(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101903534 B
(45)授权公告日 2014.07.30

(21)申请号 200880009529.2

(22)申请日 2008.03.24

(30)优先权数据
60/896,884 2007.03.23 US
60/982,093 2007.10.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2009.09.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2008/058065 2008.03.24

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2008/118877 EN 2008.10.02

(73)专利权人 翻译基因组学研究院
地址 美国亚利桑那
专利权人 华盛顿大学

(72)发明人 P·波洛克 P·古德费洛

(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 11038
代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

(56)对比文件
Siegfried et al.Distinct patterns of expression of keratinocyte growth factor and its receptor in endometrial carcinoma.《Cancer》.1997,第79卷(第6期),1166－1171.

Hansen et al.Fibroblast growth factor receptor 2,gain-of-function mutations,and tumourigenesis: investigating a potential link.《J Pathol》.2005,第207卷(第1期),27-31.

Jang et al.Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers.《Cancer res》.2001,第61卷(第9期),3541-3543.

审查员 高欣

权利要求书2页 说明书29页
序列表12页 附图6页

(54)发明名称

诊断、分类和治疗子宫内膜癌和初癌的方法

(57)摘要

描述了用于子宫内膜癌的诊断和治疗应用。诊断和治疗应用基于FGFR2基因中特定的激活突变及其表达产物。本发明涉及与FGFR2激活突变体相关的核苷酸序列、氨基酸序列、探针和引物,以及包括这些突变体来诊断和分类受试者中子宫内膜癌的试剂盒。

CN 101903534 B

1. 用于检测 FGFR2 基因中特定的变异或突变的序列特异性寡核苷酸或特异性识别 FGFR2 蛋白中的突变的抗体在制备用于在受试者中检测子宫内膜癌或初癌的方法中的制剂中的用途，该方法包括在包含子宫内膜细胞的生物样品中检测 FGFR2 中的受体突变，其中所述突变与 FGFR2 受体激活相关且选自以下的在 FGFR2 中的氨基酸取代：(a) 在 SEQ ID NOS：2(NP_075259.2) 或 3(NP_000132.1) 的 252 位 S 突变为 W；(b) 在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 310 位 K 突变为 R；(c) 在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 315 位 A 突变为 T；(d) 在 SEQ ID NO：2 的 373 位或 SEQ ID NO：3 的 372 位 S 突变为 C；(e) 在 SEQ ID NO：2 的 376 位或 SEQ ID NO：3 的 375 位 Y 突变为 C；(f) 在 SEQ ID NO：2 的 383 位或 SEQ ID NO：3 的 382 位 C 突变为 R；(g) 在 SEQ ID NO：2 的 392 位或 SEQ ID NO：3 的 391 位 M 突变为 R；(h) 在 SEQ ID NO：2 的 548 位或 SEQ ID NO：3 的 547 位 I 突变为 V；(i) 在 SEQ ID NO：2 的 550 位或 SEQ ID NO：3 的 549 位 N 突变为 K；或 (j) 在 SEQ ID NO：2 的 660 位或 SEQ ID NO：3 的 659 位 K 突变为 E；和在 SEQ ID NO：1 的 2290-91 位核苷酸 C 和 T 的缺失，其中在子宫内膜细胞中的 FGFR2 中的所述突变的存在为在受试者中子宫内膜癌或初癌的症状。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述检测包括在至少一种核酸中筛选至少一个核苷酸 FGFR2 突变，所述至少一种核酸选自基因组 DNA，RNA 和 cDNA。

3. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述突变导致在 FGFR2 中的至少一个氨基酸取代。

4. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述突变为在 SEQ ID NOS：2 和 3 的 252 位 S 突变为 W。

5. 根据权利要求 1 所述的用途，其中检测到至少两个 FGFR2 受体激活突变。

6. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述突变导致增强的配体结合、错杂的配体亲和性、组成性受体二聚化、受损的再循环、延迟的降解、或激酶激活，由此激活 FGFR2 受体。

7. 根据权利要求 1 所述的用途，其中还检测到 PTEN 失活突变。

8. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述癌为子宫内膜样组织亚型。

9. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述受试者为人类，所述 FGFR2 为组成性活性突变体。

10. 用于检测 FGFR2 基因中特定的变异或突变的序列特异性寡核苷酸或特异性识别 FGFR2 蛋白中的突变的抗体在制备用于分类子宫内膜癌的方法的制剂中的用途，该方法包括：筛选子宫内膜癌细胞中的 FGFR2 突变，并且当在子宫内膜癌细胞中发现 FGFR2 激活突变时，将子宫内膜癌的类型分类为 FGFR2 激活诱导的子宫内膜癌，其中所述突变选自以下的在 FGFR2 中的氨基酸取代：(a) 在 SEQ ID NOS：2(NP_075259.2) 或 3(NP_000132.1) 的 252 位 S 突变为 W；(b) 在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 310 位 K 突变为 R；(c) 在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 315 位 A 突变为 T；(d) 在 SEQ ID NO：2 的 373 位或 SEQ ID NO：3 的 372 位 S 突变为 C；(e) 在 SEQ ID NO：2 的 376 位或 SEQ ID NO：3 的 375 位 Y 突变为 C；(f) 在 SEQ ID NO：2 的 383 位或 SEQ ID NO：3 的 382 位 C 突变为 R；(g) 在 SEQ ID NO：2 的 392 位或 SEQ ID NO：3 的 391 位 M 突变为 R；(h) 在 SEQ ID NO：2 的 548 位或 SEQ ID NO：3 的 547 位 I 突变为 V；(i) 在 SEQ ID NO：2 的 550 位或 SEQ ID NO：3 的 549 位 N 突变为 K；或 (j) 在 SEQ ID NO：2 的 660 位或 SEQ ID NO：3 的 659 位 K 突变为 E；和在 SEQ ID NO：1 的 2290-91 位核苷酸 C 和 T 的缺失。

11. 根据权利要求 10 所述的用途，其中所述分类用于开发用于具有子宫内膜癌的受试

者的治疗，并且该方法还包括确定 FGFR2 突变是否诱导 FGFR2 激活的步骤。

12. 根据权利要求 10 所述的用途，其中所述突变导致 FGFR2 中至少一个氨基酸取代。

13. 根据权利要求 10 所述的用途，其中所述突变导致增强的配体结合、错杂的配体亲和性、组成性受体二聚化、延迟的降解、受损的再循环、或激酶激活，由此激活 FGFR2 受体。

14. 根据权利要求 10 所述的用途，其中所述癌为子宫内膜样组织亚型。

15. 根据权利要求 10 所述的用途，其中所述受试者为人类，且所述 FGFR2 为组成性活性突变体。

16. 用于诊断或分类子宫内膜癌的试剂盒，所述试剂盒包括：特异性识别 FGFR2 蛋白中的突变的抗体；以及用于诊断子宫内膜癌的说明书；其中所述突变导致在子宫内膜细胞中 FGFR2 蛋白增加的活性或表达且其中所述抗体靶向在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 252 位的 S 至 W 的突变。

诊断、分类和治疗子宫内膜癌和初癌的方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请为 2007 年 3 月 23 日提交的美国临时申请系列号 No.60/896,884 和 2007 年 10 月 23 日提交的美国临时申请系列号 No.60/982,093 的继续申请，在此将其全部内容引入以作参考。

[0003] 电子形式提交的材料的以参考方式引入

[0004] 本文中以参考方式将其全文引入的为计算机可读形式的核苷酸 / 氨基酸序列表，其与本文同时提交，并且鉴定如下 :创建于 2008 年 3 月 24 日命名为“Seq_list”的一个 27,110 字节的 ASCII(文本) 文件。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于诊断、分类和治疗子宫内膜癌的方法和试剂盒。

背景技术

[0006] 子宫内膜癌为美国女性生殖道最常见的诊断出的恶性肿瘤。据估计在 2007 年在美国将诊断出 39,080 例新子宫体 (uterine corpus) 癌，并且 7,400 名妇女将死于该疾病 (Jemal A, Siegel R, Ward E, MurrayT, Xu J, Thun MJ.CA Cancer J Clin 2007 Jan-Feb ; 57(1) :43-66)。大多数患有子宫内膜癌的妇女用子宫切除术外科手术治疗 ;然而，约 15％的妇女证明宿存或复发的肿瘤对于目前的化疗难以治愈。对于这些患有晚期、进展性或复发性疾病的妇女，存活率差，这是因为没有证明有效的辅助治疗。复发后的平均存活时间为 10 个月 (Jereczek-FossaB, Badzio A, Jassem J., Int J Gynecol Cancer 1999Jul ;9(4) : 285-94)，对于已经复发的病人而言 5 年存活率仅为 13％ (Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, 等, Lancet 2000 Apr22 ;355(9213) :1404-11)。

[0007] 恶性肿瘤通常在多个癌基因和肿瘤抑制基因上显示突变，在数以百计的基因的表达方面展示改变，并且包含各种染色体异常。尽管该基因组复杂性，靶向特异性分子异常已经显示产生人类肿瘤的快速消退，如使用选择性酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼 (Imatinib) (Gleevec) 和吉非替尼 (Gefitinib)(Iressa) 所示。为了解释该现象，BernardWeinstein 引入术语 " 癌基因依赖 (oncogene addiction)" 。他提出肿瘤细胞的信号传导线路在癌基因活性的存在下被重新编程，以致于肿瘤细胞就细胞存活和生长依赖于该癌基因活性 (Weinstein IB.Science 2002 Jul 5 ;297(5578) :63-4)。实际上，实验和临床数据支持癌基因依赖的这一概念，并且此外还暗示癌基因活性的多种机制，包括突变、重排、过度表达，可以参予癌基因依赖 (Weinstein IB, JoeAK., Nat Clin Pract Oncol 2006 Aug ;3(8) : 448-57)。

[0008] 在子宫内膜癌方面已经报道了各种体细胞基因缺陷。良好或中等分化的子宫内膜样子宫内膜癌占子宫癌的约 80％。它们的特征在于在以下方面高频率的失活突变 : PTEN(26-80％)、激活 KRAS2 突变 (13-26％) 和功能获得性 β- 联蛋白突变 (25-38％) (Hecht JL, Mutter GL., JClin Oncol 2006 Oct 10 ;24(29) :4783-91, Shiozawa T, Konishi

I.,.Int J Clin Oncol 2006 Feb;11(1):13-21)。在各种颅缝早闭综合症和软骨发育异常综合症上已经报道了在FGFR1,2和3上的生殖细胞系功能获得性突变。在这些疾病中的基因型/表型的关系是复杂的,具有超过14种不同的临床综合症与这三种受体之一的突变相关,以及几种临床综合症,例如单核白细胞增多(Pfeiffer)和颅面骨发育不全综合症与不同受体的突变相关(Crouzon Syndrome)(Passos-Bueno MR,Wilcox WR,Jabs EW,Sertie AL,Alonso LG and Kitoh H.(1999),Hum Mutat 14:115-125,Wilkie AO,Patey SJ,Kan SH,van denOuweland AM and Hamel BC.(2002),Am J Med Genet 112:266-278.)。

[0009] 虽然在理解癌症的生物学基础及在其诊断和治疗方面已经取得许多进展,在美国其仍然是死亡的主要原因之一。在其它因素中,在诊断和治疗癌症上的固有困难包括:许多不同癌亚型的存在,合适的治疗策略的相从变动(concomitant variation)以最大化有利的患者预后(outcome)的可能性。此外,在疾病进展上存在各种子宫内膜癌亚型和变化。为了合适地治疗子宫内膜癌以及为了最大化成功治疗的机会,尽可能早地鉴定出子宫内膜癌的种类或亚型是重要的。

[0010] 因此,目前存在检测和分类子宫内膜癌的方法的需求,以选择合适的和最优治疗方案。一旦被检测和分类,还存在基于子宫内膜癌的类型治疗子宫内膜癌的改进的方法的需求,以最大化成功治疗或抑制受试者中疾病复发的机会。

发明内容

[0011] 本发明提供诊断、分类和治疗子宫内膜癌的方法。通过鉴定成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2)激活突变和并将其与子宫内膜癌相关联,本文本发明人提供用于诊断、分类和治疗受试者中的子宫内膜癌的有用工具。

[0012] 在一种实施方式中,本发明为检测和诊断受试者、优选人类受试者中的子宫内膜癌或初癌的方法。该方法优选包括在包含子宫内膜细胞的生物样品中检测FGFR2中的受体突变,其中所述突变与FGFR2受体激活相关。在FGFR2中的一个或多个激活突变的存在为受试者中子宫内膜癌或初癌的症状。该激活突变为错义突变、缺失、插入,或同时缺失和插入,并且经常导致增强的配体结合、异位配体结合(promiscuousligand binding)(例如允许受体被不能与野生型受体正常结合的配体结合和激活)、组成性受体二聚化、导致信号传导增加的受损的受体再循环、延迟降解、过度表达或激酶活化。在优选的实施方式中,FGFR2为组成性活性突变体,其可能仍然需要配体刺激以用于最优化信号传导。

