[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
A61K 38/16
C07K 14/435 C07K 14/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98813339.3

[43]公开日 2001年2月14日

[11]公开号 CN 1283997A

[22]申请日 1998.12.22 [21]申请号 98813339.3
[30]优先权
[32]1997.12.22 [33]US [31]60/068,493
[86]国际申请 PCT/US98/26085 1998.12.22
[87]国际公布 WO99/32135 英 1999.7.1
[85]进入国家阶段日期 2000.7.26
[71]申请人 人类基因组科学公司
地址 美国马里兰
[72]发明人 R·L·杰茨 A·乔普拉 P·考萨尔
T·斯比茨纳格尔 E·安斯沃茨
F·克翰
[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 樊卫民

权利要求书8页 说明书53页 附图页数8页

[54]发明名称 角质形成细胞生长因子-2制剂

[57]摘要

本发明涉及角质形成细胞生长因子-2(KGF-2)及其衍生物的液体和冻干制剂。本发明进一步涉及用于治疗用途如促进或加速创伤痊愈的KGF-2制剂。

ISSN1008-4274

00.07.26

权 利 要 求 书

1. 一种药物组合物，其含有:

（a）一种 KGF-2 多肽，浓度为约 0.02-约 40mg/ml（w/v）;

（b）一种缓冲剂，其缓冲容量为约 pH5.0-约 pH8.0，浓度为约 5mM-约 50mM；和

（c）一种药学可接受的稀释剂，使组合物达到指定体积。

或其反应产物。

2. 权利要求 1 的药物组合物，其进一步含有:

（d）一种浓度为约 0.1mM-约 10mM 的螯合剂；和

（e）浓度为约 0.01mM-约 150mM 的 NaCl。

3. 权利要求 1 的药物组合物，其进一步含有下列成分之一:

（f）约 0.5%-约 2% w/v 甘油，

（g）约 0.1%-约 1% w/v 甲硫氨酸，或

（h）约 0.1%-约 2% w/v 单硫代甘油。

4. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽以约 0.05-约 30mg/ml（w/v）的浓度存在。

5. 权利要求 4 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽以约 0.1-约 20mg/ml（w/v）的浓度存在。

6. 权利要求 5 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽以约 0.2-4mg/ml 的浓度存在。

7. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽为 KGF-2 Δ33。

8. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述稀释剂为水。

9. 权利要求 2 的药物组合物，其中所述螯合剂为浓度约 1mM 的 EDTA，所述 NaCl 以约 125mM 的浓度存在。

10. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 pH 为约 pH5.5-约 pH6.5。

11. 权利要求 10 的药物组合物，其中所述 pH 为约 pH6.2。

12. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述缓冲剂选自磷酸、乙酸、乌头酸、柠檬酸、戊二酸、苹果酸、琥珀酸、碳酸，及其碱或碱土盐。

13. 权利要求 12 的药物组合物，其中所述缓冲剂是磷酸盐、乙酸盐或柠檬酸盐。

14. 权利要求 13 的药物组合物，其中所述缓冲剂是柠檬酸盐。

15. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述缓冲剂以约 5mM-约 30mM 的浓度存在。

16. 权利要求 15 的药物组合物，其中所述缓冲剂是以约 10mM-约 20mM 的浓度存在的柠檬酸盐。

17. 权利要求 1 的药物组合物，其进一步含有稳定量的一种或多种（a）抗氧化剂或（b）硫醇化合物。

18. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述组合物保存于-20℃或更低的温度下。

19. 权利要求 1 的药物组合物，其含有：

（a）2mg/ml KGF-2 Δ33 多肽（w/v）；

（b）20mM 乙酸钠；

（c）125mM NaCl；

（d）1mM EDTA；和

（e）水作为稀释剂，或

其反应产物。

20. 权利要求 19 的药物组合物，其中所述 KGF-2 Δ33 多肽选自含有 N 端甲硫氨酸的 KGF-2 Δ33 多肽、缺乏 N 端甲硫氨酸的 KGF-2 Δ33 多肽，及其混合物。

21. 一种药物组合物，其含有：

（a）一种 KGF-2 多肽，浓度为约 0.02-约 40mg/ml（w/v）；

（b）一种缓冲剂，其缓冲容量为约 pH5.0-约 pH8.0，浓度为约 5mM-约 50mM；

（c）一种填充剂；和

（d）一种药学可接受的稀释剂，使组合物达到指定体积；

或其反应产物。

22. 权利要求 21 的药物组合物，其中所述填充剂选自蔗糖、甘氨酸、

甘露醇、海藻糖及其混合物。

23. 权利要求 21 的药物组合物，其进一步含有:

（e）一种浓度为约 0.1mM-约 10mM 的螯合剂；和

（f）浓度为约 0.01mM-约 125mM 的 NaCl.

24. 权利要求 22 的药物组合物，其中所述填充剂是蔗糖或蔗糖与甘氨酸的混合物。

25. 权利要求 22 的药物组合物，其中所述填充剂以约 2%-约 10% w/v 的浓度存在。

26. 权利要求 22 的药物组合物，其中所述填充剂为 5%甘露醇、7%蔗糖、8%海藻糖或 2%甘氨酸+0.5%蔗糖。

27. 权利要求 21 的药物组合物，其中所述 pH 约为 pH6.2。

28. 权利要求 21 的药物组合物，其中所述稀释剂是水。

29. 权利要求 21 的药物组合物，其中所述缓冲剂选自磷酸、乙酸、乌头酸、柠檬酸、戊二酸、苹果酸、琥珀酸、碳酸，及其碱或碱土盐。

30. 权利要求 29 的药物组合物，其中所述缓冲剂是磷酸盐或柠檬酸盐。

31. 权利要求 30 的药物组合物，其中所述缓冲剂是柠檬酸盐。

32. 权利要求 28 的药物组合物，其中 90%以上的水通过冻干去除。

33. 权利要求 32 的药物组合物，其用能有效保持大约 290mOsm 等渗条件的量的无菌水重建。

34. 权利要求 21 的药物组合物，其中所述 KGF 多肽是 KGF-2 Δ33.

35. 权利要求 34 的药物组合物，其中所述 KGF-2 Δ33 多肽选自含有 N 端甲硫氨酸的 KGF-2 Δ33 多肽，缺乏 N 端甲硫氨酸的 KGF-2 Δ33 多肽，及其混合物。

36. 权利要求 21 的药物组合物，其中以约 5mM-约 50mM 的浓度加入所述缓冲剂。

37. 权利要求 36 的药物组合物，其中所述缓冲剂是浓度约为 10mM 的柠檬酸盐。

38. 权利要求 21 的药物组合物，其进一步含有稳定量的一种或多种

（g）抗氧化剂或（h）硫醇化合物。

39. 权利要求 32 的药物组合物，其中所述组合物用含有稳定量的抗氧化剂的无菌水重建，这些抗氧化剂包括：a）约 0.01%-约 2% w/v 单硫代甘油，b）约 0.01%-约 2% w/v 抗坏血酸，c）约 0.01%-约 2% w/v 甲硫氨酸或 d）其组合。

40. 一种药物组合物，其含有:

（a）一种浓度为约 0.02-约 40mg/ml（w/v）的 KGF-2 多肽;

（b）浓度为约 5mM-约 20mM 的柠檬酸或其药学可接受的盐;

（c）浓度约 0.01mM-约 125mM 的 NaCl;

（d）浓度约 0.1mM-约 10mM 的 EDTA，和

（e）蔗糖、甘露醇、甘氨酸或海藻糖中的一种或多种，浓度约 2% w/v -约 15% w/v；和

（f）水。

41. 权利要求 40 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽以约 2mg/ml、约 4 mg/ml 或约 10 mg/ml 的浓度存在。

42. 权利要求 40 的药物组合物，其中 90%以上的水通过冷冻干燥去除。

43. 权利要求 1 的药物组合物，其进一步含有可有效地使粘度提高到约 50-约 10,000 厘泊的量的增稠剂。

44. 权利要求 43 的药物组合物，其中所述增稠剂以有效地使粘度提高到约 50-约 1,000 厘泊的量存在。

45. 权利要求 44 的药物组合物，其中所述增稠剂的量可有效地使粘度提高到约 200-约 300 厘泊。

46. 权利要求 21 的药物组合物，其进一步含有一种可有效地使粘度提高到约 50-约 10,000 厘泊的量的增稠剂。

47. 权利要求 43 的药物组合物，其中所述增稠剂以 0-5%（w/w）的浓度存在。

48. 权利要求 43 的药物组合物，其中所述增稠剂是水溶性醚化纤维素或与烯丙基蔗糖或季戊四醇烯丙醚与丙烯酸交联的高分子量聚合物。

49. 权利要求 48 的药物组合物，其中所述醚化纤维素是烷基纤维素、羟烷基纤维素、羧基烷基纤维素或烷基羟烷基纤维素。

50. 权利要求 43 的药物组合物，其中所述醚化纤维素是甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素。

51. 权利要求 49 的药物组合物，其中所述醚化纤维素衍生物具有约 50,000-约 700,000 的分子量，并以约 0%-约 20%重量的浓度存在。

52. 权利要求 51 的药物组合物，其中所述醚化纤维素衍生物具有约 80,000-约 240,000 的分子量，并以约 2%-约 8%重量的浓度存在。

53. 权利要求 46 的药物组合物，其中所述缓冲剂是浓度为约 10mM-约 50mM 的柠檬酸盐。

54. 权利要求 53 的药物组合物，其中所述缓冲剂是浓度为约 10mM-约 20mM 的柠檬酸盐。

55. 权利要求 53 的药物组合物，其中所述填充剂是浓度为约 0.01%-约 5%的蔗糖。

56. 权利要求 55 的药物组合物，其中直接向液体制剂中加入所述增稠剂，然后冻干。

57. 权利要求 55 的药物组合物，其中通过加入溶解有增稠剂的适当稀释剂重建所述制剂，来向冻干制剂中加入该增稠剂。

58. 一种增稠 KGF-2 多肽溶液组合物，它是通过混合下列成分形成的:

（a）一种局部有效量的 KGF-2 多肽;

（b）约 10mM-约 500mM 柠檬酸钠缓冲剂;

（c）约 0.01mM-约 150mM NaCl;

（d）1mM EDTA;

（e）约 0.1%-约 7%蔗糖;

（f）约 0.75%-约 1.5%（w/v）羧甲基纤维素，或约 0.5%-约 1.5%羟丙基甲基纤维素，或约 0.25%-约 0.75%羟乙基纤维素，或约 0%-1%卡波姆，或其任意组合。

59. 权利要求 1 的组合物，其进一步含有一种胶凝剂，其量可在室温

下有效地使粘度提高到约 0.1-约 10,000 厘泊。

60. 权利要求 21 的组合物，其进一步含有一种胶凝剂，其量可在室温下有效地使粘度提高到约 0.1-约 10,000 厘泊。

61. 权利要求 59 的组合物，其中所述凝胶形成剂是能形成粘性水溶液的水溶性聚合物，或能形成粘性溶液的非水溶性、水溶胀性聚合物。

62. 权利要求 61 的组合物，其中所述凝胶形成剂是一种高分子量聚合物，其选自乙烯基聚合物、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物、多糖、蛋白质、聚（环氧乙烷）、丙烯酰胺聚合物或其盐。

63. 权利要求 62 的组合物，其中所述凝胶形成剂是（1）一种乙烯基聚合物，选自聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇及其盐和酯；或（2）一种多糖，选自纤维素衍生物、糖胺聚糖、琼脂、果胶、藻酸、葡聚糖、α-直链淀粉、支链淀粉、脱乙酰壳多糖及其盐、酯。

64. 权利要求 62 的组合物，其中所述凝胶形成剂是一种糖胺聚糖，选自透明质酸、软骨素、软骨素-4-硫酸、硫酸乙酰肝素、肝素及其盐和酯。

65. 权利要求 64 的组合物，其中所述糖胺聚糖与胶原蛋白、明胶或纤连蛋白一起存在。

66. 权利要求 62 的组合物，其中所述凝胶形成剂是一种丙烯酰胺聚合物，选自聚丙烯酰胺或聚甲基丙烯酰胺。

67. 权利要求 62 的组合物，其中所述凝胶形成剂是一种聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

68. 权利要求 67 的组合物，其含有约 10%-约 60%重量的平均分子量约 500-50,000 的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

69. 权利要求 68 的组合物，其含有约 14%-约 18%重量的分子量为 1,000-15,000 的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

70. 权利要求 69 的组合物，其中所述凝胶形成剂是一种聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物，为普流罗尼 F108、普流罗尼 F127 或泊洛沙姆 407。

71. 权利要求 1 的组合物，其中所述 KGF-2 多肽以约 0.01mg/ml-约

10mg/ml 的浓度存在。

72. 权利要求 59 的组合物，其中所述组合物是通过混合下列成分形成的:

（a）一种 KGF-2 多肽，终计算浓度为 0.01mg/ml-约 10mg/ml;

（b）一种有效量的缓冲剂;

（c）约 10%-约 60%重量的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物，其有约 500-50,000 的平均分子量；和

（d）一种药学可接受的稀释剂，优选地水。

73. 权利要求 72 的组合物，其中聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物以约 14%-约 18%的浓度存在。

74. 一种 KGF-2 凝胶制剂，其含有:

（a）一种药学有效量的 KGF-2 多肽;

（b）约 10mM-约 500mM 柠檬酸钠;

（c）约 0.01mM-约 150mM NaCl;

（d）约 1mM EDTA;

（e）约 0.1%-约 7%蔗糖;

（f）约 14%-约 18% 普流罗尼 F127；和

（g）约 pH6.2。

75. 一种 KGF-2 凝胶制剂，其含有:

（a）一种浓度为约 0.01mg/ml-约 10mg/ml（w/v）的 KGF-2 多肽;

（b）浓度约 5mM-约 20mM 的柠檬酸钠;

（c）约 10%-约 25%（w/v）的普流罗尼 F127 和泊洛沙姆 407；和

（d）水，加至所需体积。

76. 权利要求 75 的凝胶制剂，其进一步含有:

（a）浓度约 0.1mM-约 10mM 的 EDTA。

（b）浓度约 0.01mM-约 125mM 的 NaCl。

77. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽是选自 Ala(63)--Ser(208)(KGF-2Δ28)和 Ser(69)--Ser(208)(KGF-2Δ33)的 N 端缺失体。

78. 权利要求 77 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽含有 N 端甲硫氨酸，缺乏 N 端甲硫氨酸，或是其混合物。

79. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽是一种 N 端或 C 端缺失突变体，选自：Ala(39)--Ser(208)；Pro(47)--Ser(208)；Val(77)--Ser(208)；Glu(93)--Ser(208)；Glu(104) --Ser(208)；Val(123)--Ser(208)；Gly(138)-- Ser(208)；Met(1)、Thr(36)和 Cys(37)--Lys(153)。

80. 权利要求 79 的药物组合物，其中所述 KGF-2 多肽含有 N 端甲硫氨酸，缺乏 N 端甲硫氨酸，或是其混合物。

81. 权利要求 7 的药物组合物，其中所述 KGF-2 Δ33 多肽选自含有 N 端甲硫氨酸的 KGF-2 Δ33 多肽，缺乏 N 端甲硫氨酸的 KGF-2 Δ33 多肽，及其混合物。

00.07.26

说　明　书

角质形成细胞生长因子-2 制剂

发明背景

发明领域

本发明涉及角质形成细胞生长因子-2（KGF-2）及其衍生物的液体和冻干制剂。本发明进一步涉及 KGF-2 制剂，尤其是局部和注射用制剂，它们能用于对需要软组织生长和再生的适应症的治疗用途。

相关技术

成纤维细胞生长因子家族是参与软组织生长和再生的生长因子大家族。目前包括几个成员，它们在蛋白质水平上具有不同程度的同源性，除一个例外之外，似乎具有相似的较广的促有丝分裂谱，即，它们促进中胚层和神经外胚层来源的多种细胞的增殖，和/或促进血管发生。

KGF 最初根据序列同源性或因子纯化和克隆被确定为 FGF 家族的一员。角质形成细胞生长因子（KGF）作为有丝分裂原从培养的鼠角质形成细胞系中分离（Rubin, J.S.等人，美国国家科学院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）86:802-806（1989））。不同于 FGF 家族的其它成员，它对间充质衍生的细胞没有活性，但刺激上皮细胞的生长。角质形成细胞生长因子是由来源于皮肤和胎肺的成纤维细胞产生的（Rubin 等人（1989））。发现角质形成细胞生长因子 mRNA 在成人肾、结肠和髂骨中表达，但不在脑或肺中表达（Finch, P.W.等人，科学（Science）245:752-755（1989））。KGF 显示 FGF 蛋白质家族内的保守区。KGF 可与 FGF-2 受体高亲和力地结合。

