

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500390
(P2005-500390A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 38/00
A61P 1/00
A61P 17/00
A61P 17/02
A61P 27/02

F 1

A 61 K 37/02
A 61 P 1/00
A 61 P 17/00
A 61 P 17/02
A 61 P 27/02

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 C 08 4
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 129 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2003-521814 (P2003-521814) | (71) 出願人 | 591076811 カイロン コーポレイション アメリカ合衆国, カリフォルニア 946 08, エミリービル, ホートン ストリー ト 4560 |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年8月21日 (2002.8.21) | (74) 代理人 | 100089705 弁理士 社本 一夫 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成16年2月23日 (2004.2.23) | (74) 代理人 | 100076691 弁理士 増井 忠式 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/US2002/026929 | (74) 代理人 | 100075270 弁理士 小林 泰 |
| (87) 國際公開番号 | W02003/016505 | (74) 代理人 | 100080137 弁理士 千葉 昭男 |
| (87) 國際公開日 | 平成15年2月27日 (2003.2.27) | (74) 代理人 | 100096013 弁理士 富田 博行 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/313,881 | | |
| (32) 優先日 | 平成13年8月21日 (2001.8.21) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 KGF ポリペプチド組成物

(57) 【要約】

本出願において、ケラチノサイト増殖因子 (KGF) ポリペプチドを含む組成物、およびその KGF ポリペプチドを使用する方法が、記載されている。本発明の KGF ポリペプチドは、全長 KGF₁₋₆₃ に対して増強された生物活性を示す。従って、本発明の KGF ポリペプチドは、KGF₁₋₆₃ を使用して必要な量よりも少ない量で、組成物において使用され得る。本出願はまた、上皮細胞増殖を刺激するための医薬の製造における KGF ポリペプチドの使用、および創傷を処置するための医薬の製造における KGF ポリペプチドの使用を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

上皮細胞増殖を刺激するための医薬の製造における KGF ポリペプチドの使用であって、該 KGF ポリペプチドは、

(i) 図 1 のアミノ酸残基 16 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 1 5} ;

(i i) 図 1 のアミノ酸残基 19 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 1 8} ;

(i i i) 図 1 のアミノ酸残基 20 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 1 9} ;

(i v) 図 1 のアミノ酸残基 21 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 2 0} ;

(v) 図 1 のアミノ酸残基 22 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 2 1} ;

(v i) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 2 2} ;

(v i i) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 2 4} ;

(v i i i) 図 1 のアミノ酸残基 26 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 2 5} ;

(i x) (i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v)、(v i)、(v i i)、または(v i i i)の生物学的に活性なアナログであって、該生物学的に活性なアナログは、それぞれ、(i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v)、(v i)、(v i i)、または(v i i i)と同じ数のアミノ酸からなりかつ(i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v)、(v i)、(v i i)、または(v i i i)に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有する、生物学的に活性なアナログ；

からなる群より選択され、

該 KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF₁₆₃ に対して生物活性の増加を示し、かつ該ポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、該 KGF ポリペプチドは、治療上有効な量で存在し、該治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 75 % 以下である、使用。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v)、(v i)、(v i i)、(v i i i) または(i x) に対して少なくとも 80 % の配列相同性を有する、使用。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v)、(v i)、(v i i)、(v i i i) または(i x) に対して少なくとも 90 % の配列相同性を有する、使用。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 2 2} またはその生物学的に活性なアナログであり、該生物学的に活性なアナログは、141 アミノ酸からなり、かつ該生物学的に活性なアナログは、該 KGF_{d e s 1 ~ 2 2} に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療的応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 50 % 以下である、使用。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{d e s 1 ~ 2 2} である、使用。

10

20

30

40

50

【請求項 6】

請求項 1 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} またはその生物学的に活性なアナログであり、該生物学的に活性なアナログは、139 アミノ酸からなり、かつ該生物学的に活性なアナログは、該 KGF_{des 1 ~ 24} に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療的応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 50 % 以下である、使用。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} である、使用。 10

【請求項 8】

上皮細胞増殖を刺激するための医薬の製造における KGF ポリペプチドの使用であって、該 KGF ポリペプチドは、(i) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22}、または (ii) (i) の生物学的に活性なアナログであり、該生物学的に活性なアナログは、(i) と同じ数のアミノ酸からなりかつ該 (i) に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、

該 KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF (KGF₁₆₃) に対して生物活性の増加を示し、かつ該ポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、該 KGF ポリペプチドは、治療上有効な量で存在し、該治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 10 % ~ 75 % である、使用。 20

【請求項 9】

請求項 8 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i) または (ii) に対して少なくとも 80 % の配列相同性を有する、使用。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i) または (ii) に対して少なくとも 90 % の配列相同性を有する、使用。

【請求項 11】

請求項 8 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなり、N 末端アルギニンがアラニン残基で置換されている、使用。 30

【請求項 12】

請求項 8 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} である、使用。

【請求項 13】

請求項 8 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 50 % である、使用。

【請求項 14】

請求項 8 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 25 % である、使用。 40

【請求項 15】

請求項 10 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 20 % である、使用。

【請求項 16】

上皮細胞増殖を刺激するための医薬の製造における KGF ポリペプチドの使用であって、該 KGF ポリペプチドは、(i) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24}、または (ii) (i) の生物学的に活性なアナログであり、該生物学的に活性なアナログは、(i) と同じ数のアミノ酸からなりかつ該 (i) に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、

該 KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成 50

熟した全長 KGF (KGF₁₋₆₃) に対して生物活性の増加を示し、かつ該ポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、該 KGF ポリペプチドは、治療上有効な量で存在し、該治療上有効な量は、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₋₆₃ の量の 5 % ~ 75 % である、使用。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i) または (ii) に対して少なくとも 80 % の配列相同性を有する、使用。

【請求項 18】

請求項 16 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i) または (ii) に対して少なくとも 90 % の配列相同性を有する、使用。

10

【請求項 19】

請求項 16 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} である、使用。

【請求項 20】

請求項 16 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 50 % である、使用。

【請求項 21】

請求項 16 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 25 % である、使用。

20

【請求項 22】

請求項 16 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 20 % である、使用。

【請求項 23】

請求項 16 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 5 % ~ 10 % である、使用。

【請求項 24】

創傷を処置するための医薬の製造における KGF ポリペプチドの使用であって、該 KGF ポリペプチドは、

(i) 図 1 のアミノ酸残基 16 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 15} ;

30

(ii) 図 1 のアミノ酸残基 19 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 18} ;

(iii) 図 1 のアミノ酸残基 20 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 19} ;

(iv) 図 1 のアミノ酸残基 21 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 20} ;

(v) 図 1 のアミノ酸残基 22 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 21} ;

(vi) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} ;

40

(vii) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} ;

(viii) 図 1 のアミノ酸残基 26 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 25} ;

(xi) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または (viii) の生物学的に活性なアナログであって、該生物学的に活性なアナログは、それぞれ、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または (viii) と同じ数のアミノ酸からなりかつ (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または (viii) に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有する、生物学的に活性なアナログ；

50

からなる群より選択され、

該 KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF (KGF₁₋₆₃) に対して生物活性の増加を示し、かつ該 KGF ポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、該 KGF ポリペプチドは、治療上有効な量で存在し、該治療上有効な量は、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₋₆₃ の量の 75% 以下である、使用。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)に対して少なくとも 80% の配列相同性を有する、使用。

10

【請求項 26】

請求項 24 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)に対して少なくとも 90% の配列相同性を有する、使用。

【請求項 27】

請求項 24 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} またはその生物学的に活性なアナログであり、該生物学的に活性なアナログは、141 アミノ酸からなり、かつ該生物学的に活性なアナログは、該 KGF_{des 1 ~ 22} に対して少なくとも 70% の配列相同性を有し、前記治療上有効な量が、1分子ベースで、等価な治療的応答を惹起するために必要な KGF₁₋₆₃ の量の 50% 以下である、使用。

20

【請求項 28】

請求項 27 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} である、使用。

【請求項 29】

請求項 24 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} またはその生物学的に活性なアナログであり、該生物学的に活性なアナログは、139 アミノ酸からなり、かつ該生物学的に活性なアナログは、該 KGF_{des 1 ~ 24} に対して少なくとも 70% の配列相同性を有し、前記治療上有効な量が、1分子ベースで、等価な治療的応答を惹起するために必要な KGF₁₋₆₃ の量の 50% 以下である、使用。

30

【請求項 30】

請求項 29 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} である、使用。

【請求項 31】

創傷を処置するための医薬の製造における KGF ポリペプチドの使用であって、該 KGF ポリペプチドは、(i) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22}、または(ii) (i) の生物学的に活性なアナログであり、該生物学的に活性なアナログは、(i) と同じ数のアミノ酸からなりかつ該 (i) に対して少なくとも 70% の配列相同性を有し、

40

該 KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF (KGF₁₋₆₃) に対して生物活性の増加を示し、かつ該ポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、該 KGF ポリペプチドは、治療上有効な量で存在し、該治療上有効な量は、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₋₆₃ の量の 10% ~ 75% である、使用。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i) または(ii) に対して少なくとも 80% の配列相同性を有する、使用。

【請求項 33】

請求項 31 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i) または(ii)

50

i) に対して少なくとも 90 % の配列相同性を有する、使用。

【請求項 34】

請求項 31 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなり、N 末端アルギニンがアラニン残基で置換されている、使用。

【請求項 35】

請求項 31 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} である、使用。

【請求項 36】

請求項 31 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 50 % である、使用。 10

【請求項 37】

請求項 31 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 25 % である、使用。

【請求項 38】

請求項 31 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 20 % である、使用。

【請求項 39】

創傷を処置するための医薬の製造における KGF ポリペプチドの使用であって、該 KGF ポリペプチドは、(i) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} 、または (ii) (i) の生物学的に活性なアナログであり、該生物学的に活性なアナログは、(i) と同じ数のアミノ酸からなりかつ該 (i) に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、 20

該 KGF ポリペプチドは、Bab / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF (KGF₁₆₃) に対して生物活性の増加を示し、かつ該ポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、該 KGF ポリペプチドは、治療上有効な量で存在し、該治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 5 % ~ 75 % である、使用。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i) または (ii) に対して少なくとも 80 % の配列相同性を有する、使用。 30

【請求項 41】

請求項 39 に記載の使用であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i) または (ii) に対して少なくとも 90 % の配列相同性を有する、使用。

【請求項 42】

請求項 39 に記載の使用であって、前記 KGF ポリペプチドが、図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} である、使用。

【請求項 43】

請求項 39 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 50 % である、使用。 40

【請求項 44】

請求項 39 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 25 % である、使用。

【請求項 45】

請求項 39 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10 % ~ 20 % である、使用。

【請求項 46】

請求項 39 に記載の使用であって、前記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 5 % ~ 10 % である、使用。

【請求項 47】

組成物であって、

(a) 治療上有効な量の KGF ポリペプチドと、

(b) 薬学的に受容可能な賦形剤と、

を含み、該 KGF ポリペプチドは、

(i) 図 1 のアミノ酸残基 16 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 15} ;

(ii) 図 1 のアミノ酸残基 19 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 18} ;

(iii) 図 1 のアミノ酸残基 20 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 19} ;

(iv) 図 1 のアミノ酸残基 21 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 20} ;

(v) 図 1 のアミノ酸残基 22 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 21} ;

(vi) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} ;

(vii) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} ;

(viii) 図 1 のアミノ酸残基 26 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 25} ;

(ix) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)の生物学的に活性なアナログであって、該生物学的に活性なアナログは、それぞれ、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)と同じ数のアミノ酸からなりかつ(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有する、生物学的に活性なアナログ；および

(x) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)のアナログであって、それぞれ、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)のアミノ酸配列と、さらなる N 末端メチオニンとからなる、アナログ；

からなる群より選択され、

該 KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF₁₆₃ に対して生物活性の増加を示し、かつ該 KGF ポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 75 % 以下である、組成物。

【請求項 48】

請求項 47 に記載の組成物であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)に対して少なくとも 80 % の配列相同性を有する、組成物。

【請求項 49】

請求項 47 に記載の組成物であって、前記生物学的に活性なアナログが、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)に対して少なくとも 90 % の配列相同性を有する、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的に、ポリペプチド増殖因子に関する。詳細には、本発明は、ケラチノサイト増殖因子ポリペプチドを含む組成物およびそのケラチノサイト増殖因子ポリペプチドを使用する方法に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

ケラチノサイト増殖因子 (KGF) は、纖維芽細胞増殖因子 (「FGF」) のファミリーに属し、FGFの原型は、塩基性FGFおよび酸性FGFにより示される。KGFは、FGF-7としても公知である。KGFは、FGFと同様に、ヘパリンに結合し、一般的には、胚外中胚葉または胚内中胚葉に由来する種々の細胞型および神経外胚葉に由来する種々の細胞型の、増殖および分化を刺激可能である。例えば、KGFは、FGFと同様に、初期胚胞において腹側中胚葉および背側中胚葉の分化および増殖を誘導する能力を有する。例えば、Gospodarowiczら、Cell. Biol. Rev. (1991) 10 25: 307~314; およびBasilicoら、Adv. Cancer Res. (1992) 59: 115~165を参照のこと。

【0003】

他のFGFと同様に、KGFは、ヘパリン結合たんぱく質であるが、他のFGFとは異なり、KGFは、独特の標的細胞特異性を有する。特に、KGFは、上皮細胞増殖を刺激する能力において他のFGFと類似するが、内皮細胞または纖維芽細胞の増殖を刺激する能力がないことにおいて、他のFGFとは異なる。例えば、Finchら、Science (1989) 245: 752~755を参照のこと。成熟した全長KGF(本明細書中でKGF₁₋₆₃と呼ばれる)は、163アミノ酸残基を有するポリペプチドであり、N末端にアミノ酸残基14~16に広がる潜在的N-グリコシル化部位を有する。Finchら 20 Science (1989) 245: 752~755。

【0004】

Ronら、J. Biol. Chem. (1993) 268: 2984~2988は、KGF₁₋₆₃が原核生物細胞発現系において発現された場合に、マイトジエン活性を有する組換えKGF(「rKGF」)ポリペプチドが入手され得たことを見出した。このrKGF分子が、成熟KGF₁₋₆₃ポリペプチドのN末端からの3アミノ酸残基、8アミノ酸残基、27アミノ酸残基、38アミノ酸残基、および48アミノ酸残基の欠失によって短縮された場合、生じた分子の生物学的活性は変動した。3アミノ酸残基欠失および8アミノ酸残基欠失の場合、それぞれ、生じた分子のマイトジエン活性は、全長rKGFと比較して影響されなかったようであった。しかし、27アミノ酸残基の欠失によって、10分の1~20分の1に減少したマイトジエン活性を示す分子が生じた。38アミノ酸残基の欠失および48アミノ酸残基の欠失は、それぞれ、マイトジエン活性の完全な喪失およびヘパリン結合能力の完全な喪失を生じた。しかし、Ronらは、全長rKGF分子と比較して増加したマイトジエン活性を保有するいかなる短縮rKGFフラグメントを生成することもできなかった。

【0005】

Gospodarowiczらに対する米国特許第5,677,278号、同第5,773,586号、同第5,843,883号、同第5,863,767号、および同第6,074,848号は、KGF分子を記載する。23アミノ酸残基のN末端欠失を有する1つの特定の分子(KGF_{des 1-23}と呼ばれる)は、成熟した全長組換えKGF₁₋₆₃と比較して増大したマイトジエン活性を示す。

【0006】

Osslundら、Protein Sci. (1988) 7: 1681~1690は、種々のN末端短縮KGF分子およびそのマイトジエン活性の特定の測定値を報告する。同様に、国際公開WO96/11951およびWO96/11949は、種々のN末端短縮およびアミノ酸置換を有するKGF分子を記載する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、種々のN末端短縮KGFポリペプチドおよびそのアナログが、ネイティブの全 50

長 K G F₁₋₆₋₃ と比較して 1 分子ベースで増大した生物学的活性を示すという発見に基づく。従って、これらの分子を含む組成物は、上皮形成が必要な状態の処置（例えば、創傷、火傷、眼の障害、胃腸疾患および上皮細胞増殖もしくは再生の刺激により規定される任意の障害の処置）について増加した能力を有する。これらの分子は、単独でかまたは他のマイトジエン因子（例えば、他の増殖因子（例えば、他の FGF（血小板由来増殖因子（PDGF）、上皮増殖因子（EGF）、インスリン様増殖因子（IGF）、インスリン様増殖因子結合タンパク質（IGFBP）など）のいずれかが挙げられる）と組み合わせて送達され得る。

【0008】

さらに、これらの KGF 分子は、過剰増殖疾患を処置するために毒素分子を上皮細胞に標的化するために、これらの毒素分子に結合体化され得る。従って、1 つの実施形態において、本発明は、上皮細胞増殖を刺激する方法に関する。この方法は、上皮細胞を組成物と接触させる工程を含し、その組成物は、

(a) 治療上有効な量の KGF ポリペプチドと、

(b) 薬学的に受容可能な賦形剤と、

を含み、この KGF ポリペプチドは、

(i) 図 1 のアミノ酸残基 16 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 15}；

(ii) 図 1 のアミノ酸残基 19 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 18}；

(iii) 図 1 のアミノ酸残基 20 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 19}；

(iv) 図 1 のアミノ酸残基 21 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 20}；

(v) 図 1 のアミノ酸残基 22 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 21}；

(vi) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22}；

(vii) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24}；

(viii) 図 1 のアミノ酸残基 26 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 25}；

(ix) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)の生物学的に活性なアナログであって、該生物学的に活性なアナログは、それぞれ、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)と同じ数のアミノ酸からなりかつ(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有する、生物学的に活性なアナログ；

からなる群より選択され、

この KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF₁₋₆₋₃ に対して生物活性の増加を示し、かつこの KGF ポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、この KGF ポリペプチドは、治療上有効な量で存在し、この治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₋₆₋₃ の量のうちの 75 % 以下である。

【0009】

特定の実施形態において、上記生物学的に活性なアナログは、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)に対して少なくとも 80 % もしくは 90 % の配列相同性を有する。

【0010】

別の実施形態において、本発明は、上記のような方法に関し、この方法において、上記 K

10

20

30

40

50

G F ポリペプチドは、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる K G F_{d e s 1 ~ 2 2} またはその生物学的に活性なアナログであり、この生物学的に活性なアナログは、141 アミノ酸からなり、かつこの生物学的に活性なアナログは、上記 K G F_{d e s 1 ~ 2 2} に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、上記治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療的応答を惹起するために必要な K G F_{1 6 3} の量の 50 % 以下である。

【 0 0 1 1 】

なおさらなる実施形態において、本発明は、上記のような方法に関し、この方法において、上記 K G F ポリペプチドは、図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる K G F_{d e s 1 ~ 2 4} またはその生物学的に活性なアナログであり、上記生物学的に活性なアナログは、139 アミノ酸からなり、かつこの生物学的に活性なアナログは、上記 K G F_{d e s 1 ~ 2 4} に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、上記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療的応答を惹起するために必要な K G F_{1 6 3} の量の 50 % 以下である。

10

【 0 0 1 2 】

さらなる実施形態において、本発明は、上皮細胞増殖を刺激する方法に関し、この方法は、上皮細胞を組成物と接触させる工程を包含し、この組成物は、

a) 治療上有効な量の K G F ポリペプチドと、

b) 薬学的に受容可能な賦形剤と、

を含み、この K G F ポリペプチドは、(i) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる K G F_{d e s 1 ~ 2 2} 、または(i i) (i) の生物学的に活性なアナログであり、この生物学的に活性なアナログは、(i) と同じ数のアミノ酸からなりかつ(i) に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、

20

この K G F ポリペプチドは、B a l b / M K 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 K G F (K G F_{1 6 3}) に対して生物活性の増加を示し、かつこのポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、この治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な K G F_{1 6 3} の量の 10 % ~ 75 % である。

【 0 0 1 3 】

特定の実施形態において、上記生物学的に活性なアナログは、(i) または(i i) に対して少なくとも 80 % もしくは 90 % の配列相同性を有する。

30

【 0 0 1 4 】

他の実施形態において、この生物学的に活性なアナログが、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなり、N 末端アルギニンがアラニン残基で置換されている。

【 0 0 1 5 】

なおさらなる実施形態において、上記治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 K G F の量の 10 % ~ 20 % 、または 10 % ~ 25 % 、または 10 % ~ 50 % 、またはこれらの範囲内にある任意のパーセンテージである。

【 0 0 1 6 】

別の実施形態において、本発明は、上皮細胞増殖を刺激する方法に関し、この方法は、上皮細胞を組成物と接触させる工程を包含し、この組成物は、

a) 治療上有効な量の K G F ポリペプチドと、

b) 薬学的に受容可能な賦形剤と、

を含み、この K G F ポリペプチドは、(i) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる K G F_{d e s 1 ~ 2 4} 、または(i i) (i) の生物学的に活性なアナログであり、この生物学的に活性なアナログは、(i) と同じ数のアミノ酸からなりかつ(i) に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有し、

40

この K G F ポリペプチドは、B a l b / M K 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 K G F (K G F_{1 6 3}) に対して生物活性の増加を示し、かつこのポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、この治療上有効な量は、1 分子ベース

50

で、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₋₆₋₃ の量の 5 % ~ 75 % である。

【0017】

上記の方法の特定の実施形態において、上記生物学的に活性なアナログは、(i) または (ii) に対して少なくとも 80 % もしくは 90 % の配列相同性を有する。

【0018】

さらなる実施形態において、上記治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 5 % ~ 10 %、10 % ~ 20 %、10 % ~ 25 %、または 10 % ~ 50 %、またはこれらの範囲内にある任意のパーセンテージである。

【0019】

上記の方法のすべてにおいて、上皮細胞が、インビトロまたはインビボで上記 KGF ポリペプチドと接触され得る。 10

【0020】

別の実施形態において、本発明は、創傷を処置する方法に関し、この方法は、処置されるべき創傷領域に KGF ポリペプチド組成物を適用する工程、およびその創傷を治癒される工程を包含する。この組成物は、

(a) 治療上有効な量の KGF ポリペプチドと、

(b) 薬学的に受容可能な賦形剤と、

を含み、この KGF ポリペプチドは、

(i) 図 1 のアミノ酸残基 16 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 15} ; 20

(ii) 図 1 のアミノ酸残基 19 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 18} ;

(iii) 図 1 のアミノ酸残基 20 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 19} ;

(iv) 図 1 のアミノ酸残基 21 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 20} ;

(v) 図 1 のアミノ酸残基 22 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 21} ;

(vi) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} ; 30

(vii) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} ;

(viii) 図 1 のアミノ酸残基 26 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 25} ;

(ix) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または (viii) の生物学的に活性なアナログであって、該生物学的に活性なアナログは、それぞれ、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または (viii) と同じ数のアミノ酸からなりかつ (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または (viii) に対して少なくとも 70 % の配列相同性を有する、生物学的に活性なアナログ； 40

からなる群より選択され、

この KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF (KGF₁₋₆₋₃) に対して生物活性の増加を示し、かつこのポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、この治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₋₆₋₃ の量の 75 % 以下である。

【0021】

上記の方法の特定の実施形態において、上記生物学的に活性なアナログは、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii) または (ix) に対して少なくとも 80 % もしくは 90 % の配列相同性を有する。

【0022】

50

30

40

50

上記の方法のさらなる実施形態において、上記 KGF ポリペプチドは、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} またはその生物学的に活性なアナログであり、この生物学的に活性なアナログは、141 アミノ酸からなり、かつこの生物学的に活性なアナログは、上記 KGF_{des 1 ~ 22} に対して少なくとも 70% の配列相同性を有し、上記治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療的応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 50% 以下である。

【 0023 】

上記の方法の他の実施形態において、上記 KGF ポリペプチドは、図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} またはその生物学的に活性なアナログであり、上記生物学的に活性なアナログは、139 アミノ酸からなり、かつこの生物学的に活性なアナログは、上記 KGF_{des 1 ~ 24} に対して少なくとも 70% の配列相同性を有し、上記治療上有効な量が、1 分子ベースで、等価な治療的応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 50% 以下である。

10

【 0024 】

なおさらなる実施形態において、本発明は、創傷を処置する方法に関し、この方法は、処置されるべき創傷領域に KGF ポリペプチド組成物を適用する工程、およびその創傷を治癒される工程を包含する。この組成物は、

(a) 治療上有効な量の KGF ポリペプチドと、

(b) 薬学的に受容可能な賦形剤と、

を含み、この KGF ポリペプチドは、(i) 図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 22} 、または(ii) (i) の生物学的に活性なアナログであり、この生物学的に活性なアナログは、(i) と同じ数のアミノ酸からなりかつ(i) に対して少なくとも 70% の配列相同性を有し、

20

この KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF (KGF₁₆₃) に対して生物活性の増加を示し、かつこのポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、この治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な KGF₁₆₃ の量の 10% ~ 75% である。

【 0025 】

特定の実施形態において、上記生物学的に活性なアナログは、(i) または(ii) に対して少なくとも 80% もしくは 90% の配列相同性を有する。

30

【 0026 】

上記の方法のさらなる実施形態において、この生物学的に活性なアナログは、図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなり、N 末端アルギニンがアラニン残基で置換されている。

【 0027 】

さらなる実施形態において、上記治療上有効な量は、1 分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長 KGF の量の 10% ~ 20% 、または 10% ~ 25% 、または 10% ~ 50% 、またはこれらの範囲内にある任意のパーセンテージである。

【 0028 】

さらなる実施形態において、本発明は、創傷を処置する方法に関し、この方法は、処置されるべき創傷領域に KGF ポリペプチド組成物を適用する工程、およびその創傷を治癒される工程を包含する。この組成物は、

(a) 治療上有効な量の KGF ポリペプチドと、

(b) 薬学的に受容可能な賦形剤と、

を含み、この KGF ポリペプチドは、(i) 図 1 のアミノ酸残基 25 ~ 163 に示される連続するアミノ酸配列からなる KGF_{des 1 ~ 24} 、または(ii) (i) の生物学的に活性なアナログであり、この生物学的に活性なアナログは、(i) と同じ数のアミノ酸からなりかつ(i) に対して少なくとも 70% の配列相同性を有し、

40

この KGF ポリペプチドは、Balb / MK 生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長 KGF (KGF₁₆₃) に対して生物活性の増加を示し、かつこのポリペプ

50

チドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、この治療上有効な量は、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要なKGF₁₋₆₋₃の量の5%~75%である。

【0029】

特定の実施形態において、上記生物学的に活性なアナログは、(i)または(ii)に対して少なくとも80%の配列相同性もしくは90%の配列相同性を有する。

【0030】

なおさらなる実施形態において、上記治療上有効な量は、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要な全長KGFの量の5%~10%、または10%~20%、または10%~25%、または10%~50%、またはこれらの範囲内にある任意のパーセンテージである。

10

【0031】

上記の方法において、上記組成物は、インピトロまたはインピボにて上記創傷と接触され得る。

【0032】

なおさらなる実施形態において、本発明は、組成物に関し、その組成物は、

(a) 治療上有効な量のKGFポリペプチドと、

(b) 薬学的に受容可能な賦形剤と、

を含み、このKGFポリペプチドは、

(i) 図1のアミノ酸残基16~163に示される連続するアミノ酸配列からなるKGF_{des 1~15};

(ii) 図1のアミノ酸残基19~163に示される連続するアミノ酸配列からなるKGF_{des 1~18};

(iii) 図1のアミノ酸残基20~163に示される連続するアミノ酸配列からなるKGF_{des 1~19};

(iv) 図1のアミノ酸残基21~163に示される連続するアミノ酸配列からなるKGF_{des 1~20};

(v) 図1のアミノ酸残基22~163に示される連続するアミノ酸配列からなるKGF_{des 1~21};

(vi) 図1のアミノ酸残基23~163に示される連続するアミノ酸配列からなるKGF_{des 1~22};

(vii) 図1のアミノ酸残基25~163に示される連続するアミノ酸配列からなるKGF_{des 1~24};

(viii) 図1のアミノ酸残基26~163に示される連続するアミノ酸配列からなるKGF_{des 1~25};

(ix) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)の生物学的に活性なアナログであって、該生物学的に活性なアナログは、それぞれ、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)と同じ数のアミノ酸からなりかつ(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、または(viii)に対して少なくとも70%の配列相同性を有する、生物学的に活性なアナログ；および

(x) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)のアナログであって、それぞれ、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)または(ix)のアミノ酸配列と、さらなるN末端メチオニンとからなる、アナログ；

からなる群より選択され、

このKGFポリペプチドは、Balb/MK生物活性アッセイにより決定される場合に、成熟した全長KGF (KGF₁₋₆₋₃)に対して生物活性の増加を示し、かつこのポリペプチドは、上皮細胞増殖を特異的に刺激し、さらに、この治療上有効な量は、1分子ベースで、等価な治療応答を惹起するために必要なKGF₁₋₆₋₃の量の75%以下である。

20

30

40

【0033】

50

特定の実施形態において、上記生物学的に活性なアナログは、(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)または(ix)に対して少なくとも80%もしくは90%の配列相同性を有する。

【0034】

本発明のこれらの局面および他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照すると明らかになる。さらに、特定の手順または組成物をより詳細に記載する種々の参考文献が、本明細書中に示される。

【0035】

(発明の詳細な説明)