[0013] 优选地,检测步骤包括在基因组DNA、RNA或cDNA中的至少一种核酸就至少一个核苷酸FGFR2突变筛选生物样品。在特定实施方式中,激活突变导致FGFR2中的至少一个氨基酸取代。

[0014] 在优选的实施方式中,FGFR2激活突变包括选自以下至少一种的突变:在免疫球蛋白样(Ig)结构域II和III之间的连接处的突变(例如,在252位S突变为W,F或L;在253位P突变为R;在263位P突变为L;在267位S突变为P,所有突变均为SEQ ID NOS 2或3的);在Ig III结构域中的突变(例如,在276位F突变为V;在278处C突变为Y或F;在281位Y突变为C;在288位I突变为S;在289位Q突变为P;在290位Y突变为C,G.或R;在292位K突变为E;在310位K突变为R;在315位A突变为T;在321位D突变为A;在328位Y突变为C;所有突变均为SEQ ID NOS2或3的);在Ig III结构域和跨膜

(TM) 结构域之间的连接处的突变（例如，在 354 或 353 位 S 突变为 C 或 T ；在 359 或 358 位 V 突变为 F ；在 362 或 361 位 A 突变为 S ；在 372 或 371 位 S 突变为 C ；在 375 或 374 位 Y 突变为 C ；在 373 或 372 位 S 突变为 C ；在 376 或 375 位 Y 突变为 C ；所有均分别为 SEQ ID NOS 2 或 3 的）；TM 结构域的突变（例如，在 380 或 379 位 G 突变为 R ；在 383 或 382 位 C 突变为 R ；在 384 或 383 位 G 突变为 R ；在 392 或 391 位 M 突变为 R ；所有突变均分别为 SEQ ID NOS 2 或 3 的）；在 TM 结构域和酪氨酸激酶结构域 I 之间的连接处的突变（例如，IVS10+2A ＞ C 剪接突变）；在酪氨酸激酶结构域 I 中的突变（例如，在 538 或 537 位 I 突变为 V ；在 540 位 N 突变为 K ；在 548 或 547 位 I 突变为 V ；在 549 或 548 位 N 突变为 H ；在 550 或 549 位 N 突变为 K ；在 565 或 564 位 E 突变为 G ；所有突变均分别为 SEQ ID NOS 2 或 3 的）；在酪氨酸激酶结构域 II 中的突变（例如，在 641 或 640 位 K 突变为 R ；在 650 或 649 位 K 突变为 E ；在 659 或 658 位 K 突变为 N ；在 660 或 659 位 K 突变为 E ；在 663 或 662 位 G 突变为 E ；在 678 或 677 位 R 突变为 G ；所有突变均分别为 SEQ IDNOS 2 或 3 的 ；由 SEQ ID NO ：1 的 2290-91 位处的核苷酸 C 和 T 的缺失引起的阅读框移位突变）。

[0015] Ig III 结构域优选激活突变的其它实例包括，例如在 331 位 N 突变为 I ；在 337 位 A 突变为 P ；在 338 位 G 突变为 P 或 R ；在 340 位 Y 突变为 C 或 H ；在 341 位 T 突变为 P ；在 342 位 C 突变为 F，G，R，S，W 或 Y ；在 344 位 A 突变为 G 或 P ；在 347 位 S 突变为 C ；在 351 位 S 突变为 C ；上述突变都为 SEQ IDNO ：2 的 ；还包括在 SEQ ID NO ：3 中的相应突变 (equivalent mutation)。

[0016] 重要的是注意在生物样品中可以检测出超过一个 FGFR2 激活突变，例如在特定实施方式中检测出至少两个 FGFR2 受体激活突变。

[0017] 检测的子宫内膜癌可为任何亚型，例如浆液性、粘液性和子宫内膜样组织亚型 ；然而，在优选的实施方式中，检测的癌为子宫内膜样组织亚型。

[0018] 此外，本发明提供诊断或分类受试者中子宫内膜癌的方法，其包括评估测试受试者中 FGFR2 信号转导通路的活性水平，并将其与对照受试者中的活性水平比较，其中与对照受试者相比测试受试者中 FGFR2 通路的活性增加表示子宫内膜癌。该通路的活性水平可以例如通过评估 FGFR2 蛋白的表达或活性水平的增加来评估。作为选择，该表达或活性水平可以例如通过确定编码 FGFR2、优选导致受体激活的突变 FGFR2 的 mRNA 的量来评估。例如，在一种实施方式中，子宫内膜癌与由于基因组扩增导致的 FGFR2 的过度表达相关，并且该检验被特异设计成检测 FGFR2 的过度表达。

[0019] 本发明还涉及用于诊断或分类子宫内膜癌的试剂盒，包括与 FGFR2 基因的突变位点特异性杂交或相邻的寡核苷酸，该 FGFR2 基因的突变导致被该基因编码的 FGFR2 蛋白的活性增加，以及用于诊断子宫内膜癌的说明书。突变位点可以例如包括选自以下的核苷酸 ：SEQ ID NO ：1 的 755，929，943，1118，1147，1642，1650，1978 和 2290-91 位核苷酸，以及 SEQ ID NO ：7 的相应核苷酸 (equivalent nucleotide)。在优选的实施方式中，该试剂盒包括至少一种包含突变位点的探针。

[0020] 本发明进一步涉及用于诊断或分类子宫内膜癌的试剂盒，包括特异性识别 FGFR2 蛋白中的突变的抗体，以及使用说明书。任选地，与未突变 FGFR2 蛋白，例如 SEQ ID NOS ：2 和 3 的蛋白相比，该突变导致活性增加。优选地，所述抗体针对选自以下的特异性 FGFR2 蛋白突变 ：在免疫球蛋白样 (Ig) 结构域 II 和 III 之间的连接处的突变 ；在 Ig III 结构域

中的突变；在 Ig III 结构域和跨膜 (TM) 结构域之间的连接处的突变；在 TM 结构域中的突变；在 TM 结构域和酪氨酸激酶结构域 I 之间的连接处的突变；在酪氨酸激酶结构域 I 中的突变；或在酪氨酸激酶结构域 II 中的突变。更优选所述抗体针对选自以下的突变：(a) 在 SEQ IDNOS：2(NP_075259.2) 或 3(NP_000132.1) 的 252 位 S 突变为 W；(b) 在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 310 位 K 突变为 R；(c) 在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 315 位 A 突变为 T；(d) 在 SEQ ID NO：2 的 373 位或 SEQ ID NO：3 的 372 位 S 突变为 C；(e) 在 SEQ ID NO：2 的 376 位或 SEQ ID NO：3 的 375 位 Y 突变为 C；(f) 在 SEQ ID NO：2 的 383 位或 SEQ ID NO：3 的 382 位 C 突变为 R；(g) 在 SEQ ID NO：2 的 392 位或 SEQ ID NO：3 的 391 位 M 突变为 R；(h) 在 SEQID NO：2 的 548 位或 SEQ ID NO：3 的 547 位 I 突变为 V；(i) 在 SEQ ID NO：2 的 550 位或 SEQ ID NO：3 的 549 位 N 突变为 K；或 (j) 在 SEQ ID NO：2 的 660 位或 SEQ ID NO：3 的 659 位 K 突变为 E。

[0021] 本发明还提供治疗受试者中子宫内膜癌或初癌的方法。优选该受试者为感染有子宫内膜癌（例如，浆液性、粘液性和子宫内膜样组织亚型）的人类。该方法优选包括与药学上可接受的载体一起施用有效量的 FGFR2 抑制剂给患有特征在于 FGFR2 激活的子宫内膜癌或初癌的受试者，所述 FGFR2 激活例如以配体非依赖或配体依赖方式组成性激活的 FGFR2 突变形式，其中所述 FGFR2 抑制剂抑制 FGFR2 的表达或活性，由此有效地抑制受试者中子宫内膜癌的生长或增殖。FGFR2 抑制剂优选诱导子宫内膜癌细胞的细胞周期阻滞和 / 或细胞凋亡。在一种实施方式中，FGFR2 抑制剂在子宫内膜癌的外科治疗后施用给受试者，以抑制手术后子宫内膜癌的复发。在另一实施方式中，所述抑制剂施用给患有宿存性 (persistent) 或复发性子宫内膜癌同时不受手术切除的影响的患者。

[0022] 使用的 FGFR2 抑制剂可以抑制 FGFR2 基因或 FGFR2 表达产物的表达。在一种实施方式中该试剂为 FGFR2 反义核酸，优选与 SEQ ID NO：1 的片段杂交的反义核酸，所述 SEQ ID NO：1 包括至少一个选自以下的取代：在 929 位 A 被 G 取代；在 1650 位 T 被 G 取代；在 943 位 G 被 A 取代；在 755 位 C 被 G 取代；在 1650 位 T 被 A 或 G 取代；在 1127 位 A 被 G 取代；在 1175 位 C 被 G 取代；在 1642 位 A 被 G 取代；在 1978 位 A 被 G 取代；在内含子 10A ＞ C+2；或在 2290-91 位 CT 的缺失，以及 SEQ ID NO：7 的相应取代。

[0023] 在另一实施方式中，FGFR2 抑制剂通过阻断 FGFR2 结构域来抑制 FGFR2 活性。例如，FGFR2 抑制剂为针对以下的抗 FGFR2 抑制剂抗体：FGFR2 的在免疫球蛋白样 (Ig) 结构域 II 和 III 之间的连接子区域；FGFR2 的 Ig III 结构域；FGFR2 的在 Ig III 结构域和跨膜 (TM) 结构域之间的连接处；TM 结构域；FGFR2 的在 TM 结构域和酪氨酸激酶结构域 I 之间的连接处；FGFR2 的酪氨酸激酶结构域 I，或 FGFR2 的酪氨酸激酶结构域 II。例如，在一种实施方式中，FGFR2 抑制剂干扰 FGFR2 折叠、FGFR2 的三维结构、配体结合或底物结合，例如 ATP。

[0024] 优选的实例包括特异性识别包括选自以下突变的 FGFR2 氨基酸序列的抗体：(a) 在 SEQ ID NOS：2(NP_075259.2) 或 3(NP_000132.1) 的 252 位 S 突变为 W；(b) 在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 310 位 K 突变为 R；(c) 在 SEQ ID NOS：2 或 3 的 315 位 A 突变为 T；(d) 在 SEQ ID NO：2 的 373 位或 SEQID NO：3 的 372 位 S 突变为 C；(e) 在 SEQ ID NO：2 的 376 位或 SEQ ID NO：3 的 375 位 Y 突变为 C；(f) 在 SEQ ID NO：2 的 383 位或 SEQ ID NO：3 的 382 位 C 突变为 R；(g) 在 SEQ ID NO：2 的 392 位或 SEQ ID NO：3 的 391 位 M 突变为 R；(h) 在 SEQ ID NO：2 的 548 位或 SEQ ID NO：3 的 547 位 I 突变为 V；(i) 在 SEQ ID NO：2 的 550 位或 SEQ

ID NO :3 的 549 位 N 突变为 K ;或 (j) 在 SEQ ID NO :2 的 660 位或 SEQ ID NO :3 的 659 位 K 突变为 E。

[0025] 在优选的实施方式中,所述抗体针对在 SEQ ID NOS :2 或 3 的 252 位 S 至 W 的突变。在另一优选实施方式中所述抗体为人源化抗体,并优选为单克隆抗体。

[0026] 在作为选择的实施方式中,FGFR2 抑制剂为小抑制 RNA(smallinhibitory RNA)(siRNA)、小发夹 RNA(shRNA)、微 RNA(miRNA)、或核酶。在优选的实施方式中 FGFR2 抑制剂为 shRNA,优选靶向 FGFR2 的外显子 2(SEQ ID NO :4) 和 / 或 FGFR2 的外显子 15 的 shRNA(SEQ ID NO :5)。在另一特定的非限制性实施方式中,FGFR2 抑制剂为 PD173074。

[0027] 本发明还提供分类子宫内膜癌的方法。该方法允许用户合适的分类子宫内膜癌的类型,以使基于受试者具有的子宫内膜癌的类型使用特定和合适的治疗。该方法包括 :筛选子宫内膜癌细胞中的 FGFR2 突变 ;当在子宫内膜癌细胞中发现 FGFR2 激活突变时,将子宫内膜癌的类型分类为 FGFR2 激活诱导的子宫内膜癌。优选地,FGFR2 激活突变为如上鉴定的 FGFR2 突变的一种或多种。在特定实施方式中,该方法还包括确定 FGFR2 突变是否诱导 FGFR2 激活。

