[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
C12N 15/12
C07K 14/50 A61K 38/18
C07K 16/22 G01N 33/566
A61K 48/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97197264.8

[43]公开日 1999年11月3日

[11]公开号 CN 1234071A

[22]申请日 97.8.13 [21]申请号 97197264.8

[30]优先权

[32]96.8.13 [33]US [31]60/023,852

[32]97.2.28 [33]US [31]60/039,045

[86]国际申请 PCT/US97/14112 97.8.13

[87]国际公布 WO98/06844 英 98.2.19

[85]进入国家阶段日期 99.2.12

[71]申请人 人类基因组科学公司

地址 美国马里兰

[72]发明人 R·杜安 S·M·鲁宾 P·希门尼斯 M·A·拉姆派 D·门德里克 J·张 J·倪 P·A·穆勒 T·A·科雷曼 R·L·根特茨

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

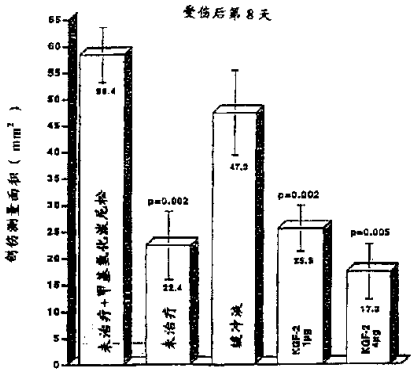
代理人 黄革生

权利要求书9页 说明书131页 附图页数67页

[54]发明名称 角质形成细胞生长因子-2(KGF-2或成纤维细胞生长因子-12,FGF-12)

[57]摘要

本发明涉及多种新鉴定的多核苷酸,由这类多核苷酸编码的多肽,这类多核苷酸和多肽的用途,以及这类多核苷酸和多肽的生产。更具体地,本发明的多肽是角质形成细胞生长因子,下文中有时也称之为"KGF-2",以前也称之为成纤维细胞生长因子12(FGF-12)。本发明也涉及抑制这类多肽的作用。本发明另外还涉及KGF-2促进或加快创伤愈合的治疗用途。本发明也涉及KGF-2的新的突变体形式,所述突变体形式显示出活性增强,稳定性增加,产量较高或溶解性较好。



ISSN 1008-4274

专利文献出版社出版

权 利 要 求 书

1.分离的多肽，所述多肽选自下述成员：

(a)角质形成细胞生长因子-2(KGF-2)N-末端的缺失突变体，其中所述突变体除图 1 中至少前 38 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基缺失外，含有图 1 所示氨基酸序列；

(b)角质形成细胞生长因子-2(KGF-2)C-末端的缺失突变体，其中所述突变体除图 1 中至少最后一个 C-末端氨基酸残基(Ser(208))，但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基缺失外，含有图 1 所示氨基酸序列，其中所述 KGF-2 C-末端缺失突变体的 N-末端氨基酸残基是图 1 的氨基酸残基 1(Met)， 36(Thr)，或 37(Cys)；

(c)角质形成细胞生长因子-2(KGF-2)N-末端和 C-末端的缺失突变体，其中所述突变体除图 1 中至少前 38 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基缺失，和图 1 中至少最后一个 C-末端氨基酸残基(Ser(208))，但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基缺失外，含有图 1 所示氨基酸序列；

(d)具有与(a)中所述 KGF-2 缺失突变体的氨基酸序列至少 95 % 相同之氨基酸序列的多肽；

(e)具有与(b)中所述 KGF-2 缺失突变体的氨基酸序列至少 95 % 相同之氨基酸序列的多肽；

(f)具有与(c)中所述 KGF-2 缺失突变体的氨基酸序列至少 95 % 相同之氨基酸序列的多肽；

(g)除了至少一个氨基酸取代外，具有与(a)中所述 KGF-2 缺失突变体的氨基酸序列相同之氨基酸序列的多肽；

(h)除了至少一个氨基酸取代外，具有与(b)中所述 KGF-2 缺失突变体的氨基酸序列相同之氨基酸序列的多肽；

(i)除了至少一个氨基酸取代外，具有与(c)中所述 KGF-2 缺失突变体的氨基酸序列相同之氨基酸序列的多肽；其中

所述分离的多肽刺激角质形成细胞的增殖。

2.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(a)。

3.权利要求 2 的分离的多肽，其中所述突变体具有至少前 46 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失。

4.权利要求 3 的分离的多肽，其中所述突变体具有至少前 62 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失。

5.权利要求 4 的分离的多肽，其中所述突变体具有至少前 68 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失。

6.权利要求 5 的分离的多肽，其中所述突变体具有至少前 76 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失。

7.权利要求 6 的分离的多肽，其中所述突变体具有至少前 92 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失。

8.权利要求 7 的分离的多肽，其中所述突变体具有至少前 103 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失。

9.权利要求 8 的分离的多肽，其中所述突变体具有至少前 122 个 N-末端氨基酸残基，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失。

10.权利要求 9 的分离的多肽，其中所述突变体具有前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失。

11.权利要求 2 的分离的多肽，其中所述突变体具有选自下列的图 1 所示氨基酸序列：Ala(39)-Ser(208); Pro(47)-Ser(208); Ala(63)-Ser(208); Ser(69)-Ser(208); Val(77)-Ser(208); Glu(93)-Ser(208); Glu(104)- Ser(208); Val(123)-Ser(208); Gly(138)-Ser(208)。

12.权利要求 2 的分离的多肽，其中所述突变体与野生型 KGF-2 相比具有增强的刺激角质形成细胞生长的活性。

13.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(d)。

14.权利要求 13 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(a)中所述 KGF-2 N-末端缺失突变体的氨基酸序列至少 97 % 相同。

15.权利要求 14 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(a)中所述 KGF-2 N-末端缺失突变体的氨基酸序列至少 99 % 相同。

16.权利要求 15 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(a)中所述 KGF-2 N-末端缺失突变体的氨基酸序列相同。

17.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(g)。

18.权利要求 17 的分离的多肽，其中所述至少一个氨基酸取代选自下述：Arg(194)Glu，Arg(194)Gln，Lys(191)Glu，Lys(191)Gln，Arg(188)Glu，Arg(188)Gln 和 Lys(183)Glu。

19.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(b)。

20.权利要求 19 的分离的多肽，其中所述突变体缺失了至少最后 10，20，30，40 或 50 个 C-末端氨基酸但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸。

21.权利要求 20 的分离的多肽，其中所述突变体缺失了最后 55 个 C-末端氨基酸。

22.权利要求 19 的分离的多肽，其中所述突变体具有选自下列的图 1 所示的氨基酸序列：Met(1)-Lys(153)，Thr(36)-Lys(153) 和 Cys(37)-Lys(153)。

23.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(e)。

24.权利要求 23 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(b)中所述 KGF-2 C-末端缺失突变体的氨基酸序列至少 97 % 相同。

25.权利要求 24 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(b)中所述 KGF-2 C-末端缺失突变体的氨基酸序列至少 99 % 相同。

26.权利要求 25 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(b)中所述 KGF-2 C-末端缺失突变体的氨基酸序列相同。

27.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(h)。

28.权利要求 27 的分离的多肽，其中所述至少一个氨基酸取代选自下述：Cys(37)Ser 和 Cys(106)Ser。

29.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(c)。

30.权利要求 29 的分离的多肽，其中所述突变体缺失了图 1 中至少前 46，62，68，76，92，103 或 122 个 N-末端氨基酸，但不超过前 137 个 N-末端氨基酸，还缺失了图 1 中至少最后 10，20，30，40 或 50 个 C-末端氨基酸，但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸。

31.权利要求 29 的分离的多肽，其中所述突变体具有选自下列的图

1 所示的氨基酸序列： Ala(39)-His(200)， Met(44)-Arg(193)，Ala(63)-Lys(153)和 Ser(69)-Lys(153).

32.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(f)。

33.权利要求 32 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(c)中所述 KGF-2 N-末端和 C-末端缺失突变体的氨基酸序列至少 97 %相同。

34.权利要求 33 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(c)中所述 KGF-2 N-末端和 C-末端缺失突变体的氨基酸序列至少 99 %相同。

35.权利要求 34 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(c)中所述 KGF-2 N-末端和 C-末端缺失突变体的氨基酸序列相同。

36.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是(i)。

37.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述突变体的所述氨基酸序列包括在 N 末端添加的 Met。

38.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽是融合蛋白的一部分。

39.权利要求 38 的分离的多肽，其中所述多肽是与标记序列融合的。

40.权利要求 39 的分离的多肽，其中所述标记序列选自六组氨酸标记或血凝素标记。

41.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽产生于或包含于重组的宿主细胞中。

42.权利要求 41 的分离的多肽，其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

43.一种分离的多肽，它选自下列成员：

(a)角质形成细胞生长因子-2(KGF-2)N-末端缺失突变体，其中所述突变体基本上由图 1 氨基酸序列 Ser(69)-Ser(208)组成；

(b)具有与(a)所述的 KGF-2 N-末端缺失突变体之氨基酸序列至少 95 %相同的氨基酸序列的多肽；

(c)除了至少一个氨基酸取代外，具有与(a)所述的 KGF-2 N-末端缺失突变体之氨基酸序列相同的氨基酸序列的多肽；其中

所述分离的多肽刺激角质形成细胞的增殖。

44.权利要求 43 的分离的多肽，其中所述多肽是(a)。

45.权利要求 44 的分离的多肽，其中所述突变体与野生型 KGF-2 相比具有增强的刺激角质形成细胞生长的活性。

46.权利要求 43 的分离的多肽，其中所述多肽是(b)。

47.权利要求 46 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(a)中所述 KGF-2 N-末端缺失突变体的氨基酸序列至少 97 % 相同。

48.权利要求 47 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(a)中所述 KGF-2 N-末端缺失突变体的氨基酸序列至少 99 % 相同。

49.权利要求 48 的分离的多肽，其中所述氨基酸序列与(a)中所述 KGF-2 N-末端缺失突变体的氨基酸序列相同。

50.权利要求 43 的分离的多肽，其中所述多肽是(c)。

51.权利要求 50 的分离的多肽，其中所述至少一个氨基酸取代增加了所述突变体的稳定性。

52.权利要求 51 的分离的多肽，其中所述至少一个氨基酸取代选自下述：Arg(194)Glu，Arg(194)Gln，Lys(191)Glu，Lys(191)Gln，Arg(188)Glu，Arg(188)Gln 和 Lys(183)Glu。

53.权利要求 43 的分离的多肽，其中所述多肽包括在 N 末端添加的氨基酸 Met。

54.权利要求 43 的分离的多肽，其中所述多肽是融合蛋白的一部分。

55.权利要求 54 的分离的多肽，其中所述多肽是与标记序列融合的。

56.权利要求 55 的分离的多肽，其中所述标记序列选自六组氨酸标记或血凝素标记。

57.权利要求 43 的分离的多肽，其中所述多肽产生于或包含于重组的宿主细胞中。

58.权利要求 57 的分离的多肽，其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

59.含有角质形成细胞生长因子-2(KGF-2)一个亲水区域的分离的多肽，其中所述肽的长度不超过150个氨基酸，并含有选自下列的图1所示氨基酸序列： Gly(41)-Asn(71)， Lys(91)-Ser(109)， Asn(135)-Tyr(164)和 Asn(181)-Ala(199)。

60.权利要求 59 的多肽，其中所述多肽的长度不超过 100 个氨基酸。

61.权利要求60的多肽，其中所述多肽的长度不超过50个氨基酸。

62.权利要求 1 的分离的多肽，其中所述多肽与一种药学可接受的载体或赋形剂混合。

63.权利要求43的分离的多肽，其中所述多肽与一种药学可接受的载体或赋形剂混合。

64.权利要求59的分离的多肽，其中所述多肽与一种药学可接受的载体或赋形剂混合。

65.编码权利要求1的多肽的分离的多核苷酸。

66.编码权利要求43的多肽的分离的多核苷酸。

67.编码权利要求59的多肽的分离的多核苷酸。

68.权利要求65的分离的多核苷酸，其中所述多核苷酸已被优化以适于在大肠杆菌中表达。

69.权利要求68的分离的多核苷酸，所述多核苷酸具有图23的核苷酸序列。

70.权利要求 68 的分离的多核苷酸，所述多核苷酸具有图 24A 的核苷酸序列。

71.权利要求 68 的分离的多核苷酸，所述多核苷酸具有图 24B 的核苷酸序列。

72.权利要求66的分离的多核苷酸，其中所述多核苷酸已被优化以适于在大肠杆菌中表达。

73.权利要求 72 的分离的多核苷酸，其中所述多核苷酸具有说明书，第125页，第7至17行所示的核苷酸序列。

74.制备重组载体的方法，所述方法包括将权利要求65， 66或67

的核酸分子插入载体中。

75.由权利要求74的方法产生的重组载体。

76.制备重组宿主细胞的方法，所述方法包括将权利要求75的重组载体导入宿主细胞。

77.由权利要求76的方法产生的重组宿主细胞。

78.权利要求1，43或59的分离的多肽，所述多肽由包括下列步骤的方法产生：

将含有编码所述多肽的多核苷酸的重组载体导入宿主细胞；

培养所述宿主细胞；和

回收所述多肽。

79.生产多肽的方法，所述方法包括：

在能表达所述载体的条件下培养权利要求77的重组宿主细胞；和

回收所述多肽。

80.刺激角质形成细胞生长或增殖的方法，所述方法包括将所述细胞与有效量的权利要求1或43的多肽接触。

81.权利要求80的方法，其中将所述多肽施用于个体。

82.权利要求81的方法，其中将所述多肽施用于个体是为了下列目的：

防止或改善皱纹或老化皮肤的出现，改善皮肤强度，促进表皮增厚，减少疤痕或改善美容外科手术后的愈合。

83.促进创伤愈合的方法，所述方法包括给个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

84.权利要求83的方法，其中所述个体的创伤愈合受损。

85.权利要求84的方法，其中所述创伤愈合的损害是由糖尿病，局部缺血障碍或受伤，类固醇，非类固醇化合物，尿毒症，营养不良，维生素缺乏症，肥胖症，感染，免疫抑制，辐射疗法或化学疗法导致的。

86.权利要求83的方法，其中所述创伤选自下述：外科伤口，切除术伤口，涉及真皮和表皮损伤的深层创伤，眼组织创伤，牙组织创伤，

口腔创伤，糖尿病患者的溃疡，皮肤溃疡，肘溃疡，动脉溃疡，静脉停滞溃疡或灼伤。

87.治疗由结肠或胃肠道(GI)外科手术导致的创伤的方法，所述方法包括给有此需要的个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

88.权利要求87的方法，其中所述手术是吻合术。

89.权利要求87的方法，其中所述个体是创伤愈合受损的个体。

90.权利要求89的方法，其中所述损害是由糖尿病，局部缺血障碍或受伤，类固醇，非类固醇化合物，尿毒症，营养不良，维生素缺乏症，肥胖症，感染，免疫抑制，辐射疗法或化学疗法导致的。

91.治疗或预防粘膜炎的方法，所述方法包括给有此需要的个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

92.权利要求91的方法，其中所述粘膜炎选自口腔，食管，胃，肠，结肠，直肠或肛门粘膜炎。

93.治疗炎性肠疾病的方法，所述方法包括给有此需要的个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

94.权利要求93的方法，其中所述疾病选自溃疡性结肠炎或Crohn's病。

95.减少炎症的方法，所述方法包括给有此需要的个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

96.权利要求95的方法，其中所述炎症与选自牛皮癣，湿疹，皮炎或关节炎的疾病或状况相关。

97.促进毛发生长的方法，所述方法包括给有此需要的个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

98.治疗已暴露于辐射中的组织或保护待暴露于辐射中的组织的方法，所述方法包括给有此需要的个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

99.权利要求98的方法，其中施用所述多肽以增加用于治疗所述个体内恶性肿瘤的辐射剂量。

100.权利要求98的方法，其中施用所述多肽以治疗辐射诱导的疾

病，所述疾病选自下述：口腔损伤，胃肠道损伤，粘膜炎，肠纤维变性，直肠炎，肺纤维变性，肺炎，胸膜后缩，生血综合征，或骨髓中毒。

101.促进泌尿道上皮愈合的方法，所述方法包括给有此需要的个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

102.促进雌性生殖道组织生长或修复的方法，所述方法包括给有此需要的个体施用有效量的权利要求1或43的多肽。

说　明　书

角质形成细胞生长因子-2(KGF-2
或成纤维细胞生长因子-12,FGF-12)

发明领域

本发明涉及新鉴定的多核苷酸，由这种多核苷酸编码的多肽，这种多核苷酸和多肽的用途，以及这种多核苷酸和多肽的生产。更具体地，本发明的多肽是一种角质形成细胞生长因子，下文中有时也称之为“ KGF-2 ”，以前也称之为成纤维细胞生长因子 12(FGF-12)。本发明也涉及抑制这种多肽的作用。本发明另外还涉及 KGF-2 促进或加快创伤愈合的治疗用途。本发明也涉及 KGF-2 的新的突变体形式，所述突变体形式显示出活性增强，稳定性增加，产量更高或溶解性更好。另外，本发明涉及纯化 KGF-2 多肽的方法。

发明背景

成纤维细胞生长因子家族为涉及软组织生长和再生的生长因子大家族。目前，它包括几个在蛋白质水平上同源性程度不同的成员，除其中的一个外，似乎都具有类似的宽的促细胞分裂谱，即它们能够促进多种来自中胚层和神经外胚层之细胞的增殖和/或促进血管生成。

从发育一些阶段极端受限的表达，到与之相反的多个组织和器官中的遍在表达，该家族不同成员的表达模式非常不同。所有的成员似乎都与肝素和硫酸肝素蛋白聚糖和糖胺聚糖结合，并高度集中于胞外基质内。起初，通过序列同源性或因子纯化和克隆，将 KGF 鉴定为 FGF 家族的成员。角质形成细胞生长因子(KGF)作为经培养的鼠角质形成细胞系的促分裂原被分离(Rubin, J. S.等，美国国家科学院院报，86:802-806(1989))。与 FGF 家族的其它成员不同的是：它对间充质衍生的细胞没什么活性，但可刺激上皮细胞的生长。角质形成细胞生长因子基因编码一种具 194 个氨基酸的多肽(Finch, P. W.等，科学，

245:752-755(1989))。N-末端的 64 个氨基酸是独特的，但该蛋白质的其余部分与 bFGF 约有 30 % 的同源性。KGF 是 FGF 家族中最与众不同的成员。该分子具有疏水性的信号序列并能有效地分泌。翻译后修饰包括信号序列的切割和在一个位点的 N-连接的糖基化，产生了一种 28KDa 的蛋白质。角质形成细胞生长因子由来源于皮肤和胎儿肺的成纤维细胞产生(Rubin 等，(1989))。已发现角质形成细胞生长因子的 mRNA 可在成人肾脏，结肠和髂骨中表达，但不能在脑或肺中表达(Finch, P. W.等，科学， 245:752-755(1989))。KGF 在 FGF 蛋白质家族内呈现出保守区域，KGF 以高亲和力与 FGF-2 受体结合。

创伤愈合受损是重要的发病源，可导致如裂开，吻合崩溃和创伤久治不愈的并发症。在正常的个体中，不难达到愈合创伤的目的。与之形成对照的是，愈合受损与如糖尿病，感染，免疫抑制，肥胖和营养不良的几种疾病有关(Cruse, P. J.和 Foord, R., 外科文献（ Arch. Surg ）， 107:206(1973); Schrock, T. R 等，外科纪事（ Ann. Surg ），177:513(1973); Poole, G. U., Jr., 外科学， 97:631(1985); Irvin, G. L 等，美国外科学， 51:418(1985))。

创伤修复是复杂的相互作用和生物学过程的结果。已描述了正常创伤愈合的 3 个阶段：急性炎症期，胞外基质与胶原的合成，和重建(Peacock, E. E., Jr.,创伤修复，第 2 版， WB Saunders, Philadelphia (1984))。所述过程涉及角质形成细胞，成纤维细胞和炎性细胞在受伤位点的相互作用。

组织再生似乎受特异性肽因子的控制，所述肽因子调节与修复过程有关的细胞的迁移和增殖(Barrett, T. B 等，美国国家科学院院报，81:6772-6774(1985);Collins, T.等，自然， 316:748-750 (1985))，因此，生长因子在治疗创伤，烧伤和其它皮肤病中是有希望的治疗剂(Rifkin, D. B.和 Moscatelli, 细胞生物学杂志， 109:1-6 (1989);Sporn, M. B. 等，细胞生物学杂志， 105:1039-1045(1987); Pierce, G. F.等，细胞生物化学杂志， 45:319-326(1991))。在急性炎症过程中，临时组织的沉积启动了愈合过程的顺序，紧接其后的是上皮重新形成，胶原合成并

沉积，成纤维细胞增殖和新血管形成，它们最终确定了模型重建阶段(Clark, R. A. F, J. Am. Acad. Dermatol， 13:701(1985))。这些事件受生长因子和炎性细胞或位于创伤边缘的细胞所分泌的细胞因子影响(Assoian, R. K 等，自然(Lond.)309:804 (1984);Nemeth, G. G 等，“生长因子及其对创伤和骨折愈合的作用”，生长因子和创伤愈合的其它方面在生物学和临床上的意义，纽约(1988),p1-17)。

已鉴定出几个与创伤愈合有关的多肽生长因子，包括角质形成细胞生长因子(KGF)(Antioniades, H 等，美国国家科学院院报， 88:565 (1991))，衍生于血小板的生长因子(PDGF)(Antioniades, H 等，美国国家科学院院报 ， 88:565(1991);Staiano-Coico, L 等，实验医学杂志，178:865-878(1993))，碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) (Golden, M. A 等，临床研究杂志， 87:406(1991))，酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)(Mellin, T. N 等，临床皮肤病学杂志（ J. Invest. Dermatol ），104: 850-855(1995))，表皮生长因子(EGF)(Whitby, D. J 和 Ferguson, W. J.，发育生物学， 147:207(1991))，转化生长因子-α(TGF-α)(Gartner, M. H 等， Surg. Forum， 42:643(1991);Todd, R 等，美国病理学杂志， 138:1307(1991))，转化生长因子-β(TGF-β)(Wong, D. T. W 等，临床研究杂志， 143:622(1987))， neu 分化因子(rNDF) (Danilenko, D. M 等，临床研究杂志， 95:842-851(1995))，胰岛素样生长因子 I(IGF-I)和胰岛素样生长因子 II(IGF-II)(Cromack, D. T 等，外科研究杂志， 42:622(1987))。

已报道说皮肤中的 rKGF-1 会刺激表皮角质形成细胞，毛囊和皮脂腺内的角质形成细胞(Pierce, G. F 等，实验医学杂志， 179:831-840 (1994))。

发明概述

本发明提供了分离的核酸分子，所述核酸分子含有编码角质形成细胞生长因子(KGF-2)的多核苷酸，该生长因子具有图 1 所示的氨基酸序列[SEQ ID NO:2]或由 1994 年 12 月 16 日保藏的保藏号为 ATCC

75977 的细菌宿主中保藏的 cDNA 克隆编码的氨基酸序列。通过测定经保藏的 KGF-2 克隆的序列确定的核苷酸序列示于图 1[SEQ ID NO:1]，该序列含有编码 208 个氨基酸残基的多肽的一个开放阅读框，其中包括第 1-3 位的起始密码子，预测前导序列约为 35 或 36 个氨基酸残基，推定其分子量约为 23.4 kDa。成熟的 KGF-2 氨基酸序列示于图 1，为约 36 或 37 至 208 位[SEQ ID NO:2]的氨基酸残基。

本发明的多肽被推测鉴定为 FGF 家族的成员，更具体地，由于其氨基酸序列与 FGF 家族其它成员的同源性，将所述多肽推测鉴定为 KGF-2。

根据本发明的一个方面，提供了新的成熟的多肽 KGF-2，及其具有生物活性的、在诊断或治疗上有用的片段，类似物和衍生物。本发明的多肽来源于人。

根据本发明的另一方面，提供了编码人 KGF-2 的分离的核酸分子，包括 mRNA、DNA、cDNA、基因组 DNA 及其反义类似物，以及具有生物活性的、在诊断或治疗上有用的片段。

根据本发明的另一方面，提供了通过重组技术生产这种多肽的方法，所述重组技术为使用重组载体，如在重组生产 KGF-2 蛋白中可用作试剂的克隆和表达质粒，以及含有人 KGF-2 核酸序列的重组原核和/或真核宿主细胞。

根据本发明的另一方面，提供了将这种多肽，或编码这种多肽的多核苷酸用作治疗目的的方法，例如用于刺激上皮细胞增殖和基底的角质形成细胞以使创伤愈合，刺激毛囊产生和皮伤愈合。KGF-2 可临床用于刺激创伤愈合，所述创伤包括外科伤口，切除术的伤口，涉及真皮和表皮损伤的深层创伤，眼组织创伤，牙组织创伤，口腔创伤，糖尿病溃疡，皮肤溃疡，肘溃疡，动脉溃疡，静脉停滞溃疡，因热暴露或化合物引起的灼伤，和其它不正常的创伤愈合疾病，如尿毒症，营养不良，维生素缺乏症和与用类固醇，放射疗法和抗肿瘤药物和抗代谢物全身性治疗相关的并发症。KGF-2 可被用来促进皮损失后的皮重建。

KGF-2 可被用来增加皮肤移植物与创伤床的粘附性，并刺激创伤床处重新形成上皮。下文列出了可使用 KGF-2 增加其与创伤床的粘附性的移植物类型：自体移植物，人工皮肤，同种移植物，自体真皮移植物，自体表皮移植物，无血管移植物， Blair-Brown 移植物，骨移植物，胚胎期形成的移植物，皮肤移植物，延迟的移植物，真皮移植物，表皮移植物，筋膜移植物，全层皮(full thickness)移植片，异源移植物，异种移植物，同种移植物，增生性移植物，角膜薄层移植物，网眼移植物，粘膜移植物， Ollier-Thiersch 移植物，网膜移植物，补片移植物，蒂移植物，全层角膜移植物，分层皮移植片，厚分层皮移植片。可使用 KGF-2 促进皮肤强度并改善老化皮肤的外观。

据信 KGF-2 也可使肝细胞的增殖，和肺、乳房、胰腺、胃、小肠和大肠中的上皮细胞的增殖产生变化。 KGF-2 可促进如皮脂细胞（ sebocyte ），毛囊，肝细胞， II 型肺细胞，产生粘蛋白的杯状细胞的上皮细胞，和其它上皮细胞以及皮肤，肺，肝脏和胃肠道中所含的它们的祖细胞的增殖。 KGF-2 可促进内皮细胞，角质形成细胞和基底的角质形成细胞的增殖。

也可使用 KGF-2 降低由放射，化学疗法治疗或病毒感染引起的肠毒性副作用。 KGF-2 对小肠粘膜具有细胞保护性作用。 KGF-2 也可刺激由化学疗法和病毒感染引起的粘膜炎(口腔溃疡)的愈合。

KGF-2 也可用于对包括烧伤(即毛囊，汗腺和皮脂腺的重新分群)的全部和部分厚度的皮肤缺陷的完全再生，和对如牛皮癣的其它皮肤缺陷的治疗。 KGF-2 通过加速损害部位重新形成上皮也可用于治疗大疱性表皮松解，该病是上皮与其下面的真皮的粘附性缺陷，可导致经常性的、破溃的和疼痛的水疱。 KGF-2 也可用于治疗胃和十二指肠溃疡，并通过在粘膜衬里处形成疤痕和使腺粘膜和十二指肠粘膜衬里更快速地再生而帮助溃疡处愈合。如 Crohn's 病和溃疡性结肠炎的炎性肠疾病分别是导致小肠或大肠粘膜表面被破坏的疾病。因此， KGF-2 也可用于促进粘膜表面重新形成表面，从而有助于更快速地愈合并阻止炎性肠疾病的进程。预期 KGF-2 治疗对整个胃肠道的粘膜产生具有

显著的作用，可用来保护肠粘膜使之远离被摄入的或外科手术后的有害物质。KGF-2 也可用于治疗与 KGF-2 的表达不足有关的疾病。

另外，KGF-2 也可用于预防和治愈因多种病理学状态引起的对肺的损伤。如 KGF-2 这样的生长因子可刺激增殖和分化，并促进肺泡和细支气管上皮的修复以预防或治疗急性或慢性肺损伤。例如，KGF-2 可有效地治疗导致肺泡渐进损失的肺气肿，和由吸烟和烧伤引起的可导致细支气管上皮和肺泡坏死的吸入剂损伤。KGF-2 也可用于刺激 II 型肺细胞的增殖和分化，这有助于治疗或预防如透明膜疾病之类的疾病，所述透明膜疾病如婴儿呼吸窘迫综合征和不成熟幼儿的支气管肺发育不良。

KGF-2 也可刺激肝细胞的增殖和分化，因此，KGF-2 可用来缓解或治疗肝脏疾病和如由肝硬变引起的暴发性肝脏疾病，由病毒性肝炎和毒性物质(即扑热息痛，四氯化碳和现有技术中已知的肝毒素)引起的肝损害的病理学。

另外，KGF-2 也可用于治疗或预防糖尿病的发作。在最近被诊断为 I 型和 II 型糖尿病，仍维持有一些胰岛细胞功能的病人中，可使用 KGF-2 维持胰岛功能以缓解，延迟或防止疾病的永久现象。KGF-2 也可被用作胰岛细胞移植过程中的辅助物以改善或促进胰岛细胞的功能。

根据本发明的另一方面，提供了抗这种多肽的抗体。

根据本发明的另一方面，提供了核酸探针，所述探针含有足够长以与人 KGF-2 序列特异性杂交的核酸分子。

根据本发明的另一方面，提供了可用作治疗肽的 KGF-2 模拟肽，模拟的 KGF-2 肽是一些通过结合和激活 KGF-2 的同源受体从而模拟 KGF-2 蛋白生物活性的短肽。模拟的 KGF-2 肽也可结合并抑制 KGF-2 的同源受体。

根据本发明的另一方面，提供了这种多肽的拮抗剂，使用所述拮抗剂可抑制这种多肽的作用，例如减少创伤愈合过程中的疤痕和预防和/或治疗肿瘤增殖，糖尿病性视网膜病，类风湿性关节炎，骨关节炎

和肿瘤生长。也可使用 KGF-2 拮抗剂治疗与 KGF-2 过量表达有关的疾病。

根据本发明的另一方面，提供了用于检测与 KGF-2 核酸序列中的突变或由这种序列编码的多肽的过量表达相关的疾病或对所述疾病的易感性的诊断试验。

根据本发明的另一方面，提供了将这种多肽，或编码这种多肽的多核苷酸用于与科学研究，DNA 合成和 DNA 载体的制备相关的体外目的的方法。

因此，本发明一方面提供了一种分离的核酸分子，所述核酸分子含有具有选自下列的一种核苷酸序列的多核苷酸：(a)编码具有图 1 完整的氨基酸序列[SEQ ID NO:2]的 KGF-2 多肽的核苷酸序列；(b)编码具有图 1 第 36 或 37 至 208 位的氨基酸序列[SEQ ID NO:2]的成熟 KGF-2 多肽的核苷酸序列；(c)编码具有由 ATCC 保藏号 75977 中所含 cDNA 克隆编码的完整氨基酸序列的 KGF-2 多肽的核苷酸序列；(d)编码具有由 ATCC 保藏号 75977 中所含 cDNA 克隆编码的氨基酸序列的成熟 KGF-2 多肽的核苷酸序列；和(e)与上述(a),(b),(c)或(d)中任一个核苷酸序列互补的核苷酸序列。

本发明的其它实施方案包括分离的核酸分子，所述核酸分子含有具有与上述(a),(b),(c),(d)或(e)中任一个核苷酸序列至少 90 %相同，更优选至少 95 %，97 %，98 %或 99 %相同的核苷酸序列的多核苷酸，或在严紧杂交条件下能与上述(a),(b),(c),(d)或(e)中的多核苷酸杂交的多核苷酸。杂交的此多核苷酸在严紧杂交条件下不与具有仅由 A 残基或仅由 T 残基组成的核苷酸序列的多核苷酸杂交。本发明其它的核酸实施方案涉及分离的核酸分子，所述核酸分子含有编码具有上述(a),(b),(c)或(d)中一种氨基酸序列的 KGF-2 的携有表位的部分的氨基酸序列的多核苷酸。

本发明另外提供了分离的 KGF-2 多肽，所述多肽具有选自下列的氨基酸序列：(a)具有图 1 所示的完整的 208 个氨基酸的序列，包括前导序列的 KGF-2 多肽的氨基酸序列[SEQ ID NO:2]；(b)具有图 1 第 36

或 37 至 208 位氨基酸序列的成熟 KGF-2 多肽的氨基酸序列[SEQ ID NO:2] (不具有前导序列); (c)具有由 ATCC 保藏号 75977 中所含 cDNA 克隆编码的完整氨基酸序列，包括前导序列的 KGF-2 多肽的氨基酸序列; 和(d)具有由 ATCC 保藏号 75977 中所含 cDNA 克隆编码的氨基酸序列的成熟 KGF-2 多肽的氨基酸序列。本发明的多肽也包括具有与上述(a),(b), (c)或(d)中所述氨基酸序列至少 90 % 相似，更优选至少 95 % 相似的氨基酸序列的多肽，以及具有与上述氨基酸序列至少 80 % 相同，更优选至少 90 % 相同，还要更优选 95 %， 97 %， 98 % 或 99 % 相同的氨基酸序列的多肽。

本发明的另一发明涉及具有 KGF-2 多肽的携有表位的部分的氨基酸序列的肽或多肽，所述 KGF-2 多肽具有上述(a),(b),(c)或(d)中的氨基酸序列。尽管本发明中也包括长度直至和包含上述本发明多肽的整个氨基酸序列的任何长度的携有表位的多肽，但具有本发明 KGF-2 多肽的携有表位的部分的氨基酸序列的肽或多肽包括具有至少 6 或 7 个，优选至少 9 个，更优选至少约 30 个氨基酸至约 50 个氨基酸的这类多肽的部分。在另一个实施方案中，本发明提供了与具有上述(a),(b), (c)或(d)中的氨基酸序列的 KGF-2 多肽特异性结合的分离的抗体。

根据本发明的另一方面，描述了 KGF-2 的新的变体。通过缺失或取代 KGF-2 的一个或多个氨基酸可产生这些变体。天然的突变被称为等位基因变异。等位基因变异可以是沉默的(经编码的多肽没有变化), 或可具有经改变的氨基酸序列。为了尝试改善或改变天然 KGF-2 的特征，可利用蛋白质工程。可使用本领域中已知的重组 DNA 技术产生新的多肽，突变蛋白和缺失突变体可显示例如增强的活性或增加的稳定性。另外，可以较高的得率纯化它们，至少在某些纯化和储存条件下，它们显示出较好的溶解性。

鉴于本文的教导，本发明的这些和其它方面对本领域的技术人员而言将是显而易见的。

图的简述

下述诸图阐明了本发明的实施方案，但并不意味着限制权利要求书中所包含的本发明的范围。

图 1A-1C 阐明了本发明多肽的 cDNA 和相应的推定的氨基酸序列。起初的 35 或 36 个氨基酸残基表示推定的前导序列(下划线的)。使用了针对氨基酸的标准的单字母缩写。当尝试测定多核苷酸序列时，测序的不准确性是常见的难题。使用 373 型自动化 DNA 测序仪(Applied Biosystems 公司)进行测序，预测测序的准确性大于 97 % 准确度[SEQ ID NO:1]。

图 2A-2D 阐明了本发明多肽和其它成纤维细胞生长因子的氨基酸序列的比较[SEQ ID NO:13-22]。

图 3A-3D 显示了 KGF-2 基因的全长 mRNA 和氨基酸序列[SEQ ID NO:23 和 24]。

图 4A-4E 显示了 KGF-2 氨基酸序列的分析，显示出α，β，转角和卷曲区；亲水性和疏水性；两亲性区域；柔性区域；抗原性指数和表面概率。在“抗原性指数-Jameson-Wolf ”图中，图 1 中的氨基酸残基 41-109 对应于 KGF-2 蛋白显示出高度抗原性的区域。疏水性区域(Hopp-Woods 作图)落在中位值线的下方(负值)，而发现亲水性区域(Kyte-Doolittle 作图)位于中位值线的上方(正值，如氨基酸残基 41-109)。作图针对的是全部 208 个氨基酸的 ORF 。

图 5 显示出有关 KGF-2 对糖尿病小鼠伤口闭合之作用的评价。受伤后立即测量创伤，并在连续 5 天中的每一天和第 8 天也测量创伤，使用下列公式来计算伤口闭合的百分比：[第 1 天的面积]-[第 8 天的面积]/[第 1 天的面积]。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /- SEM， n = 5)。

图 6 显示出有关 KGF-2 对非糖尿病小鼠伤口闭合之作用的评价。受伤后立即测量创伤，并在连续 5 天中的每一天和第 8 天也测量创伤，使用下列公式计算伤口闭合的百分比：[第 1 天的面积]-[第 8 天的面积]/[第 1 天的面积]。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /- SEM， n = 5)。

图 7 显示出糖尿病小鼠伤口闭合的时间进程。受伤后立即测量创伤，并在连续 5 天中的每一天和第 8 天测量创伤，数值表示为总面积(mm^2)。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM， n = 5)。

图 8 显示出非糖尿病小鼠伤口闭合的时间进程。受伤后立即测量创伤，并在连续 5 天中的每一天和第 8 天也测量创伤，数值表示为总面积(mm^2)。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM， n = 5)。

图 9 显示出有关 KGF-2 对糖尿病小鼠的组织病理学评价。评分由盲观测者给出，使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM，n = 5)。

图 10 显示出有关 KGF-2 对非糖尿病小鼠的组织病理学评价，评分由盲观测者给出，使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM， n = 5)。

图 11 显示出角质形成细胞生长对糖尿病小鼠的作用。评分由盲观测者给出。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM， n = 5)。

图 12 显示出角质形成细胞生长对非糖尿病小鼠的作用。评分由盲观测者给出。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM， n = 5)。

图 13 显示出皮肤增殖对糖尿病小鼠的作用。评分由盲观测者给出，使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM， n = 5)。

图 14 显示出皮肤增殖对非糖尿病小鼠的作用。评分由盲观测者给出。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM， n = 5)。

图 15 显示出 DNA 序列和由 pQE60-Cys37 构建体表达的蛋白质。表达的 KGF-2 蛋白含有从第 37 位的半胱氨酸至第 208 位丝氨酸的序列，所述蛋白质的 N 末端结合有 6X(His)标记物。

图 16 显示出甲基氢化泼尼松对大鼠伤口愈合的作用。在受伤的当天用 5mg 甲基氢化泼尼松注射雄性 SD 成年大鼠(n = 5)。动物接受皮穿孔创伤(8mm)，连续 5 天每天用缓冲溶液或溶于 50 微升缓冲溶液中

的 KGF-2 溶液治疗上述大鼠。在第 1-5 天的每天和第 8 天用经校准的 Jameson 测径器测量伤口，数值表示为第 8 天测量的结果(平均值 + /-SEM)。

图 17 显示出 KGF-2 对伤口闭合的作用。雄性 SD 成年大鼠(n = 5) 接受皮穿孔创伤(8mm)，并在受伤的当天接受 5mg 甲基氢化泼尼松注射。从受伤当天开始，连续 5 天每天用缓冲溶液或溶于 50 微升缓冲溶液中的 KGF-2 溶液治疗上述动物。在第 1-5 天的每天和第 8 天测量伤口，使用下列公式来计算伤口闭合：[第 8 天的面积]-[第 1 天的面积]/[第 1 天的面积]。第 1 天的面积测定为 64mm^2，此面积由皮穿孔造成。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM)。

图 18 显示出创伤愈合的糖皮质激素损伤模型中创伤愈合的时间进程。雄性 SD 成年大鼠(n = 5)在第 1 天接受皮穿孔创伤(8mm)，并连续 5 天每天用缓冲溶液或溶于 50 微升缓冲溶液中的 KGF-2 溶液治疗上述动物。动物在受伤当天接受了 5mg 甲基氢化泼尼松注射。从受伤当天开始，在第 1-5 天的每天和第 8 天用经校准的 Jameson 测径器测量伤口。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM)。

图 19(A)显示出受伤后第 5 天未用甲基氢化泼尼松注射的创伤愈合大鼠模型中 KGF-2 对伤口面积的作用。雄性 SD 成年大鼠(n = 5)在第 1 天接受了皮穿孔创伤(8mm)，并在受伤当天和其后连续 5 天每天用缓冲溶液或溶于 50 微升缓冲溶液中的 KGF-2 溶液治疗上述动物。每天用经校准的 Jameson 测径器测量伤口，使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM)。(B)PDGF-BB 和 KGF-2 在雄性 SD 大鼠(n = 6)中的评分。所有大鼠接受了 8mm 的背部伤口和甲基氢化泼尼松(MP)(17mg /kg)来损害创伤愈合。每天用缓冲液或多种浓度的 PDGF-BB 和 KGF-2 治疗伤口。在第 2， 4， 6， 8 和 10 天使用经校准的 Jameson 测径器测量伤口。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM)。*与缓冲液比较。** 1 微克 PDGF-BB 对 1 微克 KGF-2/E3 。

图 20 显示出在经糖皮质激素损伤的创伤愈合模型中 KGF-2 对伤口距离的作用。雄性 SD 成年大鼠(n = 5)接受了皮穿孔创伤(8mm)，

并在受伤当天接受了 17mg/kg 甲基氢化泼尼松。在其后连续 5 天的每天和第 8 天用缓冲溶液或溶于 50 微升缓冲溶液中的 KGF-2 溶液治疗上述动物。在光学显微镜下用经校准的测微计测量伤口距离。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SEM)。

图 21(A)显示了 KGF-2 对正常的原发性表皮角质形成细胞增殖的刺激。(B)显示了 KGF-2 Δ33 对正常的原发性表皮角质形成细胞增殖的刺激。(C)显示了 KGF-2 Δ28 对正常的原发性表皮角质形成细胞增殖的刺激。将正常的人原发性表皮角质形成细胞与多种浓度的 KGF-2，KGF-2 Δ33 或 KGF-2 Δ28 一起保温 3 天，然后对所有 3 个实验加入 alamarBlue 16 小时，通过 $O.D._{570nm}$ 和 $O.D._{600nm}$ 之间的差异测定细胞由 alamarBlue 转变成的红色的强度。对于每种 KGF-2 蛋白而言，在相同的检测板中包括含有完全的角质形成细胞生长培养基(KGM)的阳性对照，和含有角质形成细胞基础培养基(KBM)的阴性对照。

图 22(A)显示了被 FGFR1b 和 FGFR2 转染的 Baf3 细胞中 KGF-2 和 FGF7 对胸苷掺入的刺激作用。测定了 KGF-2(右边的组)和 FGF7(左边的组)对被 FGFR1iiib(空心圆圈)或 FGFR2iiib/KGFR(实心圆圈)转染的 Baf3 细胞增殖的作用。Y 轴表示掺入 Baf3 细胞 DNA 中的[3H]胸苷的量(cpm)，X 轴表示在组织培养基中加入的 KGF-2 或 FGF7 的终浓度。(B)显示了被 FGFR2iiib 转染的 Baf3 细胞中 KGF-2 Δ33 对胸苷掺入的刺激作用。(C)显示了被 FGFR2iiib 转染的 Baf3 细胞中 KGF-2(白线)，KGF-2Δ33(黑线)和 KGF-2Δ28(灰线)对胸苷掺入的刺激作用。

图 23 显示了大肠杆菌最优化的全长 KGF-2 的 DNA 和蛋白质序列。

图 24A 和 B 显示了大肠杆菌最优化的成熟 KGF-2 的 DNA 和蛋白质序列。

图 25 显示了含有 KGF-2 氨基酸 36 至 208 位的 KGF-2 缺失构建体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 26 显示了含有 KGF-2 氨基酸 63 至 208 位的 KGF-2 缺失构建

体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 27 显示了含有 KGF-2 氨基酸 77 至 208 位的 KGF-2 缺失构建体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 28 显示了含有 KGF-2 氨基酸 93 至 208 位的 KGF-2 缺失构建体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 29 显示了含有 KGF-2 氨基酸 104 至 208 位的 KGF-2 缺失构建体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 30 显示了含有 KGF-2 氨基酸 123 至 208 位的 KGF-2 缺失构建体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 31 显示了含有 KGF-2 氨基酸 138 至 208 位的 KGF-2 缺失构建体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 32 显示了含有 KGF-2 氨基酸 36 至 153 位的 KGF-2 缺失构建体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 33 显示了含有 KGF-2 氨基酸 63 至 153 位的 KGF-2 缺失构建体的 DNA 和被编码的蛋白质序列。

图 34 显示了 KGF-2 半胱氨酸-37 至丝氨酸的突变体构建体的 DNA 序列。

图 35 显示了 KGF-2 半胱氨酸-37/半胱氨酸-106 至丝氨酸的突变体构建体的 DNA 序列。

图 36 显示了雄性 SD 大鼠(n = 5) 中 KGF-2 Δ33 对创伤愈合之作用的评价。动物接受了 6mm 的背部创伤，并连续 4 天用多种浓度的缓冲液，或 KGF-2 Δ33 治疗上述动物。每天使用经校准的 Jameson 测径器测量伤口。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SE)。*与缓冲液比较。

图 37 显示了正常大鼠中 KGF-2 Δ33 对创伤愈合之作用的评价。雄性， SD， 250-300g，大鼠(n = 5)接受了 6mm 的全层皮背部创伤。用测径器测量伤口，并从手术当天开始连续 4 天用多种浓度的 KGF-2 Δ33 和缓冲液处理伤口，最后一天收获伤口。使用非成对 t 试验进行统计学分析。*将测量值与未治疗的对照比较。# 将测量值与缓冲液对照

比较。

图 38 显示了 KGF-2 Δ33 对切口创伤抗断强度的作用。雄性成年 SD 大鼠(n = 10)在第 1 天接受了 2.5cm 的全层皮切口创伤，受伤后用缓冲液或 KGF-2(Δ33)(1,4 和 10 微克)之一处理切口内部。在第 5 天处死动物，切下 0.5cm 的伤口样品以进行常规的组织学和抗断强度分析。横跨伤口施加外力，使用 Instron 皮肤张力计进行生物力学试验，抗断强度（ breaking strength ）被定义为破裂前受每个伤口抑制的最大外力。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SE)。

图 39 显示了 KGF-2(Δ33)对切口创伤表皮厚度的影响。雄性成年 SD 大鼠(n = 10)在第 1 天接受了 2.5cm 的全层皮切口创伤，受伤后用缓冲液或 KGF-2(Δ33)(1,4 和 10 微克)之一处理切口内部。在第 5 天处死动物，切下 0.5cm 的伤口样品以进行常规的组织学和抗断强度分析。通过取受伤位点周围的 6 次测量结果的平均值确定表皮厚度，诸测量结果是由盲观测者在使用经校准的透镜测微器的光学显微镜下观测经 Masson Trichrome 染色的切片得到的。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SE)。

图 40 显示了单次皮内注射后 KGF-2(Δ33)对表皮厚度的影响。雄性成年 SD 大鼠(n = 18)在第 0 天接受了用缓冲液或溶于 50 微升的缓冲液中的 1 和 4 微克 KGF-2 的 6 次皮内注射。注射后 24 和 48 小时处死动物，测量由颗粒状层至基层底部的表皮厚度。沿着注射位点测量大约 20 次，计算出平均厚度。诸测量结果是使用经校准的透镜测径器在光学显微镜下观测经 Masson Trichrome 染色的切片得到的。使用非成对 t 试验进行统计学分析(平均值 + /-SE)。

图 41 显示了 KGF-2(Δ33)对 BrdU 评分的影响。雄性成年 SD 大鼠(n = 18)在第 0 天接受了安慰剂或溶于 50 微升的浓度为 1 和 4 微克 KGF-2 的 6 次皮内注射。注射后 24 和 48 小时处死动物。处死前 2 小时用 5-2'-溴脱氧尿苷(100mg/kg 腹膜内)注射动物。盲观测者在光学显微镜下使用下列评分系统作出评分：0-3 没有标记或被 BrdU 标记很少的细胞；4-6 中度标记的细胞；7-10 强标记的细胞。使用非成对 t 试

验进行统计学分析(平均值 + /-SE)。

图 42 显示了 KGF-2 对 PAF-诱导的爪子水肿的抗炎症作用。

图 43 显示了 Lewis 大鼠中 KGF-2 Δ33 对 PAF-诱导的爪子水肿的抗炎症作用。

图 44 显示了 KGF-2 Δ33 对全身被辐照的 Balb/c 小鼠存活的影响。用 519 RADS 辐照 Balb/c 雄性小鼠(n = 5), 22.1g。在照射前的 2 天里和照射后连续 7 天中的每一天用缓冲液或 KGF-2(1 和 5mg/kg，皮下)治疗动物。

图 45 显示了 KGF-2 Δ33 对被辐照小鼠的体重的影响。在用 519 Rad/min 照射前的 2 天里用缓冲液或 KGF-2 Δ33 (1 和 5mg/kg)注射体重为 22.1g 的 Balb/c 雄性小鼠(n = 5), 每天给动物称重，并在辐照后连续注射 7 天。

图 46 显示了 KGF-2 Δ33 对全身被辐照的 Balb/c 小鼠存活率的影响。用 519 RADS 照射 Balb/c 雄性小鼠(n = 7), 22.1g。在照射前的 2 天里和照射后连续 7 天中的每一天用缓冲液或 KGF-2(1 和 5mg/kg，皮下)治疗动物。

图 47 显示了在糖皮质激素损伤的大鼠模型中 KGF-2 Δ33 对创伤愈合的效果。

图 48 显示了使用 BrdU 标记测定时 KGF-2 Δ33 对细胞增殖的影响。

图 49 显示了 KGF-2 Δ33 对位于大鼠结肠的吻合外科手术位点处的胶原含量的影响。

详细描述

根据本发明的一方面，提供了分离的核酸(多核苷酸)，所述核酸编码具有图 1 推定的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的多肽，或由 1994 年 12 月 16 日保藏于美国典型培养物保藏中心， 12301 Park Lawn Drive，Rockville， Maryland 20852 的 ATCC 保藏号为 75977 的克隆的 cDNA 编码的多肽。

核酸分子

除非另有说明，使用自动化DNA测序仪(如373型，可得自Applied Biosystems公司)测定通过测定本文DNA分子的序列确定的所有核苷酸序列，通过翻译如上测定的DNA序列推测由本文测定的DNA分子编码的多肽的所有氨基酸序列。因此，正如本领域技术人员对由这种自动化方法测定的任何DNA序列已知的那样，本文测定的任何核苷酸序列都可能含有一些错误。由自动化方法测定的核苷酸序列与被测序DNA分子的实际核苷酸序列至少约90％相同，更通常为至少约95％至至少约99.9％相同。通过其它方法，包括本领域中众所周知的人工DNA测序法，可更准确地测定实际的序列。现有技术中已知：与实际序列相比，被测定的核苷酸序列中的单个插入或缺失会导致该核苷酸序列翻译过程中的移码现象，从而使从所述插入或缺失点开始，由被测定的核苷酸序列编码的推测的氨基酸序列会与被测序的DNA分子实际编码的氨基酸序列完全不同。

除非另有说明，本文列出的每个“核苷酸序列”以脱氧核糖核苷酸(缩写为A,G,C和T)的序列表示。然而，核酸分子或多核苷酸的“核苷酸序列”对于DNA分子或多核苷酸而言为脱氧核糖核苷酸的序列，对于RNA分子或多核苷酸而言为相应的核糖核苷酸(A,G,C和U)序列，其中特定的脱氧核糖核苷酸序列中的每个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸(T)被尿嘧啶核糖核苷酸(U)所代替。例如，关于具有使用脱氧核糖核苷酸缩写列出的SEQ ID NO:1之序列的RNA分子，想表示的是其序列中SEQ ID NO:1的每个脱氧核糖核苷酸A,G或C已被相应的核糖核苷酸A,G或C代替，而每个脱氧核糖核苷酸T已被核糖核苷酸U所代替的RNA分子。

“分离的”核酸分子指的是从其天然环境中得到的核酸分子，DNA或RNA。例如，为了本发明的目的，载体中所含的重组DNA分子被认为是分离的。分离的DNA分子的其它例子包括异源宿主细胞中所含的重组DNA分子或溶液中纯化的(部分纯化或基本上纯化)DNA分子。分离的RNA分子包括本发明DNA分子的体内或体外RNA转

录本。本发明的分离的核酸分子另外还包括合成产生的这种分子。

本发明的分离的核酸分子包括含有具有图 1 所示核苷酸序列(SEQ ID NO:1)第 1-3 位起始密码子的开放阅读框(ORF)的 DNA 分子；含有图 1 所示的成熟 KGF-2 蛋白(最后的 172 或 173 个氨基酸)(SEQ ID NO:2)之编码序列的 DNA 分子；和含有实质上与上述不同的序列但因遗传密码的简并性仍编码 KGF-2 蛋白的 DNA 分子。当然，遗传密码是本领域中众所周知的，因此，本领域技术人员可常规制备上述简并变体。

编码本发明多肽的多核苷酸可以得自人前列腺和胎儿肺。编码多肽的 cDNA 片段最初分离自得自人正常前列腺的文库，随后，从随机引发的人胎儿肺 cDNA 文库中分离编码全长蛋白质的开放阅读框。所述阅读框在结构上与 FGF 家族相关，它含有编码 208 个氨基酸残基之蛋白质的开放阅读框，其中大约前 35 或 36 个氨基酸残基是推定的前导序列以使成熟的蛋白质含有 173 或 172 个氨基酸。该蛋白质表现出与人角质形成细胞生长因子最高程度的同源性，在 206 个氨基酸的一段序列中具有 45 % 的同一性和 82 % 的相似性。已发现在 FGF 整个家族中保守的序列在本发明的蛋白质中也是保守的，这一点也很重要。