本発明の実施は、別段示されなければ、当該分野の技術範囲内のタンパク質化学、生化学、組換えDNA技術、および薬理学の従来の方法を使用する。このような技術は、文献に十分に説明されている。例えば、T. E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 最新版); Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick および N. Kaplan編, Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990) を参考のこと。10 20

【0036】

以下のアミノ酸の略語は、本文全体を通して使用される:

| | |
|-------------------|---------------------|
| アラニン: A l a (A) | アルギニン: A r g (R) |
| アスパラギン: A s n (N) | アスパラギン酸: A s p (D) |
| システイン: C y s (C) | グルタミン: G l n (Q) |
| グルタミン酸: G l u (E) | グリシン: G l y (G) |
| ヒスチジン: H i s (H) | イソロイシン: I l e (I) |
| ロイシン: L e u (L) | リジン: L y s (K) |
| メチオニン: M e t (M) | フェニルアラニン: P h e (F) |
| プロリン: P r o (P) | セリン: S e r (S) |
| スレオニン: T h r (T) | トリプトファン: T r p (W) |
| チロシン: T y r (Y) | バリン: V a l (V)。 |

【0037】

(I. 定義)

本発明を記載するにあたり、以下の用語が使用され、以下に示されるように規定されることが意図される。

【0038】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」とは、アミノ酸残基のポリマーをいい、その生成物の最小の長さに限定されない。この用語はまた、別段示されなければ、アミノ酸配列を変化させないポリペプチドの改変（例えば、グリコシリ化形態、アセチル化形態およびリン酸化形態）を含む。本発明の目的に関して、ポリペプチドまたはタンパク質は、合成されてもよいし、組換え精製されてもよく、ならびに天然の供給源から単離されてもよい。

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「ケラチノサイト増殖因子」または「KGF」または、FGFR-2に結合し得、線維芽細胞に対する有意な活性を欠き、上皮細胞に特に特異的な、特にケラチノサイトに対して活性なタンパク質のFGFファミリーの群のメンバーをいう。KGF、そのアナログおよびフラグメント（以下に詳述される）は、合成されてもよいし、組換え生成されてもよい。さらに、KGFは、天然の供給源（例えば、任意の

10

30

40

50

哺乳動物供給源の任意のいくつかの組織（例えば、ヒト組織））から単離されてもよい。

【0040】

「成熟の全長KGF」、「KGFの長い形態」、「FL-KGF」、「ネイティブKGF」または「KGF₁₋₆₃」は、本明細書中で使用される場合、全て図1に示される163アミノ酸残基を含む成熟ポリペプチドをいう。

【0041】

本明細書中で使用される場合、用語「KGFフラグメント」とは、KGF₁₋₆₃の配列全体を含まない、KGF₁₋₆₃に由来するポリペプチドをいう。このようなフラグメントは、全長分子の短縮型バージョン、および内部欠失型バージョンであり得る。KGFフラグメントは、本明細書中の実施例4に記載されるBalb/MK生体活性アッセイにより決定される場合、KGF生体活性を有し得る。Balb/MK細胞株（Weissman, B. E. およびAaronson, S. A. Cell (1983) 32: 599-606）は、クローン性Balb/cマウスケラチノサイト細胞株である。これらの細胞は、それらの増殖が血清を含有する培地中ですら上皮細胞マイトジエンの外因性供給源に依存する。従って、KGFフラグメントおよびアナログの活性は、Balb/MK細胞を用いてED₅₀値を決定することによって測定され、この値は、細胞増殖の半最大刺激を引き起こすKGFフラグメントの濃度によって規定される。さらに、本発明のKGFフラグメントは、上皮細胞増殖を特異的に刺激する。

【0042】

標的細胞特異性を決定するために、DNA合成刺激（添加された試験サンプルの非存在下でチミジンのバックグラウンド取り込みに対する刺激された合成の比として表される）は、同じアッセイ条件下でケラチノサイト以外の細胞において観察される類似の刺激と比較される。KGFフラグメントおよびアナログの活性はまた、内皮細胞（例えば、本明細書中の実施例5に記載される成体ウシ大動脈内皮細胞（ABAE）または副腎皮質由来毛細管内皮細胞（ACE））に対して試験され得る。「上皮細胞増殖を特異的に刺激する」KGFポリペプチドまたはアナログは、飽和濃度にて以下のようである分子であり得る：（i）本明細書中の実施例4に記載のBalb/MKアッセイにおいて、KGFを受容しないウェルにおいて達成される細胞数の少なくとも4倍多いレベルまで、培養の7日間後、1ウェルあたりの最終的な細胞数を刺激し得る；および（ii）本明細書中の実施例5に記載のABAEアッセイまたはACEアッセイにおいて、KGFを受容しないウェルにおいて達成される細胞数より高いレベルまで、培養の7日後、1ウェルあたりの最終的な細胞数を有意に刺激しない。

【0043】

米国特許第5,731,170号（その全体が本明細書中に参考として援用される）は、特定の分子が、線維芽細胞とは対照的に、ケラチノサイトに対する顕著な特異性を有するKGFマイトジエン活性を提示することを報告する。

【0044】

本発明のフラグメントは、例えば、10%以上の活性（例えば、15%、20%、25%、50%、100%以上）から、10倍以上程度の活性までのどこでも、または特定の範囲の間の任意の量にて、KGF₁₋₆₃に対して1分子あたりで増強した活性を示す。従って、本発明のKGFフラグメントは、KGF₁₋₆₃を使用して、必要な量より少ない量にて、組成物中で使用され得る。本発明者らは、KGFより低い分子量の分子が生成され得ることを認識する。以下の実施例に示されるように、これらの種は、1分子あたりで比較される場合（すなわち、活性が分子量に対して調節される場合）、より活性である。特定のKGFフラグメントは、以下に詳細に記載される。

【0045】

用語「アナログ」とは、参照分子の誘導体をいう。このアナログは、上記のように、生物学的活性を維持し得る。概して、用語「アナログ」とは、改变が、活性を破壊しない限り、ネイティブのポリペプチドの配列および構造に対して、1以上のアミノ酸の付加、置換（概して、本質的には保存的）および／または欠失を有する配列および構造を有する化

10

20

30

40

50

物をいう。好ましくは、そのアナログは、親分子と少なくとも同じ生物学的活性を有し、親分子より増強した活性さえ提示し得る。ポリペプチドアナログを作製するための方法は、当該分野で公知であり、以下にさらに記載される。

【0046】

特に好ましいアナログとしては、本質的に保存的な置換（すなわち、それらの側鎖において関連するアミノ酸のファミリー内で生じる置換）を含む。具体的には、アミノ酸は、4つのファミリーに分けられる：（1）酸性 - - アスパラギン酸およびグルタミン酸；（2）塩基性 - - リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性 - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）非荷電極性 - - グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時折、芳香族アミノ酸として分類される。例えば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンに、アスパラギン酸をグルタミン酸に、スレオニンをセリンに単独で置換すること、または同様にあるアミノ酸を構造的に関連するアミノ酸に保存的置換することは、生物学的活性に対して大きな影響がないことが合理的に推定可能である。例えば、目的のポリペプチドは、その分子の所望の機能がインタクトなままである限り、ほぼ1～70までの保存的または非保存的なアミノ酸置換（例えば、1、2、3、4、5～50、15～25、5～10、または1～70の間の任意の整数）を含み得る。当業者は、本明細書中に規定される生物学的活性を保持するという合理的な見込みの下に、改变され得る目的の分子の領域を容易に決定し得る。

10

20

30

40

【0047】

例えば、シグナル伝達に関与する重要な決定因子は、KGFの最初の30個のN末端アミノ酸内に位置しないようである（Plotnikovら, Cell (2000) 101: 413-424）。さらに、KGFのNH₂末端ドメインは、その細胞特異性に関与しないようである。アミノ酸残基91～110（図1に示されるアミノ酸配列に対して番号付けされる）は、KGFにレセプター結合特異性を付与するようである（Reich-Slotskyら, J. Biol. Chem. (1995) 270: 29813-29818）。従って、少なくともアミノ酸91～110にまたがる領域を保持するアナログおよびフラグメントが好ましい。さらに、アミノ酸置換が、この領域において行われる場合、これらの置換は、本質的に保存的であるべきである。N末端配列の一部を保持するフラグメント（例えば、例えば、アミノ酸35（図1に対して番号付けられる）までは及ばない欠失を有するフラグメント）は、アミノ酸の付加、欠失および置換に対してより寛容性である。好ましい欠失としては、以下にさらに記載されるように、最初の22アミノ酸、23アミノ酸および24アミノ酸の欠失が挙げられる。当業者は、KGFの公知の構造（例えば、Osslundら, Protein Sci. (1998) 7: 1681-1690を参照のこと）、およびKGFと関連する分子（例えば、酸性FGF、塩基性FGFおよびカポジFGF（例えば、Gospodarowiczら, J. Cell. Physiol. (1990) 142: 325-333を参照のこと）との間の公知の構造/機能の関係に基づいて、変化を寛容する他の領域を容易に決定し得る。

50

【0048】

「精製される（た）」または「単離される（た）」によって、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう場合、示される分子が、同じ型の他の生物学的高分子が実質的でない状態で存在することを意味する。用語「精製（される）」は、本明細書中で使用される場合、同じ型の生物学的高分子が、好ましくは、少なくとも75重量%、より好ましくは、少なくとも85重量%、よりなお好ましくは、少なくとも95重量%、および最もより好ましくは、少なくとも98重量%、サンプル中に存在することを意味する。「特定のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド」とは、対象ポリペプチドをコードしない他の核酸分子が実質的でない核酸分子をいう；しかし、その分子は、組成物の基本的特徴に有害な影響を及ぼさないいくつかのさらなる塩基または部分を含み得る。

【0049】

50

「組換えポリペプチド」によって、本明細書中に記載の組換えDNA技術によって調製されたポリペプチドを意図する。以下にさらに記載されるように、一般に、所望のポリペプチドをコードする遺伝子がクローニングされ、次いで、形質転換生物において発現される。宿主生物は、発現条件下で外来遺伝子を発現して、ポリペプチドを生成する。あるいは、内因性ポリペプチドの発現を制御するプロモーターが、組換えポリペプチドを与えるように改変され得る。概してより少ない開始物質からより高収量を可能にし、はるかに純粋な生成物を与える組換え生成物としてポリペプチドを組換え生成することは、特に有利である。従って、本発明のポリペプチドは、細胞中に通常存在する他の分子なしで生成され得る。例えば、微量のヒトタンパク質夾雜物も含まないヒトポリペプチド組成物は、組換え非ヒト宿主細胞により生成されるヒトタンパク質のみが、組換えヒトポリペプチドであるので、容易に得られ得る。天然の供給源に由来する潜在的ウイルス因子およびヒトに対して病原性のウイルス成分もまた回避される。

10

20

【0050】

用語「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」は、本明細書中で使用される場合、任意の長さのヌクレオチド（リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれか）のポリマー形態をいう。この用語は、分子の一次構造をいうに過ぎず、従って、二本鎖および一本鎖のDNAおよびRNAを含む。これらは、改変の既知の型（例えば、当該分野で公知の標識、メチル化、「キャップ」、1以上の天然に存在するヌクレオチドのアナログでの置換、ヌクレオチド内の改変（例えば、非荷電性連結（例えば、リン酸メチル、ホスホトリエヌチド、ホスホルアミダイト、カルバメートなど）および荷電性連結（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなどでの改変）、ペンドント部分を含む改変（例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなどを含む））、インタークレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）での改変、キレート剤を含む置換（例えば、金属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属など）、アルキル化剤（alkylator）を含む改変、改変された連結での改変（例えば、アノマー性核酸など））、ならびに非改変形態のポリヌクレオチドを含み得る。

30

30

【0051】

用語「組換えDNA分子」または「組換えポリヌクレオチド」は、その起源または操作によって、以下の通りであるゲノム起源、cDNA起源、半合成起源または合成起源のポリヌクレオチドをいうために本明細書中で使用される：（1）天然に関連するポリヌクレオチドの全てまたは一部と関連しない、（2）天然に連結しているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに連結される、または（3）天然に存在しない。従って、この用語は、「合成由来の」核酸分子を包含する。

40

【0052】

「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合に、通常は、mRNAを介してポリペプチドへと翻訳される核酸分子である。コード配列の境界は、5'末端の翻訳開始コドンおよび3'末端の翻訳終止コドンによって決定され得る。コード配列は、cDNA、および組換えヌクレオチド配列を含み得るが、これらに限定されない。

40

【0053】

「制御配列」とは、コード配列の発現に影響を及ぼすことが必要な、コード配列に連結される核酸配列をいう。このような制御配列の性質は、宿主生物に依存して異なる；原核生物においては、このような制御配列としては、概して、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列が挙げられ；真核生物においては、概して、このような制御配列としては、プロモーターおよび転写終結配列が挙げられる。用語「制御配列」は、少なくとも、コード配列の発現に必要な全ての成分を含むことが意図され、さらなる成分（例えば、リーダー配列および融合パートナー配列）もまた含み得る。

50

【0054】

制御エレメント（例えば、プロモーター）は、RNAポリメラーゼがプロモーターに結合し、コード配列をmRNAに転写する場合に、細胞においてコード配列の「転写を方向付け」、続いて、mRNAが、コード配列によりコードされるポリペプチドに翻訳される。

50

【0055】

「作動可能に連結される」とは、そのように記載される成分が、それらが意図される様式にて機能することが可能になる関係にある位置をいう。コード配列に「作動可能に連結される」制御配列は、制御配列と適合する条件下で、コード配列の発現が達成されるように連結される。制御エレメントは、コード配列の発現を方向付けるように機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、翻訳されていないが、なお転写される配列の介在は、プロモーターとコード配列との間に存在し得、そのプロモーターは、なお、コード配列に「作動可能に連結される」と考えられ得る。

【0056】

本明細書中で使用される限り、用語「発現力セット」とは、適切な宿主細胞においてコード配列のクローンされたコピーの転写およびmRNAの翻訳を必要とする全てのヌクレオチド配列を含む、制御配列に作動可能に連結された少なくとも1つのコード配列を含む分子をいう。このような発現力セットは、細菌、藍藻類、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞および動物細胞のような種々の宿主において真核生物遺伝子を発現するために使用され得る。本発明のもとで、発現力セットは、クローニングベクター、特に、設計されたプラスミド、ウイルスまたはウイルス粒子が挙げられ得るが、これらに限定されない。カセットは、宿主細胞における自立的複製のために複製起点、選択マーカー、種々の制限部位、高コピー数および強いプロモーターのための能力をさらに含み得る。

10

【0057】

「ベクター」によって、適切な制御エレメントと関連する場合に複製可能であり、細胞間で遺伝子配列を移入し得る任意の遺伝エレメント（例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルスなど）を意味する。従って、この用語は、クローニングビヒクルおよび発現ビヒクル、ならびにウイルスベクターを包含する。

20

【0058】

細胞は、外来ポリヌクレオチドが細胞膜内部に導入されている場合、このポリヌクレオチドにより形質転換されている。この発現ポリヌクレオチドは、細胞のゲノムを構成する染色体DNA中に組み込まれ（共有結合され）いても、されていなくてもよい。原核生物および酵母において、例えば、外来DNAは、エピソームエレメント（例えば、プラスミド）上で維持され得る。真核生物細胞に関して、安定に形質転換された細胞は、染色体複製を通じて娘細胞により遺伝されるように、外来DNAが、染色体に組み込まれている細胞である。この安定性は、真核生物細胞が、外来DNAを含む娘細胞の集団から構成される細胞株またはクローンを樹立する能力によって実証される。

30

【0059】

宿主細胞は、外来核酸分子によって、形質転換された細胞であるか、または形質転換し得る細胞である。

【0060】

「相同性」とは、2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチドの部分の間の類似性%をいう。2つのDNAまたは2つのポリペプチドの配列は、それらの配列が、分子の規定された長さにわたり、少なくとも約50%、好ましくは、少なくとも約70%～75%、より好ましくは少なくとも約80%～85%、好ましくは、少なくとも約90%、最もより好ましくは、少なくとも約95%～98%の配列相同性を示すか、またはこれらの特定の範囲の間の任意の相同性%を示す場合、互いに「実質的に相同」である。本明細書中で使用される場合、実質的に相同とはまた、特定のDNAまたはポリペプチドの配列に対して完全な同一性を示す配列をいう。

40

【0061】

一般に、「同一性」とは、2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列のそれぞれ正確なヌクレオチド-ヌクレオチド対応またはアミノ酸-アミノ酸対応をいう。同一性%は、配列を整列し、2つの整列した配列の間のマッチの正確な数を計数し、より短い方の配列の長さで除し、その結果に100をかけることによって、2つの分子の間の配列情報の直接比較によって決定され得る。

50

【0062】

好みしくは、天然に存在するタンパク質改変体または天然に存在しないタンパク質改変体は、図1の特定のKGFフラグメントに対して、少なくとも70%、80%、85%、90%または95%以上相同なアミノ酸配列を有する。より好みしくは、それらの分子は、98%または99%相同である。相同性%は、ギャップオープンペナルティー12およびギャップ伸長ペナルティー2でのアフィンギャップ検索、BLOSUMマトリクス62を用いて、Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムを使用して決定される。このSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムは、SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)において教示される。

10

【0063】

あるいは、相同性は、相同的な領域の間で安定な二重鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続いて、一本鎖特異的ヌクレアーゼでの消化、および消化したフラグメントのサイズ決定により決定され得る。実質的に相同的なDNA配列は、例えば、その特定の系について規定されるストリンジエントな条件下でのサザンハイブリダイゼーション実験において同定され得る。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは、当該分野の技術範囲内である。例えば、Sambrookら, 前出; DNA Cloning, 前出; Nucleic Acid Hybridization, 前出を参照のこと。

20

【0064】

用語「有効量」または「薬学的有効量」とは、非毒性であるが、所望の生物学的結果を提供する薬剤の十分量をいう。その結果は、疾患の徴候、症状または原因の低減および/または緩和、あるいは生物学的系の任意の他の所望の変化であり得る。例えば、本発明の方法とともに使用するためのKGFフラグメントの有効量は、上皮細胞の刺激または増殖に十分な量であり、好みしくは、上皮細胞増殖が所望される創傷および/または熱傷、ならびに他の障害の増大した治癒を引き起こすに十分な量である。このような量は、以下に記載される。任意の個々の症例における適切な「有効」量は、慣用的な実験を用いて、当業者によって決定され得る。

30

【0065】

「薬学的に受容可能な」または「薬理学的に受容可能な」によって、生物学的でないのでもなく、さもなければ所望されないのでない材料を意味する(すなわち、この材料は、いずれの所望されない生物学的効果も、含まれる組成物の成分のいずれとも有害な様式で相互作用することもなく、個体に投与され得る)。

【0066】

「生理学的pH」または「生理学的範囲のpH」により、約7.0~8.0までの範囲のpHを意味する。好みしい生理学的pHは、約7.2~7.6の範囲である。

【0067】

本明細書中で使用される場合、用語「被験体」とは、哺乳動物および非哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：哺乳類綱の任意のメンバー：ヒト、非ヒト靈長類(例えば、チンパンジー、ならびに他のサル(ape)およびサル(monkey)種)；家畜(例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ；ウサギ、イヌ、およびネコのようなペット(domestic animal)；実験動物(例えば、ラット、マウスおよびモルモットが挙げられる)齧歯類など。非哺乳動物の例としては、鳥類、魚類などが挙げられるが、これらに限定されない。この用語は、特定の年齢も性別も示さない。

40

【0068】

(I) 発明を実施する態様)

本発明を詳細に記載する前に、本発明が、特定の処方にもプロセスパラメーターにも限定されず、よって当然のことながら、変動し得ることが理解されるべきである。本明細書中で使用される用語が、本発明の特定の実施形態のみを記載する目的であり、制限すること

50

を意味しないこともまた理解されるべきである。

【0069】

本明細書中に記載される組成物および方法に類似したまたは等価な多くの組成物および方法が、本発明の実施において使用され得るが、好ましい材料および方法が、本明細書中に記載される。

【0070】

本発明は、特定の KGF ポリペプチドフラグメントおよびこれらのフラグメントのアナログ（これは、全長配列の一部のみを保持する）は、全長配列に対して増強した生物学的活性を示すという発見に基づく。従って、全長分子とともに必要な量より少量のポリペプチドが、組成物中で使用され得る。特定の例においては、本明細書中に記載される分子を含む組成物が投与される場合、非特異的な副作用の発生がより少ない。

【0071】

本発明は特に、本明細書中で具体的に示される Ba1b / MK 生体活性アッセイによって決定される KGF₁₋₆₃ に対して生体活性における増加を示し、上皮細胞増殖を特異的に刺激する KGF フラグメントを含む組成物に関する。特に、KGF フラグメントおよびアナログの活性は、Ba1b / MK 細胞を使用して、ED₅₀ 値を決定することによって測定され、この値は、細胞増殖の半分最大刺激を引き起こす KGF フラグメントの濃度によって規定される。細胞は、以下の実施例に記載されるように、7 日間培養される。本明細書中に記載の KGF フラグメントの生体活性は、好ましくは、全長 KGF タンパク質の生体活性より、細胞増殖アッセイにおいて比較される場合、少なくとも約 1.2 ~ 1.5 倍、好ましくは、約 2 倍、より好ましくは、約 2 ~ 10 倍以上高く、本明細書中で記載され、PCT 特許出願番号 WO 90/08771 で記載されるように、化学的に規定される培地内で維持される Ba1b / MK 細胞における DNA 合成の刺激を用いて決定される場合、全長 KGF より 10 ~ 100 倍程度以上高くてよい。増強された活性レベルに起因して、本発明のポリペプチドは、同じ生物学的結果を達成するために対応する組成物中に必要な KGF₁₋₆₃ の量（すなわち、分子量について調節される）の 1 分子ベースで、90 % 以下、例えば、5 % ~ 90 %、または 10 % ~ 50 %、またはその間の任意の数値の使用を可能にする。

【0072】

本明細書中で使用するための特定のポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

KGF_{des1-15}（図 1 のアミノ酸残基 16 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなる）；KGF_{des1-15} のアナログ（図 1 のアミノ酸残基 16 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなり、さらなる N 末端メチオニンを有する）；

KGF_{des1-18}（図 1 のアミノ酸残基 19 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなる）；KGF_{des1-18} のアナログ（図 1 のアミノ酸残基 19 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなり、さらなる N 末端メチオニンを有する）；

KGF_{des1-19}（図 1 のアミノ酸残基 20 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなる）；KGF_{des1-19} のアナログ（図 1 のアミノ酸残基 20 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなり、さらなる N 末端メチオニンを有する）；

KGF_{des1-20}（図 1 のアミノ酸 21 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなる）；KGF_{des1-20} のアナログ（図 1 のアミノ酸残基 21 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなり、さらなる N 末端メチオニンを有する）；

KGF_{des1-21}（図 1 のアミノ酸残基 22 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなる）；KGF_{des1-21} のアナログ（図 1 のアミノ酸残基 22 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなり、さらなる N 末端メチオニンを有する）；

KGF_{des1-22}（図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなる）；KGF_{des1-22} のアナログ（図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなり、さらなる N 末端メチオニンを有する）；KGF_{des1-22} のアナログ（図 1 のアミノ酸残基 23 ~ 163 に示された連続するアミノ酸配列からなる）；

10

20

20

40

50

配列からなり、アラニン残基で置換されたN末端アルギニン残基を有する) ; KGF_{des 1 - 24} は、図1のアミノ酸残基25～163(両端を含む)にて示される連続アミノ酸配列からなる; そして KGF_{des 1 - 24} のアナログは、さらなるN末端メチオニンを有して、図1のアミノ酸残基25～163(両端を含む)にて示される連続アミノ酸配列からなる; そして

KGF_{des 1 - 25} は、図1のアミノ酸残基26～163(両端を含む)にて示される連続アミノ酸配列からなる; そして KGF_{des 1 - 25} のアナログは、さらなるN末端メチオニンを有して、図1のアミノ酸残基26～163(両端を含む)にて示される連続アミノ酸配列からなる。

【0073】

10

本発明の組成物において使用するために、上記で特定したフラグメントの生物学的に活性なアナログもまた企図され、ここで、この生物学的に活性なアナログは、上記フラグメントと同数のアミノ酸からなり、そしてそのフラグメントに対して、上記で決定されるように、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約85%、好ましくは少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%、そして好ましくは少なくとも約98%の配列相同性を有する。例えば、生物学的に活性なアナログは、148アミノ酸からなり、そして KGF_{des - 15} と少なくとも70%の配列相同性を有する、KGF_{des - 15} のアナログ; 145アミノ酸からなり、そして KGF_{des - 18} と少なくとも70%の配列相同性を有する、KGF_{des - 18} のアナログ; 144アミノ酸からなり、そして KGF_{des - 19} と少なくとも70%の配列相同性を有する、KGF_{des - 19} のアナログ; 143アミノ酸からなり、そして KGF_{des - 20} と少なくとも70%の配列相同性を有する、KGF_{des - 20} のアナログ; 142アミノ酸からなり、そして KGF_{des - 21} と少なくとも70%の配列相同性を有する、KGF_{des - 21} のアナログ; 141アミノ酸からなり、そして KGF_{des - 22} と少なくとも70%の配列相同性を有する、KGF_{des - 22} のアナログ; 139アミノ酸からなり、そして KGF_{des - 24} と少なくとも70%の配列相同性を有する、KGF_{des - 24} のアナログ; および 138アミノ酸からなり、そして KGF_{des - 25} と少なくとも70%の配列相同性を有する、KGF_{des - 25} のアナログ、であり得る。

20

【0074】

30

KGF₁₆₃ に関する本発明の組成物において使用するための KGF ポリペプチドの量は、目的の特定のフラグメントに依存して変動する。一般に、組成物は、1分子ベースで(すなわち、分子量について調節して)、所望の結果を達成するために(例えば、上皮細胞の分裂および/または増殖を促進するために)必要な対応する組成物中の KGF₁₆₃ の量の、約90%以下、またはさらに、75%以下、50%以下、35%以下、25%以下、10%以下を含む。従って、例えば、本明細書中に記載される組成物は、所望の活性を達成するために必要な、対応する組成物中の KGF₁₆₃ の量の、1分子ベースで、5%～90%、または10%～90%、または10～75%、または10%～50%、または10%～25%、または10%～20%を含み得る。これらの範囲の間の特定の割合もまた、本明細書中で企図されることが、理解されるべきである。

40

【0075】

特に、KGF フラグメントが、KGF_{des 1 - 15}、KGF_{des 1 - 18}、KGF_{des 1 - 19}、KGF_{des 1 - 20}、KGF_{des 1 - 21}、KGF_{des 1 - 22}、KGF_{des 1 - 24}、KGF_{des 1 - 25} またはこれらの分子由来のポリペプチドである場合、その量は、75%以下(例えば、10%～75%)であり得る。KGF フラグメントが KGF_{des 1 - 22} もしくは KGF_{des 1 - 24}、またはこれらの分子由来のポリペプチドである場合、使用される量は、50%以下、またはさらに、25%以下もしくは20%以下(例えば、5%～50%)であり得る。KGF_{des 1 - 24} およびこれに由来するポリペプチドについて、例えば、その量は、等価な治療応答を達成するために必要な KGF₁₆₃ の量の、10%以下(例えば、2%～10%)であり得る。適切な

50

量は、以下に詳細に考察される。

【0076】

本発明の好ましい実施形態において、本発明のKGFフラグメントは、特に大規模の商業的產生の場合に、組換え技術によって產生される。本発明のポリペプチドをコードする組換えDNA分子および発現ベクターが作製され得、そして遺伝子が、以下でより詳細に考察されるような、当該分野で周知の方法を使用する、従来の遺伝子発現技術によって発現され得る。特定のKGFフラグメントのアナログはまた、例えば、部位特異的変異誘発によって、組換え的に作製され得る。従って、本発明の実施形態に対する全ての言及は、特定のKGFフラグメントに関する場合、フラグメントのアナログに等価に適用される。

【0077】

本発明の1実施形態において、KGFフラグメントは、例えば、米国特許第5,731,170号に記載される技術を使用して、KGFを產生する細胞（例えば、M426ヒト胚性纖維芽細胞（Aaronson, S. A. および Todaro, G. J. *Virology* (1968) 36: 254-261））から、ネイティブな成熟KGFを単離することによって、作製され得る。次いで、N末端アミノ酸残基は、回収された分子から欠失され得る。このような欠失は、当該分野で公知の任意の従来技術によって実施され得る。

【0078】

あるいは、本発明の組成物中で使用するためのポリペプチドは、ペプチド分野の当業者に公知のいくつかの技術のいずれかによって、化学的に合成され得る。例えば、固相ペプチド合成技術については、J. M. StewartおよびJ. D. Young, *Solid 20*

Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984) ならびに G. Barany および R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross および J. Meienhofer, 編, Vol. 2, (Academic Press, New York, 1980), pp. 3-254; そして古典的な溶液合成については、M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (Springer-Verlag, Berlin 1984) ならびに E. Gross および J. Meienhofer, 編, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1 を参照のこと。本発明のポリペプチドはまた、同時複数ペプチド合成の方法によって、化学的に調製され得る。例えば、Houghten *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 5131-5135; 米国特許第4,631,30

, 211を参照のこと。

【0079】

代替的実施形態において、KGFフラグメントは、ネイティブのKGF₁₋₆₃のコード配列を単離し、欠失されるべきアミノ酸残基をコードするコドンを欠失させ、発現ベクター中に改変されたコード配列を挿入し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換して組換えKGFフラグメントおよびアナログを產生し、そして従来の精製技術を使用して組換えKGFフラグメントを単離することによって、作製され得る。