附图说明

[0028] 图 1A-E 显示 ANC3A 和 MFE296 细胞中 shRNA 介导的 FGFR2 的击倒 (knockdown),导致子宫内膜细胞的细胞死亡。图 1A 和 IB 显示 FGFR2shRNA 对子宫内膜癌细胞的细胞增殖的影响。AN3CA(图 1A) 或 MFE296(图 1B) 细胞用空载体,未沉默的,或两个独立的靶向两个不同的 FGFR2 的外显子 (X2 或 XI5) 的 FGFR2 shRNA 构建体来转导,使用 SRB 检测评估对细胞增殖的影响。使用 FGFR2 shRNA 的治疗抑制两个细胞系的增殖。未沉默的对照 shRNA 对细胞增殖没有效果。图 1C FGFR2 击倒对 ERK1/2 和 AKT 的激活的影响。shRNA 转导后,AN3CA 细胞在 0.2% FBS 中血清饥饿培养 18 小时,或保持在包含 10% FBS 的完全生长培养基中。收集裂解产物并通过 Western 印迹分析 ERK1/2 和 AKT 的 FGFR2 表达和激活。FGFR2 的击倒导致在 0.2%和 10% FBS 中 ERK1/2 激活降低,在 10% FBS 中 AKT 磷酸化中等降低,在 0.2% FBS 中对 AKT 激活没有影响。图 1D :FGFR2 击倒后的细胞死亡。AN3CA 细胞用未沉默的 siRNA(NS) 对照或 FGFR2 siRNAX2 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂来转染。转染后 48 小时,收集细胞,用 500ng/mL 膜联蛋白 V-FITC 和 1μg/mL 碘化丙啶染色,并通过流式细胞仪就膜联蛋白 -FITC 阳性细胞进行分析。FGFR2 的击倒导致膜联蛋白 V 阳性细胞的增加,指示细胞凋亡。通过 western 印迹分析来分析 30μg 的全蛋白裂解产物来确认 FGFR2 击倒。该击倒使用 siRNA 而不是 shRNA 构建体来实现,这是因为后者还表达 GFP,其与 FITC 具有重叠的发射光谱。图 1E 显示子宫内膜癌细胞系中的 PTEN 表达。收集子宫内膜癌细胞裂解产物并通过 Western 印迹分析就 PTEN 表达进行评价。

[0029] 图 2A-B 表达激活的 FGFR2 的子宫内膜癌细胞对 PD173074,一种全 FGFR 抑制剂 (pan-FGFR inhibitor) 敏感。六种子宫内膜癌细胞系的剂量效应曲线。添加 PD173074 后 72 小时用 SRB 检测测定细胞的活力。AN3CA 和 MFE296 细胞携带 N550K FGFR2 突变。HEC1A,Ishikawa,KLE 和 RL952 对于 FGFR2 为野生型。与表达野生型 FGFR2 的细胞系相比,PD173074 对表达突变体 FGFR2 的细胞系的细胞活力具有深刻的负效应。PD173074IC50 值 :AN3CA = 61.7nM ;MFE296 = 284.3nM ;HEC1A > 3000nM ;Ishikawa = 2920.7nM ;KLE > 1000nM ;RL952

＞ 1000nM。图 2B 显示 PD173074 处理后 PLCg 的激活状态。

[0030] 细胞在 0.2% FBS 中血清饥饿培养 18 小时，然后用增加浓度的 PD173074 处理 3 小时。收集裂解产物并通过 Western 印迹分析就 PLCg 的激活评价。图 2C 显示不存在 FGF2 时的细胞增殖和应答于 FGF2 的细胞增殖。组成性活性 FGFR2 激酶结构域突变 N550K 导致在不存在 (-FGF2) 和存在 (+FGF2) 外源 FGF2 配体时增殖比通过野生型受体 (WT) 诱导的增殖都增加。这些数据暗示当 N550K 被组成性激活时，其还需要配体以全活性。

[0031] 图 3A-B :通过 PD173074 的 FGFR2 抑制在具有激活的 FGFR2 的子宫内膜癌细胞中诱导细胞死亡和细胞周期阻滞。(图 3A) 膜联蛋白染色揭示用全 FGFR 抑制剂，PD173074 处理后 AN3CA 细胞的细胞死亡。以 $2.5x10^5$ 细胞 / 孔的密度铺平板的 AN3CA 细胞用 DMSO(溶剂对照 (vehiclecontrol)) 或 1μM PD173074 处理。48，72 或 96 小时后，收集细胞，用 500ng/mL 膜联蛋白 -FITC 和 1ug/mL 碘化丙啶染色，一式三份地就膜联蛋白 (annexin) 阳性细胞通过流式细胞仪分析。PD 173074 处理的细胞显示与单独用 DMSO 处理的细胞相比，膜联蛋白 -V 染色增加，指示细胞凋亡。(图 3B)PD173074 导致 AN3CA 细胞中 G1 细胞周期阻滞。将细胞在 6 孔平板上一式三份地铺平板，用 1μM PD173074 处理。添加 PD 173074 后 72 小时通过碘化丙啶染色和流式细胞仪测定细胞周期。

[0032] 图 4. 用增加浓度的 PD173074 处理后关键信号传导分子的激活状态。细胞用在 10% FBS 中增加浓度的 PD173074 处理 3 小时。收集裂解产物并通过 Western 印迹分析就 ERK1/2，AKT，STAT3 和 p38 的激活进行评价。PD173074 处理导致 ERK1/2 激活的抑制、AKT 磷酸化的中等抑制，但对 AN3CA 和 MFE296 细胞中的 STAT3 或 p38 激活没有影响。PD173074 对 HEC1A 细胞中的 ERK1/2，AKT，STAT3 或 p38 激活没有影响。

[0033] 图 5A-B.PD173074 处理后随时间关键信号传导分子的激活状态。(图 5A) 用在 10% FBS 中的 1μM PD173074 处理细胞 0 至 72 小时的指定时间。收集裂解产物并通过 Western 印迹分析就 ERK1/2，AKT，STAT3 和 p38 的激活进行评价。PD173074 处理导致 ERK1/2 激活的抑制以及 AKT 磷酸化的部分抑制，但对 AN3CA 和 MFE296 细胞中的 STAT3 或 p38 激活没有影响。PD173074 对 HEC1A 细胞中的 ERK1/2，AKT，STAT3/5 或 p 38 激活没有影响。(图 5B) 细胞在 0.2% FBS 中饥饿培养过夜，然后用在 0.2% FBS 中的 1μM PD173074 处理 0 至 72 小时的指定时间。收集裂解产物并通过 Western 印迹分析就 ERK1/2，AKT，STAT3 和 p38 的激活进行评价。PD173074 处理导致在 AN3CA 和 MFE296 细胞中 ERK1/2 激活的抑制以及 AKT 磷酸化的中等抑制。PD173074 对 HEC1A 细胞中的 ERK1/2 或 AKT 激活没有影响。

[0034] 图 6 为 FGFR2 突变的示意性表示。将 FGFR2 突变映射到 (mapped to) 功能性结构域。在原发性子宫内膜癌和细胞系中鉴定出的体细胞突变在上述蛋白的示意性表示上呈现并相对于 FGFR2b(SEQ ID NO :2 ;NP_075259.2) 编号。生殖细胞系突变与各种颅缝早闭综合症相关并相对于 FGFR2c(SEQ ID NO :3 NP_000132.1) 编号。虽然之前在生殖细胞系中未报道，四个体细胞 FGFR2 子宫内膜突变，在骨骼软骨发育不良中具有与报道的 FGFR3c 中的平行位置 (paralogous position) 中相同的错义变化 (用 ** 表示)。新的突变用下划线表示。[a]IVS10+2A ＞ C 突变可能导致与 +VT 剪接型成比例的相对增加。[b]FS 是指 2290-91 CT 的 2bp 缺失，导致移码和未成熟切断 (premature truncation)。

具体实施方式

[0035] 现在将参考本发明的优选实施方式来描述本发明，以仅用于示例性地说明本发明。本领域技术人员将理解可以根据例示的实施方式进行许多改进或变化而不背离本发明的意图和范围。

[0036] 本发明部分基于以下发现：诱导受体激活的FGFR2受体中的突变可以用于有效地检测和分类受试者中的子宫内膜癌或初癌。本发明还基于以下发现：FGFR2基因或其表达产物的抑制在治疗子宫内膜癌上是有效的。

[0037] 如本文所用，术语"子宫内膜癌"包括该疾病的所有形式和亚型，包括，例如浆液性、粘液性和子宫内膜样组织亚型。子宫内膜癌为起始于子宫内膜，子宫（子宫(womb)）的内膜的癌症。

[0038] 在本发明上下文中，FGFR2基因包括优选为人源的基因，其为SEQID NOS：1，7所示的编码核酸序列，或包括等位基因变异体和直系同源物的同源物。FGFR2蛋白包括同样优选为人源的蛋白，其具有SEQ IDNOS：2或3所示的氨基酸序列，或包括其直系同源物的同源物。图6显示FGFR2蛋白的FGFR2结构域的功能性结构域，以及与功能性结构域相关映射的FGFR2突变。

[0039] FGFR2属于由四种不同基因编码的结构相关的酪氨酸激酶受体家族(FGFRs 1-4)。FGFR2为由三个细胞外免疫球蛋白样(Ig)结构域、跨膜结构域、断裂酪氨酸激酶结构域(split tyrosine kinase domain)组成的糖蛋白。Ig III结构域中的替代剪接为在FGF/FGFR结合和信号传导中的冗余(redundany)和特异性二者的模式的主要决定因子。该剪接事件为组织特异的，并且产生拥有独特配体特异性的FGFR1-FGFR3的IIIb和IIIc受体同工型(Mohammadi M，Olsen SK and Ibrahimi OA.(2005)，Cytokine Growth Factor Rev 16：107-137，Ornitz DM andItoh N.(2001).Genome Biol 2：REVIEWS 3005)。对于FGFR2，上皮细胞谱系的细胞仅表达由内含子8编码的"IIIb"同工型(FGFR2b；SEQID NO：2；NP_07529.2)，而间充质衍生的细胞仅表达利用内含子9的"IIIc"同工型(FGFR2c；SEQ ID NO：3；NP_000132.1)(Scotet E andHoussaint E.(1995).Biochim Biophys Acta 1264：238-242)。FGFR2b同工型主要结合FGF1，FGF3，FGF7和FGF10，而FGFR2c不结合FGF7和FGF10，但是高亲合性地结合FGF1，FGF2，FGF4，FGF6和FGF8(Ibrahimi OA，Zhang F，Eliseenkova AV，Itoh N，Linhardt RJand Mohammadi M.(2004)，Hum Mol Genet 13：2313-2324)。

[0040] 在测试受试者或生物样品中FGFR2的"增加的活性"或"激活突变"与对照相比在测试受试者或生物样品中更高的总FGFR2活性，所述对照例如健康受试者或标准样品。优选地，尽管不必须，活性在测试受试者或生物样品中比在对照中高至少10％，更优选至少50％，还更优选至少100％，仍更优选至少150％。增加的活性，可以例如由增加的基础FGFR2活性、延长的刺激、延迟的降解或过度表达引起，例如由于增强的配体结合、错杂的(promiscuous)或不合适的配体结合、组成性受体二聚化、受损的再循环，导致信号传导的增加、延迟的降解或激酶激活。

[0041] FGFR2的更高表达水平可由例如在FGFR2基因的非编码区中的突变或在参予FGFR2转录或翻译的编码或非编码基因中的突变引起。FGFR2的表达水平可以由例如以下来确定：通过比较测试受试者和对照，例如通过比较肿瘤和正常子宫内膜（例如正常相邻的子宫内膜样品）的FGFR2mRNA或FGFR2蛋白水平。

[0042] “功能保守变异体”为蛋白或酶中的给定氨基酸残基已经变化但没有改变多肽的总体构象和功能的那些，包括但不限于，氨基酸被具有类似性质（例如，极性、氢键能(hydrogen bonding potential)，酸性、碱性、疏水性、芳香性等）的氨基酸取代。具有类似性质的氨基酸在本领域是已知的。例如精氨酸、组氨酸和赖氨酸为亲水性碱性氨基酸，可以互换。类似地，为疏水性氨基酸的异亮氨酸，可以被亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸取代。预期此类变化对蛋白质或多肽的表观分子量或等电点几乎没有或没有影响。

