(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103757026 A
(43)申请公布日 2014.04.30

(21)申请号 201310714120.3

(22)申请日 2013.12.20

(71)申请人 广州圣露生物技术有限公司
地址 510005 广东省广州市国际生物岛螺旋四路1号办公区四楼401单元

(72)发明人 汪炬 王宜

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224
代理人 万志香 郭元杰

(51)Int.Cl.
C12N 15/12(2006.01)
C07K 14/71(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12N 15/866(2006.01)
C12N 15/81(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 47/48(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 17/04(2006.01)
A61P 17/06(2006.01)
A61P 17/08(2006.01)
A61P 17/10(2006.01)
A61P 17/14(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页
序列表10页 附图3页

(54)发明名称

FGFR2b胞外段的基因序列、多肽及其应用

(57)摘要

本发明提供野生型、S252W突变型和P253R突变型FGFR2b胞外段的基因序列和其分别编码的多肽，所述多肽的制备体系，包括重组载体、宿主细胞以及制备方法，FGFR2b胞外段的抗体及其制备方法、以及FGFR2b胞外段与Fc段的融合多肽、拮抗剂等。本发明还提供FGFR2b胞外段多肽及组合物在治疗湿疹、粉刺、银屑病、皮肤过敏、脂溢性皮炎或脂溢性脱发的应用，通过FGFR2b胞外段对FGF信号通路进行抑制，并抑制炎性皮肤病的红肿，瘙痒等的症状，对皮脂的分泌也有抑制作用。

CN 103757026 A

1. 一种编码人体 FGFR2b 胞外段的核酸序列，其具有：

a）SEQ ID NO：1 所述的碱基序列；或

b）与 SEQ ID NO：1 的互补配对序列；或

c）与 a 或 b 的核苷酸序列编码相同序列的蛋白质，但因遗传密码的简并性而与 a 或 b 的核苷酸序列不同的序列；或

d）与 a）所述序列或 b）或 c）所述序列至少有 80% 同源性的序列。

2. 由权利要求 1 所述核苷酸序列编码的人体 FGFR2b 胞外段多肽，其具有 SEQ ID NO：2 所述的氨基酸序列；或具有与 SEQ ID NO：2 所述的氨基酸序列至少有 80% 同源性的序列。

3. 一种编码人体 FGFR2b 胞外段的核酸序列，其具有：

a）SEQ ID NO：3 所述的碱基序列；或

b）与 SEQ ID NO：3 的互补配对序列；或

c）与 a 或 b 的核苷酸序列编码相同序列的蛋白质，但因遗传密码的简并性而与 a 或 b 的核苷酸序列不同的序列；或

d）与 a）所述序列或 b）或 c）所述序列至少有 80% 同源性的序列。

4. 由权利要求 3 所述核苷酸序列编码的 S252W 突变型人体 FGFR2b 胞外段多肽，其具有 SEQ ID NO：4 所述的氨基酸序列；或具有与 SEQ ID NO：4 所述的氨基酸序列至少有 80% 同源性的序列。

5. 一种编码人体 FGFR2b 胞外段的核酸序列，其具有：

a）SEQ ID NO：5 所述的碱基序列；或

b）与 SEQ ID NO：5 的互补配对序列；或

c）与 a 或 b 的核苷酸序列编码相同序列的蛋白质，但因遗传密码的简并性而与 a 或 b 的核苷酸序列不同的序列；或

d）与 a）所述序列或 b）或 c）所述序列至少有 80% 同源性的序列。

6. 由权利要求 5 所述的核苷酸序列编码的 P253R 突变型人体 FGFR2b 胞外段的多肽，其具有序列表中 SEQ ID NO：6 所述的氨基酸序列；或具有与 SEQ ID NO：6 所述的氨基酸序列至少有 80% 同源性的序列。

7. 一种含有权利要求 1、3、5 中任一项所述核酸序列的载体。

8. 一种含有权利要求 7 所述载体的宿主细胞。

9. 根据权利要求 8 中所述的宿主细胞，其特征在于所述宿主细胞是 CHO 细胞、大肠杆菌、昆虫细胞、酵母细胞中的任一种。

10. 一种含有根据权利要求 2、4、6 中任一项所述人体 FGFR2b 胞外段多肽的人体 FGFR2b-Fc 段融合蛋白。

11. 权利要求 1、3、5 任一项所述的核酸序列、权利要求 2、4、6 任一项所述多肽用于制备治疗湿疹、粉刺、银屑病、皮肤过敏、脂溢性皮炎或脂溢性脱发的药物中的应用。

12. 权利要求 8 所述的载体、权利要求 9 所述的宿主细胞、或权利要求 10 所述的人体 FGFR2b-Fc 段融合蛋白在制备治疗湿疹、粉刺、银屑病、皮肤过敏、脂溢性皮炎或脂溢性脱发的药物中的应用。

13. 一种治疗湿疹、粉刺、银屑病、皮肤过敏、脂溢性皮炎或脂溢性脱发的药物，其特征在于，其活性成分包括权利要求 1、3、5 任一项所述的核酸序列，或权利要求 2、4、6 任一项所

述多肽，或权利要求 8 所述的载体、权利要求 9 所述的宿主细胞、权利要求 10 所述的人体 FGFR2b-Fc 段融合蛋白。

14. 根据权利要求 13 所述的药物，其特征在于，还包括有 FGFR2b 拮抗剂，所述 FGFR2b 拮抗剂是 FGF7 抗体、FGF10 抗体、FGFR2b 抗体、AZD4547、AP24534、BGJ398、PD173074、NP603、su5402、su6668、PD161570、PD166866、iRNA、microRNA、反义 RNA、spry，MKP3，DUSP，SEF，XFLRT3 中的一种或一种以上。

15. FGF7 抗体、FGF10 抗体、FGFR2b 抗体、AZD4547、AP24534、BGJ398、PD173074、NP603、su5402、su6668、PD161570、PD166866、iRNA、microRNA、反义 RNA、spry，MKP3，DUSP，SEF，XFLRT3 中的一种或一种以上在制备治疗湿疹、粉刺、银屑病、皮肤过敏、脂溢性皮炎或脂溢性脱发的药物中的应用。

FGFR2b 胞外段的基因序列、多肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域，特别是涉及 FGFR2b 胞外段的基因序列和多肽及其应用。

背景技术

[0002] 炎性皮肤病是指皮肤红肿、出现丘疹、脓疱等，角质细胞增生而突起，有时伴有瘙痒，给病人带来很大的困扰。湿疹是一种常见的由多种内外因素引起的表皮及真皮浅层的炎症性皮肤病，一般认为与变态反应有一定关系(即过敏反应)。痤疮是一种累及毛囊皮脂腺的慢性炎症性皮肤病，好发于青春期俗称“青春痘”。痤疮多发生在面部和胸背等皮脂溢出部位，国外研究表明，12-24 岁的青少年痤疮发病率高达 85%。近年来，国内外的学者纷纷研制出治疗炎性皮肤病的药物，包括中药和西药。目前临床上的常用药物主要有甾醇激素类、抗组胺类、抗表皮异常角化类如维甲酸，副作用大，不能根治。

[0003] 角质形成细胞是人体最外层细胞，保护机体免受外界损害。在病理状态下，角质形成细胞产生特异的免疫活性产物，释放前炎性细胞因子，在炎性皮肤病中起着关键性作用。间质细胞与上皮细胞相互作用时激活 EGF、FGF、IGF 等信号通路，最终导致炎症的发生，但目前具体的机制还不是很清楚。