损害性创伤愈合是发病的一个重要来源，可导致如破裂、吻合破裂和非愈合性创伤等并发症。在正常个体中，可以无并发症地实现创伤愈合。相反，损伤愈合与几种病症如糖尿病、感染、免疫抑制、肥胖症和营养不良有关（Cruse, P.J.和 Foord, R.，外科文献（Arch. Surg.）107:206

（1973）; Schrock, T.R.等人，外科纪事（Ann. Surg.）177:513（1973）; Poole, G.U., Jr.，外科学（Surgery）97:631（1985）; Irvin, G.L.等人，美国外科学（Am. Surg.）51:418（1985））。

创伤修复是复杂相互作用和生物过程的结果。在正常创伤愈合中描述了三个阶段：急性炎症期、胞外基质和胶原蛋白合成，以及重塑（Peacock, E.E., Jr.，《创伤修复》（Wound Repair），第二版，WB Saunders, Philadelphia（1984））。过程包括角质形成细胞、成纤维细胞和炎症细胞在创伤部位的相互作用。

将能促进并增强软组织生长和再生的多肽配制于药物组合物中是希望的，该组合物（1）在长期的储存期中稳定，（2）提高了多肽的药理学活性或效力，并且/或者（3）允许治疗方案中多肽的方便应用或施用。

发明概述

本发明涉及 KGF-2 及其缺失或点突变或置换突变体（在此称为 KGF-2 多肽）的液体和冻干制剂。本发明进一步涉及这些 KGF-2 多肽制剂促进或加速软组织生长或再生的应用，例如用于创伤愈合或治疗粘膜炎（mucocytis）或炎症性肠病。本发明的优选制剂使用 KGF-2 的新突变体形式，在一个实施方案中使用一种在此被称为 KGF2-Δ33 的缺失突变体。制剂中使用的辅助成分（1）为 KGF-2 多肽提供贮存稳定性，（2）进一步增强治疗组合物的软组织愈合活性，并且/或者（3）以活性形式提供 KGF-2 多肽，而允许用于特殊治疗目的的方便应用或施用。

本发明的第一方面涉及一种含有 KGF-2 多肽和具有约 pH5.0-约 pH8.0 缓冲容量的缓冲剂的制剂。有用的缓冲剂包括磷酸盐、乙酸盐、乌头酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、碳酸盐和柠檬酸盐缓冲剂，柠檬酸盐缓冲剂是优选的。

本发明的第二方面涉及一种含有 KGF-2 多肽、冻干填充剂和具有约 pH5.0-约 pH8.0 缓冲容量的缓冲剂的制剂。有用的缓冲剂包括磷酸盐、乌头酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、碳酸盐和柠檬酸盐缓冲剂，柠檬酸盐缓冲剂是优选的。

本发明的第三方面涉及一种含有 KGF-2 多肽和一种能稳定 KGF-2 多肽的含硫醇化合物、优选为单硫代甘油的制剂。该制剂优选地包含一种具有约 pH5.0-约 pH8.0 缓冲容量的缓冲剂。该制剂也可包含一种或多种抗氧化剂和/或一种或多种金属螯合剂。

本发明的第四方面涉及一种含有 KGF-2 多肽、缓冲液和在预定温度下使制剂形成胶体的高分子量化合物的制剂。一种优选的高分子量化合物是普流罗尼（Pluronic）或泊洛沙姆（Poloxamer）聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。含硫醇化合物如单硫代甘油也能包含于该制剂中为多肽提供更强的稳定性。

本发明的第五方面涉及一种含有 KGF-2 多肽、缓冲剂和增稠剂的制剂。增稠剂用于提高制剂的粘度。优选的增稠剂是羧甲基纤维素（CMC）、羟乙基纤维素（HEC）、羟丙基甲基纤维素（HPMC）、Natrosol 和卡波姆（Carbomer）。

另外，本发明的制剂也可含有金属螯合剂、抗氧化剂或含硫醇化合物，如抗坏血酸酯、单硫代甘油、半胱氨酸、生育酚、丁基化羟基苯甲醚、硫酸钠、硫酸氢钠和焦亚硫酸钠，以及防腐剂如酚、氯丁烷、苯甲醇、羟苯甲酸甲酯和羟苯甲酸丙酯。本发明的制剂也可在瓶子的液上空间中具有氮气覆盖层。此外，也可包括用氮、氩或氮气清洗配制缓冲液的本发明的制剂。

附图简述

图 1A-1C 说明 KGF-2 的 cDNA 和相应的推断氨基酸序列。最初的 35 个或 36 个氨基酸残基代表推断的前导序列（下划线标出）。使用氨基酸的标准单字母缩写。当试图测定多核苷酸序列时，测序错误是一个常见的问题。用 373 自动 DNA 测序仪（Applied Biosystems, Inc.）进行测序。测序准确度预计大于 97%（SEQ ID NO:1 和 2）。

图 2（A）-2（C）描述本发明的 KGF-2 多肽对正常原代表皮角质形成细胞增殖的刺激。图 2（A）显示 KGF-2 对正常原代表皮角质形成细胞增殖的刺激。图 2（B）显示 KGF-2 Δ33 对正常原代表皮角质形成细胞

增殖的刺激。图 2（C）显示 KGF-2 Δ28 对正常原代表皮角质形成细胞增殖的刺激。

图 3 显示 KGF-2 Δ33 液体制剂的生物活性结果—10 个月的稳定性。

图 4 显示 KGF-2 Δ33 冻干制品的生物活性结果—9 个月的稳定性。

图 5 显示单硫代甘油对 KGF-2 生物活性的作用。

优选实施方案详述

KGF-2 刺激表皮角质形成细胞的增殖，但不刺激间充质细胞如成纤维细胞的增殖。因此，"具有 KGF-2 蛋白质样活性的多肽"包括在以下所述角质形成细胞增殖测定中显示 KGF-2 活性并可与 FGF 受体同种型 1-iiib 和 2-iiib 结合的多肽。

本发明涉及 KGF-2 多肽的药用和兽医制剂。此处参考图 1（SEQ ID NO:2）的多肽或保藏 cDNA 所编码的多肽定义 KGF-2 多肽，其包括图 1（SEQ ID NO:2）的多肽或保藏 cDNA 所编码的多肽的片段、衍生物和类似物，它们基本上保留了与亲代多肽相同的生物功能。本发明中使用的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽，优选地是重组多肽。

已经发现，KGF-2 多肽在 pH4.5 或更低时或在高于大约 8.0 的 pH 时显示极低的活性和稳定性。发明者发现，KGF-2 多肽氧化并沉淀。当试图配制这些多肽以用于治疗目的时，显示出一定的困难。为了保持物理化学性质和生物活性，KGF-2 多肽能与抗氧化剂（如氧清除剂）和/或蛋白质稳定剂（如含硫醇化合物）和/或金属螯合剂（如 EDTA）一起配制。此处应用时，稳定是指保持 KGF-2 多肽的物理化学性质和基本生物活性一定时期。

根据本发明的制剂包括凝胶、增稠溶液、溶液和冻干形式。在此也将制剂称为"药物组合物"或"组合物"。

注射用制剂

液体制剂

本发明的第一方面涉及 KGF-2 多肽的液体制剂，它含有：KGF-2 多

肽和一种缓冲容量为约 pH5.0-约 pH8.0、更优选地 pH5.5-pH6.5、最优选地 pH6.2 的缓冲剂。可用的缓冲剂包括由磷酸、乙酸、乌头酸、柠檬酸、戊二酸、苹果酸、琥珀酸和碳酸衍生的缓冲剂。一般使用的是上述酸之一的碱或碱土盐。更优选地，缓冲剂是乙酸盐或柠檬酸盐，最优选地是柠檬酸盐。例如，该制剂可以包含一种通过将缓冲量的柠檬酸或其药学可接受的盐与 KGF-2 Δ33 水溶液混合而成的组合物。此外该制剂也可包含一种通过将缓冲量的乙酸或其药学可接受的盐与 KGF-2 Δ33 水溶液混合而成的组合物。优选的缓冲剂浓度为约 5mM-约 50mM。最优选地，乙酸缓冲剂具有约 20mM 的浓度，而柠檬酸缓冲剂为约 10mM-约 20mM。该制剂也可含有浓度为约 0.01mM-约 150mM、最优选地约 125mM 的 NaCl 作为渗透压调节物（tonicifier），和浓度为约 0.1mM-约 10mM、最优选地约 1mM 的金属螯合剂，如 EDTA。另外，本发明的液体制剂也可含有一种或多种（a）稳定量的抗氧化剂，如抗坏血酸盐，和/或（b）蛋白质稳定量的硫醇化合物，如单硫代甘油（MTG）。不希望为理论所束缚，可以认为，硫醇化合物如 MTG 用来保护 KGF-多肽中存在的游离巯基。液体制剂的贮存条件一般为约 2℃-约 8℃。此外，贮存条件也可为-20℃或更低。最优选地，贮存条件为约-20℃。以冷冻状态保藏 KGF-2 液体制剂可限制多肽的氧化量，其随后产生稳定的多肽制剂。

优选地，液体制剂含有:

（1）一种治疗有效量的 KGF-2 多肽;

（2）一种有效量的缓冲剂，其具有约 pH5.0-约 pH8.0 的缓冲容量;和

（3）一种药学可接受的稀释剂；和

（4）任选地一种或多种下列成分:

（a）NaCl 作为渗透压调节物，

（b）一种螯合剂，

（c）一种稳定量的抗氧化剂，和

（d）一种稳定量的蛋白质稳定剂。

KGF-2 多肽优选地在溶液中保存。

本发明的组合物是通过将上列成分混合在一起而制备的，优选地以此处所述的浓度和比例。

能在液体制剂中使用的抗氧化剂包括抗坏血酸、生育酚和丁基化羟基苯甲醚。另外，能在液体制剂中使用的稳定剂也包括硫醇如半胱氨酸、甲硫氨酸和单硫代甘油。能使用的螯合剂包括乙二胺四乙酸（EDTA）或二乙烯三胺五乙酸（DPTA），EDTA 是优选的。

含有抗氧化剂或硫醇的本发明的制剂能提高 KGF-2 多肽的稳定性。这使得可能得到具有更长保存期的药用产品。

更优选的液体制剂含有:

（1）一种 KGF-2 多肽，浓度为约 0.02-约 40mg/ml（w/v），更优选地约 0.05-约 30mg/ml（w/v），甚至更优选地约 0.1-约 20mg/ml（w/v），再更优选地约 10mg/ml（w/v），最优选地约 0.2-4mg/ml;

（2）一种缓冲剂，缓冲容量为约 pH5.0-约 pH8.0，浓度为约 5mM-约 50mM，优选地约 5mM-约 30mM；和

（3）一种药学可接受的稀释剂，优选地为水，用来使组合物达到指定体积。

可用于本发明的制剂的缓冲剂包括由乙酸、乌头酸、柠檬酸、戊二酸、苹果酸、琥珀酸、磷酸和碳酸衍生的缓冲剂。一般使用的是上述酸之一的碱或碱土盐。乙酸盐或柠檬酸盐缓冲剂如乙酸或其药学可接受的盐、或柠檬酸或其药学可接受的盐是优选的。溶液制剂的优选 pH 范围为约 pH5.0-约 pH8.0，优选地 pH5.5-pH6.5，最优选地约 pH6.2。乙酸钠或柠檬酸钠是优选的缓冲剂，柠檬酸钠是最优选的。

也可向上述溶液中优选地加入:

（4）一种螯合剂，如 EDTA，浓度为约 0.1mM-约 10mM，更优选地约 1mM;

（5）浓度为约 0.01mM-约 150mM、更优选地约 125mM 的 NaCl.

任选地，液体制剂中也可含有一种蛋白质稳定量的化合物，其选自:

（a）约 0.5%-约 2% w/v 甘油，

（b）约 0.1%-约 1% w/v 甲硫氨酸，或

（c）约 0.1%-约 2% w/v 单硫代甘油。

本发明此方面的优选实施方案包括一种通过混合下列成分而成的组合物:

（1）一种 KGF-2 多肽，浓度为约 0.02-约 40mg/ml（w/v），更优选地约 0.1-约 20mg/ml，最优选地约 0.2-4mg/ml;

（2）10mM 柠檬酸钠或 20mM 乙酸钠;

（3）125mM NaCl;

（4）1mM EDTA；和

（5）水作为稀释剂。

更优选地，溶液制剂包括一种通过混合下列成分而形成的组合物:

（1）约 0.2-4mg/ml 的 KGF-2 多肽;

（2）20mM 乙酸钠;

（3）125mM NaCl;

（4）1mM EDTA；和

（5）水作为稀释剂，

其中该溶液约 pH6.2，贮存于约-20℃。

发明者发现，KGF-2 多肽易于氧化、聚集和从溶液中沉淀。尽管 KGF-2 的氧化不破坏生物活性，但限制产物的氧化程度产生更稳定的产物。发明者观察到，如果液体制剂在太低的 pH 时，KGF-2 多肽将丧失生物活性。另外，当溶液的 pH 接近 KGF-2 的 pI 时，蛋白质将从溶液中沉淀。因此，发明者确定，液体制剂应当在约 pH6.0-约 pH7.0 的范围中保存，约 6.2 的 pH 最适于稳定 KGF-2 多肽。而且，发明者意外地确定，柠檬酸盐缓冲液尤其能稳定 KGF-2 多肽。

尽管，约 pH6.0-6.2 的柠檬酸盐缓冲液的使用产生了能降低 KGF-2 多肽的聚集而提高稳定性的液体制剂，但液体多肽制剂仍可遭受 KGF-2 多肽的氧化和沉淀。因此，发明者发展了一种如下所述的冻干制剂。

冻干制剂

本发明的第二方面涉及KGF-2 多肽的冻干制剂，其含有: 一种 KGF-2

多肽和一种缓冲容量为约 pH5.0-约 pH8.0、更优选地 pH5.5-pH6.5、最优选地 pH6.2 的缓冲剂。可用的缓冲剂包括由磷酸盐、乌头酸、柠檬酸、戊二酸、苹果酸、琥珀酸和碳酸衍生的缓冲剂。一般使用的是上述酸之一的碱或碱土盐。更优选地，缓冲剂是磷酸盐或柠檬酸盐，最优选地是柠檬酸盐。例如，该制剂可以包含一种通过将缓冲量的柠檬酸或其药学可接受的盐与 KGF-2 Δ33 水溶液混合而成的组合物。优选的缓冲剂浓度为约 5mM-约 50mM，更优选地约 10mM。最优选地，以约 10mM 的浓度加入柠檬酸盐缓冲剂。该制剂中优选地也含有浓度为约 0.01mM-约 150mM、最优选地约 20mM 的 NaCl 作为渗透压调节物，和浓度为约 0.01mM-约 10mM、最优选地约 1mM 的金属螯合剂如 EDTA。另外，制剂中也可含有填充剂/冷冻保护剂，如蔗糖、甘氨酸、甘露醇、海藻糖或其它药学可接受的填充剂。使用的填充剂的量将是，使得溶液为等渗的，并在约 2%-约 10% w/v 的范围内。优选的浓度如下：5%甘露醇、7%蔗糖、8%海藻糖或 2%甘氨酸+0.5%蔗糖。更优选地，使用蔗糖或蔗糖/甘氨酸混合物。另外，本发明的冻干制剂也可含有一种或多种（a）稳定量的抗氧化剂，如抗坏血酸盐，或（b）稳定量的硫醇化合物，例如单硫代甘油。冻干制剂的贮存条件一般为约 2℃-约 25℃。更优选地，贮存条件为等于或低于约 2℃-约 8℃。

以初始溶液中约 0.02mg/ml-约 10mg/ml 蛋白质的浓度冷冻干燥 KGF-2 多肽。

初始冻干溶液优选地含有（除了 KGF-2 多肽之外）：

（1）有效量的柠檬酸或其药学可接受的盐，优选地柠檬酸钠，浓度为约 5mM-约 20mM;

（2）浓度为约 0.01mM-约 125mM 的 NaCl;

（3）浓度为约 0.1mM-约 10mM 的 EDTA;

（4）蔗糖、甘露醇、甘氨酸或海藻糖中的一种或多种，浓度为约 2% w/v-约 15% w/v；和

（5）水。

冻干缓冲液的优选 pH 范围为约 5.5-约 8.0，优选地约 pH6.2。

更优选地，冻干缓冲液含有 10mM 柠檬酸钠、20mM 氯化钠、1mM pH6.2 的 EDTA 二钠和 7%蔗糖。

冻干的 KGF-2 多肽制剂用无菌水重建，以保持约 290mOsm 的等渗条件。KGF-2 多肽能用任选地含有稳定量的抗氧化剂的无菌水重建，包括：a）约 0.01%-约 2% w/v 的单硫代甘油，b）约 0.01%-约 2% w/v 的抗坏血酸，c）约 0.01%-约 2% w/v 的甲硫氨酸，或 d）其组合。

