클(hRANKL) 단백질을 발현할 수 있는 유전자를 pGEM-T Easy Vector에 클로닝 한 후, 실시예 2에서와 같이 염기서열과 아미노산 서열을 확인하였다. 이후, wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK)와 인간 랭클(hRANKL) 단백질 발현 플라스미드를 제조하기 위해 유전자를 도 3a에 나타낸 포유류의 발현벡터인 pLNCX2(Clontech)에 5' 말단의 제한효소 Xho I 부위와 3' 말단의 제한효소 Not I 부위에 클로닝 하였다. 클로닝 결과, 도 3b와 도 3c에 나타낸 것과 같이 wild type 수용성 재조합 인간 랭크(도 3b; wild type)(hRANK-Ig/pLNCX2)와 랭클 단백질(도 3c)(hRANKL-Ig/pLNCX2) 발현 플라스미드를 제조하였다.

[0050] 실시예 4. 점변이(site directed mutagenesis)를 이용한 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자의 클로닝 및 단백질 발현 플라스미드 제조.

[0051] 점변이(site directed mutagenesis)에 의한 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자의 발현을 위하여 하기 표 1과 같은 7 개의 forward 프라이머들을 제작하였다. 상기 프라이머들은 일부 염기서열을 변형시킨 것이며, 변형시킨 부분은 프라이머 sequence 중 굵은 글씨 및 밑줄로 나타내었다. 하기 프라이머 중 1번 프라이머는 95번의 아스파르트산(aspartic acid)을 글루타민산(glutamic acid)으로, 2번 프라이머는 97번의 글루타민산(glutamic acid)을 아스파르트산(aspartic acid)으로, 3번 프라이머는 99번의 시스테인(cysteine)을 페닐알라닌(phenylalanine)으로, 4번 프라이머는 95번의 아스파르트산(aspartic acid)을 글루타민산(glutamic acid)으로, 97번의 글루타민산(glutamic acid)을 아스파르트산(aspartic acid)으로 치환한 것이다. 5번 프라이머는 95번의 아스파르트산(aspartic acid)을 글루타민산(glutamic acid)으로, 99번의 시스테인(cysteine)을 페닐알라닌(phenylalanine)으로 치환, 6번 프라이머는 97번의 글루타민산(glutamic acid)을 아스파르트산(aspartic acid)으로, 99번의 시스테인(cysteine)을 페닐알라닌(phenylalanine)으로 치환, 7번 프라이머는 95번의 아스파르트산(aspartic acid)을 글루타민산(glutamic acid)으로, 97번의 글루타민산(glutamic acid)을 아스파르트산(aspartic acid)으로, 99번의 시스테인(cysteine)을 페닐알라닌(phenylalanine)으로 치환시킨 것이다. 또한, 상기 forward 프라이머에 Kpn I 부위를 삽입(프라이머 sequence 중 밑줄친 부분)하였다.

[0052] [표 1. Forward 프라이머]

	Forward 프라이머
1. RANK-D95E	5'-CT GGGTACCACTGGAGCCAGGAA-3' Kpn I site RANK-D95E
2. RANK-E97D	5'-CT GGGTACCACTGGAGCCAGGACTGCGAT-3' Kpn I site RANK-E97D
3. RANK-C99F	5'-CT GGGTACCACTGGAGCCAGGACTGCGAGTGCTTC-3' Kpn I site RANK-C99F
4. RANK-D95E+E97D	5'-CT GGGTACCACTGGAGCCAGGAATGCGAT-3' Kpn I site RANK-D95E+E97D
5. RANK-D95E+C99F	5'-CT GGGTACCACTGGAGCCAGGAATGCGAGTGCTTC-3' Kpn I site RANK-D95E+C99F
6. RANK-E97D+C99F	5'-CT GGGTACCACTGGAGCCAGGACTGCGATTGCTTC-3' Kpn I site RANK-E97D+C99F
7. RANK-D95E+E97D+C99F	5'-CT GGGTACCACTGGAGCCAGGAATGCGATTGCTTC-3' Kpn I site RANK-D95E+E97D+C99F

[0053]

[0054] 이후, 도 3b에 나타낸 hRANK-Ig/pLNCX2 유전자를 주형으로 하여 PCR 반응을 통해 302 bp에 달하는 7 개의 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자를 얻었다. 이때 사용된 reverse 프라이머는 5'-TCCCCCGGGCAAGTAAACATGGGGTT-3'이며, 상기 reverse 프라이머에 Sma I 부위(reverse 프라이머 sequence 중 밑줄 친 부분)를 삽입하였다. 이후, 7 개의 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질 발현 플라스미드를 제조하기 위해 hRANK-Ig/pLNCX2의 5'말단에 제한효소 Kpn I 부위와 3'말단에 제한효소 Sma I 부위에 각각의 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자를 클로닝하였다. 그 결과 도 4에 나타낸 것과 같이 7 개의 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크 발현 플라스미드(mutant hRANK-Ig/pLNCX2)를 제조하였다.

[0055] **실시예 5. 점변이(site directed mutagenesis)를 이용한 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질의 염기서열과 아미노산 서열 확인.**

[0056] 상기 실시예 4에서 제조한 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 유전자의 염기서열은 자동 DNA서열 분석기(Applied Biosystem 373A, USA)를 사용하여 생어 디데옥시 방법(Sanger dideoxy procedure)으로 DNA 염기서열을 결정하였다. 이때, 모든 서열은 유전자의 양쪽 방향으로 분석되었다. 서열번호 4 내지 10는 7 개의 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질의 DNA 염기서열을 나타내며, 서열번호 11 내지 17은 아미노산 서열을 나타낸다.

