(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [6]
A61K 38/00
C12P 21/02

(45) 공고일자 2001년12월01일
(11) 등록번호 10-0307943
(24) 등록일자 2001년08월25일

(21) 출원번호 10-1994-0704870
(22) 출원일자 1994년12월30일
번역문 제출일자 1994년12월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US1993/06228
(86) 국제출원출원일자 1993년06월29일

(65) 공개번호 특1995-0702428
(43) 공개일자 1995년07월29일

(87) 국제공개번호 WO 1994/00140
(87) 국제공개일자 1994년01월06일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 체코, 헝가리, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 마다가스카르, 몽고, 노르웨이, 폴란드, 루마니아, 슬로바키아,
AP ARIPO특허: 말라위, 수단,
EA 유라시아특허: 러시아,
EP 유럽특허: 핀랜드,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장
907138 1992년06월30일 미국(US)
940389 1992년09월03일 미국(US)
965173 1992년10월23일 미국(US)
036555 1993년03월24일 미국(US)

(73) 특허권자
루드빅 인스티튜트 포 캔서 리서치
에드워드 에이. 맥더모 2세, 로이드 제이. 오울드
미국 뉴욕주 10158 뉴욕 서드 애비뉴 605
캠브리지 뉴로사이언스, 인코포레이티드
버틀러 그레고리 비.
미국 매사츄세츠주 02139 캠브리지 원 켄달 스퀘어 빌딩 700

(72) 발명자 앤드류구디얼
영국허트포드셔더블유디35피와이콜리우드블랙케츠우드드라이브45
폴스트루반트
영국런던엔89에이에스크라우치엔드세실파크52에이
루이자밍헤티
이탈리아아이-48012바그나카발로22비아스트라델로
마이클워터필드
영국버크셔알지131알엔스피인뉴베리스피인레이찬테멀크
마크마치오니
미합중국매사추세츠02174알링톤트윈서클드라이브24
마이오수첸
미합중국매사추세츠02174알링톤데카투르스트리트65
이안힐레스
영국런던더블유1피8비티라이딩하우스스트리트91

(74) 대리인 박종혁
이기석
장용식

심사관 : 백경업

(54) 신경교질분열촉진인자및이용

요약

신경교질세포(특히, 시반세포) 분열의 촉진에 유용한 다수의 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 의 특정화 및 정제 그리고 신경교질세포 종양의 치료방법이 개시된다. 또한 신경교질세포 분열의 촉진 및 신경교질세포 종양의 치료에 사용할 수 있는 새로운 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열도 개시된다. 또한 신경교질세포를 포함하는 질환의 치료에서 치료 및 진단 보조제로서 사용하기 위한 공지된 그리고 새로운 폴리펩티드의 합성, 정제 및 시험방법이 제공된다. 또한 신경교질세포를 포함하는 질환에서 진단 및 치료적 사용에 유용한 항체 프로브의 제조에 이 폴리펩티드를 용하는 방법이 제공된다.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

신경교질 분열촉진인자 및 이용

[도면의 간단한 설명]

제1도 내지 제8도는 실시예 1에 관한 것이다.

제1도는 카르복시메틸셀룰로스 크로마토그래피로부터의 생성물의 프로필이다.

제2도는 히드록실아파타이트 HPLC로부터의 생성물의 프로필이다.

제3도는 Mono S FPLC로부터의 생성물의 프로필이다.

제4도는 겔 여과 FPLC로부터의 생성물의 프로필이다.

제5도 및 제6도는 역상 HPLC 로부터의 두가지의 부분정제된 폴리펩티드 생성물의 프로필이다.

제7도 및 제8도는 태아 소 혈청(fetal calf serum) 또는 태아 소 혈장(fetal calf plasma) 백그라운드를 사용한 역상 HPLC의 GGF-Ⅰ 및 GGF-Ⅱ 분획의 투여량-반응 곡선을 나타낸다.

제9도 내지 제12도는 GGF-Ⅰ 및 GGF-Ⅱ에서 유도된 펩티드서열, SEQ ID NO. 1-20, 22-29, 32-53 및 169를 나타낸다(하기의 실시예 2 참조). 제10도 및 제12도는 새로운 서열을 구체적으로 묘사한다.

제10도의 패널 A에는 축퇴(degenerate) 올리고뉴클레오티드 프로브 및 축퇴 PCR 프라이머를 고안하는데 사용된 GGF-Ⅰ 펩티드의 서열이 나열되어 있다(SEQ ID NO. 20, 1, 22-29, 및 17). 패널 A의 서열일부는 또한 합성 펩티드를 고안하는데 사용되었다. 패널 B는 축퇴프로브 또는 축퇴 PCR 프라이머의 고안에는 너무 짧은(6이하의 아미노산) 신규 펩티드의 서열의 리스트이다(SEQ ID NO. 17 및 52).

제12도의 패널 A는 축퇴 올리고뉴클레오티드 프로브 및 축퇴 PCR 프라이머를 고안하는데 사용된 GGF-Ⅱ펩티드의 서열의 리스트이다(SEQ ID NO. 45-52). 패널 A의 서열 일부는 합성 펩티드를 고안하는데 사용되었다. 패널 B는 축퇴프로브 또는 축퇴 PCR프라이머의 고안에는 너무 짧은(6 이하의 아미노산) 신규펩티드의 리스트이다(SEQ ID NO. 53).

제13도 내지 제20도는 실시예 3에 관한 것이고, 본 발명의 인자의 분열촉진 활성을 묘사한다.

제21도 내지 제28a도, (a, b 및 c)는 실시예 4에 관한 것이다.

제21도는 제10도 패널 A 및 제12도 패널 A의 신규펩티드 서열로부터 고안된 축퇴 올리고 뉴클레오티드 프로브의 리스트이다(SEQ ID NO. 54-88).

제22도(SEQ ID NO. 89)는 축퇴 올리고뉴클레오티드 프로브 609 및 650(각각 제21도 SEQ ID NO. 69 및 72 참조)의 결합부위를 포함하는, 재조합체 소 게놈 파지 GGF2BG1로부터의 일련의 추정 소 GGF-Ⅱ유전자 서열을 묘사한다.

이 도면은 DNA 서열의 코딩가닥 및 세번째 리딩프레임의 추론 아미노산 서열을 나타낸다. 인자 2의 펩티드 12의 서열(굵은 활자체)은 66 아미노산 오픈 리딩프레임의 일부이다(뉴클레오티드 75272).

제23도는 뇌하수체 후엽의 RNA에 존재하는 소 GGF-Ⅱ코딩서열의 절편을 분리하는 실험에서 사용된 축퇴 PCR프라이머(패널 A, SEQ ID NO. 90-108)및 단일 PCR프라이머(패널 B, SEQ ID NO. 109-119)이다.

제24도는 뇌하수체 후엽의 RNA와 제7도 패널 A 및 B의 프라이머의 리스트를 이용한 PCR 증폭 실험에서 얻어진 9개의 별개의 근접한 소 GGF-Ⅱ cDNA 구조 및 서열을 묘사한다. 이 도면의 맨윗줄은 특정화되는 cDNA 구조에 이바지하는 코딩서열의 도해이다.

제25도는 소 재조합체 파지 GGF2BG1의 물리적인 지도이다. 소의 단편은 길이가 대략 20Kb이고 소 GGF-Ⅱ유전자의 두 엑손(굵은 활자체)을 포함한다. 효소 XbaI, SpeI, NdeI, EcoRI, KpnI, 및 SstI의 제한부위가 이 물리적인 지도위에 위치되어 있다. 짙은색 부분은 서열결정을 위해 서브클로닝한 단편에 해당한다.

제26도는 추정 소 GGF-Ⅱ 유전자의 3가지 다른 유전자 산물의 구조를 나타내는 도해이다. 엑손은 그것의 발견순서대로 A에서 E까지 나열되어 있다. 선택적 스플라이싱(Splicing) 패턴 1,2 및 3은 3가지 중복되는 추론 단백질구조(GGF2BPP1, 2 및 3)를 생성하는데, 이것들은 각종 도면 제28a도, b, c도(하기에서 기술됨)에 표시되어 있다.

제27도(SEQ ID NO. 120-132)는 제10도 및 제12도에 나열된 신규펩티드서열과 제28a도, 제28b도 및 제28c도(하기에서 기술됨)에서 보여지는 추론 단백질 서열에서 확인된 GGF-Ⅰ 및 GGF-Ⅱ서열의 비교를 나타낸다. 이 도면은 9가지의 신규 GGF-Ⅱ 펩티드 서열중 6가지가 이러한 추론 단백질 서열로 설명되는 것을 보여준다. 또한 GGF-Ⅰ 서열과 유사한 두 펩티드 서열도 발견된다.

제28a도(SEQ ID NO. 133)는 제26도에서 스플라이싱 패턴번호 1로부터 얻어지는 cDNA의 추론 아미노산 서열 및 코딩가닥 DNA서열의 리스트이다. 추정되는 소 GGF-Ⅱ 유전자의 부분 cDNA는 길이가 206 아미노산인 단백질을 암호화한다. 굵은 활자체의 펩티드는 제10도 및 제12도에서 주어진 리스트로부터 확인된 것들이다. 가능한 글리코실화 부위는 밑줄로 표시한다(폴리아데닐화 시그날 AATAAA와 함께).

제28b도(SEQ ID NO. 134)는 제26도에서 스플라이싱 패턴 번호 2로부터 얻어지는 cDNA의 추론 아미노산 서열 및 코딩가닥 DNA 서열의 리스트이다.

추정되는 소 GGF-Ⅱ유전자의 부분 cDNA는 길이가 281 아미노산인 단백질을 암호화한다. 굵은 활자체의 펩티드는 제10도 및 제12도에서 주어진 리스트로부터 확인된 것들이다. 가능한 글리코실화 부위는 밑줄로 표시한다(폴리아데닐화 시그날 AATAAA와 함께).

제28c도(SEQ ID NO. 135)는 제26도에서 스플라이싱 패턴 번호 3으로부터 얻어지는 cDNA의 추론 아미노산 서열 및 코딩가닥 DNA 서열의 리스트이다. 추정되는 소 GGF-Ⅱ 유전자의 부분 cDNA는 길이가 257 아미노산인 단백질을 암호화한다. 굵은 활자체의 펩티드는 제10도 및 제12도의 리스트로부터 확인된 것들이다. 가능한 글리코실화 부위는 밑줄로 표시한다(폴리아데닐화 시그날 AATAAA와 함께).

제29도는 하기의 실시예 6에 관한 것으로서, 서던블롯(Southern blot)상의 각종 포유동물 DNA와 추정되는 소 GGF-Ⅱ유전자 서열의 교차혼성화 분석의 방사선 사진이다. 필터는 도면에 나열된 종의 EcoRI-분해 DNA(레인당 5㎍)의 레인을 포함한다. 프로브는 각 DNA샘플에서 단일의 강한 밴드를 검출하는데, 제25도의 물리적 지도에서 기대되는 것처럼 소 DNA의 4킬로 염기 단편을 포함한다. 비교적 낮은 강도의 밴드들이 마찬가지로 관찰되는데, 이것은 연관된 DNA서열을 나타낼 수 있다. 다른 포유동물의 DNA샘플 각각으로부터 강한 혼성화 밴드는 아마도 그종의 GGF-Ⅱ상동체를 나타낸다.

제30도는 대표적인 스플라이싱 변이체의 도해이다. 코딩절편은 F, E, B, A, G, C, C/D, C/D', D, D', H, K 및 L로서 표시된다. 정제단백질에서 유도된 펩티드 서열의 위치는 " 0" 로서 표시된다.

제31도(SEQ ID NO. 136-147, 160, 161)은 GGF의 코딩절편의 예상되는 펩티드 서열 및 DNA서열의 리스트이다. 라인 1은 소 GGF의 예상되는 아미노산서열의 리스트이고, 라인 2는 소 GGF의 뉴클레오티드서열의 리스트이고, 라인 3은 인간 GGF(헤레굴린, heregulin)의 뉴클레오티드서열의 리스트이고(뉴클레오티드 염기 매치는 수직선으로 표시된다), 라인 4는 인간 GGF/ 헤레굴린의 예상되는 아미노산서열의 리스트인데 이것은 예상되는 소의 서열과 다르다. 코딩절편 E, A'및 K는 단지 소의 서열만을 나타낸다. 코딩절편 D'은 단지 인간(헤레굴린) 서열만을 나타낸다.

제32도(SEQ ID NO. 148)는 BPP5의 예상되는 GGF2 아미노산서열 및 뉴클레오티드 서열이다. 상부라인은 뉴클레오티드 서열이고 하부라인은 예상되는 아미노산 서열이다.

제33도(SEQ ID NO. 149)는 GGF2BPP2 의 예상되는 아미노산서열 및 뉴클레오티드 서열이다. 상부라인은 뉴클레오티드 서열이고 하부라인은 예상되는 아미노산 서열이다.

제34도(SEQ ID NO. 150)는 GGF2BPP4 의 예상되는 아미노산서열 및 뉴클레오티드 서열이다. 상부라인은 뉴클레오티드 서열이고 하부라인은 예상되는 아미노산 서열이다.

제35도(SEQ ID NO. 151-152)는 두 GGF펩티드 서열(GGF2bpp4 및 GGF2bpp5) 과 인간 EGF(hEGF)의 정렬을 묘사한다. 별표는 보존되는 시스테인의 위치를 나타낸다.

제36도는 증가하는 양의 GGF에 대한 반응으로 계산치 200kD 단백질(안티포스 포티로신 폴리클로날 항체로 현상된 웨스턴 블롯(Western blot)의 방사선 사진에서 200kD 밴드의 강도)의 티로신 인산화 및 GGF 활성(시반세포 분열촉진검사)의 수준을 묘사한다.

제37도는 제31도에서 보여진 서열로부터 유도된 스플라이싱 변이체의 리스트이다.

제38도는 EGFL1(SEQ ID NO. 154)의 예상되는 아미노산서열(아래), 및 핵산서열(위) 이다.

제39도는 EGFL2(SEQ ID NO. 155)의 예상되는 아미노산서열(아래), 및 핵산서열(위) 이다.

제40도는 EGFL3(SEQ ID NO. 156)의 예상되는 아미노산서열(아래), 및 핵산서열(위) 이다.

제41도는 EGFL4(SEQ ID NO. 157)의 예상되는 아미노산서열(아래), 및 핵산서열(위) 이다.

제42도는 EGFL5(SEQ ID NO. 158)의 예상되는 아미노산서열(아래), 및 핵산서열(위) 이다.

제43도는 EGFL6(SEQ ID NO. 159)의 예상되는 아미노산서열(아래), 및 핵산서열(위) 이다.

제44도는 클론의 축소 코딩절편 지도이다. T3은 클론으로부터 mRNA 를 생성하는데 사용되는 박테리오파지 프로모터를 나타낸다. R=EcoRI 제한효소 위치의 측면부. 5' UT 는 5' 비번역 부위를 나타낸다. E, B, A, C, C/D', 및 D는 코딩절편을 나타낸다. 0=번역개시위치, ∧ = 소의 E 절편과 상동인 부위의 5' 한계(실시예 6 참조). 3'UT는 3' 비번역 부위를 나타낸다.

제45도는 GGF2HBS5(SEQ ID NO. 167)의 예상되는 아미노산서열(중간), 및 핵산서열(위)이다. 아래(단속적인) 서열은 GGF-Ⅱ제제로부터 유도된 펩티드서열을 나타낸다(제11도, 제12도 참조).

제46도는 재조합 인간 및 소 신경교질 성장인자의 시반세포 분열촉진활성을 묘사하는 그래프이다.

제47도는 CHO세포 조건배지(conditioned medium)의 다른 크기 분액들을 투여하여 얻은 시반세포 증식활성 데이타를 묘사하는 투여량-반응 곡선이다.

제48도는 GGF2HBS5 cDNA클론을 포함하는 바쿨로바이러스(baculovirus) 로 감염된 SF9 곤충세포에 의하여 세포외 배지로 분비되는 시반세포 분열촉진활성을 묘사하는 투여량-반응곡선이다.

제49도는 GGF 펩티드 항체를 사용한 재조합 CHO세포 조건배지의 웨스턴 블롯이다.

제50a도는 양이온 교환컬럼에서 용출된 재조합(COS세포생성) 인간 GGF-Ⅱ(rhGGF-Ⅱ) 피크의 시반세포 증식활성의 그래프이다. 제50b도는 rhGGFⅡ의 특이적인 펩티드에 대해서 만들어진 다클론성 항체를 사용한 재조합 GGFⅡ 피크에 대한 면역 블롯이다.

제51a도는 양이온 교환컬럼상의 rhGGF-Ⅱ(CHO세포생성) 을 분획으로 정제하는 것을 보여주는 그래프이다. 제51b도 및 제51c도는 제51a도에서 묘사된 분획 및 rhGGF-Ⅱ 특이적인 항체를 이용한 웨스턴 블롯의 사진이다.

제52도는 재조합 신경교질 성장인자로 처리한 시반세포에서 티로신 인산화를 나타내는 겔의 사진이다.

제53도는 GGFHBS5, GGFHFB1 및 GGFBPP5폴리펩티드의 서열(SEQ ID NO. 170, 171, 및 172) 이다.

제54도는 CHO 세포-발현벡터 pcDHFRpolyA의 지도이다.

[관련출원정보]

본 출원은 1992년 10월 23일 출원된 미국특허출원 출원번호 07/965,173 ; 1992년 9월 3일 출원된 출원번호 07/940,389, 1992년 6월 30일 출원된 출원번호 07/907,138, 1992년 4월 3일 출원된 출원번호 07/863,703 일부 계속 출원이다.

[발명의 배경]

본 발명은 시반세포(Schwann cell)를 포함하는 신경교질세포(glial cell)의 분열촉진(mitogenic) 성장인자인 척추동물 종에서 발견되는 폴리펩티드에 관한 것이다.

본 발명은 또한 그러한 인자를 제조할 수 있는 방법, 및 그러한 인자의 치료적 이용에 대한 것이다.

척추동물의 신경교질세포는 중추신경계 및 말초신경계의 분화된 결합조직을 구성한다. 중요한 신경교질세포는 시반세포를 포함하는데, 이것은 뉴론의 대사지지체를 제공하고 일부 말초뉴론의 축색돌기 주위를 둘러싸는 수초를 제공함으로써 개별적인 신경섬유를 형성한다. 시반세포는 뉴론을 지지하고, 그것이 축색돌기 주위로 발달할때 꼬여서, 인접한 신경축색돌기 주위에 막의 동심적 층을 형성함으로써 덮개 효과를 제공한다. 이 수초는 많은 신경섬유의 민감한 요소이며, 시반세포의 손상 또는 성장과 발생의 정지는 많은 말초신경계 질환과 장애의 특징인 상당한 수초탈락 또는 신경퇴화와 연관될 수 있다. 신경계의 발생에서는, 세포들이 그것의 분열과 성장을 조절하는 각종 인자들을 요구하는 것이 명백해졌고, 최근에는 다양한 그러한 인자들이 동정되었는데 일부는 시반세포분열 또는 발생에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다. 그중에서도 Brockes등은 J. Neuroscience, 4(1984) 75-83 에서 소의 뇌 및 뇌하수체 조직의 추출물에 존재하는 단백질 성장인자로서 신경교질 성장인자(GGF) 로 명명된 것을 기술한다. 이 인자는 배양 래트 시반세포를 10% 태아소혈청을 함유하는 백그라운드 배지에 대해서 분열하도록 촉진시켰다. 이 인자는 또한 31,000 달톤의 분자량을 갖고 쉽게 이합체화하는 것으로 기술되었다. Meth. Enz., 147(1987), 217-225 에서 Brockes 는 GGF에 대한 시반세포-기초 분석을 기술한다.

상기의 Brockes등은 또한 GGF를 외관상 균질상태로 정제하는 방법을 기술한다.

요약하면 기술된 하나의 대규모 정제방법은 동결건조된 소의 전엽을 추출하고 거기서 얻어진 물질을 CM 셀룰로스로부터의 NaCl 구배용출을 이용한 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함한다. 그 다음 Ultrogel 컬럼으로 겔여과를 수행한 후, 포스포셀룰로스 칼럼에서 용출하고, 최종적으로 소규모 SDS 겔 전기영동을 수행한다. 다른 방법으로는 CM-셀룰로스 물질을 직접 포스포셀룰로스 컬럼에 적용하고, 컬럼으로부터 분획을 모아서 조제 천연 겔 전기영동에 의해 정제한 후 최종적으로 SDS 겔 전기 영동을 행한다.

Brockes등은 종전에 보고된 겔여과 실험에서는(Brockes et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 8374-8377)성장인자 활성의 주요 피크가 56,000 달톤의 분자량과 함께 이동하는 것으로 관찰되었지만, 상술한 방법의 처음에서는 활성이 분자량 31,000 에서 우세하게 관찰되는 것을 발견하였다. GGF 이합체는 이 방법에서 CM-셀룰로스로부터 구배용출의 결과로서 주로 제거되는 것으로 보고되었다.

Benveniste 등(PNAS, 82 (1985), 3930-3934) 은 T 림프구-유래 신경교질 성장촉진인자를 기술한다. 이 인자는 환원조건하의 SDS겔상에서 겉보기 분자량의 변화를 나타낸다.

Kimura 등(Nature, 348 (1990), 257-260)은 좌골신경초 종양에서 얻어지는 신경 초종(Schwannoma)-유래 성장 인자(SDGF)로 명명된 인자를 기술한다. SDGF는 삼중수소-표지된 TdR의 배양 시반세포속으로의 투입을 촉진하지 않고, 대조적으로 이 조건하에서 부분적으로 정제된 GGF를 함유하는 뇌하수체 분획은 활성이 있다고 그들은 기술하고 있다. SDGF는 31,000 과 35,000 사이의 겉보기 분자량을 가진다.

Davis 및 Stroobant(J. Cell Biol., 110 (1990), 1353-1360)은 많은 후보 분열촉진인자의 스크리닝을 기술한다. 래트 시반세포를 사용하였고, 선택된 후보 물질을 포스콜린(forskolin) 있거나 없이 10% FCS(태아소혈청) 의 존재하에 시반세포에서 DNA합성을 촉진할 수 있는 능력에 대해 조사하였다. 시험한 인자들중 하나는 GGF-카르복시메틸셀룰로스분획(GGF-CM)이었고, 이것은 포스콜린 있거나 없이 FCS의 존재하에서 유사분열을 촉진하였다. 이 연구는 포스콜린존재하에 혈소판 유도 성장인자(PDGF)는 시반세포에 대한 강력한 분열촉진 인자라는 것을 나타내는 것을 밝혀냈는데 PDGF는 종전에 시반 세포에 어떤 영향도 갖지 않는다고 생각되었다.

Holmes et al. Science(1992) 256 : 1205 및 Wen et al. Cell(1992) 69: 559는 리셉터($p185^{erbB2}$) 에 결합하는 단백질을 암호화하는 DNA서열이 여러 가지 인간종양과 연관된다는 것을 증명한다.

$p185^{erbB2}$ 단백질은 티로신 키나제 활성을 갖는 185킬로달톤 막통과 단백질이다. 이 단백질은 erbB2 프로토-종양유전자에 의해 암호화된다(Yarden and Ullrich Ann. Rev. Biochem. 57 : 443(1988)). 또한 HER-2(인간세포에서) 및 neu(래트세포에서)로 칭해지는 erbB2 유전자는 표피성장인자(EGF) 의 리셉터와 밀접하게 관련된다. 최근의 증거는 $p185^{erbB2}$ 와 상호작용하는(그리고 그것은 키나제를 활성화하는) 단백질이 $p185^{erbB2}$ 함유 세포에서 증식을 유도하는 것을 가리킨다(Holmes et al. Science 256: 1205 (1992); Dobashi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 8582 (1991); Lupu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 2287(1992)). 더욱이, $p185^{erbB2}$ 결합 단백질을 암호화하는 유전자는 크기가 다양하고 차별적으로 스플라이싱(Splicing)되는 많은 RNA전사체를 생성하고, 이것은 길이가 다르고 약간의 공통 펩티드 서열 및 약간의 특유한 펩티드서열을 포함하는 일련의 단백질들로 되는 것이 명백하다. 이 사실은 인간 유방암(MDA-MB-231)에서 회수할 수 있는 차별적으로 스플라이싱되는 RNA전사체에 의해 지지되었다(Holmes et al. Science 256: 1205(1992)). 또다른 증거는 $p185^{erbB2}$ 리셉터의 리간드로서 작용하는(여기서 개시되는 것처럼) 넓은 범위의 크기의 단백질로부터 유도된다(하기참조).

[발명의 개요]

일반적으로 본 발명은 신경교질세포(특히 중추신경계의 시반세포와 신경교질)의 유사분열을 촉진하는 방법, 뿐만아니라 그러한 신경교질세포 분열촉진활성을 나타내는 신규단백질을 제공한다. 게다가 이 단백질을 암호화하는 DNA 와 이 단백질 및 관련된 단백질에 결합하는 항체가 제공된다.

본 발명의 신규단백질은 공지된 폴리펩티드를 암호화하는 서열의 선택적 스플라이싱 산물을 포함한다. 일반적으로 이 공지된 단백질은 $GGF/p185^{erbB2}$ 단백질족의 일원들이다.

구체적으로 본 발명은 특정 식을 갖는 폴리펩티드, 및 그러한 폴리펩티드를 암호화하는 DNA서열을 제공한다. 그 폴리펩티드는 다음의 식을 갖는다:

WYBAZCX

여기서, WYBAZCX는 제31도(SEQ ID NO. 136-139, 141-147, 160, 161, 173-178, 42-44, 77)에서 보여지는 아미노산 서열로 구성되고; W 는 폴리펩티드 절편 F를 함유하거나, 또는 결여되어 있고; Y 는 폴리펩티드 절편 E를 함유하거나 또는 결여되어 있고; Z 는 폴리펩티드 절편 G를 함유하거나 또는 결여되어 있고; X 는 폴리펩티드 절편 C/D HKL, C/D H, C/D HL, C/D D, C/D' HL, C/D' HKL, C/D' H, C/D' D, C/D C/D' HKL, C/D C/D' H, C/D C/D' HL, C/D C/D' D, C/D D' H, C/D D' HL, C/D D' HKL, C/D' D' H, C/D' D' HL, C/D' D' HKL, C/D C/D' D' H, C/D C/D' D' HL, 또는 C/D C/D' D' HKL 을 함유하고; 단,

a) F,Y,B,A,Z,C 또는 X중 적어도 하나가 소에서 유래되거나, 또는

b) Y 가 폴리펩티드 절편 E 를 함유하거나, 또는

c) X 가 폴리펩티드 절편 C/D HKL, C/D D, C/D' HKL, C/D C/D' HKL, C/D C/D' D, C/D D' H, C/D D' HL, C/D D' HKL, C/D' D' H, C/D' D' HKL, C/D C/D' D' H, C/D C/D' D' HL, C/D C/D' D' HKL, C/D' H, C/D C/D' H, 또는 C/D C/D' HL을 함유하는 것을 조건으로 한다.

더욱이, 본 발명은 코딩 절편$^{5'}$ FBA$^{3'}$ 로 이루어진 DNA서열 뿐만아니라 제31도(SEQ ID NO. 136, 138, 139, 173-175)에서 보여지는 아미노산 서열을 갖는 해당 폴리펩티드 절편; 코딩절편$^{5'}$ FBA$^{3'}$ 로 이루어지는 DNA 서열 뿐만아니라 제31도(SEQ ID NO. 136, 138, 140, 173, 174)에서 보여지는 아미노산 서열을 갖는 해당 폴리펩티드 절편; 코딩절편$^{5'}$ FBA$^{3'}$ 로 이루어진 DNA서열 뿐만아니라 제31도(SEQ ID NO. 136-139, 173-175)에서 보여지는 아미노산 서열을 갖는 해당 폴리펩티드 절편; 코딩절편$^{5'}$ FBA$^{3'}$ 로 이루어지는 DNA서열 뿐만아니라 제31도(SEQ ID NO. 136-138, 140, 173, 174) 에서 보여지는 아미노산 서열을 갖는 해당 폴리펩티드 절편; 및 GGF2HBS5 cDNA 클론(ATCC 기탁번호 75298, 1992년 9월 2일 기탁) 의 폴리펩티드 코딩 절편으로 이루어진 DNA서열을 포함한다.

본 발명은 더욱이 식 FBA, FEBA, FBA', FEBA' 의 펩티드 및 이 펩티드를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는데, 여기서 폴리펩티드 절편은 각각 제31도 SEQ ID NO.(136, 138, 139, 173-175), (136-139, 173-175), (136, 138, 140, 173, 174), (136-138, 140, 173, 174) 에서 보여지는 아미노산 서열에 해당한다. 정제한 GGF-Ⅱ폴리펩티드(SEQ ID NO. 167)도 또한 본 발명의 일부로서 포함된다.

더욱이 중추신경계의 신경교질 및 특히 과돌기신경교세포, 소신경교세포 및 성상세포의 치료에 유용한 펩티드 및 그러한 펩티드를 암호화하는 DNA 와 이 펩티드의 투여 방법도 본 발명의 한 양태로서 포함된다.

본 발명은 더욱이 상기에서 정의한 아미노산 서열을 암호화하는 DNA서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 또한 상기에서 정의한 아미노산 서열을 암호화하는 분리된 DNA를 함유하는 숙주세포도 포함된다. 본 발명은 더욱이 p185^{erbB2} 리셉터에 결합하여 시험관내 및/또는 시험관내에서 신경교질세포 유사분열을 촉진하는 화합물들을 포함한다.

또한 여기서 기술한 새로운 펩티드에 대한 항체도 본 발명의 일부이다. 게다가, 여기서 기술한 펩티드중 어느것에 대한 항체를 여기서 기술한 폴리펩티드의 정제를 위해 사용할 수 있다. 또한 폴리펩티드의 항체를 신경교질세포 유사분열의 치료적 억제인자를 위해 사용할 수 있다.

[발명의 구성]

본 발명은 신경교질세포를 다음식으로 정의되는 폴리펩티드와 접촉시키는 것으로 이루어지는 신경교질세포 유사분열을 촉진시키는 방법을 제공한다:

WYBAZCX

여기서, WYBAZCX는 제31도(SEQ ID NO. 136-139, 141-147, 160, 161, 173-178, 42-44, 77)에서 보여지는 폴리펩티드 절편으로 구성되고; W 는 폴리펩티드 절편 F를 함유하거나, 또는 결여되어 있고; Y 는 폴리펩티드 절편 E 를 함유하거나, 또는 결여되어 있고; Z 는 폴리펩티드 절편 G를 함유하거나, 또는 결여되어 있고; X 는 폴리펩티드 절편 C/D HKL, C/D H, C/D HL, C/D D, C/D' HL, C/D' HKL, C/D' H, C/D' D, C/D C/D' HKL, C/D C/D' H, C/D C/D' HL, C/D C/D' D, C/D D' H, C/D D' HL, D/D D' HKL, C/D' D' H, C/D' D' HL, C/D' D' HKL, C/D C/D' D' H, C/D C/D' D' HL, 또는 C/D C/D' D' HKL을 함유한다.

본 발명은 또한 본 발명의 DNA서열의 발현을 허용하는 조건하에서 상기에서 정의된 변형숙주세포를 배양하는 것으로 구성되는 신경교질세포 분열촉진인자의 제조방법을 포함한다.

본 발명의 펩티드는 제약학적 또는 수의학적 사용을 위한 제약학적 또는 수의학적 제제를 만드는데 사용할 수 있다. 선택적으로, 이 제제는 허용가능 희석제, 담체 또는 부형제와 함께 및/ 또는 단위 투여형태로 사용할 수 있다.

생체내 또는 시험관내에서 신경교질세포 분열촉진물질로서 상기에서 정의한 폴리펩티드와 신경교질세포를 접촉시킴으로써 신경교질세포의 유사분열을 촉진시키는 방법도 또한 본 발명의 태양이다. 정의된 폴리펩티드의 유효량을 투여함으로써 척추동물(바람직하게는 포유동물, 더 바람직하게는 인간) 에서 신경교질세포 분열 촉진효과를 생성하는 방법도 또한 본 발명의 한 요소이다.

상기 폴리펩티드를 사용하여 질환 및 장애를 치료하는 방법도 또한 본 발명의 일부이다. 예컨대 신경질환 또는 장애의 치료 또는 예방방법이 상기 폴리펩티드로 행해질 수 있다. 또한 상기 폴리펩티드에 감수성 또는 반응성을 보이는 세포유형이 관련된 신경계의 병태생리학적 상태의 예방 또는 치료방법도 본 발명의 일부이다.

마찬가지로 말초신경손상; 중추신경계의 신경손상; 신경퇴행성장애; 말초 또는 중추 신경계의 수초탈락; 도는 시반세포, 과돌기 신경교세포, 소신경교세포, 또는 성상세포의 손상이나 상실을 포함하는 상태의 치료방법도 본 발명에 포함된다. 예컨대, 지각 또는 운동 신경섬유의 신경장애, 신경퇴행성 장애의 치료가 포함된다. 이러한 경우 치료는 폴리펩티드의 유효량을 투여하는 것으로 구성된다.

본 발명은 또한 상기에서 정의한 폴리펩티드의 유효량을 투여함으로써 신경재생 및/또는 회복을 유도하는 방법을 포함한다. 폴리펩티드를 제약학적으로 효과적인담체와 함께 투여함으로써 그러한 약제가 만들어진다.

본 발명은 상기에서 정의한 폴리펩티드를 약제의 제조에 사용하는 것을 포함한다.

더욱이 본 발명은 상기에서 정의한 폴리펩티드를 다음 용도에 사용하는 것을 포함한다:

- 선택적으로 치료 또는 진단목적에 사용할 수 있는 항체를 생성하기 위해서 포유동물을 면역화시키는 용도.

- 경쟁검사(competitive assay) 에서 폴리펩티드의 것에 대응하는 리셉터 결합 특성을 갖는 분자를 동정 또는 정량하기 위한 용도; 및/ 또는

- 폴리펩티드에 대한 결합의 경쟁적 억제를 검출할 목적으로 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 리셉터와 함께 상기에서 정의한대로 폴리펩티드와 샘플을 접촉시키는 공정에서의 용도,

- 대응하는 리셉터의 분리를 위한 친화성 분리공정, 선택적으로 친화성 크로마토그래피에서의 용도.

본 발명은 또한 신경교종(glial tumor) 의 예방 또는 치료방법을 포함한다. 이 방법은 상기의 펩티드들에 의해 정의되는 인자의 결합을 억제하는 물질의 유효량을 투여하는 것으로 구성된다.

더욱이, 본 발명은 다음 인자를 신경교질세포에 적용함으로써 신경교질세포 분열촉진활성을 촉진시키는 방법을 포함한다:

- MDA-MB 231 인간 유방 세포주에서 분리된 30kD 폴리펩티드인자; 또는

- 신경교질세포에 대한 래트 I-EJ 형질전환된 섬유아세포 세포주에서 분리된 35kD 폴리펩티드인자; 또는

- SKBR-3 인간 유방 세포주에서 분리된 75kD 폴리펩티드인자; 또는

- 래트 I-EJ 형질전환된 섬유아세포 세포주에서 분리된 44kD 폴리펩티드인자; 또는

- 활성화된 마우스 복막 대식세포에서 분리된 25kD 폴리펩티드인자; 또는

- MDA-MB 231 인간 유방 세포에서 분리된 45kD 폴리펩티드인자; 또는

- 신경교질세포에 대한 ATL-2 인간 T- 세포주에서 분리된 7 내지 14kD 폴리펩티드 인자; 또는

- 소의 신장 세포에서 분리된 25kD 폴리펩티드인자; 또는

- 뇌에서 분리된 42kD 폴리펩티드인자(ARIA).

본 발명은 더욱이 생체내 및 시험관내에서 신경교질세포 유사분열의 촉진을 위한, EGFL1, EGFL2, EGFL3, EGFL4, EGFL5, 및 EGFL6 폴리펩티드(각기 제38도 내지 제43도 및 SEQ ID NO. 154 내지 159)의 사용방법을 포함한다.

또한 신경교질세포 유사분열의 촉진을 위한, 서열이 제45도에서 보여지는 GGF-II 폴리펩티드의 투여도 본 발명에 포함된다.

본 발명의 또다른 양태는 과학적 또는 치료적 사용을 위해 수거할 수 있는 성장인자들을 생성하도록 시반세포를 촉진시킬 목적으로 상술한 펩티드를 사용하는 것을 포함한다.

더욱이 여기서 기재된 펩티드는 예컨대 MS 같은 재-수초발생이 요구되는 질환의 치료를 위해서 중추신경교질 증식 및 재수초발생을 유도하는데 이용할 수 있다.

본 발명의 또다른 양태에서는, 여기서 기재된 신규 폴리펩티드를 아세틸콜린리셉터의 합성을 촉진하는데 이용할 수 있다.

상기한 바와같이 본 발명은 소와 인간을 포함하는 포유동물 공급원으로부터의 새로운 신경교질 성장인자를 제공하는데, 이것은 공지된 인자들과 구별된다. 이 인자는 태아 소 혈장(FCP) 의 백그라운드에 대해서 시반세포의 분열촉진활성이 있다. 본 발명은 또한 이 인자의 제조방법, 및 이 인자와 다른 인자의 활성을 정의하는 개선된 방법을 제공한다. 인자들의 치료적 이용은 본 발명의 또다른 중요한 면이다.

따라서, 본 발명의 중요한 양태들은 다음과 같다;

(a) 태아 소 혈장의 존재하에서 신경교질세포 분열촉진활성, 보다 특이적으로는 시반 세포분열촉진 활성을 가지고, 약 30kD 내지 약 36kD 의 분자량을 가지고, 아미노산 서열내에서 하기의 펩티드서열중 하나 이상을 포함하는 염기성 폴리 펩티드인자:

F K G D A H T E
A S L A D E Y E Y M X K
T E T S S S G L X L K
A S L A D E Y E Y M R K
A G Y F A E X A R
T T E M A S E Q G A
A K E A L A A L K
F V L Q A K K
E T Q P D P G Q I L K K V P M V I G A Y T
E Y K C L K F K W F K K A T V M
E X K F Y V P
K L E F L X A K; 및

(b) 태아 소 혈장의 존재하에서 신경교질세포 유사분열, 특히 시반세포의 분열을 촉진시키고, 약 55kD 내지 약 63kD 의 분자량을 가지고, 아미노산 서열내에서 하기의 펩티드 서열중 하나 이상을 포함하는 염기성 폴리펩티드인자:

V H Q V W A A K
Y I F F M E P E A X S S G
L G A W G P P A F P V X Y
W F V V I E G K
A S P V S V G S V Q E L Q R
V C L L T V A A L P P T
K V H Q V W A A K

K A S L A D S G E Y M X K
D L L L X V
E G K V H P Q R R G A L D R K
P S C G R L K E D S R Y I F F M E
E L N R K N K P Q N I K I Q K K

보다 작은 분자량 폴리펩티드 인자로부터, 그리고 보다 큰 분자량 폴리펩티드인자로 부터 유도되는 상기의 새로운 펩티드서열도 또한 그 자체로 본 발명의 양태이다. 이 서열은 일정범위의 다른 종으로부터 폴리펩티드인자(또는 대응하는 유전자 서열)를 조사, 분리 또는 제조하기 위해 본 발명의 폴리펩티드인자의 프로브공급원으로서 유용하고, 또한 재조합기술에 의해 그러한 인자를 제조하기 위한 본 발명의 폴리펩티드인자의 프로브 공급원으로서 유용하고, 종래의 기술에 의해 대응하는 항체, 바람직하게는 그 자체가 유용한 조사도구이며 가능한 치료법인 단클론성 항체를 생성하는데 유용하다.

본 발명은 또한 본 발명의 새로운 펩티드 서열에 대해서 상술한 방법에 의해 얻어질 수 있는, 분리된 신경교질세포 분열촉진활성 암호화 유전자서열, 또는 그것의 단편을 포함한다.

본 발명의 고도로 정제된 인자의 짧은 펩티드의 획득가능성은 추가의 서열이 결정될 수 있게 한다(하기의 실시예 참조).

따라서, 본 발명은 또한 신경교질세포 분열촉진활성을 가지고 하기의 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드인자를 포함한다:

(a) 각각 제 28a도, 제 28b도 또는 제 28c도, SEQ ID NO. 133-135중 어느하나에서 보여지는 DNA 서열;

(b) 제22도, SEQ ID NO. 89 에서 보여지는 DNA서열;

(c) 제 28a도, SEQ ID NO. 133에서 보여지는 서열의 뉴클레오티드 281-557에의해 표시되는 DNA 서열; 또는

(d) (a),(b) 또는 (c) 에 따르는 DNA서열중 어느 하나에 혼성화할 수 있는 DNA서열, 본 발명은 더욱이 상기 서열과의 서열단위 상동성이 60%, 바람직하게는 80% 보다 더 큰 서열을 포함한다.

본 발명은 특정 세트의 혼성화조건에 제한되지는 않지만, 하기의 프로토콜은 원한다면 수행할 수 있는 일반적인 지침을 제공한다:

Schowalter 및 Sommer(Anal. Biochem., 177: 90-94, 1989) 에 따라 PCR반응에 의해 또는 틈-번역(nick-translation)에 의해 높은 비활성(대략 10^{8} 내지 10^{9} ^{32} Pdmp/μg)으로 DNA 프로브를 표지화시키고, G-150세파덱스컬럼으로 탈염시켜서 정제할 수 있다. 프로브를 변성시키고(끓는 물에서 10 분 그후 얼음물속에 담금), 그 다음에는 1ml당 10^{8} dpm^{32} P 으로 10%황산덱스트란을 포함하는 80% 완충액 B(2g 폴리비닐피롤리딘, 2g 피콜-400, 2g 소혈청 알부민, 50ml 1 M Tris HCl (pH 7.5), 58g NaCl, 1g 피로인산나트륨, 10g 황산도데실나트륨, 950ml H_2O)의 혼성화용액에 첨가하고 60℃에서 하룻밤동안(대략 16 시간) 배양할 수 있다. 그후 필터를 60℃에서 먼저 완충액 B에서 15 분간 세척한후, 2X SSC, 0.1% SDS 에서 20 분씩 세번 세척하고, 1X SSC, 0.1% SDS에서 20 분간 한번 세척할 수 있다.

본 발명의 다른 양태는 하기의 인자들을 제공하는 것이다:

(a) 소의 뇌하수체 물질로부터 얻어진다면, 하기의 분자량 표준물:

리소짐(달걀의 흰자위) 14,400

콩 트립신 억제인자 21,500

탄산탈수효소(소) 31,000

오발부민(달걀의 흰자위) 45,000

소혈청 알부민 66,200

포스포릴라제 B(토끼근육) 97,400

을 이용한 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 환원조건이든 아니든 간에 약 30kD 내지 약 36kD 의 관측분자량을 갖는 염기성 폴리펩티드인자로서, 태아 소 혈장의 존재하에서 래트 시반세포의 분열을 촉진시키는 것을 포함하는 신경교질세포 분열촉진활성을 가지며, 역상 HPLC 를 이용하여 분리했을때 4℃에서 0.1% 트리플루오로아세트산에서 10주일간 배양한 후에 상기 활성의 적어도 50%를 유지하는 염기성 폴리펩티드인자; 및 (b) 소의 뇌하수체 물질로부터 얻어진다면, 하기의 분자량 표준물:

리소짐(달걀의 흰자위) 14,400

콩 트립신 억제인자 21,500

탄산탈수효소(소) 31,000

오발부민(달걀의 흰자위) 45,000

소혈청 알부민 66,200

포스포릴라제 B(토끼근육) 97,400

을 이용한 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 비-환원조건하에서 약 55kD 내지 약 63kD의 관측분자량을 갖는 염기성 폴리펩티드인자로서, 이 인자의 인간 등가물은 여기서 기재된 DNA클론 GGF2HBS5 에 의해 암호화되며, 태아 소 혈장의 존재하에서 래트 시반세포의 분열을 촉진시키는 것을 포함하는 신경교질세포 분열촉진활성을 가지며, 역상 HPLC를 이용하여 분리했을때 4℃에서 0.1% 트리플루오로아세트산에서 4일간 배양한 후에 활성의 적어도 50%를 유지하는 염기성 폴리펩티드인자.

단지 설명의 편의를 위해서 본 발명의 보다 낮은 분자량 및 보다 높은 분자량인자를 이하에는 각각 "GGF-Ⅰ" 및 GGF-Ⅱ" 로서 나타낸다. "GGF2" 표시는 GGF-Ⅱ 단백질에서 유도된 펩티드서열 데이타로 분리된 모든 클론에 대해 사용된다(즉, GGF2HBS5, GGF2BPP3).

인용된 분자량 범위 한계는 정확하지 않으며, 특정 폴리펩티드인자의 공급원에 따라 약간 변화된다는 것이 이해될 것이다. 말하자면 약 10%의 변이는 예컨대 다른 공급원의 재료에 대해서 불가능하지 않을 것이다.

본 발명의 다른 중요한 양태는 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하고 다음 서열들로 이루어지는 DNA서열이다:

(a) 제28a도, 제 28b도 또는 제 28c도, SEQ ID NO. 133-135중 어느 하나에서 보여지는 DNA 서열;

(b) 제22도, SEQ ID NO. 89 에서 보여지는 DNA서열;

(c) 제28a도, SEQ ID NO. 133에서 보여지는 서열의 뉴클레오티드 281-557에 의해 표시되는 DNA 서열; 또는

(d) (a),(b) 또는 (c) 에 따른 DNA서열중 어느 하나에 혼성화할 수 있는 DNA서열.

본 발명의 다른 양태는 신경교질 성장인자 및 $p185^{erbB2}$ 리간드 단백질이 동일한 유전자에 의해 암호화된다는 사실을 이용한다. 다양한 전령 RNA 스플라이싱 변이체(및 그것의 결과적인 단백질)는 이 유전자로부터 유도되고 이 산물중 많은 것은 $p185^{erbB2}$ 결합 및 활성화를 나타낸다. (GGF-Ⅱ) 유전자 산물중 몇가지는 시반세포 분열촉진 활성을 나타내는데 사용되었다. 본 발명은 GGF/$p185^{erbB2}$ 리간드 유전자의 알려진 모든 산물(상기에 나열된 참고문헌에 기재됨)의 시반세포 분열촉진 물질로서의 이용을 제공한다.

본 발명은 또한 다른 아직 천연적으로 분리되지 않은 신경교질 성장인자 유전자의 스플라이싱 변이체에도 관련된다. 제30도는 중합효소 연쇄반응 실험(역전사된 RNA 에 대해서) 및 cDNA 클론(여기서 주어짐) 의 분석으로부터 유도된 알려진 프플라이싱 패턴 및 $p185^{erbB2}$ 리간드를 암호화하는 서열로서 공표된것(Peles et al., Cell 69: 205(1992)및 Wen et al., Cell 69: 559(1992))으로부터 유도된 알려진 스플라이싱 패턴을 나타낸다. 여기서 개시된 부가적인 것과 함께 이 패턴은 존재하는 가능한 스플라이싱 변이체를 나타낸다. 따라서 본 발명의 다른 면은 이 유전자로부터 유래하는 새로운 단백질 인자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이 인자의 제조방법을 제공한다. 이 새로운 인자의 치료적 이용은 본 발명의 또다른 양태이다.

따라서 본 발명의 다른 중요한 양태는 하기와 같다:

(a) 시반세포의 분열을 촉진시키는 것을 포함하는 신경교질세포 분열촉진 활성을 갖는 일련의 인간 및 소 폴리펩티드 인자. 이 펩티드 서열은 각각 제31도, 제32도, 제33도 및 제34도, SEQ ID NO. 136-137, 173에서 보여진다.

(b) 시반세포의 분열을 촉진시키는 것을 포함하는 신경교질세포 분열촉진 활성을 가지며, Lupu et al. Science 249: 1552 (1990): Lupu et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 2287 (1992); Holmes et al. Science 256: 1205 (1992); Peles et al. 69: 205 (1992); Yarden and Peles Biochemistry 30: 3543 (1991); Dobashi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 8582 (1991); Davis et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 1536 (1991); Beaumont et al., 특허출원 PCT/US91/03443 (1990); Greene et al. 특허출원 PCT/US91/02331 (1990); Usdin and Fischbach, J. Cell. Biol. 103: 493-507 (1986); Falls et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 55: 397-406 (1990); Harris et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7664-7668 (1991); and Falls et al., Cell 72: 801-815 (1993) 에서 기재된 방법에 따라서 정제되고 특정화된 일련의 폴리펩티드 인자.

(c) 시반세포의 분열을 촉진시키는 것을 포함하는 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드인자(GGFBPP5). 아미노산서열은 제32도, SEQ ID NO. 148에서 보여지며, 제32도, SEQ ID NO. 148에서 보여지는 소 DNA서열에 의해 암호화된다.

상기에서 기술되고 제31도, 제32도, 제33도 및 제34도, SEQ ID NO. 136-150, 173-176, 178, 42-44, 77 에서 각각 주어진 새로운 인간 펩티드서열은 일련의 스플라이싱 변이체를 나타내는데, 이것은 천연의 공급원(적당한 조직에서 제조한 cDNA 라이브러리) 으로부터 전체길이의 상보적인 DNA(cDNA) 로서 분리될 수 있고 또는 당업자에 의해 개별적인 엑손(exon)(가령, 분리된 엑손으로서 유도됨) 을 갖는 DNA 구조체로서 조립될 수 있다.

$p185^{erbB2}$ 리셉터에 특이적으로 결합하는 다른 화합물, 특히 펩티드를 또한 신경교질 세포 분열촉진물질로서 본 발명에 따라 사용할 수 있다. 후보 화합물을 $p185^{erbB2}$ 결합에 대해서 일상적으로 스크리닝할 수 있으며, 그것이 결합하면 여기서 기재된 방법을 이용하여 신경교질세포 분열촉진활성에 대해서 스크리닝할 수 있다.

본 발명은 크게 감소된 활성을 나타내지 않는 상기의 폴리펩티드인자의 어떤 변형물 또는 등가물을 포함한다. 예컨대, 실질적으로 활성에 악영향을 미치지 않고 아미노산 함량 또는 서열이 변화된 변형물도 포함된다. 일례로서 EP-A 109 748에는 생물학적 활성에 필요하지 않은 본래 서열의 어떤 시스테인을 중성 아미노산으로 대체함으로써 원하지 않는 이황화물 결합의 가능성을 회피한 본래단백질의 돌연변이체가 개시되어 있다. 여기에 포함된 효과와 용도의 기술은 변형된 또는 등가의 인자을 이용하는 그런 용도와 효과가 본 발명의 일부가 되도록 이것에 준하여 설명되어야 한다.

본 발명의 새로운 서열은 재조합 기술의 이점을 열었다. 따라서 본 발명은 하기의 것들을 포함한다:

(a) DNA구조체에 의한 형질전환후 선택된 숙주세포내의 벡터내에서 작동가능리딩 프레임 위치로(조절서열에 대해서 서열의 발현을 허용하도록 위치함) 상기에서 정의한 DNA서열을 함유하는 DNA구조체(바람직하게는 조절서열이 조절가능 프로모터 가령 Trp를 포함한다), 프로모터 및 조절서열의 선택은 당업자에게는 선택의 문제인 것이 이해될 것이다.

(b) 상기의 바로(a) 에서 정의된 구조체를 상기의 DNA서열이 상기의 숙주세포에서 발현될 수 있도록 삽입함으로써 변형된 숙주세포-숙주의 선택은 중요하지 않으며, 선택된 세포는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있고, 당업계에서 공지된 방법에 의해 상기의 구조체를 삽입시켜서 유전학적으로 변형시킬 수 있다.

(c) DNA 서열의 발현을 허용하는 조건하에서 변형된 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는 상기에서 정의된 인자의 제조방법. 이러한 조건은 재조합 DNA기술의 당업자에 의해 어떤 특정구체예에 대해서 용이하게 결정될 수 있다. 이러한 수단에 의해 제조된 신경교질세포 분열촉진물질은 본 발명에 포함된다.

당업계에서 기술된 인자들중 어느 것도 본 발명의 새로운 폴리펩티드 인자들이 가지는 특징들의 조합을 갖지 않았다.

본 발명의 인자들을 특정화하는데 사용되는 시반세포검사는 태아 소 혈장의 백그라운드를 이용한다. 10%FCP가 10% FCS 를 대체한 것을 제외하고 모든 다른점에 있어서 이 검사는 상기의 Brockes et al., Meth. Enz. 에 기재된 것과 동일할 수 있다. 이러한 검사기술의 차이는 중요한데, 그것은 태아 소 혈장(혈청과는 달리) 에서의 혈소판-유도 인자의 부재가 어떤 다른 인자로부터 가능한 의사효과를 제거함으로써 시반세포에 대한 활성을 보다 정확하게 정의할 수 있도록 하기 때문이다.

또한 본 발명은 상기에서 정의된 폴리펩티드의 제조방법으로서, 척추동물의 뇌 물질을 추출하여 단백질을 얻고, 결과적인 추출물을 히드록실아파타이트 HPLC에 의해 크로마토그래피 정제를 행하고, 그후 이 분획을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동하는 것으로 이루어지는 방법을 포함한다. 약 30kD 내지 36kD 의 관측분자량을 갖는 분획 및/또는 약 55kD 내지 63kD 의 관측분자량을 갖는 분획을 모은다. 어느 경우에도 분획을 하기의 분자량 표준물을 이용한 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동을 수행한다:

리소짐(달걀의 흰자위) 14,400

콩 트립신 억제인자 21,500

탄산탈수효소(소) 31,000

오발부민(달걀의 흰자위) 45,000

소혈청 알부민 66,200

포스포릴라제 B(토끼근육) 97,400

보다 낮은 분자량 분획의 경우에는 SDS-폴리아크릴아미드 겔이 비-환원 조건 또는 환원조건에서 전개되고, 보다 높은 분자량 분획의 경우에는 겔이 비-환원조건하에서 전개된다. 그 다음 분획을 태아 소 혈장의 백그라운드에 대해서 래트 시반세포분열의 촉진활성을 시험한다.