另外，得自文库的 KGF-2 cDNA 的嵌套式 PCR 结果表明 KGF-2 也存在潜在的其它剪接形式。具体地说，使用侧翼于 KGF-2 开放阅读框之 N 末端的引物，由多个 cDNA 文库得到 0.2kb 和 0.4kb 的 PCR 产物。 0.2kb 大小是预期的 KGF-2 产物，而 0.4kb 大小可能是 KGF-2 的其它剪接形式。在得自胃癌，成人睾丸，十二指肠和胰腺的文库中观察到了这一 0.4kb 产物。

本发明的多核苷酸可以是 RNA 的形式，也可以是 DNA 的形式，所述 DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 和合成的 DNA。该 DNA 可以是双链或单链，而若是单链，则可以是编码链，也可以是非编码(反义)链。编码成熟多肽的编码序列可以与图 1 所示的编码序列(SEQ ID NO:1)或经保藏的克隆中的编码序列相同；或者也可以是不同的编码序列，这一编码序列因遗传密码的丰余性或简并性而编码与图 1 之

DNA(SEQ ID NO:1)或经保藏的 cDNA 所编码的相同的成熟多肽。

编码图 1 推测的成熟多肽(SEQ ID NO:2)或由经保藏的 cDNA 所编码的推测的成熟多肽的多核苷酸可包括：仅有成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和其它编码序列如前导序列或分泌序列或原蛋白质序列；成熟多肽的编码序列(和任选的其它编码序列)和非编码序列如内含子或推测的成熟多肽之编码序列的 5'和/或 3'非编码序列。另外，已得到全长的 mRNA，它含有该基因的 5'和 3'非翻译区(图 3)。

由于上文讨论的测序错误概率以及针对不同的已知蛋白质中前导序列的切割位点的可变异性，本领域技术人员会期望由经保藏的 cDNA 所编码的真正的 KGF-2 多肽含有约 208 个氨基酸，但可以是 200-220 个氨基酸范围内的任何一种情况；此蛋白质的实际前导序列约为 35 或 36 个氨基酸，但可以是 30-40 个氨基酸范围内的任何一种情况。

因此，术语“编码多肽的多核苷酸”包括仅包含多肽编码序列的多核苷酸以及包含另外的编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明另外涉及上文所述多核苷酸的变体，所述多核苷酸变体编码具有图 1 推定的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)之多肽或由经保藏克隆的 cDNA 编码的多肽的片段、类似物和衍生物。所述多核苷酸的变体可以是该多核苷酸天然产生的等位基因变体或该多核苷酸非天然产生的变体。

因此，本发明包括编码与图 1(SEQ ID NO:2)所示相同的推测成熟多肽或与经保藏克隆的 cDNA 所编码的相同的推测成熟多肽的多核苷酸，以及这种多核苷酸的变体，所述变体编码图 1(SEQ ID NO:2)所示多肽或由经保藏克隆的 cDNA 所编码多肽的片段、衍生物或类似物。这种核苷酸变体包括缺失变体、取代变体和添加或插入变体。

本发明包括编码可用作治疗肽的 KGF-2 模拟肽的多核苷酸。模拟的 KGF-2 肽是一些短肽，它们能够通过结合和激活 KGF-2 的相关受体来模拟 KGF-2 蛋白的生物活性。模拟的 KGF-2 肽也可以结合并抑制 KGF-2 的相关受体。 KGF-2 受体包括但不限于 FGFR2iiib 和 FGFR1iiib 。这种模拟肽可得自诸如，但不限于噬菌体展示或组合化

学的方法。例如，Wrighton 等，科学，273:458-463(1996)所述的产生模拟的 KGF-2 肽的方法。

如上所述，多核苷酸具有的编码序列可以是图 1 所示编码序列(SEQ ID NO:1)或经保藏克隆之编码序列的天然产生的等位基因变体。正如本领域中所熟知，等位基因变体是多核苷酸序列的一种可替换形式，它可具有一个或多个核苷酸的取代，缺失或添加，但基本上不会改变编码多肽的功能。

本发明也包括多核苷酸，其中成熟多肽的编码序列可以在相同的阅读框中与有助于宿主细胞表达和分泌多肽的多核苷酸序列（例如作为分泌序列行使功能以控制从细胞中转运出多肽的前导序列）融合。具有前导序列的多肽是前蛋白，它可能具有可被宿主细胞切割从而形成多肽的成熟形式的前导序列。该多核苷酸也可以编码蛋白原，所述蛋白原是成熟的蛋白质加上额外的 5'氨基酸残基。具有原序列的成熟蛋白质是蛋白原，它是蛋白质的无活性形式。一旦原序列被切割掉，剩下的就是有活性的成熟蛋白质。

因此，例如，本发明的多核苷酸可以编码成熟的蛋白质，或具有原序列的蛋白质，或既具有原序列也具有前序列(前导序列)的蛋白质。

本发明的多核苷酸也可以具有在框内与一种标记序列融合的编码序列，所述标记序列可用于纯化本发明的多肽。在宿主为细菌的情况下，该标记序列可以是由 pQE-9 载体提供的六组氨酸标记物以纯化与标记序列融合的成熟多肽，或例如，当使用哺乳动物宿主，如 COS-7 细胞时，标记序列也可以是血凝素(HA)标记物。HA 标记物相当于得自流感病毒血凝素蛋白的表位(Wilson, I 等，细胞，37:767(1984))。

术语“基因”指的是参与产生多肽链的 DNA 区段；它包括编码区之前和之后的区域(前导序列和尾随序列)以及各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

本发明全长基因的片段可被用作 cDNA 文库的杂交探针以分离全长的 cDNA 和分离与该基因具有高度序列相似性或相似的生物活性的其它 cDNA。这种类型的探针优选具有至少 30 个碱基，并可含有例如

50 个或更多个碱基。所述探针可被用于鉴定对应于全长转录本的 cDNA 克隆和含有包括调节和启动子区域、外显子和内含子的完整基因的基因组克隆。筛选的例子包括通过使用已知的 DNA 序列合成寡核苷酸探针以分离该基因的编码区。使用具有与本发明基因互补的序列的经标记的寡核苷酸筛选人 cDNA、基因组 DNA 或 cDNA 文库以确定该探针与文库的哪个成员杂交。

本发明的其它实施方案包括分离的核酸分子，所述核酸分子含有的多核苷酸具有与(a)编码具有图 1(SEQ ID NO:2)完整的氨基酸序列（包括推测的前导序列）的全长 KGF-2 多肽的一个核苷酸序列；(b)编码具有图 1(SEQ ID NO:2)中约第 36 或 37 至 208 位氨基酸序列的成熟 KGF-2 多肽(除去前导序列的全长多肽)的一个核苷酸序列；(c)编码具有由 ATCC 保藏号 75977 中所含 cDNA 克隆编码的完整氨基酸序列（包括前导序列）的全长 KGF-2 多肽的一个核苷酸序列；(d)编码具有由 ATCC 保藏号 75977 中所含 cDNA 克隆编码的氨基酸序列的成熟 KGF-2 多肽的一个核苷酸序列；(e)编码上述任一种 KGF-2 类似物或缺失突变体的一个核苷酸序列；或(f)与(a),(b),(c), (d)或(e)中任一个核苷酸序列互补的一个核苷酸序列至少 90 %相同，更优选至少 95 %，96 %， 97 %， 98 %或 99 %相同的核苷酸序列。

具有与参照的编码 KGF-2 多肽的核苷酸序列至少，例如 95 %“相同”的核苷酸序列的多核苷酸指的是除了该多核苷酸序列在参照的编码 KGF-2 多肽的核苷酸序列的每 100 个核苷酸中可包括多至 5 个点突变外，多核苷酸的核苷酸序列与参照序列是相同的。换句话说，为了得到具有与参照的核苷酸序列至少 95 %相同的核苷酸序列的多核苷酸，参照序列中多至 5 %的核苷酸可缺失或被另一种核苷酸取代，或者多至参照序列之总核苷酸的 5 %的大量核苷酸可插入参照序列中。参照序列的这些突变可在参照核苷酸序列的 5’或 3’末端位置发生，也可以在这些末端位置之间的任何地方发生，它们各自散布在参照序列的核苷酸中，或以一个或多个邻接组的形式散布在参照序列内。

实际操作过程中，使用已知的计算机程序，如 Bestfit 程序(威斯康

星序列分析程序包， Unix 第 8 版， Genetics Computer Group， University Research Park， 575 Science Drive， Madison， WI53711)可常规确定是否任何特定的核酸分子与例如，图 1 所示的核苷酸序列或经保藏的 cDNA 克隆的核苷酸序列至少 90 %， 95 %， 96 %， 97 %， 98 %或 99 %相同。 Bestfit 使用 Smith 和 Waterson，应用数学进展（ *Advances in Applied Mathematics* ）， 2:482-489(1981)的局部同源性算法规则来找出两个序列之间同源性最好的区段。当使用 Bestfit 或任何其它序列排列程序来确定特定的序列是否与，例如根据本发明的参照序列 95 %相同时，参数的设置当然应使得是对参照核苷酸序列的全长计算同一性百分比，并且允许存在达参照序列总核苷酸数目 5 %的同源性缺口。

本申请涉及与图 1[SEQ ID NO:1]所示核酸序列或经保藏 cDNA 的核酸序列至少 90 %， 95 %， 96 %， 97 %， 98 %或 99 %相同的核酸分子，而不论它们是否编码具有 KGF-2 活性的多肽。这是因为甚至当一种特定的核酸分子不编码具有 KGF-2 活性的多肽时，本领域技术人员仍知道如何将该核酸分子用作例如杂交探针或聚合酶链反应(PCR)的引物。不编码具有 KGF-2 活性的多肽的本发明核酸分子的用途特别地包括：(1)分离 cDNA 文库中的 KGF-2 基因或其等位基因变体；(2)与中期染色体的伸展物原位杂交(如“ FISH ”)以提供 KGF-2 基因精确的染色体定位，例见 Verma 等，人类染色体：基础技术手册，Pergamon 出版社，纽约(1988)；和 Northern 印迹分析以检测特定组织中的 KGF-2 mRNA 表达。

然而，优选的是具有与图 1[SEQ ID NO:1]所示核酸序列或经保藏 cDNA 的核酸序列至少 90 %， 95 %， 96 %， 97 %， 98 %或 99 %相同的序列的核酸分子，所述核酸分子实际上可编码具有 KGF-2 蛋白活性的多肽。“具有 KGF-2 活性的多肽”指的是经特殊的生物学试验测定，表现出与本发明野生型 KGF-2 蛋白的活性相似，但不必相同的活性，或与野生型 KGF-2 蛋白(全长蛋白质或，优选为成熟的蛋白质)相比有所增强的活性的多肽。

例如，下文实施例 10 和 11 中公开了 KGF-2 活性的检测方法。使用这些检测方法可测定部分纯化的或纯化的天然或重组蛋白质的 KGF-2 活性。

KGF-2 可刺激表皮角质形成细胞而不是如成纤维细胞之类的间充质细胞的增殖。因此，“具有 KGF-2 蛋白活性的多肽”包括在实施例 10 所述的角质形成细胞增殖试验中表现出 KGF-2 活性，并能与 FGF 受体同工型 1-iiib 和 2-iiib 结合(实施例 11)的多肽。尽管活性水平不必与 KGF-2 蛋白的相同，但优选“具有 KGF-2 蛋白活性的多肽”表现出与 KGF-2 蛋白基本相似的活性(即候选多肽相对于参照的 KGF-2 蛋白而言表现出较高的活性，或不高于 10 倍，优选不高于 2 倍的活性)。

当然，由于遗传密码的简并性，本领域技术人员可立即认识到具有与经保藏的 cDNA 的核酸序列或图 1[SEQ ID NO;1]所示核酸序列至少 90 %， 95 %， 96 %， 97 %， 98 %或 99 %相同的序列的大量核酸分子可编码“具有 KGF-2 蛋白活性”的多肽。实际上，由于这些核苷酸序列的简并性变体都编码相同的多肽，因此本领域技术人员甚至无需进行上述的比较试验即可明了这一点。本领域技术人员还会意识到，对于这种不是简并变体的核酸分子而言，相当数目也编码具有 KGF-2 蛋白活性的多肽。这是因为熟练的技术人员完全能掌握不大可能或不可能显著影响蛋白质功能的氨基酸取代(如一个脂肪族氨基酸被另一个脂肪族氨基酸取代)。

例如，有关如何进行表型沉默的氨基酸取代的指导例见： Bowie, J. U 等，“译解蛋白质序列中的信息：对氨基酸取代的耐受”，科学，247: 1306-1310(1990)，其中作者指出了研究氨基酸序列对变化的耐受性有两种主要的方法。第一种方法依靠的是进化过程，其中突变被自然选择接受或排斥。第二种方法使用基因工程在克隆基因的特定位置导入氨基酸变化，并选择或筛选以鉴定出保持功能性的序列。如作者所指出的，这些研究已揭示蛋白质对氨基酸取代具有令人惊奇的耐受性。作者进一步指出在蛋白质的某些位置哪些氨基酸的变化可能是允许的。例如，大多数隐蔽的氨基酸残基需要非极性的侧链，而表面侧

链的特征一般很少是保守的。其它这种表型沉默取代描述于 Bowie, J. U 等（文献同上）和本文提及的参考文献。

本发明另外涉及一类多核苷酸，当它们的序列与上文所述序列之间有至少 70 %，优选至少 90 %，更优选至少 95 %，还要更优选 96 %，97 %，98 %，99 % 同一性时，能够与上文所述序列杂交上。本发明具体地涉及在严紧条件下能够与上文所述多核苷酸杂交的多核苷酸。本文所用术语“严紧条件”是指仅当序列之间有至少 95 % 和优选至少 97 % 同一性时才会发生杂交。在一个优选实施方案中，能够与上文所述多核苷酸杂交上的多核苷酸所编码的多肽能基本上维持与由图 1(SEQ ID NO:1)之 cDNA 或经保藏的 cDNA 编码的成熟多肽相同的生物学功能或活性。

“严紧杂交条件”的例子包括于 42 ℃，在含有 50 % 甲酰胺，5 × SSC(150mM NaCl，15mM 柠檬酸三钠)，50mM 磷酸钠(pH7.6)，5 × Denhardt's 溶液，10 % 葡聚糖硫酸酯和 20μg/ml 变性的经剪切的鲑精 DNA 的溶液中保温过夜，接着于 65 ℃ 用 0.1 × SSC 洗涤滤膜。

或者，多核苷酸可至少具有 20 个碱基，优选 30 个碱基，更优选至少具有 50 个碱基，如上所述它能与本发明的多核苷酸杂交并与本发明的多核苷酸具有同一性，它有可能维持或不能维持活性。例如，可将这种多核苷酸用作 SEQ ID NO:1 之多核苷酸的探针，例如用以回收多核苷酸或用作诊断探针或用作 PCR 引物。

当然，能够与参照多核苷酸(如经保藏的 cDNA 克隆)的较大部分，如长度为 50-750nt 的部分，或甚至与全长的参照多核苷酸杂交的多核苷酸也可用作本发明的探针，对应于经保藏的 cDNA 的核苷酸序列或图 1[SEQ ID NO:1]所示的核苷酸序列的大部分(如果不是全部的话)的多核苷酸也一样能用作探针。例如，“长度至少为 20nt”的多核苷酸部分是指参照多核苷酸的核苷酸序列(如经保藏的 cDNA 或图 1[SEQ ID NO:1]所示的核苷酸序列)中的 20 个或更多个邻接的核苷酸。如上所述，所述部分在诊断上可用作根据常规 DNA 杂交技术的探针或用作引物从而通过聚合酶链反应(PCR)扩增靶序列，例见分子克隆，实验室

手册，第 2 版， Sambrook, J., Fritsch, E.F 和 Maniatis, T(1989)编，冷泉港实验室出版社，该文献全文列入本文作为参考。

由于 KGF-2 cDNA 克隆已被保藏，其确定的核苷酸序列示于图 1[SEQ ID NO:1]，产生能与 KGF-2 cDNA 分子的一部分杂交的多核苷酸对于本领域技术人员而言应是常规技术。例如，可简单地使用限制性内切核酸酶切割或通过超声处理 KGF-2 cDNA 克隆进行剪切以产生不同大小的 DNA 部分，这些 DNA 部分就是能与 KGF-2 cDNA 分子的一部分杂交的多核苷酸。或者，可根据已知技术合成产生本发明的杂交多核苷酸。当然，仅能与 polyA 序列(如图 1[SEQ ID NO:1]所示 KGF-2 cDNA 之 3'末端 poly(A)序列)，或 T(或 U)残基的互补序列杂交的多核苷酸不包括在用于与本发明的核酸部分杂交的本发明的多核苷酸中，因为这种多核苷酸可与含有 poly(A)序列或其互补物的任何核酸分子(如实际上任何一种双链 cDNA 克隆)杂交上。

本发明另外还提供了含有编码 KGF-2 蛋白之携有表位的部分的多核苷酸的分离的核酸分子。具体地说，所提供的分离的核酸分子编码含有图 1(SEQ ID NO:2)中的下列氨基酸残基的多肽，本发明人已测定出它们是 KGF-2 蛋白的抗原性区域:

1.Gly41-Asn71:GQDMVSPEATNSSSSSFSSPSSAGRHVRSYN[SEQ ID NO:25];

2.Lys91-Ser109:KIEKNGKVSGTKKENCPYS[SEQ ID NO:26];

3.Asn135-Tyr164:NKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTY [SEQ ID NO:27];和

4.Asn181-Ala199:NGKGAPRRGQKTRRKNTSA[SEQ ID NO:28]。

还有另外两个较短的推测抗原性区域， Gln74-Arg78 和 Gln170-Gln175 。下文将详细描述产生 KGF-2 之携有表位的部分的方法。

可根据有关用于专利方法的微生物保藏物国际认可的布达佩斯条约中的款项维持本文所述的保藏物。这些保藏物仅为方便本领域技术人员而提供，而不是认定根据 35U.S.C.ξ112 的规定需要保藏。经保藏材料中所含的多核苷酸序列及其所编码多肽的氨基酸序列均引入本文

作为参考，当这些序列与本文所述序列有冲突时，以前者为准。制备，使用或销售经保藏的材料需经许可，本申请未授予这种许可。

KGF-2 多肽和片段

本发明另外涉及具有图 1(SEQ ID NO:2)的推定氨基酸序列或具有由经保藏的 cDNA 编码的氨基酸序列的多肽，以及这种多肽的片段，类似物和衍生物。

本领域技术人员能理解，由于上文讨论的测序错误概率以及针对不同的已知蛋白质中前导序列的裂解位点的可变异性，由经保藏的 cDNA 所编码的实际的 KGF-2 多肽含有约 208 个氨基酸，但可以是 200-220 个氨基酸范围内的任何数目；此蛋白质的实际前导序列约为 35 或 36 个氨基酸，但可以是 30-40 个氨基酸范围内的任何数目。

涉及图 1(SEQ ID NO:2)的多肽或经保藏的 cDNA 所编码的多肽时，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”指的是保留了与这种多肽基本上相同的生物学功能或活性的多肽。因此，类似物包括蛋白原，通过裂解该蛋白原部分以产生有活性的成熟多肽而能激活该蛋白原。

本发明的多肽可以是重组的多肽，天然的多肽或合成的多肽，优选为重组的多肽。

图 1(SEQ ID NO:2)的多肽或经保藏的 cDNA 所编码的多肽的片段，衍生物或类似物可以是下列各种多肽：(i)其中一个或多个氨基酸残基被保守的或非保守的氨基酸残基(优选保守的氨基酸残基)取代，这种被取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的氨基酸残基，或(ii)其中一个或多个氨基酸残基包括取代基，或(iii)其中成熟的多肽与另一种化合物，如提高多肽半寿期的化合物(如聚乙二醇)融合，或(iv)其中另外的氨基酸与成熟多肽融合，如前导序列或分泌序列或用于纯化成熟多肽的序列或蛋白原序列。鉴于本文的教导，本领域技术人员不难掌握这种片段，衍生物和类似物。

术语“肽”和“寡肽”被认为是同义词(人们普遍这么认为)，当上下文中需要指明由肽键偶联的至少 2 个氨基酸的链时，这两个术语可以互换使用。本文中对含有 10 个氨基酸残基以上的链使用“多肽”一

词。本文所有寡肽和多肽式或序列从左至右为氨基末端至羧基末端。

本领域技术人员应当认识到，KGF-2 多肽的一些氨基酸序列可以改变，而不会显著影响蛋白质的结构或功能。如果分析序列中的这种差异，应能记得蛋白质中存在决定活性的至关重要的区域。一般而言，可以取代形成四级结构的残基，只要使用行使类似功能的残基即可。在其它场合下，如果变化发生在蛋白质的非重要区域，那么残基的类型有可能完全不重要。

因此，本发明另外包括基本上表现出 KGF-2 多肽活性或包括诸如下文所讨论的蛋白质部分的 KGF-2 蛋白区域的 KGF-2 多肽的各种变异。这种突变体包括缺失，插入，倒位，重复和类型取代(如原则是用一种亲水的残基取代另一种亲水的残基，而不是用强亲水的残基取代强疏水的残基)。小的变化或这种“中性的”氨基酸取代一般对活性影响很小。

通常视为保守的取代是脂肪族氨基酸 Ala, Val, Leu 和 Ile 中相互之间的取代；羟基残基 Ser 和 Thr 的互换，酸性残基 Asp 和 Glu 的互换，酰胺残基 Asn 和 Gln 之间的取代，碱性残基 Lys 和 Arg 的互换以及芳香族残基 Phe,Tyr 的相互取代。

如上文详述，有关何种氨基酸变化很可能是表型沉默的(即不会对功能有显著不利的影响)的其它指南例见 Bowie, J.U.等人的“译解蛋白质序列中的信息：对氨基酸取代的耐受”，科学， 247: 1306-1310(1990)。

本发明包括编码可用作治疗肽的 KGF-2 模拟肽。模拟的 KGF-2 肽是一些短肽，它们通过结合和激活 KGF-2 的相关受体来模拟 KGF-2 蛋白的生物活性。模拟的 KGF-2 肽也可以结合并抑制 KGF-2 的相关受体。 KGF-2 受体包括但不限于 FGFR2iiib 和 FGFR1iiib 。这种模拟肽可得自例如，但不限于噬菌体展示或组合化学的方法。例如，Wrighton 等，科学， 273: 458-463(1996)所述的方法可用于产生模拟的 KGF-2 肽。

优选以分离的形式提供本发明的多肽和多核苷酸，并优选已被纯

化为均质。

本发明的多肽优选为分离的形式，“分离的多肽”是指从其天然环境中取出的多肽，因此，为了本发明的目的，重组宿主细胞产生和/或含有的多肽被认为是分离的，“分离的多肽”还指从重组宿主细胞中或天然来源部分或基本上纯化好的多肽。

本发明的多肽包括 SEQ ID NO:2 的多肽(尤其是成熟的多肽)以及与 SEQ ID NO:2 的多肽至少 90 %， 95 %， 96 %， 97 %， 98 %， 99 % 相似(更优选至少 90 %， 95 %， 96 %， 97 %， 98 %， 99 % 相同)的多肽，还包括这种多肽的部分，多肽的所述部分(如下文所述的缺失突变体)一般含有至少 30 个氨基酸，更优选至少 50 个氨基酸。

众所周知，通过将一种多肽的氨基酸序列及其保守的氨基酸取代与第二种多肽的序列比较即可确定两种多肽之间的“相似性”。

两个多肽的“相似性百分比”指的是通过使用 Bestfit 程序(威斯康星序列分析程序包， Unix 第 8 版， Genetics Computer Group， University Research Park， 575 Science Drive， Madison， WI53711)和用于确定相似性的缺失设置比较两个多肽的氨基酸序列而产生的相似性评分。 Bestfit 使用 Smith 和 Waterson(应用数学进展，2:482-489,1981)的局部同源性算法规则来找出两个序列之间相似性最好的区段。

具有与参照的 KGF-2 多肽的氨基酸序列至少，例如至少 95 %“相同”的氨基酸序列的多肽指的是除了该多肽序列在参照的 KGF-2 多肽的氨基酸序列的每 100 个氨基酸中可包括多至 5 个氨基酸的改变外，该多肽的氨基酸序列与参照序列是相同的。换句话说，为了得到具有与参照的氨基酸序列至少 95 % 相同的氨基酸序列的多肽，参照序列中多至 5 % 的氨基酸残基可缺失或被另一种氨基酸取代，或者多至参照序列之总氨基酸残基的 5 % 的大量氨基酸可插入参照序列中。参照序列的这些变化可在参照氨基酸序列的氨基或羧基末端位置发生，也可以在所述末端位置之间的任何位置发生，或者各自散布在参照序列的残基中，或者散布在参照序列内的一个或多个邻接的组中。

实际操作过程中，使用已知的计算机程序，如 Bestfit 程序(威斯康星序列分析程序包， Unix 第 8 版， Genetics Computer Group ， University Research Park ， 575 Science Drive ， Madison ， WI53711)可常规确定是否任何特定的多肽与例如，图 1[SEQ ID NO:2]所示的氨基酸序列或经保藏的 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列至少 90 %， 95 %， 96 %， 97 %， 98 %或 99 %相同。当使用 Bestfit 或任何其它序列排列程序以确定特定的序列是否，例如与根据本发明的参照序列 95 %相同时，当然应设置参数以便是在参照氨基酸序列的全长基础上计算同一性百分比，并且达参照序列总氨基酸残基数目 5 %的同源性缺口是可以允许的。

如下文详述，本发明的多肽可被用于产生多克隆和单克隆抗体，所述抗体可用于下文所述的检测 KGF-2 蛋白表达的诊断试验中，或用作能增强或抑制 KGF-2 蛋白功能的激动剂和拮抗剂。另外，这种多肽可被用于酵母双杂合系统以“捕获”也是本发明的候选激动剂和拮抗剂的 KGF-2 蛋白结合蛋白。酵母双杂合系统描述于 Fields 和 Song，自然， 340:245 -246(1989)。

另一方面，本发明提供了含有本发明多肽之携有表位的部分的肽或多肽。此多肽部分的所述表位是本发明多肽的免疫原性或抗原性表位。“免疫原性表位”被定义为当整个蛋白质为免疫原时蛋白质中能引发抗体应答的部分。据信这些免疫原性表位仅限于分子上的几个位置。另一方面，蛋白质分子中可与抗体结合的区域被定义为“抗原性表位”。蛋白质的免疫原性表位的数目一般少于抗原性表位的数目，例见 Geysen 等，美国国家科学院院报， 81:3998-4002(1993)。

至于携有抗原性表位(即含有蛋白质分子中可与抗体结合的区域)的肽或多肽的选择，本领域技术人员熟知模拟蛋白质序列一部分的相对短的合成肽一般能刺激产生可与部分模拟的蛋白质发生反应的抗血清。例见 Sutcliffe, J. G， Shinnick, T. M， Green, N 和 Learner, R. A (1983)，与蛋白质上预定位点反应的抗体，科学， 219:660-666 。经常以蛋白质的一级序列描述能引发产生蛋白质反应性血清的肽，通过一

套简单的化学规则可鉴定这种肽，它们既不限于完整蛋白质的免疫决定簇区域(即免疫原性表位)，也不限于氨基或羧基末端。极端疏水的肽和含 6 个或更少残基的肽一般不能诱导可与模拟蛋白质结合的抗体；较长的、可溶性的肽，尤其是含有脯氨酸残基的肽通常是有效的。Sutcliffe 等，文献同上， p661 。例如，根据这些指南设计的，含有覆盖流感病毒血凝素 HA1 多肽链序列 75 % 的 8-39 个残基的 20 个肽中有 18 个可诱导产生能与 HA1 蛋白或整个病毒反应的抗体；对于 MulV 聚合酶而言， 12 个肽中的 12 个，对于狂犬病糖蛋白而言， 18 个肽中的 18 个可诱导产生能沉淀各自蛋白质的抗体。

因此，本发明携有抗原性表位的肽和多肽可用于产生能特异性地与本发明多肽结合的抗体，包括单克隆抗体。因此，通过融合来自经携有抗原表位的肽免疫的供体的脾细胞而得到的大多数杂交瘤通常可分泌能与天然蛋白反应的抗体， Sutcliffe 等，文献同上， p663 。由携有抗原性表位的肽或多肽产生的抗体可用于检测模拟的蛋白质，针对不同肽的抗体可用于追踪进行翻译后加工的蛋白质前体多个区域的去向。在模拟蛋白质的多种定量或定性测定，如竞争测定中可使用肽和抗肽抗体，因为已经证明甚至短肽(如约 9 个氨基酸)都可在免疫沉淀试验中结合和替代较大的肽，例见 Wilson 等，细胞， 37:767-778(1984),p777 。本发明的抗肽抗体也可用于纯化模拟的蛋白质，例如通过使用本领域所熟知的方法进行吸附层析。

根据上述指南设计的本发明携有抗原性表位的肽和多肽优选含有本发明多肽的氨基酸序列中所含的至少 7 个，更优选至少 9 个，最优选约 15-约 30 个氨基酸的序列。然而，包括本发明多肽氨基酸序列的较大部分，含有约 30， 40， 50， 60， 70， 80， 90， 100 或 150 个，或直至和包括本发明多肽全部氨基酸序列的任何长度的氨基酸的肽或多肽也被认为是本发明携有表位的肽或多肽，也可用于诱导产生与模拟蛋白质反应的抗体。优选携有表位的肽的氨基酸序列被选择为在含水溶剂中具有良好的溶解性(即该序列包括相对亲水的残基，而优选避免高度疏水的残基)；特别优选含有脯氨酸残基的序列。

可用于产生KGF-2特异性抗体的抗原性多肽或肽的非限制性例子包括下列:

1.Gly41-Asn71:GQDMVSPEATNSSSSSFSSPSSAGRHVRSYN[SEQ ID NO:25];

2.Lys91-Ser109:KIEKNGKVSGTKKENCPYS[SEQ ID NO:26];

3.Asn135-Tyr164:NKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTY [SEQ ID NO:27];和

4.Asn181-Ala199:NGKGAPRRGQKTRRKNTSA[SEQ ID NO:28]。

还有另外两个较短的推测抗原性区域， Gln74-Arg78 和 Gln170-Gln175 。

通过制备肽或多肽的任何常规方法，包括使用本发明核酸分子的重组方法，可产生本发明携有表位的肽和多肽。例如，可将携有短的表位的氨基酸序列与较大的多肽融合，该多肽可在重组生产和纯化的过程中用作载体，在免疫过程中可用来产生抗肽抗体。也可以使用已知的化学合成方法合成携有表位的肽。例如， Houghten 描述了合成大数目肽的一种简单方法，如在 4 周之内制备和鉴定(通过 ELISA-型结合研究)代表 HA1 多肽一个区段的单个氨基酸变体的 10-20mg 248 个不同的 13 残基的肽， Houghten, R. A (1985)，快速固相合成大数目肽的一般方法：各个氨基酸水平上的抗原-抗体相互作用的特异性，美国国家科学院院报 ， 82:5131-5135 。这种“同时合成多个肽(SMPS)”的方法进一步描述于 Houghten 等人的美国专利 4,631,211(1986)中。在此方法中，将用于固相合成多个肽的各个树脂包含在各个单独的可渗透溶剂的袋中，以最佳利用固相方法中所包括的多个相同的重复步骤。完全人工的方法可同时进行 500-1000 或更多个肽的合成，Houghten 等人，文献同上， p5134 。

可根据本领域众所周知的方法，使用本发明携有表位的肽和多肽诱导抗体，例见 Sutcliffe 等人，文献同上； Wilson 等人，文献同上；Chow, M 等人，美国国家科学院院报， 82:910-914 ；和 Bittle, F. J 等

人，普通病毒学杂志， 66:2347-2354(1985)。通常，可用游离的肽免疫动物；然而，通过将肽与大分子载体，如匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)或破伤风类毒素偶联，可提高抗肽抗体的滴度。例如，使用如间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)的接头，可将含有半胱氨酸的肽与载体偶联，而使用更一般的连接剂如戊二醛可将其它肽与载体偶联。通过例如腹膜内和/或皮内注射含有约 100 微克肽或载体蛋白和弗氏佐剂的乳剂，可用游离的或与载体偶联的肽免疫动物，如兔，大鼠和小鼠。需要例如以约 2 周为间隔进行几次加强注射以提供有用的抗肽抗体滴度，通过例如使用吸附于固体表面的游离肽的 ELISA 试验可检测所述滴度。通过例如将肽吸附于固相支持物上并根据本领域技术人员熟知的方法洗脱选定的抗体，从而选择抗肽抗体，可提高得自经免疫动物的血清中的抗肽抗体滴度。

可根据本领域技术人员熟知的方法鉴定本发明携有免疫原性表位的肽，即当整个蛋白质是免疫原时可引发抗体应答的所述蛋白质的诸部分。例如， Geysen 等人（文献同上）公开了在固相支持物上快速地同时合成纯度足以在酶联免疫吸附试验中反应的上百个肽的方法。然后，不用将它们与支持物分开即可轻易地检测合成的肽与抗体的相互作用。按此方法，本领域技术人员可常规地鉴定携有所需蛋白质的免疫原性表位的肽。例如， Geysen 等人通过合成一套重叠的覆盖口蹄疫病毒外被蛋白全部 213 个氨基酸的序列的所有 208 种可能的六肽，以 7 个氨基酸的分辨率定位出该蛋白质内免疫学重要的表位。然后，合成完整一套取代肽，其中在表位内每一个位置依次用所有 20 个氨基酸取代，测定赋予与抗体反应的特异性的特殊氨基酸。因此，通过此方法可常规制备本发明携有表位的肽的肽类似物。 Geysen(1987)的美国专利 4,708,781 中进一步描述了鉴定携有所需蛋白质的免疫原性表位的肽的方法。

Geysen(1990)的美国专利 5,194,392 中描述了检测或确定单体(氨基酸或其它化合物)序列的一般方法，所述单体是与所需抗体的特定互补位(抗原结合位点)互补之表位的拓扑等价物(即“ mimotope ”)。更

一般地， Geysen(1989)的美国专利 4,433,092 中描述了检测或确定单体序列的方法，所述单体是与所需特定受体的配体结合位点互补之配体的拓扑等价物。类似地， Houghten, R. A 等人(1996)的有关预先烷基化的寡肽混合物的美国专利5,480,971公开了线性的C_1-C_7-烷基预先烷基化的寡肽和这种肽的系列和文库，以及使用这种寡肽系列和文库测定优先与所需受体分子结合的预先烷基化寡肽之序列的方法。因此，通过这些方法可常规制备本发明携有表位的肽的非肽类似物。

正如本领域技术人员所期望的，本发明的 KGF-2 多肽及其上述携有表位的片段可与免疫球蛋白(IgG)的恒定区部分联合形成嵌合的多肽。这些融合蛋白便于纯化并显示出体内半寿期增加。例如，由人 CD4 多肽的前两个结构域和哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链恒定区的各个区域组成的嵌合蛋白已显示出这一现象(EPA 394,827； Traunecker 等人，自然， 331:84-86(1988))。因 IgG 部分而具有由二硫键连接的二聚体结构的融合蛋白在结合和中和其它分子方面比单体的 KGF-2 蛋白或单独的蛋白质片段更加有效(Fountoulakis 等人，生物化学杂志，270:3958 -3964(1995))。

根据本发明，也描述了 KGF-2 新的变体。通过缺失或取代 KGF-2 的一个或多个氨基酸可产生这些变体。天然的突变被称为等位基因变异，等位基因变异可以是沉默的(所编码的多肽没有变化)，也可以具有改变了的氨基酸序列。

为了尝试改善或改变天然 KGF-2 的特征，可利用蛋白质工程。也可使用本领域技术人员已知的重组 DNA 技术产生新的多肽。突变蛋白和缺失可显示出例如增强的活性或增加的稳定性。另外，它们可以较高的得率被纯化，并至少在某些纯化和储存条件下显示出较好的溶解性。下文所示的是所构建的突变的例子。

氨基末端和羧基末端缺失

使用重组 DNA 技术已修饰了 FGF 家族的多个成员。在 aFGF 和 bFGF 中，对肝素结合至关重要的带正电的分子已被取代或缺失。经修饰的分子导致肝素结合活性的降低，因此，患者体内被肝素结合的经

修饰分子的量会有所降低，由于更多的 FGF 会到达适当的受体，从而增加了效力(EP 0298723)。

含水状态的天然 KGF-2 相对不稳定，它会遭遇化学和物理降解，从而导致加工和储存过程中生物活性的损失。天然 KGF-2 在水溶液中，由于温度升高会倾向于聚集，在酸性条件下会失活。

为了改善或改变天然 KGF-2 的一个或更多个特性，可使用蛋白质工程。Ron 等人，生物化学杂志，268(4):2984-2988(1993)报道了即使丧失氨基末端 3、8 或 27 个氨基酸残基仍具有肝素结合活性的经修饰 KGF 蛋白。缺失 3 和 8 个氨基酸具有全部的活性。KGF 更多个氨基酸的缺失描述于 PCT/IB95/00971。羧基末端氨基酸的缺失可增强蛋白质的活性。一个例子是γ干扰素，通过缺失该蛋白质羧基末端的 10 个氨基酸残基可使活性提高达 10 倍(Dobeli 等人，生物技术杂志，7:199-216(1988))。因此，本发明的一方面是提供 KGF-2 的多肽类似物和编码这种类似物的核苷酸序列，所述类似物相对于天然 KGF-2 多肽而言，表现出增强的稳定性(如当暴露于典型的 pH，热条件或其它储存条件下)。

下文所示的是特别优选的 KGF-2 多肽(计数始于蛋白质中的第一个氨基酸(Met))：

Thr(残基 36)-Ser(残基 208)	Arg(65)-Ser(208)
Cys(37)-Ser(208)	Val(67)-Ser(208)
Gln(38)-Ser(208)	Ser(69)-Ser(208)
Ala(39)-Ser(208)	Val(77)-Ser(208)
Leu(40)-Ser(208)	Arg(80)-Ser(208)
Gly(41)-Ser(208)	Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-His(207)
Gln(42)-Ser(208)	Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Val(206)
Asp(43)-Ser(208)	Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Val(205)
Met(44)-Ser(208)	Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Met(204)
Val(45)-Ser(208)	Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Pro(203)
Ser(46)-Ser(208)	Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Leu(202)

Pro(47)-Ser(208)
Glu(48)-Ser(208)
Ala(49)-Ser(208)
Thr(50)-Ser(208)
Asn(51)-Ser(208)
Ser(52)-Ser(208)
Ser(53)-Ser(208)
Ser(54)-Ser(208)
Ser(55)-Ser(208)
Ser(56)-Ser(208)
Phe(57)-Ser(208)
Ser(59)-Ser(208)
Ser(62)-Ser(208)
Ala(63)-Ser(208)
Gly(64)-Ser(208)

Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Phe(201)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-His(200)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Ala(199)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Ser(198)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Thr(197)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Asn(196)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Lys(195)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Arg(194)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Arg(193)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Thr(192)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Lys(191)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Arg(188)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Arg(187)
Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Lys(183)

优选的实施方案包括 N-末端缺失 Ala(63)-Ser(208)(KGF-2Δ28)和 Ser(69)-Ser(208)(KGF-2Δ33)。其它优选的 N-末端和 C-末端缺失突变体描述于说明书实施例 13 和 16(c), 并包括 Ala(39)-Ser(208); Pro(47)-Ser(208); Val(77)-Ser(208); Glu(93)-Ser(208); Glu(104)-Ser(208); Val(123)-Ser(208); 和 Gly(138)-Ser(208)。其它优选的 C-末端缺失突变体包括: Met(1),Thr(36),或 Cys(37)-Lys(153)。

本发明中也包括 N-末端和 C-末端氨基酸都有缺失的缺失突变体。这种突变体包括上述 N-末端缺失突变体和 C-末端缺失突变体的所有联合，例如 Ala(39)-His(200)， Met(44)-Arg(193)， Ala(63)-Lys(153)， Ser(69)-Lys(153)等等。使用本领域技术人员熟知的重组技术可进行这种联合。

因此，一方面，本发明提供了 N-末端的缺失突变体，这种突变体包括那些除图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 38 个 N-末端氨基酸残基(即至

少 Met(1)-Gln(38))但不超过前 147 个 N-末端氨基酸残基缺失外，含有图 1(SEQ ID NO:2)所示其余氨基酸序列的突变体。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 38 个 N-末端氨基酸残基(即至少缺失 Met(1)-Gln(38))但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 46 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 62 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 68 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 76 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 92 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 103 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 122 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基。

除了上述 N-末端缺失突变体的范围以外，本发明也涉及上述范围的所有联合，如图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 62 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 68 个 N-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 62 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 76 个 N-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 62 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 92 个 N-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 62 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 103 个 N-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 68 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 76 个 N-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 68 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 92 个 N-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 68 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 103 个 N-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 46 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 62 个 N-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 46 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 68 个 N-末端氨基酸残基的缺

失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 46 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 76 个 N-末端氨基酸残基的缺失；等等。

另一方面，本发明提供了 C-末端缺失突变体。优选所述 C-末端缺失突变体的 N-末端氨基酸残基是图 1(SEQ ID NO:2)的氨基酸残基 1(Met)， 36(Thr)或 37(Cys)。这种突变体包括那些除图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后一个 C-末端氨基酸残基(Ser(208))但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基缺失(即缺失氨基酸残基 Glu(154)-Ser(208))外，含有图 1(SEQ ID NO:2)所示其余氨基酸序列的突变体。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后一个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 65 个 C-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 10 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 20 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 30 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 40 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基。或者，缺失包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 50 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基。

除了上述 C-末端缺失突变体的范围以外，本发明也涉及上述范围的所有联合，如图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后一个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 10 个 C-末端氨基酸残基的缺失;图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后一个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 20 个 C-末端氨基酸残基的缺失;图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后一个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 30 个 C-末端氨基酸残基的缺失;图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后一个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 40 个 C-末端氨基酸残基的缺失;图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 10 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 20 个 C-末端氨基酸残基的缺失;图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 10 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 30 个 C-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 10 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 40

个 C-末端氨基酸残基的缺失；图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后 20 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 30 个 C-末端氨基酸残基的缺失；等等。

另一方面，本发明也包括 N-末端和 C-末端残基都缺失了氨基酸的缺失突变体。这种突变体包括上述 N-末端缺失突变体和 C-末端缺失突变体的所有联合。这种突变体包括除图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 46 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基缺失，图 1(SEQ ID NO:2)中至少最后一个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基缺失外，含有图 1(SEQ ID NO:2)所示其余氨基酸序列的突变体。或者，缺失可包括图 1(SEQ ID NO:2)中至少前 62，68，76，92，103 或 122 个 N-末端氨基酸残基但不超过前 137 个 N-末端氨基酸残基的缺失，和图 1 中至少最后 10，20，30，40 或 50 个 C-末端氨基酸残基但不超过最后 55 个 C-末端氨基酸残基的缺失。另外还包括上述范围的所有联合。

氨基酸取代

本发明的另一方面也包括氨基酸的取代。天然的成熟 KGF-2 含有 44 个带电的残基，其中的 32 个带正电。根据这种残基在蛋白质三维结构中的位置，用带负电或不带电的氨基酸取代一个或多个这些成簇的残基可改变相邻残基的静电相互作用，对于增加蛋白质稳定性和减少蛋白质聚集是有用的。蛋白质的聚集不仅会导致活性的丧失，也会给药物制剂的制备带来问题，因为它们可能会是免疫原性的(Pinckard 等人，临床实验免疫学，2:331-340(1967)，Robbins 等人，糖尿病，36:838 -845(1987)，Cleland 等人，Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems，10:307-377(1993))。任何修饰都应考虑到使蛋白质分子四级结构中的电荷排斥最小化。因此，特别令人感兴趣的是用另一种带电的氨基酸和用中性的或带负电的氨基酸取代带电的氨基酸，后者会导致蛋白质所带的正电荷减少，从而改善 KGF-2 的特性。这种改善包括与天然的 KGF-2 蛋白相比，类似物的稳定性有所增加和聚集作用有所降低。

氨基酸的取代也可以改变与细胞表面受体结合的选择性，Ostade

等人，自然， 361:266-268(1993)中描述了某些 TNF α 突变导致 TNF α 仅选择性地与两种已知 TNF 受体之一结合。

KGF-2 分子可包括因自然突变或因人为操作所致的一个或多个氨基酸取代,缺失或添加。一些优选突变的例子是: Ala (49) Gln, Asn (51) Ala, Ser (54) Val, Ala (63) Pro, Gly (64) Glu, Val (67) Thr, Trp (79) Val, Arg (80) Lys, Lys (87) Arg, Tyr (88) Trp, Phe (89) Tyr, Lys (91) Arg, Ser (99) Lys, Lys (102) Gln, Lys 103(Glu), Glu (104) Met, Asn (105) Lys, Pro (107) Asn, Ser (109) Asn, Leu (111) Met, Thr (114) Arg, Glu(117) Ala, Val (120) Ile, Val (123) Ile, Ala (125) Gly, Ile (126) Val, Asn (127) Glu, Asn (127) Gln, Tyr (130) Phe, Met (134) Thr, Lys (136) Glu, Lys (137) Glu, Gly (142) Ala, Ser (143) Lys, Phe (146) Ser, Asn (148) Glu, Lys (151) Asn, Leu (152) Phe, Glu (154) Gly, Glu (154) Asp, Arg (155) Leu, Glu (157) Leu, Gly (160) His, Phe (167) Ala, Asn (168) Lys, Gln (170) Thr, Arg (174) Gly, Tyr (177) Phe, Gly (182) Gln, Ala (185) Val, Ala (185) Leu, Ala (185) Ile, Arg (187) Gln (190) Lys, Lys (195) Glu, Thr (197) Lys, Ser (198) Thr, Arg (194)Glu, Arg(194)Gln, Lys(191)Glu, Lys(191)Gln, Arg(188)Glu, Arg(188)Gln, Lys(183)Glu.

