(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.⁶ **C12N 15/12** **A61K 35/00**	**(45) 공고일자 2004년05월27일** **(11) 등록번호 10-0414615** **(24) 등록일자 2003년12월26일**

(21) 출원번호	10-1997-0706109	(65) 공개번호	10-1998-0702702
(22) 출원일자	1997년09월02일	(43) 공개일자	1998년08월05일
번역문 제출일자	1997년09월02일		
(86) 국제출원번호	PCT/AU1996/000094	(87) 국제공개번호	WO 1996/27007
(86) 국제출원출원일자	1996년02월22일	(87) 국제공개일자	1996년09월06일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 아이슬란드, 일본, 북한, 대한민국,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 케냐,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄,

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

(30) 우선권주장			
	PN1457	1995년03월02일	오스트레일리아(AU)
	PN6647	1995년11월20일	오스트레일리아(AU)
	PN7274	1995년12월22일	오스트레일리아(AU)

(73) 특허권자

암레드 오퍼레이션즈 피티와이, 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3121 리치몬드 스완 스트리트 576

(72) 발명자

매그너스 노르덴스트욜드
스웨덴, 스톡홀름 에스-161 37, 콜트라스트바겐 19

카타리나, 라센
스웨덴, 스톡홀름 에스-113 44, 다네모라가탄 10엠3티알

니콜라스킴,헤이워드
오스트레일리아,퀸즐랜드4064,패딩톤,프린스,스트리트13

(74) 대리인

김성기
나영환
이상섭

심사관 : 임혜준

(54) 신규의증식인자및이를암호하는유전자서열

요약

본 발명은 개괄적으로 혈관 내피 증식 인자와 유사한 성질을 지닌 분자 분리물 및 이를 암호하는 유전자 서열에 관한

것이다. 이 분자는 증진되거나 감소된 혈관구조 및/또는 혈관 투과성을 요하는 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 일정 범위의 치료법 및 진단법의 개발에 유용할 것이다. 또한, 본 발명의 분자는 주신경원 및 중추 신경원의 유용한 작동인자이며 대교세포의 증식을 유도할 수 있다.

명세서

기술분야

본 발명은 개괄적으로 혈관 내피 증식 인자(vascular endothelial growth factor)와 유사한 성질을 지닌 분리된 분자 및 이를 암호하는 유전자 서열에 관한 것이다. 이 분자는 증진되거나 감소된 혈관구조 및/또는 혈관 투과성을 필요로 하는 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 일정 범위의 치료법 및 진단법의 개발에 유용할 것이다. 또한, 본 발명의 분자는 주 신경 뉴론 및 중추 신경 뉴론의 유용한 작동인자(effector)이며 대교세포(astroglial cell)의 증식을 유도할 수 있다.

배경기술

본원에서 인용한 공개 문헌들의 구체적인 목록은 본원 명세서의 마지막 부분에 기재하고 있다. 본원에서 사용된 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열번호는 상기 목록의 내용에 따라 정의된 것이다.

본원 명세서 전체에서 사용된 '포함'이라는 용어는 별다른 표시가 없는 한, 기술된 인자 또는 그 전체를 포함하지만 임의의 다른 인자 또는 그 전체 또는 인자들이나 전체들의 군을 배제하는 것은 아니라는 의미로 이해되어야 할 것이다.

혈관작용 투과성 인자라고도 알려진 혈관 내피 증식 인자(Vascular Endothelial Growth Factor)(이후, 'VEGF'라고 약칭함)는 내피 조직을 특이적으로 활성화시키는 분비형의 공유 결합된 동종이량체(homodimer) 당단백질이다(Senger 등., 1993). 황체 형성(Yan 등., 1993) 및 태반 발육(Sharkey 등., 1993), 혈관 투과성 조절(Senger 등., 1993), 염증성 혈관형성(Sunderkotter 등., 1994) 및 자가이식(Dissen 등., 1994)을 비롯한 일반적인 혈관형성 및 종양 촉진성 혈관형성(Folkman amp; Shing, 1992), 류마티스양 관절염(Koch 등., 1994) 및 당뇨병 관련성 망막증(Folkman amp ; Shing, 1992)을 비롯한 인체 질환과 같은 광범위한 기능들이 VEGF와 관련있다.

따라서, VEGF는 이 VEGF를 주성분으로 한 치료제, 예방제 및 진단제에 대한 연구 또는 그 활성에 대한 연구의 표적이 되는 매우 중요한 분자이다, 또한,VEGF에 대한 대체물로서 사용하거나 VEGF와 함께 병용하기 위한 동족체 또는 다른 관련 분자에 대한 동정이 요구되고 있다.

본 발명 이전까지 본 발명자들은 복합 내분비선 신생물 제 I 형 감수성 유전자(Multiple Endocrine Neoplasia type I susceptibility gene)(MEN1)에 대해 연구를 지속해왔다. 그 결과 놀랍게도, 본 발명자들은 MEN1 유전자의 가능성에서 제외된 유전자 서열이 VEGF와 일부 유사성을 지닌 새로운 증식 인자라는 것을 발견하였다. 더우기, 본 발명의 증식 인자는 주 신경 뉴론 및 중추 신경 뉴론의 작동 분자이다.

발명의 상세한 설명

따라서, 본 발명의 한 면은 아미노산 서열이 (i) 서열 번호 2의 아미노산 서열과 약 15% 이상 유사하고; (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열과 5% 이상 유사하지 않은 생물학적으로 분리된 단백 분자(proteinaceous molecule)를 포함한다.

본 발명의 다른 면은 (i) 서열번호 2의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 15% 이상 유사하지만 약 5% 이상은 유사하지 않은 아미노산 서열을 포함하고; (ii) VEGF와 공통된 특성을 1가지 이상 나타내는 것을 특징으로 하는 생물학적으로 분리된 단백 분자를 제공한다.

본 발명의 관련된 면은 (i) 서열번호 2의 아미노산 서열과 약 15% 이상 유사하지만 약 5% 이상 유사하지 않은 아미노산 서열을 포함하고, (ii) (a) 혈관 내피 세포의 증식 유도능력: (b) flt-1/flk-1 수용체류와의 상호반응능력; 및 (c) 세포 이동, 세포 생존 및/또는 알칼리 포스파타제 세포내 농도의 증가를 유도하는 능력중 한가지 이상의 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 생물학적으로 분리된 단백 분자에 관한 것이다.

'생물학적으로 분리된'이란 용어의 의미는 분자가 생물원으로부터 1단계 이상의 정제 단계를 거친 것임을 의미하는 것이다. 이 분자는 또한 생물학적으로 순수한 것으로, 조성물내에 존재하는 다른 화합물에 대해 중량, 활성 또는 다른 편리한 수단으로 측정시 상기 조성물내 분자의 함량이 약 20% 이상, 보다 바람직하게는 약 40% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 65% 이상, 훨씬 더욱 바람직하게는 약 80 내지 90% 이상인 것을 의미한다. 가장 바람직한 것은 분자가 서열상 순수한 것이다.

본 발명의 다른 바람직한 면은, 상기 분자를 재조합 형태로 제공하는 것이다.

이러한 본 발명의 양태에 따라, (i) 서열 번호 2의 아미노산 서열과 약 15% 이상 유사하고; (ii) 서열 번호 2의 아미노산 서열과 5% 이상 유사하지 않은 아미노산 서열을 포함하는 재조합 분자를 제공한다.

이와 관련된 본 발명의 양태는 (i) 서열 번호 2의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 15% 이상 유사하지만 약 5% 이상 유사하지 않은 아미노산 서열을 포함하고; (ii) VEGF와 공통된 특성을 1가지 이상 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 분자에 관한 것이다.

또다른 본 발명의 관련 양태는 (i) 서열 번호 2의 아미노산 서열과 약 15% 이상 유사하지만 약 5% 이상 유사하지 않

은 아미노산 서열을 포함하고; (ii) (a) 혈관 내피 세포의 증식 유도능력; (b) flt-1/flk-1 수용체류와의 상호반응능력; 및 (c) 세포 이동, 세포 생존 및/또는 알칼리 포스파타제 세포내 농도의 증가를 유도하는 능력중 한가지 이상의 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 분자에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 서열 번호 1의 아미노산 서열과 약 15% 이상 유사하지만 약 5% 이상 유사하지 않은 단백 분자를 암호하는 게놈 클론 또는 부분 게놈 클론에 관한 것이다.

서열 번호 2에 기술된 아미노산 서열은 인체 VEGF에 상응하는 것이다(이하, 'VEGF $_{165}$ '라고 약칭함). 따라서, 본 발명의 분자는 VEGF의 아미노산 서열과 유사하지만 동일하지는 않은 아미노산 서열을 포함하는 VEGF-유사체 또는 VEGF 동족체이 다. 본 발명은 인체 VEGF-유사 분자를 사용하여 설명하고 있지만, 가축류(예, 양, 돼지, 말 및 소), 애완 동물(예, 개 및 고양이) 및 실험실용 시험 동물(예, 쥐, 래트, 래빗 및 기니피그)과 같은 다른 포유류, 뿐만 아니라 조류(예, 가금류), 어류 및 파충류와 같은 비포유류 유래의 동종 분자 및 암호 서열도 본 발명에 포함된다. 가장 바람직한 양태는 VEGF-유사 분자가 인체 유래의 것으로서, 염색체 11q13에 위치한 유전자에 의해 암호되는 것이다. 따라서, 본 발명은 상기 VEGF-유사 분자를 암호하는 게놈 서열 또는 그 일부까지도 포함한다.

유사율(similarity)은 최적 정렬(optimal alignment)후 서열 번호 2의 아미노산 서열 전체 또는 그 일부와의 유사율이 약 30% 이상인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 약 40% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 50% 이상, 보다 더욱더 바람직하게는 약 60 내지 70%, 가장 바람직하게는 약 80 내지 95% 이상인 것이다.

특히 바람직한 양태에서 본 발명의 VEGF-유사 분자는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그 일부, 단편, 유도체 또는 유사체를 포함한다. 특히 바람직한 유사율은 약 19 내지 20% 및 29 내지 30%이다. 또한 본원에서 사용된 유도체란 스플라이스(splice) 변형체를 포함하는 것이다. 따라서, 본 발명은 SOM175의 스플라이스 변형체도 포함한다. 본 발명에 포함되는 스플라이스 변형체의 예로는 서열 번호 6, 서열 번호 8 및/또는 서열 번호 10 중 어느 하나 이상의 서열과 실질적으로 같은 아미노산 서열을 지닌 변형체 또는 이것의 변이체 또는 유도체 또는 또다른 스플라이스 변형체를 포함하지만, 이것들에 국한되는 것은 아니다.

또 다른 양태는 (i) 서열 번호 4와 실질적으로 동일한 아미노산 서열, 또는 이 아미노산 서열이 서열 번호 2의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 5% 이상 유사하지 않다면 서열 번호 4의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 15% 이상의 유사율을 갖는 아미노산 서열을 가지며; (ii) VEGF와 공통된 생물학적 특성을 한가지 이상 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 분자를 제공한다.

또 다른 양태는 (i) 서열 번호 6과 실질적으로 동일한 아미노산 서열, 또는 이 아미노산 서열이 서열 번호 2의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 5% 이상 유사하지 않다면, 서열 번호 6의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 15% 이상의 유사율을 지닌 아미노산 서열을 가지며; (ii) VEGF와 공통된 생물학적 특성을 한가지 이상 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 분자를 제공한다.

또 다른 양태는 (i) 서열 번호 8과 실질적으로 동일한 아미노산 서열, 또는 이 아미노산 서열이 서열 번호 2의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 5% 이상 유사하지 않다면, 서열 번호 8의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 15% 이상의 유사율을 지닌 아미노산 서열을 가지며; (ii) VEGF와 공통된 생물학적 특성을 한가지 이상 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 분자를 제공한다,

또 다른 양태는 (i) 서열 번호 10과 실질적으로 동일한 아미노산 서열, 또는 이 아미노산 서열이 서열 번호 2의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 5% 이상 유사하지 않다면, 서열 번호 10의 아미노산 서열 전체 또는 일부와 약 15% 이상의 유사율을 지닌 아미노산 서열을 가지며, (ii) VEGF와 공통된 생물학적 특성을 한가지 이상 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 분자를 제공한다.

VEGF의 특성으로는 (a) 혈관 내피 세포의 증식 유도능력; (b) flt-1/flk-1 수용체류와의 상호반응능력; 및 (c) 세포 이동, 세포 생존 및/또는 알칼리 포스파타제 세포내 농도의 증가를 유도하는 능력중 한가지 이상의 특성을 포함한다. 본 발명에 따르면, 바람직한 유사율은 약 40% 이상이고, 보다 바람직하게는 약 50% 이상이며, 보다 더 바람직하게는 약 65% 이상이다.

본 발명의 또 다른 양태는 서열 번호 4의 아미노산 서열 일부 또는 서열 번호 6, 서열 번호 8 또는 서열 번호 10에 기재된 것과 같은 스플라이스 변형체 또는 이의 화학적 등가체에 상응하는 펩티드 단편을 포함한다. 본 발명의 생물학적으로 분리된 분자 또는 재조합 분자는 자연적으로 글리코실화되거나 또는 이것이 분리 또는 합성된 세포 종류에 따라 변화된 글리코실화 패턴을 포함할 수 있다. 예컨대, 원핵 세포중에서 재조합 수단에 의해 생성된다면, 이 분자는 글리코실화되지 않을 것이다. 상기 분자는 완전한 길이의 자연에 존재하는 형태이거나, 또는 절두형(truncated form) 또는 다른 유도체화된 형태일 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기술된 VEGF-유사 분자를 암호하는 핵산 분자에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 서열 번호 3과 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자, 또는 이 핵산 서열이 서열 번호 3의 뉴클레오티드 서열과 15% 이상 유사하지만 30% 이상 유사하지 않은 경우에는 서열 번호 3의 뉴클레오티드 서열을 역전사한 보체(Complement)에 대해 낮은 스트린젠시 조건(low stringency condition)하에 하이브리드화할 수 있거나 상기 핵산 서열 전체 또는 일부와 15% 이상의 유사성을 갖는 핵산 분자를 제공한다. 여기서 뉴클레오티드 서열을 역전사한 보체(complement)란 뉴클레오티드 서열의 상보적인 서열로서, 해당 서열에서 뉴클레오티드의 서열에 상보적인 뉴클레오티드의 서열이다. 상보적인 뉴클레오티드란 어떤 뉴클레오티드에 결합하는 다른 뉴클레오티드를 말한다. 따라서, A의 보체는 T이고, C의 보체는 G이고, T의 보체는 A이고, G의 보체는 C이다. 또한, 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열은 본원에서 'SOM175'라고 명명하였다. 비유사율은 약 35%인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 약 39%, 가장 바람직하게는 약 40 내지 50% 이상인 것이다.

스트린젠시율(the level of stringency)은 본원에 참고 인용되는 문헌[Sambrook 등(1989), p. 9.47-9.51]에 개시된 높은 스트린젠시(high stringency)로 간주되는 세척 단계를 이용하여 용이하게 조성할 수 있다. 본원에서 정의된 낮

은 스트린젠시(low stringency)는 4-6X SSC/0.1-0.5% w/v SDS를 사용하여 37-45℃에서 2 내지 3시간 동안 수행하는 것이다. 하이브리드화와 관련된 핵산 원료 및 농도에 따라 다른 스트린젠시 조건을 사용할 수 있으며, 예컨대, 본원에서 1-4X SSC/0.25-0.5% w/v SDS를 사용하여 45℃ 이상에서 2 내지 3시간동안 수행하는 것인 중간 스트린젠시 조건(medium stringent condition) 또는 본원에서 0.1-1X SSC/0.1% w/v SDS를 사용하여 60℃에서 1 내지 3시간동안 수행하는 것인 높은 스트린젠시가 있다.

또한, 본 발명은 서열 번호 3과 15% 이상의 뉴클레오티드 서열 상동성을 갖는 전술한 바와 같은 VEGF-유사 분자를 암호하는 핵산 분자를 포함한다. 바람직한 상동성율(level of homology)은 약 40% 이상, 보다 바람직하게는 약 60 내지 70%이다.

본 발명은 또한, 인체 VEGF에 대응하는 쥐(murine)의 동족체에 관한 것이다(이하 'mVRF'라고 명명함). mVRF는 인체 VEGF와 비교하여 전체 암호 영역상의 아미노산 잔기에 대해 92%의 보존성(conservation) 및 약 85%의 동일성(identity)을 갖고 있다. mVRF는 도 9와 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 암호화된다.

본 발명의 VEGF-유사 분자는 단독물로서 또는 VEGF와 같은 다른 분자와의 복합물로서 소정의 치료제 및/또는 진단제 개발에 유용할 것이다. 따라서, 본 발명은 VEGF-유사 분자 또는 그 일부분, 단편, 유도체, 동족체 또는 유사체 및 1종 이상의 약학적 허용성 담체 및/또는 희석제를 함유하는 약학 조성물도 포함한다. 더욱이, 본 발명은 서열 번호 3의 핵산 서열, 또는 이것과 약 15% 이상의 유사율, 보다 바람직하게는 약 40%, 보다 더 바람직하게는 약 60 내지 70%의 유사율을 갖고 있지만 30% 이상, 보다 바람직하게는 약 39%의 비유사율을 갖는 핵산 서열을 함유하는 벡터 및 이를 함유하는 숙주 세포도 포함한다. 또한, 본 발명은 서열 번호 3을 근거로 하는 안티센스 분자 및 리보자임 뿐만 아니라 VEGF-유사 분자에 대한 중화 항체도 포함한다. 이러한 분자들은 예컨대, 종양에 의한 혈관신생 또는 혈관형성을 유도하는 VEGF-유사 유전자의 과잉발현 효과를 경감시키는데 유용할 수 있다.

본 발명의 다른 양태는 (i) 서열번호 2의 아미노산 서열과 약 15% 이상 유사하지만 약 5% 이상은 유사하지 않은 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 혈관 내피 증식인자(VEGF)와 공통된 특성을 1가지 이상 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 단백분자를 포유류에게 유효량 투여하는 것으로 구성되어, 포유류내에서 대교세포 증 식을 유도하는 방법을 제공하며, 이 때 투여는 대교세포의 증식(astroglial proliferation)을 유도하기에 충분한 시간과 조건하에서 수행한다.

재조합 단백 분자는 서열 번호 3 또는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 함유하는 것이 바람직하다.

본 발명의 다른 양태는 (i) 서열번호 2의 아미노산 서열과 약 15% 이상 유사하지만 약 5% 이상은 유사하지 않은 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 혈관 내피 증식인자(VEGF)와 공통된 특성을 1가지 이상 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 단백분자를 포유류에게 유효량 투여하는 것으로 구성되어, 포유류내의 신경 생존 및/또는 증식을 촉진시키는 방법을 제공하며, 이 때 투여는 대교세포의 증식을 유도하기에 충분한 시간과 조건하에서 수행한다.

재조합 단백 분자는 서열 번호 3 또는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명은 또한 진단제로서 사용할 수 있는, VEGF-유사 분자를 암호하는 유전자에 대한 핵산 프로브 또는 VEGF-유사 분자에 대한 항체를 포함한다.

더욱이, 본 발명은 도면 및/또는 실시예를 통해 보다 상세히 설명되며, 본 발명의 범위가 이것에 국한되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

도 1은 VEGF $_{165}$ 의 뉴클레오티드 서열[서열 번호 1] 및 이에 상응하는 아미노산 서열[서열 번호 2]이다.

도 2는 SOM 175의 뉴클레오티드 서열[서열 번호 3] 및 이에 상응하는 아미노산 서열[서열 번호 4]이다.

도 3은 SOM175 단백질 서열을 이용한 BLAST 서치(search) 결과이다.

도 4는 VEGF cDNA 및 SOMl75 cDNA의 BESTFIT 배열이다.

도 5는 복수 정렬된 VEGF $_{165}$ 와 SOM175 및 이것의 뉴클레오티드 수준에서의 스플라이스 변형체(splice variant)이다.

도 6은 복수 정렬된 VEGF $_{165}$ 와 SOM175 및 이것의 아미노산 수준에서의 스플라이스 변형체이다.

도 7은 SOM 175 및 이것의 스플라이스 변형체의 모식도이다.

도 8a는 엑손/인트론 지도(exon/intron map)를 도시한 인체 SOM175의 게놈 구조의 모식도이다.

도 8b는 엑손/인트론 경계를 도시한 인체 SOM175의 게놈 구조의 모식도이다.

도 9는 mVRF cDNA 클론으로부터 유래된 뉴클레오티드 서열 및 이로부터 추정되는 펩티드 서열이다. 뉴클레오티드의 번호는 개시 코돈의 A에서부터 번호를 부여하여 좌측에 표시하였다. 아미노산은 추정상의 시그널 펩티드를 제거한 후 예상되는 성숙 단백질의 제1 잔기에서부터 번호를 부여하여 우측에 표시하였다. 교호적으로 스플라이스되는 영역은 이중으로 밑줄이 그어져 있고 각 mRNA로부터 산출되는 펩티드 서열도 표시하였다. 가능성이 있는 폴리아데닐화 시그널은 볼드체 활자로 나타내었다. 또한 mVRF $_{167}$ 및 mVRF $_{186}$ 의 개시 코돈 및 종지 코돈에 밑줄을 그었고 3' UTR내의 다형성 AC 반복 서열은 점각 박스로 표시하였다. 인트론/엑손 경계의 위치는 화살촉 모양으로 표시되어 있다.

도 10은 인간 및 쥐의 VRF 단백질 이소형태(isoform)의 BESTFIT 정렬도이다. A: mVRF $_{167}$ 및 hVRF $_{167}$, B: 각각 167 아미노산 이소형태로부터 벗어난 서열의 지점에서부터 mVRF $_{186}$ 및 hVRF $_{186}$ 서열, 아미노산 동일성은 수직 단선으로 표시하였고, 보존되는 아미노산은 콜론으로 표시하였다. 화살표는 인간 및 마우스 VRF의 예상되는 시그널 펩타이드 절단 부위를 표시한 것이다.

도 11은 mVRF $_{167}$ 및 mVEGF $_{188}$ (Breier 등, 1992) 펩티드 서열의 BESTFIT 정렬도이다. mVEGF의 시그널 펩티드 절단 부위는 화살표로 표시하였다. 동일한 아미노산은 수직 단선으로, 보존적 치환은 콜론으로 표시하였다. 아미노산 번호는 도 9에서 설명한 바와 같다.

도 12는 VRF(마우스 및 인간 동족체의 인트론/엑손 구조는 거의 동일하므로 일반적인 VRF 유전자를 도시함) 및 다른 인간 VEGF/PIGF/PDGF 유전자 군간의 유전자 구조를 비교한 것이다. 엑손은 박스로 표시하였다. 단백질 암호 영역 및 비해 독 영역은 각각 빗금친 구역과 빈 구역으로 표시하였다. VRF내에 평행선이 그어진 영역은 VRF $_{186}$ 이소형태의 교호적 스플라이싱(alternate splicing)으로 형성된 또다른 3' UTR 서열을 나타낸다. 각 유전자의 가능한 교호 스플라이스 생성물도 도시하고 있다.

도 13은 mVRF cDNA 클론과 하이브리드화되는 여러 성숙 마우스의 조직(표시 됨)에서 추출한 전체 RNA의 노던 블롯(Northern blot)의 방사선사진이다. 모든 샘플 중에서 1.3kb의 주요 전사체가 검출되었다.