바람직하게는, 가령 소 뇌하수체 물질로부터 카르복시메틸 셀룰로스 크로마토그래피에 의해 얻어지는 적당한 분획을 분리함으로써 상기의 공정을 시작한다. 또한 히드록실아파타이트 HPLC, 양이온교환 크로마토그래피, 겔 여과, 및/ 또는 역상 HPLC 는 SDS-폴리 아크릴아미드 겔 전기영동 전에 수행되는 것이 바람직하다. 이 공정의 각 단계에서, 일반적으로는 상기의 Brockes, Meth. Enz.에서 기술된 것과 같지만 10%FCS를 10%FCP 로 치환함으로써 변형시킨 검사에서 척도로서 방사성 요드데옥시우리딘의 시반세포삽입을 이용하여 활성을 측정할 수 있다. 이미 기술한대로 그러한 검사는 CNS또는 PNS세포, 가령 시반세포 분열촉진 효과를 위한 물질 자체로 본 발명의 일면이다.

따라서 본 발명은 태아 소 혈장의 백그라운드가 이용되고 그것에 대해서 검사하는 물질에 의해 촉진된 신경교질세포에서의 DNA합성을 평가하는, 신경교질세포 분열촉진활성의 검사방법을 포함한다.

본 발명의 또다른 면은 선택적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제와 함께 및/또는 단위투여 형태로, 제약학적 또는 수의학적 용도를 위해 조제된, 상기에서 정의된 어떤 인자를 함유하는 제약학적 또는 수의학적 제제이다. 본 발명의 인자를 사용할때 통상적인 제약학적 또는 수의학적 실시가 적합한 제제 또는 조성물을 제공하도록 행해질 수 있다.

따라서, 본 발명의 제제는 비경구적 투여, 가령 정맥내, 피하, 근육내, 안와내, 눈, 실내, 두개내, 캡슐내, 수강내, 시스터네, 복강내, 국부, 비강내, 에어로솔, 난절, 또한 경구 투여, 볼, 직장 또는 질 투여로 적용될 수 있다.

본 발명의 제제는 또한 본 발명의 DNA를 발현하는 숙주세포의 환자속으로의 이식에 의하여 또는 본 발명의 제제를 방출하는 외과적 이식조직편의 사용에 의하여 투여할 수도 있다.

비경구용 제제는 액체용액 또는 현탁액의 형태일 수 있고, 경구적 투여를 위한 제제는 정제 또는 캡슐의 형태일 수 있고, 비강내 투여를 위한 제제는 분말, 비강점적제, 또는 에어로솔의 형태일 수 있다. 당업계에서 공지된 제제를 만드는 방법은 예컨대 " Remington's Pharmaceutical Science" 에서 발견된다. 비경구적 투여를 위한 제제는 가령 부형제로서 멸균수 또는 식염수, 폴리에틸렌글리콜 같은 폴리알킬렌글리콜, 식물성기름, 또는 수소화 나프탈렌, 생체적합성, 생물분해성 락티드 중합체를 포함할 수 있고, 또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체를 본 인자의 방출을 조절하는데 사용할 수 있다. 다른 잠재적으로 유용한 비경구적 인자 투여시스템은 에틸렌-비닐 아세테이트 공중합체입자, 삼투압 펌프, 이식가능주입 시스템, 및 리포솜을 포함한다. 흡입을 위한 제제는 부형제로서 가령 락토스를 포함할 수 있고, 또는 가령 폴리옥시에틸렌-9-라우릴에테르, 글리코콜레이트 및 데옥시콜레이트를 포함하는 수용액일 수 있고, 또는 비강점적제의 형태로 투여하기 위한 기름용액일 수 있고 또는 비강내로 적용되는 겔로서 존재할 수도 있다.

비경구적 투여를 위한 제제는 또한 볼 투여를 위한 글리코콜레이트, 직장투여를 위한 메톡시살리실레이트, 또는 질투여를 위한 시트르산을 포함할 수 있다.

본 발명의 인자는 단독의 활성제로서 사용할 수도 있고, 또는 다른 활성성분, 예컨대 신경병학적 질환에서 뉴론의 생존을 촉진할 수 있는 다른 성장인자, 또는 펩티다제 또는 프로테아제 억제인자와 조합하여 사용할 수도 있다.

본 발명의 제제에서 본 발명의 인자의 농도는 투여량과 투여경로를 포함하는 많은 요인들에 좌우되어 다양할 것이다.

일반적으로 본 발명의 인자는 비경구적 투여를 위해서는 약 0.1 내지 10% W/V화합물을 포함하는 생리적 완충 수용액으로 제공될 수 있다. 일반적인 투여량 범위는 1 일당 약 1mg/kg 체중 내지 약 1g/kg체중이다; 바람직한 투여량범위는 1일당 약 0.01mg/kg체중 내지 100mg/kg 체중이다. 바람직한 투여량은 병태생리학적 상태의 진행유형 및 정도, 환장의 종합건강상태, 제제의 구성, 및 투여경로등에 좌우되는 것 같다.

상기에서 기술한 것처럼, 시반세포(말초신경계의 신경교질세포) 는 본 발명의 인자의 존재하에서 분열이 자극된다. 말초신경계의 시반세포는 뉴론을 지지하고 개별적인 신경섬유 주위에 수초를 생성하는데 관여한다. 이 수초는 근육으로 가는 전기자극 및 지각리셉터로부터 오는 전기자극의 적당한 전도에 중요하다.

시반세포와 신경섬유가 일차적으로 또는 이차적으로 손상되는 다양한 말초신경장애가 있다. 지각 및 운동섬유의 많은 신경장애도 존재한다(Adams 및 Victor, Principles of Neurology). 이러한 신경장애중 가장 중요한 것은 아마도 당뇨병, 다발성경화, Landry-Guillain-Barr 증후군과 관련된 신경장애, 암종에 의해 야기되는 신경장애, 및 독성약제(이들중 일부는 암종의 치료에 사용된다) 에 의해 야기 되는 신경장애이다.

그러나, 본 발명은 신경계 손상이 어떤 근본적인 원인, 가령 감염 또는 상해에 의해 야기되는 상태의 치료 또는 예방을 꾀한다. 따라서 시반세포의 수초탈락 또는 상실이 존재하는 신경계의 장애 또는 질환의 치료에 본 발명 인자를 사용하는 것이외에도, 그러한 신경교질 성장인자는 말초신경의 손상에 의해 야기되는 신경계 장애의 치료에서도 유용할 수 있다. 말초신경의 손상후에는, 시반세포의 생장 또는 재-확립후 신경섬유가 그것의 표적으로 다시 진행함으로써 재생과정이 일어난다. 시반세포의 분열을 가속시킴으로써 손상후 재생과정을 촉진시킬 수 있다.

중추신경계(뇌와 척수) 의 상해 또는 신경퇴화 질환을 치료하는데에도 유사한 방법을 이용할 수 있다.

더욱이, 각종 신경교질 세포의 종양이 있는데 가장 흔한것은 아마도 신경섬유종증이다. 이것은 신경교질세포의 과도한 성장에 의해 생기는 불균형의 작은 종양이다. 또한 어떤 시반세포 종양에서는 GGF와 매우 유사한 활성이 발견될 수 있고, 따라서 본 발명 인자의 리셉터에 대한 작용의 억제인자는 신경교질종양의 치료법을 제공하는데, 이것은 상기에서 정의된 인자와 리셉터의 결합을 억제하는 물질의 유효량을 투여하는 것으로 이루어진다.

일반적으로 본 발명은 인자-민감성 또는 인자-반응성 세포유형이 포함된 신경계의 어떤 병태생리학적 상태의 예방 또는 치료에 본 발명의 폴리펩티드 인자를 사용하는 것을 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드 인자는 또한 표준기술에 따라서 단클론성항체 같은 항체를 제조하기 위한 면역원으로서 사용할 수도 있다.

그러한 항체는 본 발명에 포함된다. 이 항체를 치료 또는 진단목적에 사용 할 수 있다. 따라서 아마도 이 인자의 비정상적인 수준과 연관된 상태는 그러한 항체를 사용함으로써 추적할 수 있다. 표준방법을 이용한 분리된 샘플의 검사를 수행하는데 시험관내 기술을 사용할 수 있다. 예컨대, 종양영상화 분야의 기술을 이용하여 신체외부에서 영상화할 수 있는 방사성 동위원소로 항체에 표지를 붙일수 있는 영상화 방법을 이용할 수도 있다.

본 발명은 또한 생체내 또는 시험관내에서 신경교질세포 분열촉진물질로서 본 발명인자의 일반적 사용, 및 그러한 용도를 위한 인자를 포함한다. 한 특정 구체예는 본 발명인자의 유효량을 투여함으로써 척추동물에서 신경교질세포 분열촉진 효과를 생성하는 방법이다. 바람직한 구체예는 신경계 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법이다.

본 발명의 추가의 일반적인 양태는 약제의 제조에 본 발명의 인자를 사용하는 것이고, 바람직하게는 신경질환이나 장애의 치료, 또는 신경재생이나 회복을 위해서 본 발명의 인자를 사용하는 것이다. 또한 본 발명의 폴리펩티드에 대응하는 리셉터결합특성을 갖는 분자를 식별하거나 정량하기 위한 경쟁적 검사에서 본 발명의 인자를 사용하는 것도 본 발명에

포함된다. 폴리펩티드는 선택적으로 방사성 동위원소로 표지화할 수 있다. 경쟁적 검사는 적당한 리셉터의 작용제 및 길항제를 식별할 수 있다.

본 발명의 다른 양태는 본 발명의 인자 각각을 각 대응 리셉터의 분리를 위한 친화성 분리공정, 선택적으로 친화성 크로마토그래피에 사용하는 것이다. 특정 단백질에 대응하는 리셉터의 분리를 위한 그런 공정은 당업계에서 공지되었고, 많은 기술을 이용할 수 있고, 본 발명의 인자에 적용할 수 있다. 예컨대, IL-6 및 IFNγ에 관해서는 Novick, D., et al., J. Chromatogr. (1990) 510: 331-7참조. 고나도트로핀 방출호르몬에 관해서는 Hazum, E., J. Chromatogr. (1990) 510: 233-8참조, G-CSF 에 관해서는 Fukunaga, R., et al., J. Biol. Chem., 265: 13386-90참조. IL-2에 관해서는 Smart, J.E., et al., J. Invest. Dermatol. (1990) 94: 158S-163S 참조. 인간 IFN-감마에 관해서는 Stefanos, S., et al., (1989) J Interferon Res., 9: 719-30 참조.

[상세한 설명]

본 발명은 신규 신경교질 성장인자의 분리 및 정제 그리고 이 인자를 암호화하는 DNA 서열의 클로닝에 대한 것이다. 본 발명의 다른 요소는 가능하게는 일련의 신경 교질 성장인자를 암호화하는 여러 유전자 스플라이싱 변이체, 특히 GGF2HBS5 특히 소 GGF-Ⅱ의 인간 등가물을 암호화하는 변이체이다. GGF 및 p185 ^{erbB2} 결합 단백질을 암호화하는 유전자는 크기가 다양하고 차별적으로 스플라이싱되는 많은 RNA전사체를 생성하고 이 전사체는 일련의 단백질로 되는데, 이것은 길이가 다르고 일부 공통 펩티드서열과 일부 단일 펩티드 서열을 포함하는 것이 명백하다. 이것은 소의 뇌하수체 후엽 RNA(여기서 주어짐), 인간 유방암(MDA-MB-231)(Holmes et al. Science 256: 1205 (1992) 및 닭 뇌 RNA(Falls et al. Cell 72: 1-20 (1993))로부터 회수가능한 차별적으로 스플라이싱되는 서열에 의하여 지지된다. 추가의 증거는 시반세포에 대한 분열촉진 물질로서(여기서 기재됨) 및 p185^{erbB2} 리셉터에 대한 리간드로서(하기의 내용참조) 작용하는 넓은 크기 범위의 단백질들로부터 유도된다.

GGF 및 p185^{erbB2} 를 암호화하는 유전자가 상동적이라는 사실을 지지하는 추가의 증거는 뉴클레오티드서열 비교로부터 유도된다. Science, 256 (1992), (1205-1210) Holmes et al.은 여러가지의 인간 악성종양과 연관된 리셉터 단백질 p185^{erbB2} 과 특이적으로 상호 작용하는 45kD 인간 단백질(헤레굴린-α) 의 정제를 기술한다. 헤레굴린-α를 암호화하는 몇가지의 상보 DNA클론이 분리되었다. Peles et al. (Cell 69: 205 (1992)) 및 Wen et al(Cell 69: 559 (1992)) 은 " neu 분화인자" (NDF)라고 부르는 단백질을 암호화하는 래트세포에서 분리된 상보 DNA를 기술한다. NDF cDNA의 번역산물은 p185 ^{erbB2} 결합활성을 갖는다. Usdin 및 Fischbach, J. Cell. Biol. 103: 493-507 (1986); Falls et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 55: 397-406 (1990); Harris et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7664-7668 (1991); 및 Falls et al., Cell 72: 801-815 (1993)은 리셉터 단백질 p185 ^{erbB2} 와 상호작용하는 42kD 당단백질의 정제를 기술하였고, 몇가지의 상보 cDNA 클론이 분리되었다(Falls et al. Cell 72: 801-815 (1993)). 여러 다른 그룹이 p185 ^{erbB2} 결합활성을 갖는 각종 분자량의 단백질의 정제를 발표하였다. 이 그룹은 Lupu et al. (1992) Proc. Natl. Acad Sci. USA 89: 2287; Yarden and Peles (1991) Biochemistry 30: 3543; Lupu et al. (1990) Science 249: 1552); Dobashi et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 179: 1536; 및 Huang et al. (1992) J. Biol. Chem. 257: 11508-11512를 포함한다.

본 발명은 제31도(SEQ ID NO. 136-147, 160, 161, 173-178, 42-44, 77) 의 코딩절편 뿐만아니라 다른 자연적으로 존재하는 GGF폴리펩티드와 실질적으로 상동적인 어떤 단백질을 포함한다.

또한 대립유전자 변이체; 자연발생 돌연변이체; 유도된 돌연변이체; 높은 또는 낮은 긴축 조건하에서 자연적으로 존재하는 핵산에 혼성화하는 DNA에 의해 암호화된 단백질(높은 및 낮은 긴축의 정의에 대해서는 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989, 6.3.1-6.3.6, 여기서 참고문헌으로 통합됨); 및 GGF 폴리펩티드의 항혈청에 의해 특이적으로 결합되는 폴리펩티드 또는 단백질도 포함된다.

이 용어는 또한 제31도의 서열을 함유하는 GGF폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 포함한다.

하기의 실시예는 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않고, 유용하게 본 발명을 예시하기 위해 주어지며, 효과적인 조제 기술의 특정지침을 제공한다.

하기의 실시예 3으로부터 보여지는 것처럼, 본 발명의 인자는 일정범위의 세포유형에 대한 분열촉진활성을 나타낸다. 섬유아세포에 관한 활성은 상처치유력을 나타내며, 본 발명은 이러한 사용을 포함한다. 제제 및/ 또는 약제 및 그것의 제조에 관한 상기의 발명의 일반적 기술은 명백하게 적당한 생성물 및 용도를 포함하도록 해석되어야 한다. 이것은 본 발명에 대한 합리적인 예상이며, 섬유아세포 성장인자(FGF) 에 대해서 유사한 활성의 발표가 주어졌다. 예컨대 Sporn et al. 의 " FGFS in Wound Healing and Tissue Repair" 섹션에 있는 " Peptide Growth Factors and their Receptors I" , P. 396(Baird and Bohlen) 을 참조할 수 있다.

[실시예 1]

소의 뇌하수체로부터 GGF-Ⅰ및 GGF-Ⅱ의 정제

Ⅰ. 인자-CM 분획의 조제

4,000 동결된 소 뇌하수체 전체(c.a. 12kg) 를 하룻방동안 녹이고, 간단히 물로 세척한 다음 Waring 블렌더에서 배치로 동일체적의 0.15M 황산암모늄중에서 균질화시켰다. 호모게네이트를 1.0M HC1 로 pH4.5까지 맞추고 80 분간 4,900g 에서 원심분리하였다. 상청액의 어떤 지방물질은 유리솜을 통과시켜서 제거하였다. 상청액의 pH 를 1.0M NaOH를 이용하여 6.5로 맞춘후에, 고체황산암모늄을 36%포화 용액이 되도록 첨가하였다. 여러시간 교반한후, 현탁액을 80 분간 4,900g 에서 원심분리하여 침전물을 제거했다. 유리솜을 통해 여과한후, 상청액이 75%포화용액이 되도록 추가로 고체황산암모늄을 첨가하였고, 여러시간 교반한후 80 분간 4,900g에서 한번더 원심분리하였다. 펠렛을 c.a. 2L 의 0.1M인산나트륨(pH 6.0)중에 재현탁시키고 동일 완충액 3×40L에 대해서 투석하였다. 투석물의 전도성이 20.0μSiemens 이하인 것을 확인한후, 카르복시메틸 셀룰로스(CM-52, Whatman)로 패킹된 Bioprocess 컬럼(120×113 mm, Pharmacia) 상에 2ml/분의 유속으로 로딩하였다. 컬럼을 2체적의 0.1M 인산나트륨 pH6.0, 그후 2체적의 50mM NaCl, 최종적으로 2체적의 동일완충액중의 0.2M NaCl으로 세척했다. 최종단계동안 10mL(5 분) 분획을 모았다. 분획 73 내지 118을 모두 합치고, 10체적의 10mM 인산나트륨 pH6.0에 대해서 두번 투석하고, 60분간 100,000g 에서 원심분리함으로써 정화시켰다.

Ⅱ. 히드록실아파타이트 HPLC

히드록실아파타이트 HPLC 는 신경교질 성장인자를 분리하는데 지금까지 사용된 기술은 아니지만, 본 발명에서 특히 효과가 있다고 밝혀졌다.

상기의 CM-셀룰로스 크로마토그래피에서 얻은 물질을 0.22㎛ 필터(Nalgene)를 통해서 여과하고, 실온에서 가드컬럼(guard column)(15×25mm, Biorad) 으로 장치되고 10mM 인산칼륨 pH6.0으로 평형시킨 고성능 히드록실아파타이트 컬럼(50×50mm, Biorad) 에 로딩하였다. 실온에서의 용출은 하기의 프로그램화된 선형 구배를 이용하여 2ml/분의 유속으로 수행하였다:

시간(분) %B 용매 A : 10mM 인산칼륨 pH6.0

0.0 0 용매 B : 1.0M 인산칼륨 pH6.0

5.0 0

7.0 20

70.0 20

150.0 100

180.0 100

185.0 0

구배용출동안 6.0mL(3분) 분획을 모았다. 분획 39-45를 합치고 10 체적의 50mM 인산나트륨 pH6.0에 대해서 투석하였다.

III. Mono S FPLC

Mono S FPLC는 보다 농축된 물질을 이후의 겔여과를 위해 준비할 수 있게 한다. 히드록실아파타이트 컬럼으로부터 모은 물질속의 어떤 입자물질은 조제용 HR10/10 Mono S 양이온교환컬럼(100×10mm, Pharmacia)에 로딩하기전에 60 분간 100,000g 에서 원심분리정화에 의해 제거하였고, 그다음 실온에서 1.0ml/분의 유속으로 50mM 인산나트륨 pH6.0으로 칼럼을 재평형시켰다. 이러한 조건하에서 결합된 단백질을 하기의 프로그램화된 선형구배를 이용하여 용출시켰다:

시간(분) %B 용매 A : 50mM 인산칼륨 pH6.0

0.0 0 용매 B : 1.2M 염화나트륨, 50mM 인산칼륨pH6.0

70.0 30

240.0 100

250.0 100

260.0 0

이 구배 프로그램동안 1mL(1분) 분획을 모았다. 분획 99 내지 115모두를 합쳤다.

IV. 겔여과 FPLC

이 단계는 최종정제전에 본 발명의 두 인자의 분리를 개시하여 농축된 분획을 생성하였다. 이 단계의 목적을 위해서, 조제용 Superose 12 FPLC 컬럼(510×20mm, Pharmacia)을 제조자의 지시에 따라서 패킹하였다. 이 컬럼을 표준화하기 위해서 제조자의 지시에 따라 이론상 플레이트 측정을 행하여 9,700 이론상 플레이트 값을 얻었다. Mono S 용출물질의 푸울(pool)을 1.0mL/분의 유속으로 50mM 인산나트륨, 0.75NaCl pH6.0중의 이 컬럼(사전에 C18 역상컬럼(Sep-pak, Millipore)을 통과시킴) 에 2.5ml분액으로 실온에서 적용시켰다. 각 샘플을 컬럼에 적용시킨후 35 분부터 1mL(0.5분) 분획을 모았다. 각 전개시 분획 27 내지 41(GGF-Ⅱ) 및 42 내지 57(GGF-Ⅰ)을 모두 합쳤다.

V. 역상 HPLC

상기의 Superose 의 12번의 전개로부터의 GGF-Ⅰ 및 GGF-Ⅱ푸울을 각각 3개의 동일 분액으로 나누었다. 각 분액을 가드 카트리지(RP-8, 15 ×3.2mm, Applied Biosystems)에 의해 보호되고 40℃에서 0.5mL/분으로 평형시킨 C8 역상컬럼(Aquapore RP-300 7 μ C8 220 × 4.6mm, Applied Biosystems)에 로딩하였다. 이러한 조건하에서 하기의 프로그램화된 선형구배를 이용하여 단백질을 용출시켰다:

시간(분) %B 용매 A : 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)

0.0 0 용매 B : 90%아세토니트릴, 0.1%TFA

60 66.6

62.0 100

72.0 100

75.0 0

프로그램화된 구배의 개시후 15.2 분부터 실리콘 처리한 튜브(Multilube tubes, Bioquote)에서 200μℓ(0.4 분) 분획을 모았다.

Ⅵ. SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동

이 단계에서는 Bio-Rad Laboratories Limited, Watford, England 의 낮은 범위의 단백질 분자량 표준물, 카탈로그 번호 161-0304 를 이용하였다. 사용된 실제 단백질, 및 그것의 분자량 표준은 이전에 여기서 나열되었다.

역상 전개로부터 분획 47 내지 53(GGF-Ⅰ)및 분획 61 내지 67(GGF Ⅱ) 를 개별적으로 모두 합쳤다. 합쳐진 물질 7μℓ 를 GGF-Ⅰ을 위한 10% β-메르캅토에탄올, 및 0.0125M Tris-Cl, 4% SDS, 20% 글리세롤의 동일 체적에서 5분간 끓이고, 4%스태킹겔(stacking gel)을 갖는 11% 폴리아크릴아미드 Laemmli겔에 로딩하고, 50V 의 일정전압에서 16 시간동안 전개하였다. 그 다음 이 겔을 고정시키고 은염색키트(Amersham)를 이용하여 염색하였다. 이러한 조건하에서, 인자들은 각각 분자량 마커에 의해 정의될때 상대분자량 30,000 내지 36,000달톤(GGF-Ⅰ) 및 55,000 내지 63,000 달톤(GGF Ⅱ) 에서 다소 확산된 밴드로서 나타났다. 겔염색으로부터, 역상 전개로부터 모아진 물질에는 GGF-Ⅰ과 GGF-Ⅱ종과 동등 수준으로 존재하는 적은 수의 다른 단백질종이 있는 것이 명백하다.

Ⅶ. 트리플루오로아세트산에서의 안정성

트리플루오로아세트산의 존재하에서 본 발명의 인자에 대한 안정성 데이타가 하기와 같이 얻어졌다:

GGF-Ⅰ: 0.1% TFA및 아세토니트릴의 존재하에서, 역상 HPLC 에서의 물질을 컬럼 전개의 종결 12시간이내 그리고 그다음 40℃에서 10 주일간의 배양후 검사하였다. 배양후에 GGF-Ⅰ은 컬럼으로부터 직접 검사한 물질의 활성을 적어도 50%를 가졌다.

GGF-Ⅱ: 0.1% TFA및 아세토니트릴의 존재하에서, -20℃에서 보관한 역상 HPLC 에서의 물질을 녹인후 그리고 그다음 40℃에서 4일간 배양후 검사하였다. 배양후에 GGF-Ⅱ는 새로 녹인 물질의 활성의 적어도 50%를 가졌다.

상기의 연구에 사용된 트리플루오로아세트산 농도는 대부분 흔하게 역상크로마토그래피에 사용된 것이다.

Ⅷ. 활성검사조건

다른 표시가 없으면 모든 공정은 37℃에서 수행되고, 제 1도 내지 제 6도에서 각 단계의 활성은 브로케스(Brockes)(상기의 Meth. Enz.)기술을 하기와 같이 변형시켜서 측정하였다. 시반세포를 조제할때 5μM 포스콜린 뿐만아니라 DMEM(Dulbecco의 변형이글배지), FCS, GGF를 첨가하였다. 검사에 사용된 세포는 10 이하의 계대수(passage number) 의 섬유아세포-제거 시반세포였으며, 이 세포를 트립신으로 플라스크로부터 제거했고 마이크로웰당 3,300세포로 바닥이 평평한 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다.

시험용액 첨가후 최종 24 시간동안 [^{125} I] IUdR 을 첨가했다. 각 검사시 백그라운드(비자극) 투입량은 100cpm 이하였고, 최대투입량은 시반세포배치 및 계대수에 따라 백그라운드에 비해 20 내지 200배였다.

상기에서 기술한 역상 HPLC 에서의 GGF-Ⅰ및 GGF-Ⅱ분획의 경우에, 각 인자에 대해서 두개의 투여량-반응곡선이 얻어졌는데, 각 인자에 대한 곡선중 하나에 대해서는 정확하게 상기의 방법을 사용하고, 단지 태아 소 혈청 대신에 태아 소 혈장으로 치환하여 검사과정에서 상기의 방법을 변형시켜서 각 인자에 대해서 다른 곡선을 얻었다. 결과를 제 7도 및 제 8도에 나타냈다.

[실시예 2]

정제한 GGF-Ⅰ및 GGF-Ⅱ의 아미노산 서열

고도로 정제된 소 뇌하수체 GGF-Ⅰ및 GGF-Ⅱ를 이용하여 아미노산 서열 분석연구를 수행하였다. 서열을 기술하는데 통상적인 단일문자코드를 사용했다. 환원되고 카르복시메틸화된 샘플에 대해서 수행된 리신 엔도펩티다제 및 프로테아제 V8분해, 11% SDS-PAGE의 55-65RD부위(상기에서 기술한 마커에 상대적인 MW)로부터 용출된 물질에 대해서 수행된 GGF-Ⅱ의 리신 엔도펩티다제 분해에 의하여 펩티드가 얻어졌다.

GGF-Ⅰ에 대해서 전체 21 펩티드 서열(제 9도, SEQ ID NO. 1-20, 169참조) 이 얻어졌는데, 그중에서 12 펩티드(제10도, SEQ IN ND. 1, 22-29, 17, 19, 및 32 참조) 는 현재의 단백질 데이타베이스에 존재하지 않고 따라서 특유한 서열을 나타낸다. GGF-Ⅱ에 대해서는 전체 12 펩티드서열(제11도, SEQ ID NO. 33-39, 51, 52, 164-166 참조) 이 얻어졌는데, 그 중에서 10 펩티드(제12도, SEQ IN ND. 45-53참조) 는 현재의 단백질 데이타베이스에 존재하지 않고 따라서 특유한 서열을 나타낸다(예외는 펩티드 GGF-Ⅱ 06 인데 이것은 아마도 중요하지 않은 적은 수의 잔기가 주어진 많은 단백질에서 동일한 서열을 보인다). 이러한 새로운 서열은 GGF Ⅰ및 Ⅱ의 진정한 아미노산 서열의 일부에 극히 대응하는 것 같다.

명백하게 매우 연관되어 있는 GGF-Ⅰ 07 및 GGF-Ⅱ 12 의 서열에 특별한 관심을 가질 수 있다. 이 유사성은 이 펩티드의 서열은 거의 확실하게 특정된 GGF종의 것이고 대부분 오염단백질로부터 유도된 것같지는 않다는 것을 나타낸다.

게다가, 펩티드 GGF-Ⅱ 02 에서 서열 XSS는 X로 표시된 위치의 아스파라긴에서 N결합된 탄수화물 부분의 존재와 일치한다.

일반적으로, 제 9도 및 제11도에서 X는 확실하게 단일위치를 명명할 수 없는 위치에서 서열결정사이클을 표시하는 미지의 잔기를 나타내는데, 그것은 사이클에서 동일크기의 시그날이 하나이상 있기 때문 또는 어떤 시그날도 존재하지 않기 때문이다. 별표는 명명된 마지막 아미노산이 그 펩티드에 존재하는 마지막 아미노산에 해당하는 펩티드를 표시한다. 남아있는 펩티드에서 명명된 마지막 아미노산 이후의 시그날강도는 그 펩티드의 마지막으로 명명된 서열을 계속시키는데 불충분하였다. 우측 세로난은 NBRF 및 EMBL 서열 데이타베이스를 분석하는 GCG패키지 FASTA 및 TFASTA 프로그램을 이용하여 컴퓨터 데이타베이스 서치한 결과를 나타낸다. 이 세로난에서 단백질의 명칭은 최대 두개의 미스매치(mismatch)를 허용하는, 명명된 펩티드아미노산서열과 그 단백질서열의 일부의 동일성을 표시한다. 의문 부호는 세

개의 미스맴치가 허용된 것을 표시한다. 사용된 약호는 하기와 같다:

HMG-1 높은 유동성그룹 단백질-1

HMG-2 높은 유동성그룹 단백질-2

LH-알파 황체형성 호르몬 알파 서브유니트

LH-베타 황체형성 호르몬 베타 서브유니트

[실시예 3]

정제한 GGF-Ⅰ 및 GGF-Ⅱ의 분열촉진 활성

GGF Ⅰ및 Ⅱ를 포함하나는 고도로 정제된 샘플의 분열촉진 활성을 정량적 방법을 이용하여 연구하였는데, 이것은 단일의 마이크로배양물을 DNA합성, 세포형태, 세포수 및 세포항원의 발현에 대해 조사할 수 있게 한다. 이 기술은 Muir et al., Analytical Biochemistry 185, 377-382, 1990에서 이전에 발표된 방법에서 변형되었다. 주요변형 내용은 하기와 같다; 1)피복되지 않은 마이크로타이터 플레이트의 사용, 2)웰당 세포수, 3)10% 태아 소혈청(FCS) 대신에 5% 태아 소 혈장(FBP) 의 사용, 4)배양물에 동시에 첨가된 분열촉진물질과 브로모데옥시우리딘(BrdU)의 존재하에서의 배양시간, 게다가 세포단일층을 세포의 상실을 피하기위하여 고정하기전에 세척하지 않았고, 단클론성 마우스 안티-BrdU 항체와 퍼옥시다제 컨쥬게이트 염소안티-마우스 면역글로불린(IgG) 항체의 배양시간을 검사의 감도를 증가시키기 위해서 2배로 증가시켰다. 또한 래트 좌골신경 시반세포에 대해서 최적화시킨 검사를 세포배양 조건을 적당히 변화시킨후에 여러세포주에 사용하였다.

Ⅰ. 분열시험방법

첫째날에 정제한 시반세포를 5% FBP/Dulbecco변형이글배지(DMEM)중의 미피복 96 웰 플레이트에 플레이팅하였다(5,000세포/웰). 둘째날에 GGF또는 다른 시험인자를 배양물에 첨가하고, 뿐만아니라 BrdU 를 최종농도 10μM 로 첨가하였다. 48시간후(제 4일째, 배양물을 흡출시킴으로써 BrdU 투입을 종결시키고, 세포를 실온에서 20분 동안 70%에탄올 200μℓ/웰로 고정하였다. 다음에는 세포를 물로 세척하고 37℃에서 10 분간 100μℓ 2N HCl과 배양하여 DNA를 변성시켰다. 흡출후 웰을 0.1M 붕산염 완충액(pH 9.0)으로 채워서 잔류산을 중화시켰다. 그리고 세포를 인산염 완충식염수(PBS) 로 세척하였다. 그 다음엔 세포를 37℃에서 15 분간 50μℓ 의 차단 완충액(0.1% 트리톤X 100 및 2% 정상 염소 혈청을 포함하는 PBS) 으로 처리하였다. 흡출후 단클론성 마우스 안티-BrdU 항체(DaKo Corp., Santa Barbara, CA)(50μℓ/웰, 차단완충액으로 희석시킴 1.4μg/ml) 를 첨가하고 37℃에서 2시간동안 배양하였다. 결합되지 않은 항체는 0.1% 트리톤X-100 을 포함하는 PBS로 세번 세척시켜서 제거하고, 퍼옥시다제-컨쥬게이트 염소 안티-마우스 IgG항체(DaKo Corp., Santa Barbara, CA)(50μℓ/웰, 차단완충액으로 희석시킴 2μg/ml) 를 첨가하고 37℃에서 1시간동안 배양하였다. PBS/트리톤으로 3번세척하고 PBS로 최종세척한 후, 0.05% 가용성 크로모겐 o-페닐렌디아민(OPD)과 0.02% H_2O_2를 포함하는 50mM 인산염/시트르산염 완충액(pH5.0) 100μℓ/웰을 웰에 첨가하였다. 실온에서 5-20 분후에, 각 웰로부터 80 μℓ 를 2N 황산 40 μℓ/웰을 포함하는 클린 플레이트에 피페트로 옮겨부어서 반응을 종결시켰다. 플레이트 계측기(Dynatech Labs)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 계측하였다. 세포단일층을 포함하는 검사 플레이트를 PBS로 두번 세척하고, 불용성 산물을 생성하기 위한 기질 디아미노벤지딘(DAB) 100 μℓ/웰 및 0.02% H_2O_2를 첨가함으로써 BrdU-DNA 에 대해서 면역세포화학적으로 염색하였다. 10-20 분후에 물로 세척함으로써 염색반응을 종결시키고 도립현미경을 이용하여 BrdU-포지티브 핵을 관찰하고 카운팅하였다.

때때로 네가티브 핵은 0.001% 톨루이딘 블루로 대비염색하고 전처럼 카운팅 하였다.

Ⅱ. 분열검사에 사용된 세포주

스위스 3T3섬유아세포: Flow Labs 의 세포를 공기중의 10% CO_2의 습기찬 분위기 에서 37℃로, 10% FCS, 페니실린 및 스트렙토마이신으로 보충된 DMEM 에서 유지하였다. 2 일마다 세포에 영양물질을 공급하거나 또는 2차배양하였다. 분열검사를 위해서, 세포를 완전배지에 5,000세포/웰의 밀도로 플레이팅하고 세포가 밀집되어 정지상태가 될때까지 1주일간 배양하였다. 혈청함유 배지를 제거하고 세포 단일층을 혈청제거-배지로 두번 세척하였다. 분열촉진물질 및 10 μM BrdU를 포함하는 혈청제거 배지 100μℓ 를 각 웰에 첨가하고 48시간 배양하였다. GGF 및 혈청 또는 PDGF(포지티브 콘트롤로서) 에 대한 투여량 반응을 수행하였다.

BHK(베이비 햄스터 신장)21 C13 섬유아세포: European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) 의 세포를 공기중의 5% CO_2의 습기찬 분위기에서 37℃로, 5% 트립토스 인산염 배양즙, 5% FCS, 페니실린 및 스트렙토마이신으로 보충된 글래스고우 변형 이글배지(GMEM)에서 유지하였다. 2 내지 3일마다 세포에 영양물질을 공급하거나 또는 2차배양하였다. 분열검사를 위해서, 세포를 24시간동안 완전배지에 2,000세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 그 다음엔 혈청함유배지를 제거하고 혈청제거배지로 세척한후 0.1% FCS 함유 GMEM 또는 GMEM 단독 100μℓ 로 대체하였다. 10μM BrdU와 함께 포지티브 콘트롤로서 GGF 및 FCS 또는 bFGF 를 첨가하고, 48 시간동안 배양하였다. 그 다음 세포배양물을 시반세포에 대해 기술한 대로 처리하였다.

C6 래트 신경교종 세포주: 계대수 39 에서 얻어진 세포를 공기중의 10% CO_2의 습기찬 분위기에서 37℃로, 5% FCS, 5% 말 혈청(HS), 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 에서 유지하였다. 3 일마다 세포에 영양물질을 공급하거나 또는 2차배양하였다. 분열검사를 위해서, 세포를 24 시간동안 완전배지에 2,000세포/웰의 밀도로 플레이팅하고 24시간배양하였다. 그다음 혈청제거배지로 세척한후, 0.1% FCS를 포함하는 F12 배지와 DMEM 의 1:1혼합물로 배지를 대체하였다. 그후 GGF, FCS 및 αFGF 에 대한 투여량 반응을 수행하고 이전에 다른 세포유형에 대해 기술한 대로 ELISA를 통해서 세포를 처리하였다.

PC12(래트 부신 크롬친화성세포종 세포): ECACC의 세포를 공기중의 5% CO_2의 습기찬 분위기에서 37℃로, 콜라겐 피복된 플라스크에서, 10% HS, 5%, FCS, 페니실린 및 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640에서 유지하였다. 3 일마다 80%의 배지를 대체함으로써 세포에 영양물질을 공급하였다. 분열검사를 위해서, 세포를 콜라겐 피복된 플레이트(50 μℓ/웰 콜라겐, Vitrogen Collagen Corp., 37℃에서 30분, 1:50희석) 상의 완전배지에 3,000세포/웰의 밀도로 플레이팅하고, 24시간 배양하였다. 그 다음 배지를 새로운 RPMI 단독 또는 1mM인슐린이나 1% FCS 를 포함하는 것으로 대체하였다. 포지티브 콘트롤로서 FCS/HS(1:2)및 GGF에 대한 투여량 반응을 이전처럼 수행하였다. 48시간후에 세포를 고정하고 이전에 기술한대로 ELISA를 수행하였다.

III. 분열검사의 결과

본 실시예에서 주어진 모든 실험은 GGF-Ⅰ과 GGF-Ⅱ의 혼합물(GGF) 을 포함하는 세파로스 12 크로마토그래피 정제 단계(실시예 1의 섹션 D참조) 의 고도로 정제된 샘플을 이용하여 수행되었다.

먼저 BrdU 삽입 검사로 얻어진 결과를, J. P. Brockes(Methods Enzymol. 147: 217, 1987)에 의해 기술된, 분열세포의 DNA속으로의 [125]Ⅰ-UdR 삽입에 기초한 시반세포에 대한 고전적인 분열검사와 비교하였다.

제13도는 동일한 세포배양조건(GGF의 존재하에서 48시간동안 배양한, 5% FBP/DMEM 중의, 5,000 세포/웰) 에서 수행된 두 검사로 얻어진 데이타의 비교를 나타낸다.

명백하게 보여지는 것처럼, 결과는 필적하지만 BrdU 삽입검사가 다소 더 민감한것 같은데, 이것은 그래프의 좌측, 즉 GGF의 보다 더 낮은 농도로 곡선이 이동하는 것에 의해 제안된다.

섹션" 분열시험방법" 에서 기술된대로, OPD 퍼옥시다제 반응의 가용성 산물의 강도를 계측함으로써 면역반응성 BrdU-DNA 를 정량한후에, 세포단일층을 포함하는 본래의 검사플레이트를 불용성 DAB생성물을 야기하는 두번째 반응을 시킬 수 있고, 이 생성물은 BrdU 포지티브핵을 염색시킨다. 그다음 도립현미경하에서 마이크로 배양물을 조사할 수 있고, 세포형태 및 BrdU-포지티브 핵과 네가티브 핵의 수를 관찰할 수 있다.

제 14a도 및 제 14b도에서는 490nm에서 흡광도 계측에 의해 평가된 BrdU-DNA 면역반응성이 동일한 배양물에서 카운팅된, 웰당 세포의 전체수에 대한 BrdU-포지티브 핵의 퍼센트 및 BrdU-포지티브 핵의 수와 비교되었다. 표준편차는 10%이하였다. 두 평가방법은 매우 양호한 관계를 나타내며 GGF의 최고투여량에서의 값사이의 불일치는 BrdU-포지티브로서 검출된 세포에서 DNA합성의 다른 정도에 의해 설명될 수 있다.

따라서 BrdU 삽입검사는 (125)I-UdR 삽입 검사와 비교했을때 시반세포에 대한 폴리펩티드의 생물학적활성에 대한 부가적인 유용정보를 제공한다. 예컨대, 제15도에서 발표된 데이타는 GGF가 시반세포에 작용하여 DNA합성을 유도하지만, 보다 낮은 투여량에서는 48시간후 마이크로 배양물에 존재하는 네가티브 세포의 수를 증가시킬 수 있다는 것을 보여준다.

그 다음 이 검사를 공급원이 다른 여러 세포주에 이용하였다. 제16도에서는 GGF 에 대한 시반세포 및 스위스 3T3섬유아세포의 분열촉진활성을 비교하였다; 3T3섬유아세포에서 얻어진 약한 반응에도 불구하고, 일부 명백하게 BrdU-포지티브인 핵이 이 배양물에서 검출되었다. 몇몇 투여량의 FCS 또는 인간재조합 PDGF 의 존재하에 콘트롤 배양을 수행했는데, 이것은 세포가 적합한 자극에 반응할 수 있는 것을 보여준다(도시되지 않음).

섬유아세포가 GGF에 반응할 수 있는 능력을 BHK 21 C13 세포주를 이용하여 더욱 조사하였다. 신장에서 추출된 이 섬유아세포는 밀집될때 정지상태에 도달하거나 접촉저해를 나타내지 않는다. 따라서 세포생존력을 위태롭게 하지 않고 매우 낮은 백그라운드 증식을 갖도록 실험조건을 고안하였다. 제17도 및 제18도에서 보여지는 것처럼 GGF는 BHK 21 C13 세포에 대한 상당한 분열촉진활성을 갖는다. 제17도는 0.1% FCS 의 존재하에서 GGF에 의해 자극된 BHK 21 C13 세포에 의해 DNA속에 BrdU 가 삽입되는 것을 보여준다. FCS 에 대한 양호한 분열촉진 반응은 세포배양 조건이 제한되지 않는 것을 나타낸다.

제18도에서 GGF의 분열촉진 효과는 웰당 카운팅된 세로의 전체수로서 그리고 BrdU-포지티브 및 BrdU-네가티브 세포의 수로서 표현된다. 데이타는 이중으로 행해진 두 실험의 전형이다; 웰 당 적어도 3 필드가 카운팅되었다. 시반세포에 있어서 낮은 투여량에서의 증식효과에 대해 관찰했을때, GGF 는 도한 생존하는 비반응세포의 수를 증가시킨다. BrdU포지티브 세포의 퍼센트는 배양물에 첨가된 GGF의 증가하는 양에 비례한다. 보다 더 높은 투여량의 GGF의 존재하에서 48 시간후 세포의 전체수는 적어도 2배로 되는데, 이것은 GGF가 BHK 21 C13 세포에서 DNA합성 및 증식을 유도하는 것을 확인시켜준다. 동일한 조건하에서, 2% FCS의 존재하에서 48시간동안 유지된 세포는 약 6배의 증가를 보였다(도시되지 않음).

C6 신경교종 세포는 신경교질세포 성질을 연구하는데 유용한 모델을 제공한다. 발현되는 표현형은 세포계대에 좌우되는 것같아서, 초기단계에서는 세포가 보다 밀접하게 성상세포 표현형을 닮고 이후의 단계(계대 70 을 넘어서는 단계)에서는 과돌기 신경 교세포 표현형을 닮는다. 이 실험에서 사용된 C6 세포는 계대 39 내지 계대52 이었다. C6세포는 매우 증식하는 집단이다. 따라서 매우 낮은 백그라운드의 BrdU 삽입을 나타내도록 실험조건을 최적화 했다. FCS 에 대한 투여량반응(제19도) 에서 보여지듯이, 분열촉진 반응에 크게 영향을 주지않고 세포생존력을 유지하기 위해서는 0.1% 혈청의 존재가 필요하였다.

제20도에서 aFGF(산성 섬유아세포 성장인자)에 대한 분열촉진반응은 FCS(8%)의 존재하에 얻어지는 최대 BrdU 삽입의 퍼센트로서 표현된다. 값은 이중으로 수행된 두 실험의 평균이다. GGF 의 효과는 aFGF 의 순수제제의 효과에 필적하였다. aFGF는 C6 세포에 대한 특이적인 성장인자로서 기술되었고(Lim R. et al., Cell Regulation 1: 741-746, 1990)그런 이유때문에 포지티브 콘트롤로서 사용되었다. BrdU포지티브 및 네가티브 세포의 직접적인 카운팅은 마이크로 배양물에서의 높은 세포밀도 때문에 가능하지 않았다. 지금까지 발표된 세포주와는 대조적으로, PC12 세포는 PC12가 혈청(세포유지에 흔히 사용되는 FCS와 HS 의 혼합물) 에 반응할 수 있는 배양 조건하에서 처리했을때 GGF에

대한 어떤 명백한 반응성을 나타내지 않았다. 그럼에도 불구하고 웰당 플레이팅된 세포의 수는 PC12세포의 행동에 영향을 미치는 것같고, 따라서 추가의 실험이 요구된다.

[실시예 4]

GGF-Ⅰ 및 GGF-Ⅱ펩티드를 함유하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 분리 및 클로닝

GGF-Ⅱ뉴클레오티드 서열의 분리 및 클로닝은 펩티드 서열정보 및 라이브러리 스크리닝을 이용하여 여기서 개략되고 하기에서 개시되는대로 수행하였다. 제4도 및 제 5도의 펩티드는 여기서 기술되는 기술에 따라서 GGF-Ⅰ서열의 분리 및 클로닝의 출발점으로 이용할 수 있는 것이 이해될 것이다. 참으로 제21도(SEQ ID NO. 54-88)는 이 목적을 위한 가능한 축퇴 올리고뉴클레오티드 프로브를 나타내고, 제23도(SEQ ID NO. 90-119)는 가능한 PCR프라이머를 나열한다. DNA 서열 및 폴리펩티드서열은 GGF-Ⅱ에 대해서 이 수단에 의해 획득가능해야 하고, 또한 그런 DNA서열이 삽입된 DNA 구조체 및 발현벡터, 그러한 구조체/벡터가 삽입됨으로써 유전적으로 변형된 숙주세포, 그러한 숙주세포를 배양함으로써 획득할 수 있는 단백질도 획득가능해야 한다.

본 발명은 그러한 발명의 요지를 포함한다.

Ⅰ. 올리고뉴클레오티드 프로브 및 프라이머의 고안 및 합성

축퇴 DNA올리고머 프로브는 아미노산서열(정제한 GGF단백질에서 생성된 펩티드로부터 유도됨)을 뉴클레오티드 서열로 역번역하여 고안하였다. 올리고머는 DNA 서열중 코딩가닥 또는 비-코딩가닥을 나타낸다. 세린, 아르기닌 또는 류신이 올리고머 고안에 포함될때에는 불명확함을 피하기 위해 두개의 별도의 합성물을 제조하였다. 예컨대 세린은 537및 538 또는 609및 610에서와 같이 TCN 또는 AGY에 의해 암호화된다. 아르기닌 또는 류신에 대해서도 유사한 코돈 분할이 행해졌다(가령 544, 545). 0.2 마이크로몰 크기의 합성으로 작동된 β-시아노에틸화학을 이용한 Biosearch 8750 4-컬럼 DNA 합성기에서 DNA올리고머를 합성하였다. 올리고머를 컬럼(500옹스트롬 CpG수지)에서 절단시키고 55-60℃에서 6-24 시간동안 농축 수산화 암모늄에서 탈보호하였다. 탈보호된 올리고머를 진공(Speedvac)하에 건조시키고 7M 우레아를 함유하는 50mM Tris-붕산염-EDTA 완충액, 15% 아크릴아미드(20 모노:1비스) 의 겔에서 전기영동으로 정제하였다. UV조사에 의해 겔에서 전체길이의 올리고머를 검출하고, 밴드를 잘라내고, 교반하면서, 4-16시간동안 1.5ml H_2O 속으로 DNA올리고머를 용출시켰다. 용출물을 건조시키고 0.1ml H_20 에 재용해시키고, 260nm에서 흡광도 측정을 하였다.

농도는 하기의 식에 따라서 결정되었다:

(A 260×유니트/ml)(60.6/길이-XμM)

모든 올리고머를 H_2O 의 첨가에 의해 50 μM 농도로 조정했다.

상기에서와 같이 고안된 축퇴프로브는 제21도, SEQ ID NO. 54-88에서 보여진다. PCR프라이머는 프로브에 대해 사용된 것과 본질적으로 동일한 방법에 의해 하기와 같이 변형시켜서 제조했다. 제한부위를 포함하는 13 뉴클레오티드의 링커가 벡터속에 클로닝시키는데 사용하기 위해서 축퇴 올리고머의 5' 말단에 포함되었다. 1,000 옹스트롬 CpG수지를 이용하여 1마이크로몰 크기로 DNA합성을 수행하고 네개의 뉴클레오티드 모두가 정상적으로 축퇴 프로브속에 삽입되는 위치에서 이노신을 사용하였다. PCR 프라이머의 정제에는 겔 전기영동정제후 에탄올 침전이 포함되었다.

Ⅱ. 라이브러리 제조 및 스크리닝

소의 게놈 DNA 라이브러리는 Stratagene 에서 구입했다(카탈로그번호: 945701). 라이브러리는 벡터 람다 Dash II 속으로 클로닝된 2×10^6 15-20Kb Sau3A1 부분 소 DNA단편을 포함하였다. 소의 전체 뇌 cDNA 라이브러리는 Clontech에서 구입했다(카탈로그 번호: BL10139). 소의 전체 뇌로부터, 소의 뇌하수체로부터 그리고 소의 뇌하수체 후엽으로 부터 제조한 mRNA 로부터 상보 DNA라이브러리가 제조되었다(In Vitrogen; Stratagene). In Vitrogen 은 두 cDNA 라이브러리를 제조했는데, 한 라이브러리는 벡터 람다 g10이며 다른것은 벡터 pcDNAI(플라스미드 라이브러리)이다. Stratagene라이브러리는 벡터 람다 unizap 에서 제조되었다. 일괄하여 cDNA 라이브러리는 1400 만 일차 재조합 파지를 포함하였다. 소의 게놈 라이브러리를 플레이트상 150,000내지 200,000파지 플라크로 23 ×23cm플레이트(Nunc)상의 E. coli K12 숙주 균주 LE392에 플레이팅하였다. 각 플레이트는 대략 하나의 소 게놈 등가물을 나타냈다. 37℃에서 하룻밤 배양한후, 플레이트를 냉각시키고 Maniatis et al.(2: 60-81)의 방법에 따라 복제 필터를 제조하였다. 각 플레이트로부터 4개의 플라크 리프트를 비충전 나일론 막(Pall Biodyne A 또는 MSI Nitropure)위에 만들었다. 5 분간 UV 광에서 가교시킴으로써 또는, 2시간동안 진공하에 80℃에서 베이킹함으로써 DNA를 막위에 고정화시켰다. 공급자의 명세서에 따라서 T4 폴리뉴클레오티드 키나제(New England Biolabs)를 이용하여 감마 ^{32} PATP(New England Nuclear; 6500Ci/mmol) 로 DNA 프로브를 표지화시켰다. 요컨대 50pmol 의 축퇴 DNA올리고머를 600μCi 감마^{32} P-ATP 및 5유니트 T4 폴리뉴클레오티드 키나제의 존재하에 30 분간 37℃에서 배양하였다. 반응을 종결시키고, 겔 전기 영동 로딩 완충액을 가한 다음 방사성표지된 프로브를 전기영동으로 정제하였다. 겔조각에서^{32} P 표지된 프로브를 절단해내고 물속으로 용출시켰다. 또다르게는, Schowalter 및 Sommer, Anal. Biochem 177: 90-94(1989) 의 프로토콜에 따라서 α-^{32} P-dATP 또는 α-^{32} P-dCTP의 삽입에 의한 PCR증폭을 통해서 DNA프로브를 표지화시켰다. PCR 반응으로 표지화된 프로브를 세파덱스 G-150컬럼에서 탈염시킴으로써 정제하였다.

예비혼성화 및 혼성화는 GMC완충액(0.52M NaPi, 7% SDS, 1%BSA, 1.5mM EDTA, 0.1M NaCl 10mg/ml tRNA)에서 수행되었다. 세척은 올리고와시(oligowash)(160ml 1M Na_2HPO_4, 200ml 20% SDS, 8.0ml 0.5M EDTA, 100ml 5M NaCl, 3632ml H_20)에서 수행 되었다. 전형적으로, 10소 게놈 등가물의 복제카피를 나타내는 20필터 (각각 400cm^2)를 100pmol의 축퇴 올리고뉴클레오티드 프로브(128-512배 축퇴) 를 갖는 혼성화용액 200ml 에서 배양하였다. 축퇴 프로브에 대해 계산된 최소 융해온도 5℃이하에서 하룻밤 동안 혼성화가 일어나도록 하였다. 최소 융해온도의 계산에서 한 AT 쌍에 대해서 2℃ 그리고 한 GC 쌍에 대해서 4℃로 가정하였다.

필터를 혼성화온도에서 4내지 5시간 올리고와시의 반복된 변화에서 세척하고, 최종적으로 DNA 프로브길이에 좌우되는 온도에서 30 분간 두번 3.2M 염화테트라메틸암모늄, 1% SDS에서 세척했다. 20량체에 대해서 최종세척온도는 60℃였다. 필터를 세우고 보력스크린(Dupont cronex Ligntening Plus) 을 이용하여 X-레이 필름(Kodak XAR5)에 노출시켰다. 대개, 이 라이브러리 스크린에서 이중시그날을 검출하기 위해서는 -80℃에서 3내지 5일 필름노출이 충분하였다. 이 결과의 분석후, 필터를 프로브제거하고 재프로브화할 수 있다. 10mM EDTA(pH8)을 포함하는 1% SDS용액에서 전체동력의 마이크로파 오븐에서 15분간의 두번의 연속사이클을 통해 배양함으로써 필터를 프로브제거했다. 프로브제거 및 각종 프로브로의 재프로브화의 적어도 3 내지 4사이클을 통해서 필터를 처리하였다.