[0057] **실시예 6. 단백질 발현 및 정제.**

[0058] 도 3a에 나타낸 pLNCX2에 클로닝한 7 개의 돌연변이 인간 수용성 재조합 랭크(mutant hRANK) 유전자, wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK) 유전자 및 인간 랭클(hRANKL) 유전자로부터 단백질을 발현시키기 위해 각각 Tetracycline off system의 293GPG 세포와 포유동물 유래 세포주인 CHO 세포를 이용하여 형질전환 시켰다. 상기 293GPG 세포를 거쳐 형질전환하면 더욱 안정적으로 발현이 유지되고, 타겟 세포에 독성을 거의 주지 않는 장점이 있기 때문에 293GPG 세포를 거쳐 CHO 세포로 형질전환 시켰다.

[0059] 우선 293GPG 세포를 6-well 조직 배양 플레이트에 well당 1×10^5 세포가 되도록 접종하고 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 1-2 μ g의 발현 벡터 DNA를 6-8 μ l의 Lipofectamine plus(Invitrogen)를 사용하여 감염시

졌다. 감염시킨 293GPG 세포를 24시간 동안 배양하여 바이러스(레트로 바이러스)를 포함하는 배양상청액을 이용하여 숙주(CHO) 세포를 4-5시간 배양 후, 혈청이 10% 함유된 배지로 교환하여 24시간 배양하였으며 이 과정을 3 회 반복 하였다. 숙주(CHO) 세포의 돼지 LAG-3 fusion Ig 단백질의 발현 확인을 위해, 무 혈청 DMEM 배지에서 숙주 세포를 배양하여 얻은 상청액을 인간 IgG ELISA kit(R&D System)를 이용하여 발현양을 확인하였다.

[0060] 7 개의 돌연변이 인간 수용성 재조합 랭크(mutant hRANK) 단백질, wild type 인간 수용성 재조합 랭크(hRANK) 단백질 및 인간 랭클(hRANKL) 단백질이 포유류 세포에서 과발현되는 것을 확인 한 후, 무 혈청 배지에 단백질 과발현 세포를 배양하여 상기 배양 상청액으로부터 단백질을 정제하기 위하여 Protein A Sepharose(Amersham) 컬럼에 완충액 A(20 mM sodium-phosphate pH 7.0)를 통과시킨 다음 단백질을 함유한 배양상청액을 통과시켰으며, 흡착되는 단백질을 완충액 B(0.1 M Citric acid-NaOH pH 3.0)를 이용하여 용출시켰다. 용출된 시료로 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 실시한 후, 쿠마지블루 염색을 하여 발현된 단백질을 확인하였으며, 이는 도 5a와 도 5b에 나타내었다.

[0061] 도 5a와 도 5b에 나타낸 것과 같이, 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK, wild type hRANK) 단백질은 약 45 킬로 달톤(Kd)으로 나타났으며(도 5a), 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL) 단백질은 약 57 킬로 달톤(Kd)으로 확인(도 5b)되었다. 상기 단백질들은 완충액 A에 투석하여 평형에 이르게 한 후, -70 °C에 보관하였다가 인간 랭클(hRANKL)과 인간 랭크(hRANK)의 상호작용 측정에 이용하였다.

[0062] **실시예 7. 유세포 분석기를 이용한 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)과 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)의 상호작용 측정.**

[0063] 유세포 분석기(FACS Calibur, BD bioscience)를 이용하여 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)과 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)의 상호작용을 측정하기 위하여, 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)이 과발현된 CHO 세포에 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)와 wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK)를 포함한 8 개의 랭크(RANK) 재조합 단백질을 처리하고 FITC로 표지된 human-Ig(Sigma)로 염색한 후, 유세포 분석법을 통해 형광강도(Fluorescence intensity)를 측정하였다 [대한민국 공개특허 10-2007-0120616]. 측정 결과는 도 6에 나타내었다.

[0064] 도 6에 보이는 것과 같이, wild type 수용성 재조합 인간 랭크(wild type RANK-Ig)보다 돌연변이 인간 수용성 재조합 랭크 단백질들(E97D RANK-Ig, D95E + E97D RANK-Ig, E97D + C99F RANK-Ig)이 CHO 세포에 발현된 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)에 효과적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[0065] **실시예 8. Biacore system을 이용한 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)과 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)의 친화도(affinity) 측정.**

[0066] 상기 실시예 7의 유세포 분석에서 효율적으로 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)에 결합하는 4 개의 랭크(RANK) 재조합 단백질들(wild type RANK-Ig, E97D RANK-Ig, D95E + E97D RANK-Ig, E97D + C99F RANK-Ig)과 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)과의 친화도(affinity)를 측정하기위해, Biacore system을 이용하였다. 상기 Biacore system을 이용한 실험은 표면 플라즈마 공명(surface plasmon resonance)을 이용한 방법으로, 리간드를 칩(chip)에 고정시킨 후 analyte의 친화도를 측정하는 것이다. 리간드로써는 도 5b에 나타낸 재조합 인간 RANKL-Ig를 사용하였고, 상기 4 개의 랭크 재조합 단백질들(wild type RANK-Ig, E97D RANK-Ig, D95E + E97D RANK-Ig, E97D + C99F RANK-Ig)을 analyte로 사용하였다. 상기 재조합 인간 RANKL-Ig는 amine coupling 방법으로 CM5 센서칩에 고정화 시키고 analyte들은 10 mM sodium acetate(pH 4.0)으로 녹여 최종 농도를 3.77 mM로 만들어 200 nM의 농도로 30 ml/min의 속도로 흘려보내며 측정하였다. 측정 결과는 표 2와 도 7에 나타내었다. 하기 표 2는 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)과 wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK) 또는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)간의 상호작용 측정 결과를 kinetic parameter로 나타낸 것이다.

[표 2. Kinetic parameters]

Proteins	$K_d (s^{-1} \cdot 10^{-2})$	$K_a (M^{-1} s^{-1} \cdot 10^3)$	$K_D (\mu M)$
Wild	1.51	2.80	5.93
Mutant 1 (D95E+E97D)	1.31	9.64	1.36
Mutant 2 (E97D)	1.86	20.10	0.93
Mutant 3 (E97D+C99F)	5.58	45.40	1.23

Binding curves were fit to a 1:1 Langmuir binding model. Results of dissociation rate constant (K_d), association rate constant (K_a), and equilibrium dissociation constant ($K_D = K_d / K_a$) are obtained from the average of two separate experiments on the different sensor chip. χ^2 values are less than 10.