도 14는 마우스에 존재하는 mVRF 및 mRNA의 발현 패턴을 나타내는 필름 방사선사진(A-C) 및 암시야(dark-field) 현미경사진(D-E)이다. E14 마우스배아(A)에 있어서, 발생하는 심장(Ha) 및 대뇌피질(Cx)상에서 양성의 시그널이 나타났다. 또한, 그 구역내 다른 조직들에 대해서도 낮은 배경 시그널이 나타났다. E17 배아(B) 및 심장(Ha)은 강한 하이브리드화 시그널로 인해 뚜렷하게 관찰되었다. 이와 동등한 강한 시그널이 흡착 주위 및 후면에 있는 갈색 지방 조직(Fa)에서도 나타났다. 척수(SC) 및 혀(T)에서는 중간정도의 하이브리드화 시그널이 나타났다. E14 배아에 비해 배경 시그널의 강도는 감소하였다. 어린 성숙 마우스(C-D)에 있어서, 심장(Ha)과 흉곽 주위의 지방 조직(Fa)상에서 양성의 시그널이 나타나는 반면, 예컨대, 허파(Lu)는 표지되지 않았다. 심장에 대한 하이브리드화 시그널은 유두 근육(D)을 비롯하여 좌심실 전체상에 균일하게 분포한다. 과량의 비방사능성 프로브(cold probe)와 하이브리드화된 E17 심장에서 양성의 시그널은 나타나지 않았다(E). 크기 바아 = 0.5mm(A), 1.2mm(B), 1mm(C), 0.3mm(D), 0.1mm(E).

도 15는 마우스 지방 조직(A-B) 및 척수(C-D)내에서의 mVRF mRNA 형질 발현을 나타내는 암시야(dark-field)(A 및 C) 및 명시야(bright-field)(B 및 D) 현미경사진이다. 수단 블랙으로 염색된 구역(B)에서 강한 표지화로 표시되는 바와 같이, 강한 하이브리드화 시그널이 지방(A)상에서 나타났다. 또한, 골격근(A-B중의 M)에서는 약한 시그널이 나타났다. 성숙한 척수(C)에서 mVRF 프로브는 회백질상에 있어 서의 뉴론 염색 패턴을 나타냈다. 톨로우딘 대비염색(counterstaining)은 mVRF mRNA가 주로 양성으로 나타나는 중심관 주위 및 배면각의 심부내에 존재하는 인터뉴론(interneuron)(도시되지 않음), 복측각내의 운동뉴론(D)을 나타내고 있다. 크기 바아 = 0.1mm(A), 0.1mm(B), 0.25mm(C), 0.015mm(D).

도 16은 생존율%, 신경돌기 과성장율% 및 평균 신경돌기 길이(㎛)로 측정되는 바와 같은, 배아발생 8일(E8)째의 병아리 감각뉴론에 대한 VEGF의 효과를 나타낸다.

도 17은 병아리 신경교에 대한 VEGF 및 SOM175의 효과를 나타낸다. CNS 신경교, 말초 신경교 및 CNS 희돌기교세포도 시험하였다.

도 18은 마우스의 대교세포에 대한 각종 SOM 175 단백질의 효과를 나타낸다. ■ ^{3}H(cpm)
1. FGF-2(10ng/ml) 양성 대조군
2. SOM $_{\triangle}$ X6 [*] 1 ng/ml
3. SOM $_{\triangle}$ X6 10 ng/ml
4, SOM $_{\triangle}$ X6 100 ng/ml
5. SOM $_{\triangle}$ X6 1000 ng/ml
6. SOM $_{\triangle}$ X6 1000 ng/ml, 헤파린 무첨가
7. SOMX6 [**] 1 ng/ml
8. SOMX6 10 ng/ml
9. SOMX6 100 ng/ml
10. SOMX6 1000 ng/ml
11. SOMX6 1000 ng/ml, 헤파린 무첨가
[*] 이것은 엑손 6이 없는 SOM175를 나타낸다:
[**] 이것은 SOM 175를 나타낸다.

도 19는 마우스의 희돌기교세포에 대한 각종 SOM175 단백질의 효과를 나타낸다. ■ ^{3}H(cpm)
1. FGF-2(10ng/ml) 양성 대조군
2. SOM $_{\triangle}$ X6 [*] 1 ng/ml
3. SOM $_{\triangle}$ X6 10 ng/ml
4. SOM $_{\triangle}$ X6 100 ng/ml
5. SOM $_{\triangle}$ X6 1000 ng/ml
6. SOM $_{\triangle}$ X6 1000 ng/ml, 헤파린 무첨가
7. SOMX6 [**] 1 ng/ml
8. SOMX6 10 ng/ml
9. SOMX6 100 ng/ml
10. SOMX6 1000 ng/ml
11. SOMX6 1000 ng/ml, 헤파린 무첨가
[*] 이것은 엑손 6이 없는 SOM175를 나타낸다:
[**] 이것은 SOM 175를 나타낸다.

도 20은 마우스의 전뇌 뉴론에 대한 각종 SOM175 단백질의 효과를 나타낸다. ■생존율%

1. FGF-2(10ng/ml) 양성 대조군
2. SOM △ X6 * 1 ng/ml
3. SOM △ X6 10 ng/ml
4. SOM △ X6 100 ng/ml
5. SOM △ X6 1000 ng/ml
6. SOM △ X6 1000 ng/ml, 헤파린 무첨가
7. SOMX6 ** 1 ng/ml
8. SOMX6 10 ng/ml
9. SOMX6 100 ng/ml
10. SOMX6 1000 ng/ml
11. SOMX6 1000 ng/ml, 헤파린 무첨가

* 이것은 엑손 6이 없는 SOM175를 나타낸다:

** 이것은 SOM175를 나타낸다.

[표 1]

서열 번호 요약

서열 번호	
1	VEGF_{165}의 뉴클레오티드 서열
2	VEGF_{165}의 아미노산 서열
3	SOM175의 뉴클레오티드 서열(VEGF-유사 분자)
4	SOM175의 아미노산 서열
5	엑손 6이 없는 SOM175의 뉴클레오티드 서열
6	엑손 6이 없는 SOM175의 아미노산 서열
7	엑손 6 및 엑손 7이 없는 SOM175의 뉴클레오티드 서열
8	엑손 6 및 엑손 7이 없는 SOM175의 아미노산 서열
9	엑손 4가 없는 SOM175 뉴클레오티드 서열
10	엑손 4가 없는 SOM175의 아미노산 서열
11	올리고뉴클레오티드
12	올리고뉴클레오티드
13	올리고뉴클레오티드
14	올리고뉴클레오티드
15	인간 SOM175 인트론/엑손의 뉴클레오티드 서열
16	쥐의 SOM175(VRF)의 뉴클레오티드 서열
17	쥐의 SOM175의 아미노산 서열
18	엑손 6이 없는 쥐의 SOM175의 아미노산 서열
19	엑손 6이 없는 인간 SOM175의 아미노산 서열 (서열 번호 6과 동일)
20	아미노산 위치 116의, 엑손 6이 없는 쥐의 SOM175에서의 분기점(point of divergence)으로부터의, 쥐의 SOM175의 아미노산 서열
21	아미노산 위치 116의, 엑손 6이 없는 인간 SOM175에서의 분기점으로부터의, 인간 SOM175의 아미노산 서열
22	쥐의 VEGF_{188}의 아미노산 서열

실시예

실시예 1

인간 cDNA 클론

오리지날 SOM175 cDNA는 코스미드 D11S750을 이용하여 인간 태아 뇌 라이브러리(λ zapII, 스트라타진)를 스크리닝하므로써 분리하였다[참조: Larsson 등(1992)]. 상기 플라스미드는 '생체 내에서' 절단하였으며, 단일 1.1 kb cDNA를 수득하였다. 또한, 3개의 독립적인 SOM175 cDNA 클론은 인간 태아 비장 라이브러리(스트라타진, 유니-잽)로부터 상기 SOM175 삽입물을 프로브로 사용하여 분리하였다. 3개의 독립적인 클론, 즉 SOM175-4A, SOM175-5A 및 SOM175-6A를 수득하였다. SOM175-5A는 엑손 4가 없는 교대로 스플라이스된 클론이었다(SOM175-e4). 이들 라이브러리 스크린은 상기 라이브러리 제조업자(스트라타진)에 의해 추천된 하이브리드화 조건 및 SOM175의 무작위 프라임된 삽입물(random primed insert)을 이용하여 수행하였다.

또한, 두 개의 부분적인 인체 SOM175 cDNA는 λ GT11 인간 흑색종 세포주 A2058 라이브러리(클론테크)로부터 분리하였다. cDNA 라이브러리 스크린은 문헌[참조: Church 와 Gilbert, (1984)]에 기재된 하이브리드화 조건을 이용하여 수행하였다. 각각의 경우에서, 프로브는 SOM175로부터 유도된 PCR 생성물(18f-700r)의 무작위 프라이밍(r andom priming)에 의해 생성하였다.

마우스 cDNA 클론

또한, 인체 SOM175를 사용하여 생후 1개월 이내의 마우스 전뇌(全腦) cDNA 라이브러리(유니잽, 스트라타진)를 스크린하였다. 4개의 비키메라성 클론, 즉 M175-A, M175-B, M175-C 및 M175-D를 분리하였다. 모든 클론은 부분 cDNA였으며, M175-C는 몇몇 인트론을 함유하였다. 이들 cDNA 중 3개의 cDNA는 엑손 6이 없었다.

M1이라 칭한 다른 클론은 서열이 완전히 결정되었으며, 전장 개방 해독 프레임 + 5'utr 의 부분 및 전체의 3'utr을 함유하는 것으로 확인되었다.

실시예 2

DNA 서열 분석

cDNA 클론(SOM175)의 전체 서열을 해독하였으며, 상기 서열은 그의 상응하는 아미노산 서열과 함께 도 2에 제시하였다. 상기 서열은 MAP 프로그램(GCG, 위스콘신 대학)을 이용하여 개방 해독 프레임(open reading frame)에 대해 스크린하였다. 672 bp인 단일 개방 해독 프레임이 관찰되었다(참조: 도 2). 약간의 5' 미해독 서열(2 bp)이 존재하는 것으로 생각된다. 3' 미해독 부분은 완전한 것으로 생각되는데, 그 이유는 3' 미해독 부분이 폴리아데닐화 시그널 및 폴리-A-테일을 포함하기 때문이다.

데이터베이스 상동성 검색(homology search)은 BLAST 알고리듬(미국, NCBI에서 운용함)을 이용하여 수행하였다. 이 분석은 VEGF의 몇몇 포유류형에 대한 상동성을 확인시켜 준다(참조: 도 3). SOM175 및 인체 VEGF $_{165}$ 사이의 상동성의 양은 BESTFIT 프로그램(GCG, 위스콘신 대학; 참조: 도 4 및 도 5)을 이용하여 수행하였다. BESTFIT 분석을 이용하여 뉴클레오티드 상동성은 69.7%로 산정하였으며, 단백질 상동성은 33.3% 이상 동일성 및 52.5% 보존성을 갖는 것으로 산정하였다. 뉴클 레오티드 서열에 대한 BLAST 분석으로 인간의 발현된 서열 태그 EST06302에 거의 완전히 부합되는 것을 확인하였다(Adams 등, (1993)).

이들 데이터는 SOM175가 VEGF와 구조적 유사성을 갖는 증식 인자를 암호화한다는 것을 나타내고 있다. 양 유전자 모두 개시 및 종결 코돈을 유사한 위치에서 나타내며, 불연속 상동성 블록을 공유하고 있다. 모두 8개의 시스테인 뿐만 아니라 이량체화에 관여하는 것으로 생각되는 기타 VEGF 잔기의 수는 보존된다. 이들 잔기는 시스테인-47, 프롤린-70, 시스테인-72, 발린-74, 아르기닌-77, 시스테인-78, 글리신-80, 시스테인-81, 시스테인-82, 시스테인-89, 프롤린-91, 시스테인-122 및 시스테인-124이고, 이들은 도 6에 나타냈다. VEGF와 SOM175 유전자 생성물 사이에 구조적 보존이 이루어지는 경우, 이들은 기능적 유사성도 공유할 가능성이 있다. SOM175는 VEGF와 몇몇 특성을 공유하나, 자신의 독특한 특성을 보유한 VEGF-유사 분자를 암호화하는 것으로 제안되었다. VEGF $_{165}$ 의 뉴클레오티드 서열 및 상응하는 아미노산 서열은 도 1에 제시하였다.

실시예 3

VEGF $_{165}$ 류와 SOM175 류(단백질) 사이의 유사성(similarity)(%) 및 발산성(divergence)(%)은 미국, 위스콘신에 소재하는 멕알리안 소프트웨어 DNASTAR를 사용하는 클러스탈법(Clustal method)을 이용하여 분석하였다. 분석 결과는 하기 표 2a 및 2b에 나타냈다. SOM175의 교호적으로 스플라이스된 형태는 모든 엑손 6이 결실된 경우, SOM175-e6; 모든 엑손 6amp;7이 결실된 경우, SOM175-e6amp;7; 모든 엑 손 4가 결실된 경우, SOM175-e4로 약식 표기하였다. SOM175의 스플라이스된 형태는 도 7에 도시하였다. 인트론/엑손 경계를 나타내는 SOM175의 게놈 지도는 도 8a 및 8b에 나타냈다.

[표 2a]

A. SOM175의 스플라이스 변형체 및 인체 VEGF$_{165}$ 사이의 뉴클레오티드 유사성(%)

	VEGF$_{165}$	SOM175	SOM175-e6	SOM175-e6&7	SOM175-e4
VEGF$_{165}$	***	34.9	39.7	41.4	37.0
SOM175		***	98.9	95.1	99.2
SOM175-e6			***	98.8	84.0
SOM175-e6&7				***	80.3
SOM175-e4					***

B. SOM175의 스플라이스 변형체 및 인체 VEGF$_{165}$ 사이의 뉴클레오티드 발산성(%)

	VEGF$_{165}$	SOM175	SOM175-e6	SOM175-e6&7	SOM175-e4
VEGF$_{165}$	***	41.7	41.6	41.7	41.8
SOM175		***	0.2	0.2	0.0
SOM175-e6			***	0.0	0.2
SOM175-e6&7				***	0.3
SOM175-e4					***

[표 2b]

A. SOM175의 스플라이스 변형체 및 인체 $VEGF_{165}$ 사이의 아미노산 동일성(%)

	$VEGF_{165}$	SOM175	SOM175-e6	SOM175-e6&7	SOM175-e4
$VEGF_{165}$	***	31.4	42.3	33.5	40.6
SOM175		***	74.7	73.7	99.1
SOM175-e6			***	76.8	99.1
SOM175-e6&7				***	99.1
SOM175-e4					***

B. SOM175의 스플라이스 변형체 및 인체 $VEGF_{165}$ 사이의 아미노산 발산성(%)

	$VEGF_{165}$	SOM175	SOM175-e6	SOM175-e6&7	SOM175-e4
$VEGF_{165}$	***	65.7	55.4	54.6	57.4
SOM175		***	19.9	4.2	0.0
SOM175-e6			***	0.0	0.0
SOM175-e6&7				***	0.0
SOM175-e4					***

실시예 4

SOM175의 기능을 결정하기 위한 생분석(hioassay)

본 분석을 수행하여 SOM175가 내피 세포 기능, 혈관 생성 및 상처 치료에 대해 VEGF와 유사한 활성을 보유하는지 여부를 평가하였다. 기타 분석은 수용체 결합분포 연구 결과에 근거하여 수행하였다.

내피 세포 기능 분석

내피 세포 증식. 내피 세포 성장은 문헌[Ferrara amp; Henzel (1989) 및 Gospodarowicz 등(1989)]에 기재된 바와 같이 분석하였다.

혈관 투과성 분석. 기니아 피그 내에서 마일즈 테스트(Miles test)를 이용하는 본 분석은 문헌[Miles amp; Miles (1952)]에 기재된 바와 같이 수행하였다.

세포 접착 분석. 내피 세포에 대한 다형체의 접착에 대한 SOM175의 영향을 분석하였다.

화학주성. 이는 표준 보이덴 챔버 화학주성 분석법(Boyden chamber chemotaxis assay)을 이용하여 수행하였다.

플라스미노겐 활성제(activator) 분석. 내피 세포는 플라스미노겐 활성제 및 SOM175 첨가시 플라스미노겐 활성제 억제제 생성에 대해 테스트하였다(Pepper 등(1991)).

내피 세포 이동 분석. 이동하여 관을 형성하기 위해 내피 세포를 자극할 수 있는 SOM175의 능력은 문헌[Montesano 등 (1986)]에 기재된 바와 같이 분석하였다.

혈관 생성 분석

병아리 융모요막에서 혈관 생성 반응의 SOM175 유도는 문헌[Leung 등(1989)] 에 기재된 바와 같이 수행하였다.

SOM175의 가능한 향신경성 작용은 하기 분석을 이용하여 평가하였다:

신경돌기 과성장 분석 및 유전자 유도(PC12 세포)

PC12 세포(크롬친화성세포종 세포주)는 교감신경 뉴론의 특성을 발현시키므로써 NGF 및 기타 향신경성 인자에 반응하는데, 상기 반응에는 초기 및 후기 유전자의 유도 및 신경돌기의 신장이 포함된다. 이들 세포를 SOM175에 노출시켰으며, 그들의 반응을 모니터하였다[Drinkwater 등 (1991); Drinkwater 등 (1993)].

말초 신경계(PNS) 유래의 배양된 뉴론

하기 PNS 뉴론의 초기 배양물을 SOM175에 노출시켰으며, 임의의 반응에 대해 모니터하였다:

- 신경릉(神經綾) 및 후근 신경절로부터 취한 감각 뉴론
- 교감신경 쇄 신경절로부터 취한 교감신경 뉴론
- 결절성 신경절로부터 취한 판 유래의 감각 뉴론
- 척수로부터 취한 운동 뉴론

상기 분석은 문헌[Suter 등 (1992) 및 Marinou 등 (1992)]에 기재되어 있다.

시험관 내에서 반응이 관찰되는 경우, 흡수 및 역 전달과 같은 특성에 대한 생체내 분석은 문헌[Hendry 등 (1992)]에 기재된 바와 같이 수행하였다.

신경 재생 (PNS)

SOM175의 향신경성 효과가 관찰되는 경우, 축삭절단된 감각 뉴론, 교감신경 뉴론 및 운동 뉴론의 재생에서 그의 가능한 역할은 문헌[Otto 등 (1989); Yip 등(1984) 및 Hendry 등 (1976)]에 기재된 방법을 이용하여 분석하였다.

CNS 뉴론에 대한 SOM175의 작용

중추 신경계 뉴론의 생존을 촉진시킬 수 있는 SOM175의 능력은 문헌[Hagg 등 (1992); Williams 등 (1986); Hefti (1986) 및 Kromer (1987)]에 기재된 바와 같이 분석하였다.

상처 치료

상처 치료에 조력할 수 있는 SOM175의 능력은 문헌[Schilling 등 (1995) 및 Hunt 등 (1967)]에 기재된 바와 같이 이용할 수 있는 대부분의 임상적으로 적당한 모델에서 테스트하였다.

조혈 시스템

조혈 시스템의 특정 세포군에 대한 여러 가지 시험관내 및 생체내 분석을 이용하였으며, 그 개요를 설명하면 다음과 같다:

간상 세포

쥐 (murine)

여러 가지 신규의 시험관내 쥐의 줄기 세포(stem cell) 분석법이 FACS-정제된 세포를 이용하여 개발되어 왔다:

(a) 줄기 세포의 재증식

이들은 치명적으로 방사선 조사된 마우스의 골수를 재생시킬 수 있는 세포들이며, 표현형은 Lin $^{-}$, Rh ^{hi}, Ly-6A/E $^{+}$, c-kit $^{+}$ 이었다. 테스트 물질은 이들 세포 상 에서 단독 또는 다수의 인자와 동시 항온처리한 후, ^{3}H 티미딘 혼입에 의해 세포 증식을 측정하여 시험하였다.

(b) 후기 줄기 세포

비교적, 이들은 골수 재생 능력이 거의 없었으나, D13 CFU-S를 생성할 수 있는 세포들이었다. 이들 세포들의 표현형은 Lin $^{-}$, Rh ^{hi}, Ly-6A/E $^{+}$, c-kit $^{+}$ 이었다. 테스트 물질은 일정 기간 동안 이들 세포와 함께 배양하였으며, 치명적으로 방사선 조사된 수용체에 주사하였으며, D13 비장 콜로니의 수를 계수하였다.

(c) 선조 세포(progenitor)-풍부한 세포

이들은 시험관 내에서 단일 증식 인자에 반응하는 세포들이며, 이들의 표현형은 Lin $^{-}$, Rh ^{hi}, Ly-6A/E $^{+}$, c-kit $^{+}$ 이었다. 본 분석은 SOM175가 조혈 선조 세포에 직접 작용할 수 있는지 여부를 확인시켜줄 것이다. 테스트 물질은 한천 배양물 내에서 이들 세포와 함께 항온처리하였으며, 7 내지 14일후 콜로니의 수를 계수하였다.

동맥경화증

평활근 세포는 동맥경화증의 발생 및 진전에 결정적인 역할을 수행하는데, 이역할 수행에는 수축 상태로부터 합성 상태로의 표현형의 변화를 필요로 한다. 마크로 파지, 내피 세포, T 임파구 및 혈소판 모두는 평활근 세포의 증식 및 표현형 조절에 영향을 미침으로써 동맥경화성 플라크의 진전에 일익을 담당한다. 다세포성 환경 내에서 평활근 세포의 증식 속도 및 표현형 조절을 측정하는 임의의 시험관내 분석법을 이용하여 평활근 세포에 대한 SOM175의 효과를 평가하였다. 상기 시스템은 상이한 세포 형태가 마주하는 커버슬립(coverslip) 상에 접종되는 변형된 로즈 챔버(modified Rose chamber)를 이용하였다.

뼈에 대한 SOM175의 효과

골아세포의 증식을 조절할 수 있는 SOM175의 능력은 문헌[Lowe 등(1991)]에 기재된 바와 같이 분석하였다. 뼈 재흡착에 대한 임의의 효과는 문헌[Lowe 등 (1991)]에 기재된 바와 같이 분석하였다. 세포내 분자 내에서 골아세포 이동 및 변화에 대한 효과(예를 들어, cAMP 축적, 알칼리 포스파타제 농도)는 문헌[Midy 등 (1994)]에 기재된 바와 같이 분석하였다.

골격근 세포에 대한 효과

근아세포의 증식 및 근관의 발육에 대한 SOM175의 효과는 문헌[Ewton 등(1980) 및 Gospodarowicz 등 (1976)]에 기재된 바와 같이 결정할 수 있다.

실시예 5

쥐의 VEGF DNA 클로닝

cDNA의 분리

쥐의 VRF(mVRF) 클론은 λ Zap 신생 전뇌 cDNA 라이브러리(스트라타진)로부터 선택하였다. 고밀도 필터(5 x 10^{4} pfu/평판)로부터 취한 초기 파지는 이미 기술한 바와 같이 hVRF cDNA(pSOM175)로부터 PCR에 의해 생성된 682

bp ^{32}P-표지된 프로브를 이용하여 하이브리드화하므로써 동정하였다. 하이드리드화 및 나일론막(하이본 드-N)의 강한 세척은 문헌[Church amp; Gilbert (1984)]에 기재된 조건 및 65℃에서 수행하였다. 양성 플라크를 취하고, 정제하고, 생체 내에서 절단하여 p블루 스크립트 SK- 내에 cDNA 클론을 함유하는 박테리아 콜로니를 생성하였다.

게놈 클론의 분리

게놈 클론은 λ Fix II 벡터(스트라타진) 내에서 클론된 마우스 균주 SV 129 라이브러리로부터 분리하였다. 고밀도 필터(5 × 10 ^{4} pfu/필터)는 mVRF cDNA 의 뉴클레오티드 233-798 부위의 PCR 증폭에 의해 생성된 563 bp ^{32}P-표지된 프로브를 이용하여 스크린하였다(참조: 도 9). 양성 클론은 모으고, 400 내지 800 pfu를 함유하는 필터를 이용하여 재스크린하였다. 큰 규모의 파지 제제는 퀴아젠(QIAGEN) λ 키트 또는 $ZnCl_2$ 정제를 이용하여 제조하였다[Santos, (1991)].