本发明包括产生稳定 KGF-2 多肽制剂的冷冻干燥循环。冷冻干燥循环用来使 KGF-2 多肽产物在初步干燥阶段低于其垮塌温度。另外，含湿量优选地低于 5%，更优选地低于 2%。这一方案必须在个体基础上对任一特殊蛋白质而定。对于含有蔗糖的根据本发明的冻干制剂的 KGF-2，一个典型的冻干循环确定如下：

温度（℃）	压力（毫托）	时间（分钟）
5（保持）	大气压	60
5 至-45（倾斜）	大气压	120
-45（保持）	大气压	120
-45（保持）	75-100	60
-45 至-20（倾斜）	75-100	125
-20（保持）	75-100	2100
-20 至+25（倾斜）	75-100	225
+25（保持）	75-100	1020

本发明的冻干制剂提供一种具有特别增高的稳定性的产品。确实，本发明的冻干 KGF-2 制剂在高达 45℃的温度下可生物学稳定至少 9 个月（图 4）。反相 HPLC 证明，本发明的冻干 KGF-2 制剂在 45℃或低于 45℃的温度及 75%的相对湿度下保持其物理化学性质可达 8 个月。在这样高的温度下如此持续时间长度的稳定性对蛋白质而言是极不寻常的。

增稠与凝胶制剂

本发明的第三方面涉及 KGF-2 多肽的增稠或凝胶制剂。

1）增稠剂:

可以向上述液体制剂中加入增稠剂来提高所得到的制剂的粘度。具有提高的粘度的制剂可利于在受控释放、与创伤形状的粘附或避免流出可能是重要之处的局部施用。这类增稠制剂可用于局部应用，如创伤愈合，来治疗皮肤病或能通过KGF-2药物组合物的局部施用而治疗的其它任何应用。

增稠剂将使粘度升高到约50-约10,000厘泊，更优选地约50-约1,000厘泊，最优选地约200-约300厘泊。粘度用旋转粘度计测定。增稠剂的最优选浓度是0-5%（w/w）。增稠溶液将一直保持液态。

适当增稠剂的实例包括但不限于，水溶性醚化纤维素和卡波姆（与烯丙基蔗糖或季戊四醇烯丙醚交联的丙烯酸的高分子量聚合物）。醚化纤维素的例子在本领域众所周知（USP中列出），包括烷基纤维素、羟烷基纤维素和烷基羟烷基纤维素，例如，甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素等等。在另一个实施方案中，局部或切口凝胶可含有约0%-约20%重量的分子量约50,000-约700,000的纤维素衍生物。在一个优选实施方案中，纤维素衍生物以约2%-约8%重量存在，并具有约80,000-约240,000的分子量。优选的纤维素衍生物是羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素和羟乙基纤维素。

当向以上详述的注射用制剂中加入增稠剂时，为了获得最佳稳定性可加入或从制剂中去除盐和缓冲剂。例如，可提高柠檬酸盐浓度。柠檬酸盐的优选浓度是，例如约10mM-约500mM柠檬酸盐，更优选地约10mM-约50mM柠檬酸盐，最优选地约10mM-约20mM柠檬酸盐。另外，在冻干制剂中可将蔗糖的量降低为约0%-约5%蔗糖。

可将增稠剂直接加入根据本发明的液体制剂中然后冷冻干燥。此外，根据本发明的冻干制剂可以通过加入适当的稀释剂、最优选地加入其中溶解有增稠剂的水来重建。这些增稠制剂能够通过喷雾施用。

根据本发明的优选增稠KGF-2多肽溶液的一个实例包含通过混合下列成分而成的产物:

（1）一种局部有效量的KGF多肽，优选地KGF-2 Δ33;

（2）约 10mM-约 500mM 柠檬酸钠缓冲剂;

（3）约 0.01-约 150mM NaCl;

（4）约 0.75-约 1.27mM、优选地约 1mM EDTA;

（5）约 0.1%-约 7%蔗糖;

（6）约 0.75%-约 1.5%（w/w）羧甲基纤维素，或约 0.5%-约 1.5%羟丙基甲基纤维素，或约 0.25%-约 0.75%羟乙基纤维素，或约 0%-1%卡波姆，或其任意组合。

这种制剂的 pH 最优选地为 pH6.2。

2）胶凝剂

本发明的另一方面涉及 KGF-2 多肽的凝胶制剂。可以向本发明的注射用制剂中加入胶凝剂，以得到一种在室温下保持液态而当施用于皮肤表面（约 37℃）时凝固的制剂。这些制剂可用于在受控释放、与创伤形状的粘附或避免流出可能是重要之处的局部施用。这些凝胶制剂可用于局部应用如创伤愈合，来治疗皮肤病或能通过 KGF-2 药物组合物的局部施用而治疗的其它任何应用。

根据本发明的 KGF-2 多肽的凝胶制剂含有:

（1）一种局部有效量的 KGF 多肽;

（2）一种缓冲剂;

（3）一种药学可接受的稀释剂，优选地是水；和

（4）一种形成凝胶的高分子量化合物。

本发明的凝胶制剂的粘度在室温下可以是约 1-约 10,000 厘泊，最优选地在室温下约 20-约 100 厘泊。粘度用旋转粘度计测定。

本发明中使用的凝胶形成高分子量化合物一般是能形成粘性水溶液的水溶性聚合物，或非水溶性、水溶膨性聚合物（例如胶原蛋白），它们也能形成粘性溶液，并且在与皮肤接触后形成胶体。

可用的凝胶形成高分子量化合物可选自乙烯基聚合物、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物、多糖、蛋白质、聚（环氧乙烷）、丙烯酰胺聚合物及其衍生物和/或盐。在美国专利号 5,427,778 中能发现能用来制备在愈合创伤中

使用的药用凝胶制剂的其它化合物，此处完全引用作为参考。

可用的乙烯基聚合物（或取代的聚乙烯）包括聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。可用的多糖包括纤维素衍生物、糖胺聚糖、琼脂、果胶、藻酸、葡聚糖、淀粉（α-直链淀粉或支链淀粉）和脱乙酰壳多糖。可用的糖胺聚糖包括透明质酸、软骨素、软骨素-4-硫酸、硫酸乙酰肝素和肝素。糖胺聚糖可用来与其它任一凝胶形成聚合物如胶原蛋白、明胶、纤连蛋白一起加速创伤痊愈。丙烯酰胺聚合物可以是聚丙烯酰胺或聚甲基丙烯酰胺聚合物。

优选的高分子量凝胶形成化合物是聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物，尤其是那些商品名为普流罗尼（PLURONICS）（BASF）或泊洛沙姆（POLAXAMERS）（BASF）的嵌段共聚物。

在一个优选实施方案中，本发明的凝胶可以含有约 10%-约 60%重量的平均分子量为约 500-50,000 的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。在一个更优选的实施方案中，本发明的凝胶可以含有约 14%-约 18%重量的分子量为 1,000-15,000 的嵌段共聚物。本发明的优选嵌段共聚物是普流罗尼 F108 和普流罗尼 F127。

聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物（普流罗尼或泊洛沙姆）具有用于局部药物递送系统的巨大潜力，因为它们显示反热胶凝行为，具有良好的药物释放特征和低毒性。当溶液升温时凝胶形成。因此，凝胶在室温下是低粘度的水溶液，而在接触哺乳动物身体以及被体温升温后，因溶液形成凝胶而粘度升高。普流罗尼凝胶能用于 KGF-2 多肽向例如创伤及希望局部递送的其它部位的受控递送。KGF-2 多肽能与普流罗尼以液态结合，并施用于伤口。胶凝发生，并有效地降低了多肽释放至伤口的速率，从而允许多肽与创伤部位之间的长时间接触。使用这种凝胶制剂的优点包括使伤口保持湿润，和使药用化合物适合伤口或适合可施用该化合物的其它部位。

根据本发明的 KGF-2 多肽的优选凝胶制剂包含柠檬酸盐缓冲剂和普流罗尼。该制剂也可含有一定量的柠檬酸或其药学可接受的盐。

根据本发明的凝胶制剂也可含有螯合剂、稳定量的抗氧化剂或硫醇。

凝胶制剂将含有一种高分子量的化合物，如普流罗尼，或将形成凝胶的量的水溶性醚化纤维素等。在根据本发明的凝胶制剂中，KGF-2 多肽优选地为约 0.01mg/ml-约 10mg/ml 的浓度。

优选地，凝胶制剂通过混合下列成分而形成:

（1）一种 KGF-2 多肽，优选地 KGF-2 Δ33，终计算浓度为 0.01mg/ml-约 10mg/ml;

（2）一种有效量的缓冲剂;

（3）约 10%-约 60%、或更优选地约 14%-约 18%重量的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物，其具有约 500-50,000 的平均分子量；和

（4）一种药学可接受的稀释剂，优选地水。

另一种优选凝胶制剂含有:

（1）一种药学有效量的 KGF-2 多肽;

（2）约 10mM-约 500mM 柠檬酸钠;

（3）约 0.01mM-约 150mM NaCl;

（4）约 1mM EDTA;

（5）约 0.1%-约 7%蔗糖;

（6）约 14%-约 18% 普流罗尼 F127；和

（7）水，

其中该制剂的 pH 为约 pH6.2。

最优选地，凝胶制剂含有:

（1）一种 KGF-2 多肽，优选地 KGF-2 Δ33，浓度为约 0.01mg/ml-约 10mg/ml（w/v），更优选地约 0.1mg/ml-约 3mg/ml，最优选地约 0.2mg/ml;

（2）浓度约 5mM-约 20mM 的柠檬酸钠;

（3）约 10%-约 25%（w/v）、优选地约 15%-约 25%、最优选地约 16%的普流罗尼 F127 或泊洛沙姆 407;

（4）约 6.7%-约 7.3%蔗糖，优选地约 7%蔗糖；和

（5）水，加至所需体积。

凝胶制剂任选地进一步含有一种或多种下列成分:

（6）浓度约 0.1mM-约 10mM 的 EDTA。

（7）浓度约 0.01mM-约 125mM 的 NaCl。凝胶制剂的优选 pH 范围是约 pH5.0-约 pH8.0，优选地 pH6.2，得到的凝及制剂应当是等渗的。

3）其它稳定剂:

所有上述本发明的制剂都可能得益于抗氧化剂、金属螯合剂、含硫醇化合物和其它普通稳定剂。这些稳定剂的实例包括但不限于:

（a）约 0.5%-约 2% w/v 甘油，

（b）约 0.1%-约 1% w/v 甲硫氨酸，

（c）约 0.1%-约 2% w/v 单硫代甘油，

（d）约 1mM-约 10mM EDTA，

（e）约 0.01%-约 2% w/v 抗坏血酸，

（f）0.003%-约 0.02% w/v 聚山梨酯 80，

（g）0.001%-约 0.05% w/v 聚山梨酯 20，

（h）精氨酸，

（i）肝素，

（j）葡聚糖硫酸酯，

（k）环化糊精，或

（l）其组合。

KGF-2 多肽的施用

本发明的 KGF-2 多肽制剂可以使用公知在药物组合物中有用的适当药用稀释剂。这类稀释剂包括但不限于盐水、缓冲盐溶液、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。制剂应当适合施用模式。优选地，如上所述根据本发明配制药物组合物。水是优选的稀释剂。

在药物组合物中，具有 KGF-2 活性的多肽可以与一种或多种药学可接受的赋形剂一起施用。应当理解，当对病人施用时，本发明的药物组合物的总每日用法由主治医师在可靠的医学判断的范围内决定。对于任一特定患者的特殊治疗有效剂量水平取决于多种因素，包括待达到的反

应的类型和程度；特殊组成，包括是否使用其它试剂；患者的年龄、体重、全身健康状况、性别和饮食；组合物的施用时间、施用途径和排除速度；治疗持续时间；与特定组合物一起或同时使用的药物（如化疗剂）；以及医学领域中众所周知的其它因素。本领域中公知的适当制剂能在《Remington 药物学》（Remington's Pharmaceutical Sciences）（最新版），Mack Publishing Company, Easton, PA 中见到。此处所用的"有效量"的 KGF-2（包括 KGF-2 有效量）因而取决于这些因素。

本发明的药物组合物可以以常规方法施用，如经口、直肠、局部、静脉内、腹膜内、肌内、关节内、皮下、鼻内、吸入、眼球内或真皮内途径。肠胃外和局部输送是优选的施用途径。此处所用的术语"肠胃外"是指包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下和关节内注射及输注的施用模式。

药物组合物以可有效治疗和/或预防特殊适应症的量施用。在大多数情况中，KGF-2 剂量为每日约 1μg/kg-约 30mg/kg 体重，需考虑施用途径、症状等。然而，剂量也能低至 0.001μg/kg。例如，在局部施用的特殊情况中，施用剂量优选地为约 0.01μg-9mg 每平方厘米。在鼻内和眼内施用时，施用剂量优选地为约 0.001μg/ml-约 10mg/ml，更优选地约 0.05mg/ml-约 4mg/ml。

作为一般问题，肠胃外施用的 KGF-2 多肽的总药物有效量为约 1μg/kg/天-10mg/kg 患者体重/天，尽管如上所述这要由治疗决定。如果连续施用，KGF-2 多肽一般通过每天 1-4 次注射或通过连续皮下输注例如使用微型泵（mini-pump）以约 1μg/kg/小时-约 50μg/kg/小时的剂量率施用。也可使用静脉袋溶液或瓶溶液。

如果持续长于特定最小天数—对于小鼠为 7 天，则影响纤维蛋白溶解系统的 KGF-2 多肽治疗过程似乎是最佳的。观察改变所需的治疗时间和发生反应所需的治疗后间隔似乎依希望的效果而不同。

对于肠胃外施用，在一个实施方案中，KGF-2 多肽通常如下配制，以希望的纯度，以单位剂量可注射形式（溶液、悬液或乳剂），将其与一种药学可接受的载体混合，即在使用的剂量和浓度时对接受者无毒性的

载体，并且与该制剂的其它成分相容。例如，该制剂优选地不包含氧化剂和公知对多肽有害的其它化合物。

通常，通过使 KGF-2 多肽与液体载体或磨碎的固体载体（或此两者）均匀并紧密地接触而制备这些制剂。然后，必要时使产物成形为希望的制剂。优选地，该载体是一种肠胃外载体，更优选地是一种与接受者血液等渗的溶液。这些载体的实例包括水、盐水、林格液和葡萄糖溶液。非水载体如固定油和油酸乙酯以及脂质体在此也是有用的。在《Remington 药物学》（最新版），Mack Publishing Company, Easton, PA 中能发现本领域所知的适当制剂。

也可对眼睛施用 KGF-2 多肽，作为液体、滴剂或增稠液——一种凝胶，来治疗动物和人中的泪腺损伤、疾病和病理。

也能作为液滴或以喷雾形式对鼻粘膜鼻内施用 KGF-2 多肽，治疗动物和人鼻粘膜和鼻窦上皮的疾病、损伤和病理。

通常，通过使 KGF-2 多肽与液体载体或磨碎的固体载体（或此两者）均匀并紧密地接触而制备这些制剂。然后，必要时使产物成形为希望的制剂。优选地，该载体是一种肠胃外载体，更优选地是一种与接受者血液等渗的溶液。这些载体的实例包括水、盐水、林格液和葡萄糖溶液。非水载体如固定油和油酸乙酯以及脂质体在此也是有用的。在《Remington 药物学》（最新版），Mack Publishing Company, Easton, PA 中能发现本领域所知的适当制剂。

载体也可含有小量的适当添加剂，如提高等渗性和化学稳定性的物质。这些物质在使用的剂量和浓度时对接受者无毒性，包括缓冲剂，如磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、乙酸和其它有机酸或其盐；抗氧化剂，如抗坏血酸；低分子量（少于约 10 个残基）多肽，例如聚精氨酸或三肽；蛋白质，如血清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸；单糖、二糖和其它糖类，包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如 EDTA；糖醇，如甘露醇或山梨糖醇；平衡离子如钠；和/或非离子型表面活性剂，如聚山梨酯、泊洛沙姆或 PEG。

KGF-2 一般在这些载体中配制，浓度约为 0.01μg/ml-50mg/ml，优选地 0.01μg/ml-10mg/ml，pH 约 5-约 8，优选地约 6-约 7，最优选地约 pH6.2。应当理解，前述某些赋形剂、载体或稳定剂的使用将产生 KGF-2 盐的制剂。

用于治疗施用的 KGF-2 可以是无菌的。通过无菌滤膜（例如，0.2 微米膜）过滤可轻易地达到无菌。治疗用 KGF-2 组合物可被置于一种具有无菌入口的容器中，例如一种具有可被皮下注射针头穿透的塞子的静脉溶液袋或小瓶。

KGF-2 通常作为水溶液或用于重建的冻干制剂贮存于单剂量或多剂量容器中，例如，密封的安瓿或小瓶。冻干制剂的一个例子是，3ml 小瓶中充满 1ml 无菌过滤的 1%（w/v）KGF-2 水溶液，并冻干所得混合液。用可能任选地含有一种或多种抗氧化剂的注射用水重建冻干 KGF-2，制备输注溶液。

