



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0113499
(43) 공개일자 2007년11월29일

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01) *C12N 15/861* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0046441

(22) 출원일자 2006년05월24일

심사청구일자 2006년05월24일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

권영근

서울특별시 강남구 도곡동 527 도곡텍슬아파트
101-102

김영명

강원 춘천시 퇴계동 현대1차아파트 105동 503호

민정기

강원 춘천시 석사동 그랜드아파트 106동 302호

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) DKK1을 포함하는 혈관신생을 억제시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 Wnt 단백질의 보조수용체 억제단백질로서 알려진 DKK1 (Dickkopf-1)을 이용하여 혈관신생을 억제하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 DKK1을 이용하여 혈관신생을 억제하는 방법은 포유동물의 조직에 DKK1 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 처리하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 DKK1 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA의 처리는 제대정맥내피세포, DKK1 과발현 세포주 및 DKK1 형질도입 마우스에서 혈관 형성을 효과적으로 억제하므로, 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료를 위한 치료제 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도6a

정상 마우스



DKK1 형질도입 마우스



특허청구의 범위

청구항 1

사람을 제외한 포유동물의 조직에 DKK1 (Dickkopf-1) 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 처리하는 단계를 포함하는 혈관신생을 억제시키는 방법.

청구항 2

DKK1 단백질을 유효성분으로 포함하는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 3

DKK1 단백질을 암호화하는 DNA를 유효성분으로 포함하는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 DKK1 단백질을 암호화하는 DNA가 비바이러스성 벡터 또는 바이러스성 벡터에 포함되어 제공됨을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 비바이러스성 벡터는 동물 세포에서 발현될 수 있는 플라스미드를 포함함을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 바이러스성 벡터가 아데노바이러스 벡터, 아데노관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 단순포진 바이러스 벡터를 포함함을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 7

제 2항에 있어서, 상기 혈관신생으로 인한 질환은 혈관신생에 의해 매개되는 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형, 동맥경화, 혈관유착, 부종성 경화증, 각막이식성 혈관신생, 신생혈관성 녹내장, 당뇨병성 망막증, 신생혈관에 의한 각막질환, 반점의 변성, 익상편, 망막변성, 후수정체 섬유 증식증, 과립성 결막염, 퇴화반, 조숙아의 망막증, 관절염, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 알츠하이머 질환, 비만, 지루성 피부염, 여드름 및 고혈압을 포함하는 암 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<15> 본 발명은 Wnt 단백질의 보조수용체 억제단백질로서 알려진 DKK1 (Dickkopf-1)을 이용하여 혈관신생을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

<16> 혈관신생 (angiogenesis)이란 새로운 혈관이 생성되는 과정을 말하며, 정상적인 생체 조건에서는 드물게 일어나지만, 배발생, 황체 형성 또는 상처치료 과정에서는 반드시 수반되는 과정이다. 특히, 혈관신생은 종양이 다른 부위로 전이하는 경우 중요하게 작용함이 알려져 있다 (Folkman J and Klagsburn M, *Science*, 235(4787), pp442-447, 1987).

<17> 혈관신생이 일어나는 과정은 일반적으로 혈관신생 촉진인자의 자극에 의하여 프로테아제로 인한 혈관기저막의 분해, 혈관 내피세포의 이동, 증식 및 혈관 내피세포 분화에 의한 관강의 형성으로 혈관이 재구성되어 새로운 모세혈관이 생성되는 것으로 이루어진다.

- <18> 그러나 혈관신생이 자율적으로 조절되지 못하고 병적으로 성장함으로써 야기되는 질환들이 있다. 병리학적 상태에서 나타나는 혈관신생에 관련된 질환으로는 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형 및 심혈관 질환인 동맥경화, 혈관유착, 부종성 경화증이 있고, 혈관신생에 의한 안과 질환으로는 각막이식성 혈관신생, 혈관신생성 녹내장, 당뇨병성 망막증, 신생혈관에 의한 각막 질환, 반점의 변성, 익상편, 망막 변성, 후수정체 섬유 증식증, 과립성 결막염 등이 있다. 관절염과 같은 만성 염증성 질환, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 지루성 피부염, 여드름과 같은 피부과 질환, 알츠하이머 및 비만도 혈관신생과 관련이 있으며, 암의 성장과 전이는 반드시 혈관신생에 의존한다 (D'Amato RJ and Adamis AP, *Ophthalmology*, 102(9), pp1261-1262, 1995; Arbiser JL, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 34(3), pp486-497, 1996 ; O'Brien KD et al. *Circulation*, 93(4), pp672-682, 1996 ; Hanahan D and Folkman J, *Cell*, 86(3), pp353-364, 1996).
- <19> 특히 암의 경우 혈관신생은 암세포의 성장과 전이에 중요한 역할을 한다. 종양은 신생혈관을 통하여 성장과 증식에 필요한 영양과 산소를 공급받으며, 또한 종양까지 침투한 신생 혈관들은 전이하는 암세포가 혈액순환계로 들어가는 기회를 줌으로써 암세포가 전이 (metastasis)되게 한다 (Folkman and Tyler, *Cancer Invasion and metastasis*, Biologic mechanisms and Therapy(S.B. Day ed.) Raven press, New York, pp94-103, 1977; Polverini PJ, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 6(3), pp230-247, 1995). 암 환자가 사망하는 주원인은 전이이며, 현재 임상에서 사용되는 화학요법이나 면역요법들이 암 환자의 생존율을 높이는데 기여하지 못하고 있는 것은 바로 암의 전이 때문이다.
- <20> 염증성 질환의 대표적인 질환인 관절염은 자가면역 이상이 원인이지만, 병이 진행되면서 관절 사이의 활액강에 생긴 만성 염증이 혈관신생을 유도하여 연골이 파괴된다. 즉, 염증을 유도하는 사이토카인의 도움으로 활액세포와 혈관내피세포가 활액강에서 증식을 하여 혈관신생이 진행되면서 연골부에 발생하는 결합조직층인 관절관누스를 형성하여 쿠션 역할을 하는 연골이 파괴된다 (Koch AE et al., *Arthritis Rheum.*, 29(4), pp471-479, 1986; Stupack DG et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32(5), pp573-581, 1999; Koch AE, *Arthritis Rheum.*, 41(6), pp951-962, 1998).
- <21> 해마다 전 세계적으로 수백만 명이 실명하게 되는 많은 안과질환도 혈관신생이 원인이 되고 있다 (Isner JM and Asahara T, *J. Clin. Invest.*, 103(9), pp1231-1236, 1999). 그 대표적인 예로 노인에게 일어나는 퇴화반 (macular degeneration), 당뇨병성 망막증 (diabetic retinopathy), 조숙아의 망막증, 신생혈관성 녹내장과 신생혈관에 의한 각막 질환과 같은 질병은 혈관신생이 원인이 되는 질병들이다 (Adamis AP et al., *Angiogenesis*, 3(1), pp9-14, 1999). 그 중 당뇨병성 망막증은 당뇨병의 합병증으로 망막에 있는 모세혈관이 초자체를 침습하여 결국 눈이 멀게 되는 질병이다.
- <22> 붉은 반점과 인설의 피부가 특징인 건선도 피부에 생기는 만성적 증식성 질환인데 치유되지 않으며 고통과 기형을 수반한다. 정상인 경우 각질세포가 한달에 한번 증식하는데 비해 건선 환자는 적어도 일주일에 한번 증식한다. 이런 빠른 증식을 하기 위해서는 많은 혈액이 공급되어야 하므로 혈관신생이 활발히 일어날 수밖에 없다 (Folkman J, *J. Invest. Dermatol.*, 59(1), pp40-43, 1972).
- <23> 비만의 경우도 지방세포 조직 (adipose tissue)도 하부 맥관구조에 의해 조절이 될 수 있으며, 항-혈관신생 억제제를 처리할 경우 용량의존적으로 체중의 감소와 지방세포조직의 감소를 나타낸다 (Rupnick MA et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(16), pp10730-5, 2002).
- <24> 또한, 최근에는 알츠하이머에 걸린 뇌에서 혈류량감소와 염증으로 인하여 혈관신생 유도인자들이 발현되고 혈관신생이 활발히 일어나서 결국 베타아밀로이드의 침착을 일으키고 신경독성 펩타이드를 분비하게 된다고 제시하고 있어, 비정상적인 뇌의 내피세포를 목표로 할 수 있는 혈관신생을 억제하는 약물들은 알츠하이머 질환을 예방하고 치료할 수 있을 것이다 (Vagnucci AH Jr. et al., *Lancet*, 361(9357), pp605-608, 2003).
- <25> 새롭게 혈관이 형성되기 위해서는 혈관내피분화과정 동안 많은 유전적 변화를 수반되어야한다. 따라서 최근에는 혈관내피세포의 분화를 조절하는 유전자를 발굴하여 이들 유전자를 조절함으로써 혈관신생을 조절하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 종양의 혈관신생을 억제하는 치료법은 넓은 유효 작용범위, 저독성 및 직접적인 내피 투여시 체내 저항성이 없다는 점에서 최근 많은 관심을 끌고 있다. 그러나, 기존의 혈관신생 억제제의 경우, 주변의 정상 혈관조직을 손상시키는 등의 다양한 부작용들이 보고되었으며, 경우에 따라 혈관신생의 치료효과를 나타내지 못할 수도 있다는 단점이 보고되었다. 따라서, 부작용을 최소화할 수 있음과 동시에 혈관신생을 효과적으로 치료할 수 있는 방법이 개발된다면, 악성 종양 등 혈관신생을 유발하는 다양한 질환을 치료하는 방법에 있어 하나의 전기를 마련할 것으로 기대되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과가 나타나지 않고 있는 실정이다. 따라서, 안전하면서도 효과적으로 혈관신생을 치료할 수 있는 방법을 개발하여야 할 필요성이