상기 표 2에서 K_d 는 해리속도상수(dissociation rate constant)를 나타내며, K_a 는 회합속도상수(association rate constant)를 나타내고, K_D 는 equilibrium dissociation constant($K_D = K_d / K_a$)를 나타낸다.

상기 표 2와 도 7에 나타낸 것과 같이, E97D RANK-Ig는 wild type RANK-Ig보다 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)에 대한 친화도가 약 2배 정도 높았으며, E97D + C99F RANK-Ig는 wild type RANK-Ig보다 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)에 대한 친화도가 약 4배 높음을 확인하였다.

산업이용 가능성

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK) 유전자에 점변이(site directed mutagenesis)를 유도하여 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)를 제조할 수 있다. 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)와 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)과의 상호작용을 측정하는 경우, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK)가 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)에 대해 높은 친화력(affinity)을 나타내어 wild type 인간 랭크(hRANK)와 인간 랭클(hRANKL)간의 상호작용을 효과적으로 차단할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 상기 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK)를 이용하여 골흡수억제, 골형성증진, 골다공증, 골관절염, 다발성골수종, 과칼슘혈증 등 각종 골대사 이상으로 인한 골 질환의 치료용 조성물로서의 사용이 기대된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 Leader-RANK 유전자의 랭크(RANK) 결합부위를 코딩하는 DNA 절편을 합성하기 위한 PCR 과정과 그 프라이머를 나타낸다.

도 2는 Leader-RANK 유전자의 랭클(RANKL) 결합부위를 코딩하는 DNA 절편을 합성하기 위한 PCR 과정과 그 프라이머를 나타낸다.

도 3a는 발현벡터(pLNCX2), 도 3b는 wild type 수용성 재조합 인간 랭크(hRANK) 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합벡터(hRANK-Ig/pLNCX2), 도 3c는 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL) 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합벡터(hRANKL-Ig/pLNCX2)의 개열지도이다.

도 4는 돌연변이 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK) 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합벡터(mutant hRANK-Ig/pLNCX2)의 개열지도이다.

도 5a는 정제된 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK, wild type hRANK) 단백질의 전기영동 결과를 나타내며,

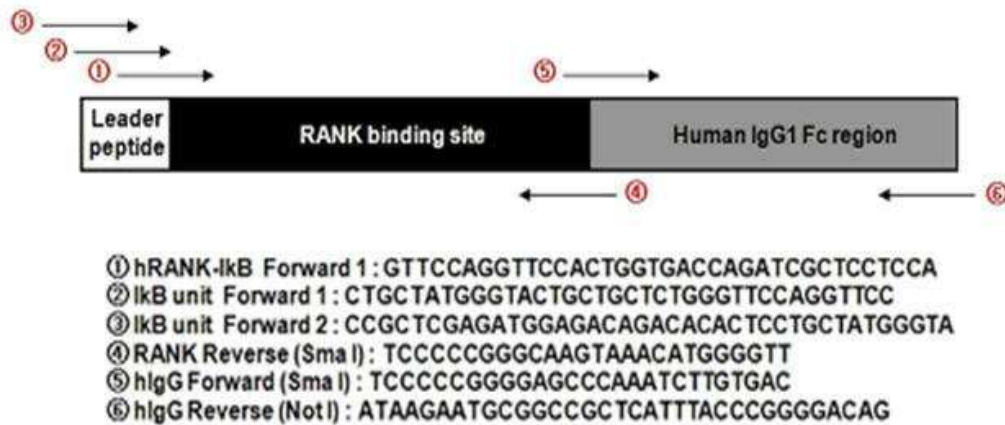
도 5b는 정제된 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL) 단백질의 전기영동 결과를 나타낸다.

[0077] 도 6은 유세포 분석기를 이용하여 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK, wild type hRANK) 단백질과 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL) 단백질이 결합함을 나타내는 도면이다.

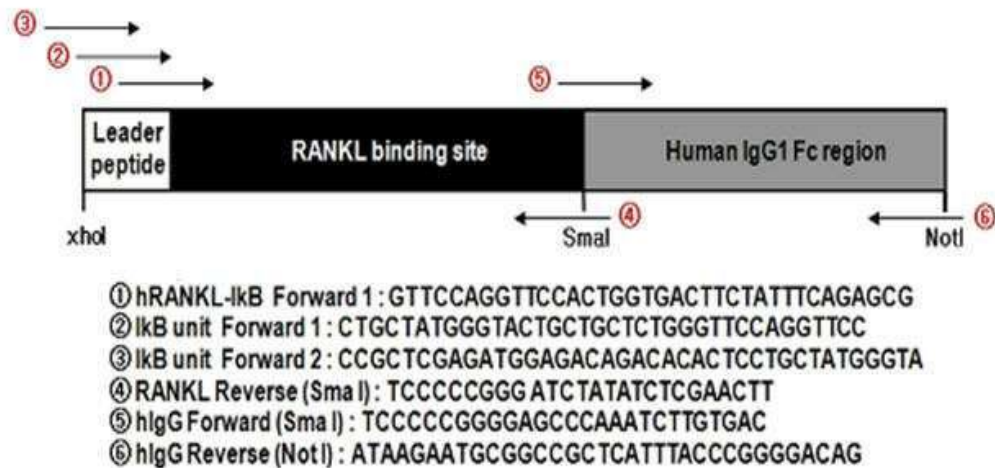
[0078] 도 7은 Biacore system을 이용한 수용성 재조합 인간 랭크(mutant hRANK, wild type hRANK)와 수용성 재조합 인간 랭클(hRANKL)간의 친화도(affinity) 측정 결과를 나타낸다.