也可以用患者特异的方式安排剂量，以提供血液中预定浓度的 KGF-2 活性，例如通过 RIA 技术所测定的。因此患者剂量可调节为达到常规的前进性波谷血液水平，如通过 RIA 所测定的，大约 50-1000ng/ml，优选地 150-500ng/ml。

KGF-2 也可通过缓释系统适当施用。缓释组合物的合适例子包括成形颗粒的半透性聚合物基质，例如薄膜或微胶囊。缓释基质包括 polyactide（美国专利号 3,773,919、EP 58,481）、L-谷氨酸和γ-乙基-L-谷氨酸盐的共聚物（U. Sidman 等人，生物聚合物（Biopolymer）22:547-556（1983））、聚（异丁烯酸 2-羟乙基酯）（R. Langer 等人，生物医学材料研究杂志（J. Biomed. Mater. Res.）15:167-277（1981）和 R. Langer，化学技术（Chem. Tech.）12:98-105（1982））、乙烯乙酸乙烯酯（R. Langer 等人，同前）或聚-D-(-)-3-羟基丁酸（EP 133,988）。缓释 KGF-2 组合物也包括脂质体包埋的 KGF-2。含有 KGF-2 的脂质体通过本身已知的方法制备：DE 3,218,121；Epstein 等人，美国国家科学院院刊 82:3688-3692（1985）；Hwang 等人，美国国家科学院院刊 77:4030-4034（1980）；EP 52,322；EP 36,676；EP 88,046；EP 143,949；EP 142,641；日本专利申请

83-118008; 美国专利号 4,485,045 和 4,544,545; 和 EP 102,324. 通常, 脂质体是小的（约 200-800 埃）单层类型, 其中液体含量高于约 30mol 百分数胆固醇, 为用于最佳 KGF-2 治疗调整所选比例。

本发明也提供一种药物包或试剂盒, 其包含一种或多种充满本发明药物组合物的一种或多种成分的容器。与这些容器相连的可能是控制药物或生物产品生产、使用或出售的政府机关所规定形式的通知, 该通知反映生产、使用或出售机构批准用于人类施用。另外, 本发明的多肽、激动剂和拮抗剂可以与其它治疗化合物结合使用。

当发明者检测根据本发明的配方制备的 KGF-2 多肽的生物活性和稳定性时, 惊奇地发现, 单硫代甘油的使用可以稳定 KGF-2 多肽, 并可作为 KGF-2 多肽的增效剂在创伤愈合中起作用。单硫代甘油增效作用的最佳浓度范围为 0.1%-2% w/v。

KGF-2 多肽

KGF-2 刺激上皮细胞和表皮角质形成细胞的增殖, 但不刺激间充质细胞如成纤维细胞。因此, "具有 KGF-2 蛋白质样活性的多肽"包括在以下和美国申请号 08/910,875 所述角质形成细胞增殖测定中显示 KGF-2 活性并可与 FGF 受体同种型 1-iiib 和 2-iiib 结合的多肽。尽管活性程度不需要与 KGF-2 蛋白质相同, 但优选地, "具有 KGF-2 蛋白质样活性的多肽"显示与 KGF-2 蛋白质基本上类似的活性（即, 相对于参照 KGF-2 蛋白质, 候选多肽显示更高的活性, 或至多低 10 倍、优选地至多低约 2 倍的活性）。

本发明的制剂中使用的 KGF-2 多肽可具有或可不具有 N 端甲硫氨酸, 优选地该多肽缺乏 N 端甲硫氨酸。

KGF-2 cDNA 克隆于 1994 年 11 月 16 日在美国典型培养物保藏中心, 专利保藏所, 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209 保藏为 ATCC 保藏号 75977。另外, 插入表达载体 pHE4-5 中的编码 KGF-2 Δ33 的 cDNA 于 1998 年 1 月 9 日在 ATCC 保藏为 ATCC 号 209575.

当涉及图 1（SEQ ID NO:2）的多肽或保藏 cDNA 所编码的多肽时,

术语“片段”、“衍生物”和“类似物”意思是一种基本上保留了与这种多肽相同的生物功能或活性的多肽。因此，类似物包括能通过原蛋白质（proprotein）部分的切割所活化，产生活性成熟多肽的原蛋白质。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽，优选地是重组多肽。

图 1（SEQ ID NO:2）的多肽或保藏 cDNA 所编码的多肽的片段、衍生物或类似物可以是（i）其中一种或多种氨基酸残基被置换为一种保守性或非保守性氨基酸残基（优选地一种保守氨基酸残基），并且这种置换氨基酸残基可能是或可能不是由遗传密码所编码，或（ii）其中一种或多种氨基酸残基含有一种取代基，或（iii）其中成熟多肽与另一种化合物，如提高多肽半衰期的化合物（例如聚乙二醇）相融合，或（iv）其中其它氨基酸与成熟多肽融合，如前导序列或分泌序列或用于成熟多肽纯化的序列或原蛋白质序列。从此处所述判断出，这些片段、衍生物和类似物处于本领域技术人员的范围之内。

术语“肽”和“寡肽”被认为是同义的（如同通常认为的），当需要表示通过肽键偶联的至少两个氨基酸的链时，每个术语能互换使用。术语“多肽”在此用于含有超过 10 个氨基酸残基的链。所有寡肽和多肽通式或序列在此都从左向右并以从氨基端到羧基端的方向书写。

本领域中应当认识到，KGF-2 多肽的某些氨基酸序列能够改变而对蛋白质的结构或功能无显著影响。如果考虑这些序列差异，应当记住，在蛋白质上存在决定活性的关键区。通常，只要使用行使相似功能的残基，则替换形成三级结构的残基是可能的。在其它情况中，如果在蛋白质的非关键区发生改变，则残基类型可能是完全不重要的。

本发明的多肽优选地为分离的形式。“分离的多肽”是指从其天然环境中分离的多肽。因此，在重组宿主细胞中产生和/或含有的多肽被认为是为了本发明而分离的。同样也指从重组宿主细胞或天然来源中部分或充分纯化的多肽。

本发明的药用制剂包括 SEQ ID NO:2 的 KGF-2 多肽（尤其是成熟多肽）及其缺失突变体，以及与 SEQ ID NO:2 的多肽及其缺失突变体至少

有 90%、95%、96%、97%、98%、99%相似性（更优选地至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性）的多肽，也包括这些多肽的部分，这部分多肽（如以下所述的缺失突变体）通常含有至少 30 个氨基酸、更优选地至少 50 个氨基酸。

如本领域中所知，两种多肽之间的“相似性”是通过将一种多肽的氨基酸序列和其保守氨基酸置换序列与第二种多肽的序列相比较而确定的。

两种多肽的“%相似性”是指用 Bestfit 程序（Wisconsin 序列分析软件包，第 8 版 for Unix，遗传学计算机集团，University Research Park，575 Science Drive, Madison, WI 53711）和测定相似性的默认设置，比较两种多肽的氨基酸序列所产生的相似性得分。Bestfit 使用 Smith 和 Waterman（应用数学进展（Advances in Applied Mathematics）2:482-489,1981）的局部同源性算法，寻找两种序列之间相似性的最佳节段。

具有与 KGF-2 多肽参照氨基酸序列至少例如 95% “相同的”氨基酸序列的多肽是指，除了多肽序列可以在 KGF-2 多肽的参照氨基酸的每 100 个氨基酸中包含可达 5 个氨基酸改变之外，该多肽的氨基酸序列与参照序列相同。换句话说，为了获得具有与参照氨基酸序列至少 95%相同的氨基酸序列的多肽，可以使参照序列中高达 5%的氨基酸残基缺失或置换为另一种氨基酸，或者可以向参照序列中插入可达参照序列总氨基酸残基 5%的许多氨基酸。参照序列的这些改变可以发生在参照氨基酸序列的氨基端或羧基端位置，或这些末端位置之间的任一处，它们或者单个散布于参照序列的残基中，或者散布于参照序列内的一个或多个相邻基团中。

作为具体问题，任一特定多肽与例如图 1 所示氨基酸序列[SEQ ID NO:2]或与保藏 cDNA 克隆所编码的氨基酸序列是否至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同，能用公知的计算机程序如 Bestfit 程序（Wisconsin 序列分析软件包，第 8 版 for Unix，遗传学计算机集团，University Research Park，575 Science Drive, Madison, WI 53711）常规

确定。当使用 Bestfit 或其它任一序列对比程序来确定一种特定序列是否与根据本发明的参照序列例如 95%相同时，设置参数，当然，使得对参照氨基酸序列的全长计算同一性的百分数，并且允许可达参照序列氨基酸残基总数 5%的同源性缺口。

KGF-2 缺失突变体

天然 KGF-2 在水溶液状态时相对不稳定，并在加工与贮存期间经受化学与物理降解，导致生物活性的丧失。在升高的温度下，天然 KGF-2 也倾向于在水溶液中聚集，并在酸性条件下失活。

特别优选的 KGF-2 多肽是以下所示的缺失突变体（编号从蛋白质中的第一个氨基酸（Met）开始）:

Thr(残基 36)--Ser(残基 208)

Cys (37) --Ser (208)
Gln (38) -- Ser (208)
Ala (39) -- Ser (208)
Leu (40) -- Ser (208)
Gly (41) -- Ser (208)
Gln (42) -- Ser (208)
Asp (43) -- Ser (208)
Met (44) -- Ser (208)
Val (45) -- Ser (208)

Ser(46)--Ser(208)

Pro (47) -- Ser (208)
Glu (48) -- Ser (208)
Ala (49) -- (Ser (208)
Thr (50) -- Ser (208)
Asn (51)-- Ser (208)
Ser (52) -- Ser (208)
Ser (53) -- Ser (208)
Ser (54) -- Ser (208)
Ser (55) -- Ser (208)

Ser (56) -- Ser (208)
Phe (57) -- Ser (208)
Ser (59) -- Ser (208)
Ser(62) -- Ser (208)
Ala(63) -- Ser (208)
Gly (64) -- Ser (208)

Arg (65) -- Ser (208)

Val (67) -- Ser (208)

Ser (69) -- Ser (208)

Val (77) -- Ser (208)

Arg (80) -- Ser (208)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--His(207)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Val(206)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Val(205)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Met(204)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Pro(203)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Leu(202)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Phe(201)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--His(200)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Ala(199)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Ser(198)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Thr(197)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Asn(196)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Lys(195)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Arg(194)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Arg(193)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Thr(192)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Lys(191)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Arg(188)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Arg(187)

Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Lys(183)

优选实施方案包括 N 端缺失 **Ala(63)--Ser(208)**（**KGF-2Δ28**）和 **Ser(69)--Ser(208)**（**KGF-2Δ33**）。其它优选的 N 端和 C 端缺失突变体包括：**Ala(39)--Ser(208)**、**Pro(47)--Ser(208)**、**Val(77)--Ser(208)**、**Glu(93)--Ser(208)**、**Glu(104)--Ser(208)**、**Val(123)--Ser(208)** 和

Gly(138)--Ser(208)。其它优选的 C 端缺失突变体包括：Met(1)、Thr(36)或 Cys(37)--Lys(153)。

本发明也包括从 N 端和 C 端均缺失氨基酸的缺失突变体。这些突变体包括上述 N 端缺失突变体和 C 端缺失突变体的所有组合，例如，Ala(39)--His(200)、Met(44)--Arg(193)、Ala(63)--Lys(153)、Ser(69)--Lys(153)等。能用本领域技术人员公知的重组技术进行这些组合。

因此，本发明的药用制剂中使用的优选 KGF 多肽包括 N 端缺失突变体，包括那些除了图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 38 个 N 端氨基酸残基（即，至少 Met(1)--Gln(38)的缺失）但最多前 147 个 N 端氨基酸残基的缺失之外，含有图 1 所示氨基酸序列（SEQ ID NO:2）的突变体。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 38 个 N 端氨基酸残基（即，至少 Met(1)--Gln(38)的缺失）但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 46 个 N 端氨基酸残基但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 62 个 N 端氨基酸残基但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 68 个 N 端氨基酸残基但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失。此外，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 76 个 N 端氨基酸残基但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 92 个 N 端氨基酸残基但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 103 个 N 端氨基酸残基但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 122 个 N 端氨基酸残基但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失。

除了含有范围为上述 N 端缺失突变体的 KGF-2 突变体的制剂之外，本发明也涉及一种含有上述范围所有组合的制剂，例如，图 1（SEQ ID

NO:2）的至少前 62 个 N 端氨基酸残基但最多前 68 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 62 个 N 端氨基酸残基但最多前 76 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 62 个 N 端氨基酸残基但最多前 92 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 62 个 N 端氨基酸残基但最多前 103 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 68 个 N 端氨基酸残基但最多前 76 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 68 个 N 端氨基酸残基但最多前 92 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 68 个 N 端氨基酸残基但最多前 103 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 46 个 N 端氨基酸残基但最多前 62 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 46 个 N 端氨基酸残基但最多前 68 个 N 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 46 个 N 端氨基酸残基但最多前 76 个 N 端氨基酸残基的缺失；等等。

在另一个实施方案中，本发明提供含有 C 端缺失突变体的制剂。优选地，所述 C 端缺失突变体的 N 端氨基酸残基是图 1（SEQ ID NO:2）的氨基酸残基 1（Met）、36（Thr）或 37（Cys）。这些含有突变体的制剂包括那些除了图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后一个 C 端氨基酸残基（Ser(208)）但最多最后 55 个 C 端氨基酸残基的缺失（即，氨基酸残基 Glu(154)--Ser(208)的缺失）之外，含有图 1 所示氨基酸序列（SEQ ID NO:2）的突变体。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后一个 C 端氨基酸残基但最多最后 65 个 C 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 10 个 C 端氨基酸残基但最多最后 55 个 C 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 20 个 C 端氨基酸残基但最多最后 55 个 C 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 30 个 C 端氨基酸残基但最多最后 55 个 C 端氨基酸残基的缺失。或者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 40 个 C 端氨基酸残基但最多最后 55 个 C 端氨基酸残基的缺失。或

者，该制剂含有一种突变体，其具有包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 50 个 C 端氨基酸残基但最多最后 55 个 C 端氨基酸残基的缺失。

除了含有范围为上述 C 端缺失突变体的 KGF-2 突变体的制剂之外，本发明也涉及一种含有上述范围所有组合的制剂，例如，图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后一个 C 端氨基酸残基但最多最后 10 个 C 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后一个 C 端氨基酸残基但最多最后 20 个 C 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后一个 C 端氨基酸残基但最多最后 30 个 C 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后一个 C 端氨基酸残基但最多最后 40 个 C 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 10 个 C 端氨基酸残基但最多最后 20 个 C 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 10 个 C 端氨基酸残基但最多最后 30 个 C 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 10 个 C 端氨基酸残基但最多最后 40 个 C 端氨基酸残基的缺失；图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后 20 个 C 端氨基酸残基但最多最后 30 个 C 端氨基酸残基的缺失；等等。

在又另一个实施方案中，KGF-2 多肽可能是一种从 N 端和 C 端残基均缺失氨基酸的缺失突变体。这些突变体包括上述 N 端缺失突变体和 C 端缺失突变体的所有组合。这些突变体包括那些除了图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 46 个 N 端氨基酸残基但最多前 137 个 N 端氨基酸残基的缺失，和图 1（SEQ ID NO:2）的至少最后一个 C 端氨基酸残基但最多最后 55 个 C 端氨基酸残基的缺失之外，含有图 1 所示氨基酸序列（SEQ ID NO:2）的突变体。或者，一种缺失可能包括图 1（SEQ ID NO:2）的至少前 62、68、76、92、103 或 122 个 N 端氨基酸但最多前 137 个 N 端氨基酸残基，和图 1 的至少最后 10、20、30、40 或 50 个 C 端氨基酸残基但最多最后 55 个 C 端氨基酸残基的缺失。进一步包括上述范围的所有组合。

KGF-2 置换突变体

有用的 KGF-2 多肽包括那些具有氨基酸置换的多肽。天然成熟 KGF-2 含有 44 种带电残基，其中 32 种带有正电荷。根据这些残基在蛋

白质三维结构中的位置，一种或多种这些聚集残基被带有负电荷或中性电荷的氨基酸的置换，可改变相邻残基的静电相互作用，并可用于达到蛋白质的增强的稳定性和聚集降低。当制备药用制剂时，蛋白质的聚集不仅能引起活性的丧失而且是有问题的，因为它们可能是免疫原性的（Pinckard 等人，临床实验免疫学（Clin. Exp. Immunol.）2:331-340（1967），Robbins 等人，糖尿病（Diabetes）36:838-845（1987），Cleland 等人，治疗药物载体系统评述（Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems）10:307-377（1993））。任一修饰都应当考虑使蛋白质分子三级结构中的电荷排斥达到最小。因此，特别关注的是带电氨基酸被另一种电荷和被中性或带负电氨基酸的置换。后者产生正电荷减少的蛋白质，改进了 KGF-2 的特性。这些改进包括与天然 KGF-2 蛋白质相比，类似物的增强的稳定性和降低的聚集。

氨基酸的替换也能改变与细胞表面受体结合的选择性。Ostade 等人，自然（Nature）361:266-268（1993），叙述了导致 TNFα只与两种已知 TNF 受体之一选择性结合的某些 TNFα突变。

KGF-2 分子可包括一种或多种氨基酸置换、缺失或添加，其可来源于天然突变或人工操作。一些优选突变的实例是:

Ala (49) Gln, Asn (51) Ala, Ser (54) Val, Ala (63) Pro, Gly (64) Glu, Val (67) Thr, Trp (79) Val, Arg (80) Lys, Lys (87) Arg, Tyr (88) Trp, Phe (89) Tyr, Lys (91) Arg, Ser (99) Lys, Lys (102) Gln, Lys 103(Glu), Glu (104) Met, Asn (105) Lys, Pro (107) Asn, Ser (109) Asn, Leu (111) Met, Thr (114) Arg, Glu(117) Ala, Val (120) Ile, Val (123) Ile, Ala (125) Gly, Ile (126) Val, Asn (127) Glu, Asn (127) Gln, Tyr (130) Phe, Met (134) Thr, Lys (136) Glu, Lys (137) Glu, Gly (142) Ala, Ser (143) Lys, Phe (146) Ser, Asn (148) Glu, Lys (151) Asn, Leu (152) Phe, Glu (154) Gly, Glu (154) Asp, Arg (155) Leu, Glu (157) Leu, Gly (160) His, Phe (167) Ala, Asn (168) Lys, Gln (170) Thr, Arg (174) Gly, Tyr (177) Phe, Gly (182) Gln, Ala (185) Val, Ala (185) Leu, Ala (185) Ile, Arg (187) Gln (190) Lys, Lys (195) Glu, Thr (197) Lys, Ser (198) Thr, Arg (194)Glu, Arg(194)Gln, Lys(191)Glu, Lys(191)Gln, Arg(188)Glu, Arg(188)Gln, Lys(183)Glu.