【0080】

本発明のさらなる実施形態において、KGFフラグメントのコード配列は、従来技術（このようなコード配列を含むことが既知のcDNAライブラリーからのKGF₁₋₆₃のコード配列の単離、および欠失されるべきアミノ酸残基の部分をコードする配列をこのコード配列から欠失させることを含む）によって、獲得され得る。N末端アミノ酸のコード配列の欠失は、インビオまたはインビトロで達成され得る。前者は、例えば、適切な発現系でのKGF₁₋₆₃コード配列の発現によって、達成され得る。後者は、N末端配列を排除するプライマーを使用する公知のPCR技術によって達成され得る。

【0081】

好ましくは、本発明の組成物中で使用するためのポリペプチドは、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現によって、組換え的に產生される。KGFフラグメント 40

10

20

30

40

50

の組換え產生のための方法は、周知である。例えば、米国特許第5,677,278号、同第5,773,586号、同第5,843,883号、同第5,863,767号および同第6,074,848号(全てGospodarowiczらに対する)；国際公開番号WO96/11951およびWO96/11949；ならびにOsslundら、Protein Sci. (1998) 7: 1681-1690を参照のこと。

【0082】

特に、本発明で使用するための分子は、分子生物学の標準的技術を使用して作製され得る。例えば、上記分子をコードするポリヌクレオチド配列は、組換え方法を使用して(例えば、その遺伝子を発現する細胞由来のcDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーをスクリーニングすることによってか、またはこのポリヌクレオチド配列を含むことが既知のベクターから遺伝子を誘導することによって)獲得され得る。さらに、所望の遺伝子は、標準技術(例えば、cDNAまたはゲノムDNAの、フェノール抽出およびPCR)を使用して、この遺伝子を含む細胞または組織から直接的に単離され得る。例えば、DNAを獲得および単離するために使用される技術の説明については、Sambrookら、前出を参照のこと。目的の遺伝子はまた、クローニングされるのではなく、合成的に產生され得る。これらの分子は、特定の配列についての適切なコドンを用いて設計され得る。次いで、完全配列は、標準的方法によって調製される重複するオリゴヌクレオチドから構築され、そして完全なコード配列へと構築される。例えば、Edge (1981) Nature 292: 756; Nambairら (1984) Science 223: 1299; およびJayら (1984) J. Biol. Chem. 259: 6311を参考のこと。

【0083】

従って、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を有するベクターから得られ得るか、もしくは完全に合成され得るか、または一部、必要に応じて、当該分野で公知の種々のオリゴヌクレオチド合成技術(例えば、部位特異的変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術)を使用して、獲得され得る。例えば、Sambrookら、前出を参考のこと。特に、所望の配列をコードするヌクレオチド配列を得る1つの方法は、従来の自動化ポリヌクレオチド合成機で產生された重複する合成オリゴヌクレオチドの相補的セットをアニーリングし、次いで適切なDNAリガーゼを用いて連結し、そして連結されたヌクレオチド配列をPCRによって増幅することによる。例えば、Jayaramanら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4084-4088を参考のこと。さらに、オリゴヌクレオチド指向性の合成(Jonesら (1986) Nature 54: 75-82)、オリゴヌクレオチド指向性の、既存のヌクレオチド領域の変異誘発(Riechmannら (1988) Nature 332: 323-327およびVerhoevenら (1988) Science 239: 1534-1536)、ならびにT₄ DNAポリメラーゼを使用する、ギャップの入ったオリゴヌクレオチドの酵素的フィルイン(filling-in)(Queenら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033)が、本発明の下で使用されて、変更もしくは増強されたレセプター結合能力、および/または低減した免疫原性を有する分子を提供し得る。

【0084】

一旦コード配列が調製または単離されると、このような配列は、任意の適切なベクターまたはレプリコン中にクローニングされ得る。多数のクローニングベクターが当業者に公知であり、そして適切なクローニングベクターの選択は、選択事項である。適切なベクターとしては、適切な制御エレメントと結合されると複製し得る、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体またはウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0085】

次いで、コード配列は、発現のために使用される系に依存して、適切な制御エレメントの制御下に置かれる。従って、コード配列は、プロモーター、リボソーム結合部位(細菌発

10

20

30

40

50

現のため) および必要に応じてオペレーターの制御下に置かれ得、その結果、目的のDNA配列が、適切な形質転換体によって、RNAへと転写される。このコード配列は、シグナルペプチドをコードする配列、または翻訳後のプロセシングにおいて宿主によって後に除去され得るリーダー配列を、含んでも含まなくてもよい。例えば、米国特許第4,431,739号; 同第4,425,437号; 同第4,338,397号を参照のこと。シグナル配列が存在する場合、これは、ネイティブの配列であり得るか、または異種シグナル配列であり得るかのいずれかである。

【0086】

制御配列に加えて、宿主細胞の増殖に関して配列の発現の調節を可能にする調節配列を付加することが所望され得る。調節配列は当業者に公知であり、そして例としては、化学的刺激もしくは物理的刺激(調節化合物の存在を含む)に応答して遺伝子の発現をオンまたはオフにするものが挙げられる。他の型の調節エレメントもまた、ベクター中に存在し得る。例えば、エンハンサー/エレメントは、構築物の発現レベルを増大させるために、本明細書中で使用され得る。例としては、SV40初期遺伝子エンハンサー(Dijkemala (1985)EMBO J. 4:761)、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復(LTR)のエンハンサー/プロモーター(Gormanら(1982)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777)およびヒトCMV由来のエレメント(Bosshartら(1985)Cell 41:521)(例えば、CMVイントロンA配列中に含まれるエレメント(米国特許第5,688,688号))が挙げられる。発現カセットは、適切な宿主細胞中での自律的複製のための複製起点、1つ以上の選択マーカー、1つ以上の制限部位、高コピー数についての能力、および強力なプロモーターをさらに含み得る。

【0087】

特定のコード配列が適切な調節配列を伴って、コード配列が制御配列の「制御」下で転写される(すなわち、この制御配列においてDNA分子に結合するRNAポリメラーゼが、コード配列を転写する)ような、制御配列に対するコード配列の位置および方向でベクター中に配置されるように、発現ベクターが構築される。目的の分子をコードする配列の改変は、この目的を達成するために所望され得る。例えば、いくつかの場合、配列が適切な配向で(すなわち、リーディングフレームを維持するように)制御配列に結合され得るよう配列を改変する必要があり得る。この制御配列および他の調節配列は、ベクターへの挿入の前に、コード配列と連結され得る。あるいは、このコード配列は、制御配列および適切な制限部位をすでに含む発現ベクター中に、直接クローニングされ得る。

【0088】

上記のように、参照KGFフラグメントの変異体またはアナログを生成することも所望であり得る。変異体またはアナログは、KGFフラグメントをコードする配列の一部の欠失、配列の挿入、および/またはこの配列内の1つ以上のヌクレオチドの置換によって、調製され得る。ヌクレオチド配列を改変するための技術(例えば、部位特異的変異誘発など)は、当業者に周知である。例えば、Sambrookら、前出; Kunkele, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoederら(1987) Biotechniques 5:786; ZollerおよびSmith(1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-McFarlandら(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409を参照のこと。

【0089】

分子は、広範な種々の系(昆虫、哺乳動物、細菌、ウイルスおよび酵母の発現系(全て当該分野で周知である))において発現され得る。例えば、昆虫細胞発現系(例えば、バキュロウイルス系)は、当業者に公知であり、そして例えば、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)に記載される。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系についての材料および方法は、とりわけ、Invitrogen, San

10

20

30

40

50

Diego CA (「MaxBac」キット) から、キットにて市販される。同様に、細菌細胞発現系および哺乳動物細胞発現系は、当該分野で周知であり、そして例えば、Sambrookら、前出に記載される。酵母発現系もまた、当該分野で公知であり、そして例えば、Yeast Genetic Engineering (Barrら、編、1989) Butterworths, Londonに記載される。

【0090】

上記系での使用に適切な多数の宿主細胞もまた、公知である。例えば、哺乳動物細胞株が当該分野で公知であり、そしてAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な不死化細胞株（例えば、以下が挙げられるが、これらに限定されない：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベイビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト胚性腎臓細胞、ヒト肝細胞癌腫細胞（例えば、Hep G2）、Madin-Darbyウシ腎臓（「MDBK」）細胞など）が挙げられる。同様に、細菌宿主（例えば、*E. coli*、*Bacillus subtilis* および *Streptococcus spp.*）は、本発明の発現構築物での用途を見出す。本発明において有用な酵母宿主は、とりわけ、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Candida maltosa*、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia guillerimondii*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe* および *Yarrowia lipolytica* が挙げられる。バキュロウイルス発現ベクターと共に使用するための昆虫細胞としては、とりわけ、*Aedes aegypti*、*Autographa californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda* および *Trichoplusia ni* が挙げられる。

【0091】

短縮型 KGF ポリペプチドおよびそのアナログの酵母における細胞内発現が、特に所望される。このような系は、細菌（例えば、*E. coli*）からの精製によって生じ得る問題（多量のDNA、内毒素およびタンパク質混入物の存在を含む）を回避する。さらに、天然に存在する酵母の酵素は、分子が組換え的に產生される場合に存在し得るN末端メチオニンを効率的に切断し、そして酵母系が使用される場合にこの酵素を過剰発現する必要がない。さらに、KGF は、天然に分泌されるタンパク質であるが、ネイティブおよび短縮型のKGF およびそのアナログは、分泌されずに、酵母内で產生され、これらは、可溶性であり、適切に折り畳まれ、そして活性である。

【0092】

目的のヌクレオチド配列を含む核酸分子は、宿主ゲノム中に安定に組み込まれ得るか、または当該分野で周知の種々の遺伝子送達技術を使用して、適切な宿主細胞中の安定なエピソームエレメント上で維持され得る。例えば、米国特許第5,399,346号を参照のこと。

【0093】

選択される発現系および宿主に依存して、分子は、タンパク質が発現される条件下で、上記の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を増殖することによって生成される。次いで、発現されたタンパク質は、宿主細胞から単離され、そして精製される。発現系が、タンパク質を増殖培地中に分泌する場合、生成物は、培地から直接精製され得る。生成物が分泌されない場合、生成物は細胞溶解物から単離され得る。適切な増殖条件および回収方法の選択は、当該分野の技術範囲内である。

【0094】

次いで、KGF フラグメントは、被験体への送達のために、以下にさらに記載される薬学的組成物へと処方される。あるいは、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、被験体に直接送達され得、そしてインビボで発現され得る。多数のウイルスに基づく

系が、哺乳動物細胞中への直接的遺伝子移入のために開発されている。これに関して、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための便利な土台を提供する。所望のポリペプチドをコードする、選択されたヌクレオチド配列は、当該分野で公知の技術を使用して、ベクター中に挿入され得、そしてレトロウイルス粒子中にパッケージングされ得る。次いで、組換えウイルスが単離され、そして被験体に送達され得る。多数の適切なレトロウイルス系が記載されている（米国特許第5,219,740号；MillerおよびRosman、Biotechniques（1989）7:980~990；Miller、A.D.、Human Gene Therapy（1990）1:5~14；Scarpaら、Virology（1991）180:849~852；Burnsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1993）90:8033~8037；ならびにBoris-LawrieおよびTemin、Cur. Opin. Genet. Develop.（1993）3:102~109）。

【0095】

多数の適切なアデノウイルスベクターもまた、記載されている。宿主ゲノム中に組み込まれるレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、染色体外のままで存在し、それによって挿入性突然変異に関連する危険が最小になる（Haj-AhmadおよびGraham、J. Virol.（1986）57:267~274；Bettら、J. Virol.（1993）67:5911~5921；Mitterederら、Human Gene Therapy（1994）5:717~729；Sethら、J. Virol.（1994）68:933~940；Barrら、Gene Therapy（1994）1:51~58；Berkner、K.L.、Biotechniques（1988）6:616~629；およびRichら、Human Gene Therapy（1993）4:461~476）。近年、種々のアデノ隨伴ウイルス（AAV）ベクター系が、遺伝子送達のために開発されている。このような系は、転写の誘導を可能にする制御配列（例えば、プロモーターおよびポリアデニル化部位、ならびに選択マーカーまたはレポーター遺伝子、エンハンサー配列および他の制御エレメント）を含み得る。AAVベクターは、当該分野で周知の技術を使用して、容易に構築され得る。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号；国際公開番号WO92/01070（1992年1月23日公開）および同WO93/03769（1993年3月4日公開）；Lebkowskiら、Molec. Cell. Biol.（1988）8:3988~3996；Vincentら、Vaccines 90（1990）（Cold Spring Harbor Laboratory Press）；Carter、B.J.、Current Opinion in Biotechnology（1992）3:533~539；Muzyczka、N.、Current Topics in Microbiol. and Immunol.（1992）158:97~129；Kotin、R.M.、Human Gene Therapy（1994）5:793~801；ShellingおよびSmith、Gene Therapy（1994）1:165~169；ならびにZhouら、J. Exp. Med.（1994）179:1867~1875を参照のこと。

【0096】

本発明の分子をコードする核酸分子を遺伝子移入により送達するための用途を見出すさらなるウイルスベクターとしては、ポックスファミリーのウイルス（例えば、ワクシニアウイルスおよび鳥類ポックスウイルス（avian poxvirus）を含む）由来のベクターが、挙げられる。例えば、国際公開番号WO91/12882；WO89/03429；およびWO92/03545を参照のこと。

【0097】

分子結合体化ベクター（例えば、Michaelら、J. Biol. Chem.（1993）268:6866~6869およびWagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1992）89:6099~6103に記載される、アデノウイルスキメラベクター）もまた、本発明の下で遺伝子送達のために使用され得る。

10

20

30

40

50

【0098】

アルファウイルス属のメンバー（例えば、これらに限定はされないが、シンドビスウイルス由来のベクターおよびセムリキ森林ウイルス由来のベクター）もまた、目的の遺伝子を送達するためのウイルスベクターとしての用途を見出す。本発明の方法の実施に有用なシンドビスウイルス（S inbus - virus）由来ベクターの記載に関しては、D ub e n s k y ら、J . V i r o l . (1 9 9 6) 7 0 : 5 0 8 ~ 5 1 9 ; および国際公開番号W O 9 5 / 0 7 9 9 5 およびW O 9 6 / 1 7 0 7 2 を参照のこと。

【0099】

目的の遺伝子はまた、ウイルスベクターを用いないで送達され得る。例えば、この遺伝子は、被験体またはその被験体に由来する細胞に送達する前に、付随する抗原を含んでかまたは含まずに、リポソーム中にパッケージングされ得る。脂質カプセル化は、一般に、核酸を安定に結合または捕捉しそして保持し得る、リポソームを使用して達成される。核酸の送達のためのキャリアとしてのリポソームの使用の概説に関しては、H u g およびS le i g h t 、B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a . (1 9 9 1) 1 0 9 7 : 1 ~ 1 7 ; S t r a u b i n g e r ら、M e t h o d s o f E n z y m o l o g y (1 9 8 3) 、第101巻、512~527頁を参照のこと。

10

【0100】

本発明のK G F フラグメントは、レセプター認識部位の同定のため、ならびにペプチドアゴニストまたはアンタゴニストの設計のために、使用され得る。さらに、ケラチノサイトに対するK G F の独自の特異性、血管内皮細胞または纖維芽細胞の増殖を誘導する能力がないこと、およびその細胞傷害性の欠如の観点から、短縮型分子およびそのアナログは、創傷治癒適用のために、特に、皮膚の再上皮形成を促進することが望まれる場合に、選択される好ましい薬剤である。短縮型K G F 分子は、角膜上皮治癒において特に有用である。分子の他の使用としては、胃腸管において見出される上皮細胞に対する特異性を利用する適用が挙げられる。

20

【0101】

本発明のフラグメントは、その意図された使用に適切な他の分子に結合体化され得る。例えば、K G F ポリペプチドは、その標的細胞（すなわち、上皮細胞、特にケラチノサイト）の破壊のために、毒性分子（例えば、リシンA、ジフテリア毒素、またはサポニン（s a p o r i n ）と結合体化され得る。本明細書中での使用に適切なこのようなK G F 毒素結合体は、当該分野で公知の方法（例えば、米国特許第4,771,128号、同第4,808,705号および同第4,894,443号、ならびに国際公開番号W O 9 2 / 0 4 9 1 8 ）によって生成され得る。

30

【0102】

本発明の組成物は、1種以上の薬学的に受容可能な賦形剤またはビヒクル、ならびに必要に応じて他の治療成分および/または予防的成分と共に、上記の分子を含む。このような賦形剤としては、水、生理食塩水、グリセロール、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、エタノールなどのような液体が挙げられる。非液体处方物のために適切な賦形剤もまた、当業者に公知である。薬学的に受容可能な塩が、本発明の組成物中で使用され得、そしてこれには、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などのような無機酸の塩類；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などのような有機酸の塩類が挙げられる。薬学的に受容可能な賦形剤および塩の徹底的な議論は、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s 、第18版（E a s t o n , P e n n s y l v a n i a : M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , 1 9 9 0 ）において利用可能である。

40

【0103】

さらに、補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、生物学的緩衝化物質、界面活性剤など）は、このようなビヒクル中に存在し得る。生物学的緩衝液は、薬理学的に受容可能であり、そして所望のp H（すなわち、生物学的に受容可能な範囲のp H）を有する处方物を提供する、実質的に任意の溶液であり得る。緩衝化溶液の例としては、生理食塩水、リン

50

酸緩衝化生理食塩水、Tri's 緩衝化生理食塩水、Hank's 緩衝化生理食塩水などが挙げられる。

【0104】

特に好ましい組成物は、局所的に適用される組成物である（例えば、軟膏、ペースト、粉剤、包帯、クリームおよび絆創膏）。このような局所的組成物としてはまた、局所麻酔（例えば、ベンゾカイン、リドカイン、ジブカイン、塩酸ジクロニン、塩酸プラモキシン、塩酸プロパラカイン、テトラカイン、塩酸ベノキシネート（benoxinate hydrochloride）、ピクリン酸アミノ安息香酸ブチル、チョウジ油およびオイゲノール、ならびに上記の組み合わせおよび誘導体が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられ得る。眼への直接送達のための眼科組成物はまた、本発明のKGフラグメントを用いて特に使用されるものである。例えば、種々の局所的組成物および眼科組成物の考察については、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版（Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990）を参照のこと。10

【0105】

上記のように、一旦処方されると、本発明の組成物は、一般に、局所的または眼に、投与される。しかし、他の投与様式としては、非経口投与（例えば、静脈内、動脈内、関節内（例えば、膝への）、皮下、皮内、筋内、経皮、鼻腔内、粘膜、およびエアロゾル投与による）が挙げられる。例えば、この組成物は、吸入（例えば、鼻または口のスプレーまたはエアロゾル）によって投与され得る。この組成物はまた、インサイチュ（例えば、移植によって）送達され得る。20

【0106】

組成物の薬学的有効量または治療的有効量が、被験体に送達される。正確な有効量は、被験体によって異なり、そして種、年齢、被験体の大きさおよび健康状態、処置される状態の性質および程度、処置を行う医師の推奨、ならびに投与のために選択された治療剤または治療剤の組み合わせに依存する。従って、所定の状況についての有効量は、慣用的な実験によって決定され得る。本発明の目的のために、局所的に投与される場合、治療剤の量は、一般的に、約0.1μg/創傷cm²～約500μg/創傷cm²、好ましくは約1μg/創傷cm²～約100μg/創傷cm²、より好ましくは約1～10μg/創傷cm²～約50μg/創傷cm²、またはこれら値の間の任意の整数（例えば、21、22、23、24・・・30、31、32、33、34・・・40、41、43・・・50・・・60・・・など）の範囲である。非経口投与について、代表的な用量は、1以上の用量中に、約0.01μg/kg体重/日～約100μg/kg/日、より好ましくは約0.1μg/kg/日～約80μg/kg/日、より好ましくは1μg/kg/日～約40μg/kg/日の範囲である。代表的に、ポリヌクレオチドが送達される場合、用量は、少なくとも1桁低い規模である。被験体は、問題の障害の兆候、症状または原因を低減および/または緩和するか、あるいは生物学的系の任意の他の所望の変更をもたらすのに必要なだけの数の用量を投与され得る。任意の事象において、目的の組成物中に存在するKGフラグメントの量は、等価な応答を得るために必要なKG₁₆₃の量よりも少ない量である。この量は、問題のフラグメントの生物学的活性を、上記のようなKG₁₆₃フラグメントの生物学的活性と比較することによって、容易に決定される。30

【0107】

（I.I.I. 実験）

本発明を実施するための特定の実施形態の例を以下に示す。これらの実施例は、例示の目的のために提供され、いかなる手段によっても本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0108】

使用される数値（例えば、量、温度など）に関する正確性を確証するための努力が成されているが、ある程度の実験的誤差および偏差が、当然、許容されるべきである。

【0109】

50

酵素は、市販の供給源から購入し、そして製造業者の指示に従って使用した。放射性核種およびニトロセルロースフィルタもまた、市販の供給源から購入した。

【0110】

DNAフラグメントのクローニングにおいて、注記される以外は、全てのDNA操作を標準的な手順に従って行った。Sambrookら、前出を参考のこと。制限酵素、T₄DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼI、クレノウフラグメントおよび他の生物学的試薬は、業者から購入し、そして製造業者の指示に従って使用した。二重鎖DNAフラグメントを、アガロースゲルで分離した。

【実施例】

【0111】

(実施例1)

(細胞内酵母発現のための短縮型KGF酵母ベクターの構築)

この実施例は、本発明とともに使用するための種々の短縮型KGF分子の細胞内発現のための酵母発現ベクターに関する手順を記載する。

【0112】

この発現ベクターは、特定の短縮型KGFコード配列を、ADH2/GAPDHプロモーター(ハイブリッド酵母プロモーター)の制御下に含んだ。特に、各異なる短縮のために、2つのオリゴ(下記を参考のこと)(上鎖および下鎖)を使用した。これらのオリゴをアニーリングさせ、その後、連結反応物中に配置した。この連結反応物は、プラスミドpS13(Nco部位およびSal部位にて切断した)、短縮型KGFをコードするKpn/Salフラグメント、およびアリールしたオリゴ対のうちの1つを含んだ。このオリゴ対は、望ましい特定の短縮型KGFタンパク質のアミノ末端をコードした。このオリゴ対は、KGFコードフラグメントのKpn部位にベクターのNco部位を連結するように設計した。プラスミドpS13は、pYAS1の誘導体である。このプラスミドを、ATCCC, Manassas, VAに1985年2月27日に寄託し、ATCC受託番号20745を割り当てられた。pYAS1の構築は、米国特許第4,751,180号に記載される。

【0113】

完全な短縮型KGFのための種々のオリゴは、以下の通りであった。このオリゴ配列中の「X」は、5'リン酸基を示す。

【0114】

【化1】

KGF_{des1-15}:

5' XCAGTGAGCAGCCCTGAGCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAG
GGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (配列番号1)

5' XCACTGTGTTGACAGAAGAGTCTTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCATGT
AATCATAACTTCTTGTGTCGCTCAGGGCTGCT 3' (配列番号 2)

【0115】

【化2】

10

20

30

40

KGF_{des1-18}:

5' XCATGGAGCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGGGGATATAA
GAGTGAGAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (配列番号 3)

5' XCACTGTGTCGACAGAAGAGTCTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCATGT
AATCATAACTTCTTGTGTGCGCTC 3' (配列番号 4)

KGF_{des1-19}:

10

5' XCATGCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGGGGATATAAGAG
TGAGAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (配列番号 5)

5' XCACTGTGTCGACAGAAGAGTCTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCATGT
AATCATAACTTCTTGTGTGCG 3' (配列番号 6)

KGF_{des1-20}:

20

5' XCATGCACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGGGGATATAAGAGTGA
GAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (配列番号 7)

5' XCACTGTGTCGACAGAAGAGTCTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCATGT
AATCATAACTTCTTGTGTG 3' (配列番号 8)

KGF_{des1-21}:

30

5' XCATGACCAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTT
CTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (配列番号 9)

5' XCACTGTGTCGACAGAAGAGTCTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCATGTAATCATA
CTTCTGGT 3' (配列番号 10)

KGF_{des1-22}:

5' XCATGAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGGGGATATAAGAGTGAGAAGA

【0 1 1 6】

【化3】

40

CTCTTCTGTCGAACACACAGTGGTAC 3' (配列番号 11)

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCATGT
AATCATAACTTCT 3' (配列番号 12)

KGF_{des1-24}:

5' XCATGTATGATTACATGGAAGGAGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTTCT
GTCGAACACACAGTGGTAC 3' (配列番号 13)

10

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCATGT
AATCATA 3' (配列番号 14)

KGF_{des1-25}:

5' XCATGGATTACATGGAAGGAGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTTCTGTC
GAACACACAGTGGTAC 3' (配列番号 15)

20

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCATGT
AATC 3' (配列番号 16)

KGF_{des1-26}:

5' XCATGTACATGGAAGGAGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTTCTGTCGAA
CACAGTGGTAC 3' (配列番号 17)

30

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCTCACTCTTATATCCCCTCCTCCAT
GTA 3' (配列番号 18)

KGF_{des1-30}:

5' XCATGGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTTCTGTCGAACACACAGTGGTAC 3'
(配列番号 19)

40

【 0 1 1 7 】

【 化 4 】

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCTCACTCTTATATCCCC 3' (配列番号
20)

KGF_{des1-35}:

5' XCATGAGAAGACTCTTCTGTCGAACACACAGTGGTAC 3' (配列番号 21)

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCT 3' (配列番号 22)

10

KGF_{des1-37}:

5' XCATGCTCTCTGTCGAACACACAGTGGTAC 3' (配列番号 23)

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAG 3' (配列番号 24)

さらに、成熟した全長 KGF (KGF₁₋₆₃) をコードする発現ベクター、および最初の 23 個の N 末端アミノ酸が欠失された短縮型 KGF 分子 (KGF_{des1-23}) をコードする発現ベクターを、作製した。例えば、米国特許第 5,677,278 号を参照のこと。天然に存在するアルギニンの代わりに N 末端にアラニン残基を有する KGF_{des1-22} のアナログもまた、作製した。

20

【0118】

(実施例 2)

(酵母細胞による短縮型 KGF 分子の細胞内発現)

上記発現ベクターを使用して、標準的方法を使用する酢酸リチウムトランスフェクションによって *Saccharomyces cerevisiae* を形質転換した。例えば、「Guide to Yeast Genetics & Molecular Biology」, Methods in Enzymology, Vol. 194 (Academic Press, 1991) を参照のこと。形質転換体を、2% グルコースを含むウラシル欠損培地上で選択した。形質転換体を、5% グルコースを含むロイシン欠損培地 5 ml 中で、振盪機器中で 30 にて一晩インキュベートした。この組換え短縮分子の生成用培地は、20 ml 培養であり、2% グルコースを含む YEP 培地中の一晩培養物を約 72 時間播種した。

30

【0119】

(実施例 3)

(短縮型組換え KGF 分子の精製)

上記からの培養物を遠心分離して、酵母細胞ペーストを形成した。細胞を、標準的技術を使用して、10 mM MgCl₂、50 mM Tris (pH 8.0)、0.1 M デチオスレイトール (DTT) 中に溶解した。その細胞溶解物は、Dynamill DKL-Pilot 中のガラスピースを使用して、バッチとして作製した。溶解物生成を、細胞破壊が 95% の時に完了した。そのホモジネートを、適切な熱交換器を使用することによって、4 ~ 8 に冷却した。その後、その溶解物を 4 にて 15,000 g で 30 分間遠心分離することによって、破片を除去した。その上清の NaCl 濃度を、0.5 M NaCl に調整し、そして組換え短縮型 KGF を、以下のように上清から精製した。

40

【0120】

(A. Heparin SepharoseTM 親和性クロマトグラフィー)

上記のようにして得た上清を、すぐに Heparin Sepharose (HS) 樹脂カラムにすぐに適用した。その溶解生成物を、HS 樹脂の 30 ml 床を通して 4 にて約

50

30分間流した。そのカラムを、0.5M NaCl、0.1M DTT、および10mM Tris-HCl (pH 7.3) を含む緩衝液中で平衡化した。一旦その細胞溶解物をローディングすると、280nmでの吸光度がベースラインに戻るまで、そのカラムを上記平衡化緩衝液で徹底的に洗浄した。増加する段階式NaCl勾配を用いてHSカラムからタンパク質を溶出した。そのNaCl濃度は、10mM Tris-HCl (pH 7.3)、0.1M DTT中で1M NaClおよび2M NaClであった。溶出の間のカラムの流速は、約90ml/時間であり、4mlサイズの画分を収集した。

【0121】

それらの画分を、Balb/Mk細胞を使用してKGF生物活性について試験した。このアッセイを下記に示す。最高の生物活性を有する画分を、1M NaClを用いて溶出し、そしてプールした。プールした画分を次のカラム上にローディングする前に、それらの画分を、0.2M NaCl、10mM Tris-HCl (pH 7.3) に対して透析した。

【0122】

(B.Mono Sカチオン交換クロマトグラフィー)

