[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C07H 21/00
A61K 38/18 C07K 14/50

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95192340.4

[43]公开日 1997年5月28日

[11] 公开号 CN 1150804A

[22]申请日 95.3.8
[30]优先权
[32]94.3.8 [33]US[31]08/207,412
[86]国际申请 PCT/US95/02950 95.3.8
[87]国际公布 WO95/24414 英 95.9.14
[85]进入国家阶段日期 96.9.28
[71]申请人 人类基因组科学公司
地址 美国马里兰州
[72]发明人 J·S·胡
J·D·高卡尼

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 李 琰

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 成纤维细胞生长因子-10

[57]摘要

本文公开了人 FGF-10 多肽的编码,这种 FGF-10 多肽的 DNA (RNA);提供了经重组技术产生这种多肽的方法;也公开了用这种多肽刺激血管形成以治疗伤口和防止神经损伤的方法;还公开了针对这种多肽的拮抗剂和其作为治疗剂在阻止异常细胞增殖、血管过多疾病和上皮透镜状细胞增殖上的用途;还公开了检测 FGF-10 编码序列中的突变和得自宿主的样品中的 FGF-10 蛋白质浓度改变的诊断方法。

权 利 要 求 书

1.一种选自下组的分离的多核苷酸：

(a)编码具有推断的SEQ ID NO.2氨基酸序列的多肽或者该多肽的片段、类似物或衍生物的多核苷酸；

(b)编码具有由ATCC 75696中包含的cDNA编码的氨基酸序列之多肽或者该多肽的片段、类似物或衍生物的多核苷酸。

2.权利要求1的多核苷酸，其中的多核苷酸是DNA。

3.权利要求1的多核苷酸，其中的多核苷酸是RNA。

4.权利要求1的多核苷酸，其中的多核苷酸是基因组DNA。

5.权利要求2的多核苷酸，其中所说的多核苷酸编码具有推断的SEQ ID NO.2的氨基酸序列的多肽。

6.权利要求2的多核苷酸，其中所说的多核苷酸编码由ATCC75696的cDNA编码的多肽。

7.权利要求1的多核苷酸，该多核苷酸具有SEQ ID NO.1所示的编码序列。

8.权利要求2的多核苷酸，该多核苷酸具有以ATCC 75696保藏的多肽的编码序列。

9.一种包含权利要求2之DNA的载体。

10.一种用权利要求9的载体经基因工程产生的宿主细胞。

11.一种产生多肽的方法，该方法包括从权利要求10的宿主细胞表达由所说DNA编码的多肽。

12.一种产生能够表达多肽的细胞的方法，该方法包括用权利要求9之载体经基因工程产生细胞。

13.一种分离的DNA，该DNA能杂交到权利要求2的DNA上，并且编码具有FGF－10活性的多肽。

14.一种选自下组的多肽：

(i)具有推断的SEQ ID NO.2氨基酸序列的多肽和其片段、类似物和衍生物，和

(ii)由 ATCC75696 之 cDNA 编码的多肽和该多肽的片段、类似物和衍生物。

15.权利要求 14 的多肽，其中的多肽是具有推断的 SEQ ID NO.2 之氨基酸序列的 FGF－10。

16.一种针对权利要求 14 的多肽的抗体。

17.一种作为权利要求 14 之多肽的刺激物有效的化合物。

18.一种作为权利要求 14 之多肽的拮抗剂有效的化合物。

19.一种治疗需要 FGF－10 的病人的方法，该方法包括给病人施用治疗有效量的权利要求 14 的多肽。

20.一种治疗需要 FGF－10 的病人的方法，该方法包括给病人施用治疗有效量的权利要求 18 的化合物。

21.权利要求 19 的方法，其中通过给病人提供编码所说多肽的 DNA 和体内表达所说多肽来施用治疗有效量的多肽。

22.一种鉴别作为 FGF－10 刺激物和拮抗剂有活性的化合物的方法，该方法包括：

(a)在细胞被 FGF－10 正常刺激的条件下，将 FGF－10、待筛选的化合物和含有细胞的反应混合物组合在一起，所说的反应混合物含有在细胞增殖时可掺入到细胞中的标记；和

(b)测定细胞的增殖程度，以鉴别化合物是否是有效的刺激物或拮抗剂。

23.一种诊断与权利要求 14 的多肽表达不足有关的疾病或疾病易感性的方法，该方法包括测定编码所说多肽的核酸序列的突变。

24.一种诊断方法，该方法包括在得自宿主的样品中分析权利要求 14 的多肽的存在。

说　　明　　书

成纤维细胞生长因子－10

本发明涉及新鉴别的多核苷酸、由这些核苷酸编码的多肽、这些多核苷酸和多肽的用途以及产生这些多核苷酸和多肽的方法。具体地说，本发明的多肽是成纤维细胞生长因子－10/肝素结合生长因子－10，此后称作“FGF－10”。本发明也涉及抑制这些多肽的作用。

成纤维细胞生长因子是以结合肝素为特征的一族蛋白质，因此也称作肝素结合生长因子(HBGF)。这些蛋白质不同成员的表达在各种组织中发现，并且在特定时序和空间控制下。这些蛋白质是各种中胚层源细胞、外胚层源细胞、内胚层源细胞(包括成纤维细胞、角膜和血管内皮细胞、粒细胞、肾上腺皮质细胞、软骨细胞、成肌细胞、血管平滑肌细胞、透镜状上皮细胞、黑素细胞、角化细胞、少突神经胶质细胞、星形细胞、成骨细胞和红细胞生成素细胞。

每一成员具有与其它成员共有的功能，也具有其独特的功能范围。除了刺激血管内皮细胞增殖的能力外，FGF－1 和 2 两者都是内皮细胞趋化性的，并且 FGF－2 已表现出能使内皮细胞透过基膜。与这些性质相适应，FGF－1 和 2 两者均具有刺激血管生成的能力。这些生长因子的另一个重要特征是它们促进伤口愈合的能力。许多 FGF 族的其它成员都表现出与 FGF－1 和 2 类似的活性(如促进血管生成和伤口愈合)。FGF 基团族的几个成员已表现出诱导中胚层形成的调节神经细胞、脂肪细胞和骨骼肌细胞分化的性质。

与普通组织中的这些生物学活性不同，FGF 蛋白质在其表达失调时作为转化蛋白质通过促进肿瘤血管化，与增加癌和肉瘤发生有关。

FGF 族目前由 8 种结构相关多肽组成。各自的基因已被克隆和测序。两个成员 FGF－1 和 FGF－2 已用许多名称说明特征，但最常见的是分别称为酸性和碱性成纤维细胞生长因子。普通基因产物影响大多数中胚层和神经外胚层来说细胞的总的增殖能力。它们

能够诱导体内血管生成并且在早期发育中可起重要作用(Burgess, W.H. and Maciag, T., Annu. Rev. Biochem., 58:575－606(1989))。

已通过基因转移将编码分泌形式 FGF－1 和真核表达载体引入到猪动脉中。这一模型确定了体内动脉壁中的基因功能。在基因转移 21 天后,FGF－1 的表达在猪动脉中诱导内膜增厚(Nabel, E.G., et al., Nature, 362:844－6(1993))。也已进一步说明,碱性成纤维细胞生长因子可以调节神经胶质瘤的生长和发展而与其在肿瘤发生中的作用无关,并且对这些作用来说可能需要碱性成纤维细胞生长因子释放或分泌(Morrison, R.S., et al., J. Neurosci. Res., 34:502－9(1993))。

成纤维细胞生长因子(例如碱性 FGF)还与 Kaposi's 肉瘤细胞体外生长有关(Huang, Y. Q., et al., J. Clin. Invest., 91: 1191－7(1993))。编码人碱性成纤维细胞生长因子的 cDNA 序列也已克隆到波噬菌体 T7RNA 聚合酶识别的转录启动子的下游。如此获得的碱性成纤维细胞生长因子已表现出促细胞分裂纤维蛋白溶酶兑激活剂合成和血管生成试验中不可区分于人胎盘成纤维细胞生长因子的生物学活性(Squires, C.H., et al., J. Biol, Chem., 263: 16297－302(1988))。

US 5,155,241 公开了基本上纯的哺乳动物碱性成纤维细胞生长因子和它们的产生方法。也公开了牛和人碱性成纤维细胞生长因子的氨基酸序列以及编码牛物种多肽的 DNA 序列。

本发明的多肽已被推断性地鉴别为 FGF 族的成员之一,这是氨基酸序列同源于 FGF 族其它成员的结果。

本发明的一个方面提供了新的成熟的多肽(它们是 FGF－10)以及其生物学活性的,诊断或治疗上有用的片段、类似物和衍生物。本发明的多肽是人来源的。

本发明的一个方面提供了编码人 FGF－10 的分离的核酸分子,包括 mRNA、DNA、cDNA、基因组 DNA 以及其反义类似物和其生物学活性的诊断或治疗上有用的片段。