[0043] 在蛋白质或酶中除了称为保守的那些氨基酸之外的氨基酸可以不同，从而类似功能的任何两种蛋白质之间的蛋白或氨基酸序列相似性百分比可以变化，并且可以为，例如从70％至99％，按照比对方案例如通过聚类法(Cluster Method)来确定，其中相似性基于MEGALIGN算法。″变异体″还包括通过BLAST或FASTA算法确定的具有至少60％氨基酸同一性，优选至少75％、最优选至少85％、还更优选至少90％、仍更优选至少95％的多肽或酶，并且与要比较的天然或亲本蛋白或酶具有相同或基本上类似的性质或功能。特别的变异体为“功能获得性”变异体，其是指其中蛋白质或酶中至少一个给定氨基酸残基改变的多肽变异体，该改变提高了多肽的特定功能，包括但不限于蛋白质活性。氨基酸残基的改变可以用具有类似性质的氨基酸取代氨基酸。

[0044] 如本文所用，术语″同源″和″相似″是指拥有″相同进化起源″的蛋白质之间的关系，包括来自超家族（例如，免疫球蛋白超家族）的蛋白和来自不同物种的同源蛋白。此类蛋白（及其编码基因）具有如其序列相似性所反映的序列同源性，无论根据百分比相似性或作为保守位置的特定残基或基序的存在。

[0045] 在特定的实施方式中，当在DNA序列的规定长度上按照序列比对算法，例如BLAST，FASTA，DNA Strider等确定的至少约80％、最优选至少约90％或至少95％的核苷酸匹配时，两种DNA序列为“基本上同源或相似”。

[0046] 术语″突变体或突变″是指在例如DNA的遗传物质或任何处理机制上任何可检测的变化，或此类变化的结果。当与对照材料比较时，此类变化可称为“异常”。这包括基因突变，其中结构（例如基因的DNA序列改变，由任何突变过程产生的任何基因或DNA，以及由改性基因或DNA序列表达的任何表达产物（例如，蛋白质）。术语″变异体″还可用于表示改性或变化的基因、DNA序列、酶、细胞等，即，任何种类的突变体。

[0047] 如本文所用，″序列特异性寡核苷酸″是指相关的寡核苷酸组，其可用于检测FGFR2基因中特定的变异或突变，优选FGFR2激活突变。

[0048] “探针”是指核酸或寡核苷酸，由于探针中的至少一个序列与受试者的靶蛋白中的序列的互补性导致其与靶区域中的序列形成杂交结构。

[0049] 本发明提供可用于抑制FGFR2表达的反义核酸（包括核酶）。″反义核酸″优选为单链核酸分子，其当在细胞质条件下与RNA或DNA分子中的互补碱基杂交时，抑制后者的作用。如果RNA为信使RNA转录产物(transcript)，反义核酸为反转录物(countertranscript)或mRNA干扰互补核酸。如目前所用，″反义″广泛地包括RNA-RNA相互作用、RNA-DNA相互作用、核酶、RNA-诱导的沉默配合物以及RNASe-H介导的阻滞。反义核酸分子可由用于在细胞中表达的重组基因编码（例如，美国专利No.5,814,500；美国专利No.5,811,234），或作为选择它们可以合成地制备（例如，美国专利No.5,780,607）。合成的寡核苷酸适合用作反义用途。

[0050] 诊断方法

[0051] 根据本发明，可以检测诱导受体激活的FGFR2受体的突变，包括过度表达和延迟降解，来诊断或分类受试者中的子宫内膜癌或初癌。

[0052] 如本文所用，″受试者″为可能发展子宫内膜癌的人类或非人类哺乳动物，例如，灵长类、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类。在所有实施方式中优选人类受试者。优选地受试者为怀疑患有子宫内膜癌、已经诊断患有子宫内膜癌、或具有子宫内膜癌的家族史的人类。用于鉴定怀疑患有子宫内膜癌的受试者的方法可以包括物理检查、受试者的家族病史、受试者的病史、子宫内膜活组织检查、或许多成像技术例如超声波成像、计算断层照相法、磁共振成像、磁共振光谱分析或正电子发射断层显像。用于子宫内膜癌的诊断方法和子宫内膜癌的临床描绘对医疗领域的技术人员而言是已知的。

[0053] 因此，诊断方法可以包括例如，检测FGFR2基因中的突变，其中所述突变导致增加的FGFR2受体活性。FGFR2突变可以尤其影响FGFR2基因的编码区域，例如，在FGFR2基因的IgII或Ig III结构域中的突变。所述突变可为错义突变，优选导致核酸取代或缺失或二者组合的错义突变。优选地，所述突变导致一个，以及有时多个氨基酸取代或缺失，例如参见以下表2。

[0054] 本发明的诊断方法还包括检测FGFR2蛋白中的突变，特别是导致FGFR2蛋白的活性增加的突变。优选地突变为选自以下组的FGFR2中的至少一种突变：在免疫球蛋白样(Ig)结构域II和III之间的连接处的突变；在Ig III结构域中的突变；在Ig III结构域和跨膜(TM)结构域之间的连接处的突变；在TM结构域中的突变；在TM结构域和酪氨酸激酶结构域I之间的连接处的突变；在酪氨酸激酶结构域I中的突变；或在酪氨酸激酶结构域II中的突变。更优选突变诱导FGFR2中的氨基酸取代，例如SEQ ID NOS:2或3的252位S突变为W；或SEQ ID NO:2的550位或SEQ ID NO:3的549位N突变为K。在另一实施方式中，FGFR2中的氨基酸取代为SEQ ID NOS:2或3的310位K突变为R；或SEQ ID NO:2的392位或SEQ ID NO:3的391位M突变为R。在一非限制性实施方式中，突变由以下组成：SEQ ID NO:1(NM-02297.2)的2290-91位的核苷酸C和T的缺失；SEQ ID NO:7；或IVS10+2A＞C剪接突变。

[0055] 典型地，检测出的FGFR2受体激活突变通过例如以下增加受体的激活：增强配体结合、改变的(错杂的)配体亲和性、组成性受体二聚化、延迟的降解、来自细胞膜的受损的再循环、过度表达、或激酶激活，从而激活FGFR2受体。

[0056] 如本文所用，术语″诊断″是指在任何发展阶段的疾病的鉴定，还包括确定受试者发展该疾病或复发的倾向(predisposition)。本发明还提供确认和分类子宫内膜癌的类型的方法。

[0057] 术语″生物样品″是指从其可以获得DNA的任何细胞来源。优选地，生物样品获自子宫区域或其附近，以确保作为子宫内衬的子宫内膜细胞存在于生物样品中。在一种实施方式中，生物样品以血液的形式，例如来自月经或绝经后测定位点的子宫血液。

[0058] 在另一实施方式中，受试者中子宫内膜癌的诊断包括评估在测试受试者子宫内膜细胞中的FGFR2蛋白的表达、延迟降解或活性的水平，并将其与对照受试者中的表达或活性的水平相比较，其中与对照受试者相比，测试受试者中FGFR2蛋白的表达和/或活性增加表示子宫内膜癌或初癌。

[0059] FGFR2 的表达或延迟降解水平可以通过确定编码生物样品中 FGFR2 蛋白的 mRNA 的量，或通过确定生物样品中 FGFR2 蛋白的浓度来评估。FGFR2 活性的水平可以通过确定 FGFR2 信号传导通路信号传导通量中的活性水平，例如通过如本文所述测定样品或受试者中 FGFR2 活性来评估。

[0060] 基于核酸的检验

[0061] 根据本发明，FGFR2 核酸，即以 FGFR2 DNA 或以其转录产物的突变形式，以及 FGFR2 的失控表达 (deregulated expression)，例如过度表达，或 FGFR2 通路的其它组分可以通过各种合适的方法检测。

[0062] 可以使用用于分析和测序生物样品中包含的核酸以及用于诊断遗传异常的标准方法，并且用于基因型分析的许多策略对本领域技术人员而言是已知的。

[0063] 在优选的实施方式中，FGFR2 基因中突变的确定包括使用核酸序列例如特异性寡核苷酸，来检测生物样品中 FGFR2 基因组 DNA 或 mRNA 的突变。此类寡核苷酸可以特异性地与 FGFR2 核酸中存在的突变位点，或与该突变位点相邻的区域杂交。还可以使用允许扩增 FGFR2 全部或部分的引物。作为选择，或与此技术组合，本文描述的或本领域技术人员已知的的寡核苷酸测序可以用于检测 FGFR2 突变。

[0064] 本领域技术人员可以使用固相法使用溶液和实施方式中的杂交探针。在包括固相法的实施方式中，测试核酸被吸收，或否则被固定在所选的基质或表面上。固定的单链核酸然后与所选探针进行特异性杂交。

[0065] 在另一实施方式中，本领域技术人员可以使用扩增技术、例如 PCR 或反向 PCR(" 反向聚合链反应 ") 中的寡核苷酸探针，来分别特异性地扩增可能存在于生物样品中的靶 DNA 或 mRNA。

[0066] 可用的寡核苷酸包括允许扩增 FGFR2 外显子的引物。

[0067] 本发明更特别涉及在体外诊断子宫内膜癌或初癌的方法，包括以下步骤 :

[0068] a) 使包含 DNA 的生物样品与允许扩增 FGFR2 基因全部或部分的特异性寡核苷酸，在允许所述探针与包含于生物样品中的 DNA 杂交的条件下接触，在生物样品中包含的所述 DNA 已经被赋予适合杂交的可及性 ;

[0069] b) 扩增所述 DNA ;

[0070] c) 检测扩增产物 ;

[0071] d) 将获得的扩增产物与用正常对照生物样品获得的扩增产物比较，并由此检测 FGFR2 基因中的可能异常。

[0072] 在特定实施方式中，生物样品中的 DNA 无需扩增直接测序。在这些实施方式中，测序的 DNA 与对照序列比较以用于检测 FGFR2 基因中的可能异常。

[0073] 本发明方法还适用于例如通过 RT-PCR，例如通过扩增包含于生物样品中的 mRNA，检测 FGFR2 基因的转录产物中的异常。

[0074] 因此本发明的另一主题为在体外诊断子宫内膜癌的方法，如上所述包括以下步骤 :

[0075] a) 从包含于生物样品中的 mRNA 产生 cDNA ;

[0076] b) 使所述 cDNA 与允许扩增 FGFR2 基因转录产物的全部或部分的特异性寡核苷酸，在允许所述探针与所述 cDNA 杂交的条件下接触 ;

[0077] c) 扩增所述 cDNA ;

[0078] d) 检测扩增产物 ;

[0079] e) 将获得的扩增产物与用正常对照生物样品获得的扩增产物比较，并由此检测 FGFR2 基因的转录产物中的可能异常。

[0080] 对照可以为本领域技术人员已知的任何正常子宫内膜对照样品，例如正常的子宫内膜附近的样品或获自血液或颊粘膜拭子 (buccalswab) 的正常 DNA。

[0081] 对于 RNA 分析，生物样品可以为如上所述的任何细胞来源，例如活组织检查组织，从其使用本领域已知的标准方法例如硫氰酸胍 - 苯酚 - 氯仿提取 (Chomocyznski 等，Anal. Biochem.，1987，162 :156)。然后分离的 RNA 通过聚合酶链反应 (RT-PCR)，使用对所选位点特异的特异性寡核苷酸引物，进行偶合地逆转录和扩增。选择引物退火的条件以确保特异的逆转录和扩增，这样，扩增产物的出现为特定遗传变异的存在的症状。在另一实施方式中，RNA 被逆转录和扩增，其后通过例如直接测序鉴定扩增序列。在另一实施方式中，获自 RNA 的 cDNA 可以被克隆并测序以鉴定突变。

[0082] 本发明的 FGFR2 核酸还可用作例如治疗和诊断检验中的探针。例如，本发明提供包括基本上纯的寡核苷酸的探针，所述寡核苷酸包括具有能够与不同于野生型基因 (SEQ ID NOS :1 和 7) 的 FGFR2 基因的区域特异性杂交的核苷酸序列的区域，例如突变或多态区域。然后此类探针可以用于特异性检测在取自受试者的样品中存在 FGFR2 基因的何种突变。突变或多态区域可以位于 FGFR2 基因的启动子、外显子或内含子序列。

[0083] 特别优选本发明的探针具有许多足以允许与靶核苷酸序列特异性杂交的核苷酸。因此，依赖于预定的应用，就特异性的合适水平，本领域技术人员可以构建和测试合适长度的探针，所述探针基于 SEQID NOS :1-3 并与本文提供的突变体序列互补。其中靶核苷酸序列以 DNA 的大片段形式存在，例如几十或几百 k 碱基的基因组 DNA 片段，与用于检测以 DNA 的较短片段形式存在的靶序列的探针相比，探针的大小可能必须较长，以提供充分的特异性杂交。例如，在某些诊断方法中，FGFR2 基因的部分可以被首先扩增，并进而从其余的染色体 DNA 分离，然后与探针杂交。在此类情况下，较短的探针可能提供充分的杂交特异性。例如，具有约 10 个核苷酸的核苷酸序列的探针可能是足够的，虽然优选约 15 个核苷酸、还更优选 20 个核苷酸的探针。