HSカラムから溶出したプールした画分を、高圧液体クロマトグラフィー(FPLC)システム(Pharmacia, Piscataway, N.J.)に接続したMono Sカラム上へとSuperループを用いてローディングした。このMono Sカチオン交換カラムを、10mM Tris (pH 7.3) を用いて平衡化した。プールした画分をローディングした時、吸光度がベースラインに戻るまで、このカラムを、上記平衡化緩衝液を用いて流速1ml/分にて徹底的に洗浄した。その後、直線NaCl勾配(10mM Tris (pH 7.3) 中0.2M NaCl~1M NaCl)にて流速1ml/分でカラムから溶出し、1ml画分を収集した。

【0123】

主要なタンパク質ピークは、約0.6M NaClにて溶出した。このタンパク質ピークを通る画分を、生物活性についてアッセイし、そして活性画分をプールし、SDS-PAGE分析に供した。プールした画分のタンパク質濃度を、Bioread (Richmond, Calif., USA)からのタンパク質アッセイキットに添付されている指示書に従うBradfordアッセイによって決定した。

【0124】

(実施例4)

(Balb/Mk細胞を使用するKGF生物活性アッセイ)

KGF生物活性を、プールした0.6M NaCl画分がBalb/Mk細胞の増殖を促進する能力によって評価した。詳細には、Balb/Mk細胞のストック培養物を、10%ウシ胎仔血清と、0.25μg/ml フンジゾンと、10ng/ml 酸性FGF(aFGF)とを補充した、低カルシウムダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で増殖させ、そして維持した。その細胞を、99%の湿度を有する10%CO₂雰囲気中で37にてインキュベートした。この生物活性アッセイのために、細胞を、ストック培養物について上記しGospodarowiczら、J. Cell. Physiol. (1990) 142:325~333に記載されたような培地1ml中に1ウェルあたり5×10³細胞の密度にて、12ウェルプレート中に播種した(但し、播種培地は、aFGFを全く含まなかった)。

【0125】

望ましいカラム画分の10μlアリコートを、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中の0.2% (w/v)ゼラチン1ml中に希釈した。この希釈物10μlを、22mmウェルを含む12ウェルクラスタープレート中に1ウェルあたり5×10³細胞で播種したBalb/Mk細胞に添加した。そして希釈したカラム画分かまたは10ng aFGF含有培地のいずれかの10μlアリコートを、1日おきに細胞に添加した。

【0126】

培養7日間後に、細胞をトリプシン処理し、そして CoulterTMカウンター(Co

10

20

30

40

50

ulter Electronics, Hialeah, Fla, USA) を使用して最終細胞密度を決定した。その培養培地を、0.9% NaClと、0.01Mリン酸ナトリウム(pH 7.4)と、0.25%トリプシンと、0.02% EDTA(STV)とを含む溶液で置換することによって、その細胞をプレートから遊離させた。その細胞を、37にて5分～10分間この溶液中でインキュベートし、その後、ストック培養培地を、細胞に添加した。その後、その細胞を、CoulterTMカウンターを使用して計数した。最終細胞密度を、カラム画分のタンパク質濃度の関数としてグラフにした。そのタンパク質濃度を、対数スケールにてグラフにした。

【0127】

そのED₅₀を、(a)曲線の最低細胞密度値と最高細胞密度値との間の差異を半分に除算し、(b)そのグラフから、どのタンパク質濃度が、(a)において得られた細胞密度数に対応するかを決定することによって、計算した。

【0128】

KGF_{des 1～22}、KGF_{des 1～23}、KGF_{des 1～24}、KGF_{des 1～26}、およびKGF_{des 1～30}についての代表的バイオアッセイの結果を、図2Aに示す。同様の比較を、KGF_{des 1～23}、KGF_{des 1～26}、KGF_{des 1～30}、酸性FGF(aFGF)および全長KGF(FL-KGF)を用いて行った。結果を、図2Bに示す。異なる短縮形態のED₅₀を、100%として採用したネイティブKGFのED₅₀に対して正規化した(表1)。KGF_{des 1～22}、KGF_{des 1～23}、およびKGF_{des 1～24}は、生物学的活性の有意な増加を有した。詳細には、KGF_{des 1～22}は、ネイティブKGF₁₆₃より約6倍高い活性であり、一方、KGF_{des 1～23}およびKGF_{des 1～24}は、ネイティブKGF₁₆₃より10倍高い活性であった。1分子ベースで比較して分子量について調整した場合でさえ、これらの種は、KGF₁₆₃と比較して大いに増大した活性を示した。KGF_{des 1～24}を越えてKGF_{des 1～24}までの欠失は、KGFの短縮形態を、ネイティブ形態と匹敵する活性を有するようにし、KGF_{des 1～26}を越える欠失は、生物学的活性の減少をもたらした。

【0129】

ネイティブ形態の生物学的活性のうちのほんの2～3%しか保持しないKGF_{des 1～35}は、Balb/Mk細胞に対して試験した場合に、aFGFと同程度活性であったことに注目すべきである。この形態は、他の短縮物のいずれよりも高くaFGFと相同意であるので、このKGF短縮形態は、KGFに特有の標的細胞特異性を失ったかもしれないかに関する疑問が生じた。上記に説明したように、KGFは、広範な標的細胞(特に、内皮細胞)を有する他のFGF形態とは対照的に、上皮起源の細胞のみを刺激する。しかし、このことは、見かけ上生じない。なぜなら、ヘパリンの存在下もしくは不在下で、副腎皮質由来毛細血管内皮細胞(ACE)または成体ウシ大動脈内皮細胞(ABA E)のいずれかに対して試験した場合(下記を参照のこと)、KGF_{des 1～35}およびより短い他の短縮物は、不活性であったからである(図3)。

【0130】

【表1】

10

20

30

40

表1. KGFポリペプチドのマイトジエン活性

| KGFポリペプチド | 平均 % 相対活性 (単位重量 ベース)* | KGF _{xxx} の分子量** | 平均 % 相対活性 (1分子 ベース) |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 全長 (KGF ₁₆₃) | 100 | 18882 | 100 |
| KGF _{des1-15} | 154 | 17229 | 141 |
| KGF _{des1-18} | 166 | 16958 | 149 |
| KGF _{des1-19} | 100 | 16829 | 89 |
| KGF _{des1-20} | 187 | 16673 | 165 |
| KGF _{des1-21} | 200 | 16536 | 175 |
| KGF _{des1-22} | 600 | 16435 | 522 |
| KGF _{des1-23} | 1000 | 16278 | 862 |
| KGF _{des1-24} | 1000 | 16191 | 857 |
| KGF _{des1-25} | 150 | 16028 | 127 |
| KGF _{des1-26} | 100 | 15913 | 84 |
| KGF _{des1-30} | 28.5 | 15433 | 23 |
| KGF _{des1-35} | 3 | 14892 | 2 |

10

20

30

40

* (K G F _{xxx} の E D ₅₀ ÷ K G F ₁₆₃ の E D ₅₀) × 100

** 分子量 (MW) は、Vector NTI プログラム (1999年12月22日), Infomax, Inc. を使用して計算した。

【0131】

E. coli において発現された、天然に存在するN末端アルギニンの代わりにアラニンで置換されたKGF_{des1-22} アナログの活性を、E. coli で発現されたKGF_{des1-23} と比較した。このアナログを、複数回試験した。このアナログは、E. coli で発現されたKGF_{des1-23} のE D₅₀ と類似するE D₅₀ を示した。

【0132】

(実施例5)

(A B A E 細胞またはA C E 細胞に対するKGF生物活性)

KGFを、他の形態のFGF (塩基性FGF (bFGF) または酸性FGF (aFGF)) と比較した場合の、大血管由来の血管内皮細胞 (成体ウシ大動脈内皮細胞 (A B A E)) または毛細血管細胞に由来する血管内皮細胞 (副腎皮質由来毛細血管内皮細胞 (A C E)) に対する活性の欠如によって特徴付け得る。種々のFGF短縮形態がこの細胞特異性を保持しているか否かを分析するために、内皮細胞に対するその生物学的活性を試験した。

【0133】

50

A B A E 細胞およびA C E 細胞のストック培養物を、10%ウシ血清と、0.25 μg / ml フンジゾンと、2ng / ml b F G Fとを補充した、ダルベッコ改変イーグル培地中で、増殖させそして維持した。その細胞を、10%CO₂濃度および99%湿度とともに、37にてインキュベートした。

【0134】

マイトジエンアッセイにおいて、Gospodarowiczら、Proc. Natl. Acad. USA (1976) 73: 4120~4124; Gospodarowiczら、J. Cell. Physiol. (1976) 127: 121~136; およびGospodarowiczら、Proc. Natl. Acad. USA (1989) 86: 7311~7315に記載されるように、ストック培養培地中にて、12ウェルプレートの1ウェルあたり、5×10³個のA B A E 細胞またはA C E 細胞のいずれかをプレートした。

【0135】

飽和濃度のKGF₁₆₃および種々の短縮型KGF改変体および塩基性FGFを、1日おきに添加した。培養7日間後、Balb / MK細胞培養について記載されるように細胞をトリプシン処理し、そして最終細胞密度をCoulterカウンターを使用して決定した。

【0136】

図3に示されるように、試験したN末端短縮KGFポリペプチドのすべてが、b F G Fと比較してA B A E およびA C E の両方に対する活性を欠いた。これらの短縮は、酸性FGFとの構造的アライメントに一部に基づいた。これらの結果は、ネイティブKGFの能力は、細胞特異性を変化させることなく酸性FGFの能力へと変化され得ることを、確認する。酸性FGFは、Balb / M k 細胞についての公知のマイトジエンであり、その能力は、KGFの能力の10分の1である。このことは、KGFレセプターに対してのより低いFGFの結合親和性を反映する。ネイティブKGFの最初の30アミノ酸～35アミノ酸の除去は、これらの短縮型アナログにより示される生物学的活性の強力な減少（ネイティブKGFの28.5%および3%）をもたらす。同時に、酸性FGFとKGFとの間の相同意性の程度は、FGFレセプターと相互作用するための細胞構造決定因子が維持される場合に、増加する。従って、より長く欠失しているKGFアナログは、酸性FGFとより類似して挙動する。驚くべきことに、最長の欠失の場合でさえ、KGFに典型的な標的細胞特異性は維持され、そして、酸性FGFおよび塩基性FGFとは対照的に、そのアナログは、血管内皮細胞についてマイトジエンではない。

【0137】

（実施例6）

（熱安定性研究）

ネイティブのKGFポリペプチドおよび種々のN末端短縮型KGFポリペプチドの、上昇した温度に耐える能力を試験した。0.1mg / ml タンパク質を含むサンプルを、PBSを含まないCa⁺⁺ Mg⁺⁺中に調製し、そして各サンプルの100 μlを、1mlプラスチックバイアルへとアリコートした。このバイアルを密封し、そして37のインキュベーターに置いた。所定の時間間隔で、バイアルを取り出し、そして可溶性タンパク質の損失について分析した。

【0138】

30 μlのアリコートを、SDS-PAGE電気泳動により分析した。SDS-PAGEを、Tris-グリシンプレキャストゲル（5%～20%のアクリルアミド、Laemmli Nature (1970) 227: 680-685に従う）を用いる電気泳動システム（Novex, San Diego, California, U. S. A.）で行った。サンプルを、還元または非還元のSDSサンプル緩衝液と、加熱しないでローディングの前に混合した。

【0139】

タンパク質を、Coomassieブルー染色により検出した。この染色したゲルを、B 50

io Rad Model GS 700 Imaging デンシトメーター (Richmond, Calif., USA) を用いてデンシトメトリーによりスキャンした。可溶性タンパク質の量を、染色されたバンドの面積を積分し、そして 37 でのインキュベーション時間の関数として結果をプロットすることにより決定した。次いで、可溶性単量体タンパク質の損失についての半減期を、これらの動力学的曲線から評価した。

【0140】

種々の時間間隔でのサンプルの生物学的活性をまた、上記の Balb / MK 細胞増殖アッセイを用いて決定した。種々のサンプルの生物学的活性についての半減期を、37 でのインキュベーション時間の関数としてサンプルの ED₅₀ をプロットすることにより決定した。

10

【0141】

特に、ネイティブ KGF (KGF₁₋₆₃) 対 KGF_{des1-23} の熱安定性およびオリゴマー形成を、37 にて 0 ~ 8 日間の範囲で KGF ポリペプチド (PBS 中に希釈した 184 μg / ml ネイティブ KGF および 138 μg / ml KGF_{des1-23}) をインキュベートすることにより評価した。アリコートを、毎日取り、そしてそれら能力を Balb / MK 細胞について評価し、一方で、オリゴマー形成を SDS - PAGE により評価した。SDS - PAGE により分析した場合、ネイティブの KGF は、二量体を容易に形成した。二量体化は、KGF_{des1-23} についてははるかに明白ではなかった。ネイティブ KGF の単量体形態についての時間の関数として染色した際の低下もまた顕著であった。再度、これも、KGF_{des1-23} についてははるかに明白ではなかった。

20

【0142】

細胞増殖アッセイは、これらの条件下で、ネイティブ KGF の生物学的半減期は、2 日であり、一方、KGF_{des1-23} の半減期は、7 日であったことを示した。

【0143】

熱安定性研究はまた、KGF_{des1-15}、KGF_{des1-18}、KGF_{des1-19}、KGF_{des1-120}、KGF_{des1-21}、KGF_{des1-22}、KGF_{des1-24}、KGF_{des1-25}、KGF_{des1-26}、KGF_{des1-30}、および KGF_{des1-35} を、全長 KGF よりも、様々な程度ではあるが、より安定にしたことを示す。3 日ごとにサンプルを採取して 24 日間続く代表的な安定性研究を図 4 に示す。この研究において、KGF_{des1-24} および KGF_{des1-15} (100 μg / ml) を、PBS 中に希釈し、そして 37 でインキュベートした。SDS - PAGE によりサンプルを非還元条件下で分析した。次いで、ゲルを染色し、そしてデンシトメトリーによりスキャンした。

30

【0144】

9 日 ~ 24 日の熱安定性研究の延長は、KGF_{des1-23} 対ネイティブ KGF のより正確に規定された半減期の溶液を可能にする。図 5 に示されるように、ネイティブの KGF の半減期は、KGF_{des1-23} について 7 日対 17 日であった。

40

【0145】

これらの結果は、合わせると、ネイティブの KGF と短縮型分子との間の生物学的活性の差異は、一部、異なる熱安定性により引き起こされ得ることを示す。

40

【0146】

(実施例 7)

(pH 2.1 での酸安定性)

時間の関数としてのオリゴマーの形成の後、37 にて種々の時間間隔の間維持された、ネイティブの KGF サンプルおよび KGF_{des1-23} サンプルを、逆相 HPLC により分析した。100 μl のサンプルを、水中の 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) (pH 2.1) に希釈した。次いで、このサンプルを、0.1% (v/v) TFA 中で平衡化した、Vydac C₄ カラム (0.46 cm × 25 cm、5 μm 粒子サイズ、300 ポアサイズ) にアプライした。タンパク質を、線形の 115 分の多重線形アセトニトリル勾配 (20 ~ 100%) で溶出した。吸収ピークを、これらの表面積を積分することによ

50

り、それらのタンパク質含有量について分析した。単量体タンパク質の量を、時間の関数としてプロットした。次いで、この単量体タンパク質についての半減期を、上記のように推定した。オリゴマーの形成を決定するために、サンプルをまた、SDS-PAGEにより非還元条件下で分析した。種々のタンパク質ピークの生物学的活性を、上記のように、Bab/Mk細胞増殖アッセイを用いて決定した。

【0147】

特に、ネイティブのKGF(28 μg/ml)およびKGF_{des1-23}(36 μg/ml)を、PBS中に希釈し、37にて0~9日間の範囲の時間間隔の間でインキュベーションし、そしてアリコートを、酸条件(pH 2.1)下で、逆相高圧液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)により、毎日分析した。ネイティブおよびKGF_{des1-23}の両方について60分で溶離した、UV吸収の単一のピークを観察した。ピークの強度は、時間の関数として減少した。しかし、この減少は、KGF_{des1-23}よりもネイティブのKGFについてより明白であり、その結果、9日までに、両方のピークの積分は、ネイティブKGFの量がKGF_{des1-23}の1/3であったことを示した。ネイティブKGFの質量の減少は、生物学的活性の激しい低下に関係していた。7日までに、ネイティブのKGFは、不活性化した。対照的に、KGF_{des1-23}は、その本来の生物学的活性の50%をまだ保持した(図6)。

【0148】

(実施例8)

(一度のみ対一日おきに加えた場合の、ネイティブKGF対KGF_{des1-23}の生理活性の比較)

上記の細胞増殖アッセイにおいて、漸増濃度のネイティブKGFおよびKGF_{des1-23}を、1日おきに加えた。安定性が増加した活性の機構である場合、たとえ、全ての細胞増殖が少ないとしても、ネイティブKGFポリペプチドまたは短縮型KGFポリペプチドを、一日おきよりもむしろ、一度で、加えた場合、これらは、なおも、用量応答において同じ差異であるべきである。この仮説を試験するために、種々の濃度のKGF_{des1-18}、KGF_{des1-23}およびKGF_{des1-25}を、図7に示される濃度で一回のみ加えた。図7および表2に示されるように、生物学的活性の同じ差異が、KGF_{des1-23}で観察された。特にKGF_{des1-23}は、1日おきに加えた場合、ネイティブKGFよりも、10倍より活性であったのに対して、一度で加えた場合、13倍、より活性であった。さらに、KGF_{des1-18}ポリペプチドおよびKGF_{des1-25}ポリペプチドの両方は、ネイティブのKGFを超える活性の増加を示した。このことは、増加した安定性が、増加した能力に寄与する機構の1つであるを確かにする。

【0149】

【表2】

表2. 一度にかまたは一日おきにのいずれかで加えた
ネイティブのKGF 対 短縮型KGFの生物学的活性の比較

| KGFポリペプチド | 平均活性% | |
|------------------------|--------|----------|
| | 一度に加えた | 1日おきに加えた |
| 全長 | 100 | 100 |
| KGF _{des1-18} | 173 | 150 |
| KGF _{des1-23} | 1320 | 1000 |
| KGF _{des1-25} | 173 | 160 |

10

20

30

40

50

(実施例 9)

(ネイティブ KGF の迅速な消失の原因となるプロテアーゼ汚染)

ネイティブ KGF 調製物のプロテアーゼ汚染 (KGF_{des 1-23} 調製物由来を除く) がネイティブ KGF の迅速な消失の原因であった可能性を除外するために、以下の実験を行った。ネイティブの KGF および KGF_{des 1-23} (100 μg / ml) を、PBS 中に希釈し、そして単独かまたは等比率 (v/v) のいずれかで、37°にてインキュベートした。サンプルを、3、6、9 および 12 日目に取り、そして上記のように、SDS-PAGE により分析した。染色の後、ゲルをデンシトメトリーでスキャンした。ネイティブの KGF が消失し、KGF_{des 1-23} が消失しない場合、プロテアーゼ汚染を除外した。

10

【0150】

ネイティブの KGF は、6 日までに消失した。しかし、KGF_{des 1-23} は、12 日後になおも見られ得、このことは、ネイティブ KGF の消失についての理由としてのプロテアーゼ汚染の可能性を排除する。しかし、驚くべきことに、KGF_{des 1-23} を単独でインキュベートした場合、対 KGF_{des 1-23} をネイティブの KGF と組合させてインキュベートした場合には、バンド染色強度における差異があった。KGF_{des 1-23} バンドの染色強度は、ネイティブの KGF と混合した場合よりも、単独でインキュベートした場合、かなり増大した。KGF_{des 1-23} がネイティブの KGF と共にインキュベートした場合、複合体形態および KGF_{des 1-23} を溶液から取り出すことが可能である。

20

【0151】

ネイティブ KGF 対 KGF_{des 1-23} の生物学的活性を分析した場合、能力の 10 倍の増加が観察され、これは、短縮型形態対ネイティブ形態のより高い熱安定性と関係した。従って、増大した安定性は、増大した能力を一部説明する。しかし、このことは、増大した活性に寄与する機構のみであるようではない。特定の理論にとらわれることなく、ネイティブの KGF の活性の欠如は、溶液からの沈殿に起因し得る。上記の種々の短縮を、安定性および生物学的活性について分析した場合、これらは、ネイティブ形態と比較して、増大した安定性および生物学的活性を示した。しかし、増大した安定性と増大した生物学的活性との間にわずかな関係が存在した。例えば、KGF_{des 1-15} および KGF_{des 1-24} は、匹敵する熱安定性を有したが、KGF_{des 1-24} は、ネイティブ KGF よりも、10 倍より強力であった一方、KGF_{des 1-15} は、1.5 倍より活性であった。従って、他の機構が存在するようであり、これは、最も強力な分子、KGF_{des 1-22}、KGF_{des 1-23} および KGF_{des 1-24} の増大した能力に寄与する。能力の最大増加を与えるドメインが、これらの残基からなるドメインに限定されることもまた著しかった。従って、これらの 3 つの残基は、レセプターと相互作用する KGF の最適な立体配座を提供し得る。

30

【0152】

短縮化は、ネイティブの KGF 能力が、細胞特異性の変化なしに aFGF の能力に変化され得ることを確認する。酸性 FGF は、Balb / Mk 細胞についての公知のマイトジエンであり、そしてこれは、KGF よりも 10 倍低い活性である。このことは、KGF レセプターについての低い結合アフィニティーに起因する。30 ~ 35 アミノ酸の除去は、短縮型ポリペプチドの生物学的活性の強力な低下 (それぞれ、ネイティブの KGF の 28.5% および 3%) を導く。同時に、より長い欠失は、aFGF と KGF との間の相同性の度合を増加し、そして FGF レセプターと相互作用するための細胞構造決定因子を増加する。従って、欠失が長くなれば、より aFGF のように、短縮型 KGF ポリペプチドは振舞う。驚くべくことに、最も長い欠失でさえ、KGF の特色を示す標的細胞特異性 (すなわち、上皮起源の細胞について) を保持し、そして最も短いポリペプチドは、aFGF または bFGF とは対照的に、血管内皮細胞に対して分裂促進性ではなかった。KGF の NH₂ 末端ドメイン (少なくとも最初の 35 残基と同じくらい遠いドメインが考慮される) は、その細胞特異性に関与するようにみえないというこれらの知見は、以前の報告と対照

40

50

的である（例えば、国際公開WO 90/08771を参照のこと）。

【0153】

（実施例10）

（N末端短縮型KGFポリペプチドのインビオでの効力）

全長KGF (KGF₁₋₆₃) およびN末端短縮型分子 (KGF_{des1-23}) を、外科的結腸吻合 (anastomosis) の治癒のラットモデルにおいて試験した。特に、5mg/ml KGF₁₋₆₃ または1mg/ml KGF_{des1-23} を含む、KGF処方物を、ラットに腹腔内投与する。結腸の陰窩の深さ (μm) 、治癒に関する細胞増殖の測定、およびmmHgの破裂圧、治癒した創傷の強度の測定を、KGF₁₋₆₃ を与えたラットについて2、4および7日目に、そして短縮型分子を与えたラットについて2、4、6日目に測定した。結果を表3および4に示す。

【0154】

特に、1mg/mlの短縮型分子は、創傷治癒を促進する5mg/mlの全長KGFと同じくまたはそれよりも有効であった。より小用量の短縮型分子もまた有効であった。これらの結果に基づくと、他のN末端短縮型KGF（特に、KGF_{des1-22} およびKGF_{des1-24}）もまた、KGF₁₋₆₃ を用いて必要とされるよりも、より少ない用量を用いる創傷治癒があまり有効でなければ、有効であるようである。

【0155】

【表3】

20

表3. ビヒクルコントロールの%として表した、結腸の陰窩の深さ (μm)

| 測定した日 | 全長 KGF, 5 mg/kg | 短縮型 KGF, 1 mg/kg |
|--------------------------------|-----------------|------------------|
| 2 | 127 | 176 |
| 4 | 125 | 129 |
| 7 (6日のKGF _{des1-23}) | 154 | 138 |

30

【0156】

【表4】

表4. ビヒクルコントロールの%として表した、破裂圧 (mmHg)

| 測定した日 | 全長 KGF, 5 mg/kg | 短縮型 KGF, 1 mg/kg |
|--------------------------------|-----------------|------------------|
| 2 | 134 | 163 |
| 4 | 149 | 151 |
| 7 (6日のKGF _{des1-23}) | 119 | 148 |

40

従って、新規のKGF組成物および新規のKGF組成物を用いる方法が開示される。本発明の好ましい実施形態を、いくらか詳細に記載してきたが、明白なバリエーションが、添付の特許請求の範囲に規定される発明の精神と範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】図1（配列番号25および配列番号26）は、成熟した全長KGF (KGF₁₋₆₃) についてのDNA配列および対応するアミノ酸配列を示す。

50

【図2A】図2Aおよび図2Bは、種々のN末端短縮KGFポリペプチドの生物学的活性の比較を示す。図2Aは、KGF_{des 1~22}（黒菱形）、KGF_{des 1~23}（黒四角）、KGF_{des 1~24}（黒三角）、KGF_{des 1~26}（×）およびKGF_{des 1~30}（二重×）の活性を比較する。

【図2B】図2Aおよび図2Bは、種々のN末端短縮KGFポリペプチドの生物学的活性の比較を示す。図2Bは、KGF_{des 1~23}（黒四角）、KGF_{des 1~26}（×）およびKGF_{des 1~30}（二重×）と、酸性FGF（aFGF、黒菱形、中央の線）および全長KGF（FL-KGF（黒菱形、上から2番目の線）との比較を示す。

【図3】図3は、種々の短縮KGF分子を、ウシ大動脈弓由来の血管内皮細胞（成体ウシ大動脈内皮細胞（ABA-E）、図の左側）またはウシ副腎毛細血管（副腎皮質毛細血管内皮細胞（ACE）、図の右側）のいずれかに対して試験した、実験の結果を示す。そのヒストグラムは、飽和濃度の種々のKGFポリペプチドまたは塩基性FGF（bFGF）に、培養7日間後に曝露した培養物の最終細胞密度を示す。

【図4】図4は、SDS-PAGEにより測定した可溶性KGF_{des 1~24}（黒三角）およびKGF_{des 1~15}（黒丸）の量を、37にてインキュベートした時間の関数として示す。

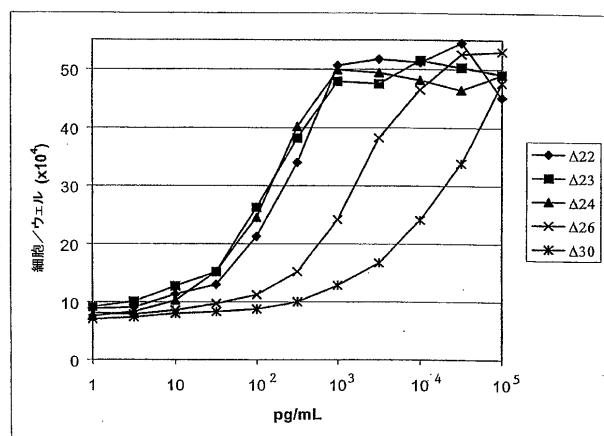
【図5】図5は、SDS-PAGEにより測定した可溶性KGF_{des 1~23}（黒四角）およびネイティブKGF（FL、黒菱形）の量を、37にてインキュベートした時間の関数として示す。

【図6】図6は、実施例に記載される熱安定性および酸安定性の試験の結果を示す。FL-KGFは、KGF_{1~63}を示す。T-KGFは、KGF_{des 1~23}を示す。このヒストグラムは、飽和濃度のKGF_{des 1~23}またはKGF_{1~63}のいずれかに曝露して7日間後の培養物の最終細胞密度を示す。

【図7】図7は、Balb/Mk細胞の増殖に対する、1回だけ添加した場合の漸増濃度のネイティブKGF（FL、黒菱形）、およびKGF_{des 1~18}（黒丸）、KGF_{des 1~23}（黒四角）およびKGF_{des 1~25}（黒三角）の効果を示す。

【図8】図8（配列番号27および28）は、KGF_{des 1~22}についてのDNA配列および対応するアミノ酸配列を示し、そのN末端アルギニン残基は、アラニン残基で置換されている。

【図2A】



【図2B】

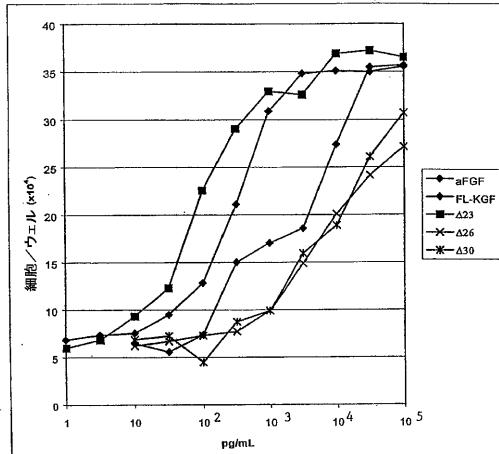
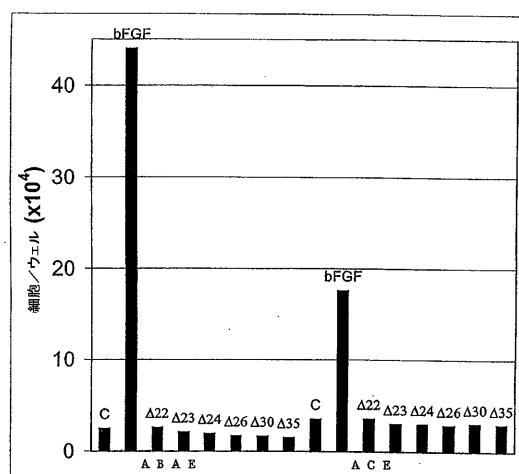


FIG. 2A

FIG. 2B

【図3】



【図4】

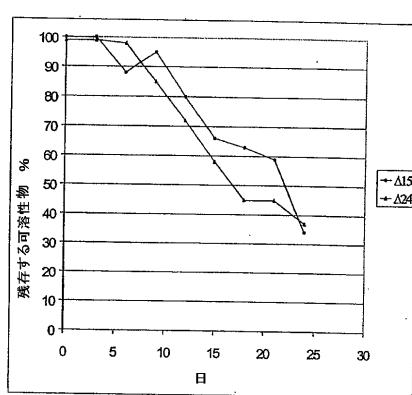
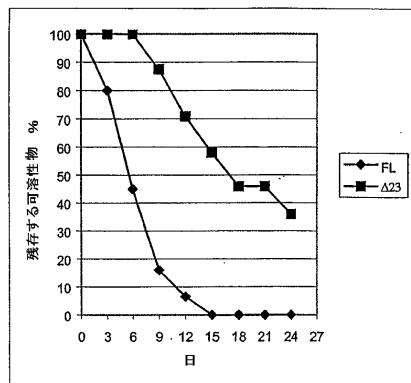


FIG. 3

FIG. 4

【図5】



【図6】

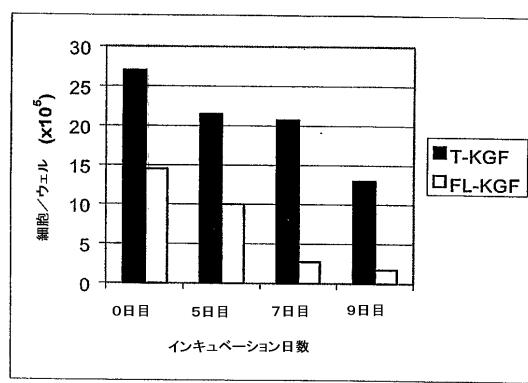


FIG. 5

FIG. 6

【図7】

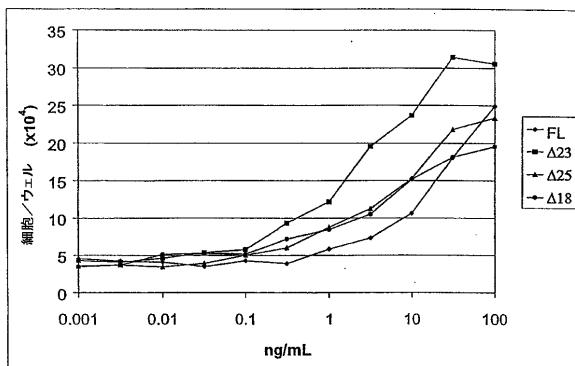


FIG. 7

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016505 A2(51) International Patent Classification⁵: C12N Kenneth [US/US]; C/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94622-8097 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/26929

(22) International Filing Date: 21 August 2002 (21.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/313,881 21 August 2001 (21.08.2001) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60/313,881 (CIP)

Filed on 21 August 2001 (21.08.2001)

(71) Applicant (for all designated States except US): CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GOSPODAROWICZ, Denis, J. [US/US]; C/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94622-8097 (US). KAVANAUGH, W., Michael [US/US]; C/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94622-8097 (US). CRAWFORD,

(81) Designated States (national): AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, OM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SL, SG, SI, SK, SI, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CL, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NU, SN, TD, TO).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

A2

(54) Title: KGF POLYPEPTIDE COMPOSITIONS

(57) Abstract: Compositions comprising keratinocyte growth factor (KGF) polypeptides and methods of using the same are described. The KGF polypeptides of the present invention display enhanced bioactivity relative to full-length KGF₁₋₆₅. Accordingly, the KGF polypeptides of the present invention may be used in compositions in lesser amounts than would be necessary using KGF₁₋₆₅.