本发明的另一方面提供了经重组技术产生这种多肽的方法,所

述重组技术经采用重组载体(如重组产生 FGF－10 蛋白质中有用的克隆和表达质粒)以及包含人 FGF－10 核酸序列的重组原核和/或真核宿主细胞。

本发明的另一方面提供了为治疗目的(如促进创伤、烫伤和溃疡愈合以防止神经紊乱引起的神经损伤,并防止皮肤老化和头发脱落)使用这种多肽或编码该多肽的多核苷酸的方法。

本发明的另一方面提供了针对这些多肽的抗体。

本发明的另一方面提供了针对这些多肽的拮抗剂,该拮抗剂可以用于在例如治疗肿瘤和血管过多疾病中抑制这种多肽的作用。

本发明的另一方面提供了包含长度足以特异性杂交到人 FGF－10 序列上的核酸分子的核酸探针。

本发明的另一方面提供了检测与 FGF－10 核酸序列突变或由该序列编码的多肽的过度表达相关的疾病或疾病易感性的诊断试验方法。

本发明的再一方面提供了为了体外与科学研究、DNA 合成和 DNA 载体制造相关的目的使用这些多肽或编码这些多肽的多核苷酸的方法。

从本发明的阐述,本领域技术人员会清楚本发明的各个方面。

下列附图仅意在说明本发明的特定的实施方案,无意于以任何方式限制本发明。

图 1 描绘了 FGF－10 的 cDNA 序列和相应的推定的氨基酸序列。所示的氨基酸序列代表蛋白质的成熟形式。使用了氨基酸的标准单字母缩写词。当试图确定多核苷酸序列时,测序不精确性是常见的问题。用 373 自动化 DNA 序列测定仪(Applied Biosystems, Inc.)完成测序。测序准确度预计大于 97%。

图 2 说明 FGF－10 和其它 FGF 族成员之间的氨基酸序列同源性,保守氨基酸用粗体表示。

图 3 表示 FGF－10 蛋白质体外转录/转译后的 SDS－PAGE 凝胶。

本发明的一方面提供了分离的核酸分子(多核苷酸),该核酸分

子编码具有图1的推定的氨基酸序列(SEQ ID NO.2)的成熟多肽或编码由1994年3月4日以ATCC75696保藏的克隆的cDNA编码的成熟多肽。

最初在得自8周龄早期人组织的cDNA文库中发现了本发明的多核苷酸,接着在得自人扁机体的文库中发现全长cDNA。其结构上与成纤维细胞生长因子基因族的所有成员相关,含有编码181个氨基酸的多肽的开放读框。在顶端配对物是:1)在129个氨基酸骨架内与从脑分离的FGF-9 37%相同的67%序列相似;2)在121个氨基酸区与FGF-7(角化细胞生长因子)36%相同和64%相似;3)在110个氨基酸骨架内与FGF-1(酸性FGF)33%相同和55%相似。此外,在本发明的多肽中,FGF/HBGF族特征GXLX(S,T,A,G)X6(D,E)CXFXE(X指任何氨基酸残基;(D,E)指D或E残基;X6指任意的6个氨基酸残基)是保守的。

本发明的多核苷酸可以是RNA形式或DNA形式,该DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA。所述DNA可以是双链的或单链的。编码成熟多肽的编码序列可以相同于图1所示的编码序列(SEQ ID NO.1)或保藏克隆的序列,或者作为遗传密码的过剩或简并的结果可以是不同的编码序列,但该序列编码与图1的DNA(SEQ ID NO.1)或保藏的cDNA所编码的相同的成熟多肽。

编码图1的成熟多肽(SEQ ID NO.2)或编码由保藏的cDNA编码的成熟多肽的多核苷酸可以包括:仅成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和附加编码序列,如引导或分泌序列或前蛋白序列;成熟多肽的编码序列(和可有可无的附加编码序列)和非编码序列,如内含子或成熟多肽编码序列的非编码序列5′和/或3′。

因此,"编码多肽的多核苷酸"一词包括仅包含多肽编码序列的多核苷酸以及包含附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及以上所述的多核苷酸的变体,所述变体编码具有图1所示的推断的氨基酸序列(SEQ ID NO.2)的多肽的片段、类似物和衍生物,或者编码由保藏的克隆的cDNA编码的多肽的片段、类似物和衍生物。该多核苷酸变体可以是所述多核苷酸的天然产生的

等位变体或所述多核苷酸的非天然产生的变体。

因此，本发明包括编码与图 1 所示的相同的成熟多肽(SEQ ID NO.2)或编码由保藏的克隆的 cDNA 编码的相同成熟多肽的多核苷酸以及这种多核苷酸的变体，该变体编码图 1 多肽(SEQ ID NO.2)或由保藏克隆的 cDNA 编码的多肽的片段、衍生物或类似物。该核苷酸变体包括缺失变体、取代变体和添加或插入变体。

如以上说明的，所述多核苷酸可以具有为图 1 所示的编码序列(SEQ ID NO.1)或保藏克隆编码序列的天然产生的等位变体的编码序列。如本领域公知的，等位变体是多核苷酸序列的一种可替换的形式，它可以具有一个或多个核苷酸的取代、缺失或添加，基本上不改变被编码的多肽的功能。

本发明也包括多核苷酸，其中的成熟多肽的编码序列可以以相同的读框融合进有助于从宿主细胞表达和分泌多肽的多核苷酸序列，例如，起控制多肽从细胞转运的分泌序列作用的引导序列。具有引导序列的多肽是一种前蛋白，且可以具有由宿主细胞切掉形成成熟形式多肽的引导序列。所述多核苷酸也可以编码一种前蛋白，该前蛋白是加有附加 5′氨基酸残基的成熟蛋白。一种具有序列原的成熟蛋白是一种前蛋白，并且是蛋白质的一种失活形式。一旦切掉序列原，就留下活性成熟蛋白质。

因此，例如，本发明的多核苷酸可以编码成熟蛋白质、具有序列原的蛋白质或具有序列原和前序列(引导序列)两者的蛋白质。

本发明的多核苷酸也可以具有在读框中融合进使得本发明的多肽纯化的标记序列的编码序列。在细菌宿主的情况下，所述标记序列可以是由 pQE－9 载体供给的使融合进标记的成熟多肽纯化的六个组氨酸的标记，或者例如当使用哺乳动物宿主(例如 COS－7 细胞)时，所述标记序列可以是血凝素(HA)标记。该 HA 标记相当于得自流感血凝素蛋白质的表位(Wilson, I., et al., Cell, 37: 767 (1984))。

本发明还涉及杂交到上述序列上的多核苷酸(如果两个序列之间有至少 50％相同，最好 70％相同)。本发明特别涉及在严格条件

下杂交到上述多核苷酸上的多核苷酸。这里使用的“严格条件”指仅在序列之间有至少95%，最好97%相同时发生杂交。在一个优选的实施方案中，杂交到上述多核苷酸上的多核苷酸编码基本上保持与由图1的cDNA(SEQ ID NO.1)或保藏的cDNA编码的成熟多肽相同的生物学功能或活性的多肽。

这里所称的保藏物将按照用于专利程序的国际认可的微生物保藏的布达佩斯条约保持。这些保藏物仅为了方便而提供，并且不是35U.S.C §112要求的保藏。保藏材料中包含的多核苷酸序列以及由其编码的多肽的氨基酸序列在此一并参考，并且解决本文序列描述的任何矛盾。制造、使用或销售所述保藏材料可能需要许可，但无这种许可在此得到同意。

本发明还涉及具有图1的推定的氨基酸序列(SEQ ID NO.2)或具有由保藏的cDNA编码的氨基酸序列的FGF－10多肽，以及这种多肽的片段、类似物和衍生物。

当涉及图1的多肽(SEQ ID NO.2)或由保藏的cDNA编码的多肽时，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”指基本上保持与这种多肽相同的生物学功能或活性的多肽。因此，类似物包括可通过切割前蛋白质部分激活产生活性成熟多肽的前蛋白质。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽，优选的是重组多肽。

图1的多肽(SEQ ID NO.2)或由保藏的cDNA编码的多肽的片段、衍生物或类似物可以是(i)其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸残基(优选的是保守氨基酸残基)取代的多肽，这种取代的氨基酸残基可以是也可以不是被遗传密码子编码的氨基酸，或(ii)其中一个或多个氨基酸残基包含取代基的多肽，或(iii)其中成熟多肽与另一种化合物(如增加多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合的多肽，或(iv)其中附加氨基酸融合进成熟多肽(如引导或分泌序列或用于纯化成熟多肽或前蛋白质序列的序列)的多肽。由本发明的阐述，这些片段、衍生物和类似物被视为在本领域技术人员的知识范围内。

本发明的多肽和多核苷酸最好以分离的形式提供，并且最好是纯化至具有同质性。

术语“分离的”指物质从其来源的环境移出(如，若是天然产生的，则是从天然环境移出)。例如，存在于活的动物中的天然产生的多核苷酸或多肽是非分离的，但与天然系统中的某些或全部共存物质分离的相同的多核苷酸或DNA或多肽是分离的。这种多核苷酸可能是载体的一部分，和/或这种多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分，并且在这种载体或组合物不是其天然环境的一部分时仍然是分离的。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体、用本发明的载体由基因工程产生的宿主细胞，和经重组技术产生本发明的多肽的方法。