至于符号说明，例如 Ala(49)Gln 指的是图 1(SEQ ID NO:2)第 49 位的 Ala 被 Gln 取代。

优选变化为微不足道的，如不会显著影响蛋白质的折叠或活性的保守氨基酸取代。下文所示的是本领域技术人员熟知的保守氨基酸取代的例子:

芳香族: 苯丙氨酸，色氨酸，酪氨酸

疏水的: 亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸

极性的: 谷氨酰胺，天冬酰胺

碱性的: 精氨酸，赖氨酸，组氨酸

酸性的: 天冬氨酸，谷氨酸

小的: 丙氨酸，丝氨酸，苏氨酸，甲硫氨酸，甘氨酸

当然，熟练的技术人员可根据包括上述那些在内的很多因素决定氨基酸取代的数目。一般而言，根据目的，任何给定 KGF-2 多肽的取

代数目不超过 50， 40， 30， 20， 10， 5 或 3 个。例如，在 KGF-2 C-末端一些可改善稳定性的取代描述于上文和实施例 22 中。

通过本领域技术人员熟知的方法，如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham 和 Wells，科学， 244:1081-1085(1989))可鉴定 KGF-2 中对功能至关重要的氨基酸。后一种方法在分子中的每个残基处导入单个丙氨酸突变，然后检测所得突变体分子的生物活性，如受体结合或体外和体内增殖活性(例见实施例 10 和 11)。通过结构分析，如结晶作用，核磁共振或光亲和标记也可确定对配体-受体结合至关重要的位点(例见 Smith 等人，分子生物学杂志， 224:899-904(1992); 和 de Vos 等人，科学， 255:306-312(1992))。

本发明的另一方面是用丝氨酸取代氨基酸第 37 和 106 和 150 位的半胱氨酸。半胱氨酸的奇数数目意味着至少一个半胱氨酸残基可用于分子间交联或成键，所述交联或成键可导致蛋白质采取不符合需要的四级结构。一个或多个半胱氨酸被丝氨酸或例如丙氨酸所取代的新的 KGF-2 蛋白一般以较高得率的可溶的、正确折叠的蛋白质形式被纯化。尽管未被证实，但据信第 106 位的半胱氨酸残基对于功能是至关重要的，此半胱氨酸在所有其它 FGF 家族成员中是高度保守的。

本发明的另一方面是 KGF-2 与其它蛋白质或其片段的融合蛋白，如与其它 FGF 蛋白，如 KGF(FGF-7)， bFGF， aFGF， FGF-5， FGF-6 等的融合蛋白或杂合体。已报道了 KGF(FGF-7)的这种杂合体。在公开的 PCT 申请号 90/08771 中，产生了由 KGF 的前 40 个氨基酸残基和 aFGF 的 C-末端部分组成的嵌合蛋白。据报道该嵌合体象 KGF 一样靶向角质形成细胞，但缺乏对肝素的敏感性，后者是 aFGF 而不是 KGF 的特征。与免疫球蛋白(IgG)恒定区的部分融合而成的融合蛋白经常显示出增加的体内半寿期。由人 CD4 多肽前 2 个结构域和哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链恒定区的各个区域组成的嵌合蛋白已显示出这一点(欧洲专利申请，公开号为 394827， Traunecker 等人，自然， 331， 84-86(1988))。具有二硫键连接的二聚体结构的融合蛋白也能更有效地结合单独的单体分子(Fountoulakis 等人，生物化学杂

志， 270:3958-3964(1995))。

KGF-2 的抗原性/亲水部分

如图 4A-4E 所述， KGF-2 蛋白中有 4 个主要的高度亲水性区域。即氨基酸残基 Gly41-Asn71 ， Lys91-Ser109 ， Asn135-Tyr164 和 Asn181-Ala199[SEQ ID NO:25-28]。还有另外两个较短的推测抗原性区域， Gln74-Arg78 和 Gln170-Gln175 。已知亲水性部分主要位于蛋白质的外部(表面)，因此，便于抗体识别这些区域。所述区域似乎也与 KGF-2 和其受体的结合相关。得自这些区域的合成肽可干扰 KGF-2 与其受体的结合，因此阻断了蛋白质的功能。得自该蛋白质亲水性部分的合成肽也可以是激动剂，即模拟 KGF-2 的功能。

因此，本发明进一步涉及含有 KGF-2 亲水性区域的分离的多肽，其中所述多肽的长度不超过 150 个氨基酸，优选不超过 100， 75 或 50 个氨基酸，该多肽含有一个或多个上述 KGF-2 亲水性区域。

化学修饰

可进一步修饰 KGF 野生型和类似物以使其含有非蛋白质的正常部分的其它化学组成成分。那些衍生化的组成成分可改善该蛋白质的溶解性、生物半寿期或吸附作用。所述组成成分也可以减少或消除该蛋白质任何不必要的副作用等等。有关这些组成成分的综述例见 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES，第 18 版， Mack 出版公司， Easton, PA (1990)。聚乙二醇(PEG)是一种已用于制备治疗用蛋白质的这类化学组成成分。PEG 与蛋白质的结合已显示出可保护蛋白质使之免受蛋白酶水解， Sada 等人，发酵生物工程杂志，71:137-139(1991)。可使用多种方法来结合某些 PEG 组成成分，例见 Abuchowski 等人，《用作药物的酶》(Holcerberg 和 Roberts 编),p367-383(1981)。很多公开的专利描述了 PEG 衍生物和如何制备它们的方法，例见 Ono 等人，美国专利 5,342,940； Nitecki 等人，美国专利 5,089,261； Delgado 等人，美国专利 5,349,052 。通常， PEG 分子通过蛋白质上的反应性基团与该蛋白质连接。相对而言，氨基基团，如赖氨酸上的氨基基团或蛋白质的氨基末端便于这种结合。

有关“多肽和肽”这一章中提及的每篇文献，其全文列入本文作为参考。

载体和宿主细胞

本发明也涉及包括本发明分离的DNA分子的载体，用重组载体进行基因工程改造的宿主细胞，和通过重组技术生产KGF-2多肽或其片段的方法。

可使用本发明多肽的片段或部分通过肽合成来生产相应的全长多肽；因此，这些片段可用作生产全长多肽的中间体。可使用本发明多核苷酸的片段或部分来合成本发明全长的多核苷酸。本发明也涉及包括本发明多核苷酸的载体，用本发明的载体进行基因工程改造的宿主细胞，和通过重组技术生产本发明多肽的方法。

用本发明的载体对宿主细胞进行基因工程改造(转导或转化或转染)，所述载体可以是例如克隆载体或表达载体。载体的形式可以是例如质粒，病毒颗粒，噬菌体等等。可在适当加以改进以激活启动子，选择转化子或扩增KGF-2基因的常规营养培养基中培养经改造的宿主细胞。如温度，pH等的培养条件是选用来表达的宿主细胞以前所用的那些条件，这对于本领域技术人员而言应是显而易见的。

通过重组技术可将本发明的多核苷酸用于生产多肽，因此，例如，所述多核苷酸可包含在多种表达载体中的任一种中以表达多肽。这种载体包括染色体的、非染色体的和合成的DNA序列，如SV40的衍生物；细菌质粒；噬菌体DNA；杆状病毒；酵母质粒；衍生自质粒和噬菌体DNA、病毒DNA（如痘苗病毒，腺病毒，禽痘病毒和假狂犬病病毒）之联合的载体。然而，只要能在宿主中复制和存活，任何其它的载体都可使用。

可通过多种方法将适当的DNA序列插入载体。通常，通过本领域已知的方法将DNA序列插入适当的限制性内切核酸酶位点。这种方法和其它方法应是本领域技术人员所熟知的。

表达载体中的DNA序列与适当的表达控制序列(启动子)有效地相连以介导cDNA合成。至于这种启动子的代表性例子，应提及的有：

LTR 或 SV40 启动子，大肠杆菌 *lac* 或 *trp*，噬菌体λ P_L 启动子和已知能控制原核细胞或真核细胞或它们的病毒中的基因表达的其它启动子。表达载体也含有用于起始翻译的核糖体结合位点和转录终止子。载体也包括用于增强表达的适当序列。

另外，表达载体优选含有一个或多个选择性标记基因以提供可用于选择已转化的宿主细胞的表型性状，如用于真核细胞培养物的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性，或大肠杆菌中的四环素和氨苄青霉素抗性。

可使用含有上文所述适当的 DNA 序列以及适当的启动子或控制序列的载体来转化适当的宿主以使宿主表达蛋白质。

至于适当宿主的代表性例子，应提及的有：细菌细胞，如大肠杆菌，链霉菌，鼠伤寒沙门氏菌；真菌细胞，如酵母；昆虫细胞，如果蝇 S2 和 *Spodoptera Sf9*；动物细胞，如 CHO， COS 或 Bowes 黑素瘤细胞；腺病毒；植物细胞等。根据本文的教导，本领域技术人员应能掌握如何选择适当的宿主。

更具体地，本发明也包括含有一个或多个上文广泛描述的序列的重组构建体。这些构建体含有载体，如质粒或病毒载体，其中以正向或反向插入了本发明的序列。在此实施方案优选的方面，该构建体进一步包含与该序列有效相连的调控序列，如启动子。大量的适当的载体和启动子是本领域技术人员熟知的，并可商购。列出下列载体是为了举例：细菌： pQE70， pQE60， pQE-9(Qiagen)， pBS， pDIO， phagescript， psiX174， pBluescript SK， pbsks， pNH8A， pNH16a， pNH18A， pNH46A (Stratagene)； ptrc99a， pKK223-3， pKK233-3， pDR540， pRIT5 (Pharmacia)；真核细胞： pWLNEO， pSV2CAT， pOG44， pXT1， pSG (Stratagene)， pSVK3， pBPV， pMSG， pSVL(Pharmacia)。然而，只要能在宿主中复制和存活，任何其它的质粒或载体都可使用。

可使用具有选择性标记的 CAT(氯霉素转移酶)载体或其它载体从任何合乎需要的基因中选择启动子区域。两个适当的载体是 pKK232-

8 和 pCM7。特别命名的细菌启动子包括 lacI 启动子，lacZ 启动子，T3 启动子，T7 启动子，gpt 启动子，λ P_R、P_L 启动子和 trp 启动子。真核启动子包括 CMV 即早期启动子，HSV 胸苷激酶启动子，早期和晚期 SV40 启动子，逆转录病毒的 LTR 启动子和小鼠金属硫蛋白-I 启动子。适当载体和启动子的选择是本领域技术人员熟知的。

在另一个实施方案中，本发明涉及含有上述构建体的宿主细胞。宿主细胞可以是高等真核细胞如哺乳动物细胞，或低等真核细胞如酵母细胞；或者宿主细胞也可以是原核细胞如细菌细胞。可通过磷酸钙转染，DEAE-葡聚糖介导的转染，或电穿孔(Davis, L 等人，分子生物学基础方法(1986))将构建体导入宿主细胞中。

可以常规方式使用宿主细胞中的构建体以产生由重组序列编码的基因产物。或者，也可通过常规的肽合成仪合成生产本发明的多肽。

在适当启动子的控制下，成熟的蛋白质可在哺乳动物细胞、酵母、细菌或其它细胞中表达。使用衍生自本发明 DNA 构建体的 RNA，也可利用无细胞的翻译系统来产生这种蛋白质。可在原核和真核宿主中使用的适当的克隆和表达载体描述于 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港，纽约(1989)，该文献已列入本文作为参考。

通过在载体中插入增强子序列可增加高等真核细胞对编码本发明多肽的 DNA 的转录。增强子是对启动子起作用以增加其转录的顺式作用的 DNA 元件，通常约为 10 至 300bp。例子包括复制起点晚期侧的第 100 - 270bp 的 SV40 增强子，巨细胞病毒早期启动子增强子，复制起点晚期侧的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。

为了将翻译的蛋白质分泌到内质网腔、外周质空间或胞外环境中，可将适当的分泌信号掺入被表达的多肽中。所述信号对于该多肽而言可以是内源的，也可以是外源的。

多肽可以经修饰的形式，如融合蛋白的形式被表达，多肽不仅可包括分泌信号，也可包括其它的异源功能区域。例如，可在多肽的 N-末端加上另外的氨基酸区域，尤其是带电的氨基酸以改善多肽在宿主细胞中、纯化过程中或随后的处理和储存过程中的稳定性和持久性。

也可以在多肽中加入肽组成成分以便于纯化，最终制备多肽之前可除去这类区域。本领域技术人员熟知在多肽中加入肽组成成分以引发分泌或外泌，改善稳定性和便于纯化等等，这是本领域内的常规技术。优选的融合蛋白含有得自免疫球蛋白的异源区域，该区域可用于增溶受体。例如，EP-A-0 464 533(加拿大同族 2045869)中公开了含有免疫球蛋白分子恒定区各个部分和另一种人蛋白质或其部分的融合蛋白。在很多情况下，融合蛋白中的 Fc 部分对于治疗和诊断用途十分有利，因此，导致例如药物动力学特性有所改善(EP-A0 232 262)。另一方面，对于一些应用而言，需要在融合蛋白以所述有利的方式被表达、检测和纯化之后缺失掉 Fc 部分。如当 Fc 部分成为治疗和诊断用途的障碍时，如当融合蛋白被用作免疫接种用的免疫原时即是如此。例如在筛选药物时，将如 shIL-5 之类的人蛋白质与 Fc 部分融合以进行高生产率筛选试验来鉴定 hIL-5 的拮抗剂，例见 D. Bennett 等人，分子识别杂志，第 8 卷，52-58(1995)和 K. Johanson 等人，生物化学杂志，Vol.270，No.16，p9459-9471(1995)。

通常，重组的表达载体包括复制起点和允许转化宿主细胞的抗性标记，如大肠杆菌的氨苄青霉素抗性基因和酿酒酵母的 TRP1 基因，和得自高表达基因的启动子以介导下游结构序列的转录。这种启动子可得自编码如 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)之类的糖酵解酶，α-因子，酸性磷酸酶或热休克蛋白等的操纵子。异源结构序列与翻译起始和终止序列，优选与能介导被翻译的蛋白质分泌至外周间隙或胞外基质中的前导序列以适当的方式装配在一起。任选异源序列可编码包括赋予所需特征的 N-末端鉴定肽的融合蛋白，所述特征如所表达重组蛋白的稳定化或纯化过程的简化。

通过将与功能性的启动子处于有效的阅读相中的编码所需蛋白质的结构 DNA 序列以及适当的翻译起始和终止信号一起插入可构建用于细菌的有用的表达载体。载体可含有一个或多个表型选择性标记和一个复制起点以确保载体的维持并在必要时提供宿主内的扩增。尽管也可利用其它的选择，但用于转化的合适的原核宿主包括大肠杆菌，

枯草芽孢杆菌，鼠伤寒沙门氏菌，以及假单胞菌属、链霉菌属和葡萄球菌属的多个种。

作为代表性的而非局限性的例子，用于细菌的有用的表达载体可含有选择性标记和得自含有已知克隆载体 pBR322(ATCC37017)之遗传元件的商购质粒的细菌复制起点。这种可商购载体包括例如 pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals， Uppsala， Sweden)和 GEM1(Promega Biotec， Madison， WI， USA)。这些 pBR322“骨架”部分与适当的启动子和欲表达的结构序列联合在一起。

转化合适的宿主菌株并将宿主菌株培养至适当的细胞密度之后，通过适当的方式(如温度变化或化学诱导)诱导选定的启动子，并将细胞再培养一段时间。

一般通过离心收获细胞，通过物理或化学方法破碎细胞，保留所得的粗提取物以进一步纯化。

通过包括冷冻-融化循环，超声处理，机械破碎，或使用细胞裂解剂等在内的任何便利方法可破碎用于表达蛋白质的微生物细胞，这些方法是本领域技术人员所熟知的。

可使用多种哺乳动物细胞培养系统来表达重组蛋白，哺乳动物表达系统的例子包括 Gluzman，细胞， 23:175(1981)所述的猴肾成纤维细胞 COS-7 系，以及能表达可容性载体的其它细胞系，如 C127， 3T3， CHO， HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体可含有复制起点，合适的启动子和增强子，和任何必需的核糖体结合位点，聚腺苷酸化位点，剪接供体和受体位点，转录终止序列，和 5'侧翼的非转录序列。可使用得自 SV40 剪接和聚腺苷酸化位点的 DNA 序列提供所需的非转录的遗传元件。

通过包括硫酸铵或乙醇沉淀，酸提取，阳离子或阴离子交换层析，磷酸纤维素层析，疏水作用层析，亲和层析，羟基磷灰石层析和凝集素层析等的方法从重组细胞培养物中回收和纯化 KGF-2 多肽。必要时，可进行蛋白质的重折叠步骤来完成成熟蛋白质的构型。最后，可使用高效液相层析(HPLC)完成最终的纯化步骤。

本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或化学合成方法的产物，或由原核或真核宿主(如培养中的细菌，酵母，高等植物，昆虫和哺乳动物细胞)通过重组技术产生。取决于重组生产方法中所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，也可以是非糖基化的。本发明的多肽也可以包括起始甲硫氨酸氨基酸残基。

KGF-2 的诊断和治疗应用

下文章节中所用的“KGF-2”是指本文所述的全长和成熟形式的 KGF-2，以及本文所述的 KGF-2 类似物，衍生物和突变体。本发明也涉及将 KGF-2 基因用作诊断试验的一部分以检测与 KGF-2 核酸序列中存在突变有关的疾病或对所述疾病的易感性。

可通过多种技术在 DNA 水平上检测 KGF-2 基因内携有突变的个体。用于诊断的核酸可得自病人的细胞，如血液，尿，唾液，组织活检和尸检材料。可直接将基因组 DNA 用于检测，或在分析前，通过使用 PCR(Saiki 等，自然，324:163-166(1986))酶促扩增基因组 DNA。也可将 RNA 或 cDNA 用于相同目的。例如，可使用与编码 KGF-2 的核酸互补的 PCR 引物来鉴定和分析 KGF-2 突变。例如，通过比较扩增产物与正常基因型在大小上的变化可检测出缺失和插入。通过将已扩增的 DNA 与经放射性标记的 KGF-2 RNA，或者经放射性标记的 KGF-2 反义 DNA 序列杂交可鉴定出点突变。通过 RNA 酶 A 消化或通过解链温度的差异可将完全匹配的序列与错配的双螺旋区分开。

通过在含或不含变性剂的凝胶上检测 DNA 片段电泳迁移率的变化可进行基于 DNA 序列差异的基因试验。通过高分辨率的凝胶电泳肉眼可见小序列缺失和插入。在变性的甲酰胺梯度凝胶上可区分不同序列的 DNA 片段，在所述凝胶中，根据不同 DNA 片段特殊的解链或部分解链温度，其迁移率被阻滞在凝胶的不同位置(例见 Myers 等，科学，230: 1242(1985))。

通过如 RNA 酶和 S1 保护作用的核酶保护试验或化学裂解方法(如 Cotton 等，PNAS，USA，85:4397-4401(1985))也可揭示特定位置处的序列变化。

因此，通过诸如杂交， RNA 酶保护作用，化学裂解，直接 DNA 测序或使用限制性酶(如限制性片段长度多态性(RFLP))和基因组 DNA 的 Southern 印迹之类的方法可检测特定的 DNA 序列。

除了更常规的凝胶电泳和 DNA 测序外，也可通过原位分析来检测突变。

本发明也涉及用于检测各种组织中 KGF-2 蛋白水平之变化的诊断测定，因为相对于正常的对照组织样品而言，该蛋白质的过量表达可检测疾病或对疾病的易感性的存在，所述疾病如肿瘤。用于检测得自宿主的样品中 KGF-2 蛋白水平的试验是本领域技术人员熟知的，这些方法包括放射性免疫测定，竞争结合测定， Western 印迹分析，ELISA 测定和“夹心”测定。ELISA 测定(Coligan 等，免疫学最新方法， 1(2)，第 6 章，(1991))起初包括制备特异于 KGF-2 抗原的抗体，优选为单克隆抗体。另外还制备抗该单克隆抗体的报道抗体。报道抗体上结合有可检测的试剂，如放射活性，荧光标记或，在此例中为辣根过氧化物酶。从宿主体内取样，将样品置于能与样品中蛋白质结合的固相支持物，如聚苯乙烯盘上保温。然后通过与非特异性蛋白质如牛血清白蛋白一起保温以覆盖盘上任何游离的蛋白质结合位点，接着，使单克隆抗体与聚苯乙烯盘上结合的任何 KGF-2 蛋白结合。用缓冲液洗去所有未结合的单克隆抗体。此时将与辣根过氧化物酶连接的报道抗体置于盘中，使报道抗体与结合于 KGF-2 的任何单克隆抗体结合，然后洗去未结合的报道抗体。在盘中加入过氧化物酶底物，当与标准曲线相比时，在给定时间内显色的量即为给定体积的病人样品中存在的 KGF-2 蛋白的量的测量结果。

也可使用竞争性测定，其中特异于 KGF-2 的抗体与固相支持物结合，将经标记的 KGF-2 和得自宿主的样品在固相支持物上穿过，通过例如液体闪烁层析检测到的标记物的量与样品中 KGF-2 的量相关。

“夹心”试验类似于 ELISA 测定，在“夹心”测定中， KGF-2 穿过固相支持物，并与固相支持物上结合的抗体相结合。然后使第二抗体与 KGF-2 结合。然后使特异于第二抗体的经标记的第三抗体穿过

固相支持物并与第二抗体结合，再确定量的大小。

可将所述多肽，其片段或其它衍生物，或它们的类似物，或表达它们的细胞用作免疫原以产生其抗体。这些抗体可以是例如多克隆或单克隆抗体。本发明也包括嵌合的、单链的、人源化的抗体以及 Fab 片段或 Fab 表达文库的产物。可使用本领域中已知的多种方法产生这种抗体和片段。

通过将所述多肽直接注射至动物体内或通过给动物，优选为非人类动物施用所述多肽可得到针对对应于本发明序列的多肽而产生的抗体。然后，如此得到的抗体会结合多肽自身。按此方法，甚至仅编码多肽一个片段的序列也可用于产生能结合整个天然多肽的抗体。然后可将这种抗体用于从表达所述多肽的组织中分离该多肽。

为了制备单克隆抗体，可使用能提供通过连续细胞系培养物产生的抗体的任何技术。例如杂交瘤技术(Kohler & Milstein ，自然，256:495-497(1975))， trioma 技术，人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等，今日免疫学， 4:72(1983))和用于产生人单克隆抗体的 EBV 杂交瘤技术(Cole 等，单克隆抗体和癌症疗法， Alan R. Liss， Inc， p77-96 (1985))。

经描述用于产生单链抗体的技术(美国专利 4,946,778)也适于产生针对本发明免疫原性多肽产物的单链抗体。也可使用转基因小鼠表达针对本发明免疫原性多肽产物的人源化抗体。

可使用本发明多肽刺激新血管的生长或血管生成。尤其是，本发明的多肽可刺激角质形成细胞的细胞生长和增殖。因此，本发明提供了将这种多肽，或编码这种多肽的多核苷酸用于治疗目的的方法，所述治疗目的如刺激上皮细胞增殖和基底的角质形成细胞以使创伤愈合，以及刺激毛囊产生和治愈真皮创伤。

如上所述，本发明的多肽可用来通过刺激上皮细胞增殖而治愈真皮创伤。这些创伤可以是浅表的，也可以是很深并涉及皮肤之真皮和表皮的损害。因此，本发明提供了促进创伤愈合的方法，所述方法包括给个体施用有效量的 KGF-2 。

施用 KGF-2 的个体可以是能以正常的速率治愈创伤，也可以是愈合受损。当给愈合未受损的个体施用时，施用 KGF-2 可加快正常的愈合过程。当给愈合受损的个体施用时，施用 KGF-2 便于创伤的愈合，否则的话，创伤愈合将很缓慢或根本不愈合。如下文所述，很多痛苦和疾病可导致愈合受损。这些痛苦和疾病包括糖尿病(如 II 型糖尿病)，同时用类固醇和其它药剂治疗，和局部缺血障碍或受伤。已表现出损害创伤愈合的类固醇包括可的松，氢化可的松，地塞米松和甲基氢化泼尼松。

非类固醇类化合物，如奥曲肽乙酸盐已表现出会损害创伤愈合。Waddell， B.等，美国外科手术， 63:446-49(1997)。据信本发明可促进受这种非类固醇药剂治疗的个体的创伤愈合。

多种生长因子已显示出可促进愈合受损之个体的创伤愈合，例见 Steed, D 等， J. Am. Coll. Surg， 183:61-64(1996); Richard, J 等，糖尿病养护（ Diabetes Care ）， 18:64-69(1995); Steed, D.， J. Vasc. Surg ， 21:71-78(1995); Kelley, S 等， Proc. Soc. Exp. Biol.， 194:320- 326(1990)。这些生长因子包括生长激素释放因子，血小板衍生的生长因子，和碱性的成纤维细胞生长因子。因此，本发明也包括联合施用 KGF-2 和一种或多种可促进创伤愈合的其它生长因子或其它药剂。

本发明也提供了促进以正常速率愈合创伤和愈合受损的两种个体中吻合愈合和由外科手术导致的其它创伤的愈合的方法。所述方法包括在吻合术或其它外科手术之前，之后和/或过程中给个体施用有效量的 KGF-2 。吻合是两个管状结构的连接，例如，当中间一段肠被除去，剩下的部分相互连接以重新构成肠道时即会发生吻合。与皮肤愈合不同，吻合伤口的愈合过程一般看不清楚。另外，至少胃肠道中的创伤愈合在无并发症的情况下可快速发生；然而，并发症经常需要由额外的外科手术来纠正， Thornton, F 和 Barbul, A ，北美外科手术及临床（ Surg. Clin. North Am.）， 77:549-573(1997)。如实施例 21 和 28 所示，结肠吻合术后用 KGF-2 治疗可导致腹膜泄漏和吻合收缩现象显

著减少。据信 KGF-2 是通过加快愈合进程从而降低因这种进程引发的并发症发生概率，而导致这些结果的。

因此，本发明也提供了在以正常速率愈合创伤或愈合受损的个体中于吻合术或其它外科手术后加快创伤愈合的方法，所述方法包括施用有效量的 KGF-2 。

也可使用本发明的多肽刺激细胞的分化，所述细胞如肌肉细胞，组成神经组织的细胞，前列腺细胞和肺细胞。

KGF-2 可在临床上用于在正常个体和患有会诱导不正常的创伤愈合之疾病的个体中刺激创伤的伤口愈合，所述创伤包括外科伤口，切除术的伤口，涉及真皮和表皮损伤的深层创伤，眼组织创伤，牙组织创伤，口腔创伤，糖尿病患者的溃疡，皮肤溃疡，肘溃疡，动脉溃疡，静脉停滞溃疡，因暴露于热或化合物引起的灼伤，所述疾病如尿毒症，营养不良，维生素缺乏症，肥胖症，感染，免疫抑制和与用类固醇，放射疗法，抗肿瘤药物和抗代谢物全身性治疗相关的并发症。 KGF-2 可被用于促进与局部缺血和局部缺血损伤相关之创伤的愈合，所述创伤如由静脉循环系统回流受损和/或不足导致的慢性静脉腿溃疡。

也可使用 KGF-2 来促进皮损伤后的皮重建。另外，也可使用 KGF-2 来增加表皮的抗张强度和表皮厚度。

也可使用 KGF-2 来增加皮肤移植物与创伤床的粘附性，并刺激创伤床处重新形成上皮。下文列出了可使用 KGF-2 增加其与创伤床的粘附性的移植物类型：自体移植物，人工皮肤，同种移植物，自体真皮移植物，自体表皮移植物，无血管移植物， Blair-Brown 移植物，骨移植物，胚胎期形成的移植物，皮肤移植物，延迟的移植物，真皮移植物，表皮移植物，筋膜移植物，全层皮移植片，异源移植物，异种移植物，同种移植物，增生性移植物，角膜薄层移植物，网眼移植物，粘膜移植物， Ollier-Thiersch 移植物，网膜移植物，补片移植物，蒂移植物，全层角膜移植物，分层皮移植片，厚分层皮移植片。可使用 KGF-2 促进皮肤强度并改善老化皮肤的外观。

据信 KGF-2 也可使肝细胞的增殖，和肺，乳房，胰腺，胃，小肠

和大肠中的上皮细胞的增殖产生变化。KGF-2 可促进如皮脂细胞，毛囊，肝细胞，II 型肺细胞，产生粘蛋白的杯状细胞之类的上皮细胞，和其它上皮细胞以及皮肤，肺，肝脏，肾脏和胃肠道中所含的它们的祖细胞的增殖。因此，KGF-2 可刺激肝细胞的增殖和分化，故 KGF-2 可被用来缓解或治疗肝脏疾病和如由肝硬变引起的暴发性肝脏疾病，由病毒性肝炎和毒性物质(即扑热息痛，四氯化碳和现有技术中已知的其它肝毒素)引起的肝损害的病理状态。也可使用 KGF-2 来刺激或促进肝脏的再生。

也可使用 KGF-2 来降低由病毒感染的治疗，放射疗法，化学疗法或其它治疗引起的肠毒性副作用。KGF-2 对小肠粘膜具有细胞保护性作用。KGF-2 也可预防性地或治疗性地用于预防或减少因化学疗法，其它药剂和病毒感染引起的粘膜炎并刺激粘膜炎(如口腔，食管，肠，结肠，直肠和肛门溃疡)的愈合。因此，本发明也提供了预防或治疗粘膜疾病或病理学事件的方法，所述疾病或病理学事件包括溃疡性结肠炎，Crohn's 疾病和粘膜被损害的其它疾病，所述方法包括施用有效量的 KGF-2 。类似地，本发明也提供了预防或治疗口腔(包括与咽和咽下部粘膜损伤相关的吞咽疼)，食管，胃，肠，结肠和直肠粘膜炎的方法，而不论导致所述损害的药剂或用药方式如何。

KGF-2 也可促进内皮细胞，角质形成细胞和基底角质形成细胞的增殖，因此，本发明也提供了刺激所述细胞类型增殖的方法，所述方法包括使细胞与有效量的 KGF-2 接触。也可给个体施用有效量的 KGF-2 以体内刺激细胞增殖，或使 KGF-2 在体外与这种细胞接触。

本发明也提供了促进泌尿道上皮愈合的方法，所述方法包括给个体施用有效量的 KGF-2，因此，本发明提供了加速泌尿道上皮愈合或治疗多种涉及泌尿道上皮细胞(即沿着尿道排列的细胞)的病理学的方法。包括导管插入术，外科手术，或细菌感染(如被可导致性传播疾病，如淋病的致病因子感染)的多种机制均可能损害到含有这种细胞的组织层。

本发明也包括促进雌性生殖道组织愈合的方法，所述方法包括施

用有效量的 KGF-2。包括念珠菌感染，滴虫病，加德纳属菌感染，淋病，衣原体，支原体感染和其它性传播疾病的多种疾病可导致雌性生殖道的组织损伤。

如实施例 10，18 和 19 所示，KGF-2 可刺激表皮角质形成细胞增殖和增加表皮厚度。因此，在完整皮肤的再生；全层皮和部分厚度皮肤的缺陷，包括烧伤(即毛囊，汗腺和皮脂腺的重新分群)；和对如牛皮癣之类的其它皮肤缺陷的治疗时可使用 KGF-2。

KGF-2 也可通过加速损害部位重新形成上皮而用于治疗大疱性表皮松解，该病是上皮与其下面的真皮的粘附性缺陷，可导致经常性的破溃和疼痛的水疱。KGF-2 也可用于治疗胃和十二指肠溃疡，并可协助更快速地在粘膜衬里处愈合和使腺粘膜和十二指肠粘膜衬里再生而帮助溃疡处愈合。如 Crohn's 病和溃疡性结肠炎等炎性肠疾病分别是导致小肠或大肠粘膜表面被破坏的疾病。因此，KGF-2 也可用于促进粘膜表面重新形成表面，目的是更快速地愈合并阻止炎性肠疾病的进程。预期 KGF-2 治疗对整个胃肠道的粘膜产生具有显著的作用，可被用来保护肠粘膜使之免受被摄入的或外科手术后的有害物质的影响。如上所述，也可使用 KGF-2 来促进肠或结肠吻合术的愈合。KGF-2 也可用于治疗与 KGF-2 的表达不足有关的疾病。

另外，KGF-2 也可用于预防和治愈因多种病理学状态引起的对肺的损伤。作为一个生长因子，KGF-2 可刺激增殖和分化并促进肺泡和支气管上皮的修复以预防，缓解或治疗急性或慢性肺损伤。例如，KGF-2 可有效地治疗会导致肺泡渐进性损失的肺气肿，和由吸烟和烧伤引起的、可导致支气管上皮和肺泡坏死的吸入剂损伤。KGF-2 也可用于刺激 II 型肺细胞的增殖和分化，这有助于治疗或预防如透明膜疾病之类的疾病，所述透明膜疾病比如有婴儿呼吸窘迫综合征和不成熟儿的支气管肺发育异常。

导致急性肾衰竭的三个原因是肾前的(如心衰竭)，内源性的(由化学治疗剂诱导的肾中毒性)和肾后的(如尿道阻塞)，这些原因可导致肾小管细胞死亡，小管腔阻塞，和滤液回流至肾小球中(参见 Thadhani

等，新英格兰医学杂志， 334:1448-1460(1996))。如胰岛素类生长因子 I，成骨蛋白-1，肝细胞生长因子和表皮生长因子等的生长因子已显示出具有改善动物模型中肾疾病的潜力。 Taub 等，细胞因子， 5:175-179(1993); Vukicevic 等， J. Am. Soc. Nephrol， 7:1867(1996)。KGF-2 也可刺激肾细胞的增殖和分化，因此可用于缓解或治疗如急性和慢性肾衰竭和晚期肾疾病之类的肾疾病和病理学。

KGF-2 也可刺激乳腺组织的增殖和分化，因此可用于促进因外科手术，外伤或癌症所致的乳腺组织损伤的愈合。

另外，也可使用 KGF-2 治疗或预防糖尿病的发作。在刚被诊断为 I 型和 II 型糖尿病，但仍维持有一些胰岛细胞功能的病人中，可使用 KGF-2 来维持胰岛功能从而缓解，延迟或防止疾病的永久表现。KGF-2 也可被用作胰岛细胞移植过程中的辅助物以改善或促进胰岛细胞的功能。

另外， KGF-2 的抗炎症特性对于治疗其中炎症是主要致病原因的急性和慢性疾病是有利的，所述疾病包括但不限于牛皮癣，湿疹，皮炎和/或关节炎。因此，本发明提供了预防或减轻个体中炎症和涉及炎症之疾病的方法，所述方法包括施用有效量的 KGF-2 。

也可使用 KGF-2 促进因外伤，外科手术或化学药品所致损伤导致的脑组织损伤的愈合并缓解所述脑组织损伤。

另外，由于 KGF-2 可增加表皮的厚度，因此可使用该蛋白质改善老化的皮肤，减少皮肤皱纹，减少外科手术后的疤痕。创伤组织的疤痕经常涉及真皮成纤维细胞的过度增殖。如实施例 10 所示， KGF-2 不刺激成纤维细胞的增殖，因此， KGF-2 似乎是特异于表皮角质形成细胞的有丝分裂原，并可诱导创伤愈合，同时形成最少量的疤痕。因此，本发明提供了促进创伤愈合，同时形成最少疤痕的方法，所述方法包括给个体施用有效量的 KGF-2 。可在产生创伤的过程(如美容外科手术，偶发的或由利器导致的蓄意的组织外伤)之前，之中和/或之后施用 KGF-2 。

如上所述， KGF-2 也可刺激角质形成细胞和毛囊的增殖，因此，

可使用 KGF-2 促进秃头和毛发移植病人中毛发的生长。因此，本发明进一步提供了促进毛发生长的方法，所述方法包括施用足以刺激毛囊产生的量的 KGF-2 。

本发明也提供了保护个体免受电离辐射，化学疗法或抗病毒剂治疗之影响的方法，所述方法包括施用有效量的 KGF-2 。本发明另外还提供了治疗因暴露于电离辐射，化学治疗剂或抗病毒剂所致的组织损害的方法，所述方法包括施用有效量的 KGF-2 。个体可能因很多原因而暴露于电离辐射，这些原因包括治疗目的(如治疗过度增殖性疾病)，放射性同位素偶然地释放至环境中的结果，或非侵害性医学诊断方法(如 X 射线)过程中所致。另外，相当一部分个体在其工作地点和家中暴露于放射性氡中。长期连续的环境暴露已被用于计算估计寿命下降的估计值， Johnson, W 和 Kearfott, K ，健康物理学， 73:312-319(1997)。如实施例 23 所示，本发明的蛋白质可增强暴露于辐射之动物的存活，因此，可使用 KGF-2 增强遭受辐射诱导之损伤的个体的存活率，保护个体使之免受亚致死剂量辐射的影响，在治疗如过度增殖疾病的病痛时增加辐射的治疗率。

也可使用 KGF-2 保护个体使之耐受正常情况下不能耐受的辐射，化学治疗药物或抗病毒剂的剂量。当以此方式使用时，或要不然的话按本文所述使用时，可在辐射治疗/暴露，化学疗法或用抗病毒剂治疗之前，之后和/或之中施用 KGF-2 。当治疗患有如过度增殖性疾病的晚期病痛的个体时，大剂量的辐射和化学治疗剂特别有用。

另一方面，本发明提供了预防或治疗如辐射诱导的口腔和胃肠道损伤，粘膜炎，肠纤维变性，直肠炎，辐射诱导的肺纤维变性，辐射诱导的肺炎，辐射诱导的胸膜后缩，辐射诱导的生血综合征，辐射诱导的骨髓中毒性之疾病的方法，所述方法包括给个体施用有效量的 KGF-2 。

KGF-2 可单独使用，也可与一种或多种能赋予抗辐射之保护作用的其它药剂或其它药剂联合使用。多种细胞因子(如 IL-1 ， TNF ， IL-6 ， IL-12)已显示出可赋予这种保护作用，例见 Neta, R.等，实验

医学杂志， 173:1177(1991)。另外， IL-11 显示出可保护经辐射和化学疗法联合处理后的小肠粘膜细胞(Du, X. X.等，血液， 83:33(1994))和辐射诱导的胸损伤(Redlich, C. A.等，免疫学杂志， 157:1705-1710(1996))。几种生长因子已显示出可赋予针对辐射暴露的保护作用，如成纤维细胞生长因子和转化生长因子β-3， Ding, I.等，肿瘤学报， 36:337-340(1997); Potten, C 等，英国癌症杂志， 75:1454-1459(1997)。

本文所用的“个体”是指动物，优选指哺乳动物(如类人猿，奶牛，马，猪，公猪，绵羊，啮齿动物，山羊，狗，猫，鸡，猴，兔，雪貂，鲸，海豚)，更优选指人。

通常，使用 KGF-2 编码氨基酸 1 至 35 或 36 的信号序列，通过杂交和/或计算机检索的算法规则来鉴定分泌的蛋白质。

可使用 KGF-2 的核苷酸序列通过杂交来分离 5'序列，然后将含有受其天然启动子/增强子序列控制的 KGF-2 基因的质粒用于体外研究，目的是鉴定出 KGF-2 基因表达的内源性细胞的和病毒的反式激活蛋白。

在设计用于鉴定对 KGF-2 受体起作用的肽模拟物的实验中，也可将 KGF-2 蛋白用作阳性对照。

根据本发明的另一方面，提供了将这种多肽、或编码这种多肽的多核苷酸用于与科学研究、 DNA 合成和 DNA 载体的制备相关的体外目的和提供人类疾病之诊断和治疗的目的的方法。

全长 KGF-2 基因的片段可用作 cDNA 文库的杂交探针以分离全长的 KGF-2 基因和分离与所述基因具有高度序列相似性或相似的生物活性的其它基因。这种类型的探针一般至少具有 20 个碱基，然而，优选探针具有至少 30 个碱基，尽管探针可含有更多个碱基，但一般不超过 50 个碱基。所述探针可被用来鉴定对应于全长转录本的 cDNA 克隆和含有包括调节和启动子区域，外显子和内含子的完整 KGF-2 基因的基因组克隆。一个筛选的例子包括通过使用已知的 DNA 序列合成寡核苷酸探针而分离 KGF-2 基因的编码区。使用具有与本发明基因互补的序

列的经标记的寡核苷酸筛选人 cDNA 文库，基因组 DNA 文库或 cDNA 文库以确定探针与文库的哪些成员杂交。

本发明还提供了鉴定 KGF-2 多肽之受体的方法。通过本领域技术人员已知的多种方法，例如配体淘选和 FACS 分选(Coligan 等，免疫学最新方法， 1(2)，第 5 章(1991))可鉴定出编码该受体的基因。优选进行的表达克隆中聚腺苷酸化的 RNA 制备自对多肽反应的细胞，由此 RNA 产生的 cDNA 文库被分成若干群，并被用于转染 COS 细胞或对多肽不反应的其它细胞。将在玻璃载玻片上生长的经转染细胞暴露于经标记的多肽中。可通过包括位点特异性蛋白激酶之识别位点的碘化作用或包含作用等的多种方式标记所述多肽。固定和保温之后，对载玻片进行放射自显影分析。鉴定阳性群，制备亚群，使用重复的亚分群和重新筛选的方法重新转染，最终产生编码推定受体的单一克隆。

作为受体鉴定的另一可替代方法，经标记的多肽可与表达受体分子的细胞膜或提取物制品进行光亲和连接。通过 PAGE 分析分辨交联的物质，并将所述物质暴露于 X-射线胶片。切下含有多肽受体的经标记复合物，分离成肽片段，并进行蛋白质微量测序。使用得自微量测序的氨基酸序列设计一套简并的寡核苷酸探针以筛选 cDNA 文库从而鉴定出编码推定受体的基因。

本发明提供了筛选化合物以鉴定出可激发 KGF-2 作用或阻断 KGF-2 功能的那些化合物的方法。这种测定的一个例子包括在角质形成细胞可正常增殖的细胞培养条件下，将哺乳动物角质形成细胞，欲筛选的化合物和 ^{3}[H]胸苷相混合。可在缺乏欲筛选的化合物的情况下进行对照试验，并与存在欲测定之化合物时角质形成细胞增殖的量相比较以确定该化合物是否可刺激角质形成细胞的增殖。

为了筛选拮抗剂，可在 KGF-2 存在下进行相同的试验，测定该化合物阻止角质形成细胞增殖的能力，并测定拮抗剂的能力。通过测定 ^{3}[H]胸苷掺入的液体闪烁层析确定角质形成细胞增殖的量。

在另一种方法中，可在化合物存在下将表达 KGF-2 受体的哺乳动物细胞或膜制品与经标记的 KGF-2 一起保温，然后测定化合物增强或

阻断此相互作用的能力。或者，在存在或缺乏该化合物的情况下测定和比较 KGF-2 和受体间相互作用后已知的第二信使系统的反应。这种第二信使系统包括但不限于 cAMP 鸟苷酸环化酶，离子通道或磷酸肌醇水解。

潜在的 KGF-2 拮抗剂的例子包括能与该多肽结合的抗体，或者有时为寡核苷酸。或者，潜在的 KGF-2 拮抗剂可以是 KGF-2 突变体形式，该突变体形式能与 KGF-2 受体结合，但不引发产生第二信使反应，因此，有效地阻断了 KGF-2 的作用。

另一潜在的 KGF-2 拮抗剂是使用反义技术制备的反义构建体。可使用反义技术通过三股螺旋的形成或者反义 DNA 或 RNA 来控制基因表达，这两种方法均基于多核苷酸与 DNA 或 RNA 的结合。例如，使用编码本发明成熟多肽的多核苷酸序列 5'编码部分设计长度约为 10 至 40 个碱基对的反义 RNA 寡核苷酸。DNA 寡核苷酸被设计成与涉及转录的基因区域互补(三股螺旋，例见 Lee 等，核酸研究， 6:3073(1979); Cooney 等，科学， 241:456(1988)；和 Dervan 等，科学，251:1360(1991))，从而防止转录和产生 KGF-2 。反义 RNA 寡核苷酸在体内与 cDNA 杂交并阻断 cDNA 分子翻译成 KGF-2 多肽(反义-Okano ，神经化学杂志， 56:560(1991); 作为基因表达的反义抑制剂的寡脱氧核苷酸， CRC 出版社， Boca Raton ， FL(1988))。上述寡核苷酸也可提供给细胞以在体内表达反义 RNA 或 DNA ，从而抑制 KGF-2 的产生。

潜在的 KGF-2 拮抗剂包括结合并占用 KGF-2 受体的结合位点从而使受体无法接近 KGF-2 ，进而其正常的生物学功受到抑制的小分子，这种小分子的例子包括但不限于小肽或肽类分子。

也可使用 KGF-2 拮抗剂抑制对肿瘤中新血管生长或血管生成的诱导。由 KGF-2 刺激的血管生成对也可由本发明拮抗剂治疗的几种病理状况同样可起一定的作用，所述病理状况包括糖尿病性视网膜病，和对病理组织生长的抑制，如类风湿性关节炎。

也可使用 KGF-2 拮抗剂治疗肾小球肾炎，肾小球肾炎的特征在于

肾小球上皮细胞显著增殖，形成充满 Bowman 间隙的细胞团块。

也可使用拮抗剂来抑制外科手术后疤痕疙瘩形成中可见的疤痕组织的过量产生，心肌梗死后的纤维变性或与肺纤维变性和再狭窄相关的纤维损害。也可使用 KGF-2 拮抗剂治疗由 KGF-2 刺激的其它增殖性疾病，包括癌症和卡波西肉瘤。

也可使用 KGF-2 拮抗剂治疗角膜炎，所述角膜炎是特征在于表皮细胞增殖的眼色素层炎症对角膜深层的慢性浸润。

也可在具有下文所述的药学可接受的载体的组合物中使用拮抗剂。

可将本发明的多肽，激动剂和拮抗剂与适当的药用载体联合使用以制成药物组合物。这种组合物含有治疗有效量的多肽，激动剂或拮抗剂和药学可接受的载体或赋形剂。所述载体包括但不限于盐水，缓冲盐溶液，葡聚糖，水，甘油，乙醇及其联合。制剂应适合施用的模式。

本发明也提供了含有一个或多个被本发明药物组合物的一种或多种成分充满的容器的药物包装或试剂盒。随容器所附的是管理药品或生物制品的制备，应用或销售的政府机构建议形式的注意事项，该注意事项反映有关人用药的制备，应用或销售得到了该机构的许可。另外，也可将本发明的多肽，激动剂和拮抗剂与其它治疗性的化合物一起使用。

具有 KGF-2 活性的多肽可在药物组合物中与一种或多种药学可接受的赋形剂联合施用。应理解当施用于人患者时，护理医生在正确的医学判断范围内可决定本发明药物组合物每天的总用量。任何具体患者的特定治疗有效剂量水平取决于多种因素，包括欲达到的反应的类型和程度，所用其它药剂的特殊组合(如果有的话)；患者的年龄，体重，健康状况，性别和饮食；施用的时间，施用的途径和组合物外泌的速率；治疗的期限；与特定组合物联合或同时使用的药物(如化学治疗剂)；和医学领域众所周知的其它因素。本领域已知的适当制剂见于 Remington's Pharmaceutical Sciences(最新版)， Mack 出版公司，

Easton， PA。

考虑到各个患者的临床条件(尤其是仅用 KGF-2 治疗时的副作用)， KGF-2 组合物释放的位点，施用的方法，施用的计划和实际操作人员已知的其它因素，以与良好的医学实践一致的方式配制和服用治疗所用的 KGF-2 组合物。因此，通过上述考虑可确定用于本文目的的“有效量”的 KGF-2(包括 KGF-2 有效量)。

可以简便的方式，如口服，局部，静脉内，腹膜内，肌内，动脉内，皮下，鼻内或皮内途径施用所述药物组合物。所施用药物组合物的量应能有效地治疗和/或预防特异性的指征。在大多数情况下，考虑到施用的途径，症状等，每天的剂量为每公斤体重约 1 微克至 50 毫克。在局部给药的特殊情况下，优选施用的剂量约为每平方厘米 0.01 微克至 9 毫克。

尽管如上所述，可在治疗上斟酌剂量，但一般建议每份更优选的剂量中胃肠外施用的 KGF-2 总的药物有效量范围为每天每公斤患者体重 1 微克至 100 毫克。如果连续给药，一般以约 1 微克/公斤/小时至 50 微克/公斤/小时的剂量速率，通过每天 1-4 次注射，或者通过使用例如微泵连续地皮下灌注来施用 KGF-2。也可使用静脉内袋装溶液或瓶状溶液。

如果持续天数大于某一最小数目(对小鼠而言为 7 天)，影响纤维蛋白溶解系统的 KGF-2 治疗过程似乎是最适的。观察变化所需的治疗时间和治疗后发生反应的间隔长度似乎随所需影响的不同而不同。

通过缓释系统也适于施用 KGF-2。缓释组合物适当的例子包括成形物质形式(如薄膜或微胶囊)的半透性聚合物基质。缓释基质包括聚交酯类(美国专利 3,773,919， EP 58,481)， L-谷氨酸和γ-乙基-L-谷氨酸的共聚物(U. Sidman 等，生物聚合物， 22:547-556 (1983))，聚(2-羟乙基异丁烯酸酯)(R. Langer 等，生物医学材料研究杂志， 15:167-277(1981)，和 R. Langer，化学技术， 12:98-105 (1982))，乙烯乙酸乙烯基酯(R. Langer，文献同上)或聚 D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。缓释的 KGF-2 组合物也包括脂质体包裹的 KGF-2。通过已知方法本

身可制备含有KGF-2的脂质体，所述方法如：DE 3,218,121；Epstein等，美国国家科学院院报，82:3688-3692(1985)；Hwang等，美国国家科学院院报，77:4030-4034(1980)；EP 52,322；EP 36,676；EP 88,046；EP 143,949；EP 142,641；日本专利申请83-118008；美国专利4,485,045和4,544,545；和EP 102,324。一般而言，脂质体是小的(约200-800埃)单层型，其中脂类含量大于类固醇的约30摩尔百分比，调节百分比，以达到最佳的KGF-2治疗。

对于胃肠外施用而言，在一个实施方案中，一般通过将所需纯度水平的KGF-2以单位剂量的可注射形式(溶液，悬浮液或乳剂)与药学可接受的载体混合来配制KGF-2，所述载体在所用剂量和浓度下对受体无毒性，并且与制剂中的其它成分相容。例如，优选制剂不包括氧化剂和已知对多肽有害的其它化合物。

通常通过将KGF-2均匀和密切地与液体载体或精细分开的固体载体或这两者接触可制备制剂。然后，如有必要，将产物制成所需的制剂形状。优选载体是胃肠外载体，更优选为与受体血液等渗的溶液。这种载体的例子包括水，盐水，Ringer's溶液和葡萄糖溶液。如固定油和乙基油酸之类的不含水的载体以及脂质体在本文中也是有用的。本领域中已知的适当的制剂见于Remington's Pharmaceutical Sciences(最新版)，Mack出版公司，Easton，PA。

载体可适当地含有极少量的添加剂，如增强等渗性和化学稳定性的物质。这种物质在所用剂量和浓度下对受体是无毒性的，包括如磷酸盐，柠檬酸盐，琥珀酸，乙酸，和其它有机酸或其盐的缓冲液；如抗坏血酸之类的抗氧化剂；低分子量(少于约10个残基)的多肽，如多精氨酸或三肽；蛋白质，如血清白蛋白，明胶，或免疫球蛋白；亲水性的聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸，谷氨酸，天冬氨酸，或精氨酸；单糖，二糖和包括纤维素或其衍生物，葡萄糖，甘露糖或糊精等的其它碳水化合物；如EDTA之类的螯合剂；如甘露醇或山梨醇之类的糖醇；如钠之类的相反离子；和/或非离子型表面活性剂，如聚山梨酯，聚羟亚烃或PEG。

一般在 pH 约为 3 至 8 的条件下，以约为 0.01 微克/毫升至 100 毫克/毫升，优选为 0.01 微克/毫升至 10 毫克/毫升的浓度在所述载体中配制 KGF-2 。应理解使用上述某些赋形剂，载体或稳定剂会导致 KGF-2 盐的形成。

用于治疗应用的 KGF-2 应是无菌的。通过穿过无菌的滤膜(如 0.2 微米的膜)进行过滤可容易地完成除菌。治疗用的 KGF-2 组合物一般被置于具有无菌出入口的容器中，例如，静脉内溶液袋，或具有可被皮下注射针头穿透的塞子的小瓶。

通常，KGF-2 可作为含水溶液或用于恢复的冻干制剂形式储存在单位剂量或多剂量的容器中，例如，密闭的安瓿瓶或小瓶中。冻干制剂的一个例子是将 5ml 经除菌过滤的 1 %(w/v)含水 KGF-2 溶液灌入 10ml 的小瓶，将所得混合物冻干。通过使用抑菌的注射用水恢复冻干的 KGF-2 可制备灌注溶液。

也可以以患者特异性的方式安排服药以便为血液提供经诸如 RIA 技术测定为预定浓度的 KGF-2 活性。因此，可调节患者的剂量安排以达到经 RIA 测定为以约 50-1000ng/ml，优选为 150-500ng/ml 的浓度规则地不断流过血液的水平。

本发明药物组合物的施用方式有：口服，直肠，胃肠外，脑池内，真皮内，阴道内，腹膜内，局部(通过粉末，软膏，凝胶，乳油，滴剂或经皮的补片)，颊，或口或鼻喷雾给药。“药学可接受的载体”是指无毒性的固体，半固体或液体填充剂，稀释剂，包裹材料或任何形式的制剂辅助物。本文所用的术语“胃肠外”指的是包括静脉内，肌内，腹膜内，胸骨内，皮下和动脉内注射和灌注等的施用模式。

根据本发明，KGF-2 多肽，身为多肽的激动剂和拮抗剂也可通过在体内表达而得以应用，这就是常说的“基因疗法”。

因此，例如，可离体用编码多肽的多核苷酸(DNA 或 RNA)对来自患者的细胞进行改造，然后将经改造的细胞提供给需用该多肽治疗的患者。这种方法是本领域所熟知的方法。例如，可以通过本领域熟知的方法，利用含有编码本发明多肽之 RNA 的逆转录病毒颗粒对细胞进

行改造。

类似地，可通过例如本领域熟知的方法，在体内改造细胞以在体内表达多肽。本领域中已知，可给患者施用能产生含有编码本发明多肽之 RNA 的逆转录病毒颗粒的生产者细胞以在体内改造细胞并在体内表达多肽。鉴于本发明的教导，本领域技术人员可轻易地掌握用来施用本发明多肽的这些和其它方法。例如，用于改造细胞的表达载体不仅可以是逆转录病毒，也可以是腺病毒，所述腺病毒与适当的传递载体联合后可用于在体内改造细胞。其它传递载体的例子包括基于 HSV 的载体系统，腺相关病毒载体，和惰性的载体，如包被有葡聚糖的铁颗粒。

可从中得到上文所述的逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒包括但不限于 Moloney 鼠白血病病毒，脾坏死病毒，如 Rous 肉瘤病毒，Harvey 肉瘤病毒，禽白血病病毒，长臂猿白血病病毒(gibbon ape leukemia virus)，人免疫缺损病毒，腺病毒，骨髓增殖性肉瘤病毒，和乳癌病毒。在一个实施方案中，逆转录病毒质粒载体得自 Moloney 鼠白血病病毒。

载体包括一个或多个启动子，可以使用的适当的启动子包括但不限于逆转录病毒的 LTR； SV40 启动子；和人巨细胞病毒(CMV)启动子(Miller 等，生物技术，第 7 卷， 9:980-990(1989))或任何其它的启动子(例如细胞启动子，如包括但不限于组蛋白， polIII 和β-肌动蛋白启动子等的真核细胞启动子)。可使用的其它病毒启动子包括但不限于腺病毒启动子，胸苷激酶(TK)启动子，和 B19 细小病毒启动子。鉴于本文的教导，合适启动子的选择对于本领域技术人员而言是显而易见的。

编码本发明多肽的核酸序列受适当启动子的控制。可使用的适当启动子包括但不限于腺病毒启动子，如腺病毒主要晚期启动子；或异源启动子，如巨细胞病毒(CMV)启动子；呼吸道合胞病毒(RSV)启动子；诱导型启动子，如 MMT 启动子，金属硫蛋白启动子；热休克蛋白启动子；白蛋白启动子； ApoAI 启动子；人珠蛋白启动子；病毒胸

苷激酶启动子，如单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子；逆转录病毒 LTR(包括上文所述的经修饰的逆转录病毒 LTR)；β-肌动蛋白启动子；和人生长激素启动子。启动子也可以是控制编码所述多肽之基因的天然启动子。

可使用逆转录病毒质粒载体转导包装细胞系以形成生产者细胞系。可被转染的包装细胞系的例子包括但不限于 PE501， PA317，ψ-2，ψ-AM， PA12， T19-14X， VT-19-17-H2，ψCRE，ψCRIP，GP+E-86， GP+envAm12 和 Miller，人基因疗法， 1:5-14(1990)(全文列入本文作为参考文献)中所述的 DAN 细胞系。载体可通过本领域已知的任何方法转导包装细胞。所述方法包括但不限于电穿孔，脂质体的应用，和 $CaPO_4$ 沉淀。或者也可将逆转录病毒质粒载体包裹在脂质体中，或与脂类偶联，然后施用于宿主。

生产者细胞系产生含有编码多肽之核酸序列的感染性逆转录病毒载体颗粒。然后可使用这种逆转录病毒载体颗粒在体内或体外转导真核细胞。经转导的真核细胞会表达编码多肽的核酸序列。可被转导的真核细胞包括但不限于胚胎干细胞，胚胎癌细胞以及造血干细胞，肝细胞，成纤维细胞，成肌细胞，角质形成细胞，内皮细胞和支气管上皮细胞。

染色体测定

本发明的序列也可用于染色体鉴定。该序列特异性地靶向并能与各个人染色体上的特定座位杂交。另外，目前迫切需要鉴定染色体上的特定位点。目前可用来标记染色体座标的基于实际序列资料(重复多态性)的染色体标记试剂较少。将那些序列同与疾病相关之基因相联系的重要的第一步是根据本发明将 DNA 作图于染色体上。

简而言之，通过由 cDNA 制备 PCR 引物(优选为 15-25bp)可将序列作图于染色体上。使用 3'非翻译区的计算机分析快速选择引物，所述引物在基因组 DNA 中跨越的区域不超过一个外显子，因而不会使扩增过程变得复杂。然后使用这些引物进行含有各个人染色体的体细胞杂合体的 PCR 筛选。只有那些含有对应于引物的人基因的杂合体会产

生扩增的片段。

体细胞杂合体的 PCR 作图是将特定 DNA 排布于特定染色体上的快速方法。使用相同寡核苷酸引物，通过本发明，可以类似的方法，用得自特定染色体或大基因组克隆库的一系列片段可进行亚定位。可类似地用于作图至其染色体的其它作图策略包括原位杂交，用经标记的流式分选的染色体进行预筛选和通过与构建染色体特异性 cDNA 文库杂交进行预选择。

可使用 cDNA 克隆与中期染色体涂布物的荧光原位杂交(FISH)一步提供精确的染色体定位。短至 50 或 60 个碱基的 cDNA 可使用此技术，有关此技术的综述例见 Verma 等，人类染色体：基本技术手册，Pergamon 出版社，纽约(1988)。

一旦序列被作图于精确的染色体座位，即可将序列在染色体上的物理位置与基因图谱资料相联系，所述资料例见 V. McKusick，人类的孟德尔遗传(可通过约翰霍普金斯大学 Welch 医学图书馆在网上得到)。然后通过连锁分析(物理上相邻的基因的共遗传性)鉴定已作图于相同染色体区域的基因和疾病之间的关系。

接着，必需确定患病和不患病的个体之间 cDNA 或基因组序列的差异。如果在一些或所有患病的个体中观察到突变，而在任何正常的个体中均未观察到突变，那么突变就可能是疾病的引发因子。

最新的物理作图和基因作图技术之分辨力表明，精确定位于与疾病相关之染色体区域的 cDNA 可以是 50 至 500 个潜在的致病基因中的一个(假定作图分辨力为 10^6 个碱基，一个基因为 20kb)。

参照下列实施例进一步描述本发明；然而，应理解本发明并不局限于这些实施例。除非另有说明，所有的部分或量均为重量。

为了便于理解下列实施例，下面将描述一些常见的方法和/或术语。

“质粒”被命名为：首先是小写的 p 和/或接着是大写的字母和/或数字。本文的起始质粒或者是可商购的，公众可不费力地得到的，或者是可根据公知技术由可得到的质粒构建的。另外，与本文所述质

粒等价的质粒是本领域中熟知的，对于本领域技术人员而言是显而易见的。

DNA 的“消化”指的是用仅对 DNA 中的某些序列起作用的限制性酶催化切割 DNA。本文所用的多种限制性酶可以商购，其所用的反应条件，辅因子和其它需求条件是本领域技术人员熟知的。为了进行分析，一般在约 20 微升的缓冲溶液中将 1 微克质粒或 DNA 片段与约 2 个单位的酶一起使用。为了分离 DNA 片段以构建质粒，一般在较大的体积中用 20 至 250 单位的酶消化 5 至 50 微克 DNA。特定限制性酶的适当缓冲液和底物的量由制造商指定。一般是在 37 ℃下保温约 1 小时，但可根据厂商的说明而改变保温时间。消化后，直接在聚丙烯酰胺凝胶上电泳反应产物以分离所需片段。