至于命名，例如，Ala(49)Gln 是指图 1（SEQ ID NO:2）的位置 49 处的 Ala 被 Gln 代替。

改变优选地是次要性质的改变，如不显著影响蛋白质折叠或活性的保守性氨基酸置换。本领域技术人员所知的保守性氨基酸置换的实例如下所示：

芳族:	苯丙氨酸
	色氨酸
	酪氨酸
疏水性:	亮氨酸
	异亮氨酸
	缬氨酸
极性:	谷氨酰胺
	天冬酰胺
碱性:	精氨酸
	赖氨酸
	组氨酸
酸性:	天冬氨酸
	谷氨酸
小:	丙氨酸
	丝氨酸
	苏氨酸
	甲硫氨酸
	甘氨酸

当然，技术人员所进行的氨基酸置换的数量取决于许多因素，包括上述因素。一般而言，对于任一给定的 KGF-2 多肽，置换的数量根据目的不超过 50、40、30、20、10、5 或 3 个。例如，能在 KGF-2 的 C 端进行

多个置换以提高稳定性。

对于功能不可缺少的 KGF-2 中的氨基酸能用本领域众所周知的方法鉴定，如定点诱变或丙氨酸扫描诱变（Cunningham 和 Wells，科学 244:1081-1085（1989））。后一方法将单丙氨酸突变引入分子中的每一残基处。然后检测得到的突变分子的生物活性，如受体结合或体外和体内增殖活性。（见，例如实施例 1）。对于配体-受体结合关键的位点也能用结构分析如结晶、核磁共振或光亲和标记来测定。（见，例如：Smith 等人，分子生物学杂志（J. Mol. Biol.）224:899-904（1992）；和 de Vos 等人，科学，255:306-312（1992））。

其它有用的 KGF 多肽包括在氨基酸位置 37 和 106 和 150 处用丝氨酸替换半胱氨酸的多肽。不均匀数量的半胱氨酸意思是，至少一个半胱氨酸残基可用于能造成蛋白质适应一种不希望的三级结构的分子间交联或键合。一个或多个半胱氨酸被替换为丝氨酸或如丙氨酸的新型 KGF-2 蛋白质，通常以较高产率的可溶性、正确折叠的蛋白质纯化。尽管不希望被理论所束缚，但据认为位置 106 处的半胱氨酸残基对于功能是至关重要的。该半胱氨酸残基在所有其它 FGF 家族成员中高度保守。

KGF-2 多肽组合物的治疗用途

本发明的多肽可以刺激角质形成细胞生长和增殖。因此，能用本发明的组合物刺激上皮细胞增殖和基底角质形成细胞用于创伤愈合，并刺激毛囊产生和皮肤创伤的痊愈。这些创伤可能是表面的或是深层的，包括皮肤真皮和表皮的损伤。

KGF-2 可用于治疗许多疾病和病症。例如，KGF-2 在多种创伤愈合模型中有体外和体内活性。见，1997 年 8 月 13 日提交的美国专利号 08/910,875，和 1998 年 2 月 13 日提交的 09/023,082。

施用 KGF-2 的个体可以以正常速度愈合创伤，或者可能是痊愈受损的。当对不是痊愈受损的个体施用时，施用 KGF-2 来加速正常痊愈过程。当对痊愈受损的个体施用时，施用 KGF-2 以利于用其它方法只能缓慢愈合或根本不能愈合的创伤的痊愈。许多痛苦和病症能导致痊愈受损。这

些痛苦和病症包括糖尿病（例如II型糖尿病）、用类固醇和非甾类药剂两者的治疗和局部缺血堵塞或损伤。

许多生长因子显示能促进痊愈受损的个体的创伤愈合。这些生长因子包括生长激素释放因子、血小板衍生生长因子和碱性成纤维细胞生长因子。因此，本发明也包括KGF-2组合物与一种或多种其它生长因子或能促进创伤痊愈的其它药剂一起施用。

本发明的组合物也能促进个体中由手术操作引起的吻合和其它创伤的愈合，两种都以正常速度愈合创伤并且是愈合损伤的。

本发明的组合物也可用来刺激细胞的分化，例如肌细胞、构成神经组织的细胞、前列腺细胞和肺细胞。

本发明的组合物在临床上可用于刺激创伤的创伤愈合中，包括外科创伤、切除创伤、包括真皮和表皮损伤的深层创伤、眼组织创伤、牙组织创伤、口腔创伤、糖尿病溃疡、皮肤溃疡、肘溃疡、动脉溃疡、静脉停滞溃疡和由于热暴露于热或冷的极端温度、或接触化学药品引起的灼伤，用于正常个体和那些患有诱导异常创伤痊愈的病症的个体，这些病症如尿毒症、营养不良、维生素缺乏、肥胖症、感染、免疫抑制和与用类固醇、放射治疗和抗肿瘤药及抗代谢药全身治疗有关的并发症。这些组合物也可用于促进愈合与局部缺血和缺血性损伤有关的创伤，如静脉循环系统返回缺陷和/或不足引起的慢性静脉下肢溃疡；促进皮肤损伤之后的皮肤重建；增强表皮的抗张强度和表皮厚度；增强皮肤移植物与创伤床的粘附，并刺激创伤床的上皮再形成。

KGF-2 多肽的其它治疗用途包括但不限于，例如，刺激上皮细胞增殖和基底角质形成细胞，用于治疗灼伤和皮肤缺陷如银屑病和大疱性表皮松解症。KGF-2 能用来增强皮肤移植物与创伤床的粘附，刺激创伤床的上皮再形成。KGF-2 也能用来减少由辐射、化学治疗或病毒感染引起的肠毒性的副作用。KGF-2 能用来治疗肝、肺、肾、胸、胰、胃、小肠和大肠的疾病和病症。KGF-2 能用来治疗炎性肠病、糖尿病、血小板减少症、低纤维蛋白原血症、低白蛋白血症、低球蛋白血症、出血性膀胱炎、口干燥症、角膜结膜炎干燥症。KGF-2 能用来刺激唾液腺、泪腺的

上皮细胞，刺激窦的上皮再形成和鼻粘膜的生长。

能用本发明的组合物治疗的许多其它适应症在美国申请号08/910,875和09/023,082中有述，在此引用作为参考。

本发明涉及KGF-2及其缺失突变体的新型液体和冻干制剂。本发明进一步涉及用于治疗用途的KGF-2制剂。这些制剂提供了优于活性KGF-2多肽的稳定性，在某些情况中能加强并显著提高多肽的创伤愈合活性。

此处使用时，"个体"是指一种动物，优选地一种哺乳动物（如猿、母牛、马、猪、野猪、绵羊、啮齿动物、山羊、狗、猫、鸡、猴、兔、白鼬、鲸和海豚），更优选地为人。

本发明的制剂中使用的KGF-2 Δ33多肽可具有或可以不具有N端甲硫氨酸，优选地该多肽缺乏N端甲硫氨酸。如以下所述，本发明的KGF-2多肽制剂的稳定性用增殖测定法来测定。

角质形成细胞增殖测定

表皮角质形成细胞是皮肤表皮中的细胞。皮肤中角质形成细胞的生长和扩散是创伤痊愈中的一个重要过程。因此，角质形成细胞的增殖测定是蛋白质刺激角质形成细胞生长因而创伤痊愈的活性的重要指示。

然而，角质形成细胞难以体外生长。极少存在角质形成细胞系。这些细胞系具有不同的细胞和遗传缺陷。为了避免由细胞缺陷（如重要生长因子受体丢失或生长对重要生长因子依赖性）引起的该测定法的复杂化，为该测定选择原代皮肤角质形成细胞。这些原代角质形成细胞从Clonetics, Inc.（San Diego, CA）获得。

KGF-2多肽的生物活性能通过细胞增殖测定法来测定，其使用被成纤维细胞生长因子2iiib受体（FGFR2iiib）转染的鼠Baf3 2b细胞。通过在细胞暴露于以下所述蛋白质之后[甲基-^{3}H]-胸苷的掺入来测定细胞的增殖。在每孔含有约22000个Baf3 2b细胞的96孔组织培养板中进行该测定。一式三份使细胞暴露于不同浓度的KGF-2多肽，并在CO_2培养箱中37℃温育大约48小时。随后向每孔中加入近似量的含有标记胸苷的细

胞培养基，并且再继续温育 5 小时。然后用细胞收集器在 96 孔格式的玻璃纤维滤垫上收集细胞。干燥滤垫，用平板液体闪烁计数器计数掺入每一样品中的放射性。在这些测定条件下，与用适当稀释的安慰剂缓冲液或简单地用磷酸缓冲盐溶液处理的对照细胞相比，暴露于 KGF-2 的细胞显示增强的放射性掺入。

另一种可用的角质形成细胞增殖测定法使用 Alamar Blue。Alamar Blue 是一种可得的蓝色染料，当加入培养基中由线粒体代谢。随后该染料在组织培养上清液中变为红色。红色染料的量可以通过读取 570nm 与 600nm 光密度的差直接定量。该读值反映细胞活性和细胞数量。

正常的原代皮肤角质形成细胞（CC-0255，合并的 NHEK-Neo）购自 Clonetics，Inc.。这些细胞为第 2 代。角质形成细胞在完全角质形成细胞生长培养基（CC-3001，KGM；Clonetics, Inc.）中生长，直到达到 80% 汇合。按照使用说明书用胰蛋白酶消化细胞。简言之，用 Hank's 平衡盐溶液洗细胞两次。将 2-3ml 胰蛋白酶加入细胞中在室温下大约 3-5 分钟。加入胰蛋白酶中和溶液，收集细胞。在室温下以 600×g 旋转离心细胞 5 分钟，并用预温的培养基以每平方厘米 3000 个细胞的浓度接种于新摇瓶中。

对于增殖测定，除了最外面几排之外，在 Corning 平底 96 孔板中每孔平板接种 1000-2000 个角质形成细胞于完全培养基中。将外面的孔填充 200μl 无菌水。这有助于使孔的温度和湿度波动保持最小。在 37℃、5% CO_2 下培养细胞过夜。用角质形成细胞基础培养基（CC-3101，KBM，Clonetics，Inc.）洗细胞两次，并向每孔中加入 100μl KBM。温育 24 小时。以用 KBM 连续稀释生长因子，并向每孔中加入 100μl。用 KGM 作为阳性对照，KBM 作为阴性对照。每一浓度点使用六个孔。温育 2-3 天。温育结束时，用 KBM 洗细胞一次，并加入 100μl 含有 10% v/v 预混合于培养基中的 alamarBlue 的 KBM。温育 6-16 小时，直到 KGM 阳性对照中培养基颜色开始变红。通过直接将培养板置于平板读数仪中测定 O.D.570nm-O.D.600nm。

KGF-2 缺失突变体的构建

在本发明的组合物中可使用的缺失突变体能通过下列方法构建。

用优化的 KGF-2 构建体作为模板，从 KGF-2 基因的 5'端和 3'端构建缺失突变体。根据可能负影响大肠杆菌中表达的基因区选择缺失。对于 5'缺失，用以下所列引物作为 5'引物。这些引物含有所示的限制酶切位点和一个 ATG 以编码起始甲硫氨酸。KGF-2（FGF-12）208 氨基酸 3' HindIII 引物用作 3'引物。用标准条件进行 PCR 扩增 25 个循环。KGF-2 36aa/208aa 缺失突变体的产物对于 5'位点用 BspHI 限制性酶切，对于 3'位点用 HindIII 酶切，并克隆到已用 BspHI 和 HindIII 消化的 pQE60 中。其它所有产物对于 5'限制酶用 NcoI 限制性酶切，对于 3'位点用 HindIII 酶切，并克隆到已用 NcoI 和 HindIII 消化的 pQE60 中。对于 KGF-2（FGF-12），用 36aa/153aa 和 128aa 3' HindIII 作为 3'引物，用 FGF-12 36aa/208aa 作为 5'引物。对于 FGF-12 62aa/153aa，用 128aa 3' HindIII 作为 3'引物，用 FGF-12 62aa/208aa 作为 5'引物。得到的克隆的命名表明由缺失产生的多肽的第一个和最后一个氨基酸。例如，KGF-2 36aa/153aa 表明，缺失突变体的第一个氨基酸是 KGF-2 的氨基酸 36，而最后一个氨基酸是氨基酸 153。这些 KGF-2 缺失突变体的构建在美国申请号 08/910,875 和 09/023,082 中也有描述，在此引用作为参考。此外，如以下所述，每一个突变体具有添加的 N 端 Met。然而，在根据本发明的制剂中使用的 KGF-2 缺失多肽可具有或可不具有 N 端甲硫氨酸，优选地该多肽缺乏 N 端甲硫氨酸。

缺失引物的序列：

FGF12 36aa/208aa:

5' BsphI GGACCCTCATGACCTGCCAGGCTCTGGGTCAGGAC (SEQ ID NO:3)

FGF12 63aa/208aa:

5' NcoI GGACAGCCATGGCTGGTCGTCACGTTCG (SEQ ID NO:4)

FGF12 77aa/208aa:

5' NcoI GGACAGCCATGGTTCGTTGGCGTAAACTG (SEQ ID NO:5)

00·07·26

FGF12 93aa/208aa:

5' NcoI GGACAGCCATGGAAAAAAACGGTAAAGTTTC (SEQ ID NO:6)

FGF12 104aa/208aa:

5' NcoI GGACCCCCATGGAGAACTGCCCGTAGAGC (SEQ ID NO:7)

FGF12 123aa/208aa:

5' NcoI GGACCCCCATGGTCAAAGCCATTAACAGCAAC (SEQ ID NO:8)

FGF12 138aa/208aa:

5' NcoI GGACCCCCATGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAG (SEQ ID NO:9)

FGF12 3' HindIII: （用于上述所有缺失克隆）

CTGCCCAAGCTTATTATGAGTGTACCACCATTGGAAG (SEQ ID NO:10)

FGF12 36aa/153aa:

5' BsphI（如上）

3'HindIII CTGCCCAAGCTTATTACTTCAGCTTACAGTCATTGT (SEQ ID NO:11)

FGF12 63aa/153aa :

5' NcoI 和 3' HindIII，如上。

N 端缺失突变体 KGF-2 Δ33 的构建

KGF-2 Δ33 在 pQE6 中的构建

为了进行聚合酶链反应引导的扩增和KGF2Δ33向大肠杆菌表达载体pQE6中的亚克隆，合成与KGF2希望区互补的两条寡核苷酸引物（5952和19138），其具有下列碱基序列。

引物 5952: 5' GCGGCACATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTG 3'（SEQ ID NO:12）