宿主细胞可以是用本发明的载体(可以是例如，克隆载体或表达载体)经基因工程(转导或转化或转染)产生的。载体可以以例如质粒、病毒颗粒、噬菌体等形式存在。所述基因工程宿主细胞可在修饰为适于激活启动子、选择转化体或扩增FGF－10基因的常规营养培养基中培养、培养条件(例如温度、PH等)是以前使用的所选择的宿主细胞表达那些，且对普通技术人员是显而易见的。

本发明的多核苷酸可以用于经重组技术产生多肽。因此，例如，所述多核苷酸序列可以包括在各种表达载体(特别是表达多肽的载体或质粒)的任何一种中。这些载体包括染色体、非染色体和合成DNA序列，例如，SV40衍生物；细菌质粒；噬菌体DNA；酵母质粒；得自质粒和噬菌体DNA组合的载体，病毒DNA(例如痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒和假性狂犬病毒)。然而，只要是可复制的和在宿主中存活的，任何其它载体或质粒都可以使用。

合适的DNA序列可以用各种方法插入到载体中。一般来说，DNA序列经本领域公知的方法插入到合适的限制性核酸内切酶位点。这些方法和其它方法被认为在本领域技术人员的范围内。

在表达载体中的DNA序列可经操作连接到指导mRNA合成的合适的表达控制序列(启动子)上。作为这些启动子的代表性例子，

可以提及的是：LTR 或 SV40 启动子、大肠杆菌 lac 或 trp、噬菌体 λP_L 启动子的其它已知的在原核或真核细胞或其病毒中控制基因表达的其它启动子。所述表达载体也包含翻译起始和转录终止的核糖体结合位点。所述载体也包含扩增表达的合适序列。

此外，所述表达载体最好包含一种基因，该基因提供选择转化宿主细胞的表型特征，如真核细胞培养物的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性，或者例如大肠杆菌中的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含如本文以上所述的合适 DNA 序列以及合适的启动子或控制序列的载体可以用于转化合适的宿主，使得宿主表达蛋白质。作为合适宿主的代表性例子可以提到的是：细菌细胞，如大肠杆菌、鼠伤寒沙门市菌、链霉菌；真菌细胞，如酵母；昆虫细胞，如果蝇 S2 (Drosophila S2) 和粘虫 Sf9 (Spodoptera Sf9)、动物细胞，如 CHO、COS 或 BOWES 黑素瘤；腺病毒；植物细胞等。经本文的阐述，选择合适的宿主被认为在本领域普通技术人员的知识范围内。

更具体地说，本发明也包括包含以上广泛描述的一种或多种序列的重组构建体。该构建体包含一种载体，例如质粒或病毒载体，本发明的序列已以正向或逆向插入到该构建体中。在这一实施方案优选的一面，所述构建体还包含可经操作连接到序列上的调节序列，包括例如启动子。大量合适的载体和启动子是本领域技术人员公知的，并且是商业上可获得的。以举例方式给出下列载体：细菌的：pQE70、pQE60、pQE－9 (Qiagen)、pBS、phagescript、psiX174" pBluescript SK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene)；pTRL99A、pKK223－3、pKK233－3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)。真核生物的：pWLneo、pSV2cat、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia)。然而，只要是可复制的和在宿主中生存的，任何其它质粒或载体都可以使用。

可以使用 CAT (氯霉素乙酰转移酶) 载体或其它带有选择性标记的载体从任何所需基因选择启动子区。两种合适的载体是 pKK232－8 和 pCM7。特别提到的细菌启动子包括 lacI、tacZ、T3、T7、gpt、λPR、PL 和 trp。真核细胞启动子包括 CMV 立即早期、HSV

胸苷激酶、早期和晚期SV40、得自逆转录病毒的LTRs和小鼠金属硫蛋白－I。合适载体和启动子的选择完全在本领域普通技术人员的知识范围内。

在另一实施方案中，本发明涉及包含以上所述构建体的宿主细胞。所述宿主细胞可以是高等真核细胞(如哺乳动物细胞)或低等直核细胞(如酵母细胞)，或者所述宿主细胞可以是原核细胞(如细菌细胞)。向宿主细胞中引入构建体可以经磷酸钙转染、DEAE－葡聚糖介导的转染或电穿孔进行(Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology 1986))。

所述宿主细胞中的构建体可以用于以常规方法产生由重组序列编码的基因产物。此外，本发明的多肽可以由常规的肽合成器合成产生。

成熟蛋白质可以在哺乳动物细胞、酵母、细菌或其它细胞中在合适启动子的控制下表达。经采用得自本发明的DNA构建体的RNA，无细胞转译系统也可用于产生这些多肽。Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)描述了与原核和真核宿主一起使用的合适的克隆和表达载体，上述文献公开的内容在此一并参考。

向载体中插入增强子序列增加高等真核生物对编码本发明的多肽之DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用之件，通常为约10－300bp，作用在启动子上增加其转录。例子包括复制起点后边的SV40增强子(bp100到270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、转录起点后边的多瘤增强子和腺病毒增强子。

一般来说，重组表达载体包括复制起点和允许宿主细胞转化的可选择标记(如大肠杆菌的氨苄青霉素抗性基因和啤瓶糖酵母TRP1基因)以及得自指导下游结构序列转录的高表达基因的启动子。其中，这种启动子可以源于编码糖酵解酶(如3－磷酸甘油酸激酶(PGK)、α因子、酸性磷酸酶或热休克蛋白质)的操纵子。异源结构序列以合适的相位与转译、起始和终止序列装配。异源序列可编码可不编码包括N－末端识别肽的并赋予所需特征(例如表达的重

组产物稳定或易于纯化)的融合蛋白质。

通过在带有功能性启动子的可操作的读码中插入编码所需蛋白质的结构DNA序列以及合适的转译、起始和终止信号构建用于细菌的有用的表达载体,该载体包含一种或多种表型可选择标记和一个复制起点,以保证保持该载体并且(如果需要)在宿主内给出扩增。用于转化的合适的兄核宿主包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤害沙门氏菌及假单胞菌、链霉菌和葡萄球菌属内的各种微生物,尽管其它微生物也可以用作选择的对象。

作为代表性的但非限制性的例子,用于细菌的有用的表达载体可以包含得自商业上可获得的质粒的可选择标记和细菌复制起点,所述质粒包含熟知的克隆载体pBR322(ATCC 37017)的遗传元件。这些商业载体包括,例如pKK223－3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsa, Sweden)和GEMI(Promega Biotec, Madison, WI, USA)这些pBR322"骨架"片段与合适的启动子和待表达的结构序列组合。

在合适的宿主菌株转化和宿主菌株生长至合适的细胞密度后,选择的启动子经合适的方法(如温度转变或化学诱导)脱阻抑,细胞培养额外的一段时间。

经离心典型地收集细胞,用物理或化学方法破碎,保持所形成的粗提物用于进一步纯化。

用于表达蛋白质的微生物细胞可以用任何方便的方法(包括冻融循环、超声、机械破碎或使用细胞溶解剂)破碎。

各种哺乳动物细胞培养系统也可以用于表达重组蛋白质。哺乳动物表达系统的例子包括Gluzman, Cell, 23;175(1981)描述的猴肾成纤维细胞COS－7细胞系和其它能够表达匹配载体的细胞系,例如,C127、3T3、CHO HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体包含复制起点、合适的启动子和增强子,以及任何必需的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列和5′侧翼非转录序列。得自SV40病毒基因组的DNA序列,例如SV40起点、早期启动子、增强子、剪接和聚腺苷酸化位点可以用于提供所需的非转录遗传元件。

可以用在此之前使用的方法从重组细胞培养物回收和纯化FGF－10，所述的方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。如果必要，在完成成熟蛋白质的构型中可以使用蛋白质重析叠步骤。最后，高效液相色谱(HPLC)可以用于最终的纯化步骤。

本发明的多肽可以是天然的纯化产物，或化学合成方法的产品或由重组技术从原核或真核宿主(如从培养中的细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞产生的。依赖于重组产生方法中使用的宿主，本发明的多肽可以是由哺乳动物或其它真核生物碳水化合物糖基化的，或者可以是非糖基化的。本发明的多肽也可以包含起始甲硫氨酸氨基酸残基。

由于能够制激血管内皮细胞生长，本发明的多肽可以用于刺激由各种疾病(如血栓形成、动脉硬化和其它心血管疾病)引起的局部缺血组织血管形成的处理中。

因为FGF－10具有作为各种类型细胞(如成纤维细胞和骨胳肌细胞)的促有丝分裂剂的能力，所以FGF－10也可以用于处理损伤、烫伤、手术后组织修复和溃疡伤口。

FGF－10也可以用于治疗和预防某些神经紊乱或神经衰弱疾病(如Alzheimer's病、Parkin son's病和AIDS－相关综合症)中发生的神经损害。FGF－10具有刺激软骨细胞生长的能力，因此它可用于增加骨和牙周再生，并用于帮助组织移植或骨移植。

FGF－10也可以用于通过刺激角化细胞生长预防由日晒引起的皮肤老化。

因为FGF－10激活头发形成细胞和促进黑素细胞生长，所以FGF－10可以用于防止头发脱落。相同的情况是，当与其它细胞因子合用时，FGF－10刺激造血细胞和骨髓细胞生长和分化。