도면

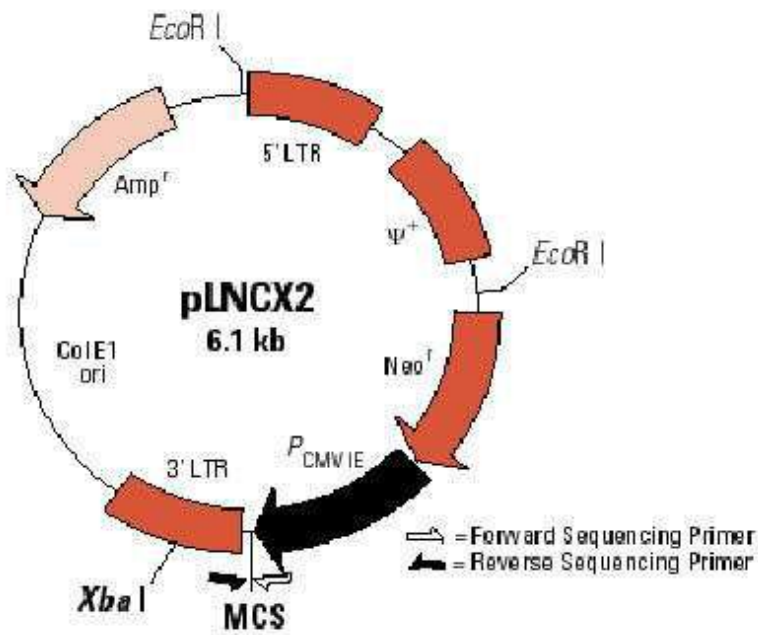
도면1



도면2

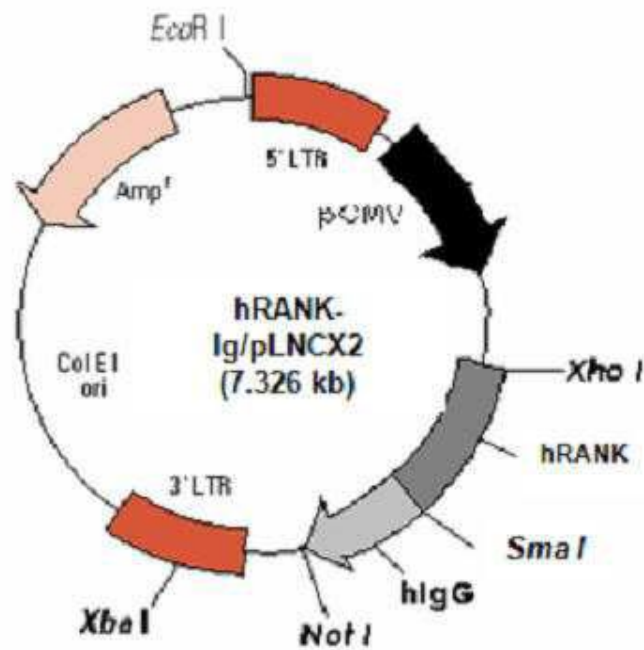


도면3a

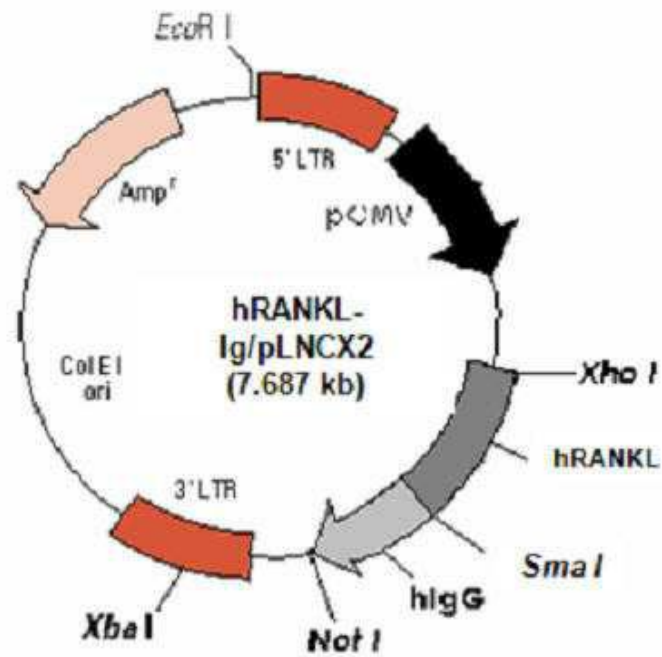


MCS (multi cloning site)의 제한효소 부위

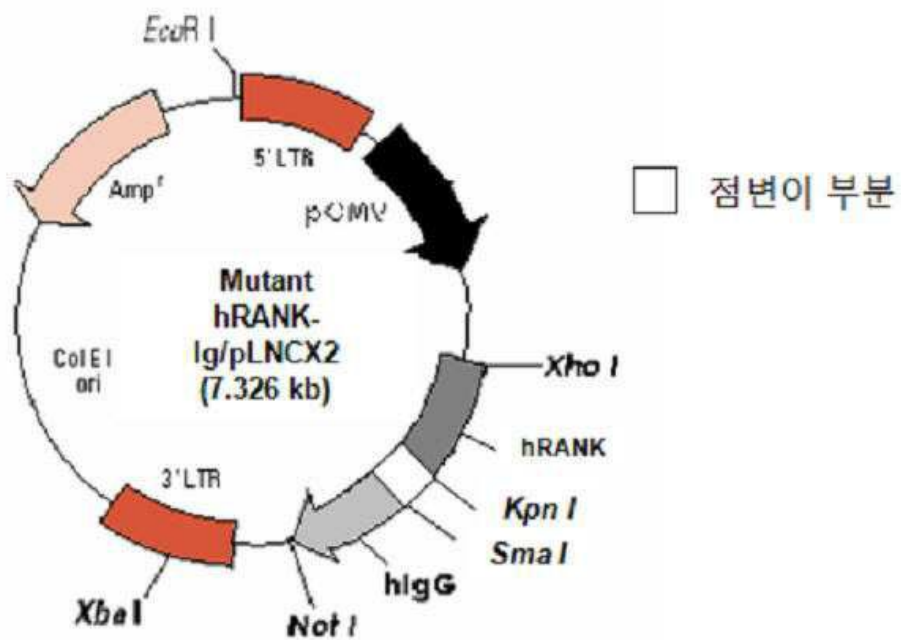
도면3b



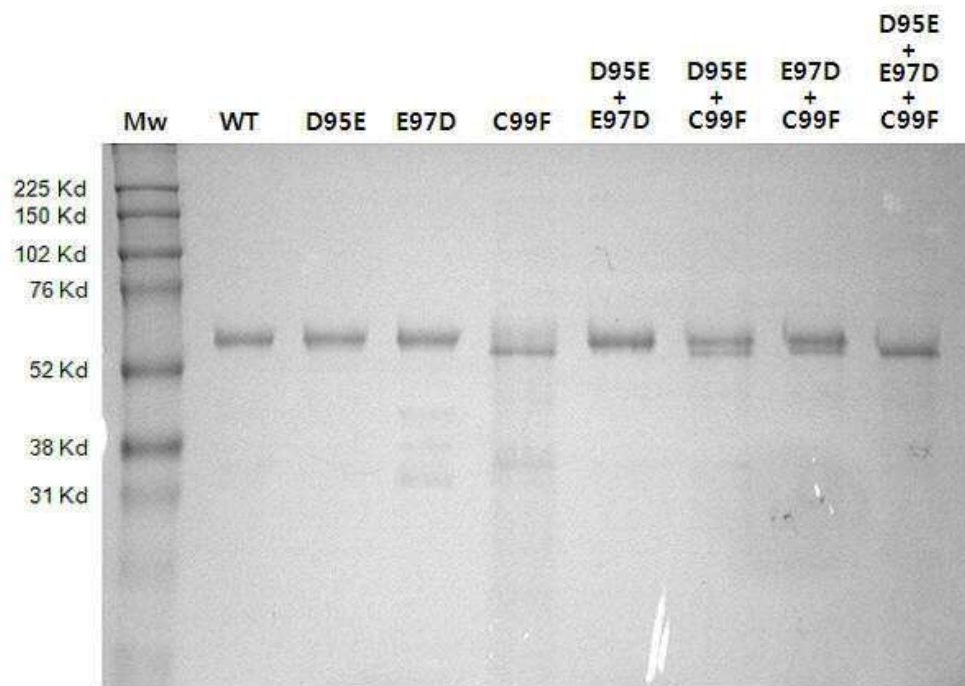
도면3c



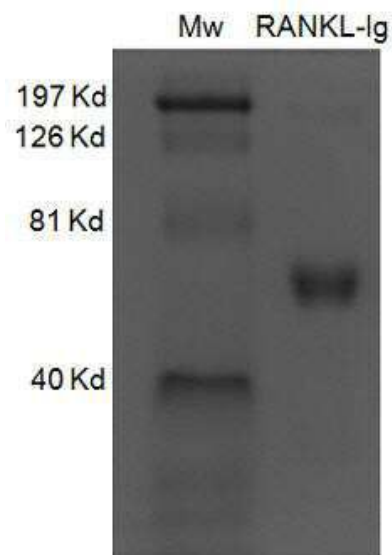
도면4



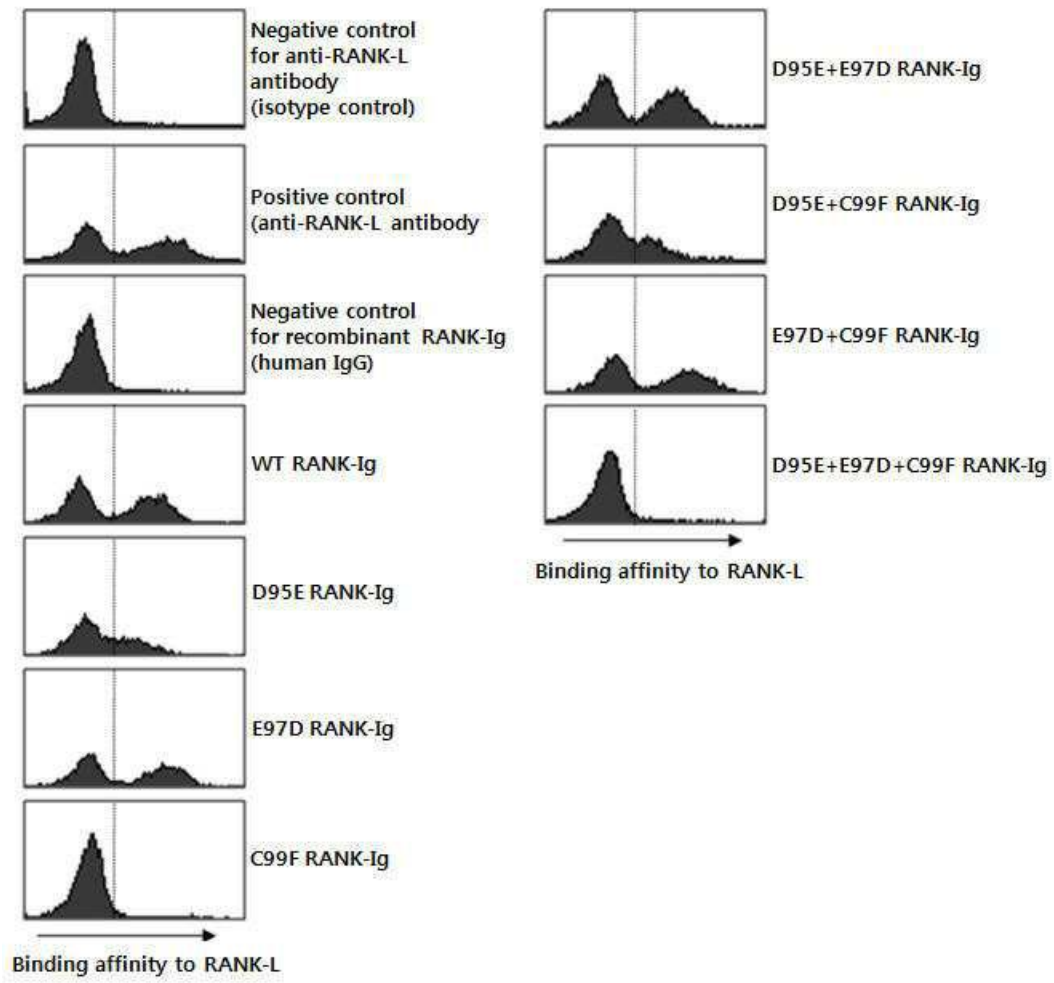
도면5a



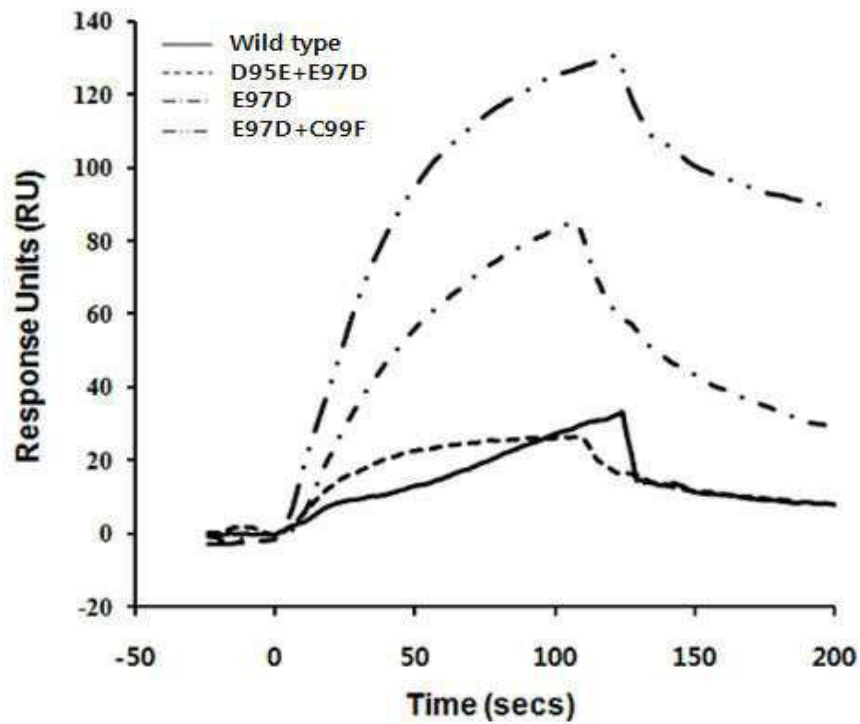
도면5b



도면6



도면7



서열 목록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
 <120> The improving efficacy of water-soluble recombination human RANK using site directed mutagenesis and the compositions for treatment of bone disease

<160> 17

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 185

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence for RANKL binding site

<400> 1

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

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

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

Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys
50 55 60

Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr
65 70 75 80

Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys
85 90 95

Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln
100 105 110

His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala
115 120 125

Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp
130 135 140

Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu
145 150 155 160

Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro
165 170 175

Asn Glu Pro His Val Tyr Leu Pro Gly
180 185

<210> 2
<211> 1326
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence for RANK

<400> 2

ccgctcgaga tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg ggttcaggt	60