뉴클레오티드 서열 결정 및 분석

cDNA는 제조업자의 사양에 따라 어플라이드 바이오시스템 인코오포레이티드(ABI) 염료 종결자(terminator) 서열결정 키트를 사용하고, 여러 가지 벡터계 및 내부 프라이머를 이용하여 양 스트랜드로부터 서열결정하였다. 서열은 ABI 모델 373A 자동화 DNA 서열결정기로 분석하였다. 펩티드 상동체 배열은 프로그램 BESTFIT(GCG, 위스콘신)을 이용하여 수행하였다.

인트론/액손 경계의 확인

엔손 경계 및 인접 부위의 확인은 마우스 게놈 DNA 또는 mVRF 게놈 λ 클론을 주형으로 사용하는 PCR을 이용하여 수행하였다. 인트론을 확인하기 위해 PCR에 사 용한 프라이머는 hVRF 서열로부터 유도하였으며, 가능한 인간-마우스 서열 미스매치(mismatch)를 허용하기 위해 예상된 Tm 보다 5 내지 10℃ 낮은 어닐링(annealing) 온도를 사용하였다. 모든 PCR 생성물은 아가로오즈 겔 전기영동으로 크기를 결정하고 QIA퀵 스핀 칼럼(퀴아젠)을 이용하여 겔을 정제하고, 인트론/엑손 경계는 이들 생성물로부터 직접 서열결정하였다. 또한, 몇몇 스플라이스 접합부는 MVRF의 서브클로닝된 게놈 단편으로부터 서열결정하였다. 인트론/엑손 경계는 cDNA와 게놈 DNA 서열을 비교하므로써 확인하였다.

노던 분석

총 세포성 RNA는 문헌[Chomczynski 및 Sacchi (1987)]의 방법을 이용하여 새로운 정상적인 성체 마우스 조직(뇌, 신장, 간, 근육) 패널로부터 제조하였다. 총 RNA 20 ㎍을 전기영동하고, 나일론 막(하이본드-N, 아메르샴)으로 이동시키고, 표준 조건하에서 하이브리드화하였다(Church 및 Gilbert (1984)). 필터는 65℃에서 0.1 x SSC(20xSSC 는 3 M NaCl/0.3 M 시트르산 삼나트륨이다), 0.1% SDS 로 세척하고, 강화 스크린을 이용하여 -70℃에서 1 내지 3일 동안 X-선 필름에 노출시켰다.

mVRF cDNA의 특정화

쥐의 VRF 상동체는 hVRF cDNA 클론을 이용하여 쥐의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하므로써 분리하였다. 크기가 0.8 내지 1.5 kb인 5개의 클론을 회수하고, 서열결정하였다. 상기 cDNA 서열을 편집하여 전체적인 개방 해독 프레임(스플라이스 형태에 따라 621 bp 또는 564 bp; 하기 참조) 및 3' UTR(379 bp), 뿐만 아니라 163 bp의 5' UTR을 포함하는 전장 1041 bp의 cDNA 서열을 수득하였다(참조: 도 9).

추정되는 개시 코돈은 hVRF 내의 개시 코돈의 위치와 부합되었다. 하나의 다른 아웃-오브 프레임(out of frame) ATG 는 -47에 위치하였으며, 두 개의 종결 코돈은 상류(각각 -9 위치 및 -33 위치)에서 관찰되었고 추정되는 개시 코돈과 인-프레임 (in-frame)상태였다.

hVRF의 추정되는 N-말단 시그널 펩티드는 81%의 동일성으로 mVRF 내에 존재하는 것으로 생각된다(17/21 아미노산). mVRF 내에서의 펩티드 절단은 잔기 21 이후에서 발생하는 것으로 생각된다(참조: 도 10). 이들 데이터는 성숙한 mVRF가 분비되고, 따라서 이는 생각컨대 증식 인자로서 작용할 수 있음을 암시하는 것이다.

hVRF에 있어서, 두 개의 개방 해독 프레임(ORF)은 라이브러리 스크리닝에 의해 분리된 cDNA에서 검출하였다. 5개 중 4개의 클론은 교대로 스플라이스되었으며, hVRF의 엑손 6에 상동성인 101 bp의 단편이 없는 것으로 확인되었다. mVRF의 2가지 이소형태(isoform)의 추정 펩티드 서열이 결정되었으며, 이는 상응하는 인체 이소형태와 나란히 배열되었다(참조: 도 10).

$mVRF_{186}$ 을 암호화하는 메시지는 엑손 7의 말단을 향해 위치 +622에서 종결되는 암호화 서열을 갖는 621 bp ORF를 함유한다(참조: 도 9). $mVRF_{167}$ 을 암호화하는 더 작은 메시지는 실질적으로 +622 TAG의 하류에서 종결되는데, 그 이유는 101 bp 엑손 6으로부터의 스플라이싱으로 인한 프레임 전이 및 엑손 8의 개시 위치 근처인 +666 위치에 종결 코돈(TGA)의 도입 때문이다(참조: 도 9).

$mVRF_{168}$ 단백질은 VEGF의 아미노부 및 중심부와 강한 상동성을 갖는 한편, 카 르복실 단부는 알라닌이 풍부한 완전히 발산성이었다. $mVRF_{167}$ 은 이들 유사성을 보유하고, 또한 C-말단에 대해 mVEGF에 대한 상동성을 유지하였다(참조: 도 11). $hVRE_{167}$ 에 대한 $mVRF_{167}$ 의 전체적인 상동성은 각각 85% 동일성 및 92% 유사성이었다(참조: 도 10). 유사하게, $mVRF_{167}$ 및 mVEGF 간의 상동성[Breier 등(1992)]은 각각 49% 동일성 및 71% 보존적 아미노산 치환이었다(참조: 도 11).

그러나, 표준 척추동물 폴리아데닐화 시그널(AATAAA)[참조: Brinstiel 등(1986)]은 mVRF cDNA 내에 존재하지 않지만, 매우 부합하는 서열 GATAAA가 마우스 및 인간 VRF cDNA 둘다에서 유사한 위치에 존재하였다(참조: 도 9). hVRF와는 대조적으로, mVRF는 3'UTR의 3' 최단부(뉴클레오티드 위치 998 내지 1011; 참조: 도 9)에 AC 디뉴클레오티드 반복부를 함유하는 것으로 확인되었다. 이 반복부의 다형태는 디뉴클레오티드의 수가 7 에서 11 사이에서 변함에 따라 몇몇 mVRF cDNA 사이에서 관찰되었다.

mVRF의 게놈 특정화

인트론/엑손 경계(참조: 표 3)는 상응하는 hVRF의 경계에 상동성을 갖는 서열이 인접해 있는 프라이머를 이용하여 매핑(mapping)하였다. mVRF의 인트론 I, III, IV 및 VI(참조: 표 3과 도 12)는 hVRF 개재서열(intervening sequence) 보다 더 작았다. 완전한 게놈 서열은 mVRF의 5' UTR로부터 가장 큰 개재 부분(2.2kb)인 인트론 VI 까지 mVRF의 증폭된 인트론 및 클로닝된 게놈부를 서열결정하므로써 편집하였다. mVRF와 hVRF 사이의 게놈 구조에는 한 가지 중요한 차이점이 존재하는 데, 이는 mVRF의 엑손 7/인트론 VI 경계가 cDNA 서열에 대해 추가로 10 bp 하류에 위치하므로써, mVRF의 엑손 7은 hVRF 내의 상응하는 엑손 보다 10 bP 더 길다는 점이었다.

엑손 6amp;7은 인간 상동체 내에서 존재하는 것으로 확인된 바와 같이 mVRF내에서 인접해 있다. mVRF의 엑손 6과 hVRF 간의 강한 서열 상동성(참조: 도 10)은 이 서열이 유지된 인트론 서열이 아니라 오히려 VRF$_{186}$ 이소형태의 작용부를 암호화함을 암시하는 것이다.

일반적인 인트론/엑손 구조는 VEGF 유전자류(VEGF, PICF, hVRF)의 여러가지 구성원 사이에서 보존된다. 따라서, mVRF 유전자의 전체적인 게놈 구조가 이들 유전자와 매우 유사하다는 것이 놀라운 일은 아니다(참조: 도 12).

이전의 비교 지도화 연구 결과, 염색체 11q13 상에 인간 다중 내분비 종양의 타입 1 병소 주위의 부위는 마우스 염색체 19의 인접 단편과 동일 염색분체 상에 존재하는 것으로 확인되었다[Rochelle 등 (1992)]. 본 발명자들은 1 kb의 인간 MEN1 병소 내에서 hVRF 유전자를 지도화하였기 때문에(상기 참조), 쥐 VRF 유전자는 염색체 19의 동원체 근처에서 지도화되었다.

mVRF의 발현 연구

성체 마우스 조직(근육, 심장, 폐 및 간)으로부터 취한 RNA의 노던 분석은 발현이 편재하는 것으로 생각되며, 주로 크기가 약 1.3 kb인 주 밴드로서 존재하는 것으로 보여진다(참조: 도 14). 이는 2.0 및 5.5 kb의 두 개의 주 밴드가 모든 조 사된 조직 내에서 확인된, hVRF에 대해 관찰된 패턴과는 다소 상이하다. 아마도 1.3 kb의 쥐의 메시지는 더 짧은 인간 전사체에 상응하며, 이러한 크기 차이는 각각의 5'UTRs의 길이 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

실시예 6

출생전 및 출생후 마우스에서 쥐 VEGF의 발현

동물

임신한 마우스(n=4) 및 어린 성체 마우스(n=2)(스웨덴, ALAB의 C57 양육 마우스)를 이산화탄소로 죽이고, 관련 조직을 적출하고, 껵쇠 상에서 냉동하였다. 조직은 추가 사용할 때까지 -70℃로 보관하였다. 본 연구에는 두 개의 임신기간을 사용하였다; 태아일 8(E8), 14 및 E17.

인시투(in situ) 하이브리드화 조직 분석

인시투 하이브리드화는 문헌[참조: Dagerlind 등 (1992)]에 기술된 바와 같이 수행하였다. 간략히 설명하면, 횡 단편(14 ㎛)을 저온 유지 장치(cryostat)(독일 마이크롬) 내에서 절단하고, 프로브-온 슬라이드(Probe-On slides)(미국 피셔 사이언티픽) 상에서 해동하고, 사용할 때까지 흑색의 밀봉된 상자에서 저장하였다. mVRF를 암호화화는 mRNA에 상보적인 합성 42량체 올리고뉴클레오티드의 서열은 ACCACCACCTCCCTGGGCTGGCATGT GGCACGTGCATAAACG[서열 번호: 11](뉴클레오티드 120-161에 상보적임) 및 AGTTGTTT GACCACATTGCCCATG AGTTCCATGCTCAGAGGC[서열 번호: 12](뉴클레오티드 162-203에 상보적임)이었다. 2개의 교호적으로 스플라이스된 형태를 검출하기 위해, 올리고뉴클레오티드 GATCCTGGGGCTGGAGTGGGATGGATGATGTCAGCTGG[서열 번호: 13] (뉴클레오티드 xxx-xxx에 상보적임) 및 GCGGGCAGAGGATCCTGGGGCTGTCTGG CCTCACAGCACT[서열 번호: 14]를 사용하였다. 프로브는 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라아제(미국 IBI)로 비활성(specific activity) 7-10 x 10^{8} cpm / ㎍ 까지 3'-말단에 데옥시아데노신-알파[티오]트리포스페이트[^{35}S](미국 NEN)으로 표지하였으며, 42℃에서 16-18 시간 동안의 예비처리없이 상기 단편에 하이브리드화하였다. 하이브리드화 혼합물은 50% v/v 포름아미드, 4xSSC(1xSSC = 0.15 M NaCl 및 0.015 M 나트륨 시트레이트), 1 x 덴하르트 용액(각각 0.02% 폴리비닐피롤리돈, BSA 및 피콜), 1% v/v 사르코실(N-라우로일사르코신; 시그마), 0.02 M 인산염 완충용액(pH 7.0), 10% w/v 덱스트란 설페이트(스웨덴 파마시아), 250 ㎍/㎖ 효모 tRNA(시그마), 500 ㎍/㎖ 전단 처리 및 열 변성된 연어 정자 DNA(시그마) 및 200 mM 디티오트레이톨(DTT: 스웨덴 LKB)을 포함하였다. 대조용 단편에서, 양 프로브의 특이성은 상기 하이브리드화 혼합물에 20배 초과량의 미표지된 프로브를 첨가하므로써 조사하였다. 또한, 인접 단편은 상이한 발현 패턴을 제공하는, 본 연구와는 무관한 프로브와 하이브리드화하였다. 하이브리드화후, 상기 단편을 1 x SSC 로 55℃에서 수회 세척하고, 에탄올 내에서 탈수하고, NTB2 핵 트랙 에멀젼(nuclear track emulsion)(미국 코닥)내에 침지하였다. 3 내지 5주후, 상기 단편은 D-19 현상액(미국 코닥) 내에서 현상하고, 커버 슬립으로 덮었다. 몇몇 경우, 단편을 에멀젼 침지하기 전에 자동방사능 필름(영국 베타-맥스 오토라디오그래피 필름 아메르샴 리미티드)에 노출시켰다.

4개의 상이한 프로브는 조사한 모든 조직에서 동일한 하이브리드화 패턴을 제공하였다. 마우스 VRF 발현은 이미 E8 배에서 관찰되었으며, 양성 시그널은 신경관에 가장 상응할 것 같은 구조에 대해 기록하였다. E14 마우스 배의 시상 봉합부에서, 가장 강한 하이브리드화 시그널이 심장과 신경계, 특히 대뇌 피질에 존재하였다(참조: 도 14A). 발현은 모든 다른 조직에서 낮게 나타났다. 후기 임신 기간 E17에서, 높은 mVRF mRNA 시그널은 심장, 등의 갈색 지방 조직 및 목 주위에 국한되었다(참조: 도 14B). 명백히 양성인 하이브리드화 시그널은 척수의 회백질 및 혀 내에 존재하였다(참조: 도 14B). 대뇌 피질의 발현은 14일에 비해 명백히 감소하였다. 예를 들어, 근육 내에서 E14 배 내에서 나타난 약한 배경(background) 발현은 이 임신기간에서 감소하였다. 강한 mVRF mRNA 하이브리드화 시그널은 단지 어린 성체 마우스의 심장 및 갈색 지방 내에서만 존재하였다(참조: 도 l4C) 심장에 대한 시그널은 유두 근육을 포함하는 전체적인 심실벽에 분포하였다(참조: 도 l4D), 과량의 비방사성 프로브와 하이브리드화하는 심장 조직 단편에서, 배경 시그널 이상의 특이적인 표지화는 전혀 기록되지 않았다(참조: 도 14E).

심장을 제외하고, mVRF mRNA 시그널은 갈색 지방과 형태학적으로 유사한 흉곽 외부의 어떤 조직에 존재하였다. 이는 동일한 부분에서 강한 염색을 나타내는 수단 블랙 대응염색으로 확인하였다(참조: 도 15A 및 도 15B), 성체 마우스 척수의 횡단편에서, mVRF 프로브는 회백질 부분에 대해 신경 염색 패턴을 제공하였다(참조: 도 15C). 톨루이딘을 이용하는 대응염색(참조: 도 15D)은 복부 혼(ventral horn)(참조: 도 15C 및 15D), 등 혼(dorsal horn)의 저부 및 중심 도관 주변의 인 터뉴론(참조: 도 15C)이 mVRF mRNA에 대해 큰 양으로 양성인 것으로 나타났다.

실시예 7

병아리 감각 뉴론에 대한 VEGF 및 SOM175 단백질의 효과

E8 병아리 김각 뉴론에 대한 VEGF 및 SOM175 단백질의 효과는 문헌[참조: Nurcombe 등 (1992)]에 기재된 방법을 이용하여 측정하였다. 뉴론 분석은 1개의 분석 웰 당 2000 개의 세포를 이용하여 48 시간째에 판독하였다. 결과는 ^{3}H-티미딘 계수를 이용하여 얻었다. 뉴론의 생존율(%), 신경돌기 외성장 및 평균 신경돌기 길이(㎛)는 양성 대조용으로 NGF를 이용하고, VEGF, 헤파린 존재 하에서의 VEGF 및 헤파린 및 5 μM의 5'-플루오로우라실(5FU) 존재하에서 VEGF의 농도를 변화시키면서 측정하였다. 5FU는 신경교질 세포를 사멸시켰다.

상기 측정 결과는 도 16에 나타냈다. 상기 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, VEGF는 뉴론 생존을 촉진하는데 효과적이었으나, 상기 효과에는 신경교질 세포의 존재를 필요로 하였다. 도 17은 3개 타입의 병아리 신경교에 대한 VEGF 및 SOM175의 효과를 측정한 결과를 나타낸다. 테스트한 신경교는 CNS 신경교, 말초 신경교 및 CNS 희돌기교세포(稀突起膠細胞)였다. 헤파린은 모든 배양물에서 10 ㎍/㎖ 이었으며, 분석은 24시간째에 판독하였다. 결과는 1개의 웰당 2000개의 세포를 이용하는 ^{3}H-티미딘 계수로 측정하였다.

상기 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 병아리 중추 뉴론 및 말초 뉴론에 있어서, 대교세포는 헤파린 존재 하에서 SOM175에 의해 현저히 자극되어 증식하 지만, 병아리 희돌기교세포는 분열 속도 증가가 무시할 수 있을 정도로 나타났다.

실시예 8

마우스 초기 뉴론 및 중추 뉴론에 대한 SOM175 단백질의 효과

실시예 7의 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, VEGF 이소형태는 대교세포의 작용을 통해 병아리 초기 뉴론 및 중심 뉴론에 대한 효과를 보유하였다. 유사한 실험을 마우스 세포에서 반복 수행하였다.

배양 조건

문헌[참조: 'Methods in Neurosciences(Vol. 2): Cell Culture' Ed. P.M. Conn, Academic Press, San Diego (1990)]의 대교세포에 대해서는 pp33-46, 희돌기교세포에 대해서는 pp56-74 및 중추 뉴론에 대해서는 pp87-102에 기재된 바와 같이 모든 시험관내 실험에서 뉴론 세포 및 신경교 세포를 제조하고, 배양하였다.

세포는 폴리-L-오르니틴(0.1 mg/㎖, 1hr)으로 피복한 24-웰 배양 클러스터(Nunc) 상에서 2,000 세포/웰의 밀도로 평판배양하였다. 배양 개시후 48 시간이 경과한 후, 널리 알려진 기법[참조: Maruta 등 (1993)]을 이용하여 역상 광하에서 상기 웰 내의 뉴론을 계수하였다. 신경교질 세포는 하기 하는 바와 같이 세포 분열 속도를 모니터하기 위해 [^{3}H]티미딘 흡수를 이용하여 평가하였다 헤파린(10 ㎍/㎖, 저분자량 분획, 시그마 케미칼 코오포레이숀)은 특별히 언급되는 경우를 제외하고, 배양중 항상 존재하였다. 뉴론 배양물은 5 mM 5-플루오로-2-데옥시우리딘(시그마)으로 보충하여 배경 신경교질 성장을 억제하였다.

신경교질 세포 증식에 대한 ^{3}H-티미딘 혼입 분석

상기 세포는 표준 배지 내의 저장 농도 0.1 mCi/㎖로부터 ^{3}H-티미딘(비활성 103 μCi/㎍)을 이용하여 14 시간 동안 펄스처리하고, 최종 배양 부피를 20 ㎕ 웰로 하였다. 상기 웰의 내용물을 수거하고, 니트로셀룰로오즈 페이퍼(타이터텍, 플로우)상에 흡수하였다. 잔류하는 흡착 세포는 트립신/베르센(오스트레일리아, 빅토리아 CSL 리미티드)과 함께 5분 동안 배양하여 제거하였다. 상기 과정을 2회 반복하였다. 니트로셀룰로오즈 디스크는 표준 타이터텍 회수기(플로우)내에서 처음에는 증류수, 그 다음에는 메탄올을 이용하여 세척하였다. 상기 니트로셀룰로오즈 디스크를 건조하고, 신틸레이션(scintillation) 유체(5% v/v 트리톤-X를 함유함)를 첨가하고, 상기 디스크는 신틸레이션 계수기 상에서 계수하였다.

가장 큰 활성은 헤파린과 함께 전달되는 경우 그들의 증식에 현저한 자극이 존재하는 마우스 대교세포 배양물 상에서 엑손 6이 없는 SOM175 (SOM⊿X6) 의 제조물을 이용하여 확인하였다(참조: 도 16). 희돌기교세포의 증식에 대한 자극은 거의 없었으며(참조: 도 17), 분리된 전뇌 뉴론의 생존 반응의 식별할 수 있는 가능성은 매우 희박했다(참조: 도 18). 모두 세 개의 그래프에서 각각의 점에 대한 표준 오차는 8% 미만이었다.

뉴론의 생존 가능성은 신경교질 세포 증식을 촉진하므로써 유지할 수 있다. 또한, SOM⊿X6 은 대교세포 증식의 양호한 인듀서(inducer)이며, 중추 신경계 내피 세포 상에서 대교세포 무수신경섬유의 형성과 함께 발현될 수 있다.

당업자는 본원에 기술된 본 발명이 본 명세서에 상세히 기술된 것과는 다르게 변형 실시될 수 있음을 인식할 것이다. 본 발명은 이러한 모든 변형 실시를 포함하는 것으로 이해하여야 할 것이다. 또한, 본 발명은 본원에 언급 또는 제시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물을 개별적으로 또는 총괄하여 포함하며, 상기 단계 또는 특징중 임의의 두 개 이상의 모든 조합을 포함한다.

[표 3]

쥐의 VRF 유전자의 스플라이스 접합

5' UTR*	엑손 1	〉223bp	CCCAGgtacgtgcgt	인트론 I	495bp
ttccccacagGCCCC	엑손 2	43bp	GAAAGgtaataatag	인트론 II	288bp
ctgcccacagTGGTG	엑손 3	197bp	TGCAGgtaccagggc	인트론 III	196bp
ctgagcacagATCCT	엑손 4	74bp	TGCAGgtgccagccc	인트론 IV	182bp
ctcttttcagACCTA	엑손 5	36bp	GACAGattcttggtg	인트론 V	191bp
ctcctcctagGGTTG	엑손 6	101bp		인트론 없음	
CCCACTCCAGCCCCA	엑손 7	135bp	TGTAGgtaaggagtc	인트론 VI	~2200bp
cactccccagGTGCC	엑손 8	394bp	AGAGATGGAGACACT		
대문자 및 소문자는 각각 엑손 및 인트론의 서열을 나타낸다. *는 엑손 1의 5' 말단이 결정되지 않았다는 것을 의미한다.					

관계 서적 목록

Adams MD, Soares MB, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC,(1993) Nature Genet, 4, 373-380.

Birnstiel ML, Busslinger M 및 Strub K (1985) Cell 41,349-359.

Breier G, Albrecht U, Sterrer S 및 Risau W (1992) Development 114.521-532.

Chomczynski P 및 Sacchi N (1987) Analyt. Biochem. 162, 156-159.

Church G 및 Gilbert W (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 18, 1991-1995.

Dagerlind A, Friberg K, Bean AJ 및 Hokfelt T (1992) Histochemistry 98, 39-49.

Dissen GA, Lara HE, Fabrenbach WH, Costa ME, Ojeda SR, (1994) Endocrinology 134, 1146-1154.

Drinkwater CC, Barker PA, Suter U 및 Shooter EM (1993) J. Biol.Chem., 268, 23202-23207

Drinkwater CC, Suter U, Angst C 및 Shooter EM (1991) Proc. Roy Soc. Lond. (시리즈 B), 246,307-313.

Ewton DZ & Florini JR (1980) Endocrinology, 106: 577-583.