FGF－10也可以用于在移植前保持器官，或支持初生组织的细胞培养。

本发明的另一方面提供了为与科学研究、DNA合成、DNA载体

制备相关的体外目的和为提供治疗人疾病的诊断学与治疗学目的，使用这些多肽或编码这些多肽的多核苷酸的方法。

全长 FGFG－10 基因片段也可以用作 eDNA 文库的杂交探针，用来分离全长 FGF－10 基因和分离具有与以上基因高度序列类似性或具有类似生物学性质的其它基因。这种类型的探针一般具有至少 20 个碱基。然而尽管它们可以具有更大数目的碱基，但优选的探针具有至少 30 个碱基并且一般不超过 50 个碱基。所述探针也可以用于识别相应于全长转录物的 cDNA 克隆和基因组克隆或包含完整的包括调节和启动子区，外显子和内含子的 FGF—10 基因的克隆。筛选的例子包括经采用公知的 DNA 序列合成寡核酸探针来分离 FGF－10 基因的编码区。具有互补于本发明的基因序列的序列的标记的寡核苷酸被用于筛选人 cDNA、基因组 DNA 或 mRNA 文库，以确定探针杂交到文库的哪些成员上。

本发明提供了识别 FGF－10 多肽受体的方法。可以用许多本领域公知的方法，例如配体淘选和 FACS 挑选(Coligan, etal., Current Protocols in Immun., 1(2), Chapter 5, (1991))，鉴别编码受体的基因。优选地使用表达克隆，其中从对多肽反应的细胞制备聚腺苷酸化 RNA，将从这一 RNA 产生的 cDNA 文库分成集合体，用于转染 COS 细胞或对多肽不反应的其它细胞。将生长在载玻片上的转染细胞露置于标记的多肽下。可以用各种方法包括位点特异性蛋白质激酶识别位点的碘化或包涵来标记多肽。在固定和培养后，对载玻片进行放射自显影分析。识别阳性集合体，制备亚集合体，并且用重复制备亚集合体和再筛选方法再转染，最终产生编码推定的受体的单克隆。

作为受体识别的一种可替换的方法，可将标记多肽与表达受体分子的细胞膜或抽提制备物光亲合连接。将交联的物质用 PAGE 分析分离，并置于 X－光膜下。可将含有多肽受体的标记复合物切下，分离成肽片段，并进行蛋白质微测序。从微测序获得的氨基酸序列被用于设计一组筛选 cDNA 文库的简并寡核苷酸探针，以识别编码推定受体的基因。

本发明提供了一种筛选化合物以识别调节 FGF－10 作用的化合物的方法。这种试验的一个例子包括在成纤维细胞正常增殖的细胞培养条件下将哺乳动物成纤维细胞、FGF－10、待筛选的化合物和^{3}〔H〕胸苷组合。在没有待筛选化合物存在下进行对照试验，与在有化合物存在下成纤维细胞增殖的量比较，通过测定每一种情况下对^{3}〔H〕胸苷的摄取确定所筛选的化合物是否刺激角质形成细胞增殖。

为筛选拮抗剂，可以进行相同的试验，测定化合物阻止成纤维细胞增殖的能力，并测定拮抗剂能力。通过测定^{3}〔H〕胸苷掺入的液体闪烁色谱测定成纤维细胞增殖的量。

在另一种方法中，将表达 FGF－10 受体的哺乳动物细胞或膜制备物在所述化合物存在下与标记的 FGF－10 一起培养。然后可以测定化合物增强或阻断这一相互作用的能力。此外，测定在 FGF－10 与受体相互作用后的已知的第二信使系统的反应，并在存在或不存在化合物下进行比较。这种第二信使系统包括但不限于，cAMP 乌苷酸环化酶、离子通道或磷酸肌醇水解。

潜在的 FGF－10 拮抗剂的例子包括结合到多肽上的抗体或某些情况下的寡核苷酸。另外，潜在的 FGF－10 拮抗剂可以是结合 FGF－10 受体的 FGF－10 的突变形式，然而无第二信使反应被引发，因此，FGF－10 的作用被有效地阻断。

另一种潜在的 FGF－10 拮抗剂是由反义技术制备的反义构建体。反义技术可以用于通过三螺旋形成或反义 DNA 或 RNA 控制基因表达，这两种方法都基于多核苷酸与 DNA 或 RNA 的结合。例如编码本发明的成熟多肽的多核苷酸序列的 5′编码部分用于设计长度约 10 到 40 个碱基对的反义 RNA 寡核苷酸。将 DNA 寡核苷酸设计成与转录中涉及的基因区互补（三股螺旋——参见 Lee et al., Nucl. Acids Res., 6：3073（1979）；Cooney et al, Science, 241：456（1988）；和 Dervan et al., Science, 251：1360（1991）），从而阻止 FGF－10 的转录和产生。反义 RNA 寡核苷酸体内杂交到 mRNA 上，阻断 mRNA 分子转译成 FGF－10 多肽（Antisensw－Okano, J. Neu-

rochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988))。以上所述的寡核苷酸也可以传送到细胞,以便体内可以表达反义 RNA 或 DNA,抑制 FGF－10 的产生。

潜在的 FGF－10 拮抗剂包括小分子,这些小分子结合并占据 FGF－10 受体结合位点,使得 FGF－10 不能接近受体,以致正常的生物学活性受到抑制。小分子的例子包括但不限于小肽或类肽分子。

FGF－10 拮抗剂也可以用于抑制 FGF－10 对新生细胞和组织的细胞生长和增殖作用,从而延迟或阻止异常细胞生长和增殖,例如肿瘤细胞的生长。

FGF－10 拮抗剂也可以用于防止血管过多疾病和防止囊外内障手术后的上皮透镜状细胞增殖。

所述的拮抗剂也可以用于与药学上可接受的载体(如此后所描述的)组合。

本发明的多肽、刺激物和拮抗剂也可用于与合适的药物载体组合,组成药物组合物。这种药物组合物包含治疗有效量的多肽、刺激物或拮抗剂和药学上可接受的载体或赋形剂。所述载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇和它们的组合。配方必须适合于施用方式。

本发明也提供了包含一个或多个装有一种或多种本发明的药物组合物成份的容器的药物包或药盒。与这种容器有关的可以是由管理药品和生物制品制造、使用或销售的政府机构以规定的形式发出的通知,这种通知反映出有关人施用品制造、使用或销售的政府机构的认可。此外,本发明的多肽、刺激物和拮抗剂可以用于与其它治疗化合物结合。

所述药物组合物可以以便利的方式给药,如以口服、表面、静脉内、腹膜内、肌内、皮下、鼻内或真皮内途径给药。所述药物组合物以治疗和/或预防特定疾病有效的量施用,一般以至少约 100μg/Kg 体重施用,在大多种情况下,以不超过约 8mg/Kg 体重/天的量施用。

在大多数情况下，考虑到给药途径、症状等，日剂量从约 10μg/Kg 到约 1mg/Kg 体重。在表面给药的特定情况下，施用的剂量优选地是约 0.1μg 至 9mg/cm^2。

FGF－10 多肽，为肽的刺激物和拮抗剂也可以按照本发明经体内表达这种多肽使用，这常被称作“基因治疗”。

因此，例如，用来自体内的编码多肽的多核苷酸(DNA 或 RNA)经基因工程制得细胞，然后该基因工程细胞向待治疗病人提供多肽。这些方法是本领域公知的。例如可以按照本领域公知的方法，用包含编码本发明的多肽的 RNA 的送转录病毒颗粒由基因工程制得细胞。

类似地，用例如本领域公知的方法体内由基因工程制备用于体内表达多肽的细胞。如本领域公知的，产生包含编码本发明多肽的 RNA 的逆转录病毒颗粒的产生细胞可以给病人施用以便在体内由基因工程制备细胞和体内表达多肽。通过本发明的阐述，用这类方法施用本发明多肽的这些和其它方法对本领域技术人员应是显而易见的。例如基因工程细胞表达载体可以不是逆转录病毒颗粒(如腺病毒)，它们在与合适的传送载体组合后可以用于在体内由基因工程产生细胞。

本发明也涉及 FGF－10 基因作为诊断试验的一部分在检测与 FGF－10 核酸序列突变存在相关的疾病或疾病易感性上的用途。

具有 FGF－10 基因突变的个体可以用各种技术在 DNA 水平上检测。可以从病人细胞(如血、尿、唾液、组织活组织检查和尸体检查材料)获得诊断用的核苷酸。在分析前，基因组 DNA 可以直接用于检测，或者可以用 PCR 酶促扩增(Saiki et al., Nature, 324:163－166 (1986))。RNA 或 cDNA 也可以用于相同的目的。一个例子是与编码 FGF－10 的核酸互补的 PCR 引物可以用于鉴别和分析 FGF－10 突变。例如，缺失和插入可以经与普通基因型比较的扩增产物的大小变化来检测。点突变可以通过将扩增 DNA 杂交到放射性标记的 FGF－10RNA 或者放射性标记的 FGF－10 反义 DNA 序列上来识别。完全配对的序列可以由 RNase A 消化或由熔化温度不同与错