III. 재조합 파지 분리, 생장 및 DNA제조

이 방법은 재조합 DNA (Maniatis et al 2: 60-2:81) 에 기재된 표준프로토콜대로 수행하였다.

IV. DNA 분해와 서던 블롯을 이용한 분리된 클론의 분석

재조합파지 DNA 샘플(2μg)을 제한엔도뉴클레아제 공급자(New England Biolabs) 에 의해 추천된 조건에 따라서 분해시켰다. 37℃에서 4시간 배양후, 0.1M 아세트산나트륨 및 3체적의 에탄올의 존재하에서 반응산물을 침전시켰다. 침전된 DNA를 원심분리로 모으고, 75% 에탄올로 헹구고 건조시켰다. 모든 재현탁 샘플을 아가로스겔(전형적으로 TAE 완충액; 0.04M 트리스아세트산염, 0.002M EDTA중에서 1%)에 로딩하였다. 겔 전개는 4내지 20시간 cm당 1볼트였다. 마커에는 람다 Hind IIIDNA 단편 및/또는 φX174 HaeIIIDNA 단편(New England Biolabs) 이 포함되었다. 겔을 0.5μg/ml의 브롬화에티듐으로 염색하고 사진을 찍었다. 서던블로팅을 위해서, DNA 를 먼저 0.125N HCl로 처리하여 겔에서 탈퓨린시키고, 0.5N NaOH에서 변성시키고, 비충전 나일론막으로 20 ×SSC(3M 염화나트륨, 0.03M 시트르산

나트륨) 중에서 이동시켰다. 블로팅은 6시간내지 24 시간 행해졌고, 필터를 0.5M Tris HCl pH 7.5, 0.15M 염화나트륨에서 중화시키고, 그다음 50mM Tris-붕산염 EDTA 에서 간단히 헹구었다.

교차결합을 위해서, 필터를 먼저 투명 플라스틱 랩으로 싼다음, DNA 면을 5분동안 자외선에 노출시켰다. 혼성화 및 세척은 라이브러리 스크리닝에 대해 기재된 것처럼 수행하였다(본 실시예의 섹션 2 참조). 유사한 유전자가 다른 종에서 존재하는지의 여부를 결정하기 위한 혼성화 분석을 위해 약간 변형을 시켰다. DNA 필터는 Clonetech에서 구입하였고(카탈로그번호 7753-1) 레인당 각종 종들의 EcoRI 분해된 DNA 5μg 을 포함한다. 상기의 섹션 2에서 기술된 것처럼 PCR증폭반응에 의해 프로브를 표지화시키고, 10% 황산덱스트란을 포함하는 80%완충액 B(2g 폴리비닐 피롤리딘, 2g Ficoll-400, 2g 소혈청 알부민, 50ml 1M Tris-HCl(pH7.5) 58g NaCl, 1g 피로인산나트륨, 10g 황산도데실 나트륨, 950ml H_2O)에서 혼성화를 행하였다. 10분간 끓인다음 얼음물에서 급속 냉각시켜서 프로브를 변성시켰다. 프로브를 ml 당 10^6 dpm^{32} P 로 혼성화 완충액에 첨가하고 60℃에서 하룻방 배양하였다. 필터를 60℃에서 먼저 완충액 B 그 후 2×SSC, 0.1% SDS 그다음 1×SSC, 0.1% SDS 에서 세척하였다. 높은 긴축을 위해서, 실험, 최종세척을 0.1×SSC, 1% SDS 에서 행하고 온도를 65℃로 올렸다.

서던블롯 데이타를 이용하여 게놈 클론의 제한지도를 만들고 소 단편이 GGF 프로브(서브클로닝의 후보) 에 혼성화하는 것을 나타냈다.

Ⅴ. 혼성화 프로브에 상동적인 DNA절편의 서브클로닝

DNA 분해물(가령, 5μg)을 1% 아가로스 겔에 로딩한 다음 염색후 겔에서 적당한 단편을 절단하였다. DNA 는 유리 비드에 흡착시킨후 공급자(Bio 101) 에 의해 기술된 프로토콜을 이용하여 용출시켜서 정제하였다. 회수한 DNA단편(100-200ng)을 pUC18의 유도체인 pT3T7(Ambion)등의 선형화된 탈인산화 백터에 T4 리가제(New England Biolabs)를 이용하여 결합시켰다. 이 벡터는 E. coli β-락탐아제 유전자를 운반하여, 암피실린을 함유한 플레이트에서 형질전환체를 선택할 수 있다. 이 벡터는 또한 숙주에 β-갈락토시다제 상보성을 제공하며, 따라서 이소프로필티오 갈락토시드 및 블루갈(Bluogal)(Bethesda Research Labs)을 이용하여 비-재조합체(청색)를 검출할 수 있다. 결합반응물의 일부를 이용하여 E. coli K12 XL1블루 수용 가능세포(competent cell)(Stratagene 카탈로그 번호: 200236) 를 형질전환시킨 다음, 암피실린 ml 당 50μg 을 포함하는 LB 플레이트에서 형질전환체를 선택하였다. 백색콜로니를 선택하고 DNA분해 및 DNA서열 분석을 위해 플라스미드 미니프렙(mini prep)을 제조하였다. 선택된 클론을 재시험하여 그것의 삽입체 DNA가 GGF프로브에 혼성화하는지를 결정하였다.

Ⅵ. DNA 서열결정

표준프로토콜에 따라서 5ml배양물에서 이중가닥 플라스미드 DNA주형을 제조 하였다. 서열결정은 제조자 프로토콜(Sanger et al, PNAS; USA 74: 5463 (1977)의 변형)에 따라서 Sequenase 2.0 및 디데옥시뉴클레오티드 서열결정키트(US Biochemical)를 이용한 디데옥시 사슬 종결방법에 의해 수행되었다. 또 다르게는, 서열결정이 사이클 서열결정키트(New England Biolabs; Bethesda Research Laboratories)를 이용하여 DNA 열사이클러(Perkin Elmer, 모델 4800)에서 행해졌고, 5'-말단표지화된 프라이머를 이용하여 제조자 지시에 따라서 수행되었다. 서열프라이머는 서열결정 키트로 공급된 것이거나 또는 클론으로 부터 결정된 서열에 따라서 합성되었다. 서열결정 반응물은 6% 폴리아크릴아미드의 0.4mm두께의 서열 결정 겔상에서 로딩되고 전개되었다. 겔을 건조시키고 X-레이 필름에 노출시켰다. 전형적으로 표준 서열결정키트를 사용할때에는^{35} S 가 삽입되고, 사이클 서열결정 반응에는^{32} P 말단표지화된 프라이머가 사용된다. 겔의 아래쪽부터 윗쪽까지(5' 에서 3' 으로의 방향) 서열이 DNA서열에디터로 판독되었다. 이 데이터를 Genetics Computer Group(GCG, University of Wisconsin) 에 의해 공급된 프로그램을 이용하여 분석하였다.

Ⅶ. RNA 제조 및 PCR증폭

GGF펩티드를 암호화하는 서열을 포함하고 게놈 DNA에서 검출되는 오픈 리딩프레임을 뇌하수체 RNA의 PCR 증폭을 통해 연장시켰다. 구아니딘 중성-CsCl방법(Chirgwin et al, Biochemistry 18: 5294 (1979)에 따라서 동결된 소의 조직(Pelfreeze) 으로부터 RNA를 조제하였다. 폴리아데닐화된 RNA는 올리고-dT 셀룰로스 컬럼 크로마토그래피(Aviv 및 Leder PNAS(USA) 69:1408 (1972)에 의해 선택되었다.

Perkin Elmer PCR/RNA 키트번호: N 808-0017를 이용하여 cDNA 로 전환되는 전체 RNA 또는 폴리아데닐화된 RNA샘플로 시작하여 특정 DNA표적서열을 증폭시켰다. 제 1가닥 역전사반응에는 1μg 주형 RNA및 제한효소 인식부위 링커가 연결된 올리고 dT 의 프라이머 또는 제한 부위가 연결된 클로닝된 서열로부터 결정된 특이적인 안티센스 프라이머가 사용되었다. 제 2가닥을 생성하기 위한 프라이머는 3'RACE 반응(Frohman et al., PNAS(USA) 85: 8998(1988)) 에서 사용된 플러스 가닥 특유서열이거나, 또는 제 1가닥반응생성물을 dATP 로 터미날 트란스페라제 테일링(tailing) 시켜서 제 2표적부위가 첨가된다면 제한 부위가 연결된 올리고 dT 프라이머이다(가령, 5' RACE 반응은 Frohman et al. 의 동일문헌 참조). 또 다르게는, 고정된 PCR반응에서와 같이 제 2가닥 프라이머가 축퇴이어서 특정 펩티드서열을 나타낸다.

증폭 프로필은 하기의 일반 도해와 같다: 1) 95℃에서 5분 침액파일; 2) 열사이클 파일로서 95℃에서 1분; 45℃, 50℃ 또는 55℃의 어닐링 온도까지 1분간 온도를 떨어뜨리고; 어닐링 온도를 1분간 유지하고; 1 분간 72℃까지 온도를 상승시키고; 1 분동안 72℃에서 연장시키거나 1분 + 10 초동안 자동연장시키고; 3) 5분동안 72℃에서 연장사이클; 4) 무한시간동안 4℃에서 침액파일, 열사이클 파일(#2)은 대개 30 사이클동안 진행되었다. 각 100μℓ 증폭반응의 16μℓ 샘플은 3시간동안 1cm당 4볼트에서 TAE완충액중에서 전개된 2% Nusieve 1% 아가로스겔에서의 전기영동에 의해 분석하였다. 겔을 염색한 다음, 프라이머에 내재적인 표지화된 DNA 프로브로 프로브화된 비충전 나일론막에 블로팅하였다.

DNA 증폭산물의 특정 세트는 블로팅실험에서 확인될 수 있고 그것의 위치는 정제 및 재증폭의 지침으로 사용되었다. 적합하면 선택된 샘플의 남아있는 부분을 조제 겔에 로딩하고, 그 다음 전기영동하고, 겔로부터 0.5mm두께의 4 내지 5조각(특정산물의 기대되는 위치를 함유하는 조각)을 취하였다. 이 아가로스를 으깬다음, 40℃에서 2-16시간동안 0.5ml의 전기영동 완충액에 침액시켰다. 으깬 아가로스를 2분간 원심분리하고, 수층을 새로운 튜브로 옮겼다. 재증폭은 원래의 반응에서와 같은 반응 프로필 및 동일한 세트의 프라이머를 이용하여 용출된 물질의 5μℓ(생성물의 약 1%)에 대해서 수행되었다. 재증폭 반응이 완결된후, 샘플을 클로로포름으로 추출하고 새로운 튜브로 옮겼다. 링커에 존재하는 제한부위에서 절단하기 위해서 농축된 제한효소 완충액과 효소를 반응물에 첨가하였다. 분해된 PCR생성물을 겔 전기영동으로 정제한 다음, 상기의 서브클로닝 섹션에서 기술된 벡터속에 서브클로닝하였다.

DNA서열결정은 상기에서 기술한 대로 수행되었다.

Ⅷ. DNA 서열분석

DNA서열은 단편 어셈블리 프로그램을 이용하여 조립되었고 아미노산서열은 GCG 프로그램 GelAssemble, Map 및 Translate에 의해 추론되었다. 추론된 단백질 서열은 WordSearch 를 이용하여 단백질 서열 데이타베이스를 서치하기 위한 의문의 서열로서 사용되었다.

분석은 VMS 5.1에서 작동하는 VAX 스테이션 3100 워크스테이션에서 행해졌다. 데이타베이스 서치는 GCG Version 7.0을 이용하여 SwissProt release number 21에서 행해졌다.

IX. GGF-Ⅰ과 GGF-Ⅱ를 암호화하는 유전자의 클로닝 및 서열결정의 결과

상기에서 기술한대로, 소의 GGF-Ⅱ를 암호화하는 DNA서열을 밝혀내기 위해서 GGF-Ⅱ펩티드서열로 부터 축퇴 올리고뉴클레오티드 프로브를 고안하였다. 정제한 GGF-Ⅱ제제(제11도및 제12도참조) 의 리신 엔도펩티다제 분해를 통해 생성된 펩티드, GGF-Ⅱ12(SEQ ID NO. 44)는 정제한 GGF-Ⅰ 제제에서 생성된 트립신에 의한 펩티드, GGF-Ⅰ 07(SEQ ID NO. 39)과 강한 아미노산서열 상동성을 나타냈다. 따라서 GGF-Ⅱ 12 는 10개의 축퇴 올리고뉴클레오티드 프로브를 생성하는데 이용되었다(각각 제21도, SEQ ID NO. 69.70,71 및 79 의 올리고 609, 610 및 649내지 656참조). GGF-Ⅱ 12 의 두 중첩 부분을 암호화하는 프로브의 두 세트(세트 1=609, 610; 세트2=649-656) 로 필터의 이중세트를 프로브화 하였다. 혼성화 시그날이 관찰되었지만 단지 한 클론만이 두 프로브세트에 혼성화되었다. 이 클론(GGF2BG1) 을 정제하였다.

파지클론 GGF2BG1의 DNA의 서던 블롯분석은 두 세트의 프로브가 소 DNA서열과 혼성화되는 것을 확인시켜주고, 더욱이 양 프로브가 클론내에서 동일한 세트의 DNA단편과 반응하는 것을 보였다. 이러한 실험에 기초하여 원래의 클론의 4Kb EcoRI 소-단편을 밝혀내고, 서브클로닝하고 부분적으로 서열결정하였다. 제22도는 뉴클레오티드서열(SEQ ID NO. 89) 및 초기 DNA 서열 판독의 추론된 아미노산 서열을 나타내는데, 이것을 프로브 609및 650의 혼성화 부위를 포함하고 이 소의 게놈 DNA의 일부가 펩티드12(KASLADSGEYM) 를 암호화하는 것을 확인시켜주었다.

추가의 서열분석은 추정되는 소 GGF-Ⅱ유전자와 cDNA 를 나타내는 중복서열의 분리를 위한 출발점이 되는 66 아미노산 오픈 리딩프레임상에 GGF-Ⅱ 12가 위치하는 것을 나타냈다(하기참조). 몇가지의 PCR 방법을 이용하여 추정되는 소 GGF-Ⅱ유전자에 대한 추가의 코딩서열을 얻었다. 소전체 뇌하수체, 뇌하수체 전엽, 뇌하수체 후엽, 및 시상하부로부터 전체 RNA및 올리고 dT-선택된(폴리 A함유) RNA샘플을 얻었다. 제23도, SEQ ID NO. 109-119에서 보여지는 리스트의 프라이머를 이용하여, 한쪽 PCR 반응(RACE) 을 이용하여 3' 및 5' 방향으로 cDNA 말단을 증폭시키고, 부가적인 GGF-Ⅱ 펩티드를 나타내는 축퇴 올리고뉴클레오티드 프라이머로 고정된 PCR반응을 수행하였다.

제24도는 이 실험에서 얻어진 인접한 DNA구조 및 서열을 요약하고 있다. 3' RACE 반응으로 부터 3개의 다르게 스플라이싱되는 서열을 생성하고, 클로닝하고, 서열결정하였다. 5' RACE 반응은 적어도 52 아미노산의 코딩서열을 포함하는 추가의 엑손의 발견으로 이끌었다. 그 추론된 아미노산 서열의 분석은 GGF-Ⅰ-18 과 유사한 서열 및 펩티드 GGF-Ⅱ-6을 나타냈다(하기참조). 고정된 PCR반응은 300bp의 추가의 cDNA절편내에 포함된 펩티드 GGF-Ⅱ-1,2,3, 및 10 의(cDNA)코딩서열의 확인으로 이끌었다. 이 절편(즉, 절편 E, 제31도참조) 의 5' 한계는 펩티드 GGF-Ⅱ-1을 암호화하고 PCR 반응에서 사용된 올리고뉴클레오티드에 의해 정의된다(추가의 5' 서열 데이타는 실시예 6에서 인간클론에 대해 기술된 것과 같이 존재한다). 따라서 이 클론은 존재하는 전체 9개의 새로운 GGF-Ⅱ펩티드 서열중에서 6가지를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

클로닝된 유전자는 먼저 GGF2BG1의 물리적 지도를 제조함으로써 특정화시키는데, 이것은 그것들이 발견된 채로 코딩서열을 위치시킬 수 있게 한다(하기의 제25도 참조). 상기에서 기술한 코딩서열로부터의 DNA프로브를 이용하여 이 파지클론상에서 엑손을 포함하는 DNA단편을 식별하고 양 방향으로 중복되는 클론을 식별하였다. 추정되는 소 GGF-Ⅱ유전자는 적어도 5 코딩 절편으로 나누어진다. 코딩 절편은 일반적인 유전암호를 이용하여 폴리펩티드 서열로 번역될 수 있는 일정한 길이의 DNA서열로서 정의 된다. 제31도에서 기술되고 본 출원에서 언급되는 코딩 절편은 하기와 같다;

1) GGF 유전자내에 존재하는 특별한 엑손(가령 코딩절편 a), 또는 2) mRNA의 특정 소그룹에서 보이는 둘이상의 엑

손 세트로부터 추출되는 특별한 엑손으로서, 각 세트는 보여지는 유전자 산물에서와 같이 특정 폴리펩티드 절편으로 번역될 수 있다. 청구범위에서 나타나는 폴레펩티드 절편은 유사한 DNA코딩절편의 번역 산물이다. 단지 코딩절편 A와 B만이 엑손으로서 정의되고 지금까지 서열결정 및 매핑되었다. 확인된 인접한 코딩서열의 개요는 제26도에서 보여진다. 엑손이 그것의 발견순서대로 (알파벳순으로) 나열되어 있다. 엑손 B가 코딩절편 E와 코딩절편 A를 연결하는 cDNA 에 포함될 수 있는 것은 인트론/엑손 경계로부터 명백하다. 즉 엑손 B는 리딩프레임을 깨뜨리지 않고 스플라이싱될 수 없다. 따라서 3가지의 다른 스플라이싱 패턴은 추정되는 소 GGF-Ⅱ cDNA 서열 1,2 및 3을 생성할 수 있다고 본 발명자는 제안한다. GGF2BPP1, CDS, GGF2BPP2. CDS 및 GGF2BPP3. CDS로 표시되는 코딩서열은 각각 제 28a도(SEQ ID NO. 133), 제 28b도(SEQ ID NO. 134), 및 제 28c도(SEQ ID NO. 135)에 주어져 있다. 3 가지의 cDNA 의 추론되는 아미노산 서열도 또한 제 28a도(SEQ ID NO. 133), 제 28b도(SEQ ID NO. 134), 및 제 28c도(SEQ ID NO. 135)에 주어져 있다.

3가지의 추론되는 구조는 길이 206, 281 및 257아미노산의 단백질을 암호화 한다. 추론된 단백질서열의 첫 183개의 잔기는 세가지 유전자 산물 모두 동일하다. 위치184 에서 클론들은 상당히 다르다. GGF2BPP1에서 글리신의 코돈 GGT는 또한 GGF2BPP2와 GGF2BPP3 의 스플라이싱 도너로서 작용하고, 이것은 각각 다르게 엑손 C, C/D, C/D'및 D 또는 C, C/D 및 D에 첨가한다. 이것은 제33도(SEQ ID NO. 149)에서 보여진다.

GGFⅡBPP1은 코딩절편 A 스플라이싱 접합점을 지나서 다음의 개재서열(인트론)로 판독함으로써 생성되는 절단형 유전자 산물이다. 이것은 제31도(SEQ ID NO. 140)에서 코딩절편 A' 을 타나낸다. 전사체는 표준적인 AATAAA, 폴리아데닐화 서열에 인접하여 종결되고, 이 절단형 유전자 산물은 진실로 성숙한 전사체를 나타낸다고 본 발명자는 제안한다. 다른 더 긴 두개의 유전자 산물은 동일한 3' 비번역서열 및 폴리아데닐화 부위를 공유한다.

이 세가지의 분자 모두 9개의 새로운 GGF-Ⅱ펩티드서열중 6을 포함하고(제12도 참조)다른 펩티드는 GGF-Ⅰ-18(제27도 참조) 과 매우 상동적이다. 이러한 발견은 이 재조합 분자가 소 GGF-Ⅱ의 적어도 일부를 암호화하는 높은 가능성을 제공한다. 더욱이, 3 펩티드의 계산치 등전점은 GGF-Ⅰ및 Ⅱ의 물성과 일치한다. GGF-Ⅱ의 분자크기는 대략 60kD 이기 때문에, 세가지 cDNA 중 가장 긴것은 아미노산 수의 예상치의 거의 1/2을 갖는 단백질을 암호화해야 한다.

B 와 A 엑손을 포함하는 프로브를 PCR증폭을 통해서 표지화시키고 소외 뇌하수체 후엽로부터 분리한 RNA에서 만든 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는데 이용하였다. 하나의 클론(GGF2BPP5)은 제30도에 나타낸 패턴을 보였고 코딩절편 A와C 사이에서 부가적인 DNA코딩 절편(G) 을 포함하였다. 전체 핵산서열은 제32도(SEQ ID NO. 148)에서 보여진다. 가장 긴 오픈리딩 프레임의 예상되는 번역산물은 241아미노산이다.

상기에서 기술한 프로브를 이용하여 소의 뇌하수체 후엽 라이브러리로부터 두번째 cDNA (GGF2BPP4)의 일부를 분리하였다. 이 클론은 제30도에 나타낸 패턴을 보였다. 이 클론은 5' 말단이 불완전하지만, 코딩절편 G와 D가 결핍되어 하나의 스플라이싱 변이체이다. BPP4는 또한 영역 C/D를 넘어서 영역 H, K 및 L을 가진 새로운 3' 말단을 나타낸다. BPP4의 서열을 제34도(SEQ ID NO. 150)에 나타냈다.

[실시예 5]

각종 종들의 GGF서열

데이타베이스 서치는 어떤 예상되는 GGF 번역 생성물과 공지된 단백질서열 사이에서 어떤 의미있는 유사성을 나타내지 않았다.

이것은 GGF-Ⅱ가 새로운 단백질 집단 또는 단백질 초집단의 첫번째 원소라는 것을 제안한다. 다른 포유동물의 DNA와의 높은 긴축 교차 혼성화연구(DNA 블로팅실험) 에서는, 이 소의 재조합 분자의 DNA프로브가 시험한 다양한 샘플에서 특정 서열을 용이하게 검출할 수 있다는 것을 명백하게 나타냈다.

매우 상동적인 서열이 또한 인간의 게놈 DNA에서 검출된다. 이 방사선 사진은 제29도에서 보여진다. 래트 및 인간 DNA를 함유하는 레인의 시그날 GGF유전자의 래트 및 인간의 등가물을 나타내며, 이 유전자에 의해 암호화된 몇몇 cDNA 의 서열이 최근에 Holmes 등(Science 256: 1205 (1992)) 및 Wen등(Cell 69: 559 (1992)) 에 의해 발표되었다.

[실시예 6]

인간 GGF2 를 암호화하는 인간 서열의 분리

소 GGFⅡ코딩절편 E 의 서열을 포함하는 몇몇 인간 클론을 뇌간에서 제조한 인간cDNA라이브러리(Stratagene 카탈로그 #935206) 를 스크리닝함으로써 분리하였다. 이러한 방법은 소의 E절편을 포함하는 클론의 예상되는 펩티드서열과(GGF2 에 특유한) GGF2펩티드의 대부분사이의 강한 연결에 기초하여 행해졌다. 이 라이브러리를 하기에 나열된 올리고뉴클레오티드 프로브 914-919를 사용하여 실시예 4 섹션Ⅱ에 기재된 대로 스크리닝하였다.

914TCGGGCTCCATGAAGAAGATGTA
915TCCATGAAGAAGATGTACCTGCT
916ATGTACCTGCTGTCCTCCTTGA
917TTGAAGAAGGACTCGCTGCTCA
918AAAGCCGGGGGCTTGAAGAA
919ATGARGTGTGGGCGGCGAAA

이 프로브로 검출한 클론을 더욱 혼성화에 의해 분석하였다. 절편 A로부터의 중합 효소 연쇄반응(PCR) 생성물을 표지화함으로써 생성된 코딩절편 A에서 유도되는 프로브 (제21도참조) 를 또한 사용하여 일차 라이브러리를 스크리닝하였다. A 및 E 유도된 프로브와 혼성화하는 몇몇 클론을 선택하고, 하나의 특별한 클론 GGF2HBS5 를 더욱 분석하기 위해 선택하였다. 이 클론은 코딩절편(제31도에서 보여지는 EBACC/D'D) 의 패턴으로 표시된다. 이 클론의 E절편은 제37도에서 보여지는 E의 절단형 소 유형의 인간등가물이다. GGF2HBS5는 기술된 모든 " 추정" GGF-Ⅱ후보의 GGF-Ⅱ를 암호화하는 가장 가능성 있는 후보이다. 코딩서열 절편 E의 길이는 786뉴클레오티드 +264 염기의 비번역 서열이다. GGF2HBS5에 의해 암호화되는 단백질의 예상되는 크기는 대략 423 아미노산(대략 45kD, 제45도, SEQ ID NO: 167참조)이며, 이것은 GGF-Ⅱ의 탈글리코실화된 형태의 크기와 유사하다(실시예 16 참조). 부가적으로, 제27도에서 나열된 GGF-Ⅱ펩티드중 입곱가지는 영역 E로부터 예상되는 단백질 서열내에 해당하는 등가의 서열을 갖는다. 펩티드Ⅱ-6 및 Ⅱ-12 는 예외인데, 이것은 각각 코딩절편 B및 코딩절편 A내에 해당한다. GGF2HBS5 단백질을 암호화하는 RNA 는 GGF2HBS5 삽입체를 함유하는 벡터(Bluescript SK[Stratagene Inc.] 제44도참조)에 위치한 박테리오파지 T7 프로모터에 의해 작동되는 시험관내 전사시스템에서 생성되었다. 이 RNA 는 세포-유리(토끼 망상적혈구) 번역 시스템에서 번역되었고 단백질 산물의 크기는 45kD 였다.

부가적으로, 세포-유리 산물을 시반세포 분열촉진 검사하여 생물학적 활성을 확인하였다. 조건배지로 처리한 시반세포는 ^{125}Ⅰ-우리딘의 삽입 및 185킬로달톤 범위의 단백질의 티로신 인산화로 측정했을때 둘다 증가된 증식을 나타낸다.

따라서 제12도에서 보여지는 소의 펩티드에 매우 상동적인 인간의 펩티드를 암호화하는 DNA서열의 존재 및 GGF2HBS5 에 의해 암호화된 산물의 크기는 GGF2HBS5가 소 GGF2 의 인간등가물을 암호화하는 것을 확인시켜준다. 이 클론으로 형질전환된 세포로부터 제조한 조건배지가 시반세포 분열촉진활성을 일으킨다는 사실은 GGFⅡHBS5 유전자산물(BPP5 유전자산물과는 다름) 이 분비되는 것을 확인시켜준다. 부가적으로 GGFⅡBPP5유전자 산물은 p185^{erbB2} 같은 리셉터 티로신 키나제 또는 밀접하게 연관된 리셉터(실시예 14 참조)를 통해서 시반세포증식 반응을 매개하는 것같다.

[실시예 7]

포유동물 및 곤충세포에서 인간 재조합체 GGF2 의 발현

인간 GGF2 를 암호화하는 GGF2HBS5 cDNA클론(실시예 6에서 기재되고 또한 HBS5 로서 여기서 나타냄) 을 벡터 pcDL-SRα296(Takebe et al, Mol. Cell. Biol. 8: 466-472 (1988)속에 클로닝하고, COS-7 세포를 100mm접시에서 DEAE-덱스트란방법(Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. CSH Laboratory NY (1989)) 에 의해서 트랜스펙션 시켰다. 일시적으로 발현하는 COS세포의 세포용해물 또는 조건배지를 트랜스펙션 후 3또는 4일경에 수거하였다. 용해물을 제조하기 위해서 세포단일층을 PBS로 세척하고, 접시로부터 긁어내서 0.25M Tris-HCl, pH8 150㎕ 중에서 세번의 동결/해빙 사이클에 의해 용해시켰다. 세포파편을 펠렛화하고 상청액을 회수했다. 조건배지샘플(7ml) 을 모은 다음, 제조자(Amicon, Beverly, MA) 에 의해 기술된대로 Centiprep-10 및 Centricon-10 유니트를 이용하여 농축하고 10mM Tris, pH 7.4로 완충액 교환하였다. 래트 신경 시반세포를 기술한 대로(실시예 3 참조) DNA 합성 전구물질의 삽입에 대해 검사하였다. 실시예 3에서 기술한대로 조건배지 또는 세포용해물 샘플을 시반세포 증식 검사로 시험하였다. 분열촉진활성 데이타를 제46도에 나타냈다. GGF2를 암호화하는 cDNA GGF2HBS5는 단백질 산물의 배지로의 분비를 지시하였다. 세포용해물을 이용한 검사로 결정했을때 전체활성의 적은 부분은 세포내부에서 검출할수 있었다. GGF2HFB1 및 GGFBPP5 cDNA 는 산물의 세포외 배지로의 분비를 지시하지 못하였다. 이 클론의 GGF활성은 단지 세포용해물에서만 검출할 수 있었다(제46도).

재조합 GGF2 는 또한 CHO세포에서 발현되었다. GGF2를 암호화하는 GGF2HBS5 cDNA를 벡터 pcdhfrpolyA(제54도) 의 EcoRI부위속에 클로닝하고 인산칼슘 공침전방법(Graham 및 Van Der Eb, Virology 52: 456-467 (1973)) 에 의하여 DHFR 네가티브 CHO세포주(DG44)속에 트랜스펙션시켰다. 96-웰 플레이트의 뉴클레오티드 및 뉴클 레오시드 유리된 α배지(Gibco) 에서 클론을 선택하였다. 3주일후, 실시예 3에서 기술한 시반세포 증식검사에 의하여 개별적인 클론의 조건배지 샘플을 GGF발현에 대해 스크리닝하였다. 배지속으로 GGF활성의 상당한 수준을 분비하는 안정한 클론을 식별하였다. CHO 세포 조건배지의 다른 체적 분액으로부터 시반세포 증식활성 데이타를 이용하여 제47도에서 보여지는 투여량 반응곡선을 얻었다(Graham 및 Van Der Eb, Virology 52: 456, 1973). 이 물질은 GGF2 로 특이적인 펩티드에 대해 생긴 폴리클로날 항혈청으로 프로브화된 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 대략 69-90kD의 넓은 밴드(뇌하수체에서 추출된 GGF2 와 더 높은 분자량의 글리코형태의 기대되는 크기) 가 특이적으로 표지화 된다(제49도, 레인12).

재조합 GGF2 를 또한 곤충세포에서 바쿨로바이러스 발현을 이용하여 발현시켰다. Sf9 곤충세포를 3-5(10^6세포/ml)의 다중도로 GGF2HBS5 cDNA클론을 함유하는 바쿨로바이러스로 감염시키고 Sf900-Ⅱ배지(Gibco) 에서 배양하였다. 시반세포 분열촉진활성이 세포외 배지로 분비되었다(제48도). 포스콜린의 부재하에 시반세포 증식검사에서 다른 체적의 곤충세포 조건배지를 시험하였다. 데이타를 이용하여 제48도에서 보여지는 투여량 반응곡선을 얻었다.

이 물질은 또한 상술한 GGFⅡ특이적인 항체로 프로브화된 웨스턴 블롯으로 분석하였다(제47도). 탈글리코실화 GGF-Ⅱ의 크기인 45kD의 밴드(실시예 16 참조)가 나타났다.

본 실시예에서 사용된 방법은 하기와 같다:

재조합체 인간 및 소 신경교질 성장인자의 시반세포 분열촉진 활성을 하기와 같이 결정하였다:

일시적인 포유동물의 발현실험에서 얻은 조 재조합 GGF제제를 이용하여 5μM 포스콜린의 존재하에 배양시반세포의 분열촉진 반응을 측정하였다. 방법에서 기술한대로 트랜스펙션 되거나 또는 모조 트랜스펙션된 COS세포에서 얻은 물질이 18-24 시간 노출시킨 후[^{125} I]-우리딘의 삽입을 결정하였다. 4 세트의 데이타의 평균 및 표준편차를 표시한다. 부분정제한 원래의 소 뇌하수체 GGF(카르복시메틸 셀룰로스 분획; Goodearl et al., 제출됨) 에 대한 분열촉진 반응은 100% 활성을 기준으로(GGF) 로 표시된다.

cDNA(제53도) 를 pcDL-SRα296(Takebe et al., Mol. Cell Biol. 8: 466-472 (1988))속에 클로닝하고, COS-7 세포를 100mm접시에서 DEAE-덱스트란방법(Sambrook et al., In Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd. ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989))에 의해 트랜스펙션 시켰다. 트랜스펙션후 3또는 4일경에 세포용해물 또는 조건배지를 수거하였다. 세포용해물을 제조하기 위해서, 세포단일층을 PBS로 세척하고, 접시로부터 긁어내고, 0.25M Tris-HCl, pH8 150μℓ 중에서 세번의 동결/해빙 사이클에 의해 용해시켰다. 세포파편을 펠렛화하고 상청액을 회수하였다. 조건배지샘플(7ml)을 모은 다음, 제조자(Amicon, Beverly, MA) 에 의해 기술된대로 Centriprep-10 및 Centricon-10 유니트를 이용하여 농축하고 10mM Tris, pH 7.4로 완충액 교환하였다. 래트 좌골신경 시반세포를 기술된대로(Davis 및 Stroobant, J. Cell Bio1. 110: 1353-1360(1990) ; Brockes et al., Brain Res. 165: 105-118 (1979)) DNA합성 전구물질의 삽입에 대해서 검사하였다.

재조합 CHO 세포 조건배지의 웨스턴 블롯을 하기와 같이 수행하였다:

재조합 CHO클론을 MCDB 302 단백질-유리 배지 7ml에서 3일간 배양하였다. 2ml 의 조건배지를 농축하고, 10mM Tris-HCl, pH 7.4 에 대해서 완충액 교환하고 동결 건조시켰다. 펠렛을 SDS-PAGE 샘플 완충액중에 재현탁시키고, 환원 SDS 겔 전기영동을 행하고 GGF 펩티드 항체로 웨스턴 블로팅하여 분석했다. 트랜스펙션되지 않은 CHO-DG 44 숙주의 조건배지를 이용함으로써 CHO콘크롤을 행하고 재조합 클론의 조건배지를 이용하여 CHO HBS5 수준을 검사하였다.

[실시예 8]

소 GGF에 연관된 다른 인간의 서열의 분리

실시예 5 및 6의 결과는 인간의 공급원의 GGF연관서열이 소 GGF서열에서 추출된 DNA프로브를 이용하여 쉽게 분리할 수 있다는 것을 나타낸다. 또 다르게는 Holmes 등(Science 256: 1205 (1992))에 의해 기술된 방법을 이용할 수 있다. 본 실시예에서는 $p185^{erbB2}$ 리셉터에 결합하여 이 리셉터를 활성화하는(그리고 GGF에 관련된다) 인간의 단백질(헤레굴린α) 을 종양세포주에서 정제하고, 유도된 펩티드 서열을 이용하여, 헤레굴린을 암호화하는 cDNA 를 클로닝하는데 이용되는 올리고뉴클레오티드 프로브를 생성한다.

$p185^{erbB2}$ 리셉터 활성화의 생화학적 검사는 시반세포증식과 다르다. 이것은 뇌하수체 cDNA의 GGF서열의 클로닝을 위해 실시예 1-4에서 사용한 것과 유사한 방법이다. 헤레굴린 단백질 및 상보적인 DNA를 하기의 방법에 따라 종양세포주로부터 분리하였다. 헤레굴린은 Percell Biolytica 마이크로담체 비드(Hyclone Labs)에서 생장한 MDA-MB-231 유방암 세포(ATCC # HTB 26) 의 조건배지로부터 정제하였다. 배지(10 리터) 를 막(10kD 차단)(Millipore)을 통한 여과에 의해 ~25배 농축하고 원심 분리 및 필터(0.22 ㎛)를 통한 여과에 의해 정화시켰다. 여과액을 헤파린 세파로스 컬럼(Pharmacia)에 적용하고 단백질을 인산염-완충 식염수중의 0.3, 0.6, 및 0.9M NaCl의 단계별로 용출시켰다. 다양한 크로마토그래피 분획의 활성은 MCF-7 유방암세포(ATCC # HTB22)에서 $p185^{erbB2}$ 의 티로신 인산화의 증가를 정량하여 측정했다. 혈청(10%)(10^5세포/웰)을 함유하는 F12(50%)Dulbecco 최소 필수배지(50%)의 24-웰 Costar 플레이트에 플레이팅하고, 적어도 24시간동안 부착시켰다. 검사전에, 최소 1시간동안 세포를 혈청없는 배지속으로 옮겼다. 컬럼분획(10 내지 100μℓ)을 37℃에서 30 분간 배양하였다. 그 다음 상청액을 흡출하고 SDS-PAGE 샘플완충액 100μℓ 의 첨가에 의해 반응을 종결시켰다. 샘플을 100℃에서 5분간 가열하고 트리스-글리신 겔(4내지 20%)(Novex)에 일부(10 내지 15μℓ)를 적용시켰다. 전기영동후에 단백질을 폴리비닐리덴디플루오라이드(PVDF) 막에 전기블로팅하고, Tween-20(0.05%)을 포함하는 트리스-완충 식염수(TBST)중의 소혈청 알부민(5%)으로 차단시켰다. 블롯을 포스포티로신(Upstate Biotechnology) 에 대한 단클론성항체(1:1000 희석)로 실온에서 최소 1시간동안 프로브화시켰다. 블롯을 TBST 로 세척하고, 알칼리 포스파타제에 결합된 마우스 면역글로불린 G에 대한 항체(Promega)(1:7500희석) 로 최소 30 분간 프로브화시켰다. 반응성 밴드를 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-1-포스페이트 및 니트로-블루테트라졸륨으로 가시화 시켰다. 면역 블롯을 Scan Jet Plus(Hewlett-Packard) 농도계로 스캐닝하였다. 자극되지 않은 MCF-7세포의 시그날 강도는 20 내지 30 유니트였다. 완전히 자극된 $p185^{erbB2}$ 는 180 내지 200유니트의 시그날을 생성했다. 활성의 대부분을 포함한 0.6M NaCl푸울을 에탄올(30%) 함유 17mM 인산나트륨(pH 6.8)에서 평형된 폴리아스파르트산(polyLC)컬럼에 적용하였다. 평형완충액중의 0.3M에서 0.6M NaCl 까지의 직선구배를 이용하여 결합된 단백질을 용출시켰다.

TFA(0.1%)와 아세토니트릴(15%)을 포함하는 완충액으로 평형된 C4역상컬럼(SynChropak RP-4) 에서 활성피크(~0.45M NaCl) 를 더욱 분류하였다. 이 컬럼으로부터 25% 부터 40%까지의 아세토니트릴 구배로 60 분간 단백질을 용출시켰다. 분획(1ml)을 모으고, 활성을 측정하고, 트리스-글리신 겔(4-20%, Novex)에서의 SDS-PAGE로 분석했다.

HPLC-정제한 HRG-α를 SDS(0.1%), 10mM 디티오트레이톨, 0.1M NH_4HCO_3 (pH 8.0)중의 리신 C 로 20 시간동안 37℃에서 분해하고, 결과의 단편을 Synchrom C4컬럼(4000Å, 0.2 ×10cm)에서 분석하였다. 이 컬럼을 0.1% TFA 로 평형시키고 0.1% TFA 중의 1-프로판올 구배로 용출시켰다(W. J. Henzel, J. T. Stults, C. Hsu, D. W. Aswad, J. Biol. Chem. 264, 15905 (1989)). 크로마토그래피 전개로부터의 피크를 진공건조시키고 서열결정하였다. 펩티드중 하나(~24% 1-프로판올에서 용출) 는 서열[A]AEKEKTF[C]VNGGEXFMVkDLXNP(SEQ ID NO. 162) 을 나타냈다. 괄호안의 잔기는 불확실하며 X는 아미노산을 확인하는 것이 가능하지 않았던 사이클을 나타낸다. 초기수율은 8.5pmol이었고 이 서열은 어떤 공지된 단백질에 해당하지 않았다. 잔기 1, 9, 15,및 22 는 이후에 cDNA 서열에서 시스테인으로 확인되었다. PVDF 막에 오버로딩되고 블로팅된 겔의 ~45kD밴드의 직접적인 서열결정은 매우 낮은 초기수율(0.2pmol) 로 낮은 빈도 서열 XEXKE[G][R]GK[G]K[G]KKKEXGXG[K](SEQ ID NO. 163) 을 나타냈다. 이것은 헤레굴린-α의 아미노산잔기 2 내지 22 에 해당하는데(제31도), 이것은 세린 2가 proHRG-α의 NH_2-말단이라는 것을 제안한다. NH_2 말단이 차단되었지만, 때로는 소량의 정상적으로 차단된 단백질이 번역후 변형되지 않을 수 있는 것이 관찰되었다. NH_2 말단 지정은 시아노겐 브로마이드로 분해후 단백질의 질량분석법에 의해 확인되었다. 분리된 단백질의 COOH-말단은 명확하게 확인되지 않았지만, 그러나 단백질 분해물의 혼합서열결정에 의해, 성숙서열은 잔기 241을 지나서 연장되는 것같지는 않다. 아미노산의 약호는 다음과 같다: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; 및 Y, Tyr.

cDNA 클론의 공급원으로서, 올리고(dT)-프라이머화된 λgt10(T. V. Huynn, R. A. Young, R. W. Davis, λgt10 and λgt 11 DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, D. Glover, Ed. (IRC Press, Oxford, (1984)) cDNA 라이브러리는 MDA-MB-231 세포로부터 정제한 mRNA 로(J. M. Chirwin, A. E. Przbyla, R. J. MacDonald, W. J. Rutter, Biochemistry 18, 5294 (1979))제조되었다(U. Gubler and B. J. Hoffman, Gene 25, 263 (1983)). 13-아미노산서열 AEKEKTFCVNGGE(SEQ ID NO. 164)(13) 을 암호화하는 뉴클레오티드는 인간 코돈빈도

최적치(R. Lathe, J. Mol, Biol 183, 1 (1985))의 기초하에 고안되었고 화학적으로 합성되었다: 5'-CTCGCC (G 또는 T) CC (A 또는 G) TTCAC (A 또는 G) CAGAAGGTCTTCTCCTTCTCAGC-3';(SEQ ID NO. 165). 프로브 고안의 목적을 위해서 아미노산 서열의 미지의 잔기에는 시스테인을 지정하였다. 프로브를 인산화에 의해 표지화하고 낮은 긴축 조건하에 cDNA 라이브러리에 혼성화 시켰다. 이 라이브러리에서 proHRG-α 단백질이 확인되었다. MDA-MB-231 세포 mRNA 로부터 만들어진 제 2올리고(dT)-프라이머화된 λgt10 라이브러리를 proHRG-α의 5'및 3' 말단으로부터 유도된 서열로 프로브화하여 HRB-β1 cDNA를 확인하였다. 클론13(제2a도) 은 프라이머화된(5'-CCTCGCTCCTTCTTCTTGCCCTTC-3' 프라이머(SEQ ID NO. 166); proHRG-α안티센스 뉴클레오티드 33 내지 56) MDA-MB-231 λgt10 라이브러리를 5'HRG-α서열로 스크리닝하여 얻은 생성물이었다. 프로브로서 클론 13 의 5' 말단에 해당하는 서열을 이용하여 MDA-MB-231 세포 mRNA 로부터 유도된 제 3 올리고(dT)-프라이머화된 λgt10 라이브러리에서 proHRG β2 및 proHRG β3 를 식별하였다. 4 개의 HRG각각을 암호화하는 두 cDNA 클론을 서열결정하였다(F. Sanger, S. Milken, A, R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463 1977). 클론 84 로 표시한 다른 cDNA 는 아미노산 420까지 proHRG β2 와 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 위치 421의 종결 코돈 다음에는 다른 3'-비번역 서열이 온다.

[실시예 9]

추가의 스플라이싱 변이체의 분리

실시예 6의 방법은 스플라이싱 변이의 결과로서 생기는 4가지 밀접하게 연관된 서열(헤레굴린 α, β1, β2, β3)을 생성하였다. Peles 등(Cell 69, 205 (1992)), 및 Wen 등(Cell 69, 559 (1992)) 은 $p185^{erbB2}$ 에 결합하는 단백질을 포함하는 실시예 1-4 및 6에서 기술된 것과 유사한 정제 및 클로닝 방법을 이용하여 다른 스플라이싱 변이체(래트로부터)를 분리하였다. cDNA클론은 하기와 같이 얻어졌다(형질전환된 래트섬유아세포 세포주의 $p185^{erbB2}$ 결합 단백질의 정제 및 서열결정을 통하여).

$p185^{erbB2}$ 결합 단백질을 하기와 같이 조건배지로부터 정제하였다. 500 롤러용기(전체 120)리터) 의 세번의 수거로부터 모은 조건배지를 0.2μ필터를 통한 여과에 의해 정화 하고 20kD 분자크기 차단값을 갖는 막을 이용한 펠리콘 한외여과시스템으로 31배농축 하였다. 모든 정제단계는 Pharmacia패스트 단백질 액체 크로마토그래피 시스템을 이용하여 행하였다. 농축된 물질을 헤파린-세파로스 컬럼(150ml, 인산염-완충식염수(PBS) 로 예비평형시킴) 에 직접 로딩하였다. 280nm 파장에서 어떤 흡광도도 검출되지 않을 때까지 0.2M NaCl을 포함하는 PBS로 칼럼을 세척했다. 그다음 결합된 단백질을 NaCl(0.2M부터 1.0M 까지) 의 연속적인 구배(250ml) 로 용출시켰다. 그리고 5ml분획을 모았다. 모은 분획중 샘플(0.01ml)은 키나제 자극활성의 정량분석에 이용되었다. 세번의 컬럼 전개의 활성분획(전체체적=360ml) 을 모으고, YM10한외여과막(Amicon, Danvers, MA) 을 이용하여 25ml 로 농축하고, 황산암모늄을 1.7M 의 농도에 도달하도록 첨가했다. 원심분리(10,000 ×g, 15 분) 에 의한 제거후, 모은 물질을 페닐-Superose 컬럼(HR 10/10, Pharmacia)에 로딩하였다. 컬럼을 0.1M Na_2PO_4 (pH 7.4)중의 $(NH_4)_2SO_4$ (1.7M 부터 염이 없는 상태까지)의 45ml 구배로 전개시키고, 2ml 분획을 모으고, 키나제 촉진에 대해 검사하였다(샘플 당 0.002ml)(실시예 6에서 기재된대로). 활성의 주요피크를 모으고 50mM인산나트륨 완충액(pH 7.3)에 대해 투석하였다. 모노-S 양이온-교환 컬럼(HR 5/5, Pharmacia) 을 50mM 인산나트륨으로 사전평형시켰다. 활성물질(단백질 0.884mg;35ml) 을 로딩한후, 컬럼을 출발완충액으로 세척한 다음 NaCl 의 구배로 1ml/분의 속도로 전개하였다. 키나제 촉진 활성은 0.45-0.55M 염에서 회수되고, 각각 2ml씩 4개의 분획에 걸쳐 분포한다. 이것들을 모아서 Cu^{3+} 킬레이팅 컬럼(1.6ml, HR 2/5 킬레이팅 Superose, Pharmacia) 에 직접 로딩하였다. 단백질의 대부분은 수지에 흡착하지만, 염화암모늄(0-1M)의 30ml 직선구배로 천천히 용출시켰다. 활성은 0.05 내지 0.2M NH_4Cl의 범위에서 단일 피크의 단백질로 용출되었다. 각종 정제단계의 샘플을 겔 전기영동한후 ICN (CostaMesa, CA) 의 키트를 이용하여 은염색에 의해 분석하고, 그것의 단백질 함량은 Bio-Rad(Richmond, CA) 의 키트를 이용하여 쿠마시 블루 염료 결합 검사로 측정하였다.

p44 단백질(10 μg)을 0.1M 중탄산암모늄 완충액(pH 7.8) 200μℓ 에서 재구성하였다. 1:10의 효소대 기질 비율로 18 시간동안 37℃에서 L-1-토실-아미드 2-페닐에틸클로로 메틸 케톤-처리된 트립신(Serva) 으로 분해시켰다. 결과적인 펩티드 혼합물을 역상 HPLC 로 분리하고, 다이오드-어레이 디텍터와 워크스테이션으로 장치된 HP 1090액체 크로마토그래피 시스템 및 Vydac C4 마이크로컬럼(2.1mm내경×15cm, 300Å) 을 이용 하여 215nm 에서 모니터하

였다. 이 컬럼을 0.1% 트리플루오로아세트산(이동상A)으로 평형시키고, 0%-55%이동상B(0.1% 트리플루오로아세트산중의 90%아세토니트릴)의 직선구배로 70분간 용출시켰다. 유속은 0.2ml/분이었고, 컬럼온도를 25℃로 조절하였다. HPLC시스템으로부터 수동으로 모은 펩티드피크의 1/3분액을 에드만(Edman) 분해에 의한 N-말단서열분석으로 특정화 하였다. 27.7분(T27.7) 이후에 용출된 분획은 혼합된 아미노산 서열을 포함하였고 하기와 같이 환원시킨후 추가로 재크로마토그래피하였다: 펩티드 분획의 70%분액을 진공건조시키고, 0.2M중탄산암모늄 완충액(pH 7.8) 100㎕에서 재구성하였다. 용액에 DTT(최종농도 2mM) 를 가하고, 그다음 37℃에서 30분간 배양하였다. 그후 환원된 펩티드 혼합물을 Vydac컬럼(2.1mm내경×15cm) 을 이용한 역상 HPLC 에 의하여 분리하였다. 용출조건 및 유속은 상기에서 기술한 것과 동일하였다. 펩티드의 아미노산 서열 분석은 온라인 페닐티오 히단토인(PTH) 아미노산 분석기가 장치된 모델 477 단백질 시퀀서(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 및 모델 900데이타 분석시스템(Hunkapiller 등 (1986) In Methods of Protein Microcharacterization, J. E. Shively, ed. (Clifton, New Jersey: Humana Press p. 223-247)으로 수행하였다. 단백질을 폴리브렌 및 NaCl 로 사전사이클링된 트리플루오로아세트산-처리한 유리섬유 디스크상에 로딩하였다. 이중 주사기 펌프 및 역상(C-18)협경컬럼 (Applied Biosystems, 2.1mm × 250mm)을 이용하는 마이크로 액체 크로마토 그래피시스템(모델 120) 으로 PTH-아미노산 분석을 행하였다.

표준공정(Maniatis 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor, New York(1982))에 의해 Rat1-EJ세포로부터 RNA를 분리하고 mRNA 세퍼레이터 키트(Clontech Lab, Inc., Palo Alto, CA)를 이용하여 폴리(A)$^{+}$ 를 선택하였다. cDNA는 Superscript 키트(BRL Life Technologies, Inc., Bethesda, MD) 로 합성하였다. 컬럼-분류된 이중가닥 cDNA 를 PCD-X벡터(Okayama 및 Berg, Mol. Cell Biol. 3: 280 (1983)) 의 유도체인 SalI-및 NotI-분해된 pJT-2 플라스미드 벡터속에 결합시키고 일렉트로포레이션(Dower et al., Nucl. Acids Res. 16: 6127 (1988)) 에 의해 DH10B E. coli 세포속에 형질전환시켰다. 대략 5×10 ^{5} 일차 형질전환체를 NDF의 N-말단(잔기 5-24) 및 T40.4 트립신에 의한 펩티드(잔기 7-12) 의 단백질 서열로부터 유도된 두 올리고 뉴 클레오티드 프로브로 스크리닝하였다. 그것의 각각의 서열은 하기와 같다(N은 4가지 뉴클레오티드 모두를 표시한다):

```
(1)  5'-ATA GGG AAG GGC GGG GGA AGG GTC NCC CTC NGC
          A    T
          AGG GCC GGG CTT GCC TCT GGA GCC TCT-3'
(2)  5'-TTT ACA CAT ATA TTC NCC-3'
   C   G       G   C

(1: SEQ ID No. 167; 2: SEQ ID No. 168)
```

합성 올리고 뉴클레오티드를 T4 폴리뉴클레오티드 키나제를 이용하여 [γ-^{32} P]ATP 로 말단-표지화시키고 니트로셀룰로스 필터의 복제세트를 스크리닝하는데 이용했다. 혼성화 용액은 6×SSC, 50mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 2X 덴하르트용액, 50μg/ml 연어 정자DNA, 20%포름아미드(프로브1) 또는 포름아미드부재(프로브2) 로 이루어졌다. 필터를 50℃에서 0.5×SSC, 0.2% SDS, 2mM EDTA로 세척하거나(프로브1) 또는 37℃에서 2×SSC, 0.2% SDS, 2mM EDTA 로 세척하였다(프로브2). 필터의 방사선 사진은 두 프로브와 혼성화하는 10 개의 클론을 나타냈다. 이 클론을 상술한대로 재플레이팅 및 프로브 혼성화에 의해 정제하였다. cDNA클론은 제조자의 지시에 따라서 Applied Biosystems Taq DyeDeoxy ^{TM} 터미네이터 사이클 시퀀싱 키트 및 Applied Biosystems 373A 자동화된 DNA시퀀서를 이용하여 서열결정하였다. 어떤 경우에는, 제조자의 지시에 따라 [^{35} S]dATP(Amersham)및 U. S. Biochemicals 의 Sequenase ^{TM} 키트를 이용하여 서열을 얻었다. 프라이머로서 합성올리고뉴클레오티드를 이용함으로써 cDNA클론 44 의 두가닥을 서열결정하였다. 7 개의 독립적인 cDNA 클론에서 5' 쪽 350 뉴클레오티드의 서열을 결정하였다. 결과적인 클론은 제30도(NDF) 에서 보여지는 패턴을 나타냈다.