Ferrara N & Henzel WJ (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 851-185.

Folkman J & Shing Y (1992) J. Biol. Chem. 267, 10931-10934.

Gospodarowicz D, Abraham JA & Schilling J (1989) Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, 7311-7315.

Gospodarowicz D, Weseman J, Morgan JS & Lindstrom J (1976) J.Cell Biol., 70: 395-405.

Hagg T, Quon D, Higaki J & Varon S (1992) Neuron, 8, 145-158.

Hefti S (1986) J.Neurosci, 6, 2155-2162.

Hendry IA & Campbell J (1976) J. Neurocytol., 5, 351-360.

Hendry IA, Murphy M, Hilton DJ, Nicola NA & Bartlett PF (1992)

J. Neurosci. 12, 3427-3434.

Hunt 등, (1967) Am. J. Surgery, 114: 302-307.

Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemoti EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N, (1994) J. Immunol. 152, 4149-4156.

Kromer AF (1987) Science, 235, 214-216.

Larsson C, Weber G, Kvanta E, Lewis C, Janson M, Jones C, Glaser T, Evans G, Nordenskjold M, (1992) Hum Genet. 89, 187-193.

OZUS Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV & Ferrara N (1989) Science 246· 1306-1309.

Lowe C, Cornish J, Callon K, Martin TJ & Reid IR (1991) J. Bone Mineral Res., 6, 1277-1283.

Martinou JC, Martinou I & Kato AC (1992) Neuron, 8, 737-744.

Lowe C, Cornish J, Martin TJ & Reid IR (1991) Calcif. Tissue Int., 49, 394-397.

Maruta 등 (1993) Growth Factors 8: 119-134.

Midy V & Plouet J (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., 199: 380-386.

Miles AA & Miles EM (1952) J. Physiol. (Lond) 118:228-257

Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R & Orci, L (1986) Proc. Natl Acad. Sci USA, 83, 7297-7301.

Nurcombe 등 (1992) Development 116: 1175-1183.

Otto D., Frotscher M & Unsicker K (1989) J Neurosci Res., 22, 83-91.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 902-906.

Rochell JM, Watson ML, Oakey RJ 및 Seldin MF (1992) Genomics 14, 26-31.

Roth S & Weston J (1967) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 58: 974-980.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 제2 판 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Santos MA (1991) Nucleic Acids Res. 19, 5442.

Schilling 등,(1959) Surgery, 46: 702-710.

Senger DR, Van De Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF (1993) Cancer Netastasis Rev. 12, 303-324.

Sharkey AM, Chamock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK, (1993) J. Reprod. Fertil. 99, 609-615.

Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardway R, Sorg E,

(1993) J. Leukocyt. Biol. 55, 410-422.

Suter U, Angst C, Tien C-L, Drinkwater CC, Lindsay RM 및 Shooter EM (1992) J. Neurosci., 12, 306-318.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, & Abraham J (1991) J. Biol. Chem. 266, 11947-11954.

Williams LR, Varon S, Peterson GM, Wictorin K, Fischer W, Bjorklund A & Gage FH (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9231-9235.

Yan Z, Weich HA, Bernart W, Breckwoldt M, Neulen J, (1993) J Clin. Endocrinol. Metab. 77, 1723-1725.

Yip NK, Rich KM, Lampe PA & Johnson EM Jr (1984) J. Neurosci., 4, 2986-2992.

서열표

```
<110> Hayward, Nicholas K.
      Weber, Gunther
      Grimmond, Sean
      Nordenskjold, Magnus
      Larsson, Catharina

<120> A NOVEL GROWTH FACTOR AND A GENETIC SEQUENCE ENCODING
      SAME

<130> DAVIES

<140> 08/765,588
<141> 1996-02-22

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 649
<212> DNA
<213> Nucleotide Sequence of VEGF165

<220>
<221> CDS
<222> (17) .(589)

<400> 1
tcgggcctcc gaaacc atg aac ttt ctg ctg tct tgg gtg cat tgg agc ctt 52

                  Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu
                   1               5                  10

gcc ttg ctg ctc tac ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag gct gca ccc    100

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro
         15                  20                  25

atg gca gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg    148

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met
     30                  35                  40

gat gtc tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac    196

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp
 45                  50                  55                  60

atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca tcc    244

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser
                 65                  70                  75
```

```
tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag ggc ctg     292

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu
             80                  85                  90

gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg cgg     340

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
         95                 100                 105

atc aaa cct cac caa ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta cag     388

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln
    110                 115                 120

cac aac aaa tgt gaa tgc aga cca aag aaa gat aga gca aga caa gaa     436

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu
125                 130                 135                 140

aat ccc tgt ggg cct tgc tca gag cgg aga aag cat ttg ttt gta caa     484

Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln
                145                 150                 155

gat ccg cag acg tgt aaa tgt tcc tgc aaa aac aca gac tcg cgt tgc     532

Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys
            160                 165                 170

aag gcg agg cag ctt gag tta aac gaa cgt act tgc aga tgt gac aag     580

Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys
        175                 180                 185

ccg agg cgg tgagccgggc aggaggaagg agcctccctc agcgtttcgg             629

Pro Arg Arg
    190

gaaccagatc tctcaccagg                                               649


<210>  2
<211>  191
<212>  PRT
<213>  Nucleotide Sequence of VEGF165

<400>  2
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
  1               5                  10                  15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
             20                  25                  30
```

```
Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
        35                  40                  45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
    50                  55                  60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65                  70                  75                  80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
                85                  90                  95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
            100                 105                 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
        115                 120                 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
    130                 135                 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
145                 150                 155                 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
                165                 170                 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
            180                 185                 190


<210> 3
<211> 1094
<212> DNA
<213> Nucleotide Sequence of SOM175

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(623)

<400> 3
cc atg agc cct ctg ctc cgc cgc ctg ctg ctc gcc gca ctc ctg cag     47

   Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln
    1               5                  10                  15

ctg gcc ccc gcc cag gcc cct gtc tcc cag cct gat gcc cct ggc cac     95

Leu Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His
                20                  25                  30

cag agg aaa gtg gtg tca tgg ata gat gtg tat act cgc gct acc tgc    143

Gln Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys
            35                  40                  45
```

```
cag ccc cgg gag gtg gtg gtg ccc ttg act gtg gag ctc atg ggc acc   191

Gln Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr
         50                  55                  60

gtg gcc aaa cag ctg gtg ccc agc tgc gtg act gtg cag cgc tgt ggt   239

Val Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly
     65                  70                  75

ggc tgc tgc cct gac gat ggc ctg gag tgt gtg ccc act ggg cag cac   287

Gly Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His
 80                  85                  90                  95

caa gtc cgg atg cag atc ctc atg atc cgg tac ccg agc agt cag ctg   335

Gln Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu
                100                 105                 110

ggg gag atg tcc ctg gaa gaa cac agc cag tgt gaa tgc aga cct aaa   383

Gly Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys
            115                 120                 125

aaa aag gac agt gct gtg aag cca gac agg gct gcc act ccc cac cac   431

Lys Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His
        130                 135                 140

cgt ccc cag ccc cgt tct gtt ccg ggc tgg gac tct gcc ccc gga gca   479

Arg Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala
    145                 150                 155

ccc tcc cca gct gac atc acc cat ccc act cca gcc cca ggc ccc tct   527

Pro Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser
160                 165                 170                 175

gcc cac gct gca ccc agc acc acc agc gcc ctg acc ccc gga cct gcc   575

Ala His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala
                180                 185                 190

gct gcc gct gcc gac gcc gca gct tcc tcc gtt gcc aag ggc ggg gct   623

Ala Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
            195                 200                 205

tagagctcaa cccagacacc tgcaggtgcc ggaagctgcg aaggtgacac atggcttttc 683

agactcagca gggtgacttg cctcagaggc tatatcccag tgggggaaca aaggggagcc 743
```

```
tggtaaaaaa cagccaagcc cccaagacct cagcccaggc agaagctgct ctaggacctg 803

ggcctctcag agggctcttc tgccatccct tgtctccctg aggccatcat caaacaggac 863

agagttggaa gaggagactg ggaggcagca agaggggtca cataccagct caggggagaa 923

tggagtactg tctcagtttc taaccactct gtgcaagtaa gcatcttaca actggctctt 983

cctcccctca ctaagaagac ccaaacctct gcataatggg atttgggctt tggtacaaga 1043

actgtgaccc ccaaccctga taaaagagat ggaaggaaaa aaaaaaaaaa a          1094


<210> 4
<211> 207
<212> PRT
<213> Nucleotide Sequence of SOM175

<400> 4
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1               5                   10                  15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
             20                  25                  30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
         35                  40                  45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
     50                  55                  60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65                  70                  75                  80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
                 85                  90                  95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
            100                 105                 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
        115                 120                 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
    130                 135                 140

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro
145                 150                 155                 160

Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala
```

```
                165                     170                     175

His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
            180                     185                     190

Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
        195                     200                     205


<210> 5
<211> 993
<212> DNA
<213> Nuc. Seq. of SOM175 Absent Exon 6

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(566)

<400> 5
cc atg agc cct ctg ctc cgc cgc ctg ctg ctc gcc gca ctc ctg cag      47

   Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln
     1               5                  10                  15

ctg gcc ccc gcc cag gcc cct gtc tcc cag cct gat gcc cct ggc cac     95

Leu Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His
                 20                  25                  30

cag agg aaa gtg gtg tca tgg ata gat gtg tat act cgc gct acc tgc    143

Gln Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys
             35                  40                  45

cag ccc cgg gag gtg gtg gtg ccc ttg act gtg gag ctc atg ggc acc    191

Gln Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr
         50                  55                  60

gtg gcc aaa cag ctg gtg ccc agc tgc gtg act gtg cag cgc tgt ggt    239

Val Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly
     65                  70                  75

ggc tgc tgc cct gac gat ggc ctg gag tgt gtg ccc act ggg cag cac    287

Gly Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His
 80                  85                  90                  95

caa gtc cgg atg cag atc ctc atg atc cgg tac ccg agc agt cag ctg    335

Gln Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu
                100                 105                 110
```

```
ggg gag atg tcc ctg gaa gaa cac agc cag tgt gaa tgc aga cct aaa    383

Gly Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys
            115                 120                 125

aaa aag gac agt gct gtg aag cca gat agc ccc agg ccc ctc tgc cca    431

Lys Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro
        130                 135                 140

cgc tgc acc cag cac cac cag cgc cct gac ccc cgg acc tgc cgc tgc    479

Arg Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys
    145                 150                 155

cgc tgc cga cgc cgc agc ttc ctc cgt tgc caa ggg cgg ggc tta gag    527

Arg Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu
160                 165                 170                 175

ctc aac cca gac acc tgc agg tgc cgg aag ctg cga agg tgacacatgg    576

Leu Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
                180                 185

cttttcagac tcagcagggt gacttgcctc agaggctata tcccagtggg ggaacaaagg 636

ggagcctggt aaaaaacagc caagccccca agacctcagc ccaggcagaa gctgctctag 696

gacctgggcc tctcagaggg ctcttctgcc atcccttgtc tccctgaggc catcatcaaa 756

caggacagag ttggaagagg agactgggag gcagcaagag gggtcacata ccagctcagg 816

ggagaatgga gtactgtctc agtttctaac cactctgtgc aagtaagcat cttacaactg 876

gctcttcctc ccctcactaa gaagacccaa acctctgcat aatgggattt gggctttggt 936

acaagaactg tgacccccaa ccctgataaa agagatggaa ggaaaaaaaa aaaaaaa    993


<210> 6
<211> 188
<212> PRT
<213> Nuc. Seq. of SOM175 Absent Exon 6

<400> 6
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1               5                  10                  15
```

```
Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
            20                  25                  30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
        35                  40                  45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
    50                  55                  60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65                  70                  75                  80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
                85                  90                  95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
            100                 105                 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
        115                 120                 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg
    130                 135                 140

Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys Arg
145                 150                 155                 160

Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
                165                 170                 175

Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
            180                 185


<210> 7
<211> 858
<212> DNA
<213> Nuc. Seq. of SOM175 Absent Exons 6&7

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(431)

<400> 7
cc atg agc cct ctg ctc cgc cgc ctg ctg ctc gcc gca ctc ctg cag     47

   Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln
   1               5                   10                  15

ctg gcc ccc gcc cag gcc cct gtc tcc cag cct gat gcc cct ggc cac    95

Leu Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His
                20                  25                  30
```

```
cag agg aaa gtg gtg tca tgg ata gat gtg tat act cgc gct acc tgc   143

Gln Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys
            35                  40                  45

cag ccc cgg gag gtg gtg gtg ccc ttg act gtg gag ctc atg ggc acc   191

Gln Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr
        50                  55                  60

gtg gcc aaa cag ctg gtg ccc agc tgc gtg act gtg cag cgc tgt ggt   239

Val Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly
    65                  70                  75

ggc tgc tgc cct gac gat ggc ctg gag tgt gtg ccc act ggg cag cac   287

Gly Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His
80                  85                  90                  95

caa gtc cgg atg cag atc ctc atg atc cgg tac ccg agc agt cag ctg   335

Gln Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu
                100                 105                 110

ggg gag atg tcc ctg gaa gaa cac agc cag tgt gaa tgc aga cct aaa   383

Gly Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys
            115                 120                 125

aaa aag gac agt gct gtg aag cca gat agg tgc cgg aag ctg cga agg   431

Lys Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
        130                 135                 140

tgacacatgg cttttcagac tcagcagggt gacttgcctc agaggctata tcccagtggg 491

ggaacaaagg ggagcctggt aaaaaacagc caagccccca agacctcagc ccaggcagaa 551

gctgctctag gacctgggcc tctcagaggg ctcttctgcc atcccttgtc tccctgaggc 611

catcatcaaa caggacagag ttggaagagg agactgggag gcagcaagag ggtcacata 671

ccagctcagg ggagaatgga gtactgtctc agtttctaac cactctgtgc aagtaagcat 731

cttacaactg gctcttcctc ccctcactaa gaagacccaa acctctgcat aatgggattt 791

gggctttggt acaagaactg tgacccccaa ccctgataaa agagatggaa ggaaaaaaaa 851
```

```
aaaaaaa                                                                      858


<210> 8
<211> 143
<212> PRT
<213> Nuc. Seq. of SOM175 Absent Exons 6&7

<400> 8
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1               5                  10                  15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
            20                  25                  30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
        35                  40                  45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
    50                  55                  60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65                  70                  75                  80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
                85                  90                  95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
            100                 105                 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
        115                 120                 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
    130                 135                 140


<210> 9
<211> 910
<212> DNA
<213> Nuc. Seq. of SOM175 Absent Exon 4

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(305)

<400> 9
cc atg agc cct ctg ctc cgc cgc ctg ctg ctc gcc gca ctc ctg cag      47

   Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln
    1               5                  10                  15

ctg gcc ccc gcc cag gcc cct gtc tcc cag cct gat gcc cct ggc cac     95
```

```
Leu Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His
                20                  25                  30

cag agg aaa gtg gtg tca tgg ata gat gtg tat act cgc gct acc tgc    143
Gln Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys
            35                  40                  45

cag ccc cgg gag gtg gtg gtg ccc ttg act gtg gag ctc atg ggc acc    191
Gln Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr
        50                  55                  60

gtg gcc aaa cag ctg gtg ccc agc tgc gtg act gtg cag cgc tgt ggt    239
Val Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly
    65                  70                  75

ggc tgc tgc cct gac gat ggc ctg gag tgt gtg ccc act ggg cag cac    287
Gly Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His
80                  85                  90                  95

caa gtc cgg atg cag acc taaaaaaaag gacagtgctg tgaagccaga           335
Gln Val Arg Met Gln Thr
                100

cagggctgcc actccccacc accgtcccca gccccgttct gttccgggct gggactctgc 395

ccccggagca ccctccccag ctgacatcac ccatcccact ccagccccag gcccctctgc 455

ccacgctgca cccagcacca ccagcgccct gaccccggga cctgccgctg ccgctgccga 515

cgccgcagct tcctccgttg ccaagggcgg ggcttagagc tcaacccaga cacctgcagg 575

tgccggaagc tgcgaaggtg acacatggct tttcagactc agcagggtga cttgcctcag 635

aggctatatc ccagtgggga acaaagagga gcctggtaaa aaacagccaa gcccccaaga 695

cctcagccca ggcagaagct gctctaggac ctgggcctct cagagggctc ttctgccatc 755

ccttgtctcc ctgaggccat catcaaacag gacagagttg gaagaggaga ctgggaggca 815

gcaagagggg tcacatacca gctcagggga gaatggagta ctgtctcagt ttctaaccac 875
```

```
tctgtgcaag taagcatctt acaactggct cttcc                              910


<210> 10
<211> 101
<212> PRT
<213> Nuc. Seq. of SOM175 Absent Exon 4

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

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
             20                  25                  30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
         35                  40                  45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
     50                  55                  60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65                  70                  75                  80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
                 85                  90                  95

Val Arg Met Gln Thr
            100


<210> 11
<211> 42
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<400> 11
accaccacct ccctgggctg gcatgtggca cgtgcataaa cg                        42


<210> 12
<211> 42
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<400> 12
agttgtttga ccacattgcc catgagttcc atgctcagag gc                        42


<210> 13
<211> 38
<212> DNA.
```

```
<213> Oligonucleotide

<400> 13
gatcctgggg ctggagtggg atggatgatg tcagctgg                         38


<210> 14
<211> 40
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<400> 14
gcgggcagag gatcctgggg ctgtctggcc tcacagcact                       40


<210> 15
<211> 236
<212> DNA
<213> Human SOM175

<400> 15
atgaggggcc aggtacgtga ggtctcccac aggcccctgg aaagaatact tacatctgct 60

cccatggtgt atgcaggtcc gagatgctga atacagatcc tcatgcaggt gtcaggcaac 120

ttttcaagac ctaaagacag gtgagtcttt ctcctccgta ggctgcctcc agccccaggc 180

cccccactcc agccccagac ccagacacct gtagccctgc tcaggtgccg aggtga     236


<210> 16
<211> 1242
<212> DNA
<213> mVRF

<220>
<221> CDS
<222> (166)..(789)

<400> 16
gcacgagctc aggccgtcgc tgcggcgctg cgttgcgctg cctgcgccca gggctcggga 60


gggggccgcg gaggagccgc cccctgcgcc ccgccccggg tccccgggtc cgcgccatgg 120


ggcggctctg gctgaccccc ccccacaccg ccgggctagg gcccg atg agc ccc ctg 177
                                                  Met Ser Pro Leu
                                                   1

ctg cgt cgc ctg ctg ctt gtt gca ctg ctg cag ctg gct cgc acc cag   225
```

```
Leu Arg Arg Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Gln Leu Ala Arg Thr Gln
 5                  10                  15                  20

gcc cct gtg tcc cag ttt gat ggc ccc agt cac cag aag aaa gtg gtg   273

Ala Pro Val Ser Gln Phe Asp Gly Pro Ser His Gln Lys Lys Val Val
                 25                  30                  35

cca tgg ata gac gtt tat gca cgt gcc aca tgc cag ccc agg gag gtg   321

Pro Trp Ile Asp Val Tyr Ala Arg Ala Thr Cys Gln Pro Arg Glu Val
             40                  45                  50

gtg gtg cct ctg agc atg gaa ctc atg ggc aat gtg gtc aaa caa cta   369

Val Val Pro Leu Ser Met Glu Leu Met Gly Asn Val Val Lys Gln Leu
         55                  60                  65

gtg ccc agc tgt gtg act gtg cag cgc tgt ggt ggc tgc tgc cct gac   417

Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly Cys Cys Pro Asp
     70                  75                  80

gat ggc ctg gaa tgt gtg ccc act ggg caa cac caa gtc cga atg cag   465

Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln Val Arg Met Gln
 85                  90                  95                 100

atc ctc atg atc cag tac ccg agc agt cag ctg ggg gag atg tcc ctg   513

Ile Leu Met Ile Gln Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly Glu Met Ser Leu
                105                 110                 115

gga gaa cac agc caa tgt gaa tgc aga cct aaa aaa aag gag agt gct   561

Gly Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Lys Glu Ser Ala
            120                 125                 130

gtg agg cca gac agg gtt gcc ata ccc cac cac cgt ccc cag ccc cgc   609

Val Arg Pro Asp Arg Val Ala Ile Pro His His Arg Pro Gln Pro Arg
        135                 140                 145

tct gtt ccg ggc tgg gac tct acc ccg gga gca ccc tcc cca gct gac   657

Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Thr Pro Gly Ala Pro Ser Pro Ala Asp
    150                 155                 160

atc atc cat ccc act cca gcc cca gga tcc tct gcc cgc ctt gca ccc   705

Ile Ile His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Ser Ser Ala Arg Leu Ala Pro
165                 170                 175                 180

agc gcc gcc aac gcc ctg acc ccc gga cct gcc gtt gcc gct gta gac   753

Ser Ala Ala Asn Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Val Ala Ala Val Asp
```

```
                185                     190                     195

gcc gcc gct tcc tcc att gcc aag ggc ggg gct tag agctcaaccc        799
Ala Ala Ala Ser Ser Ile Ala Lys Gly Gly Ala
            200                     205

agacacctgt aggtgccgga agccgcgaaa gtgacaagct gctttccaga ctccacgggc 859

ccggctgctt ttatggccct gcttcacagg gagaagagtg gagcacaggc gtaacctcct 919

cagtctggga ggtcactgcc ccaggacctg gaccttttag agagctctct cgccatcttt 979

tatctcccag agctgccatc taacaattgt caaggaacct catgtctcac ctcaggggcc 1039

agggtactct ctcacttaac caccctggtc aagtgagcat cttctggctg gctgtctccc 1099

ctcactatga aaaccccaaa cttctaccaa taacgggatt tgggttctgt tatgataacc 1159

gtgacacaca cacacactca cactctgata aaagagatgg agacactaaa aaaaaaaaaa 1219

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa                                         1242
```

```
<210> 17
<211> 207
<212> PRT
<213> mVRF

<400> 17
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Gln Leu
 1               5                  10                  15
Ala Arg Thr Gln Ala Pro Val Ser Gln Phe Asp Gly Pro Ser His Gln
            20                  25                  30
Lys Lys Val Val Pro Trp Ile Asp Val Tyr Ala Arg Ala Thr Cys Gln
        35                  40                  45
Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Ser Met Glu Leu Met Gly Asn Val
    50                  55                  60
Val Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65                  70                  75                  80
Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
                85                  90                  95
Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Gln Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
            100                 105                 110
Glu Met Ser Leu Gly Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
        115                 120                 125
Lys Glu Ser Ala Val Arg Pro Asp Arg Val Ala Ile Pro His His Arg
    130                 135                 140
```

```
Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Thr Pro Gly Ala Pro
145                 150                 155                 160
Ser Pro Ala Asp Ile Ile His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Ser Ser Ala
                165                 170                 175
Arg Leu Ala Pro Ser Ala Ala Asn Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Val
            180                 185                 190
Ala Ala Val Asp Ala Ala Ala Ser Ser Ile Ala Lys Gly Gly Ala
        195                 200                 205


<210> 18
<211> 188
<212> PRT
<213> mVRF167

<400> 18
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Gln Leu
 1              5                   10                  15

Ala Arg Thr Gln Ala Pro Val Ser Gln Phe Asp Gly Pro Ser His Gln
            20                  25                  30

Lys Lys Val Val Pro Trp Ile Asp Val Tyr Ala Arg Ala Thr Cys Gln
        35                  40                  45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Ser Met Glu Leu Met Gly Asn Val
    50                  55                  60

Val Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65                  70                  75                  80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
                85                  90                  95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Gln Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
            100                 105                 110

Glu Met Ser Leu Gly Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
        115                 120                 125

Lys Glu Ser Ala Val Arg Pro Asp Ser Pro Arg Ile Leu Cys Pro Pro
    130                 135                 140

Cys Thr Gln Arg Arg Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys Arg
145                 150                 155                 160

Cys Arg Arg Arg Arg Phe Leu His Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
                165                 170                 175

Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Pro Arg Lys
            180                 185

<210> 19
<211> 188
```

```
<212> PRT
<213> hVRF167

<400> 19
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1               5                   10                  15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
             20                  25                  30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
         35                  40                  45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
     50                  55                  60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65                  70                  75                  80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
                 85                  90                  95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
            100                 105                 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
        115                 120                 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg
    130                 135                 140

Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys Arg
145                 150                 155                 160

Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
                165                 170                 175

Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
            180                 185


<210> 20
<211> 71
<212> PRT
<213> mVRF186

<400> 20
Arg Val Ala Ile Pro His His Arg Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly
 1               5                   10                  15

Trp Asp Ser Thr Pro Gly Ala Pro Ser Pro Ala Asp Ile Ile His Pro
             20                  25                  30

Thr Pro Ala Pro Gly Ser Ser Ala Arg Leu Ala Pro Ser Ala Ala Asn
         35                  40                  45
```

```
Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Val Ala Ala Val Asp Ala Ala Ala Ser
    50                  55                  60

Ser Ile Ala Lys Gly Gly Ala
65                  70


<210> 21
<211> 71
<212> PRT
<213> hVRF186

<400> 21
Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly
1               5                   10                  15

Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro
            20                  25                  30

Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser
        35                  40                  45

Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser
    50                  55                  60

Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
65                  70


<210> 22
<211> 214
<212> PRT
<213> mVEGF188

<400> 22
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Thr Leu Ala Leu Leu Leu
1               5                   10                  15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Thr Thr Glu Gly
            20                  25                  30

Glu Gln Lys Ser His Glu Val Ile Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
        35                  40                  45

Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
    50                  55                  60

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
65                  70                  75                  80

Arg Cys Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ala Leu Glu Cys Val Pro Thr
                85                  90                  95

Ser Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
            100                 105                 110
```

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(i) 혈관 내피 세포의 증식 유도 능력:
(ii) *flt* -1/ *flk* -1 수용체류와의 상호 반응 능력: 및/또는
(iii) 세포 이동. 세포 생존 및/또는 알칼리 포스파타제의 세포내 농도 증가를 유도할 수 있는 능력
중 1가지 이상의 특성을 나타내는 생물학적으로 분리된 단백 분자로서,
상기 단백 분자는 (a) 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9 또는 서열번호 16에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열: 또는 (b) 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 17 또는 서열번호 18에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 것인 생물학적으로 분리된 단백 분자.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 서열번호 4에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 서열번호 6에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 서열번호 8에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하 는 것인 단백 분자.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 서열번호 10에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 6.