配双链体区别。

基于 DNA 序列不同的遗传试验可以通过检测有或没有变性剂时 DNA 片段在凝胶上电泳迁移率的改变来进行。小的序列缺失和插入可以通过高分辨凝胶电泳看见。不同序列的 DNA 片段可以在变性甲酰胺梯度凝胶上辨别，不同 DNA 片段的迁移按其特定的熔化或部分融化温度在凝胶的不同位置被阻滞(参见，例如 Myers et al.，Science，230：1242(1985))。

在特定位置的序列变化也可以经核酸酶保护试验(如 RNase 和 SI 保护)或化学裂解法(例如，Cotton et al.，PNAS，USA，85：4397－4401(1985))描示出。

因此，特定 DNA 序列的检测也可以由多种方法进行，这些方法例如杂交、RNase 保护、化学裂解、直接 DNA 测序或使用限制性酶(如，限制性片段长度多态性(RFLP)和基因组 DNA 的 Southern 印迹。

除了较常用的凝胶电泳和 DNA 测序外，也可以用原位分析检测突变。

本发明也涉及检测各种组织中 FGF－10 蛋白质改变的水平的诊断试验方法，因为与正常对照组织样品相比的蛋白质的过度表达可以检测疾病或疾病易感性(如肿瘤)的存在。用于检测得自宿主的样品中 FGF－10 蛋白质水平的试验方法是本领域技术人员熟知的，包括放射免疫测定、竞争性结合试验、Western 印迹分析、ELISA 试验的“夹心”试验。ELISA 试验(Coligan，et al.，Current Protocols in Immunology，1(2)，Chapter 6，(1991))开始包括制备对 FGF－10 抗原特异性的抗体，优选的是单克隆抗体。此外，针对单克隆抗体制备报道抗体。可检测的反应剂(如放射活性、荧光或这一实施例中的辣根过氧化物酶)连接到报道抗体上。从宿主移出样品，在结合样品中蛋白质的固体支持物(如聚苯乙烯皿)上温育。然后通过与非特异性蛋白质(类似牛血清白蛋白)一起温育覆盖皿上的任何游离蛋白质结合位点。接着，在皿中温育单克隆抗体，在此期间，单克隆抗体连接到附着于聚苯乙烯皿上的任何 FGF－10 蛋白质上。用缓冲溶液洗

掉所有未结合的单克隆抗体。将连接辣根过氧化物酶的报道抗体置入皿中，引起报道抗体与任何结合有 FGF－10 的单克隆抗体结合，然后洗掉未连接的报道抗体。接着将过氧化物酶底物添加剂皿中，与标准曲线比较，在给定时间内的显色量是量度给定体积的病人样品中存在的 FGF－10 蛋白质的量的尺度。

可以使用竞争试验，其中对 FGF－10 特异性的抗体附着于固体支持物上，标记 FGF－10 和来源于宿主的样品通过固体支持物，通过例如液体闪烁色谱检测的标记的量可以与样品中 FGF－10 的量相关联。

“夹心”试验类似于 ELISA 试验。在“夹心”试验中，FGF－10 通过固体支持物并结合到附着于固体支持物上的抗体上。然后第二抗体结合到 FGF－10 上。接着，标记的和对第二抗体特异性的第三抗体通过固体支持物并结合到第二抗体上，结合的量可以定量测定。

本发明的序列对染色体识别也有价值。所述序列特异性定向于并可以杂交到单个人染色体的特定位置。而且，当前需要识别染色体上的特定位点。目前可获得很少的用于标记染色体位置的基于实际序列数据(重复多态性的)的染色体标记试剂。按照本发明的染色体的 DNA 作图是将那些序列和与疾病相关的基因关联起来的重要的第一步。

简单地说，可以通过从 CDNA 制备 PCR 引物(优选的是 15－25bp)对染色体序列作图。3’未转译区的计算机分析用于快速选择长度不大于基因组 DNA 中一个外显子的引物。由此使扩增方法复杂化。然后将这些引物用于含单个人染色体的体细胞杂交体的 PCR 筛选。仅有包含相应于引物的人基因的那些杂交体产生扩增的片段。

体细胞杂交体的 PCR 作图是指定特定染色体的特定 DNA 的快速方法。按照本发明由相同的寡核苷酸引物，可以用一组特定染色体片段或一组大的基因组克隆以类似的方法再定位。可以类似地用于对染色体作图的其它作图策略包括原位杂交、用标记的流式分选染色体预筛选，经杂交构建染色体特异性－cDNA 文库的预选择。

在一个步骤中，有关中期染色体分布的 cDNA 克隆的荧光原位杂交(FISH)可以给出准确的染色体位置。这一技术可以与短至 500 或 600 碱基的 cDNA 一起使用；然而，大于 2,000bp 的克隆具有结合到独一无二的染色体位置给出简单检测的足够信号强度的较大可能性。FISH 需要使用克隆，表达序列标记(本发明的基因片段)得自这种克隆，并且该克隆越长越好。例如，2,000bp 是好的，4,000 更好，大于 4,000 对于在合理的时间内获得良好的结果可能不是必需的。这种技术的综述参见 Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988)。

一旦序列对准确染色体位置作图，则序列在染色体上的自然位置就可以与遗传图数据相关，这种数据在例如 V. MeKusick, Mendelian Inheritance in Man 中找到(通过 Johns Hopkins University Weleh Medical Library 可联机获得)。然后经连锁分析(自然毗邻基因的共遗传)鉴别基因与已对相同的染色体区作图的疾病之间的关系。

接着需要确定感染和非感染个体之间 cDNA 或基因组序列的不同。如果在某些或全部感染个体中观察到突变，而在任何正常个体中观察不到，则突变很可能是疾病的起因。

按物理作图和遗传作图技术现在的分辨率，准确定位到疾病相关染色体区的 cDNA 可能是一种 50 和 500 之间的潜在致病基因(这里假定 1 兆碱基作图分辨率和每 20kb 一个基因)。

所述多肽、其片段或其衍生物、或其类似物、或表达它们的细胞可以用作免疫原以由此产生抗体。这些抗体可以是例如多克隆抗体或单克隆抗体。本发明也包括嵌合、单链和人源化抗体，以及 Fab 片段或 Fab 表达文库产物。本领域公知的各种方法可以用于产生这种抗体和片段。

针对相应于本发明序列的多肽的产生的抗体可以通过直接将所述多肽注射到动物中或通过给动物(优选的是非人动物)施用所述多肽来获得。如此获得的抗体将结合所述多肽本身。用这种方式，即使仅编码多肽的片段的序列也可以用于产生结合整个天然多肽的抗

体。然后这种抗体可以用于从表达多肽的组织分离多肽。

为了制备单克隆抗体，可以使用任何经连续细胞系培养产生抗体的技术。例子包括杂交瘤技术(Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495－497)，trioma 技术、人 β－细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., 1983. immunology Today 4:72)，和产生人单克隆抗体的 EBV－杂交瘤技术(Cole, et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77－96)。

可以采用描述过的产生单链抗体的技术(US 4, 946, 778)以产生针对本发明的免疫原性多肽产物的单链抗体。转基因小鼠也可以用于表达针对本发明免疫原性多肽产物的人源化抗体。

将参照实施例进一步描述本发明。然而应当清楚，本发明不受这些实施例的限制。除非有特别的说明，所有份数或用量均为重量值。

为了有利于理解下列实施例，以下描述某些经常出现的方法和/或术语。

"质粒"用写在前面的小写字母 p 和/或后接大写字母和/或数字表示。本发明中的起始质粒是市售的或者无限制性的公众可获得的，或者可以按照出版的方法从可获得的质粒构建。此外，所述质粒的等价质粒是本领域公知的，对普通技术人员是显而易见的。

DNA 的"消化"指用仅在某些 DNA 序列上作用的限制酶酶切 DNA。本发明中使用的各种限制酶是商业上可获得的，使用普通技术人员公知的其反应条件，辅助因子和其它条件。为了分析目的，一般是在约 20μl 缓冲液溶液中使用 1μg 质粒或 DNA 片段和 2 单位的酶。为了质粒构建分离 DNA 片段目的，一般是在较大体积中用 20 到 50 单位的酶消化 5 到 50μgDNA。用于特定限制酶的合适缓冲溶液和底物的量由制造者指定。一般在 37℃下使用约 1 小时的温育时间，但可以按供应者的说明变化。消化后，将反应物直接在聚丙烯酰胺凝胶上电泳以分离所需片段。

用 Goeddel, D. et al., Nucleic Acids Res., 8:4057(1980)描述的 8%聚丙烯酰胺凝胶完成酶切片段的大小分离。

"寡核苷酸"指可以化学合成的单链聚脱氧核苷酸或两条互补的聚脱氧核苷酸链。这种合成寡核苷酸无5′磷酸盐，因此在激酶存在下在不与ATP一起添加磷酸盐的情况下将不连接到另一个寡核苷酸上。合成寡核苷酸将连接到未去磷酸化的片段上。

"连接"指在两个双链核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程(Maniatis, T., et al., Id., p. 146)。除非有其它说明，连接可以用公知的缓冲液和条件用每0.5μg约等摩尔量的待连接DNA片段10单位T4 DNA连接酶("连接酶")来完成。