[0084] 在优选的实施方式中，探针或引物还包括连接至其的优选能够被检测的标记。标记可以例如选自放射性同位素、荧光化合物、酶、酶辅因子。

[0085] 在本发明另一优选实施方式中，用作例如探针或引物的分离的核酸，被改性以变得更稳定。改性的示例性的核酸分子包括 DNA 的氨基磷酸化、硫代磷酸化 (phosphothioate)、甲基膦酸化类似物 (analogs)(还参见美国专利 Nos.5,176,996 ; 5,264,564 和 5,256,775)。

[0086] 在另一实施方式中，可以使用 HPLC 或变性 HPLC(DHPLC) 技术来分析 FGFR2 核酸。当观察到在部分变性温度下进行 HPLC 分析时 (所述部分变性温度即足以使在碱基对错配位点处的异源双链体变性的温度)，显影 (develope)DHPLC，同源双链体可以从具有相同碱基对长度的异源双链体分离 (Hayward-Lester，等，Genome Research，1995，5 : 494 ;Underhill，等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，1996，93 :193 ;Doris，等，DHPLC Workshop，1997，Stanford University)。这样，使用 DHPLC 应用于突变检测 (Underhill，等，Genome

Research,1997,7 :996 ;Liu,等,核酸 Res.,1998,26 ;1396)。DHPLC 可以区分少至仅一个碱基对区别的异源双链体。如美国专利 Nos.6,287,822 或 6,024,878 所述,″ Matched Ion Polynucleotide Chromatography ″ (MIPC), 或 ″ Denaturing Matched Ion Polynucleotide Chromatography″ (DMIPC) 为也可以连同本发明一起使用的分离方法。

[0087] 作为选择,可以使用 DGGE 法(变性梯度凝胶电泳)或 SSCP 法(单链构象多态性)以用于检测 FGFR2 基因中的异常。DGGE 为使用通过包含各种浓度的变性剂的凝胶的电泳,在少至仅有单个碱基对变化的序列差异的基础上,用于分辨相同长度的两个 DNA 片段的方法 (Guldberg 等, Nuc.Acids Res.1994,22 :880)。SSCP 为用于检测两个 DNA 之间的序列差异的方法,包括两种物质 (species) 杂交以及通过凝胶电泳的随后错配缺失检测 (Ravnik-Glavac 等,Hum.Mol.Genet.1994,3 :801)。还可使用″热裂解″,其为用来检测两个 DNA 之间的序列差异的方法,包括两种物质 (species) 杂交以及通过化学裂解的随后错配缺失检测 (Cotton,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1988,85 :4397)。此类方法优选在直接测序后。有利的是,RT-PCR 可以用于检测 FGFR2 转录产物中的异常,因为其允许将剪切突变的结果例如由于隐蔽位点的激活导致的外显子跳跃或异常剪接可视化。同样优选此类方法在直接测序后。

[0088] 也可有利地实施使用微阵列的技术,优选允许高通量筛选的微阵列技术,以用于检测 FGFR2 基因中的异常或用于检测 FGFR2 基因的表达或导致如本文所述信号传导增加的 FGFR2 通路中其它组分的基因。微阵列可以如此设计以使同一套相同的寡核苷酸与微阵列的至少两个选择的离散区域连接,从而可以容易地将与阵列的所述选择区域之一接触的正常样品,和与所述另一选择区域接触的测试样品比较。这些检测使用微流体管道 (microfluidic conduits),避免正常样品和测试样品的混合。有用的微阵列技术包括由 Nanogen,Inc(San Diego,Calif.) 等发展的那些和由 Affymetrix 发展的那些。然而,也被称为“基因芯片”或“DNA 芯片”的微阵列的所有类型,可以适合于鉴定突变。此类微阵列在本领域是已知的。

[0089] 在其上连接寡核苷酸的固相载体可由玻璃、硅、塑料(例如聚丙烯、尼龙)、聚丙烯酰胺、硝基纤维素或其它材料制成。用于将核酸连接到表面的一种方法为通过在玻璃板上印刷,大体如 Schena 等,Science 1995,270 :467-470 所述。该方法对于制备 cDNA 的微阵列而言尤其有用。还参见 DeRisi 等,Nature Genetics 1996,14 :457-460 ;Shalon 等,Genome Res.1996,6 :639-645 ;and Schena 等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1995,93 :10539-11286。

[0090] 还可使用用于制备微阵列的其它方法,例如通过掩膜 (Maskos andSouthern,Nuc.Acids Res.1992,20 :1679-1684)。原则上,可以使用任何种类的阵列,例如在尼龙杂交膜上的斑点印迹(参见 Sambrook 等, Molecular Cloning A Laboratory Manual(2nd Ed.), Vol.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989),尽管如本领域技术人员所意识到的,由于杂交体积将变小,优选非常小的阵列。对于这些检测,选择杂交和洗涤条件,以使连接的寡核苷酸″特异性结合″或″特异性杂交″到测试样品中存在的 FGFR2 基因的至少部分,即所述探针与具有互补核酸序列的 FGFR2 位点 (locus) 杂交、形成双链或结合,但不与具有非互补核酸序列的位点杂交。如本文所用,当如果较短的多核苷酸少于或等于 25 个碱基时,使用标准碱基配对规则不存在错配,或如果较短的多核苷酸多于 25 个碱基,存在不超过 5%的错配时,则认为一个多核苷酸序列与另一个互补。优选地,

多核苷酸完全互补（没有错配）。通过进行包括阴性对照的杂交检测可以容易地证明特异性杂交条件导致特异性杂交（参见，例如，Shalon 等，supra，and Chee 等，Science 1996，274 :610-614)。

[0091] 可以获得各种方法以用于检测和分析杂交事件。依赖于用于标记 DNA 探针的报告基团 (reporter group)（荧光团、酶、放射性同位素等），荧光分析地，比色分析地或通过放射自显影地进行检测和分析。通过观察和测定发射的放射，例如荧光放射或粒子发射，可以获得关于杂交事件的信息。

[0092] 当使用荧光标记的探针时，在转录阵列的各位点的荧光发射可以优选通过扫描共聚焦激光显微镜来检测。在一种实施方式中，进行使用合适激发线的分离扫描以用于所用的两种荧光团的每一种。作为选择，可以使用允许在对两种荧光团特异的波长下同时发生试样照亮 (simultaneous specimen illumination) 的激光，并且可以同时分析来自两种荧光团的发射（参见 Shalon 等 Genome Res. 1996，6 :639-695)。

[0093] 基于蛋白的检验

[0094] 作为分析 FGFR2 核酸的替代方案，可以基于蛋白质中的突变、或蛋白质的失控产物 (dysregulated production)，例如生产过剩 (overproduction) 来评价 FGFR2。

[0095] 在优选的实施方式中，通过免疫检验检测 FGFR2。例如 Western 印迹允许检测特定的变异、或 FGFR2 的存在或不存在。特别是，免疫检验可以检测 FGFR2 蛋白的特定（野生型或突变体）氨基酸序列。还可使用其它免疫检验形式代替 Western 印迹，如下所述以用于生产抗体。这些中之一为 ELISA 检验。

[0096] 在 ELISA 检验中，针对 FGFR2(FGFR2 的表位片段）的抗体，被固定在所选的表面，例如，能够结合蛋白质的表面例如聚苯乙烯微量滴定板的孔。洗涤以除去未完全吸收的多肽后，非特异性的蛋白例如胎牛血清白蛋白 (BSA) 的溶液可以结合到所选表面。这允许阻断在固定表面上的非特异吸收位点，从而降低由抗血清非特异结合到表面上的背景。然后固定表面 (immobilizing surface) 与样品接触，从而以有助于免疫复合物（抗原 / 抗体）形成的方式来测试。这可以包括用稀释剂例如 BSA、牛 γ 球蛋白 (BGG) 和 / 或磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS)/Tween 的溶液。然后使该样品在约 25 至 37 摄氏度下孵育 2 至 4 小时。孵育后，洗涤与样品接触的表面以除去未免疫复合的材料。洗涤方法可以包括用溶液，例如 PBS/Tween 或硼酸盐缓冲液洗涤。在测试样品和结合抗体之间形成特定的免疫复合物后，随后洗涤，免疫复合物形成的出现和平均量可以通过使免疫复合物遭受针对 FGFR2 突变体的二抗来确定，所述二抗识别蛋白质上的突变表位。为了提供检测方法，二抗可以具有相关的活性，例如酶活性，所述酶活性例如将在与合适的发色底物一起孵育时产生显色。然后可以通过使用例如可视光谱分光光度计测定颜色产生的程度来实现定量。

[0097] 典型地，检测抗体缀合到酶，例如过氧化物酶 ；蛋白质通过添加可溶发色团过氧化物酶底物例如四甲基联苯胺，然后添加 1M 硫酸来测定。测试蛋白浓度通过与标准曲线比较来确定。

[0098] 这些策略在 Current Protocols in Molecular Biology，V.2Ch.11 和 Antibodies，a Laboratory Manual，Ed Harlow，David Lane，Cold Spring Harbor Laboratory(1988)pp 579-593 中详细描述。

[0099] 作为选择，可以使用生化检验来检测 FGFR2 的表达或累积，例如通过检测通过聚

丙烯酰胺凝胶电泳分析的样品中带的存在或不存在；通过高效液相色谱（包括反相、离子交换和凝胶渗透）中任一种分析的样品中色谱峰的存在或不存在；通过分析毛细管电泳色谱(analyticalcapillary electrophoresis chromatography)中的FGFR2的存在或不存在；或任何本领域已知的其它定量或定性的生化技术。

[0100] 上述讨论的免疫检验包括使用针对FGFR2蛋白或其片段的抗体。此类抗体的生产描述于以下。

[0101] 抗-FGFR2抗体

[0102] 此类抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、单链、Fab片段、Fab表达文库和例如人源化抗体。

[0103] 本领域已知的各种方法可以用于生产针对FGFR2多肽或其衍生物或类似物的多克隆或单克隆抗体。对于抗体的生产，可以通过使用抗原性多肽注射来免疫各种宿主动物，包括但不限于兔、小鼠、大鼠、绵羊、山羊等。

[0104] 为了制备针对FGFR2多肽的单克隆抗体，可以使用任何通过在培养基中的连续细胞系生产抗体分子的技术。这些技术包括但不限于由Kohler和Milstein等最早开发的杂交瘤技术(Nature 256:495-497,1975)，以及三源杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等，Immunology Today 4:72,1983;Cote等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:2026-2030,1983)和EBV-杂交瘤技术，以生产人单克隆抗体(Cole等，in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,AlanR.Liss,Inc.,pp.77-96,1985)。在本发明其它实施方式中，可以在无菌动物中生产单克隆抗体（国际专利公开号WO 89/12690,1989年12月28日出版）。

[0105] 根据本发明，可以采用所述用于生产单链抗体的技术（美国专利Nos.5,476,786和5,132,405 to Huston;美国专利No.4,946,778)来生产FGFR2多肽特异性单链抗体。实际上，可以将这些基因递送在体内表达。本发明的其它实施方式使用描述用于构建Fab表达文库的技术(Huse等，Science 246:1275-1281,1989)来允许快速和容易鉴定就FGFR2多肽，或其衍生物或类似物而言具有所需特异性的单克隆Fab片段。

[0106] 包含抗体分子的独特型的抗体片段可以通过已知技术产生。例如，此类片段包括但不限于：可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的$F(ab')_2$片段、可以通过减少$F(ab')_2$片段的二硫桥键产生的Fab′片段，以及可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的Fab片段。

[0107] 在生产抗体时，筛选所需的抗体可以通过本领域已知的技术来实现，例如放射性免疫检测、ELISA(酶联免疫吸附检测)、"三明治"免疫检测、放射免疫检测、凝胶扩散沉淀素反应(gel diffusion precipitinreactions)、免疫扩散检测、原位免疫检测（例如使用胶体金、酶或放射性同位素标记）、western印迹、沉淀反应、凝集检测（例如，凝胶凝集检测、血凝检测）、补体结合检测、免疫荧光检测、蛋白A检测和免疫电泳检测等。在一种实施方式中，通过检测在一抗上的标记来检测抗体结合。在另一实施方式中，通过检测二抗或试剂与一抗的结合来检测一抗。在另一实施方式中，二抗被标记。本领域已知许多方法用于在免疫检测中检测结合，并且在本发明的范围内。

[0108] 诊断试剂盒

[0109] 本发明还提供用于确定受试者中FGFR2基因内序列的试剂盒，以诊断或分类子宫

内膜癌。该试剂盒包括用于确定在变异位置的序列的装置，并且可以任选地包括用于分析突变的数据。用于序列确定的装置可以包括合适的基于核酸的和免疫学上的试剂。优选地，该试剂盒还包括合适的缓冲液，对照试剂（合适时），以及用于确定在变异位置的序列和用于诊断或分类受试者中的子宫内膜癌的说明。