发明内容

[0004] 基于此，本发明的目的在于提供治疗炎性皮肤病的 FGFR2b 胞外段的基因序列和多肽及其应用。

[0005] 本发明采用如下技术方案：

[0006] 本发明提供一种编码野生型人体 FGFR2b 胞外段的核苷酸序列，其具有：

[0007] a）SEQ ID NO：1 所述的碱基序列；或

[0008] b）与 SEQ ID NO：1 的互补配对序列；或

[0009] c）与 a 或 b 的核苷酸序列编码相同序列的蛋白质，但因遗传密码的简并性而与 a 或 b 的核苷酸序列不同的序列；或

[0010] d）与 a）所述序列或 b）或 c）所述序列至少有 80% 同源性的序列。

[0011] 本发明还提供一种由上述核苷酸序列（SEQ ID NO：1）编码的人体 FGFR2b 胞外段的多肽，其具有 SEQ ID NO：2 所述的氨基酸序列，或具有与 SEQ ID NO：2 所述的氨基酸序列至少有 80% 同源性的序列。

[0012] 本发明还提供另一种编码人体 FGFR2b 胞外段的核苷酸序列，其具有：

[0013] a）SEQ ID NO：3 所述的碱基序列；或

[0014] b）与 SEQ ID NO：3 的互补配对序列；或

[0015] c）与 a 或 b 的核苷酸序列编码相同序列的蛋白质，但因遗传密码的简并性而与 a 或 b 的核苷酸序列不同的序列；或

[0016] d）与 a）所述序列或 b）或 c）所述序列至少有 80% 同源性的序列。

[0017] 本发明还提供由上述核苷酸序列(SEQ ID NO:3)编码的S252W突变型人体FGFR2b胞外段的多肽,其具有序列表中SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列,或具有与SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列至少有80%同源性的序列。

[0018] 本发明还提供另一种编码人体FGFR2b胞外段的核苷酸序列,其具有:

[0019] a)SEQ ID NO:5所述的碱基序列;或

[0020] b)与SEQ ID NO:5的互补配对序列;或

[0021] c)与a或b的核苷酸序列编码相同序列的蛋白质,但因遗传密码的简并性而与a或b的核苷酸序列不同的序列;或

[0022] d)与a)所述序列或b)或c)所述序列至少有80%同源性的序列。

[0023] 本发明还提供一种由上述核苷酸序列(SEQ ID NO:5)编码的P253R突变型人体FGFR2b胞外段的多肽,其具有序列表中SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列,或具有与SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列至少有80%同源性的序列。

[0024] 本发明还提供一种含有前述任一种核苷酸序列的载体。

[0025] 本发明还提供一种含有上述载体的宿主细胞。

[0026] 优选地,上述宿主细胞可以是CHO细胞、大肠杆菌、昆虫细胞、酵母细胞中的任一种。

[0027] 本发明还提供一种含有前述任一种人体FGFR2b胞外段多肽的人体FGFR2b-Fc段融合蛋白。

[0028] 优选地,上述嵌合分子含有与免疫球蛋白表位标记序列或Fc区融合的人体FGFR2b胞外段多肽。

[0029] 本发明还提供上述FGFR2b胞外段的基因序列和多肽等的应用。

[0030] 具体技术方案如下。

[0031] 上述的任一种核酸序列、上述多肽中任一项用于制备治疗湿疹、粉刺、银屑病、皮肤过敏、脂溢性皮炎或脂溢性脱发的药物中的应用。

[0032] 上述载体、上述宿主细胞、上述人体FGFR2b-Fc段融合蛋白在制备治疗湿疹、粉刺、银屑病、皮肤过敏、脂溢性皮炎或脂溢性脱发的药物中的应用。

[0033] 一种治疗湿疹、粉刺、银屑病、皮肤过敏、脂溢性皮炎或脂溢性脱发的药物,其活性成分包括上述任一项核酸序列,上述任一项多肽,或上述的载体、或上述宿主细胞、上述人体FGFR2b-Fc段融合蛋白。

[0034] 在其中一个实施例中,还包括有FGFR2b拮抗剂,所述FGFR2b拮抗剂是FGF7抗体、FGF10抗体、FGFR2b抗体、AZD4547、AP24534、BGJ398、PD173074、NP603、su5402、su6668、PD161570、PD166866、iRNA、microRNA、反义RNA、spry,MKP3,DUSP,SEF,XFLRT3中的一种或一种以上。

[0035] 本发明的有益效果,在于利用FGFR2b胞外段多肽或其药用组合物阻断如EGF/FGF/VEGF/IGF等生长因子信号通路,阻止其激活,从而抑制炎症的发生。具体来说,本发明抑制炎性皮肤病的红肿,瘙痒等症状,对皮脂的分泌也有抑制作用,有助于改善包括湿疹、过敏性皮炎、皮肤过敏、脂溢性皮炎、痤疮等问题皮肤的治疗修复。

附图说明

[0036] 图 1 为实施例 1 中野生型、S252W 突变型、P253R 突变型 FGFR2b 胞外段的 SDS-PAGE 图。

[0037] 图 2 为实施例 1 中野生型、S252W 突变型、P253R 突变型 FGFR2b 胞外段的 western blotting 鉴定图。

[0038] 图 3 为实施例 8 中 FGF7 抗体、FGFR 胞外段各组小鼠第 3、4 次激发后左耳结痂数。

[0039] 图 4 为实施例 8 中 FGF7 抗体、FGFR 胞外段各组小鼠各激发时期耳部结痂厚度比较。

具体实施方式

[0040] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容，特举以下实施例结合附图详细说明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (NewYork:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂，均为市售产品。

[0041] 实施例 1 野生型及突变型 FGFR2b 胞外段多肽基因在大肠杆菌中的表达

[0042] 本实施例描述野生型和突变型 FGFR2b 胞外段基因（SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5）的制备方法，以及通过其在大肠杆菌（E.coli）中的表达来制备 FGFR2b 胞外段多肽（SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6）的方法。

[0043] 一、FGFR2b 胞外段多肽基因的制备：

[0044] 1、用 Trizol 法从人胎盘组织提取野生型 FGFR2b 胞外段总 mRNA，并建立 cDNA 文库；

[0045] （1）以 Trizol 法抽提 mRNA：

[0046] 细胞培养到汇合度达 90% 时，加入 Trizol 溶液以对细胞进行裂解；把所得细胞裂解液转移至 EP 管中，加入 1/5 体积的氯仿，吸取上层无色水相至新的 EP 管中，加入 1/2Trizol 体积的异丙醇；

[0047] 离心，在 EP 管底部可见白色乳胶状沉淀，再加入 75% 乙醇，洗涤沉淀；

[0048] 凉干后，加入去 RNA 酶水，用移液枪反复吹打混匀，让 RNA 充分溶解，检测 RNA 浓度及纯度。

[0049] （2）以 PCR 反应进行 mRNA 逆转录获得 cDNA：

[0050] 在 PCR 管内加入样品 mRNA，在 PCR 仪上进行 mRNA 预变性，条件为 65℃，10min。预变性后立即插入冰中。

[0051] 逆转录反应体系：总体积为 20μL，并按照以下用量继续添加：

[0052]

[0053]

a、预变性	总 RNA	1μg
	DEPC 水	最多 11.5μL
b、逆转录	Oligo dT	1μL
	10Mm dNTP	2μL
	HRP RNase 抑制剂	0.5μL
	5×RT buffer	4μL
	逆转录酶 Ace	1μL
	总体积：	20μL

[0054] 逆转录 PCR 程序：30℃，10min；42℃，1h；70℃，10min。

[0055] 2、引物的设计：

[0056] 本发明中引物设计均来自于北京六合华大基因科技股份有限公司。

[0057] 野生型引物序列为：SEQ ID NO.7 和 8

[0058] F1：CGCATATGGCACCATACTGGACCAAC;

[0059] R1：ATGGATCCCTATTACAGGATGACTGTTACCAC，包括酶切位点 Nde Ⅰ和 BamHI。

[0060] 为获得 S252W 突变型和 P253R 突变型 FGFR2b 胞外段多肽基因，设计一对定点突变引物，其中：

[0061] S252W 突变型引物序列为：SEQ ID NO.9 和 10。

[0062] F2：TTGT GGAGCG ATGGCCTCACCGGCCCAT；

[0063] R2：ATGGGCCGGT GAGGCCATCGCTCCACAA。

[0064] P253R 突变型引物序列为：SEQ ID NO.11 和 12。

[0065] F2：TTGTGGAGCGATCGCGTCACCGCCCAT;