계속해서 대두되었다.

<26> DKK1은 Wnt의 억제 단백질인 Dickkopf류의 일종으로서, 양서류 (*Xenopus*)의 머리 형성에 관여하는 중요한 단백질로서 최초로 알려졌다 (Glinka A et al., *Nature*, 391(6665), pp357-362, 1998). DKK1은 두개의 특징적인 시스테인이 많은 부위 (cysteine-rich domain) 가지고 있으며 다양한 길이의 연결부위로 구분되어있다. 특히 시스테인-2 부분은 이들 Dickkopf류 간에 고도로 보존되어 있으며 10개의 보존된 시스테인 아미노산을 포함하고 있다 (Krupnik VE et al., *Gene*, 238(2), pp301-313, 1999).

<27> 현재까지 DKK1의 기능은 알츠하이머 환자의 뇌에서 신경세포의 퇴화, 멜라노사이트 (melanocyte)의 성장 및 분화 억제, 줄기세포의 세포주기 조절 등에 대한 연구 보고가 있을 뿐, DKK1의 혈관 신생에 대한 억제 효과에 대한 연구 보고가 교시되거나 기재된 바 없다 (Caricasole A et al., *J. Neurosci.*, 24(26), pp6021-6027, 2004; Yamaguchi Y et al, *J. cell Biol.*, 165(2), pp275-85, 2004; Gregory CA. et al, *J. Biol. Chem.*, 278(30), pp28067-28078, 2003).

<28> 이에 본 발명자들은 혈관내피세포의 분화과정을 조절하는 유전자를 발굴하고 기능을 규명하여 안전하면서도 효과적으로 혈관신생을 치료할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, Wnt 단백질의 보조 수용체 억제 단백질로 알려진 DKK1 단백질을 생체에 처리하거나, DKK1 단백질을 암호화하는 DNA를 형질감염 또는 형질도입 시켰을 때, 혈관신생을 효과적으로 억제하여 혈관신생과 관련된 질환의 치료에 활용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<29> 본 발명의 목적은 DKK1 (Dickkopf-1) 단백질을 또는 이를 암호화하는 DNA를 이용하여 혈관신생을 억제시키는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<30> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 사람을 제외한 포유동물의 조직에 DKK1 (Dickkopf-1) 단백질을 또는 DKK1 단백질을 암호화하는 DNA를 처리하는 단계를 포함하는 혈관신생을 억제시키는 방법을 제공한다.

<31> 본원 발명의 DKK1 (Dickkopf-1) 단백질을 암호화하는 DNA는 비바이러스성 벡터 또는 바이러스성 벡터를 사용하여 조직 내로 전달됨을 특징으로 한다.

<32> 본원 발명의 비바이러스성 벡터는 동물 세포에서 발현될 수 있는 플라스미드를 포함함을 특징으로 한다.

<33> 본원 발명의 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 단순포진 바이러스 벡터를 포함함을 특징으로 한다.

<34> 또한, 본원 발명은 DKK1 단백질을 또는 이를 암호화하는 DNA를 유효성분으로 포함하는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<35> 본원 발명의 혈관신생으로 인한 질환은 혈관신생에 의해 매개되는 혈관종, 혈관섬유증, 혈관기형, 동맥 경화, 혈관유착, 부종성 경화증, 각막이식성 혈관신생, 신생혈관성 녹내장, 당뇨병성 망막증, 신생혈관에 의한 각막질환, 반점의 변성, 익상편, 망막변성, 후수정체 섬유 증식증, 과립성 결막염, 퇴화반, 조숙아의 망막증, 관절염, 건선, 모세관 확장증, 화농성 육아종, 알츠하이머 질환, 비만, 지루성 피부염, 여드름 및 고형암을 포함하는 암 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혈관신생으로 인한 질환임을 특징으로 한다.

<36>

<37> 이하, 본 발명은 상세히 설명한다.

<38> 본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 DKK1 (Dickkopf-1) 단백질 또는 이를 암호화하는 서열번호 :2의 염기 서열인 DKK1 단백질을 암호화하는 DNA를 처리하는 단계를 포함하는 혈관신생을 억제시키는 방법을 제공하나, 본 발명의 DKK1은 상기 서열에 한정되는 것은 아니며, 모든 포유동물의 DKK1을 포함한다.