tccactggtg accagatcgc tctccatgt accagtgaga agcattatga gcactctgga	120
cgggtgctgta acaaatgtga accaggaaag tacatgtctt ctaaatacac tactacctct	180
gacagtgtat gtctgccctg tggcccgat gaatacttgg atagctggaa tgaagaagat	240
aaatgcttgc tgcataaagt ttgtgataca ggcaaggccc tggtagccgt ggtcgccggc	300
aacagcacga cccccggcg ctgcgcgtgc acggtgggt accactggag ccaggactgc	360
gagtgtgcc gccgcaacac cgagtgcgcg cgggctctgg gcgccagca cccgttcag	420
ctcaacaagg acacagtgtg caaaccttgc ctgcaggct acttctctga tgcctttcc	480
tccacggaca aatgcagacc ctggaccaac tgtaccttcc ttggaaagag agtagaacat	540
catgggacag agaaatccga tgcggtttgc agttcttctc tgccagctag aaaaccacca	600
aatgaacccc atgtttactt gcccggggag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc	660
ccacctgcc cagcacctga actcctgggg ggacctcag tcttctctt cccccaaaa	720
cccaaggaca cctcatgat ctccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg	780
agccacgaag accctgaggt caagtccaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	840
gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc	900
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	960
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggcgagcc ccgagaacca	1020
caggtgtaca ccctgcccc atccggggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc	1080
tgcctggtca aaggcttcta tccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1140

ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc	1200
tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcacgtctc	1260
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtccccgggt	1320
aaatga	1326
<210> 3	
<211> 1587	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> DNA sequence for RANKL	
<400> 3	
ccgctcgaga tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgctgctctg ggttcaggt	60