[실시예 10]

다른 가능한 스플라이싱 변이체의 검출방법

소의 cDNA 클론과 PCR산물의 추론된 아미노산 서열과 공표된 인간(제31도)과 래트의 서열의 정렬은 높은 수준의 유사성을 보이는데, 이것은 이 서열이 3가지의 종 내에서 상동유전자로부터 유도되는 것을 나타낸다. cDNA/PCR산물 수준에서 검출할 수 있는 다양한 수의 전령 RNA전사체는 아마도 광범위한 조직-특이적인 스플라이싱에 기인한다. 제30도에서 얻어지고 보여지는 패턴은 다른 스플라이싱 변이체가 존재하는 것을 제안한다. 가능한 스플라이싱 변이체의 리스트를 제37도에 나타낸다. 이 변이체중 많은 것은 특별한 코딩절편에 특이적인 프라이머쌍을 이용한 PCR실험에 의하여 그리고 다른 조직들로부터 유도된 cDNA 라이브러리의 코딩절편 특이적인 프로브화에 의하여 얻을 수 있다. 또 다르게는, 당업자에게 공지된 절단 및 스플라이싱 기술을 통해서 특정 cDNA 클론, PCR 산물 또는 게놈 DNA부위로부터 변이체를 조립할 수 있다. 가령, 공통 코딩절편(예컨대, A)의 드문 제한효소 절단부위를 이용하여 GGF2BPP5 의 FBA 아미노말단을 GGF2BPP1, GGFBPP2, GGFBPP3 또는 GGFBPP4 의 카르복시말단 서열에 연결시킬 수 있다. 코딩절편 E 및/또는 G의 존재 또는 부재가 사용시 이점을 제공한다면, 이 코딩절편이 발현구조체내에 포함될 수 있다. 이 변이체 서열은 재조합 시스템에서 발현될 수 있고 시반세포 분열촉진 활성의 수준뿐만아니라 $p185^{erbB2}$ 리셉터에 결합하고 활성화할 수 있는 능력을 결정하기 위해서 재조합 산물을 분석할 수 있다.

[실시예 11]

GGF 의 기능적인 요소의 확인

GGF 서열족의 추론되는 구조는 가장 긴 형태(GGF2BPP4 에 의해 나타냄) 가 세포외부분이 표피성장인자와 닮은 도메인을 포함하는 막통과 단백질을 암호화하는 것을 나타낸다(Carpenter및 Wahl, Peptide Growth Factor and Their Receptors I pp. 69-133, Springer-Verlag, NY 1991 참조). 코딩절편 C 및 C/D 또는 C/D' 펩티드 서열에서 시스테인 잔기의 위치는 표피성장인자(EGF) 펩티드서열의 유사한 잔기에 대해서 보존된다(재35도, SEQ ID NO. 151-153참조). 이것은 세포외 도메인이 리셉터인식 및 생물학적 활성화 부위로서 작용하는 것을 제안한다. 변이체 형태중 몇몇은 H, K 및 L 코딩절편이 결핍되어 있고 따라서 분비되고 확산가능한 생물학적 활성 단백질로서 발현될 수 있다. EGF-유사 도메인(EGFL)을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 GGF DNA 서열은 신경교질세포 분열촉진활성을 자극시키는 완전한 생물학적 활성을 가질 수 있다.

이 단백질의 막 결합형태는 배발생시 또는 신경재생시 뉴론의 표면에서 발현되면 시반세포증식을 유도할 수 있다(뉴론의 표면 증식하는 시반 세포의 표면과 친밀하게 연관되는 경우).

분비되는(막결합되지 않은) GGF는 고전적으로 확산성 인자로서 작용할 수 있고, 이것은 분비되는 곳으로부터 약간 떨어진 시반세포와 상호작용할 수 있다. 기타 형태는 조직상처 및 세포파괴를 통한 공급원에 의해 세포내로 부터 방출될 수 있다. 분비되는 GGF의 실례는 GGF2HBS5(실시예 6 참조) 에 의해 암호화되는 단백질이다; 이것은 세포외부로 향하는 것으로 발견된 유일한 GGF이다(실시예 7). 분비는 아마도 단지 영역 E에서만 발견되는 N-말단 소수성 서열을 통해서 매개되고, 이 영역 E 는 GGF2HBS5에 암호화된 재조합체 GGF-Ⅱ내에 포함된 N-말단 도메인이다.

다른 GGF는 비-분비형인것 같다(실시예 6 참조). 이 GGF는 조직 손상의 결과로서 방출되는 상처반응 형태일 수 있다. GGF-Ⅱ(GGF2HBS5 에 이해 암호화됨) 및 영역 B와 A를 포함하는 다른 단백질의 예상되는 단백질 구조의 다른 영역은 인간 기저막 헤파린 황산염 프로테오글리칸 코어 단백질(ref.)과의 유사성을 나타낸다. 이 GGF에서 C2 면역글로불린 폴드의 제 2시스테인 다음에 위치한 펩티드 ADSGEY 는 그 기저박막 단백질에서 발견되는 22 개의 C-2반복부중 9 개에 존재한다. 이러한 증거는 이 단백질이 뉴론과 신경교질과 연관된 것과 같은 매트릭스 단백질과 연관될 수 있는 것을 강하게 제안하고, 표적부위에서 신경교질성장인자의 격리방법을 제안할 수 있다.

[실시예 12]

재조합 세포로부터 GGF의 정제

생물학적 활성을 검사하기 위한 전체길이 또는 일부의 GGF를 얻기 위해서 클로닝된 DNA 를 이용하여 단백질을 과잉생산할 수 있다. 몇가지 방법을 이용할 수 있다. 상술한 서열을 포함하는 재조합 E. coli 세포를 제조할 수 있다. pNH8a 또는 pHH16a(Stratagene, Inc.) 같은 발현시스템을 제조자 방법에 따라서 이러한 목적에 사용할 수 있다. 또 다르게는 이 서열을 포유류의 발현벡터에 삽입할 수 있고 과잉생산 세포주를 제조할 수 있다. 하나의 실례로서 이러한 목적을 위해 GGF를 암호화하는 DNA, 클론 GGF2BPP5 이 COS세포 및 중국 햄스터 난소세포에서 발현되었다 (실시예 7 참조)(J. Biol. Chem. 263, 3521-3527, (1981)). GGF DNA 서열을 포함하는 이 벡터를 확립된 방법을 이용하여 숙주세포속에 트랜스펙션시킬 수 있다.

dhfr 유전자(pMSXND 벡터에 포함된) 를 증폭시키고, 그 과정에서 인접한 GGF 단백질 암호화 서열을 공-증폭시키는 세포를 선택하기 위해서 메토트렉세이트의 존재하에서 G418-내성클론을 생장시킬 수 있고 또는 일시적인 발현을 조사할 수 있다. CHO 세포는 전적으로 혈청-제거, 단백질-제거 배지에서 유지될 수 있기 때문에(Hamilton 및 Ham, In Vitro 13, 537-547 (1977)), 그 배지에서 원하는 단백질을 정제할 수 있다. 실시예 9에서 생성된 항혈청을 이용한 웨스턴 분석을 이용하여 과잉생산세포의 조건배지에서 원하는 단백질의 존재를 검출할 수 있다.

일시적으로 발현하는 COS세포에 의한 조건배지로부터 원하는 단백질(rGGF-Ⅱ) 을 하기와 같이 정제하였다. 조건배지에서, rGGF-Ⅱ를 수거하고 양이온 교환크로마토그래피(POROS-HS)를 이용하여 부분정제하였다. 이 컬럼을 33.3mM MES pH 6.0으로 평형시켰다. 조건배지를 10ml/분의 유속으로 로딩하였다. 시반세포 증식활성을 포함하고 면역반응성이 있는 피크(상술한 GGFⅡ펩티드에 대한 폴리클로날 항혈청을 이용)를 50mM Tris, 1M NaCl pH 8.0으로 용출시켰다(각기 제 50a도 및 제 50b도).

또한 rGGF-Ⅱ를 안정한 중국 햄스터 난소 세포주를 이용하여 발현시켰다. 수거한 조건배지의 rGGF-Ⅱ를 양이온 교환크로마토그래피(POROS-HS)를 이용하여 부분정제하였다. 컬럼을 PBS pH 7.4 로 평형시켰다. 조건배지를 10ml/분으로 로딩하였다. 시반세포 증식활성 및 면역반응성(GGFⅡ폴리클로날 항혈청을 이용)을 포함 하는 피크를 50mM Hepes, 500mM NaCl pH 8.0으로 용출시켰다. 증식뿐만 아니라 면역반응성을 갖는 부가적인 피크가 50mM Hepes, 1M NaCl pH 8.0 에서 관찰되었다 (제51도).

rGGF-Ⅱ는 고해상도 단계로서 소수성 상호작용 크로마토그래피; 양이온교환/역상크로마토그래피(필요하다면 제 2 고해상도 단계로서);바이러스 불활성화단계 및 음이온 교환 크로마토그래피 같은 DNA 제거단계를 이용하여 더욱 정제할 수 있다.

사용된 방법의 상세한 설명은 다음과 같다:

양이온 교환 컬럼에서 용출된 재조합 GGF-Ⅱ피크의 시반세포 증식활성을 하기와 같이 측정하였다: 배양된 시반세포의 분열촉진 반응을 50mM Tris, 1M NaCl pH 8.0에 의해 용출된 피크를 이용하여 5M 포스콜린의 존재하에 측정하였다. 피크를 20 1, 10 1 (1:10) 10 1및 (1:100)10 1으로 첨가했다. I-우리딘의 삽입을 18-24시간 노출후 측정하고 (CPM) 으로 표현했다.

GGF-Ⅱ의 펩티드에 대해서 만들어진 폴리클로날 항체를 이용한 면역블롯은 하기와 같이 수행되었다: 다른 분획들 10μℓ 를 4-12% 구배겔에서 전개시켰다. 겔을 니트로셀룰로스 페이퍼로 옮기고, 니트로셀룰로스 블롯을 5% BSA 로 차단시키고, GGF-Ⅱ-특이적인 항체(1:250희석) 로 프로브화하였다. ^{125} Ⅰ단백질 A(1:500희석, 비활성=9.0/ci/g)을 이차항체로서 이용했다. 면역블롯을 6시간동안 코닥 X-레이 필름에 노출시켰다. 1M NaCl 로 용출된 피크 분획은 65-90kD에서 넓은 면역반응성 밴드를 보였는데, 이것은 GGFⅡ및 보다 더 높은 분자량의 글리코형태의 기대되는 크기 범위이다.

양이온교환 컬럼에서의 GGF-Ⅱ정제를 하기와 같이 수행하였다: rGGFⅡ를 발현하는 CHO 세포 조건배지를 10ml/분으로 양이온교환 컬럼에 로딩하였다. 컬럼을 PBS pH 7.4로 평형시켰다. 용출은 각각 50mM Hepes 500mM NaCl pH 8.0 과 50mM Hepes 1M NaCl pH 8.0으로 이루어졌다. 모든 분획을 여기서 기술된 시반세포 증식검사(CPM) 를 이용하여 분석하였다. BSA 를 표준물로 사용하는 브래드포드검사(Bradford assay)에 의해 단백질농도(mg/ml)를 결정하였다.

각 분획 10μℓ 를 이용하여 웨스턴 블롯을 행하였다. 제 51a도 및 제 51b도에서 나타난 것처럼, 면역반응성 및 시반세포활성은 같이 이동한다.

여기서 기술된 시반세포 분열촉진 검사를 이용하여 전체길이의 클론의 발현된 산물 또는 그것의 생물학적으로 활성이 있는 부분을 검사할 수 있다. 전체길이의 클론 GGF2BPP5 는 COS세포에서 일시적으로 발현되었다. 트랜스펙션된 COS세포의 세포내 추출물은 실시예 1에서 기술된 시반세포 증식검사로 검사했을때 생물학적 활성을 나타낸다. 게다가, GGF2HBS5를 암호화하는 전체길이의 클론이 CHO및 곤충(실시예 7) 세포에서 일시적으로 발현되었다. 이경우 두 세포 추출물 및 조건배지는 실시예 1에서 기술된 시반세포 증식검사에서 생물학적 활성을 보인다. GGF 유전자(헤레굴린을 포함) 로 부터 유도된 스플라이싱 변이체 상보적 DNA족에 속하는 것들은 이러한 방식으로 발현될 수 있고 당업자에 의해 시반세포 증식검사에서 검사될 수 있다.

한편, COS-7 세포에서 스플라이싱 변이체 Neu 분화인자(NDF) 를 발현하는 다른 변이체로 부터 재조합물질을 Wen 등(Cell 69, 559 (1992)) 에 따라 분리할 수 있다. pJT-2 진핵생물의 플라스미드 벡터속에 삽입된 cDNA 클론은 SV40 초기 프로모터의 조절하에 있으며, SV40 종결 및 폴리아데닐화 시그날이 3'-측면위치한다. COS-7 세포를 하기와 같이 일렉트로포레이션에 의해 pJT-2 플라스미드 DNA로 트랜스펙션시켰다: 6×10^{6} 세포(DMEM 및 10% FEBS 0.8ml 중에 존재) 를 0.4cm 큐벳으로 옮기고 10μℓ 의 TE 용액(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 중의 플라스미드 DNA 20μg 과 혼합하였다. 200 옴으로 세팅된 펄스 콘트롤러 유니트가 장치된 Bio-Rad 유전자 펄서장치를 이용하여 1600V 및 25μF 에서 실온에서 일렉트로포레이션을 수행하였다. 그 다음 세포를 20ml의 DMEM, 10% FBS로 희석시키고 T75플라스크(Falcon)로 옮겼다. 37℃에서 14시간배양한후, 배지를 DMEM, 1% FBS로 대체하고, 추가로 48 시간 배양하였다. 세포로부터 수거된 재조합 단백질을 함유하는 조건배지는 이 단백질에 대한 리셉터를 발현하는 세포주에서 생물학적 활성을 나타냈다. 이 세포주(배양된 인간 유방암 세포주 AU 565)를 재조합물질로 처리했다. 처리한 세포는 erbB2리셉터의 활성화의 특징인 형태변화를 나타냈다. 이러한 유형의 조건배지를 또한 시반세포 증식검사에서 시험할 수 있다.

[실시예 13]

$p185^{erbB2}$ 리셉터에 결합하는 다른 단백질의 정제 및 검사

Ⅰ. gp30및 p70의 정제

여기서 참고문헌으로 통합된 Lupu 등(Science 249, 1552 (1990)) 및 Lippman and Lupu(특허출원번호 PCT/US91/03443(1990))은 하기와 같이 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 의 조건배지로 부터 단백질을 정제했다. 조건배지 수거는 잘알려진 방법을 이용하여 수행하였다. Amicon 한외여과셀(YM5막)(Amicon, DanVers, MA)에서 배지를 100배 농축하였다. 정화하고 농축시킨 다음, 이후 수일간 연속수거를 행하는 동안 배지를 -20℃에서 보관했다. 농축시킨 배지는 Spectra/por € 3튜빙(Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA)을 이용하여 100 체적의 0.1 M 아세트산에 대해서 4℃에서 2일간 투석시켰다. 투석동안 침전된 물질은 4℃에서 30분간 4000rpm에서 원심분리하여 제거했다; 프로테아제 억제인자를 첨가했다. 그 다음 정화시킨 샘플을 동결건조시켰다.

동결건조시킨 조건배지를 최종농도 약 25mg/ml전체 단백질이 되도록 1M 아세트산에 녹였다. 10,000rpm 에서 15 분간의 원심분리에 의해 불용성 물질을 제거하였다. 그 다음 샘플을 세파덱스 G-100컬럼(XK16, Pharmacia, Piscataway, NJ) 에 로딩하고, 평형시키고 4℃에서 1M 아세트산으로 30ml/시간의 위쪽으로의 유속으로 용출시켰다. 100배 농축된 배지 4ml 로부터 100ng의 단백질을 처리하였다. 3ml 의 용출물을 포함하는 분획을 동결건조시키고 검사를 위해서 300μℓ PBS중에 재현탁시켰는데 이것은 더욱 정제하기 위한 공급원으로서 공급되었다.

세파덱스 G-100정제된 물질을 역상 고압력 액체크로마토그래피(HPLC)에서 전개시켰다. 첫번째 단계는 가파른 아세토니트릴 구배를 포함했다. C3-역상컬럼을 물(HPLC-등급) 중의 0.05% TFA(트리플루오로아세트산) 로 평형시킨 후 가파른 아세토니트릴구배 및 모든 다른 HPLC 단계를 실온에서 수행하였다. 샘플을 로딩하고 30 분간 1ml/분의 유속으로 직선구배(0.05% TFA중의 0~45%아세토니트릴) 로 분획을 용출시켰다. 280nm 에서 흡광도를 측정했다. 1ml분획을 모으고 EGF리텝터-경쟁활성을 분석하기 전에 동결건조시켰다.

두번째 HPLC 단계는 얕은 아세토니트릴 구배를 포함했다. 이전의 HPLC 단계로부터 활성 분획푸울을 동일한 컬럼에서 재크로마토그래피하였다. 용출은 5 분간 0.05% TFA중의 0-18%아세토니트릴 구배 그다음 30 분간 0.05% TFA 중의 18-45% 아세토니트릴 직선 구배로 행하였다. 유속은 1.0ml/분이었고, 1ml분획을 모았다. 인간 TGF α-유사인자는 RRA에 의해 검출할 수 있는 단일 피크로서 30-32% 아세토니트릴 농도에서 용출되었다.

Lupu 등(Proc. Natl, Acad. Sci. 89, 2287 (1992))은 $p185^{erbB2}$ 리셉터에 결합하는 다른 단백질을 정제하였다. 10% 태아 소혈청(GIBCO) 이 보충된 개선된 이글배지(IMEM; GIBCO) 에서 증식된 SKBr-3(인간 유방암 세포주) 의 생장에 사용된 조건배지로부터 이 특별한 단백질 p75가 정제되었다. 단백질 p75를 $p185^{erbB2}$ 친화성 컬럼을 이용하여 농축된(100X)조건배지에서 정제했다. 제조합체 발현을 통해서 $p185^{erbB2}$ (p75에 결합하는) 의 94kD 세포외 도메인이 생성되었고, 이것은 폴리아크릴 아미드 히드라지도-세파로스 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 커플링되었다. 커플링후 매트릭스를 얼음냉각 1.0M HCl 로 광범위하게 세척하고 비드를 0.5M $NaNO_2$ 로 활성화시켰다. 20분간 온도를 0℃를 유지하고 여과하고 얼음냉각 0.1M HCl 로 세척하였다. 농축된 조건배지 500ml 을 중력에 의해 비드를 통해서 전개시켰다. 컬럼을 4.0부터 2.0까지의 pH 값에서 1.0M 시트르산으로 단계적으로 세척 및 용출시켰다(erbB2 p75 의 분리를 가능하게 하기 위해서). 모든 분획을 Pharmacia PD10 칼럼에서 탈염시켰다. 정제에 의해 3.0-3.5용출 pH 에서 75kDa의 균질적인 폴리펩티드를 얻었다(SDS-PAGE 및 은염색으로 분석하여 확인함).

II. gp30과 $p185^{erbB2}$ 의 결합

정제한 gp30 단백질을 그것이 $p185^{erbB2}$ 에 결합하는지의 여부를 결정하기 위한 검사로 시험하였다. $p185^{erbB2}$ 에 대한 단클론성 항체로 경쟁검사를 하였다. gp30 단백질은 SK-BR-3 및 MDA-MB-453 세포($p185^{erbB2}$ 리셉터를 발현하는 인간 유방암 세포주) 에서 $p185^{erbB2}$ 와의 항체결합을 치환했다. 또한 gp30 의 시반세포증식활성을 실시예 1-3에서 기술된 검사과정을 이용하여 정제한 gp30으로 시반세포 배양물을 처리함으로써 입증할 수 있다.

III. p75 와 $p185^{erbB2}$ 의 결합

SKBr-3 조건배지로부터 얻은 75-kDa 폴리펩티드(p75) 가 참으로 SKBr-3 세포에서 erbB2발암 단백질의 리간드 인지를 평가하기 위해서, gp30에 대해서 상술한 것과 같은 경쟁검사를 이용하였다. p75 는 결합활성을 나타내지만, 다른 크로마토그래피 분획의 물질은 그러한 활성을 보이지 않는 것이 발견되었다(데이타는 나타내지 않음). 유출물질은 일부 결합활성을 보였다. 이것은 떨어진 erbB2 ECD의 존재에 기인할 수 있다.

IV. 다른 $p185^{erbB2}$ 리간드

Peles등(Cell 69, 205 (1992)) 은 또한 래트세포에서 $p185^{erbB2}$ 자극리간드를 정제하였다(NDF, 방법은 실시예 8 참조). Holmes등(Science 256, 1205 (1992))은 $p185^{erbB2}$ 에 결합하고 자극하는 인간세포로 부터의 헤레굴린 α를 정제하였다(실시예 6 참조). Tarakovsky등, Oncogene 6:218 (1991)은 활성화된 매크로파지에서 분리된 25kD 폴리 펩티드와, $p185^{erbB2}$ 상동성을 갖는 Neu리셉터의 결합을 기술하였는데, 여기서 참고문헌으로 통합되었다.

VI. NDF 분리

Yarden 및 Peles(Biochemistry 30, 3543 (1991))은 $p185^{erbB2}$ 리셉터를 자극시킬 35kD 당단백질을 확인하였다. 이 단백질은 하기의 방법에 따라 조건배지에서 확인되었다. 래트 I-EJ 세포를 175-cm^2 플라스크(Falcon)에서 밀집 상태까지 생장시켰다. 단일층을 PBS 로 세척하고 10-16시간동안 혈청-제거배지중에 방치했다. 배지를 제거하고 새로운 혈청-제거배지로 치환하고, 3 일간 배양한후 수거했다. 저속 원심분리에 의해 조건배지를 정화하고, YM2 막(분자량 차단값 2000)이 장치된 Amicon 한외여과 셀에서 100배 농축시켰다. 조건배지에서 neu자극활성의 생화학적 분석은 리간드가 열안정하지만 환원에는 민감한 35-kD당단백질이라는 것을 나타낸다. 이 인자는 높은 농도의 염이나 산성 알코올에 의해 침전될 수 있다. 선택적 침전, 헤파린-아가로스 크로마토그래피, 및 묽은 산에서의 겔 여과에 의한 분자의 부분정제는 프로토발암성 리셉터를 자극시킬 수 있지만 본질적으로 활성이 있는 발암성 neu 단백질에는 효과가 없는 활성리간드를 생성했다. 그러나, 정제된 분획은 관련된 EGF의 리셉터를 또한 자극시킬 수 있는 능력을 유지하였는데, 이것은 이 두 리셉터가 2 방향 기작을 통해서 기능적으로 커플링되어 있는 것을 제안한다. 또 다르게는 추정리간드가 양 리셉터와 동시에 상호작용한다. 이 인자의 제시된 생화학적 특성은 이러한 가능성을 탐구하기 위해 완전정제된 인자를 사용할 수 있게 하는데 이용할 수 있다.

다른 문헌에서는, Davis 등(Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 1536 (1991), Proc. Natl Acad. Sci. 88, 8582 (1991)) 및 Greene 등, PCT 특허출원 PCT/US91/02331 (1990)이 인간의 T-세포(ATL-2) 세포주의 조건배지로부터 단백질의 정제를 기술한다.

ATL-2세포주는 IL-2-독립적인 HTLV-1 (+)T세포주이다. 마이코플라즘-제거 ATL-2세포를 5% CO_2 가 있는 습기찬 분위기에서 37℃에서 배양배지로서 10% FCB 를 함유하는 RPMI 1640배지(10% FCS-RPMI 1640) 중에서 유지하였다. 단백질성 물질의 정제를 위해, ATL-2 세포를 1×PBS 로 두번세척하고, 72시간동안 혈청-제거 RPMI 1640 배지/2mM L-글루타민 3×10^5 ml에서 배양한후, 세포를 펠렛화하였다. 그렇게 생성된 배양물 상청액을 " 조건배지" (C.M.) 라고 명명했다. 1000d 차단값을 갖는 YM-2 Diaflo막(Amicon, Boston, MA)을 이용하여, C.M. 을 1 리터로부터 10ml까지 100배 농축시켰다. 어떤 검사에 이용하기 위해서, 1000MW 보다 더 큰 성분을 포함하는 농축 C.M.을 RPMI 배지로 원래의 체적으로 재희석시켰다. 1 리터 제조물의 이러한 두 컬럼정제한 물질중 일부를 폴리아크릴아미드 구배 겔을 이용하여 겔 전기영동하고(Integrated Separation Systems, Hyde Park, MD 또는 Amersham 의 Phorecast System, Arlington Heights, IL) 은 염색시킨 것은 적어도 4 내지 5밴드를 나타냈는데, 그중 10kD 및 20kD 밴드는 이 물질에 특유하였다. 1000MW 보다더 작은 성분을 포함하는 통과된 C.M. 은 희석없이 사용되었다.

농축된 조건배지를 0.45 μ Uniflo 필터(Schleicher 및 Schuell, Keene, NH)로 필터 멸균한 다음 10mM Tris-Cl, pH 8.1 로 미리평형시킨 DEAE-SW음이온 교환컬럼(Waters, Inc., Milford, MA) 에 적용시켜서 추가로 정제하였다. HPLC전개당 원래의 ATL-2 조건배지 1리터를 나타내는 농축 C.M. 단백질을 컬럼에 흡착시킨 다음, 4ml/분의 유속으로 OmM부터 40mM NaCl 까지의 직선구배로 용출시켰다. 10% 의 적당한 DEAE 분획(1컬럼정제한 물질) 또는 1%의 적당한 C18분획(2 컬럼정제한 물질)과의 시험관내 면역복합체 키나제 검사를 이용하여 분획들을 검사했다. 시험관내 면역복합체 키나제 검사를 이용할 때 p185c-neu의 티로신 키나제 활성을 투여량-의존적 방식 으로 증가시키는 활성은 약 220 내지 240mM의 NaCl 의 4 내지 5분획(36-40) 에서 하나의 우세한 피크로서 용출되었다. HPLC-DEAE

정제후, 활성분획의 단백질을 농축시키고 모으고, 농축시키고 C18(무수한 매트릭스) 역상 크로마토 그래피에 적용시켰다(Waters, Inc., Milford, MA)(C18 #1단계 또는 2 컬럼 정제된 물질로서 나타냄). 용출은 0.1% TFA 에 대한 2-프로판올의 직선구배로 수행하였다. 모든 분획을 RPMI 1640 배지에 대해서 투석하여 2-프로판올을 제거하고, 하기에서 기술한 시험관내 면역복합체 키나제 검사 및 1% 농도의 적합한 분획을 이용하여 검사하였다.

p185c-neu의 티로신 키나제 활성을 증가시키는 활성은 두피크로 용출되었다. 하나는 분획 11-13에서 용출되고, 두번째의 약간 더 적은 활성피크는 분획 20-23에서 용출되었다. 이 두 피크는 각각 약 5 내지 7% 의 이소프로판올 및 11 내지 14% 이소프로판올에 해당한다. 특정화 연구에는 C18 #1 생성 분획 11-13 을 이용하였다.

두번째 크로마토그래피 단계에서 얻은 활성 분획을 모아서 단백질성 물질샘플로서 나타냈다.

20 리터 제조물은 동일한 정제방법을 이용했다. DEAE 활성 분획 35-41을 모아서 상술한 대로 C18크로마토그래피에 적용시켰다. C18 #1 분획 11-13 및 21-24둘다 투여량-의존적 활성을 가졌다. 분획 11-13의 푸울을 추가의 C18 크로마토그래피 단계에 적용시켰다(C18 #2 또는 3컬럼 정제된 물질로서 나타냄). 다시 분획 11-13 및 21-24는 활성을 가졌다. 실시예 8에서 기술된 시험관내 면역복합체키나제 검사에 의해 결정했을때 분획 23 의 투여량 반응은 분획 23 체적당 0.005% 및 분획 23체적당 0.05%의 첨가에 의하여 얻어질 수 있다. 이것은 얻어진 최고의 순도를 나타낸다.

분자량 범위는 겔여과 크로마토그래피 및 한외여과 막 분석에 기초하여 결정되었다. 10,000분자량 차단값 필터에 의하여 거의 동일한 양의 티로신 키나제 활성이 유지되고 통과되었다. 30,000분자량 차단값 필터에 의하여 거의 모든 활성이 통과되었다. 활성크로마토그래피 분획의 분자량 범위는 동일한 전개 조건을 이용하여 생성된 일련의 단백질 분자량 표준물(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)의 용출 프로필과 투여량-의존적 neu-활성화 활성을 함유하는 분획을 비교함으로써 결정되었다. 활성의 저분자량 범위는 7,000과 14,000 달톤사이에서 확인되었다. 활성의 두 번째 범위는 약 14,000 내지 약 24,000 달톤이었다.

폴리아크릴아미드 구배겔(Integrated Separation Systems, Hyde Park, MD 또는 Amersham 의 Phorecase System, Arlington Heights, IL)을 이용한 겔 전기영동후, 상업적으로 얻을 수 있는 은염색키트(BioRad, Rockville Centre, NY)로 3-컬럼 정제된 물질(C18 #2)의 은염색을 행하였다. 20리터 제조물의 C18 #2 정제로부터 분획 21, 22, 23 및 24를 마커와 함께 전개시켰다. 분획 22 및 23 은 $p185^{erbB2}$ (neu)키나제 검사에서 가장 강력한 투여량 반응을 보였다(하기참조). 선택된 분자량 분획이 $p185^{erbB2}$ 와 상호작용하는 사실이 면역복합체 키나제 검사로 입증되었다.

여기서 참고문헌으로 통합된 Huang등(1992, J. Biol, Chem, 257: 11508-11512) 은 소의 신장으로부터 부가적인 neu/erbB2 리간드 성장인자를 분리하였다. 25kD 폴리펩티드 인자는 칼럼 분류과정, 이후 DEAE/셀룰로스(DE52), Sulfadex(황산 염화된 세파덱스 G-50), 헤파린-세파로스 4B, Superdex 75(패스트 단백질 액체 크로마토그래피) 에서의 연속적인 컬럼 크로마토그래피에 의하여 분리하였다. 인자 NEL-GF 는 neu/erbB2 유전자 산물의 티로신-특이적인 자기인산화를 자극시킨다.

Ⅶ. $p185^{erbB2}$ 와의 NDF리간드 결합에 대한 면역복합체 검사

이 검사는 ATL-2 조건배지(C.H.)또는 단백질성 물질의 양을 변화시켜서 PN-NR6 세포 용해물과 예비-배양시킴으로써 생기는 면역침전된 p185 의 자기인산화 활성의 차이를 반영하고 하기에서는 neu-활성화 활성으로 나타낸다.

면역복합체 키나제 검사에서 사용된 세포주는 다음의 방법에 따라 얻어지고, 제조되고, 배양되었는데, 그 방법은 개시내용이 여기서 참고문헌으로 통합된 Kokai et al., Cell 55, 287-292 (1989. 7.28)및 개시내용이 여기서 참고문헌으로 통합된 " Methods of Treating Cancerous Cells With Anti-Receptor Antibodies" 라는 제목으로 Mark I. Green 이 1989 년 7월27일 출원한 미국특허출원 제 386,820호에서 기술되었다.

세포주는 모두 5% CO_2가 있는 습기찬 분위기에서 37℃에서 배양배지로서 5% FCS를 함유하는 DMEM 배지(5% FCS-DMEM) 에서 유지되었다.

150mm접시의 밀집한 세포 배양물을 냉각 PBS로 두번세척하고, 10ml의 동결-해빙 완충액(150mM NaCl. 1mM $MgCl_2$, 20mM Hepes, pH 7.2 10% 글리세룰, 1mM EDTA, 1% 아프로티닌) 속에 긁어넣고, 원심분리하였다(600×g, 10 분). 세포펠렛을 1ml용해 완충액(50mM Hepes, pH 7.5 150mM NaCl, 3% Brij 35, 1mM EDTA, 1.5mM $MgCl_2$, 1% 아프로티닌, 1mM EGTA, 20 μM Na_3VO_4, 10% 글리세롤) 중에 재현탁시키고 4℃에서 30분동안 회전시켰다. 모든 화학약품은 다른 표시가 없으면 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo 에서 구입하였다. 40,000×g 에서 30 분간 원심분리하여 불용성물질을 제거했다. 이후에 사용한 투명한 상청액을 세포용해물로 나타냈다.

세포용해물을 50μℓ 의 50%(체적/체적) 프로틴 A-세파로스(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)와 15 분간 배양하고 2분간 원심분리하여 용해물을 사전 정화하였다. 사전정화한 세포용해물 50μℓ 분액을 최종체적 1ml의 용해 완충액에서 조건배지, 단백질성 물질, 또는 특정된 다른 인자들과 함께 15 분간 얼음에서 배양하였다. 그 다음 샘플을 p185neu 및 p185c-neu의 세포외 도메인을 인식하는 7. 16. 4 단클론성 항체 또는 다른 적합한 항체 5μg 과 얼음에서 20 분간 배양한후, 4℃에서 회전시키면서 50%(v/v) 프로틴 A-세파로스 50μℓ 와 20 분간 배양했다. 면역복합체를 원심분리로 모으고, 세척완충액(50mM Hepes, pH 7.5, 0.1% Brij 35, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% 아프로티닌, 30μM Na_3VO_4) 500μℓ 로 4번, 그다음엔 반응완충액(20mM Hepes(pH 7.4), 3mM $MnCl_2$ 및 0.1% Brij 35, 30μM, Na_3VO_4) 으로 두번 세척하였다. 펠렛을 반응완충액 50μℓ 에 재현탁시키고(감마-^{32}P)-ATP(Amersham, Arlington Heights, IL) 를 최종농도 0.2μM 이 되도록 첨가하였다. 샘플을 27℃에서 20분간 또는 4℃에서 25 분간 더 순수한 샘플과 배양하였다. 2mM ATP 및 2mM EDTA 를 포함하는 3×SDS 샘플 완충액을 첨가한 다음 100℃에서 5 분간 그것을 배양함으로써 반응을 종결시켰다.

그후 샘플을 10% 아크릴아미드 겔에서 SDS-PAGE 분석하였다. 겔을 염색하고, 건조시키고, 보력스크린으로 코닥 XAR 또는 XRP필름에 노출시켰다.

Ⅷ. 아세틸콜린 리셉터 유도활성(ARIA)의 정제

아세틸콜린 리셉터 합성을 자극하는 42kD 단백질인 ARIA 는 Gerald Fischbach 의 실험실에서 분리되었다(Falls et al., Cell 72: 801-815 (1993)). ARIA 는 $p185^{erbB2}$ 와 유사한 185kDa 근육 막통과 단백질의 티로신 인산화를 유도하고 배양된 배근관에서 아세틸콜린 리셉터 합성을 자극한다. ARIA를 암호화하는 cDNA 클론의 서열분석은 ARIA 가 GGF/erbB2리간드 단백질족에 속하는 것을 보여주며, 이것은 잠재적으로 가령 여기서 기재된 GGF2 의 신경 교질세포 분열자극 및 다른 응용에 유용하다는 것을 보여준다.

[실시예 14]

시반세포에서 GGF에 의해 매개되는 단백질 티로신 인산화

래트시반세포는 증식을 유도할 만큼 충분한 수준의 신경교질 성장인자로 처리한 후에 단백질 티로신 인산화의 자극을 나타낸다(제36도). 부분정제한 GGF의 다양한 양을 실시예 3에서 개략된 방법에 따라서 래트시반세포의 일차 배양물에 적용시켰다. 폴리 D-리신 피복된 24 웰 플레이트에서 DMEM/10% 태아 소 혈청/5μM 포스콜린/0.5μg/mL GGF-CM(0.5mL/웰) 중에서 시반세포를 생장시켰다. 밀집되었을때 웰당 0.5mL의 DMEM/10% 태아 소혈청을 세포에 공급하고 인큐베이터에서 하룻방 동안 방치하였다. 다음날 0.2mL의 DMEM/10% 태아 소혈청을 세포에 공급하고 1시간동안 인큐베이터에서 방치하였다. 그 다음 시험샘플을 다른 농도로 그리고 필요하면 다른 길이의 시간동안 직접 배지에 첨가하였다. 그후 세포를 비등하는 용액완충액(인산나트륨, 5mM, pH 6.8; SDS, 2%, β-메르캅토에탄올, 5%; 디티오 트레이톨, 0.1M; 글리세롤, 10%; 브로모페놀블루, 0.4%; 바나듐산나트륨, 10mM) 에서 용해시키고, 비등하는 수조에서 10분 배양한 다음 직접분석하거나 또는 -70℃에서 동결시켰다. 샘플은 Towbin et al. (1979) Proc. NaCl. Acad. Sci, USA 76: 4350-4354에서 기술된 표준방법을 이용하여 7.5% SDS-PAGE 겔에서 전개시킨 다음 니트로셀룰로스 상에 일렉트로블로팅하여 분석하였다. 블로팅된 니트로셀룰로스를 Kamps and Selton(1988) Oncogene 2 : 305-315에서 기술된 표준방법을 이용하여 안티포스 포티로신으로 프로브화하였다. 프로브화된 블롯을 하룻방동안 방사선사진 필름에 노출시키고 표준실험실 프로세서를 이용하여 현상하였다. Ultrascan XL 강화레이저 농도계(LKB)를 이용하여 농도측정을 행하였다. 사전염색된 고분자량 표준물(Sigma) 과 상대적으로 분자량 결정을 했다. 단백질 인산화 및 시반세포증식의 투여량 반응은 매우 유사하다(제36도). 인산화된 밴드의 분자량은 $p185^{erbB2}$ 의 분자량과 매우 가깝다. GGF2HBS5클론으로의 COS세포 번역물로 부터 제조한 조건배지로 시반세포를 처리했을때 유사한 결과가 얻어졌다. 이러한 결과는 GGF와 185^{erbB2} 의 기대되는 상호작용과 185^{erbB2} 의 활성화와 잘 연관된다.

재조합 GGF-Ⅱ으로 이 실험을 반복하였다. GGF-Ⅱ클론(GGF2HBS5)으로 안정하게 형질전환된 CHO세포주에서 유도된 조건배지는 상술한 검사를 이용할때 단백질티로신인산화를 촉진시킨다. 모조 트랜스펙션된 CHO세포는 이 활성을 촉진시키지 못하였다(제52도).

[실시예 15]

MDA-MB-231세포주의 단백질 인자에 의한 시반세포 증식 검사

시반세포증식은 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 에서 유도된 조건배지에 의하여 매개된다. 검사 1일경에, 10^4 일차 래트시반세포를 96 웰 마이크로타이터 플레이트의 웰당 5% 태아 소혈청으로 보충된 Dulbecco 변형 이글배지 100μℓ 중에서 플레이팅하였다. 검사 2일경에, 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 10μℓ 의 조건배지(실시예 6에서 기술한대로 배양된 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 로부터) 를 첨가하였다. 검사 6일경에, 플레이트당 시반세포의 수를 산 포스파타제 검사(Connolly et al. Anal. Biochem. 152: 136 (1986)의 방법에 따라서) 를 이용하여 결정했다. 플레이트를 100μℓ 의 인산염완충 식염수(PBS) 로 세척하고 웰당 100μℓ 의 반응완충액(0.1M 아세트산 나트륨(pH 5.5), 0.1%트리톤 X-100, 10mM p-니트로페닐 포스페이트) 을 첨가했다. 플레이트를 37℃에서 2시간 동안 배양하고 10μℓ 의 1N NaOH의 첨가에 의해 반응을 종결시켰다. 각 샘플의 광학밀도는 410nm에서 분광광도계로 계측하였다.

콘트롤 세포주(HS-294T, erbB-2리간드의 비-생산자) 의 조건배지로 처리한 시반세포에 대해서 세포수의 38%촉진이 관찰되었다. 이러한 결과는 MDA-MB-231 세포주($p185^{erbB2}$ 결합활성을 분비함) 에 의해 분비되는 단백질이 시반세포증식을 촉진시키는 것을 보여준다.

[실시예 16]

GGF의 N-글리코실화

GGF-Ⅱ후보 클론 GGF2BPP 1, 2 및 3의 cDNA 서열로부터 예상되는 단백질 서열은 많은 컨센서스(consensus) N-글리코실화 모티프를 포함한다. GGFⅡ02펩티드 서열의 틈은 이러한 모티프중 하나의 아스파라긴 잔기와 일치하고, 이것은 탄수화물이 아마도 이 부위에 결합되는 것을 나타낸다.

단백질의 아스파라긴 잔기와 탄수화물 사이의 공유결합을 절단하는 효소인 N-글리칸아제와 배양한후 SDS-PAGE 에서 운동성 변화를 관찰함으로써 GGF의 N-글리코실화를 연구하였다.

GGF-Ⅱ의 N-글리칸아제 처리는 MW 40-42 kDa 의 주요 밴드와 45-48 kDa에서의 작은 밴드를 생성했다. 비-환원 조건하에서 활성용출 실험은 45-50 kDa에서 단일의 활성 탈글리코실화된 종을 나타냈다.

GGF-I으로의 활성 용출실험은 또한 N-글리칸아제로 처리하면 전기영동 운동성의 증가를 나타내서, MW 26-28 kDa의 활성종을 생성하였다. 은 염색은 운동성 변화가 있는 것을 확인시켰지만, 사용된 샘플에서의 백그라운드 염색 때문에 어떤 N-탈글리코실화된 밴드도 정할 수 없었다.

[기탁]

T7 프로모터의 조절하에 있는 플라스미드 pBluescript 5K 내의 GGF-Ⅱ단백질(실시 예 6)을 암호화하는 핵산(cDNA, GGF2HBS5)은 1992 년 9월 2일 메릴랜드 록빌리의 아메리칸 타입 컬춰 콜렉션에 기탁되었고, ATCC수탁번호 75298이 주어졌다. 출원인은 이것에 대해 발행된 특허기간의 만료전에 비-생존가능해지면 이 플라스미드를 대체할 책임을 인정하고, 그러한 특허가 발행되었음을 ATCC 에 통지할 책임을 인정하며, 그때에는 기탁물이 공중에게 이용될 수 있게 된다. 그시점 이전에는 37 CFR §1.14및 35 USC §112 의 조건하에 기탁물이 특허청장에게 이용될 수 있게 될 것이다.

[발명의 효과]

본 발명은 시반세포(Schwann cell)를 포함하는 신경교질세포(glial cell)의 분열촉진(mitogenic) 성장인자인 척추동물 종에서 발견되는 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명은 또한 그러한 인자를 제조할 수 있는 방법, 및 그러한 인자의 치료적 이용을 제공한다.

미 생 물

상세한 설명 107페이지 17-22행의 미생물과 관련한 선택용지 [1]

A. 기탁의 확인 [2]
다른 기탁이 추가용지상에서 확인됨 ☐ [3]

기탁기관의 명칭 [4]
아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션

기탁기관주소 (우편번호와 국가명 포함) [4]
미합중국 마릴랜드 20852, 록크빌 파크로운 드라이브 12301

기탁일 [5]	수탁번호 [6] : 75298
1992년 9월 2일	

B. 추가지시 [7] (적용되지 않을 경우 공란),
별도의 첨부용지상에 본 정보가 계속됨 ☐

GGF2HBSS 단백질을 암호화하는 핵산

C. 지시가 적용될 지정국가 [3] (모든 지정국가에 대한 지시가 아닐 경우)

D. 지시의 별도 제공 [8] (적용되지 않을 경우 공란)

이하에 기술된 지시가 이후에 국제사무국에 제출될 것임 [9]
(예를들면, 기탁의 수탁번호와 같이 지시의 일반적 특성을 특정할 것)

E. ■ 본 용지는 국제출원이 출원될 때 국제출원과 함께 접수함 (수리관청이 점검함)

도로츠 앨. 보톤크
(담당자)

☐ 국제사무국에 의한 접수일 (출원인으로부터) [10]

(담당자)

(57) 청구의 범위

청구항 1.

제31도(SEQ ID NO. 136, 138, 139)에서 보여지는 FBA 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 2.

제31도(SEQ ID NO. 136-139, 163)에서 보여지는 FEBA 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 3.

제31도(SEQ ID NO. 136, 139, 140)에서 보여지는 FBA' 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 4.

제31도(SEQ ID NO. 136-139, 140, 163)에서 보여지는 FEBA' 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 5.

제45도(SEQ ID NO. 167)에서 보여지는 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 정제된 GGF2 폴리펩티드.

청구항 6.

신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 단백질의 정제방법에 있어서, 상기 방법은 태아 소 혈장의 존재하에서 시반세포의 분열을 촉진시키는 분열촉진활성을 갖는 염기성 폴리펩티드 인자에 대한 항체와 세포추출물을 접촉시키는 것으로 이루어지고, 상기의 폴리펩티드는 약 30KD 내지 약 36KD 의 분자량을 가지고, 상기의 폴리펩티드는 하기의 폴리펩티드 서열중 적어도 하나를 그것의 아미노산 서열내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

F K G D A H T E
A S L A D E Y E Y M X K
T E T S S S G L X L K
A S L A D E Y E Y M R K
A G Y F A E X A R
T T E M A S E Q G A
A K E A L A A L K
F V L Q A K K
E T Q P D P G Q I L K K V P M V I G A Y T
E Y K C L K F K W F K K A T V M
E X K F Y V P
K L E F L X A K

청구항 7.

신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 단백질의 정제방법에 있어서, 상기 방법은 태아 소 혈장의 존재하에서 시반세포의 분열을 촉진시키는 분열촉진활성을 갖는 염기성 폴리펩티드 인자에 대한 항체와 세포추출물을 접촉시키는 것으로 이루어지고, 상기의 폴리펩티드는 약 55KD 내지 약 63KD 의 분자량을 가지고, 상기의 폴리펩티드는 하기의 폴리펩티드 서열중 적어도 하나를 그것의 아미노산 서열내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

V H Q V W A A K
Y I F F M E P E A X S S G
L G A W G P P A F P V X Y
W F V V I E G K
A S P V S V G S V Q E L Q R
V C L L T V A A L P P T
K V H Q V W A A K

K A S L A D S G E Y M X K
D L L L X V
E G K V H P Q R R G A L D R K
P S C G R L K E D S R Y I F F M E
E L N R K N K P Q N I K I Q K K

청구항 8.

신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 단백질의 정제방법에 있어서, 상기 방법은 신경교질세포 분열촉진활성을 가지고 하기의 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 인자에 대한 항체와 세포추출물을 접촉시키는 것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

(a) 제28a도, 제28b도, 제28c도(각기 SEQ ID NO. 133-135)에서 보여지는 DNA서열;

(b) 제22도(SEQ ID NO. 89)에서 보여지는 DNA서열;

(c) 제28a도에서 보여지는 서열의 뉴클레오티드 281-557에 의해 나타내지는 DNA 서열;

(d) (a), (b) 또는 (c)의 DNA서열에 혼성화하는 DNA서열.

청구항 9.

신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 단백질의 정제방법에 있어서, 상기 방법은 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 환원조건 또는 그렇지 않은 조건에서 약 30KD 내지 약 36KD 의 분자량을 갖는 염기성 폴리펩티드 인자에 대한 항체와 세포 추출물을 접촉시키는 것으로 이루어지고, 상기의 폴리펩티드 인자는 태아 소 혈장의 존재하에서 래트 시반세포의 분열을 촉진시키는 분열촉진활성을 가지며, 역상 HPLC 를 이용하여 분리했을때 4℃에서 0.1% 트리플루오로아세트산중에서 10 주일간 배양한 후에 상기 활성의 적어도 50%를 유지하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 단백질의 정제방법에 있어서, 상기의 방법은 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 비- 환원조건하에서 약 55KD 내지 약 63KD 의 분자량을 갖는 염기성 폴리펩티드 인자에 대한 항체와 세포추출물을 접촉 시키는 것으로 이루어지고, 상기의 폴리펩티드 인자는 태아 소 혈장의 존재하에서 래트 시반세포의 분열을 촉진시키는 분열촉진활성을 가지며, 역상 HPLC 를 이용하여 분리했을때 4℃에서 0.1% 트리플루오로아세트산중에서 4일간 배양한 후에 상기 활성의 적어도 약 50%를 유지하는 것을 특징으로하는 방법.

청구항 11.

제38도의 SEQ ID NO. 154에 보여지는 EGFL1 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 12.

제39도의 SEQ ID NO. 155에 보여지는 EGFL2 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 13.

제40도의 SEQ ID NO. 156에 보여지는 EGFL3 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 14.

제41도의 SEQ ID NO. 157에 보여지는 EGFL4 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 15.

제42도의 SEQ ID NO. 158에 보여지는 EGFL5 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 16.

제43도의 SEQ ID NO. 159에 보여지는 EGFL6 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 17.

제31도(SEQ ID NO. 137, 163)에 보여지는 E 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 18.

제31도(SEQ ID NO. 160, 142)에 보여지는 C-C/D 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 19.

제31도(SEQ ID NO. 160, 143)에 보여지는 C-C/D' 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 20.

제31도(SEQ ID NO. 138, 139)에 보여지는 B-A 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 21.

제45도의 SEQ ID NO. 167에 보여지는 아미노산 서열의 362-411 아미노산을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 22.

제32도의 SEQ ID NO. 148에 보여지는 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 GGF2BPP5 폴리펩티드.

청구항 23.

제34도의 SEQ ID NO. 150에 보여지는 아미노산 서열을 함유하며 신경교질세포 분열촉진활성을 갖는 GGF2BPP4 폴리펩티드.

청구항 24.

샘플 내에서 제1항 내지 제4항, 제11항 내지 23항의 폴리펩티드에 대한 수용기의 존재를 확인하는 방법으로서, 상기 샘플을 상기 폴리펩티드에 접촉시키는 단계 및 상기 수용기의 존재를 지시하는 그들 사이의 결합을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제1항 내지 제4항, 제11항 내지 23항의 폴리펩티드에 대한 결합능이 있는 수용기를 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 샘플에 대해 친화성 리간드로서 상기 펩티드를 사용한 친화성 분리를 수행하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

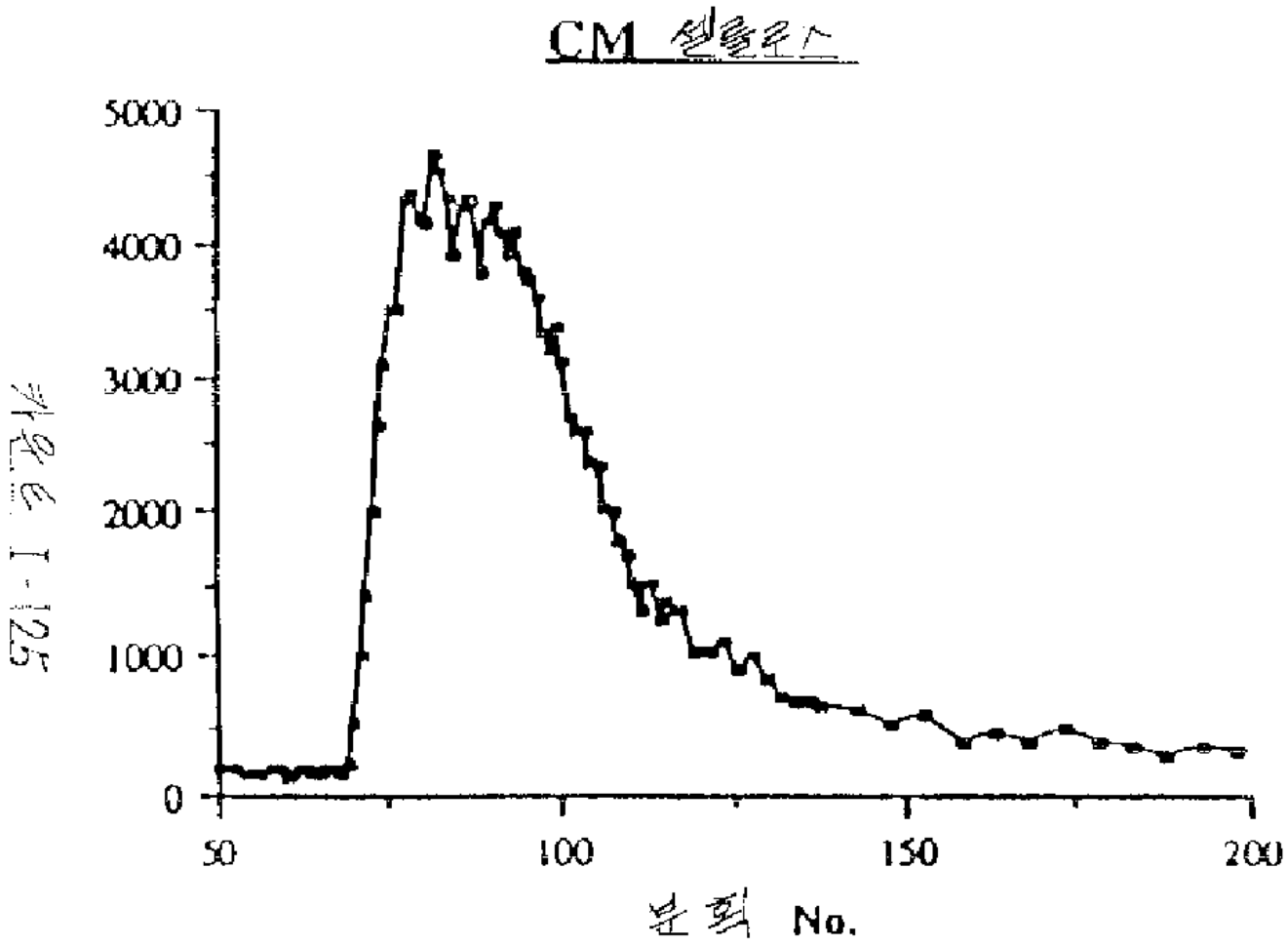
제1항 내지 제4항, 제11항 내지 23항중 어느 한 항에 있어서, 세포내에서 아세틸콜린 수용기 합성을 유도하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 27.