<39> 상기 DKK1 단백질은 포유동물의 조직에서 추출한 DKK1 단백질 또는 재조합 DKK1 단백질을 포함한다.

<40> 본 발명의 DKK1 단백질 및 이를 암호화하는 DKK1 유전자는 하기와 같이 수득될 수 있다.

- <41> 혈관내피세포의 총 RNA를 분리하고 역전사하여 얻은 상보적 DNA를 주형으로 하여 DKK1 프라이머, 바람직하게는 서열번호 5 및 6의 프라이머를 사용한 중합반응으로 증폭된 DKK1 유전자를 획득할 수 있다.
- <42> 상기 획득된 DKK1 유전자에 제한효소, 바람직하게는 EcoRI와 XhoI를 처리하여 단백질 정제용 플라스미드, 바람직하게는 pcDNA-His 벡터에 클로닝하여 플라스미드를 획득하고 상기 플라스미드를 발현세포, 바람직하게는 인간신장세포인 293 세포 (ATCC, 미국)에 유전자 전달 시약, 바람직하게는 리포펙타민 (Lipofectamin, Invitrogen, 미국)을 이용하여 형질 전환시킨다. 이후, 선택적 형질전환 세포 분리 시약, 바람직하게는 G418 (Sigma, 미국)을 이용하여 형질 전환된 세포만을 분리한 후 대량으로 배양하고 그 배양 배지를 컬럼, 바람직하게는 니켈 컬럼 (Ni-NTA agarose, Qiagen, 미국)에 적용하여 배지내로 분리된 DKK1 단백질을 정제하고 재조합 DKK1 단백질의 발현을 확인한다.
- <43>
- <44> 상기 방법으로 획득한 DKK1 단백질을 인간 제대정맥내피세포에 처리하였을 때 관 형성을 억제하며, DKK1 (Dickkopf-1) 단백질을 암호화하는 DNA를 형질감염시킨 DKK1 과발현 세포주는 관 형성이 억제되었고, DKK1 (Dickkopf-1) 단백질을 암호화하는 DNA를 형질도입시킨 마우스의 대동맥 고리 조직은 혈관 발아 (sprouting)가 억제되었으며, 상기 형질도입 마우스의 배 (embryo)는 혈관발생이 억제되어 탁월한 혈관생성 억제 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- <45> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 획득된 혈관신생을 억제하는 DKK1 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 유효성분으로 함유하는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- <46> 본 발명의 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <47> 본 발명의 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <48> 본 발명의 조성물의 유효성분인 DKK1 (Dickkopf-1) 단백질을 암호화하는 DNA를 환부에 지속적으로 공급하기 위해 상기 DNA를 삽입할 수 있는 벡터로는 아데노바이러스 (adenovirus) 벡터, 아데노관련 바이러스 (adeno-associated virus) 벡터, 레트로바이러스 (retrovirus) 벡터, 렌티바이러스 (lentivirus) 벡터, 단순포진 바이러스 (herpes simplex virus) 벡터 또는 동물 세포에서 발현될 수 있는 플라스미드에 포함됨을 특징으로 한다.
- <49> 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 함유하는 조성물의 투여 형태는 주사제에서 통상적으로 사용되는 어떠한 기제라도 사용 가능하다. 예를 들어, 기제는 증류수, 염화나트륨 염 용액, 염화나트륨 및 무기물염의 혼합물 또는 그와 유사한 혼합물, 만니톨, 락토스, 텍스트란, 글루코스 등의 용액, 글리신, 아르기닌 같은 아미노산 용액, 유기산 용액 또는 염 용액 및 글루코스 용액의 혼합 및 이와 유사한 용액 등을 포함한다. 또한, 주사제는 통상의 방법으로 삼투압 조절제, pH 조절제, 감기름이나 콩기름과 같은 식물성 기름, 또는 레시틴, 비이온성 표면활성제와 같은 표면활성제를 상기한 기제에 첨가하여 용액, 현탁액 또는 콜로이드 용액 등으로 제조

할 수 있다. 이러한 주사제는 분말형, 동결건조형 등으로 제조하여 사용하기 바로 전에 용해하여 쓸 수도 있다.

<50> 본 발명에 따른 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA를 유효성분으로 함유하는 조성물은 고체상인 경우 유전자 치료 바로 전에 필요하면 미리 멸균한 기재에 용해하여 사용하거나, 액상인 경우 별도의 처리 없이 그대로 사용할 수 있다.

<51> 본 발명의 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 혈관신생에 의해 유발되는 질환 부위에 국부적으로 0.0001 내지 1000 mg/kg의 양을 1주에 1회 내지 수회 투여하거나, 수술 이후에 카테터 (catherter)와 같은 것을 통해 일회 투여하여 목표 지점에서 흡수되도록 할 수 있다. 그 투여량은 투여경로, 질환의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<52> 본 발명의 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA는 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

<53> 이하, 본 발명을 하기의 참조예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<55> 단, 하기 참조예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참조예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<56> 참조예 1. 인간 제대정맥내피세포 (HUVEC)의 배양

<57> 연세대학병원 산부인과에서 분리 받은 산모의 탯줄 정맥으로부터 하기의 과정으로 혈관세포를 분리하였다. 코드 버퍼 (Cord buffer; 0.2% glucose phosphate buffered saline)로 혈관을 세척 후, 0.2 % 타입 I 콜라게나아제 (type I collagenase, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)를 정맥에 약 5 ml 가량 넣은 후 37 °C에서 5분간 방치했다. 실온에서 코드 버퍼 20 ml을 정맥에 넣고 반대편으로 분리되어 나온 혈관세포를 수집하고, 다시 한번 코드 버퍼만을 혈관에 주입하여 37 °C에서 반응시킨 후 혈관세포인 사람 제대정맥 내피세포 (HUVEC; Human umbelical vein endothelial cell)를 수집하고 세척하여, 0.1 % 젤라틴 (gelatin)이 코팅된 조직배양용 T75 플라스크에 주입하였다. 배양배지는 EGM™-2 완전배지 (EGM™-2 complete medium, Cambrex, MD, USA)를 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, confluent 상태가 되면 트립신-EDTA용액을 분리하여 세포를 분리하고, 3 내지 6 세대 (passage)의 세포를 실험에 사용하였다.