引物 19138: 5' GGGCCCAAGCTTATGAGTGTACCACCAT 3'（SEQ ID NO:13）

在N端引物（5952）中，引入了一个AflIII限制位点，而在C端引

物（19138）中引入了一个 HindIII 限制位点。引物 5952 也含有一个与 KGF2 编码区相邻并符合读框的 ATG 序列，以允许克隆片段在大肠杆菌中的翻译，而引物 19138 含有两个与 KGF2 编码区相邻并符合读框的终止密码子（优势性用于大肠杆菌），它们确保在大肠杆菌中的正确翻译终止。

应用本领域技术人员众所周知的标准条件和成熟 KGF-2（aa 36-208）的核苷酸序列作为模板，进行聚合酶链反应。得到的扩增子用 AflIII 和 HindIII 限制性消化，并亚克隆到 NcoI/ HindIII 消化的 pQE6 蛋白质表达载体中。

KGF-2 Δ33 在 pHE1 中的构建

为了进行聚合酶链反应引导的扩增和 KGF2Δ33 向大肠杆菌表达载体 pHE1 中的亚克隆，合成与 KGF2 希望区对应的两条寡核苷酸引物（6153 和 6150），其具有下列碱基序列。

引物 6153: 5' CCGGCGGATCCCATATGTCTTACAACCACCTGCAGG 3'（SEQ ID NO:14）

引物 6150: 5' CCGGCGGTACCTTATTATGAGTGTACCACCATTGG 3'（SEQ ID NO:15）

在 N 端引物（6153）中，引入了一个 NdeI 限制位点，而在 C 端引物（6150）中引入了一个 Asp718 限制位点。引物 6153 也含有一个与 KGF2 编码区相邻并符合读框的 ATG 序列，以允许克隆片段在大肠杆菌中的翻译，而引物 6150 含有两个与 KGF2 编码区相邻并符合读框的终止密码子（优势性用于大肠杆菌），它们确保在大肠杆菌中的正确翻译终止。

应用本领域技术人员众所周知的标准条件和成熟 KGF-2（aa 36-208）的核苷酸序列作为模板，进行聚合酶链反应。得到的扩增子用 NdeI 和 Asp718 限制性消化，并亚克隆到 NdeI/Asp718 消化的 pHE1 蛋白质表达载体中。

KGF-2 Δ33 的核苷酸序列:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTT
CTCTTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA
AAACGGTAAAGTTTCTGGGACCAAGAAGGAGAACTGCCCGTACAGC
ATCCTGGAGATAACATCAGTAGAAATCGGAGTTG
TTGCCGTCAAAGCCATTAACAGCAACTATTACTTAGCCATGAACAA
GAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAAGAATTTAAC
AATGACTGTAAGCTGAAGGAGAGGATAGAGGAAAATGGATACAAT
ACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAG

GCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCAAGG
AGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTTCTTC
CAATGGTGGTACACTCATAA (SEQ ID NO:16)

KGF-2 Δ33 的氨基酸序列:

（贴 44 页 5-8 行）

MSYNFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSV
EIGVVGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNT
YASFKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS
(SEQ I

B. 优化 KGF-2 Δ33 多核苷酸序列的构建

为了提高 KGF2Δ33 在大肠杆菌中的表达水平，优化完整基因的密码子，以匹配那些在大肠杆菌中最常使用的密码子。当在 N 端区域中对用于产生 KGF2Δ33 的模板进行密码子优化时，C 端氨基酸（84-208）需要优化。

首先，对氨基酸 172-208 进行密码子优化，产生 KGF2Δ33(s172-208)。这通过重叠 PCR 策略实现。合并寡核苷酸 PM07 和 PM08（对应于氨基酸 172-208），通过加热到 70℃并使之冷却到 37℃，使之一起退火。退火的寡核苷酸然后作为模板用于由引物 PM09 和 PM10 引导的标准 PCR 反

应。在一个按照本领域技术人员众所周知的标准条件并使用 KGF2Δ33 作为模板进行的单独 PCR 反应中，用寡核苷酸 PM05（与 KGF2 编码区内的 PstI 位点重叠）和 PM11 扩增对应于氨基酸 84-172 的 KGF-2 区域。在第三次 PCR 反应中，合并第一次 PCR 反应的产物（对应于密码子优化的氨基酸 172-208）和第二次 PCR 反应的产物（对应于密码子未优化的氨基酸 84-172），并作为模板用于由寡核苷酸 PM05 和 PM10 引导的标准PCR反应。得到的扩增子用PstI/HindIII消化，并亚克隆到PstI/HindIII消化的 pQE6KGF2Δ33 中，有效地置换相应的非密码子优化区，产生 pQE6KGF2Δ33（s172-208）。

为了完成 KGF2 的密码子优化，使用重叠寡核苷酸，产生对应于氨基酸 84-172 的 KGF2 区最适的合成基因密码子。合并四种寡核苷酸（PM31、PM32、PM33 和 PM34），进行 7 个循环的下列 PCR：94℃，30 秒；46.5℃，30 秒；72℃，30 秒。

然后按照标准方法，用 1μl 第一次 PCR 反应物作为模板，进行由引物 PM35 和 PM36 引导的第二次 PCR。得到的密码子优化的基因片段然后用 PstI/SalI 消化，并亚克隆到 PstI/SalI 消化的 pQE6KGF2Δ33（s172-208）中，产生完全优化的 KGF2 编码基因 pQE6KGF2Δ33s。

为了产生一种备择的大肠杆菌蛋白质表达载体，用引物 PM102 和 PM130 对 pQE6KGF2Δ33s PCR 扩增 KGF2Δ33s。得到的扩增子用 NdeI 和 EcoRV 消化，并亚克隆到用 NdeI 和 Asp718 消化的 pHE1 表达载体（平端）中，产生 pHE1Δ33s。

在密码子优化的 KGF-2 Δ33s 构建中使用的寡核苷酸序列：

PM05: CAACCACCTGCAGGGTGACG (SEQ ID NO:18)

PM07: AACGGTCGACAAATGTATGTGGCACTGAACGGTAAAGGTG CTCCACGTCGTGGTCAGAAAACCCGTCGTAAAAACACC (SEQ ID NO:19)

PM08: GGGCCCAAGCTTAAGAGTGTACCACCATTGGCAGAAAGT GAGCAGAGGTGTTTTTACGACGGGTTTTCTGACCACG (SEQ ID NO:20)

PM09: GCCACATACATTTGTCGACCGTT (SEQ ID NO:21)

PM10: GGGCCCAAGCTTAAGAGTG (SEQ ID NO:22)

PM11:GCCACATACATTTGTCGACCGTT (SEQ ID NO:23)

PM31:CTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTTCTCCTTCACCA AATACTTCCTGAAAATCGAAAAAAACGGTAAAGTTTCTGGTACCAA G (SEQ ID NO:24)

PM32:AGCTTTAACAGCAACAACACCGATTTCAACGGAGGTGATTTC CAGGATGGAGTACGGGCAGTTTTCTTTCTTGGTACCAGAAACTTTAC C (SEQ ID NO:25)

PM33:GGTGTTGTTGCTGTTAAAGCTATCAACTCCAACTACTACCTGG CTATGAACAAGAAAGGTAAACTGTACGGTTCCAAAGAATTTAACAA C (SEQ ID NO:26)

PM34:GTCGACCGTTGTGCTGCCAGTTGAAGGAAGCGTAGGTGTTGT AACCGTTTTCTTCGATACGTTCTTTCAGTTTACAGTCGTTGTTAAATT CTTTGGAACC (SEQ ID NO:27)

PM35: GCGGCGTCGACCGTTGTGCTGCCAG (SEQ ID NO:28)

PM36: GCGGCCTGCAGGGTGACGTTCGTTGG (SEQ ID NO:29)

PM102: CCGGCGGATCCCATATGTCTTACAACCACCTGCAGG (SEQ ID NO:30)

PM130: CGCGCGATATCTTATTAAGAGTGTACCACCATTG (SEQ ID NO:31)

KGF-2 Δ33 的核苷酸序列（s172-208）:

ATGTCTTACAACCACCTGCAGGGTGACGTTCGTTGGCGTAAACTGTT CTCCTTCACCAAATACTTCCTGAAAATCGAAAA

AAACGGTAAAGTTTCTGGTACCAAGAAAGAAAACTGCCCGTACTCC ATCCTGGAAATCACCTCCGTTGAAATCGGTGTTG

TTGCTGTTAAAGCTATCAACTCCAACTACTACCTGGCTATGAACAAG
AAAGGTAAACTGTACGGTTCCAAAGAATTTAAC
AACGACTGTAAACTGAAAGAACGTATCGAAGAAAACGGTTACAACA
CCTACGCTTCCTTCAACTGGCAGCACAACGGTCG
ACAAATGTATGTGGCACTGAACGGTAAAGGTGCTCCACGTCGTGGT
C A G A A A A C C C G T C G T A A A A A C A C C T C T G C T C
ACTTTCTGCCAATGGTGGTACACTCTTAA (SEQ ID NO:32)

KGF-2 Δ33 的氨基酸序列（s172-208）:

MSYNHLQGDVRWRKLFSFTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCPYSILEITSV
EIGVVAVKAINSNYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNT
YASFNWQHNGRQMYVALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMVVHS
(SEQ ID NO:33)

实施例

实施例　1KGF-2 液体制剂

混合下列成分，产生一种液体 KGF-2 Δ33 液体制剂，　-20℃贮存。

2mg/ml KGF-2 Δ33 多肽，
20mM 乙酸钠，
125mM 氯化钠，
1mM EDTA，
水，pH6.2。

该制剂在 2-8℃或更低温度的贮存条件下保持其体外生物活性可达 10 个月。图 3 显示第 10 个月时的生物活性。该制剂在 2-8℃或更低温度的贮存条件下保持其所有物理化学性质可达 11 个月。

生物活性用如下的细胞增殖测定法测定。常规培养 BaF3 细胞，保存于含有 10% NBCS、10% WEHI 细胞条件培养基、2mM 谷氨酰胺、

600μg/ml 遗传霉素（GENETICIN）、1μl β-巯基乙醇/500ml 生长培养基、500 单位青霉素和 50μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中（Ornitz, D., M. 等人（1996），生物化学杂志（J. Biol. Chem.）271:15292-15297）。为进行细胞增殖测定，离心收集 BaF3 细胞，并用基础培养基（它与生长培养基具有相同的组成，但不含 WEHI 条件培养基，而补加有 1μg/ml 肝素）洗涤。该操作之后，将细胞重悬浮于基础培养基中，并在 96 孔细胞培养皿中每孔平板接种 22,000 细胞/180μl。在另一个 96 孔板中用 PBS 进行 KGF-2 的适当稀释（比所需的终浓度高 10 倍），加到细胞中至 200μl 的终体积。将细胞板在 37℃、5% CO_2 培养箱中温育 36-40 小时，向每孔中加入 50μl 基础培养基中的 0.5μCi 甲基-^{3}H 胸苷。将平板在培养箱中再温育 5 小时，用 Tomtec Harvester 96 通过在玻璃纤维滤器中过滤收集细胞。用 Wallac β平板闪烁计数器计数掺入的胸苷。

实施例 2　KGF-2 冻干制剂

混合下列成分，产生一种 KGF-2 Δ33 冻干制剂。

10mg/ml KGF-2 Δ33,
10mM 柠檬酸钠,
20mM 氯化钠,
1mM EDTA,
7% w/v 蔗糖,
水（冻干后去除）
pH6.2。

该制剂在 45℃或更低温度的贮存条件下保持其体外生物活性可达 9 个月。图 4 显示第 9 个月时的生物活性。生物活性用实施例 1 中详述的细胞增殖测定法测定。反相 HPLC 证明，该制剂在 45℃或更低的温度和 75%相对湿度下保持其物理化学性质可达 8 个月。

实施例 3 增稠制剂中的 KGF-2

混合下列成分，产生一种 KGF-2 Δ33 增稠制剂。

2mg/ml KGF-2 Δ33,

10mM 柠檬酸钠,

20mM 氯化钠,

1mM EDTA,

7% w/v 蔗糖,

1.25%羧甲基纤维素,

水

pH6.2。

该制剂通过将 KGF-2 Δ33 多肽加入羧甲基纤维素溶液中而制备。经旋转粘度计测定，得到的制剂的粘度约为 250 厘泊。在羧甲基纤维素的存在下 KGF-2 多肽保留生物活性。制剂的生物活性用实施例 1 中详述的细胞增殖测定法测定。

实施例 4　凝胶制剂中的 KGF-2

混合下列成分，产生一种 KGF-2 Δ33 凝胶制剂。

2mg/ml KGF-2 Δ33,

10mM 柠檬酸钠,

20mM 氯化钠,

1mM EDTA,

7% w/v 蔗糖,

16% 普流罗尼 F127,

水

pH6.2。

向约 2℃-约 8℃的普流罗尼溶液中加入 KGF-2 Δ33。得到的制剂的粘度在 20℃时约为 50 厘泊，在约 37℃时凝固。经实施例 1 中详述的细胞增殖测定法测定，在普流罗尼 F127 存在下 KGF-2 保留生物活性。

实施例 5　单硫代甘油对 KGF 2 的活化

用或不用单硫代甘油（MTG）制备 KGF-2 Δ33 蛋白质贮存制剂

（0.1-2.0mg/ml）。

用 pH7.2 的 1×磷酸缓冲盐溶液（PBS）稀释该蛋白质制剂，以达到用于细胞增殖测定所需的浓度。

细胞培养

常规培养 BaF32b 细胞，并保存于含有 10% NBCS、10% WEHI 细胞条件培养基、2mM 谷氨酰胺、600μg/ml 遗传霉素、1μl β-巯基乙醇/500ml 生长培养基、50 单位青霉素和 50μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中（Ornitz, D., M.等人（1996），生物化学杂志 271:15292-15297）。

细胞增殖测定

为进行细胞增殖测定，离心收集 BaF32b 细胞，并用基础培养基（它与生长培养基具有相同的组成，但不含 WEHI 条件培养基，而补加有 1μg/ml 肝素）洗涤。该操作之后，将细胞重悬浮于基础培养基中，并在 96 孔细胞培养皿中每孔平板接种 22,000 细胞/180μl。在另一个 96 孔板中用 PBS 进行 KGF 2 的适当稀释（比所需终浓度高 10 倍），加到细胞中至 200μl 的终体积。将细胞板在 37℃、5% CO_2 培养箱中温育 36-40 小时，向每孔中加入 50μl 基础培养基中的 0.5μCi 甲基-^{3}H 胸苷。将平板在培养箱中再温育 5 小时，用 Tomtec Harvester 96 通过在玻璃纤维滤器中过滤收集细胞。用 Wallac β平板闪烁计数器计数掺入的胸苷。

结果

A. MTG 浓度对 KGF-2 活性的影响

用暴露于不同浓度单硫代甘油（MTG）的 KGF-2 进行细胞增殖测定。对照样品不含赋形剂。用不同浓度的 MTG 观察到 MTG 对 KGF-2 活性的刺激，如图 5 所示。活性的增加为对照的 10-150%，取决于所用 MTG 的浓度。用该生长因子家族的其它成员观察不到细胞增殖活性的提高。从这些观察中推断出，MTG 对 KGF-2 活性的刺激是相当特异的。

结论

单硫代甘油似乎特异地刺激 KGF-2 的体外细胞增殖活性。

00·07·26

实施例 6　含柠檬酸盐的 KGF-2 凝胶制剂

混合下列成分，产生一种 KGF-2 制剂，其在室温下为液体，随后在施用于皮肤后形成胶体。

20mM 柠檬酸钠，

125mM 氯化钠，

1mM EDTA 二钠，

17% 普流罗尼 F127，pH6.0，

水。

实施例 7　含乙酸盐的 KGF-2 凝胶制剂

混合下列成分，产生一种在施用于皮肤后能形成胶体的 KGF-2 制剂。

20mM 乙酸钠，

125mM 氯化钠，

1mM EDTA 二钠，

17% 普流罗尼 F127，pH6.0，

水。

实施例 8　液体 KGF-2 制剂

在四种不同的制剂中，和三种不同的 pH 下：pH5.0、pH5.5 和 pH6.0，评估柠檬酸钠作为保持 KGF-2 Δ33 的缓冲剂的适宜性。

制剂：

A. KGF-2 Δ33 1 mg/ml 或 2mg/ml

20mM 柠檬酸钠，

125mM 氯化钠，

1mM EDTA 二钠，

水。

B. 如上述 "A"，另外含有 1%甘油。

C. 如上述 "A," 另外含有 0.05%甲硫氨酸。

D. 如上述 "A," 另外含有 1%单硫代甘油。

在上述所有制剂中 KGF-2 Δ33 的浓度为 1mg/ml 和 2mg/ml。

2. 冻干制剂

在三种填充剂—甘露醇、蔗糖和海藻糖—之一的存在下冻干 KGF-2 Δ33。制剂:

A. 10mM 柠檬酸钠、20mM 氯化钠、1mM EDTA 二钠和 4%甘露醇, pH6.0

B. 10mM 柠檬酸钠、20mM 氯化钠、1mM EDTA 二钠和 7%蔗糖, pH6.0

C. 10mM 柠檬酸钠、20mM 氯化钠、1mM EDTA 二钠和 8%海藻糖, pH6.0

KGF-2 多肽的浓度为 3mg/ml 和 8mg/ml。评估参数为用水重建之前及之后的 RP-HPLC、SDS-PAGE、外观。

3. 10mg/ml KGF-2 冻干

评估了制剂是否允许 10mg/ml 蛋白质的冻干, 以及重建后的蛋白质稳定性。

制剂:

10mM 柠檬酸钠、20mM 氯化钠、1mM EDTA 二钠和 4%甘露醇, pH6.0。

冻干产品用水或含有 1%单硫代甘油的水重建。

显然, 可以与以上叙述和实施例中特别描述的不同地方法实施本发明。

根据以上所述, 本发明的大量修改和变化是可能的, 因而, 它们落在附加的权利要求书的范围之内。

此处引用的所有文献(包括专利、专利申请、杂志文章、实验室手册、书或其它文件)的全部公开内容都在此引入作为参考。

00.07.26

序列表

<110> Gentz, Reiner L.
Chopra, Arvind
Kaushal, Parveen
Spitznagel, Thomas
Unsworth, Edward
Khan, Fazal
Human Genome Sciences, Inc.