WO 03/016505

5

KGF POLYPEPTIDE COMPOSITIONSTechnical Field

The present invention relates generally to polypeptide growth factors. Specifically, the invention relates to compositions comprising keratinocyte growth factor 10 polypeptides and methods of using the same.

Background of the Invention

Keratinocyte growth factor (KGF) belongs to the family of fibroblast growth factors ("FGFs"), the prototypes of which are represented by basic FGF and acidic FGF. 15 KGF is also known as FGF-7. KGF, like FGFs, binds heparin and is generally capable of stimulating the proliferation and differentiation of a variety of cell types derived from the primary or secondary mesoderm as well as from neuroectoderm. For example, KGF, like FGFs, has the ability to induce the differentiation and proliferation of ventral as well as dorsal mesoderm in early blastulae. See, e.g., Gospodarowicz et. al. *Cell. Biol. Rev.* 20 (1991) 25:307-314; and Basilico et al. *Adv. Cancer Res.* (1992) 59:115-165. Like other FGFs, KGF is a heparin-binding protein, but unlike other FGFs, it has a unique target cell specificity. Particularly, KGF is similar to other FGFs in its ability to stimulate epithelial cell proliferation, but is dissimilar to other FGFs in its inability to stimulate endothelial cells or fibroblast proliferation. See, e.g., Finch, et. al. *Science* 25 (1989) 245: 752-755. Mature, full-length KGF, designated herein as KGF₁₆₃, is a polypeptide with 163 amino acid residues, and possesses a potential N-glycosylation site that extends from amino acid residue 14 to 16 at the N-terminus. Finch, et. al. *Science* (1989) 245: 752-755.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Ron et al. *J. Biol. Chem.* (1993) 268:2984-2988 found that when KGF₁₆₃ was expressed in a prokaryotic expression system, a recombinant KGF ("rKGF") polypeptide could be obtained that possessed mitogenic activity. When the rKGF molecule was truncated by deletion of 3, 8, 27, 38, and 48 amino acid residues from the N-terminus of the mature KGF₁₆₃ polypeptide, biological activity of the resulting molecules varied. With deletion of 3 and 8 amino acid residues, respectively, the mitogenic activity of the resulting molecules did not appear to be affected as compared to full-length rKGF. Deletion of 27 amino acid residues, however, resulted in molecules that displayed 10-20 fold reduced mitogenic activity. Deletion of 38 and 48 amino acid residues, respectively, resulted in complete loss of mitogenic activity and heparin-binding ability. Ron et al., however, failed to produce any truncated rKGF fragments that possessed increased mitogenic activity as compared to the full-length rKGF molecule.

U.S. Patent Nos. 5,677,278, 5,773,586, 5,843,883, 5,863,767 and 6,074,848, all to Gospodarowicz et al., describe KGF molecules. One particular molecule, with an N-terminal deletion of 23 amino acid residues, termed KGF_{des1-23}, demonstrates enhanced mitogenic activity as compared to mature, full-length recombinant KGF₁₆₃.

Osslund et al. *Protein Sci.* (1998) 7:1681-1690 reports various N-terminal truncated KGF molecules and certain measurements of their mitogenic activity. Similarly, International Publications WO 96/11951 and WO 96/11949 describe KGF molecules with various N-terminal truncations and amino acid substitutions.

Disclosure of the Invention

The present invention is based on the discovery that various N-terminally truncated KGF polypeptides, and analogs thereof, display enhanced biological activity on a per molecule basis relative to native, full-length KGF₁₆₃. Thus, compositions containing these molecules have increased potency for the treatment of conditions where epithelialization is required, such as for the treatment of wounds, burns, ophthalmic disorders, gastrointestinal diseases and any disorder where stimulation of epithelial cell proliferation or regeneration is desired. These molecules can be delivered alone or in combination with other mitogenic agents, such as other growth factors, including for

WO 03/016505

PCT/US02/26929

example, any of the other FGFs, as well as platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF), insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), and the like.

Moreover, these KGF molecules can be conjugated to toxin molecules in order to target these toxins to epithelial cells in order to treat hyperproliferative diseases.

Accordingly, in one embodiment, the subject invention is directed to a method of stimulating epithelial cell proliferation. The method comprises contacting epithelial cells with a composition comprising:

(a) a therapeutically effective amount of a KGF polypeptide, wherein the KGF polypeptide is selected from the group consisting of:

(i) KGF_{des1-15} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 16-163, inclusive, of Figure 1;

(ii) KGF_{des1-18} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 19-163, inclusive, of Figure 1;

(iii) KGF_{des1-19} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 20-163, inclusive, of Figure 1;

(iv) KGF_{des1-20} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 21-163, inclusive, of Figure 1;

(v) KGF_{des1-21} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 22-163, inclusive, of Figure 1;

(vi) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1;

(vii) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1;

(viii) KGF_{des1-25} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 26-163, inclusive, of Figure 1;

(ix) a biologically active analog of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), wherein the biologically active analog consists of the same number of amino acids as (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), respectively, and has at least 70% sequence homology thereto,

WO 03/016505

PCT/US02/26929

wherein the KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein the therapeutically effective amount is 75% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response; and

5 (b) a pharmaceutically acceptable excipient.

In certain embodiments, the biologically active analog has at least 80% or 90% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

In another embodiment, the invention is directed to a method as described above 10 wherein the KGF polypeptide is KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog thereof wherein the biologically active analog consists of 141 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto, and wherein the therapeutically effective amount is 50% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed 15 to elicit an equivalent therapeutic response.

In yet further embodiments, the invention is directed to a method as described above wherein the KGF polypeptide is KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog thereof wherein the biologically active analog consists of 139 amino acids 20 and has at least 70% sequence homology thereto, and wherein the therapeutically effective amount is 50% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

In a further embodiment, the invention is directed to a method of stimulating epithelial cell proliferation which comprises contacting epithelial cells with a 25 composition comprising:

a) a therapeutically effective amount of a KGF polypeptide, wherein the KGF polypeptide is (i) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1, or (ii) a biologically active analog of (i) which consists of the same number of amino acids as (i) and has at least 70% sequence 30 homology thereto,

WO 03/016505

PCT/US02/26929

wherein the KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF_{163}) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein the therapeutically effective amount is 10% to 75% of the amount on a per molecule basis of KGF_{163} needed to elicit an equivalent therapeutic response; and

5 (b) a pharmaceutically acceptable excipient.

In certain embodiments, the biologically active analog has at least 80% or 90% sequence homology to (i) or (ii).

In other embodiments, the biologically active analog consists of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1 with the N-terminal arginine residue substituted with an alanine residue.

In still further embodiments, the therapeutically effective amount is 10% to 20%, or 10% to 25%, or 10% to 50% of the amount on a per molecule basis, or any percentage within these ranges, of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

10 In another embodiment, the invention is directed to a method of stimulating epithelial cell proliferation comprising contacting epithelial cells with a composition comprising:

a) a therapeutically effective amount of a KGF polypeptide, wherein the KGF polypeptide is (i) $KGF_{des1-24}$ consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at 15 amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1, or (ii) a biologically active analog of (i) which consists of the same number of amino acids as (i) and has at least 70% sequence homology thereto,

wherein the KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF_{163}) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein the therapeutically effective amount is 5% to 75% of the amount on a per molecule basis of KGF_{163} needed to elicit an equivalent therapeutic response; and

20 (b) a pharmaceutically acceptable excipient.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

In certain embodiments of the method described above, the biologically active analog has at least 80% or at least 90% sequence homology to (i) or (ii).

In additional embodiments, the therapeutically effective amount is 5% to 10%, 10% to 20%, 10% to 25%, or 10% to 50%, or any percentage within these ranges, of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

In all of the methods described above, epithelial cells may be contacted with the KGF polypeptides *in vitro* or *in vivo*.

In another embodiment, the invention is directed to a method of treating wounds comprising applying a KGF polypeptide composition to an area of a wound to be treated and allowing the wound to heal. The composition comprises:

(a) a therapeutically effective amount of a KGF polypeptide, wherein the KGF polypeptide is selected from the group consisting of:

(i) KGF_{des1-15} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 16-163, inclusive, of Figure 1;

(ii) KGF_{des1-18} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 19-163, inclusive, of Figure 1;

(iii) KGF_{des1-19} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 20-163, inclusive, of Figure 1;

(iv) KGF_{des1-20} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 21-163, inclusive, of Figure 1;

(v) KGF_{des1-21} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 22-163, inclusive, of Figure 1;

(vi) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1;

(vii) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1;

(viii) KGF_{des1-25} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 26-163, inclusive, of Figure 1;

WO 03/016505

PCT/US02/26929

(ix) a biologically active analog of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), wherein the biologically active analog consists of the same number of amino acids as (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), respectively, and has at least 70% sequence homology thereto,

5 wherein the KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF_{163}) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein the therapeutically effective amount is 75% or less of the amount on a per molecule basis of KGF_{163} needed to elicit an equivalent therapeutic response; and

10 (b) a pharmaceutically acceptable excipient.

In certain embodiments of the above method, the biologically active analog has at least 80% or 90% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

In additional embodiments of the above method, the KGF polypeptide is $KGF_{des1-22}$ consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog thereof wherein the biologically active analog consists of 141 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto, and wherein the therapeutically effective amount is 50% or less of the amount on a per molecule basis of KGF_{163} needed to elicit an equivalent therapeutic response.

20 In other embodiments of the above method, the KGF polypeptide is $KGF_{des1-24}$ consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog thereof wherein the biologically active analog consists of 139 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto, and wherein the therapeutically effective amount is 50% or less of the amount on a per molecule basis of KGF_{163} needed to elicit an equivalent therapeutic response.

25 In still further embodiments, the invention is directed to a method of treating wounds comprising applying a KGF polypeptide composition to an area of a wound to be treated and allowing the wound to heal, said composition comprising:

30 a) a therapeutically effective amount of a KGF polypeptide, wherein the KGF polypeptide is (i) $KGF_{des1-22}$ consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at

WO 03/016505

PCT/US02/26929

amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1, or (ii) a biologically active analog of (i) which consists of the same number of amino acids as (i) and has at least 70% sequence homology thereto,

5 wherein the KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein the therapeutically effective amount is 10% to 75% of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response; and

(b) a pharmaceutically acceptable excipient.

10 In certain embodiments, the biologically active analog has at least 80% sequence homology or at least 90% sequence homology to (i) or (ii).

In additional embodiments of the method above, the biologically active analog consists of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1 with the N-terminal arginine residue substituted with an alanine 15 residue.

In still further embodiments, the therapeutically effective amount for use in the methods above is 10% to 20%, or 10% to 25%, or 10% to 50% of the amount on a per molecule basis, or any percentage within these ranges, of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

20 In additional embodiments, the invention is directed to a method of treating wounds comprising applying a KGF polypeptide composition to an area of a wound to be treated and allowing the wound to heal, said composition comprising:

a) a therapeutically effective amount of a KGF polypeptide, wherein the KGF polypeptide is (i) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at 25 amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog of (i) which consists of the same number of amino acids as (i) and has at least 70% sequence homology thereto,

wherein the KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein the therapeutically 30

WO 03/016505

PCT/US02/26929

effective amount is 5% to 75% of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response; and

(b) a pharmaceutically acceptable excipient.

In certain embodiments of the above method, the biologically active analog has at least 80% sequence homology or at least 90% sequence homology to (i) or (ii).

In still further embodiments, the therapeutically effective amount for use in the method above is 5% to 10%, or 10% to 20%, or 10% to 25%, or 10% to 50% of the amount on a per molecule basis, or any percentage within these ranges, of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

In the above methods, the composition may be contacted with the wound *in vitro* or *in vivo*.

In yet further embodiments, the invention is directed to a composition comprising:

(a) a therapeutically effective amount of a KGF polypeptide, wherein the KGF polypeptide is selected from the group consisting of:

(i) KGF_{des1-15} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 16-163, inclusive, of Figure 1;

(ii) KGF_{des1-18} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 19-163, inclusive, of Figure 1;

(iii) KGF_{des1-19} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 20-163, inclusive, of Figure 1;

(iv) KGF_{des1-20} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 21-163, inclusive, of Figure 1;

(v) KGF_{des1-21} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 22-163, inclusive, of Figure 1;

(vi) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1;

(vii) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1;

(viii) KGF_{des1-25} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 26-163, inclusive, of Figure 1;

WO 03/016505

PCT/US02/26929

(ix) a biologically active analog of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), wherein said biologically active analog consists of the same number of amino acids as (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), respectively, and has at least 70% sequence homology thereto; and

5 (x) an analog of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix), consisting of the amino acid sequence of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix), respectively, and an additional N-terminal methionine,

wherein the KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and 10 specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein the therapeutically effective amount is 75% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response; and

(b) a pharmaceutically acceptable excipient.

In certain embodiments, the biologically active analog has at least 80% sequence 15 homology or at least 90% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

These and other aspects of the present invention will become evident upon reference to the following detailed description and attached figures. In addition, various 20 references are set forth herein which describe in more detail certain procedures or compositions.

Brief Description of the Figures

Figure 1 (SEQ ID NOS:25 and 26) depicts the DNA sequence and corresponding amino acid sequence for mature, full-length KGF (KGF₁₆₃).

25 Figures 2A and 2B show a comparison of the biological activity of various N-terminally truncated KGF polypeptides. Figure 2A compares activity of KGF_{des1-22} (◆), KGF_{des1-23} (■), KGF_{des1-24} (▲) KGF_{des1-26} (X) and KGF_{des1-30} (double X), while Figure 2B shows a comparison of KGF_{des1-23} (■), KGF_{des1-26} (X) and KGF_{des1-30} (double X) with acidic FGF (aFGF, ◆, middle line) and full-length KGF (FL-KGF, ◆, second to the top line).

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Figure 3 shows the results of experiments where various truncated KGF molecules were tested on vascular endothelial cells derived from either the bovine aortic arch (adult bovine aortic endothelial cells (BAAE), left side of figure) or from the bovine adrenal gland capillaries (adrenal cortex-derived capillary endothelial cells (ACE), right side of figure). The histograms show the final cell density of cultures exposed to saturating concentrations of the various KGF polypeptides, or basic FGF (bFGF), after seven days in culture.

Figure 4 shows the amount of soluble KGF_{des1-24} (▲) and KGF_{des1-15} (●), determined by SDS-PAGE as a function of time of incubation at 37°C.

Figure 5 shows the amount of soluble KGF_{des1-21} (■) and native KGF (FL, ♦) determined by SDS-PAGE as a function of time of incubation at 37°C.

Figure 6 depicts the results of the thermal and acid stability test described in the examples. FL-KGF represents KGF₁₆₃. T-KGF represents KGF_{des1-23}. The histograms represent the final cell density of the cultures after seven days when exposed to saturating concentrations of either KGF_{des1-23} or KGF₁₆₃.

Figure 7 shows the effect of increasing concentrations of native KGF (FL, ♦) and KGF_{des1-15} (●), KGF_{des1-23} (■) and KGF_{des1-25} (▲) on the proliferation of Balb/Mk cells when added only once.

Figure 8 (SEQ ID NOS:27 and 28) shows the DNA sequence and corresponding amino acid sequence for KGF_{des1-23}, with the N-terminal arginine residue substituted with an alanine residue.

Detailed Description of the Invention

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional methods of protein chemistry, biochemistry, recombinant DNA techniques and pharmacology, within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

The following amino acid abbreviations are used throughout the text:

| | | |
|----|------------------------|------------------------|
| 5 | Alanine: Ala (A) | Arginine: Arg (R) |
| | Asparagine: Asn (N) | Aspartic acid: Asp (D) |
| | Cysteine: Cys (C) | Glutamine: Gln (Q) |
| | Glutamic acid: Glu (E) | Glycine: Gly (G) |
| | Histidine: His (H) | Isoleucine: Ile (I) |
| | Leucine: Leu (L) | Lysine: Lys (K) |
| 10 | Methionine: Met (M) | Phenylalanine: Phe (F) |
| | Proline: Pro (P) | Serine: Ser (S) |
| | Threonine: Thr (T) | Tryptophan: Trp (W) |
| | Tyrosine: Tyr (Y) | Valine: Val (V) |

15 I. Definitions

In describing the present invention, the following terms will be employed, and are intended to be defined as indicated below.

20 The terms "polypeptide" and "protein" refer to a polymer of amino acid residues and are not limited to a minimum length of the product. The terms also include, unless otherwise indicated, modifications of the polypeptide that do not change the sequence of amino acids, for example, glycosylated, acetylated and phosphorylated forms. A polypeptide or protein, for purposes of the present invention, may be synthetically or recombinantly produced, as well as isolated from natural sources.

25 As used herein, the term "keratinocyte growth factor" or "KGF" refers to a member of a group of the FGF family of proteins which is capable of binding to FGFR-2, lacks significant activity on fibroblasts, is uniquely specific for epithelial cells and is particularly active on keratinocytes. KGF, analogs and fragments thereof (defined below) may be synthetically or recombinantly produced. Moreover, KGF may be isolated from natural sources, such as from any of several tissues of any mammalian source, for example from human tissues.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

"Mature, full-length KGF," "long form of KGF," "FL-KGF," "native KGF" or "KGF₁₆₃" as used herein all refer to the mature polypeptide that contains 163 amino acid residues, as shown in Figure 1.

5 As used herein, the term "KGF fragment" refers to a polypeptide derived from KGF₁₆₃ that does not include the entire sequence of KGF₁₆₃. Such a fragment may be a truncated version of the full-length molecule, as well as an internally deleted polypeptide. A KGF fragment may have KGF bioactivity as determined by the Balb/MK bioactivity assay, described in Example 4 herein. The Balb/MK cell line (Weissman, B. E. and 10 Aaronson, S. A. *Cell* (1983) 32:599-606) is a clonal Balb/c mouse keratinocyte cell line. These cells are dependent for their growth upon an exogenous source of an epithelial cell mitogen even in medium containing serum. Thus, activity of the KGF fragments and 15 analogs is measured by determining the ED₅₀ value using Balb/Mk cells, said value defined by the concentration of KGF fragment that causes half maximal stimulation of cell proliferation. Additionally, the KGF fragments of the invention specifically stimulate epithelial cell proliferation.

To determine target cell specificity, DNA synthesis stimulation, expressed as the 20 ratio of stimulated synthesis over background incorporation of thymidine in the absence of added test sample, is compared to analogous stimulation observed in cells other than keratinocytes under the same assay conditions. The activity of the KGF fragments and 25 analogs can also be tested on endothelial cells, such as adult bovine aortic endothelial cells (ABAE) or adrenal cortex-derived capillary endothelial cells (ACE), as described in Example 5 herein. A KGF polypeptide or analog that "specifically stimulates epithelial cell proliferation" may be a molecule that, at saturating concentrations, (i) in the Balb/Mk assay described in Example 4 herein, can stimulate the final cell number per well after 7 days in culture to a level at least 4-fold higher than the cell number achieved in wells receiving no KGF; and (ii) in the ABAE or ACE assay described in Example 5 herein, does not significantly stimulate the final cell number per well after 7 days in culture to a level higher than the cell number achieved in wells receiving no KGF.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

U.S. Patent No. 5,731,170, incorporated by reference herein in its entirety, reports that certain molecules display KGF mitogenic activity with marked specificity for keratinocytes as opposed to fibroblasts.

5 The fragments of the present invention will display enhanced activity on a per molecule basis relative to KGF₁₆₃, such as anywhere from 10% or more activity, such as 15%, 20%, 25%, 50%, 100% or more, to as much as 10-fold or more activity, or any amount between the specified ranges. Hence, the KGF fragments of the present invention may be used in compositions in lesser amounts than would be necessary using KGF₁₆₃.
10 The inventors herein recognize that truncations produce molecules of lower molecular weight than full-length KGF. As shown below in the Examples, these species are more active when compared on a per molecule basis (i.e., when activity is adjusted for the molecular weight). Particular KGF fragments are described in detail below.

15 The term "analog" refers to derivatives of the reference molecule. The analog may retain biological activity, as described above. In general, the term "analog" refers to compounds having a native polypeptide sequence and structure with one or more amino acid additions, substitutions (generally conservative in nature) and/or deletions, relative to the native molecule, so long as the modifications do not destroy activity. Preferably, the analog has at least the same biological activity as the parent molecule, and may even display enhanced activity over the parent molecule. Methods for making polypeptide
20 analogs are known in the art and are described further below.

25 Particularly preferred analogs include substitutions that are conservative in nature, i.e., those substitutions that take place within a family of amino acids that are related in their side chains. Specifically, amino acids are generally divided into four families: (1) acidic -- aspartate and glutamate; (2) basic -- lysine, arginine, histidine; (3) non-polar -- alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan; and (4) uncharged polar -- glycine, asparagine, glutamine, cysteine, serine, threonine, tyrosine. Phenylalanine, tryptophan, and tyrosine are sometimes classified as aromatic amino acids. For example, it is reasonably predictable that an isolated replacement of leucine with isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, a threonine with a serine, or a similar conservative replacement of an amino acid with a structurally related amino
30

WO 03/016505

PCT/US02/26929

acid, will not have a major effect on the biological activity. For example, the polypeptide of interest may include up to about 1-70 conservative or non-conservative amino acid substitutions, such as 1, 2, 3, 4, 5-50, 15-25, 5-10, or any integer between 1-70, so long as the desired function of the molecule remains intact. One of skill in the art may readily determine regions of the molecule of interest that can be modified with a reasonable likelihood of retaining biological activity as defined herein.

5 For example, none of the critical determinants involved in signaling appear to be located within the first 30 N-terminal amino acids of KGF (Plotnikov, et. al. *Cell* (2000) 101:413-424). Additionally, the NH₂ terminal domain of KGF does not appear to be involved in its cell specificity. Amino acid residues 91-110, numbered relative to the amino acid sequence set forth in Figure 1 appear to confer receptor binding specificity to KGF (Reich-Slotsky, et al. *J. Biol. Chem.* (1995) 270:29813-29818). Thus, analogs and fragments which retain the region spanning at least amino acids 91-110 are preferred. Moreover, if amino acid substitutions are made in this region, they should be 10 conservative in nature. Fragments which retain portions of the N-terminal sequence, e.g., fragments with deletions that do not extend to, for example, amino acid 35, numbered relative to Figure 1, are more tolerable to amino acid additions, deletions and substitutions. Preferred deletions include deletions of the first 22, 23 and 24 amino acids, as described further below. One of skill in the art can readily determine other regions that 15 will tolerate change based on the known structure of KGF (see, e.g., Osslund et al. *Protein Sci.* (1998) 7:1681-1690), as well as the known structure/function relationships between KGF and related molecules such as acidic FGF, basic FGF and kaposi FGF (see, e.g., Gospodarowicz et al., *J. Cell. Physiol.* (1990) 142:325-333).

20 By "purified" and "isolated" is meant, when referring to a polypeptide or 25 polynucleotide, that the indicated molecule is present in the substantial absence of other biological macromolecules of the same type. The term "purified" as used herein preferably means at least 75% by weight, more preferably at least 85% by weight, more preferably still at least 95% by weight, and most preferably at least 98% by weight, of biological macromolecules of the same type are present in the sample. An "isolated 30 polynucleotide which encodes a particular polypeptide" refers to a nucleic acid molecule

WO 03/016505

PCT/US02/26929

which is substantially free of other nucleic acid molecules that do not encode the subject polypeptide; however, the molecule may include some additional bases or moieties which do not deleteriously affect the basic characteristics of the composition.

By a "recombinant polypeptide" is intended a polypeptide which has been prepared by recombinant DNA techniques as described herein. In general, the gene coding for the desired polypeptide is cloned and then expressed in transformed organisms, as described further below. The host organism expresses the foreign gene to produce the polypeptide under expression conditions. Alternatively, the promoter controlling expression of an endogenous polypeptide can be altered to render a recombinant polypeptide. It is particularly advantageous to produce polypeptides recombinantly as recombinant production generally allows for higher yields from less starting material, and renders a far purer product. Thus, the polypeptides of the invention can be produced in the absence of other molecules normally present in cells. For example, human polypeptide compositions free of any trace of human protein contaminants can be readily obtained because the only human protein produced by a recombinant non-human host cell is the recombinant human polypeptide. Potential viral agents from natural sources and viral components pathogenic to humans are also avoided.

The term "polynucleotide" or "nucleic acid molecule" as used herein refers to a polymeric form of nucleotides of any length, either ribonucleotides or deoxyribonucleotides. This term refers only to the primary structure of the molecule and thus includes double- and single-stranded DNA and RNA. It also includes known types of modifications, for example, labels which are known in the art, methylation, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example proteins (including for e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelates (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxida-

WO 03/016505

PCT/US02/26929

tive metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomic nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide.

The terms "recombinant DNA molecule," or "recombinant polynucleotide" are used herein to refer to a polynucleotide of genomic, cDNA, semisynthetic, or synthetic origin which, by virtue of its origin or manipulation: (1) is not associated with all or a portion of a polynucleotide with which it is associated in nature, (2) is linked to a polynucleotide other than that to which it is linked in nature, or (3) does not occur in nature. Thus, the term encompasses "synthetically derived" nucleic acid molecules.

A "coding sequence" is a nucleic acid molecule which is translated into a polypeptide, usually via mRNA, when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence may be determined by a translation start codon at the 5'-terminus and a translation stop codon at the 3'-terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, cDNA, and recombinant nucleotide sequences.