<58> 참조예 2. 재조합 인간 DKK1 단백질 획득

<59> 혈관내피세포의 총RNA를 트리졸액 (TRIzol reagent, Invitrogen, 미국)을 이용하여 분리한 후 oligo (dT) 프라이머 및 역전사효소 (Promega, 미국)를 사용하여 역전사한 후, 중합효소 (Stratagen, 미국)를 이용하여 하기의 조건, 상세하게는 94 °C에서 5분간 전변성 (pre-denaturation)한 후, 94 °C에서 30초간 변성 (denaturation), 50 °C에서 30초간 서열번호 5 및 6의 DKK1 프라이머를 결합 (annealing), 72 °C에서 30초간 연장 (extension)함을 1회로 하여 중합반응은 총 30회 반복하였으며, 증폭된 DKK1 유전자에 EcoRI과 XhoI를 처리하여 단백질 정제용 플라스미드인 pcDNA-His 벡터에 클로닝한 플라스미드를 인간신장세포인 293 세포 (ATCC, 미국)에 리포펙타민 (Lipofectamin, Invitrogen, 미국)을 이용하여 형질 전환시켰다. 선택적 형질전환 세포 분리 시약인 G418 (Sigma, 미국)을 이용하여 형질 전환된 세포만을 분리한 후 대량으로 배양하고 그 배양 배지를 니켈 컬럼 (Ni-NTA agarose, Qiagen, 미국)에 적용하여 배지내로 분비된 DKK1 단백질을 정제하여 재조합 DKK1 단백질의 발현을 확인하였다 (도 2a 참조).

<60> 참조예 3. 렌티바이러스 벡터를 이용한 DKK1 과발현 및 억제 세포주 구축

<61> 인간 DKK1 유전자를 렌티바이러스 벡터에 클로닝 하여 제작한 플라스미드를 바이러스 생산 세포주에 형질 도입한 DKK1 과발현 및 억제 세포주로부터 수득한 DKK1 바이러스를 벡터코리아 (vectorcorea, 충청남도, 대한민국)로부터 제공받아 상기 참조예 1에서 준비한 인간제대정맥내피세포에 첨가시킨 뒤 48시간 후 이들 세포로부터 RNA를 분리하여 하기의 역전사 및 중합반응을 실시하여 DKK1 유전자 발현 양상을 확인하였다. 트리졸 액 (TRIzol reagent, Invitrogen, 미국)을 이용하여 총 RNA를 분리한 후 oligo (dT) 프라이머 및 역전사효소

(Promega, 미국)를 사용하여 역전사한 후, 중합효소 (Stratagen, 미국)를 이용하여 하기의 조건, 상세하게는 94 °C에서 5분간 전변성 (pre-denaturation)한 후, 94 °C에서 30초간 변성 (denaturation), 50 °C에서 30초간 프 라이머를 결합 (annealing), 72 °C에서 30초간 연장 (extension)함을 1회로 하여 중합반응은 총 30회 반복하였 으며, 그 결과를 하기 도 3a에 나타내었다.

<62> 하기 도 3a에 나타난 바와 같이, 렌티바이러스 시스템을 이용한 DKK1의 과발현 또는 발현 억제 세포주 가 잘 제작되었음을 확인할 수 있었다.

<63> **참조예 4. DKK1 형질도입 마우스 제작**

<64> 생체 내 (*in vivo*)에서 DKK1 유전자가 혈관신생에 미치는 효과를 분석하기 위하여 혈관내피세포에서만 활성화되는 Tie2 전사조절부위를 이용하여 혈관에만 과잉 발현되는 마우스를 제작하였다 (Schlaeger TM et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(7), 3058-3063, 1997). 상기 마우스의 제작을 위하여 도 4a의 모식도에 나타 난 바와 같이, 서열번호 4의 마우스 DKK1 유전자를 제한효소 HindIII 및 NotI (NEB, 영국)를 처리한 후 형질도입 벡터 (pSP vector, Clontech, 미국)에 삽입하여 클로닝하였다 (도 4a 참조). 상기 플라스미드를 제한효소 SalI (NEB, 영국)으로 처리하여 직선화시켜 DNA 절편을 만들었으며, 성선자극호르몬 방출호르몬 (Gonadotropin, Sigma, 미국)으로 배란을 촉진시킨 마우스 (C57BL6, 오리엔트, 한국)로부터 분리한 난자들에 주입하여 형질도입 시킨 후, 수정하여 대리모 마우스 (ICR, 오리엔트, 한국)에 넣어 착상시켰다. 21일 후 태어난 마우스의 꼬리를 잘라 단백질 분해효소 K (proteinase K, Sigma, 미국)를 처리하여 DNA를 분리한 후, 서열번호 7 및 8의 DKK1 프라이머를 이용하여 증폭 [94 °C에서 5분간 전변성, (94 °C에서 30초간 변성, 55 °C에서 30초간 결합, 72 °C에 서 30초간 연장) x 30회, 72°C에서 10분간 후연장하여 형질도입된 마우스를 확인하였다 (도 4b 참조).

<65> 도 4c에 나타난 바와 같이, 정상 마우스와 DKK1 형질 도입된 마우스들 사이에서 크기가 현저히 다르 는 것을 확인할 수 있었으며, 상기의 결과는 혈관의 비정상적인 발달로부터 야기된 것으로 추측 가능하다.

<66> **실험예 1. 제대정맥내피세포의 분화과정동안 DKK1의 발현 양상**

<67> 10mg단백질/ml 농도의 매트리지젤 (Matrigel, Collaborative Biomedical Products, USA) 250 μ l을 직경 16mm의 세포배양 웰에 넣어 37°C에서 30분간 중합시켰다. 참조예 1의 인간제대정맥내피세포를 20 %(v/v) 우태아 혈청 (FBS; fetal bovine serum, Hyclone, 미국), 100 units/ml 페니실린 (penicillin, Invitrogen, 미국), 10 μ g/ml 스트렙토마이신 (streptomycin, Invitrogen, 미국), 3ng/ml 섬유아세포 성장인자 (bFGF; basic fibroblast growth factor, Upstate Biotechnology, USA), 5 units/ml 헤파린 (heparin, Sigma, 미국)을 포함 한 M199 성장배지(Invitrogen, USA)에서 배양하고 트립신을 처리하여 수득한 후, 이를 상기 성장배지로 다시 부 유시켜 준비된 매트리지젤 층에 2×10^5 세포/웰의 농도로 깔아주고 분화를 유도하였다 (도 1a 참조). 분화과정은 세포분화정도에 따라 크게 세 단계로 구분하였으며, 상세하게는 대조군으로 쓰인 분화시작단계의 1단계, 세포가 이동하여 혈관을 만들기 시작하는 단계의 2단계, 완전히 혈관 형태로 분화한 단계의 3단계이다. TRIZOL 용액 (Invitrogen, 미국)을 이용하여 각 단계의 세포로부터 RNA를 분리하여 서열번호 5 및 6의 프라이머를 사용하여 참조예 4의 중합반응 조건과 같이 역전사 및 증폭시킨 후 DKK1 유전자의 발현 양상을 확인하였다 (도 1b 참조).

<68> 하기 도 1b에 나타난 바와 같이, DKK1 유전자는 관 형성 과정동안 그 발현이 현저히 감소하는 양상을 보였으며 상기 실험 결과는 DKK1이 관 형성의 음성적 조절인자로 작용할 수 있음을 나타낸다.