[0066] R2：ATGGGCGGTGACGCGATCGCTCCACAA

[0067] 3、FGFR2b 胞外段基因序列的扩增：

[0068] 为扩增野生型 FGFR2b 胞外段基因，使用野生型 PCR 引物（SEQ ID No.7 和 8），对编码 FGFR2b 的胞外段的 DNA 序列进行初步扩增。

[0069] 为扩增两种突变型 FGFR2b 胞外段基因，利用重叠延伸 PCR 法，以野生型 FGFR2b 基因为模板，分别使用突变型 PCR 引物，扩增得到含有 S252W 突变的 FGFR2b 胞外段基因和含有 P253R 的突变的 FGFR2b 胞外段基因。

[0070] FGFR2b 胞外段基因序列的扩增体系和反应条件如下（PrimerSTAR max 来自 TaKaRa）：

[0071]

PCR 反应体系：		反应条件：		
PrimerSTAR max	25μL	96 ℃	5min	
上游引物	3μL	94 ℃	15s	31cycle
下游引物	3μL	60℃	15s	
模板	4μL	72 ℃	5s	
ddH20	15μL	72 ℃	10min	
总体积：	50μL			

[0072]

[0073] 4、收集、纯化、鉴定步骤：

[0074] 琼脂糖电泳，切胶回收，回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度和纯度。OD260/OD280 比值应为 1.7-1.9。

[0075] 二、野生型及突变型 FGFR2b 胞外段多肽基因重组载体的构建：

[0076] 1、以双酶切和连接反应构建重组质粒

[0077] 将 PCR 扩增的序列与 pET3c 载体(来自美国 Invitrogen 公司)同时进行 Nde Ⅰ和 BamH Ⅰ的双酶切，酶切反应条件：37℃水浴 4h；

[0078] pET3c 质粒和 FGFR2b 经 Nde Ⅰ和 BamH Ⅰ双酶切后，进行连接，连接反应条件为 16℃水浴 12h。

[0079] 2、重组质粒的表达和鉴定

[0080] $CaCl_2$ 法转化大肠杆菌 DH5α 菌株：

[0081] (1)活化不含任何质粒的 DH5α 菌株，接种 50μL 至 5mlLB 管中，不加任何抗生素 37℃摇床恒温培养 2h 左右，6000rpm，离心 1min 收集 1.5ml 菌体；

[0082] (2)弃上清后，用 800μL 冰浴的 $CaCl_2$ 重悬菌体，6000rpm，离心 1min，弃上清；

[0083] (3)用 50μL 冰浴 $CaCl_2$ 重悬，用移液器轻轻吹打，在壁上细胞吹离；

[0084] (4)取 10μL 连接产物与 50μL 感受态细胞混匀，冰浴 30min；

[0085] (5)混合物在 42℃热激 90s，迅速放到冰上 2-3min；

[0086] (6)加 200μLLB 培养基混匀，37℃震荡培养 45min，摇床转速在 130-150rpm 之间。

[0087] 重组质粒的双酶切鉴定：

[0088] 用接种环多次挑取单菌落分别至于含 0.1%Amp 的 5mlLB 培养基中，并做好标记，37℃摇床震荡培养 12h，抽提质粒(按照 OMEGA 质粒小提试剂盒操作方法)，进行双酶切鉴定(方法同实施例 1)，选取双酶切鉴定成功的单克隆送生工生物公司测序，获得测序正确的 pET3c-FGFR2b、pET3c-S252W-FGFR2b、pET3c-P253R-FGFR2b 三种重组质粒。

[0089] 三、FGFR2b 胞外段多肽基因在大肠杆菌中的表达：

[0090] (1)按照上述 $CaCl_2$ 法转化大肠杆菌 DH5α 菌株的方法，同理将上述三种重组质粒

分别转入到 BL21（+）工程菌种中，获得表达菌株；

[0091] （2）按 1：50 的接种比例将 BL21+ 工程菌接种到含有 0.1%Amp 的灭菌的 LB 液体培养基中，37℃摇床培养（200rpm）；

[0092] 当菌体 OD600 达到 0.6 ～ 0.8 时，设对照组和诱导组：

[0093] 诱导组加 0.84M 的 IPTG 至终浓度为 0.84mM，37℃诱导表达 3h；

[0094] 对照组不做任何处理；

[0095] 以 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白表达情况（参见图 1）。

[0096] 四、FGFR2b 胞外段多肽的收集与纯化：

[0097] （1）培养细胞 5 小时后，离心收获细胞；

[0098] （2）按 1：8-1：10 的菌体质量与破碎缓冲液的比例，超声破碎菌体，破碎缓冲液为：0.15MNaCl、25mMPB、2mMEDTA，pH=7.5；

[0099] （3）使用肝素亲和层析柱（GE17-0998-0150ml）在允许紧密结合蛋白的条件下纯化已溶解的 FGFR2b 的胞外段蛋白，收集洗脱峰；

[0100] 亲和层析平衡液：25mM HEPES，0.15M NaCl，pH=7.5；

[0101] 肝素洗脱液：25mM HEPES，1.5M NaCl，pH=7.5；流速为 5ml/min。

[0102] （4）在一些原核表达的菌中，FGFR2b 的胞外段蛋白以包涵体形式表达，则通过包涵体清洗以及变复性技术来获得活性形式的 FGFR2b 的胞外段蛋白（具体方法可参考专利 ZL200710029286.6）。

[0103] 所得蛋白经测序确定为序列正确的如 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6 所示的 FGFR2b 的胞外段蛋白。

[0104] 实施例 2 FGFR2b 的胞外段在哺乳动物细胞中表达

[0105] 该实施例描述通过在哺乳动物细胞中的重组表达野生型和突变型 FGFR2b 胞外段基因（SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5）制备潜在糖基化形式的 FGFR2b 的胞外段多肽的方法。

[0106] 1、引物设计：SEQ ID NO.13 和 14

[0107] 上游引物：ATATGGATCC GCCGCCACC ATG GCACCATACTGGACCAAC；

[0108] 下游引物：GCGCAAGCTT TCATTA CAGGATGACTGTTACCAC 包括酶切位点 BamH Ⅰ，Hind Ⅲ。

[0109] 2、载体构建：

[0110] 载体 pCDNA3.1（-）（购买于美国 Invitrogen 公司）作为表达载体；

[0111] 将 FGFR2b（SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5）分别连接到 pCDNA3.1（方法同实施例 1），由此产生的载体称为 pCDNA3.1-FGFR2b。

[0112] 3、pCDNA3.1-FGFR2b 转染 293 细胞

[0113] （1）按照去内毒素质粒小提试剂盒的方法（购买于 OMEGA 公司）抽提 pCDNA3.1-FGFR2b 质粒；

[0114] （2）选用人 293 细胞（ATCC CCL1573）为宿主细胞，以添加了胎牛血清和任选的营养成分和 / 或抗生素的 DMEM 培养基，37℃、5%C02 饱和湿度培养箱培养令细胞生长至融合；

[0115] （3）转染 24h 前，用 0.25% 胰酶消化对数期生长的 293 细胞，用无双抗的 DMEM 培养基吹打细胞成悬液，铺于六孔板中，每孔 2×105 个，使其在转染时完全贴壁，且细胞密度达

到 50%-60%；

[0116] 用 LipofectamineTM2000 脂质体转染试剂盒(购买于美国 Invirtogen 公司)进行转染,具体转染步骤如下：

[0117] LipofectamineTM2000 的稀释：按六孔板每孔 5μL LipofectamineTM2000 加到 250μL opti-MEM 培养基的比例稀释,静置 5min；