除非有其它说明，按Graham, F. and Van der Eb, A., Virology, 52:456－457(1973)描述的方法完成转化。

实施例1

在人成熟组织中FGF－10mRNA的组织分布

为了分析FGF－10mRNA的表达，以放射性标记的完整的FGF－10cDNA为探针用2μg来源于几种人成熟组织的聚A^+mRNA完成Northem分析。结果表明1，4kb信息在骨胳肌中得到最高的表达，在心、脑、胎盘、肾和胰中得到中等水平的表达，在肝脏中得到低水平的表达。在心脏中也存在4.4kb、2.4kb和0.5kb的3种其它片段。很可能这些心脏中的不同大小的mRNA由交替的剪接形成。在脑中，也存在4.4kb mRNA。从Clontech Laboratories, Inc. Palo Alto. CA获得具有2μg结合到膜上的几种人成熟组织的聚A^+mRNA尼龙印迹。该印迹与完整的FGF－10cDNA杂交，所述cDNA经随机引物标记用放射活性dCTP标记。在7% SDS、0.5MAapO4、PH7.2和1% BSA中于65℃下过夜完成杂交。在0.2xSSC、0.1% SDS中65℃下洗涤2x30分钟后，将所述印迹露置于带增感屏的X光胶片下一夜。

实施例2

经体外转录和转译表达FGF－10

体外转录和转译FGF－10cDNA，ATCC＃75696，以确定由全长和部分FGF－10cDNA编码的可转译多肽的大小。用以下三对引物经PCR扩增pBluescript SK载体中的FGF－10全长和部分cDNA

插入物：1)M13－反向和正向引物；2)M13－反向引物和 FGF 引物 P20；3)M13－反向引物和 FGF 引物 P22。这些引物的序列如下：

M13－2 反向引物：

5′－ATGCTTCCGGCTCGTATG－3′(SEQ ID NO.3)

这一序列位于 pBlueseript 载体中 FGF－10cDNA 插入物 5′末端的上游，并以就 cDNA 来说的反义取向。T3 启动子序列位于这一引物和 FGF－10cDNA 之间。

M13－2 正向引物

5′－GGGTTTTCCCAGTCACGAC－3′(SEQ ID NO.4)

这一序列位于 pBluescript 载体中 FGF－10cDNA 插入物 3′末端的下游，并以就 cDNA 插入物来说的反义取向。

FGF 引物 P20：

5′－GTGAGATCTGAGGGAAGAAGGGGA－3′(SEQ ID NO.5)

在 3′引物上的这一引物的 15bp 序列对 FGF－10cDNA 序列 bp780－766 是反义的，它在终止密码子下游 12bp。

FGF 引物 P22：

5′－CCACCGATAATCCTCCTT－3′(SEQ ID NO.6)

这一序列以反义取向位于 FGF－10cDNA 内，在终止密码子下游的约 213bp。

用所有三对引物的 PCR 反应产生在 cDNA 插入物前面带有 T3 启动子序列的扩增产物。所有三对引物产生编码全长 FGF－10 多肽的 PCR 产物。

将第一对引物的约 1μgPCR 产物、第二对引物的 0.3μg 产物、第三对引物的 0.3μg 产物用于体外转录/转译。用 TNT™偶联网织红细胞裂解物系统(Promega, CAT# L4950)在 25μl 体积中完成体外转录/转译反应。具体地说，反应物含有 12.5μlTNT 兔网织细胞裂解物、2μlTNT 反应缓冲液、1μlT3 聚合酶、1μl1mM 氨基酸混合物(减去甲硫氨酸)、4μl ^{35}S－甲硫氨酸(＞100Ci/mmol, 10mCi/ml)、1μl40U/μl RNasin 核糖核酸酶抑制剂、0.5 或 1μgPCR 产物。加入

无核酸酶的水使体积达25μl。反应物在30℃下温育2小时。在4－20％梯度SDS－PAGE凝胶上分析5μl反应产物。在25％异丙醇和10％乙酸中固定后，干燥凝胶并在70℃下置于X－光胶片下一夜。

如图3所示，包含全长FGF－10cDNA和在3′未转译区(3′UTR)缺少约340bp和约140bp的cDNA的PCR产物产生相同长度的转译产物，其分子量估计为约19kd(2－4泳道)。

通过本发明的阐述，进行本发明的许多修饰和变化是可能的，因而这些修饰和变化也在所附权利要求的范围内，除了具体描述的那些之外，也可以实施本发明。

序列表

(1)一般信息

(i)申请人:HU, ET AL.

(ii)发明名称:成纤维细胞生长因子－10

(iii)序列数:6

(iv)通讯地址:

(A)通讯人:CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI, STEWART&OLSTEIN

(B)街道:6 BECKER FARM ROAD

(C)城市:ROSELAND

(D)州:NEW JERSEY

(E)国家:USA

(F)邮码:07068

(v)计算机可读形式:

(A)介质类型:3.5 英寸磁盘

(B)计算机:IBM PS/2

(C)操作系统:MS－DOS

(D)软件:WORD PERFECT 5.1

(vi)当前的申请资料:

(A)申请号

(B)申请日:

(C)分类号:

(vii)以前的申请资料

(A)申请号:08/207,412

(B)申请日:1994 年 5 月 8 日

(viii)律师/代理人信息:

(A)姓名:FERRARO, GREGORY D.

(B)登记号:36,134

(C)证书号:325800－347

(ix)通讯信息

(A)电话:201－994－1700

(B)传真:201－994－1744

(2)SEQ ID NO.1 信息:

(i)序列特征

(A)长度:1121 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:cDNA

(xi)序列描述:SEQ ID NO.1

```
GGCAAAGTGG GATGATCTGT CACTACACCT GCAGCACCAC GCTCGGAGGA CAGCTCCTGC   60
CTGCAGCTTC CAGACCCAGG AAGCCTGAGG GGAAGGAAGG AAGTACGGGC GAAATCATCA  120
GATTGGCTTC CCAGATTTGG GAATCTGAAG CGGGCCCACA TCTTCCGGCC AACTTCCATT  180
GAACTTCCCA GCACTCGAAA GGGACCGAAA TGGAGAGCAA AGAACCCCAG CTCAAAGGGA  240
TTGTGACAAG GTTATTCAGC CAGCAGGGAT ACTTCCTGCA GATGCACCCA GATGGTACCA  300
TTGATGGGAC CAAGGACGAA AACAGCGACT ACACTCTCTT CAATCTAATT CCCGTGGGCC  360
TGCGTGTAGT GGCCATCCAA GGAGTGAAGG CTAGCCTCTA TGTGGCCATG AATGGTGAAG  420
GCTATCTCTA CAGTTCAGAT GTTTTCACTC CAGAATGCAA ATTCAAGGAA TCTGTGTTTG  480
AAAACTACTA TGTGATCTAT TCTTCCACAC TGTACCGCCA GCAAGAATCA GGCCGAGCTT  540
GGTTTCTGGG ACTCAATAAA GAAGGTCAAA TTATGAAGGG GAACAGAGTG AAGAAAACCA  600
AGCCCTCATC ACATTTTGTA CCGAAACCTA TTGAAGTGTG TATGTACAGA GAACCATCGC  660
TACATGAAAT TGGAGAAAAA CAAGGGCGTT CAAGGAAAAG TTCTGGAACA CCAACCATGA  720
ATGGAGGCAA AGTTGTGAAT CAAGATTCAA CATAGCTGAG AACTCTCCCC TTCTTCCCTC  780
TCTCATCCCT TCCCCTTCCC TTCCTTCCCA TTTACCCATT TCCTTCCAGT AAATCCACCC  840
AAGGAGAGGA AAATAAAATG ACAACGCAAG CACCTAGTGG CTAAGATTCT GCACTCAAAA  900
TCTTCCTTTG TGTAGGACAA GAAAATTGAA CCAAAGCTTG CTTGTTGCAA TGTTGTAGAA  960
AATTCACGTT CACAAAGATT ATCACACTTA AAAGCAAAGG AAAAAATAAA TCAGAACTCC 1020
ATAAATATTA AACTAAACTG TATTGTTATT AGTAGAAGGC TAATTGTAAT GAAGACATTA 1080
ATAAAGGTGA AATAAACTTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A                      1121
```

(2)SEQ ID NO.2 信息:

(i)序列特征:

(A)长度:181 个氨基酸

(B)类型:氨基酸

(C)链型:

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:蛋白质

(xi)序列描述:SEQ ID NO.2:

```
Met Glu Ser Lys Glu Pro Gln Leu Lys Gly Ile Val Thr Arg Leu
 5                  10                  15
Phe Ser Gln Gln Gly Tyr Phe Leu Gln Met His Pro Asp Gly Thr
            20                  25                  30
Ile Asp Gly Thr Lys Asp Glu Asn Ser Asp Tyr Thr Leu Phe Asn
        35                  40                  45
Leu Ile Pro Val Gly Leu Arg Val Val Ala Ile Gln Gly Val Lys
    50                  55                  60
Ala Ser Leu Tyr Val Ala Met Asn Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr Ser
65                  70                  75
Ser Asp Val Phe Thr Pro Glu Cys Lys Phe Lys Glu Ser Val Phe
                80                  85                  90
Glu Asn Tyr Tyr Val Ile Tyr Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Gln Gln
            95                  100                 105
Glu Ser Gly Arg Ala Trp Phe Leu Gly Leu Asn Lys Glu Gly Gln
        110                 115                 120
Ile Met Lys Gly Asn Arg Val Lys Lys Thr Lys Pro Ser Ser His
    125                 130                 135
Phe Val Pro Lys Pro Ile Glu Val Cys Met Tyr Arg Glu Pro Ser
140                 145                 150
Leu His Glu Ile Gly Glu Lys Gln Gly Arg Ser Arg Lys Ser Ser
155                 160                 165
Gly Thr Pro Thr Met Asn Gly Gly Lys Val Val Asn Gln Asp Ser
            170                 175                 180
Thr
```