tccactgggtg acatgttcgt ggccctcctg gggctggggc tgggccaggt tgtctgcagc	120
gtcgccctgt tcttctatct cagagcgcag atggatccta atagaatatc agaagatggc	180
actcactgca tttatagaat tttgagactc catgaaaatg cagattttca agacacaact	240
ctggagagtc aagatacaaa attaatacct gattcatgta ggagaattaa acaggccttt	300
caaggagctg tgcaaaagga attacaacat atcgttggat cacagcacat cagagcagag	360
aaagcgatgg tggatggctc atggttagat ctggccaaga ggagcaagct tgaagctcag	420
ccttttgctc atctcactat taatgccacc gacatcccat ctggttccca taaagtgagt	480
ctgtcctctt ggtaccatga tcgggggttg gccaagatct ccaacatgac ttttagcaat	540
ggaaaactaa tagttaatca ggatggcttt tattacctgt atgccaacat ttgctttcga	600
catcatgaaa cttcaggaga cctagctaca gagtatcttc aactaatggt gtacgtcact	660

aaaaccagca tcaaaatccc aagttctcat accctgatga aaggaggaag caccaagtat	720
tggtcagga attctgaatt ccatttttat tccataaacg ttggtggatt ttttaagtta	780
cggctctggag aggaaatcag catcgaggtc tccaaccctt ccttactgga tccggatcag	840
gatgcaacat acittggggc ttttaaagtt cgagatatag atcccgggga gcccaaatct	900
tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	960
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc	1020
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	1080
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg	1140
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1200
aagtgcagg tctccaaca agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1260
aaaggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccggga ggagatgacc	1320
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagca catgccgtg	1380
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1440
tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1500
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag	1560
agcctctccc tgtccccggg taaatga	1587