按 Goeddel, D 等，核酸研究， 8:4057(1980)所述使用 8 % 的聚丙烯酰胺凝胶进行已切割片段的大小分离。

“寡核苷酸”指可以化学合成的一条单链多脱氧核苷酸或两条互补的多脱氧核苷酸链。所述合成的寡核苷酸没有 5'磷酸，因此，在存在激酶的条件下，没有用 ATP 加入磷酸时不能与另一寡核苷酸相连。合成的寡核苷酸可以与未去磷酸化的片段相连。

“连接”指在两个双链核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程(Maniatis, T.等， Id.,p.146)。除非特别说明，每 0.5μg 近似等摩尔量的待连接 DNA 片段，可用已知的缓冲液和条件，用 10 单位 T4 DNA 连接酶(“连接酶”)完成所述连接。

当外源 DNA 已经被导入细胞膜内时，则该细胞已被所述 DNA “转化”。对于构成细胞基因组的染色体 DNA 来说，外源 DNA 可以被整合也可以不被整合(共价连接的)至染色体 DNA 间。例如对于原核生物和酵母而言，外源 DNA 可以保持在附加型元件如质粒上。就真核细胞而言，稳定转化或转染的细胞是其中外源 DNA 已经被整合至染色体中以致可通过染色体复制遗传至子代的细胞。通过真核细胞建立由含外源 DNA 之子代细胞的种群组成的细胞系或克隆的能力可证明这种能力。转化的实例参见 Graham, F.& Van der Eb, A.,病毒学(Virology),52:456-

457(1973)。

“转导”或“转导的”指细胞吸收外源 DNA 并将外源 DNA 整合至它们的染色体中的过程。例如可通过转染(指细胞用以吸收 DNA 的各种技术)或感染(用病毒将 DNA 转移至细胞中)完成转导。

实施例 1

KGF-2 的细菌表达和纯化

将编码 KGF-2 的 DNA 序列 ATCC#75977 首先用 PCR 寡核苷酸引物扩增，所述引物对应于加工过的 KGF-2 cDNA（包括信号肽序列）的 5’和 3’序列。5’寡核苷酸引物含有序列 5’CCCCACATGTGGAAATGGATACTGACACATTGTGCC3’(SEQ ID NO.3)，该序列含有 Afl III 限制酶位点，该位点包括并随后是从推测的起始密码子开始的 KGF-2 编码序列的 30 个核苷酸。3’序列 5’CCCAAGCTTCCACAAACGTTGCCTTCCTCTATGAG3’(SEQ ID NO.4)含有 Hind III 位点的互补序列，随后是 KGF-2 的 26 个核苷酸。这些限制酶位点与细菌表达载体 pQE-60(Qiagen, Inc. Chatsworth, CA)上的限制酶位点相容。pQE-60 编码抗生素抗性(AMp^r)，一个细菌复制起点(ori)，IPTG 调节型启动子操纵子(P/O)，核糖体结合位点(RBS)，6-His 标记和限制酶位点。然后将 pQE-60 用 NcoI 和 HindIII 消化。将扩增的序列连接到 pQE-60 中，并符合读框地插入。然后按照 Sambrook,J.等在分子克隆：实验室操作手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)(冷泉港实验室出版社(1989))中描述的方法，用连接混合物转化大肠杆菌菌株 M15/rep4(Qiagen, Inc.)。M15/rep4 含有多拷贝的质粒 pREP4，该质粒表达 lacI 阻遏物并赋予卡那霉素抗性(Kan^r)。根据其在 LB 平板上的生长能力来鉴定转化体，并筛选出氨苄青霉素/卡那霉素抗性菌落。分离质粒 DNA 并通过限制分析进行鉴定。使含所期望的构建体的克隆在补加了 Amp(100 μ g/ml)和 Kan(25 μ g/ml)的 LB 液体培养基中生长过夜(O/N)。以 1：100 至 1：250 的比例，用 O/N 培养物接种大体积培养基。使细胞生长至光密度 600($O.D.^{600}$)为 0.4-0.6。然后加入 IPTG(异丙

基-B-D-硫代半乳糖苷)达到 1 mM 的终浓度。通过使 lacI 阻遏物失活，IPTG 诱导清理所述 P/O，从而导致基因表达的增加。使细胞再生长 3 至 4 小时。然后通过离心收集细胞。将细胞沉淀溶解于离液剂 6 M 盐酸胍中。澄清后，在可以紧密结合蛋白质的条件下，在肝素亲和柱上通过色谱从该溶液中纯化溶解的 KGF-2(Hochuli, E.等，色谱学杂志，411:177-184(1984))。用高盐缓冲液从该柱上将 KGF-2(75%纯)洗脱下来。

实施例 2

KGF-2 截短变体的细菌表达和纯化

将编码 KGF-2 的 DNA 序列，ATCC#75977 首先用 PCR 寡核苷酸引物扩增，所述引物对应于 KGF-2 多肽之截短变体的 5'和 3'序列。所述截短变体含所述多肽减去所述 36 个氨基酸的信号序列，在构成全长蛋白质氨基酸 37 的半胱氨酸残基前加入一个甲硫氨酸和丙氨酸残基。所述 5'寡核苷酸引物含有序列 5'CATGCCATGGCGTGCCAAGCCCTTGGTCAGGACATG3'(SEQ ID NO：5)，该序列含有 NcoI 限制酶位点，该位点接着 KGF-2 编码序列的 24 个核苷酸。3'序列 5'CCCAAGCTTCCACAAACGTTGCCTTCCTCTATGAG3'(SEQ ID NO：6)含有与 HindIII 位点互补的序列，随后是 KGF-2 基因的 26 个核苷酸。所述限制酶位点与细菌表达载体 pQE-60(Qiagen, Inc. Chatsworth, CA)上的限制酶位点相容。pQE-60 编码抗生素抗性(Amp^r)，一个细菌复制起点(ori)，IPTG 调节型启动子操纵子(P/O)，核糖体结合位点(RBS)，6-His 标记和限制酶位点。然后将 pQE-60 用 NcoI 和 HindIII 消化。将扩增的序列连接到 pQE-60 中，并符合读框地插入。然后按照 Sambrook,J.等在分子克隆：实验室操作手册(冷泉港实验室出版社(1989))中描述的方法，用连接混合物转化大肠杆菌菌株 M15/rep4(Qiagen, Inc.)。M15/rep4 含有多拷贝的质粒 pREP4，该质粒表达 lacI 阻遏物并赋予卡那霉素抗性(Kan^r)。根据其在 LB 平板上的生长能力来鉴定转化体，并筛选出氨苄青霉素/卡那霉素抗性菌落。分离质

粒 DNA 并通过限制分析进行鉴定。使含所需要的构建体的克隆在补加了 Amp(100 μ g/ml)和 Kan(25 μ g/ml)的 LB 液体培养基中生长过夜(O/N)。以 1： 100 至 1： 250 的比例，用 O/N 培养物接种大体积培养基。使细胞生长至光密度 600(O.D.^{600})为 0.4-0.6 。然后加入 IPTG(异丙基-B-D-硫代半乳糖苷)达到 1 mM 的终浓度。通过使 lacI 阻遏物失活，IPTG 诱导清理所述 P/O ，从而导致基因表达的增加。使细胞再生长 3 至 4 小时。然后通过离心收集细胞。将细胞沉淀溶解于离液剂 6 M 盐酸胍中。澄清后，在可以紧密结合蛋白质的条件下，在肝素亲和柱上通过色谱从该溶液中纯化溶解的 KGF-2(Hochuli, E.等，色谱学杂志，411:177-184(1984))。用高盐缓冲液从该柱上将 KGF-2 洗脱下来。

实施例 3

用杆状病毒表达系统克隆并表达 KGF-2

将编码全长 KGF-2 蛋白质的 DNA 序列 ATCC#75977 用 PCR 寡核苷酸引物扩增，所述引物对应于该基因的 5'和 3'序列:

5'引物含有序列 5'GCG*GGATCC*GCCATCATGTGGAAATGGATACTCAC3'(SEQ ID NO： 7)并含有 BamHI 限制酶位点(斜体字)，该位点后接有 6 个核苷酸，所述核苷酸组装成真核细胞中的一个有效翻译起始信号(Kozak, M.,分子生物学杂志， 196:947-950(1987))并正好在 KGF-2 基因的前 17 个核苷酸后(划线部分为翻译起始密码子“ ATG ”)。

3'引物含有序列 5'GCGCGGTACCACAAACGTTGCCTTCCT3'(SEQ ID NO： 8)并含有限制内切酶 Asp718 的切割位点和与 KGF-2 基因之 3'非翻译序列互补的 19 个核苷酸。用市售试剂盒(Qiagen, Inc., Chatsworth, CA)从 1%琼脂糖凝胶上分离扩增的序列。然后将该片段用内切酶 BamHI 和 Asp718 消化，再在 1%琼脂糖凝胶上纯化。将该片段命名为 F2 。

用杆状病毒表达系统(有关综述参见： Summers, M.D. & Smith, G.E., 杆状病毒载体和昆虫细胞培养方法手册(A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures), Texas

Agricultural Experimental Station Bulletin No.1555(1987))，将载体pA2(修饰的 pVL941 载体，下文讨论)用于表达 KGF-2 蛋白质。该表达载体含有苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)的强多角体蛋白启动子，该启动子后接有限制内切酶 BamHI 和 Asp718 的识别位点。将猿猴病毒(SV)40 的聚腺苷酸化位点用于有效的聚腺苷酸化。为了易于筛选重组体病毒，将大肠杆菌的β-半乳糖苷酶基因以与多角体蛋白启动子相同的方向插入，所述启动子后接有多角体蛋白基因的聚腺苷酸化信号。多角体蛋白序列的两侧均有病毒序列，所述病毒序列用于细胞介导的共转染的野生型病毒 DNA 之同源重组。可以用许多其它杆状病毒载体例如 pAc373,pVL941 和 pAcIM1(Luckow, V.A. & Summers, M.D.,病毒学 170:31-39)代替 pRG1 。

将该质粒用限制酶 BamHI 和 Asp718 消化。然后用市售试剂盒(Qiagen, Inc., Chatsworth, CA)从 1%琼脂糖凝胶上分离该 DNA 。将该载体命名为 V2 。

将片段 F2 和质粒 V2 用 T4 DNA 连接酶连接。然后转化大肠杆菌 HB101 ，通过使用两个克隆寡核苷酸的 PCR，鉴定含带 KGF-2 基因之质粒(pBacKGF-2)的细菌。用 DNA 测序确定该克隆片段的序列。

用脂转染法(Felgner 等，美国国家科学院院报，84:7413-7417(1987))将 5 μ g 质粒 pBacKGF-2 与 1.0 μ g 市售线性化杆状病毒(“BaculoGold™ 杆状病毒 DNA ”，Pharmingen, San Diego, CA)共转染。

在含 50μl 无血清 Grace's 培养基(Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD)之微滴定板的无菌孔中，将 1 μ g BaculoGold™ 杆状病毒 DNA 与 5 μ g 质粒 pBacKGF-2 混合。此后，加入 10μl Lipofectin 加 90μl Grace's 培养基，混合并在室温培养 15 分钟。然后将转染混合物滴加至 Sf9 昆虫细胞(ATCC CRL 1711)中，所述 Sf9 昆虫细胞接种于含 1 毫升无血清的 Grace's 培养基的 35 毫米组织培养平板中。将该平板前后摇动以混合新加入的溶液。然后将平板在 27 ℃保温 5 小时。5 小时后，从平板中除去转染溶液，并加入 1 毫升补加了 10%胎牛血清的 Grace's

昆虫培养基。将平板放回至培养箱中，在 27 ℃继续培养 4 天。

4 天后，收集上清液，然后按照与 Summers 和 Smith(出处同前)所述相似的方法完成噬斑试验。作为一种改进，使用含“ Blue Gal ”(Life Technologies Inc., Gaithersburg)的琼脂糖凝胶，这样可以容易分离出蓝色噬斑。(“噬斑试验”的详细描述可参见 Life Technologies Inc.提供的有关昆虫细胞培养和杆状病毒学的用户指南， 9-10 页)。

系列稀释后 4 天，将病毒加到细胞中，用 Eppendorf 取液器的吸头挑出染成蓝色的噬斑。然后将含重组病毒的琼脂重悬在含 200μl Grace's 培养基的 Eppendorf 管中。通过简单离心除去琼脂，利用含重组杆状病毒的上清液来感染接种于 35 毫米平皿中的 Sf9 细胞。 4 天后，收集这些培养平皿的上清液，然后贮存于 4 ℃。

使 Sf9 细胞在补加了 10%热失活的 FBS 的 Grace's 培养基中生长。以感染复数(MOI)2 用重组杆状病毒 V-KGF-2 感染所述细胞。 6 小时后，除去培养基，并换成 SF900II 培养基减甲硫氨酸和半胱氨酸(Life Technologies Inc., Gaithersburg)。 42 小时后，加入 5μCi ^{35}S 甲硫氨酸和 5μCi ^{35}S 半胱氨酸(Amersham)。再培养细胞 16 小时，然后离心收集细胞并通过 SDS-PAGE 和放射自显影肉眼观察被标记上的蛋白质。

实施例 4

大部分用于在哺乳动物细胞中瞬时表达 KGF-2 蛋白质基因序列的载体都应携有 SV40 复制原点。这样在表达 T 抗原的细胞(例如 COS 细胞)中可以复制很多拷贝的载体，所述 T 抗原是启动病毒 DNA 合成所需的。也可将任何其它哺乳动物细胞系用于该目的。

典型的哺乳动物表达载体含有介导 mRNA 转录起始的启动子，蛋白质编码序列和终止转录所需的信号，以及转录本聚腺苷酸化所需的信号。其它元件包括增强子， Kozak 序列，和侧翼是用于 RNA 剪接的供体和受体位点的间插序列。用 SV40 的早期和晚期启动子，逆转录病毒(例如 RSV ， HTLVI ， HIVI ）的长末端重复序列(LTR)和巨细胞病毒(CMV)的早期启动子可达到高效转录。然而，也可以使用细胞信号(例如

人肌动蛋白启动子)。用于实施本发明的适宜的表达载体包括例如 pSVL 和 pMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat(ATCC 37152), pSV2dhfr(ATCC 37146)和 pBC12MI(ATCC 67109)。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人 Hela 细胞, 283 细胞, H9 细胞和 Jurkart 细胞, 小鼠 NIH3T3 细胞和 C127 细胞, Cos1 细胞, Cos7 细胞和 CV1 细胞, 非洲绿猴细胞, 鹌鹑 QC1-3 细胞, 小鼠 L 细胞和中国仓鼠卵巢细胞。

或者, 可在稳定的细胞系中表达该基因, 所述细胞系含有整合到染色体中的该基因。与选择性标记如 dhfr、gpt、新霉素、潮霉素基因共转染可鉴定并分离出被转染的细胞。

还可扩增被转染的基因以表达大量的编码蛋白。 DHFR(二氢叶酸还原酶)是一种有用的标记, 可用来培育携带数百甚至数千拷贝之所需基因的细胞系。另一个有用的选择性标记是谷氨酰胺合成酶(GS)(Murphy 等, 生物化学杂志, 227:277-279(1991); Bebbington 等, 生物/技术, 10:169-175(1992))。利用这些标记, 可以使哺乳动物细胞在选择性培养基中生长并筛选出有最大抗性的细胞。这些细胞系含有整合至染色体中的扩增的基因。经常利用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞来生产蛋白质。

表达载体 pC1 和 pC4 含有劳氏肉瘤病毒的强启动子(LTR)(Cullen 等, 分子和细胞生物学, 438-447(1985 年 3 月))和 CMV 增强子片段(Boshart 等, 细胞, 41:521-530(1985))。多克隆位点, 例如限制酶切割位点 BamHI, XbaI 和 Asp718 有利于所需基因的克隆。所述载体还含有大鼠前胰岛素原基因的 3'内含子及聚腺苷酸化和终止信号。

A.在 COS 细胞中表达重组 KGF-2

表达质粒 KGF-2 HA 衍生于载体 pcDNAI/Amp(Invitrogen), 该载体中含有: 1) SV40 复制起点, 2)氨苄青霉素抗性基因, 3)大肠杆菌复制起点, 4)接有多接头区的 CMV 启动子, SV40 内含子和聚腺苷酸化位点。 HA 标记对应于前述衍生于流感病毒血凝素蛋白的一个表位(Wilson,I.等, 细胞, 37: 767(1984))。HA 标记融合于靶蛋白上, 使得用识别 HA 表位的抗体很容易检测该重组蛋白。编码整个 KGF-2 前体 HA 标记的 DNA 片段与 HA 标记读框一致地融合, 因此该重组蛋白质的

表达是在 CMV 启动子的指导下。

将质粒构建策略描述于下:

用下列两个引物通过 PCR 构建编码 KGF-2 的 DNA 序列 ATCC # 75977: 5'引物 5'TAACGAGGATCCGCCATCATGTGGAAATGGATACTGACAC3' (SEQ ID NO: 9)含有 BamHI 位点，后接有从起始密码子开始的 KGF-2 编码序列的 22 个核苷酸; 3'序列 5'TAAGCACTCGAGTGAGTGTACCACCATTGGAAGAAATG3'(SEQ ID NO: 10)含有与 XhoI 位点互补的序列，HA 标记和 KGF-2 编码序列的最后 26 个核苷酸（不包括终止密码子）。因此，该 PCR 产物含有 BamHI 位点，KGF-2 编码序列并接有一个 XhoI 位点，一个符合读框地融合的 HA 标记，与 HA 标记相接的翻译终止密码子。将 PCR 扩增的 DNA 片段和载体 pcDNA-3'HA 用 BamHI 和 XhoI 限制酶消化并连接，得到 pcDNA-3'HA-KGF-2 。将连接混合物转化到大肠杆菌菌株 XL1 Blue(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)中，将转化培养物铺在氨苄青霉素培养基平板上并筛选抗性菌落。从转化体中分离出质粒 DNA，通过 PCR 和限制分析以检测是否存在正确的片段。为了表达重组 KGF-2，通过 DEAE-DEXTRAN 方法(Sambrook,J.,等，分子克隆: 实验室手册，冷泉港实验室出版社(1989))，用所述表达载体转染 COS 细胞。通过放射性标记和免疫沉淀法(Harlow, E. & Lane, D.,抗体: 实验室手册，冷泉港实验室出版社(1988))检测 KGF-2 HA 蛋白质的表达。转染 2 天后，将细胞用 ^{35}S-半胱氨酸标记 8 小时。然后收集培养基，并用去污剂(RIPA 缓冲液(150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1%SDS, 1% NP-40, 0.5% DOC, 50mM Tris, pH7.5)) (Wilson, I.等，出处同前, 37: 767(1984))裂解细胞。细胞裂解产物和培养基均用 HA 特异性单克隆抗体进行沉淀。将沉淀的蛋白质在 15%SDS-PAGE 凝胶上分析。

B. 利用 CHO 表达系统表达并纯化人 KGF-2 蛋白质

将载体 pC1 用于 KGF-2 蛋白质的表达。质粒 pC1 是质粒 pSV2-dhfr[ATcc 登记号 37146]的衍生物。这两个质粒均含有在 SV40 早期启动子控制下的小鼠 DHFR 基因。用这些质粒转染的不具有二氢叶酸活性的

中国仓鼠卵巢细胞或其它细胞可通过使细胞在补加了化疗剂氨甲喋呤的选择性培养基(α-MEM， Life Technologies)上生长来进行筛选。对在氨甲喋呤(MTX)抗性细胞中扩增 DHFR 基因已经有许多记载(参见例如 Alt,F.W.,Kellems, R.M., Bertino, J.R.,和 Schimke, R.T., 1978,生物化学杂志， 253:1357-1379, Hamlin, J.L.和 Ma, C.1990,生物化学和生物物理学通报，1097:107-143,Page, M.J.和 Sydenham, M.A.1991, 生物技术，9:64-68)。通过目标酶 DHFR 的过生产，在浓度不断增加的 MTX 中生长的细胞发展了对该药物的抗性，所述 DHFR 的过生产是 DHFR 基因扩增的结果。如果将第二种基因与 DHFR 基因相连，则该基因通常也会被共扩增和过表达。这是本领域用来培育含 1000 拷贝以上目标基因之细胞系的方式。随后，当除去氨甲喋呤后，细胞系含有整合至染色体中的扩增的基因。

为了表达所需基因，质粒 pC1 含有劳氏肉瘤病毒之长末端重复序列(LTR)的强启动子(Cullen,等，分子和细胞生物学(Molecular and Cellular Biology), 1985 年 3 月号:438-4470)加上从人巨细胞病毒(CMV)之即早期基因的增强子中分离出的一个片段(Boshart 等，细胞， 41： 521-530，1985)。所述启动子下游是下列可使基因进行整合的单一限制酶切割位点： BamHI, PvuII 和 NruI。在这些克隆位点后，该质粒在所有三种阅读框架中含有翻译终止密码子，其后接有大鼠前胰岛素原基因的 3'内含子和聚腺苷酸化位点。也可将其它高效启动子用于该表达，例如人β 肌动蛋白启动子， SV40 早期或晚期启动子或其它逆转录病毒例如 HIV 和 HTLVI 的长末端重复序列。对于 mRNA 的聚腺苷酸化，也可以使用例如来自人生长激素或球蛋白基因的其它信号。

在与选择性标记例如 gpt,G418 或潮霉素基因共转染后，也可以筛选携带整合至染色体中之基因的稳定细胞系。开始时最好使用一种以上的选择性标记，例如 G418 加氨甲喋呤。

将质粒 pC1 用限制酶 BamHI 消化，然后通过本领域已知的方法，用牛肠磷酸酶去磷酸化。再从 1%琼脂糖凝胶中分离所述载体。

用下列 PCR 寡核苷酸引物扩增编码 KGF-2 的 DNA 序列 ATCC

No.75977，所述寡核苷酸引物对应于该基因的5'和3'序列。5'引物含有序列 5'TAACGAGGATCCGCCATCATGTGGAAATGGATACTGACAC3' (SEQ ID NO： 9)，其中含有BamHI位点（下划线），后接有图1(SEQ ID NO： 1) 的KGF-2编码序列的21个碱基。如下所述，插入到一表达载体后，编码人KGF-2的扩增片段的5'末端提供了一有效的信号肽。如Kozak,M.(分子生物学杂志， 196:947-950(1987))所述，用于真核细胞翻译起始的有效信号适当地插在所述构建体的载体部分。

3'引物含有序列 5'TAAGCAGGATCCTGAGTGTACCACCATTGGAAGAAATG 3'(SEQ ID NO:10)，该序列含有BamHI限制位点，后接有与图1（ SEQ ID NO:1 ）所列KGF-2编码序列的最后26个核苷酸（不包括终止密码子）互补的核苷酸。

按上述从1%琼脂糖凝胶中分离扩增的片段，用内切核酸酶BamHI消化，然后再在1%琼脂糖凝胶上纯化。

将分离的片段和去磷酸化的载体用T4 DNA连接酶连接。然后转化大肠杆菌HB101细胞，鉴定含质粒pC1的细菌。通过DNA测序确定插入基因的序列和方向。

CHO-DHFR细胞的转染

将缺乏活性 DHFR 酶的中国仓鼠卵巢细胞用于转染。用脂转染法(Felgner等，出处同前)将5 μ g质粒C1与0.5 μ g质粒pSV-neo共转染。质粒pSV2-neo含有显性选择性标记neo基因，该基因来自Tn5，它编码一种酶，该酶可赋予对一组抗生素包括 G418 的抗性。将细胞接种在添加了1mg/ml G418的αminus MEM中。2天后，将细胞用胰蛋白酶消化并接种于杂交瘤克隆平板(Greiner, Germany)，然后培养10-14天。该期间后，将单个克隆用胰蛋白酶消化，然后接种于含不同浓度氨甲喋呤(25 nM, 50nM, 100nM, 200nM, 400nM)的6孔培养皿中。将在最高浓度的氨甲喋呤中生长的克隆转移到含更高浓度氨甲喋呤(500nM, 1 μ M,2 μ M, 5 μ M)的新的6孔平板中。重复相同的过程，直到克隆在100 μ m的浓度中生长。

用 Western 印迹分析和 SDS-PAGE 分析所需基因产物的表达。

实施例 5

重组 KGF-2 的体外转录和翻译

PCR 产物衍生于 pA2 载体中克隆的 cDNA，该载体用于 KGF-2 的昆虫细胞表达。用于该 PCR 的引物是：5'ATTAACCCTCACTAAAGGGAGGCCATGTGGAAATGGATACTGACACATTGTGCC3'(SEQ ID NO：11)和 5'CCCAAGCTTCCACAAACGTTGCCTTCCTCTATGAG3'(SEQ ID NO：12)。

第一个引物含有 ATG 起始密码子 5'侧的 T3 启动子的序列。第二个引物与 KGF-2 开放阅读框架的 3'末端互补，并编码终止密码子的反向互补序列。

用市售的 Qiagen 试剂盒纯化所得 PCR 产物。将 0.5 μ g 的该 DNA 作为模板用于体外转录-翻译反应。用品名为 TNT 的 Promega 试剂盒完成该反应。利用放射性标记的甲硫氨酸为底物，按有关试剂盒的说明完成试验，不同的是，只按说明体积的 1/2 使用试剂，使反应在 33 ℃进行 1.5 小时。

在 10-15%变性聚丙烯酰胺凝胶上，电泳分离 5 μ l 反应物。将凝胶用比例为 6：3：1 的水：甲醇：乙酸混合物固定 30 分钟。然后在加热和真空下干燥凝胶，随后将凝胶对 X 射线胶片曝光 16 小时。该胶片显影结果表明存在与理论上翻译的 KGF-2 大小一致的放射性蛋白质带，这有力地说明克隆的 KGF-2 cDNA 含有编码具有预期大小之蛋白质的开放阅读框架。

实施例 6

经基因治疗进行表达

通过皮肤活组织解剖从一个受试者中得到成纤维细胞。将所得的组织放在组织培养基中并将其分成小片。将所述组织块放在组织培养瓶的湿表面，每个瓶中大约放 10 块。将瓶底部朝上，拧紧并在室温下放置过

夜。在室温下 24 小时后，将培养瓶倒过来，组织块仍固定于烧瓶底部，加入新鲜培养基(例如 Ham's F12 培养基，含 10%FBS，青霉素和链霉素)。然后将其在 37 ℃培养约 1 周。此时，加入新鲜培养基，然后每隔数天换液一次。再培养 2 周后，就出现成纤维细胞单层。将所述单层用胰蛋白酶消化并刮出放入较大的培养瓶中。

将两侧为莫洛尼鼠肉瘤病毒之长重复序列的 pMV-7(Kirschmeier, P.T.等， DNA， 7： 219-25(1988))用 EcoRI 和 HindIII 消化，随后用牛肠磷酸酶处理。将线性载体在琼脂糖凝胶上进行分离并用玻璃珠纯化。

用分别对应于 5'和 3'末端序列的 PCR 引物扩增编码本发明多肽的 cDNA。5'引物含有 EcoRI 位点，3'引物还含有 HindIII 位点。存在 T4 DNA 连接酶的条件下，将等量莫洛尼鼠肉瘤病毒线性骨架和该扩增的 EcoRI 和 HindIII 片段加到一起。将所得混合物保持于可使所述两片段进行连接的条件下。用连接混合物转化细菌 HB101，然后将转化的 HB101 铺在含卡那霉素的琼脂上，以确定载体含有正确插入的所需基因。

在含 10%牛血清(CS)、青霉素和链霉素的 Dulbecco 改进的 Eagles 培养基(DMEM)中，使兼性 pA317 或 GP + aml2 包装细胞在组织培养基中生长至铺满密度。然后将含所述基因的 MSV 载体加到该培养基中，用所述载体转导所述包装细胞。现在，包装细胞会产生含所述基因的感染性病毒颗粒(此时将所述包装细胞称为生产者细胞)。

将新鲜培养基加到转导的生产者细胞中，然后从铺满生产者细胞的 10cm 平板中收集培养基。将含感染性病毒颗粒的已消耗的培养基通过 millopore 滤纸过滤以除去脱附的生产者细胞，然后用该培养基感染成纤维细胞。从成纤维细胞的次铺满平板中除去培养基，迅速地换入来自生产者细胞的培养基。除去该培养基，换入新鲜培养基。如果病毒效价高，将会感染所有成纤维细胞，而且无需进行筛选。如果效价很低，则需使用具有选择性标记如 neo 和 his 的逆转录病毒载体。

然后，将加工过的成纤维细胞单独或已在 cytodex3 微载体玻珠生长

至铺满后，注射到宿主中。现得到的成纤维细胞生产蛋白质产物。

实施例 7

在糖尿病小鼠模型中 KGF-2 刺激伤口愈合

为了证明角质形成细胞生长因子 2(KGF-2)可加快伤口愈合过程，使用伤口愈合的遗传性糖尿病小鼠模型。 db+/db+小鼠的全层皮(full thickness)伤口愈合模型是一种被表征过的临床相关的可重现的伤口愈合受损的模型。糖尿病性伤口的愈合依赖于肉芽组织的形成和上皮再形成而不是收缩(Gartner, M.H.等，外科研究杂志， 52:389(1992); Greenhalgh, D.G.等，美国病理学杂志， 136:1235(1990))。

糖尿病动物有许多 II 型糖尿病特征。与其正常的杂合(db+/+m)同窝幼畜相比，纯合(db+/db+)小鼠比较肥胖。突变体糖尿病小鼠(db+/db+)在染色体 4 上有一常染色体隐性突变(db+)(Coleman 等，美国国家科学院院报， 77： 283-293(1982))。动物有贪食、烦渴和多尿症。突变体糖尿病小鼠(db+/db+)的血糖升高，胰岛素水平升高或正常，细胞介导的免疫受到抑制(Mandel 等，免疫学杂志， 120:1375(1978); Debray-Sachs,M 等，临床实验免疫学， 51(1):1-7(1983); Leiter 等，美国病理学杂志， 114:46-55(1985))。在这些动物中还有外周性神经病、心肌并发症和微血管损伤、基膜增厚和肾小球过滤异常(Norido, F.等，实验神经学， 83(2):221-232(1984); Robertson 等，糖尿病， 29(1):60-67(1980); Giacomelli 等，实验室研究， 40 (4):460-473(1979); Coleman, D.L., 糖尿病， 31(增刊):1-6(1982))。这些纯合糖尿病小鼠发展成高血糖，即具有胰岛素抗性，这与人 II 型糖尿病类似(Mandel 等，免疫学杂志， 120： 1375-1377(1978))。

在这些动物观察到的特征表明，该模型中的愈合可能与在人糖尿病中观察到的愈合相似(Greenhalgh 等，美国病理学杂志， 136： 1235-1246(1990))。该研究结果表明，在糖尿病性和非糖尿病性杂合的同窝幼畜中， KGF-2 对全层皮伤口的愈合有强刺激作用。在经 KGF-2 处理的动物中，可观察到对上皮再形成和胶原原纤维的增加以及真皮内的肉芽

组织有显著的影响。外源施用生长因子可通过将炎性细胞吸入到伤口中而加快肉芽组织的形成。

动物

在这项研究中使用遗传性的糖尿病雌性 C57BL/KsJ(db+/db+)小鼠和其非糖尿病(db+/+m)的杂合的同窝幼畜（ Jackson 实验室）。购买 6 周龄的动物，在开始研究时是 8 周龄。将动物单独安置并不限量地供应食物和水。所有操作均用无菌技术完成。按照人类基因组科学公司社会事业性动物饲养和利用委员会的规则和指南，以及实验室动物的饲养和使用指南完成试验。

KGF-2

在 pQE60-Cys37 中过表达并将用于伤口愈合研究的重组人 KGF-2 纯化， pQE60-Cys37 是一种大肠杆菌表达载体系统(pQE-9, Qiagen)。从该构建体表达的蛋白质是从 37 位半胱氨酸至 208 位丝氨酸的 KGF-2，并在该蛋白质 N 末端带有 6X(His)标记(SEQ ID NO： 29-30)(图 15)。将含有 95%以上纯的重组物质的诸级分用于所述试验。用含 100mM Tris, 8.0 和 600mM NaCl 的载体配制角质形成细胞生长因子 2。终浓度为 80 μ g/ml 和 8 μ g/ml 储备液。用相同的载体从储备液制备稀释溶液。

外科创伤

按以前报道的方法(Tsuboe, R.和 Rifkin, D.B. ,实验医学杂志，172:245-251(1990))产生伤口。简而言之，在受伤当天，通过腹膜内注射溶解于去离子水中的三溴乙醇(0.01mg/ml)， 2,2,2-三溴乙醇和 2-甲基-2-丁醇而使动物麻醉。剃干净动物背部的毛，用 70%乙醇溶液和碘清洗此块皮肤。在损伤前，用无菌纱布擦干外科手术区。然后用 Keyes 组织穿孔器产生 8mm 全层皮伤口。损伤后立即轻轻伸展周围的皮肤以避免伤口扩张。在试验过程中，伤口一直暴露于外。从损伤当天开始，进行连续 5 天的局部治疗。治疗前，用无菌盐水和纱布轻轻清洗伤口。

肉眼检查伤口，并在手术当天及手术后每隔 2 天从固定的距离位置拍照。通过在 1-5 天每天进行测量并在第 8 天也进行测量来确定伤口的闭合。用校正的 Jameson 测径器水平和垂直地测量伤口。如果肉眼再观察不到肉芽组织而且伤口被连续的上皮所覆盖，就可以认为伤口已经愈合了。

按 KGF-2 的两种不同剂量施用 KGF-2，一种剂量是每一伤口每天施用 50 μ l 载体中的 4 μ g KGF-2，持续 8 天，另一种剂量是每一伤口每天施用 50 μ l 载体中的 40 μ g KGF-2，持续 8 天。对载体对照组施用 50 μ l 载体溶液。

在第 8 天，通过腹膜内注射戊巴比妥钠(300mg/kg)对动物实行安乐死。然后收集伤口和伤口周围的皮肤用于组织学和免疫组织化学分析。将组织样品放在组织盒内组织活体解剖用海绵之间的 10%中性缓冲的福尔马林中以便进一步加工。

试验设计

对三组动物进行评估，每组 10 只动物(5 只糖尿病动物，5 只非糖尿病对照动物)：1)载体安慰剂对照，2)KGF-2 4 μ g/天，和 3)KGF-2 40 μ g/天。按如下设计该研究：

N	组	治疗
N = 5 db+/db+	载体	50 μ l
N = 5 db+/+m	载体	50 μ l
N = 5 db+/db+	KGF-2	4 μ g/50 μ l
N = 5 db+/+m	KGF-2	4 μ g/50 μ l
N = 5 db+/db+	KGF-2	40 μ g/50 μ l
N = 5 db+/+m	KGF-2	40 μ g/50 μ l

伤口面积和闭合的测量

通过在垂直和水平轴测量面积并得到伤口的总面积来分析伤口的闭合。然后通过确定最初的伤口面积(第 0 天)和治疗后的面积(第 8 天)之间的差异来评估收缩情况。在第 1 天的伤口面积是 $64mm^2$，相当于真皮孔的大小。用下列公式计算：

[第 8 天的开口面积]-[第 1 天的开口面积]/[第 1 天的开口面积]

组织学

将样品固定在 10%缓冲的福尔马林中，将石蜡包埋的样品块以与伤口表面垂直的方向切开(5 μ m)，并用 Reichert-Hung 切片机切片。在一分为二的伤口的横断面切片上进行常规苏木精-曙红(H&E)染色。通过伤口的组织学检查来评估是否因 KGF-2 的治疗而改变了被修补皮肤的愈合过程和形态外观。所述评估包括确定是否存在细胞积累、炎性细胞、毛细管、成纤维细胞、上皮再形成和表皮成熟(Greenhalgh, D.G.等，美国病理学杂志， 136： 1235(1990))(表 1)。由盲观测者使用校正的透镜测微计进行测量。

免疫组织化学

上皮再形成

利用 ABC Elite 检测系统，用多克隆兔抗人角蛋白抗体，对组织切片进行免疫组织化学染色。用人皮肤作为阳性组织对照，而用非免疫 IgG 作为阴性对照。用校正的透镜测微计，通过评估伤口上皮再形成的程度来确定角质形成细胞的生长。

细胞增殖标记

利用 ABC Elite 检测系统，用抗 PCNA 抗体(1:50)来证实皮肤样品中增殖细胞核抗原/细胞周期蛋白(PCNA)。人结肠癌作为阳性组织对照，用人脑组织作为阴性组织对照。每个样品都包括略去基本抗体、而代之以非免疫小鼠 IgG 的一张切片。这些切片的排列次序是基于增殖的程度，用 0-8 级表示，级别越低反映增殖较少，而级别越高反映增殖越强。

统计分析

用非成对 t 检验分析试验数据。 p 值<0.05 即认为有显著性。将数据表示为平均值±SEM 。

结果

KGF-2 对伤口闭合的影响

与杂合的正常小鼠相比，糖尿病小鼠显示出愈合受损。在糖尿病和非糖尿病动物中，每一位点 4 μ g KGF-2 的剂量可产生最大响应(图 5，6)。与缓冲液对照组相比，这些结果有统计显著性($p=0.002$ 和 $p<0.0001$)。用 KGF-2 处理后，在剂量为 4 μ g/天的组中，平均闭合为 60.6%，在剂量为 40 μ g/天的组中，平均闭合为 34.5%。到第 8 天，缓冲液对照组动物的伤口仅有 3.8%闭合。在损伤后第 2-5 天和第 8 天，从用 KGF-2 治疗的 db+/db+小鼠的伤口得到的重复测量值表明，与缓冲液对照组相比，到损伤后第 3 天，总伤口面积(mm^2)有显著改善。这种改善一直持续着，并且，在试验结束时可观察到统计学上显著的结果(图 7)。在接受了 KGF-2 的 db/+m 组的动物中，与缓冲液对照组相比，重复测量也表明伤口面积有较大的减少(图 8)。这些结果证实了在 KGF-2 处理的动物中，其伤口闭合率较大。

KGF-2 对组织学评分的影响

在第 8 天， KGF-2 在糖尿病(db+/db+)模型中的组织病理学评估结果表明，与缓冲液对照相比，伤口评分有统计学上显著的提高($p<0.0001$)。用 4 μ g 和 40 μ g 剂量的 KGF-2 观察到的药理学作用之间没有显著差异。缓冲液对照组具有最小的细胞积累，没有肉芽组织或上皮迁移，而 4 μ g 和 40 μ g 剂量的 KGF-2(分别为 $p<0.0001$ &$p=0.06$)出现上皮覆盖伤口，新血管形成，肉芽组织形成和成纤维细胞和胶原沉积(图 9)。

用苏木精-曙红染色的样品完成皮肤伤口的组织病理学评估。记分标准有 1-12 级， 1 分表示细胞积累最小并很少或几乎没有肉芽形成， 12 分表示有丰富的成纤维细胞出现，大量胶原沉积并有大量覆盖伤口的新上皮(表 1)。

表 1
组织学切片评分

分数	标准
1-3	没有至最小细胞积累。没有肉芽组织或上皮迁移
4-6	薄的不成熟的肉芽，即炎性细胞占优势，但有很少的成纤维细胞、毛细管或胶原沉积。上皮迁移最少。
7-9	中等程度厚的肉芽组织，从炎性细胞占优势至有更多的成纤维细胞和胶原沉积。大量的新血管形成。上皮从最小至中等程度的迁移。
10-12	成纤维细胞占优势的厚的血管肉芽组织，大量胶原沉积。上皮部分覆盖至完全覆盖伤口。

在施用这两种剂量的 KGF-2 后，评估非糖尿病同窝幼畜，表明与缓冲液对照组相比，评估的所有测量值均没有显著活性(图 10)。缓冲液对照组显示出不成熟的肉芽组织，炎性细胞和毛细管。其平均值高于糖尿病组，表明在糖尿病(db+/db+)小鼠中愈合受损。

KGF-2 对上皮再形成的影响

用细胞角蛋白(cytokeratine)免疫染色确定上皮再形成的程度。评分以闭合程度为基础，分为 0(无闭合)至 8(完全闭合)级。在接受了 4 μ g/天剂量的组中，与缓冲液对照组相比，上皮再形成的分数有统计学上显著的提高， $p<0.001$(图 11)。在该组中，观察到角质形成形成细胞位于新形成的覆盖伤口的表皮内。在不同阶段，两种剂量的 KGF-2 都有有丝分裂外观。在所述两种 KGF-2 剂量，评估非糖尿病组也有显著提高的上皮再形成级别(分别为 $p=0.006$ 和 0.01)(图 12)。

KGF-2 对细胞增殖的影响

增殖细胞核抗原免疫染色说明，在 4 μ g 和 40 μ g 组内均有显著增殖(图 13)。非糖尿病组接受两种剂量 KGF-2 有相似的结果，与缓冲液对照组相比，这两个组均有明显较高的分数(图 14)。特别是在表皮的基层观察到表皮增殖。另外，在真皮，特别是在毛囊中观察到高密度的 PCNA-标记的细胞。

结论

这些结果表明 KGF-2 特异性地刺激初级表皮角质形成细胞的生长。另外，这些试验表明，在糖尿病小鼠中，局部施用的重组人 KGF-2 显著加快了全层皮切割的真皮伤口的愈合速度。组织学评估表明 KGF-2 可诱导角质形成细胞增殖，同时诱导表皮增厚。根据增殖细胞核抗原(PCNA)显示，所述增殖位于上皮的基层。在真皮水平，胶原沉积、成纤维细胞增殖和新血管形成重建了皮肤的正常结构。

与有较少 PCNA 标记之细胞的缓冲液组相比， KGF-2 处理之动物上的 PCNA 标记细胞密度较高，说明了对真皮-表皮水平的角质形成细胞、成纤维细胞和毛囊的刺激作用。因 KGF-2 导致的愈合过程的增强与该试验所观察到的一致。对应所评估的参数(上皮再形成和伤口闭合百分比)，这一效果是统计学上显著的。重要的是，主要在表皮较内层的基层中观察到 PCNA 标记的角质形成细胞。真皮表现为含成纤维细胞、胶原和肉芽组织的正常化组织。

以每天的测量值为基础，在非糖尿病动物中观察到的活性表明 KGF-2 对第 8 天以及试验过程中的伤口闭合百分比产生显著的药理学反应。尽管与缓冲液对照相比，组织病理学评估没有显著差异，但角质形成细胞生长和 PCNA 分数表明有显著影响。

总之，这些结果说明，在使用 db+/db+小鼠的损伤和正常切割伤口模型中， KGF-2 均有显著活性，因此，可将 KGF-2 用于治疗伤口，包括外科手术伤口、糖尿病溃疡、静脉停滞性溃疡、灼伤和其它皮肤疾病。

实施例 8

在类固醇损伤的大鼠模型中 KGF-2 介导的伤口愈合

在各种体外和体内系统中类固醇对伤口愈合的抑制作用已有许多记载(Wahl, S.M. 糖皮质激素和伤口愈合。《抗炎类固醇作用：基础和临床应用》， 280-302(1989); Wahl, S.M.等，免疫学杂志， 115:476-481(1975); Werb, Z.等，实验医学杂志， 147:1684-1694(1978))。糖皮质激素通过下

列途径来抑制伤口愈合：抑制血管生成，降低血管通透性(Ebert, R.H.等， An. Intern. Med.37:701-705(1952))，减少成纤维细胞增殖和胶原合成(Beck, L.S.等，生长因子， 5:295-304(1991); Haynes, B.F.等，临床研究杂志， 61:703-797(1978))并可使循环中的单核细胞暂时减少(Haynes, B.F.等，临床研究杂志， 61:703-797(1978); Wahl, S.M.，糖皮质激素和伤口愈合。《抗炎类固醇作用：基础和临床应用》，学术出版社，纽约，280-302(1989))。全身性施用类固醇以阻碍伤口愈合是大鼠中很常见的现象(Beck, L.S.等，生长因子， 5:295-304(1991);Haynes， B.F.等，临床研究杂志, 61:703-797 (1978); Wahl, S.M.，糖皮质激素和伤口愈合《抗炎类固醇作用：基础和临床应用》，学术出版社，纽约， 280-302(1989); Pierce, G.F.等，美国国家科学院院报， 86： 2229-2233(1989))。

为了说明 KGF-2 可加快愈合过程，对向大鼠全层皮切割的皮肤伤口多次局部施用 KGF-2 的效果进行评估，在所述大鼠中，已通过全身性施用甲基氢化泼尼松损害了愈合。体外研究已表明 KGF-2 特异性地刺激初级人表皮角质形成细胞的生长。本实施例通过用校正的 Jameson 测径器测量伤口缺口并通过组织形态测量法(histomorphometry)和免疫组织化学法，说明了局部施用重组人 KGF-2 可加快大鼠全层皮切割皮肤伤口的愈合速度。组织学评估表明 KGF-2 能加快上皮再形成，并由此加快伤口修复。

动物

在本实施例中使用重量为 250-300 克的年青成年雄性 Sprague Dawley 大鼠(Charles River Laboratories)。购买 8 周龄动物，在研究开始时，动物为 9 周龄。在损伤时，通过全身性施用甲基氢化泼尼松(17mg/kg/大鼠，肌肉内注射)来损害大鼠的愈合反应。将动物单独安置并不受限制地供给食物和水。用无菌技术完成所有操作。按照人基因组科学公司社会事业性动物饲养和利用委员会的规则和指南以及实验室动物的饲养和使用指南完成试验。

KGF-2

在 pQE60-Cys37 中过表达并纯化重组人 KGF-2， pQE60-Cys37 是一种大肠杆菌表达载体系统(pQE-9, Qiagen)。从该构建体表达的蛋白质是从 37 位半胱氨酸至 208 位丝氨酸的 KGF-2，并在该蛋白质的 N 末端带有 6X(His)标记(图 15) (SEQ ID NO： 29-30) 。将含有 95%以上纯的重组物质的诸级分用于所述试验。用含有 1X PBS 的载体配制 KGF-2 。终浓度为 20 μ g/ml 和 80 μ g/ml 储备液。用相同的载体从储备液制备稀释溶液。

在大肠杆菌表达载体系统中过表达并纯化 KGF-2Δ28 。将含有 95%以上纯的重组物质的诸级分用于所述试验。用含有 1X PBS 的载体配制 KGF-2 。终浓度为 20 μ g/ml 和 80 μ g/ml 储备液。用相同的载体从储备液制备稀释溶液。

外科损伤

按上述实施例 7 的方法产生伤口。在损伤那天，通过肌肉内注射氯胺酮(50mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg)而使动物麻醉。剃干净动物的背部，用 70%乙醇和碘溶液清洗皮肤。在损伤前，用无菌纱布擦干外科手术区。利用 Keyes 组织穿孔器产生一个 8mm 的全层皮伤口。在试验过程中，伤口一直暴露于外。从损伤当天开始，连续 7 天每天局部施用试验物质一次，随后施用甲基氢化泼尼松。处理前，用无菌盐水和纱布轻轻清洗伤口。

肉眼检查伤口，并在损伤当天及治疗结束时隔一段固定的距离拍照。通过在 1-5 天每天进行测量并在第 8 天也进行测量来确定伤口的闭合，以进行作图。用校正的 Jameson 测距器水平和垂直地测量伤口。如果肉眼再观察不到肉芽组织，而且连续的上皮覆盖了伤口，就可以认为伤口已经愈合了。

用两种不同剂量的 KGF-2 完成剂量反应，一种剂量为每伤口每天施用 50 μ l 载体中的 1 μ g KGF-2，第二种剂量为每伤口每天施用 50 μ l 载体中的 4 μ g KGF-2，均持续 5 天。载体对照组接受 50 μ l 1X PBS。

在第 8 天，通过腹膜内注射戊巴比妥钠(300mg/kg)对动物实行安乐死。然后收集伤口和伤口周围的皮肤用于组织学分析。将组织样品放在组织盒内组织活体解剖用海绵之间的 10%中性缓冲的福尔马林中以便进一步加工。

试验设计

对四组动物进行评估，每组 10 只动物(5 只用甲基氢化泼尼松， 5 只不用糖皮质激素)： 1)未处理对照， 2) 载体安慰剂对照， 3)KGF-2 1 μ g/天， 4) KGF-2 4 μ g/天。按如下设计该研究：

N	组	治疗
· 用糖皮质激素处理		
N = 5	未处理	-
N = 5	载体	50 μ l
N = 5	KGF-2(1 μ g)	50 μ l
N = 5	KGF-2(4 μ g)	50 μ l
· 未用糖皮质激素处理		
N = 5	未处理	-
N = 5	载体	50 μ l
N = 5	KGF-2(1 μ g)	50 μ l
N = 5	KGF-2(4 μ g)	50 μ l

伤口面积和闭合的测量

通过在垂直和水平轴测量面积并得到伤口的总面积来分析伤口的闭合。然后通过确定最初的伤口面积(第 0 天)和治疗后的面积(第 8 天)之间的差异来评估收缩情况。在第 1 天的伤口面积是 64mm^2，相当于真皮孔的大小。用下列公式计算：

[第 8 天的开口面积]-[第 1 天的开口面积]/[第 1 天的开口面积]

组织学

将样品固定在10%缓冲的福尔马林中，将石蜡包埋的样品块以与伤口表面垂直的方向切开(5 μ m)，并用 Olympus 切片机切片。在一分为二的伤口的横断面切片上进行常规苏木精-曙红(H&E)染色。通过伤口的组织学检查使我们可以评估是否因 KGF-2 的治疗而改变了被修补皮肤的愈合过程和形态外观。由盲观测者使用校正的透镜测微计来测定伤口缺口的距离。

统计分析

用非成对 t 检验分析试验数据。 p 值<0.05 视为有显著性。将数据表示为平均值±SEM 。

结果

将用和不同甲基氢化泼尼松的未处理对照组的伤口闭合情况进行比较的结果表明，与正常大鼠相比，在损伤后第 8 天，经甲基氢化泼尼松处理的大鼠的伤口愈合明显受损。在注射甲基氢化泼尼松的组中，总伤口面积为 58.4mm^2，而在未接受糖皮质激素的组中为 22.4mm^2(图 16)。

KGF-2 对伤口闭合的影响

在损伤时向大鼠全身性施用甲基氢化泼尼松延缓了正常大鼠的伤口闭合(p=0.002)。在第 8 天试验结束时，甲基氢化泼尼松损害组的伤口闭合测量值表明，与未处理组相比，用 KGF-2 时伤口闭合在统计学上显著加快(1 μ g p=0.002&4 μ g p=0.005)(图 16)。在接受 1 μ g KGF-2 的组中伤口闭合百分比为 60.2%(p=0.002)，在接受 4 μ g KGF-2 的组中伤口闭合百分比为 73%(p=0.0008)。与之相比，未处理组的伤口闭合百分比为 12.5%，载体对照组的为 28.6%(图 17)。

从第 1 天至第 8 天，糖皮质激素组中的伤口闭合长度分析表明，在处理组中，用这两种 KGF-2 剂量时，从损伤后的第 3 天至第 8 天，伤口大小均有显著减小(图 18)。

这些结果表明，与未处理组相比，用 4 μ g KGF-2 处理的组显著(p=0.05)加快了伤口闭合(图 19A)。尽管在正常动物中很难评估蛋白质或其它化合物加快伤口愈合的能力(由于恢复很快)，但是已显示在该模型中 KGF-2 可加快伤口愈合。

用 KGF-2 处理过的伤口的组织病理学评估

伤口缺口的组织形态测量学表明 KGF-2 处理组的伤口距离减小。未处理组的伤口缺口为 5336μ，而用 1 μ g KGF-2 处理过的组的伤口缺口减小至 2972μ；用 4 μ g KGF-2(p=0.04)处理组的伤口缺口减小至 3086μ(图 20)。

KGF-2Δ28 在伤口愈合中的作用

在甲基氢化泼尼松损害的大鼠模型中，评估 KGF-2Δ28 和 PDGF-BB 在伤口愈合中的作用。该试验按照与上述有关 KGF-2 蛋白质相同的方法完成，不同之处在于 KGF-2Δ28 蛋白质未被 His 标记，并且在第 2， 4， 6， 8 和 10 天测量伤口愈合。用于蛋白质的缓冲液载体均为 40mM NaOAc 和 150mM NaCl,pH6.5，但不用于全长 KGF-2 的“ E2 ”制剂。用于“ E2 ” KGF-2 制剂的缓冲液载体为 20mM NaOAc 和 400mM NaCl,pH6.4。

图 19B 中的结果表明，与未处理组相比， KGF-2Δ28 在统计学上显著地加快伤口闭合，并可逆转甲基氢化泼尼松对伤口愈合的影响。

结论

本实施例说明 KGF-2 可逆转甲基氢化泼尼松对伤口愈合的影响。外源性地施用生长因子通过将炎性细胞吸引至伤口而加速肉芽组织形成。以每天测量值为基础，在未接受甲基氢化泼尼松的动物中也观察到相似的活性，表明 KGF-2 对第 5 天的伤口闭合百分比有显著的药理学反应。对于测量 KGF-2 和其它化合物对伤口愈合面积影响的效力来说，大鼠的糖皮质激素损害的伤口愈合模型是一个适宜的和可重现的模型。

总之，这些结果表明在糖皮质激素损伤的和正常切割的伤口模型中， KGF-2 均有显著活性。因此，可将 KGF-2 临床上用于刺激伤口愈合，所述伤口包括外科手术伤口、糖尿病溃疡、静脉停滞溃疡，灼伤和其它异常伤口愈合疾病如尿毒症，营养不良，维生素缺乏和用类固醇和抗肿瘤药物所进行的全身性治疗。

实施例 9

KGF-2 mRNA 表达的组织分布

用 Sambrook 等所述的方法(上文所述)，完成 Northern 印迹分析以检测人组织中编码 KGF-2 蛋白质之基因的表达水平。通过 PCR 得到对应于本发明 KGF-2 完整开放阅读框架(SEQ ID NO： 1)的探针，将所述探针用 rediprime™DNA 标记系统(Amersham Life Science)按照生产商的说明用 ^{32}P 标记。标记后，按照生产商方法号 PT1200-1，用 CHROMA SPIN-100™柱(Clontech Laboratories Inc.)纯化探针。然后用纯化过的标记探针检测各种人组织，分析编码 KGF-2 的基因的表达情况。