<69> **실험예 2. 제대정맥내피세포에서 관 형성에 미치는 DKK1의 효과**

<70> 10mg단백질/ml 농도의 매트리지젤 (Matrigel, Collaborative Biomedical Products, USA) 250 μ l을 직경 16mm의 세포배양 웰에 넣어 37°C에서 30분간 중합시켰다. 참조예 1의 인간제대정맥내피세포를 20 %(v/v) 우태아 혈청 (FBS; fetal bovine serum, Hyclone, 미국), 100 units/ml 페니실린 (penicillin), 10 μ g/ml 스트렙토마이 신 (streptomycin), 3ng/ml 섬유아세포 성장인자 (bFGF; basic fibroblast growth factor, Upstate Biotechnology, USA), 5 units/ml 헤파린을 포함한 M199 성장배지(Invitrogen, USA)에서 배양하고 트립신을 처 리하여 수득한 후, 이를 상기 성장배지로 다시 부유시켜 준비된 매트리지젤 층에 2×10^5 세포/웰의 농도로 깔아주 고 분화를 유도하였다. 분화유도와 동시에 50 ng/ml 및 100 ng/ml의 농도로 DKK1을 첨가하여 20시간 동안 배양 한 후, 형성된 관 모양 형성도를 광학 이미지 기술로 촬영 (ZEISS, 독일)하여 분석하였다 (도 2b 참조). 이때, 대조군으로는 DKK1을 처리하지 않은 실험군을 사용하였다.

<71> 하기 도 2b에 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때 DKK1 처리군은 DKK1의 처리 농도 증가와 비례 하여 형성된 관의 면적과 연결정도가 현저히 감소한 것으로 나타났다.

실험예 3. DKK1 과발현 또는 발현억제 세포주에서 관 형성에 미치는 DKK1의 효과

10mg/단백질/ml 농도의 마트리젤 (Matrigel, Collaborative Biomedical Products, USA) 250 μ l을 직경 16mm의 세포배양 웰에 넣어 37℃에서 30분간 중합시켰다. 참조에 3의 DKK1 과발현 혹은 억제 세포주를 20 % (v/v) 우태아혈청 (FBS; fetal bovine serum, Hyclone, 미국), 100 units/ml 페니실린 (penicillin, Invitrogen, 미국), 10 μ g/ml 스트렙토마이신 (streptomycin, Invitrogen, 미국), 3ng/ml 섬유아세포 성장인자 (bFGF; basic fibroblast growth factor, Upstate Biotechnology, USA), 5 units/ml 헤파린을 포함한 M199 성장배지 (Invitrogen, USA)에서 배양하고 트립신을 처리하여 수득한 후, 이를 상기 성장배지로 다시 부유시켜 준 비된 마트리젤 층에 2×10^5 세포/웰의 농도로 깔아주고 9시간 동안 배양한 후, 형성된 관모양 형성도를 광학 이미징 기술로 촬영하였다 (도 3b 참조). 이때, 대조군으로는 렌티바이러스를 감염시킨 실험군을 사용하였다.

상기 도 3b에 나타난 바와 같이, DKK1이 과발현된 세포주에서는 관 형성이 억제되었으며, DKK1의 발현을 억제시킨 세포주에서는 오히려 관형성이 촉진되었다.

실험예 4. DKK1 형질도입 마우스에서 대동맥 고리 조직에서 혈관 발아 (sprouting)에 미치는 DKK1의 효과

6주령의 정상 마우스 (C57BL6, 오리엔트, 경기도, 한국) 및 상기 참조예 4에서 제작한 DKK1이 형질도입된 마우스의 등쪽을 따라 생성된 동맥혈관을 1mm 크기로 잘라 획득한 대동맥 고리 조직을 마트리젤 110 μ l로 코팅된 평판의 48-웰에 위치시키고, 다시 마트리젤 40 μ l로 덮어서 밀봉한 다음, 최종 부피 200 μ l가 되도록 혈관 내피세포 배양 배지 (SFM, Invitrogen, 미국)를 각 웰에 넣어 주고, 5일 후에 각 고리로부터 뻗어 나온 발아된 혈관 (sprout)의 개수를 측정하고, DKK1 처리군과 대조군간의 혈관 발아 정도를 비교하여 하기 도 5에 나타내었다 (도 5 참조). 발아 정도는 혈관을 5부위로 나눈 뒤 다섯 부분 모두 발아하면 5점, 발아하지 않으면 0점으로 부위별로 점수를 매겨 나타내었다.

하기 도 5에 나타난 바와 같이, DKK1이 혈관에서 과잉 발현되도록 제작된 마우스로부터 획득한 대동맥 고리 조직에서의 혈관 발아가 정상 마우스와 비교하여 현저히 억제되었음을 확인할 수 있었다.

실험예 5. DKK1 형질도입 마우스의 배 (embryo)에서 혈관발생에 미치는 DKK1의 효과

임신한지 9-10일 지난 정상 마우스와 DKK1이 형질도입된 마우스의 배들을 꺼내어 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)에 담귀 하루 동안 고정시킨 후 혈관내피세포에만 특이적으로 발현하는 단백질인 폰 빌레브란트 인자 [von Willebrand Factor (vWF)]의 항체 (Chemicon, 미국)를 이용하여 염색한 후 혈관의 발생정도를 관찰하여 하기 도 6에 나타내었다 (Sadler JE, *J. Thromb. Haemost.*, 3(8), pp1702-1709, 2005).

하기 도 6a에 나타난 바와 같이, DKK1이 형질 도입된 마우스의 배에서는 전반적인 혈관의 발생이 억제되어있는 것으로 나타났다.

더욱 상세한 확인을 위하여 상기 배의 머리 부위에 생성된 혈관을 광학 현미경 (Olympus, 일본)을 이용하여 확대분석 (x200) 하였다 (도 6b 참조). DKK1이 형질도입된 배의 머리 부위에서의 혈관발생이 정상 배의 혈관발생에 비해 현저히 억제된 것을 확인할 수 있었다.

DKK1이 다른 부위의 혈관발생 억제에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기와 같이 준비한 배의 척추부분 대동맥 및 결사슬 동맥의 발달 정도를 하기와 같이 형광 염색하였다. 상기 배를 30 % 자당 (sucrose) 용액에서 하루 동안 탈수화 한 후 -70 °C에서 동결하고, 동결된 조직을 10 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 붙이고 염소 혈청으로 2시간 동안 블로킹 (blocking) 시킨 뒤 폰 빌레브란트 인자 (von Willebrand Factor (vWF))의 항체를 1차 항체로 사용하여 4℃에서 하루 동안 처리하였다. 다음날 혈관세포 염색을 위한 녹색 형광물질 및 혈관주위의 평활근세포 염색을 위한 빨간색 형광물질이 붙어있는 2차 항체를 1시간 동안 처리하여 커버글라스를 덮은 뒤 형광 현미경하에서 관찰하여 하기 도 6c 및 도 6d에 나타내었다. 하기 도 6c 및 6d에 나타난 바와 같이, DKK1이 형질도입된 마우스에서는 척추부분의 대동맥 및 결사슬 동맥의 발달이 억제되어있음을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