"Control sequences" refer to nucleic acid sequences which are necessary to effect the expression of coding sequences to which they are ligated. The nature of such control sequences differs depending upon the host organism; in prokaryotes, such control sequences generally include promoter, ribosomal binding site, and transcription termination sequence; in eukaryotes, generally, such control sequences include promoters and transcription termination sequences. The term "control sequences" is intended to include, at a minimum, all components necessary for expression of a coding sequence, and may also include additional components, for example, leader sequences and fusion partner sequences.

A control element, such as a promoter, "directs the transcription" of a coding sequence in a cell when RNA polymerase will bind the promoter and transcribe the coding sequence into mRNA, which is then translated into the polypeptide encoded by the coding sequence.

"Operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components so described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A control sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression

WO 03/016505

PCT/US02/26929

of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences. The control elements need not be contiguous with the coding sequence, so long as they function to direct the expression thereof. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter and the coding sequence and the promoter can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

As used herein, the term "expression cassette" refers to a molecule comprising at least one coding sequence operably linked to a control sequence which includes all nucleotide sequences required for the transcription of cloned copies of the coding sequence and the translation of the mRNAs in an appropriate host cell. Such expression cassettes can be used to express eukaryotic genes in a variety of hosts such as bacteria, blue-green algae, plant cells, yeast cells, insect cells and animal cells. Under the invention, expression cassettes can include, but are not limited to, cloning vectors, specifically designed plasmids, viruses or virus particles. The cassettes may further include an origin of replication for autonomous replication in host cells, selectable markers, various restriction sites, a potential for high copy number and strong promoters.

By "vector" is meant any genetic element, such as a plasmid, phage, transposon, cosmid, chromosome, virus etc., which is capable of replication when associated with the proper control elements and which can transfer gene sequences between cells. Thus, the term includes cloning and expression vehicles, as well as viral vectors.

A cell has been "transformed" by an exogenous polynucleotide when the polynucleotide has been introduced inside the cell membrane. The exogenous polynucleotide may or may not be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome of the cell. In prokaryotes and yeasts, for example, the exogenous DNA may be maintained on an episomal element, such as a plasmid. With respect to eukaryotic cells, a stably transformed cell is one in which the exogenous DNA has become integrated into the chromosome so that it is inherited by daughter cells through chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the eukaryotic cell to establish cell lines or clones comprised of a population of daughter cells containing the exogenous DNA.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

A "host cell" is a cell which has been transformed, or is capable of transformation, by an exogenous nucleic acid molecule.

"Homology" refers to the percent similarity between two polynucleotide or two polypeptide moieties. Two DNA, or two polypeptide sequences are "substantially homologous" to each other when the sequences exhibit at least about 50%, preferably at least about 70% to 75%, more preferably at least about 80%-85%, preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95%-98% sequence homology, or any percent homology between the specified ranges, over a defined length of the molecules. As used herein, substantially homologous also refers to sequences showing complete identity to the specified DNA or polypeptide sequence.

In general, "identity" refers to an exact nucleotide-to-nucleotide or amino acid-to-amino acid correspondence of two polynucleotides or polypeptide sequences, respectively. Percent identity can be determined by a direct comparison of the sequence information between two molecules by aligning the sequences, counting the exact number of matches between the two aligned sequences, dividing by the length of the shorter sequence, and multiplying the result by 100.

Preferably, naturally or non-naturally occurring protein variants have amino acid sequences which are at least 70%, 80%, 85%, 90% or 95% or more homologous to the particular KGF fragment derived from Figure 1. More preferably, the molecules are 98% or 99% homologous. Percent homology is determined using the Smith-Waterman homology search algorithm using an affine gap search with a gap open penalty of 12 and a gap extension penalty of 2, BLOSUM matrix of 62. The Smith-Waterman homology search algorithm is taught in Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482-489 (1981).

Alternatively, homology can be determined by hybridization of polynucleotides under conditions which form stable duplexes between homologous regions, followed by digestion with single-stranded-specific nuclease(s), and size determination of the digested fragments. DNA sequences that are substantially homologous can be identified in a Southern hybridization experiment under, for example, stringent conditions, as defined for that particular system. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of

WO 03/016505

PCT/US02/26929

the art. See, e.g., Sambrook et al., *supra*; *DNA Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

5 The terms "effective amount" or "pharmaceutically effective amount" refer to a nontoxic but sufficient amount of the agent to provide the desired biological result. That result can be reduction and/or alleviation of the signs, symptoms, or causes of a disease, or any other desired alteration of a biological system. For example, an effective amount of a KGF fragment for use with the present methods is an amount sufficient to stimulate epithelial cell stimulation or proliferation, and preferably an amount sufficient to cause increased healing of wounds and/or burns, and other disorders where epithelial cell
10 proliferation is desired. Such amounts are described below. An appropriate "effective" amount in any individual case may be determined by one of ordinary skill in the art using routine experimentation.

15 By "pharmaceutically acceptable" or "pharmacologically acceptable" is meant a material which is not biologically or otherwise undesirable, i.e., the material may be administered to an individual without causing any undesirable biological effects or interacting in a deleterious manner with any of the components of the composition in which it is contained.

20 By "physiological pH" or a "pH in the physiological range" is meant a pH in the range of approximately 7.0 to 8.0 inclusive. Preferred physiological pH is in the range of approximately 7.2 to 7.6 inclusive.

25 As used herein, the term "subject" encompasses mammals and non-mammals. Examples of mammals include, but are not limited to, any member of the Mammalia class: humans, non-human primates such as chimpanzees, and other apes and monkey species; farm animals such as cattle, horses, sheep, goats, swine; domestic animals such as rabbits, dogs, and cats; laboratory animals including rodents, such as rats, mice and guinea pigs, and the like. Examples of non-mammals include, but are not limited to, birds, fish and the like. The term does not denote a particular age or gender.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

II. Modes of Carrying Out the Invention

Before describing the present invention in detail, it is to be understood that this invention is not limited to particular formulations or process parameters as such may, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments of the invention only, and is not intended to be limiting.

Although a number of compositions and methods similar or equivalent to those described herein can be used in the practice of the present invention, the preferred materials and methods are described herein.

10 The present invention is based on the discovery that certain KGF polypeptide fragments and analogs of these fragments, which retain only a portion of the full-length sequence, show enhanced bioactivity relative to the full-length sequence. Thus, smaller amounts of the polypeptide may be used in compositions than would be necessary with the full-length molecule. In certain instances, there is less occurrence of non-specific side-effects when compositions including the molecules described herein are administered.

15 The present invention particularly relates to compositions comprising KGF fragments which exhibit an increase in bioactivity relative to KGF₁₋₆₃ as determined by the Balb/MK bioactivity assay specified herein and which specifically stimulate epithelial cell proliferation. Particularly, activity of the KGF fragments and analogs is measured by 20 determining the ED₅₀ value using Balb/Mk cells, said value defined by the concentration of KGF fragment that causes half maximal stimulation of cell proliferation. The cells are cultured for 7 days, as described below in the examples. The bioactivity of the KGF fragments herein is preferably at least about 1.2 to 1.5-fold, preferably, about 2-fold and, more preferably, about 2- to 10-fold greater or more than that of the full-length KGF protein, when compared in the cell proliferation assay, and may be as much as 10- to 25 100-fold greater or more than full-length KGF, as determined using stimulation of DNA synthesis in Balb/Mk cells maintained in a chemically defined medium, as described herein and in PCT Patent Application, No. WO 90/08771. Due to the enhanced activity level, the polypeptides of the subject invention allow the use of 90% or less, such as 5%- 30 90%, or 10%-50%, or any number therebetween, on a per molecule basis (i.e., adjusted for

WO 03/016505

PCT/US02/26929

the molecular weight) of the amount of KGF₁₆₃ that would be necessary in corresponding compositions to achieve the same biological results.

Particular polypeptides for use herein include but are not limited to the following:

5 KGF_{des1-15} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 16-163, inclusive, of Figure 1; an analog of KGF_{des1-15} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 16-163, inclusive, of

Figure 1 and having an additional N-terminal methionine;

10 KGF_{des1-18} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 19-163, inclusive, of Figure 1; an analog of KGF_{des1-18} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 19-163, inclusive, of

Figure 1 and having an additional N-terminal methionine;

15 KGF_{des1-19} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 20-163, inclusive, of Figure 1; an analog KGF_{des1-19} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 20-163, inclusive, of Figure 1 with an additional N-terminal methionine;

KGF_{des1-20} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 21-163, inclusive, of Figure 1; an analog of KGF_{des1-20} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 21-163, inclusive, of

Figure 1 with an additional N-terminal methionine;

20 KGF_{des1-21} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 22-163, inclusive, of Figure 1; an analog of KGF_{des1-21} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 22-163, inclusive, of

Figure 1 with an additional N-terminal methionine;

25 KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1; an analog of KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of

Figure 1 with an additional N-terminal methionine; an analog of KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of

Figure 1 with the N-terminal arginine residue substituted with an alanine residue;

WO 03/016505

PCT/US02/26929

5 KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1; an analog of KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1 with an additional N-terminal methionine; and

10 KGF_{des1-25} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 26-163, inclusive, of Figure 1; and an analog of KGF_{des1-25} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 26-163, inclusive, of Figure 1 with an additional N-terminal methionine.

15 Also contemplated for use in the subject compositions are biologically active analogs of the above-specified fragments, wherein the biologically active analogs consist of the same number of amino acids as the above fragments and have at least about 50%, preferably at least about 70%, preferably at least about 75%, preferably at least about 80%, preferably at least about 85%, preferably at least about 90%, preferably at least about 95%, and preferably at least about 98% sequence homology thereto, as determined as described above. For example, the biologically active analog may be an analog of KGF_{des-15} that

20 consists of 148 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto; an analog of KGF_{des-18} that consists of 145 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto; an analog of KGF_{des-19} that consists of 144 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto; an analog of KGF_{des-20} that consists of 143 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto; an analog of KGF_{des-21} that consists of 142

25 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto; an analog of KGF_{des-22} that consists of 141 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto; an analog of KGF_{des-24} that consists of 139 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto; and an analog of KGF_{des-25} that consists of 138 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto.

30 The amount of KGF polypeptide for use in the subject compositions relative to KGF₁₆₃ will vary depending on the particular fragment of interest. In general, compositions will comprise about 90%, or less, even 75%, or less, 50%, or less, 35%, or less, 25%, or less, or 10% or less, on a per molecule basis (i.e., adjusted for molecular weight), of the amount of KGF₁₆₃ in a corresponding composition that would be necessary

WO 03/016505

PCT/US02/26929

to achieve the desired result, such as to promote epithelial cell division and/or proliferation. Thus, for example, the compositions described herein may include 5%-90%, or 10%-90%, or 10%-75%, or 10%-50%, or 10%-25%, or 10%-20% on a per molecule basis, of the amount of KGF₁₆₃ in a corresponding composition that would be necessary to achieve the desired result. It is to be understood that particular percentages between these ranges are also contemplated herein.

Particularly, if the KGF fragment is KGF_{des1-15}, KGF_{des1-18}, KGF_{des1-19}, KGF_{des1-20}, KGF_{des1-21}, KGF_{des1-22}, KGF_{des1-23}, KGF_{des1-25}, or polypeptides derived from these molecules, the amount may be 75%, or less, such as 10% to 75%. If the KGF fragment is KGF_{des1-24} or KGF_{des1-26}, or polypeptides derived from these molecules, the amount used may 50%, or less, or even 25%, or 20%, or less, such as 5% to 50%. For KGF_{des1-24} and polypeptides derived therefrom, for example, the amount may be 10%, or less, such as 2% to 10% of the amount required of KGF₁₆₃ to achieve an equivalent therapeutic response. Appropriate amounts are discussed in detail below.

In a preferred embodiment of the present invention, the KGF fragments of the present invention are produced by recombinant technology, particularly in the case of large-scale commercial production. Recombinant DNA molecules and expression vectors encoding the polypeptides of the present invention can be made and the genes expressed by conventional gene expression technology using methods well-known in the art, as discussed in more detail below. Analogs of particular KGF fragments may also be made recombinantly, for example, by site-directed mutagenesis. Thus, all references to embodiments of the present invention as they relate to particular KGF fragments apply equally to analogs of the fragments.

In one embodiment of the present invention, the KGF fragment can be made by isolating native, mature KGF from cells producing the same, such as M426 human embryonic fibroblasts (Aaronson, S. A. and Todaro, G. J. *Virology* (1968) 36:254-261), using techniques described in, e.g., U.S. Patent No. 5,731,170. N-terminal amino acid residues can then be deleted from the recovered molecule. Such deletion can be performed by any conventional techniques known in the art.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Alternatively, polypeptides for use in the subject compositions can be synthesized chemically, by any of several techniques that are known to those skilled in the peptide art. See, e.g., J. M. Stewart and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984) and G. Barany and R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2, (Academic Press, New York, 1980), pp. 3-254, for solid phase peptide synthesis techniques; and M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (Springer-Verlag, Berlin 1984) and E. Gross and J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, for classical solution synthesis. The polypeptides of the present invention can also be chemically prepared by the method of simultaneous multiple peptide synthesis. See, e.g., Houghten *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:5131-5135; U.S. Patent No. 4,631,211.

In an alternative embodiment, the KGF fragments can be made by isolating the coding sequence of native KGF₁₆₃, deleting the codons that encode the amino acid residues to be deleted, inserting the modified coding sequence into an expression vector, transforming host cells with the expression vector to produce the recombinant KGF fragments and analogs, and isolating the recombinant KGF fragment using conventional purification techniques.

In a further embodiment of the present invention, the coding sequence of the KGF fragment can be obtained by conventional techniques, including the isolation of the coding sequence of KGF₁₆₃ from a cDNA library known to contain such, and deleting therefrom the sequence encoding the portion of amino acid residues to be deleted. Deletion of the coding sequence of the N-terminal amino acids can be accomplished *in vivo* or *in vitro*. The former can be achieved, for example, by expression of the KGF₁₆₃ coding sequence in an appropriate expression system. The latter can be achieved by known PCR techniques using primers that exclude the N-terminal sequences.

Preferably, polypeptides for use in the present compositions are produced recombinantly, by expression of a polynucleotide encoding the same. Methods for the recombinant production of KGF fragments are well known. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,677,278, 5,773,586, 5,843,883, 5,863,767 and 6,074,848, all to Gospodarowicz et al.;

WO 03/016505

PCT/US02/26929

International Publications WO 96/11951 and WO 96/11949; and Osslund et al. *Protein Sci.* (1998) 7:1681-1690.

In particular, the molecules for use with the present invention can be made using standard techniques of molecular biology. For example, polynucleotide sequences coding for the above-described molecules can be obtained using recombinant methods, such as by screening cDNA and genomic libraries from cells expressing the gene, or by deriving the gene from a vector known to include the same. Furthermore, the desired gene can be isolated directly from cells and tissues containing the same, using standard techniques, such as phenol extraction and PCR of cDNA or genomic DNA. See, e.g., Sambrook et al., 10 *supra*, for a description of techniques used to obtain and isolate DNA. The gene of interest can also be produced synthetically, rather than cloned. The molecules can be designed with appropriate codons for the particular sequence. The complete sequence is then assembled from overlapping oligonucleotides prepared by standard methods and assembled into a complete coding sequence. See, e.g., Edge (1981) *Nature* 292:756; 15 Nambiar et al. (1984) *Science* 223:1299; and Jay et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.

Thus, particular nucleotide sequences can be obtained from vectors harboring the desired sequences or synthesized completely or in part using various oligonucleotide synthesis techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and polymerase chain reaction (PCR) techniques where appropriate. See, e.g., Sambrook, *supra*. In 20 particular, one method of obtaining nucleotide sequences encoding the desired sequences is by annealing complementary sets of overlapping synthetic oligonucleotides produced in a conventional, automated polynucleotide synthesizer, followed by ligation with an appropriate DNA ligase and amplification of the ligated nucleotide sequence via PCR. See, e.g., Jayaraman et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4084-4088. Additionally, 25 oligonucleotide directed synthesis (Jones et al. (1986) *Nature* 324:75-82), oligonucleotide directed mutagenesis of pre-existing nucleotide regions (Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327 and Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), and enzymatic filling-in of gapped oligonucleotides using T₄ DNA polymerase (Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033) can be used under the invention to provide molecules 30 having altered or enhanced receptor-binding capabilities, and/or reduced immunogenicity.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Once coding sequences have been prepared or isolated, such sequences can be cloned into any suitable vector or replicon. Numerous cloning vectors are known to those of skill in the art, and the selection of an appropriate cloning vector is a matter of choice. Suitable vectors include, but are not limited to, plasmids, phages, transposons, cosmids, 5 chromosomes or viruses which are capable of replication when associated with the proper control elements.

The coding sequence is then placed under the control of suitable control elements, depending on the system to be used for expression. Thus, the coding sequence can be placed under the control of a promoter, ribosome binding site (for bacterial expression) 10 and, optionally, an operator, so that the DNA sequence of interest is transcribed into RNA by a suitable transformant. The coding sequence may or may not contain a sequence coding for a signal peptide or leader sequence which can later be removed by the host in post-translational processing. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397. If a signal sequence is present, it can either be the native sequence or it may be a 15 heterologous signal sequence.

In addition to control sequences, it may be desirable to add regulatory sequences which allow for regulation of the expression of the sequences relative to the growth of the host cell. Regulatory sequences are known to those of skill in the art, and examples 20 include those which cause the expression of a gene to be turned on or off in response to a chemical or physical stimulus, including the presence of a regulatory compound. Other types of regulatory elements may also be present in the vector. For example, enhancer elements may be used herein to increase expression levels of the constructs. Examples 25 include the SV40 early gene enhancer (Dijkema et al. (1985) *EMBO J.* 4:761), the enhancer/promoter derived from the long terminal repeat (LTR) of the Rous Sarcoma Virus (Gorman et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777) and elements derived from human CMV (Boshart et al. (1985) *Cell* 41:521), such as elements included in the CMV intron A sequence (U.S. Patent No. 5,688,688). The expression cassette may further include an origin of replication for autonomous replication in a suitable host cell, one or 30 more selectable markers, one or more restriction sites, a potential for high copy number and a strong promoter.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

An expression vector is constructed so that the particular coding sequence is located in the vector with the appropriate regulatory sequences, the positioning and orientation of the coding sequence with respect to the control sequences being such that the coding sequence is transcribed under the "control" of the control sequences (i.e., RNA polymerase which binds to the DNA molecule at the control sequences transcribes the coding sequence). Modification of the sequences encoding the molecule of interest may be desirable to achieve this end. For example, in some cases it may be necessary to modify the sequence so that it can be attached to the control sequences in the appropriate orientation; i.e., to maintain the reading frame. The control sequences and other regulatory sequences may be ligated to the coding sequence prior to insertion into a vector. Alternatively, the coding sequence can be cloned directly into an expression vector which already contains the control sequences and an appropriate restriction site.

As explained above, it may also be desirable to produce mutants or analogs of the reference KGF fragment. Mutants or analogs may be prepared by the deletion of a portion of the sequence encoding the KGF fragment, by insertion of a sequence, and/or by substitution of one or more nucleotides within the sequence. Techniques for modifying nucleotide sequences, such as site-directed mutagenesis, and the like, are well known to those skilled in the art. See, e.g., Sambrook et al., *supra*; Kumkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:448; Geisselsoder et al. (1987) *BioTechniques* 5:786; Zoller and Smith (1983) *Methods Enzymol.* 100:468; Dalbie-McFarland et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79:6409.

The molecules can be expressed in a wide variety of systems, including insect, mammalian, bacterial, viral and yeast expression systems, all well known in the art. For example, insect cell expression systems, such as baculovirus systems, are known to those of skill in the art and described in, e.g., Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* (1987). Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available in kit form from, *inter alia*, Invitrogen, San Diego CA ("MaxBac" kit). Similarly, bacterial and mammalian cell expression systems are well known in the art and described in, e.g., Sambrook et al.,

WO 03/016505

PCT/US02/26929

supra. Yeast expression systems are also known in the art and described in, e.g., *Yeast Genetic Engineering* (Barr et al., eds., 1989) Butterworths, London.

A number of appropriate host cells for use with the above systems are also known. For example, mammalian cell lines are known in the art and include immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC), such as, but not limited to, Chinese hamster ovary (CHO) cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, monkey kidney cells (COS), human embryonic kidney cells, human hepatocellular carcinoma cells (e.g., Hep G2), Madin-Darby bovine kidney ("MDBK") cells, as well as others. Similarly, bacterial hosts such as *E. coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus spp.*, will find use with the present expression constructs. Yeast hosts useful in the present invention include *inter alia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Insect cells for use with baculovirus expression vectors include, *inter alia*, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, and *Trichoplusia ni*.

Intracellular expression of the truncated KGF polypeptides and analogs thereof in yeast is particularly desirable. Such systems avoid problems which may arise with purification from bacteria, such as *E. coli*, including the presence of large amounts of DNA, endotoxins, and protein contaminants. Moreover, naturally occurring yeast enzymes efficiently cleave the N-terminal methionine which may be present when the molecules are recombinantly produced and there is no need to overexpress the enzyme when a yeast system is used. Additionally, although KGF is a naturally secreted protein, when native and truncated KGF, and analogs thereof, are produced internally in yeast without secretion, they are soluble, properly folded and active.

Nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences of interest can be stably integrated into a host cell genome or maintained on a stable episomal element in a suitable host cell using various gene delivery techniques well known in the art. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 5,399,346.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Depending on the expression system and host selected, the molecules are produced by growing host cells transformed by an expression vector described above under conditions whereby the protein is expressed. The expressed protein is then isolated from the host cells and purified. If the expression system secretes the protein into growth media, the product can be purified directly from the media. If it is not secreted, it can be isolated from cell lysates. The selection of the appropriate growth conditions and recovery methods are within the skill of the art.

5 The KGF fragments are then formulated into pharmaceutical compositions, described further below, for delivery to a subject. Alternatively, polynucleotides encoding the polypeptide of interest may be delivered directly to the subject and expressed *in vivo*. A number of viral based systems have been developed for direct gene transfer into 10 mammalian cells. In this regard, retroviruses provide a convenient platform for gene delivery systems. A selected nucleotide sequence encoding the desired polypeptide can be inserted into a vector and packaged in retroviral particles using techniques known in the art. The recombinant virus can then be isolated and delivered to a subject. A number of 15 suitable retroviral systems have been described (U.S. Patent No. 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A.D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

10 A number of suitable adenovirus vectors have also been described. Unlike retroviruses which integrate into the host genome, adenoviruses persist 15 extrachromosomally thus minimizing the risks associated with insertional mutagenesis (Haj-Ahmad and Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett et al. (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth et al. (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr et al. (1994) *Gene Therapy* 1:51-58; Berkner, K.L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; and Rich et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476). 20 Various adeno-associated virus (AAV) vector systems have been developed recently for gene delivery. Such systems can include control sequences, such as promoter and 25 polyadenylation sites, as well as selectable markers or reporter genes, enhancer sequences, 30

WO 03/016505

PCT/US02/26929

and other control elements which allow for the induction of transcription. AAV vectors can be readily constructed using techniques well known in the art. *See, e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,173,414 and 5,139,941; International Publication Nos. WO 92/01070 (published 23 January 1992) and WO 93/03769 (published 4 March 1993); Lebkowski et al. (1988)

5 *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B.J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyckza, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling and Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; and Zhou et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

10 Additional viral vectors which will find use for delivering the nucleic acid molecules encoding the molecules of the present invention by gene transfer include those derived from the pox family of viruses, such as vaccinia virus and avian poxvirus. *See, e.g.*, International Publication Nos. WO 91/12882; WO 89/03429; and WO 92/03545.

15 Molecular conjugate vectors, such as the adenovirus chimeric vectors described in Michael et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:6866-6869 and Wagner et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099-6103, can also be used for gene delivery under the invention.

20 Members of the Alphavirus genus, such as but not limited to vectors derived from the Sindbis and Semliki Forest viruses, will also find use as viral vectors for delivering the gene of interest. For a description of Sindbis-virus derived vectors useful for the practice of the instant methods, see, Dubensky et al., *J. Virol.* (1996) 70:508-519; and International Publication Nos. WO 95/07995 and WO 96/17072.

25 The gene of interest can also be delivered without a viral vector. For example, the gene can be packaged in liposomes prior to delivery to the subject or to cells derived therefrom, with or without the accompanying antigen. Lipid encapsulation is generally accomplished using liposomes which are able to stably bind or entrap and retain nucleic acid. For a review of the use of liposomes as carriers for delivery of nucleic acids, see, Hug and Sleight, *Biochim. Biophys. Acta.* (1991) 1097:1-17; Straubinger et al., in *Methods of Enzymology* (1983), Vol. 101, pp. 512-527.

30 The KGF fragments of the present invention can be used for identification of receptor recognition sites as well as for the design of peptide agonists or antagonists.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Moreover, in view of the unique specificity of KGF for keratinocytes, its inability to induce the proliferation of vascular endothelial cells or fibroblasts, and its lack of cytotoxicity, the truncated molecules and analogs thereof are a preferred agent of choice for wound healing applications, particularly where there is a desire to promote re-epithelialization of the skin. The truncated KGF molecules are also particularly useful in corneal epithelial repair. Other uses of the molecules include applications that utilize the specificity for epithelial cells found in the gastrointestinal tract.

The fragments of the present invention may be conjugated to other molecules suitable for its intended use. For example, the KGF polypeptides can be conjugated to a toxin molecule, such as ricin A, diphtheria toxin, or saporin for destruction of its target cell, i.e., epithelial cells, particularly, keratinocytes. Such KGF toxin conjugates suitable for use herein can be produced by methods known in the art, for example, U.S. Pat. Nos. 4,771,128, 4,808,705, and 4,894,443 and International Publication No. WO 92/04918.

The compositions of the invention comprise the molecules described above, together with one or more pharmaceutically acceptable excipients or vehicles, and optionally other therapeutic and/or prophylactic ingredients. Such excipients include liquids such as water, saline, glycerol, polyethyleneglycol, hyaluronic acid, ethanol, etc. Suitable excipients for nonliquid formulations are also known to those of skill in the art. Pharmaceutically acceptable salts can be used in the compositions of the present invention and include, for example, mineral acid salts such as hydrochlorides, hydrobromides, phosphates, sulfates, and the like; and the salts of organic acids such as acetates, propionates, malonates, benzoates, and the like. A thorough discussion of pharmaceutically acceptable excipients and salts is available in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

Additionally, auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, biological buffering substances, surfactants, and the like, may be present in such vehicles. A biological buffer can be virtually any solution which is pharmacologically acceptable and which provides the formulation with the desired pH, i.e., a pH in the physiologically

WO 03/016505

PCT/US02/26929

acceptable range. Examples of buffer solutions include saline, phosphate buffered saline, Tris buffered saline, Hank's buffered saline, and the like.

Particularly preferred compositions are those which are applied topically, such as ointments, pastes, powders, dressings, creams and plasters. Such topical compositions may also include topical anesthetics, such as but not limited to, benzocaine, lidocaine, dibucaine, dyclonine hydrochloride, pramoxine hydrochloride, proparacaine hydrochloride, tetracaine, benoxinate hydrochloride, butamben picrate, clove oil and eugenol, as well as combinations and derivatives of the above. Ophthalmic compositions for direct delivery for the eye are also of particular use with the KGF fragments of the invention. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990) for a discussion of various topical and ophthalmic compositions.

As explained above, once formulated, the compositions of the invention are generally administered topically or ophthalmically. However, other modes of administration include parenteral administration, for example, intravenously, intra-arterially, intra-articularly (e.g., into the knee), subcutaneously, intradermally, intramuscularly, transdermally, intranasally, mucosally, and by aerosol administration. For example, the composition can be administered by inhalation, e.g., as a nasal or mouth spray or aerosol. The compositions may also be delivered *in situ*, e.g., by implantation.

A pharmaceutically or therapeutically effective amount of the composition will be delivered to the subject. The precise effective amount will vary from subject to subject and will depend upon the species, age, the subject's size and health, the nature and extent of the condition being treated, recommendations of the treating physician, and the therapeutics or combination of therapeutics selected for administration. Thus, the effective amount for a given situation can be determined by routine experimentation. For purposes of the present invention, generally a therapeutic amount if administered topically will be in the range of about 0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of wound to approximately 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of wound, preferably about 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of wound to approximately 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of wound, more preferably about 1-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of wound to approximately 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, or any integer between these values, such as 21, 22, 23, 24...30, 31, 32, 33, 34...40, 41, 43...50...60..., and

WO 03/016505

PCT/US02/26929

so on. For parenteral administration, typical doses will be in the range of about 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/day to about 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, more preferably about 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ to about 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, more preferably 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ to about 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ in one or more doses. Typically, if polynucleotides are delivered, the doses will be at least an order of magnitude lower. The subject may be administered as many doses as is required to reduce and/or alleviate the signs, symptoms, or causes of the disorder in question, or bring about any other desired alteration of a biological system. In any event, the amount of KGF fragment present in the subject composition is an amount less than the amount of KGF₁₆₃ necessary in order to obtain an equivalent response. This amount is readily determined by comparing the bioactivity of the fragment in question to that of KGF₁₆₃, as described above.

III. Experimental

Below are examples of specific embodiments for carrying out the present invention. The examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (e.g., amounts, temperatures, etc.), but some experimental error and deviation should, of course, be allowed for.

Enzymes were purchased from commercial sources, and used according to the manufacturers' directions. Radionucleotides and nitrocellulose filters were also purchased from commercial sources.