서열번호 4에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열의 분리된 또는 재조합된 펩티드 단편.

청구항 7.

서열번호 6에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열의 분리된 또는 재조합된 펩티드 단편.

청구항 8.

서열번호 8에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열의 분리된 또는 재조합된 펩티드 단편.

청구항 9.

서열번호 10에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열의 분리된 또는 재조합된 펩티드 단편.

청구항 10.

서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9 또는 서열번호 16에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 9 또는 서열번호 16에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클 레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자.

청구항 11.

(i) 혈관 내피 세포의 증식 유도 능력;

(ii) *flt* -1/ *flk* -1 수용체류와의 상호 반응 능력; 및/또는

(iii) 세포 이동, 세포 생존 및/또는 알칼리 포스파타제의 세포내 농도 증가를 유도할 수 있는 능력

중 1가지 이상의 특성을 나타내는 단백 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 상기 서열과 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 또는 재조합된 핵산 분자로서,

상기 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 17 또는 서열번호 18에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 암호화하는 것인 분리된 또는 재조합된 핵산 분자.

청구항 12.

제 10 항에 있어서, 서열번호 3에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 13.

제 10 항에 있어서, 서열번호 5에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 14.

제 10 항에 있어서, 서열번호 7에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포 함하는 것인 핵산 분자.

청구항 15.

제 10 항에 있어서, 서열번호 9에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 16.

제 11 항에 있어서, 서열번호 4에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단백 분자를 암호화하는 것인 핵산 분자.

청구항 17.

제 11 항에 있어서, 서열번호 6에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단백 분자를 암호화하는 것인 핵산 분자.

청구항 18.

제 11 항에 있어서, 서열번호 8에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단백 분자를 암호화하는 것인 핵산 분자.

청구항 19.

제 11 항에 있어서, 서열번호 10에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단백 분자를 암호화하는 것인 핵산 분자.

청구항 20.

제 11 항에 있어서, 상기 단백 분자의 성숙 형태(mature form)를 암호화하는 것인 핵산 분자.

청구항 21.

제 1 항에 있어서, 서열번호 3에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 22.

제 1 항에 있어서, 서열번호 5에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 23.

제 1 항에 있어서, 서열번호 7에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 24.

제 1 항에 있어서, 서열번호 9에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 25.

제 1 항에 있어서, 상기 단백 분자는 리더 서열(leader sequence)이 없는 단백 분자의 성숙 형태(mature form)인 것인 단백 분자.

청구항 26.

제 10 항의 핵산 분자와 하이브리드화하는 안티센스 분자.

청구항 27.

제 1 항에 있어서, 서열번호 16에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 28.

제 1 항에 있어서, 서열번호 17에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 29.

제 1 항에 있어서, 서열번호 18에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백 분자.

청구항 30.

제 1 항에 있어서, 상기 단백 분자는 대교세포 증식을 유도하고/하거나, 신경생존 및/또는 증식을 촉진시킬 수 있는 것인 단백 분자.

청구항 31.

제 10 항에 있어서, 서열번호 16에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 핵산 분자.

청구항 32.

제 11 항에 있어서, 서열번호 17에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단백 분자를 암호화하는 것인 핵산 분자.

청구항 33.

제 11 항에 있어서, 서열번호 18에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단백 분자를 암호화하는 것인 핵산 분자.

청구항 34.

제 11 항의 핵산 분자를 포함하는 것인 재조합 벡터.

청구항 35.

제 1 항의 단백 분자를 제조하는 방법으로서,

상기 단백 분자를 합성하는 데 효과적인 조건하에서 성장하는 적당한 숙주 세포 내에서 제 1 항의 단백 분자를 암호화하는 핵산 분자를 발현시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 36.

포유 동물에 있어서 대교세포 증식을 유도하거나, 신경 생존 및/또는 증식을 촉진시키기 위한 약제로서, 제 34 항의 벡터 또는 제 1 항의 생물학적 활성 단백 분자를 활성 성분으로 포함하는 것인 약제.

청구항 37.

서열번호 17에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열의 분리된 또는 재조합된 펩티드 단편.

청구항 38.

서열번호 18에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열의 분리된 또는 재조합된 펩티드 단편.

도면

도면1

도 1a

도 1b

도 1c

도 1d

도면1a

```
1       TCGGCCTCC GAAACC ATG AAC TTT CTG
                         Met Asn Phe Leu
                          1

50      CTT GCC TTG CTG CTC TAC CTC CAC
        Leu Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His
                        15

98      CCC ATG GCA GAA GGA GGA GGG CAG
        Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln
                 30                  35

146     ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC
        Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr
             45                  50

194     GAC ATC TTC CAG GAG TAC CCT GAT
        Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp
         60                  65

242     TCC TGT GTG CCC CTG ATG CGA TGC
        Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys
                        80

290     CTC GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG
        Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu
                     95

338     CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG
        Arg Ily Lys Pro His Gln Gly Gln
                110                 115
```

도면1b

```
CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC          49
Leu Ser Trp Val His Trp Ser
  5                  10

CAT GCC AAG TGG TCC CAG GCT GCA      97
His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala
 20                  25

AAT CAT CAC GAA GTG GTG AAG TTC     145
Asn His His Glu Val Val Lys Phe
                 40

TGC CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG     193
Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val
             55

GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA     241
Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro
         70                  75

GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC     289
Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly
     85                  90

TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT ATG     337
Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met
100                 105

CAC ATA GGA GAG ATG AGC TTC CTA     385
His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
                120
```

도면1c

```
386     CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA
        Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg
            125                 130

434     GAA AAT CCC TGT GGG CCT TGC TCA
        Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser
        140                 145

482     CAA GAT CCG CAG ACG TGT AAA TGT
        Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys
                        160

530     TGC AAG GCG AGG CAG CTT GAG TTA
        Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu
                    175

578     AAG CCG AGG CGG TGAGCCGGGC AGGAG
        Lys Pro Arg Arg
                190

630     GAACCAGATC TCTCACCAGG
```

도면1d

```
CCA AAG AAA GAT AGA GCA AGA CAA      433
Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln
            135

GAG CGG AGA AAG CAT TTG TTT GTA      481
Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val
        150                 155

TCC TGC AAA AAC ACA GAC TCG CGT      529
Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg
    165                 170

AAC GAA CGT ACT TGC AGA TGT GAC      577
Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp
180                 185

GAAGG AGCCTCCCTC AGCGTTTCGG          629


                                     649
```

도면2

도 2a

도 2b

도 2c

도 2d

도 2e

도 2f

도면2a

```
1       CC ATG AGC CCT CTG CTC CGC CGC
           Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg
            1               5

48      CTG GCC CCC GCC CAG GCC CCT GTC
        Leu Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val
                         20

96      CAG AGG AAA GTG GTG TCA TGG ATA
        Gln Arg Lys Val Val Ser Trp Ile
                     35

144     CAG CCC CGG GAG GTG GTG GTG CCC
        Gln Pro Arg Glu Val Val Val Pro
                 50                  55

192     GTG GCC AAA CAG CTG GTG CCC AGC
        Val Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser
             65                  70

240     GGC TGC TGC CCT GAC GAT GGC CTG
        Gly Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu
         80                  85

288     CAA GTC CGG ATG CAG ATC CTC ATG
        Gln Val Arg Met Gln Ile Leu Met
                        100

336     GGG GAG ATG TCC CTG GAA GAA CAC
        Gly Glu Met Ser Leu Glu Glu His
                    115
```

도면2b

```
CTG CTG CTC GCC GCA CTC CTG CAG     47
Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln
         10                  15

TCC CAG CCT GAT GCC CCT GGC CAC     95
Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His
     25                  30

GAT GTG TAT ACT CGC GCT ACC TGC    143
Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys
 40                  45

TTG ACT GTG GAG CTC ATG GGC ACC    191
Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr
                 60

TGC GTG ACT GTG CAG CGC TGT GGT    239
Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly
             75

GAG TGT GTG CCC ACT GGG CAG CAC    287
Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His
         90                  95

ATC CGG TAC CCG AGC AGT CAG CTG    335
Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu
    105                 110

AGC CAG TGT GAA TGC AGA CCT AAA    383
Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys
120                 125
```

도면2c

```
384    AAA AAG GAC AGT GCT GTG AAG CCA
       Lys Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro
               130                 135

432    CGT CCC CAG CCC CGT TCT GTT CCG
       Arg Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro
           145                 150

480    CCC TCC CCA GCT GAC ATC ACC CAT
       Pro Ser Pro Ala Asp Ile Thr His
       160                 165

528    GCC CAC GCT GCA CCC AGC ACC ACC
       Ala His Ala Ala Pro Ser Thr Thr
                       180

576    GCT GCC GCT GCC GAC GCC GCA GCT
       Ala Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala
                   195
```

도면2d

```
GAC AGG GCT GCC ACT CCC CAC CAC      431
Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His
                140

GGC TGG GAC TCT GCC CCC GGA GCA      479
Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala
            155

CCC ACT CCA GCC CCA GGC CCC TCT      527
Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser
        170                 175

AGC GCC CTG ACC CCC GGA CCT GCC      575
Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala
    185                 190

TCC TCC GTT GCC AAG GGC GGG GCT T   624
Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
200                 205
```

도면2e

```
625    AGAGCTCAAC  CCAGACACCT  GCAGGTGCCG

685    GACTCAGCAG  GGTGACTTGC  CTCAGAGGCT

745    GGTAAAAAAC  AGCCAAGCCC  CCAAGACCTC

805    GCCTCTCAGA  GGGCTCTTCT  GCCATCCCTT

865    GAGTTGGAAG  AGGAGACTGG  GAGGCAGCAA

825    GGAGTACTGT  CTCAGTTTCT  AACCACTCTG

985    CTCCCCTCAC  TAAGAAGACC  CAAACCTCTG

1045   CTGTGACCCC  CAACCCTGAT  AAAAGAGATG
```

도면2f

GAAGCTGCGA AGGTGACACA TGGCTTTTCA 684

ATATCCCAGT GGGGGAACAA AGGGGAGCCT 744

AGCCCAGGCA GAAGCTGCTC TAGGACCTGG 804

GTCTCCCTGA GGCCATCATC AAACAGGACA 864

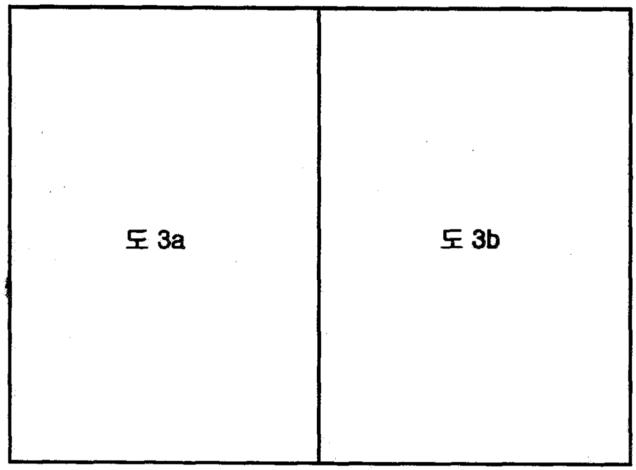
GAGGGGTCAC ATACCAGCTC AGGGGAGAAT 924

TGCAAGTAAG CATCTTACAA CTGGCTCTTC 984

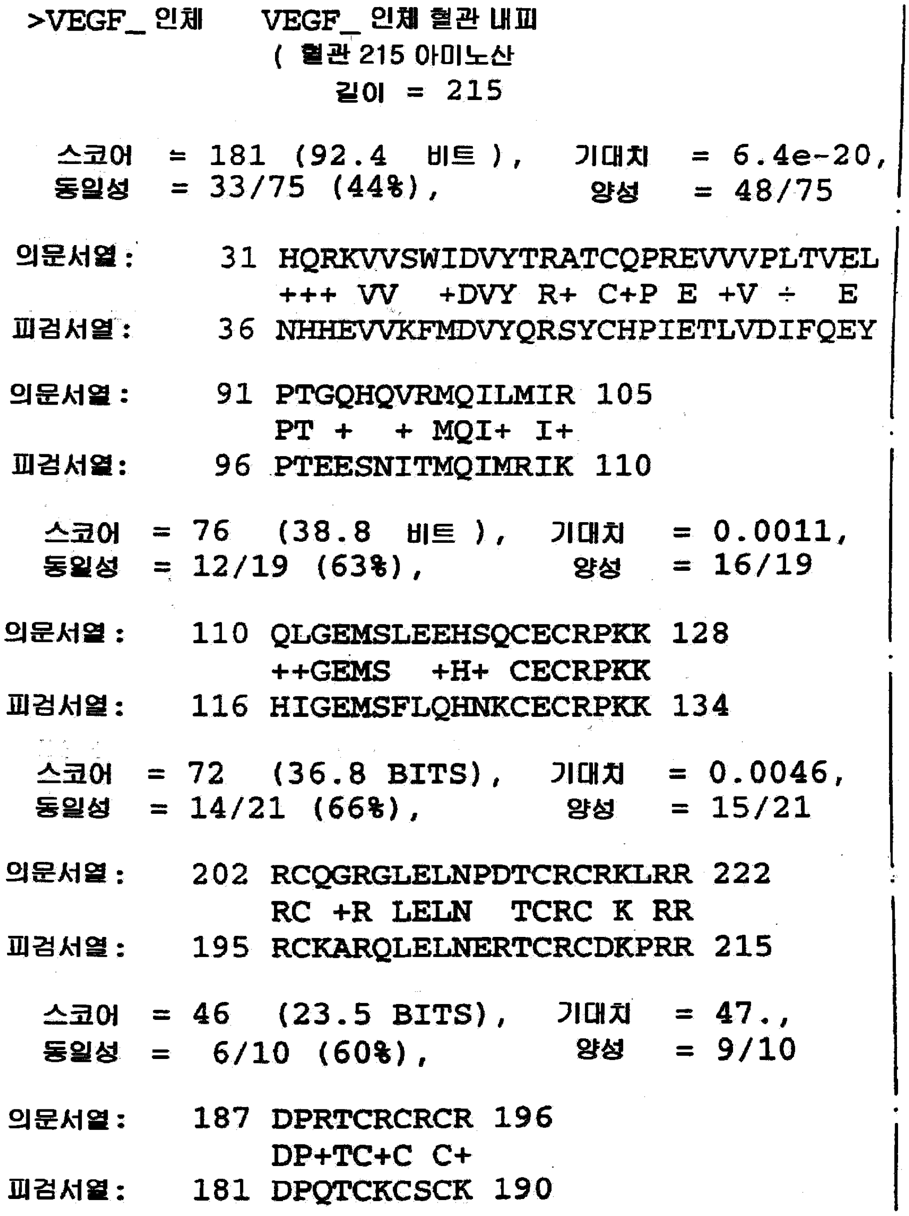
CATAATGGGA TTTGGGCTTT GGTACAAGAA 1044

GAAGGAAAAA AAAAAAAAAA 1094

도면3

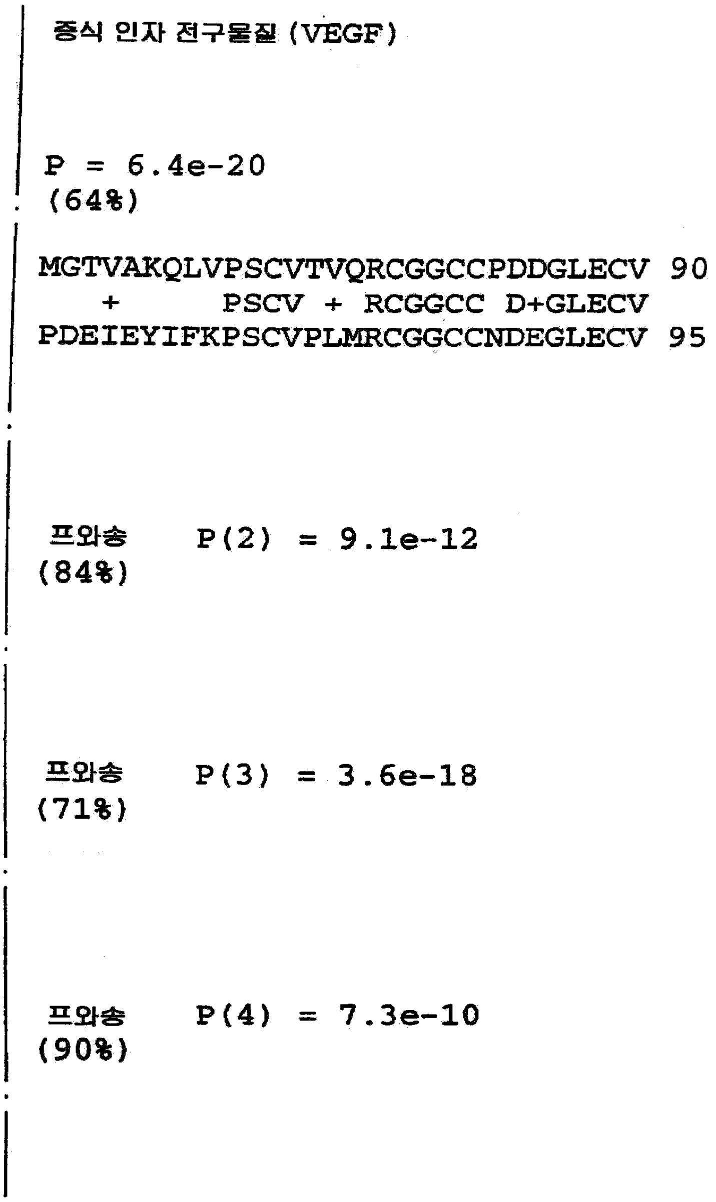


도면3a



```
>VEGF_ 인체      VEGF_ 인체 혈관 내피
                  ( 혈관 215 아미노산
                       길이  =  215

  스코어   =  181  (92.4   비트 ),    기대치   =  6.4e-20,
  동일성   =  33/75  (44%),            양성    =  48/75

 의문서열:       31  HQRKVVSWIDVYTRATCQPREVVVPLTVEL
                     +++ VV   +DVY R+ C+P E +V +   E
 피검서열:       36  NHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEY

 의문서열:       91  PTGQHQVRMQILMIR  105
                     PT  +    + MQI+ I+
 피검서열:       96  PTEESNITMQIMRIK  110

  스코어   =  76   (38.8  비트 ),    기대치   =  0.0011,
  동일성   =  12/19  (63%),           양성    =  16/19

 의문서열:      110  QLGEMSLEEHSQCECRPKK  128
                     ++GEMS   +H+ CECRPKK
 피검서열:      116  HIGEMSFLQHNKCECRPKK  134

  스코어   =  72   (36.8 BITS),     기대치   =  0.0046,
  동일성   =  14/21  (66%),           양성    =  15/21

 의문서열:      202  RCQGRGLELNPDTCRCRKLRR  222
                     RC  +R LELN   TCRC  K RR
 피검서열:      195  RCKARQLELNERTCRCDKPRR  215

  스코어   =  46   (23.5 BITS),     기대치   =  47.,
  동일성   =   6/10  (60%),           양성    =  9/10

 의문서열:      187  DPRTCRCRCR  196
                     DP+TC+C C+
 피검서열:      181  DPQTCKCSCK  190
```

도면3b



증식 인자 전구물질 (VEGF)

P = 6.4e-20
(64%)

```
MGTVAKQLVPSCVTVQRCGGCCPDDGLECV 90
   +       PSCV + RCGGCC D+GLECV
PDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECV 95
```

프와송 P(2) = 9.1e-12
(84%)

프와송 P(3) = 3.6e-18
(71%)

프와송 P(4) = 7.3e-10
(90%)