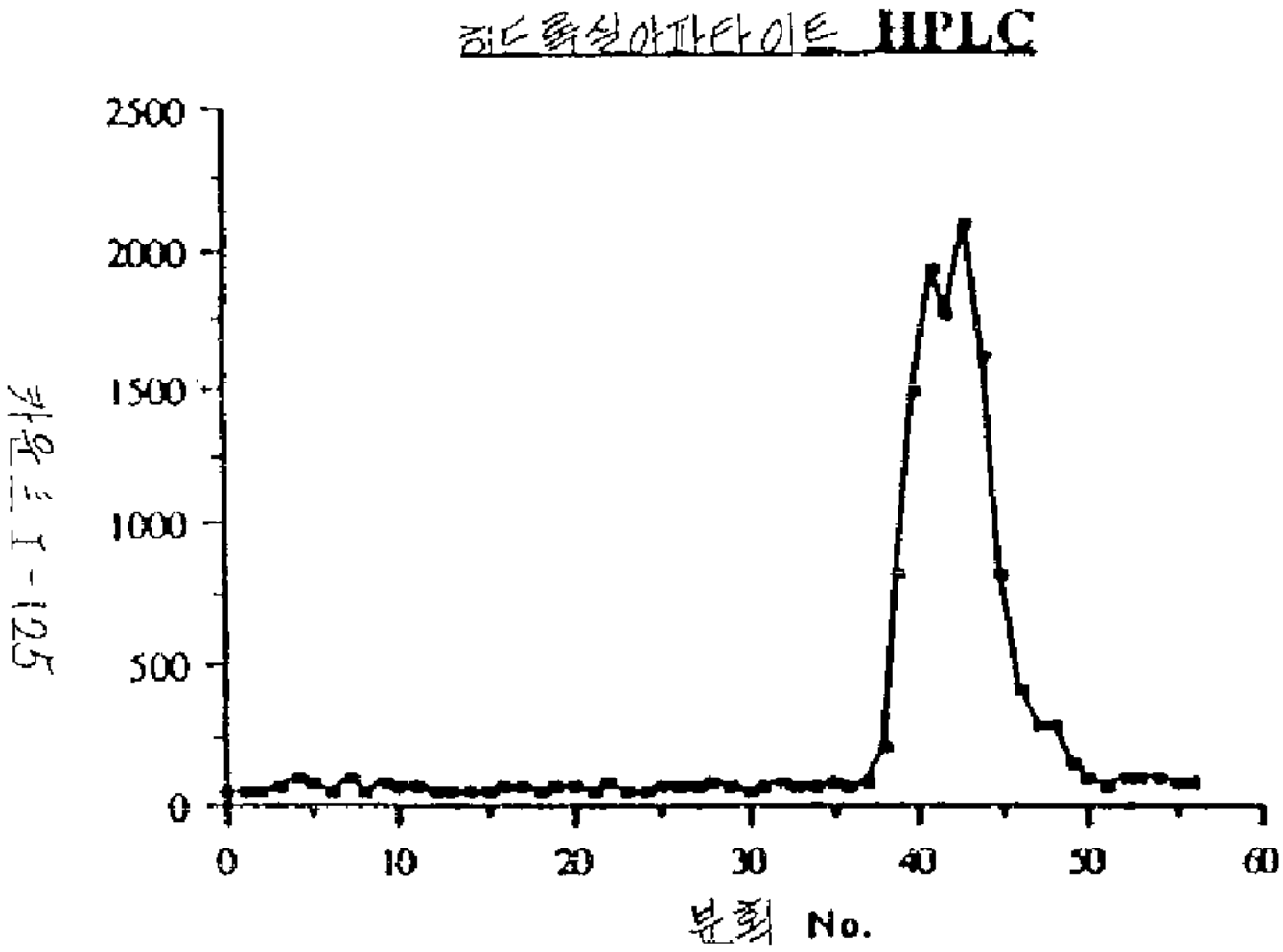
제1항 내지 제4항, 제11항 내지 23항중 어느 한 항에 있어서, 신경교질세포에 의한 신경세포의 미엘린화를 유도하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

도면

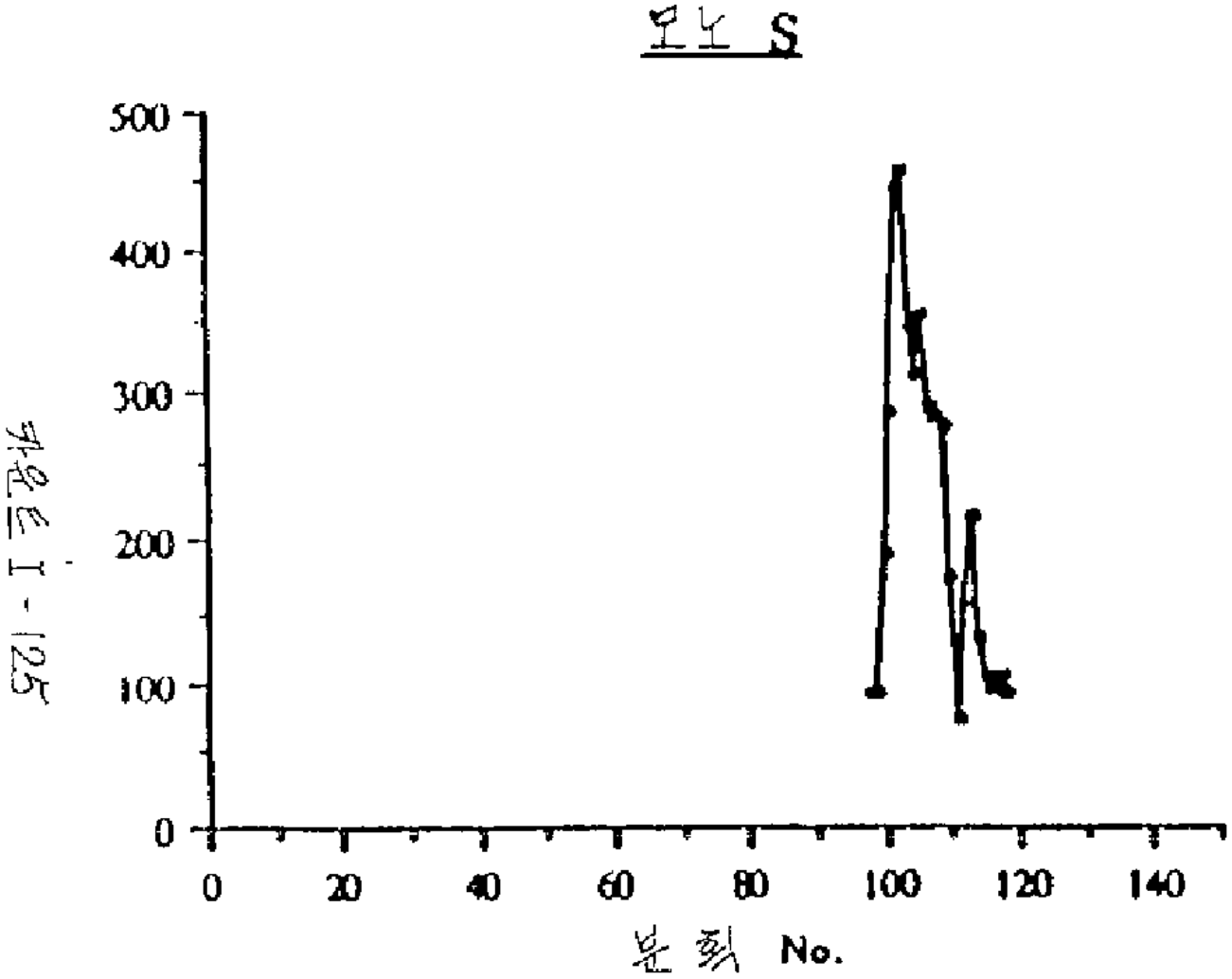
도면 1



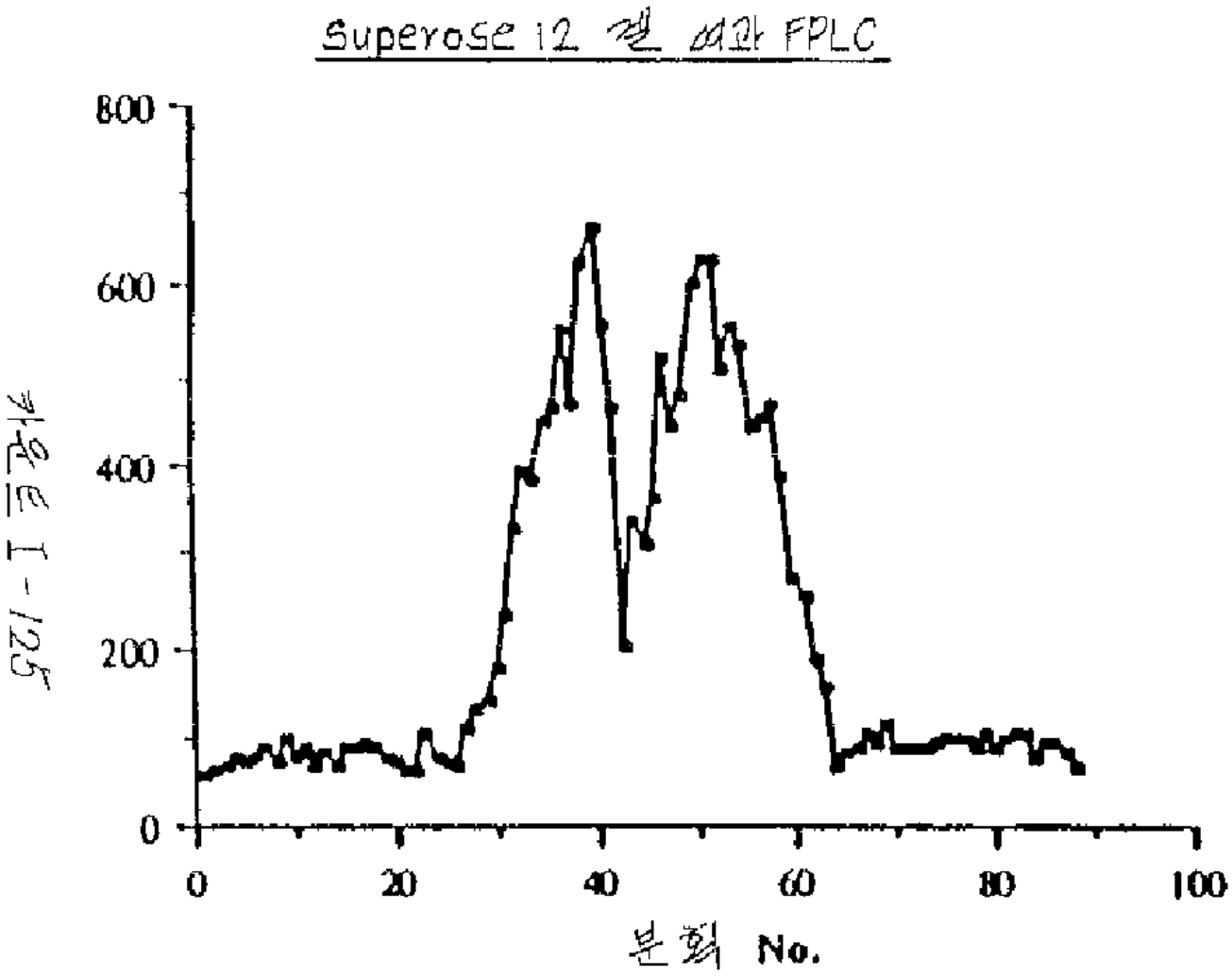
도면 2


히드록실아파타이트 HPLC
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
분획 No.

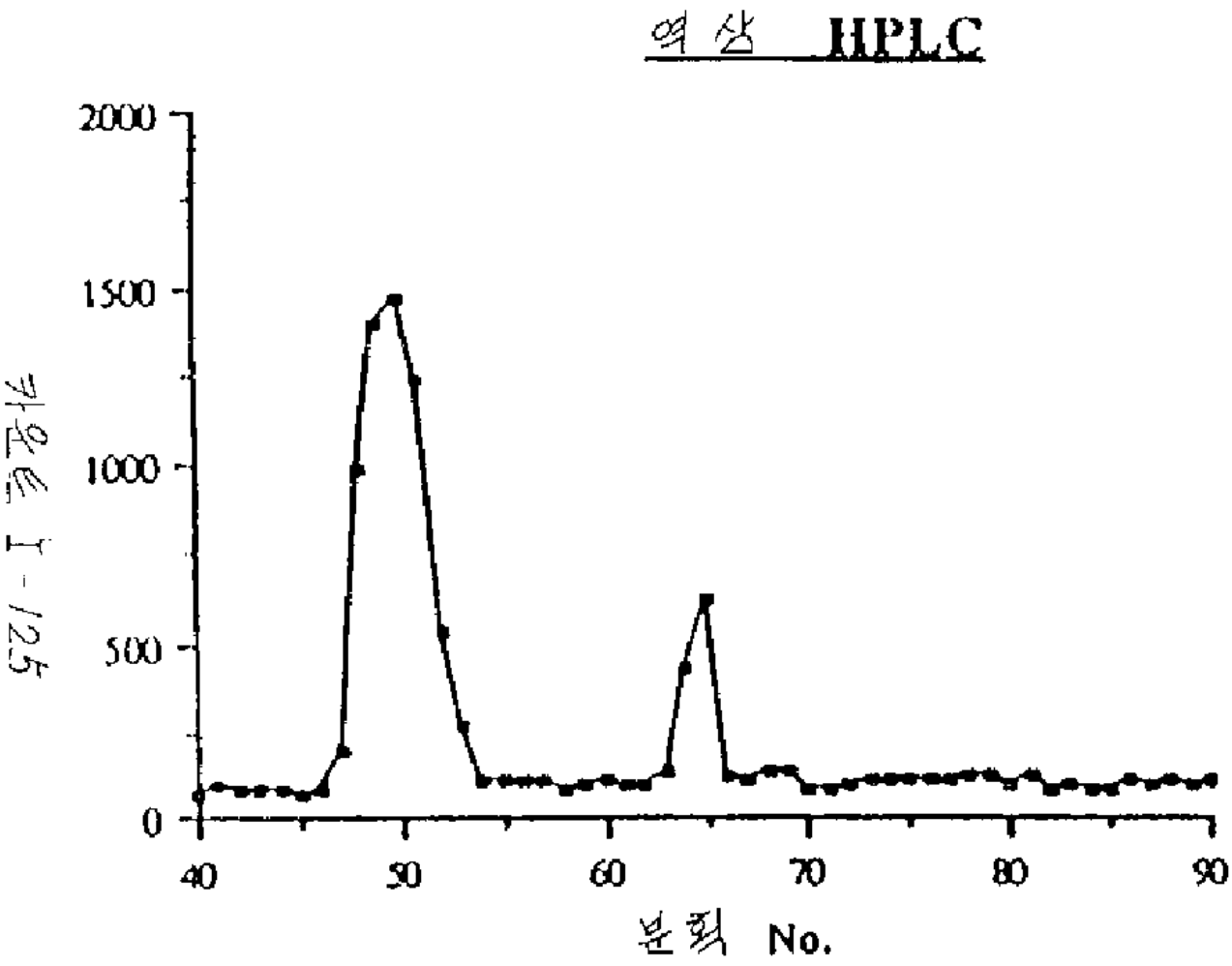
도면 3



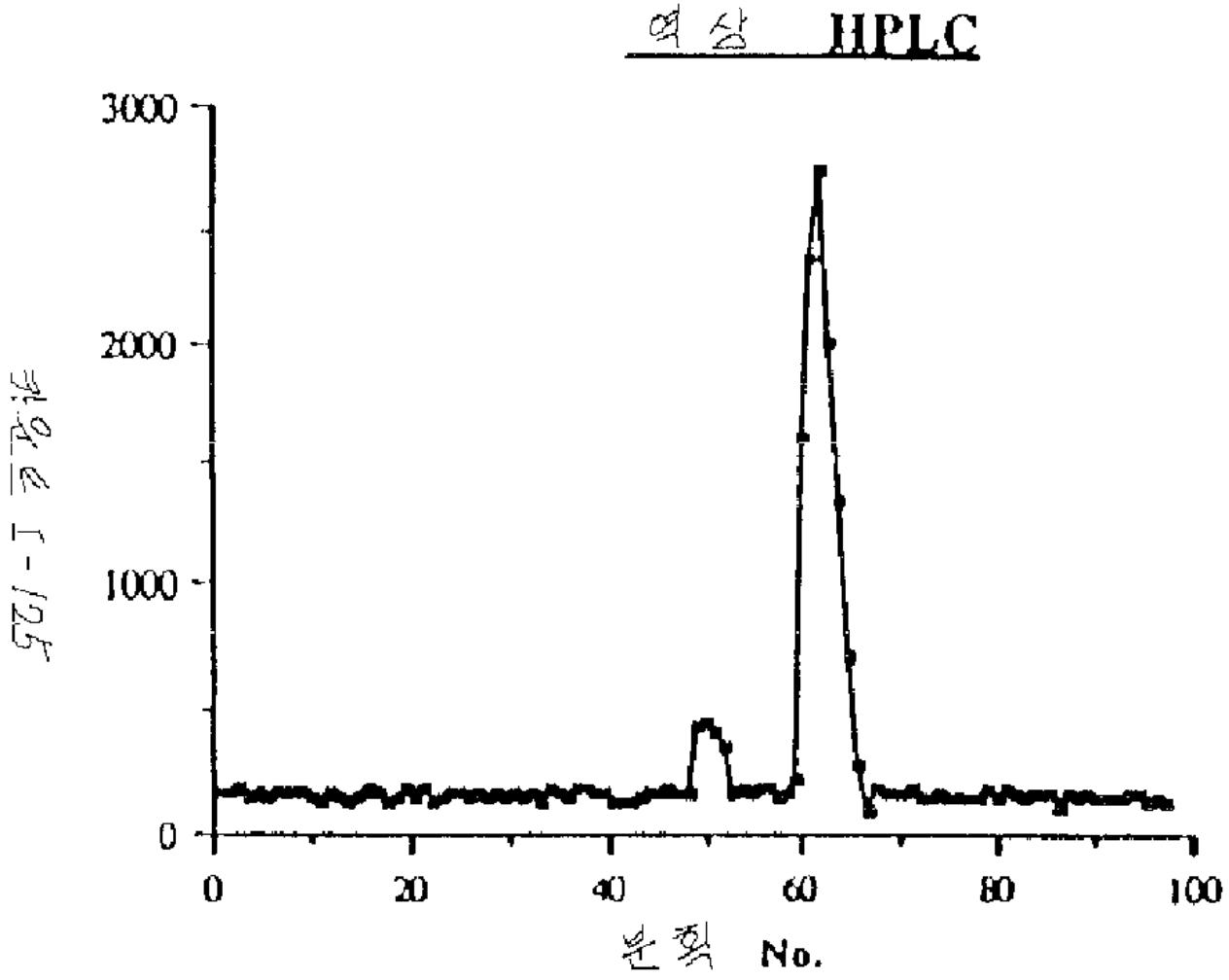
도면 4



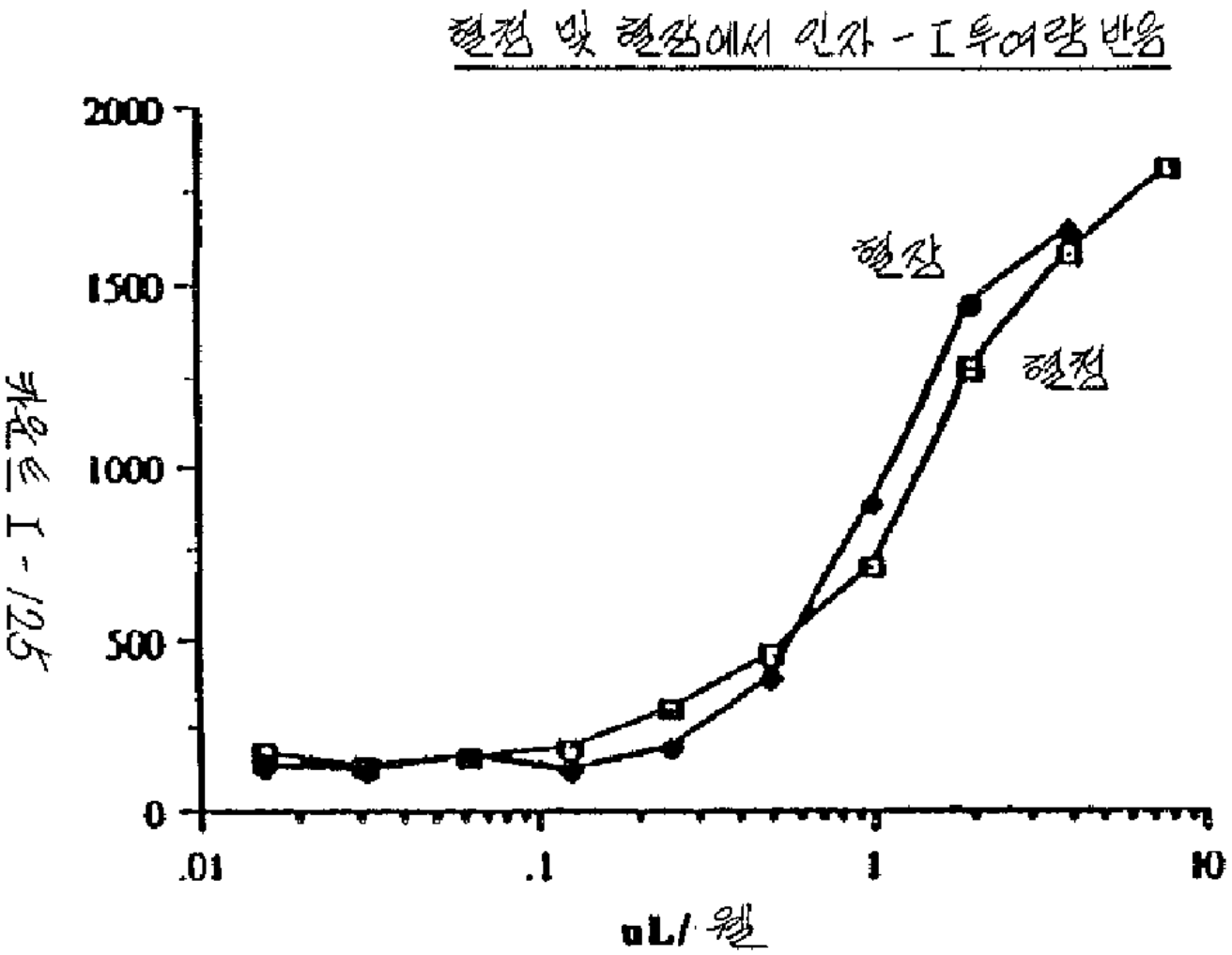
도면 5



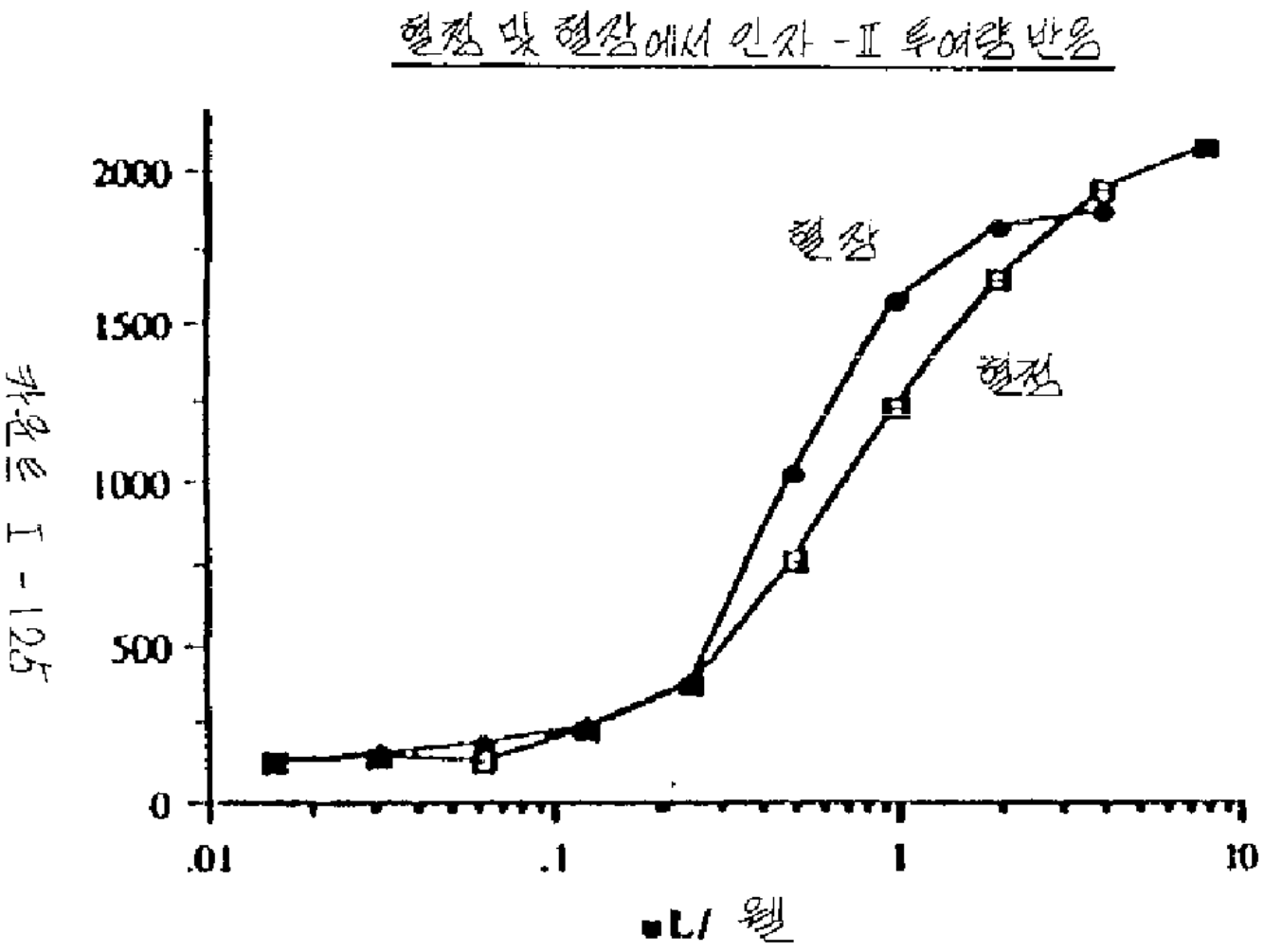
도면 6



도면 7



도면 8


혈전 및 혈장에서 인자 -II 투여량 반응
2000
1500
1000
500
0
.01
.1
1
10
혈장
혈전
I-125 표지된 카운트
mL/ 웰

도면 9

N-말단

SF-I 01 F K G D A H T E (SEQ ID NO: 1)

트립신에 의한 펩티드

SF-I 02 K/R A S L A D E Y E Y M X K * (SEQ ID NO: 2
SF-I 03 K/R T E T S S S G L X L K * (SEQ ID NO: 3)
SF-I 04 K/R K L G E M W A E (SEQ ID NO: 4) HMG-1
SF-I 05 K/R L G E K R A (SEQ ID NO: 5) HMG-17
SF-I 06 K/R I K S E H A G L S I G D T A K * (SEQ ID NO: 6) HMG-2
SF-I 07 K/R A S L A D E Y E Y M R K * (SEQ ID NO: 7)
SF-I 08 K/R I K G E H P G L S I G D V A K * (SEQ ID NO: 8) HMG-1
SF-I 09 K/R M S E Y A F F V Q T X R * (SEQ ID NO: 9) HMG-2
SF-I 10 K/R S E H P G L S I G D T A K * (SEQ ID NO: 10) HMG-1
SF-I 11 K/R A G Y F A E X A R * (SEQ ID NO: 11)
SF-I 12 K/R K L E F L X A K * (SEQ ID NO: 12)
SF-I 13 K/R T T E M A S E Q G A (SEQ ID NO: 13)
SF-I 14 K/R A K E A L A A L K * (SEQ ID NO: 14)
SF-I 15 K/R F V L Q A K K * (SEQ ID NO: 15)
SF-I 16 K/R L G E M W (SEQ ID NO: 16) HMG-1

프로테아제 V8 펩티드

SF-I 17 E F Q P D P G Q I L X X V P M V I G A Y T (SEQ ID NO: 169)
SF-I 18 E Y K C L K F K W F K K A T V M (SEQ ID NO: 17)
SF-I 19 E A K Y F S X X D A (SEQ ID NO: 18) LH-왈파
SF-I 20 E X K F Y V P (SEQ ID NO: 19)
SF-I 21 E L S F A S V R L P Q C P P G V Q P M V S F P V A L LH-베타(SEQ ID NO: 20

도면 10

A

OGF-I 01 F K G D A H T E	(SEQ ID NO: 1
OGF-I 02 A S L A D E Y E Y H X K	(SEQ ID NO: 22)
OGF-I 03 T E T S S S G L X L K	(SEQ ID NO: 23)
OGF-I 07 A S L A D E Y E Y H R K	(SEQ ID NO: 24)
OGF-I 11 A G Y F A E X A R	(SEQ ID NO: 25)
OGF-I 13 T T E H A S E Q G A	(SEQ ID NO: 26)
OGF-I 14 A K E A L A A L K	(SEQ ID NO: 27)
OGF-I 15 F V L Q A K K	(SEQ ID NO: 28)
OGF-I 17 E T Q P D P G Q I L K K V P H V I G A Y T	(SEQ ID NO: 29)
OGF-I 18 E Y K C L K F K W F K K A T V H	(SEQ ID NO: 17

B

OGF-I 20 E X K F Y V P	(SEQ ID NO: 19
OGF-I 12 K L E F L X A K	(SEQ ID NO: 32)

도면 11

트립신에의한 펩티드

GGF-II 01	K/R VHQVWAAK*		(SEQ ID NO: 45)
GGF-II 02	K/R YIFFMEPEAXSSG		(SEQ ID NO: 46)
GGF-II 03	K/R LGAWGPPAFPVXY		(SEQ ID NO: 47)
GGF-II 04	K/R WFVVIEGK*		(SEQ ID NO: 48)
GGF-II 05	K/R ALAAAGYDVEK*	히스톤H1	(SEQ ID NO: 164)
GGF-II 06	K/R LVLR*		(SEQ ID NO: 165)
GGF-II 07	K/R XXYPGQITSN	트립신	(SEQ ID NO: 166)
GGF-II 08	K/RASPVSVGSVQELVQR*		(SEQ ID NO: 49)
GGF-II 09	K/RVCLLTVAALPPT		(SEQ ID NO: 50)
GGF-II 10	K/RDLLLXV		(SEQ ID NO: 53)

리신엔도펩티다제-C펩티드

GF-II 11	KVHQVWAAK*	(SEQ ID NO: 51)
GF-II 12	KASLADSGEYMXK*	(SEQ ID NO: 52)

도면 12

A

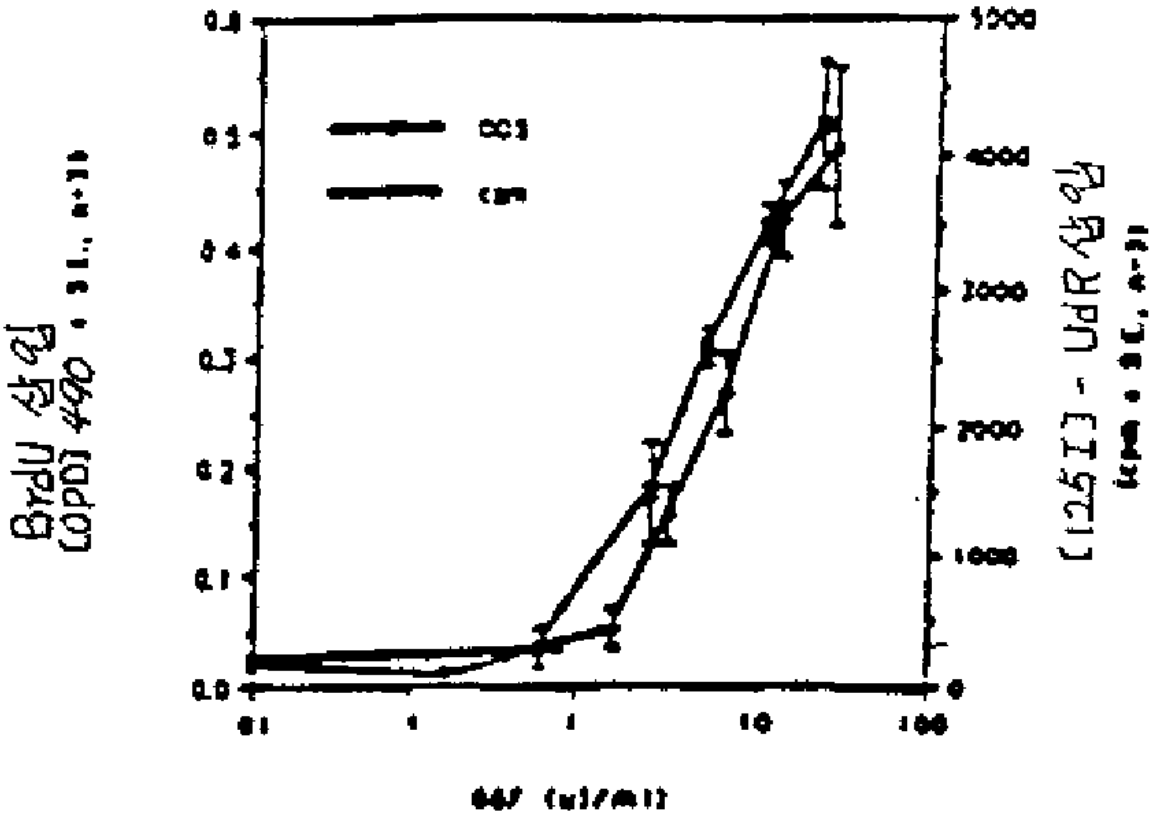
GGF-II 01	VHQVWAAK	(SEQ ID NO: 45)
GGF-II 02	YIFFMEPEAXSSG	(SEQ ID NO: 46)
GGF-II 03	LGAWGPPAFPVXY	(SEQ ID NO: 47)
GGF-II 04	WFVVIEGK	(SEQ ID NO: 48)
GGF-II 08	ASPVSVGSVQELVQR	(SEQ ID NO: 49)
GGF-II 09	VCLLTVAALPPT	(SEQ ID NO: 50)
GGF-II 11	KVHQVWAAK	(SEQ ID NO: 51)
GGF-II 12	KASLADSGEYMXK	(SEQ ID NO: 52)

B 새로운 인자 II 펩티드 - 기타

GGF-II 10	DLLLXV	(SEQ ID NO: 53)

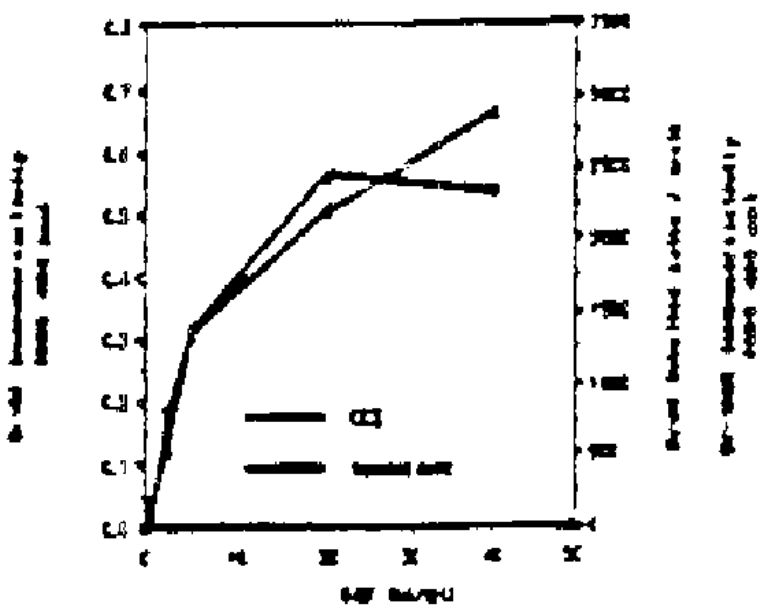
도면 13

시판 세포 배양물의 DNA 합성검사에서 BrdU ELISA 및 [125I] UdR 카운팅 방법의 비교

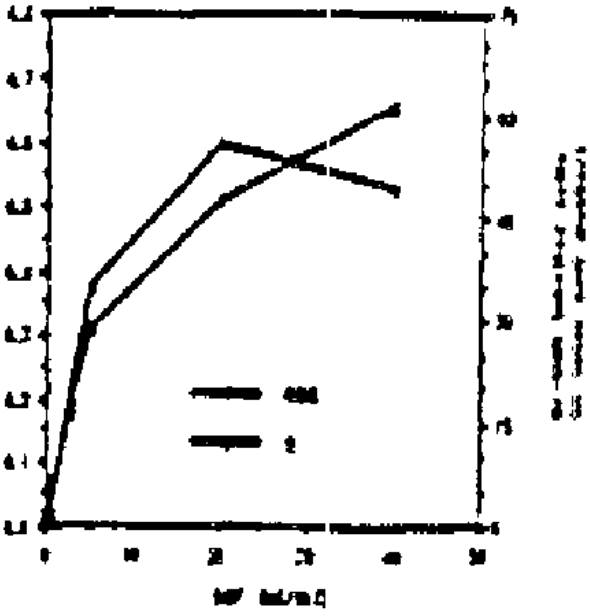


도면 14

Br-UdR 면역 반응성과 Br-UdR 표지된 세포수의 비교



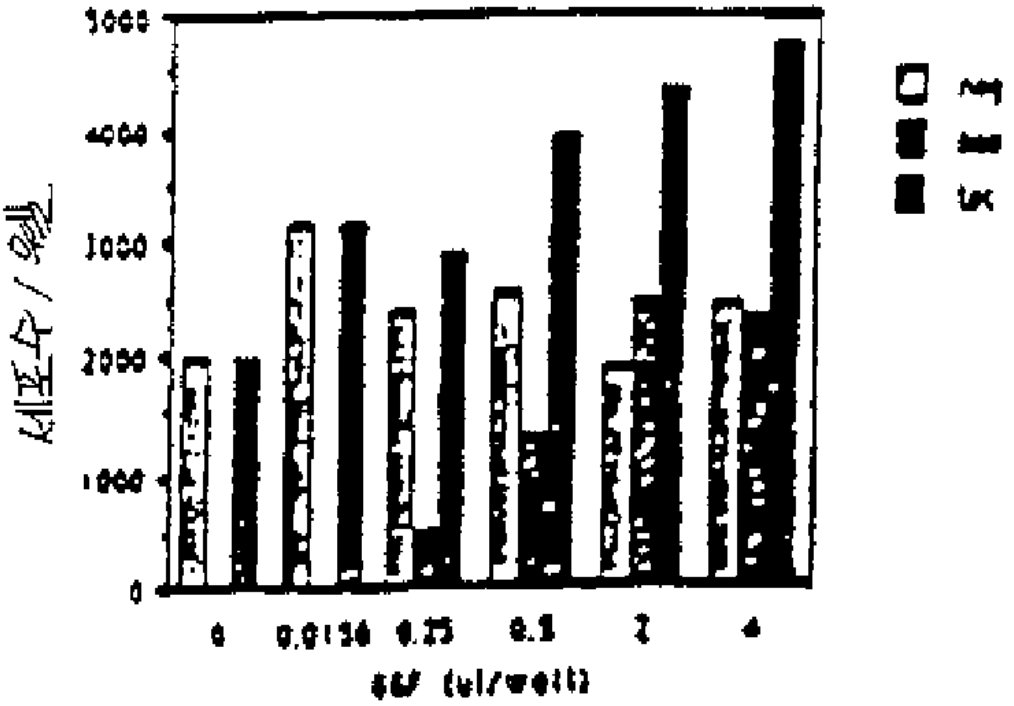
제 14a 도



제 14b 도

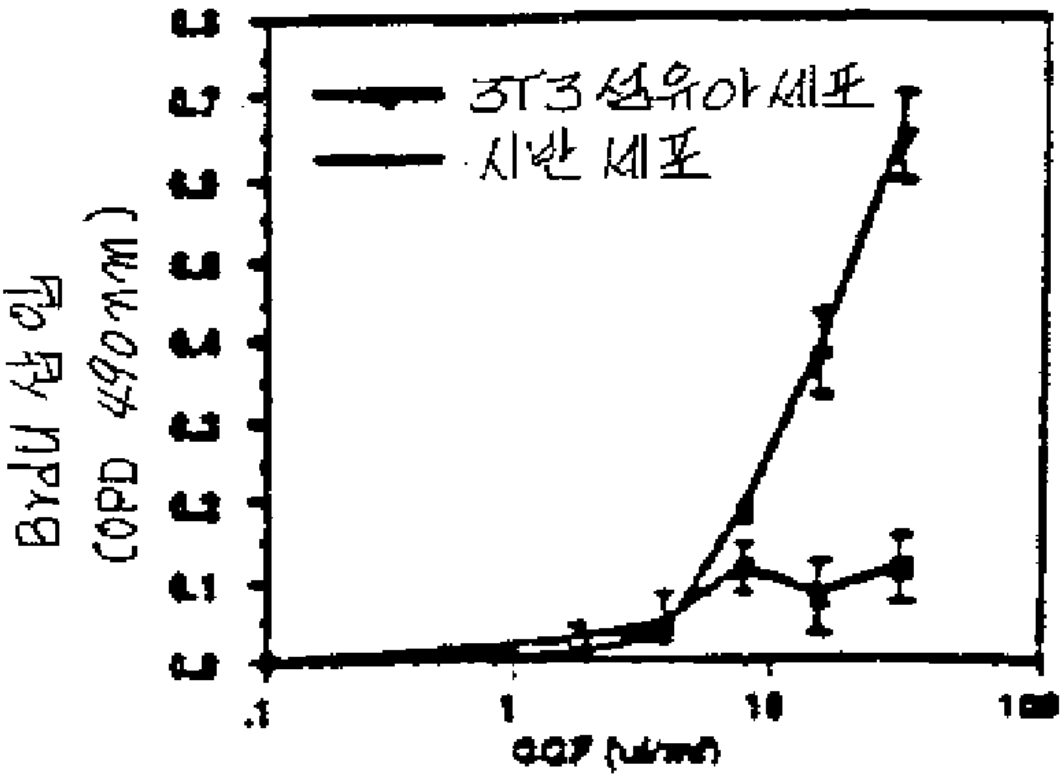
도면 15

래트 좌골신경 시반세포의 GGF에 대한 분열증진반응

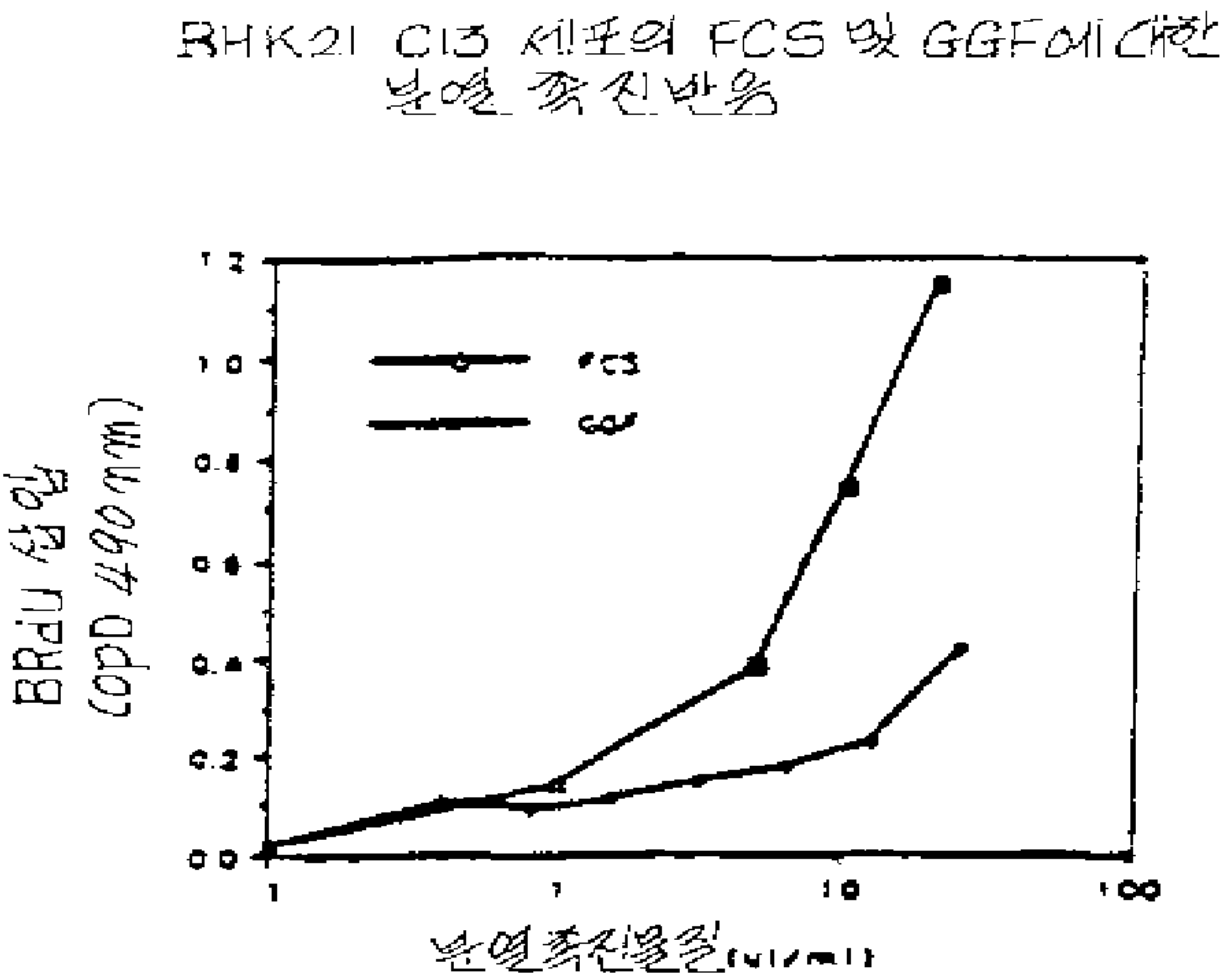


도면 16

GGF의 존재하에서 래트 좌골신경 시반세포 및 3T3 섬유아세포에서의 DNA 합성

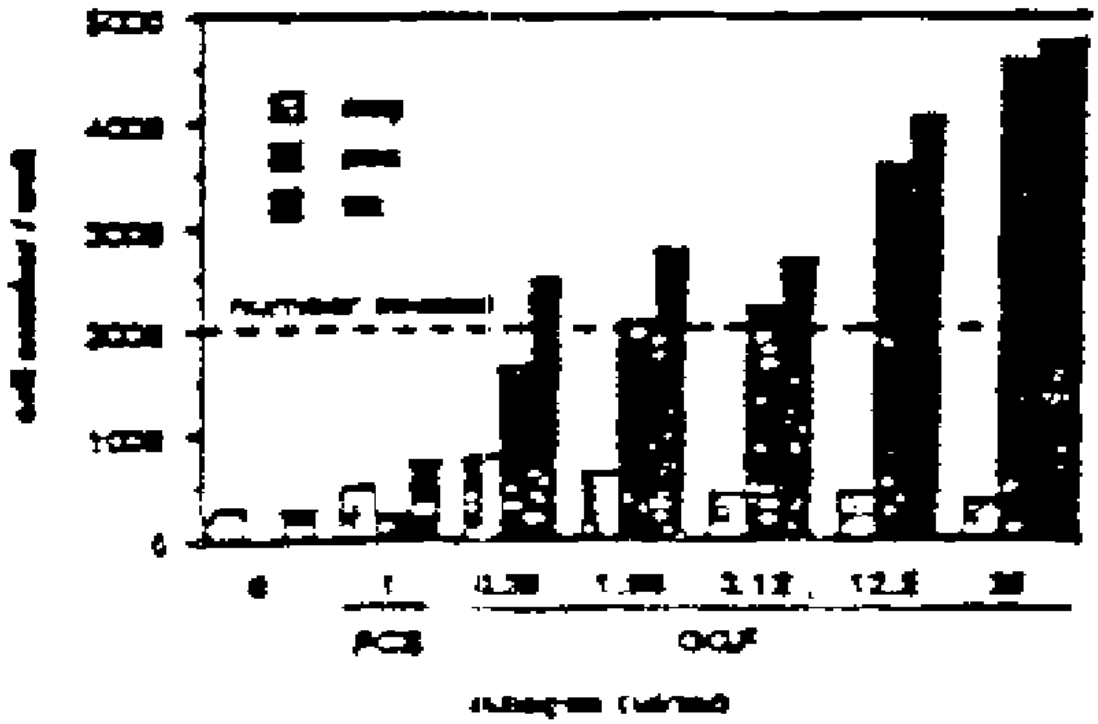


도면 17

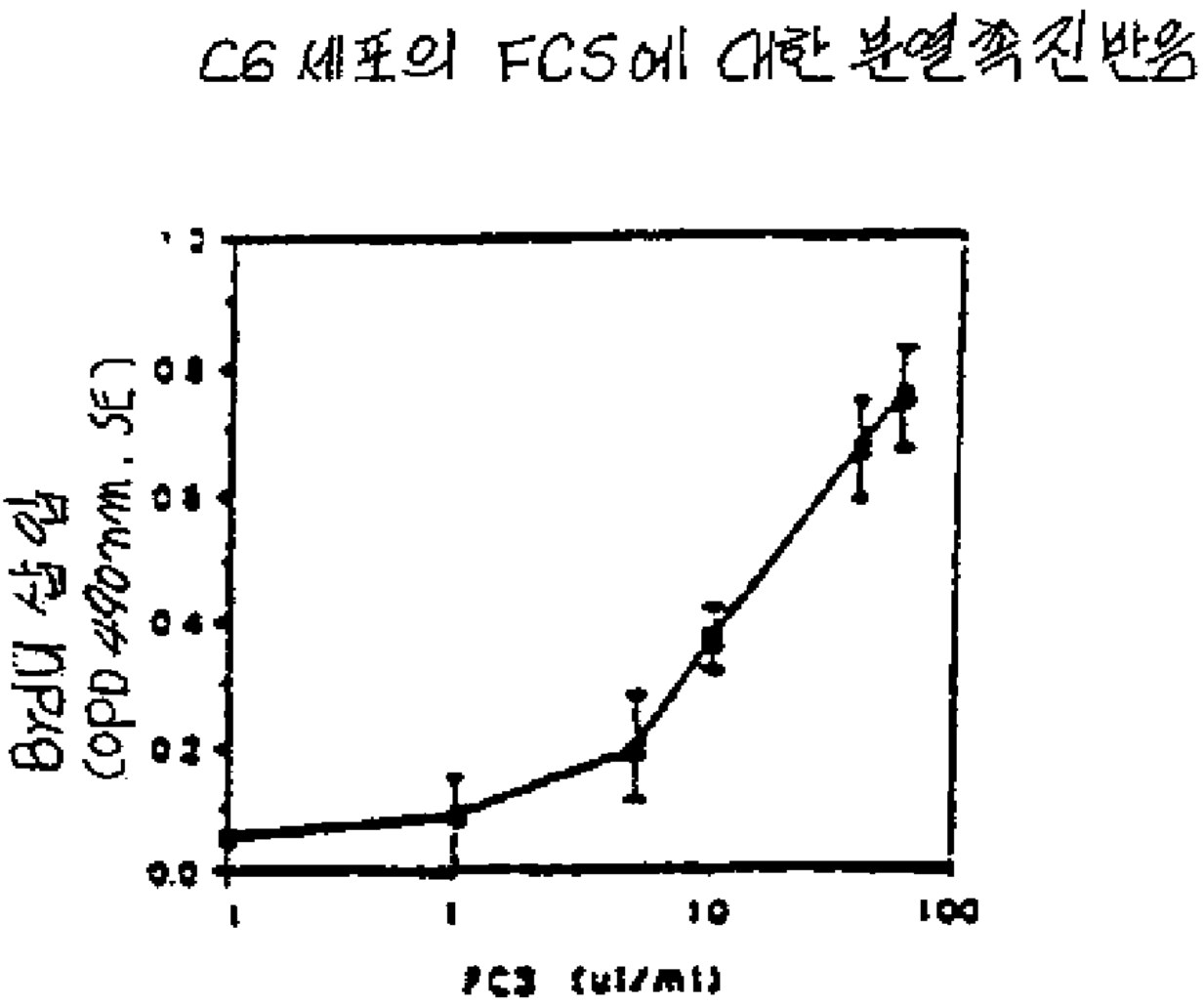

RHK21 C13 세포의 FCS 및 GGF에 대한 분열 촉진반응
BRdU 삽입 (OPD 490nm)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C3
GGF
1
10
100
분열촉진물질(ng/ml)