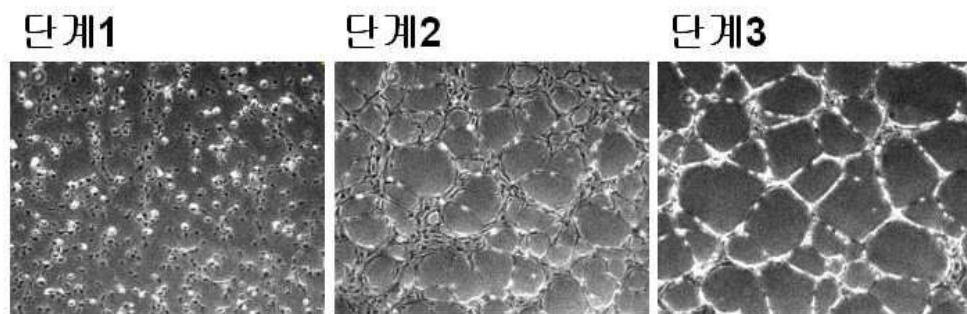
상기에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 DKK1을 이용하여 혈관신생을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명의 DKK1을 이용하여 혈관신생을 억제시키는 방법은 포유동물의 조직에 DKK1 단백질 또는 DKK1 (Dickkopf-1) 단백질을 암호화하는 DNA를 이용하여 형질감염 또는 형질 도입하여 발현시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 DKK1은 혈관형성을 효과적으로 억제하므로, 혈관신생으로 인한 질환의 예방 및 치료를 위한 치료제 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1a는 마트리젤 위에서 인간제대정맥내피세포 (HUVEC; Human umbelical vein endothelial cell)의 형태분화 과정을 3단계로 나누어 나타낸 도이고,
- <2> 도 1b는 인간제대정맥내피세포의 형태분화 과정의 각 단계별 DKK1 유전자의 발현양상을 나타낸 도이며,
- <3> 도 2a는 DKK1 재조합 단백질을 발현 및 정제하여 확인한 도이며,
- <4> 도 2b는 DKK1 재조합 단백질의 처리농도에 따른, 인간제대정맥내피세포에서의 관 형성 억제를 나타낸 도이고,
- <5> 도 3a는 렌티바이러스를 이용한 DKK1 유전자 과발현 및 억제 세포주의 제작을 확인한 도이고,
- <6> 도 3b는 DKK1 유전자 과발현 및 억제 세포주의 관 형성 정도를 비교한 도이고,
- <7> 도 4a는 DKK1 형질도입 마우스의 제작을 위한 벡터의 모식도이며,
- <8> 도 4b는 DNA 증폭을 통해서 마우스의 DKK1 형질도입을 확인한 도이고,
- <9> 도 4c는 정상 마우스와 DKK1 형질도입 마우스의 크기를 비교한 도이며,
- <10> 도 5는 정상 마우스와 DKK1 형질도입 마우스의 대동맥고리조직 혈관발아 정도의 변화를 나타낸 도이고,
- <11> 도 6a는 정상 마우스와 DKK1 형질도입 마우스의 배 (embryo)에서 혈관발생정도를 비교한 도이며,
- <12> 도 6b는 정상 마우스와 DKK1 형질도입 마우스의 배 (embryo)에서 머리부분의 혈관발생정도를 비교한 도이고,
- <13> 도 6c는 정상 마우스와 DKK1 형질도입 마우스의 배 (embryo)에서 척추부분의 대동맥의 발달 정도를 형광 염색하여 비교한 도이며,
- <14> 도 6b는 정상 마우스와 DKK1 형질도입 마우스의 배 (embryo)에서 척추부분의 결사슬 동맥의 발달 정도를 형광 염색하여 비교한 도이다.