[0110] 基于核酸的诊断试剂盒

[0111] 本发明提供用于检测生物样品中 FGFR2 遗传变异的基于核酸的方法。FGFR2 基因中特定位置的序列使用本领域已知的合适方法确定，不限制地包括一种或多种下述技术：使用用于 PCR 扩增的特异性探针的杂交、限制性片段化 (restriction fragmentation)、直接测序、SSCP、以及本领域已知的其它技术。

[0112] 在一种实施方式中，诊断试剂盒包括以下组分：

[0113] a) 探针 DNA：该探针 DNA 可以被预标记，作为选择，该探针 DNA 可以是未标记的，用于标记的成分可以包括在试剂盒中单独的容器中，以及

[0114] b) 杂交试剂：该试剂盒还包括其它合适封装的特定杂交策略所需的试剂和材料，包括固相基质（如果使用），和标准品。

[0115] 在另一实施方式中，诊断试剂盒包括：

[0116] a) 序列确定引物：测序引物可以被预标记，或可以包含亲和纯化或连接部分；以及

[0117] b) 序列确定试剂：该试剂盒还包括其它合适封装的特定测序策略所需的试剂和材料。

[0118] 在一优选实施方式中，该试剂盒包括测序引物板，其序列与临近变异位置的序列相对应。

[0119] 基于抗体的诊断试剂盒

[0120] 本发明还提供基于抗体的方法以用于检测生物样品中 FGFR2 蛋白的突变（或野生型）。该方法包括以下步骤：(i) 使样品与一种或多种抗体制剂在生物样品中的 FGFR2 和抗体之间能够形成稳定抗原 - 抗体复合物的条件下接触，其中各抗体制剂对突变体（或野生型）FGFR2 是特异的；和 (ii) 使用本领域已知的任何合适的方法检测在步骤 (i) 中形成的任何抗原 - 抗体复合物，其中复合物的检测出指示突变体（或野生型）FGFR2 的存在。

[0121] 典型地，免疫检验使用标记的抗体或标记的抗原性组分（例如与样品中的抗原就与抗体的结合进行竞争的那些）。合适的标记不限制性的包括基于酶的、荧光、化学发光的、放射性或染料的分子。从探针扩增信号的检验也是已知的，例如，使用生物素和亲和素的那些，以及酶标记的免疫检验，例如 ELISA 检验。

[0122] 诊断试剂盒典型地包括一种或多种以下组分：

[0123] (i)FGFR2- 特异性抗体。该抗体可以被预标记，作为选择，该抗体可以是未标记的，用于标记的成分可以包括在试剂盒中单独的容器中，或提供第二标记的抗体；和

[0124] (ii) 反应组分：该试剂盒还可以包含其它合适封装的特定杂交策略所需的试剂和材料，包括固相基质（如果使用），和标准品。

[0125] 上述试剂盒优选包括用于实施和阅读测试的说明书以诊断或分类子宫内膜癌。此外，在优选的实施方式中，诊断试剂盒适合高通量和 / 或自动化操作。

[0126] 治疗子宫内膜癌的方法

[0127] 本发明还提供治疗特征在于FGFR2激活的子宫内膜癌的方法。该治疗方法优选包括抑制受试者中的FGFR2活性。通常该方法包括与药学上可接受的载体一起施用给需要此类治疗的患者以有效量的调控FGFR2表达或活性的试剂。例如，治疗试剂可以为FGFR2反义核酸、抗FGFR2细胞内抑制剂抗体或小分子抑制剂。

[0128] 治疗组分包括作为有效活性试剂的FGFR2抑制剂。合适抑制剂的实例包括抑制FGFR2 DNA合成及其表达产物（例如，FGFR2 RNA或蛋白）的那些抑制剂。在一示例性实施方式中，抑制剂为小分子FGFR2抑制剂，例如PD173074。在另一示例性实施方式中，使用RNA干扰，其中抑制剂为抑制RNA合成和/或翻译的试剂，例如小抑制RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)或核酶。

[0129] 在另一实施方式中，抑制剂包括针对FGFR2、优选突变FGFR2，特别是针对其至少一个Ig结构域的抗体。优选该抗体对FGFR2的IgII和Ig III结构域之间的突变的连接子区域，例如针对S252W突变是特异的。通常，优选的抗体为单克隆抗体，特别是改性的抗体以使它们不诱导人类受试者中免疫原性反应（例如，人源化抗体）。阻断FGFR2活性的抗体可以根据本领域技术人员已知的任何标准方法生产和选择，例如在诊断应用上下文中所述的那些。

[0130] 细胞内抗体（有时也称为“内抗体”）已经用于调控许多系统中的细胞内蛋白的活性（参见Marasco,Gene Ther.1997,4:11;Chen等,Hum.Gene Ther.1994,5:595），例如病毒感染(Marasco等,Hum.Gene Ther.1998,9:1627)和其它感染性疾病(Rondon等,Annu.Rev.Microbiol.1997,51:257)、以及癌基因，例如p21(Cardinale等，FEBS Lett.1998,439:197-202;Cochet等,Cancer Res.1998,58:1170-6)，myb(Kasono等,Biochem Biophys Res Commun.1998,251:124-30)，erbB-2(Graus-Porta等，Mol Cell Biol.1995,15:1182-91)等。可以采用该技术来通过表达抗FGFR2细胞内抗体来抑制FGFR2活性。

[0131] 合适的其它抑制剂包括针对FGFR2，更优选突变的FGFR2同工型的反义寡核苷酸。载体包括根据本发明的编码反义核酸的序列，并且可以通过任何已知的方法，例如本领域可利用的基因治疗的方法来施用该载体。对于基因治疗方法的综述，参见Goldspiel等，ClinicalPharmacy 1993,12:488-505;Wu and Wu,Biotherapy 1991,3:87-95;Tolstoshev,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.1993,32:573-596;Mulligan,Science 1993,260:926-932;and Morgan and Anderson,Ann.Rev.Biochem.1993,62:191-217;May,TIBTECH 1993,11:155-215.Methods commonly known in the art of recombinantDNA technology that can be used are described in Ausubel等,(eds.),1993,Current Protocols in Molecular Biology,JohnWiley&Sons,NY;Kriegler,1990,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY;and in Chapters 12 and13,Dracopoli等,(eds.),1994,Current Protocols in HumanGenetics,John Wiley&Sons,NY。

[0132] 如本文所用的术语"治疗"是指在受试者的子宫内膜癌的发展或进程中的治疗性干预。术语"治疗"还包括预防已经诊断为患有已知FGFR2激活突变的受试者中子宫内膜癌的发展或复发。

[0133] 在本文所用的术语"治疗有效量"来指足以调控，例如降低FGFR2活性水平例如约10％，优选约50％，更优选约90％的量或剂量。优选地，治疗有效量可以改善或呈递在受

试者的活性、功能或应答上的临床显著的缺陷。作为选择，治疗有效量足以引起受试者中临床显著状况的改进。

[0134] FGFR2 抑制剂抑制 FGFR2 活性或表达，并且与药学上可接受的载体一起有利地配制在药物组合物中。然后该物质可被称为针对子宫内膜癌的活性成分或治疗试剂。

[0135] 如上讨论，活性成分的浓度或量依赖于所需剂量和施用方案。合适的剂量范围极大地依赖于所用的 FGFR2 抑制剂、但可以包括仅旨在举例说明的约 0.01mg/kg 至约 100mg/kg 体重每天。

[0136] 药物组合物还可以包括其它生物学上的活性化合物。术语″药学上可接受的″是指分子实体和组合物，其为生理学上可忍受的，并且当施用给人类时，典型地不产生过敏或类似不良反应，例如嘈杂 (gastricupset)、头晕等。优选地，如本文所用，术语″药学上可接受的″是指被联邦或国家政府批准或在美国药典或其它公认的药典上列出，以用于动物，特别是人类。术语″载体 (carrier)″是指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体 (vehicle)。此类药物载体可为无菌液体，例如水或油，包括石油、动物、植物或合成来源的那些，例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水和生理盐水溶液以及右旋糖和甘油的水溶液优选用作载体，特别用于注射液。合适的药物载体描述于 E.W.Martin 的″ Remington′ s Pharmaceutical Sciences″ 。

[0137] 根据本发明，本发明的药物组合物可以胃肠外、经粘膜，例如口腔（经口）、鼻、阴道或直肠、或透皮地引入。胃肠外途径包括静脉内、小动脉内、肌肉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内施用。直接靶向子宫，例如通过直接施用给子宫或子宫内膜 (uterus lining)，可能是有利的。

[0138] 在一种实施方式中，治疗化合物可以以受控的释放系统来递送。例如，多肽可以通过以下施用：以持续泵入的方式使用静脉输注，在合适的聚合物基质例如聚乳酸 / 聚谷氨酸 (PLGA)、包含胆固醇和活性成分的混合物的小球 (SilasticR.TM ;Dow Coming，Midland，Mich. ：参见美国专利 No.5,554,601)、皮下灌输、可灌输的渗透泵、透皮贴剂、脂质体或其它施用模式。

[0139] 本发明的实施例仅示例性地提供和理解，不限制本发明或所附权利要求的范围。本领域技术人员将意识到本发明可以以根据此处权利要求和说明书的任何形式实施。

[0140] 实施例 1

[0141] 子宫内膜癌中激活 FGFR2 突变的检测

[0142] 我们的发现显示 FGFR2 的激活和过度表达在子宫内膜肿瘤发生上起作用。外显子 8 比外显子 9 长 3 个核苷酸，因此 FGFR2b 同工型比 FGFR2c 同工型长一个密码子。信号传导的特异性还通过受体、配体和硫酸类肝素蛋白多糖 (heparin sulphate proteoglycans) 的组织特异性表达来提供 (Allen 等，2001 ；Fiore，2001)。由于 FGFR2″ b″ 和″ c″ 同工型长度的差异，所有突变相对于上皮表达的 FGFR2b 同工型 (SEQ IDNO ：2 ；NP_075259.2) 编号。对于外显子 8 下游出现的那些，在本文我们在括号和在表 2 中提供相对于 FGFR2c 同工型 (SEQ ID NO ：3 ；NP_000132.1) 编号的相应突变。在两个子宫内膜细胞系中鉴定出的 N550K(N549K) 变异体可能导致与在患有 Crouzon 综合症 (Kan 等，2002) 和软骨发育不良 (Bellus 等，1995) 的患者中的 FGFR2 和 FGFR3 中已经报道的生殖细胞系错义变化相同或类似的受体激活（图 1)。

[0143] 接下来我们设法确定在原发性子宫癌中激活FGFR2突变的光谱和频率。之前已经在生殖细胞系（外显子7,8,10,13和15）中鉴定出FGFR2和FGFR3中激活突变的外显子的直接测序就187种原发性子宫癌进行，这187种原发性子宫癌代表肿瘤的所有级别和阶段以及子宫内膜癌的主要组织学亚型（表1）。

[0144] 表1子宫内膜癌患者人口统计、疾病特征和FGFR2突变状态

[0145]

	群组 n=187	
	全部子宫癌群组 n%	具有FGFR2突变的病例 n%
年龄（年）	66.5 ± 11.1*	
种族		
白种人	150 (80)	18 (12)
美国黑人	33(18)	1(3)
其它或非特异的	4(2)	0(0)
组织学		
子宫内膜样	115(61)	18 (16)
浆液性或混合浆液性/子宫内膜样	45 (24)	1(2)
透明细胞	8(4)	0(0)
未另外指出的腺癌	1 (<1)	0(0)
癌肉瘤	17(9)	0(0)
子宫内膜间质肉瘤	1 (<1)	0(0)
阶段		
I	79(42)	9(11)
II	16(9)	1(6)
III	67 (36)	6(9)
IV	25 (13)	3(12)
FIGO 级别		
1	49 (26)	7(14)
2	39 (21)	9(23)
3+	99 (53)	3(3)

[0146] *平均 ± 标准偏差

[0147] +伴随分类为级别3的癌肉瘤和肉瘤具有浆液性或透明细胞特征的所有癌

[0148] 应该注意，在ESS-1中报道的A315T衍生自在间充质表达的同工型（FGFR2c）中出现的子宫内膜间质肉瘤，并且在外显子9(NM_000141)中就突变筛选所有癌肉瘤（同时具有恶性上皮和间质要素的肿瘤）。对于肿瘤的亚类（32个子宫内膜样子宫内膜癌+17个癌肉瘤），测序包含第二和第三免疫球蛋白结构域（下文中称为D2和D3）、跨膜结构域和整个激酶结构域的外显子5-18以确定新体细胞突变的相对发生。除在外显子7,10,13和15中发现的突变外，在该更广泛的突变筛选中鉴定出另一突变，在外显子18中的2bp缺失。突变在19个病例（10％）中鉴定出。115个子宫内膜样子宫内膜癌中的18个（16％）具有突变，以及一个浆液性癌（45分之1,2％）含有突变。在癌肉瘤和透明细胞癌中未看到突变。