<120> 角质成形细胞生长因子-2 制剂

<130> 1488.103PC01

<140> 待分配
<141> 如下

<150> US 60/068,493
<151> 1997-12-22

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 627
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(624)

<400> 1

```
atg tgg aaa tgg ata ctg aca cat tgt gcc tca gcc ttt ccc cac ctg   48
Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu
  1               5                  10                  15

ccc ggc tgc tgc tgc tgc tgc ttt ttg ttg ctg ttc ttg gtg tct tcc   96
Pro Gly Cys Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser
             20                  25                  30

gtc cct gtc acc tgc caa gcc ctt ggt cag gac atg gtg tca cca gag   144
Val Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu
         35                  40                  45

gcc acc aac tct tct tcc tcc tcc ttc tcc tct cct tcc agc gcg gga   192
Ala Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly
     50                  55                  60

agg cat gtg cgg agc tac aat cac ctt caa gga gat gtc cgc tgg aga   240
Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg
```

00.07.26

```
65                  70                  75                  80

aag cta ttc tct ttc acc aag tac ttt ctc aag att gag aag aac ggg   288
Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly
                85                  90                  95

aag gtc agc ggg acc aag aag gag aac tgc ccg tac agc atc ctg gag   336
Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu
            100                 105                 110

ata aca tca gta gaa atc gga gtt gtt gcc gtc aaa gcc att aac agc   384
Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser
        115                 120                 125

aac tat tac tta gcc atg aac aag aag ggg aaa ctc tat ggc tca aaa   432
Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys
    130                 135                 140

gaa ttt aac aat gac tgt aag ctg aag gag agg ata gag gaa aat gga   480
Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly
145                 150                 155                 160

tac aat acc tat gca tca ttt aac tgg cag cat aat ggg agg caa atg   528
Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met
                165                 170                 175

tat gtg gca ttg aat gga aaa gga gct cca agg aga gga cag aaa aca   576
Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr
            180                 185                 190

cga agg aaa aac acc tct gct cac ttt ctt cca atg gtg gta cac tca   624
Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser
        195                 200                 205

tag                                                               627
```

<210> 2
<211> 208
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

```
Met Trp Lys Trp Ile Leu Thr His Cys Ala Ser Ala Phe Pro His Leu
  1               5                  10                  15

Pro Gly Cys Cys Cys Cys Cys Phe Leu Leu Leu Phe Leu Val Ser Ser
             20                  25                  30

Val Pro Val Thr Cys Gln Ala Leu Gly Gln Asp Met Val Ser Pro Glu
         35                  40                  45
```

Ala Thr Asn Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly
50 55 60

Arg His Val Arg Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg
65 70 75 80

Lys Leu Phe Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly
85 90 95

Lys Val Ser Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu
100 105 110

Ile Thr Ser Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser
115 120 125

Asn Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Lys Gly Lys Leu Tyr Gly Ser Lys
130 135 140

Glu Phe Asn Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met
165 170 175

Tyr Val Ala Leu Asn Gly Lys Gly Ala Pro Arg Arg Gly Gln Lys Thr
180 185 190

Arg Arg Lys Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser
195 200 205

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> 人

<400> 3
ggaccctcat gacctgccag gctctgggtc aggac 35

<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> 人

<400> 4
ggacagccat ggctggtcgt cacgttcg 28

<210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> 人

<400> 5
ggacagccat ggttcgttgg cgtaaactg 29

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> 人

<400> 6
ggacagccat ggaaaaaaac ggtaaagttt c 31

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> 人

<400> 7
ggacccccat ggagaactgc ccgtagagc 29

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> 人

<400> 8
ggacccccat ggtcaaagcc attaacagca ac 32

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<400> 9
ggacccccat ggggaaactc tatggctcaa aag 33

<210> 10
<211> 37
<212> DNA
<213> 人

<400> 10
ctgcccaagc ttattatgag tgtaccacca ttggaag 37

<210> 11
<211> 36

<212> DNA
<213> 人

<400> 11
ctgcccaagc ttattacttc agcttacagt cattgt 36

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> 人

<400> 12
gcggcacatg tcttacaacc acctgcaggg tg 32

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> 人

<400> 13
gggcccaagc ttatgagtgt accaccat 28

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> 人

<400> 14
ccggcggatc ccatatgtct tacaaccacc tgcagg 36

<210> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> 人

<400> 15
ccggcggtac cttattatga gtgtaccacc attgg 35

<210> 16
<211> 426
<212> DNA
<213> 人

<400> 16
atgtcttaca accacctgca gggtgacgtt cgttggcgta aactgttctc tttcaccaaa 60

tacttcctga aaatcgaaaa aaacggtaaa gtttctggga ccaagaagga gaactgcccg 120

tacagcatcc tggagataac atcagtagaa atcggagttg ttgccgtcaa agccattaac 180

agcaactatt acttagccat gaacaagaag gggaaactct atggctcaaa agaatttaac 240

aatgactgta agctgaagga gaggatagag gaaaatggat acaataccta tgcatcattt 300

aactggcagc ataatgggag gcaaatgtat gtggcattga atggaaaagg agctccaagg 360

agaggacaga aaacacgaag gaaaaacacc tctgctcact ttcttccaat ggtggtacac 420

tcataa 426

<210> 17
<211> 141
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

Met Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg Lys Leu Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly Lys Val Ser
20 25 30

Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ser
35 40 45

Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser Asn Tyr Tyr
50 55 60

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

Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr
85 90 95

Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met Tyr Val Ala
100 105 110

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

Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser
130 135 140

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人

<400> 18
caaccacctg cagggtgacg 20

<210> 19
<211> 78
<212> DNA
<213> 人

<400> 19
aacggtcgac aaatgtatgt ggcactgaac ggtaaaggtg ctccacgtcg tggtcagaaa 60

acccgtcgta aaaacacc 78

<210> 20
<211> 76
<212> DNA
<213> 人

<400> 20
gggcccaagc ttaagagtgt accaccattg gcagaaagtg agcagaggtg tttttacgac 60

gggttttctg accacg 76

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> 人

<400> 21
gccacataca tttgtcgacc gtt 23

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> 人

<400> 22
gggcccaagc ttaagagtg 19

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> 人

<400> 23
gccacataca tttgtcgacc gtt 23

<210> 24
<211> 90
<212> DNA
<213> 人

<400> 24
ctgcagggtg acgttcgttg gcgtaaactg ttctccttca ccaaatactt cctgaaaatc 60

gaaaaaaacg gtaaagtttc tggtaccaag 90

<210> 25
<211> 90
<212> DNA
<213> 人

<400> 25
agctttaaca gcaacaacac cgatttcaac ggaggtgatt tccaggatgg agtacgggca 60

gttttctttc ttggtaccag aaactttacc 90

<210> 26
<211> 90
<212> DNA
<213> 人

<400> 26
ggtgttgttg ctgttaaagc tatcaactcc aactactacc tggctatgaa caagaaaggt 60

aaactgtacg gttccaaaga atttaacaac 90

<210> 27
<211> 100
<212> DNA
<213> 人

<400> 27
gtcgaccgtt gtgctgccag ttgaaggaag cgtaggtgtt gtaaccgttt tcttcgatac 60

gttctttcag tttacagtcg ttgttaaatt ctttggaacc 100

<210> 28
<211> 25
<212> DNA
<213> 人

<400> 28

gcggcgtcga ccgttgtgct gccag 25

<210> 29
<211> 26
<212> DNA
<213> 人

<400> 29
gcggcctgca gggtgacgtt cgttgg 26

<210> 30
<211> 36
<212> DNA
<213> 人

<400> 30
ccggcggatc ccatatgtct tacaaccacc tgcagg 36

<210> 31
<211> 34
<212> DNA
<213> 人

<400> 31
cgcgcgatat cttattaaga gtgtaccacc attg 34

<210> 32
<211> 426
<212> DNA
<213> 人

<400> 32
atgtcttaca accacctgca gggtgacgtt cgttggcgta aactgttctc cttcaccaaa 60

tacttcctga aaatcgaaaa aaacggtaaa gtttctggta ccaagaaaga aaactgcccg 120

tactccatcc tggaaatcac ctccgttgaa atcggtgttg ttgctgttaa agctatcaac 180

tccaactact acctggctat gaacaagaaa ggtaaactgt acggttccaa agaatttaac 240

aacgactgta aactgaaaga acgtatcgaa gaaaacggtt acaacaccta cgcttccttc 300

aactggcagc acaacggtcg acaaatgtat gtggcactga acggtaaagg tgctccacgt 360

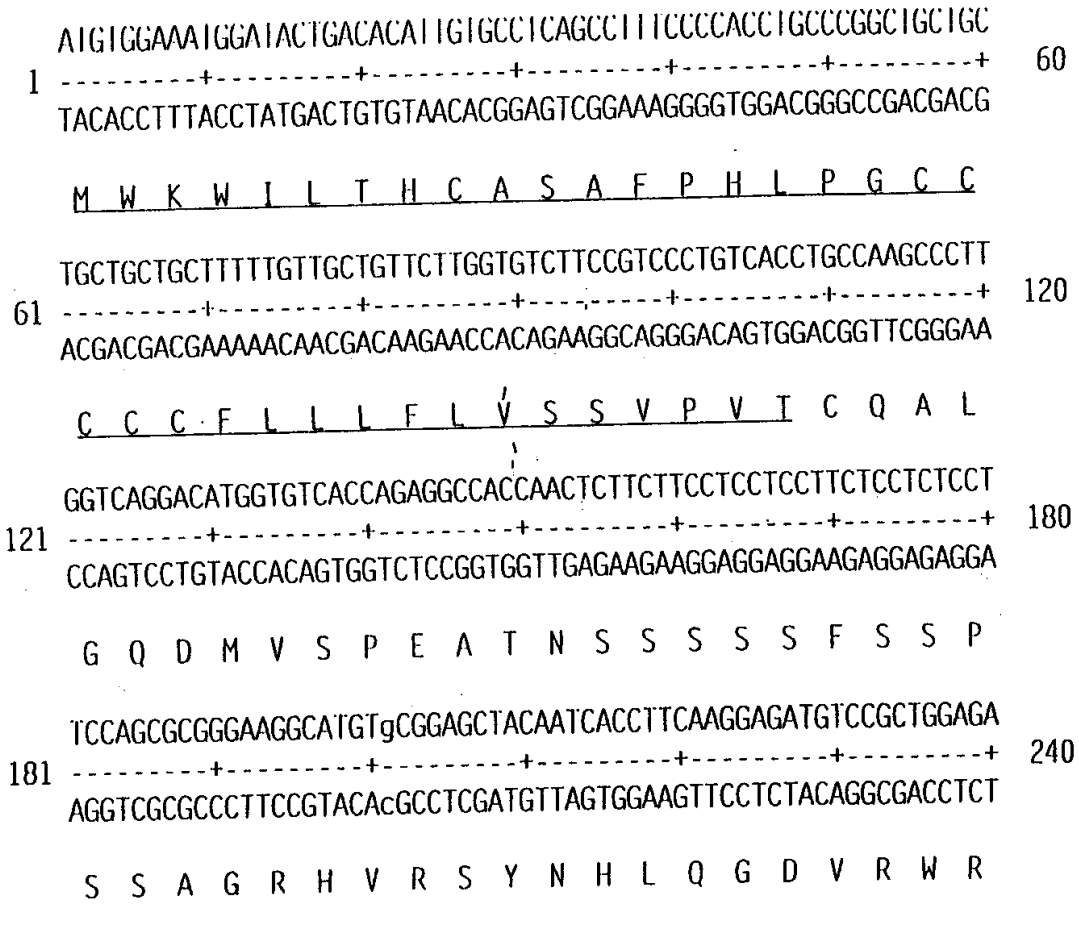
cgtggtcaga aaacccgtcg taaaaacacc tctgctcact ttctgccaat ggtggtacac 420

tcttaa 426

<210> 33
<211> 141
<212> PRT
<213> 人

<400> 33

```
Met Ser Tyr Asn His Leu Gln Gly Asp Val Arg Trp Arg Lys Leu Phe
  1               5                  10                  15

Ser Phe Thr Lys Tyr Phe Leu Lys Ile Glu Lys Asn Gly Lys Val Ser
             20                  25                  30

Gly Thr Lys Lys Glu Asn Cys Pro Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ser
         35                  40                  45

Val Glu Ile Gly Val Val Ala Val Lys Ala Ile Asn Ser Asn Tyr Tyr
     50                  55                  60

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

Asn Asp Cys Lys Leu Lys Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly Tyr Asn Thr
                 85                  90                  95

Tyr Ala Ser Phe Asn Trp Gln His Asn Gly Arg Gln Met Tyr Val Ala
            100                 105                 110

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

Asn Thr Ser Ala His Phe Leu Pro Met Val Val His Ser
    130                 135                 140
```


ATGTGGAAATGGATACTGACACATTGTGCCTCAGCCTTTCCCCACCTGCCCGGCTGCTGC
1
60
TACACCTTTACCTATGACTGTGTAACACGGAGTCGGAAAGGGGTGGACGGGCCGACGACG
M W K W I L T H C A S A F P H L P G C C
TGCTGCTGCTTTTTGTTGCTGTTCTTGGTGTCTTCCGTCCCTGTCACCTGCCAAGCCCTT
61
120
ACGACGACGAAAAACAACGACAAGAACCACAGAAGGCAGGGACAGTGGACGGTTCGGGAA
C C C F L L L F L V S S V P V T C Q A L
GGTCAGGACATGGTGTCACCAGAGGCCACCAACTCTTCTTCCTCCTCCTTCTCCTCTCCT
121
180
CCAGTCCTGTACCACAGTGGTCTCCGGTGGTTGAGAAGAAGGAGGAGGAAGAGGAGAGGA
G Q D M V S P E A T N S S S S S F S S P
TCCAGCGCGGGAAGGCATGTgCGGAGCTACAATCACCTTCAAGGAGATGTCCGCTGGAGA
181
240
AGGTCGCGCCCTTCCGTACAcGCCTCGATGTTAGTGGAAGTTCCTCTACAGGCGACCTCT
S S A G R H V R S Y N H L Q G D V R W R