从 Clontech 得到多组织 Northern(MTN)印迹，所述诸印迹含有来自各种人组织(H)的 polyA RNA 或人免疫系统组织(IM)的 polyA RNA，按照生产商方法号 PT1190-1，用 ExpressHyb™杂交溶液(Clontech)通过标记的探针检测诸印迹。杂交并洗涤后，将印迹固定并在-70 ℃对胶片曝光过夜，按照标准方法对胶片显影。

在大部分人组织中，均可观察到一种约 4.2kb 的主要 mRNA 类型。KGF-2 mRNA 在心、胰、胎盘和卵巢中相对丰富。约 5.2kb 的少量 mRNA 类型也普遍存在。此 5.2kb mRNA 的“身分”不清楚。有可能 5.2kb 转录本编码 KGF-2 的另一种剪接形式或 KGF 家族的第三个成员。 KGF-2 cDNA 是 4.1kb，与 4.2kb mRNA 的大小一致。

实施例 10

角质形成细胞增殖试验

真皮角质形成细胞是皮肤表皮中的细胞。皮肤中角质形成细胞的生长和扩展是伤口愈合中的一个重要过程。因此，角质形成细胞增殖试验是刺激角质形成细胞生长以及伤口愈合的蛋白质活性的一项重要指标。

但是，角质形成细胞很难在体外生长。仅有极少量的角质形成细胞系。这些细胞系有不同的细胞和遗传缺陷。为了避免因细胞缺陷如关键生长因子受体的丢失或生长依赖于关键生长因子而给该试验带来的复杂

化，因而选择初级真皮角质形成细胞完成该试验。这些初级角质形成细胞是从 Clonetics, Inc.(San Diego,CA)得到的。

使用 alamarBlue 的角质形成细胞增殖试验

alamarBlue 是一种活性蓝色染料，当加到培养基中时，由线粒体代谢。然后该染料在组织培养上清液中变成红色。通过 570nm 与 600nm 之间的光密度读数差就可直接定量确定红色染料的量。该读数反应了细胞活性和细胞数量。

从 Clonetics, Inc.购买正常的初级真皮角质形成细胞(CC-0255，NHEK-Neo 群的)。这些细胞是第 2 代细胞。角质形成细胞在完全的角质形成细胞生长培养基(CC-3001， KGM； Clonetics, Inc.)中生长至达到 80%铺满。按照生产商的说明，用胰蛋白酶消化细胞。简而言之，将细胞用 Hank's 平衡的盐溶液洗涤两次。将 2-3ml 胰蛋白酶加至细胞中，在室温消化约 3-5 分钟。加入胰蛋白酶中和溶液并收集细胞。在室温将细胞以 600 × g 离心 5 分钟，然后使用预热的培养基，以 3000 个细胞/cm^2 的密度将其铺在新培养瓶中。

为了进行增殖分析，除最外行外，以 1000-2000 个角质形成细胞/孔将细胞铺在 Corning 平底 96 孔平板的完全培养基中。向外侧孔中加入 200μl 无菌水。这样有助于使孔的温度湿度的波动达到最小。在 37 ℃，在 5%CO_2 中使细胞生长过夜。用角质形成细胞基础培养基(CC-3101，KBM， Clonetics, Inc.)将细胞洗涤两次，然后向各孔中加入 100μl KBM。培养 24 小时。用 KBM 连续稀释生长因子并向各孔加入 100μl。用 KGM 作为阳性对照，用 KBM 作为阴性对照。每个浓度点使用 6 个孔。培养 2-3 天。在培养结束时，用 KBM 将细胞洗涤一次，加入 100μl 在培养基中预先混有 10%v/v alamarBlue 的 KBM。培养 6-16 小时直到 KGM 阳性对照的培养基颜色开始变红。将平板直接放在平板读数仪下，测量 O.D.570nm 减去 O.D.600nm 的值。

结果

KGF-2 对角质形成细胞增殖的刺激作用

为了证实 KGF-2(即如上述实施例 7 和 8 所述，从氨基酸 Cys37 开始的 KGF-2)和 N-末端缺失突变体 KGF-2Δ33 和 KGF-2Δ28 对于刺激表皮角质形成细胞生长是有活性的，将正常的人初级表皮角质形成细胞与大肠杆菌中表达并纯化的 KGF-2 蛋白质(批号 E3)(SEQ ID NO： 2)，KGF-2Δ33(批号 E1)和 KGF-2Δ28(批号 E2)一起保温。KGF-2 蛋白刺激表皮角质形成细胞的生长， EC50 为约 5ng/ml，与 FGF7/KGF-1 的相同(图 21A)。相比之下，其它 FGF，如 FGF-1 和 FGF-2 不能刺激初级角质形成细胞的生长。KGF-2Δ33 的 EC50 为 0.2ng/ml， KGF-2Δ28 的 EC50 为 2ng/ml(见图 21B 和 C)。因此，在刺激初级表皮角质形成细胞的增殖方面， KGF-2 似乎与 FGF7/KGF 一样有效。但是，在刺激角质形成细胞增殖方面， KGF-2Δ33 比上述实施例 7 和 8 所述的“ Cys(37)” KGF-2 和 KGF-2Δ28 更有效。

伤口组织的结疤涉及真皮成纤维细胞的过度增殖。为确定 KGF-2 的刺激作用是否对角质形成细胞而不是成纤维细胞特异，对小鼠 Balb.c.3T3 成纤维细胞和人肺成纤维细胞进行检测。在增殖试验中，这两种成纤维细胞对 KGF-2 都没有反应。因此， KGF-2 看起来是表皮角质形成细胞特异性的促分裂原，而不是间充质细胞如成纤维细胞的促分裂原。这表明 KGF-2 引起伤口组织结疤的可能性很小。

实施例 11

A.KGF-2 对用特异性 FGF 受体转染之细胞的促有丝分裂作用

为了确定哪种 FGF 受体同工型介导 KGF-2 的增殖作用，按照 Santos-Ocampo 等，生物化学杂志， 271:1726-1731 (1996))中所述的方法，检测 KGF-2 对表达特异性 FGF 受体同工型之细胞的影响。已知 FGF7/KGF 通过与 FGFR2iiib 形式结合并特异性地激活 FGFR2iiib 形式而诱导上皮细胞的有丝分裂(Miki 等，科学， 251： 72-75(1991))。因此，用表达下列 FGF 受体同工型之一的细胞检测 KGF-2 在有丝分裂试验中的增殖作用： FGFR1iiib、 FGFR2iiib、 FGFR3iiib 和 FGFR4。

表达 FGF 受体之细胞的有丝分裂试验

按 Santos-Ocampo 等，生物化学杂志，271:1726-1731 (1996))中所述的方法，将胸苷掺入表达特异性 FGF 受体的 BaF3 细胞中。简而言之，洗涤表达特异性 FGF 受体的 BaF3 细胞并重悬在 Dubeco 改进的 Eagle 培养基，10%新生牛血清，L-谷胺酰胺中。在 96 孔试验平板的培养基中，每孔铺约 22500 个细胞，所述培养基含有 2μg/ml 肝素。将检测试剂加到各孔中，使每孔的体积达到 200μl。在 37 ℃将细胞培养 2 天。向各孔中加入 50 μ l 体积中的 1μCi ^{3}H-胸苷。4-5 小时后，通过玻璃纤维滤纸过滤收集细胞。用 Wallac β 平板闪烁计数器对掺入的 ^{3}H-胸苷计数。

结果

如通过 ^{3}H-胸苷掺入所说明的(图 22A)，这些结果表明 KGF-2 蛋白质(添加了 N 末端 Met 的图 1 所示的 Thr(36)-Ser(208)(SEQ ID NO:2))可强烈刺激表达 KGF 受体 FGFR2iiib 同工型之 Baf3 细胞的增殖。令人感兴趣的是，KGF-2 对表达 FGFR1iiib 同工型之 Baf3 细胞的增殖只有轻微的刺激作用。KGF-2 对表达受体的 FGFR3iiib 或 FGFR 形式的细胞没有任何作用。

FGF7/KGF 刺激表达 KGF 受体 FGFR2iiib 同工型之细胞的增殖，但不刺激表达 FGFR1iiib 同工型的细胞的增殖。KGF-2 与 FGF7/KGF 之间的差异是非常有趣的。在对照试验中，aFGF 刺激其受体 FGFR1iiib 和 iiic，而 bFGF 刺激其受体 FGFR2iiic。因此，这些结果表明 KGF-2 与 FGFR2iiib 同工型结合并刺激有丝分裂。与 FGF7/KGF 相比，KGF-2 也与 FGFR1iiib 同工型结合并刺激有丝分裂。

B. KGF-2Δ33 对用特异性 FGF 受体转染之细胞的促有丝分裂作用

如上所证实，FGF 或 KGF-1 和-2 均与 FGF2iiib 受体(FGFR2 iiib)结合并将其激活。用表达下列 FGF 受体同工型之一的细胞检测 KGF-2Δ33 在有丝分裂试验中的增殖作用：FGFR2iiib 或 FGFR2iiic(2iiic 受

体转染的细胞作为阴性对照)。

按照本实施例上述部分 A 完成试验。简而言之，在 RPMI 中培养 BaF3 细胞，该 RPMI 含有 10%牛血清(BCS-不是胎牛血清)，10%来自 WEHI3 细胞(在含 5%BCS 的 RPMI 中生长)培养物的条件培养基，50nM β-巯基乙醇，L-Glu(100X 储备液的 2 %)和青霉素/链霉素(100X 储备液的 1 %)。

为了进行试验，用含 10%BCS 和 1μg/ml 肝素的 RPMI 培养基将 BaF3 细胞润洗两次。将 BaF3 细胞(22000 个细胞/孔)铺在 96 孔平板的 150μl RPMI 培养基中，该 RPMI 培养基含有 10%BCS 和 1μg/ml 肝素。以从约 0 至 10nM 的浓度，加入酸性 FGF、碱性 FGF、KGF-1(HG15400)或 KGF-2 蛋白质(HG03400，03401，03410 或 03411)。在 37 ℃，将细胞在 200μl 的终体积中培养 48 小时。所有试验均以一式三份完成。将氚标记的胸苷(0.5 μCi)加至各孔中，并在 37 ℃保温 4 小时，然后通过玻璃纤维滤纸过滤收集细胞。用液体闪烁计数确定掺入的放射性总量。使用下列阳性对照：FGFR2iiic 细胞使用碱性 FGF 和酸性 FGF；FGFR2iiib 细胞使用酸性 FGF 和 KGF-1。使用下列阴性对照：基础培养基(含有 10%BCS 和 1μg/ml 肝素的 RPMI)。

结果

如用 ^{3}H-胸苷掺入所说明的(图 22A-C)，这些结果表明 KGF-2(N 末端加有 Met 的 Thr(36)-Ser(208))，KGF-2Δ33 和 KGF-2Δ28 蛋白质可强烈刺激表达 KGF-2 受体 FGFR2iiib 同工型的 BaF3 细胞的增殖。KGF-2 蛋白质对表达该受体的 FGFR2iiic 形式的细胞没有任何作用。这些结果表明 KGF-2 蛋白质与 FGFR2iiib 同工型结合并刺激有丝分裂。另外，似乎 KGF-2Δ33 也能够比 KGF-2(Thr(36)-Ser(208))更好地刺激 BaF3 细胞的增殖。

实施例 12

A.构建大肠杆菌优化的全长 KGF-2

为了提高全长 KGF-2 在大肠杆菌表达系统中的表达水平，将该基因的氨基末端部分的密码子优化成最常用的大肠杆菌密码子。为了合成最佳的 KGF-2 区，合成 6 种寡核苷酸：1-6 号(序列如下所示)。在下列条件下，将这些重叠寡核苷酸用于 7 轮 PCR 反应：

变性	95 ℃	20 秒
退火	58 ℃	20 秒
延伸	72 ℃	60 秒

用与上述相同的条件，用第一个 PCR 反应物 1μl ， KGF-2 的合成引物 6 作为 3'引物， KGF-2 合成的 5'BamHI 作为 5'引物，经 25 个循环完成第二个 PCR 反应。将由最终反应产生的产物用 AvaII 和 BamHI 消化。将实施例 1 的 KGF-2 构建体用 AvaII 和 HindIII 消化，并分离片段。将这两个片段在一个三片段连接中克隆至已用 BamHI 和 HindIII 消化的 pQE-9 中。

用于构建优化的合成 KGF-2 1/208 的引物如下：

KGF-2 的合成引物 1：

ATGTGGAAATGGATACTGACCCACTGCGCTTCTGCTTTCCCGCACC
TGCCGGGTTGCTGCTGCTGCTGCTTCCTGCTGCTGTTC (SEQ ID NO: 31)

KGF-2 的合成引物 2：

CCGGAGAAACCATGTCCTGACCCAGAGCCTGGCAGGTAACCGGAA
CAGAAGAAACCAGGAACAGCAGCAGGAAGCAGCAGCA (SEQ ID NO:32)

KGF-2 的合成引物 3：

GGGTCAGGACATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTTCTTCTTCTT
CTTTCTCTTCTCCGTCTTCTGCTGGTCGTCACG (SEQ ID NO: 33)

KGF-2 的合成引物 4：

GGTGAAAGAGAACAGTTTACGCCAACGAACGTCACCCTGCAGGTG
GTTGTAAGAACGAACGTGACGACCAGCAGAAGACGG (SEQ ID NO:34)

KGF-2 的合成引物 5：

CGTTGGCGTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGA
AAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAA (SEQ ID NO:35)

KGF-2 的合成引物 6：

TTTGGTCCCAGAAACTTTACCGTTTTTTTCGATTTTCAG (SEQ ID NO:36)

KGF-2 的合成 5' BamHI：

AAAGGATCCATGTGGAAATGGATACTGACCCACTGC (SEQ ID NO:37)

在图 23 中列出了所得的克隆(SEQ ID NO： 38 和 39)。

B.构建大肠杆菌优化的成熟 KGF-2

为了进一步提高 KGF-2 成熟形式在大肠杆菌表达系统中的表达水平，将该基因氨基末端部分的密码子优化成最常用的大肠杆菌密码子。与 KGF-2 的成熟形式相对应，构建从苏氨酸 36 开始的 KGF-2 的截短形式。将实施例 12A 的大肠杆菌合成 KGF-2 作为 PCR 反应的模板，所述 PCR 反应用 BspHI 5'KGF-2 作为 5'引物(下文给出的序列)，用 HindIII 3'KGF-2 作为 3'引物(下文给出序列)。用在实施例 12A 中的标准条件进行 25 个循环完成扩增。将所得产物用 BspHI 和 HindIII 消化，然后克隆至已用 NcoI 和 HindIII 消化的大肠杆菌表达载体 pQE60 中。

BspHI 5'KGF-2 引物:

TTTCATGACTTGTCAAGCTCTGGGTCAAGATATGGTTC(SEQ ID NO:40)

HindIII3'KGF-2 引物:

GCCCAAGCTTCCACAAACGTTGCCTTCC (SEQ ID NO:41)

在图 24A 中列出了所得的克隆(SEQ ID NO： 42 和 43)。

C.构建另一大肠杆菌优化的成熟 KGF-2

为了进一步提高 KGF-2 成熟形式在大肠杆菌表达系统中的表达水平，将所述大肠杆菌优化基因之氨基末端部分 53 个氨基酸的密码子变成

其它常用的大肠杆菌密码子。为了合成优化的 KGF-2 区，合成 6 个寡核苷酸：编号为 18062， 18061， 18058， 18064， 18059 和 18063(下文给出序列)。在下列条件下，将这些重叠寡核苷酸用于 7 轮 PCR 反应：

变性	95 ℃	20 秒
退火	58 ℃	20 秒
延伸	72 ℃	60 秒

完成 7 轮合成后，将该区的 5'引物 18169 和该整个区的 3'引物 18060 加到 PCR 反应中，所述 PCR 反应含 1μl 来自所述 6 个寡核苷酸的初始反应物。用下列条件，将该产物扩增 30 轮：

变性	95 ℃	20 秒
退火	55 ℃	20 秒
延伸	72 ℃	60 秒

在与上述相同的条件下，用引物 18066 和 18065 开始第二个 PCR 反应以扩增该基因的 3'区 25 轮。在琼脂糖凝胶上分离所得的产物。将含该产物的凝胶块用 10mM Tris, 1mM EDTA,pH7.5 稀释。利用每一稀释过的凝胶块各 1 μ l 再进行另一个 PCR 反应，其中使用引物 18169 作为 5'引物，引物 18065 作为 3'引物。用与上述相同的条件将产物扩增 25 轮。将最后这次反应产生的产物用 EcoRI 和 HindIII 限制性切割，然后克隆至也用 EcoRI 和 HindIII 切割的 pQE60 中(现在为 pQE6)。

5'合成引物的序列：

18169 KGF2 5' EcoRI/RBS:

TCAGTGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAATCATGACTTGCCAGG

[SEQ ID NO:44]

18062 KGF2 合成的新 R1 有义引物:

TCATGACTTGCCAGGCACTGGGTCAAGACATGGTTTCCCCGGAAGCTA

[SEQ ID NO:45]

18061 KGF2 合成的 R2 有义引物:

GCTTCAGCAGCCCATCTAGCGCAGGTCGTCACGTTCGCTCTTACAACC

[SEQ ID NO:46]

18058 KGF2 合成的 R3 有义引物:

GTTCGTTGGCGCAAACTGTTCAGCTTTACCAAGTACTTCCTGAAAATC [SEQ ID NO:47]

18066 KGF2 20bp AvaII 有义引物:

TCGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGAC [SEQ ID NO:48]

18064 KGF2 合成的 F1 反义引物:

GATGGGCTGCTGAAGCTAGAGCTGGAGCTGTTGGTAGCTTCCGGGGAA [SEQ ID NO:49]

18059 KGF2 合成的 F2 反义引物:

AACAGTTTGCGCCAACGAACATCACCCTGTAAGTGGTTGTAAGAG [SEQ ID NO:50]

18063 KGF2 合成的 F3 反义引物:

TTCTTGGTCCCAGAAACTTTACCGTTTTTTTCGATTTTCAGGAAGTA [SEQ ID NO:51]

18060 KGF2 AvaII 反义引物:

TTCTTGGTCCCAGAAACTTTACCG [SEQ ID NO:52]

18065 KGF2 HindIII 3'终止引物:

AGATCAGGCTTCTATTATTATGAGTGTACCACCATTGGAAGAAAG [SEQ ID NO:53]

在图 24B 中列出了合成的 KGF-2 基因序列和其相应的氨基酸序列 (SEQ ID NO： 54 和 55)。

实施例 13

构建 KGF-2 缺失突变体

用实施例 12A 的优化 KGF-2 构建体为模板，从 KGF-2 基因的 5'末端和 3'末端构建缺失突变体。以可能对大肠杆菌中表达产生不利影响的

基因区为基础，选择缺失。对应5'缺失，用下文所列的引物作为5'引物。这些引物含有标明的限制位点和编码起始甲硫氨酸的 ATG 。将 KGF-2(FGF-12)208 氨基酸 3'HindIII 引物用作 3'引物。用与实施例 12 所列相同的标准条件完成 25 轮的 PCR 扩增。用 BspHI 限制性切割 KGF-2 36aa/208aa 缺失突变体产物的 5'位点，用 HindIII 限制性切割 3'位点，然后克隆至已用 BspHI 和 HindIII 消化过的 pQE60 中。用 NcoI 作为 5'限制酶，用 HindIII 作为 3'位点限制酶，对所有其它产物进行限制性切割，然后克隆至已用 NcoI 和 HindIII 消化过的 pQE60 中。对于 KGF-2(FGF-12) 36aa/153aa，用 128aa 3'HindIII 作为 3'引物，用 FGF-12 36aa/208aa 作为 5'引物。对于 FGF-12 62aa/153aa，用 128aa 3'HindIII 作为 3'引物，用 FGF-12 62aa/208aa 作为 5'引物。所得克隆的名称显示因所述缺失而产生之多肽的第一个和最后一个氨基酸。例如， KGF-2 36aa/153aa 表示该缺失突变体的第一个氨基酸是 KGF-2 的氨基酸 36，最后一个氨基酸是 KGF-2 的氨基酸 153。另外，如在图 25-33 中所说明的，每个突变体均加有 N-末端 Met。

缺失引物的序列如下:

FGF12 36aa/208aa:

5' BsphI GGACCCTCATGACCTGCCAGGCTCTGGGTCAGGAC [SEQ ID NO:56]

FGF12 63aa/208aa:

5' NcoI GGACAGCCATGGCTGGTCGTCACGTTCG [SEQ ID NO:57]

FGF12 77aa/208aa:

5' NcoI GGACAGCCATGGTTCGTTGGCGTAAACTG [SEQ ID NO:58]

FGF12 93aa/208aa:

5' NcoI GGACAGCCATGGAAAAAAACGGTAAAGTTTC [SEQ ID NO:59]

FGF12 104aa/208aa:

5' NcoI GGACCCCCATGGAGAACTGCCCGTAGAGC [SEQ ID NO:60]

FGF12 123aa/208aa:

5' NcoI GGACCCCCATGGTCAAAGCCATTAACAGCAAC [SEQ ID NO:61]

FGF12 138aa/208aa:

5' NcoI GGACCCCCATGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAG [SEQ ID

NO:62]

FGF12 3' HindIII: (用于上述所有的缺失克隆)

CTGCCCAAGCTTATTATGAGTGTACCACCATTGGAAG [SEQ ID NO:63]

FGF12 36aa/153aa:

5' BsphI (如上述)

3'HindIII CTGCCCAAGCTTATTACTTCAGCTTACAGTCATTGT [SEQ ID NO:64]

FGF12 63aa/153aa:

5' NcoI 和 3' HindIII，如上述。

在图 25-33 中列出了所得缺失突变体的序列。(SEQ ID NO： 65-82)

实施例 14

构建 KGF-2 的半胱氨酸突变体

为了构建 C-37 突变，用引物 5457 5'BsphI 和 5258 173aa 3'HindIII 扩增来自实施例 12A 的 KGF-2(FGF-12)模板。引物 5457 5'BsphI 将半胱氨酸 37 变成丝氨酸。用实施例 12A 的标准条件进行 25 轮完成扩增。将所得产物用 BsphI 和 HindIII 限制性切割，然后克隆至已用 BsphI 和 HindIII 消化的大肠杆菌表达载体 pQE60 中。(图 34)(SEQ ID NO： 83)

为了将半胱氨酸 106 突变为丝氨酸，进行两个 PCR 反应以便进行该半胱氨酸的寡核苷酸定点诱变。在一个反应中，用 5453 BsphI 作为该反应的 5'引物，用 5455 作为该反应的 3'引物。在第二个反应中，用 5456 作为 5'引物，用 5258 HindIII 作为 3'引物。在实施例 12 所列的标准条件下，将反应扩增 25 轮。在用 5453 BsphI 作为 5'引物、用 5258 HindIII 作为 3'引物的随后反应中，用 1μl 各 PCR 反应的产物作为模板。用实施例 12 所列的标准条件完成 25 轮的扩增。将所得产物用 BspHI 和 HindIII 消化，然后克隆至已用 NcoI 和 HindIII 消化的大肠杆菌表达载体 pQE60 中。

需要进行两个 PCR 反应来产生 C-37/C-106 突变体。用引物 5457 BsphI 和 5455 来产生含半胱氨酸 37 被丝氨酸所取代的突变体的 5'区，

用引物5456和5258 HindIII来产生含半胱氨酸106被丝氨酸所取代的突变体的3'区。在第二个反应中，用从每个前期反应得到的各1μl产物一起作为模板，利用5457 BsphI引物作为5'引物，用5258 HindIII引物作为3'引物来产生C-37/C-106突变体。将该PCR产物用BsphI和HindIII限制性消化，然后克隆至已用NcoI和HindIII消化的pQE60中。所得克隆列于图35(SEQ ID NO： 84)。

半胱氨酸突变引物的序列:

5457 BspHI: GGACCCTCATGACCTCTCAGGCTCTGGGT (SEQ ID NO:85)

5456: AAGGAGAACTCTCCGTACAGC (SEQ ID NO: 86)

5455: GCTGTACGGTCTGTTCTCCTT (SEQ ID NO: 87)

5453 BspHI: GGACCCTCATGACCTGCCAGGCTCTGGGTCAGGAC (SEQ ID NO: 88)

5258 HindIII: CTGCCCAAGCTTATTATGAGTGTACCACCATTGGAAG (SEQ ID NO: 89)

实施例15

KGF-2(FGF-12)的生产和纯化

将编码实施例12B中所述的优化成熟蛋白质(即KGF-2的氨基酸T36至S208)的DNA序列克隆至质粒pQE-9(Qiagen)中。在37℃，含100μg/ml氨苄青霉素和25μg/ml卡那霉素的LB中，让大肠杆菌(M15/rep4; Qiagen)过夜生长至稳定期。以1： 50的稀释度，用该培养物接种含100μg/ml氨苄青霉素和25μg/ml卡那霉素的新鲜LB培养基。使细胞在37℃生长至$O.D._{595}$为0.7，通过加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至1mM的终浓度进行诱导。3-4小时后，离心收集细胞，然后以5体积缓冲液：1体积细胞糊的比例，将细胞重悬于含60mM $NaPO_4$和360mM NaCl的缓冲液中。在Mautin Gaulin中破碎细胞后，通过加入NaOH将提取物的pH调至8.0，然后离心澄清。

将澄清的可溶性提取物上样于Poros HS-50柱(2.0 x10.0cm; PerSeptive Biosystems, Inc.)，然后用含0.5M,1.0M和1.5M NaCl的50mM $NaPO_4$ pH8.0分步洗脱已结合的蛋白质。然后用50mM $NaPO_4$

pH6.5 将在 1.5M 的盐级分中洗脱下来的 KGF-2 稀释 5 倍，达到 300mM 的最终盐浓度。使含 KGF-2 的该级分依次通过 Poros HQ-20 柱(2.0 x7.0cm; PerSeptive Biosystems, Inc.)，然后结合于 Poros CM-20 柱(2.0 x9.0cm; PerSeptive Biosystems, Inc.)中。收集在约 500 mM-约 750 mM NaCl 下洗脱出来的含 KGF-2(FGF-12)的诸级分，稀释，再重上样于 CM-20 柱以便进行浓缩。最后，在凝胶过滤柱(S-75； Pharmacia)上于 40mM NaOAc pH6.5， 150mM NaCl 中分离该蛋白质(E-5 批)。或者，在磷酸缓冲盐溶液(PBS,E-4 批)上跑凝胶过滤柱。收集含 KGF-2 的级分并用 Bio-Rad 蛋白质测定确定蛋白质的浓度。经 SDS-PAGE 判断蛋白质的纯度>90%。最后，用 Limulus Amebocyte Lysate 检测(Cape Cod Associates)确定的内毒素水平≤1 Eu/mg 。经这种方式制备的蛋白质能够与肝素结合，这是 FGF 家族成员的一个标志。

实施例 16

A.构建 N-末端缺失突变体 KGF-2Δ33

为了提高 KGF2 在大肠杆菌中的表达水平，并提高大肠杆菌表达的 KGF2 的溶解性和稳定性，制备从加工前的 KGF2 中除去了前 68 个氨基酸的缺失变体 KGF-2Δ33(KGF-2 aa 69-208)。产生该缺失变体的原理是基于下列观察结果。首先，成熟 KGF2(KGF-2 aa 36-208)含奇数个(3 个)半胱氨酸残基，这可因分子内二硫键形成而发生聚集。 KGF Δ33 缺失变体仅含有 2 个半胱氨酸残基，这样降低了分子内二硫键形成以及随后发生聚集的可能性。聚集的减少可导致活性 KGF2 蛋白质产率提高。第二，KGF Δ33 缺失变体除去了多丝氨酸区，所述多丝氨酸区在 KGF-1 中不存在，而且似乎对活性并不重要，但可能会阻碍所述蛋白质在大肠杆菌中的表达。因此，除去多丝氨酸区可提高活性 KGF-2 蛋白质的表达水平。第三， KGF Δ33 在大肠杆菌中的表达会引起 KGF-2 在残基 68 和 69 之间的自然裂解。因此，预期 KGF2 Δ33 可以被有效地加工并在大肠杆菌中是稳定的。

在 pQE6 中构建 KGF2Δ33

为了进行聚合酶链反应指导的扩增并将 KGF2Δ33 亚克隆至大肠杆菌表达载体 pQE6 中，合成与所需 KGF2 区互补的两个寡核苷酸引物(5952 和 19138)，它们的序列如下：

引物 5952： 5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'

引物 19138：5' GGGCCCAAGCTTATGAGTGTACCACCAT 3'

在 N-末端引物(5952)的情况下，插入一个 AflIII 限制位点，而在 C-末端引物(19138)的情况下，插入一个 HindIII 限制位点。引物 5952 还含有一个与 KGF2 编码区邻接并符合读框的 ATG 序列以便在大肠杆菌中翻译克隆的片段，而引物 19138 含有与 KGF2 编码区邻接并符合读框的 2 个终止密码子(在大肠杆菌中优先使用的)，这样可确保在大肠杆菌中正确地进行翻译终止。

用本领域技术人员熟知的标准条件，将成熟 KGF-2(aa 36-208) 的核苷酸序列(在实施例 12C 中构建的)为模板，完成聚合酶链反应。将所得的扩增子用 AflIII 和 HindIII 限制性消化并亚克隆至经 NcoI/HindIII 消化的 pQE6 蛋白质表达载体中。

在 pHE1 中构建 KGF2Δ33

为了进行聚合酶链反应指导的扩增并将 KGF2Δ33 亚克隆至大肠杆菌表达载体 pHE1 中，合成对应于所需 KGF2 区的两个寡核苷酸引物(6153 和 6150)，它们的序列如下：

引物 6153：5' CCGGCGGATCCCATATGTCTTACAACCACCTGCAGG 3'

引物 6150：5' CCGGCGGTACCTTATTATGAGTGTACCACCATTGG 3'

在 N-末端引物(6153)的情况下，插入一个 NdeI 限制位点，而在 C-末端引物(6150)的情况下，插入一个 Asp718 限制位点。引物 6153 还含有一个与 KGF2 编码区邻接并符合读框的 ATG 序列以便在大肠杆菌中翻译克隆的片段，而引物 6150 含有与 KGF2 编码区邻接并符合读框的 2 个终止密码子(在大肠杆菌中优先使用的)，这样可确保在大肠杆菌中正确地进行翻译终止。

用本领域技术人员熟知的标准条件，将成熟 KGF-2(aa 36-208) 的核苷酸序列(在实施例 12C 中构建的)为模板，完成聚合酶链反应。将所得的扩增子用 NdeI 和 Asp718 限制性消化并亚克隆至经 NdeI/Asp718 消化的 pHE1 蛋白质表达载体中。

KGF2Δ33 的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT
TCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA
AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAG
CATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG
TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA
GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC
AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG
GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGG
AGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTT
CCAATGGTGGTACACTCATAA

KGF2Δ33 的氨基酸序列:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITS
VEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFN
NDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKTR
RKNTSAHFLPMVVHS

B.构建优化的 KGF-2Δ33

为了提高 KGF2Δ33 在大肠杆菌中的表达水平，将完整基因的密码子进行优化以便与大肠杆菌中最常使用的密码子相匹配。由于用于产生 KGF2Δ33 的模板在 N 末端区内已进行了密码子优化，因此，需要将 C 末端氨基酸(84-208)优化。

首先，将氨基酸 172-208 进行密码子优化以产生 KGF2Δ33(s172-

208)。通过重叠 PCR 策略可达到此目的。将寡核苷酸 PM07 和 PM08(对应于氨基酸 172-208)合并在一起，并通过将它们加热至 70 ℃然后冷却至 37 ℃而一起退火。然后将已退火的寡核苷酸用作标准 PCR 反应的模板，所述标准 PCR 反应由引物 PM09 和 PM10 指导。在按照本领域技术人员熟知的标准条件并用 KGF2Δ33 为模板进行的另一个 PCR 反应中，用寡核苷酸 PM05(它与 KGF2 编码区内的 Pst1 位点重叠)和 PM11 扩增对应于氨基酸 84-172 的 KGF2 区。在第三个 PCR 反应中，将第一个 PCR 反应的产物(对应于已优化密码子的氨基酸 172-208)和第二个 PCR 反应的产物(对应于密码子未被优化的氨基酸 84-172)合并并作为寡核苷酸 PM05 和 PM10 指导的标准 PCR 反应的模板。将所得扩增子用 Pst1/HindIII 消化，并亚克隆至 Pst1/HindIII 消化的 pQE6KGF2Δ33 中，有效地取代对应的密码子未被优化的区，从而产生 pQE6KGF2Δ33(s172-208)。

为了完成 KGF2 的密码子优化，用重叠寡核苷酸产生对应于 KGF2 氨基酸 84-172 区的已优化密码子的合成基因。首先，将四个寡核苷酸(PM31、PM32、PM33 和 PM34)合并并完成 7 个循环的 PCR：94 ℃，30 秒；46.5 ℃，30 秒；和 72 ℃，30 秒。

按照标准方法，用 1μl 第一个 PCR 反应产物为模板，完成由引物 PM35 和 PM36 指导的第二个 PCR 反应。将所得的已优化密码子的基因片段用 PstI/SalI 消化并亚克隆至 PstI/SalI 消化的 pQE6KGF2Δ33 (s172-208) 中以产生一个已完全优化的 KGF2 编码基因，pQE6KGF2Δ33s。

为了构建另一种大肠杆菌蛋白质表达载体，利用 PQE6KGF2Δ33s 上的引物 PM102 和 PM130 对 KGF2Δ33s 进行 PCR 扩增。所得的扩增子用 NdeI 和 EcoRV 消化，并亚克隆至已用 NdeI 和 Asp718 消化的 pHE1 表达载体（钝末端形式）中，从而形成 pHE1Δ33s。

在构建密码子优化的 KGF2Δ33s 中所用的寡核苷酸序列:

PM05: CAACCACCTGCAGGGTGACG

PM07: AACGGTCGACAAATGTATGTGGCACTGAACGGTAAAGGTG

CTCCACGTCGTGGTCAGAAAACCCGTCGTAAAAACACC

PM08:

GGGCCCAAGCTTAAGAGTGTACCACCATTGGCAGAAAGTGAGCAG

AGGTGTTTTTACGACGGGTTTTCTGACCACG

PM09: GCCACATACATTTGTCGACCGTT

PM10: GGGCCCAAGCTTAAGAGTG

PM11:GCCACATACATTTGTCGACCGTT

PM31:

CTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTTCTCCTTCACCAAAT

ACTTCCTGAAAATCGAAAAAAACGGTAAAGTTTC

TGGTACCAAG

PM32:

AGCTTTAACAGCAACAACACCGATTTCAACGGAGGTGATTTCCAGG

ATGGAGTACGGGCAGTTTTCTTTCTTGGTACCAG

AAACTTTACC

PM33:

GGTGTTGTTGCTGTTAAAGCTATCAACTCCAACTACTACCTGGCTAT

GAACAAGAAAGGTAAACTGTACGGTTCCAAAGA

ATTTAACAAC

PM34:

GTCGACCGTTGTGCTGCCAGTTGAAGGAAGCGTAGGTGTTGTAACC

GTTTTCTTCGATACGTTCTTTCAGTTTACAGTCG

TTGTTAAATTCTTTGGAACC

PM35: GCGGCGTCGACCGTTGTGCTGCCAG

PM36: GCGGCCTGCAGGGTGACGTTCGTTGG

PM102: CCGGCGGATCCCATATGTCTTACAACCACCTGCAGG

PM130: CGCGCGATATCTTATTAAGAGTGTACCACCATTG

KGF2Δ33(s172-208)的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT

TCTCCTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGTACCAAGAAAGAAAACTGCCCGTACTCC
ATCCTGGAAATCACCTCCGTTGAAATCGGTGTTG
TTGCTGTTAAAGCTATCAACTCCAACTACTACCTGGCTATGAACAA
GAAAGGTAAACTGTACGGTTCCAAAGAATTTAAC
AACGACTGTAAACTGAAAGAACGTATCGAAGAAAACGGTTACAAC
ACCTACGCTTCCTTCAACTGGCAGCACAACGGTCG
ACAAATGTATGTGGCACTGAACGGTAAAGGTGCTCCACGTCGTGGT
C A G A A A A C C C G T C G T A A A A A C A C C T
CTGCTCACTTTCTGCCAATGGTGGTACACTCTTAA

KGF2Δ33(s172-208)的氨基酸序列:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITS
VEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYN
TYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS

C.构建N末端缺失突变体KGF-2Δ4

为了提高KGF2在大肠杆菌中的表达水平，并提高大肠杆菌表达的KGF2的溶解性和稳定性，构建从加工前KGF2中除去了前38个氨基酸(包括37位的半胱氨酸)的一种缺失变体KGF-2Δ4(氨基酸39-208)。由于所得KGF2缺失分子含偶数个半胱氨酸残基，因分子内二硫键形成所引起的聚集问题就可以减少，从而提高了活性蛋白质的表达水平。

为了进行聚合酶链反应指导的扩增并将KGF2Δ4亚克隆至大肠杆菌蛋白质表达载体pQE6中，合成两个寡核苷酸引物(PM61和19138)，它们的碱基序列如下:

PM61: CGCGGCCATGGCTCTGGGTCAGGACATG
19138: GGGCCCAAGCTTATGAGTGTACCACCAT

在N-末端引物(PM61)的情况下，插入一个NcoI限制位点，而在C-末端引物(19138)的情况下，插入一个HindIII限制位点。PM61还含有一个与KGF2编码区邻接且读框一致的ATG序列以便在大肠杆菌中翻

译已克隆的片段，而19138含有与KGF2编码区邻接且读框一致的2个终止密码子(在大肠杆菌中优先使用的)，这样可确保在大肠杆菌中正确地发生翻译终止。

用本领域技术人员熟知的标准条件，以全长KGF2(aa 36-208)(在实施例12C中构建的)为模板，完成聚合酶链反应。将所得的扩增子用NcoI和HindIII限制性消化并亚克隆至已用NcoI / HindIII消化过的pQE6蛋白质表达载体中。

KGF2Δ4的核苷酸序列:

ATGGCTCTGGGTCAAGATATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTT
CCTCTTCCTCTTTCTCTTCCCCGTCTTCCGCTGG
TCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGC
GTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGA
AAATCGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACT
GCCCGTACAGCATCCTGGAGATAACATCAGTAGAA
ATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAG
CCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAA
AGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAA
TGGATACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGC
ATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTC
CAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACC
TCTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAA

KGF2Δ4的氨基酸序列:

MALGQDMVSPEATNSSSSSFSSPSSAGRHVRSYNHLQGDVRWRKLFS
FTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSVEIGVVAVKAINSNYYLA
MNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMYV
ALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS

实施例17

在正常大鼠内KGF-2Δ33刺激的伤口愈合

为了证实 KGF-2Δ33 可加快伤口愈合，用下列模型检查切割伤口的伤口愈合情况。

用 Keyes 皮肤打孔器在 Sprague Dawley 大鼠(n=5)背上打出一 6mm 的切割伤口。将伤口敞开并用各种浓度 KGF-2Δ33(在 40mM NaOAc 和 150mM NaCl,pH6.5 缓冲液中)和缓冲液(40mM NaOAc 和 150mM NaCl,pH6.5)从创伤当天开始进行局部处理，连续处理 4 天。每天用校正的 Jameson 测径器测量伤口。用平方毫米表示伤口的大小。在最后一天测量伤口，并收集伤口进一步分析。用非成对 t 检验完成统计学分析(平均值±SE)。评估参数包括伤口闭合百分比，组织学分数(1-3 表示有最少的细胞积累，没有肉芽； 4-6 表示不成熟肉芽，炎性细胞，毛细血管；7-9 表示肉芽组织，细胞、成纤维细胞、新上皮； 10-12 表示含成纤维细胞、胶原和上皮的成熟真皮)，上皮再形成和免疫组织化学。

在创伤后第 3 天，与缓冲液对照的 38.9mm^2 相比，用 KGF-2Δ33 处理减小了伤口大小(用 4μg，伤口大小为 30.4mm^2,p=0.006; 用 1μg，伤口大小为 33.6mm^2, p=0.0007)。在创伤后第 4 天，与缓冲液对照的 33.8mm^2 相比，用 KGF-2Δ33 处理减小了伤口大小(用 0.1μg，伤口大小为 27.2mm^2,p=0.02; 用 0.4μg，伤口大小为 27.9mm^2, p=0.04)。在创伤后第 5 天，与缓冲液对照的 25.1mm^2 相比，用 KGF-2Δ33 处理减小了伤口大小(用 4μg，伤口大小为 18.1mm^2 p=0.02)。参见图 36。

在第 5 天收集伤口后，评估其它参数。与缓冲液对照的 60.2%相比，用 4μg KGF-2Δ33 提高了伤口闭合的百分比(71.2%,p=0.02)。与缓冲液对照的 6.4 相比，施用 1μg 和 4μg KGF-2Δ33 还可提高组织学分数(用 1μg 为 8.4, p=0.005; 用 4μg 为 8.5, p=0.04 。)。相对于缓冲液对照的 923μm，施用 1μg 和 4μg KGF-2Δ33 改善了上皮再形成(用 1μg 为 1389μm, p=0.007; 用 4μg 为 1220μm, p=0.02)。参见图 37。

该研究说明，正如通过总伤口面积的减少所表明的，每日用 KGF-2Δ33 处理加快了正常动物中的伤口愈合速率。另外，伤口样品的组织学评估和上皮再形成的评估也表明，在所述正常大鼠模型中， KGF-2Δ33 也提高了愈合速率。

实施例 18

在正常大鼠中 KGF-2Δ33 对抗拉强度和表皮厚度的影响

为了证实 KGF-2Δ33 可提高伤口的抗拉强度和表皮厚度，进行下列试验。

在雄性 Sprague Dawley 大鼠(n=8 或 9)的背部切割一 2.5cm 的全层皮切割伤口。用 3 个等距离的金属皮肤夹子缝合皮肤切口。在切割时局部涂抹缓冲液(40mM NaOAc 和 150mM NaCl,pH6.5)或 KGF-2Δ33(在 40mM NaOAc 和 150mM NaCl,pH6.5 缓冲液中的溶液)。在第 5 天切割四条 0.5cm 宽的伤口带。用 Instron™ 皮肤张力计来研究样品的抗断强度，并将样品用于羟脯氨酸测定和组织病理学分析。抗断强度是指各伤口在裂开前所承受的最大力量。用非成对 t 检验进行统计学分析(平均值±SE)。

在切割皮肤大鼠模型中，切割后在伤口内局部涂抹一次 KGF-2 Δ33 可使抗断强度、抗拉强度和表皮厚度在统计学上显著增加。在一项研究中，用 KGF-2 以 1 、 4 和 10μg 处理的伤口的抗断强度明显高于用缓冲液处理的对照组(1μg 时 107.3g, p=0.0006; 4μg 时 126.4g, p<0.0001; 10μg 时 123.8g, p<0.0001)。参见图 38 。

在光学显微镜下对马森氏三色切片进行表皮厚度测定。与缓冲液对照组的 54.8μ 相比，用 KGF-2 Δ33 处理的伤口表现出表皮厚度增加(1μg 时 60.5μ， 4μg 时 66.51μ, p=0.01， 10μg 时 59.6μ)。参见图 39 。

这些研究表明，单次伤口内涂抹 KGF-2 提高并加快了伤口的愈合过程，表现为切割伤口的抗断强度和表皮厚度增加。

实施例 19

KGF-2 Δ33 对正常大鼠皮肤的影响

为了说明真皮内注射 KGF-2Δ33 后， KGF-2Δ33 对正常大鼠皮肤的影响，进行如下实验。

在第 0 天，对雄性成年 SD 大鼠(n=3)真皮内注射 6 次 50μl 安慰剂或

50 μ l 的浓度为 1 和 4μg 的 KGF-2 Δ33(在 40mM NaOAc 和 150mM NaCl,pH6.5 缓冲液中的溶液)。在第 24 和 48 小时处死动物，处死动物前 2 小时对动物注射 5-2'-溴-脱氧尿苷(BrdU)(100mg/kg i.p.)。测定从颗粒层到基底层底部的表皮厚度。沿注射部位进行约 20 次测量并计算出平均厚度。用校准的测微计在光学显微镜下对马森氏三色切片进行测量。由两个盲观察者在光学显微镜下用如下计分系统进行 BrdU 计分： 0-3 表示没有至很少量的 BrdU 标记的细胞； 4-6 表示中等标记； 7-10 表示强标记的细胞。注射后 24 和 48 小时处死动物。用非成对 t 检验进行统计学分析。(平均值±SE)。

与缓冲液对照的 27.1μ 相比， KGF-2 Δ33 处理过的皮肤在 24 小时时表现出表皮厚度增加(1μg 时为 32.2μ, p<0.001; 4μg 时为 35.4μ, p<0.0001)。与缓冲液对照的 27.8μ 相比， KGF-2 Δ33 处理的皮肤在 48 小时时表现出表皮厚度增加(1μg 时为 34.0μ， p=0.0003， 4μg 时为 42.4μ, p<0.0001)。参见图 40 。与缓冲液对照的 3.33 相比， KGF-2 Δ33 处理过的皮肤在 48 小时时还表现出 BrdU 免疫染色增加(1μg 时为 4.37, p=0.07， 4μg 时为 6.85, p<0.0001)。参见图 41 。

这些研究表明，皮肤内注射 KGF-2 提高并加快了表皮厚度增加。因此， KGF-2 可用于预防或缓解皱纹，改善老化的皮肤和减少伤疤或改善美容手术后的伤口愈合。此外， KGF-2 还可预防性地用于预防或减少口腔粘膜炎(口腔溃疡)、由于化疗或其它试剂引起的肠炎。

实施例 20

KGF-2 对 PAF 引起的爪水肿的抗炎效果

为了说明 KGF-2 的抗炎效果，用 PAF 引起的爪水肿炎症模型进行如下实验。

将 lewis 大鼠(190-210 克)每 4 只分成一组，对大鼠右后爪的足垫用 120μl 含有 2.5 纳摩尔 PAF 的溶液进行皮下注射，该溶液中同时含有如下试剂： 125μg Ckb-10(B5), 24μg LPS, 73μg KGF-2[图 1(SEQ ID NO:2) 的 Thr(36)-Ser(208)， N-末端为 Met]或不加蛋白质。对左后足注射相同

量的缓冲液作为平行对照。在临注射PAF前、注射PAF后30分钟和90分钟用体积描记图系统测量大鼠爪的体积。计算鼠爪体积改变的百分数(%)。

实验1和实验2的试验试剂

组 (N=4)	PAF(R.) 2.5nMol	Ckβ-10(R.) 1.04mg/ml	LPS(R.) 200μg/ml	KGF-2(R.) 0.73mg/ml	缓冲液
1	20μl	-	-	-	100μl
2	20μl	100μl	-	-	-
3	20μl	-	100μl	-	-
4	20μl	-	-	100μl	-

如图42所示，正如所预期的，右后爪单独注射PAF 0.5小时后使鼠爪的体积显著增加(对于实验1或实验2，分别为75或100%)；而注射缓冲液的左后爪或单独注射LPS或SEB的右后爪仅表现出轻微的水肿症状(数据未给出)。但当将KGF-2与PAF同时局部注射时，与单独用PAF攻击的鼠爪相比，前一情况下鼠爪的体积明显减小(对于实验1或实验2，分别为25或50%)。当将PAF与Ckb-10(一种不同的蛋白质)、LPS或SEB(两种炎性介体)一起注射动物时未观察到爪水肿的减弱。这些结果表明KGF-2的抗炎效果是特异性的，而不是由于该蛋白质的某些非特异性性质引起的。

KGF-2 Δ33对大鼠中PAF引起的爪水肿的影响

在上述用KGF-2 Δ33证实其刺激角质形成细胞增殖的体外生物学活性及其在体内对伤口愈合的影响的各实验后，还在大鼠内评估了KGF-2 Δ33对PAF引起的大鼠爪水肿模型的效果。将lewis大鼠(190-210克)每4只分成一组，对大鼠右后爪的足垫用120μl含有2.5纳摩尔PAF的溶液进行皮下注射，该溶液中还含有210μg KGF-2 Δ33或白蛋白。对左后爪单独注射相同量的缓冲液、白蛋白或KGF-2 Δ33作为平行对照。在注射PAF后的不同间隔时间用体积描记图系统测量大鼠爪的体积。计算

鼠爪体积改变的百分数(%)。

如图 43 所示，正如所预期的，右后爪在注射 PAF 和白蛋白 0.5 小时后，爪体积显著增加(75%)；而只注射缓冲液、白蛋白或 KGF-2 Δ33 的左后爪仅表现出轻微的水肿症状。但是，当将 KGF-2 Δ33 与 PAF 同时局部注射时，与用 PAF + 白蛋白攻击的鼠爪相比，在持续 4 小时的整个实验过程中，前一情况下鼠爪的体积明显减小(平均 20%)。这些结果证实了 KGF-2 Δ33 的抗炎性质。

实验试剂

组 (N=4)	PAF 2.5nMol	白蛋白 2.1mg/ml	KGF-2 Δ33 2.1mg/ml	缓冲液
1	20μl	100μl	-	-
2	20μl	-	100μl	-
3	-	120μl	-	-
4	-	-	120μl	-
5	-	-	-	120μl

因此，KGF-2 可用于治疗炎症是主要病因的急性或慢性病症，所述病症包括但不仅限于牛皮癣、湿疹皮炎和/或关节炎。

实施例 21

KGF-2 Δ33 对结肠端-端吻合术大鼠模型的影响

本实施例说明 KGF-2 Δ33 可以在 Wistar 或 Sprague Dawley 大鼠的肠或结肠吻合术模型中提高肠修复的速率。

实验性吻合术中应用大鼠是一种已很好表征过的、外科手术伤口愈合相关的可重现的模型。该模型还可用于研究长期类固醇治疗或各种化疗方案对结肠和小肠内外科手术伤口愈合的质量和速度的影响(Mastboom W. J. B.等，英国外科手术杂志(Br. J. Surg.), 78:54-56(1991), Salm R.等，外科手术肿瘤学杂志(J. Surg. Oncol.), 47: 5-11, (1991), Weiber S.等，欧洲外科手术研究(Eur. Surg. Res.), 26:173-178(1994))。吻合术的愈合与身体其它部位伤口的愈合相似。愈合早期的特征是急性

炎症，随后是成纤维细胞的增殖和胶原的合成。胶原逐渐成型，当新的胶原合成时伤口变坚固(Koruda M.J.和 Rolandelli, R.H., 外科手术研究杂志(J. Surg. Res.), 48:504-515(1990))。大部分术后并发症例如吻合泄漏发生于手术后的最初几天--该期间内结肠的强度主要由伤口边缘承受缝合线的能力来保证。据报道，在手术后的最初几天内胃肠道承受缝合线的能力下降了 80%(Hogstrom H 和 Haglund U. Acta Chir Scand 151:533-535(1985), Jonsson K 等, 美国外科手术杂志(Am. J. Surg.), 145: 800-803(1983))。

肌肉内联合注射氯胺酮(50mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg)将雄性成年 SD 大鼠(n=5)麻醉。沿中线切开 4cm 长打开腹腔。在距腹膜反射区 3cm 处从左结肠切下 1cm 宽的片段并保留边缘血管。进行单层端-端吻合术，用 5-0 Vicryl 反转缝合线缝 8-10 针恢复肠的连续性。然后通过注射器用缓冲液或 1 和 4μg 浓度的 KGF-2 Δ33 局部处理吻合处。然后用 3-0 连续丝缝合线缝合肌肉层并用外科夹子闭合皮肤使切割伤口闭合。然后每日皮下施用缓冲液或 1 和 5mg/kg 的 KGF-2 Δ33 。在手术当天进行称重，然后每天称座一次。最后一次处理(第 5 天)24 小时后对动物实行安乐死。将动物麻醉并进行钡灌肠，然后以固定的距离进行 X-射线透视。结肠内给药后由两个盲观察者进行放射分析，结果表明用 KGF-2 Δ33 处理的组 1)在手术部位的钡泄漏速率降低， 2)手术部位的收缩程度降低，和 3)远离手术部位的粪便量增加。

结肠吻合术放射学分析

组	粪便量	吻合处的收缩	近端膨胀	腹膜泄漏
未处理组 (N=5)	20%	80%	80%	60%
缓冲液组 (N=5)	40%	60%	80%	75%

KGF-2Δ33 [1mg/kg] (N=5)	60%	20%	100%	20%
KGF-2Δ33 [5mg/kg] (N=4)	100%	0%	75%	25%

实施例 22

构建 KGF-2 羧基末端突变

KGF-2 的羧基末端带有大量电荷。这些带电荷残基的密度有可能会影响该蛋白质的稳定性，从而影响溶解性。为了产生在溶液中稳定的突变蛋白，在所述基因的所述区域产生一系列突变。

为了产生点突变体 194R/E、194R/Q、191K/E、191K/Q，188 R/E、188 R/Q，用本领域技术人员熟知的标准条件，在 PCR 反应中用 KGF2Δ33 为模板，用 5952 KGF2Δ33 5'Afl III5'引物和标明的 3'引物（所述引物含有 KGF-2 的适宜点突变）。将所得产物用 Afl III 和 HindIII 消化，然后克隆至已用 NcoI 和 HindIII 消化的大肠杆菌表达载体 pQE60 中。

KGF2Δ33，194R/E 的构建:

使用下列引物:

5952 KGFΔ33 5' AflIII：

5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'