In the cloning of DNA fragments, except where noted, all DNA manipulations were done according to standard procedures. See, Sambrook et al., *supra*. Restriction enzymes, T₄ DNA ligase, DNA polymerase I, Klenow fragment, and other biological reagents were purchased from commercial suppliers and used according to the manufacturers' directions. Double-stranded DNA fragments were separated on agarose gels.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Example 1Construction of truncated KGF Yeast Vectors for
Intracellular Yeast Expression

5 This example describes a procedure for construction of yeast expression vectors for intracellular expression of the various truncated KGF molecules for use with the subject invention.

10 The expression vectors included the particular truncated KGF coding sequence under the control of the ADH2/GAPDH promoter, a hybrid yeast promoter. In particular, for each different truncation, two oligos were used (see below), a top strand and a bottom strand. The oligos were annealed and then placed in a ligation reaction. The ligation reactions included the plasmid pSI3, cut at Nco and Sal sites, a Kpn/Sal fragment, encoding a truncated KGF and one of the annealed oligo pairs. The oligo pairs encoded the amino terminus of the particular truncated KGF protein desired and were designed to link the Nco site of the vector to the Kpn site of the KGF encoding fragment. Plasmid 15 pSI3 is a derivative of pYAS11, which was deposited with the ATCC, Manassas, VA, on Feb. 27, 1985, and assigned ATCC Accession No. 20745. The construction of pYAS11 is described in U.S. Pat. No. 4,751,180.

20 The various oligos for the completed truncated KGFs were as follows. The "X" in the oligo sequences represents a 5' phosphate group.

25 **KGF_{des1-15}:**
5' XCATGAGCAGCCCTGAGCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAG
GGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTCTGCGAACACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:1)
5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCTCACTCTTATATCCCCCTTCCATGTAATCATAACTTCTTGTCGCTCAGGGCTGCT 3' (SEQ ID NO:2)

WO 03/016505

PCT/US02/26929

KGF_{des1-18}:5' XCATGGAGCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGGGGATATAA
GAGTGAGAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:3)5 5' XCACTGTGTCGACAGAAGAGTCTTCACTCTTATATCCCTCCATGT
AATCATAACTTCITGTGTGTCCTC 3' (SEQ ID NO:4)KGF_{des1-19}:5' XCATGCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGGGGATATAAGAG
10 TGAGAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:5)5' XCACTGTGTCGACAGAAGAGTCTTCACTCTTATATCCCTCCATGT
AATCATAACTTCITGTGTGTCG 3' (SEQ ID NO:6)15 KGF_{des1-20}:
5' XCATGCACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGGGGATATAAGAGTGA
GAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:7)5' XCACTGTGTCGACAGAAGAGTCTTCACTCTTATATCCCTCCATGT
20 AATCATAACTTCITGTGTG 3' (SEQ ID NO:8)KGF_{des1-21}:5' XCATGACCAGAAGTTATGATTACATGGAAGGGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTT
CTGTCGAACACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:9)25 5' XCACTGTGTCGACAGAAGAGTCTTCACTCTTATATCCCTCCATGTAATCATA
CTTCTGGT 3' (SEQ ID NO:10)KGF_{des1-22}:

30 5' XCATGAGAAGTTATGATTACATGGAAGGGGGATATAAGAGTGAGAAGA

WO 03/016505

PCT/US02/26929

CTCITCTGTCGACACACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:11)

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGCTTCTCACTCTTATATCCCTCCTTCATGT
AATCATAACTTCT 3' (SEQ ID NO:12)

5

KGF_{des1-24}:5' XCATGTATGATTACATGGAAGGAGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTTCT
GTCGAACACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:13)

10

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGCTTCTCACTCTTATATCCCTCCTTCATGT
AATCATA 3' (SEQ ID NO:14)KGF_{des1-25}:

15

5' XCATGGATTACATGGAAGGAGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTCTGTC
GAACACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:15)5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGCTTCTCACTCTTATATCCCTCCTTCATGT
AATC 3' (SEQ ID NO:16)

20

KGF_{des1-26}:5' XCATGTACATGGAAGGAGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTCTGTCGAA
CACAGTGGTAC 3' (SEQ ID NO:17)

25

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGCTTCTCACTCTTATATCCCTCCTTCAT
GTA 3' (SEQ ID NO:18)KGF_{des1-30}:5' XCATGGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGGTAC 3'
(SEQ ID NO:19)

30

WO 03/016505

PCT/US02/26929

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCTCACTCTTATATCCCC 3' (SEQ ID
NO:20)

KGF_{des1-35}:

5' XCATGAGAAGACTCTCTGTCGAACACAGTGTTAC 3' (SEQ ID NO:21)

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAGTCTTCT 3' (SEQ ID NO:22)

KGF_{des1-37}:

10 5' XCATGCTCTCTGTCGAACACAGTGTTAC 3' (SEQ ID NO:23)

5' XCACTGTGTTCGACAGAAGAG 3' (SEQ ID NO:24)

15 Additionally, expression vectors encoding mature, full-length KGF (KGF₁₆₃) and a truncated KGF molecule with a deletion of the first 23 N-terminal amino acids, KGF_{des1-23}, were produced. See, e.g., U.S. Patent No. 5,677,278. An analog of KGF_{des1-22}, with an alanine residue at the N-terminus instead of the naturally occurring arginine, was also produced.

20 Example 2

Intracellular Expression of Truncated KGF Molecules by Yeast Cells

The expression vectors described above were used to transform *Saccharomyces cerevisiae* cells by lithium acetate transfection, using standard methods. See, e.g., "Guide to Yeast Genetics & Molecular Biology," Methods in Enzymology, Vol. 194 (Academic Press, 1991). Transformants were selected on uracil-deficient media having 2% glucose. Transformants were incubated overnight in 5 ml of leucine-deficient media with 5% glucose at 30°C in a shaking apparatus. The culture for production of the recombinant truncated molecules was a 20 ml culture, seeded with the overnight culture in YEP medium with 2% glucose for approximately 72 hours.

30

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Example 3Purification of the Truncated Recombinant KGF Molecules

The cultures from above were centrifuged to form a yeast cell paste and cells were lysed in 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris, pH 8.0, 0.1 M dithiothreitol (DTT), using standard techniques. The cell lysate was generated as a batch, using glass beads in a Dynomill DKL-Pilot. Lysate generation was complete when cell breakage was ≥95%. The homogenate was cooled to 4-8°C by using a suitable heat exchanger. Debris was then removed by centrifugating the lysate at 15,000 g for thirty minutes at 4°C. The NaCl concentration of the supernatant was adjusted to 0.5 M NaCl and recombinant, truncated KGF was purified from the supernatant as follows.

A. Heparin Sepharose™ Affinity Chromatography

Supernatant obtained as described above was immediately applied to a Heparin Sepharose (HS) resin column. The lysed product was allowed to run for approximately 30 minutes at 4°C through a 30 ml bed of HS resin. The column was equilibrated in a buffer containing 0.5 M NaCl, 0.1 M DTT and 10 mM Tris-HCl at pH 7.3. Once the cell lysate was loaded, the column was washed extensively with the equilibration buffer until the absorbance at 280 nm returned to baseline. Protein was eluted from the HS column with an increasing step-wise NaCl gradient. The NaCl concentrations were 1 M and 2 M NaCl, in 10 mM Tris-HCl at pH 7.3, 0.1 M DTT. The flow rate of the column during elution was approximately 90 ml/hr and 4 ml size fractions were collected.

The fractions were tested for KGF bioactivity utilizing Balb/Mk cells. The assay is described below. The fractions with the highest bioactivity were eluted with 1 M NaCl and were pooled. Before the pooled fractions were loaded onto the next column, the fractions were dialyzed overnight against 0.2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl at pH 7.3.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

B. Mono S Cation Exchange Chromatography

The pooled fractions eluted from the HS column were loaded with a Super loop onto a Mono S column linked to a fast high pressure liquid chromatography (FPLC) system (Pharmacia, Piscataway, N.J.). The Mono S cation exchange column was 5 equilibrated with 10 mM Tris at pH 7.3. When the pooled fractions were loaded, the column was washed extensively at a flow rate of 1 ml/min. with the equilibration buffer until the absorbance returned to baseline. Then, protein was eluted from the column with a linear NaCl gradient, 0.2 M to 1 M NaCl in 10 mM Tris, at pH 7.3 at a flow rate of 1 ml/min., and 1 ml fractions were collected.

10 A major protein peak eluted at about 0.6 M NaCl. Fractions across the protein peak were assayed for bioactivity and active fractions were pooled and subjected to SDS-PAGE analysis. The protein concentration of the pooled fractions was determined by Bradford assay according to instructions accompanying the protein assay kit from BioRad (Richmond, Calif., USA).

15

Example 4KGF Bioactivity Assay Utilizing Balb/Mk Cells

KGF bioactivity was assessed by the ability of the pooled 0.6 M NaCl fractions to 20 promote growth of Balb/Mk cells. In particular, stock cultures of Balb/Mk cells were grown and maintained in low calcium Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.25 µg/ml fungizone, and 10 ng/ml acidic FGF (aFGF). The cells were incubated at 37°C in a 10% CO₂ atmosphere with 99% 25 humidity. For the bioactivity assay, the cells were seeded in 12-well plates at a density of 5 x10³ cells per well in 1 ml of medium as described above for the stock cultures (except that the seeding medium contained no aFGF), and as described in Gospodarowicz et al. *J. Cell. Physiol.* (1990) 142: 325-333.

Ten microliter aliquots of the desired column fractions were diluted into 1 ml of 0.2% (w/v) gelatin in phosphate buffered saline (PBS). Ten microliters of this dilution were added to Balb/Mk cells seeded in 12-well cluster plates containing 22 mm wells, at 5

WO 03/016505

PCT/US02/26929

$\times 10^3$ cells per well, and a 10 μ l aliquot of either the diluted column fractions or medium containing 10 ng aFGF were added to the cells every other day.

After seven days in culture, the cells were trypsinized and the final cell density was determined using a CoulterTM counter (Coulter Electronics, Hialeah, Fla., USA). The cells were released from the plates by replacing the culture medium with a solution containing 0.9% NaCl, 0.01 M sodium phosphate (pH 7.4), 0.25% trypsin, and 0.02% EDTA (STV). The cells were incubated in this solution for 5-10 minutes at 37°C and then the stock culture medium was added to the cells. The cells were then counted using a CoulterTM counter. The final cell density was graphed as a function of column fraction protein concentration. The protein concentration was graphed on a log scale.

The ED₅₀ was calculated by (a), dividing in half the difference between the lowest and highest cell density value of the curve; and (b), determining from the graph what protein concentration corresponds to that cell density number obtained in (a).

Results of a typical bioassay for KGF_{des1-22}, KGF_{des1-23}, KGF_{des1-24}, KGF_{des1-25} and KGF_{des1-30} are shown in Figure 2A. A similar comparison was done with KGF_{des1-21}, KGF_{des1-26}, KGF_{des1-30}, acidic FGF (aFGF) and full-length KGF (FL-KGF) and results are shown in Figure 2B. When the ED₅₀ of the different truncated forms was normalized to that of native KGF taken as 100% (Table 1) KGF_{des1-22}, KGF_{des1-23} and KGF_{des1-24} had significant increases in their biological activity. In particular, KGF_{des1-23} was approximately 6-fold more active, while KGF_{des1-23} and KGF_{des1-24} were 10-fold more active than native KGF₁₆₃. Even when compared on a per molecule basis and adjusted for molecular weight, these species displayed greatly enhanced activity relative to KGF₁₆₃. Deletion beyond KGF_{des1-24} to KGF_{des1-26} rendered the truncated forms of KGF with comparable activity to the native form, and deletions beyond KGF_{des1-26} led to a reduction in biological activity.

It should be noted that KGF_{des1-35} which retained only 2-3% of the biological activity of the native form, was as active as aFGF when tested on Balb/Mk cells. Since this form is more homologous to aFGF than any of the other truncations, the question was raised as to whether this truncated form of KGF might have lost the target cell specificity peculiar to KGF. As explained above, KGF only stimulates cells of epithelial origin in

WO 03/016505

PCT/US02/26929

contrast to other forms of FGF which have a wide range of target cells, and endothelial cells in particular. However, this apparently does not occur since when tested on either adrenal cortex-derived capillary endothelial cells (ACE) or adult bovine aortic endothelial cells (BAE) cells (see below), in the presence or absence of heparin, KGF_{des1-35}, as well as other shorter truncations, were inactive (Figure 3).

5

10

15

20

| Table 1. Mitogenic Activity of KGF Polypeptides | | | |
|---|---|--------------------------------|--|
| KGF Polypeptide | Average % Relative Activity (per unit weight basis)* | MW of KGF _{xxx} ** | Average % Relative Activity (on a per molecule basis) |
| Full Length (KGF ₁₋₅) | 100 | 18882 | 100 |
| KGF _{des1-15} | 154 | 17229 | 141 |
| KGF _{des1-18} | 166 | 16958 | 149 |
| KGF _{des1-19} | 100 | 16829 | 89 |
| KGF _{des1-20} | 187 | 16673 | 165 |
| KGF _{des1-21} | 200 | 16536 | 175 |
| KGF _{des1-22} | 600 | 16435 | 522 |
| KGF _{des1-23} | 1000 | 16278 | 862 |
| KGF _{des1-24} | 1000 | 16191 | 857 |
| KGF _{des1-25} | 150 | 16028 | 127 |
| KGF _{des1-26} | 100 | 15913 | 84 |
| KGF _{des1-20} | 28.5 | 15433 | 23 |
| KGF _{des1-35} | 3 | 14892 | 2 |

WO 03/016505

PCT/US02/26929

^{*}ED₅₀ of (KGF_{xxx} ÷ KGF₁₆₃) X 100^{**}Molecular weight (MW) was calculated using the Vector NTI program (December 22, 1999), Infomax, Inc.

5

10 The activity of an analog of KGF_{del1-22}, with an alanine substituted for the naturally occurring N-terminal arginine, expressed in *E. coli*, was compared to an *E. coli*-expressed KGF_{del1-23}. The analog was tested multiple times and showed an ED₅₀ similar to that of *E. coli*-expressed KGF_{del1-23}.

Example 5

KGF Bioactivity on ABAE or ACE Cells

15 KGF can be characterized by its lack of activity on vascular endothelial cells derived from large vessels (adult bovine aortic endothelial cells, ABAE) or capillary cells (adrenal cortex-derived capillary endothelial cells, ACE) as compared with other forms of FGF, such as basic FGF (bFGF) or acidic FGF (aFGF). To analyze whether the various truncated forms of FGF retained this cell specificity, their biological activity on endothelial cells was tested.

20 Stock cultures of ABAE and ACE cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% bovine serum, 0.25 µg/ml fungizone, and 2 ng/ml bFGF. The cells were incubated at 37°C with a 10% CO₂ concentration and 99% humidity.

25 In the mitogenic assay, either 5 x 10³ ABAE or ACE cells were plated per well in 12-well plates in stock culture medium, as described in Gospodarowicz et. al. *Proc. Natl. Acad. USA* (1976) 73:4120-4124; Gospodarowicz et. al. *J. Cell. Physiol.* (1976) 127:121-136; and Gospodarowicz et. al. *Proc. Natl. Acad. USA* (1989) 86:7311-7315.

30 Saturating concentrations of KGF₁₆₃, as well as the various truncated variants of KGF and basic FGF were added every other day. After 7 days in culture, cells were

WO 03/016505

PCT/US02/26929

trypsinized as described for the Balb/MK cell cultures and the final cell density was determined using a Coulter counter.

As shown in Figure 3, all of the tested N-terminally truncated KGF polypeptides lacked activity on both ABAE and ACE as compared with bFGF. The truncations were based, in part, on structure alignment with acidic FGF. The results confirm that the potency of native KGF can be changed to that of acidic FGF without changing cell specificity. Acidic FGF is a known mitogen for Balb/Mk cells and its potency is 10-fold less than that of KGF. This reflects its lower binding affinity for the KGF receptor. Removal of the first 30 to 35 amino acids of native KGF leads to the strong decrease in biological activity shown by those truncated analogs (28.5 and 3% that of native KGF). At the same time, the degree of homology between acidic FGF and KGF increases when cell structural determinants for interacting with the FGF receptor are kept. Thus, KGF analogs with longer deletions behave more like acidic FGF. Surprisingly, even with the longest deletion, the target cell specificity typical of KGF is kept and the analogs, in contrast with acidic FGF or basic FGF, are not mitogenic for vascular endothelial cells.

Example 6

Thermal Stability Studies

The ability of native KGF and various N-terminally truncated KGF polypeptides to withstand elevated temperatures was examined. Samples containing 0.1 mg/ml protein were prepared in Ca^{++} Mg^{++} -free PBS and 100 μl of each sample was aliquoted into 1 ml plastic vials. The vials were sealed and placed in a 37°C incubator. At predetermined time intervals, vials were withdrawn and analyzed for the loss of soluble proteins.

30 μl aliquots were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. SDS-PAGE was performed on an electrophoresis system (Novex, San Diego, California, U.S.A.) using Tris-glycine precast gels (5% to 20% acrylamide, according to the method of Laemmli *Nature* (1970) 227:680-685). Samples were mixed with reducing or non-reducing SDS sample buffer without heating before loading.

The proteins were detected by Coomassie blue staining. The stained gels were scanned by densitometry using a BioRad Model GS 700 Imaging densitometer

WO 03/016505

PCT/US02/26929

(Richmond, Calif., USA). The amount of soluble protein was determined by integrating the stained-band area and plotting the result as a function of time of incubation at 37°C. The half-life for the loss of soluble monomeric protein was then estimated from these kinetic curves.

5 The biological activity of the samples at various time intervals was also determined using the Balb/Mk cell proliferation assay as described above. The half-life for biological activity of the various samples was determined by plotting the ED₅₀ of the samples as a function of time of incubation at 37°C.

In particular, the thermal stability and oligomer formation of native KGF (KGF₁₆₃) 10 verses KGF_{des1-23} was assessed by incubating the KGF polypeptides (184 µg/ml native KGF and 138 µg/ml KGF_{des1-23}, diluted in PBS) for periods ranging from 0 to 8 days at 37°C. Aliquots were taken daily and their potency assessed on Balb/Mk cells, while oligomer formation was assessed by SDS-PAGE. When analyzed by SDS-PAGE, native KGF formed dimers readily. Dimerization was far less evident for KGF_{des1-23}. Also 15 striking was the decrease in staining as a function of time for the monomeric form of native KGF. Again, this was far less evident for KGF_{des1-23}.

The cell proliferation assay indicated that under these conditions, the biological half-life of native KGF was 2 days while that of KGF_{des1-23} was 7 days.

20 Thermal stability studies also indicated that KGF_{des1-15}, KGF_{des1-18}, KGF_{des1-19}, KGF_{des1-20}, KGF_{des1-21}, KGF_{des1-22}, KGF_{des1-24}, KGF_{des1-25}, KGF_{des1-26}, KGF_{des1-30} and KGF_{des1-35} were more stable than the full-length KGF, although by varying degrees. A typical stability study which lasted 24 days with samples taken every 3 days is shown in Figure 4. In this study, KGF_{des1-24} and KGF_{des1-15} (100 µg/ml) were diluted in PBS and incubated at 37°C. Samples were analyzed under non-reducing conditions by SDS-PAGE. Gels were 25 then stained and scanned by densitometry.

Extension of the thermal stability studies from 9 days to 24 days permitted a more accurately defined half-life solution of KGF_{des1-23} versus native KGF. As shown in Figure 5, the half-life of native KGF was 7 days versus 17 days for KGF_{des1-23}.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

These results, taken together, indicate that the difference in biological activity between native KGF and the truncated molecules might be caused, in part, by differing thermal stability.

5

Example 7
Acid Stability at pH 2.1

To follow the formation of oligomer as a function of time, native KGF and KGF_{des1-23} samples, maintained for various time intervals at 37°C, were analyzed by reverse phase HPLC. 100 µl samples were diluted to 1 ml in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water, pH 2.1. The sample was then applied to a Vydac C₄ column (0.46 cm x 25 cm, 5 µm particle size, 300 Å pore size) equilibrated in 0.1% (v/v) TFA. Protein was eluted with a linear 115 min multilinear acetonitrile gradient in (20-100%). The absorbance peaks were analyzed for their protein content by integrating their surface area. The amount of monomeric protein was plotted as a function of time. The half-life for the monomeric protein was then estimated as described above. To determine the formation of oligomers, samples were also analyzed under non-reducing conditions by SDS-PAGE. Biological activity of the various protein peaks was also determined using the Balb/Mk cell proliferation assay as described above.

In particular, native KGF (28 µg/ml) and KGF_{des1-23} (36 µg/ml) were diluted in PBS and incubated for periods of time ranging from 0 to 9 days at 37°C and aliquots were analyzed daily by reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) under acid conditions (pH 2.1). A single peak of UV absorbance was observed which eluted at 60 minutes for both native and KGF_{des1-23}. The intensity of the peak decreased as a function of time. However, the decrease was far more pronounced for native KGF than KGF_{des1-23}, so that by day 9, integration of both peaks indicated that the amount of native KGF was one-third that of KGF_{des1-23}. The decrease in mass of native KGF was associated with a drastic decrease in biological activity. By day 7, native KGF had become inactive. In contrast, KGF_{des1-23} still retained 50% of its original biological activity (Figure 6).

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Example 8**Comparison of the Bioactivity of Native KGF versus KGF_{des1-23} when****Added Only Once Versus Every Other Day**

In the cell proliferation assay described above, increasing concentrations of native KGF and KGF_{des1-23} were added every other day. If stability is the mechanism for enhanced activity, there should still be the same difference in dose response when native KGF or truncated KGF polypeptides are added once, rather than every other day, even though overall cell proliferation is less. To test this hypothesis, varying concentrations of KGF_{des1-18}, KGF_{des1-23} and KGF_{des1-25} were added only once, in the concentrations shown in Figure 7. As shown in Figure 7 and Table 2, the same difference in biological activity was observed with KGF_{des1-23}. In particular, KGF_{des1-23} was 13-fold more active than native KGF when added once, versus 10-fold more active when added every other day. Additionally, both the KGF_{des1-18} and KGF_{des1-25} polypeptides showed an increase in activity over native KGF. This confirms that increased stability is one of the mechanisms which contributes to increased potency.

20

| Table 2. Comparison of the Biological Activity of Native Versus Truncated KGFs Added Either Once or Every Other Day | | |
|---|--------------------|-----------------------|
| KGF Polypeptide | Average % Activity | |
| | Added Once | Added Every Other Day |
| Full Length | 100 | 100 |
| KGF _{des1-18} | 173 | 150 |
| KGF _{des1-23} | 1320 | 1000 |
| KGF _{des1-25} | 173 | 160 |

25

WO 03/016505

PCT/US02/26929

Example 9Is Protease Contamination Responsible for the Rapid Disappearance of Native KGF

To rule out the possibility that protease contamination of the native KGF preparation, absent from the KGF_{des1-23} preparation, was responsible for the rapid disappearance of native KGF, the following experiment was done. Native KGF and KGF_{des1-23} (100 µg/ml) were diluted in PBS and incubated at 37°C either alone or mixed at an equal ratio (v/v). Samples were taken on day 3, 6, 9 and 12 and analyzed by SDS-PAGE, as described above. After staining, the gels were scanned by densitometry. If the native KGF disappeared and KGF_{des1-23} did not, protease contamination would be ruled out.

Native KGF disappeared by day 6. However, KGF_{des1-23} could still be seen after 12 days, eliminating the possibility of protease contamination as a reason for the disappearance of native KGF. Surprising however, was the difference in the band-staining intensity when KGF_{des1-23} was incubated alone versus incubated in combination with native KGF. The staining intensity of the KGF_{des1-23} band was far greater when incubated alone than when mixed with the native KGF. It is possible that when KGF_{des1-23} is incubated with native KGF, complexes form and KGF_{des1-23} is taken out of solution.

When the biological activity of native KGF versus KGF_{des1-23} was analyzed, a 10-fold increase in potency was observed which correlated with greater thermal stability of the truncated form versus the native form. Thus, increased stability could in part explain the increased potency. This however does not appear to be the only mechanism contributing to increased activity. Without being bound by a particular theory, the lack of activity of native KGF may be due to precipitation out of solution. When various truncations above were analyzed for stability and biological activity, they showed increased stability and biological activity as compared to the native form. However, there was little correlation between increased stability and increased biological activity. For example, KGF_{des1-15} and KGF_{des1-24} had comparable thermal stability but KGF_{des1-24} was 10-fold more potent than native KGF while KGF_{des1-15} was 1.5-fold more active. Therefore other mechanisms likely exist which contribute to the increased potency of the most potent molecules, KGF_{des1-22}, KGF_{des1-23}, and KGF_{des1-24}. It is also remarkable that the domain

WO 03/016505

PCT/US02/26929

conferring maximum increase in potency is limited, consisting of three residues. These three residues may therefore provide optimum conformation of KGF in its interaction with the receptor.

Truncation confirms that the potency of native KGF can be changed to that of aFGF without changing cell specificity. Acidic FGF is a known mitogen for Balb/Mk cells and it is 10-fold less active than KGF. This is due to its lower binding affinity for the KGF receptor. Removal of the first 30 to 35 amino acids led to a strong decrease in biological activity of the truncated polypeptides (28.5% and 3%, respectively, of native KGF). At the same time, the longer deletions increase the degree of homology between aFGF and KGF and increase cell structural determinants for interacting with the FGF receptor. Thus, the longer the deletions, the more like aFGF the truncated KGF polypeptides behave. Surprisingly, even the longest deletion retained the target cell specificity typical of KGF, i.e., for cells of epithelial origin, and the shortest polypeptides, in contrast with aFGF or bFGF, were not mitogenic for vascular endothelial cells. These findings, that the NH₂ terminal domain of KGF does not seem to be involved in its cell specificity, at least as far as the first 35 residues are concerned, are in contrast with earlier reports (see, e.g., International Publication No. WO 90/08771).

Example 10

In Vivo Efficacy of N-Terminally Truncated KGF Polypeptides

Full-length KGF (KGF₁₆₃) and an N-terminally truncated molecule, KGF_{des1-23*} were tested in a rat model of healing of a surgical colonic anastomosis. In particular, KGF formulations, containing 5 mg/ml KGF₁₆₃ or 1 mg/ml KGF_{des1-23} were administered intraperitoneally to rats. Colonic crypt depth (in μ m), a measure of cellular proliferation related to healing, and bursting pressure in mm mercury, a measure of strength of the healed wound, were measured on days 2, 4 and 7 for rats given KGF₁₆₃ and on days 2, 4 and 6 for rats given the truncated molecule. Results are shown in Tables 3 and 4.

In particular, 1 mg/ml of the truncated molecule was as effective or more effective than 5 mg/ml of full-length KGF in promoting wound healing. Smaller doses of the truncated molecule were also effective. Based on these results, it is likely that other N-

WO 03/016505

PCT/US02/26929

terminally truncated KGFs, particularly KGF_{des1-22} and KGF_{des1-24}, are also as effective, if not more effective, for wound healing using smaller doses than that required using KGF₁₆₃.

5

| Table 3. Colonic Crypt Depth in μm , Expressed as Percent of Vehicle Control | | |
|---|--------------------------|------------------------|
| Day Measured | Full Length KGF, 5 mg/kg | Truncated KGF, 1 mg/kg |
| 2 | 127 | 176 |
| 4 | 125 | 129 |
| 7 (6 of KGF _{des1-23}) | 154 | 138 |

10

| Table 4. Bursting Pressure in mm Hg, Expressed as Percent of Vehicle Control | | |
|--|--------------------------|------------------------|
| Day Measured | Full Length KGF, 5 mg/kg | Truncated KGF, 1 mg/kg |
| 2 | 134 | 163 |
| 4 | 149 | 151 |
| 7 (6 of KGF _{des1-23}) | 119 | 148 |

15

Thus, novel KGF compositions and methods for using the same are disclosed. Although preferred embodiments of the subject invention have been described in some detail, it is understood that obvious variations can be made without departing from the spirit and the scope of the invention as defined by the appended claims.

20

WO 03/016505

PCT/US02/26929

We Claim:

1. Use of a KGF polypeptide in the manufacture of a medicament for stimulating epithelial cell proliferation, wherein said KGF polypeptide is selected from the group consisting of:
 - 5 (i) KGF_{des1-15} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 16-163, inclusive, of Figure 1;
 - (ii) KGF_{des1-18} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 19-163, inclusive, of Figure 1;
 - 10 (iii) KGF_{des1-19} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 20-163, inclusive, of Figure 1;
 - (iv) KGF_{des1-20} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 21-163, inclusive, of Figure 1;
 - (v) KGF_{des1-21} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 22-163, inclusive, of Figure 1;
 - 15 (vi) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1;
 - (vii) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1;
 - 20 (viii) KGF_{des1-25} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 26-163, inclusive, of Figure 1;
 - (ix) a biologically active analog of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), wherein said biologically active analog consists of the same number of amino acids as (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), respectively, and has at least 70% sequence homology thereto,
 - 25 wherein said KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein said KGF polypeptide is present in a therapeutically effective amount and the therapeutically

WO 03/016505

PCT/US02/26929

effective amount is 75% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

2. The use of claim 1, wherein said biologically active analog has at least 80% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

3. The use of claim 1, wherein said biologically active analog has at least 90% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

10 4. The use of claim 1, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog thereof wherein said biologically active analog consists of 141 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto, and wherein the therapeutically effective amount is 50% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

15 5. The use of claim 4, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1.