도면4

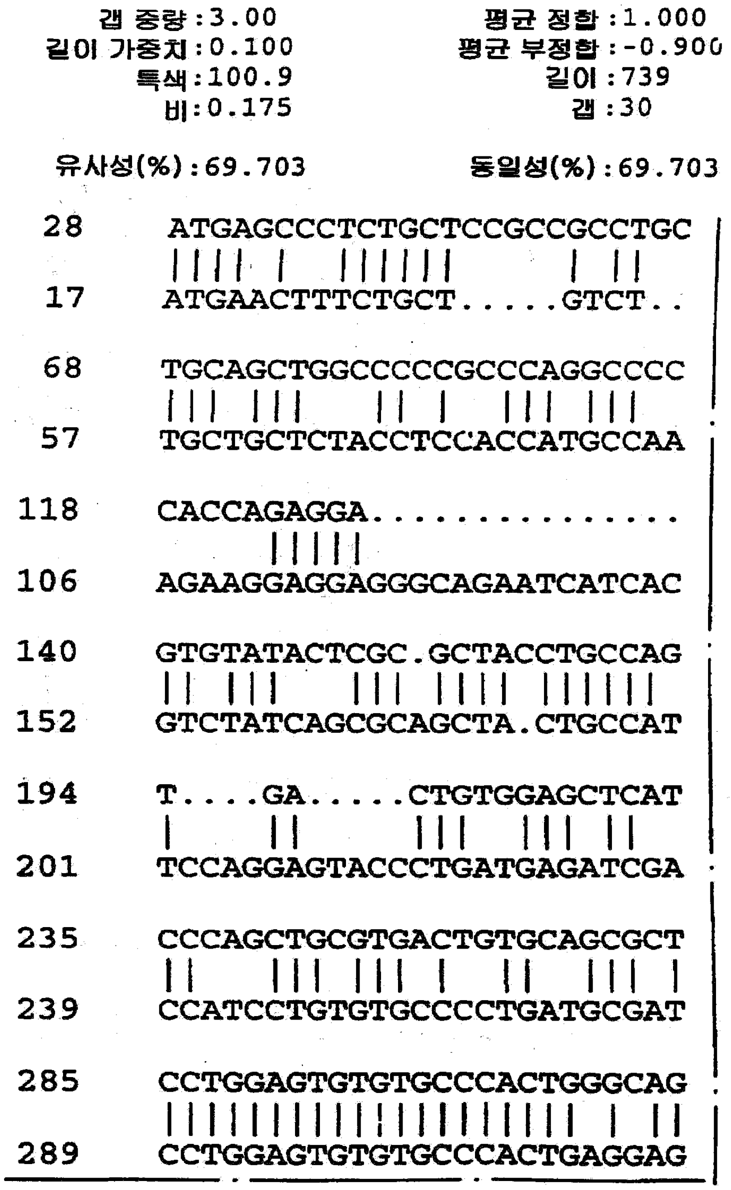
도 4a

도 4b

도 4c

도 4d

도면4a



```
     갭 중량:3.00              평균 정합:1.000
길이 가중치:0.100            평균 부정합:-0.900
       특색:100.9                  길이:739
         비:0.175                    갭:30

 유사성(%):69.703              동일성(%):69.703

 28     ATGAGCCCTCTGCTCCGCCGCCTGC
        |||| |  ||||||     | ||
 17     ATGAACTTTCTGCT.....GTCT..

 68     TGCAGCTGGCCCCCGCCCAGGCCCC
        ||| |||   || |  ||| |||
 57     TGCTGCTCTACCTCCACCATGCCAA

118     CACCAGAGGA...............
             |||||
106     AGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCAC

140     GTGTATACTCGC.GCTACCTGCCAG
        || |||   ||| |||| ||||||
152     GTCTATCAGCGCAGCTA.CTGCCAT

194     T....GA.....CTGTGGAGCTCAT
        |    ||     |||  ||| ||
201     TCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGA

235     CCCAGCTGCGTGACTGTGCAGCGCT
        ||   ||| ||| |  ||  ||| |
239     CCATCCTGTGTGCCCCTGATGCGAT

285     CCTGGAGTGTGTGCCCACTGGGCAG
        |||||||||||||||||||| | ||
289     CCTGGAGTGTGTGCCCACTGAGGAG
```

도면4b

```
TGCTCGCCGCACT..........CC     67
   | |  ||| |          |
...TGGGTGCATTGGAGCCTTGCCT     56

TGTCTCCCAGCCTGATGCCCCTGGC     117
    |||||| |||   ||| ||||
GTGGTCCCAGGCTGCA.CCCATGGC     105

.AAGTGGTG....TCATGGATAGAT     147
 ||||||||    |||||    |||
GAAGTGGTGAAGTTCATG....GAT     151

CCCCGGGAG...GTGGTGGTGCCCT     193
||    |||    ||||||    ||
CCAATCGAGACCCTGGTGGACATCT     200

GGGCACCGTGGCCAAACAGCTGGTG     234
|  || | |   |||         |
GTACATCTT...CAA.........G     238

GTGGTGGCTGCTGCCCTGACGATGG     284
| || |||||||||  |||||| ||
GCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGGG     288

CACCAAGTCCGGATGCAGAT.....     329
  | |  ||   ||||||||
TCCAACATCACCATGCAGATTATGC     338
```

도면4c

```
330    ........CCTCATGATCCGGTACC
               |||||           |
339    GGATCAAACCTCA...........C

369    GTCCCTGGAAGAACACAGCCAGTGT
       |  | |   | | |||| | | |||
376    GAGCTTCCTACAGCACAACAAATGT

419    GTGCTGTGAAGCCAGACAGGGCTGC
       |        ||| ||||| |
423    G........AGCAAGACAAG.....

469    CGTTCTGTTCCGGGCTGGGACTCTG
          | ||  ||  |||  ||
443    ...TGTGGGCCTTGCTCAGA.....

519    CATCACCCATCCCACTCCAGCCCCA

468    .........................

569    GC..........ACCACCAGCGCCC
       ||          || |
469    GCATTTGTTTGTACAA.........

609    TGCCGACGCCGCAGCTTCCTCCGTT
       || | |   | |||  ||   ||||
509    TG.CAAAAACACAGACTC..GCGTT

657    AACCCAGACACCTGCAGGTGCCGGA
       |||  |
554    AACGAACGTACTTGCAGATGTGACA
```

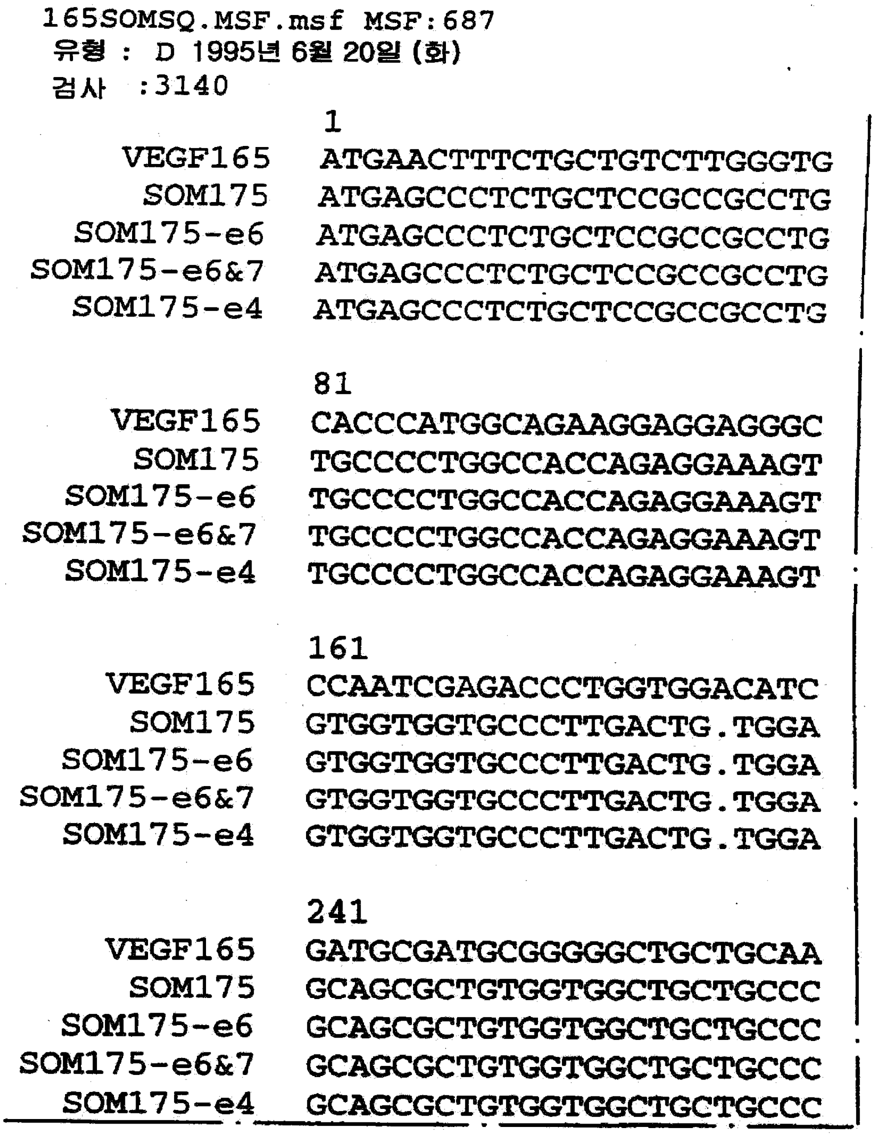
도면4d

```
CGAGCAGTCAGC...TGGGGGAGAT     368
| ||  | ||||   | || |||||
CAAG..GCCAGCACATAGGAGAGAT     375

GAATGCAGACCTAAAAAAAAGGACA     418
|||||||||||   ||| || || |
GAATGCAGACC...AAAGAAAGATA     422

CACTCCCCACCACCGTCCCCAGCCC     468
           |   ||||
...........AAAATCCC......     442

CCCCCGGAGCACCCTCCCCAGCTGA     518
    ||||| |
...GCGGAGAA..............     467

GGCCCCTCTGCCCACGCTGCACCCA     568
                        |
........................A     468

TGACCCCCGGACCTGCCGCTGCCGC     608
 || || | ||| ||    ||   |
.GATCCGCAGACGTGTAAATGTTCC     508

GCCAAGGGCGGGGC..TTAGAGCTC     656
||    |||| |||   | ||| |
GC..AAGGCGAGGCAGCTTGAGTTA     553

AGCTGCGAAGGTGA                695

AGCCGAGGCGGTGA                592
```

도면5

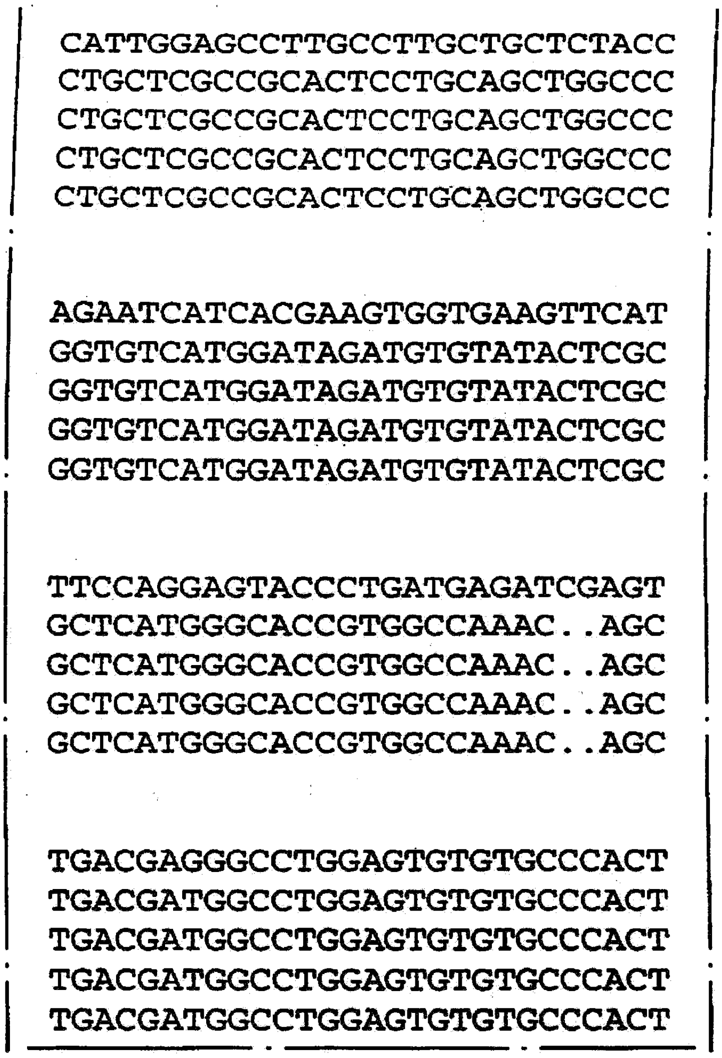
도 5a	도 5b	도 5c
도 5d	도 5e	도 5f

도면5a



```
165SOMSQ.MSF.msf MSF:687
유형 : D 1995년 6월 20일 (화)
검사 :3140
               1
    VEGF165    ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTG
     SOM175    ATGAGCCCTCTGCTCCGCCGCCTG
  SOM175-e6    ATGAGCCCTCTGCTCCGCCGCCTG
SOM175-e6&7    ATGAGCCCTCTGCTCCGCCGCCTG
  SOM175-e4    ATGAGCCCTCTGCTCCGCCGCCTG

               81
    VEGF165    CACCCATGGCAGAAGGAGGAGGGC
     SOM175    TGCCCCTGGCCACCAGAGGAAAGT
  SOM175-e6    TGCCCCTGGCCACCAGAGGAAAGT
SOM175-e6&7    TGCCCCTGGCCACCAGAGGAAAGT
  SOM175-e4    TGCCCCTGGCCACCAGAGGAAAGT

               161
    VEGF165    CCAATCGAGACCCTGGTGGACATC
     SOM175    GTGGTGGTGCCCTTGACTG.TGGA
  SOM175-e6    GTGGTGGTGCCCTTGACTG.TGGA
SOM175-e6&7    GTGGTGGTGCCCTTGACTG.TGGA
  SOM175-e4    GTGGTGGTGCCCTTGACTG.TGGA

               241
    VEGF165    GATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAA
     SOM175    GCAGCGCTGTGGTGGCTGCTGCCC
  SOM175-e6    GCAGCGCTGTGGTGGCTGCTGCCC
SOM175-e6&7    GCAGCGCTGTGGTGGCTGCTGCCC
  SOM175-e4    GCAGCGCTGTGGTGGCTGCTGCCC
```

도면5b



```
CATTGGAGCCTTGCCTTGCTGCTCTACC
CTGCTCGCCGCACTCCTGCAGCTGGCCC
CTGCTCGCCGCACTCCTGCAGCTGGCCC
CTGCTCGCCGCACTCCTGCAGCTGGCCC
CTGCTCGCCGCACTCCTGCAGCTGGCCC

AGAATCATCACGAAGTGGTGAAGTTCAT
GGTGTCATGGATAGATGTGTATACTCGC
GGTGTCATGGATAGATGTGTATACTCGC
GGTGTCATGGATAGATGTGTATACTCGC
GGTGTCATGGATAGATGTGTATACTCGC

TTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGT
GCTCATGGGCACCGTGGCCAAAC..AGC
GCTCATGGGCACCGTGGCCAAAC..AGC
GCTCATGGGCACCGTGGCCAAAC..AGC
GCTCATGGGCACCGTGGCCAAAC..AGC

TGACGAGGGCCTGGAGTGTGTGCCCACT
TGACGATGGCCTGGAGTGTGTGCCCACT
TGACGATGGCCTGGAGTGTGTGCCCACT
TGACGATGGCCTGGAGTGTGTGCCCACT
TGACGATGGCCTGGAGTGTGTGCCCACT
```

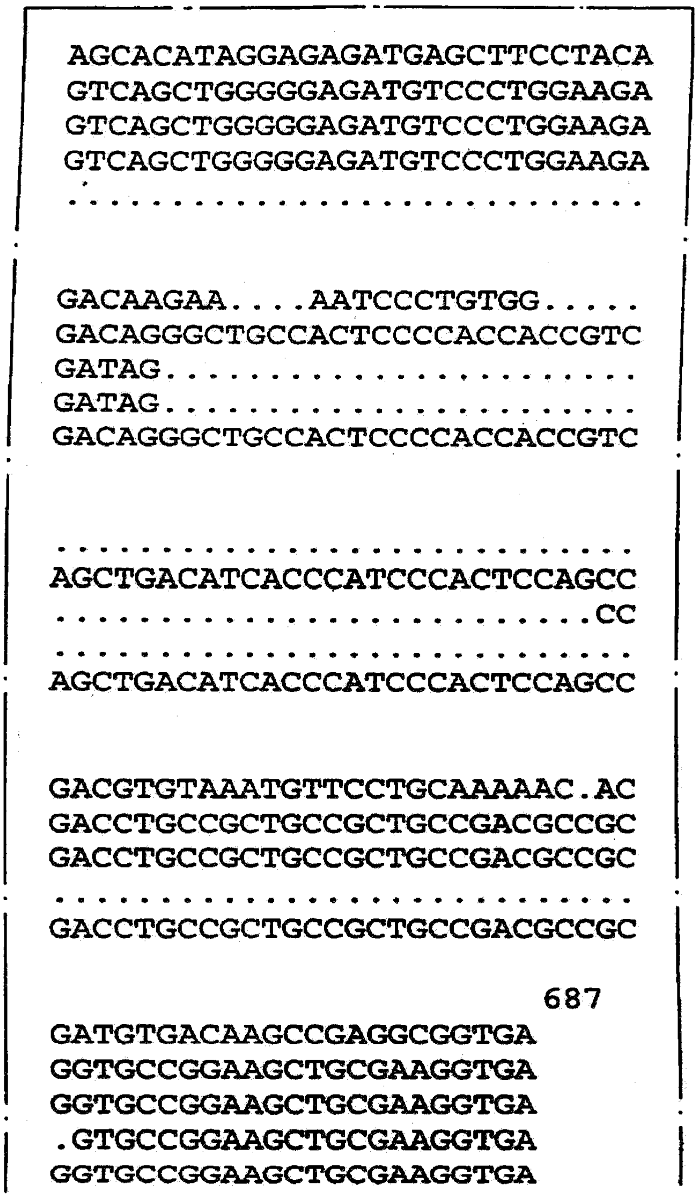
도면5c

```
                            80
TCCACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTG.
CCGCCCAGGCCCCTGTCTCCCAGCCTGA
CCGCCCAGGCCCCTGTCTCCCAGCCTGA
CCGCCCAGGCCCCTGTCTCCCAGCCTGA
CCGCCCAGGCCCCTGTCTCCCAGCCTGA

                           160
GGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCAT
G.....CTACCTGC.CAGCC.CCGGGAG
G.....CTACCTGC.CAGCC.CCGGGAG
G.....CTACCTGC.CAGCC.CCGGGAG
G.....CTACCTGC.CAGCC.CCGGGAG

                           240
ACATCTTCAAGCCATCCTGTGTGCCCCT
TGGTGCCCAG......CTGCGTGACTGT
TGGTGCCCAG......CTGCGTGACTGT
TGGTGCCCAG......CTGCGTGACTGT
TGGTGCCCAG......CTGCGTGACTGT

                           320
GAGGAGTCCAACATCACCATGCAGATTA
GGGCAGCACCAAGTCCGGATGCAGATCC
GGGCAGCACCAAGTCCGGATGCAGATCC
GGGCAGCACCAAGTCCGGATGCAGATCC
GGGCAGCACCAAGTCCGGATGCAGA...
```

도면5d

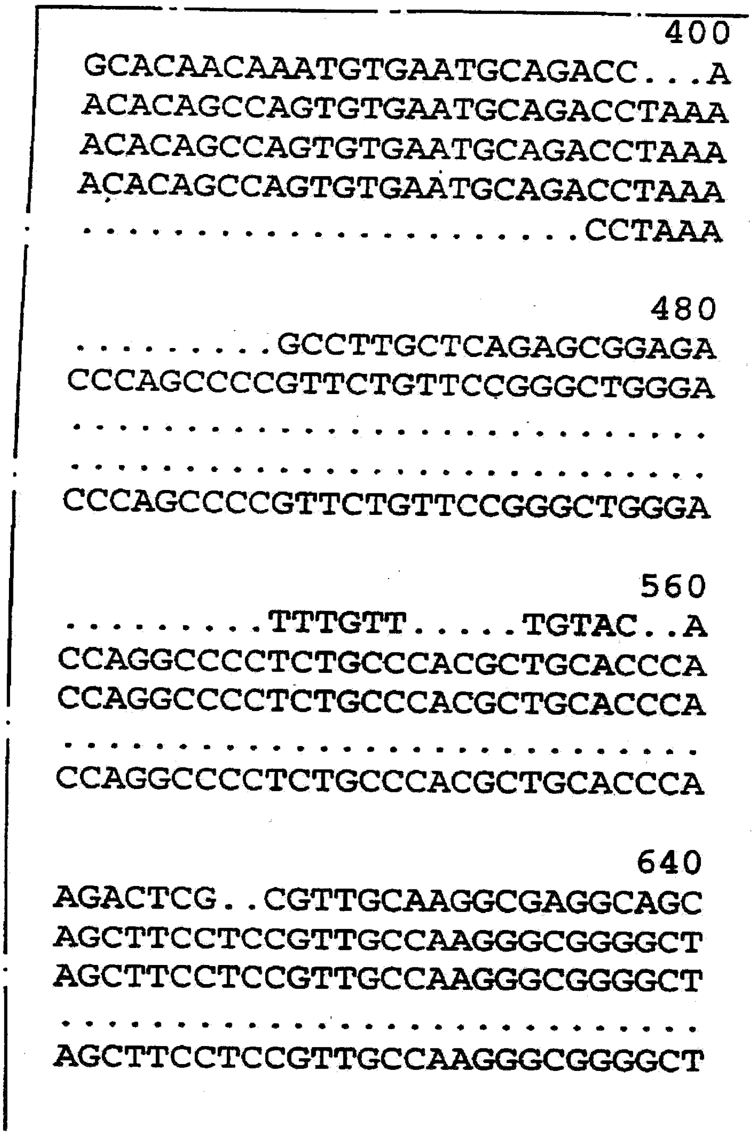
```
                321
    VEGF165     TGCGGATCAAACCTCACCAAGGCC
     SOM175     TCATGATCCGG...TACCCGAGCA
  SOM175-e6     TCATGATCCGG...TACCCGAGCA
SOM175-e6&7     TCATGATCCGG...TACCCGAGCA
  SOM175-e4     ........................

                401
    VEGF165     AAGAAAGATAG........AGCAA
     SOM175     AAAAAGGACAGTGCTGTGAAGCCA
  SOM175-e6     AAAAAGGACAGTGCTGTGAAGCCA
SOM175-e6&7     AAAAAGGACAGTGCTGTGAAGCCA
  SOM175-e4     AAAAAGGACAGTGCTGTGAAGCCA

                481
    VEGF165     ...........AAGCA........
     SOM175     CTCTGCCCCCGGAGCACCCTCCCC
  SOM175-e6     ........................
SOM175-e6&7     ........................
  SOM175-e4     CTCTGCCCCCGGAGCACCCTCCCC

                561
    VEGF165     A...............GATCCGCA
     SOM175     GCACCACCAGCGCCCTGACCCCCG
  SOM175-E6     GCACCACCAGCGCCCTGACCCCCG
SOM175-e6&7     ........................
  SOM175-e4     GCACCACCAGCGCCCTGACCCCCG

                641
    VEGF165     TTGAGTTAAACGAACGTACTTGCA
     SOM175     TAGAGCTCAACCCAGACACCTGCA
  SOM175-e6     TAGAGCTCAACCCAGACACCTGCA
SOM175-e6&7     ........................
  SOM175-e4     TAGAGCTCAACCCAGACACCTGCA
```

도면5e



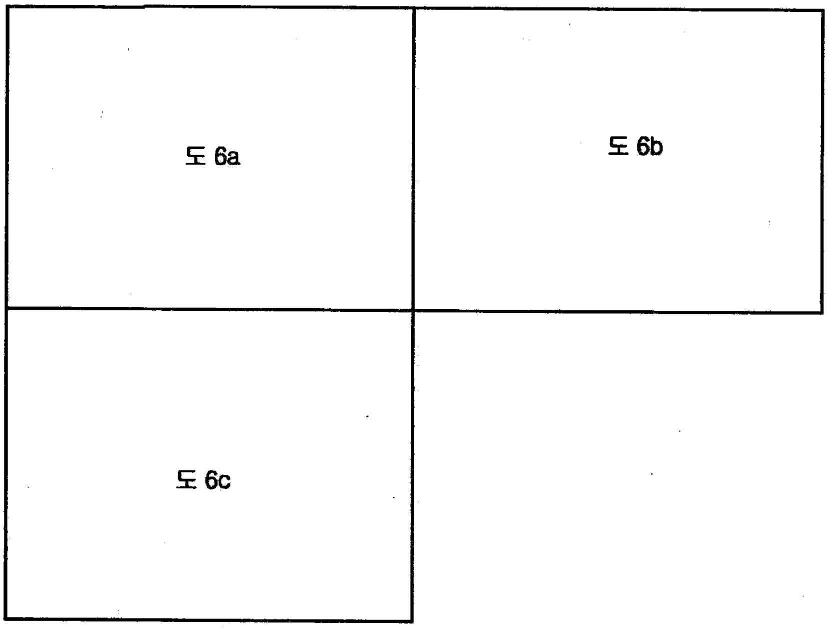
```
AGCACATAGGAGAGATGAGCTTCCTACA
GTCAGCTGGGGGAGATGTCCCTGGAAGA
GTCAGCTGGGGGAGATGTCCCTGGAAGA
GTCAGCTGGGGGAGATGTCCCTGGAAGA
............................

GACAAGAA....AATCCCTGTGG.....
GACAGGGCTGCCACTCCCCACCACCGTC
GATAG.......................
GATAG.......................
GACAGGGCTGCCACTCCCCACCACCGTC

............................
AGCTGACATCACCCATCCCACTCCAGCC
..........................CC
............................
AGCTGACATCACCCATCCCACTCCAGCC

GACGTGTAAATGTTCCTGCAAAAAC.AC
GACCTGCCGCTGCCGCTGCCGACGCCGC
GACCTGCCGCTGCCGCTGCCGACGCCGC
............................
GACCTGCCGCTGCCGCTGCCGACGCCGC

                    687
GATGTGACAAGCCGAGGCGGTGA
GGTGCCGGAAGCTGCGAAGGTGA
GGTGCCGGAAGCTGCGAAGGTGA
.GTGCCGGAAGCTGCGAAGGTGA
GGTGCCGGAAGCTGCGAAGGTGA
```