<210> 4
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA sequence for mutant RANK(D95E)

<400> 4
atggccccgc gcgccccgcg gcgccccgcg ctgttcgcgc tgcctgctgt ctgcgcgctg 60
ctgccccgcg tgcaggtggc ttgacagatc gctcctccat gtaccagtga gaagcattat 120
gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc 180
actactacct ctgacagtgt atgtctgccc tgtggccccg atgaatactt ggatagctgg 240
aatgaagaag ataatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggtggcc 300
gtggtcgccg gcaacagcac gaccccccg cgctgcgcgt gcacggctgg gtaccactgg 360
agccaggaat gcgagtgtg ccgccgcaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag 420
caccgttgc agtcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttgagg ctacttctt 480
gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga cctggacca actgtacctt ccttgaaag 540
agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggtt gcagttcttc tctgccagt 600
agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttccccggg agcccaaac ttgtgacaaa 660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccattccggg atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tcctttttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtccccgg gtaaatga 1338

<210> 5
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence for mutant RANK(E97D)

<400> 5
atggccccgc gcgccccgcg gcgccccgcg ctgttcgcgc tgctgctgct ctgcgcgctg 60
ctgccccgcg tgcaggctgc tttgcagatc gtcctccat gtaccagtga gaagcattat 120
gagcatctgg gacggctgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgct ttctaaatgc 180
actactacct ctgacagtgt atgtctgccc tgtggccccg atgaatactt ggatagctgg 240
aatgaagaag ataaatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggctggc 300
gtggctgcgc gcaacagcac gacccccgcg cgttcgcgct gcacggctgg gtaccactgg 360
agccaggact gcgattgctg ccgccgaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag 420
caccgttgc agctcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttgagg ctacttctct 480
gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga ccttgacca actgtacctt ccttgaaaag 540
agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagttcttc tctgccagct 600

agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttgcccgagg agcccaaadc ttgtgacaaa	660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc	720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag	960
gttccaaca aagccctccc agcccccac gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg atgagctgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctcc	1320
ctgtccccgg gtaaatga	1338

<210> 6
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA sequence for mutant RANK(C99F)

<400> 6	
atggccccgc gcgccccgcg gcgccccgcg ctgttcgcgc tgctgctgct ctgcgcgctg	60
ctgccccgcg tgcaggtggc ttgacagatc gctcctccat gtaccagtga gaagcattat	120

gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc	180
actactacct ctgacagtggt atgtctgccc tggggcccg atgaatactt ggatagctgg	240
aatgaagaag ataaatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggiggcc	300
gtggtcgccg gcaacagcac gaccccccg cgctgcgcgt gcacggctgg gtaccactgg	360
agccaggact gcgagtgtt cgcgcgaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag	420
caccgttgc agctcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttgagg ctacttctct	480
gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga ccttgacga actgtacctt ccttgaaaag	540
agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagtcttc tctgccagct	600
agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttgcccggg agcccaaac ttgtgacaaa	660
actcacacat gccacacgtg cccagcacct gaactcctgg ggggacgctc agtcttctc	720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtcaag	960
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gaaaaacca tctccaaagc caaaggcag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320

ctgtccccgg gtaaatga 1338

<210> 7
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence for mutant RANK(D95E+E97D)

<400> 7
atggccccgc gcgccccgcg gcgccccgc ctgttcgcgc tgctgctgct ctgcgcgctg 60

ctgccccgcg tgcaggtggc ttgacagatc gctcctccat gtaccagtga gaagcattat 120

gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc 180

actactacct ctgacagtgt atgtctgcc tggggccccg atgaatactt ggatagctgg 240

aatgaagaag ataatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggtggcc 300

tggttcgccg gcaacagcac gacccccgcg cgttcgcgct gcacggctgg gtaccactgg 360

agccaggaat gcgattgctg ccgccgaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag 420

cacccgttgc agctcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttgagg ctacttctct 480

gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga ccttgaccca actgtacctt ccttgaaaag 540

agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagttcttc tctgccagct 600

agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttgccggggg agcccaaatac ttgtgacaaa 660

actcacacat gccacacgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc 720

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aagccctccc agcccccata gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtcttg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtccccgg gtaaatga	1338

<210> 8
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA sequence for mutant RANK(D95E+C99F)

<400> 8 atggccccgc gcgccccggc gcgccccgcg ctgttcgcgc tgcgtctgct ctgcgcgctg	60
ctgccccggc tgcaggtggc tttgcagatc gctcctccat gtaccagtga gaagcattat	120
gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc	180
actactacct ctgacagtgt atgtctgccc tgtggccccg atgaatactt ggatagctgg	240
aatgaagaag ataatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggtggcc	300

gtggtcgccg gcaacagcac gacccccgg cgctgcgcgt gcacggctgg gtaccactgg 360

agccaggaat gcgagtgttt ccgccgcaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag 420

caccctgtgc agctcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttgagg ctacttctct 480

gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga cctggacca actgtacctt ccttggaag 540

agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagttcttc tctgccagct 600

agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttccccggg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccacgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc 720

ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtec tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtcaag 960

gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtcttg cacaaccact acacgcagaa gacgtctcc 1320

ctgtccccgg gtaaatga 1338

<210> 9
<211> 1338
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence for mutant RANK(E97D+C99F)