[0149] 表2在原发性子宫内膜癌中的FGFR2突变的光谱

[0150]

病例编号	FGFR2b 核苷酸[a]	FGFR2b 密码子[b]	FGFR2c 密码子[c]	组织型	阶段	级别	MSI 状况
AN3 CA[d]	A929G	K310R	K310R	子宫内膜样			阳性
AN3 CA[d]	T1650G	N550K	N549K	子宫内膜样			阳性
MFE296	T1650G	N550K	N549K	子宫内膜样			阴性
				间质			
ESS-1	G943A[e]		A315T[f]	肉瘤			阴性
1359	C755G	S252W	S252W	子宫内膜样	I	2	阳性
1574	C755G	S252W	S252W	子宫内膜样	I	2	阳性
1492[d]	C755G	S252W	S252W	子宫内膜样	I	1	阴性
1484	C755G	S252W	S252W	子宫内膜样	III	3	阴性
1316	C755G	S252W	S252W	子宫内膜样	III	1	阴性
1792	C755G	S252W	S252W	子宫内膜样	III	1	阳性
1438	C755G	S252W	S252W	浆液性	IV	3	阴性
1482	C755G	S252W	S252W	子宫内膜样	IV	2	阳性
1267	T1650A	N550K	N549K	子宫内膜样	II	2	阳性
1391	T1650A	N550K	N549K	子宫内膜样	III	2	阳性
1528	T1650G	N550K	N549K	子宫内膜样	IV	2	阴性
1655	A1127G	Y376C	Y375C	子宫内膜样	III	2	阳性
1492[d]	A1127G	Y376C	Y375C	子宫内膜样	I	1	阴性
1684	C1118G	S373C	S372C	子宫内膜样	I	1	阳性
1094	T1147C	C383R	C382R	子宫内膜样	I	1	阳性
1361	T1175G	M392R	M391R	子宫内膜样	I	1	阳性
1744	A1642G	I548V	I547V	子宫内膜样	III	2	阳性
1717	A1978G	K660E	K659E	子宫内膜样	I	2	阴性
1272	内含子 10 A>C+2			子宫内膜样	I	1	阴性
1289	2290-91 缺失 CT	移码	移码	子宫内膜样	I	3	阳性

[0151] [a] 相对于 NM_022970.2 编号，[b] 相对于 P_075259.2 编号，[c] 相对于 NP_000132.1 编号，[d] 在一样品中两个突变。[e] 将 NM_000141 作为 ESS-1 的编号衍生自表达 FGFR2c 同工型的间质肉瘤。[f] 在 FGFR2b 的等效位置没有丙胺酸。

[0152] 对于所有突变，测序组成性 DNA 以确认突变体细胞地发生。在子宫内膜样病例中，在具有错配修复缺陷的病例（49 分之 11，22％）中与正常错配修复（61 分之 6，10％）相比，存在过量的 FGFR2 突变，虽然未达到统计学显著性（$p = 0.10$）。应该注意未就 5 种肿瘤确定微卫星不稳定性（MSI）状态。我们未包括在 MSI 阳性病例中的 2bp 缺失，因为其不可能是激活的，并因此可以代表旁观者突变。虽然存在过量的证明微卫星不稳定性的肿瘤中的突变，我们主张在 FGFR2 中的这些突变由于以下事实是致病的：在 MSI 阳性和微卫星稳

定 (MSS) 的原发性肿瘤中都观察到相同的突变，大多数突变与在生殖细胞系中鉴定出的激活突变相同，如果它们是与微卫星不稳定性相关的旁观者突变，不能预期该巧合。

[0153] 在 11 个不同突变中我们鉴定出，7 个之前已经报道与颅缝早闭或骨骼发育不良综合症相关，一个 (A315T) 出现在已经报道类似错义突变 (A315S) 的 FGFR2c 残基处，4 个突变是新的 (图 1)。根据肿瘤组织型的突变分布，以及含有 FGFR2 突变的肿瘤级别和阶段总结于表 2。S252W 突变为鉴定出的最常见突变，在 8 个独立肿瘤中看出。该突变出现在 D2 和 D3 之间的连接子区域，其提供与 FGF 配体的关键接触。S252W 和临近的 P253R 突变引起 Apert 综合症，最严重的颅缝早闭综合症，其特征在于颅缝早闭以及严重的手和脚的并趾 (Park 等，1995)。

[0154] 使用生化、结构和生物检验的研究的组合已经显示，S252W 突变证明增加的配体结合和配体异位 (ligand promiscuity)(Ibrahimi 等，2001 ；Ibrahimi 等，2004 ；Yu 等，2000)。使用 S252W FGFR2c 和 S252W FGFR2b 突变体受体已经进行广泛的体外亲和研究，显示对于多个 FGF 该突变增加受体的结合亲和性 2-8 倍，除了违反因作为选择的剪接同工型而给予的配体结合特异性之外 (Ibrahimi 等，2004)。

[0155] 在该肿瘤板上 S252W 突变的流行暗示在子宫内膜样子宫内膜癌中该突变的阳性选择。虽然 FGF 配体的表达还未在正常周期的子宫内膜和子宫内膜癌中检查出，存在几个研究，其报道 FGF2 的表达在管腔和腺上皮的基部占优势 (Moller 等，2001 ；Sangha 等，1997)。几个研究还显示 FGF2 表达在与复杂增生和腺癌相关的腺上皮中的增加 (Gold 等，1994)。子宫内膜上皮细胞正常仅表达不能结合 FGF2 的 FGFR2b 同工型。然而，在这些细胞中 S252W 突变的获得将预期导致 S252W FGFR2b 受体的自分泌激活。S252W 突变还能够使突变体受体结合在子宫内膜基质中高度表达的 FGF9(Tsai 等，2002)。S252W 突变的流行暗示不同的 FGFR2 同工型在介导子宫内膜中的定向上皮 - 间充质信号传导上起重要作用。

[0156] 鉴定出 4 个其它细胞外结构域突变，在细胞系中的 K310R 和 A315T，在原发性肿瘤中的 S373C(S372C) 和 Y376C(Y375C)，后一突变在两个独立肿瘤中看出 (图 1，表 2)。在这些导致额外的丝氨酸残基的损失或获得的 FGFR2c(或平行的 FGFR3) 中的细胞外突变上进行的功能性研究已经证明，这些错义变化导致由于形成分子间二硫键而不是内部分子二硫键引起的组成性受体二聚化 (Naski 等，1996)。在生殖细胞系中，细胞外近膜 FGFR2c 突变 S372C 和 Y375C 已经在几个患有 Beare-Stevenson 皮肤旋纹综合症中报道，所述 Beare-Stevenson 皮肤旋纹综合症为具有宽范围其它临床特征的颅缝早闭综合症 (Przylepa 等，1996)。在 FGFR3c 中的平行突变 (G370C 和 Y373C) 还与严重的软骨增生、致死性侏儒 I 型 (thanatophoric dysplasia type I) 相关 (Rousseau 等，1996)。与 A315S 突变类似，A315T 突变可能赋予 FGFR2c 不正常地结合 FGF10 的能力 (Ibrahimi 等，2004)。

[0157] 我们在跨膜结构域内鉴定出两个突变，C383R(C382C) 和 M392R(M391E)。我们鉴定出的 C383R 突变与在 FGFR3(G380R) 中的平行位置处的非保守错义突变类似，其占患有软骨发育不全的患者的超过 95％ (Shiang 等，1994)。已经报道 FGFR3 G380R 突变增加受体半衰期和赋予受体对配体诱导的内在化的抗性 (Monsonego-Ornan 等，2000)。更近期的研究显示尽管野生型受体经受在配体刺激后的溶酶体降解，突变的 G380R 突变体受体从溶酶体再循环回原生质膜，从而增强 FGF 信号传导 (Cho 等，2004)。新的 M392R 突变为与良好研究的与具有黑棘皮病的 Crouzon 综合症相关的 FGFR3 A391E 突变最接近的两个残基 (Meyers

等,1995)。A391E 突变的生物物理分析证明在 FGFR3 跨膜结构域的二聚化自由能上的变化符合二聚物的稳定性 (Li 等,2006)。虽然之前在 FGFR2c 中的 C382R 突变已经显示导致组成性受体磷酸化和 NIH3T3 细胞的转化 (Li 等,1997),通过这些跨膜 FGFR2b 突变的受体激活的确切机制的解释仍然有待探索。

[0158] 除了细胞外和跨膜结构域突变之外,在 FGFR2 激酶结构域中鉴定出 4 个不同突变。虽然这些中的两个,N550K(N549K) 和 K660E(K659E),尚未在任何颅缝早闭综合症中鉴定为生殖细胞系突变,在 FGFR2c 中的类似 N549H 突变与 Crouzon Syndrome 相关 (Kan 等,2002),并且在平行位置等同的突变已经在与软骨发育不良 (N540K) 和致死性侏儒 II(K650E) 相关的 FGFR3 中看到过 (Naski 等,1996)。N549H 和 K650N 突变体 FGFR2c 激酶的晶体结构显示,这些突变通过在激酶铰链区弛缓 (loosening) 新的自体抑制剂分子刹车来激活激酶 (M.Mohammadi,未出版的结果)。

[0159] 新的 IVS10+2A ＞ C 剪接突变的病理后果是未知的,然而尝试推测其将导致增加的受体信号传导。在 FGFR1-3 的细胞内近膜区域中存在另外的剪接,导致外显子 10 下游的两个氨基酸,缬氨酸和苏氨酸 (VT) 的包含或排除。IVS10+2A ＞ C 突变导致 GCAAGT 的非典型剪接供体位点,并假定在基因组中非典型 GC-AG 供体 / 受体对比 GA-AG 供体 / 受体对 15-30x 更频繁的观察到 (Burset 等,2000 ;Chong 等,2004)。IVS10+2A ＞ C 突变可能导致 +VT 同工型的相对比例增加。将 FGFR 连接到 MAPK 以及 PI3K 通路的 FRS2 适配子信号传导蛋白结合包括另外的剪接 VT 的鼠 FGFR1 的近膜结构域中的序列 (Burgar 等,2002)。这样,IVS10+2A ＞ C 突变可能导致增加 +VT 转录水平的更有效的剪接供体位点,这反过来又将导致增加的 FRS2a 介导的信号传导。

[0160] 一种子宫内膜肿瘤显示携带新的 2bp 缺失 2287-88 CT,导致从 LTTNE 至 LTHNQStop 的移码和变化,所述 LTHNQStop 在密码子 766,外显子 18 的末尾密码子具有未成熟切断。该 2bp 缺失可能导致截短的 FGFR2 受体,其以与 FGFR2 的类似截短的 C3 转录产物类似的方式组成性激活 (Moffa 等,2004) 或作为选择其可以简单地由旁观者突变表示。

[0161] 两个子宫内膜样品显示携带两个突变,携带 N550K(N549K) 和 K310R 的 AN3 CA MSI 阳性细胞系,以及携带 S252W 和 Y376C(Y375C) 的 MSI 阴性肿瘤 1492。在相同肿瘤中两个推测的显性激活突变的发现是未预期的。有趣的是,注意在每一病例中,伴随着配体依赖性 S252W 或未表征的 K310R,存在已知要导致组成性配体非依赖性受体激活的突变,暗示对于在子宫内膜上皮中的增加的 FGFR2 激活而言可能存在其它选择压力。

[0162] 实施例 2

[0163] 通过抑制 FGFR2 治疗子宫内膜癌

[0164] 材料和方法

[0165] 测序分析

[0166] 如之前所述 (8) 进行突变分析。PCR 引物序列为 M13 接尾 (tailed),并且测序在两个方向进行。引物序列通过从作者请求获得。

[0167] 细胞培养和试剂

[0168] 人类子宫内膜 MFE296 细胞系购自 European Collection of CellCultures(Salisbury,Wiltshire,UK)。人类子宫内膜细胞系 AN3CA,HEC1A,Ishikawa,RL952 和 KLE 由 Dr.Paul Goodfellow 提供 (Washington University,St.Louis,MO)。MFE296