도면5f

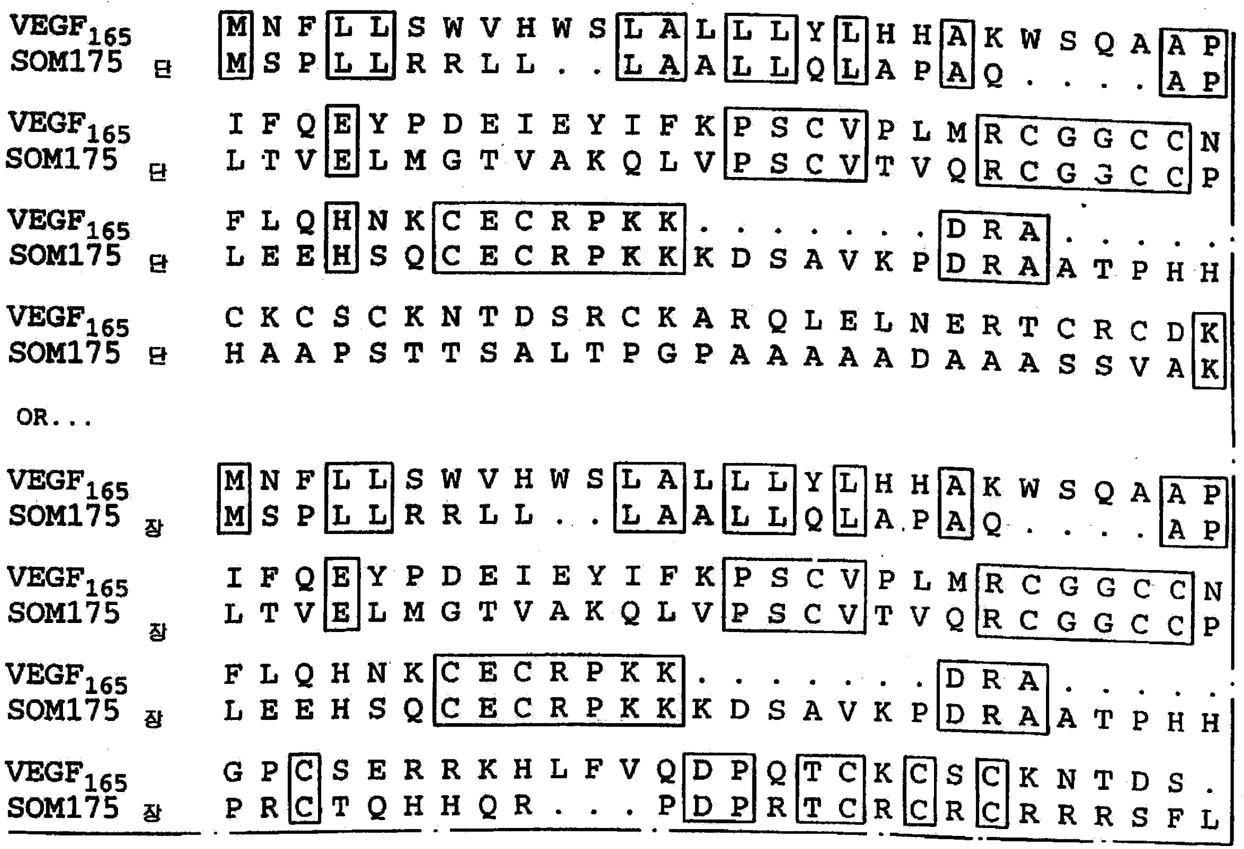


```
                             400
GCACAACAAATGTGAATGCAGACC...A
ACACAGCCAGTGTGAATGCAGACCTAAA
ACACAGCCAGTGTGAATGCAGACCTAAA
ACACAGCCAGTGTGAATGCAGACCTAAA
......................CCTAAA

                             480
.........GCCTTGCTCAGAGCGGAGA
CCCAGCCCCGTTCTGTTCCGGGCTGGGA
............................
............................
CCCAGCCCCGTTCTGTTCCGGGCTGGGA

                             560
.........TTTGTT.....TGTAC..A
CCAGGCCCCTCTGCCCACGCTGCACCCA
CCAGGCCCCTCTGCCCACGCTGCACCCA
............................
CCAGGCCCCTCTGCCCACGCTGCACCCA

                             640
AGACTCG..CGTTGCAAGGCGAGGCAGC
AGCTTCCTCCGTTGCCAAGGGCGGGGCT
AGCTTCCTCCGTTGCCAAGGGCGGGGCT
............................
AGCTTCCTCCGTTGCCAAGGGCGGGGCT
```

도면6



도면6a



VEGF$_{165}$ M N F L L S W V H W S L A L L L Y L H H A K W S Q A A P
SOM175 단 M S P L L R R L L . . L A A L L Q L A P A Q . . . . . A P

VEGF$_{165}$ I F Q E Y P D E I E Y I F K P S C V P L M R C G G C C N
SOM175 단 L T V E L M G T V A K Q L V P S C V T V Q R C G G C C P

VEGF$_{165}$ F L Q H N K C E C R P K K . . . . D R A . . . . .
SOM175 단 L E E H S Q C E C R P K K K D S A V K P D R A A T P H H

VEGF$_{165}$ C K C S C K N T D S R C K A R Q L E L N E R T C R C D K
SOM175 단 H A A P S T T S A L T P G P A A A A A D A A A S S V A K

OR...

VEGF$_{165}$ M N F L L S W V H W S L A L L L Y L H H A K W S Q A A P
SOM175 장 M S P L L R R L L . . L A A L L Q L A P A Q . . . . . A P

VEGF$_{165}$ I F Q E Y P D E I E Y I F K P S C V P L M R C G G C C N
SOM175 장 L T V E L M G T V A K Q L V P S C V T V Q R C G G C C P

VEGF$_{165}$ F L Q H N K C E C R P K K . . . . D R A . . . . .
SOM175 장 L E E H S Q C E C R P K K K D S A V K P D R A A T P H H

VEGF$_{165}$ G P C S E R R K H L F V Q D P Q T C K C S C K N T D S .
SOM175 장 P R C T Q H H Q R . . . P D P R T C R C R C R R R S F L

도면6b

```
MAEGGGQNHHE.VVKFMDVYQRSYCHPIETLVD   60
VSQPDAPGHQRKVVSWIDVYTRATCCPREVVVP   55

DEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMS  121
DDGLECVPTGQHQVRMQILMIR.YPSSQLGEMS  115

..........RQENPCGPCSERRKHLF.VQDPQT  170
RPQPRSVPGWDSAPGAPSPADITHPTPAPGPSA  175

PRR                                191
GGA                                207

MAEGGGQNHHE.VVKFMDVYQRSYCHPIETLVD   60
VSQPDAPGHQRKVVSWIDVYTRATCQPREVVVP   55

DEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMS  121
DDGLECVPTGQHQVRMQILMIR.YPSSQLGEMS  115

RQENP............................C 170
RPQPRSVPGWDSAPGAPSPADITHPTPAPGPLC  177

RCKARQLELNERTCRCDKPRR              191
RCQGRGLELNPDTCRCRKLRR              222
```

도면6c

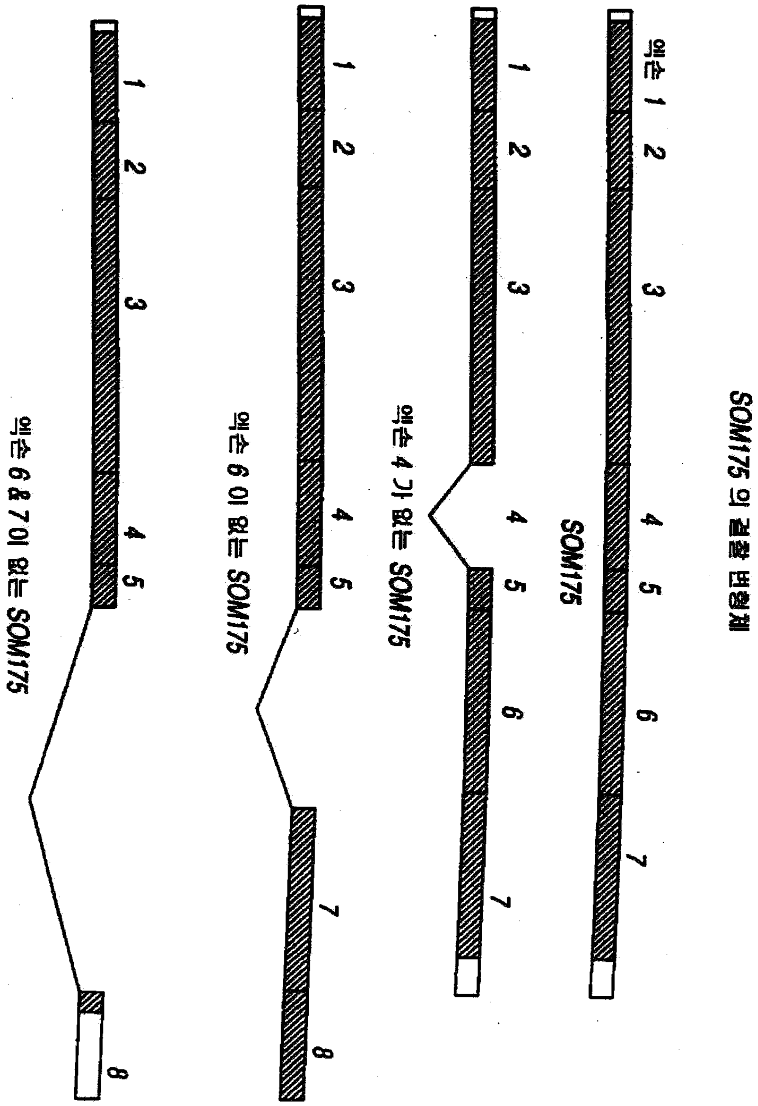
100% 상동 지역은 박스로 나타내었고, 동종이량체화와 관련 있는 것으로 추정되는 보존 잔기는 밑줄로 나타내었다.

도시된 VEGF 서열은 총 길이가 191 아미노산으로서, 26 아미노산 리더 서열 (이 서열의 제거로 성숙 VEGF165 가 발생됨)을 포함한다.

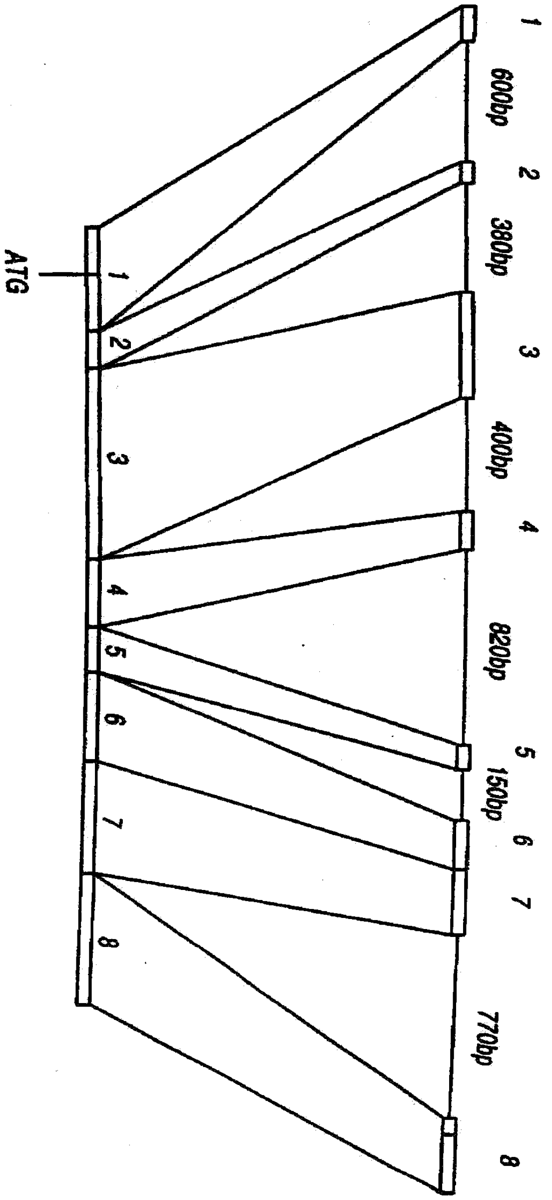
VEGF165 에 대한 SOM175의 상동성은 단백질 수준에서 27%(33%)이나, 이 부위내에서는 100% 상동성 블록이 존재한다. 특히 VEGF의 동종이량체와 관련 있는 것으로 추정되는 잔기들을 비롯하여 많은 구조적 잔기가 보존된다.(PDGF와 비교하여)

즉 시스테인-47
프롤린 -70, 시스테인-72, 발린 -74
아르기닌-77, 시스테인-78, 글리신-80, 시스테인-81 & 82
시스테인-89, 프롤린 -91
시스테인 122 & 124

도면7


SOM175 의 접합 변형체
엑손 1 2 3 4 5 6 7
SOM175
1 2 3 4 5 6 7
엑손 4 가 없는 SOM175
1 2 3 4 5 7 8
엑손 6 이 없는 SOM175
1 2 3 4 5 8
엑손 6 & 7 이 없는 SOM175

도면8a



인체의 SOM175의 게놈 구조

도면8b

5'UTR...	**ATG**AGG	* 엑손 1	(60bp)	GGCCAG	gtacgtgagg
tctcccacag	GCCCCT	엑손 2	(43bp)	GGAAAG	aatacttaca
tctgctccca	TGGTGT	엑손 3	(187bp)	ATGCAG	gtccgagatg
ctgaatacag	ATCCTC	엑손 4	(73bp)	ATGCAG	gtgtcaggca
acttttcaag	ACCTAA	엑손 5	(34bp)	AGACAG	gtgagtcttt
ctcctccgta	GGCTGC	엑손 6	(101bp)	CTCCAG	ccccaggccc
cccactccag	CCCCAG	엑손 7	(109bp)	ACCCAG	acacctgtag
ccctgctcag	GTGCCG	* 엑손 8	(22bp)	AGG**TGA**	...3'UTR

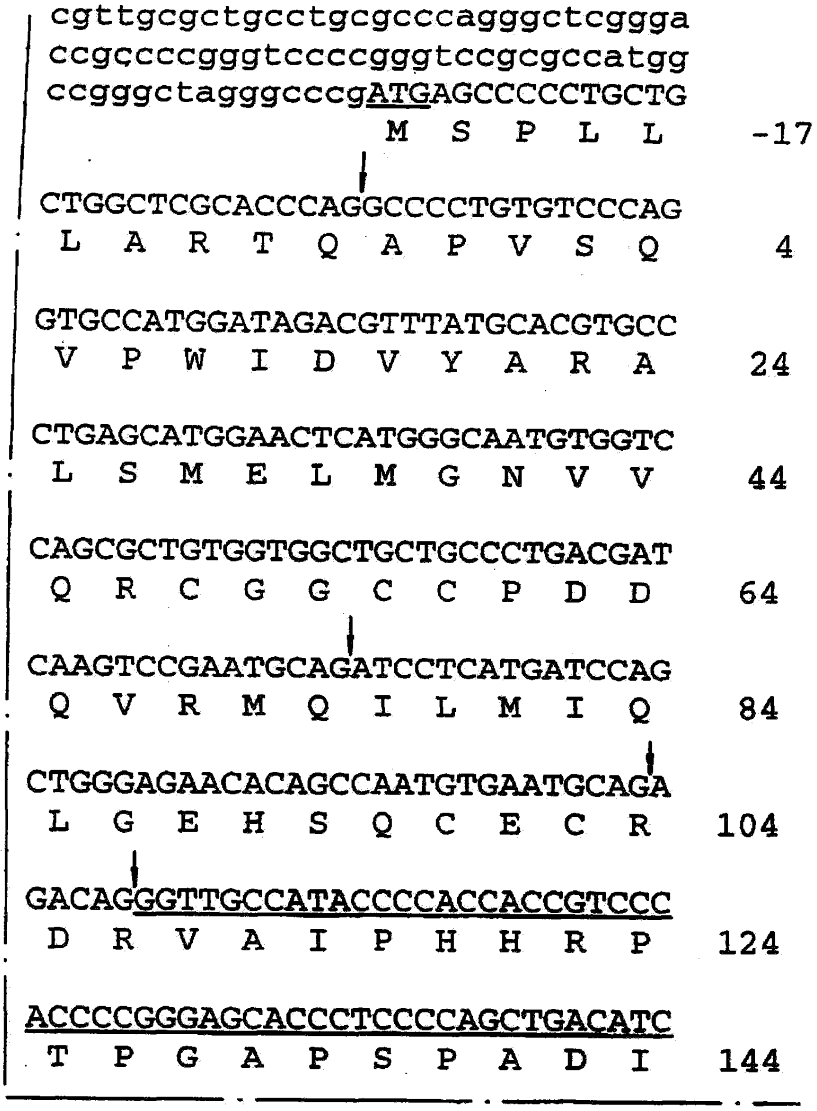
도면9

도 9a	도 9b
도 9c	도 9d

도면9a

```
-163   gcacgagctcaggccgtcgctgcggcgctg
-103   gggggccgcggaggagccgccccctgcgcc
 -43   ggcggctctggctgacccccccccacaccg


  16   CGTCGCCTGCTGCTTGTTGCACTGCTGCAG
        R  R  L  L  L  V  A  L  L  Q

                                  ↓
  76   TTTGATGGCCCCAGTCACCAGAAGAAAGTG
        F  D  G  P  S  H  Q  K  K  V

 136   ACATGCCAGCCCAGGGAGGTGGTGGTGCCT
        T  C  Q  P  R  E  V  V  V  P

 196   AAACAACTAGTGCCCAGCTGTGTGACTGTG
        K  Q  L  V  P  S  C  V  T  V

 256   GGCCTGGAATGTGTGCCCACTGGGCAACAC
        G  L  E  C  V  P  T  G  Q  H

 316   TACCCGAGCAGTCAGCTGGGGGAGATGTCC
        Y  P  S  S  Q  L  G  E  M  S

 376   CCTAAAAAAAAGGAGAGTGCTGTGAGGCCA
        P  K  K  K  E  S  A  V  R  P

 436   CAGCCCCGCTCTGTTCCGGGCTGGGACTCT
        Q  P  R  S  V  P  G  W  D  S
```

도면9b



```
cgttgcgctgcctgcgcccagggctcggga
ccgccccgggtccccgggtccgcgccatgg
ccgggctagggcccgATGAGCCCCCTGCTG
                M  S  P  L  L     -17
               ↓
CTGGCTCGCACCCAGGCCCCTGTGTCCCAG
 L  A  R  T  Q  A  P  V  S  Q        4

GTGCCATGGATAGACGTTTATGCACGTGCC
 V  P  W  I  D  V  Y  A  R  A       24

CTGAGCATGGAACTCATGGGCAATGTGGTC
 L  S  M  E  L  M  G  N  V  V       44

CAGCGCTGTGGTGGCTGCTGCCCTGACGAT
 Q  R  C  G  G  C  C  P  D  D       64
               ↓
CAAGTCCGAATGCAGATCCTCATGATCCAG
 Q  V  R  M  Q  I  L  M  I  Q       84
                             ↓
CTGGGAGAACACAGCCAATGTGAATGCAGA
 L  G  E  H  S  Q  C  E  C  R      104
     ↓
GACAGGGTTGCCATACCCCACCACCGTCCC
 D  R  V  A  I  P  H  H  R  P      124

ACCCCGGGAGCACCCTCCCCAGCTGACATC
 T  P  G  A  P  S  P  A  D  I      144
```

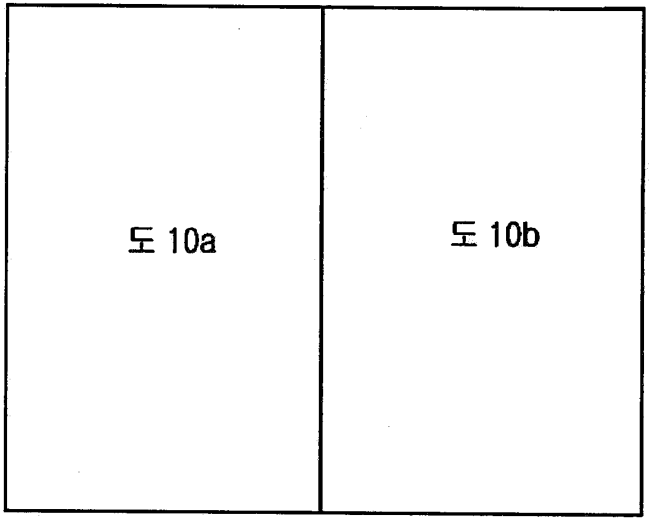
도면9c

```
496   ATCCATCCCACTCCAGCCCCAGGATCCTCT
       I  H  P  T  P  A  P  G  S  S
                      S  P  R  I  L

556   CTGACCCCCGGACCTGCCGTTGCCGCTGTA
       L  T  P  G  P  A  V  A  A  V
      P  D  P  R  T  C  R  C  R  C

616   GGGGCTTAGAGCTCAACCCAGACACCTGTA
       G  A  *
      R  G  L  E  L  N  P  D  T  C

676   ctttccagactccacgggcccggctgcttt
736   agcacaggcgtaacctcctcagtctgggag
796   gagctctctcgccatcttttatctcccaga
856   atgtctcacctcaggggccagggtactctc
916   ttctggctggctgtctcccctcactatgaa
976   gggttctgttatgataactgtgacacacac
1036  gacactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

도면9d