[0118] 待转染质粒的稀释：按六孔板每孔 4μg 待转染质粒加到 250μL opti-MEM 培养基的比例稀释；

[0119] 等体积混合以上两种稀释液,静置 20min,每孔加 500μL 混合液,每孔 1.5ml 补加 opti-MEM 培养基；37℃,5%C02 的培养箱培养 4-6h 后换成 10%FBS DMEM 培养基；转染 24h 后,小心吸去旧的培养基,换上新鲜的 DMEM 完全培养基,继续培养。

[0120] 4、FGFR2b 胞外段蛋白质的纯化与鉴定：

[0121] 蛋白质的纯化与实施例 1 类似,并通过 Western Blot 进行鉴定为正确序列。见图 2。

[0122] 实施例 3 FGFR2b 胞外段在 CHO 细胞中表达

[0123] 本实施例描述野生型和突变型 FGFR2b 胞外段基因(SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5)在 CHO 细胞中的表达来制备 FGFR2b 胞外段多肽(SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6)的方法,所用基因序列的制备请见实施例 1。

[0124] 1. 引物设计：

[0125] 上游引物：ATAT GGATCC GCCGCCACC ATG GCACCATACTGGACCAAC；

[0126] 下游引物：GCGCGAATTC TCATTA CAGGATGACTGTTACCAC 包括酶切位点 BamH Ⅰ, EcoRI。

[0127] 2、载体构建：

[0128] 载体 pIRESneo3 (购自 Clontech 公司)作为表达载体；

[0129] 将 FGFR2b (SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5)分别连接到 pIRESneo3 (方法同实施例 1),由此产生的三种载体都称为 pIRESneo3-FGFR2b。

[0130] 3、pIRESneo3-FGFR2b 转染 CHO-DG44 细胞

[0131] (1)用无内毒素质粒大提试剂盒抽提质粒 pIRESneo3-FGFR2b；

[0132] (2)分别用 pIRESneo3-FGFR2b 质粒转染 CHO-DG44 细胞,经嘌呤霉素高压筛选后得到稳定克隆的重组 CHO 细胞；

[0133] (3)取重组 CHO 细胞,按 5×105 个 /ml 接种于含 4mmol/L 谷氨酰胺、0.68mg/L 次黄嘌呤、0.194mg/L 胸腺嘧啶的 proCHO5 培养基中,用 5L 的摇瓶培养 1.5L 体积,在转速为 110r/min37℃培养 72h 后,转至 31℃继续培养 216h;

[0134] (4)收获 1.5L 培养体积下细胞培养液上清,取 500ml 经 0.45um 滤膜过滤,使用肝素亲和层析柱纯化目的蛋白。

[0135] 实施例 4 FGFR2b 胞外段多肽在酵母细胞中表达

[0136] 本实施例描述野生型和突变型 FGFR2b 胞外段基因(SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5)的制备方法,以及通过其在酵母细胞中的表达来制备 FGFR2b 胞外段多肽(SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6)的方法,所用基因序列的制备请见实施例 1。

[0137] 1、载体的构建：

[0138] 采用 PCR 方法，设计引物从 cDNA 文库中扩增出 FGFR2b 人胞外段基因片段；

[0139] 将产物分离纯化后经 EcoR Ⅰ和 Xba Ⅰ酶切，并将其插入到毕赤酵母表达载体 pPICZαA 中，以得到重组的酵母表达载体 pPICZαA/FGFR2b；同时，插入编码 ADH2/GAPDH 启动子的 DNA，以使 FGFR2b 的胞外段分泌表达。

[0140] 2、酵母细胞的转化：

[0141] （1）用上述表达质粒转化酵母细胞如酵母株 AB110；

[0142] （2）在选择的发酵培养基中培养；

[0143] （3）通过用 10% 三氯醋酸沉淀和用 SDS-PAGE 分离，接着用考马斯蓝染色凝胶，可以检测转化酵母的上清液。

[0144] 3、FGFR2b 的胞外段蛋白质的纯化与鉴定

[0145] （1）经离心而从发酵培养基中除去酵母细胞；

[0146] （2）使用 8000KD 的柱式超滤器浓缩培养基，分离和纯化重组 FGFR2b 的胞外段；

[0147] （3）使用肝素柱亲和层析（同实施例 1），进一步纯化含 FGFR2b 的胞外段的浓缩物。

[0148] 所得蛋白经测序确定为序列正确的如 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6 所示的 FGFR2b 的胞外段蛋白。

[0149] 实施例 5 FGFR2b 胞外段在杆状病毒及感染的昆虫细胞中的表达

[0150] 本实施例描述野生型和突变型 FGFR2b 胞外段基因（SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5）的制备方法，以及通过其在杆状病毒．感染的昆虫细胞中的表达来制备 FGFR2b 胞外段多肽（SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6）的方法。

[0151] （一）载体的构建：

[0152] （1）按照前文的方法获得载体 pFastBac-FGFR2b；

[0153] （2）转化 DH10Bac 大肠杆菌感受态：

[0154] 感受态 DH10Bac 从 -80℃中取出后放到冰上溶解；

[0155] 取 5μL 的 pFastBac-FGFR2b 质粒无菌条件下加到感受态中，冰上放置 30min，42℃热激 45s，热激后立刻放到冰上，静置 2 分钟；

[0156] 加 0.9ml 室温的 S.O.C. 培养基（Cat.No.15544-034），225rmp（37℃）震荡 45min；

[0157] 用 S.O.C. 培养基按照 1：10 比例稀释培养物，取 100μL 稀释液涂到含有 50μg/ml 卡纳（kanamycin）、10μg/ml 四环素（tetracycline）、7μg/ml 庆大霉素（gentamicin）、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上，将涂好的平板放到 37℃培养 24h；

[0158] 次日，挑取白斑小摇，菌液进行 PCR 鉴定；

[0159] 将鉴定正确的菌液接种到 5ml 培养基中，37℃培养过夜；

[0160] 提取阳性杆粒。利用 Bac-to-bac HT Vectorkit（购自 invitrogen 公司，cat.1058-027）试剂盒抽提重组质粒 DNA，琼脂糖电泳检测转化结果。

[0161] （二）重组杆状病毒的转染：

[0162] 阳性杆粒提出后，使用分光光度计测其浓度，并且按照每次 1μg 的用量计算转染所需体积，使用 Cellfectin II Reagent（invitrogen）进行转染：

[0163] （1）准备一瓶细胞密度在 1.5-2.5×10^6cells/mL 之间的 sf9 细胞，95% 以上具有细胞活性，且培养基中不含抗生素；

[0164] 在六孔板中每孔加入 2mL Grace's 基础培养基（不能加入抗生素），从备好的 sf9

细胞中取出 $8X10^5$ 个接种到其中，室温静置 15 分使细胞贴壁；

[0165] （2）用 100μL Grace's 基础培养基稀释 8μL CellfectinII Reagent（使用前上下颠倒 10 次），轻轻混匀，室温静置 30 分钟；

[0166] 用 100μL Grace's 基础培养基稀释 1μg Bacmid，轻轻混匀；

[0167] （3）将上述稀释的 CellfectinII Reagent 与稀释的 Bacmid 混合（约 210μL），轻轻混匀后室温静置 15-30min。

[0168] （4）将形成的 210μL 转染复合物一滴一滴地加入步骤 1 中的 sf9 细胞中，27℃细胞培养箱中培养 5 小时。

[0169] （5）吸弃上清，换为 2mL 的 Grace's 完全培养基。

[0170] （6）27℃培养 72 小时以上直到出现感染迹象。

[0171] （三）FGFR2b 胞外段蛋白质的纯化：

[0172] 按实施例 1 的方法进行。

[0173] 实施例 6 FGFR2b-Fc 段融合蛋白在大肠杆菌的表达

[0174] 本实施例是 FGFR2b-Fc 段融合蛋白在大肠杆菌的表达的实验示例。

[0175] 1、通过 PCR 和重叠 PCR 扩增获得 FGFR2b 胞外段、Fc 段和 FGFR2b-L-Fc 目的基因；

[0176] （1）引物设计如下：

[0177] FGFR2b-F1：SEQ ID NO.15

[0178] ATATACTAGTGATGACGACGACAAGGCACCATACTGGACCAAC

[0179] FGFR2b-R1：SEQ ID NO.16

[0180] CGACCCACCACCGCCGGAGCCACCGCCACC CAGGATGACTGTTACCAC

[0181] Fc-F2：SEQ ID NO.17

[0182] GGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTCCCAAGAGCTGCGACAAG

[0183] Fc-R2：SEQ ID NO.18

[0184] ATATGAATTCTCATTACTTGCCGGGGGACAGG

[0185] （2）PCR 反应体系和反应条件如下：

[0186]

PCR 反应体系		反应条件		
PrimerSTAR max	25μL	96 ℃	5min	
FGFR2b -F1 / Fc-F2	3μL	94 ℃	15s	31cycle
FGFR2b -R1/ Fc-R2	3μL	60 ℃	15s	
质粒模板	4μL	72 ℃	5s	
ddH20	15μL	72 ℃	10min	
总体积：50μL				

[0187] （3）按照实施例 1 中 PCR 产物切胶回收的方法回收 FGFR2b 和 Fc 段 DNA：

[0188]

重叠 PCR 反应体系：		反应条件：		
PrimerSTAR max	25μL	96 ℃	5min	
FGFR2b 模板	2μL	94 ℃	15s	
Fc 模板	2μL	60 ℃	15s	5cycle
ddH20	15μL	72 ℃	5s	
总体积：44μL		72 ℃	10min	

[0189] （4）上述 5 个循环完成后加 FGFR2b-F1 和 Fc-R2 引物各 3μL，再进行 30 个循环，PCR 产物切胶回收的方法按照实施例 1。

[0190] 2、按照前文所述方法，将 FGFR2b-L-Fc 基因构建到 pET43.1 表达载体，并以双酶切鉴定和测序结果显示成功构建 FGFR2b-L-Fc-pET43.1 重组质粒；

[0191] 3、按照前文所述方法，将上述载体转入大肠杆菌原核表达；

[0192] 4、凝胶层析初分离目的蛋白后肠激酶酶切获得 FGFR2b-L-Fc 单体，肝素亲和层析纯化目的蛋白（FGFR2b-Fc 段融合蛋白）；

[0193] 5、SDS-PAGE 显示，在 110KD 左右有融合蛋白的表达，肝素亲和层析纯化有单一的条带，Western Blot 检测目的蛋白能特异性识别 FGFR。

[0194] 实施例 7 制备结合 FGFR2b 的抗体

[0195] 该实施例描述能够与 FGFR2b 特异结合的单克隆抗体的制备。

[0196] 一、免疫原的制备

[0197] 生产单克隆抗体的技术为本领域技术人员所已知。可以使用的免疫原包括纯化的 FGFR2b、FGFR2b 胞外段、含有 FGFR2b 胞外段的融合蛋白，和在细胞表面表达重组 FGFR2b 的细胞。无需繁琐实验，本领域熟练技术人员就可对免疫原作出选择。

[0198] 二、通过小鼠脾细胞制备单克隆抗体制备

[0199] 1、采用 Balb/c 小鼠，经腹膜内注射 100 微克在完全 Freund’s 佐剂（Sigma）中乳化的 FGFR2b 胞外段免疫原。12 天后，再次用在所选佐剂中乳化的免疫原对免疫后的小鼠进行加强免疫。3 周后增加免疫注射而对小鼠加强免疫。4 周后采用眼眶放血方式定期采集小鼠血清样品，进行 ELISA 分析，以检测抗 -FGFR2b 的抗体。

[0200] 2、已经检测到适宜的抗体滴度后，对抗体“阳性”动物最后一次静脉注射 FGFR2b，3 或 4 天后，处死小鼠，取其脾细胞。然后将脾细胞与所选鼠骨髓瘤细胞系（如 P3X63AgU.1，得自 ATCCCRL1597 号）融合（使用 35% 聚乙二醇）。将融合产生的杂交瘤细胞接种到 96 孔组织培养板上，所述培养板上含有 HAT（次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷）的 RPMI-1640 培养基以抑制非融合细胞、骨髓杂合体和脾细胞杂合体的增殖，37℃二氧化碳培养箱培养。

[0201] 3、根据 ELISA 中的抗 FGFR2b 活性来筛选杂交瘤细胞。筛选能分泌所需抗 FGFR2b 单克隆抗体的“阳性”杂交瘤细胞的测定，是本领域常识。给同系 Balb/c 小鼠腹腔注射阳性杂交瘤细胞，以产生含有抗 -FGFR2b 单克隆抗体的腹水。或者，使杂交瘤细胞在组织培养烧瓶或滚瓶中生长。

[0202] 4、使用硫酸铵沉淀，继之用凝胶排阻层析法，完成对腹水中产生的单克隆抗体的纯化。

[0203] 类似的，我们可以制备 FGF7、FGF10 的抗体。

[0204] 实施例 8 FGF7 抗体及 FGFR2b 胞外段对湿疹的治疗作用

[0205] 本实施例通过小鼠实验描述 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4（S252W 突变型）、SEQ ID NO.6（P253R 突变型）所示的 FGFR2b 胞外段以及 FGF7 抗体对湿疹的治疗作用，实验结果如图 3 和图 4 所示。

[0206] 一、实验步骤

[0207] 1、将清洁级雄性 ICR 小鼠（由中山大学动物实验中心提供）共 70 只，按体重随机分成 7 组：正常组、模型组、FGF7 抗体组、野生型 FGFR2b 胞外段蛋白组、两种突变型 FGFR2b 胞外段蛋白组以及实施例 6 所述的 FGFR2b-Fc 融合蛋白组，每组 10 只；

[0208] 2、除正常组外，将其余小鼠腹部刮毛，以 1%2,4- 二硝基氯苯（DNCB）的乙醇溶液 100μl 涂于腹部致敏，5 天后小鼠左耳廓均匀涂补 0.5% 的 DNCB 乙醇溶液 25μl，每隔三天激发 1 次，共激发 4 次，并分别于每次激发后用螺旋测微器测定小鼠耳肿胀度；

[0209] 3、FGF7 抗体组、野生型 FGFR2b 胞外段蛋白组、S252W 以及 P253R 突变型 FGFR2b 胞外段蛋白组、FGFR2b-Fc 融合蛋白组分别按 25μL/ 只分别涂药于左耳，每日一次，若于激发当日，则在激发前 1h 给药；

[0210] 正常组和模型组给予等体积蒸馏水，连续用药 17d。

[0211] 二、实验结果

[0212] 如图 3 所示，与正常组相比，模型组小鼠左耳结痂数量明显增强。与模型组相比，无论是第三次还是第四次激发 FGF7 抗体组、野生型 FGFR2b 胞外段蛋白组和 S252 及 P253R 两种突变型 FGFR2b 胞外段蛋白组、FGFR2b-Fc 融合蛋白组小鼠左耳结痂数明显减少，并且 S252W 突变型 FGFR2b 效果更好。

[0213] 如图 4 所示，与正常组相比，模型组左耳结痂厚度显著增加。与模型组相比，FGF7 抗体组、野生型 FGFR2b 胞外段蛋白组和 S252 及 P253R 两种突变型 FGFR2b 胞外段蛋白组及 FGFR2b-Fc 融合蛋白组小鼠左耳结痂厚度明显减少，并且 S252W 突变型 FGFR2b 效果更好。

[0214] 实施例 9 FGF7 抗体、野生型、融合蛋白型以及两种突变型 FGFR2b 胞外段对粉刺的治疗作用

[0215] 本实验通过兔子实验描述 FGF7 抗体、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4（S252W 突变型）、SEQ ID NO.6（P253R 突变型）所示的 FGFR2b 胞外段对粉刺的治疗作用，包括其抑制角化作用的实验和抑制皮脂腺斑的实验，所得实验结果如表 1 和表 2 所示。