20 6. The use of claim 1, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog thereof wherein said biologically active analog consists of 139 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto, and wherein the therapeutically effective amount is 50% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

25 7. The use of claim 6, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

8. Use of a KGF polypeptide in the manufacture of a medicament for stimulating epithelial cell proliferation, wherein said KGF polypeptide is (i) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1, or (ii) a biologically active analog of (i) which consists of the same number of amino acids as (i) and has at least 70% sequence homology thereto,

5 wherein said KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein said KGF polypeptide is present in a therapeutically effective amount and the therapeutically effective amount is 10% to 75% of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

9. The use of claim 8, wherein said biologically active analog has at least 80% sequence homology to (i) or (ii).

15

10. The use of claim 8, wherein said biologically active analog has at least 90% sequence homology to (i) or (ii).

20

11. The use of claim 8, wherein said biologically active analog consists of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1 with the N-terminal arginine residue substituted with an alanine residue.

25

12. The use of claim 8, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1.

13. The use of claim 8, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 50% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

30

WO 03/016505

PCT/US02/26929

14. The use of claim 8, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 25% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

5 15. The use of claim 10, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 20% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

10 16. Use of a KGF polypeptide in the manufacture of a medicament for stimulating epithelial cell proliferation, wherein said KGF polypeptide is (i) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1, or (ii) a biologically active analog of (i) which consists of the same number of amino acids as (i) and has at least 70% sequence homology thereto,

15 wherein said KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein said KGF polypeptide is present in a therapeutically effective amount and the therapeutically effective amount is 5% to 75% of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

20 17. The use of claim 16, wherein said biologically active analog has at least 80% sequence homology to (i) or (ii).

25 18. The use of claim 16, wherein said biologically active analog has at least 90% sequence homology to (i) or (ii).

19. The use of claim 16, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

20. The use of claim 16, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 50% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

5 21. The use of claim 16, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 25% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

10 22. The use of claim 16, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 20% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

15 23. The use of claim 16, wherein the therapeutically effective amount is 5% to 10% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

24. Use of a KGF polypeptide in the manufacture of a medicament for treating wounds, wherein said KGF polypeptide is selected from the group consisting of:

20 (i) KGF_{des1-15} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 16-163, inclusive, of Figure 1;

(ii) KGF_{des1-16} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 19-163, inclusive, of Figure 1;

(iii) KGF_{des1-19} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 20-163, inclusive, of Figure 1;

25 (iv) KGF_{des1-20} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 21-163, inclusive, of Figure 1;

(v) KGF_{des1-21} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 22-163, inclusive, of Figure 1;

30 (vi) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1;

WO 03/016505

PCT/US02/26929

(vii) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1;

(viii) KGF_{des1-25} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 26-163, inclusive, of Figure 1;

5 (ix) a biologically active analog of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), wherein said biologically active analog consists of the same number of amino acids as (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), respectively, and has at least 70% sequence homology thereto,

10 wherein said KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein said KGF polypeptide is present in a therapeutically effective amount and the therapeutically effective amount is 75% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

15

25. The use of claim 24, wherein said biologically active analog has at least 80% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

20

26. The use of claim 24, wherein said biologically active analog has at least 90% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

25

27. The use of claim 24, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog thereof wherein said biologically active analog consists of 141 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto, and wherein the therapeutically effective amount is 50% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

28. The use of claim 27, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1.

5 29. The use of claim 24, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog thereof wherein said biologically active analog consists of 139 amino acids and has at least 70% sequence homology thereto, and wherein the therapeutically effective amount is 50% or less of the amount on a per molecule basis 10 of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

30. The use of claim 29, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1.

15 31. Use of a KGF polypeptide in the manufacture of a medicament for treating wounds, wherein said KGF polypeptide is (i) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1, or (ii) a biologically active analog of (i) which consists of the same number of amino acids as (i) 20 and has at least 70% sequence homology thereto,

wherein said KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein said KGF polypeptide is present in a therapeutically effective amount and the therapeutically 25 effective amount is 10% to 75% of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

32. The use of claim 31, wherein said biologically active analog has at least 80% sequence homology to (i) or (ii).

30

WO 03/016505

PCT/US02/26929

33. The use of claim 31, wherein said biologically active analog has at least 90% sequence homology to (i) or (ii).

5 34. The use of claim 31, wherein said biologically active analog consists of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1 with the N-terminal arginine residue substituted with an alanine residue.

10 35. The use of claim 31, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1.

36. The use of claim 31, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 50% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

15 37. The use of claim 31, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 25% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

20 38. The use of claim 31, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 20% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

25 39. Use of a KGF polypeptide in the manufacture of a medicament for treating wounds, wherein said KGF polypeptide is (i) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1, or a biologically active analog of (i) which consists of the same number of amino acids as (i) and has at least 70% sequence homology thereto,

30 wherein said KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and

WO 03/016505

PCT/US02/26929

specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein said KGF polypeptide is present in a therapeutically effective amount and the therapeutically effective amount is 5% to 75% of the amount on a per molecule basis of KGF₁₋₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response.

5

40. The use of claim 39, wherein said biologically active analog has at least 80% sequence homology to (i) or (ii).

10

41. The use of claim 39, wherein said biologically active analog has at least 90% sequence homology to (i) or (ii).

42. The use of claim 39, wherein said KGF polypeptide is KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1.

15

43. The use of claim 39, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 50% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

20

44. The use of claim 39, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 25% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

25

45. The use of claim 39, wherein the therapeutically effective amount is 10% to 20% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

30

46. The use of claim 39, wherein the therapeutically effective amount is 5% to 10% of the amount on a per molecule basis of the amount of full-length KGF needed to elicit an equivalent therapeutic response.

WO 03/016505

PCT/US02/26929

47. A composition comprising:

(a) a therapeutically effective amount of a KGF polypeptide, wherein said KGF polypeptide is selected from the group consisting of:

5 (i) KGF_{des1-15} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 16-163, inclusive, of Figure 1;

(ii) KGF_{des1-18} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 19-163, inclusive, of Figure 1;

(iii) KGF_{des1-19} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 20-163, inclusive, of Figure 1;

10 (iv) KGF_{des1-20} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 21-163, inclusive, of Figure 1;

(v) KGF_{des1-21} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 22-163, inclusive, of Figure 1;

15 (vi) KGF_{des1-22} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 23-163, inclusive, of Figure 1;

(vii) KGF_{des1-24} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 25-163, inclusive, of Figure 1;

(viii) KGF_{des1-25} consisting of the contiguous amino acid sequence depicted at amino acid residues 26-163, inclusive, of Figure 1;

20 (ix) a biologically active analog of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), wherein said biologically active analog consists of the same number of amino acids as (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) or (viii), respectively, and has at least 70% sequence homology thereto; and

25 (x) an analog of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix), consisting of the amino acid sequence of (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix), respectively, and an additional N-terminal methionine, wherein said KGF polypeptide exhibits an increase in bioactivity relative to mature, full-length, KGF (KGF₁₆₃) as determined by the Balb/MK bioactivity assay and specifically stimulates epithelial cell proliferation, and further wherein the therapeutically

WO 03/016505

PCT/US02/26929

effective amount is 75% or less of the amount on a per molecule basis of KGF₁₆₃ needed to elicit an equivalent therapeutic response; and

(b) a pharmaceutically acceptable excipient.

5 48. The composition of claim 47, wherein said biologically active analog has at least 80% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

49. The composition of claim 47, wherein said biologically active analog has at least 90% sequence homology to (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) or (ix).

10

WO 03/016505

PCT/US02/26929

1/9

10

C N D M T P E Q M A T N V N
TGC AAT GAC ATG ACT CCA GAG CAA ATG GCT ACA AAT GTG AAC

20

C S S P E R H T R S Y D Y M E
TGT TCC AGC CCT GAG CGA CAC ACA AGA AGT TAT GAT TAC ATG GAA

30

G G D I R V R R L F C R T Q W
GGA GGG GAT ATA AGA GTG AGA AGA CTC TTC TGT CGA ACA CAG TGG

40

Y L R I D K R G K V K G T Q E
TAC CTG AGG ATC GAT AAA AGA GGC AAA GTA AAA GGG ACC CAA GAG

50

M K N N Y N I M E I R T V A V
ATG AAG AAT AAT TAC AAT ATC ATG GAA ATC AGG ACA GTG GCA GTT

60

G I V A I K G V E S E F Y L A
GGA ATT GTG GCA ATC AAA GGG GTG GAA AGT GAA TTC TAT CTT GCA

70

M N K E G K L Y A K K E C N E
ATG AAC AAG GAA GGA AAA CTC TAT GCA AAG AAA GAA TGC AAT GAA

80

D C N F K E L I L E N H Y N T
GAT TGT AAC TTC AAA GAA CTA ATT CTG GAA AAC CAT TAC AAC ACA

90

Y A S A K W T H N G G E M F V
TAT GCA TCA GCT AAA TGG ACA CAC AAC GGA GGG GAA ATG TTT GTT

100

A L N Q K G I P V R G K K T K
GCC TTA AAT CAA AAG GGG ATT CCT GTA AGA GGA AAA AAA ACG AAG

110

120

K E Q K T A H F L P M A I T
AAA GAA CAA AAA ACA GCC CAC TTT CTT CCT ATG GCA ATA ACT

130

140

150

160

163

FIG. 1

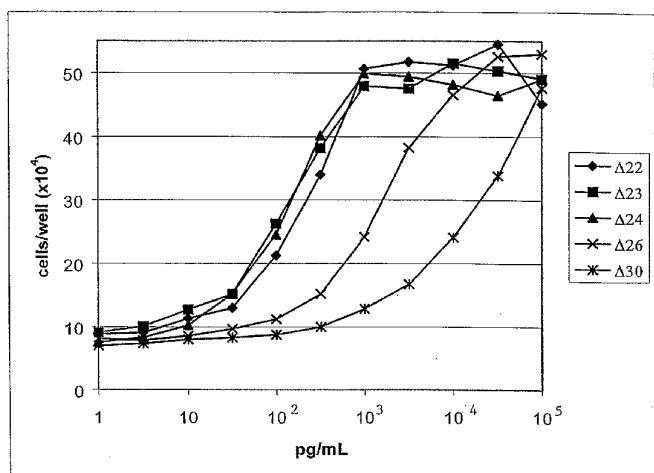


FIG. 2A

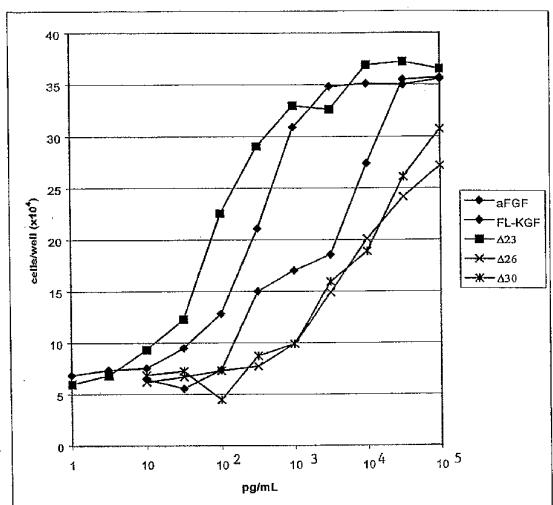


FIG. 2B

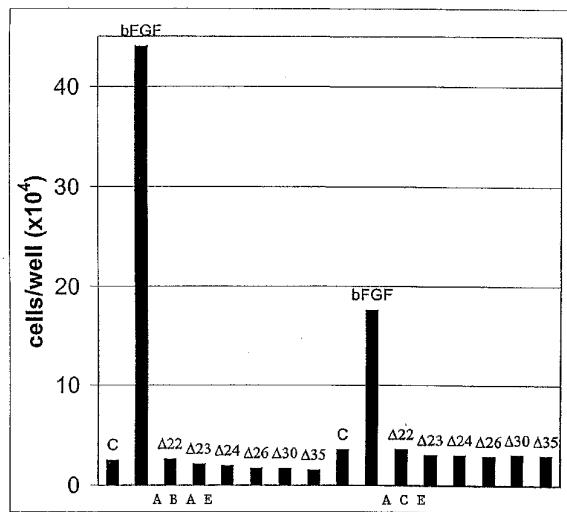


FIG. 3

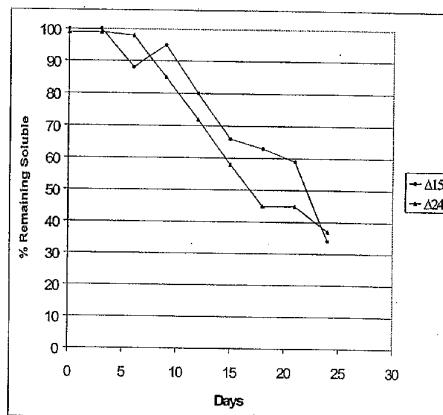


FIG. 4

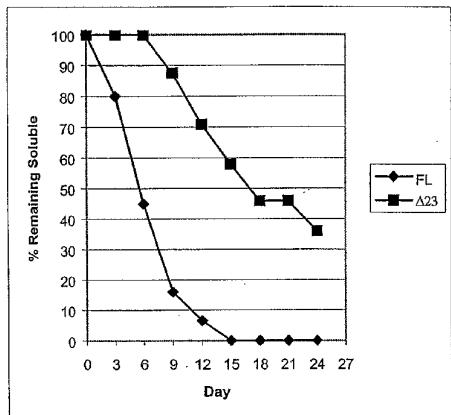


FIG. 5

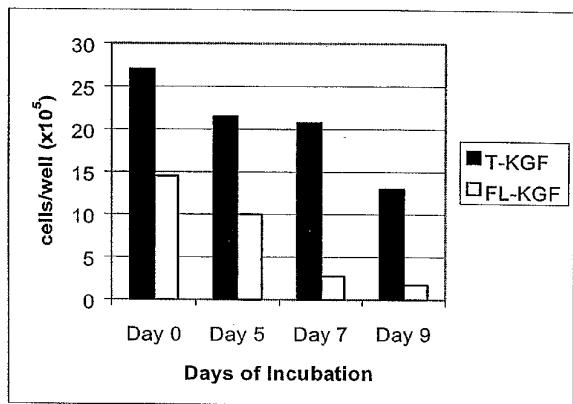


FIG. 6

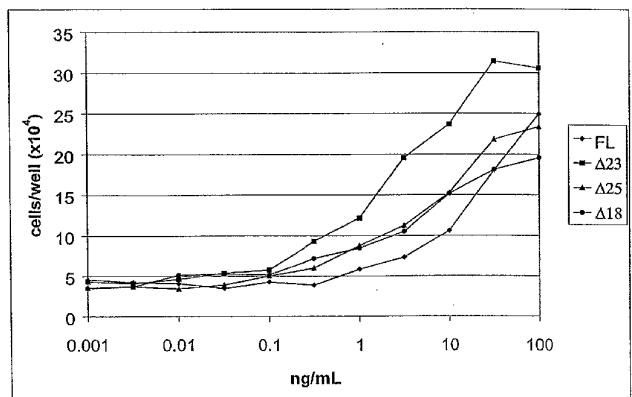


FIG. 7

WO 03/016505

PCT/US02/26929

9/9

GCT AGT TAT GAT TAC ATG GAA GGA GGG GAT ATA AGA GTG AGA AGA
A S Y D Y M E G G D I R V R R
CTC TTC TGT CGA ACA CAG TGG TAC CTG AGG ATC GAT AAA AGA GGC
L F C R T Q W Y L R I D K R G
AAA GTA AAA GGG ACC CAA GAG ATG AAG AAT AAT TAC AAT ATC ATG
K V K G T Q E M K N N Y N I M
GAA ATC AGG ACA GTG GCA GTT GGA ATT GTG GCA ATC AAA GGG GTG
E I R T V A V G I V A I K G V
GAA AGT GAA TTC TAT CTT GCA ATG AAC AAG GAA GGA AAA CTC TAT
E S E F Y L A M N K E G K L Y
GCA AAG AAA GAA TGC AAT GAA GAT TGT AAC TTC AAA GAA CTA ATT
A K K E C N E D C N F K E L I
CTG GAA AAC CAT TAC AAC ACA TAT GCA TCA GCT AAA TGG ACA CAC
L E N H Y N T Y A S A K W T H
AAC GGA GGG GAA ATG TTT GTT GCC TTA AAT CAA AAG GGG ATT CCT
N G G E M F V A L N Q K G I P
GTA AGA GGA AAA AAA ACG AAG AAA GAA CAA AAA ACA GCC CAC TTT
V R G K K T K K E Q K T A H F
CTT CCT ATG GCA ATA ACT
L P M A I T

FIG. 8

WO 03/016505

PCT/US02/26929

1/12

SEQUENCE LISTING

<110> GOSPODAROWICZ, Denis J.
KAVANAUGH, W. Michael
CRAWFORD, Kenneth

<120> KGF POLYPEPTIDE COMPOSITIONS

<130> 1431.003 / 2300-1431.40

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-15

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)

<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 1
catgagcago cctgagcgcac acacaagaag ttatgattac atggaggag gggatataag 60
atgagaaga ctcttctgtc qaacacatgt gtac 94

<210> 2
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-15

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)

<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 2
cactgtgttc gacagaagag tcttctcact cttatataccc ctccttccat gtaatcataa 60
cttcttgtgt gtcgctcagg gctgtct 86

WO 03/016505

PCT/US02/26929

2/12

<210> 3
<211> 85
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-18

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 3
catggagcga cacacaagaa gttatgatta catggaagga ggggatataa gagtgagaag 60

actcttctgt cgaacacagt ggtac 85

<210> 4
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-18

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 4
cactgtgttc gacagaagag tcttctcaet ctatataccc ctccctccat gtaatcataa 60

cttcttgcgt gtgcgtc 77

<210> 5
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-19

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 5
catgcgacac acaagaagtt atgattacat ggaaggagg gatataagag tgagaagact 60

WO 03/016505

PCT/US02/26929

3/12

82

cttctgtcga acacagtggc ac

<210> 6
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-19<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group<400> 6
cactgtgttc gacagaagag tcttctcact ctatataccc ctccttccat gtaatcataaa 60
cttcttgtgt gtcc 74<210> 7
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-20<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group<400> 7
catgcacaca agaagttatg attacatgga aggaggggat ataagagtga gaagacttt 60
ctgtcgaaca cagtggcac 79<210> 8
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-20<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

WO 03/016505

PCT/US02/26929

4/12

<400> 8
cactgtgttc gacagaagag ttttctact ctatatccc ctcttccat gtaatctaa 60
tttttgtt g 71

<210> 9
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-21

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 9
catgaccaga agttatgatt acatggaagg agggatata agagtgagaa gactcttctg 60
tcgaacacag tggatc 76

<210> 10
<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-21

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 10
cactgtgttc gacagaagag ttttctact ctatatccc ctcttccat gtaatctaa 60
tttttgtt 68

<210> 11
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-22

<220>

WO 03/016505

PCT/US02/26929

5/12

```
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 11
catgagaagt tatgattaca tggaaggagg ggatataaga gtgagaagac tcttcgtcg 60
aacacagtgg tac 73

<210> 12
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
      KGF-des1-22

<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 12
cactgtgttc gacagaagag ttttttactt cttatatccc ctccctccat gtaatcataa 60
tttct 65

<210> 13
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
      KGF-des1-24

<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 13
catgtatgtat tacatggaaag gaggggatata aagagtgaga agactttct gtctaaacaca 60
gtggtaa 67

<210> 14
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
```

WO 03/016505

PCT/US02/26929

6/12

<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-24

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 14
cactgtgttc gacagaagag tcttttcaact ctatataccc ctctttccat gtaatcata 59

<210> 15
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-25

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 15
catggattac atggaaggag gggatataag agtgagaaga ctcttctgtc gaacacagtg 60

gtac 64

<210> 16
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-25

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 16
cactgtgttc gacagaagag tcttttcaact ctatataccc ctctttccat gtaatc 56

<210> 17
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 03/016505

PCT/US02/26929

7/12

<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-26

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 17
catgtacatg gaaggagggg atataaagagt gagaagactc ttctgtcgaa cacagtggta 60

c 61

<210> 18
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-26

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 18
cactgtgttc gacagaagag tctttctcact ctatataccc ctcttccat gta 53

<210> 19
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo1 for
KGF-des1-30

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 19
catggggat ataagagtga gaagacttctt ctgtcgaaaca cagtggta 49

<210> 20
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 03/016505

PCT/US02/26929

8/12

<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-30<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group<400> 20
cactgtgttc gacagaagag tctttctact ctatataccc c

41

<210> 21
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-35<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group<400> 21
catgagaaga ctcttctgtc gaacacatgtg gtac

34

<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
KGF-des1-35<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group<400> 22
cactgtgttc gacagaagag tctttct

26

<210> 23
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 1 for
KGF-des1-37

WO 03/016505

9/12

PCT/US02/26929

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 23
catgctcttc tgtcgaacac agtggta 28

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligo 2 for
      KGF-des1-37

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> wherein the 5' C has a 5' phosphate group

<400> 24
cactgtgttc gacagaagag 20

<210> 25
<211> 489
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: DNA encoding
      KGF-163

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(489)

<400> 25
tgc aat gac atg act cca gag caa atg gct aca aat stg aac tgt tcc 48
Cys Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser
  1           5           10          15
agc cct gag cga cac aca aca agt tat gat tac atg gaa gga ggg gat 96
Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp
  20          25           30
ata aga gtg aga aga ctc ttc tgt cga aca cag tgg tac ctg agg atc 144
Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile
  35           40           45
gat aaa aga ggc aaa gta aaa ggg acc caa gag atg aag aat aat tac 192
Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr
  50           55           60

```

WO 03/016505

PCT/US02/26929

10/12

| | |
|---|-----|
| aat atc atg gaa atc agg aca gtg gca gtt gga att gtg gca atc aaa | 240 |
| Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| gaa atc atg gaa atc agg aca gtg gca gtt gga att gtg gca atc aaa | 288 |
| Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu | |
| 85 90 95 | |
| aat gca aag aaa gaa tgc aat gaa gat tgt aac ttc aaa gaa cta att | 336 |
| Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile | |
| 100 105 110 | |
| ctg gaa aac cat tac aac aca tat gca tca gct aaa tgg aca cac aac | 384 |
| Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn | |
| 115 120 125 | |
| gaa ggg gaa atg ttt gtt gcc tta aat caa aag ggg att cct gta sga | 432 |
| Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg | |
| 130 135 140 | |
| gaa aaa aaa acg aag aaa gaa caa aaa aca gcc cac ttt ctt cct atg | 480 |
| Gly Lys Lys Thr Lys Dls Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met | |
| 145 150 155 160 | |
| gca ata act | 489 |
| Ala Ile Thr | |
| <210> 26 | |
| <211> 163 | |
| <212> PRT | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <400> 26 | |
| Cys Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser | |
| 1 5 10 15 | |
| Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp | |
| 20 25 30 | |
| Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile | |
| 35 40 45 | |
| Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr | |
| 50 55 60 | |
| Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu | |
| 85 90 95 | |
| Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile | |
| 100 105 110 | |
| Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn | |

WO 03/016505

PCT/US02/26929

11/12

| | | |
|---|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
| Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Ile Ile Thr | | 160 |

<210> 27
<211> 423
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: DNA encoding
KGF-des1-22 (with the N-terminal arginine residue
substituted with an alanine residue)

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(423)

```

<400> 27
gtc agt tat gat tac atg gaa ggg gat ata aga gtg aga aga ctc 48
Ala Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
          1           5           10          15

```

| | |
|---|----|
| ttc tgt cga aca cac tgg tac ctg agg atc gat aaa aga ggc aaa gta | 96 |
| Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val | |
| 20 25 30 | |

aaa ggg acc caa gag atg aag aat aat tac aat atc atg gaa atc agg 144
Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
35 40 45

```

aca gtg gca gtt gga att gtg gca atc aaa ggg gtg gaa agt gaa ttc 192
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
      50           55           60

```

tat ctt gca atg aac aag gaa gga aaa ctc tat gca aag aaa gaa tgc 240
 Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
 65 70 75 80

aat gaa gat tgt aac ttc aaa gaa cta att ctg gaa aac cat tac aac 288
 Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
 85 90 95

```

aca tat gca tca gct aaa tgg aca cac aac gga ggg gaa atg ttt gtt 336
Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
100          105          110

```

gcc tta aat caa aag ggg att cct gta aga gga aaa aaa acg aag aaa 384

WO 03/016505

PCT/US02/26929

12/12

Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Thr Lys Lys
115 120 125

gaa caa aaa aca gcc cac ttt ctt cct atg gca ala act 423
Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
130 135 140

<210> 28
<211> 141
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 28
Ala Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu
1 5 10 15

Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val
20 25 30

Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg
35 40 45

Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe
50 55 60

Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys
65 70 75 80

Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn
85 90 95

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
100 105 110

Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Thr Lys Lys
115 120 125

Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
130 135 140

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau

(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/016505 A3

(51) International Patent Classification? A61K 38/16, 38/17, 38/18 (74) Agent: GUTH, Joseph, H.; Chiron Corporation, Intellectual Property - R440, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US)

(21) International Application Number: PCT/US2002/026929

(81) Designated States (national): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZW.

(22) International Filing Date: 21 August 2002 (21.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/313,881 21 August 2001 (21.08.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/313,881 (CIP) Filed on 21 August 2001 (21.08.2001)

(71) Applicant (for all designated States except US): CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US).

(85) Published: — with international search report — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GOSPODAROW-ICZ, Denis, I. [US/US]; Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94622-8097 (US), KAYANAUGH, W., Michel [US/US]; Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94622-8097 (US), CRAWFORD, Kenneth [US/US]; Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94622-8097 (US).

(86) Date of publication of the international search report: 8 January 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: KGF POLYPEPTIDE COMPOSITIONS

(57) Abstract: Compositions comprising keratinocyte growth factor (KGF) polypeptides and methods of using the same are described. The KGF polypeptides of the present invention display enhanced bioactivity relative to full-length KGF₁₋₅₃. Accordingly, the KGF polypeptides of the present invention may be used in compositions in lesser amounts than would be necessary using KGF₁₋₅₃.

WO 2003/016505 A3

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US02/26929 | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|------------|--|-----------------------|---|--|------|---|--|-------------------|---|--|-------------|---|--|------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/16, 38/17, 38/18 US CL : 424/85.1; 514/2, 12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/85.1; 514/2, 12 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST (U.S. Patents, Pre-Grant Publications), Derwent, EPO, JPO, DIALOG (biotech files), Sequence databases | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 30%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 98/24813 A2 (AMGEN INC.) 11 June 1998 (11.06.98), see entire document, especially Figures 7, 10-14 and 16, and p. 48.</td> <td>1-49</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 96/11949 A1 (AMGEN INC.) 25 April 1996 (25.04.96), see entire document, especially Figure 10.</td> <td>1-3, 24-26, 47-49</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>4-23, 27-46</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 96/11949 A1 (AMGEN INC.) 25 April 1996 (25.04.96) see entire document, especially Figures 12, 15-19 and 21.</td> <td>1-49</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | WO 98/24813 A2 (AMGEN INC.) 11 June 1998 (11.06.98), see entire document, especially Figures 7, 10-14 and 16, and p. 48. | 1-49 | X | WO 96/11949 A1 (AMGEN INC.) 25 April 1996 (25.04.96), see entire document, especially Figure 10. | 1-3, 24-26, 47-49 | Y | | 4-23, 27-46 | X | WO 96/11949 A1 (AMGEN INC.) 25 April 1996 (25.04.96) see entire document, especially Figures 12, 15-19 and 21. | 1-49 |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | WO 98/24813 A2 (AMGEN INC.) 11 June 1998 (11.06.98), see entire document, especially Figures 7, 10-14 and 16, and p. 48. | 1-49 | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | WO 96/11949 A1 (AMGEN INC.) 25 April 1996 (25.04.96), see entire document, especially Figure 10. | 1-3, 24-26, 47-49 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | | 4-23, 27-46 | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | WO 96/11949 A1 (AMGEN INC.) 25 April 1996 (25.04.96) see entire document, especially Figures 12, 15-19 and 21. | 1-49 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority (claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 29 September 2003 (29.09.2003) | | Date of mailing of the international search report 17 NOV 2003 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Authorized officer Yvonne L. Eyler, Ph.D. <i>Janice Faru</i> Telephone No. (703) 308-0196 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

| | | |
|---------------------------|-----------------------|------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
| // C 0 7 K 14/475 | C 1 2 N 15/00 Z N A A | |
| C 1 2 N 15/09 | C 0 7 K 14/475 | |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU, ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZW

(74)代理人 100092886

弁理士 村上 清

(72)発明者 ゴスボダロビッツ, デニス ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94622-8097, エミリービル, ピー.オー.ボックス 8097, カイロン コーポレイション 気付

(72)発明者 カバノー, ダブリュー.マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94622-8097, エミリービル, ピー.オー.ボックス 8097, カイロン コーポレイション 気付

(72)発明者 クローフォード, ケニス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94622-8097, エミリービル, ピー.オー.ボックス 8097, カイロン コーポレイション 気付

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA21 CA04 DA12 EA04 GA11 HA03

4C084 AA02 AA13 AA14 BA02 BA08 BA21 BA22 BA23 CA62 DB54
NA13 NA14 NA15 ZA332 ZA662 ZA892
4H045 AA30 BA10 CA40 DA01 EA20 FA72 FA74 GA23 GA26