도면 18

GGF의 존재하에서 48시간후 BHK 21 C13 세포 마이크로 배양물의 생존 및 증식

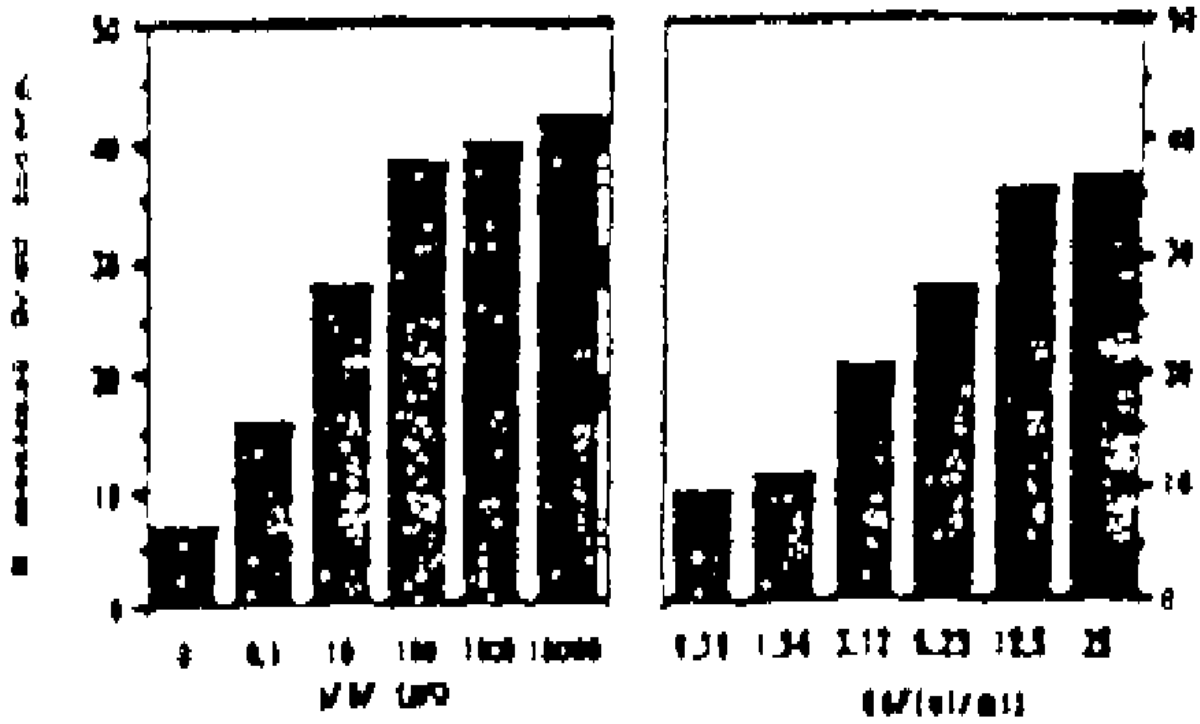


도면 19


C6 세포의 FCS에 대한 분열촉진반응
BrdU 삽입 (OPD 490nm, SE)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1
1
10
100
FCS (ul/ml)

도면 20

C6 세포의 aFGF 및 GGF에 대한 분열촉진반응



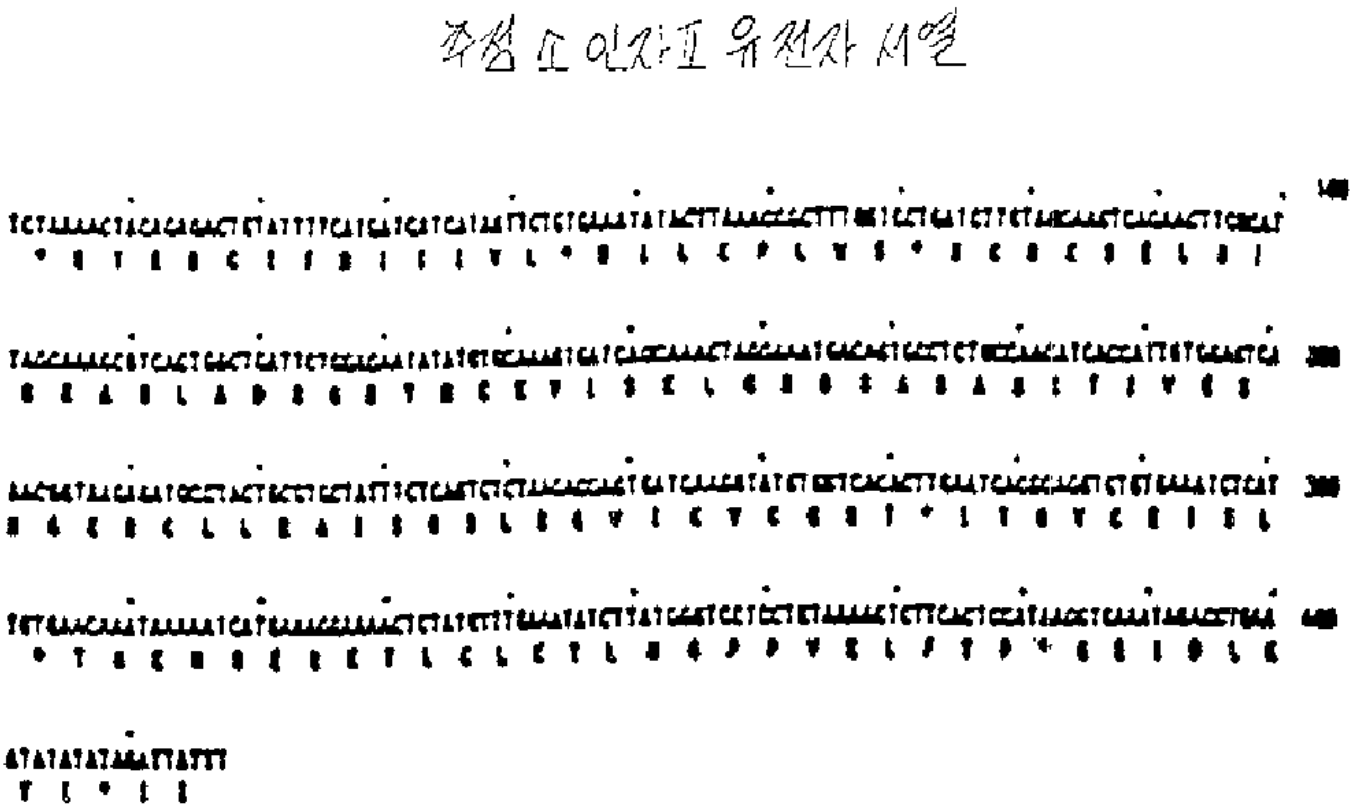
도면 21

FIGURE 21

인자 I 및 인자 II에 대한 축중 올리고뉴클레오티드 프로브

올리고	서열	펩티드	
535	TTYAARGCNGAYGCNCAYAC	GGFI-1	(SEQ ID NO: 54)
536	CATRTAYTCRTAYTCRTCNGC	GGFI-2	(SEQ ID NO: 55)
537	TGYTCNGANGCCATYTCNGT	GGFI-13	(SEQ ID NO: 56)
538	TGYTCRCTNGCCATYTCNGT	GGFI-13	(SEQ ID NO: 57)
539	CCDATNACCATNGGNACYTT	GGFI-17	(SEQ ID NO: 58)
540	GCNGCCCANACYTGRTGNAC	GGFII-1	(SEQ ID NO: 59)
541	GCYTCNGGYTCCATRAARAA	GGFII-2	(SEQ ID NO: 60)
542	CCYTCDATNACNACRAACCA	GGFII-4	(SEQ ID NO: 61)
543	TCNGCRAARTANCCNGC	GGFI-11	(SEQ ID NO: 62)
544	GCNGCNAGNGCYTCYTTNGC	GGFI-14	(SEQ ID NO: 63)
545	GCNGCYAAYGCYTCYTTNGC	GGFI-14	(SEQ ID NO: 64)
546	TTYTTNGCYTGNAGNACRAA	GGFI-15	(SEQ ID NO: 65)
551	TTYTTNGCYTGYAANACRAA	GGFI-15	(SEQ ID NO: 66)
568	TGNACNAGYTCYTGNAC	GGFII-8	(SEQ ID NO: 67)
569	TGNACYAAYTCYTGNAC	GGFII-8	(SEQ ID NO: 68)
609	CATRTAYTCNCCNGARTCNGC	GGFII-12	(SEQ ID NO: 69)
610	CATRTAYTCNCCRCTRTCNGC	GGFII-12	(SEQ ID NO: 70)
649	NGARTCNGCYAANGANGCYTT	GGFII-12	(SEQ ID NO: 71)
650	NGARTCNGCNAGNGANGCYTT	GGFII-12	(SEQ ID NO: 72)
651	RCTRTCNGCYAANGANGCYTT	GGFII-12	(SEQ ID NO: 73)
652	RCTRTCNGCNAGNGANGCYTT	GGFII-12	(SEQ ID NO: 74)
653	NGARTCNGCYAARCTNGCYTT	GGFII-12	(SEQ ID NO: 75)
654	NGARTCNGCNAGRCTNGCYTT	GGFII-12	(SEQ ID NO: 76)
655	RCTRTCNGCYAARCTNGCYTT	GGFII-12	(SEQ ID NO: 78)
656	RCTRCTNGCNAGRCTNGCYTT	GGFII-12	(SEQ ID NO: 79)
659	ACNACNGARATGGCTCNNGA	GGFI-13	(SEQ ID NO: 80)
660	ACNACNGARATGGCAGYNGA	GGFI-13	(SEQ ID NO: 81)
661	CAYCARGTNTGGCCNGCNAA	GGFII-1	(SEQ ID NO: 82)
662	TTYGTNGTNATHGARGCNAA	GGFII-4	(SEQ ID NO: 83)
663	AARGCNGAYGCNCAYACNGA	GGFI-1	(SEQ ID NO: 84)
664	CARGCNTTNGCNGCNTTNAA	GGFI-14	(SEQ ID NO: 85)
665	GTNGGNTCNGTNCARGARTT	GGFII-8	(SEQ ID NO: 86)
666	GTNGGNAGTGTNCARGARTT	GGFII-8	(SEQ ID NO: 87)
694	NACYTTYTTNAARAATYTGNCC	GGFI-17	(SEQ ID NO: 88)

도면 22



(SEQ ID NO: 89)

도면 23

인자 I 및 인자 II의 PCR 프라이머

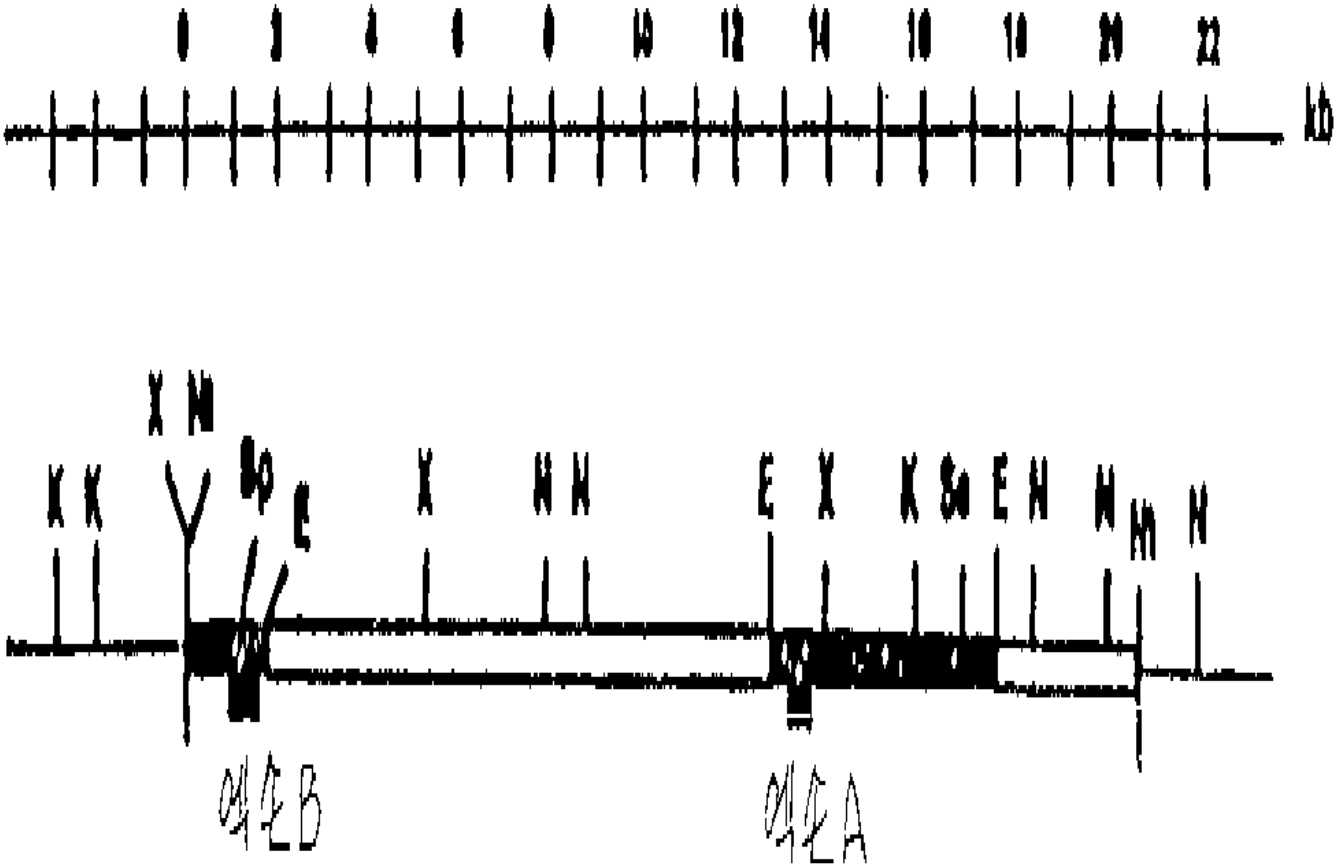
정방향 PCR 프라이머

올리고	서열	펩티드	
657	CCGAATTCTGCAGGARACNCARCCNGAYCCNGG!	GGFI-17	(SEQ ID NO: 90)
658	AAGGATCCTGCAGNGTRTANGCNCCNATHACCATHGG!	GGFI-17	(SEQ ID NO: 91)
667	CCGAATTCTGCAGGCNGAYTCNGGNGARTAYATG!	GGFII-12	(SEQ ID NO: 92)
668	CCGAATTCTGCAGGCNGAYATYGGNGARTAYAT!	GGFII-12	(SEQ ID NO: 93)
669	AAGGATCCTGCAGNNNCATRTAYTCNCCNGARTC!	GGFII-12	(SEQ ID NO: 94)
670	AAGGATCCTGCAGNNNCATRTAYTCNCCRRTRTC!	GGFII-12	(SEQ ID NO: 95)
671	CCGAATTCTGCAGCAYGARGTNTGGGCNGGNAA!	GGFII-1	(SEQ ID NO: 96)
672	CCGAATTCTGCAGATHTTYTTYATGGARCCNGARG!	GGFII-2	(SEQ ID NO: 97)
673	CCGAATTCTGCAGGGGGNCCNCCNGCNTTYCCNGT!	GGFII-3	(SEQ ID NO: 98)
674	CCGAATTCTGCAGTGGTTYGTNGTNATHGARGG!	GGFII-4	(SEQ ID NO: 99)
677	AAGGATCCTGCAGYTTNGCNGCCCANACYTGRTG!	GGFII-1	(SEQ ID NO: 100)
678	AAGGATCCTGCAGGCYTCNGGYTCCATRAARAA!	GGFII-2	(SEQ ID NO: 101)
679	AAGGATCCTGCAGACNGGRAANGCNGGNGGNCC!	GGFII-3	(SEQ ID NO: 102)
680	AAGCATCCTGCAGYTTNCCYTCRATNACNACRAAC!	GGFII-4	(SEQ ID NO: 103)
681	CATRTAYTCRTAYTCTCNGCAAGGATCCTGCAG!	GGFI-2	(SEQ ID NO: 104)
682	CCGAATTCTGCAGAARGGNGAYGCNCAYACNGA!	GGFI-1	(SEQ ID NO: 105)
683	GCNGCYAANGCYRCYTTNGCAAGGATCCTGCAG!	GGFI-14	(SEQ ID NO: 106)
684	GCNGCNAGNGCYTCYTTNGCAAGGATCCTGCAG!	GGFI-14	(SEQ ID NO: 107)
685	TCNGCRAARTANCCNGCAAGGATCCTGCAG!	GGFII-1	(SEQ ID NO: 108)

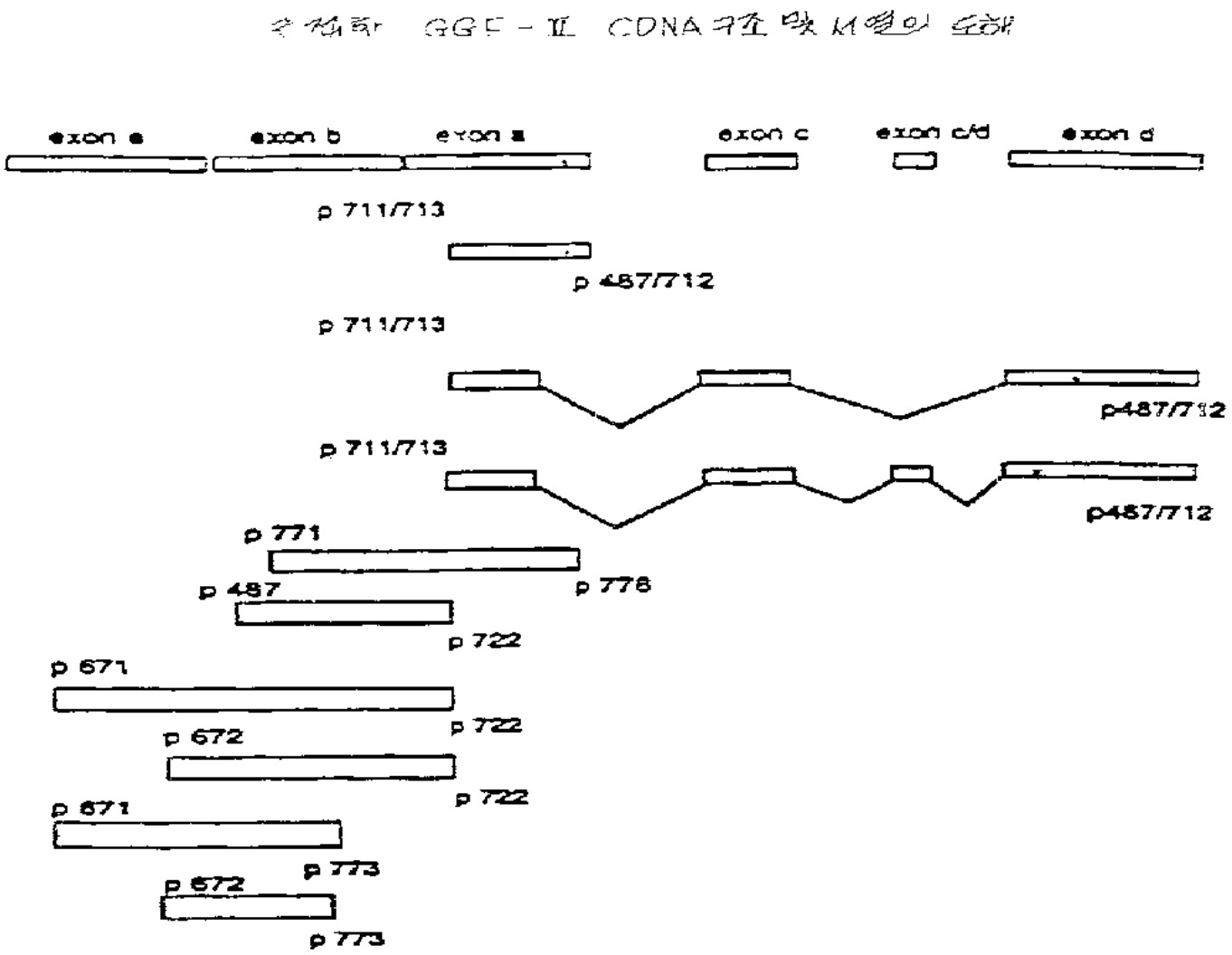
인자 II의 안팔 PCR 프라이머

올리고	서열	주해	
721	CATCGATCTGCAGGCTGATTCTGGAGAATATATGTGCA!	3' RACE	(SEQ ID NO: 109)
712	AAGGATCCTGCAGCCACATCTGGAGTCGACATCGATT!	3' RACE	(SEQ ID NO: 110)
713	CCGAATTCTGCAGTGATCAGCAAACTAGGAAATGACA!	3' RACE	(SEQ ID NO: 111)
731	CATCGATCTGCAGCCTAGTTTGCTGATCACTTTGCAC!	5' RACE	(SEQ ID NO: 112)
722	AAGGATCCTGCAGTATATTCTCCAGAATCAGCCAGTG!	5' RACE; ANCHORED	(SEQ ID NO: 113)
725	AAGGATCCTGCAGGCACGCAGTAGGCATCTGTTA!	EXON A	(SEQ ID NO: 114)
726	CCGAATTCTGCAGCAGAACTTCGCATTAGCAAAGC!	EXON A	(SEQ ID NO: 115)
771	CATCCCGGGATGAAGAGTCAGGAGTCTGTGGCA!	EXONS B+A	(SEQ ID NO: 116)
772	ATACCCGGGCTGCAGACAATGAGATTTCACACACCTGCG!		(SEQ ID NO: 117)
773	AAGGATCCTGCAGTTTGCAACCTGCCACAGACTCCT!	ANCHORED	(SEQ ID NO: 118)
776	ATACCCGGGCTGCAGATGAGATTTCACACACCTGCGTCA!	EXONS B+A	(SEQ ID NO: 119)

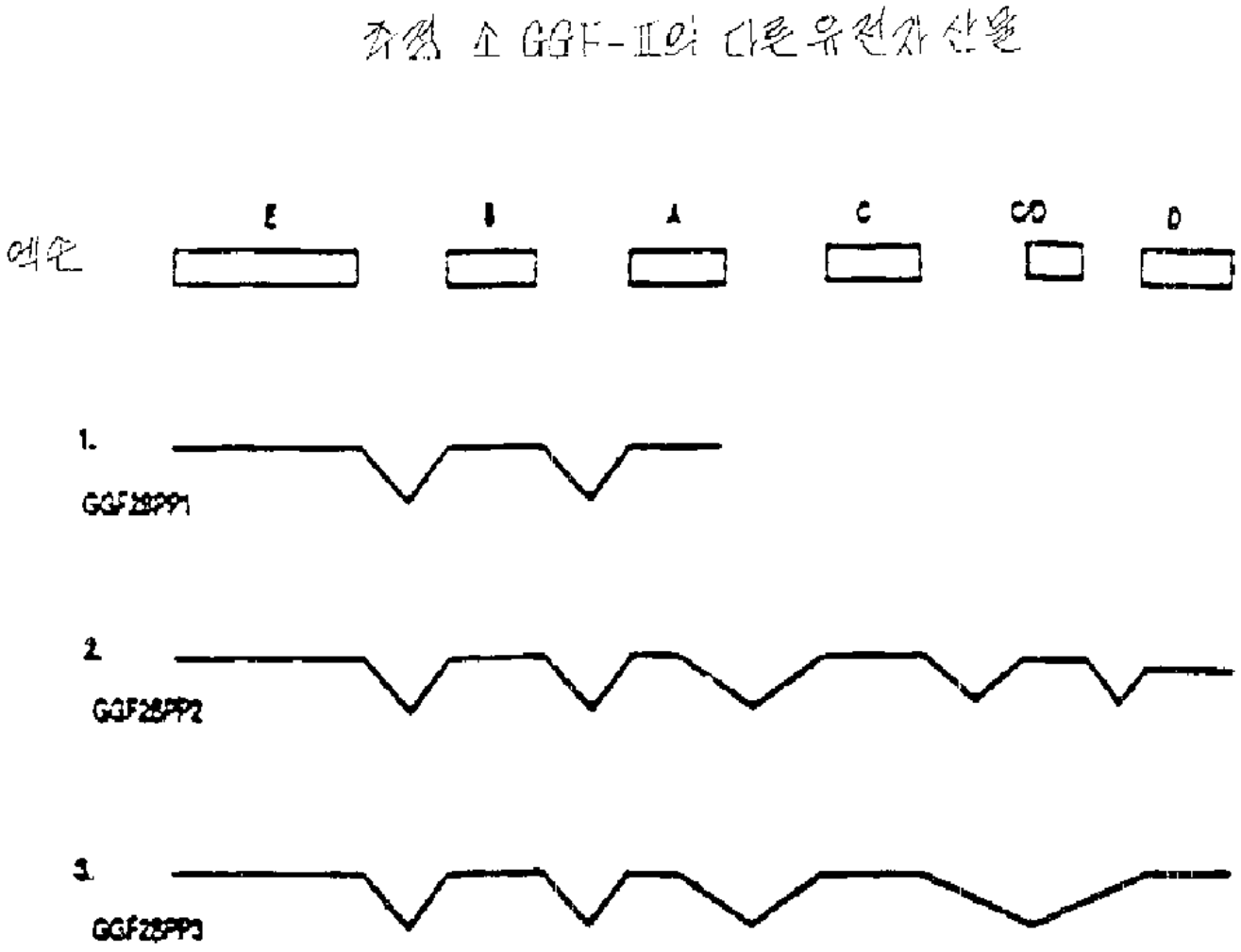
도면 24



도면 25


exon a
exon b
exon a
exon c
exon c/d
exon d
p 711/713
p 487/712
p 711/713
p487/712
p 711/713
p487/712
p 771
p 778
p 487
p 722
p 671
p 722
p 672
p 722
p 671
p 773
p 672
p 773

도면 26

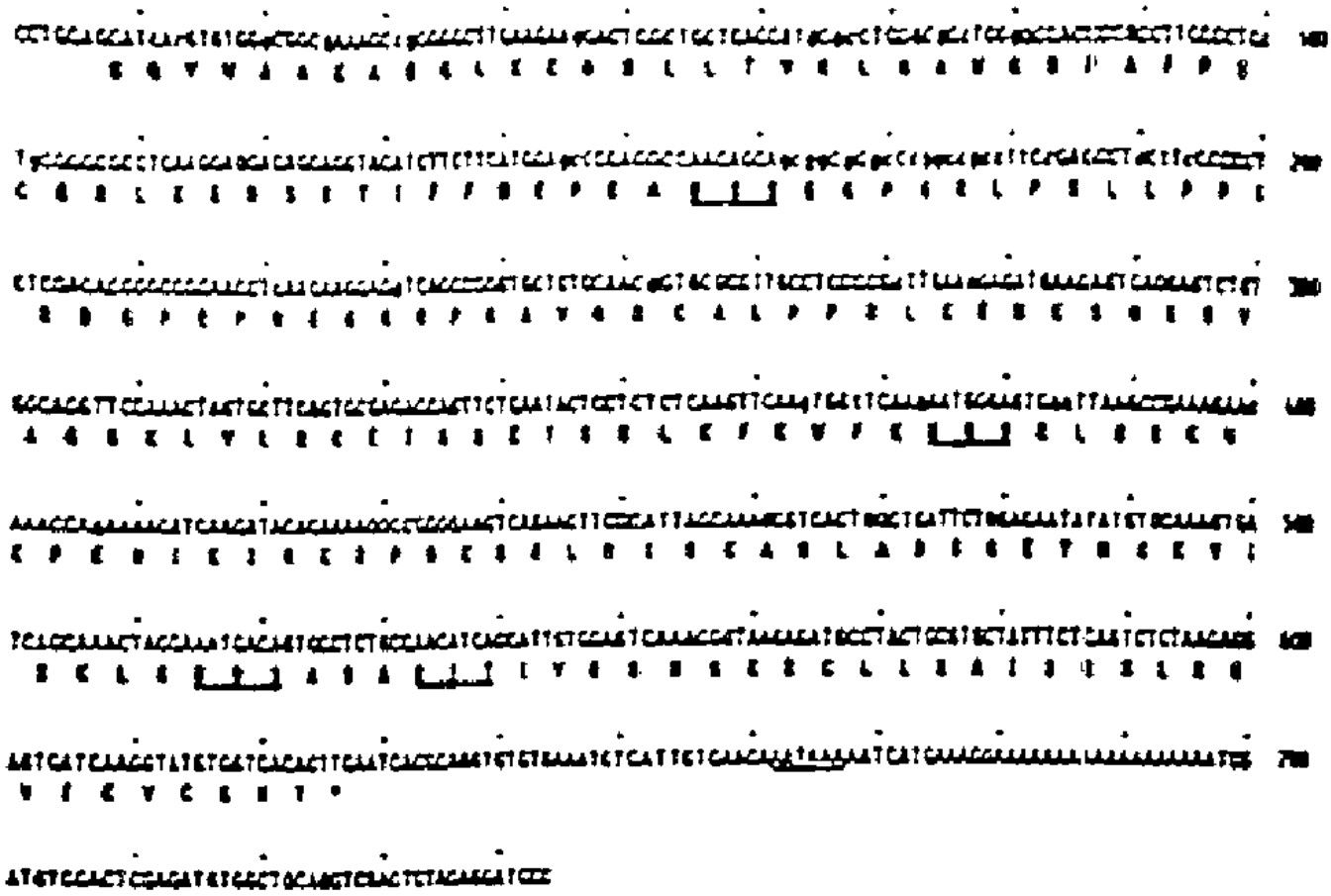


도면 27

추정상 GGF-II 단백질의 주로 아미노산 서열에서 확인된 GGF-II 펩티드

펩티드	Pos.	서열배치	
II-1		VHQVWAAK	
	1:	HQVWAAK AAGLK	(SEQ ID NO: 120)
II-10		DLLLXV	
	14: CGLXX dslltv RLGAM		(SEQ ID NO: 121)
II-03		LGAWGPPAFPVXY	(SEQ ID NO: 122)
	21: LLTVR lgavghpafpecg RLXED		(SEQ ID NO: 123)
II-02		YIPFMEPEAXSSG	(SEQ ID NO: 124)
	41: KEDSR YIPFMEPEANSSG GPGRL		(SEQ ID NO: 125)
II-6		LVLR	
	103: VAGSX LVLR CETSS		(SEQ ID NO: 126)
I-18		EYKCLKFKWFKKATVK	(SEQ ID NO: 127)
	112: CETSS eysslkfkvfkngsel SRXXX		(SEQ ID NO: 128)
II-12		XASLADSGEYNCK	(SEQ ID NO: 129)
	151: ELRIS XASLADSGEYNCK VISKL		(SEQ ID NO: 130)
I-07		ASLADEYEYNRK	(SEQ ID NO: 131)
	152: LRISX esladsgeyncx VISKL		(SEQ ID NO: 132)

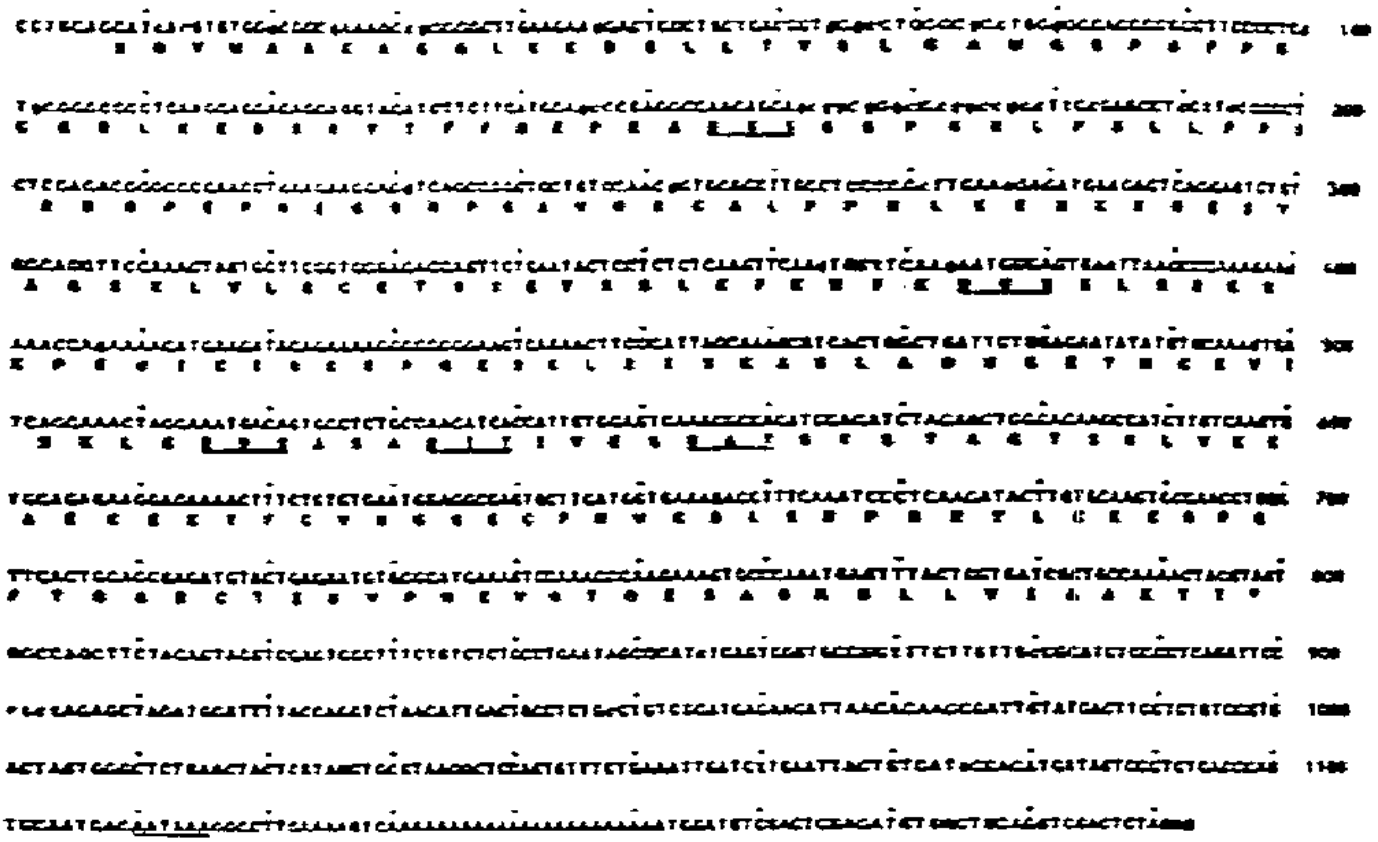
도면 28a



(SEQ ID NO: 133)

도면 28b

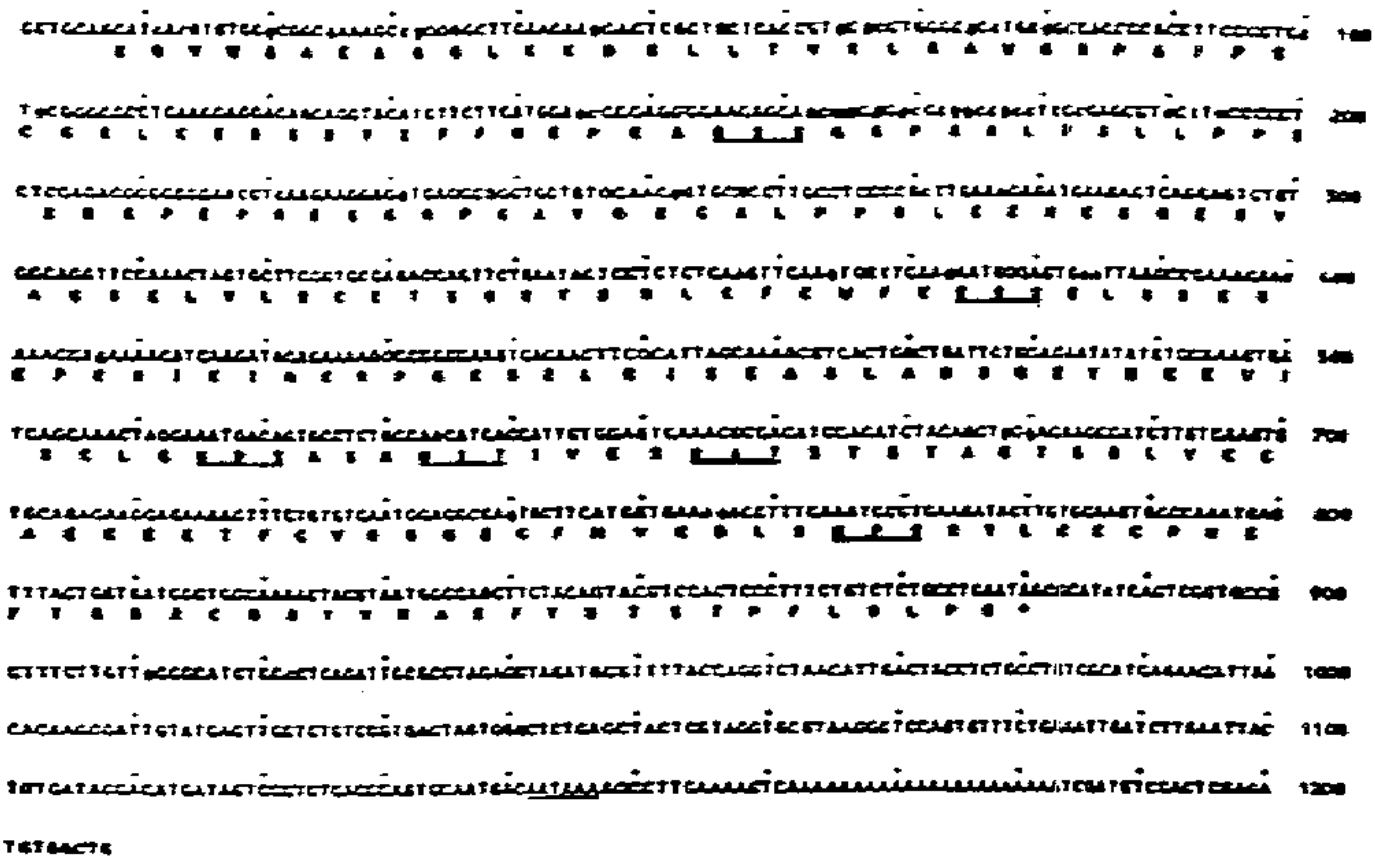
CDNA 2의 뉴클레오티드 서열 및 추론 아미노산 서열



(SEQ ID NO: 134)

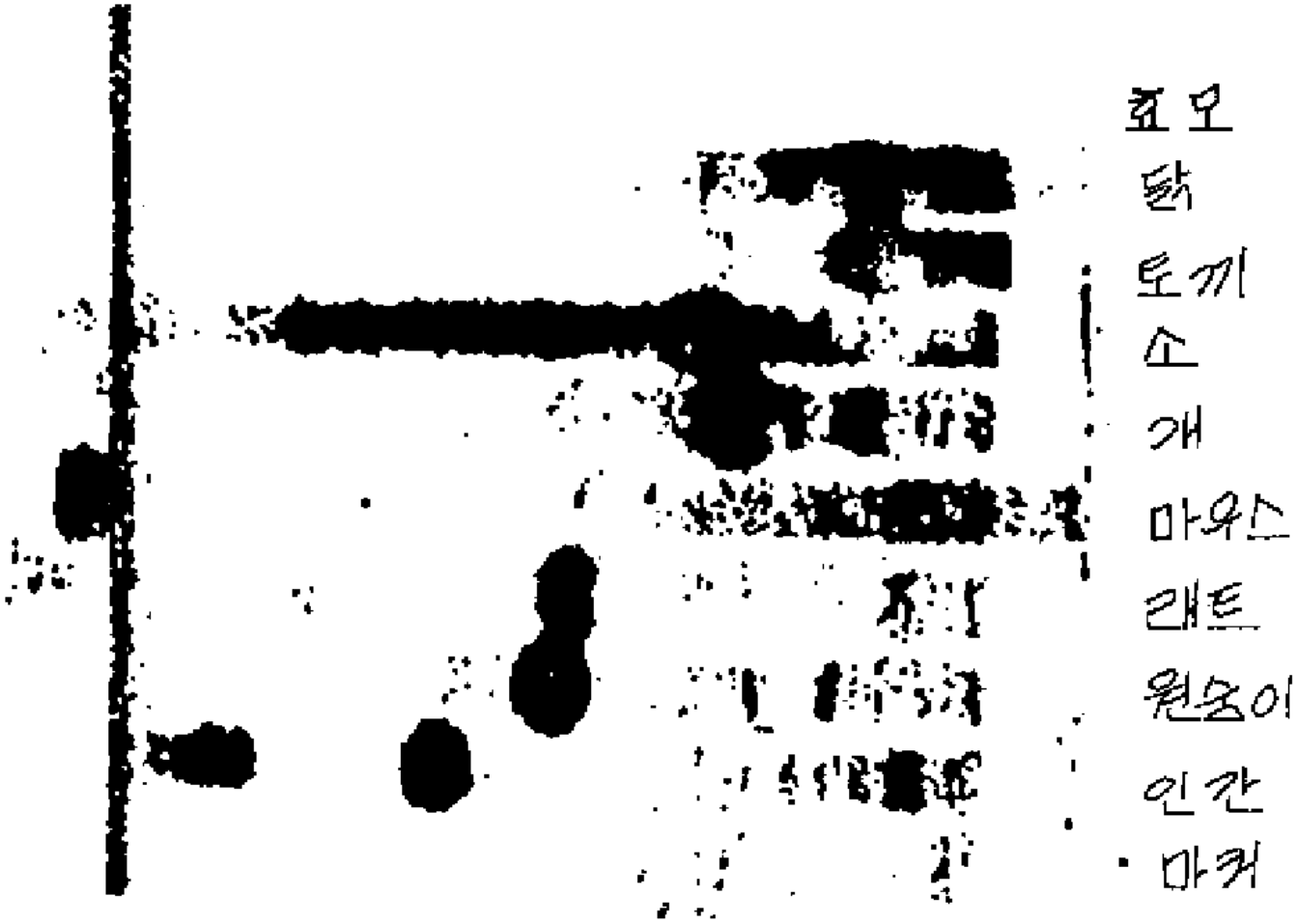
도면 28c

cDNA 3의 뉴클레오티드서열 및 추론 아미노산 서열

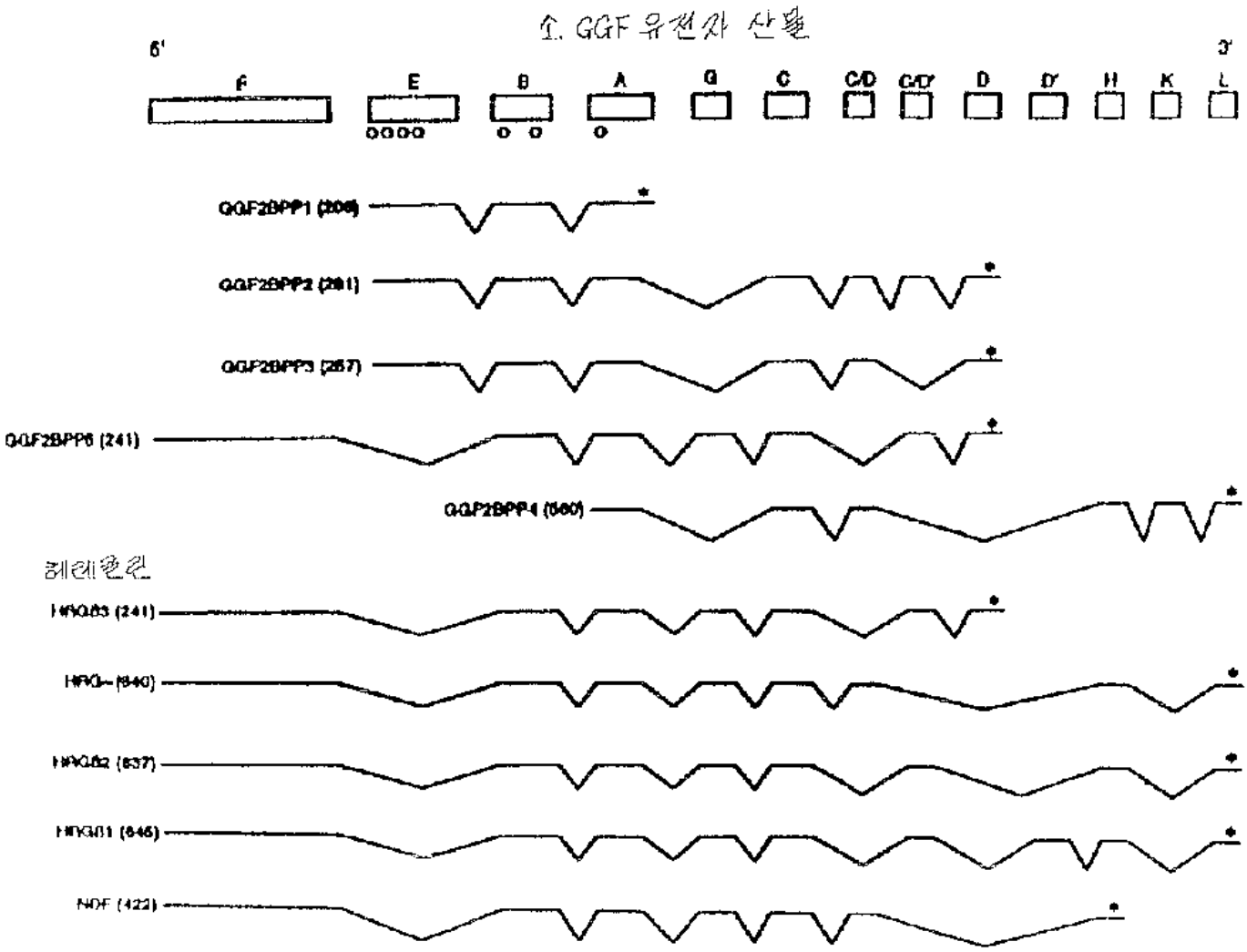


(SEQ ID NO: 135)

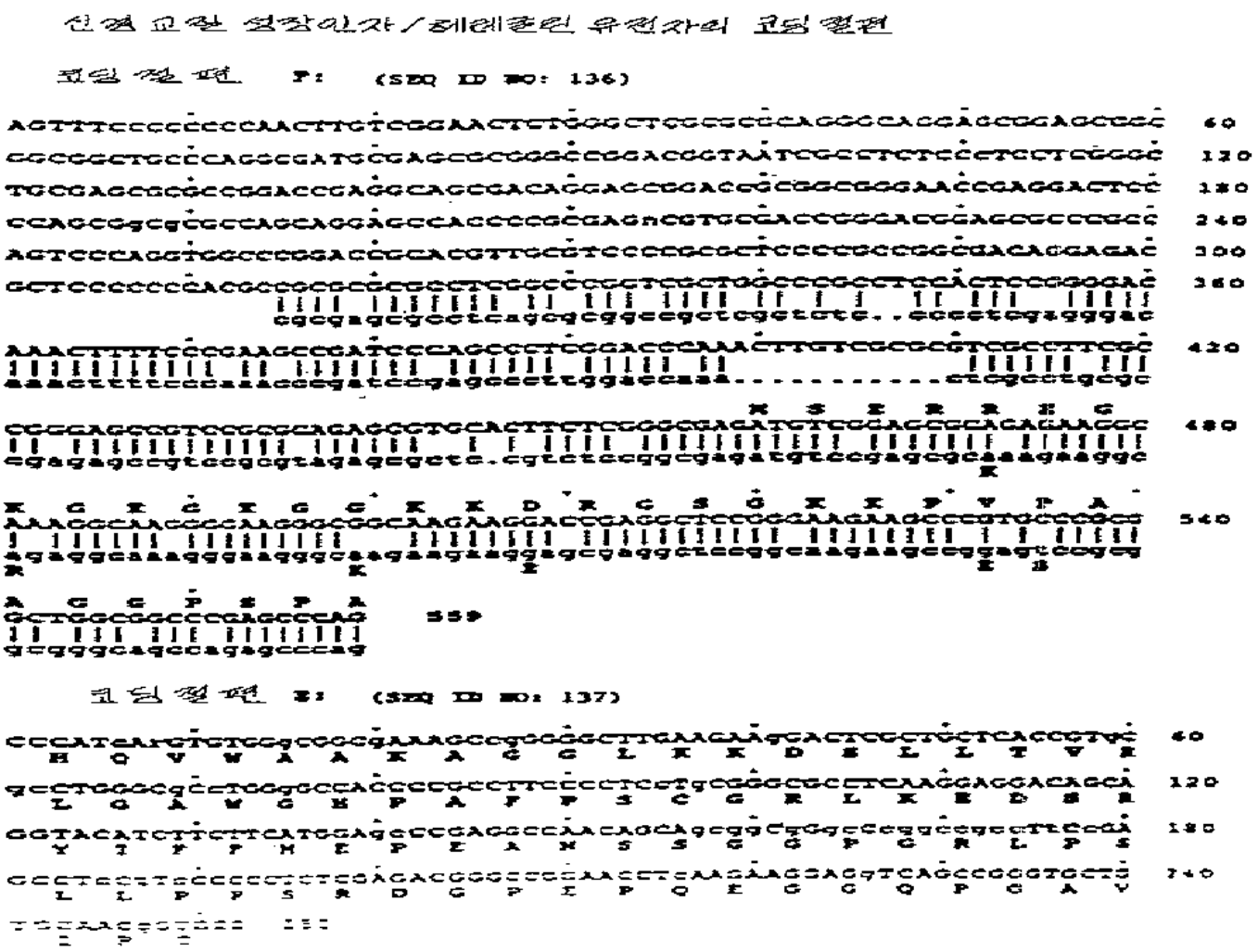
도면 29



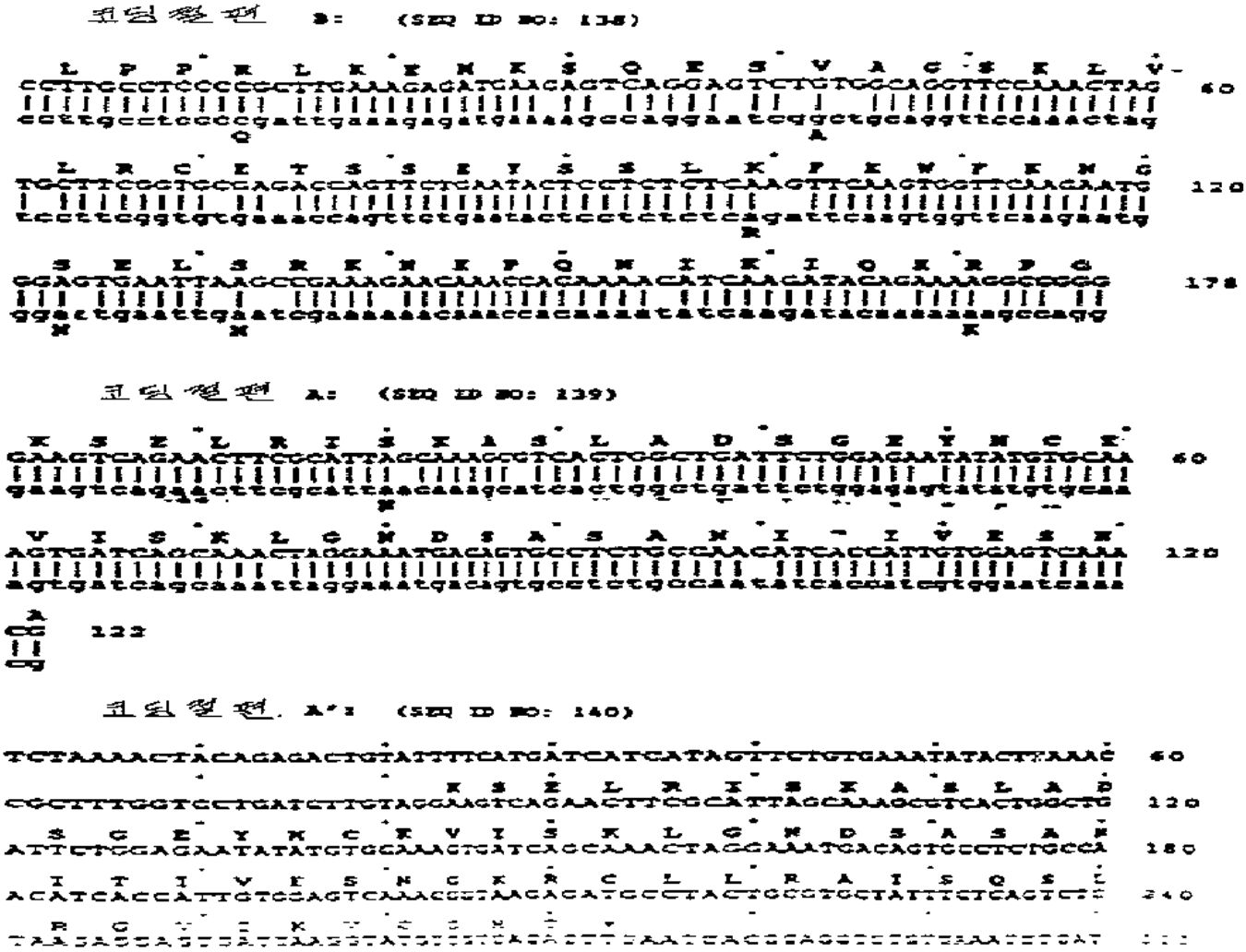
도면 30


소. GGF 유전자 산물
5'
3'
F
E
B
A
G
C
C/D
C/D'
D
D'
H
K
L
GGF2BPP1 (206)
GGF2BPP2 (281)
GGF2BPP3 (257)
GGF2BPP5 (241)
GGF2BPP4 (560)
레레윤린
HRG3 (241)
HRG1 (646)
HRG2 (637)
HRG3 (646)
NDF (422)