도면

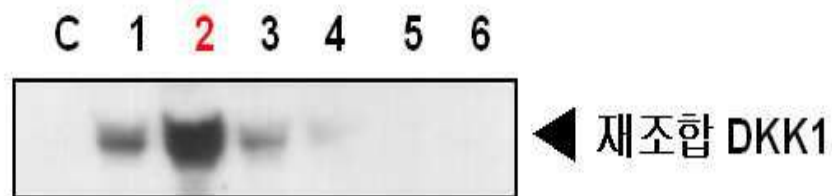
도면1a



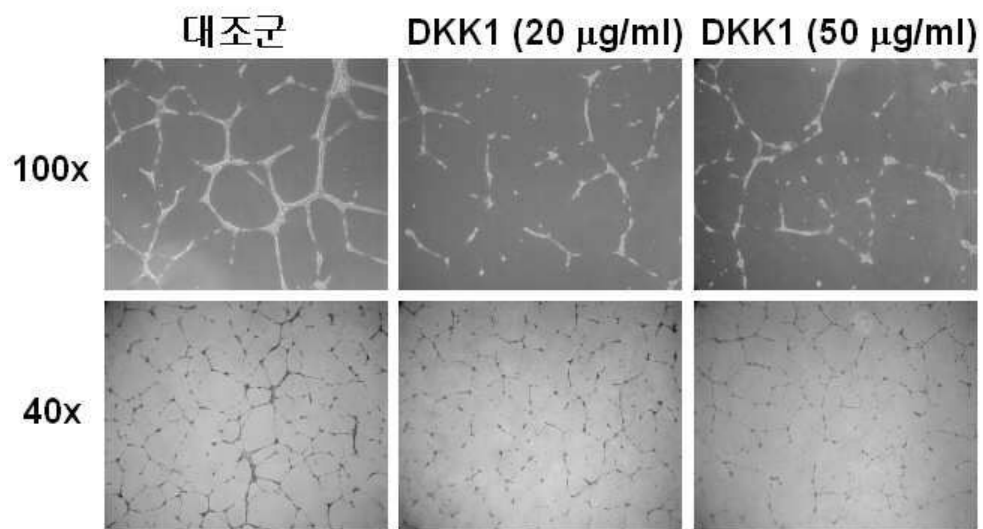
도면1b



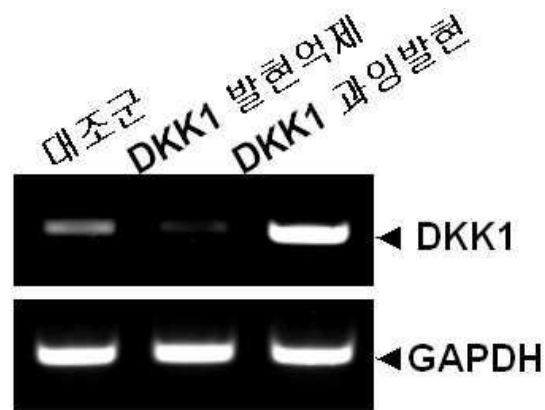
도면2a



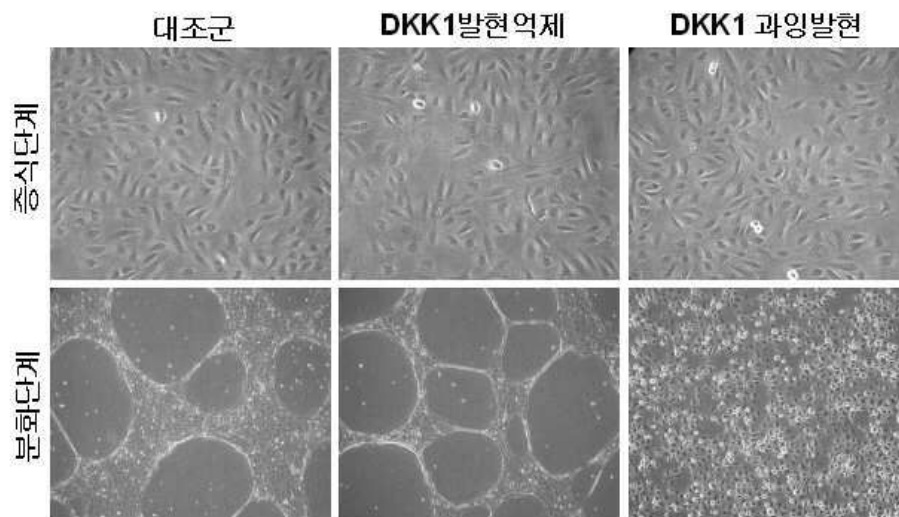
도면2b



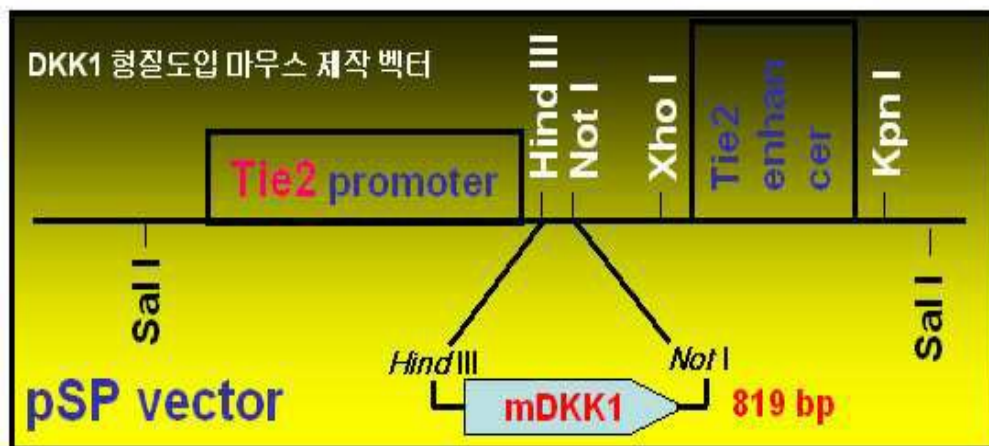
도면3a



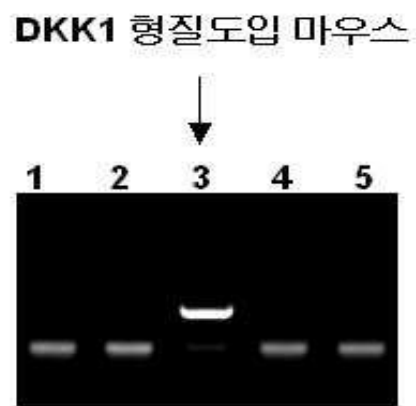
도면3b



도면4a



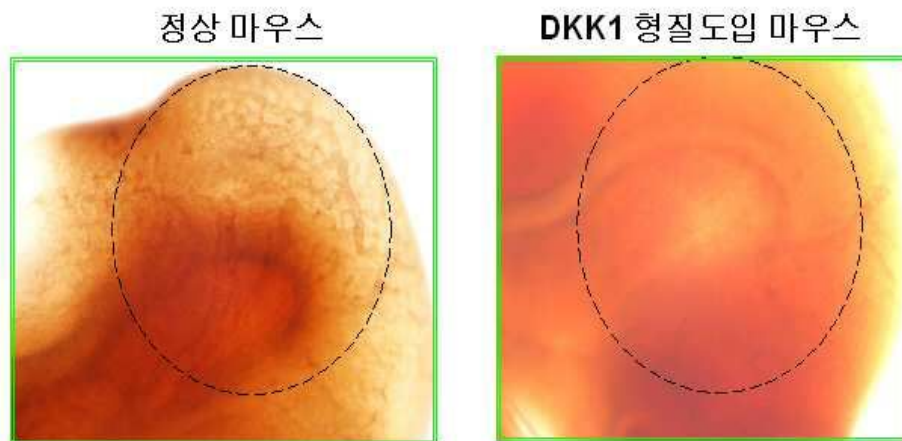
도면4b



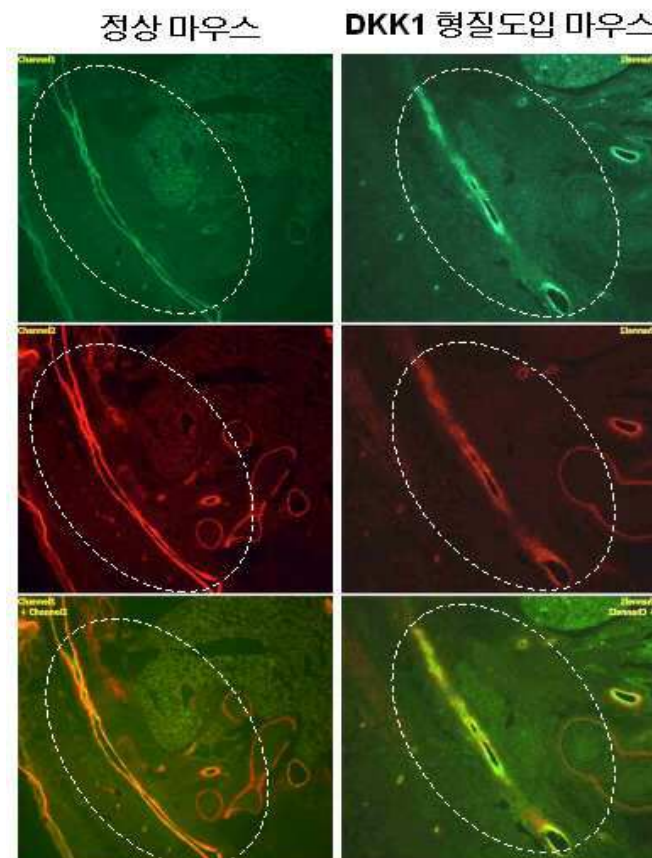
도면4c



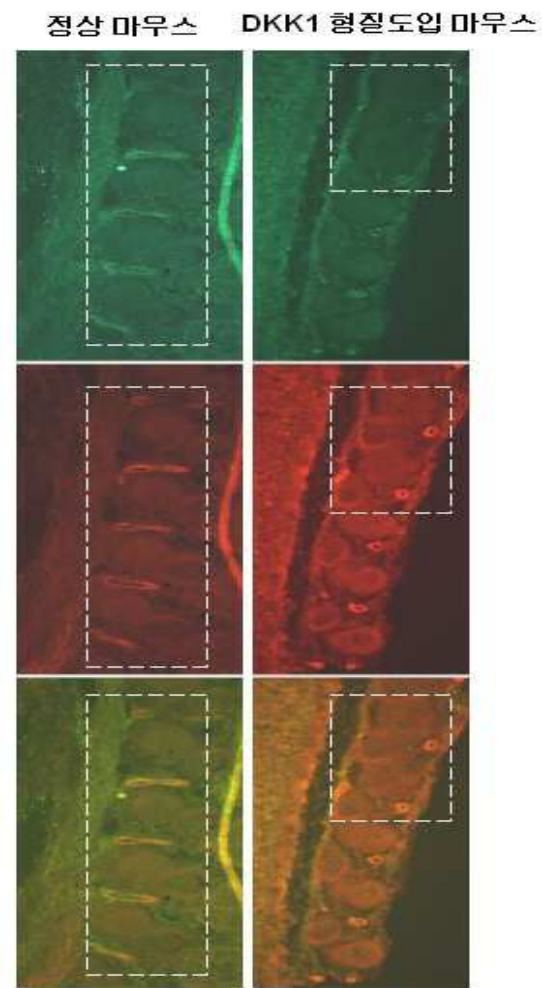
도면6b



도면6c



도면6d



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY
- <120> A METHOD FOR INHIBITING ANGIOGENESIS USING DKK1
- <130> DIF/2006-05-0012/SY
- <160> 8
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 266
- <212> PRT

<213> Human DKK1

<400> 1

Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Arg Val Phe Val Ala Met
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Leu Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Val Ser Ala Thr
20 25 30

Leu Asn Ser Val Leu Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro Pro
35 40 45

Leu Gly Gly Ala Ala Gly His Pro Gly Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro
50 55 60

Gly Ile Leu Tyr Pro Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Ile Asp Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu
100 105 110

Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys
115 120 125

Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn
130 135 140

His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn
145 150 155 160

Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser
165 170 175

Lys Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser
180 185 190

Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys
195 200 205

Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg
210 215 220

Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly
225 230 235 240

Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn
245 250 255

Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
260 265

<210> 2

<211> 801

<212> DNA

<213> Human DKK1

<400> 2

atgatggctc tgggcgcagc gggagctacc cgggtctttg tcgcgatggt agcggcggct 60

ctcggcggcc accctctgct gggagtgagc gccacctga actcggttct caattccaac 120

gctatcaaga acctgcccc accgctgggc ggcgctgcgg ggcacccagg ctctgcagtc 180

agcgcgcgc cggaatcct gtaccgggc gggaataagt accagacat tgacaactac 240

cagccgtacc cgtgcgcaga ggacgaggag tgcggcactg atgagtactg cgctagtccc 300

accgcggag gggacgcggg cgtgcaaac tgtctgcct gcaggaagcg ccgaaaacgc 360

tgcctgcgtc acgctatgtg ctgccccggg aattactgca aaaatggaat atgtgtgtct 420

tctgatcaaa atcatttccg aggagaaatt gaggaacca tcttgaaag ctttggtaat 480

gatcatagca ctttgatgg gtattccaga agaaccacct tgtcttcaa aatgtatcac 540

accaaaggac aagaaggctc tgtttgtctc cgtcatcag actgtgctc aggatttgtt 600

tgtgctagac acttctggc caagatctgt aaacctgtcc tgaaagaagg tcaagtgtgt 660

accaagcata ggagaaaagg ctctcatgga ctagaaatat tccagcgttg ttactgtgga 720

gaaggctgtg ctgcccggat acagaaagat caccatcaag ccagtaattc ttctaggctt 780

cacacttgtc agagacacta a 801

<210> 3