下转图 1B

图 1A

上接图 1A

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

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

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

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

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

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

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

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

下转图 1C

图 1B

上接图 1B

```
                TACAATACCTATGCATCATTTAACTGGCAGCATAATGGGAGGCAAATGTATGTGGCATTG
                +---------+---------+---------+---------+---------+---------+
481             ATGTTATGGATACGTAGTAAATTGACCGTCGTATTACCCTCCGTTTACATACACCGTAAC
                 Y  N  T  Y  A  S  F  N  W  Q  H  N  G  R  Q  M  Y  V  A  L

                AATGGAAAAGGAGCTCCAAGGAGAGGACAGAAAACACGAAGGAAAAACACCTCTGCTCAC
                +---------+---------+---------+---------+---------+---------+
541             TTACCTTTTCCTCGAGGTTCCTCTCCTGTCTTTTGTGCTTCCTTTTTGTGGAGACGAGTG
                 N  G  K  G  A  P  R  R  G  Q  K  T  R  R  K  N  T  S  A  H

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

FIG.1C

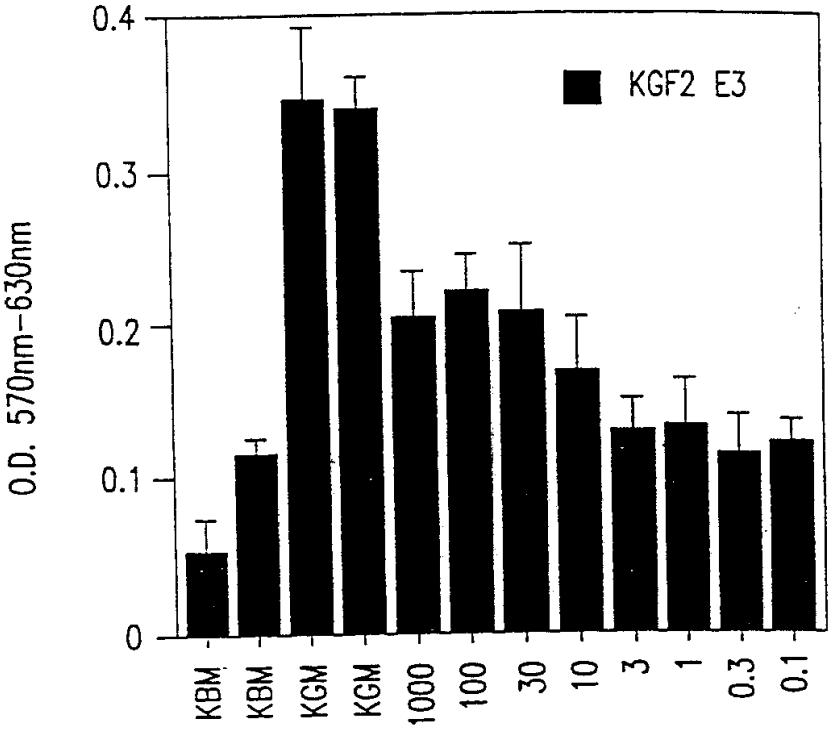

0.4
0.3
0.2
0.1
0
O.D. 570nm-630nm
KGF2 E3
KBM
KBM
KGM
KGM
1000
100
30
10
3
1
0.3
0.1
浓度（ng/ml）

图 2A

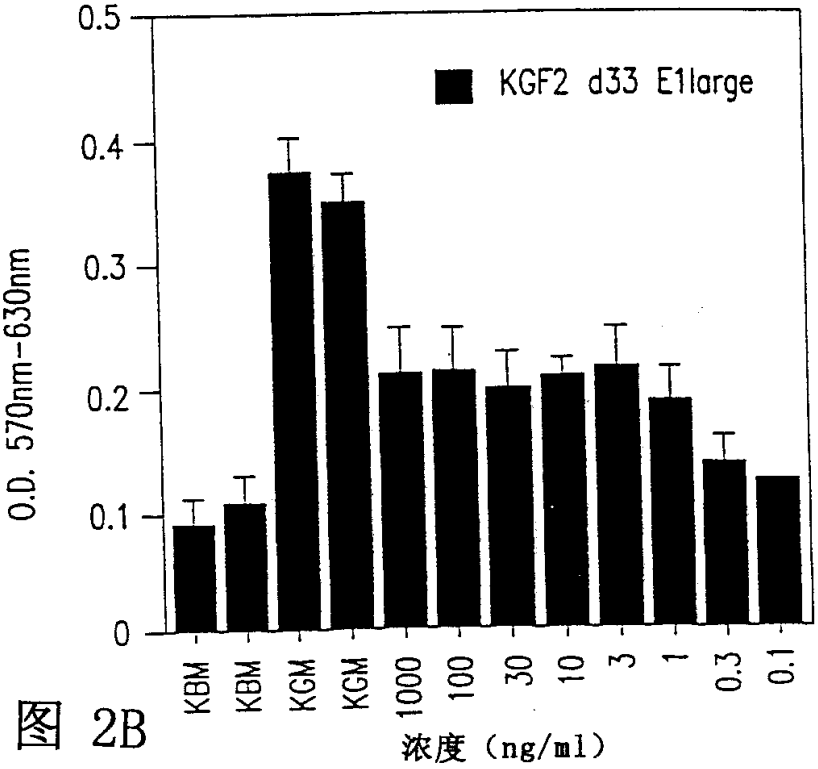

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
O.D. 570nm-630nm
KGF2 d33 E1large
KBM
KBM
KGM
KGM
1000
100
30
10
3
1
0.3
0.1
浓度（ng/ml）

图 2B

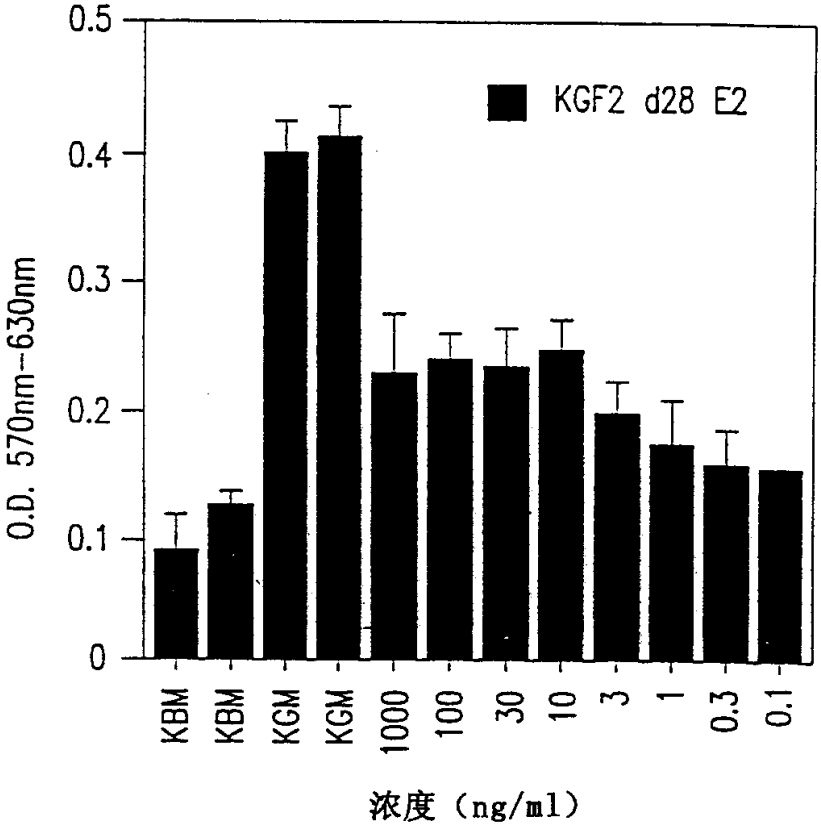

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
O.D. 570nm-630nm
KGF2 d28 E2
KBM
KBM
KGM
KGM
1000
100
30
10
3
1
0.3
0.1
浓度（ng/ml）

图 2C

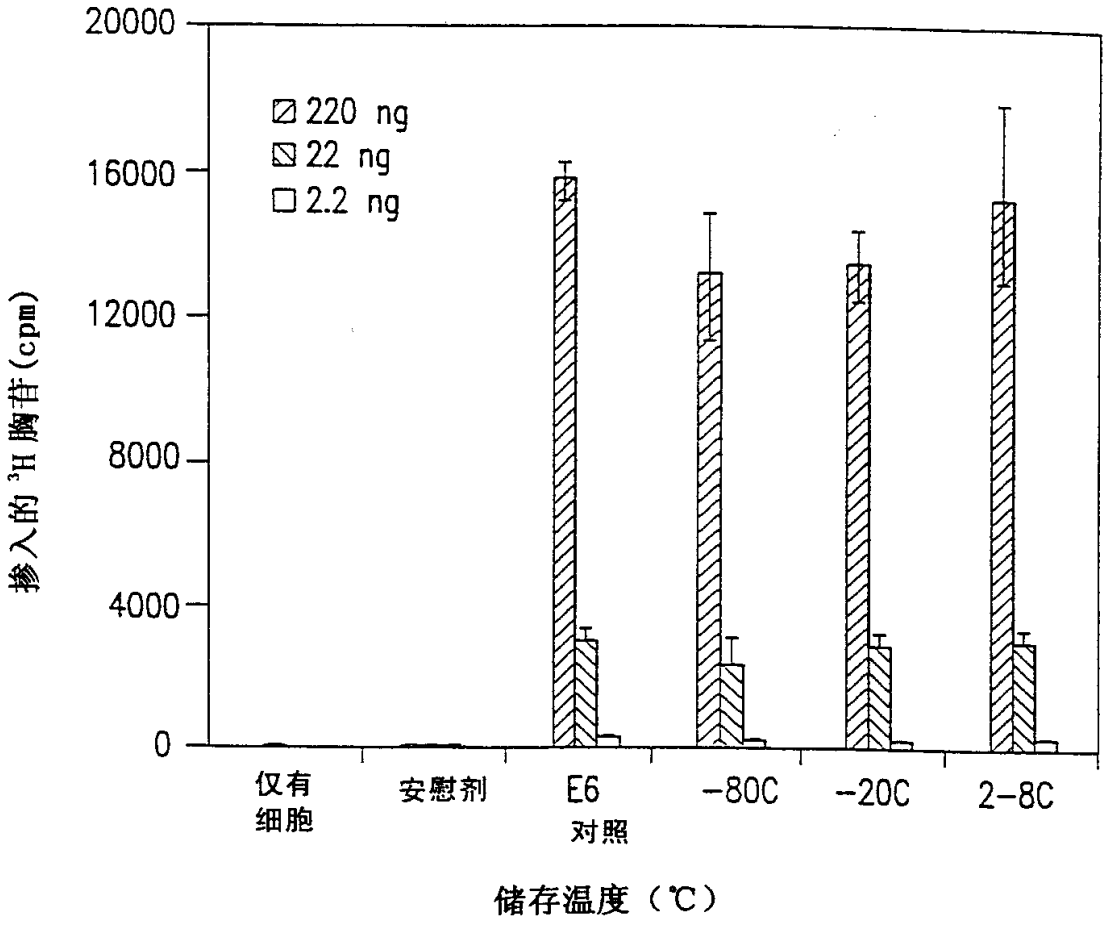

20000
16000
12000
8000
4000
0
220 ng
22 ng
2.2 ng
掺入的 ³H 胸苷(cpm)
仅有细胞
安慰剂
E6
对照
-80C
-20C
2-8C
储存温度（℃）

图 3

00.07.26

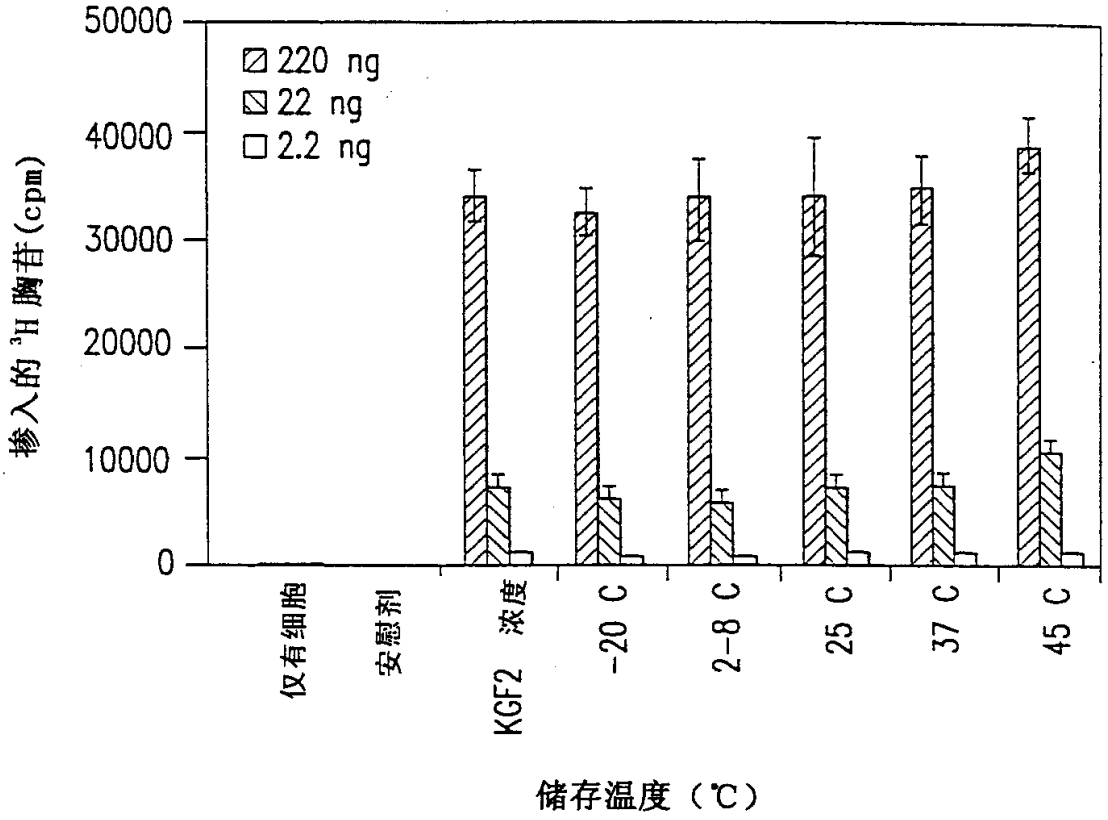

50000
40000
30000
20000
10000
0
220 ng
22 ng
2.2 ng
掺入的 ³H 胸苷(cpm)
仅有细胞
安慰剂
KGF2 浓度
-20 C
2-8 C
25 C
37 C
45 C
储存温度（℃）

图 4

00.07.26

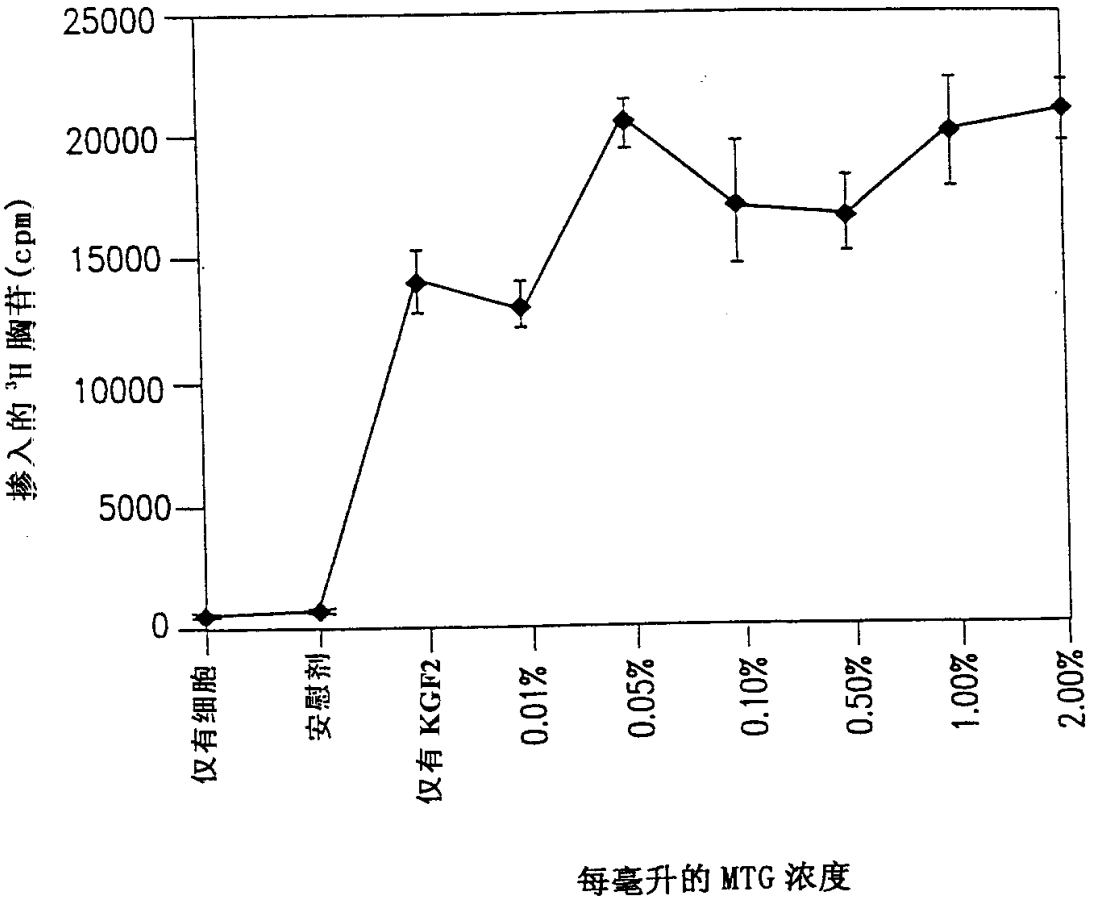

25000
20000
15000
10000
5000
0
掺入的 ^{3}H 胸苷(cpm)
仅有细胞
安慰剂
仅有 KGF2
0.01%
0.05%
0.10%
0.50%
1.00%
2.00%
每毫升的 MTG 浓度

图 5