[0216] 一、FGFR2b 胞外段抑制角化作用的实验：

[0217] 1、实验步骤

[0218] （1）取雄性大耳白兔（体重 2 ～ 3kg，由中山大学动物实验中心提供）42 只，分为正常对照组、生理盐水组、FGF7 抗体组、野生型、实施例 6 所述的 FGFR2b-Fc 融合蛋白以及两种突变型 FGFR2b 胞外段共 7 组，每组 6 只；

[0219] （2）第 1 组 6 只为正常对照组，不涂煤焦油；余下 6 组共 36 只兔，在双耳内侧耳管开口处 2cm×2cm 范围，每天涂 0.5ml 煤焦油 1 次，连续 2 周，形成兔耳实验性角化模型；

[0220] （3）给药阶段：

[0221] 第 2 组为生理盐水组，每日于双耳角化处涂 0.1ml 生理盐水；

[0222] 第 3 组为野生型 FGF7 抗体给药组，每天于双耳角化处分别涂 100μg/ml 的 0.1ml；

[0223] 第 4 组为野生型 FGFR2b 胞外段给药组，每天于双耳角化处分别涂 100μg/ml 的 0.1ml；

[0224] 第 5 组为 S252W 突变型 FGFR2b 胞外段给药组，每天于双耳角化处分别涂 100μg/ml 的 0.1ml；

[0225] 第 6 组为 P253R 突变型 FGFR2b 胞外段给药组，每天于双耳角化处分别涂 100μg/ml 的 0.1ml；

[0226] 第 7 组为实施例 6 所述的 FGFR2b-Fc 段融合蛋白给药组，每天于双耳角化处分别涂 100μg/ml 的 0.1ml。

[0227] 以上各组均每天涂药 2 次，连续 1 周。

[0228] (4) 实验效果测定指标

[0229] 根据其表皮增厚及毛囊口扩张程度和角化物多少将标本的组织病理变化分为 4 级：无粉刺为 0；毛囊漏斗部可见少量致密角化物为 +；毛囊漏斗部可见中等量角化物，并向皮脂腺延伸为 ++；扩张的毛囊内有广泛的角化物为 +++。

[0230] 2、实验结果

[0231] 实验结果如表 1 所示。与第 2 组比，第 3，4，5，6，7 组角化明显受到抑制，其中第 5 组效果最好。

[0232]

		组织病理学改变（级）			P 值
组别	n	0	+	++	与生理盐水组相比
1	6	6	0	0	<0.01
2	6	0	1	5	
3	6	2	4		<0.01
4	6	3	3	0	<0.01
5	6	4	2	0	<0.01
6	6	3	3		<0.01
7	6	0	6	0	<0.01

[0233]

[0234] 表 1：FGF7 抗体及 FGFR 胞外段对兔耳实验性角化模型影响

[0235] 二、FGFR2b 胞外段抑制皮脂腺斑的实验

[0236] 1、实验步骤：

[0237] (1) 取成年雄性金黄地鼠 48 只，于 20℃左右的环境中喂标准饲料，2 周后用于实验；

[0238] (2) 将 48 只金黄地鼠背部用脱毛剂脱毛，暴露两侧皮脂腺斑后，随机分为生理盐水组、FGF7 抗体组、野生型 FGFR2b 胞外段组、S252W 突变型 FGFR2b 胞外段组、P253R 突变型胞外段组、FGFR2b-Fc 段融合蛋白共 6 组，每组 8 只；

[0239] (3)给药阶段：

[0240] 第1组为生理盐水组(阴性对照组)，在两侧皮脂腺斑的每侧涂生理盐水0.1ml；

[0241] 第2组为FGF7抗体组，在两侧皮脂腺斑涂100μg/ml的0.1ml；

[0242] 第3组为野生型FGFR2b胞外段给药组，在两侧皮脂腺斑涂100μg/ml的0.1ml；

[0243] 第4组为S252W突变型FGFR2b胞外段给药组，在两侧皮脂腺斑涂100μg/ml的0.1ml；

[0244] 第5组为P253R突变型FGFR2b胞外段给药组，在两侧皮脂腺斑涂100μg/ml的0.1ml；

[0245] 第6组为融合型FGFR2b胞外段－Fc融合蛋白给药组，在两侧皮脂腺斑涂100μg/ml的0.1ml；

[0246] 以上各组，每天涂药2次，连续30天；

[0247] (4)实验效果鉴定：

[0248] 最后一次给药24h后，用乙醚麻醉各组金黄地鼠，取两侧皮脂腺斑，于光镜下观察组织学变化。

[0249] 判定皮脂腺厚度：重叠腺叶数≥4叶为“厚”；重叠腺叶数为2或3叶为“中”；1个腺叶为“薄”。

[0250] 2、实验结果：

[0251] 实验结果如表2所示。与第2组比，第3，4组皮脂腺斑明显受到抑制，较第5组效果更好。P值为各治疗组与对照组比较所得。

[0252]

组别	皮脂腺斑厚度			P值	皮脂腺斑密度		P值
	厚	中	薄		密	松	
1	4	3	1		7	1	
2	1	3	4	<0.01	2	6	<0.01
3	1	2	5	<0.01	1	7	<0.01
4	0	2	6	<0.01	1	7	<0.01
5	1	3	4	<0.01	3	4	<0.01
6	2	2	4	<0.01	3	4	<0.01

[0253] 表2：FGFR胞外段及FGF7抗体对黄金地鼠皮脂腺斑厚度和密度影响

[0254] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

[0001]

序列表

<110> 广州圣露生物技术有限公司
<120> FGFR2b 胞外段的基因序列、多肽及其应用

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 738
<212> DNA
<213> FGFR2b 胞外段

<400> 1
gcaccatact ggaccaacac agaaaagatg gaaaagcggc tccatgctgt gcctgcggcc 60

aacactgtca agtttcgctg cccagccggg gggaacccaa tgccaaccat gcggtggctg 120

aaaaacggga aggagtttaa gcaggagcat cgcattggag gctacaaggt acgaaaccag 180

cactggagcc tcattatgga aagtgtggtc ccatctgaca agggaaatta tacctgtgtg 240

gtggagaatg aatacgggtc catcaatcac acgtaccacc tggatgttgt ggagcgatcg 300

cctcaccggc ccatcctcca agccggactg ccggcaaatg cctccacagt ggtcggagga 360

gacgtagagt ttgtctgcaa ggtttacagt gatgcccagc cccacatcca gtggatcaag 420

cacgtggaaa agaacggcag taaatacggg cccgacgggc tgccctacct caaggttctc 480

aagcactcgg ggataaatag ttccaatgca gaagtgctgg ctctgttcaa tgtgaccgag 540

gcggatgctg gggaatatat atgtaaggtc tccaattata tagggcaggc caaccagtct 600

gcctggctca ctgtcctgcc aaaacagcaa gcgcctggaa gagaaaagga gattacagct 660

tccccagact acctggagat agccatttac tgcatagggg tcttcttaat cgcctgtatg 720

gtggtaacag tcatcctg 738

<210> 2

[0002]

<211> 246
<212> PRT
<213> FGFR2b 胞外段

<400> 2

Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala
1 5 10 15

Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn
20 25 30

Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln
35 40 45

Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu
50 55 60

Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val
65 70 75 80

Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val
85 90 95

Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
100 105 110

Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val
115 120 125

Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys
130 135 140

Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu
145 150 155 160

[0003]

Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asn Ala Glu Val Leu Ala Leu Phe
165 170 175

Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Lys Val Ser Asn
180 185 190

Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Lys
195 200 205

Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr
210 215 220

Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met
225 230 235 240

Val Val Thr Val Ile Leu
245

<210> 3
<211> 738
<212> DNA
<213> FGFR2b 胞外段

<400> 3
gcaccatact ggaccaacac agaaaagatg gaaaagcggc tccatgctgt gcctgcggcc 60

aacactgtca agtttcgctg cccagccggg gggaacccaa tgccaaccat gcggtggctg 120

aaaaacggga aggagtttaa gcaggagcat cgcattggag gctacaaggt acgaaaccag 180

cactggagcc tcattatgga aagtgtggtc ccatctgaca agggaaatta tacctgtgtg 240

gtggagaatg aatacgggtc catcaatcac acgtaccacc tggatgttgt ggagcgatgg 300

cctcaccggc ccatcctcca agccggactg ccggcaaatg cctccacagt ggtcggagga 360

[0004]

gacgtagagt ttgtctgcaa ggtttacagt gatgcccagc cccacatcca gtggatcaag 420

cacgtggaaa agaacggcag taaatacggg cccgacgggc tgccctacct caaggttctc 480

aagcactcgg ggataaatag ttccaatgca gaagtgctgg ctctgttcaa tgtgaccgag 540

gcggatgctg gggaatatat atgtaaggtc tccaattata tagggcaggc caaccagtct 600

gcctggctca ctgtcctgcc aaaacagcaa gcgcctggaa gagaaaagga gattacagct 660

tccccagact acctggagat agccatttac tgcatagggg tcttcttaat cgcctgtatg 720

gtggtaacag tcatcctg 738

<210> 4
<211> 246
<212> PRT
<213> FGFR2b 胞外段

<400> 4

Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala
1 5 10 15

Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn
20 25 30

Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln
35 40 45

Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu
50 55 60

Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val
65 70 75 80

Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val
85 90 95

[0005]

Val Glu Arg Trp Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
100 105 110

Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val
115 120 125

Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys
130 135 140

Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu
145 150 155 160

Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asn Ala Glu Val Leu Ala Leu Phe
165 170 175

Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Lys Val Ser Asn
180 185 190

Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Lys
195 200 205

Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr
210 215 220

Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met
225 230 235 240

Val Val Thr Val Ile Leu
245

<210> 5
<211> 738

[0006]

<212> DNA
<213> FGFR2b 胞外段

<400> 5
gcaccatact ggaccaacac agaaaagatg gaaaagcggc tccatgctgt gcctgcggcc 60

aacactgtca agtttcgctg cccagccggg gggaacccaa tgccaaccat gcggtggctg 120

aaaaacggga aggagtttaa gcaggagcat cgcattggag gctacaaggt acgaaaccag 180

cactggagcc tcattatgga aagtgtggtc ccatctgaca agggaaatta tacctgtgtg 240

gtggagaatg aatacgggtc catcaatcac acgtaccacc tggatgttgt ggagcgatcg 300

cgtcaccggc ccatcctcca agccggactg ccggcaaatg cctccacagt ggtcggagga 360

gacgtagagt ttgtctgcaa ggtttacagt gatgcccagc cccacatcca gtggatcaag 420

cacgtggaaa agaacggcag taaatacggg cccgacgggc tgccctacct caaggttctc 480

aagcactcgg ggataaatag ttccaatgca gaagtgctgg ctctgttcaa tgtgaccgag 540

gcggatgctg gggaatatat atgtaaggtc tccaattata tagggcaggc caaccagtct 600

gcctggctca ctgtcctgcc aaaacagcaa gcgcctggaa gagaaaagga gattacagct 660

tccccagact acctggagat agccatttac tgcatagggg tcttcttaat cgcctgtatg 720

gtggtaacag tcatcctg 738

<210> 6
<211> 246
<212> PRT
<213> FGFR2b 胞外段

<400> 6

Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala
1 5 10 15

Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn
20 25 30

[0007]

Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln
35 40 45

Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu
50 55 60

Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val
65 70 75 80

Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val
85 90 95

Val Glu Arg Ser Arg His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
100 105 110

Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val
115 120 125

Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys
130 135 140

Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu
145 150 155 160

Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asn Ala Glu Val Leu Ala Leu Phe
165 170 175

Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Ile Cys Lys Val Ser Asn
180 185 190

Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Lys
195 200 205

[0008]

Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr
210 215 220

Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met
225 230 235 240

Val Val Thr Val Ile Leu
245

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 7
cgcatatggc accatactgg accaac 26

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 8
atggatccct attacaggat gactgttacc ac 32

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 9
ttgtggagcg atggcctcac cggcccat 28

<210> 10
<211> 28
<212> DNA

[0009]

<213> 人工序列

<400> 10
atgggccggt gaggccatcg ctccacaa 28

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 11
ttgtggagcg atcgcgtcac cgcccat 27

<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 12
atgggcggtg acgcgatcgc tccacaa 27

<210> 13
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 13
atatggatcc gccgccacca tggcaccata ctggaccaac 40

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 14
gcgcaagctt tcattacagg atgactgtta ccac 34

<210> 15
<211> 43

[0010]

<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 15
atatactagt gatgacgacg acaaggcacc atactggacc aac 43

<210> 16
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 16
cgacccacca ccgccggagc caccgccacc caggatgact gttaccac 48

<210> 17
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 17
ggcggtggtg ggtcgggtgg cggcggatct cccaagagct gcgacaag 48

<210> 18
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 18
atatgaattc tcattacttg ccgggggaca gg 32

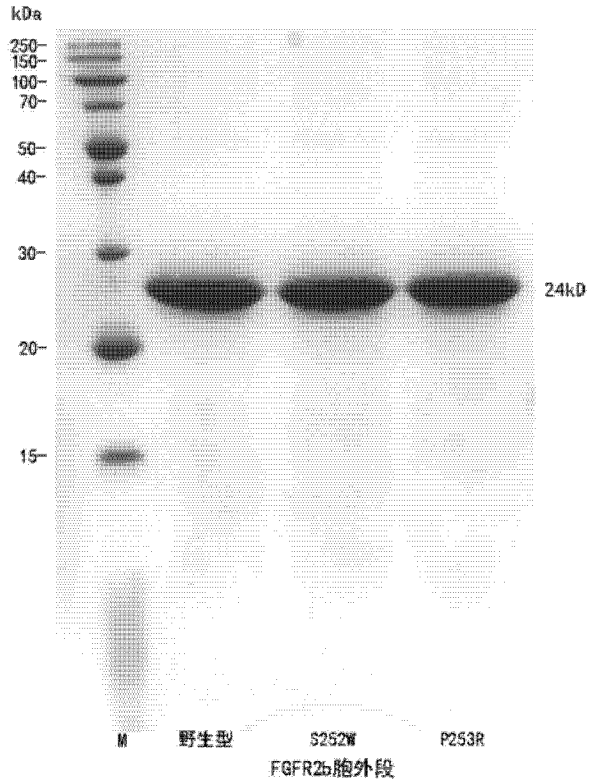
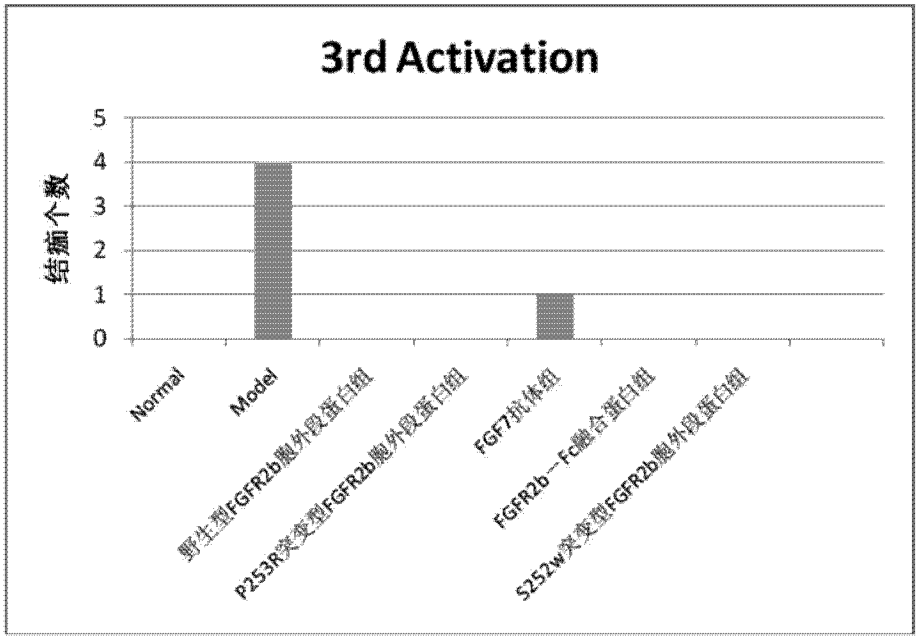

kDa
250
150
100
70
50
40
30
20
15
24kD
M
野生型
S252W
P253R
FGFR2b胞外段

图 1

24kD
野生型
S252W
P253R
FGFR2b胞外段

图 2


3rd Activation
结痂个数
5
4
3
2
1
0
Normal
Model
野生型FGFR2b胞外段蛋白组
P253R突变型FGFR2b胞外段蛋白组
FGF7抗体组
FGFR2b—Fc融合蛋白组
S252w突变型FGFR2b胞外段蛋白组