<400> 9

atggccccgc gcgccccgcg gcgccccgcg ctgttcgcgc tgctgctgct ctgcgcgctg	60
ctcgcgccgc tgcaggtggc ttgcagatc gtcctccat gtaccagtga gaagcattat	120
gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc	180
actactacct ctgacagtgt atgtctgcc tggggccgc atgaatactt ggatagctgg	240
aatgaagaag ataatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggtggcc	300
gtggtcgccg gcaacagcac gacccccgcg cgttcgcgct gcacggctgg gtaccactgg	360
agccaggact gcgattgctt ccgccgcaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag	420
caccgttgc agctcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttcagg ctacttctct	480
gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga cctggacca actgtacctt ccttgaaag	540
agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagttcttc tctgccagct	600
agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttccccggg agcccaaatc ttgtgacaaa	660
actcacacat gccaccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc	720
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atccaagac aaagccgcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtec tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtcaag	960

gtctccaaca aagccctccc agcccccac gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cctgctgga ctccgacggc 1200

tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct cctgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa ggcctctcc 1320

ctgtccccgg gtaaatga 1338

<210> 10
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA sequence for mutant RANK(D95E+E97D+C99F)

<400> 10
 atggccccgc gcgcccggcg gcgcccgcg ctgttcgcgc tgctgctgct ctgcgcgctg 60

ctgccccgcg tgcaggtggc ttgcagatc gctcctccat gtaccagtga gaagcattat 120

gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc 180

actactacct ctgacagtgt atgtctgcc tgtggcccg atgaatactt ggatagctgg 240

aatgaagaag ataatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggtggcc 300

gtggtcgccg gcaacagcac gacccccgg cgtgcgcgt gcacggctgg gtaccactgg 360

agccaggaat gcgattgctt ccgcgcgaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag 420

caccgttgc agctcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttgagg ctacttctct 480

gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga ccttggacca actgtacctt ccttggaaaag 540

agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagtcttc tctgccagct 600

agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttgcccgggg agcccaaadc ttgtgacaaa 660

actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 720

ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgaatg gcaaggagta caagtgaag 960

gttccaaca aagccctccc agcccccac gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tcctttctc tctacagca gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctcc 1320

ctgtccccgg gtaaatga 1338

<210> 11
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> amino acid sequence for mutant RANK(D95E)

<400> 11
 Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu

1	5	10	15
Leu Cys Ala	Leu Leu Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro		
	20	25	30
Pro Cys Thr	Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn		
	35	40	45
Lys Cys Glu	Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser		
	50	55	60
Asp Ser Val	Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp		
	65	70	75
Asn Glu Glu	Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys		
	85	90	95
Ala Leu Val	Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys		
	100	105	110
Ala Cys Thr	Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Glu Cys Glu Cys Cys Arg		
	115	120	125
Arg Asn Thr	Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Gly Ala Gln His Pro Gln		
	130	135	140
Leu Asn Lys	Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser		
	145	150	155
Asp Ala Phe	Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr		
	165	170	175
Phe Leu Gly	Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala		
	180	185	190
Val Cys Ser	Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His		
	195	200	205
Val Tyr Leu	Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Tyr Cys		
	210	215	220
Pro Pro Cys	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
	225	230	235
			240

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

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

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

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

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

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid sequence for mutant RANK(E97D)

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His

195	200	205
Val Tyr Leu Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Tyr Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
	245	250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
	260	265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
	275	280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
	290	295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
	325	330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
	340	345 350
Arg Glu Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
	355	360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
	370	375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
	405	410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
	420	425 430

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

<210> 13
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequence for mutant RANK(C99F)

<400> 13
Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr

	165		170		175										
Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Val	Glu	His	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala
	180		185		190										
Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His
	195				200							205			
Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Tyr	Cys
	210				215						220				
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
	225				230					235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			245					250						255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
		260						265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	275						280					285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
	290					295					300				
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
	305				310					315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			325						330					335	
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
		340						345					350		
Arg	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
	355						360					365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
	370					375					380				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
	385				390					395					400

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

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

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

<210> 14
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequence for mutant RANK(D95E+E97D)

<400> 14
Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Gly Ala Gln His Pro Gln

130	135	140	
Leu Asn Lys Asp Thr	Val Cys Lys Pro Cys	Leu Ala Gly Tyr Phe Ser	
145	150	155	160
Asp Ala Phe Ser Ser Thr	Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr	Asn Cys Thr	
	165	170	175
Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala			
	180	185	190
Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His			
	195	200	205
Val Tyr Leu Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Tyr Cys			
	210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
	225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
	245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
	290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
	305	310	315
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
	325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
	340	345	350
Arg Glu Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
	355	360	365

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequence mutant RANK(D95E+C99F)

<400> 15
Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys

100	105	110
Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Glu Cys Glu Cys Phe Arg		
115	120	125
Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Gly Ala Gln His Pro Gln		
130	135	140
Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser		
145	150	155
160		
Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr		
165	170	175
Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala		
180	185	190
Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His		
195	200	205
Val Tyr Leu Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Tyr Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
320		
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequence for mutant RANK(E97D+C99F)

<400> 16
Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

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

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

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

Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp

65	70	75	80
Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys	85	90	95
Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys	100	105	110
Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Asp Cys Phe Arg	115	120	125
Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Gly Ala Gln His Pro Gln	130	135	140
Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser	145	150	155
Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr	165	170	175
Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala	180	185	190
Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His	195	200	205
Val Tyr Leu Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Tyr Cys	210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu	225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu	245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	290	295	300

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

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> amino acid sequence for mutant RANK(D95E+E97D+C99F)

<400> 17
Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

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

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

35	40	45	
Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser			
50	55	60	
Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp			
65	70	75	80
Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys			
85	90	95	
Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys			
100	105	110	
Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Glu Cys Asp Cys Phe Arg			
115	120	125	
Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Gly Ala Gln His Pro Gln			
130	135	140	
Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser			
145	150	155	160
Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr			
165	170	175	
Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala			
180	185	190	
Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His			
195	200	205	
Val Tyr Leu Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Tyr Cys			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
260	265	270	

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

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

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

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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