KGF2 3' HindIII 194aa R 至 E：

5'CTGCCCAAGCTTTTATGAGTGTACCACCATTGGAAGAAAGTGAGC
AGAGGTGTTTTTTTCTCGTGTTTTCTGTCC 3'

KGF2Δ33,194R/E 的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT
TCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAG
CATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG

TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA

GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC

AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG

GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGG
ACAGAAAACACGAGAAAAAAACACCTCTGCTCACT

TTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

KGF2Δ33,194R/E 的氨基酸序列:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITS
VEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYN
TYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKTREKNTSAHFLPMVVH
S

KGF2Δ33， 194R/Q 的构建:

使用下列引物:

5952 KGF Δ33 5' AflIII:

5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'

KGF2 3' HindIII 194aa R 至 Q:

5'CTGCCCAAGCTTTTATGAGTGTACCACCATTGGAAGAAAGTGAGC
AGAGGTGTTTTTCTGTCGTGTTTTCTGTCC 3'

KGF2Δ33,194R/Q 的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT
TCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAG
CATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG

TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA
GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC

AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG

GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGG
ACAGAAAACACGACAGAAAAACACCTCTGCTCACT

TTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

KGF2Δ33,194R/Q 的氨基酸序列:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITS
VEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYN
TYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKTRQKNTSAHFLPMVVH
S

KGF2Δ33,191K/E 构建:

使用下列引物:

5952 KGF Δ33 5' AflIII :

5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'

KGF2 3' HindIII 191aa K 至 E :

5'CTGCCCAAGCTTTTATGAGTGTACCACCATTGGAAGAAAGTGAGC
AGAGGTGTTTTTCCTTCGTGTTTCCTGTCCTCTCCTTGG 3'

KGF2Δ33,191K/E 核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT
TCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAG
CATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG

TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA
GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC

AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG

GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGG

ACAGGAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACT

TTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

KGF2Δ33,191K/E 氨基酸序列:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITS
VEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYN
TYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQETRRKNTSAHFLPMVVH
S

KGF2Δ33,191K/Q 的构建:

使用下列引物:

5952 KGF Δ33 5' AflIII :

5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'

KGF2 3' HindIII 191aa K 至 Q :

5'CTGCCCAAGCTTTTATGAGTGTACCACCATTGGAAGAAAGTGAGC
AGAGGTGTTTTTCCTTCGTGTCTGCTGTCCTCTCCTTGG 3'

KGF2Δ33,191K/Q 的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT
TCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAG
CATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG

TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA
GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC

AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG

GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGG
ACAGCAGACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACT

TTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

KGF2Δ33,191K/Q 的氨基酸序列:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITS
VEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYN
TYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQQTRRKNTSAHFLPMVVH
S

KGF2Δ33， 188R/E 的构建:

使用下列引物:

5952 KGF Δ33 5' AflIII :

5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'

KGF2 3' HindIII 188aa R 至 E :

5'CTGCCCAAGCTTTTATGAGTGTACCACCATTGGAAGAAAGTGAGC
AGAGGTGTTTTTCCTTCGTGTTTTCTGTCCTTCCCTTGGAGCTCCTTT
3'

KGF2Δ33， 188R/E 的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT
TCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAG
CATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG

TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA
GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC

AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG

GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGGAAGG

ACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACT

TTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

KGF2Δ33， 188R/E 的氨基酸序列:

MYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSV
EIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNT
YASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPREGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS

KGF2Δ33， 188R/Q 的构建:

使用下列引物:

5952 KGF Δ33 5' AflIII：

5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'

KGF2 3'HindIII 188aa R 至 Q：

5'CTGCCCAAGCTTTTATGAGTGTACCACCATTGGAAGAAAGTGAGC
AGAGGTGTTTTTCCTTCGTGTTTTCTGTCCCTGCCTTGGAGCTCCTTT
3'

KGF2Δ33， 188R/Q 的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT
TCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAG
CATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG

TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA
GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC

AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG

GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGCAGGG

ACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACT

TTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

KGF2Δ33， 188R/Q 的氨基酸序列:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITS
VEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYN
TYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRQGQKTRRKNTSAHFLPMVVH
S

KGF2Δ33,183K/E 的构建:

为完成突变 183K/E，进行两个 PCR 反应以便对该赖氨酸进行寡核苷酸定点诱变。在一个反应中，用 5952 KGFΔ33 5'AflIII 为 5'引物，用 KGF2 183aa K 至 E 有义序列作为该反应的 3'引物。在第二个反应中，用 KGF2 5'183aaK 至 E 反义序列作为该反应的 5'引物，用 KGF2 3'HindIII TAA 终止序列作为 3'引物。用 KGF2Δ33 作为这些反应的模板。在本领域技术人员熟知的标准条件下扩增所述反应。在随后的反应中，用来自这些 PCR 反应的产物各 1μl 作为模板， 5'引物为 5453 BsphI， 3'引物为 5258 HindIII。在本领域技术人员熟知的标准条件下进行扩增。将所得产物用 AflIII 和 HindIII 消化，然后克隆至已用 NcoI 和 HindIII 消化的大肠杆菌表达载体 pQE60 中。

使用下列引物:

5952 KGF Δ33 5' AflIII:

5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'

KGF2 5' 183aa K 至 E 有义序列:

5' TTGAATGGAGAAGGAGCTCCA 3'

KGF2 183aa K 至 E 反义序列:

5' TGGAGCTCCTTCTCCATTCAA 3'

KGF2 3' HindIII TAA 终止序列:

5' CTGCCCAAGCTTTTATGAGTGTACCACCATTGG 3'

KGF2Δ33， 183K/E 的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGT
TCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAG
CATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG

TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA
GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC

AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG

GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAGAAGGAGCTCCAAGGAGAGG
ACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACT

TTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

KGF2Δ33， 183K/E 的氨基酸序列:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITS
VEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYN
TYASFNWQHNGRQMYVALNGEGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS

实施例 23

在 Balb/c 小鼠中，全身照射后 KGF-2 对存活的影响

通常将电离辐射用于治疗许多恶性肿瘤，包括肺癌和乳腺癌，淋巴瘤和骨盆肿瘤(Ward, W.F.等，肺病动物模型的 CRC 手册(CRC Handbook of Animal Models of Pulmonary Disease), CRC Press ,pp.165-195(1989))。但是，辐射诱导的损伤(肺、肠等)限制了辐射疗法的强度和成功(Morgan, G.W.等，国际辐射肿瘤学生物物理杂志(Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.), 31:361(1995))。胃肠粘膜的细胞周期比较

快，并对细胞毒性试剂特别敏感(Potten, C.S.等， In: Cytotoxic Insult to Tissue, Churchill Livingstone, pp.105-152(1983))。肠辐射损伤的部分表现包括急性直肠炎、肠纤维变性、狭窄或瘘形成(Anseline, D.F.等，外科手术纪事(Ann. Surg.), 194:716-724(1981))。可保护正常结构免受辐射影响但不改变肿瘤的辐射敏感性的治疗方法在这些疾病的治疗中是非常有益的。不管照射面积多大，辐射剂量受正常组织的辐射敏感性所限制。全身或局部身体照射后的并发症包括肺炎、纤维变性、胃肠损伤和骨髓疾病。

在 TBI 后，还证实了包括 IL-1 、 TNF 、 IL-6 、 IL-12 等的多种细胞因子有辐射保护作用(Neta, R.等，实验医学杂志(J. Exp. Med.) ，173:1177(1991))。已经表明在辐射和化疗联用后(Du, X.X.等，血液，83:33(1994))以及辐射诱导的胸损伤后(Redlich, C.A.等，免疫学杂志，157:1705-1710(1996))， IL-11 可保护小肠粘膜细胞。

动物

所有试验均用 BALB/c 小鼠完成。购买 6 周龄的动物，在研究开始时，动物为 7 周龄。所有操作均用无菌技术完成。按照人类基因组科学公司社会事业性动物饲养和使用委员会的规则和指南以及实验室动物的饲养和使用指南完成该项研究，该委员会审查过并赞成这一实验方案。

KGF-2

该蛋白质是具有 141 个氨基酸的人蛋白质，称为 KGF-2Δ33 。KGF-2Δ33 为 KGF-2 的截短同工型，不含成熟蛋白质的前 33 个氨基末端残基。已经将编码所述蛋白质的基因克隆至一个大肠杆菌表达载体中。将含纯度大于 95%的重组物质的级分用于所述试验。用含 40mM 乙酸钠 + 150mM 氯化钠, pH6.5 的载体配制 KGF-2 。用相同的载体从储备液配制稀释溶液。

全身辐射和试验设计

用 68 Mark I Shepherd Cesi μ m 辐照器以 519 拉德(5.19 戈瑞)照射小鼠。将 KGF-2Δ33 每天皮下施用，从照射前 2 天开始，并在照射后持续 7 天。每天记录所有小鼠的体重。让各组小鼠随机接受下列三种治疗之一：全身照射(total body irradiation, TBI)加缓冲液， TBI 加 KGF-2Δ33(1 mg/kg sq)， TBI 加 KGF-2Δ33(5 mg/kg sq)。进行 2 个独立的试验。

结果

用照射过的动物完成 2 项研究。在第一项研究中，用 519 拉德(5.19 戈瑞)照射动物。在照射前 2 天，用缓冲液或 1 和 5mg/kg (s.q.)KGF-2Δ33 处理动物，此后每天处理，持续 7 天。在全身照射后第 25 天，缓冲液组中的动物有 1/5 存活。相比之下， KGF-2 处理组中， 1mg/kg 组有 5/5 动物存活， 5 mg/kg 组有 4/5 动物存活(图 44)。

另外，在 TBI 后第 20 天， KGF-2 处理的动物体重分别增加了 0.9%和 5.3%。相比之下，在第 20 天，缓冲液处理组动物的体重减轻了 4.2%。在相同的时间内，正常的未照射的年龄匹配的对照动物，体重增加了 6.7%(图 45)。

在第二项研究中的动物也用 519 拉德(5.19 戈瑞)照射。在照射前 2 天，用缓冲液或 1 和 5mg/kg (s.q.)KGF-2Δ33 处理动物，此后每天处理，持续 7 天。在全身照射后第 15 天，缓冲液组中的动物全部死亡。施用 1mg/kg KGF-2 的动物组中有 30%存活，施用 5mg/kg KGF-2 的动物组中有 60%存活。在 TBI 后第 25 天，施用 1mg/kg KGF-2 的组有 20%动物存活，施用 5mg/kg KGF-2 的组有 50%动物存活(图 46)。

结论

总之，这些结果表明在 TBI 后， KGF-2 有保护作用。 KGF-2 提高经 TBI 后之动物的存活率的能力表明 KGF-2 在辐射诱导的损伤中是有用的，而且在恶性肿瘤的治疗中可提高辐射的治疗率。

实施例 24

用小鼠皮炎 TPA 模型评估 KGF-2

为了证实 KGF-2 可减弱接触性皮炎的发展，使用十四烷酰佛波醇乙酸酯(TPA)诱导的小鼠皮炎模型。在试验性皮炎中利用雌性 BALB/c 和雄性 Swiss Webster 小鼠是接触性皮炎已被很好地表征过的、相关的且可重复的模型。在局部施用 TPA 后，这些小鼠品系会产生长期炎性反应，所述炎性反应包括局部血液动力学，血管渗透性和白细胞的局部迁移，这些病理学变化与人皮炎症状相似(Rao 等，1993,炎症， 17(6):723; Rao 等， 1994， J.Kipid Mediators Cell Signalling， 10:213)。

局部施用 TPA(4μg/耳，耳的内外表面各 10μl)的丙酮溶液(200μg/ml)后 60 分钟，给小鼠组腹膜内、皮下或静脉内施用载体或 KGF-2 。对照组接受 20μl 丙酮作为局部给药。施用 TPA 4 小时后，测量耳厚度的增加，并将耳切下进行组织学分析。为了确定血管渗透性对 TPA 的反应，在局部施用 TPA 后的选定时间，通过尾静脉给小鼠静脉内注射埃文氏蓝(Evans blue) (300mg/kg)， 15 分钟后，杀死小鼠。切下耳，取下来，再用二甲基甲酰胺提取并离心。用分光光度计测量 590nm 的吸收值。

实施例 25

KGF-2Δ33 在伤口愈合中的作用

以开始的体外数据为基础，检测 KGF-2Δ33 在皮肤中的生物学作用，所述体外数据证实了 KGF-2 具有刺激初级人表皮角质形成细胞和已用 FGFR 同工型 2iiib 转染的鼠原 B BaF3 细胞的能力。进行初步试验以确定真皮内施用后 KGF-2Δ33 的生物学作用。真皮内研究后，用各种伤口愈合模型(包括全层皮打孔器活检伤口和切割伤口)研究 KGF-2Δ33 以确定其作为伤口愈合剂的潜力。

KGF-2Δ33 在糖皮质激素损害的大鼠伤口愈合模型中的作用

伤口愈合受损是与各种疾病如糖尿病有关的一个重要临床问题，它是全身性施用类固醇或抗代谢产物导致的并发症。已知在人和组织修复

的动物模型中全身性地施用糖皮质激素进行治疗会损害伤口愈合。在施用糖皮质激素后，已经观察到循环中的单核细胞水平有所降低，前胶原合成受到抑制。因此，愈合的炎症期和基质合成是与组织修复的复杂过程有关的重要因素。在本发明研究中，用大鼠全层皮切割的皮肤伤口评估了多次局部施用 KGF-2 的效果，在所述大鼠中，已全身性施用甲基氢化泼尼松而损害了愈合。

在 Sprague Dawley 大鼠(n=5/治疗组)背部产生 8mm 的伤口，并接受甲基氢化泼尼松(17mg/kg,肌肉内)以损害愈合。每天用 50μl 体积的缓冲液或 0.1,0.5 和 1.5μg KGF-2 局部处理伤口。用校正的 Jameson 测径器在第 2、4、6 和 8 天测量伤口。在第 6 天(数据未列出)和第 8 天(图 47)，与缓冲液对照组相比， KGF-2 处理组的伤口闭合在统计学上显著减小。

在糖尿病小鼠模型中 KGF-2Δ33 对伤口愈合的影响

用 6mm 活检打孔器在 6 周龄体重为 30-35g 的遗传性糖尿病纯合雌性(db+/db+)小鼠(n=6)背部打出一全层皮伤口。将伤口敞开，每天用安慰剂或 0.1,0.5 和 1.5μg KGF-2 处理。用 Jameson 测径器测量伤口的闭合。在第 10 天，对动物实行安乐死并收集伤口进行组织学分析。

与安慰剂处理组或未处理组相比， 0.1μg KGF-2 可显著提高伤口闭合百分比(p=0.02)。与安慰剂处理组或未处理组相比，施用 0.1μg KGF-2 可提高组织学分数(p=0.03)，与未处理组相比，施用 0.5μg (p=0.01)和 1.5μg(p=0.05)也可提高组织学分数。

结论

以上述结果为基础，在受到损害的条件下如施用糖皮质激素和患有糖尿病的情况下， KGF-2 有显著的活性。因此， KGF-2 在临床上可用来刺激手术后的伤口愈合，用于刺激糖尿病患者或循环不良患者的慢性溃疡(例如静脉功能不全和静脉溃疡)、灼伤和其它异常伤口愈合疾病如尿毒症、营养不良、维生素缺乏症以及用类固醇和抗肿瘤药物进行全身性

治疗产生的异常伤口愈合疾病的愈合。

实施例 26

KGF-2Δ33 对口腔粘膜的作用

临床使用的细胞毒性试剂有不合适的作用，即它们可抑制某些部位正常上皮例如口腔粘膜的增殖，从而在粘膜屏障引起威胁生命的紊乱。我们已经进行了研究以确定 KGF-2 在所述临床区的效力。在粘膜炎模型中，数据说明 KGF-2 有治疗作用。

KGF-2Δ33 对仓鼠口腔粘膜的作用

我们着手确定 KGF-2 是否可诱导正常口腔粘膜上皮的增殖。用雄性 Golden Syrian 仓鼠评估 KGF-2 在口腔粘膜中的作用。每天用缓冲液或 KGF-2Δ33(0.1,1 和 10μg/颊)，以 100μl/颊的体积局部施用于被麻醉的仓鼠的颊部从而处理仓鼠的颊囊。将所述化合物与颊接触最少 60 秒然后咽下。处理 7 天后，按上述方法给动物注射 BrdU 并杀死。用抗 BrdU 抗体标记增殖中的细胞。图 48 表明，当用 1μg 和 10μg KGF-2Δ33 处理动物时， BrdU 标记有显著增加(细胞增殖)(与缓冲液处理相比)。

用 KGF-2 局部处理诱导了正常粘膜上皮细胞的增殖作用。基于这些结果，可将 KGF-2 临床上用于避免因任何化疗剂(或其它毒性药物方案)、辐射治疗或化疗-辐射治疗组合引起的口腔粘膜炎。另外， KGF-2 可用作治疗试剂，它可减轻因毒性试剂(化疗)或放射疗法而造成的口腔粘膜损伤的严重性。

实施例 27

KGF-2Δ33 对大鼠局部缺血伤口愈合的作用

本实施例所列试验的目的是用局部缺血伤口愈合模型，确定 KGF-2 在伤口愈合中的效力。

通过增加一个全层皮随机肌皮带状瓣(3x4cm)而部分地阻碍局部皮肤的血液供应。在局部皮肤上产生全层皮伤口，该伤口由该肌皮瓣组成。

使用 60 只成年 Sprague-Dawley 大鼠，并将其随机分成 KGF-2Δ33 治疗组和安慰剂组以用于该研究(5 只动物/组/时间点)。分别在创伤后第 1、3、5、7、10 和 15 天收集伤口。

在创伤后第 10 天和 15 天前，KGF-2 和缓冲液处理组之间的伤口抗断强度均没有显著差异。

结果表明，在创伤后 10 天之后，在局部缺血的伤口修复中，KGF-2 可显著提高伤口抗断强度。这些结果还说明，与以前在正常伤口愈合中得到的数据相比，在这两组中局部缺血延迟了愈合过程。

所述肌皮瓣模型提供了有关因静脉血回流而引起的局部缺血情况的数据和资料。这些结果说明 KGF-2 可用于治疗因静脉血回流受损和/或静脉功能不全而引起的慢性静脉性腿溃疡。

实施例 28

评估 KGF-2 在大鼠结肠吻合术中的愈合效果

本发明试验的结果说明在 Wistar 或 Sprague Dawley 大鼠的肠或结肠吻合术模型中，KGF-2Δ33 可提高肠修复的速率。另外，可用该模型说明 KGF-2 和其同工型具有提高胃肠或结肠壁与缝线结合的能力。

在试验性吻合术中使用大鼠是一个已很好地表征过的、外科手术伤口愈合中相关的并可重现的模型。该模型还可用于研究在结肠和小肠中，长期类固醇治疗或各种化疗方案对手术伤口愈合质量和愈合速率的影响(Mastboom, W.J.B.等，英国外科手术杂志，78:54-56(1991); Salm, R.等，外科肿瘤学杂志，47:5-11(1991); Weiber, S.等，欧洲外科手术研究，26:173-178(1994))。吻合术的愈合与身体其它部位的伤口愈合相似。愈合早期的特征是有急性炎症，随后成纤维细胞增殖并有胶原合成。胶原逐渐定型，伤口由于新胶原的合成而变坚固(Koruda, M.J.和 Rolandelli, R.H.,外科手术研究杂志，48:504-515(1990))。大多数术后并发症如吻合泄漏都发生在手术后的最初几天--在此期间结肠的强度主要通过伤口边缘固定缝线的能力来保证。已经报道在手术后的最初几天，胃肠道固定缝线的能力降低了 80%(Hogstrom, H.和 Haglund, U., Acta

Chir. Scand.151:533-535(1985); Jonsson, K.等，美国外科手术杂志，145:800-803(1983))。

肌肉内联用氯胺酮(50mg/kg)甲苯噻嗪(5mg/kg)麻醉大鼠。在皮肤消毒、手术过程中和手术后整个过程中均将动物保持于加热的垫上。将腹腔切开一 4cm 长的中线切口。切除距离腹膜反射区(peritoneal reflection)3 厘米的 1 厘米宽的左结肠段，同时保留边缘血管。完成单层端-端吻合术，使用 8-0 聚丙烯纺织纤维反转缝线，缝 8-10 针以保持肠的连续性。肌肉层用 3-O 连续丝线缝合切割伤口，皮肤用外科夹子闭合。每天对每只动物进行临床评估，包括个体体重，体温和食物消费情况。

手术后，立即每天皮下、局部、腹膜内、肌肉内、胃内或结肠内施用 KGF-2Δ33 和安慰剂，并一直持续至第 7 天将动物杀死时。有未处理对照、安慰剂组和 KGF-2Δ33 组。安乐死前 2 小时，经腹膜内注射给动物注射 100mg/kg BrdU。最后一次处理(第 5 天) 后 24 小时，对动物实行安乐死。在前腹膜壁切割一中线伤口，取出 1 厘米长的结肠片段，包括实行吻合术的片段。取出手术位点的第三段片段用于总胶原分析。

在两个试验中，将雄性成年 SD 大鼠(n=5)麻醉并用 6-0 聚丙烯纺织纤维反转缝线，缝 8-10 针以完成远端结肠的单层端-端吻合术。在吻合位点用注射器局部施用缓冲液或 1 和 4μg KGF-2Δ33。然后每天将缓冲液或浓度为 1mg/kg 或 5mg/kg 的 KGF-2Δ33 腹膜内施用给动物。在第 5 天对动物实行安乐死，切下结肠并用液氮骤冷，冻干并进行胶原分析。胶原浓度表示为μg 胶原/mg 组织干重。用非成对 t 检验完成统计学分析。平均值 ± SE。在第 5 天，将大鼠麻醉并进行钡灌肠，然后进行放射照相分析。对这两个试验的端-端左结肠吻合术的钡灌肠放射学评估表明用 1mg/kg 和 5mg/kg KGF-2 处理的动物，其腹膜泄漏有一致的减少。该数据列于下表。另外，用张力计检测手术位点的抗断强度。在 KGF-2Δ33 处理组和缓冲液组之间未观察到显著差异。如图 49 所示，相对于缓冲液对照组，施用 1mg/kg KGF-2Δ33(p=0.02)和 5mg/kg KGF-2Δ33(p=0.004)后，在手术位点的胶原含量显著增加。

表

结肠吻合术放射学分析

组	粪便量	吻合处的收缩*	腹膜泄漏
未处理组 (n=8)	50%	2.0	75%
缓冲液组 (n=7)	57%	1.0	50%
KGF-2Δ33[1mg/kg] (n=8)	50%	1.3	37%
KGF-2Δ33[5mg/kg] (n=9)	77%	1.6	11%

*吻合的收缩分数: 0-没有收缩; 1-5 最小至严重收缩

肌肉内联用氯胺酮(50mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg)麻醉成年 SD 大鼠(n=5)。将腹腔切开一 4cm 长的中线切口。切除靠近腹膜反射(peritoneal reflection)3cm 的 1 厘米宽的左结肠段，同时保留边缘血管。完成单层端-端吻合术，使用 8-10 间断的 6-0 聚丙烯纺织纤维反转缝线以恢复肠的连续性。然后通过注射器用缓冲液或浓度为 1μg 和 4μg 的 KGF-2 局部处理吻合处。肌肉层用 3-O 连续丝线缝合切割伤口，皮肤用外科夹子闭合。然后每天将缓冲液或浓度为 1mg/kg 或 5mg/kg 的 KGF-2Δ33 皮下施用给动物。手术后当天给动物称重并此后每天称动物的体重。在最后一次处理(第 5 天)后 24 小时，动物实行安乐死。麻醉动物并使动物接受钡灌肠，从固定的距离进行 X-射线分析。然后切下吻合处以进行组织病理学和生物机械分析。

实施例 29

用炎性肠疾病模型评估 KGF-2

KGF-2 是一种体外可诱导角质形成细胞增殖并且在体内对各种伤口愈合模型有活性的蛋白质。本研究的目的是确定 KGF-2 在鼠结肠炎模型中是否是有效的，所述结肠炎是由于无限制地与饮用水中的葡聚糖硫酸

钠接触而诱发的。

在炎性肠疾病模型中，使用 6-8 周龄的雌性 Swiss Webster 小鼠(20-25g, Charles River, Raleigh, NC)，所述炎性肠疾病是无限制地施用 4% 葡聚糖硫酸钠(DSS,36,000-44,000MW, American International Chemistry, Natick, MA)一周而引发的。每天非肠道地施用 KGF-2(n=10)。用三种参数确定效力：1)临床分数，以对粪的评估为基础；2)组织学分数，以对结肠的评估为基础；和 3)体重变化。临床分数由两部分组成，总最高分为 4 分。将粪便的坚松度记为：0 = 坚固；1 = 松；2 腹泻。同样以 0-2 级评估粪便中的血液情况，0 = 无血；1 = 隐约有血；2 = 大量直肠出血。组内平均分数在 3 分以上表明可能致死，而且疾病已经发展至不可治疗的阶段。在第 0、4、5、6 和 7 天记录临床分数。为了得到组织学分数，以基于炎症分数(0-3)和隐窝分数(0-4)的盲方式评估上升段、横行段和下降段结肠的玻片。每天称量体重。将数据表示为平均值±SEM。用非成对的 Student's t 检验确定与疾病对照之间的显著差异(*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001)。

当每天给 DSS 处理的小鼠腹膜内(IP)施用剂量为 1,5 或 10mg/kg 的 KGF-2Δ33，施用 7 天后，KGF-2 显著降低了临床分数，即分别降低了 28%，38%和 50%。组织学评估与临床分数的剂量依赖性抑制作用非常平行，施用 1,5 和 10mg/kg KGF-2Δ33，将组织学分数分别显著降低了 26%、48%和 51%。KGF-2 还显著降低了与 DSS 诱发的结肠炎有关的体重减轻。

在第二项研究中，比较每天腹膜内或皮下施用 KGF-2Δ33 的相对效力。在第 7 天试验结束时，腹膜内注射 KGF-2 的动物，其临床分数降低了 34%，而皮下注射 KGF-2 的动物，降低了 46%。相比于 DSS 对照，皮下给药也显著地降低了体重减轻的程度。基于临床分数和体重的测量，皮下施用 KGF-2 至少与腹膜内施用一样有效。

显然，可以用与前文描述和实施例所述不同的方式实施本发明。

在上述教导下，本发明的许多修饰和改变都是可行的，因此也在所附权利要求的范围内，可以用与具体描述不同的方式实施本发明。

全部文献(包括专利、专利申请、杂志文章、实验室手册、书或其它文献)的全部内容均引入本文作为参考。

图 1A

```
     ATGTGGAAATGGATACTGACACATTGTGCCTCAGCCTTTCCCCAGCTGCCCGGCTGCTGC
  1  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  60
     TACACCTTTACCTATGACTGTGTAACACGGAGTCGGAAAGGGGTGGACGGGCCGACGACG

      M  W  K  W  I  L  T  H  C  A  S  A  F  P  H  L  P  G  C  C

     TGCTGCTGCTTTTTGTTGCTGTTCTTGGTGTCTTCCGTCCCTGTCACCTGCCAAGCCCTT
 61  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  120
     ACGACGACGAAAAACAACGACAAGAACCACAGAAGGCAGGGACAGTGGACGGTTCGGGAA

      C  C  C  F  L  L  L  F  L  V  S  S  V  P  V  T  C  Q  A  L

     GGTCAGGACATGGTGTCACCAGAGGCCACCAACTCTTCTTCCTCCTCCTTCTCCTCTCCT
121  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  180
     CCAGTCCTGTACCACAGTGGTCTCCGGTGGTTGAGAAGAAGGAGGAGGAAGAGGAGAGGA

      G  Q  D  M  V  S  P  E  A  T  N  S  S  S  S  S  F  S  S  P

     TCCAGCGCGGGAAGGCATGTgCGGAGCTACAATCACCTTCAAGGAGATGTCCGCTGGAGA
181  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  240
     AGGTCGCGCCCTTCCGTACAcGCCTCGATGTTAGTGGAAGTTCCTCTACAGGCGACCTCT

      S  S  A  G  R  H  V  R  S  Y  N  H  L  Q  G  D  V  R  W  R
```

与图 1B 匹配

与图 1A 匹配

图 1B

```
     AAGCTATTCTCTTTCACCAAGTACTTTCTCAAGATTGAGAAGAACGGGAAGGTCAGCGGG
241  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 300
     TTCGATAAGAGAAAGTGGTTCATGAAAGAGTTCTAACTCTTCTTGCCCTTCCAGTCGCCC

      K  L  F  S  F  T  K  Y  F  L  K  I  E  K  N  G  K  V  S  G  -

     ACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTT
301  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 360
     TGGTTCTTCCTCTTGACGGGCATGTCGTAGGACCTCTATTGTAGTCATCTTTAGCCTCAA

      T  K  K  E  N  C  P  Y  S  I  L  E  I  T  S  V  E  I  G  V  -

     GTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTC
361  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 420
     CAACGGCAGTTTCGGTAATTGTCGTTGATAATGAATCGGTACTTGTTCTTCCCCTTTGAG

      V  A  V  K  A  I  N  S  N  Y  Y  L  A  M  N  K  K  G  K  L  -

     TATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGA
421  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 480
     ATACCGAGTTTTCTTAAATTGTTACTGACATTCGACTTCCTCTCCTATCTCCTTTTACCT

      Y  G  S  K  E  F  N  N  D  C  K  L  K  E  R  I  E  E  N  G  -
```

与图 1C 匹配

与图 1B 匹配

图 1C

```
     TACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTG
481  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 540
     ATGTTATGGATACGTAGTAAATTGACCGTCGTATTACCCTCCGTTTACATACACCGTAAC

      Y  N  T  Y  A  S  F  N  W  Q  H  N  G  R  Q  M  Y  V  A  L  -

     AATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCAC
541  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 600
     TTACCTTTTCCTCGAGGTTCCTCTCCTGTCTTTTGTGCTTCCTTTTTGTGGAGACGAGTG

      N  G  K  G  A  P  R  R  G  Q  K  T  R  R  K  N  T  S  A  H  -

     TTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG
601  ---------+---------+------- 627
     AAAGAAGGTTACCACCATGTGAGTATC
      F  L  P  M  V  V  H  S  *
```

图 2A

```
      1                                                                  50
FGF4  MS.GPGTAAV ALLPAVLLAL LA........ .PWAGRGGAA APTAPNGTLE
FGF6  MSRGAGRLQG TLWALVFLGI LV........ .GMVVPSPAG TR.ANNTLLD
FGF5  .......MSL SFLLLLFFSH LILSAWAHGE KRLAPKGQPG PAATDRNPIG
FGF1  .......... .......... .......... .......... ..........
FGF2  .......... .......... .......... .......... ..........
FGF9  .......... .......... .......... .......... ..........
FGF7  .......... .......... .......... ..MAPLGEVG NYFGVQDAVP
FGF7  .......... ......MHKW ILTWILPTLL .....YRSCF HIICLVGTIS
KGF2  .......... ......MWKW ILTHCASAFP HLPGCCCCCF LLLFLVSSVP
FGF3  .......... .......... .......... .......MGL IWLLLLSLLE
FGF8  MGSPRSALSC LLLHLLVLCL QAQVRSAAQK RGPGAGNPAD TLGQGHEDRP

      51                                                                 100
FGF4  AELERRWESL VALSLARLPV AA..QPKEAA VQSGAGDY.. ...LLGIKRL
FGF6  S...RGWGTL LSRSRAGLAG EI......AG VNWESG.Y.. ...LVGIKRQ
FGF5  SSSRQSSSSA MSSSSASSSP AASLGSQGSG LEQSSFQW.. ...SPSGRRT
FGF1  ......MAEG EITTFTALTE KFN...LPPG .......N.. ...YK...KP
FGF2  ......MAAG SITTLPALPE DGGSGAFPPG .......H.. ...FK...DP
FGF9  FGNVPVLPVD SPVLLSDHLG QSEAGGLPRG PAVTDLDH.. ...LKGILRR
FGF7  LACNDMTPEQ M...ATNVNC ......SSPE RHTRSYDY.. ...MEGGDIR
KGF2  VTCQALGQDM VSPEATNSSS SSFSSPSSAG RHVRSYNH.. ...LQ.GDVR
FGF3  PGWPAAGPGA .......... ...RLRRDAG GRGGVYEH.. ...L.GGAPR
FGF8  FGQRSRAGKN FTNPAPNYPE EGSKEQRDSV LPKVTQRHVR EQSLVTDQLS
```

与图 2B 匹配

与图 2A 匹配

图 2B

```
      101                                                                150
FGF4  RRL.....YC NVGIGFHLQA LPDGRIGGAH ADT.RDSLLE LSPVERGV.V
FGF6  RRL.....YC NVGIGFHLQV LPDGRISGTH EEN.PYSLLE ISTVERGV.V
FGF5  GSL.....YC RVGIGFHLQI YPDGKVNGSH EAN.MLSVLE IFAVSQGI.V
FGF1  KLL.....YC SNG.GHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ LSAESVGE.V
FGF2  KRL.....YC KNG.GFFLRI HPDGRVDGVR EKSDPHIKLQ LQAEERGV.V
FGF9  RQL.....YC R.T.GFHLEI FPNGTIQGTR KDHSRFGILE FISIAVGL.V
FGF7  VRR.....LF CRT.QWYLRI DKRGKVKGTQ EMKNNYNIME IRTVAVGI.V
KGF2  WRK.....LF SFT.KYFLKI EKNGKVSGTK KENCPYSILE ITSVEIGV.V
FGF3  RRK.....LY CAT.KYHLQL HPSGRVNGSL .ENSAYSILE ITAVEVGI.V
FGF8  RRLIRTYQLY SRTSGKHVQV LANKRINAMA EDGDPFAKLI VETDTFGSRV

      151                                                                200
FGF4  SIFGVASRFF VAMSSKGKLY G.SPFFTDEC TFKEILLPNN YNAYESYKYP
FGF6  SLFGVRSALF VAMNSKGRLY A.TPSFQEEC KFRETLLPNN YNAYESDLYQ
FGF5  GIRGVFSNKF LAMSKKGKLH A.SAKFTDDC KFRERFQENS YNTYASAIHR
FGF1  YIKSTETGQY LAMDTDGLLY G.SQTPNEEC LFLERLEENH YNTYISKKH.
FGF2  SIKGVCANRY LAMKEDGRLL A.SKCVTDEC FFFERLESNN YNTYRSRKY.
FGF9  SIRGVDSGLY LGMNEKGELY G.SEKLTQEC VFREQFEENW YNTYSSNLYK
FGF7  AIKGVESEFY LAMNKEGKLY A.KKECNEDC NFKELILENH YNTYAS....
KGF2  AVKAINSNYY LAMNKKGKLY G.SKEFNNDC KLKERIEENG YNTYAS....
FGF3  AIRGLFSGRY LAMNKRGRLY A.SEHYSAEC EFVERIHELG YNTYASRLYR
FGF8  RVRGAETGLY ICMNKKGKLI AKSNGKGKDC VFTEIVLENN YTALQNAKY.
```

与图 2C 匹配

与图 2B 匹配

图 2C

```
      201                                                          250
FGF4  .......... GM......FI ALSKNGKTKK G..NRVSPTM KVTHFLPRL.
FGF6  .......... GT......YI ALSKYGRVKR G..SKVSPIM TVTHFLPRI.
FGF5  .......... TEKTGREWYV ALNKRGKAKR GCSPRVKPQH ISTHFLPRFK
FGF1  .......... ...AEKNWFV GLKKNGSCKR G..PRTHYGQ KAILFLPLPV
FGF2  .......... ...T..SWYV ALKRTGQYKL G..SKTGPGQ KAILFLPMSA
FGF9  HV........ ..DTGRRYYV ALNKDGTPRE G..TRTKRHQ KFTHFLPRPV
FGF7  .......AKW THNGGEM.FV ALNQKGIPVR G..KKTKKEQ KTAHFLPMAI
KGF2  .......FNW QHNGRQM.YV ALNGKGAPRR G..QKTRRKN TSAHFLPMVV
FGF3  TVSSTPGARR QPSAERLWYV SVNGKGRPRR G..FKTRRTQ KSSLFLPRVL
FGF8  .......... .....EGWYM AFTRKGRPRK G..SKTRQHQ REVHFMKRLP

      251                                                          300
FGF4  .......... .......... .......... .......... ..........
FGF6  .......... .......... .......... .......... ..........
FGF5  QSEQPELSFT VTVPEKKNPP SPIKSKIPLS APRKNTNSVK YRLKFRFG..
FGF1  SSD....... .......... .......... .......... ..........
FGF2  KS........ .......... .......... .......... ..........
FGF9  DPDKVPELYK DILSQS.... .......... .......... ..........
FGF7  T......... .......... .......... .......... ..........
KGF2  HS........ .......... .......... .......... ..........
FGF3  DHRDHEMVRQ LQSGLPRPPG KGVQPRRRRQ KQSPDNLEPS HVQASRLGSQ
FGF8  RGHHTTEQSL RFEFLNYPPF TRSLRGSQRT WAPEPR.... ........ .
```

与图 2D 匹配

图 2D

与图 2C 匹配

	301
FGF4	.....
FGF6	.....
FGF5	.....
FGF1	.....
FGF2	.....
FGF9	.....
FGF7	.....
KGF2	.....
FGF3	LEASAH
FGF8	.....

图 3A

```
GGAATTCCGG GAAGAGAGGG AAGAAAACAA CGGCGACTGG GCAGCTGCCT CCACTTCTGA      60

CAACTCCAAA GGGATATACT TGTAGAAGTG GCTCGCAGGC TGGGGCTCCG CAGAGAGAGA     120

CCAGAAGGTG CCAACCGCAG AGGGGTGCAG ATATCTCCCC CTATTCCCCA CCCCACCTCC     180

CTTGGGTTTT GTTCACCGTG CTGTCATCTG TTTTTCAGAC CTTTTTGGCA TCTAACATGG     240

TGAAGAAAGG AGTAAAGAAG AGAACAAAGT AACTCCTGGG GGAGCGAAGA GCGCTGGTGA     300

CCAACACCAC CAACGCCACC ACCAGCTCCT GCTGCTGCGG CCACCCACGT CCACCATTTA     360

CCGGGAGGCT CCAGAGGCGT AGGCAGCGGA TCCGAGAAAG GAGCGAGGGG AGTCAGCCGG     420

CTTTTCCGAG GAGTTATGGA TGTTGGTGCA TTCACTTCTG GCCAGATCCG CGCCCAGAGG     480

GAGCTAACCA GCAGCCACCA CCTCGAGCTC TCTCCTTGCC TTGCATCGGG TCTTACCCTT     540

CCAGTATGTT CCTTCTGATG AGACAATTTC CAGTGCCGAG AGTTTCAGTA CA ATG         595
                                                           Met

TGG AAA TGG ATA CTG ACA CAT TGT GCC TCA GCC TTT CCC CAC CTG CCC       643
Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu Pro

GGC TGC TGC TGC TGC TGC TTT TTG TTG CTG TTC TTG GTG TCT TCC GTC       691
Gly Cys Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser Val

CCT GTC ACC TGC CAA GCC CTT GGT CAG GAC ATG GTG TCA CCA GAG GCC       739
Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu Ala

ACC AAC TCT TCT TCC TCC TCC TTC TCC TCT CCT TCC AGC GCG GGA AGG       787
Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly Arg

CAT GTC CGG AGC TAC AAT CAC CTT CAA GGA GAT GTC CGC TGG AGA AAG       835
His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg Lys

CTA TTC TCT TTC ACC AAG TAC TTT CTC AAG ATT GAG AAG AAC GGG AAG       883
Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly Lys

GTC AGC GGG ACC AAG AAG GAG AAC TGC CCG TAC AGC ATC CTG GAG ATA       931
Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu Ile

ACA TCA GTA GAA ATC GGA GTT GTT GCC GTC AAA GCC ATT AAC AGC AAC       979
Thr Ser Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser Asn

TAT TAC TTA GCC ATG AAC AAG AAG GGG AAA CTC TAT GGC TCA AAA GAA      1027
Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys Glu

TTT AAC AAT GAC TGT AAG CTG AAG GAG AGG ATA GAG GAA AAT GGA TAC      1075
Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly Tyr
```

图 3B

```
AAT ACC TAT GCA TCA TTT AAC TGG CAG CAT AAT GGG AGG CAA ATG TAT      1123
Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met Tyr

GTG GCA TTG AAT GGA AAA GGA GCT CCA AGG AGA GGA CAG AAA ACA CGA      1171
Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr Arg

AGG AAA AAC ACC TCT GCT CAC TTT CTT CCA ATG GTG GTA CAC TCA          1216
Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser

TAGAGGAAGG CAACGTTTGT GGATGCAGTA AAACCAATGG CTCTTTTGCC AAGAATAGTG    1276

GATATTCTTC ATGAAGACAG TAGATTGAAA GGCAAAGACA CGTTGCAGAT GTCTGCTTGC    1336

TTAAAAGAAA GCCAGCCTTT GAAGGTTTTT GTATTCACTG CTGACATATG ATGTTCTTTT    1396

AATTAGTTCT GTGTCATGTC TTATAATCAA GATATAGGCA GATCGAATGG GATAGAAGTT    1456

ATTCCCAAGT GAAAAACATT GTGGCTGGGT TTTTTGTTGT TGTTGTCAAG TTTTTGTTTT    1516

TAAACCTCTG AGATAGAACT TAAAGGACAT AGAACAATCT GTTGAAAGAA CGATCTTCGG    1576

GAAAGTTATT TATGGAATAC GAACTCATAT CAAAGACTTC ATTGCTCATT CAAGCCTAAT    1636

GAATCAATGA ACAGTAATAC GTGCAAGCAT TTACTGGAAA GCACTTGGGT CATATCATAT    1696

GCACAACCAA AGGAGTTCTG GATGTGGTCT CATGGAATAA TTGAATAGAA TTTAAAAATA    1756

TAAACATGTT AGTGTGAAAC TGTTCTAACA ATACAAATAG TATGGTATGC TTGTGCATTC    1816

TGCCTTCATC CCTTTCTATT TCTTTCTAAG TTATTTATTT AATAGGATGT TAAATATCTT    1876

TTGGGGTTTT AAAGAGTATC TCAGCAGCTG TCTTCTGATT TATCTTTTCT TTTTATTCAG    1936

CACACCACAT GCATGTTCAC GACAAAGTGT TTTTAAAACT TGGCGAACAC TTCAAAAATA    1996

GGAGTTGGGA TTAGGGAAGC AGTATGAGTG CCCGTGTGCT ATCAGTTGAC TTAATTTGCA    2056

CTTCTGCAGT AATAACCATC AACAATAAAT ATGGCAATGC TGTGCCATGG CTTGAGTGAG    2116

AGATGTCTGC TATCATTTGA AAACATATAT TACTCTCGAG GCTTCCTGTC TCAAGAAATA    2176

GACCAGAAGG CCAAATTCTT CTCTTTCAAT ACATCAGTTT GCCTCCAAGA ATATACTAAA    2236

AAAAGGAAAA TTAATTGCTA AATACATTTA AATAGCCTAG CCTCATTATT TACTCATGAT    2296

TTCTTGCCAA ATGTCATGGC GGTAAAGAGG CTGTCCACAT CTCTAAAAAC CCTCTGTAAA    2356

TTCCACATAA TGCATCTTTC CCAAAGGAAC TATAAAGAAT TTGGTATGAA GCGCAACTCT    2416
```

图 3C

CCCAGGGGCT TAAACTGAGC AAATCAAATA TATACTGGTA TATGTGTAAC CATATACAAA 2476

AACCTGTTCT AGCTGTATGA TCTAGTCTTT ACAAAACCAA ATAAAACTTG TTTTCTGTAA 2536

ATTTAAAGAG CTTTACAAGG TTCCATAATG TAACCATATC AAAATTCATT TTGTTAGAGC 2596

ACGTATAGAA AAGAGTACAT AAGAGTTTAC CAATCATCAT CACATTGTAT TCCACTAAAT 2656

AAATACATAA GCCTTATTTG CAGTGTCTGT AGTGATTTTA AAAATGTAGA AAAATACTAT 2716

TTGTTCTAAA TACTTTTAAG CAATAACTAT AATAGTATAT TGATGCTGCA GTTTTATCTT 2776

CATATTTCTT GTTTTGAAAA AGCATTTTAT TGTTTGGACA CAGTATTTTG GTACAAAAAA 2836

AAAGACTCAC TAAATGTGTC TTACTAAAGT TTAACCTTTG GAAATGCTGG CGTTCTGTGA 2896

TTCTCCAACA AACTTATTTG TGTCAATACT TAACCAGCAC TTCCAGTTAA TCTGTTATTT 2956

TTAAAAATTG CTTTATTAAG AAATTTTTTG TATAATCCCA TAAAAGGTCA TATTTTTCCC 3016

ATTCTTCAAA AAAACTGTAT TTCAGAAGAA ACACATTTGA GGCACTGTCT TTTGGCTTAT 3076

AGTTTAAATT GCATTTCATC ATACTTTGCT TCCAACTTGC TTTTTGGCAA ATGAGATTAT 3136

AAAAATGTTT AATTTTTGTG GTTGGAATCT GGATGTTAAA ATTTAATTGG TAACTCAGTC 3196

TGTGAGCTAT AATGTAATGC ATTCCTATCC AAACTAGGTA TCTTTTTTTC CTTTATGTTG 3256

AAATAATAAT GGCACCTGAC ACATAGACAT AGACCACCCA CAACCTAAAT TAAATGTTTG 3316

GTAAGACAAA TACACATTGG ATGACCACAG TAACAGCAAA CAGGGCACAA ACTGGATTCT 3376

TATTTCACAT AGACATTTAG ATTACTAAAG AGGGCTATGT GTAAACAGTC ATCATTATAG 3436

TACTCAAGAC ACTAAAACAG CTTCTAGCCA AATATATTAA AGCTTGCAGA GGCCAAAAAT 3496

AGAAAACATC TCCCCTGTCT CTCCCACATT TCCCTCACAG AAAGACAAAA AACCTGCCTG 3556

GTGCAGTAGC TCACACCTGT AATCCCAGCA GTTTGGGAGA CTGTGGGAAG ATGGCTTGAG 3616

TCCAGGAGTT CTAGACAGGC CTGAGAAACC TAGTGAGACA TCCTTCTCTT AAACAAAACA 3676

AAACAAAACA AATGTAGCCA TGCGTGGTGG CATATACCTG TGGTCCCAAC TACTCAGGAG 3736

GCTGAAACGG AAGGATCTCT TGGGCCCCAG GAGTTTGAGG CTGCAGTGAG CTATAATCTT 3796

GCCATTGCAC TCCAGCCTGG GTGAAAAAGA GCCAGAAAGA AAGGAAAGAG AGAAAAGAGA 3856

AAAGAAAGAG AGAAAAGACA GAAAGACAGG AAGGAAGGAA GGAAGGAAGG AAGGAAGGAA 3916

GGAAGCAAGG AAAGAAGGAA GGAAGGAAAG AAGGGAGGGA AGGAAGGAGA GAGAAAGAAA 3976

GATTGTTTGG TAAGGAGTAA TGACATTCTC TTGCATTTAA AAGTGGCATA TTTGCTTGAA 4036

图 3D

ATGGAAATAG AATTCTGGTC CCTTTTGCAA CTACTGAAGA AAAAAAAAAG CAGTTTCAGC 4096

CCTGAATGTT GTAGATTTGA AAAAAAAAAA AAAAAAACTC GAGGGGGGGC CCGTACCCAA 4156

TTCGCCCTAT AGTGAGTCGT A 4177

图 4A

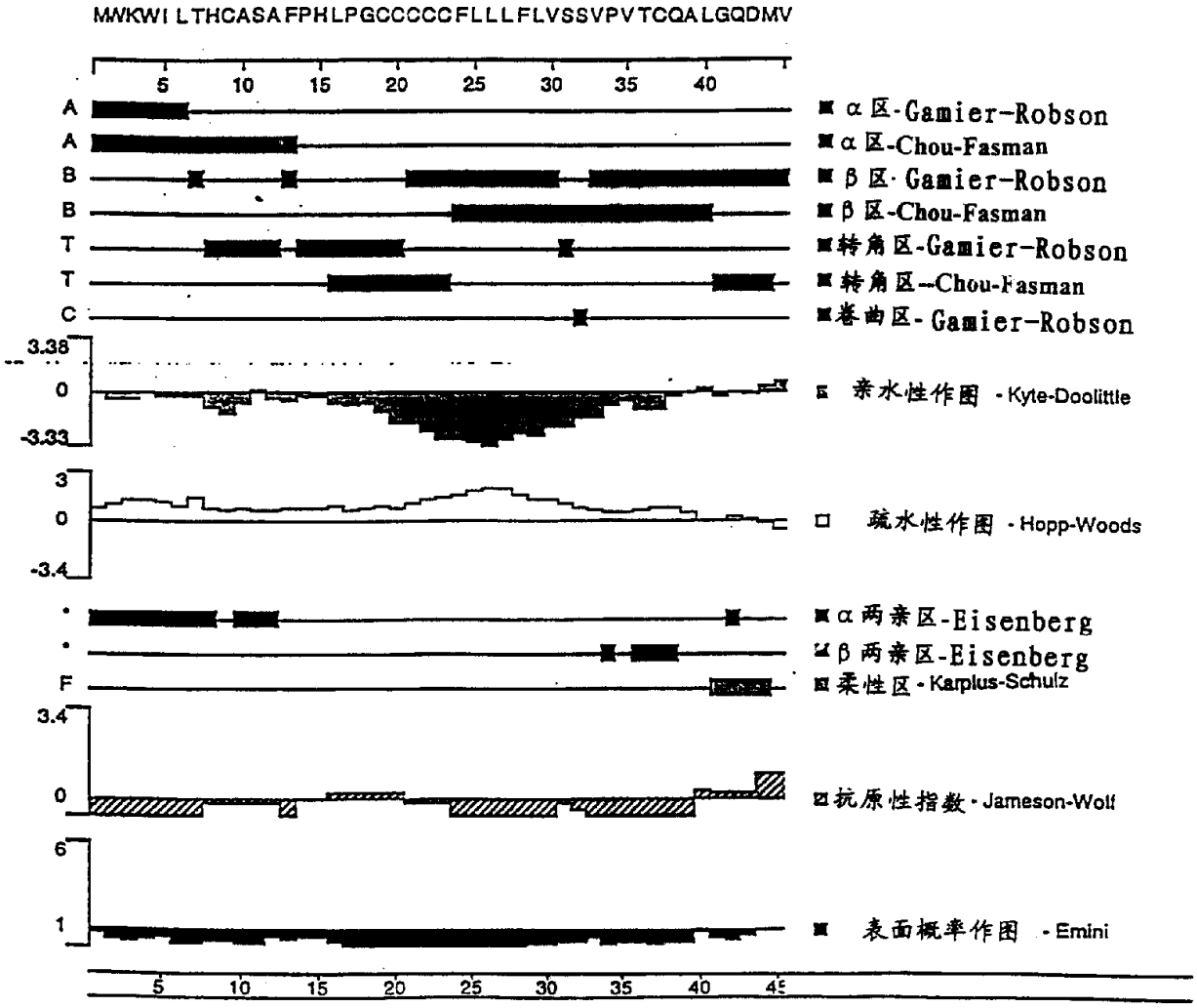

MWKWI LTHCASAFPHLPGCCCCCFLLLFLVSSVPVTCQALGQDMV
5 10 15 20 25 30 35 40
A
A
B
B
T
T
C
α区-Gamier-Robson
α区-Chou-Fasman
β区-Gamier-Robson
β区-Chou-Fasman
转角区-Gamier-Robson
转角区-Chou-Fasman
卷曲区-Gamier-Robson
3.38
0
-3.33
亲水性作图 -Kyte-Doolittle
3
0
-3.4
疏水性作图 -Hopp-Woods
α两亲区-Eisenberg
β两亲区-Eisenberg
F
柔性区-Karplus-Schulz
3.4
0
抗原性指数-Jameson-Wolf
6
1
表面概率作图 -Emini
5 10 15 20 25 30 35 40 45