(2)SEQ ID NO.3 信息:

(i)序列特征

(A)长度:18 个碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:寡核苷酸

(xi)序列描述:SEQ ID NO.3

ATGCTTCCGG CTCGTATG

(2)SEQ ID NO. 4 信息:

(i)序列特征

(A)长度:19 个碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:寡核苷酸

(xi)序列描述:SEQ ID NO. 4:

GGGTTTTCCC AGTCACGAC

(2)SEQ ID NO. 5 信息

(i)序列特征

(A)长度:24 个碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:寡核苷酸

(xi)序列描述:SEQ ID NO. 5:

GTGAGATCTG AGGGAAGAAG GGGA

(2)SEQ ID NO. 6 信息:

(i)序列特征

(A)长度:18 个碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:寡核苷酸

(xi)序列描述:SEQ ID NO. 6:

CCACCGATAA TCCTCCTT

说 明 书 附 图

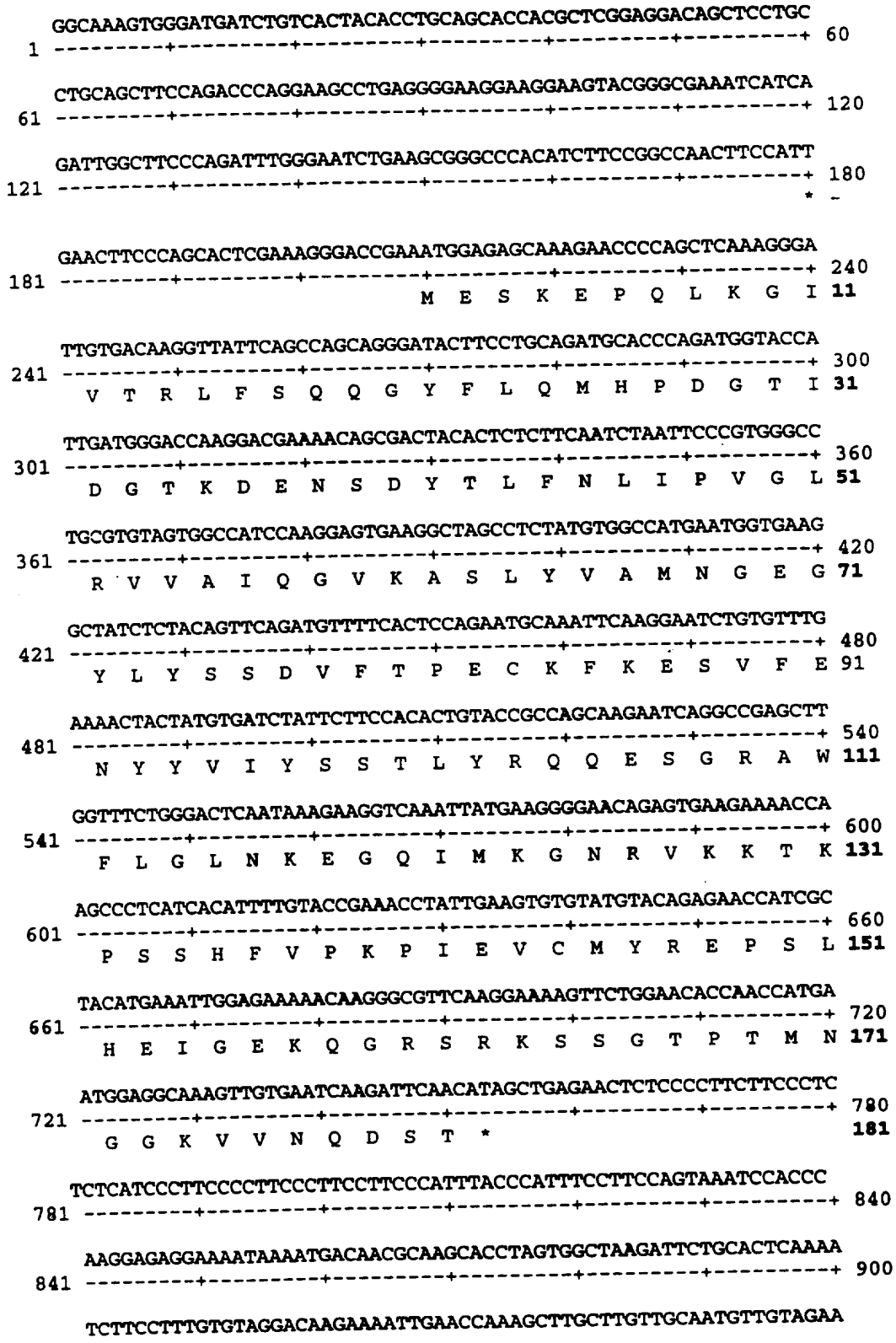

GGCAAAGTGGGATGATCTGTCACTACACCTGCAGCACCACGCTCGGAGGACAGCTCCTGC
1 60
CTGCAGCTTCCAGACCCAGGAAGCCTGAGGGGAAGGAAGGAAGTACGGGCGAAATCATCA
61 120
GATTGGCTTCCCAGATTTGGGAATCTGAAGCGGGCCCACATCTTCCGGCCAACTTCCATT
121 180
GAACTTCCCAGCACTCGAAAGGGACCGAAATGGAGAGCAAAGAACCCCAGCTCAAAGGGA
181 240
M E S K E P Q L K G I 11
TTGTGACAAGGTTATTCAGCCAGCAGGGATACTTCCTGCAGATGCACCCAGATGGTACCA
241 300
V T R L F S Q Q G Y F L Q M H P D G T I 31
TTGATGGGACCAAGGACGAAAACAGCGACTACACTCTCTTCAATCTAATTCCCGTGGGCC
301 360
D G T K D E N S D Y T L F N L I P V G L 51
TGCGTGTAGTGGCCATCCAAGGAGTGAAGGCTAGCCTCTATGTGGCCATGAATGGTGAAG
361 420
R V V A I Q G V K A S L Y V A M N G E G 71
GCTATCTCTACAGTTCAGATGTTTTCACTCCAGAATGCAAATTCAAGGAATCTGTGTTTG
421 480
Y L Y S S D V F T P E C K F K E S V F E 91
AAAACTACTATGTGATCTATTCTTCCACACTGTACCGCCAGCAAGAATCAGGCCGAGCTT
481 540
N Y Y V I Y S S T L Y R Q Q E S G R A W 111
GGTTTCTGGGACTCAATAAAGAAGGTCAAATTATGAAGGGGAACAGAGTGAAGAAAACCA
541 600
F L G L N K E G Q I M K G N R V K K T K 131
AGCCCTCATCACATTTTGTACCGAAACCTATTGAAGTGTGTATGTACAGAGAACCATCGC
601 660
P S S H F V P K P I E V C M Y R E P S L 151
TACATGAAATTGGAGAAAAACAAGGGCGTTCAAGGAAAAGTTCTGGAACACCAACCATGA
661 720
H E I G E K Q G R S R K S S G T P T M N 171
ATGGAGGCAAAGTTGTGAATCAAGATTCAACATAGCTGAGAACTCTCCCCTTCTTCCCTC
721 780
G G K V V N Q D S T * 181
TCTCATCCCTTCCCCTTCCCTTCCTTCCCATTTACCCATTTCCTTCCAGTAAATCCACCC
781 840
AAGGAGAGGAAAATAAAATGACAACGCAAGCACCTAGTGGCTAAGATTCTGCACTCAAAA
841 900
TCTTCCTTTGTGTAGGACAAGAAAATTGAACCAAAGCTTGCTTGTTGCAATGTTGTAGAA

图 1 1/2

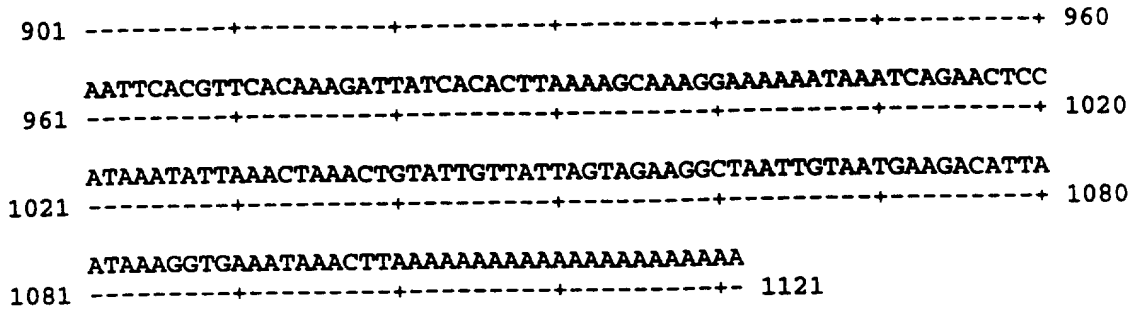

901
960
AATTCACGTTCACAAAGATTATCACACTTAAAAGCAAAGGAAAAAATAAATCAGAACTCC
961
1020
ATAAATATTAAACTAAACTGTATTGTTATTAGTAGAAGGCTAATTGTAATGAAGACATTA
1021
1080
ATAAAGGTGAAATAAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1081
1121