```
GCCCGCCTTGCACCCAGCGCCGCCAACGCC
 A  R  L  A  P  S  A  A  N  A      164
C  P  P  C  T  Q  R  R  Q  R        130

GACGCCGCCGCTTCCTCCATTGCCAAGGGC
 D  A  A  A  S  S  I  A  K  G      184
R  R  R  R  F  L  H  C  Q  G        150

GGTGCCGGAAGCCGCGAAAGTGAcaagctg
                                    186
R  C  R  K  P  R  K *               167

tatggccctgcttcacagggagaagagtgg
gtcactgccccaggacctggacctttaga
gctgccatctaacaattgtcaaggaacctc
tcacttaaccaccctggtcaagtgagcatc
aaccccaaacttctaccaataacgggattt
acacactcacactctgataaaagagatgga
aaaaaaaaaaaa
```

도면10



도면10a

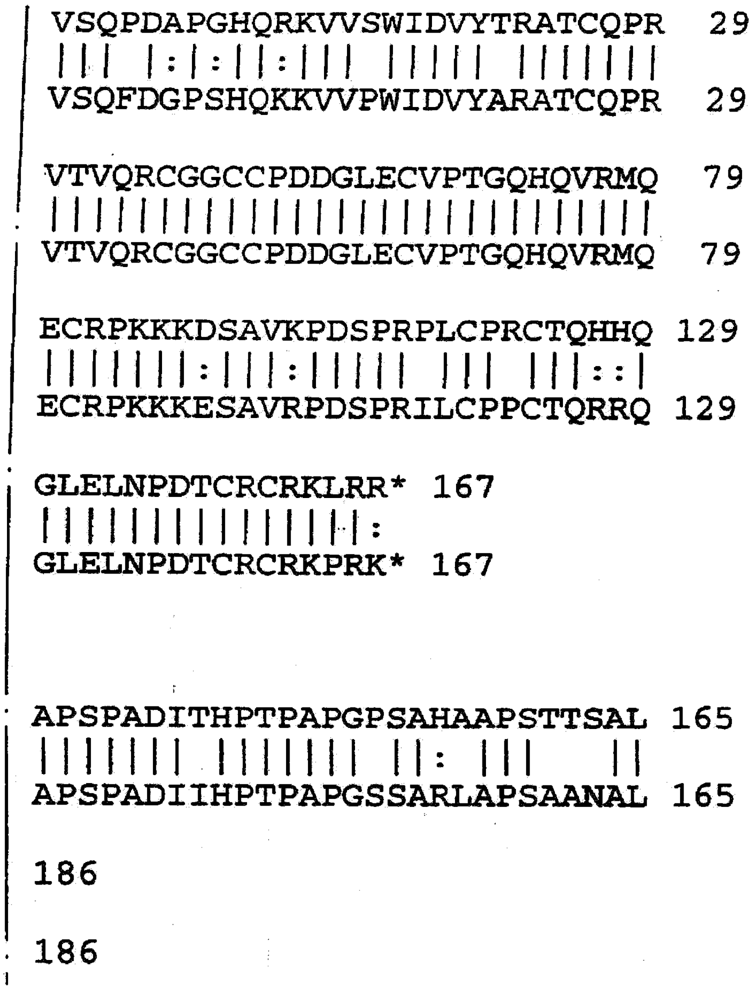
A

```
                                    ↓
hVRF167   -21  MSPLLRRLLLAALLQLAPAQAP
               |||||||||||||||||  |||
mVRF167   -21  MSPLLRRLLLVALLQLARTQAP

hVRF167    30  EVVVPLTVELMGTVAKQLVPSC
               |||||| :|||| | |||||||
mVRF167    30  EVVVPLSMELMGNVVKQLVPSC

hVRF167    80  ILMIRYPSSQLGEMSLEEHSQC
               |||| |||||||||||:|||||
mVRF167    80  ILMIQYPSSQLGEMSLGEHSQC

hVRF167   130  RPDPRTCRCRCRRRSFLRCQGR
               |||||||||||||| ||:||||
mVRF167   130  RPDPRTCRCRCRRRRFLHCQGR
```

B

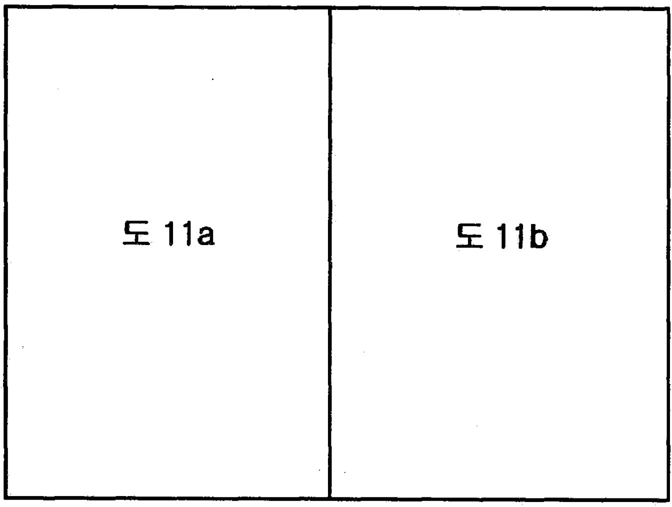
```
hVRF186   116  RAATPHHRPQPRSVPGWDSAPG
               | ||||||||||||||||| ||
mVRF186   116  RVAIPHHRPQPRSVPGWDSTPG

hVRF186   166  TPGPAAAAADAAASSVAKGGA*
               ||||| || ||||||:|||||
mVRF186   166  TPGPAVAAVDAAASSIAKGGA*
```

도면10b



```
VSQPDAPGHQRKVVSWIDVYTRATCQPR   29
||| |:|:||:||| ||||| |||||||
VSQFDGPSHQKKVVPWIDVYARATCQPR   29

VTVQRCGGCCPDDGLECVPTGQHQVRMQ   79
||||||||||||||||||||||||||||
VTVQRCGGCCPDDGLECVPTGQHQVRMQ   79

ECRPKKKDSAVKPDSPRPLCPRCTQHHQ  129
|||||||:|||:||||| ||| |||::|
ECRPKKKESAVRPDSPRILCPPCTQRRQ  129

GLELNPDTCRCRKLRR*  167
||||||||||||||||:
GLELNPDTCRCRKPRK*  167



APSPADITHPTPAPGPSAHAAPSTTSAL  165
||||||| ||||||| ||: |||   ||
APSPADIIHPTPAPGSSARLAPSAANAL  165

186

186
```

도면11



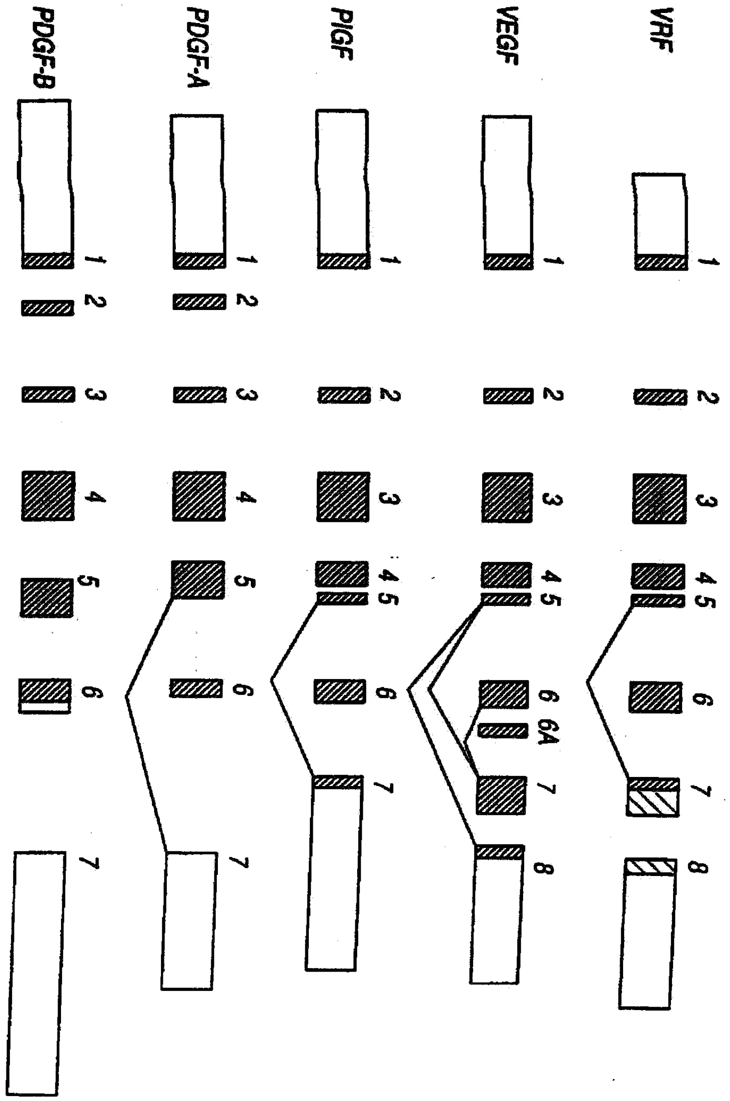
도면11a

```
mVRF167    -21 MSPLLRRL..LLVALLQL..
               |  || ::   |: || |
mVEGF188   -26 MNFLLSWVHWTLALLLYLHH

mVRF167     25 TCQPREVVVPLSMELMGNVV
                | | | :| :  |  :::
mVEGF188    24 YCRPIETLVDIFQEYPDEIE

mVRF167     75 QVRMQILMIQYPSSQ.LGEM
                : |||: |    ||  :|||
mVEGF188    74 NITMQIMRIKPHQSQHIGEM

mVRF167    119 ..............ILCPPC
                             : |  ||
mVEGF188   124 QKRKRKKSRFKSWSVHCEPC

mVRF167    152 GLELNPDTCRCRKPRK
                ||||  ||||  |||:
mVEGF188   173 QLELNERTCRCDKPRR
```

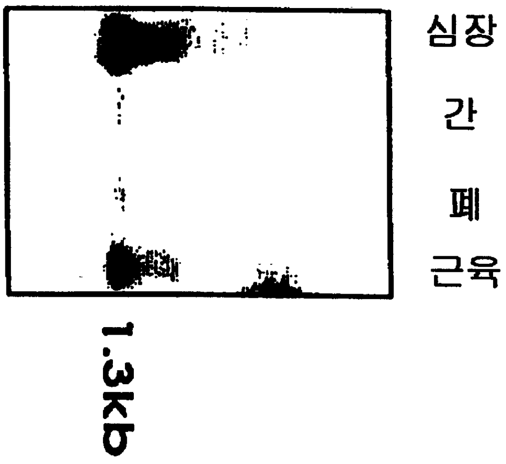
도면11b

```
      ↓
AR.TQAPVSQFDGPSHQKKVVPWIDVYARA      24
|:  ||:    :|  : : |: ::||| |
AKWSQAAPTT.EGEQKSHEVIKFMDVYQRS      23

KQLVPSCVTVQRCGGCCPDDGLECVPTGQH      74
  : |||| : ||:||| |::||||||::
YIFKPSCVPLMRCAGCCNDEALECVPTSES      73

SLGEHSQCECRPKKKESAVRPDSPR.....     118
|: :|| |||||||         |  |
SFLQHSRCECRPKKDRTKPEKKSVRGKGKG     123

TQRRQR...PDPRTCRCRCRRRRFLHCQGR     151
 :|| :    || ||:| |:     :| :|
SERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDS.RCKAR     172

                                   167

                                   188
```

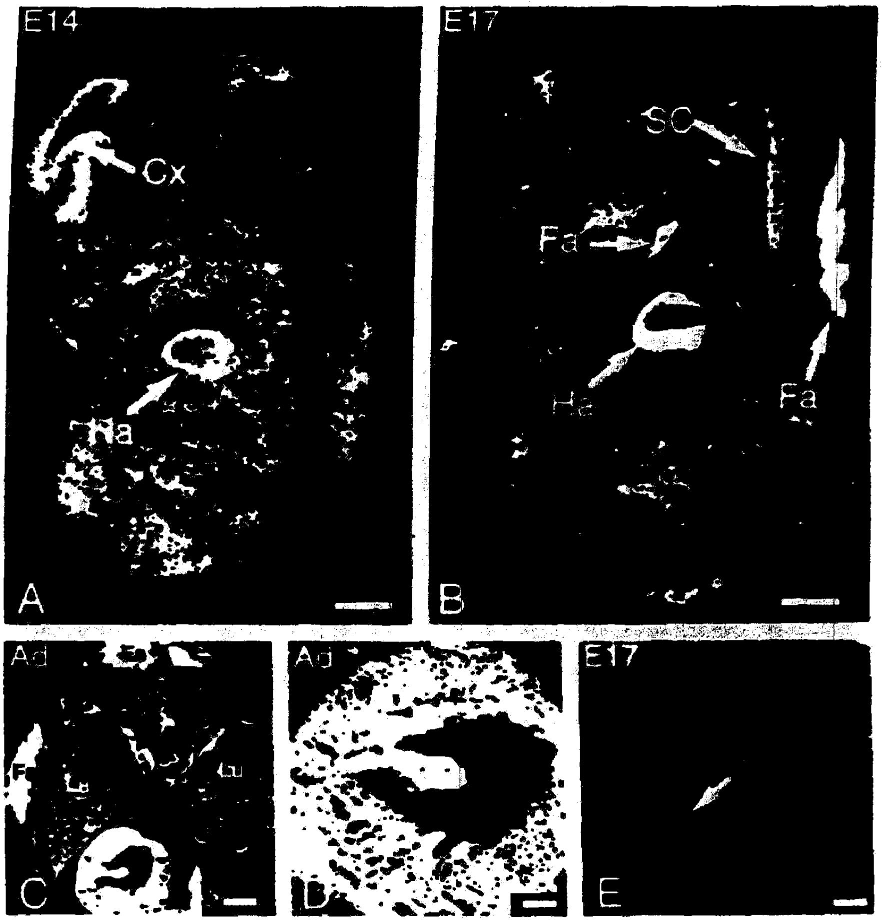
도면12



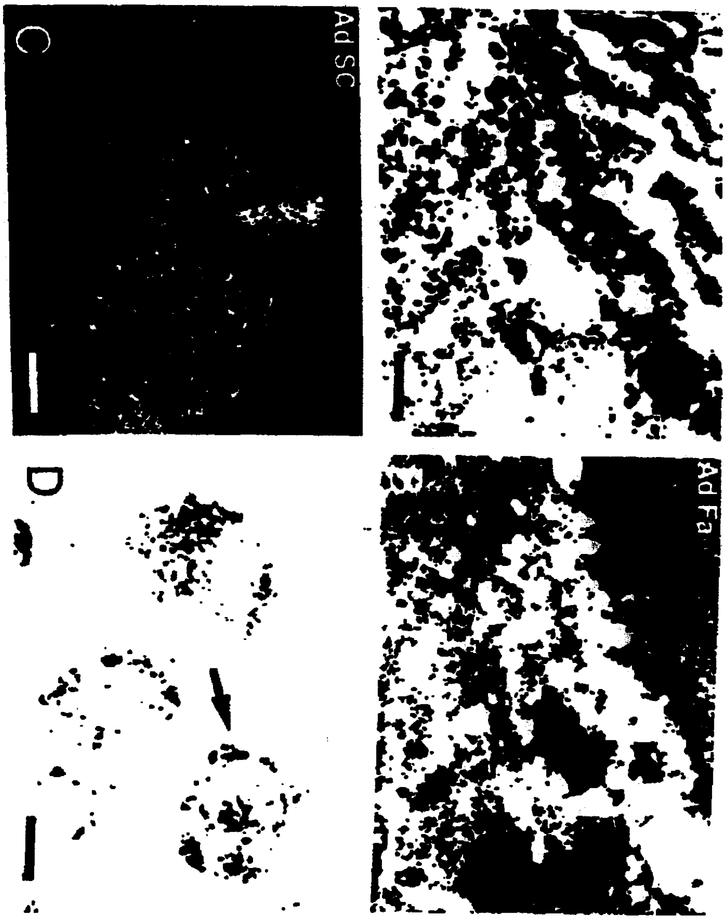
도면13



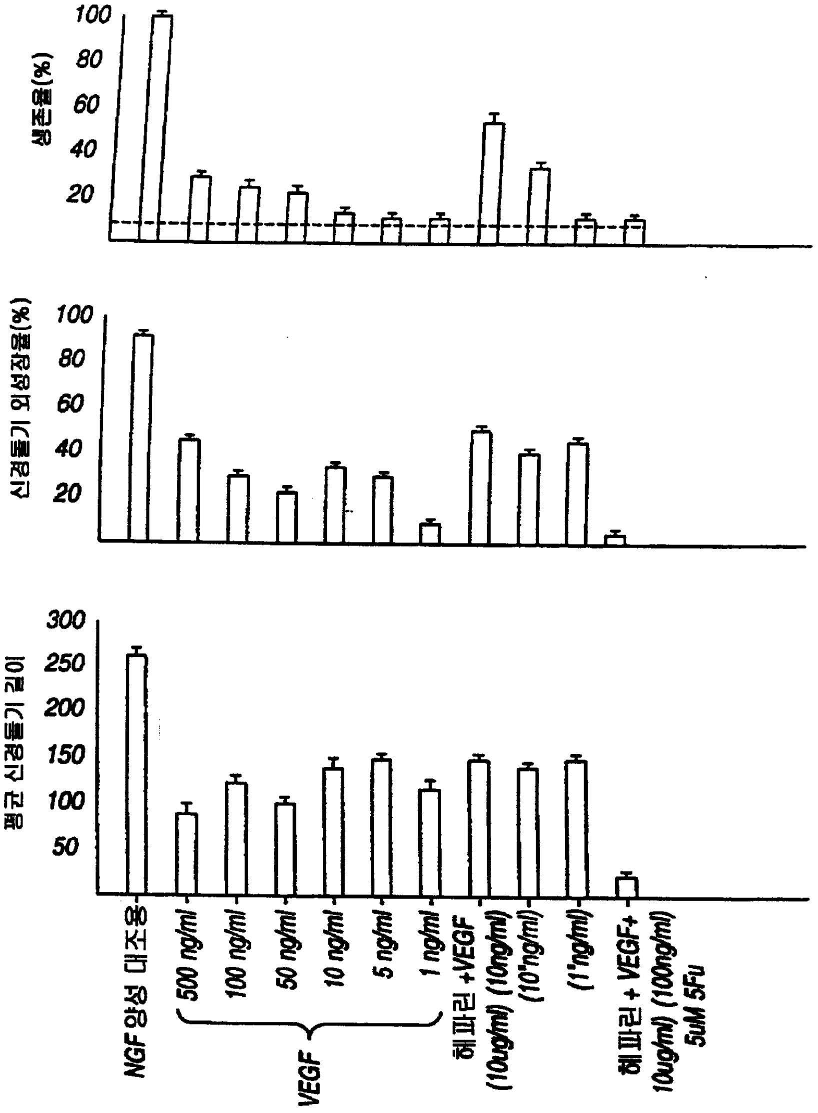
도면14



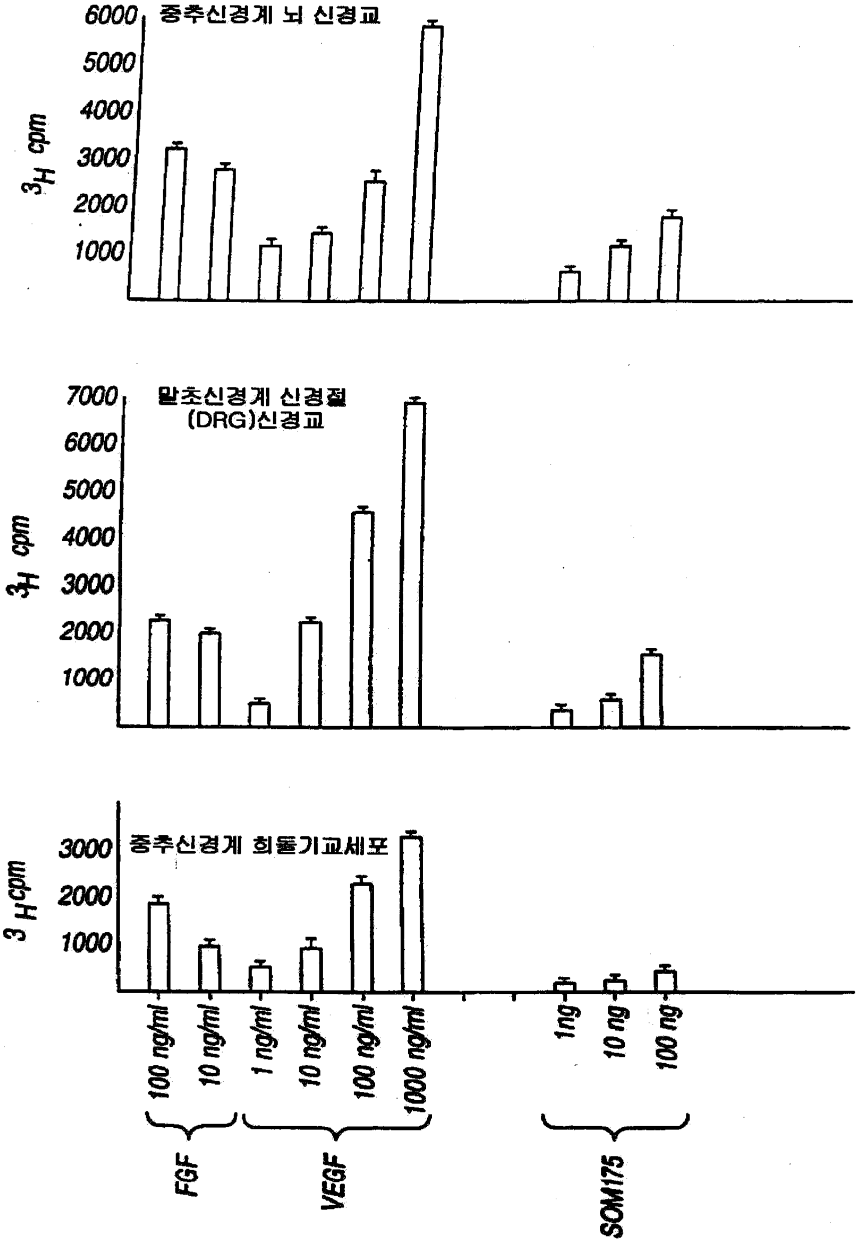
도면15



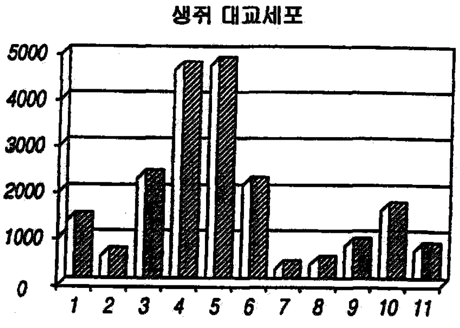
도면16


생존율(%)
100
80
60
40
20
신경돌기 외성장율(%)
100
80
60
40
20
평균 신경돌기 길이
300
250
200
150
100
50
NGF 양성 대조용
500 ng/ml
100 ng/ml
50 ng/ml
10 ng/ml
5 ng/ml
1 ng/ml
VEGF
헤파린 +VEGF
(10ug/ml) (10ng/ml)
(10"ng/ml)
(1"ng/ml)
헤파린 + VEGF+
10ug/ml) (100ng/ml)
5uM 5Fu

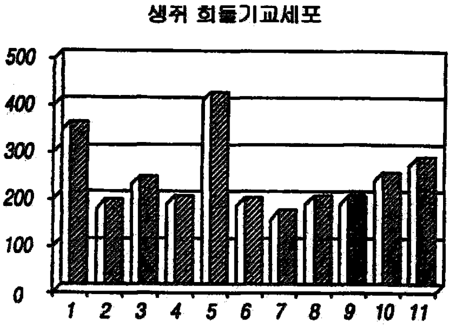
도면17


중추신경계 뇌 신경교
6000
5000
4000
3000
2000
1000
3H cpm
말초신경계 신경절
(DRG)신경교
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
3H cpm
중추신경계 희돌기교세포
3000
2000
1000
3 Hcpm
100 ng/ml
10 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
100 ng/ml
1000 ng/ml
1ng
10 ng
100 ng
FGF
VEGF
SOM175

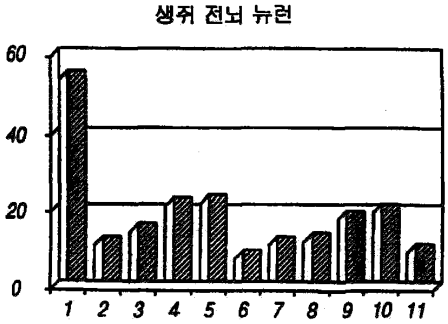
도면18


생쥐 대교세포
5000
4000
3000
2000
1000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

도면19


생쥐 희돌기교세포
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

도면20


생쥐 전뇌 뉴런
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11