图 4B

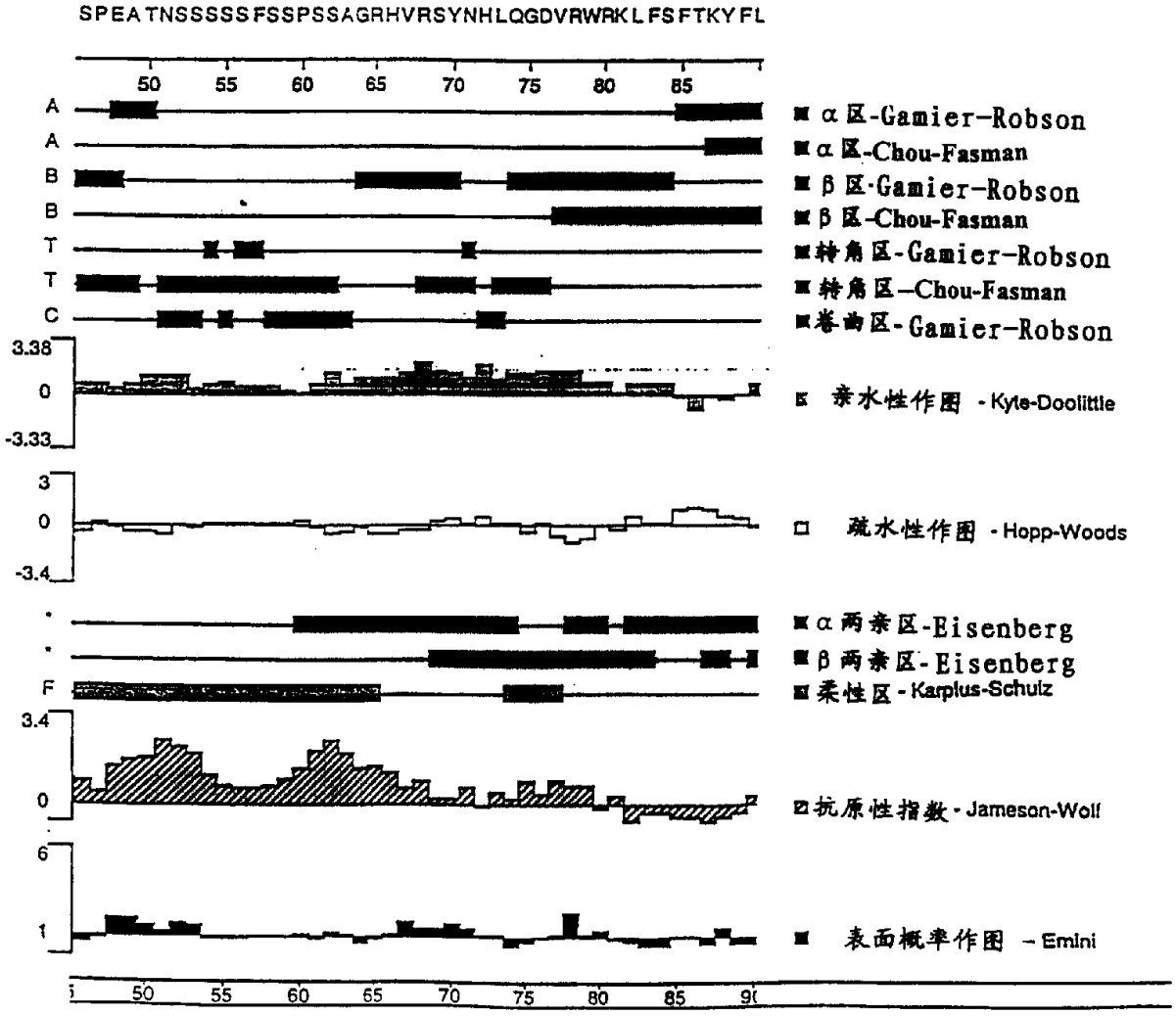

SPEATNSSSSSFSSPSSAGRHVRSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFL
50 55 60 65 70 75 80 85
A
A
B
B
T
T
C
α区-Gamier-Robson
α区-Chou-Fasman
β区-Gamier-Robson
β区-Chou-Fasman
转角区-Gamier-Robson
转角区-Chou-Fasman
卷曲区-Gamier-Robson
3.38
0
-3.33
亲水性作图 -Kyte-Doolittle
3
0
-3.4
疏水性作图 -Hopp-Woods
α两亲区-Eisenberg
β两亲区-Eisenberg
F
柔性区-Karplus-Schulz
3.4
0
抗原性指数-Jameson-Wolf
6
1
表面概率作图 -Emini
50 55 60 65 70 75 80 85

图 4C

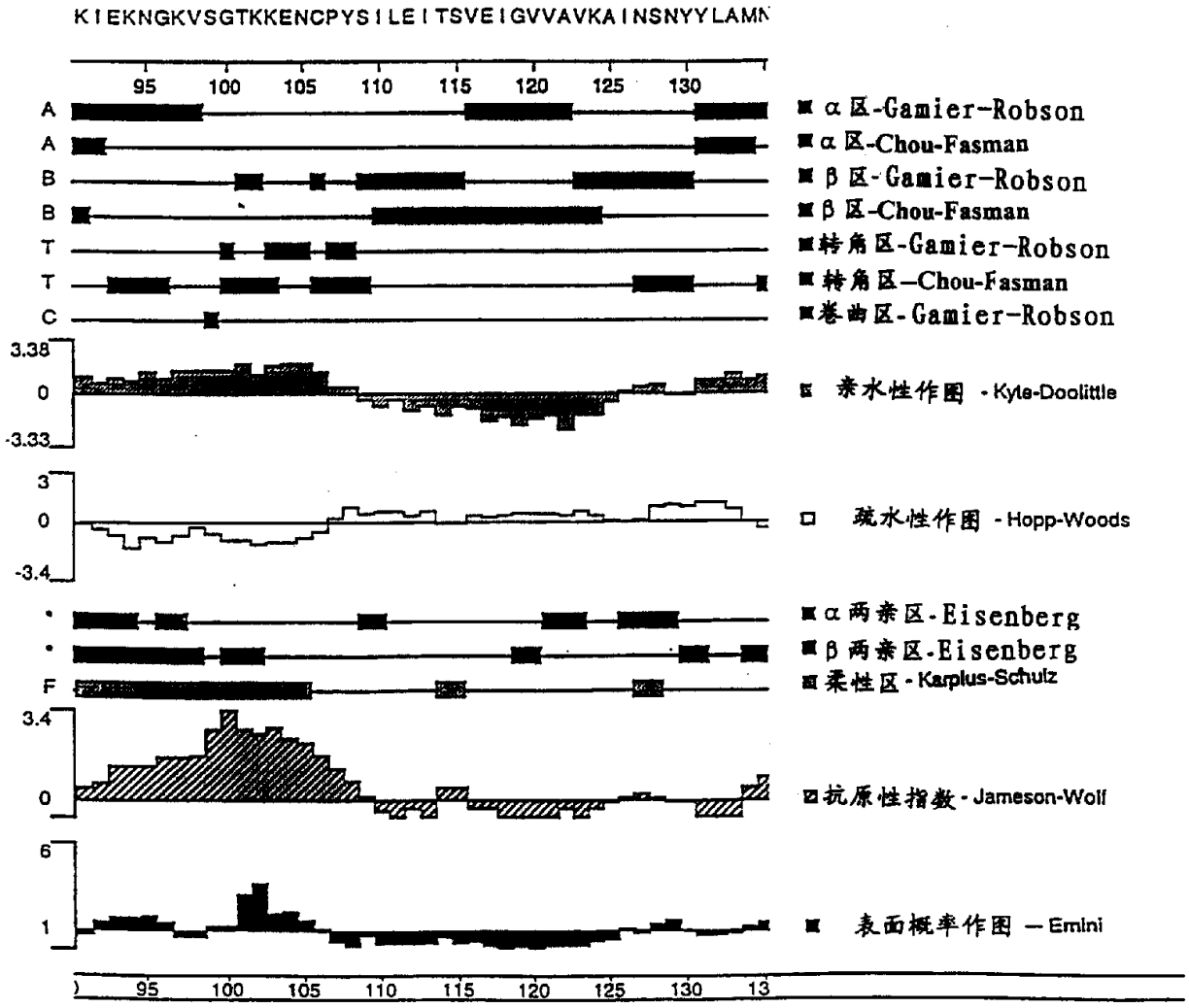

K I E K N G K V S G T K K E N C P Y S I L E I T S V E I G V V A V K A I N S N Y Y L A M
95 100 105 110 115 120 125 130
A
A
B
B
T
T
C
α 区-Gamier-Robson
α 区-Chou-Fasman
β 区-Gamier-Robson
β 区-Chou-Fasman
转角区-Gamier-Robson
转角区—Chou-Fasman
卷曲区-Gamier-Robson
3.38
0
-3.33
亲水性作图 - Kyte-Doolittle
3
0
-3.4
疏水性作图 - Hopp-Woods
α 两亲区-Eisenberg
β 两亲区-Eisenberg
F
柔性区 - Karplus-Schulz
3.4
0
抗原性指数 - Jameson-Wolf
6
1
表面概率作图 — Emini
95 100 105 110 115 120 125 130 13

图 4D

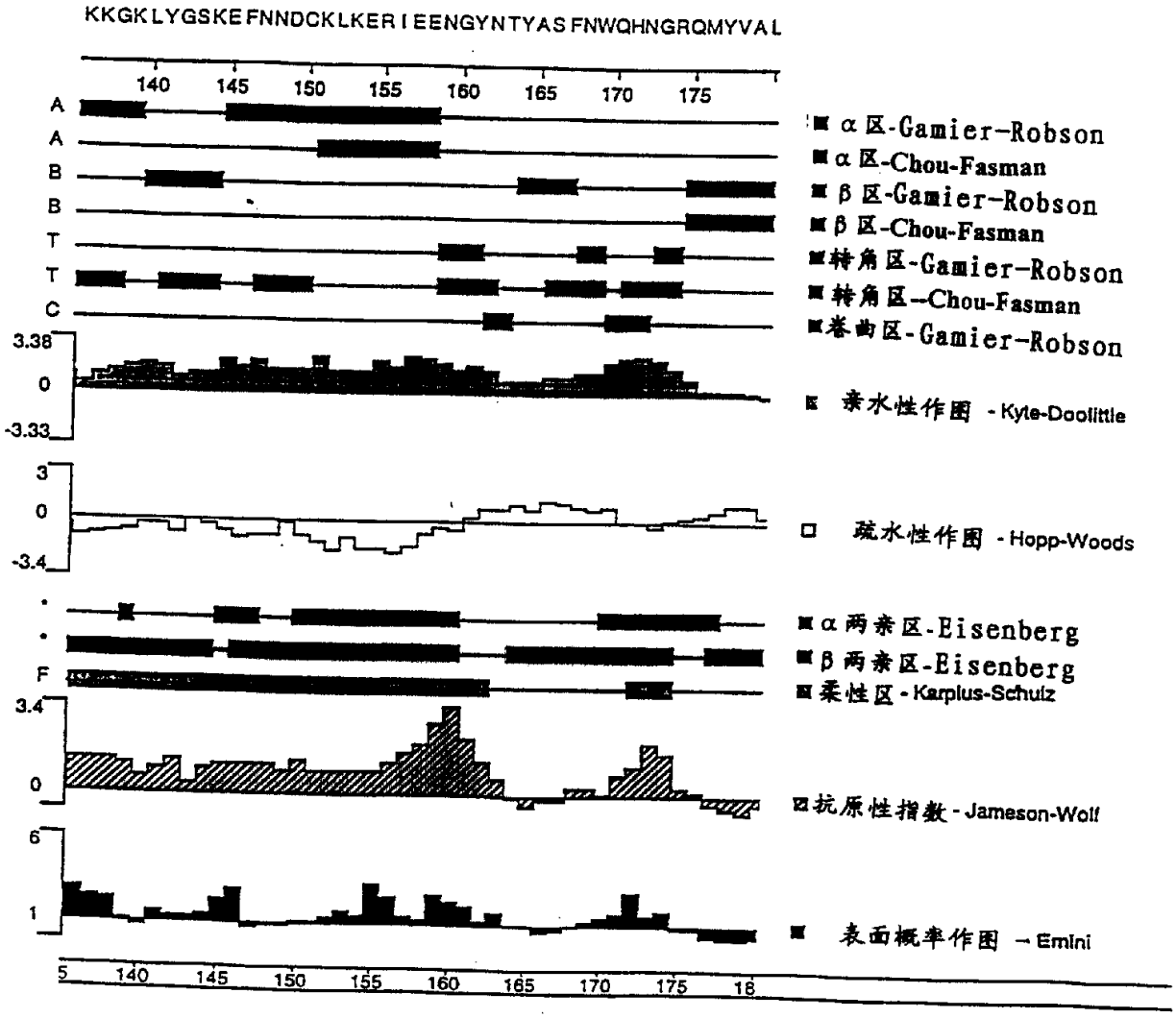

KKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMYVAL
140 145 150 155 160 165 170 175
A
A
B
B
T
T
C
α区-Gamier-Robson
α区-Chou-Fasman
β区-Gamier-Robson
β区-Chou-Fasman
转角区-Gamier-Robson
转角区--Chou-Fasman
卷曲区-Gamier-Robson
3.38
0
-3.33
亲水性作图 - Kyte-Doolittle
3
0
-3.4
疏水性作图 - Hopp-Woods
α两亲区-Eisenberg
β两亲区-Eisenberg
F
柔性区 - Karplus-Schulz
3.4
0
抗原性指数 - Jameson-Wolf
6
1
表面概率作图 - Emini
5 140 145 150 155 160 165 170 175 18

图 4E

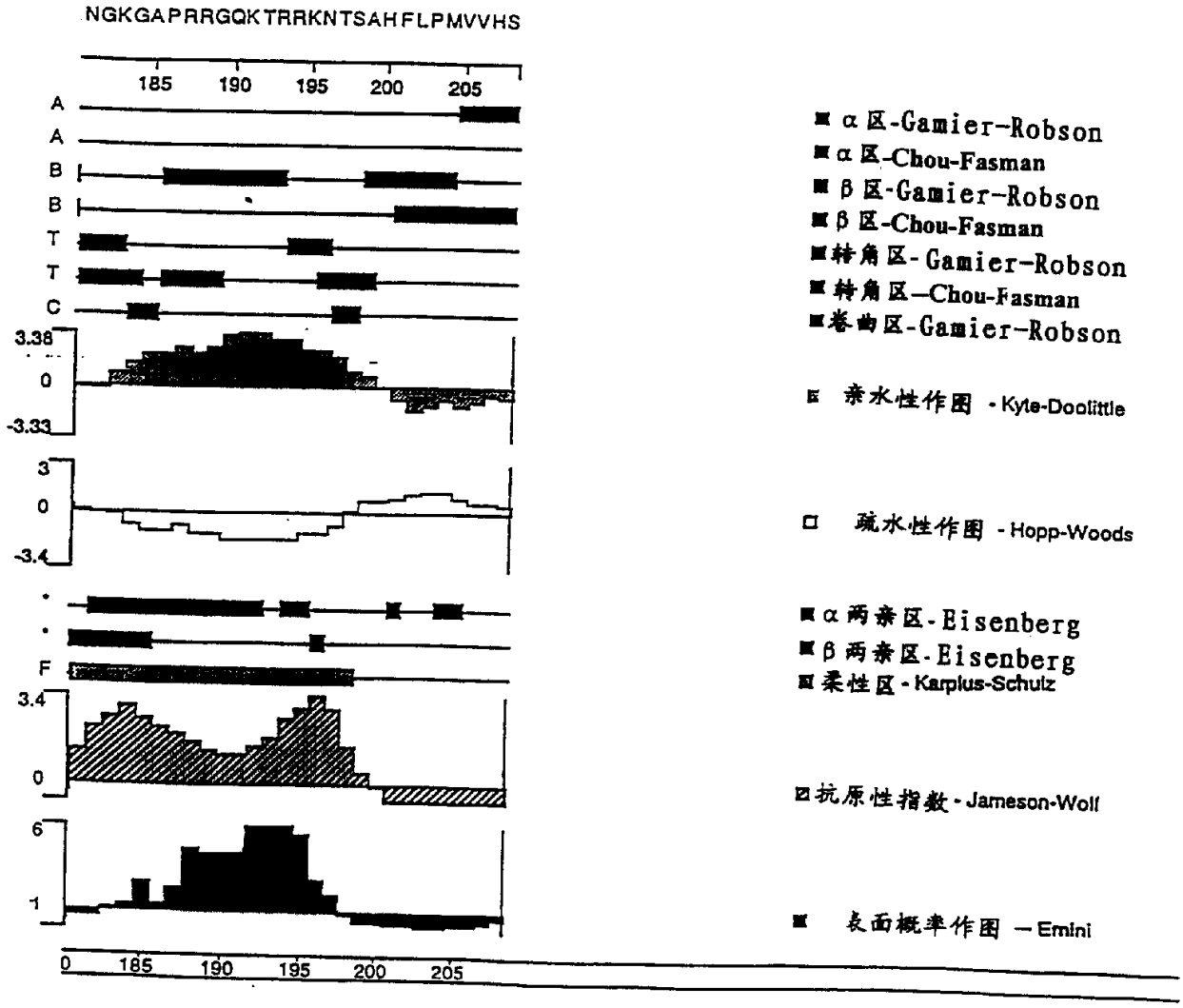

NGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS
185
190
195
200
205
A
A
B
B
T
T
C
3.38
0
-3.33
3
0
-3.4
F
3.4
0
6
1
0
185
190
195
200
205
α区-Gamier-Robson
α区-Chou-Fasman
β区-Gamier-Robson
β区-Chou-Fasman
转角区-Gamier-Robson
转角区—Chou-Fasman
卷曲区-Gamier-Robson
亲水性作图 -Kyte-Doolittle
疏水性作图 -Hopp-Woods
α两亲区-Eisenberg
β两亲区-Eisenberg
柔性区-Karplus-Schulz
抗原性指数-Jameson-Wolf
表面概率作图 —Emini

图 5

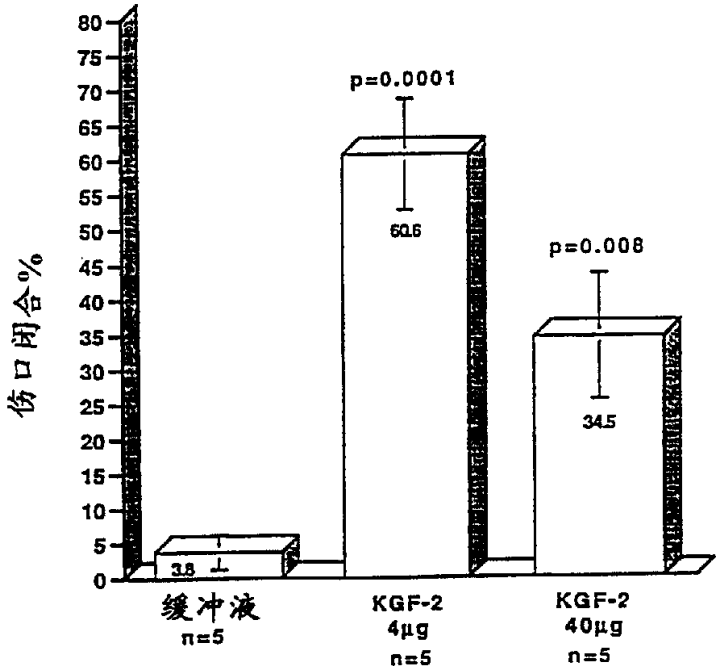

伤口闭合%
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
p=0.0001
60.6
p=0.008
34.5
3.8
缓冲液
n=5
KGF-2
4μg
n=5
KGF-2
40μg
n=5

图 6

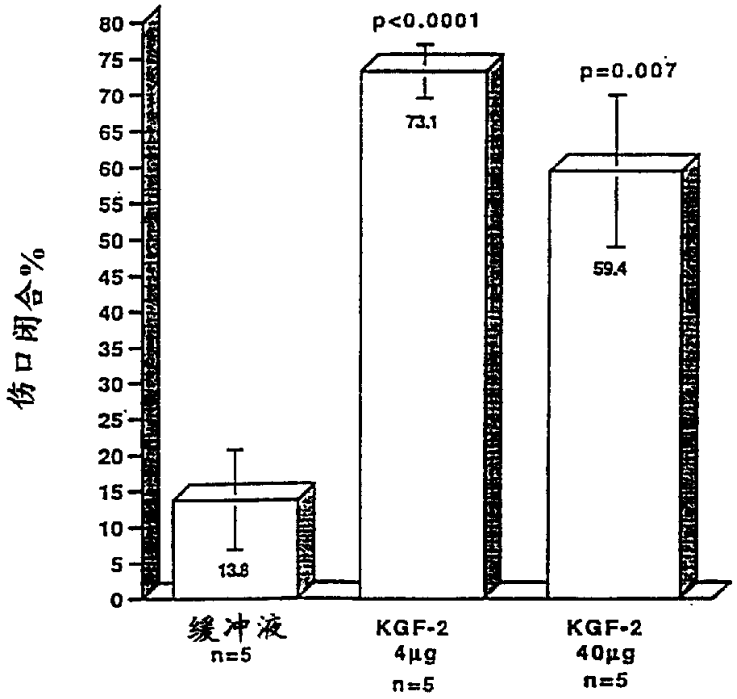

伤口闭合%
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
p<0.0001
73.1
p=0.007
59.4
13.8
缓冲液
n=5
KGF-2
4μg
n=5
KGF-2
40μg
n=5

图 7

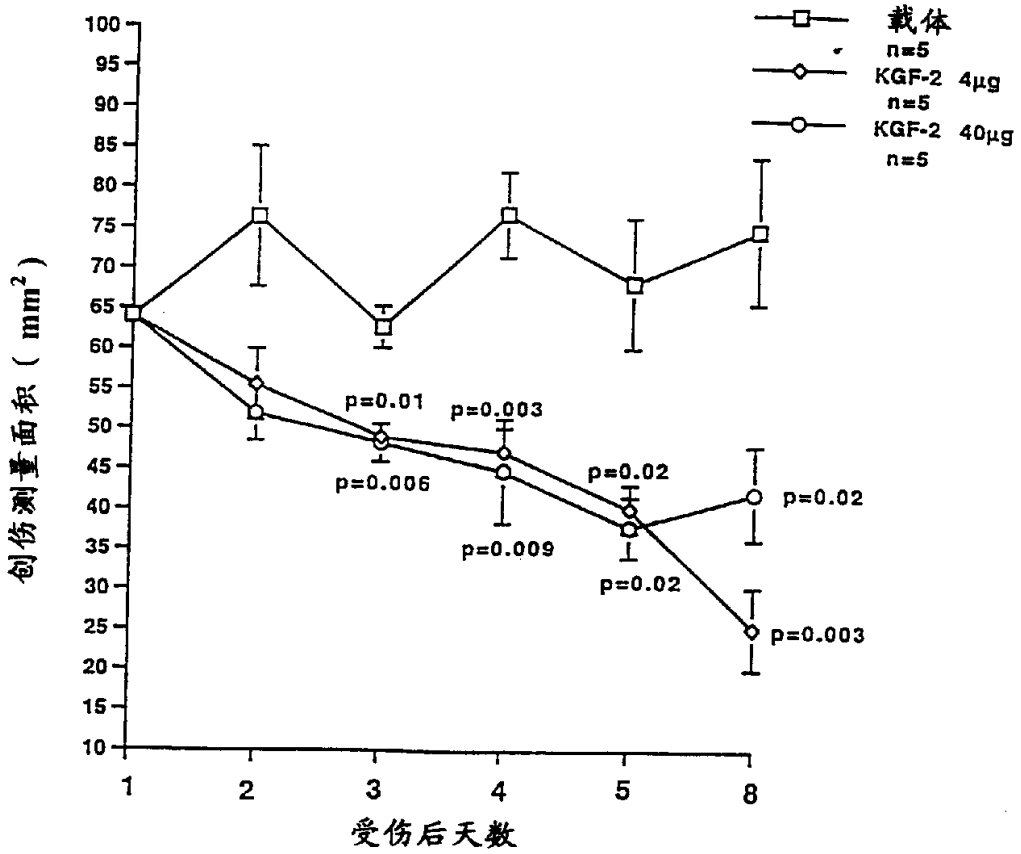

载体
n=5
KGF-2 4μg
n=5
KGF-2 40μg
n=5
创伤测量面积（mm²）
受伤后天数
p=0.01
p=0.003
p=0.006
p=0.02
p=0.009
p=0.02
p=0.02
p=0.003

图 8

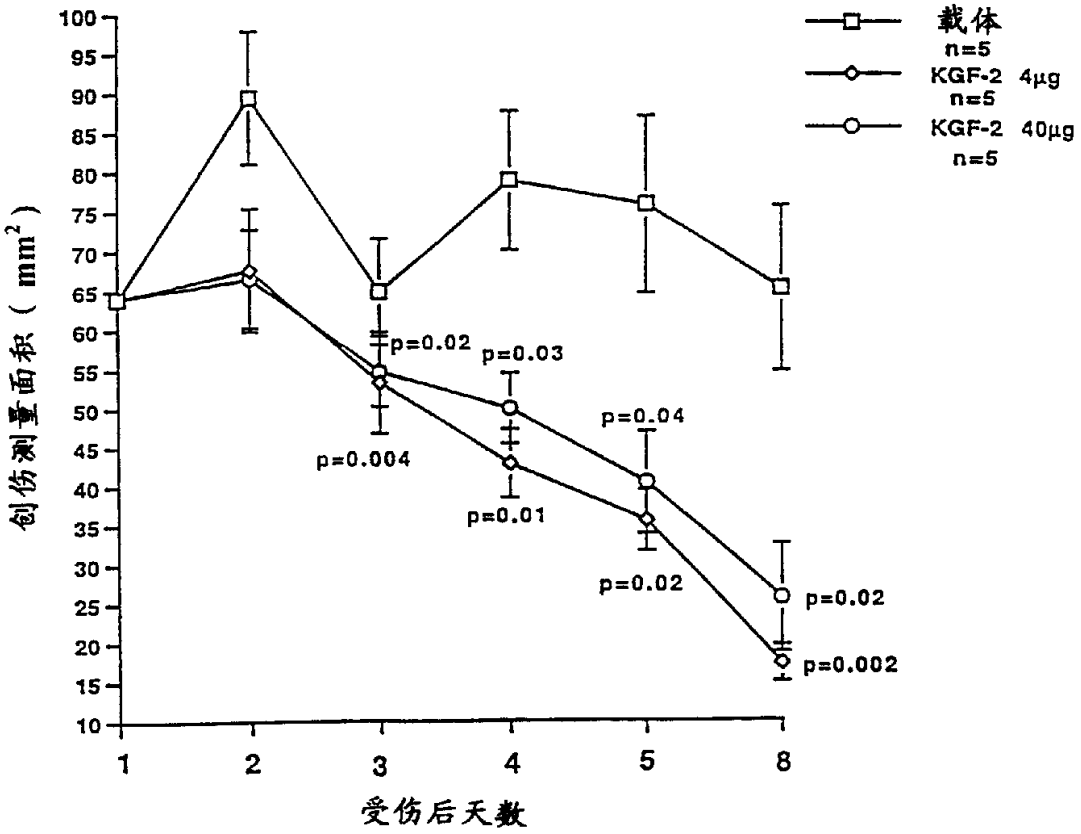
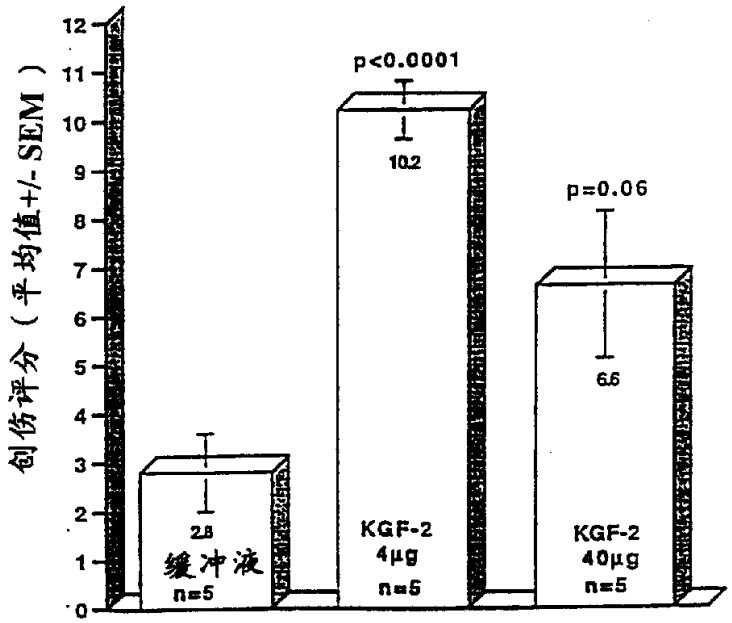
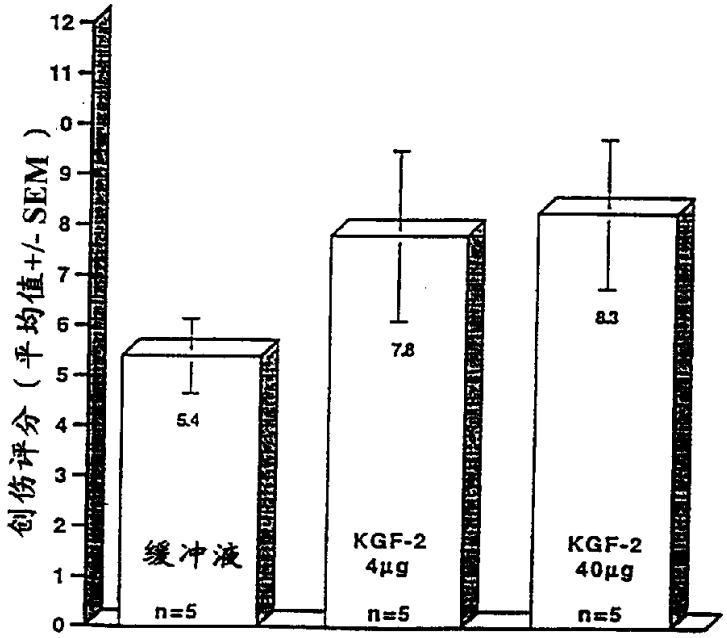

载体
n=5
KGF-2 4μg
n=5
KGF-2 40μg
n=5
创伤测量面积（mm²）
受伤后天数
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
1
2
3
4
5
8
p=0.02
p=0.03
p=0.04
p=0.004
p=0.01
p=0.02
p=0.02
p=0.002

图 9



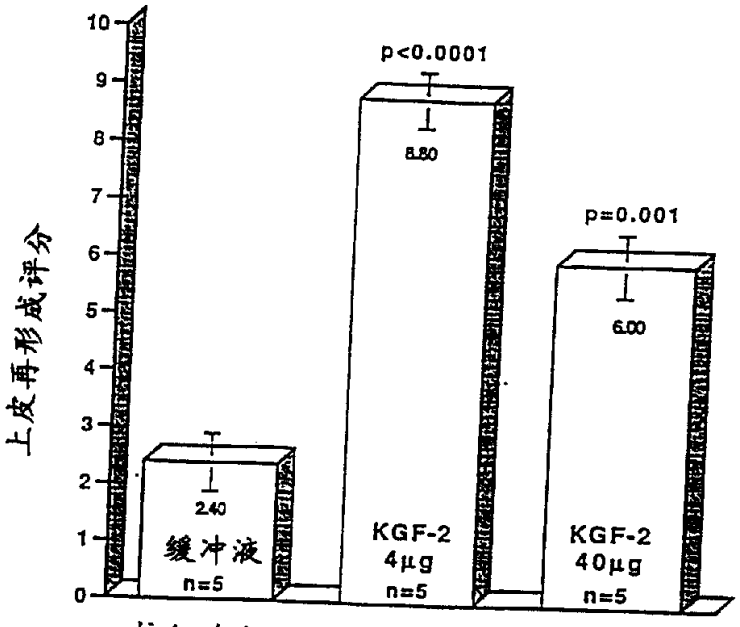
1-3 细胞积聚现象最少，未成颗粒状
4-6 不成熟地成颗粒状，炎性细胞，毛细血管
10-12 成纤维细胞，胶原，上皮细胞

图 10



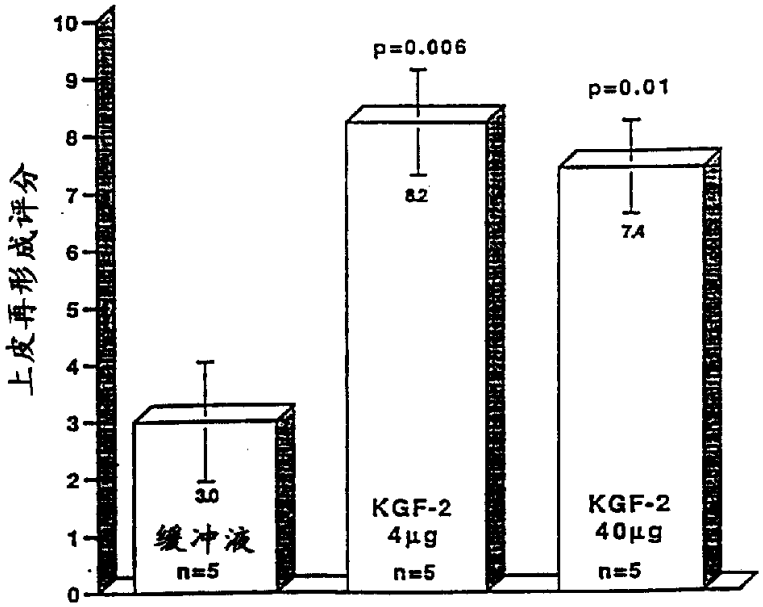
1-3 细胞积聚现象最少，未成颗粒状
4-6 不成熟地成颗粒状，炎性细胞，毛细血管
7-9 颗粒状组织，细胞，成纤维细胞，新的上皮细胞
10-12 成纤维细胞，胶原，上皮细胞

图 11



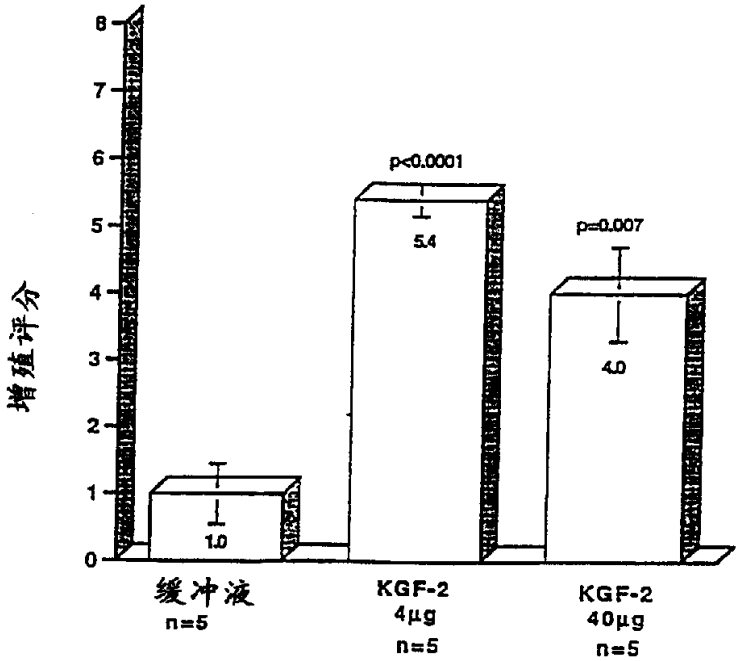
抗细胞角蛋白免疫染色
0-未闭合
5-轻微到中度闭合
10-完全闭合

图 12



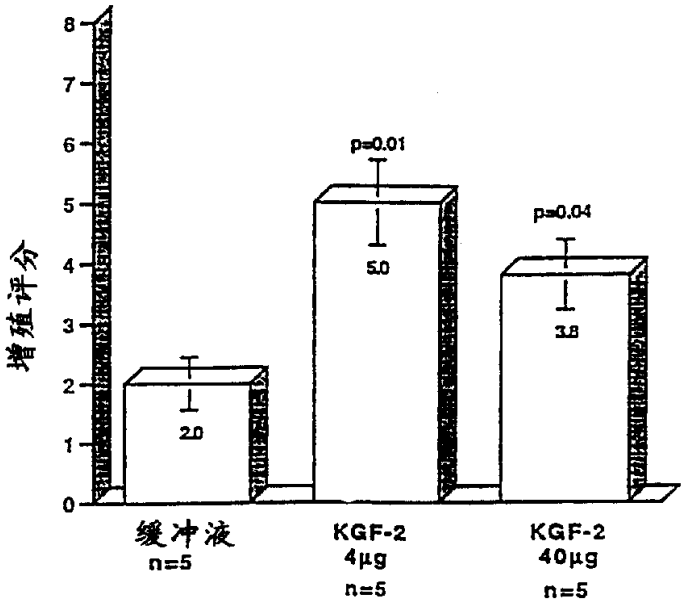
抗细胞角蛋白免疫染色
0-未闭合
5-轻微到中度闭合
10-完全闭合

图 13



PCNA 评分
0-2 轻度增殖
3-5 中度增殖
6-8 高度增殖

图 14



PCNA 评分
0-2 轻度增殖
3-5 中度增殖
6-8 高度增殖

图 15

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCTGCCAGGCTCTGGGTC
AGGACATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTTCCTCTTCCTCTTTCTCTTCCC
CGTCTTCCGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTC
GTTGGCGTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAAA
AACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCCTG
GAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAG
CAACTATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAG
AATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGAT
ACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTAT
GTGGCATTGAaTGGAAAAGGAGCTCCAaGGAGAGGACAGAAAACACGAAG
GAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

MRGSHHHHHHGSCQALGQDMVSPEATNSSSSSFSSPSSAGRHVRSYNHLQGD
VRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSVEIGVVAVKAINSN
YYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMYVA
LNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS

kgf-2 合成的 cys37 Bam HI
AAAGGATCCTGCCAGGCTCTGGGTCAGGACATG

图 16

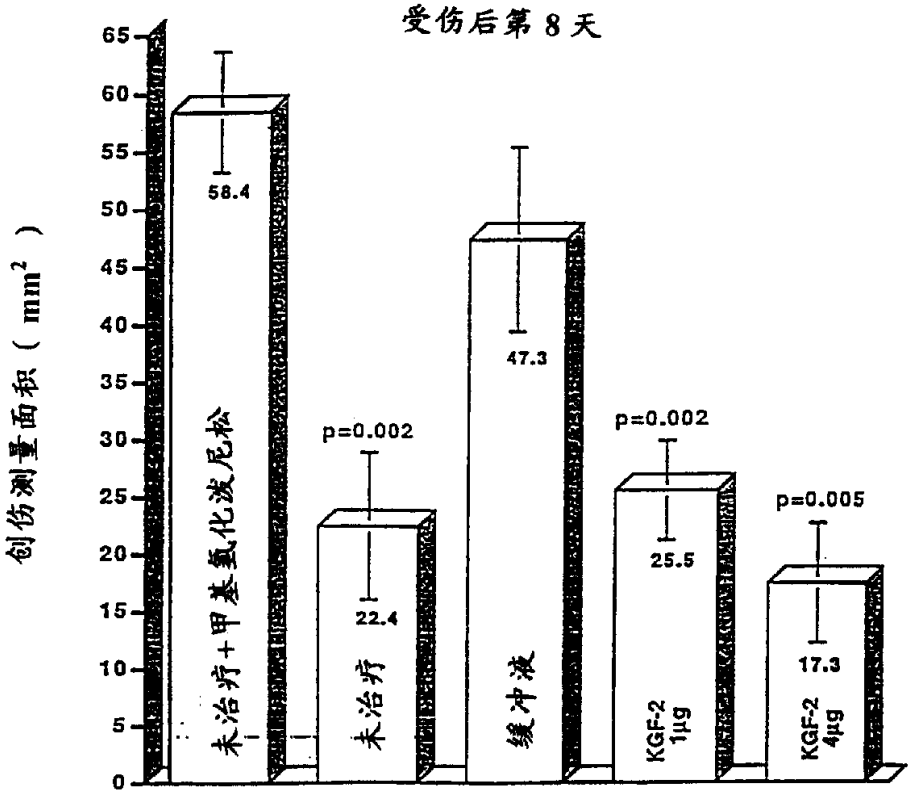

受伤后第 8 天
创伤测量面积（ mm²）
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
58.4
未治疗+甲基氢化泼尼松
p=0.002
22.4
未治疗
47.3
缓冲液
p=0.002
25.5
KGF-2
1μg
p=0.005
17.3
KGF-2
4μg

图 17

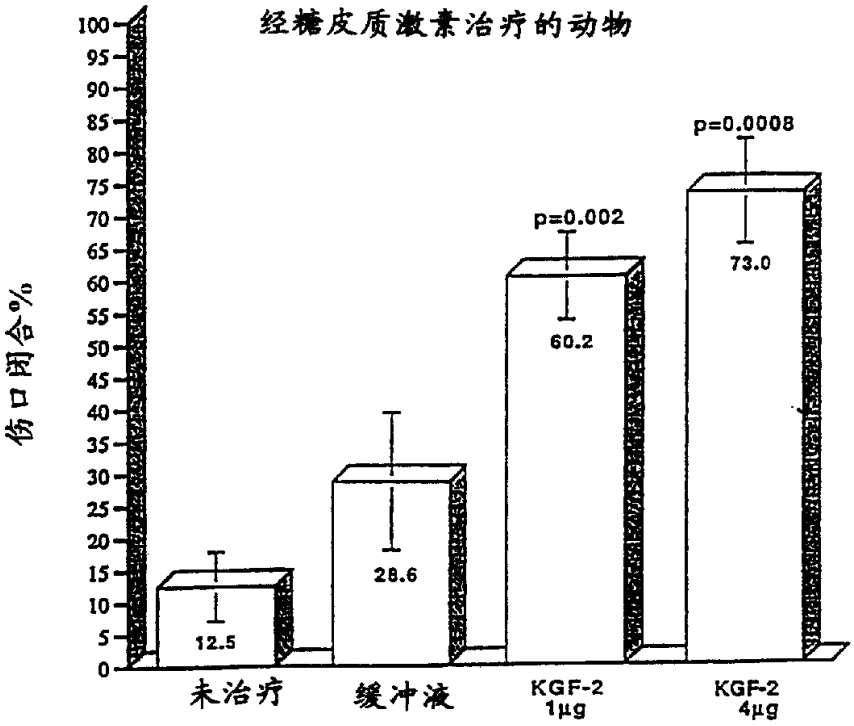

经糖皮质激素治疗的动物
伤口闭合%
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
12.5
28.6
60.2
73.0
p=0.002
p=0.0008
未治疗
缓冲液
KGF-2
1μg
KGF-2
4μg

图 18

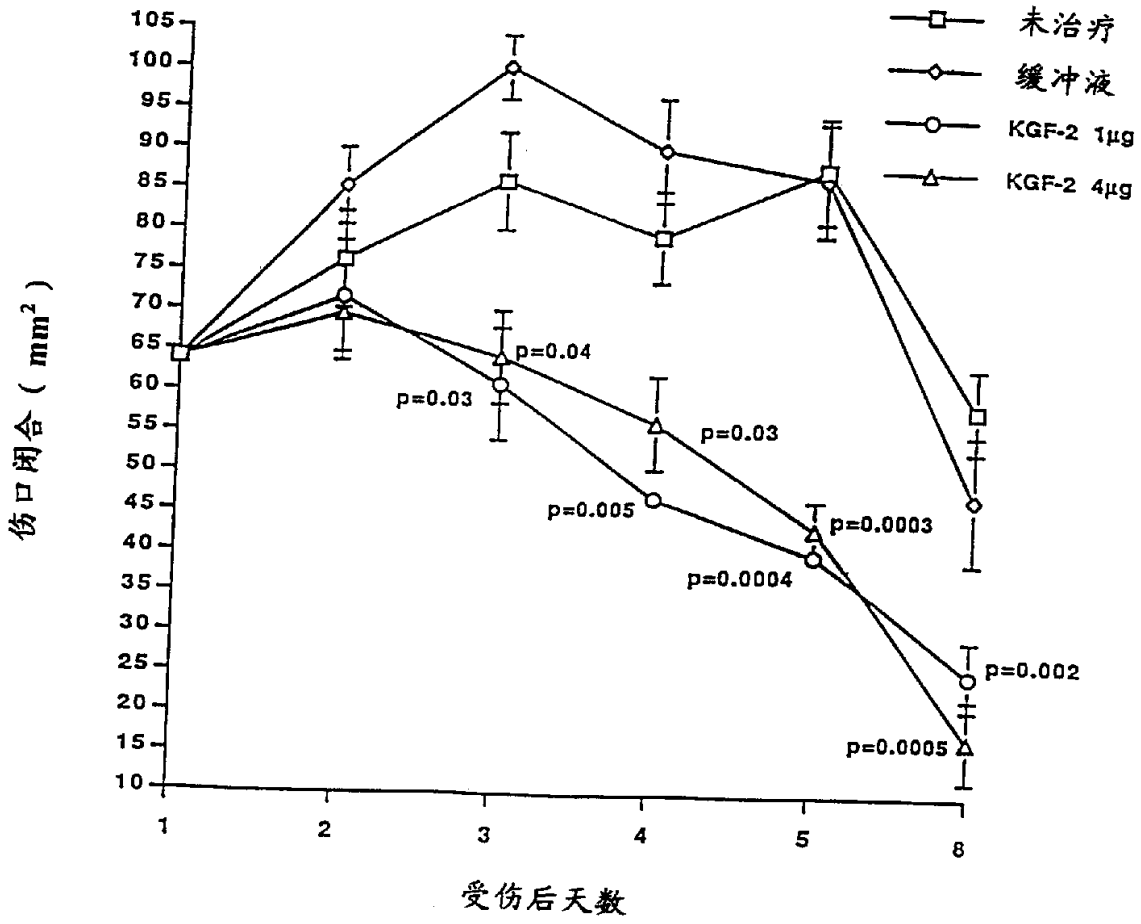

未治疗
缓冲液
KGF-2 1μg
KGF-2 4μg
伤口闭合（mm²）
受伤后天数
105
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
1
2
3
4
5
8
p=0.04
p=0.03
p=0.03
p=0.005
p=0.0003
p=0.0004
p=0.002
p=0.0005

图 19A

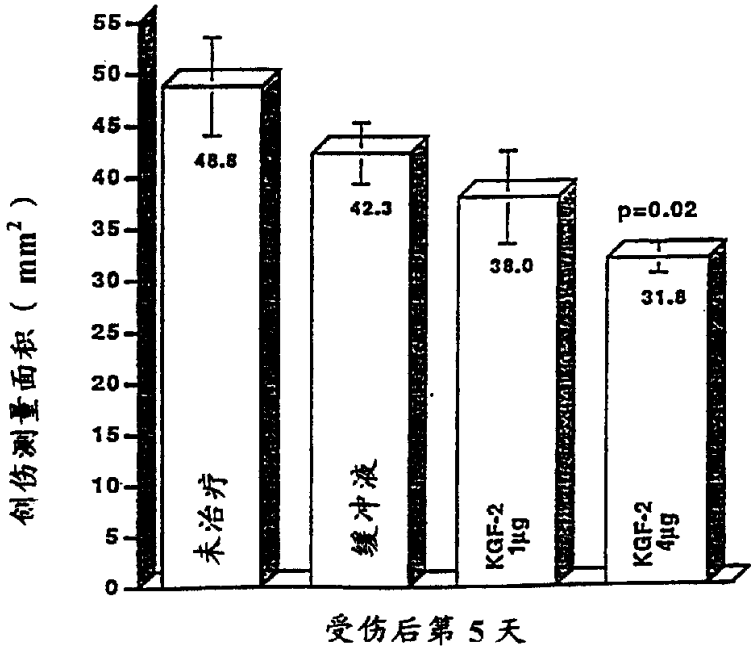
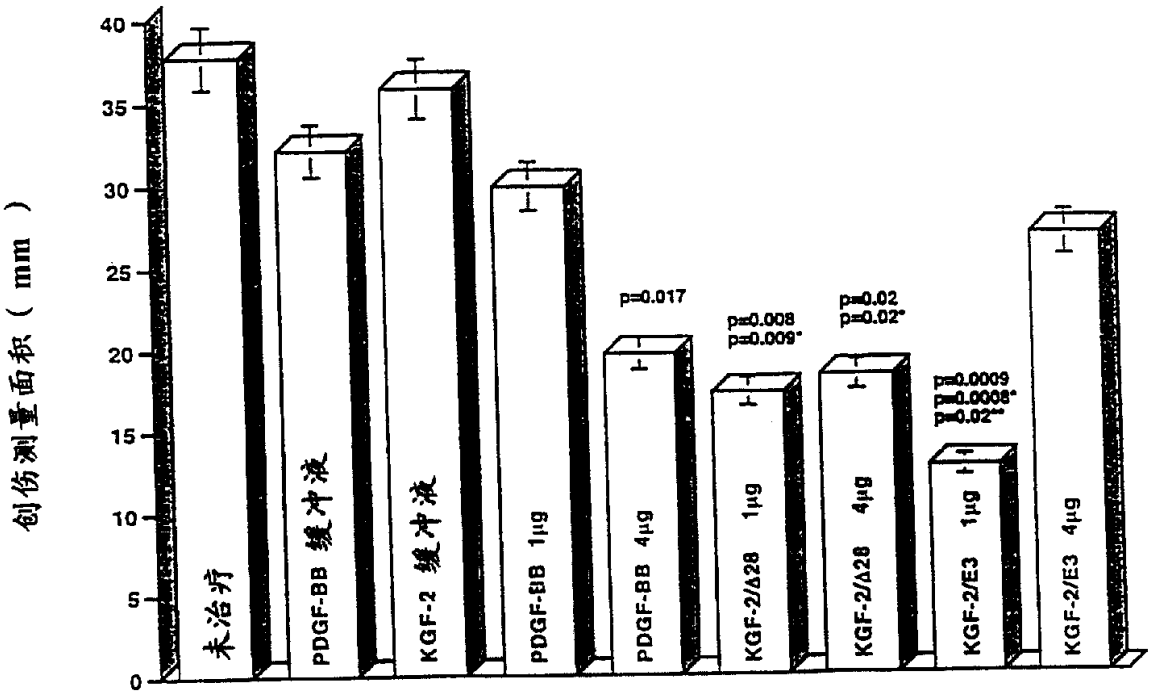

创伤测量面积（mm²）
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
48.8
42.3
38.0
p=0.02
31.8
未治疗
缓冲液
KGF-2 1μg
KGF-2 4μg
受伤后第 5 天

图 19B



受伤后第 10 天

图 20

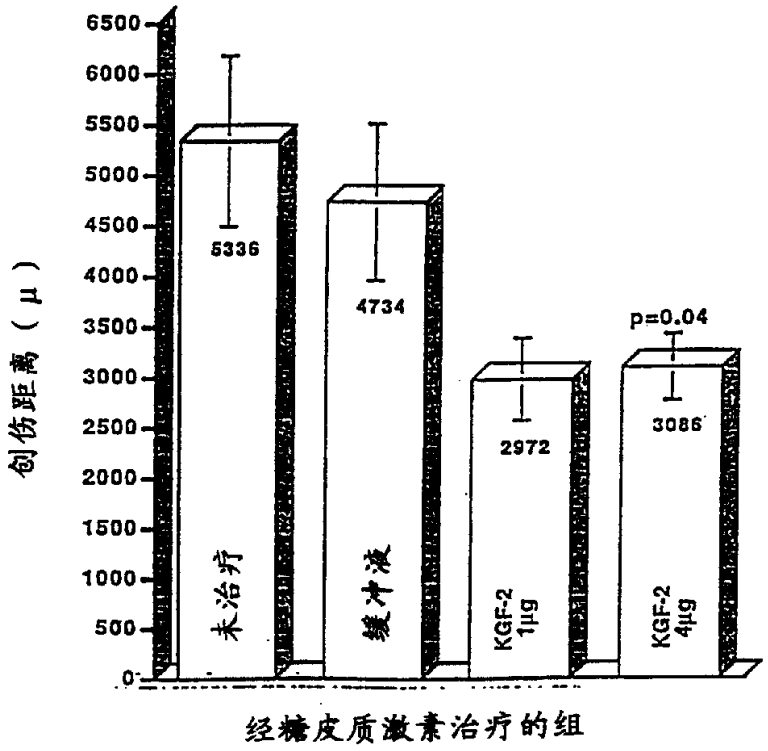
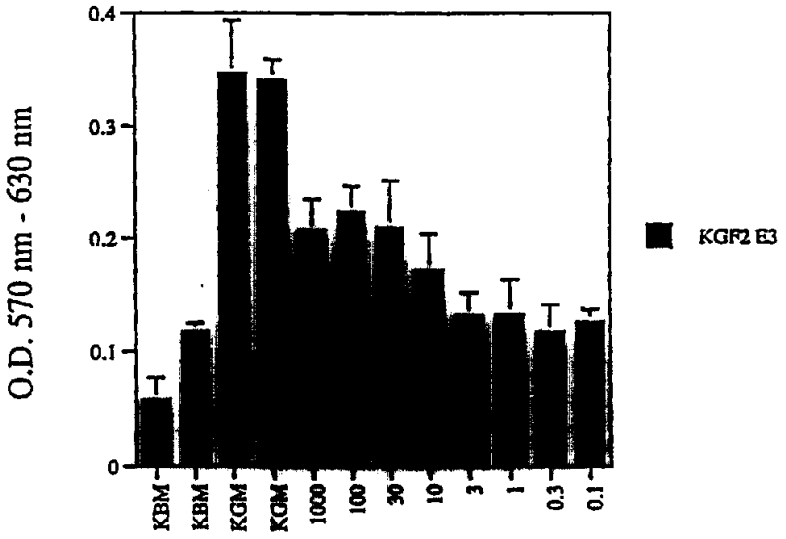

6500
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
创伤距离（μ）
5336
4734
2972
p=0.04
3086
未治疗
缓冲液
KGF-2
1μg
KGF-2
4μg
经糖皮质激素治疗的组

图 21A


O.D. 570 nm - 630 nm
0.4
0.3
0.2
0.1
0
KBM
KBM
KGM
KGM
1000
100
30
10
3
1
0.3
0.1
KGF2 E3

浓度（ ng/ml ）

图 21B

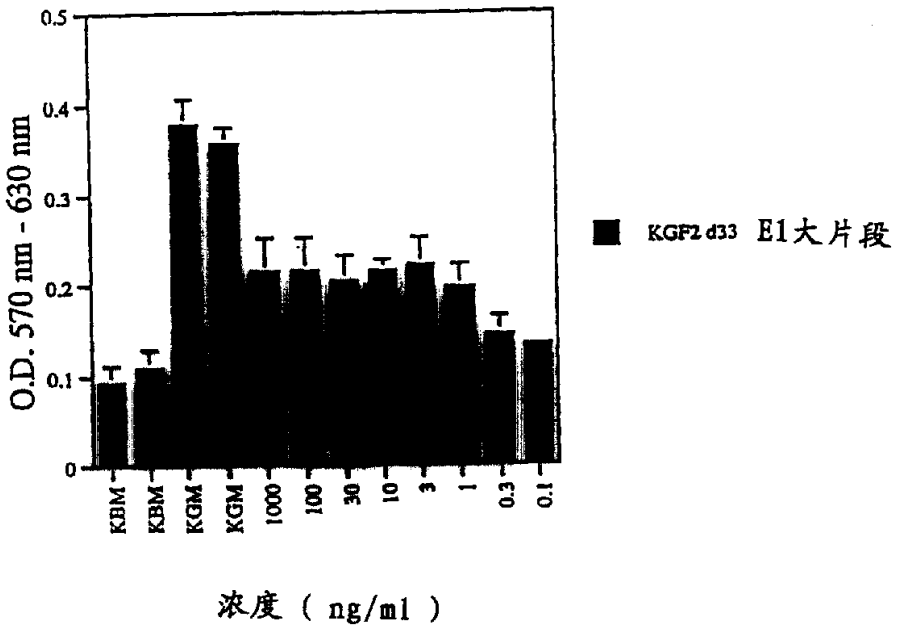

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
O.D. 570 nm - 630 nm
KBM
KBM
KGM
KGM
1000
100
30
10
3
1
0.3
0.1
KGF2 d33 E1大片段
浓度（ ng/ml ）