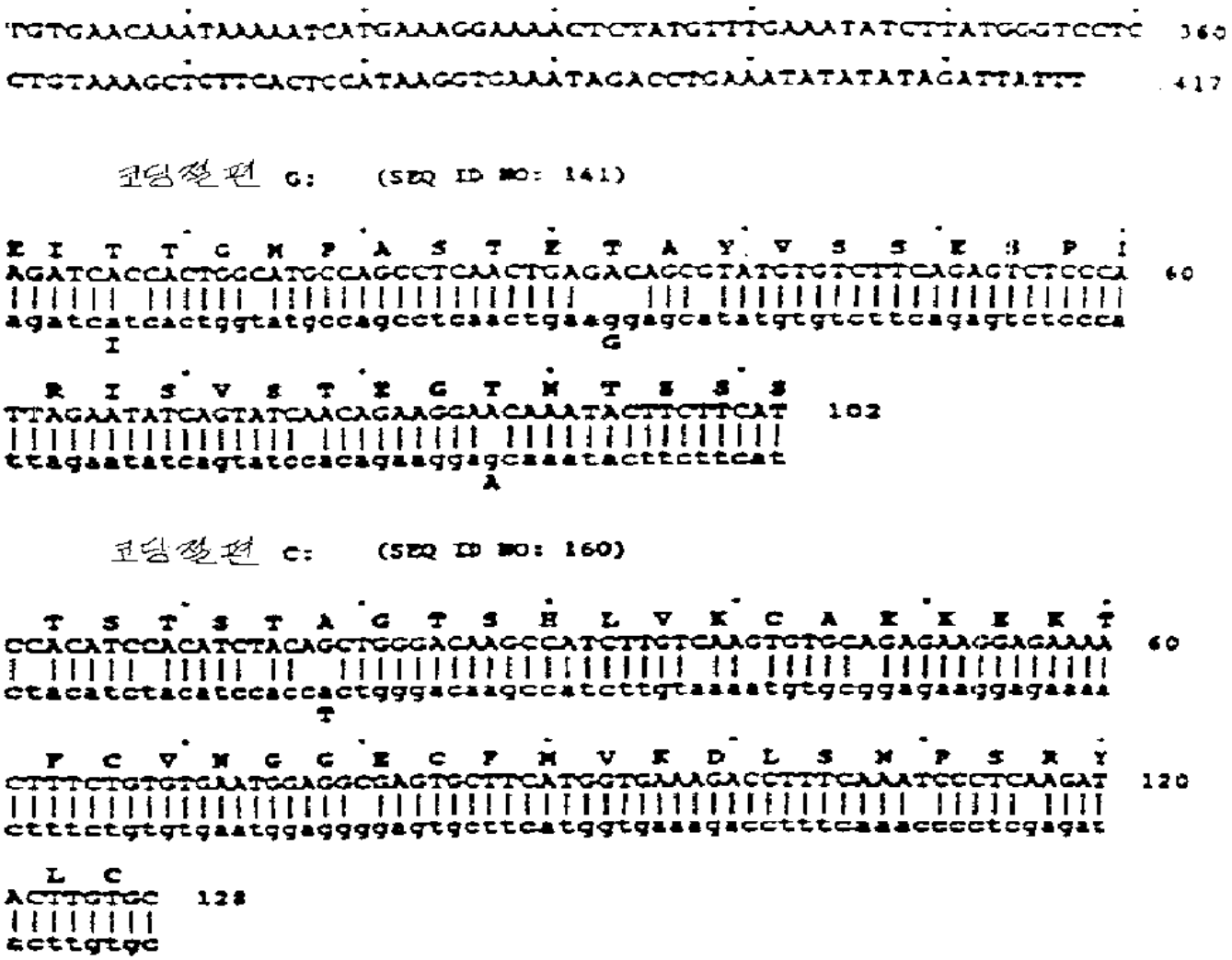
도면 31a


신경 교질 섬창인자/레레콘린 유전자의 코딩 염편
코딩 염편 F: (SEQ ID NO: 136)
코딩 염편 R: (SEQ ID NO: 137)

도면 31b

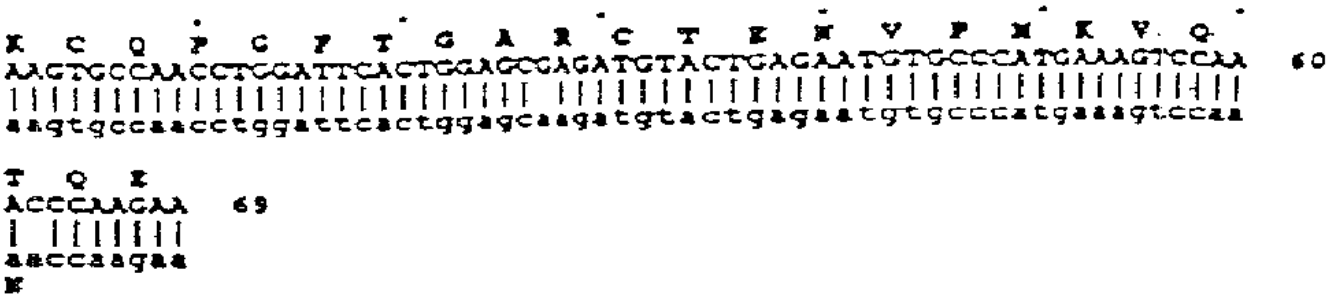


도면 31c

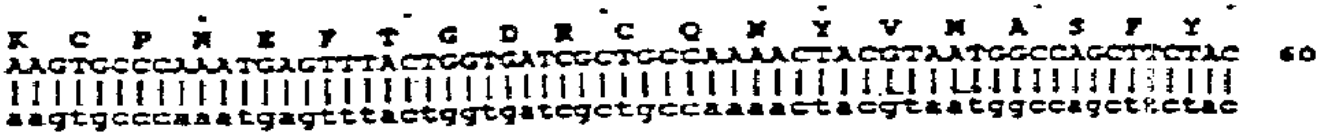

TGTGAACAAATAAAAATCATGAAAGGAAAACTCTATGTTTGAAATATCTTATGGGTCCTC 360
CTGTAAAGCTCTTCACTCCATAAGGTCAAATAGACCTCAAATATATATATAGATTATTT 417
코딩쪽편 G: (SEQ ID NO: 141)
E I T T C M P A S T E T A Y V S S E S P I
AGATCACCACTGGCATGCCAGCCTCAACTGAGACAGCCTATGTGTCTTCAGAGTCTCCCA 60
agatcatcactggtatgccagcctcaactgaaggagcatatgtgtcttcagagtctcccA
I G
R I S V S T E G T M T E S S
TTAGAATATCAGTATCAACAGAAGGAACAAATACTTCTTCAT 102
ttagaatatcagtatccacagaaggagcaaatacttcttcat
A
코딩쪽편 C: (SEQ ID NO: 160)
T S T S T A G T S H L V K C A K K E K T
CCACATCCACATCTACAGCTGGGACAAGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAA 60
ctacatctacatccaccactgggacaagccatcttgtaaaatgtgcggagaaggagaaaa
T
F C V M G G E C F M V K D L S M P S R Y
CTTTCTGTGTGAATGGAGGCGAGTGCTTCATGGTGAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGAT 120
ctttctgtgtgaatggaggggagtgcttcatggtgaaagacctttcaaaccccctcgagat
L C
ACTTGTGC 128
acttgtgc

도면 31d

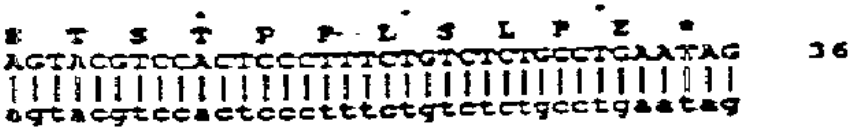
코딩절편 C/D: (SEQ ID NO: 142)



코딩절편 C/D': (SEQ ID NO: 143)

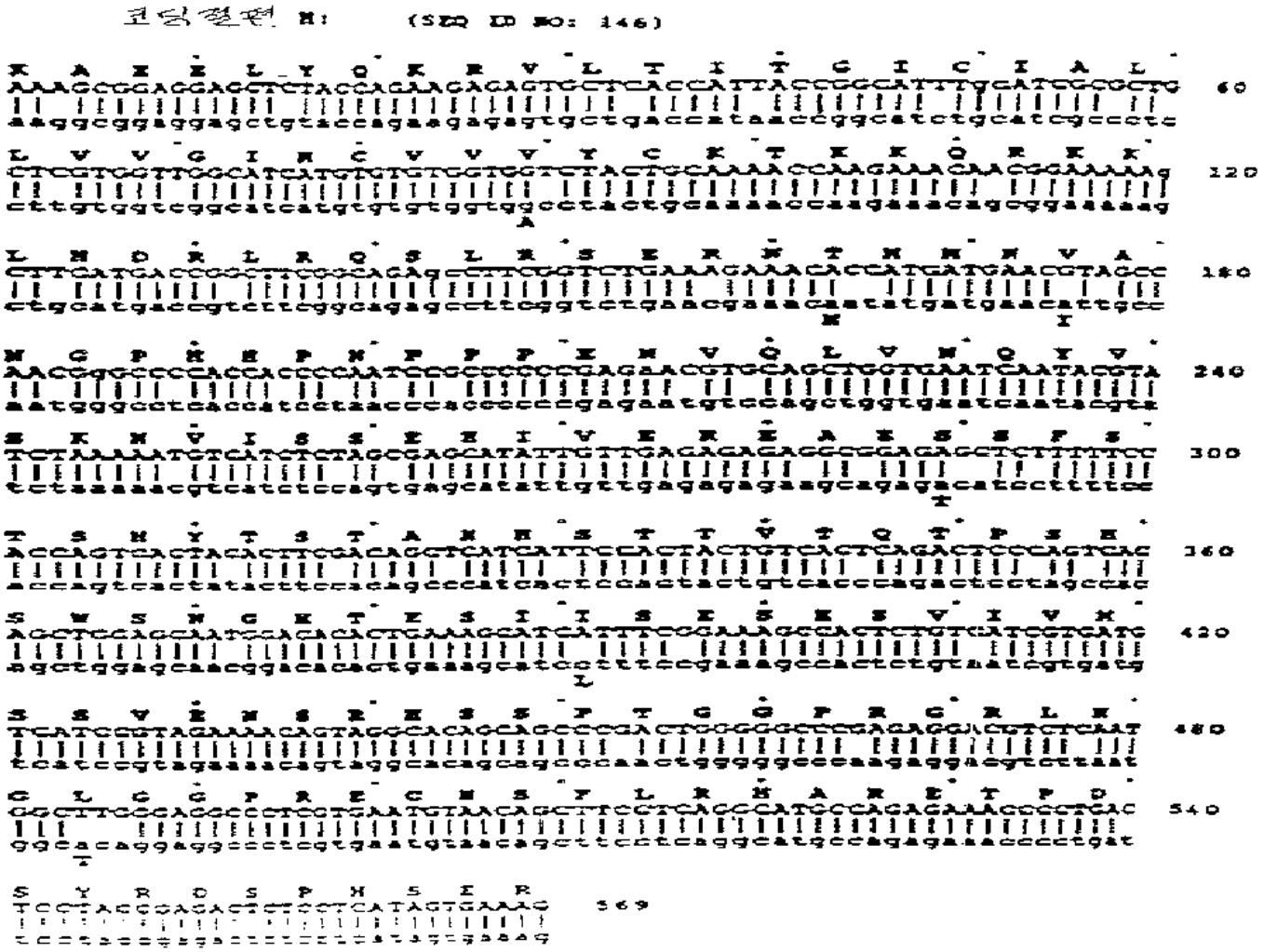


코딩절편 D: (SEQ ID NO: 144)

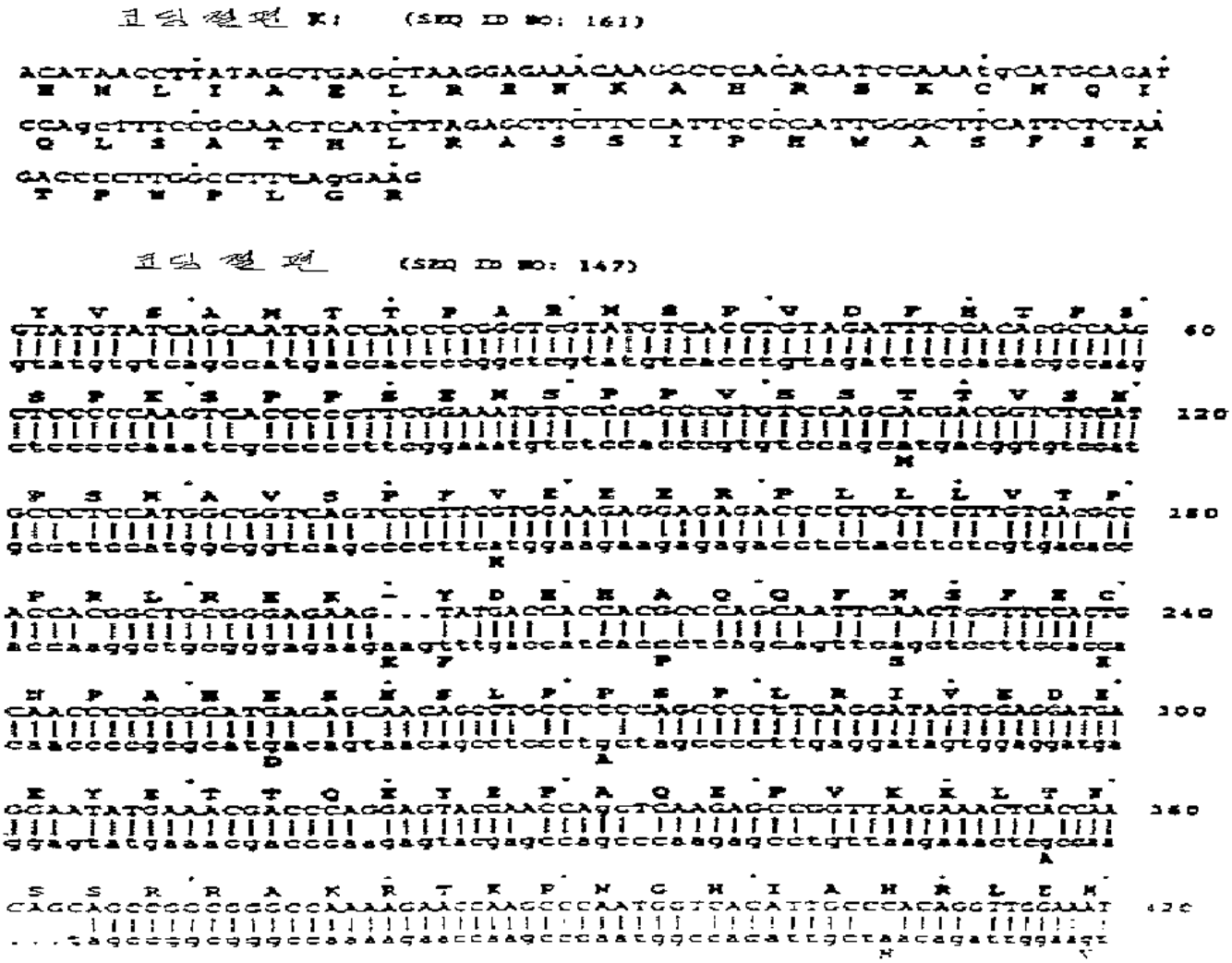


코딩절편 D': (SEQ ID NO: 145)

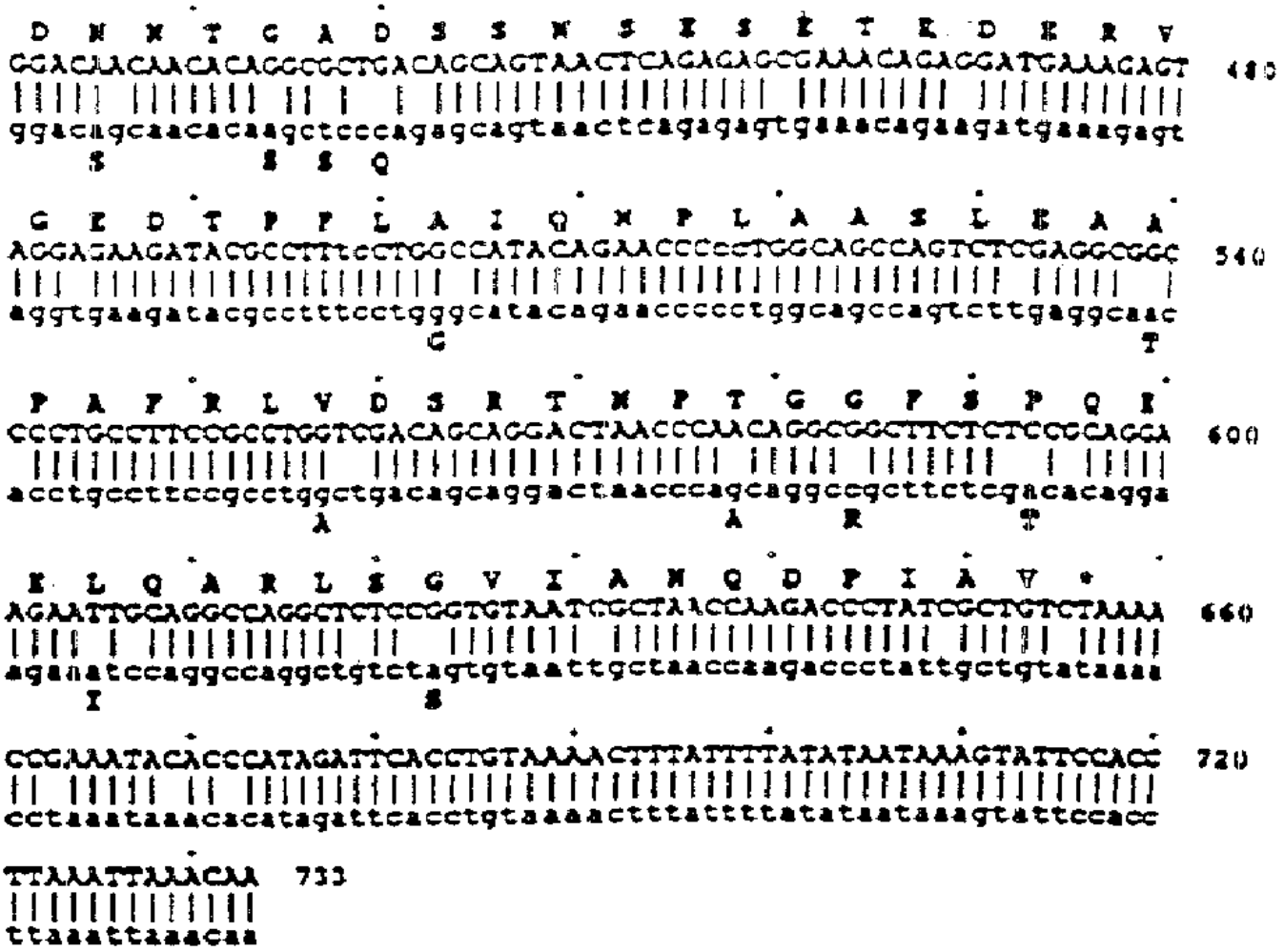
도면 31e



도면 31f

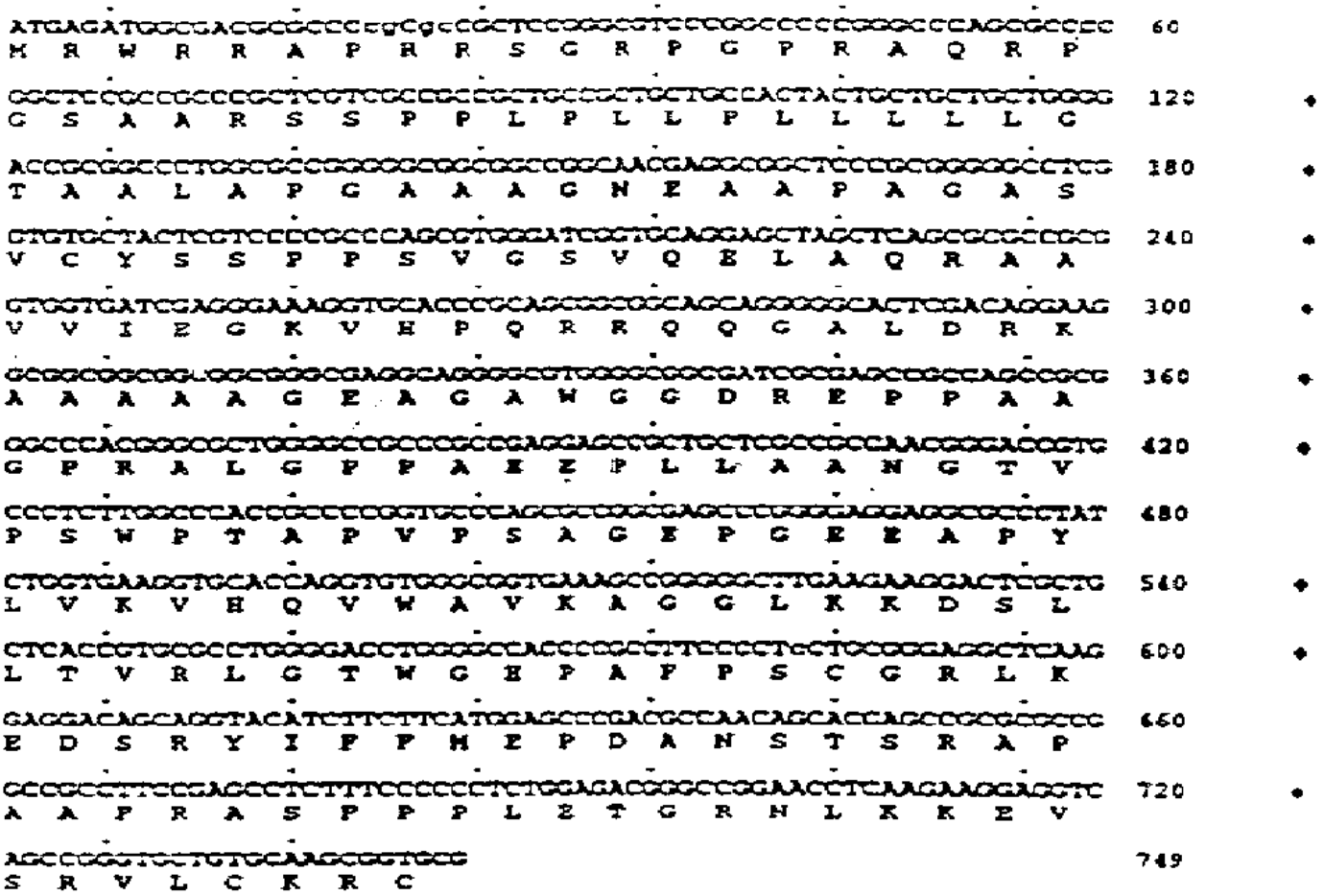


도면 31g



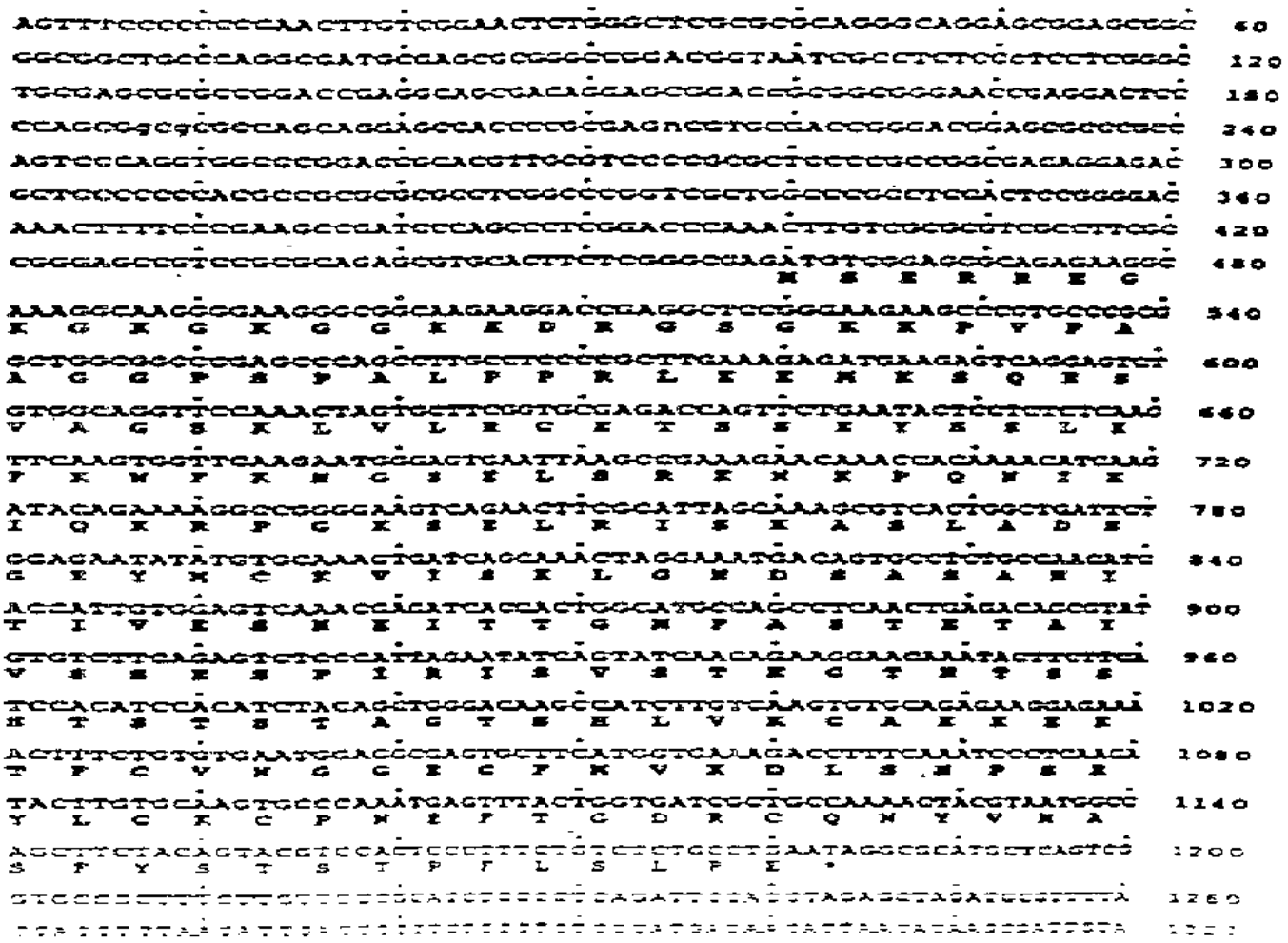
도면 31h

인간 코딩절편 E (SEQ ID NO: 163)

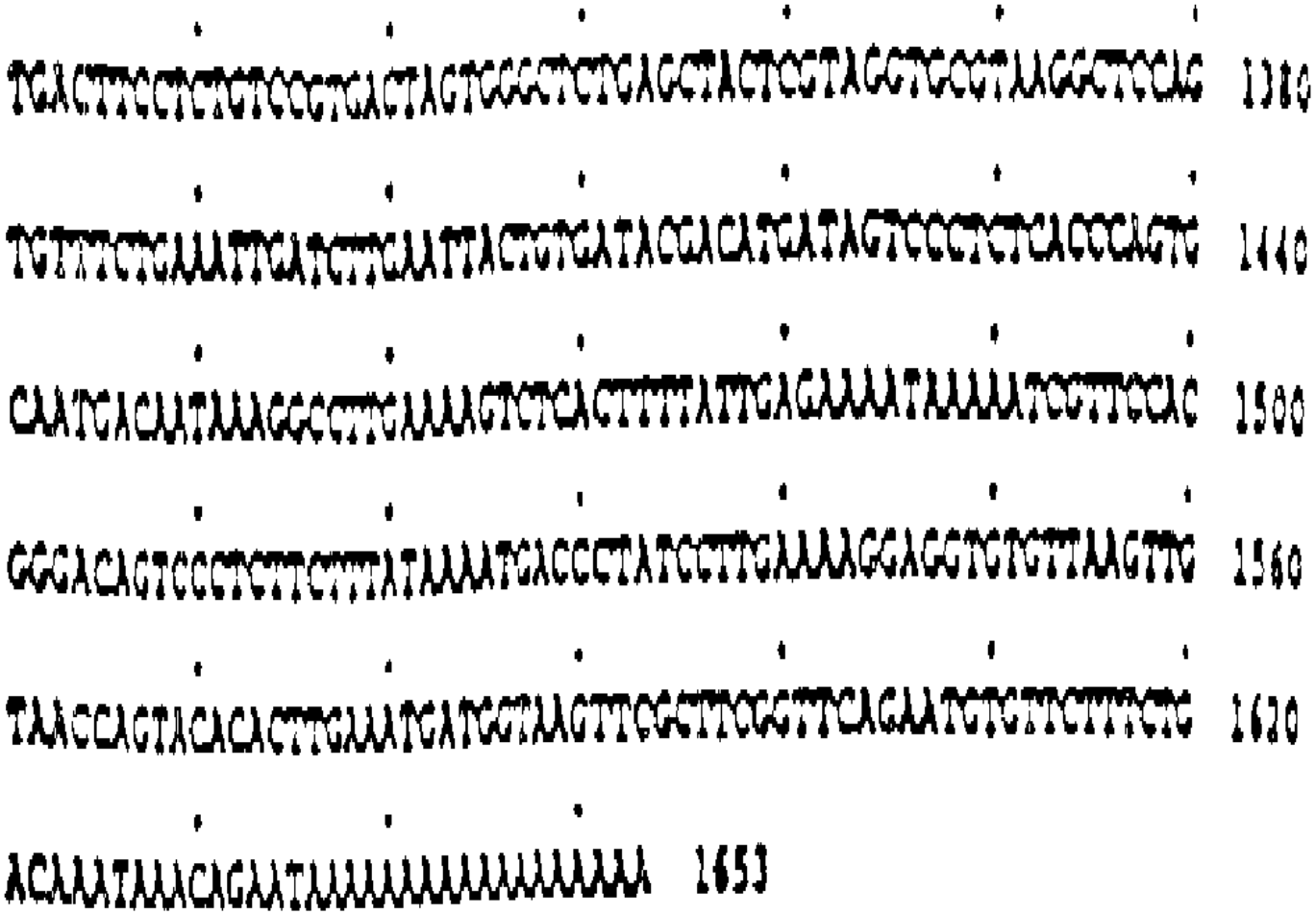


도면 32a

GOF2 BPP5 뉴클레오티드 서열 및 추론 아미노산 서열



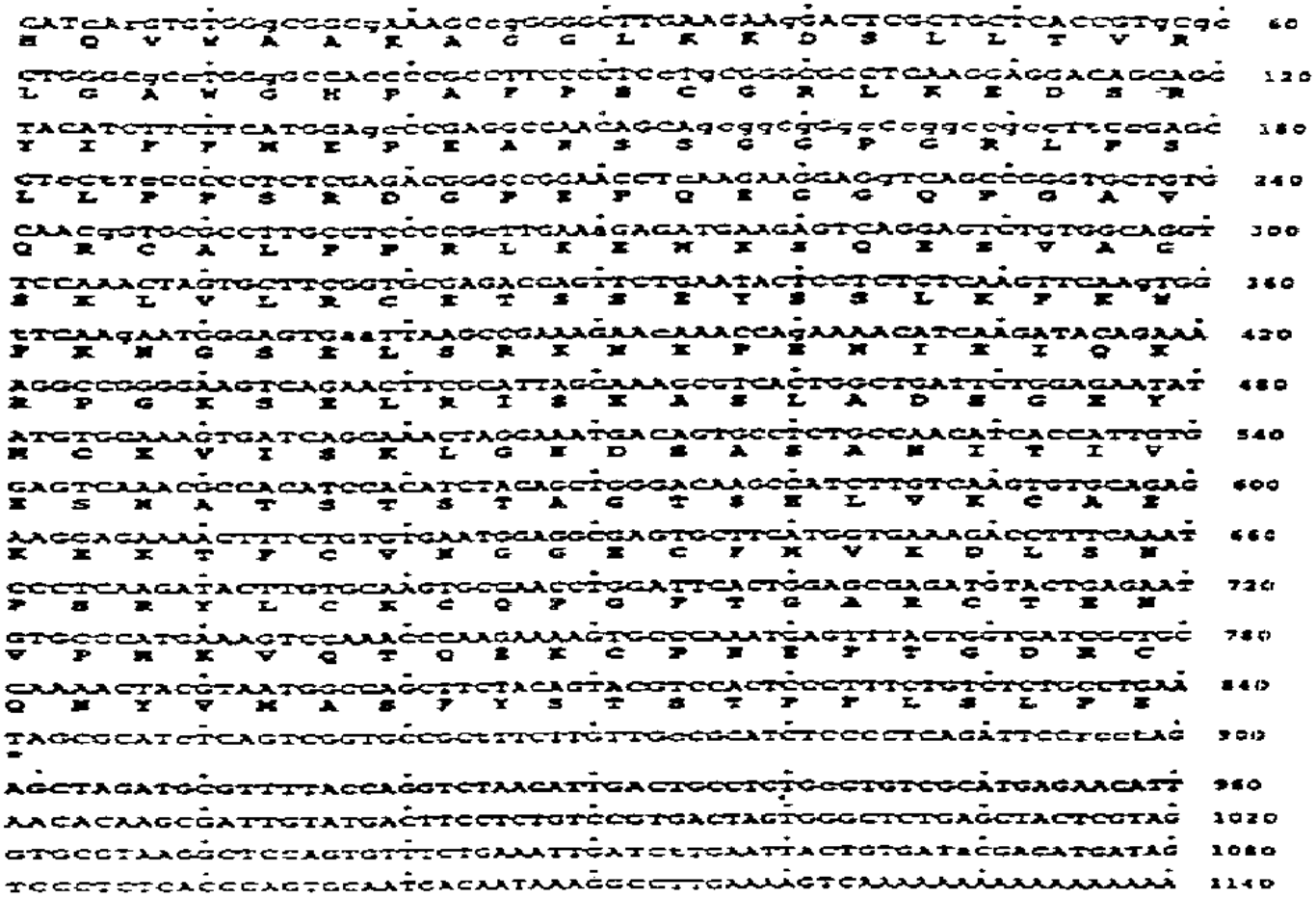
도면 32b



도면 33

(SEQ ID NO: 149)

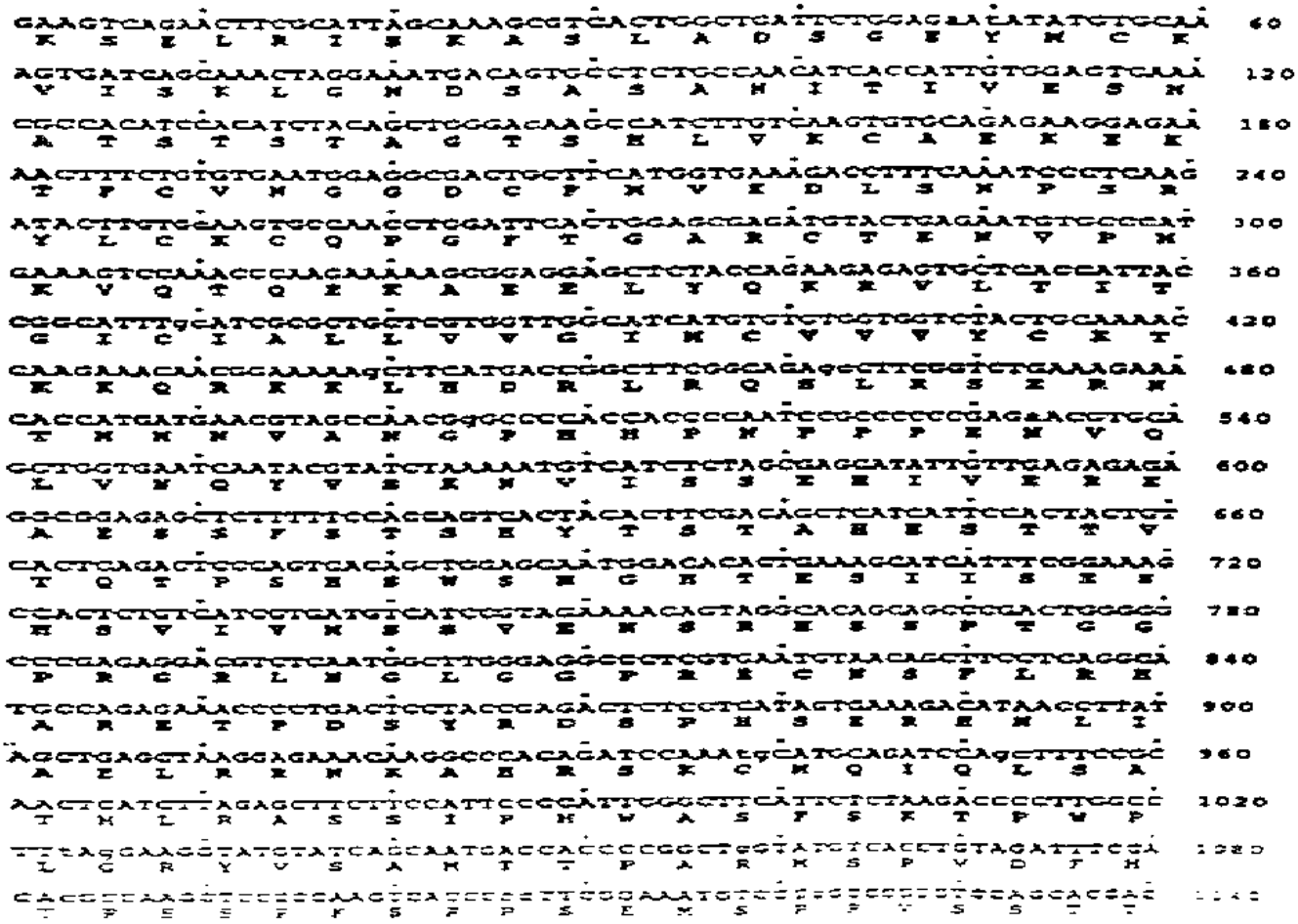
GGF2 BPP2 뉴클레오티드 서열 및 추론 단백질 서열



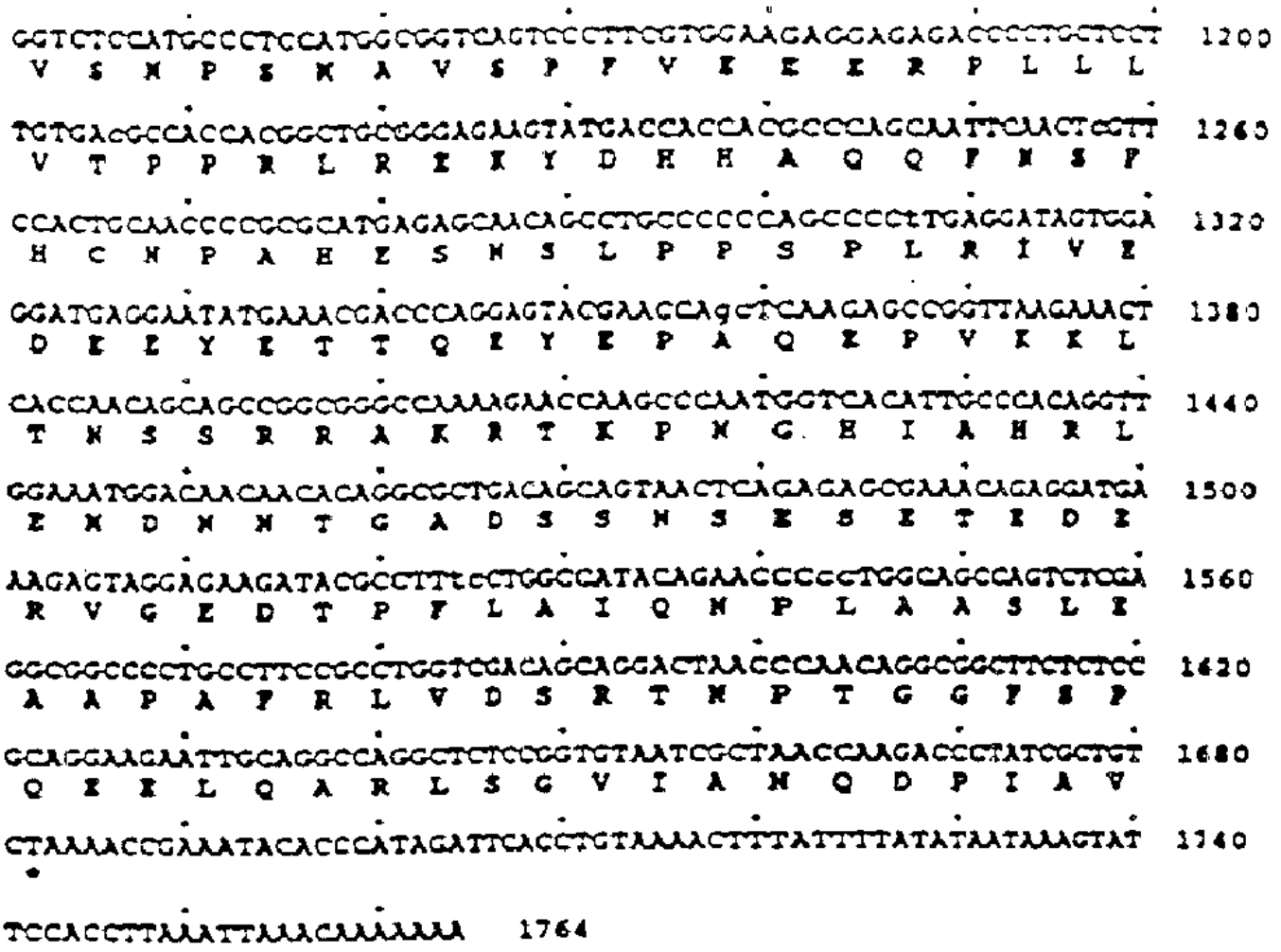
도면 34a

(SEQ ID NO: 130)

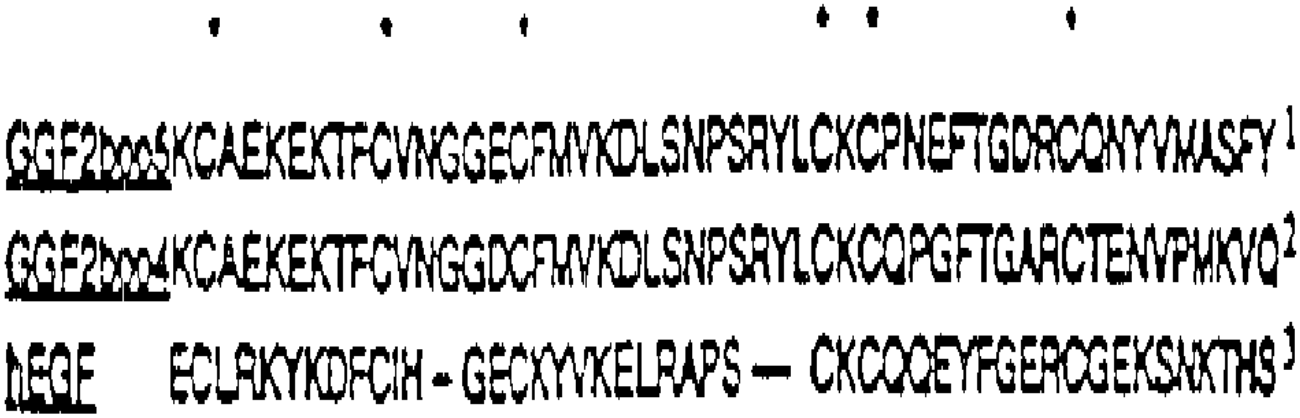
GGF2 BPP4 뉴클레오티드 서열 및 추론 단백질 서열



도면 34b



도면 35



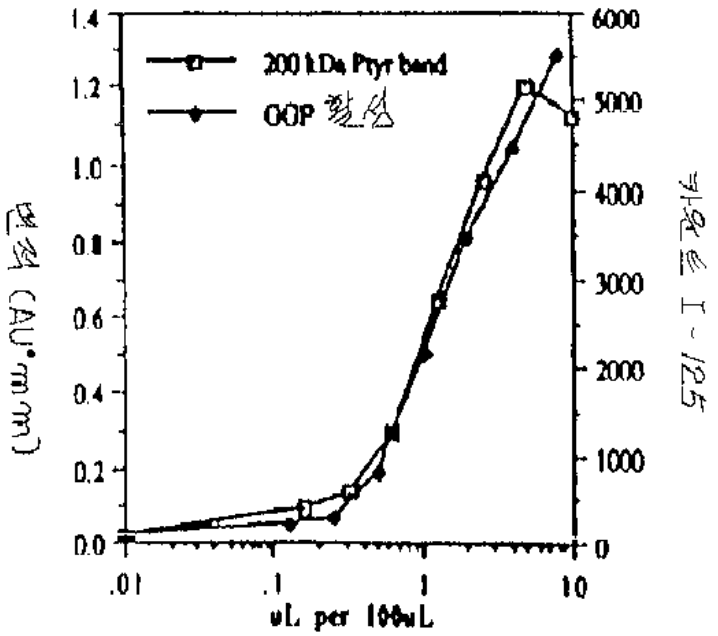
1(SEQ ID NO: 151)

2(SEQ ID NO: 152)

3(SEQ ID NOL 153)

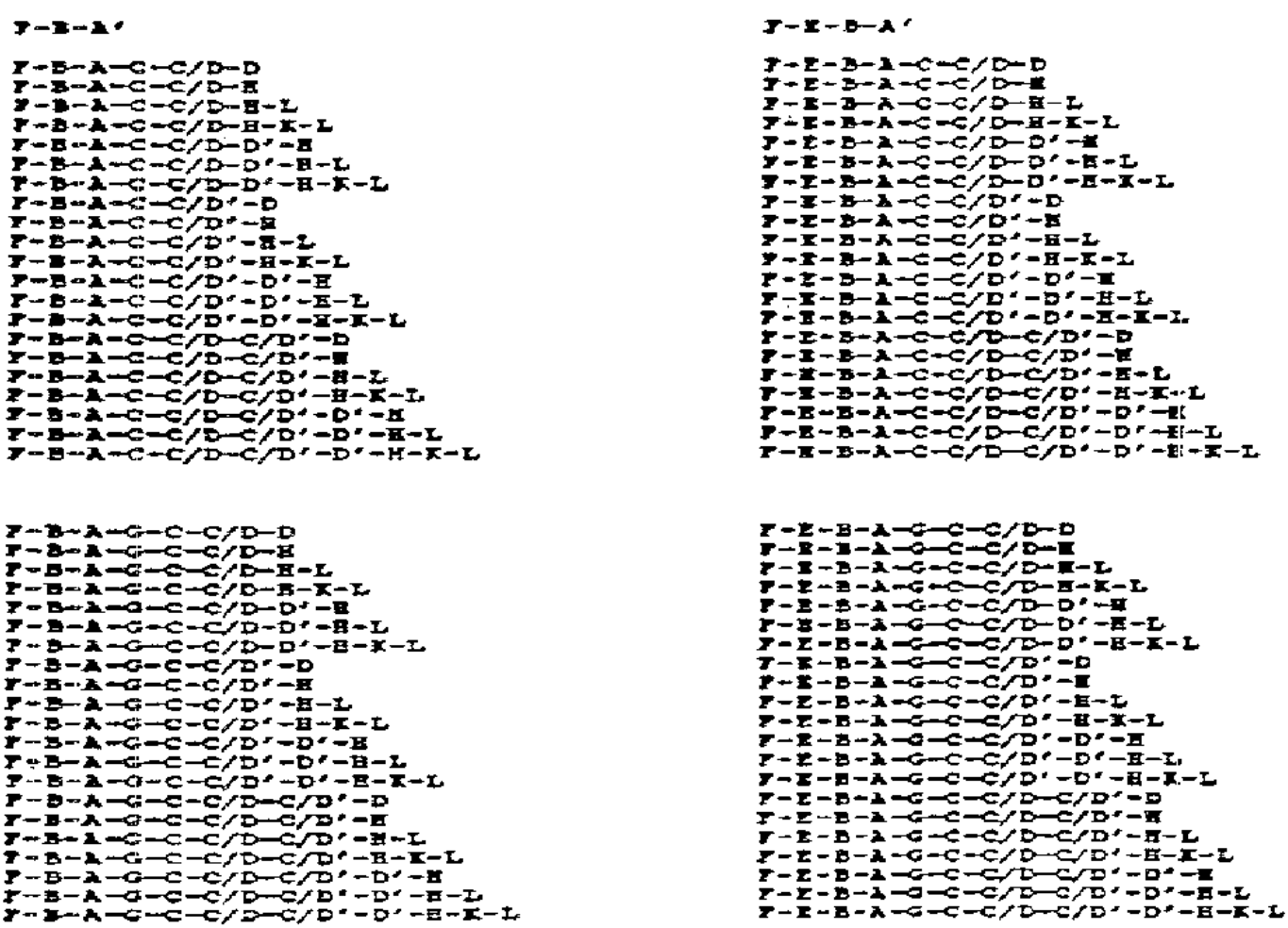
도면 36

분열촉진활성과 비교된 200kDa 티로신 인산화



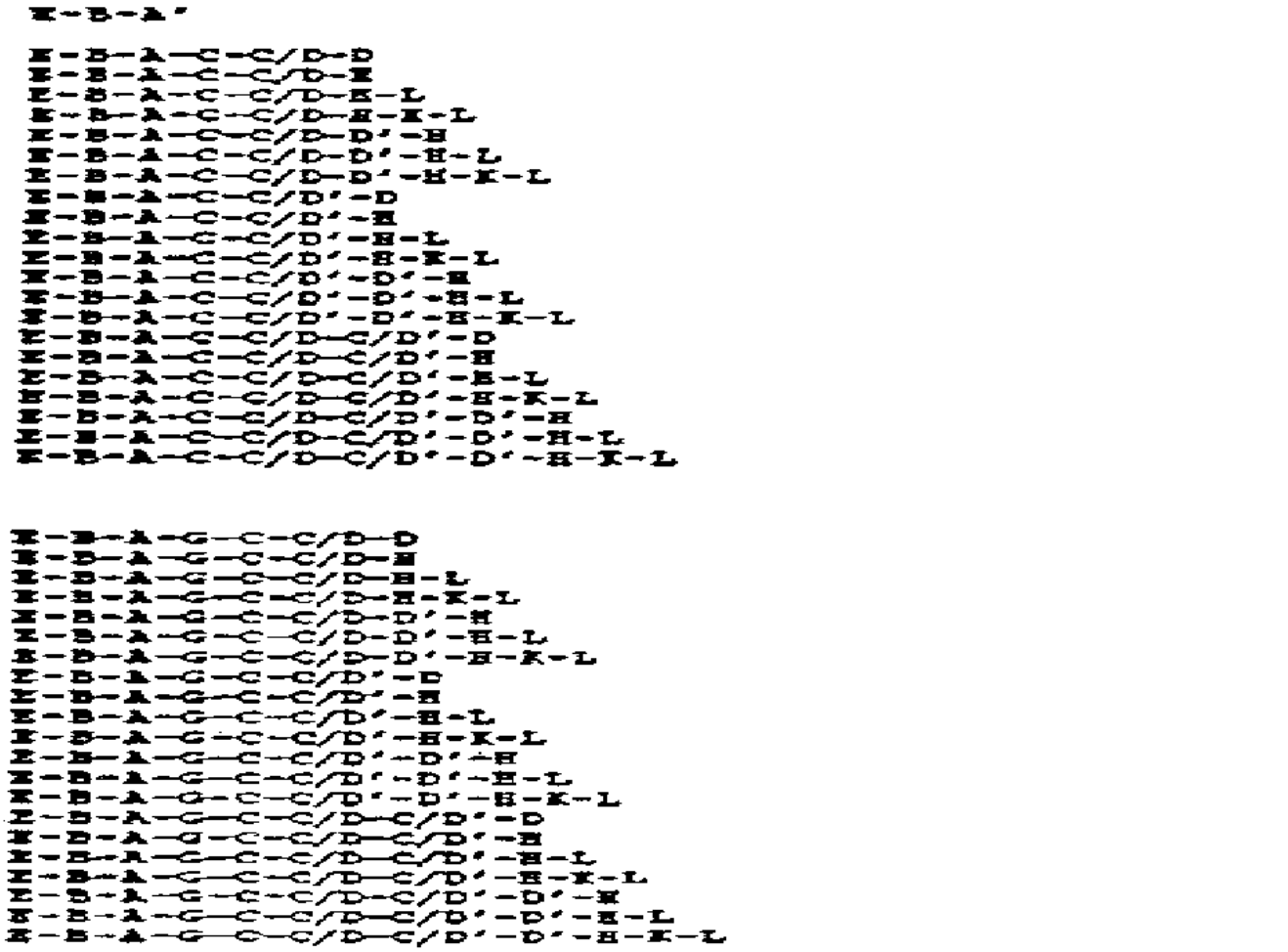
도면 37a

GGF/헤테로원 스플라이싱 변이체



도면 37b

GGF/헤레조린 스플라이싱 변이체



도면 38

EGFL1

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTCAATGGAGGCGAGTGC
S H L V K C A E K E K T F C V N G G E C

TTCATGGTGAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTGCCCAAATGAGTTT
F M V K D L S N P S R Y L C K C P N E F

ACTGGTGATCGCTGCCAAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAGTACGTCCACTCCCTTT
T G D R C Q N Y V M A S F Y S T S T P F

CTGTCTCTGCCTGAATAG
L S L P E *

(SEQ ID NO: 154)

도면 39

EGFL2

```
AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTGAATGGAGGCGAGTGC
S  H  L  V  K  C  A  E  K  E  K  T  F  C  V  N  G  G  E  C

TTCATGGTGAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTGCCCACCTGGATTC
F  M  V  K  D  L  S  N  P  S  R  Y  L  C  K  C  Q  P  G  F

ACTGGAGCGAGATGTACTGAGAATGTGCCCATGAAAGTCCAAACCCAAGAAAAAGCGGAG
T  G  A  R  C  T  E  N  V  P  M  K  V  Q  T  Q  E  K  A  E

GAGCTCTACTAA
E  L  Y  *
```

(SEQ ID NO: 155)