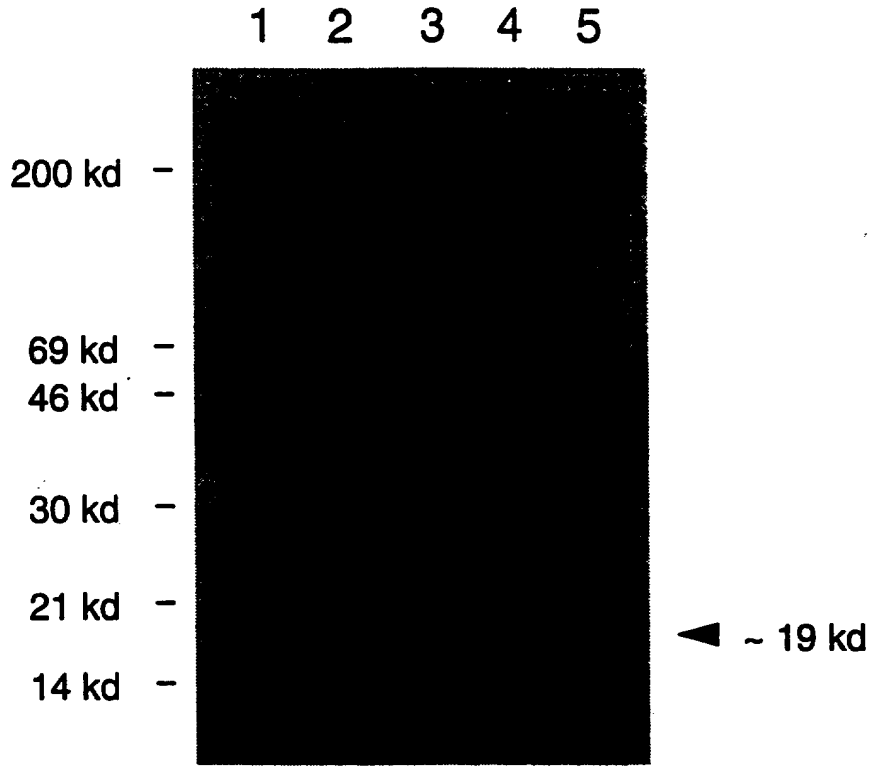
图 1　2/2

```
        1                                                                  50
Fgf-1   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-2   .......... .......... ..LGDRGRGR ALPGGRLGGR GRGRAPERVG
Fgf-4   .......... MS.GPGTAAV ALLPAVLLAL LA........ .PWAGRGGAA
Fgf-6   MALGQKLFIT MSRGAGRLQG TLWALVFLGI LV........ .GMVVPSPAG
Fgf-5   .......... .......MSL SFLLLLFFSH LILSAWAHGE KRLAPKGQPG
Fgf-9   .......... .......... .......... .......... ..MAPLGEVG
Fgf10   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-3   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-7   .......... .......... .......... .........M HKWILTWILP

        51                                                                100
Fgf-1   .......... .......... .......MAE GEITTFTALT EKFN...LPP
Fgf-2   GRGRGRGTAA PRAAPAARGS RPGPAGTMAA GSITTLPALP EDGGSGAFPP
Fgf-4   APTAPNGTLE AELERRWESL VALSLARLPV AA..QPKEAA VQSGAGDYLL
Fgf-6   TR.ANNTLLD S...RGWGTL LSRSRAGLAG EI......AG VNWESG.YLV
Fgf-5   PAATDRNPIG SSSRQSSSSA MSSSSASSSP AASLGSQGSG LEQSSFQWSP
Fgf-9   NYFGVQDAVP FGNVPVLPVD SPVLLSDHLG QSEAGGLPRG PAVTDLDHLK
Fgf10   .......... .......... .......... .......... .MESKEPQLK
Fgf-3   .......... MGLIWLLLLS LLEPGWPAAG PGARLRRDAG GRGGVYEHLG
Fgf-7   TLLYRSCFHI ICLVGTISLA CNDMTPEQMA TNVNCSSPER HTRSYDYMEG

        101                                                               150
Fgf-1   GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ LSAESVGEVY
Fgf-2   GHFKDPKRLY CKNGGFFLRI HPDGRVDGVR EKSDPHIKLQ LQAEERGVVS
Fgf-4   GIKRLRRLYC NVGIGFHLQA LPDGRIGGAH ADT.RDSLLE LSPVERGVVS
Fgf-6   GIKRQRRLYC NVGIGFHLQV LPDGRISGTH EEN.PYSLLE ISTVERGVVS
Fgf-5   SGRRTGSLYC RVGIGFHLQI YPDGKVNGSH EAN.MLSVLE IFAVSQGIVG
Fgf-9   GILRRRQLYC RT..GFHLEI FPNGTIQGTR KDHSRFGILE FISIAVGLVS
Fgf10   GIVTR..LFS QQ..GYFLQM HPDGTIDGTK DENSDYTLFN LIPVGLRVVA
Fgf-3   GAPRRRKLYC AT..KYHLQL HPSGRVNGSL .ENSAYSILE ITAVEVGIVA
Fgf-7   GDIRVRRLFC RT..QWYLRI DKRGKVKGTQ EMKNNYNIME IRTVAVGIVA

        151                                                               200
Fgf-1   IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKH...
Fgf-2   IKGVCANRYL AMKEDGRLLA SKCVTDECFF FERLESNNYN TYRSRKY...
Fgf-4   IFGVASRFFV AMSSKGKLYG SPFFTDECTF KEILLPNNYN AYESYKY...
Fgf-6   LFGVRSALFV AMNSKGRLYA TPSFQEECKF RETLLPNNYN AYESDLY...
Fgf-5   IRGVFSNKFL AMSKKGKLHA SAKFTDDCKF RERFQENSYN TYASAIH...
Fgf-9   IRGVDSGLYL GMNEKGELYG SEKLTQECVF REQFEENWYN TYSSNLY...
Fgf10   IQGVKASLYV AMNGEGYLYS SDVFTPECKF KESVFENYYV IYSSTLY...
Fgf-3   IRGLFSGRYL AMNKRGRLYA SEHYSAECEF VERIHELGYN TYASRLYRTV
Fgf-7   IKGVESEFYL AMNKEGKLYA KKECNEDCNF KELILENHYN TYASAKW...

        201                                                               250
Fgf-1   .......... .AEKNWFVGL KKNGSCKRG. .PRTHYGQKA ILFLPLPVSS
Fgf-2   .......... .T..SWYVAL KRTGQYKLG. .SKTGPGQKA ILFLPMSAKS
Fgf-4   .......PGM ......FIAL SKNGKTKKG. .NRVSPTMKV THFLPRL...
Fgf-6   .......QGT ......YIAL SKYGRVKRG. .SKVSPIMTV THFLPRI...
Fgf-5   .......RTE KTGREWYVAL NKRGKAKRGC SPRVKPQHIS THFLPRFKQS
Fgf-9   .......KHV DTGRRYYVAL NKDGTPREG. .TRTKRHQKF THFLPRPVD.
Fgf10   .......RQQ ESGRAWFLGL NKEGQIMKG. .NRVKKTKPS SHFVPKPIE.
Fgf-3   SSTPGARRQP SAERLWYVSV NGKGRPRRG. .FKTRRTQKS SLFLPRVLDH
Fgf-7   .........T HNGGEMFVAL NQKGIPVRG. .KKTKKEQKT AHFLPMAIT.
```

图 2 1/2

```
        251                                                        300
Fgf-1   D.......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-2   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-4   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-6   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-5   EQPELSFTVT VPEKKNPPSP IKSKIPLSAP RKNTNSVKYR LKFRFG....
Fgf-9   .......... ..PDKVPELY KDILSQS... .......... ..........
Fgf10   .......... ..VCMYREPS LHEIGEKQGR SRKSSGTPTM NGGKVVNQDS
Fgf-3   RDHEMVRQLQ SGLPRPPGKG VQPRRRRQKQ SPDNLEPSHV QASRLGSQLE
Fgf-7   .......... .......... .......... .......... ..........

        301
Fgf-1   ....
Fgf-2   ....
Fgf-4   ....
Fgf-6   ....
Fgf-5   ....
Fgf-9   ....
Fgf10   T*..
Fgf-3   ASAH
Fgf-7   ....
```

图 2 2/2



泳道 1: 14-C & rainbow M.W. 标记
泳道 2: FGF10 (M13- 反向 & 正向引物)
泳道 3: FGF10 (M13- 反向 & FGF-P20 引物)
泳道 4: FGF10 (M13- 反向 & FGF-P22 引物)
泳道 5: FGF 对照

图 3