图 21C

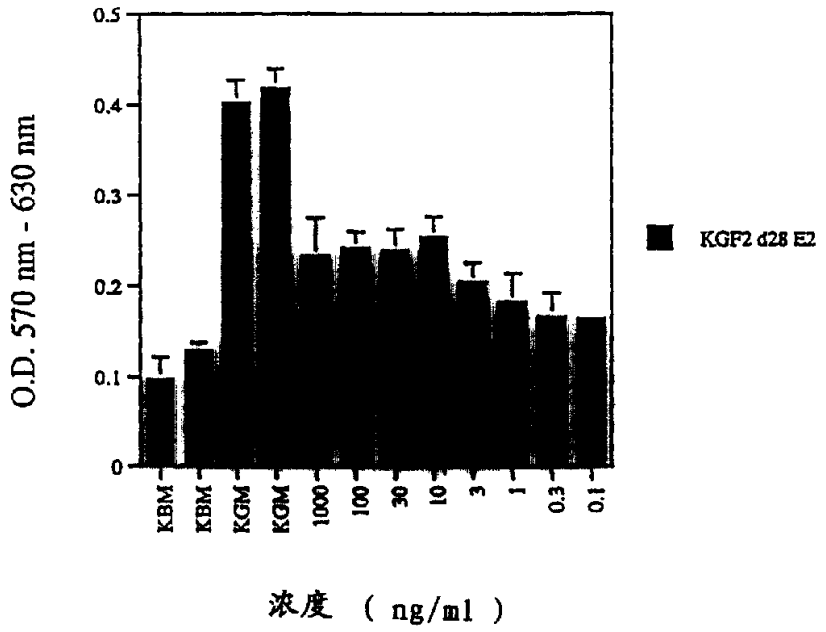

O.D. 570 nm - 630 nm
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
KBM
KBM
KGM
KGM
1000
100
30
10
3
1
0.3
0.1
KGF2 d28 E2
浓度 （ ng/ml ）

图 22A

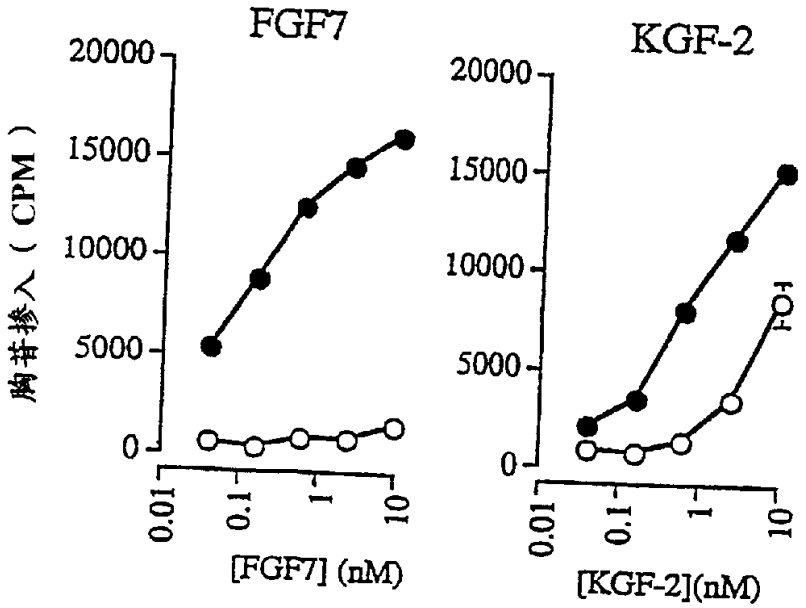

FGF7
KGF-2
胸苷掺入（CPM）
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
[FGF7] (nM)
[KGF-2](nM)

图 22B

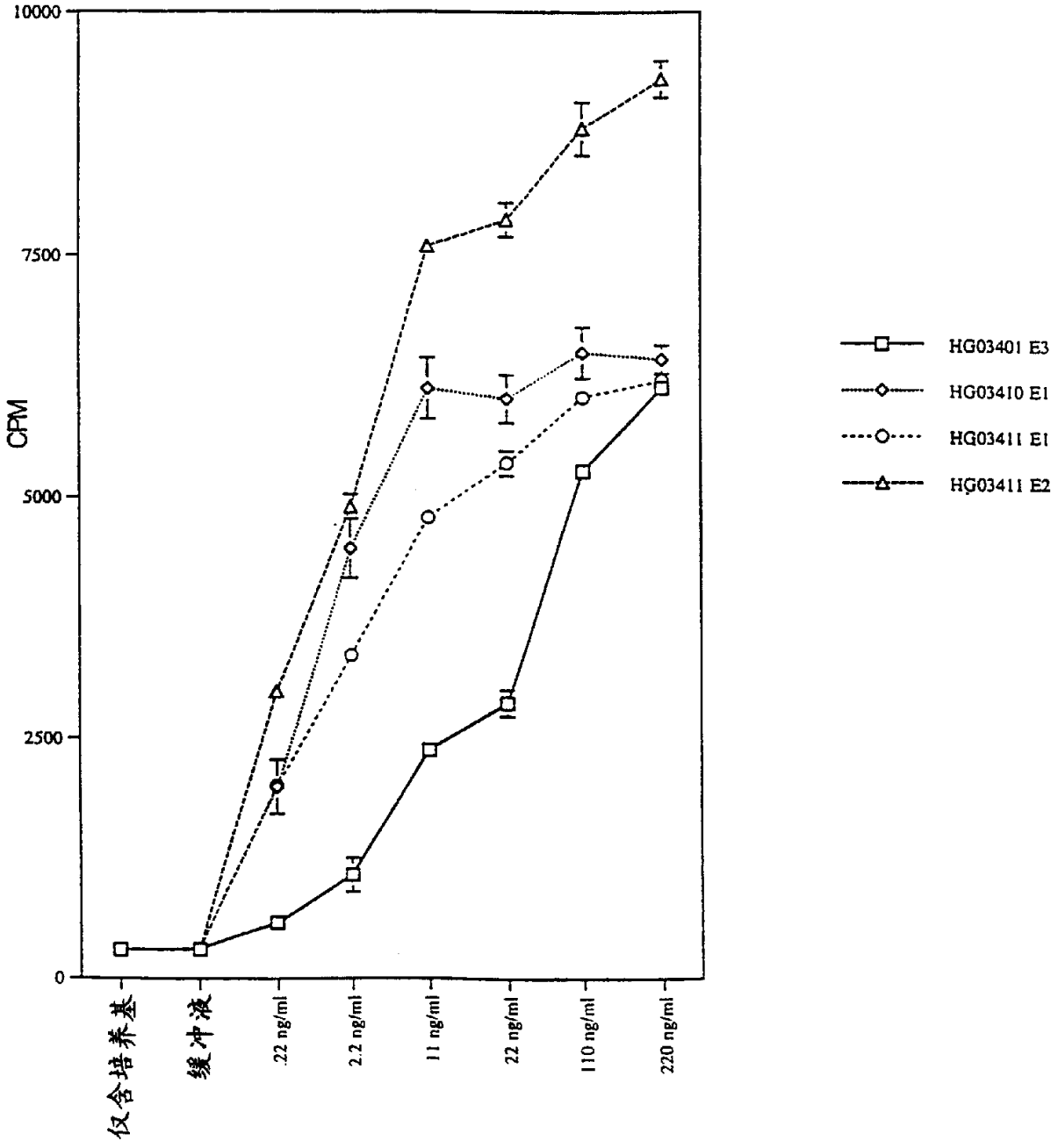

10000
7500
5000
2500
0
CPM
仅含培养基
缓冲液
.22 ng/ml
2.2 ng/ml
11 ng/ml
22 ng/ml
110 ng/ml
220 ng/ml
HG03401 E3
HG03410 E1
HG03411 E1
HG03411 E2

图 22C

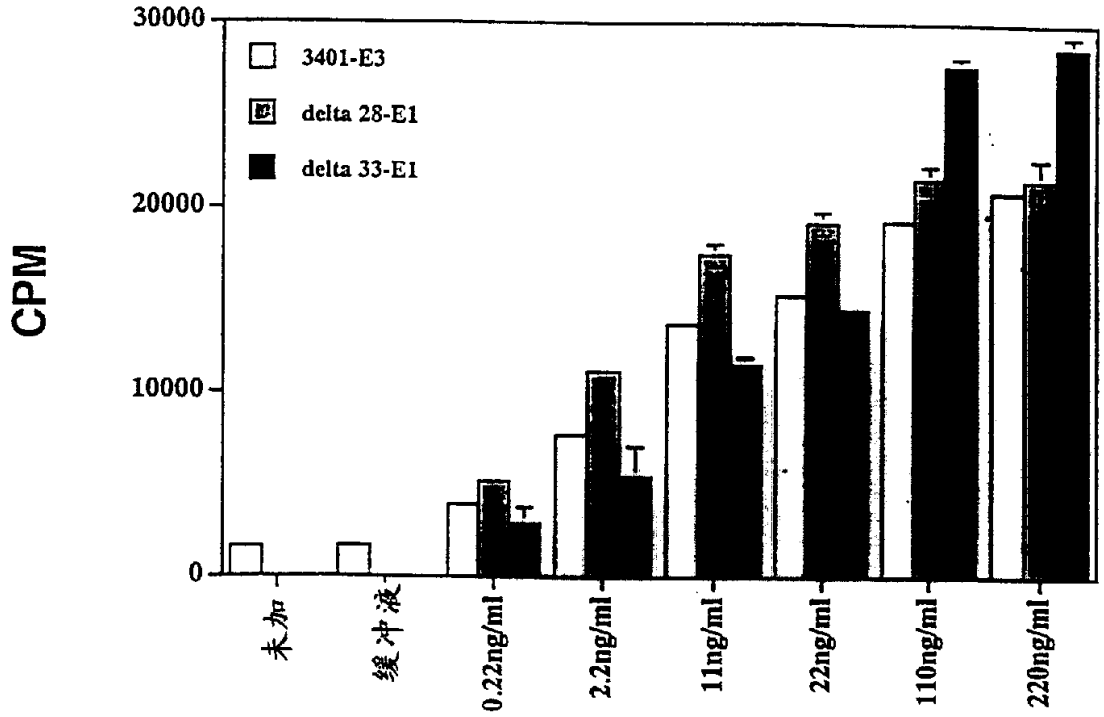

CPM
30000
20000
10000
0
3401-E3
delta 28-E1
delta 33-E1
未加
缓冲液
0.22ng/ml
2.2ng/ml
11ng/ml
22ng/ml
110ng/ml
220ng/ml

图 23

ATGTGGAAATGGATACTGACCCACTGCGCTTCTGCTTTCCCGCACCTGCCGGGTTGCTGC 60
Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu Pro Gly Cys Cys

TGCTGCTGCTTCCTGCTGCTGTTCCTGGTTTCTTCTGTTCCGGTTACCTGCCAGGCTCTG 120
Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser Val Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu

GGTCAGGACATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTTCCTCTTCCTCTTTCTCTTCCCCG 180
Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu Ala Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Pro

ACTTCCGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGT 240
Thr Ser Ala Gly Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg

AAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGG 300
Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly Lys Val Ser Gly

ACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTT 360
Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val

GTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTC 420
Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys Gly Lys Leu

TATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGA 480
Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly

TACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTG 540
Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met Tyr Val Ala Leu

AATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCAC 600
Asn Gly Lys Gly Ala Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His

TTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG 627
Phe Leu Pro Met Val Val His Ser ·

图 24A

ATGACCTGCCAGGCTCTGGGTCAGGACATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTTCCTCT 60
Met Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu Ala Thr Asn Ser Ser Ser

TCCTCTTTCTCTTCCCCGTCTTCCGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCTGCAG 120
Ser Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln

GGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAAA 180
Gly Asp Val Arg Trp Arg Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys

AACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCCTGGAGATAACA 240
Asn Gly Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr

TCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATG 300
Ser Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser Asn Tyr Tyr Leu Ala Met

AACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAG 360
Asn Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu

AGGATAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGG 420
Arg Ile Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg

CAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGG 480
Gln Met Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr Arg Arg

AAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG 525
Lys Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser •

图 24B

```
ATGACTTGCCAGGCACTGGGTCAAGACATGGTTTCCCCGGAAGCTACCAACAGCTCCAGCTCTAGCTTCA
TACTGAACGGTCCGTGACCCAGTTCTGTACCAAAGGGGCCTTCGATGGTTGTCGAGGTCGAGATCGAAGT  70

 M  T  C  Q  A  L  G  Q  D  M  V  S  P  E  A  T  N  S  S  S  S  S  F
GCAGCCCATCTAGCGCAGGTCGTCACGTTCGCTCTTACAACCACTTACAGGGTGATGTTCGTTGGCGCAA
CGTCGGGTAGATCGCGTCCAGCAGTGCAAGCGAGAATGTTGGTGAATGTCCCACTACAAGCAACCGCGTT  140

S  S  P  S  S  A  G  R  H  V  R  S  Y  N  H  L  Q  G  D  V  R  W  R  K
ACTGTTCAGCTTTACCAAGTACTTCCTGAAAATCGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAG
TGACAAGTCGAAATGGTTCATGAAGGACTTTTAGCTTTTTTTGCCATTTCAAAGACCCTGGTTCTTCCTC  210

 L  F  S  F  T  K  Y  F  L  K  I  E  K  N  G  K  V  S  G  T  K  K  E
AACTGCCCGTACAGCATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACA
TTGACGGGCATGTCGTAGGACCTCTATTGTAGTCATCTTTAGCCTCAACAACGGCAGTTTCGGTAATTGT  280

N  C  P  Y  S  I  L  E  I  T  S  V  E  I  G  V  V  A  V  K  A  I  N
GCAACTATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAA
CGTTGATAATGAATCGGTACTTGTTCTTCCCCTTTGAGATACCGAGTTTTCTTAAATTGTTACTGACATT  350

S  N  Y  Y  L  A  M  N  K  K  G  K  L  Y  G  S  K  E  F  N  N  D  C  K
GCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGG
CGACTTCCTCTCCTATCTCCTTTTACCTATGTTATGGATACGTAGTAAATTGACCGTCGTATTACCCTCC  420

 L  K  E  R  I  E  E  N  G  Y  N  T  Y  A  S  F  N  W  Q  H  N  G  R
CAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCT
GTTTACATACACCGTAACTTACCTTTTCCTCGAGGTTCCTCTCCTGTCTTTTGTGCTTCCTTTTTGTGGA  490

Q  M  Y  V  A  L  N  G  K  G  A  P  R  R  G  Q  K  T  R  R  K  N  T
CTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG
GACGAGTGAAAGAAGGTTACCACCATGTGAGTATC  525

S  A  H  F  L  P  M  V  V  H  S
```

图 25

ATGACCTGCCAGGCTCTGGGTCAGGACATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTTCC
TCTTCCTCTTTCTCTTCCCCGTCTTCCGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCT
GCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAAT
CGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCC
TGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAAC
TATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAA
TGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATCAT
TTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCT
CCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAAT
GGTGGTACACTCATAG

MTCQALGQDMVSPEATNSSSSSFSSPSSAGRHVRSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIE
KNGKVSGTKKENCPYSILEITSVEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKL
KERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS.

图 26

ATGGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGT
AAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAAAAACGGTAAAGTTTCT
GGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAAT
CGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAAGAA
GGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGA
TAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGG
CAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAACAC
GAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

MAGRHVRSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSVEIGV
VAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMY
VALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS.

图 27

ATGGTTCGTTGGCGTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAAA
AACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCCTGGAGAT
AACATCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTT
AGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTA
AGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATCATTTAACTGG
CAGCATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAG
AGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTAC
ACTCATAG

MVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSVEIGVVAVKAINSNYYLAM
NKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQ
KTRRKNTSAHFLPMVVHS.

图 28

ATGGAAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCAT
CCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCA
ACTATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC
AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATC
ATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAG
CTCCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCA
ATGGTGGTACACTCATAG

MEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSVEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDC
KLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVH
S.

图 29

ATGGAGAACTGCCCGTACAGCATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTGT
TGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAAC
TCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAA
AATGGATACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTA
TGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAA
AACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

MENCPYSILEITSVEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGY
NTYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS.

图 30

ATGGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACT
CTATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAA
ATGGATACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTATG
TGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAA
CACCTCTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

MVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMY
VALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS.

图 31

ATGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAGGAGAG
GATAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGA
GGCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAAC
ACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAATGGTGGTACACTCATAG

MGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKT
RRKNTSAHFLPMVVHS.

图 32

ATGACCTGCCAGGCTCTGGGTCAGGACATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTTCC
TCTTCCTCTTTCTCTTCCCCGTCTTCCGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCT
GCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAAT
CGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCC
TGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAAC
TATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAA
TGACTGTAAGCTGAAG

MTCQALGQDMVSPEATNSSSSSFSSPSSAGRHVRSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIE
KNGKVSGTKKENCPYSILEITSVEIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKL
K

图 33

ATGGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGT
AAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAAAAACGGTAAAGTTTCT
GGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAAT
CGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAAGAA
GGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAATGACTGTAAGCTGAAG

MAGRHVRSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSVEIGV
VAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLK

图 34

C-37至 Ser

ATGACCTCTCAGGCTCTGGGTCAGGACATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTTCC
TCTTCCTCTTTCTCTTCCCCGTCTTCCGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCT
GCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAAT
CGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGCATCC
TGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAAC
TATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAA
TGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATCAT
TTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCT
CCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAAT
GGTGGTACACTCATAG

图 35

C-106 至Ser

ATGACCTGCCAGGCTCTGGGTCAGGACATGGTTTCTCCGGAAGCTACCAACTCTTCC
TCTTCCTCTTTCTCTTCCCCGTCTTCCGCTGGTCGTCACGTTCGTTCTTACAACCACCT
GCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTTCTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAAT
CGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTCTCCGTACAGCATCC
TGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAAC
TATTACTTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAACAA
TGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAATACCTATGCATCAT
TTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCT
CCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTCCAAT
GGTGGTACACTCATAG

图 36

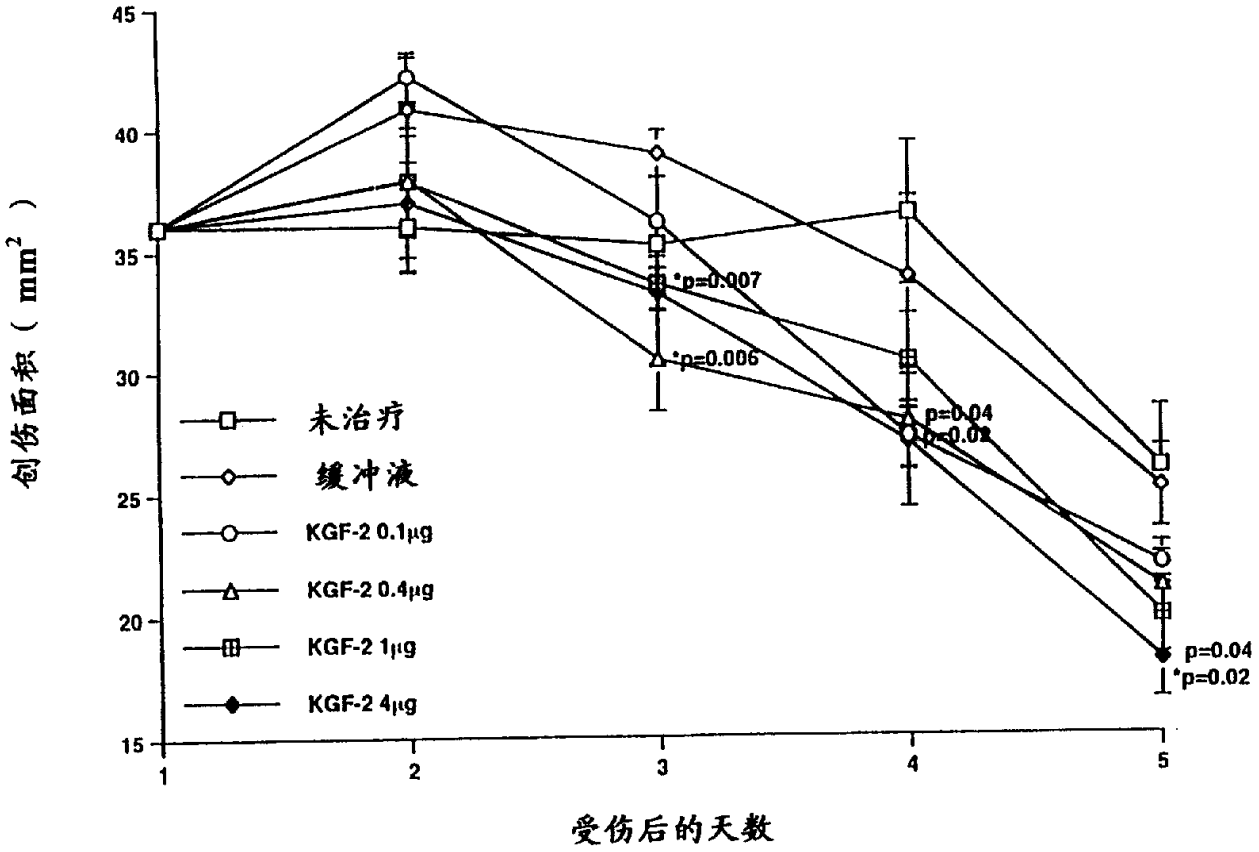

45
40
35
30
25
20
15
1
2
3
4
5
创伤面积（mm²）
受伤后的天数
未治疗
缓冲液
KGF-2 0.1μg
KGF-2 0.4μg
KGF-2 1μg
KGF-2 4μg
*p=0.007
*p=0.006
p=0.04
*p=0.02
p=0.04
*p=0.02

图 37

KGF-2 Δ 33 对正常的创伤愈合大鼠模型的作用

治疗组	伤口大小 (mm)	%伤口闭合	组织学评分	上皮再形成 (μm)	BrdU 评分
未治疗	25.9 ± 2.5	58.8 ± 3.7	6.8 ± 0.2	1142 ± 141	3.8 ± 0.4
缓冲液	25.1 ± 1.7	60.2 ± 2.6	6.4 ± 0.2	923 ± 61	5.0 ± 0.4
KGF-2/Δ33 (0.1μg)	22.0 ± 0.9	65 ± 1.4	6.8 ± 0.2	1275 ± 148	4.6 ± 0.7
KGF-2/Δ33 (0.4 μg)	21.1 ± 1.4	68.4 ± 2.4	8.0 ± 0.5 p=0.0445*	1310 ± 182	4.2 ± 0.7
KGF-2/Δ33 (1.0μg)	19.9 ± 1.5	66.2 ± 2.1	8.4 ± 0.4 p=0.0159* p=0.0053†	1389 ± 115 p=0.0074†	3.3 ± 0.25 p=0.0217†
KGF-2/Δ33 (4.0μg)	18.1 ± 1.6 p=0.0398* p=0.0200†	71.2 ± 2.6 p=0.0367* p=0.0217†	8.5 ± 0.3 p=0.0047* p=0.0445†	1220 ± 89 p=0.0254†	5.3 ± 0.9

图 38

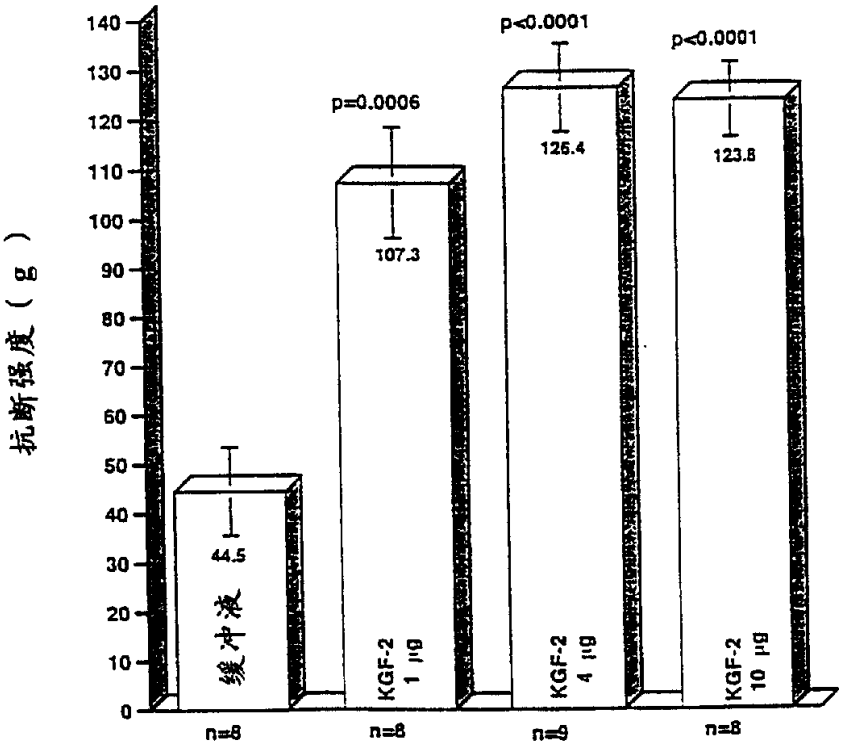

抗断强度（g）
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
44.5
缓冲液
p=0.0006
107.3
KGF-2
1 μg
p<0.0001
126.4
KGF-2
4 μg
p<0.0001
123.8
KGF-2
10 μg
n=8
n=8
n=9
n=8

图 39

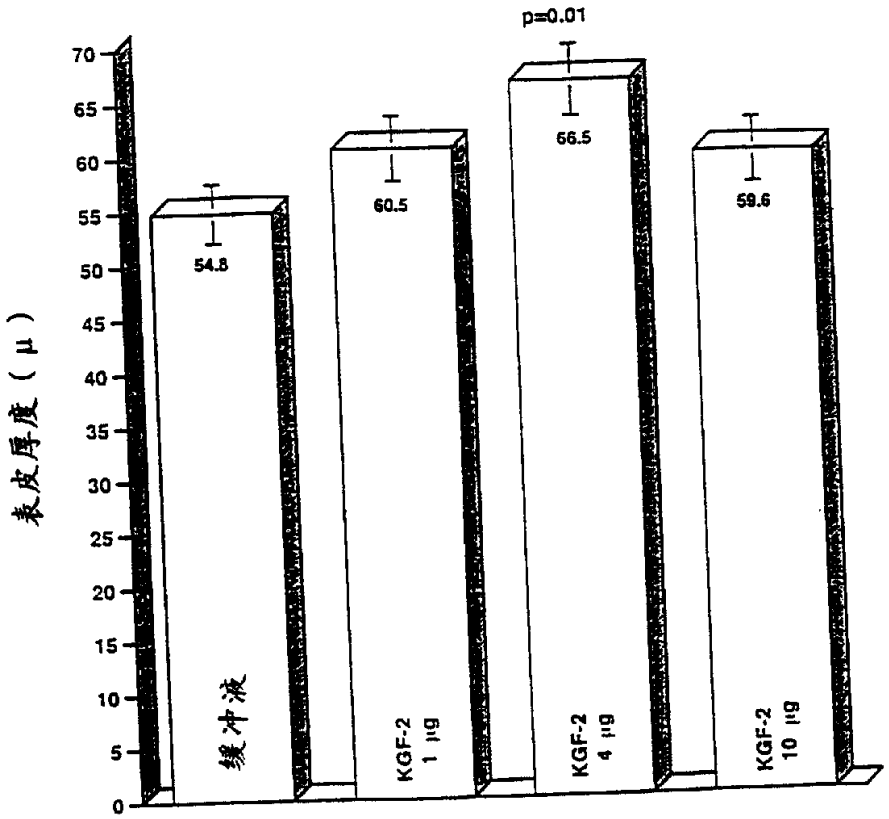

p=0.01
表皮厚度（μ）
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
54.8
60.5
66.5
59.6
缓冲液
KGF-2
1 μg
KGF-2
4 μg
KGF-2
10 μg

图 40

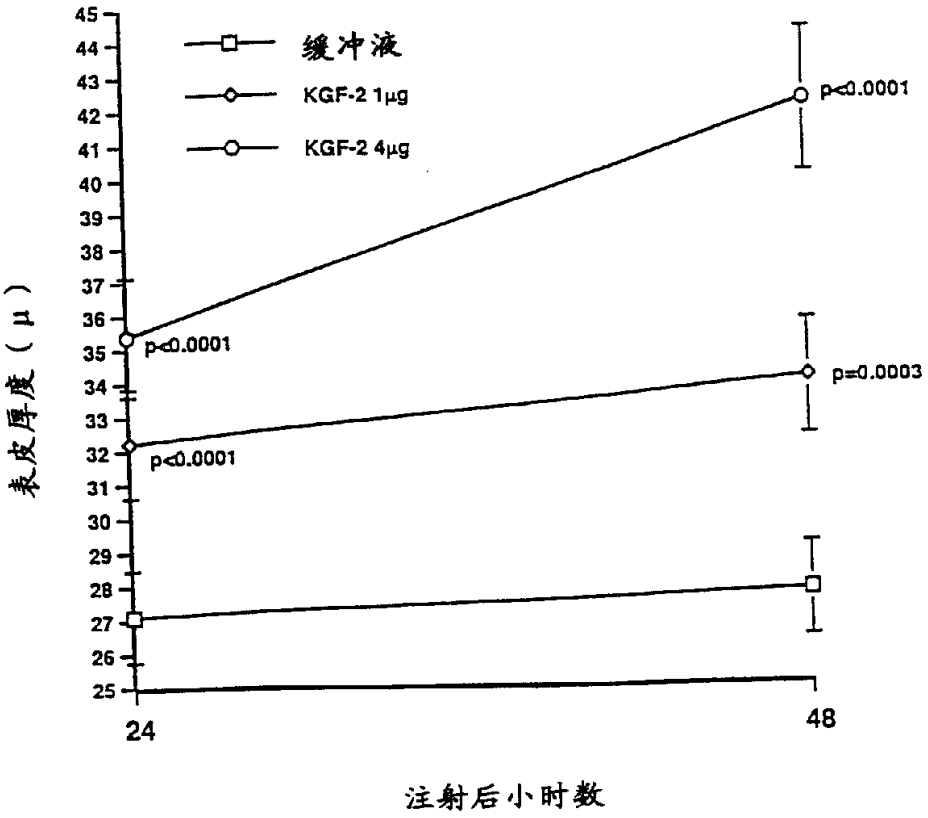

缓冲液
KGF-2 1μg
KGF-2 4μg
p<0.0001
p<0.0001
p=0.0003
p<0.0001
表皮厚度（μ）
45
44
43
42
41
40
39
38
37
36
35
34
33
32
31
30
29
28
27
26
25
24
48
注射后小时数

图 41

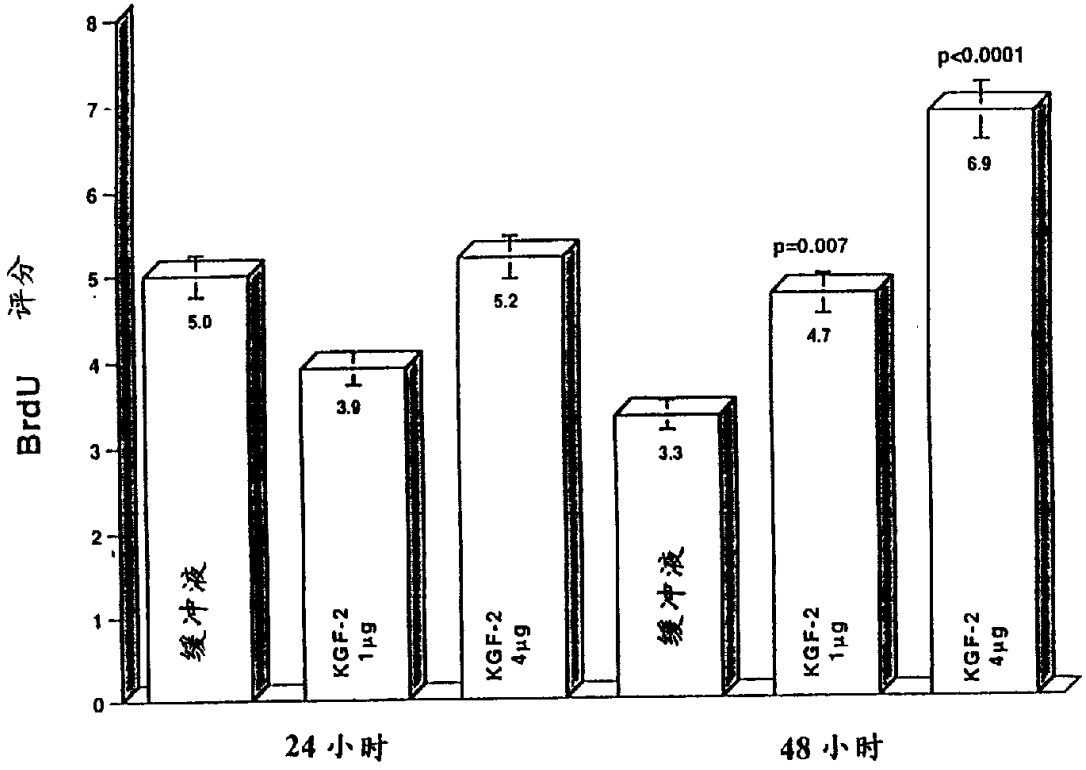
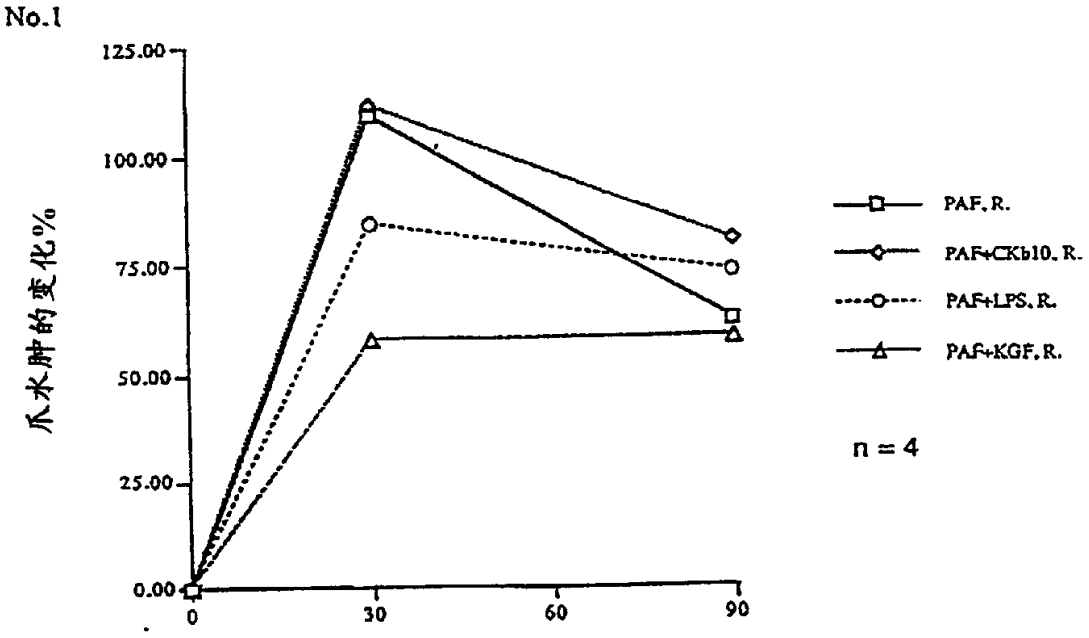
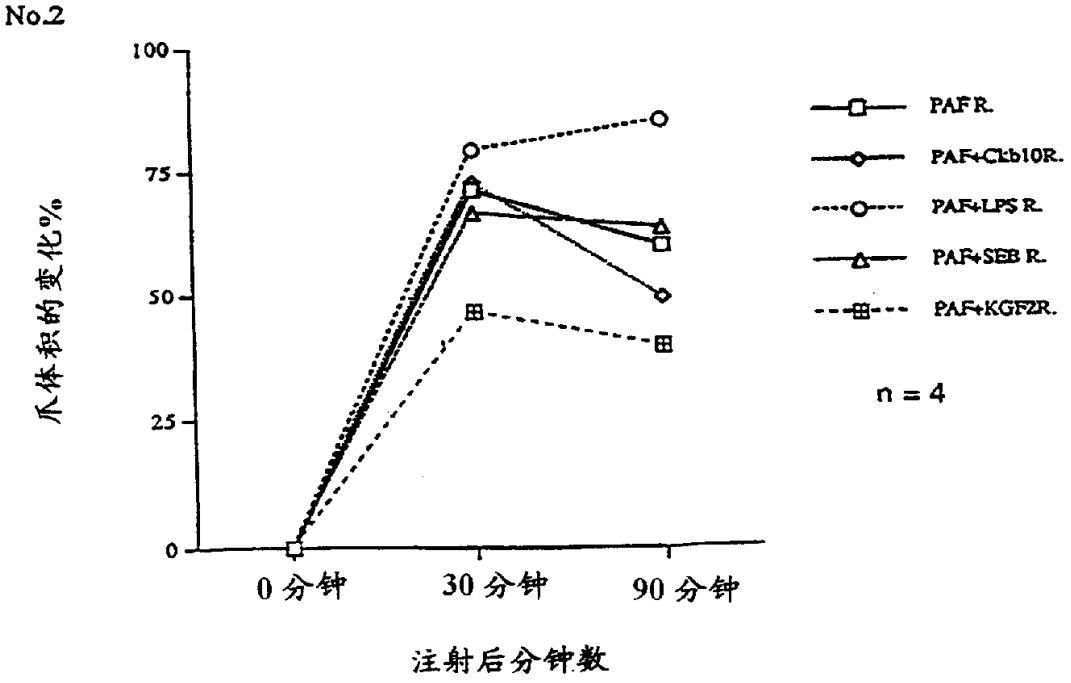

BrdU 评分
0
1
2
3
4
5
6
7
8
缓冲液
KGF-2 1μg
KGF-2 4μg
缓冲液
KGF-2 1μg
KGF-2 4μg
5.0
3.9
5.2
3.3
4.7
6.9
p=0.007
p<0.0001
24 小时
48 小时

图 42


No.1
125.00
100.00
75.00
50.00
25.00
0.00
0
30
60
90
爪水肿的变化%
PAF.R.
PAF+CKb10.R.
PAF+LPS.R.
PAF+KGF.R.
n = 4


No.2
100
75
50
25
0
爪体积的变化%
0 分钟
30 分钟
90 分钟
注射后分钟数
PAF R.
PAF+Ckb10R.
PAF+LPS R.
PAF+SEB R.
PAF+KGF2R.
n = 4

KGF-2 △ 33 对 Lewis 大鼠经 PAF 诱导的爪水肿的作用

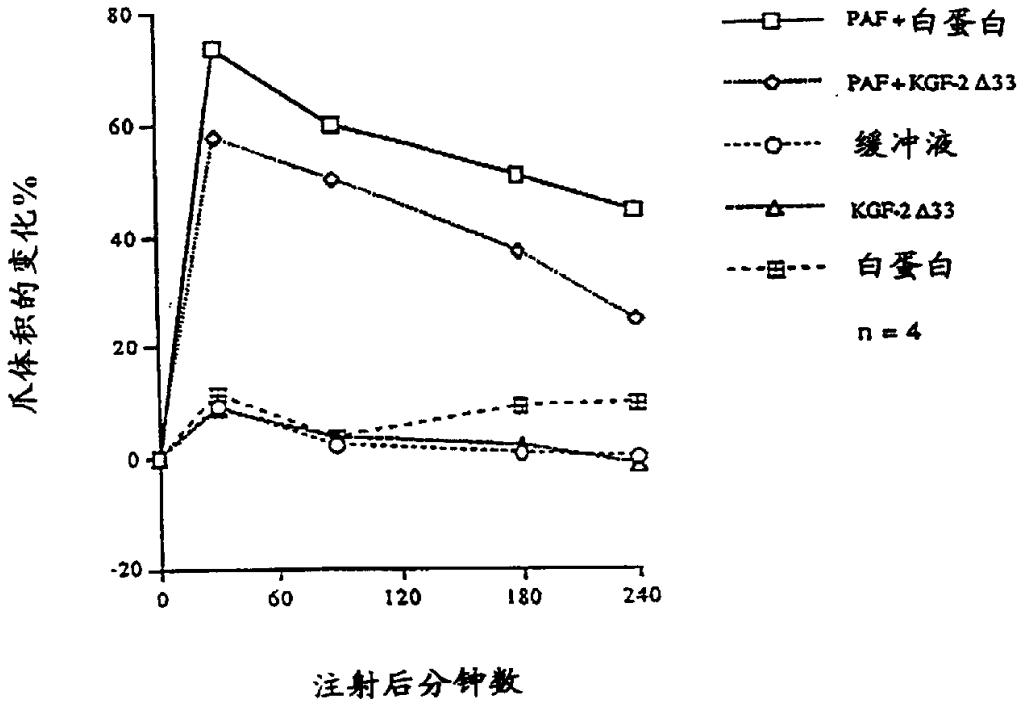


图 43

KGF-2 △ 33 对全身辐照后的 Balb/C 小鼠的作用

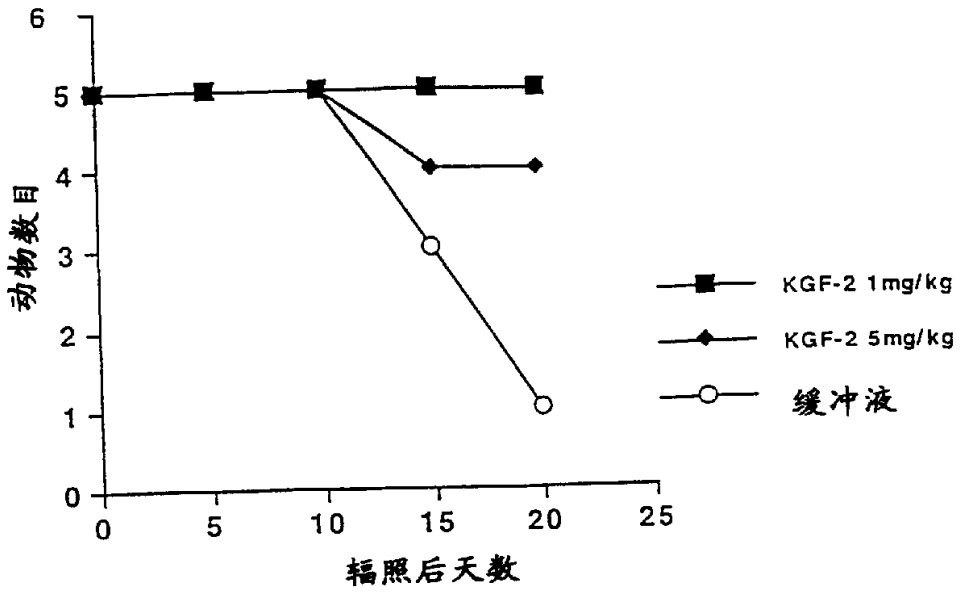


图 44

KGF-2 Δ33 对辐照后的小鼠体重的影响

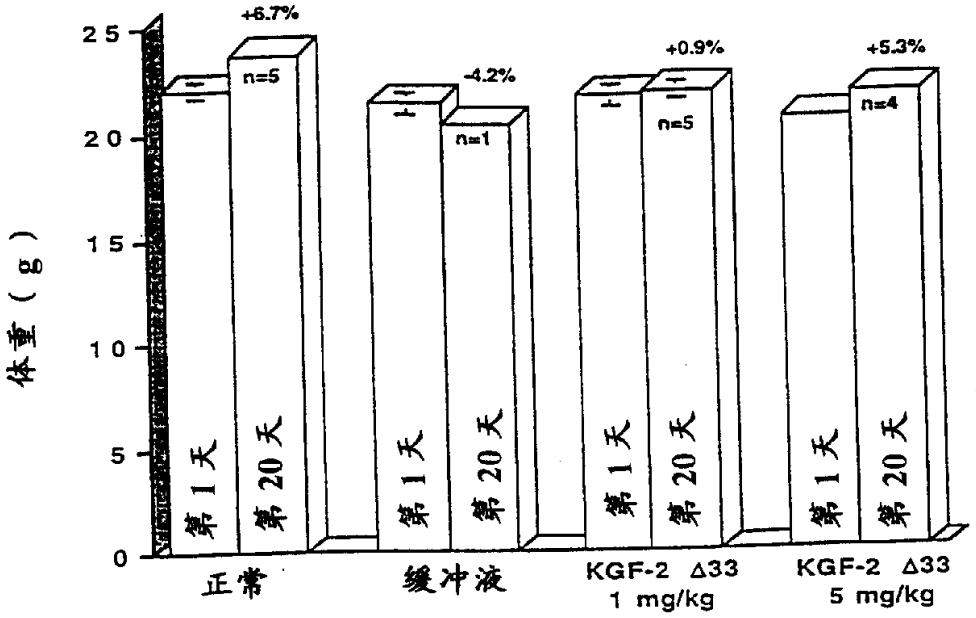


图 45

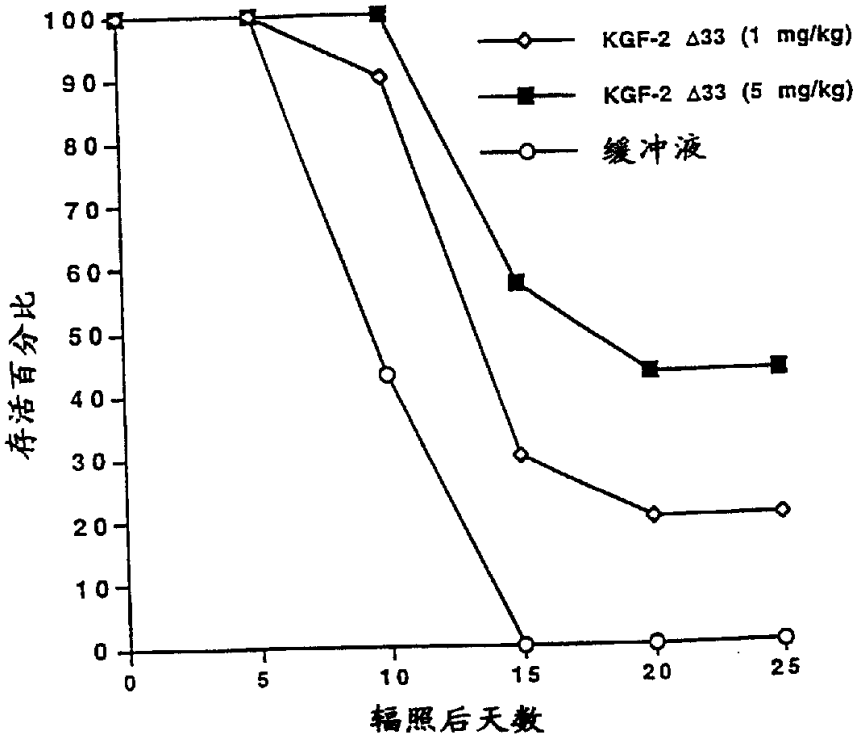
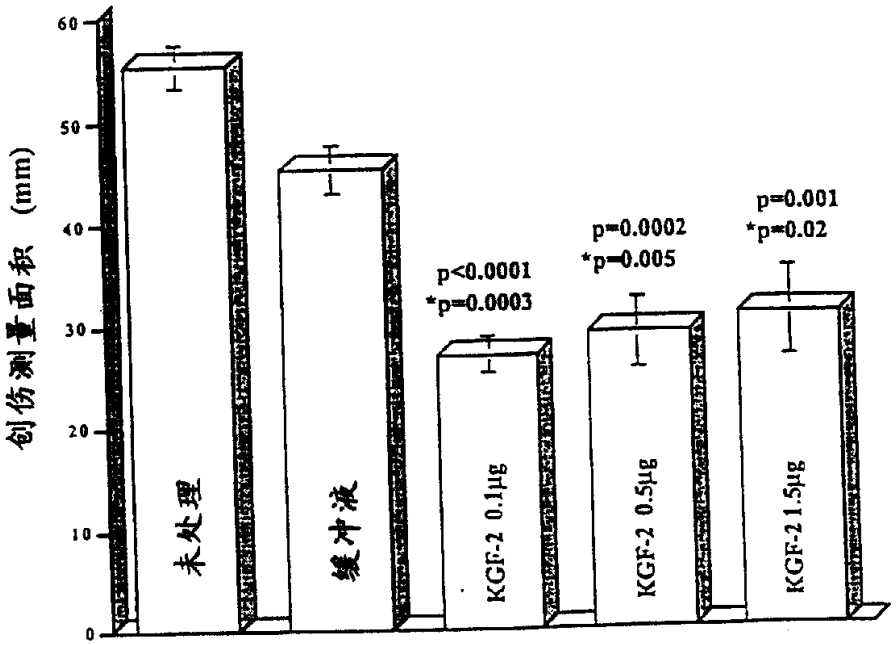

KGF-2 Δ33 (1 mg/kg)
KGF-2 Δ33 (5 mg/kg)
缓冲液
存活百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
辐照后天数

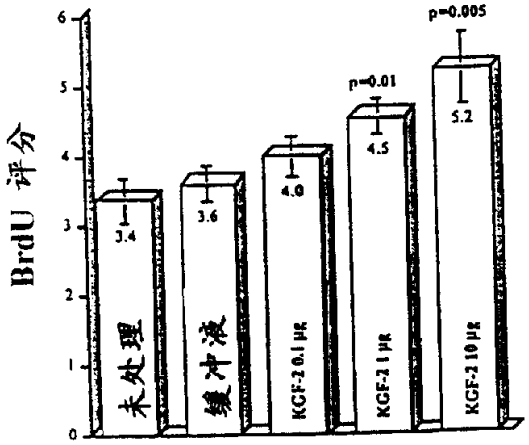
图 46


创伤测量面积 (mm)
60
50
40
30
20
10
0
未处理
缓冲液
KGF-2 0.1μg
KGF-2 0.5μg
KGF-2 1.5μg
p<0.0001
*p=0.0003
p=0.0002
*p=0.005
p=0.001
*p=0.02

受伤后第 8 天

图 47

图 48


BrdU 评分
0
1
2
3
4
5
6
3.4
3.6
4.0
4.5
5.2
p=0.01
p=0.005
未处理
缓冲液
KGF-2 0.1 μg
KGF-2 1 μg
KGF-2 10 μg

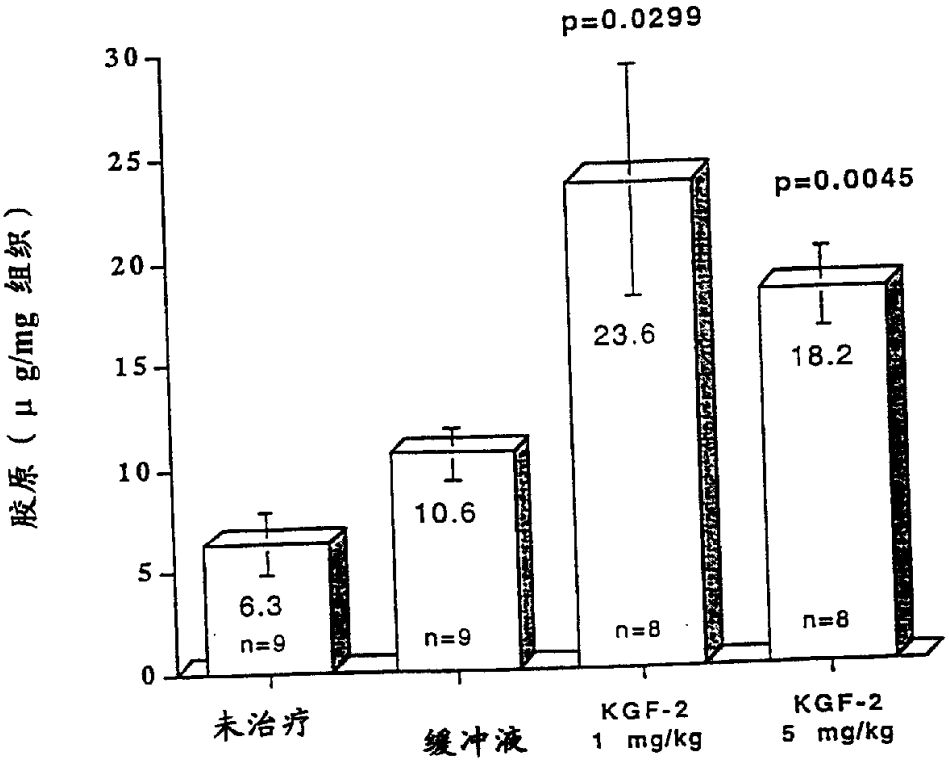

p=0.0299
p=0.0045
30
25
20
15
10
5
0
胶原（μg/mg 组织）
6.3
n=9
10.6
n=9
23.6
n=8
18.2
n=8
未治疗
缓冲液
KGF-2
1 mg/kg
KGF-2
5 mg/kg

图 49