도면 40

EGFL3

```
AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTGAATGGAGGCGAGTGC
S  H  L  V  K  C  A  E  K  E  K  T  F  C  V  N  G  G  E  C

TTCATGGTGAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTGCCCAAATGAGTTT
F  M  V  K  D  L  S  N  P  S  R  Y  L  C  K  C  P  N  E  F

ACTGGTGATCGCTGCCAAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCGGAGGAGCTCTAC
T  G  D  R  C  Q  N  Y  V  M  A  S  F  Y  K  A  E  E  L  Y

TAA
*
```

(SEQ ID NO: 156)

도면 41

EGFLA

```
AGCCATCTTGTCAAGTGTGGAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTGAATGGAGGCGAGTGC
S  H  L  V  X  C  A  E  K  E  K  T  F  C  V  N  G  G  E  C

TTCATGGTGAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTGCCCAAATGAGTTT
F  M  V  K  D  L  S  N  P  S  R  Y  L  C  K  C  P  N  E  F

ACTGGTGATCGCTGCCAAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAAGCATCTTGGGATTGAA
T  G  D  R  C  Q  N  Y  V  M  A  S  F  Y  K  H  L  G  I  E

TTTATGGAGAAAGCGGAGGAGCTCTACTAA
F  M  E  K  A  E  E  L  Y  *
```

(SEQ ID NO: 157)

도면 42

EGFL5

```
AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAAGGACAAAACTTTCTGTGTGAATGGAGGCGAGTGC
S  H  L  V  K  C  A  E  K  E  K  T  F  C  V  N  G  G  E  C

TTCATGGTGAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTGCCAACCTGGATTC
F  M  V  K  D  L  S  N  P  S  R  Y  L  C  K  C  Q  P  G  F

ACTGGAGCGAGATGTACTGAGAATGTGCCCATGAAAGTCCAAACCCAAGAAAAGTGCCCA
T  G  A  R  C  T  E  N  V  P  M  K  V  Q  T  Q  E  K  C  P

AATGAGTTTACTGGTGATCGCTGCCAAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAGTACGTCC
N  E  F  T  G  D  R  C  Q  N  Y  V  M  A  S  F  Y  S  T  S

ACTCCCTTTCTGTCTCTGCCTGAATAG
T  P  F  L  S  L  P  E  *
```

(SEQ ID NO: 158)

도면 43

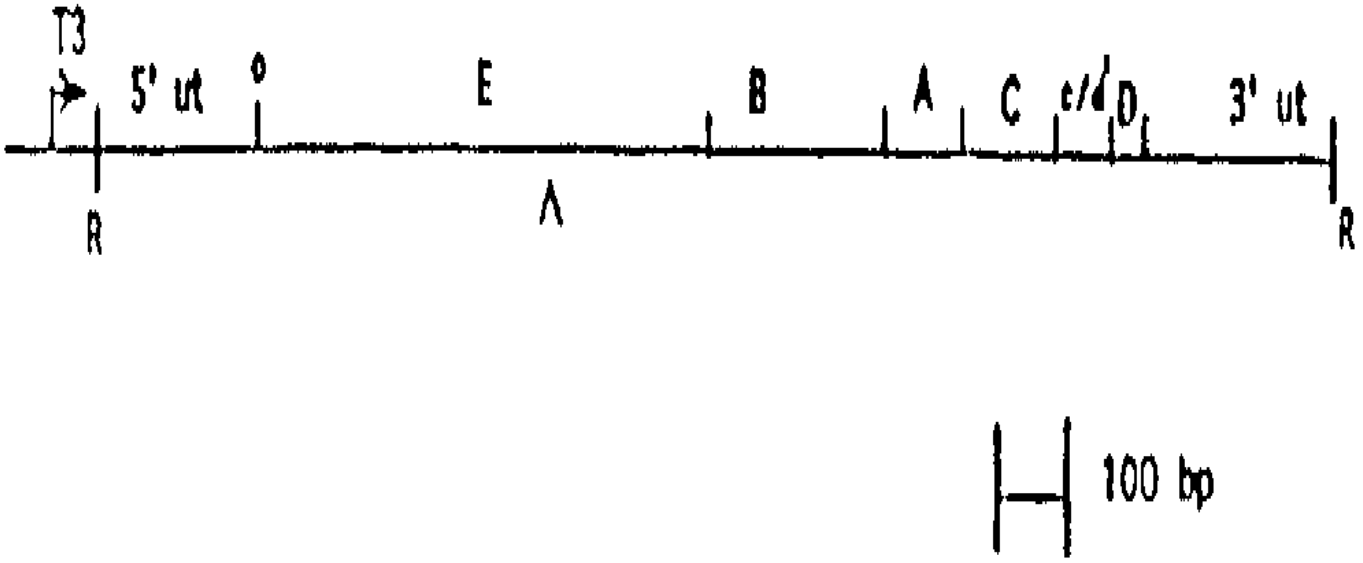
ZGFL6

```
AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTGAATGGAGGCGAGTGC
S  H  L  V  K  C  A  E  K  E  K  T  F  C  V  N  G  G  E  C

TTCATGGTGAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTGCCAACCTGGATTC
F  M  V  K  D  L  S  N  P  S  R  Y  L  C  K  C  Q  P  G  F

ACTGGAGCGAGATGTACTGAGAATGTCCCCATGAAAGTCCAAACCCAAGAAAAGTGCCCA
T  G  A  R  C  T  E  N  V  P  M  K  V  Q  T  Q  E  K  C  P

AATGAGTTTACTGGTGATCGCTGCCAAAACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCGGAG
N  E  F  T  G  D  R  C  Q  N  Y  V  M  A  S  F  Y  K  A  E

GAGCTCTACTAA
E  L  Y  *
```

(SEQ ID NO: 159)

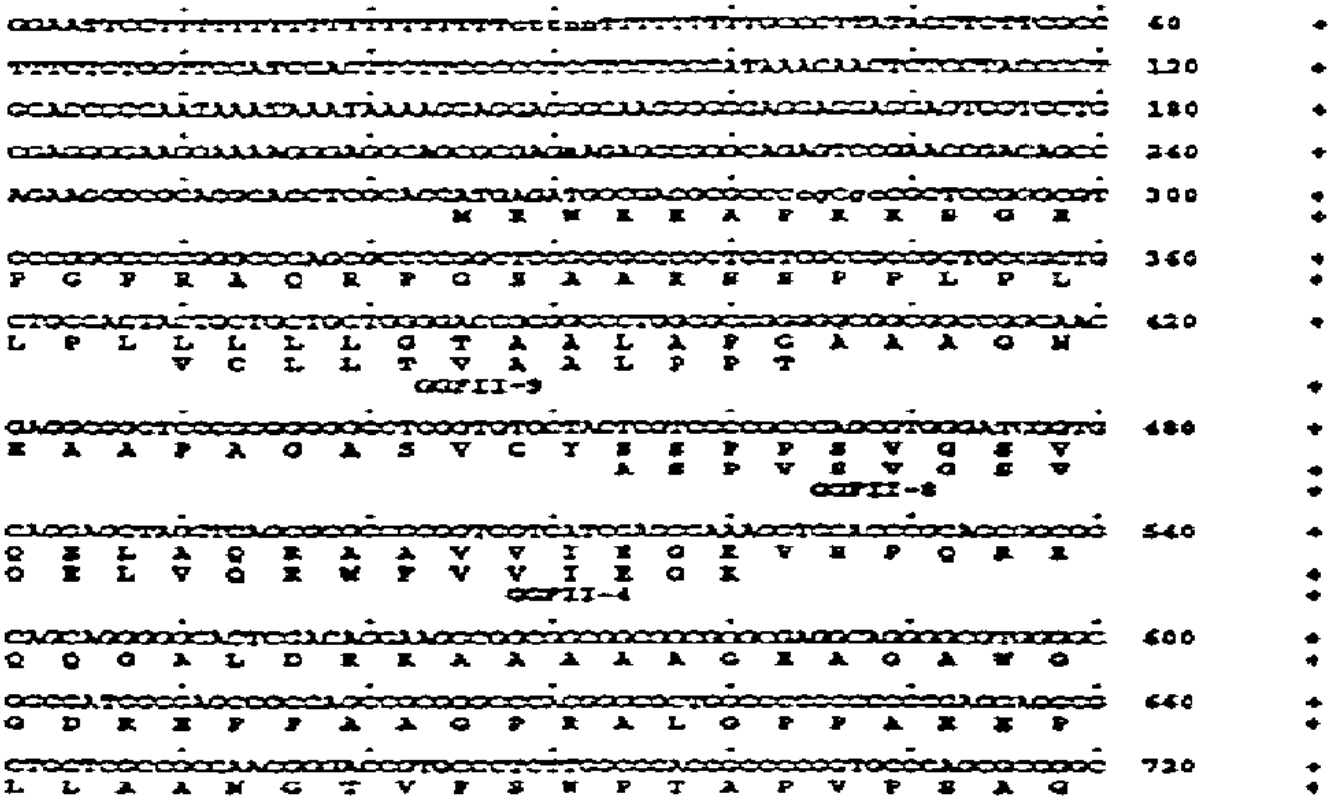
도면 44

GGF2HBS5



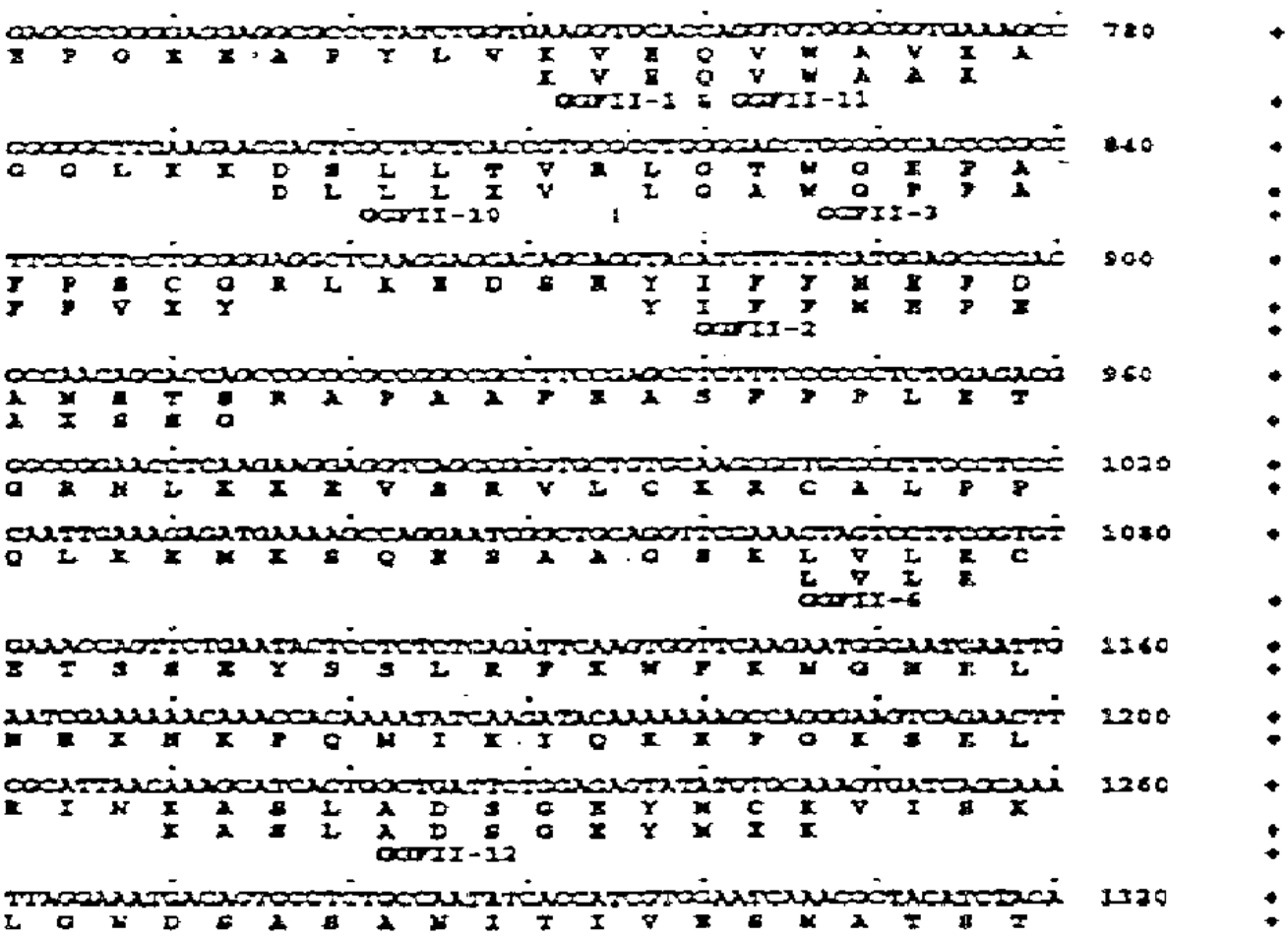
도면 45a

GGF2 HBS5의 뉴클레오티드 서열 및 추론 아미노산 서열

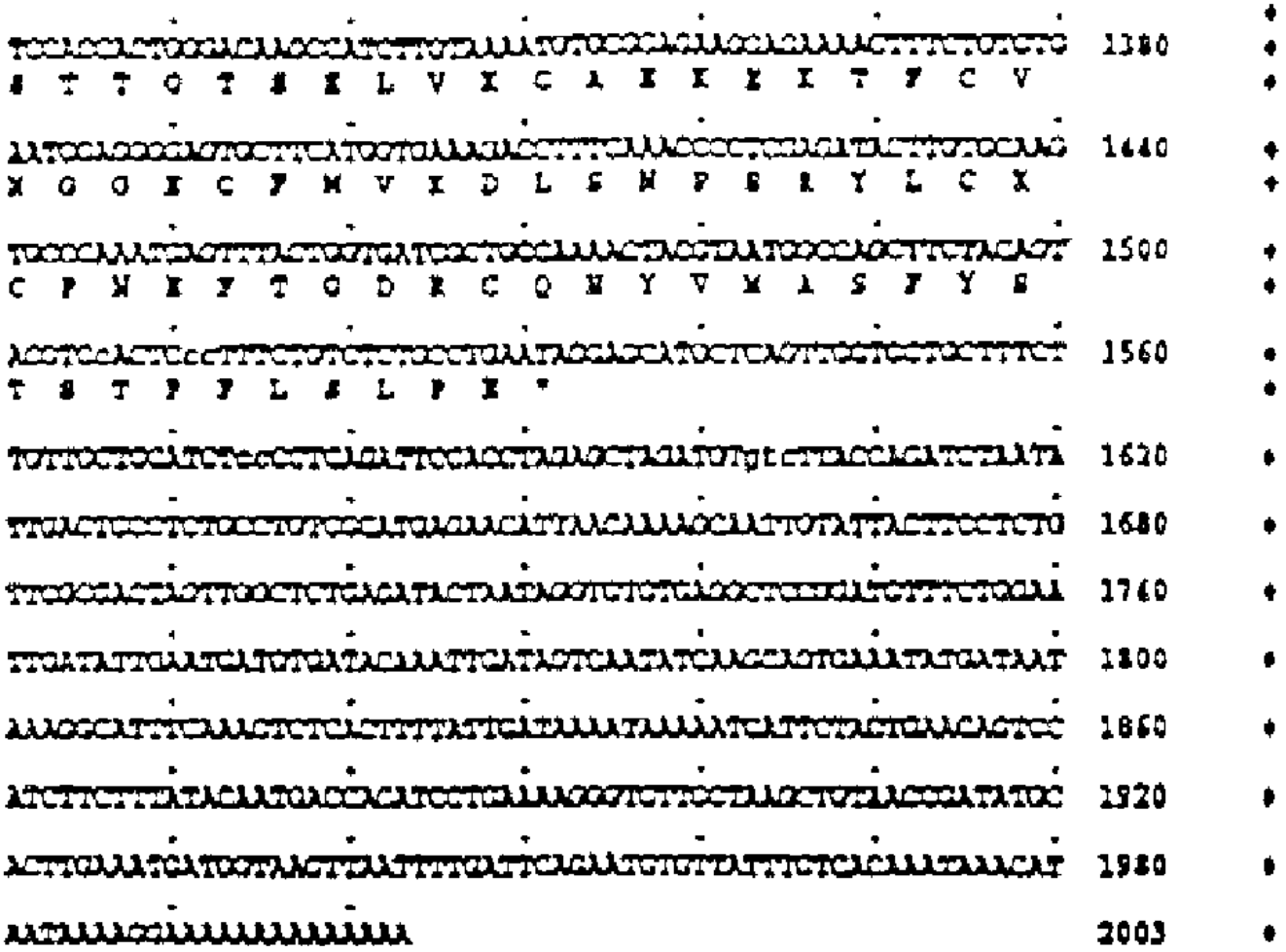


(SEQ ID NO: 167)

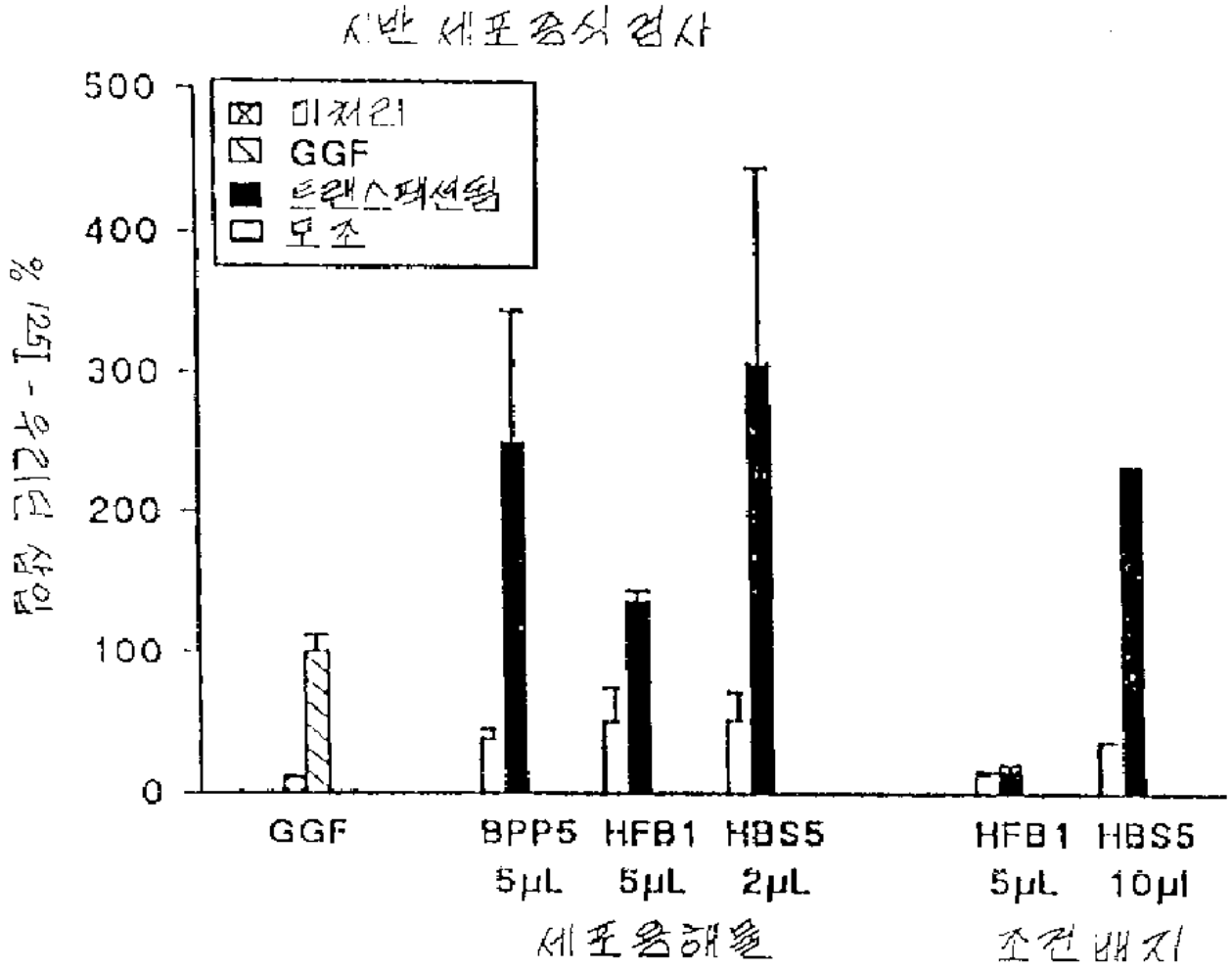
도면 45b



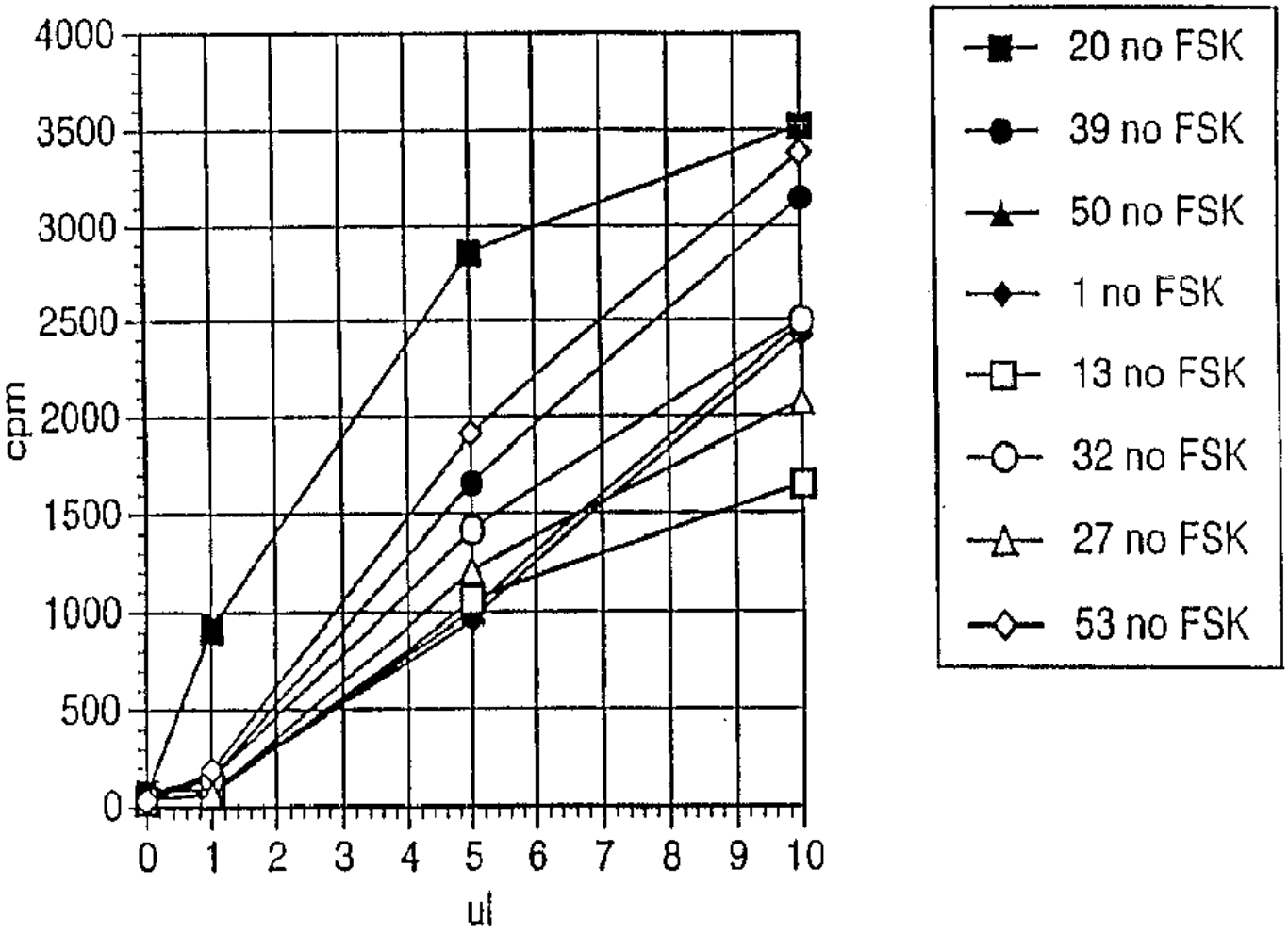
도면 45c



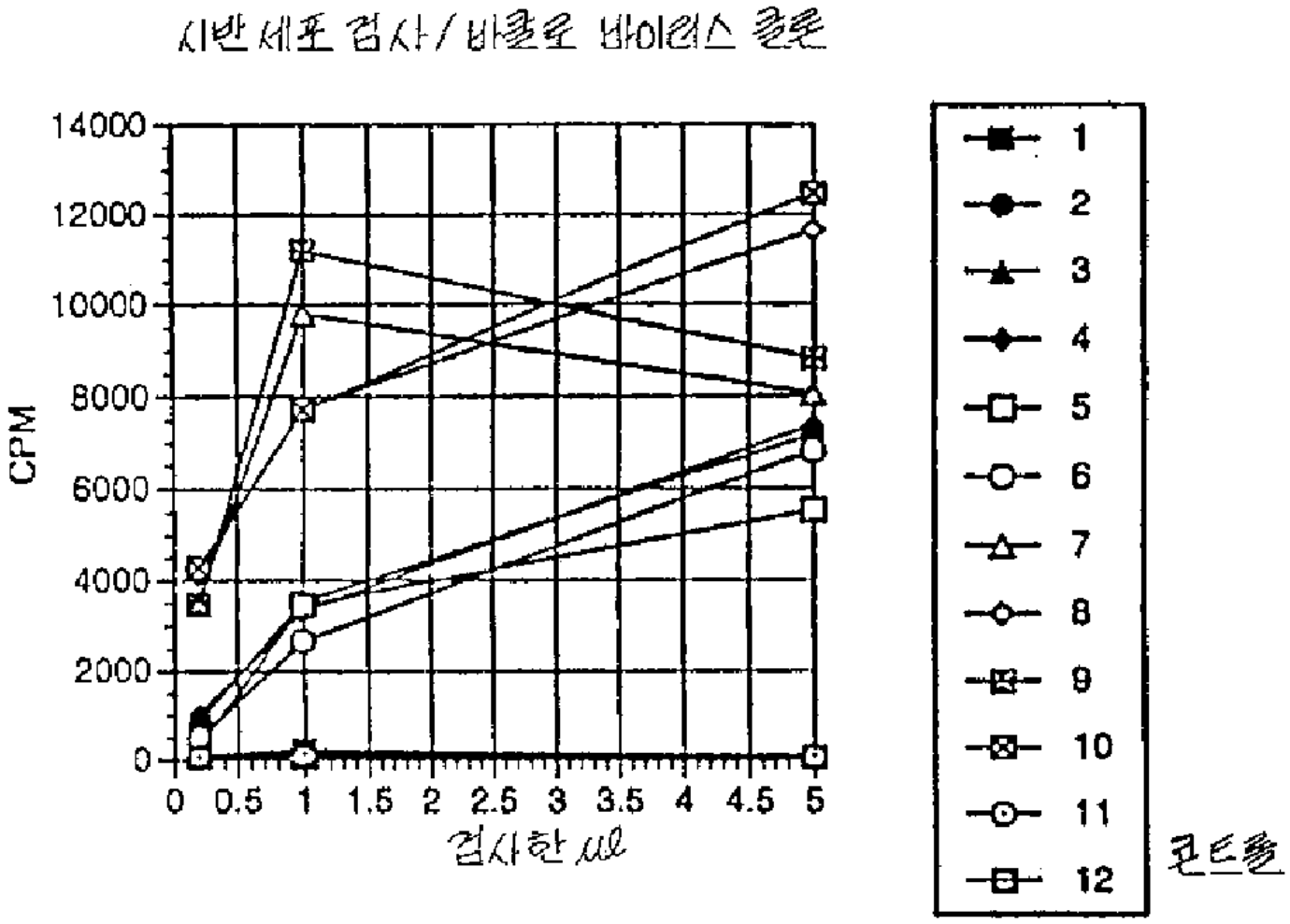
도면 46


시판 세포증식 검사
500
400
300
200
100
0
미처리
GGF
트랜스페션됨
모조
GGF
BPP5 5μL
HFB1 5μL
HBS5 2μL
HFB1 5μL
HBS5 10μl
세포용해물
조건배지

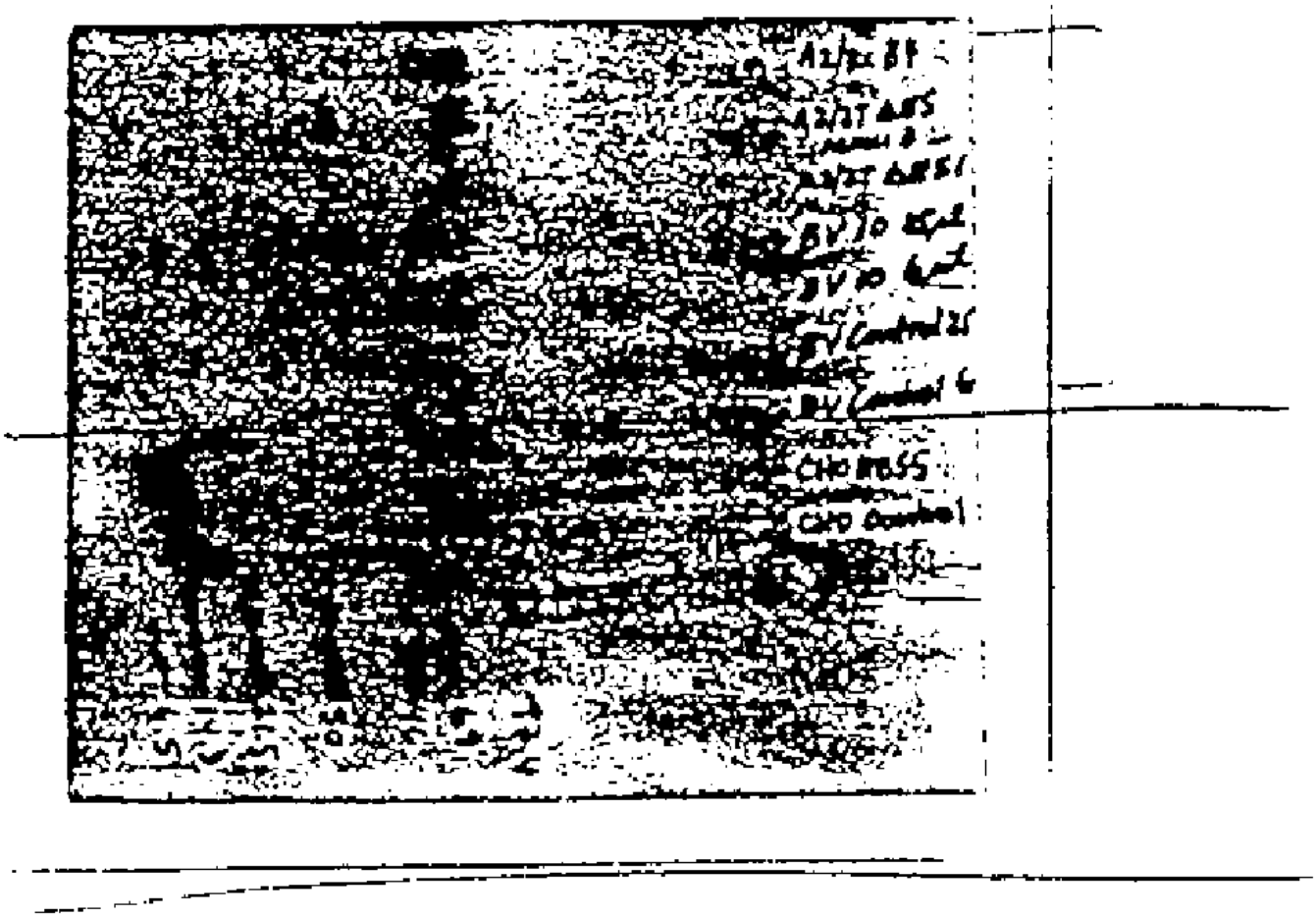
도면 47


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
cpm
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
ul
20 no FSK
39 no FSK
50 no FSK
1 no FSK
13 no FSK
32 no FSK
27 no FSK
53 no FSK

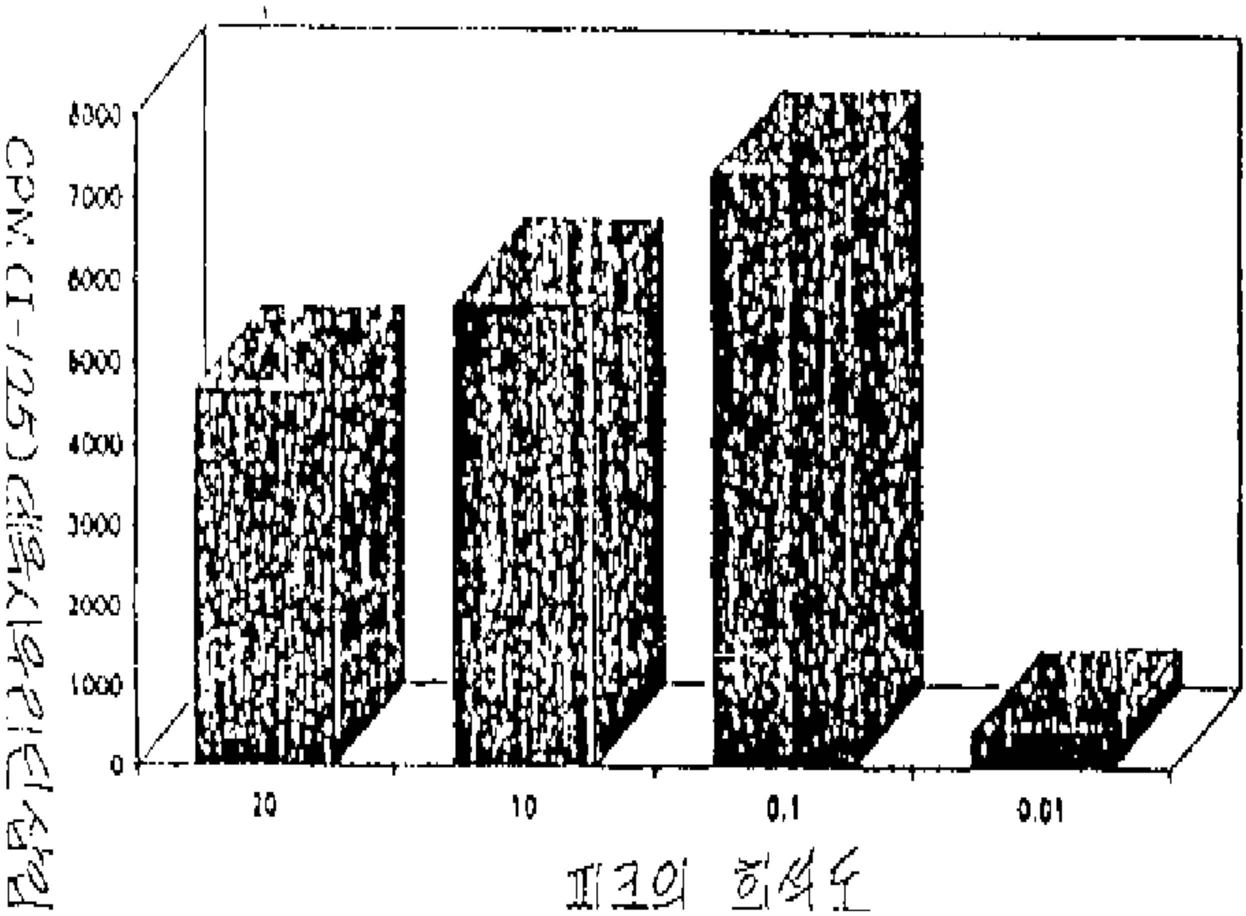
도면 48


시판 세포 검사 / 바클로 바이러스 클론
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CPM
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5
검사한 ㎕
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
콘트롤

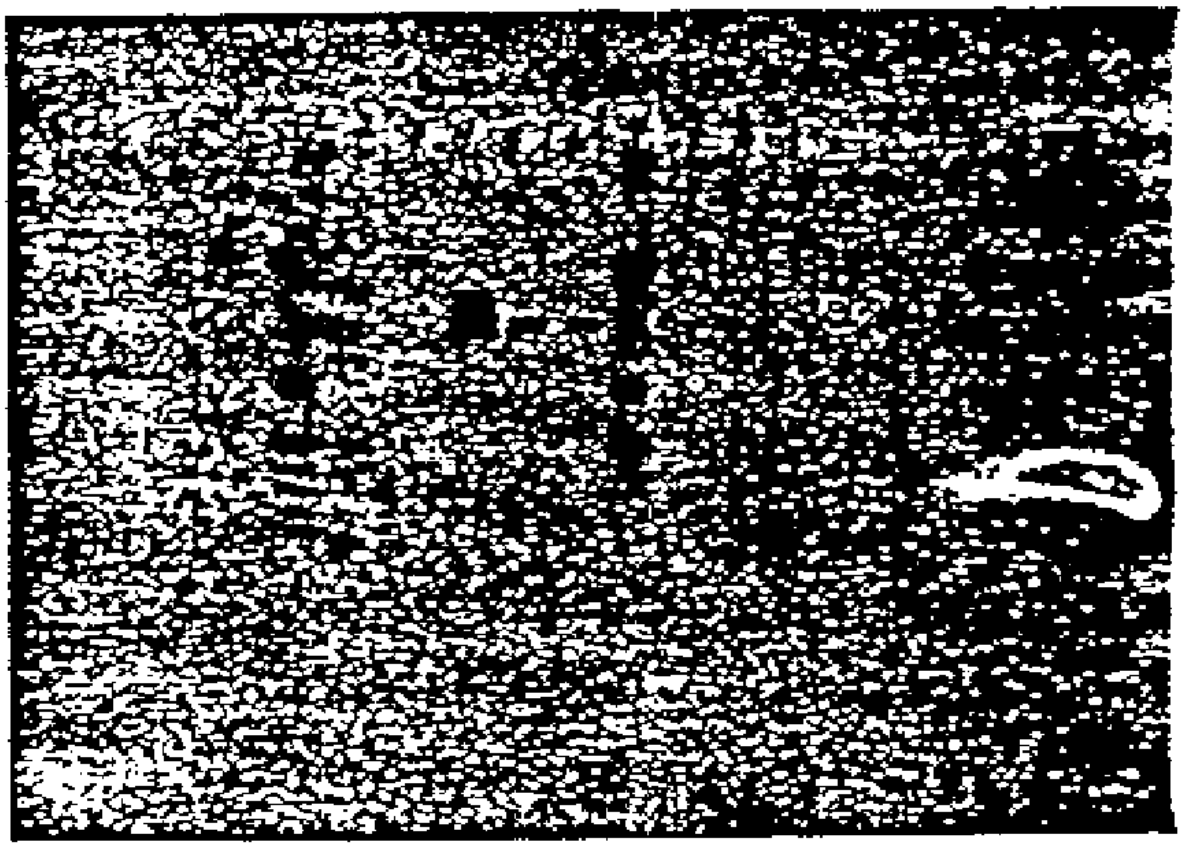
도면 49



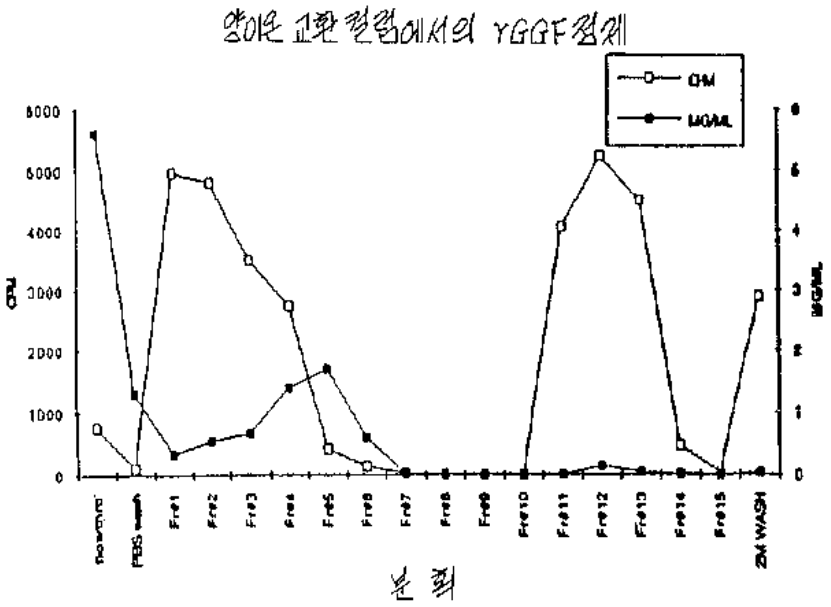
도면 50a

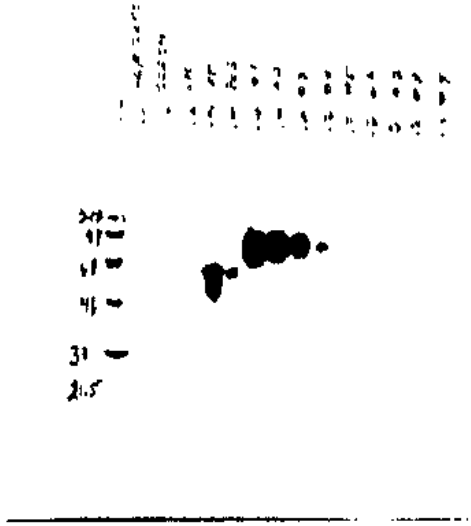

CPM (I-125)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
20
10
0.1
0.01
피크의 희석도

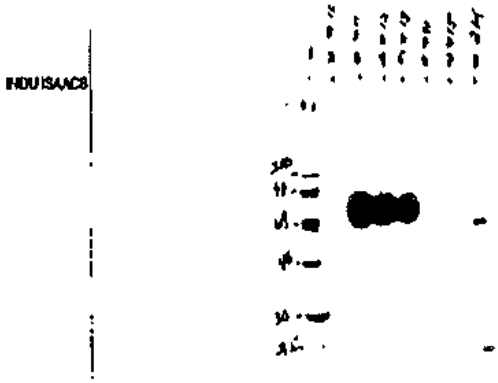
도면 50b



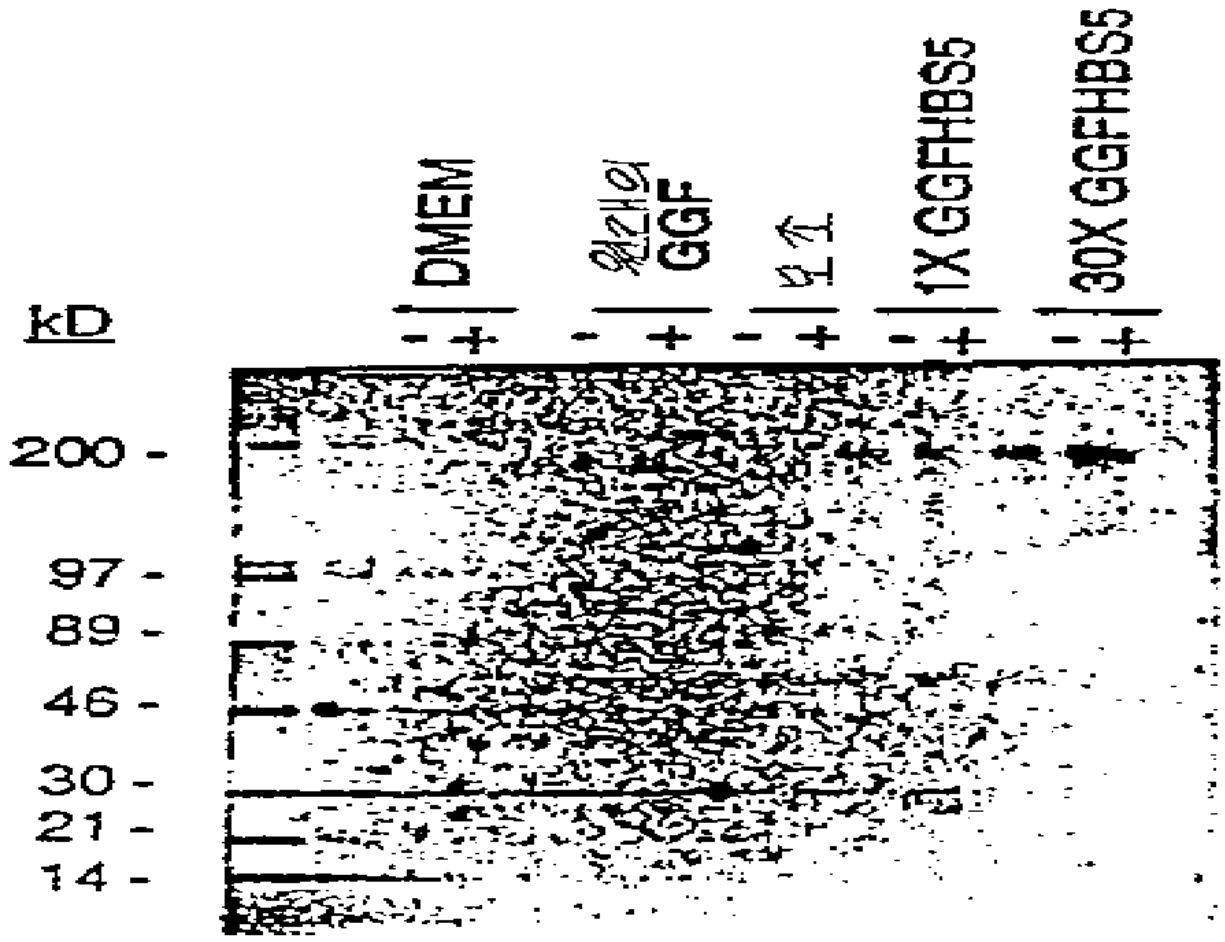
도면 51


양이온 교환 컬럼에서의 YGGF절제
CPM
MG/ML
8000
6000
4000
3000
2000
1000
0
CPM
Fr#1
Fr#2
Fr#3
Fr#4
Fr#5
Fr#6
Fr#7
Fr#8
Fr#9
Fr#10
Fr#11
Fr#12
Fr#13
Fr#14
Fr#15
2M WASH
분획



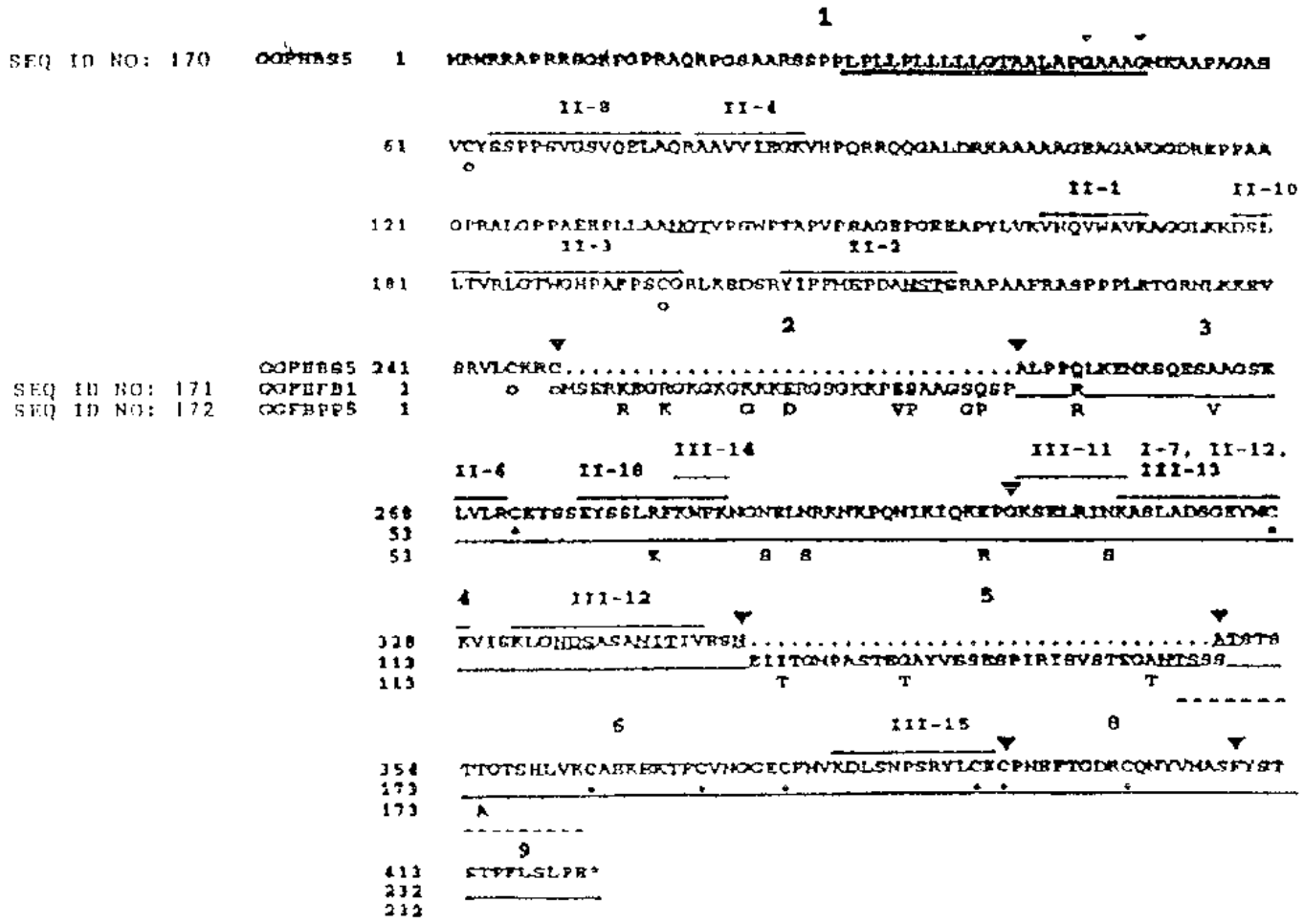

INDUISAAC8

도면 52

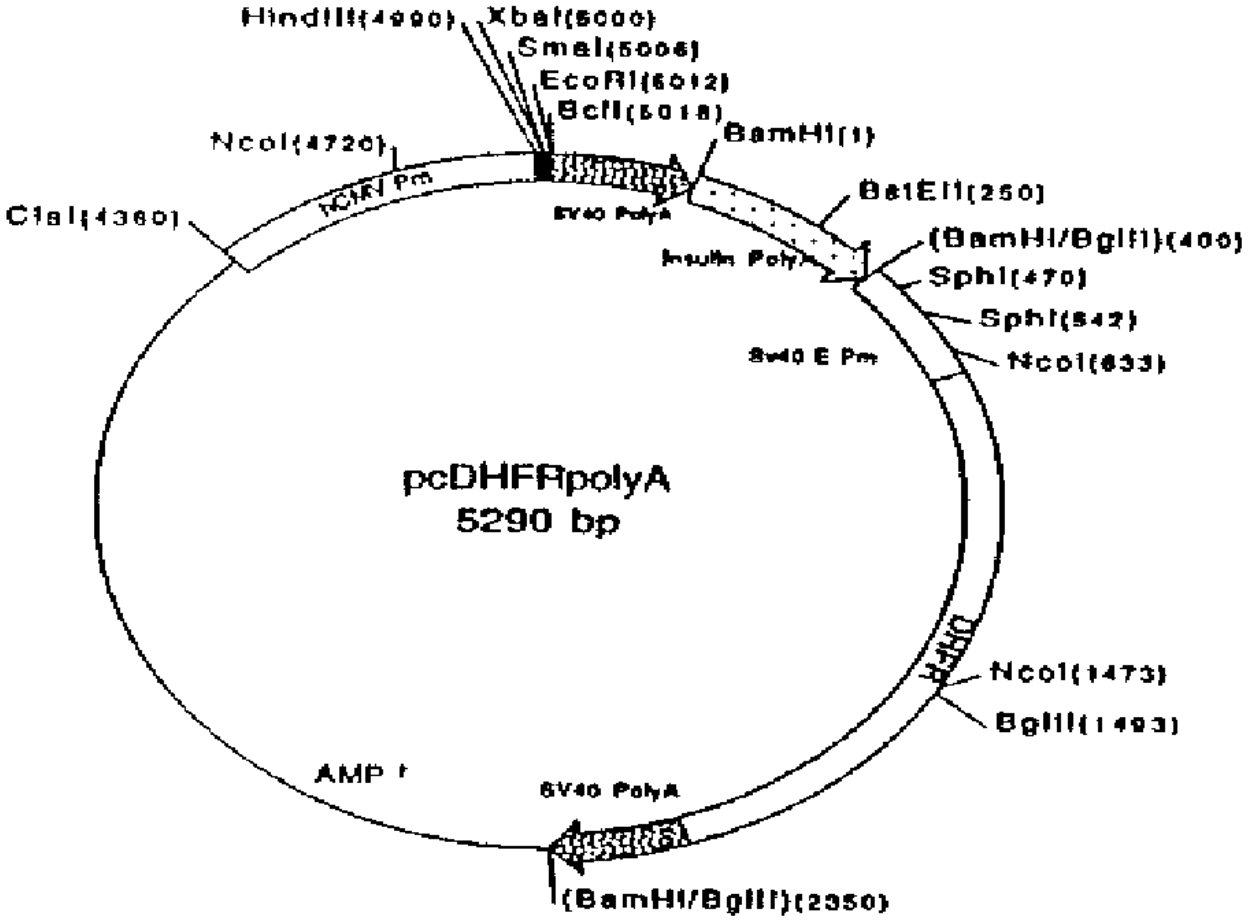


도면 53

인간 및 소 신경교원 섬장인자의 주요 서열



도면 54


HindIII(4990)
XbaI(5000)
SmaI(5006)
EcoRI(5012)
BclI(5018)
BamHI(1)
NcoI(4720)
ClaI(4360)
BglII(250)
(BamHI/BglII)(400)
SphI(470)
SphI(542)
NcoI(633)
pcDHFRpolyA
5290 bp
NcoI(1473)
BglII(1493)
AMP r
(BamHI/BglII)(2350)