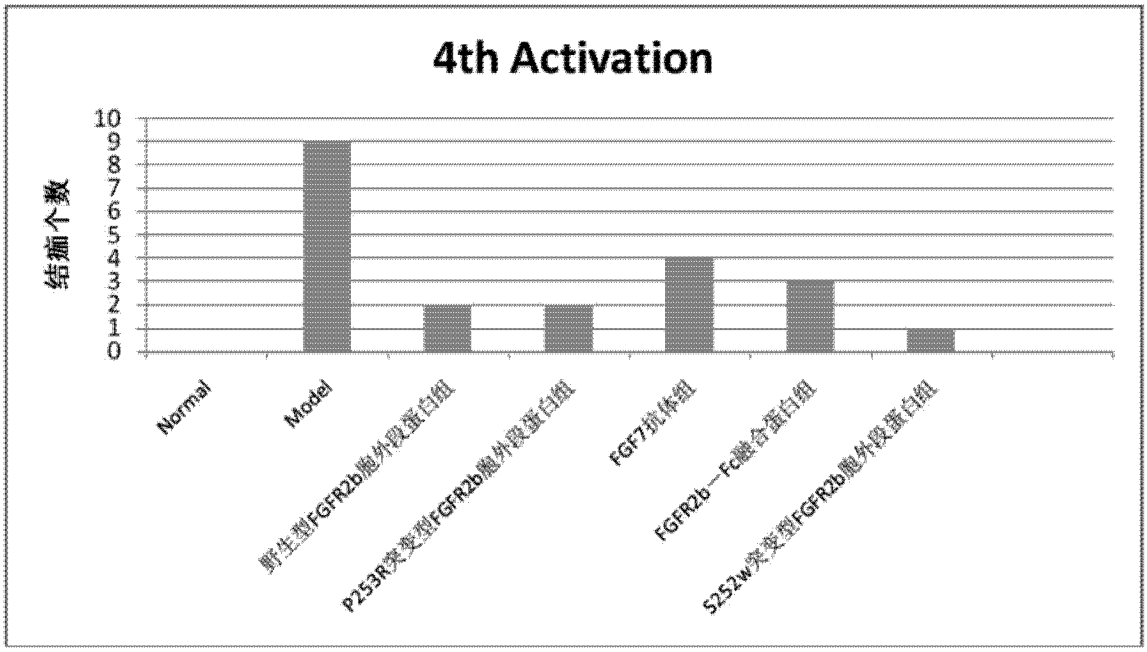

4th Activation
结痂个数
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Normal
Model
野生型FGFR2b胞外段蛋白组
P253R突变型FGFR2b胞外段蛋白组
FGF7抗体组
FGFR2b—Fc融合蛋白组
S252w突变型FGFR2b胞外段蛋白组

图 3

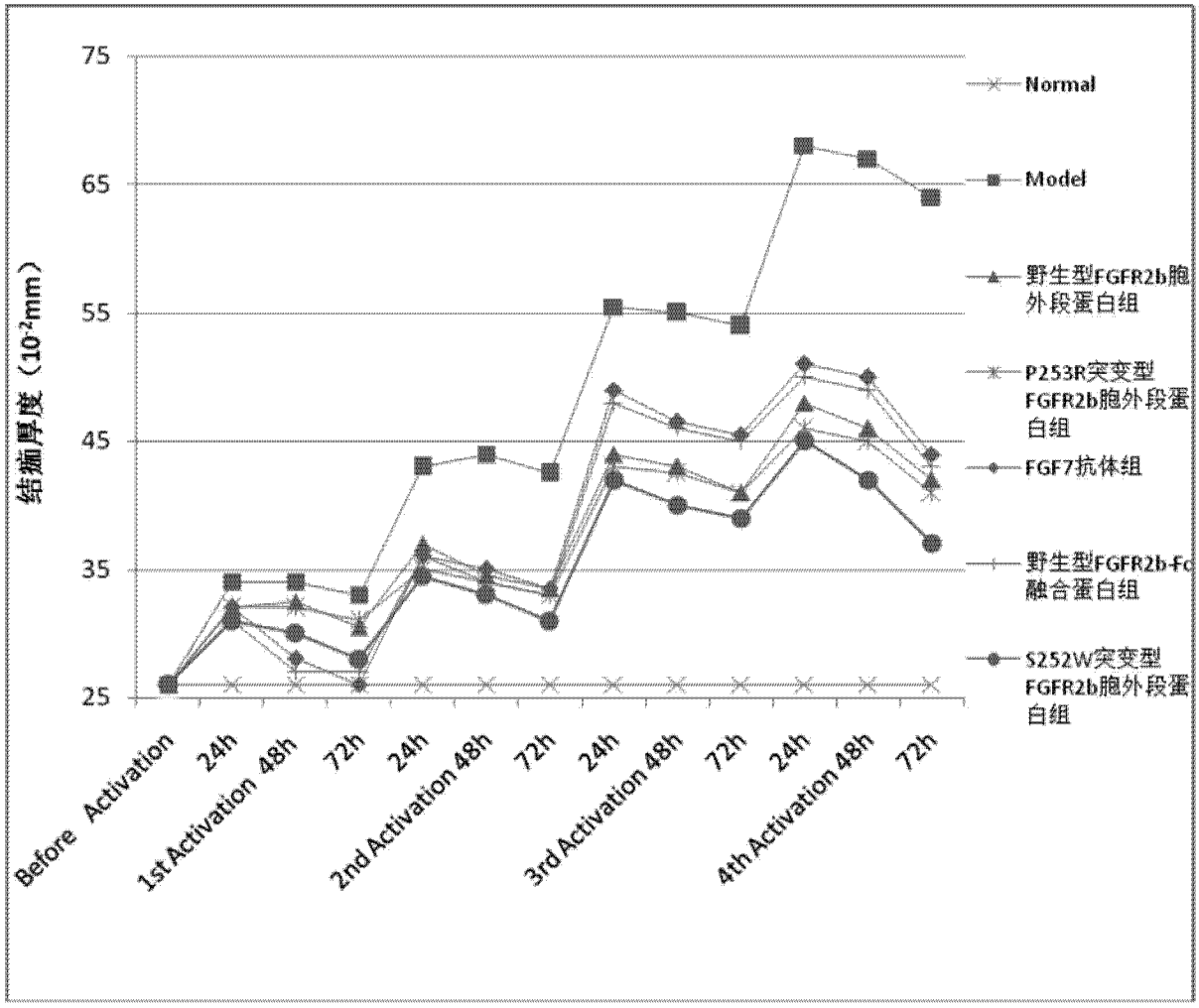

75
65
55
45
35
25
结痂厚度（10-2mm）
Before Activation
24h
1st Activation 48h
72h
24h
2nd Activation 48h
72h
24h
3rd Activation 48h
72h
24h
4th Activation 48h
72h
Normal
Model
野生型FGFR2b胞外段蛋白组
P253R突变型FGFR2b胞外段蛋白组
FGF7抗体组
野生型FGFR2b-Fc融合蛋白组
S252W突变型FGFR2b胞外段蛋白组

图 4