<211> 272

<212> PRT

<213> Mouse DKK1

<400> 3

Met Met Val Val Cys Ala Ala Ala Ala Val Arg Phe Leu Ala Val Phe
1 5 10 15

Thr Met Met Ala Leu Cys Ser Leu Pro Leu Leu Gly Ala Ser Ala Thr
20 25 30

Leu Asn Ser Val Leu Ile Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro
35 40 45

Pro Leu Gly Gly Ala Gly Gly Gln Pro Gly Ser Ala Val Ser Val Ala
50 55 60

Pro Gly Val Leu Tyr Glu Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Leu Asp Asn
65 70 75 80

Tyr Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Ser Asp Glu
85 90 95

Tyr Cys Ser Ser Pro Ser Arg Gly Ala Ala Gly Val Gly Gly Val Gln
100 105 110

Ile Cys Leu Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala
115 120 125

Met Cys Cys Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Met Pro Ser
130 135 140

Asp His Ser His Phe Pro Arg Gly Glu Ile Glu Glu Ser Ile Ile Glu
145 150 155 160

Asn Leu Gly Asn Asp His Asn Ala Ala Ala Gly Asp Gly Tyr Pro Arg
165 170 175

Arg Thr Thr Leu Thr Ser Lys Ile Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly
180 185 190

Ser Val Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ala Ala Gly Leu Cys Cys Ala
195 200 205

Arg His Phe Trp Ser Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln
210 215 220

Val Cys Thr Lys His Lys Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe
225 230 235 240

Gln Arg Cys Tyr Cys Gly Glu Gly Leu Ala Cys Arg Ile Gln Lys Asp
245 250 255

His His Gln Ala Ser Asn Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
260 265 270

<210> 4

<211> 818

<212> DNA

<213> Mouse DKK1

<400> 4

atgatggttg tgtgtgcagc ggcagctgtc cggttcttgg ccgtgtttac aatgatggct 60

ctctgcagcc tccctctgct aggagccagt gccaccttga actcagttct catcaattcc 120

aacgcgatca agaacctgcc cccaccgtg ggtggtgctg gggggcagcc gggtctctgct 180

gtcagtggtg cgccgggagt tctctatgag ggcgggaaca agtaccagac tcttgacaac 240

taccagccct acccttgccg tgaagatgag gattgcggct ctgacgagta ctgctccagc 300

cccagccgcg gggcagccgg cgctggaggt gtacagatct gtctggcttg ccgaaagcgc	360
aggaagcgct gcatgaggca cgctatgtgc tgccccggga actctgcaaa aatggaatat	420
gcatgccctc tgaccacagc cattttcctc gaggggaaat tgaggaaagc atcattgaaa	480
accttggtta tgaccacaac gccgccgcgg gggatggata tcccagaaga accacactga	540
cttcaaaaat atatcacacc aaaggacaag aaggctccgt ctgcctccga tcatcagact	600
gtgccgcagg gctgtgttgt gcaagacact tctgttccaa gatctgtaa cctgtcctta	660
aagaaggta ggtgtgcacc aagcacaac ggaaaggctc ccacgggctg gagatatcc	720
agcgtgtta ctgcggggaa ggcctggctt gcaggatata gaaagatcac catcaagcca	780
gcaattcttc taggtccac acctgccaga gacactaa	818

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human DKK1 forward primer

<400> 5	
atgatggctc tgggcgcagc	20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human DKK1 reverse primer

<400> 6
ttagtgtctc tgacaagtgt 20

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse DKK1 forward primer

<400> 7
atgatggttg tgtgtgcagc ggc 23

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse DKK1 reverse primer

<400> 8
ttagtgtctc tggcaggtg 19