细胞在补充有 10％胎牛血清 (FBS)、2mM L- 谷氨酰胺和青霉素 - 链霉素的 MEM 中生长。AN3CA 细胞在补充有 10％ FBS、非必需氨基酸、2mM L- 谷氨酰胺和青霉素 - 链霉素的 DMEM 中培养。HEC1A 细胞在补充有 10％ FBS 和青霉素 - 链霉素的 50％ DMEM 和 50％ RPMI 1640 中生长。Ishikawa 和 RL952 细胞在补充有 10％ FBS、非必需氨基酸和青霉素 - 链霉素的 DMEM 中生长。KLE 细胞在补充有 10％ FBS 和青霉素 - 链霉素的 50％ DMEM 和 50％ F-12 培养基中生长。所有培养基、FBS 和补充物购自 Invitrogen(Carlsbad,CA)。所有细胞在包含 5％ CO_2 的加湿气氛在 37C 下生长。PD173074 购自 Sigma-Aldrich(St.Louis,MO),在原液浓度 1mM 的 DMSO 中重构,贮存在 -20C 下。KH1-LV 慢病毒载体 (lentivector) 质粒由 Dr.Maria S.Soengas 友好提供 (University of Michigan,Ann Arbor,MI),pNHP,pVSV-G,和 pTAT 慢病毒 (lentiviral) 封装质粒由 Dr.MatthewHuentelman 友好提供 (Translational Genomics Research Institute,Phoenix,AZ)。

[0169] shRNA 设计

[0170] 针对以下序列设计靶向 FGFR2 的两个不同外显子 (外显子 2 和外显子 15) 的两个独立的 shRNA 构建体 :靶向外显子 2 的 shRNA :TTAGTTGAGGATACCACATTA(SEQ ID NO :4 ;核苷酸 79-99,NM_022970) ;靶向外显子 15 的 siRNA :ATGTATTCATCGAGATTTA(SEQ ID NO :5 ;核苷酸 1866-1884,NM_022970)。未沉默的 shRNA 构建体还可基于来自 Qiagen 的未沉默的 shRNA 序列 (SEQ ID NO :6 ;AATTCTCCGAACGTGTCACGT) 设计,并用作阴性对照。将相应的寡核苷酸退火,并克隆入 KH1-LV 慢病毒载体。KH1-LV 自体失活慢病毒 (lentiviral) 载体允许短发夹序列在 H1 启动子的控制下表达,以及在人类泛素 -C 启动子的控制下的 GFP 的表达,能够容易地监视转导效率。克隆策略获自请求时的作者。

[0171] 慢病毒生产

[0172] 75-cm^2 培养瓶用 50mg/ml 聚 -D- 赖氨酸 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) 包被,并以 $8X10^6$ 细胞每瓶的密度接种 HEK293FT 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。第二天,用 7.1μg pNHP,2.8μg gpVSV-G,0.5μg pTAT 和 3.5μg KH1-LV 使用 SuperFect 转染试剂 (Qiagen,Valencia,CA) 以 SuperFect(μl) 比 DNA(μg) 为 4 ： 1 的比例,根据制造商策略转染该细胞。包含病毒的培养基在 24 和 40 小时后收集,合并,过滤通过 0.45-mm 低蛋白结合 Durapore 过滤器 (MilliporeCorporation,Billerica,MA) 以除去细胞碎片,等分病毒制品并在 -80℃下贮存直至使用。

[0173] 慢病毒转导

[0174] 细胞在 6 孔板上以 $4x10^5$ 细胞每孔的密度铺平板。第二天,细胞用慢病毒原液在 6μg/ml 聚凝胺 (Sigma-Aldrich,St.Louis,MO) 的存在下感染。对于各试验使用空载体和未沉默的 shRNA 感染作为对照。如通过 eGFP 可视化确定的,在各 shRNA 试验中实现了大于 90％的转导效率 (数据未示出)。

[0175] 生长抑制检验

[0176] 感染 24 小时后,细胞被胰蛋白酶化并在 96 孔板上在完全培养基中以 5,000 细胞每孔一式三份地铺平板,并使用磺酰罗丹明 B(SRB) 检测评估增殖 (Sigma-Aldrich, St.Louis,MO)。在指定的时间点,孔用 10％ (wt/vol) 三氯乙酸固定,用 SRB 染色 30 分钟,并用 1％ (vol/vol) 乙酸洗涤。将蛋白结合染料溶解于 10mM Tris 碱溶液,在 510nm 下测定吸光度。对于 PD173074 药物研究,细胞在完全培养基中以 5,000 细胞每孔在 96 孔板上铺

平板。第二天，加入增加浓度的 PD 173074，并在 72 小时后使用 SRB 检验评估增殖。

[0177] 膜联蛋白 V-FITC 标记的凋亡细胞

[0178] 根据制造商说明书 (BioVision, Inc.Mountain View, CA)，使用膜联蛋白 V-FITC 染色以测定在经受细胞凋亡的细胞上的磷脂酰丝氨酸曝露。用 siRNA 而不是 shRNA 构建体实现击倒，因为后者还表达与 FITC 具有重叠发射光谱的 GFP。在 6 孔板上以每孔 $2.5x10^5$ 细胞铺平板。24 小时后，细胞用 25nM 未沉默的 (NS)siRNA 或 FGFR2 siRNA X2，使用 Lipofectamine 2000 转染试剂转染。使 siRNA 双链体与 Lipofectamine2000 在室温下形成复合物 20 分钟，转染在 37℃下进行 24 小时。转染 48 小时后，收集漂浮和粘附 (attached) 的细胞，在冷 PBS 中洗涤，在膜联蛋白结合缓冲液中 (10mM Hepes(pH 7.4)，140mM NaCl，2.5mM CaCl2) 再悬浮，用 500ng/mL 膜联蛋白 V-FITC 和 1μg/mL 碘化丙啶 (Sigma-Aldrich，St.Louis，MO) 染色，使用 CyAn ADP 流式细胞仪和 Summit 软件，版本 4.3(Dako Cytomation，Carpinteria，CA) 就膜联蛋白阳性细胞分析。对于 PD173074 研究，在 6 孔板上以 $1x10^5$ 细胞每孔的密度将细胞铺平板。24 小时后，用 1μM PD173074 或 DMSO(溶剂对照) 处理细胞，并且在指定的时间点，用膜联蛋白 V-FITC 染色和通过流式细胞仪分析。

[0179] 细胞周期分析

[0180] 细胞在 6 孔板上以 $1x10^5$ 细胞每孔的密度铺平板。第二天，用 1μM PD173074 或 DMSO(溶剂对照) 处理细胞。72 小时后，细胞如 {Krishan，1975#28} 所述用碘化丙啶染色和通过流式细胞仪分析。使用 ModFit 软件 (Verity Software House，Inc.Topsham，ME) 进行细胞周期分析。

[0181] Western 印迹分析

[0182] 细胞以 $2x10^6$ 细胞每皿的密度在 $60mm^2$ 皿中铺平板。第二天，细胞在 0.2％ FBS 饥饿培养 18 小时，或维持在完全培养基中，然后与增加浓度的 PD 173074 一起孵育 3 小时。细胞在冰冷的 PBS 中洗涤，在激酶缓冲液 [20mM Hepes pH7.4，2mM EGTA，1％ Triton X100，10％甘油，1mMNa_3VO_4，1mM NaF，100uM AEBSF，和 1 片 /10mL Mini CompleteProtease Inhibitor(Roche Molecular Biochemicals，Indianapolis，IN)] 中裂解，在冰上简短地超声波处理，使用具有牛 γ 球蛋白标准品的 Quick Start Bradford Reagent(Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA) 评估蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 在 4-12％梯度凝胶上分离等量的蛋白，并转移到聚偏二氟乙烯膜 (Invitrogen，Carlsbad，CA) 上。膜用抗体免疫印迹到磷酸化的完全 AKT、ERK1/2、p38、STAT-3 和 STAT-5、PLCγ 和完全 PTEN(Cell Signaling Technology，Beverly，MA)。用 BekC17 抗体检测 FGFR2 表达 (Santa Cruz Biotechnology，Inc.，Santa Cruz，CA)。使用辣根过氧化物酶缀合的羊抗鼠或抗兔二抗 (Biomeda，FosterCity，CA)，然后化学发光染色。对于 shRNA 研究，裂解产物在 shRNA 转导 48 小时后收集，并如上处理。

[0183] 统计分析

[0184] 使用 GraphPad Prism version 4.0 for Macintosh 进行统计分析 (GraphPad Software，San Diego，CA)。通过剂量 - 效应分析使用具有可变斜率的 S 形剂量效应的非线性衰退计算 IC50 值。通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 分析凋亡数据。处理组之间的显著差异使用 T 检验 (Student′ s t test) 确定。当 $P < 0.05$ 时所有 P 值认为是显著的。数据表示为平均 ±SE。

[0185] 结果

[0186] 原发性子宫内膜癌中的FGFR2,PTEN和KRAS2突变的模式:伴发的(concomitant)FGFR2和PTEN突变以及相互排斥的FGFR2和KRAS2突变。

[0187] 假设PTEN和KRAS2突变在子宫内膜样子宫内膜癌中是常见的,我们首先设法确定FGFR2激活是否出现在具有在PTEN上的功能损失突变和/或在KRAS上的功能获得性突变的肿瘤中。我们测序了我们已知FGFR2突变状况的116个子宫内膜肿瘤中的所有九个PTEN的外显子和KRAS的外显子1。由于可获得DNA的量的限制,我们仅测序KRAS的外显子1,由于在外显子1中的突变占子宫内膜样子宫内膜癌中KRAS突变的高于96%(The Catalog of Somatic mutations in Cancer,http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)。突变分析揭示PTEN突变在70%(82/116)的肿瘤中。在这些具有FGFR2突变的肿瘤中,77%(14/18)还携带PTEN突变,证明在FGFR2中的突变经常与子宫内膜样子宫内膜肿瘤中的PTEN突变一起出现。KRAS突变在12%(15/116)的肿瘤中鉴定出。在GFR2和KRAS中的激活突变是相互排斥的。值得注意的是,一种肿瘤拥有在FGFR2中的移码突变(2290-91缺失CT),并且包含KRAS突变。然而,由于该FGFR2突变的致病性质是未知的,我们认为在FGFR2中的激活突变与在KRAS中的激活突变是相互排斥的。PTEN激活突变与KRAS和FGFR2突变一起出现(表3)。

[0188]

病例编号	FGFR2 突变	KRAS 突变	PTEN 突变	阶段	级别	MSI
AN3CA	pLys310Arg; Asn550Lys	wt	p.Arg130fsX4			+
MFE296	p.Asn550Lys	wt	wt			-
1359	p.Ser252Trp	wt	wt	I	2	+
1574	p.Ser252Trp	wt	p.[Gly44AlafsX7(+)Y68X]	I	2	+
1492	p.Ser252Trp; Tyr376Cys	wt	p.Arg130Gly	I	1	-
1484	p.Ser252Trp	wt	p.[Arg130Gly(+)F56V]	III	3	-
1316	p.Ser252Trp	wt	p.Leu112Val	III	1	-
1792	p.Ser252Trp	wt	wt	III	1	+
1482	p.Ser252Trp	wt	p.Thr319X	IV	2	+
1267	p.Asn550Lys	wt	p.AlaA 126Asp	II	2	+
1391	p.Asn550Lys	wt	p.Q245X	III	2	+
1528	p.Asn550Lys	wt	p.Arg130Gly	IV	2	-
1655	p.Tyr376Cys	wt	p.Arg30811efsX5	III	2	+
1684	p.Ser373Cys	wt	p.Arg130Gly	I	1	+
1094	p.Cys383Arg	wt	p.Leu108-Asp109	I	1	+
1361	p.Met392Arg	wt	p.Thr319X	I	1	+
1744	p.Ile548Val	wt	p.[Phe21SerfsX2(+)K66N]	III	2	+
1717	p.Lys660Glu	wt	p.Ser59X	I	2	-
1272	c.1287+2A>C	wt	wt	I	1	-
1289	p.Thr762fsX3	p.Gly12Asp	wt	I	3	+
1284	wt	p.Gly12Asp	p.[Arg130Gly(+)Gly165Arg]	II	1	+
1606	wt	p.Gly12Asp	p.Val191GlyfsX7	I	1	-
1856	wt	p.Gly12Asp	wt	I	2	+
1411	wt	p.Gly12Ala	p.[Arg47Gly(+)Gly165Arg]	III	2	+
1966	wt	p.Gly12Ala	p.[Arg130X(+)Ala148LysfsX3]	III	2	+
1393	wt	p.Gly12Cys	p.Ile4HisfsX5	III	2	+
1609	wt	p.Gly12Cys	p.Lys267ArgfsX8	I	3	+
1044	wt	p.Gly12Val	p.Arg130Gln	III	3	+
1599	wt	p.Gly12Val	p.[Arg130Gly(+)Gln171X]	III	2	+
1873	wt	p.Gly12Val	p.V290X	I	1	+
1656	wt	p.Gly12Val	p.Gly251ValfsX5	I	I	-
1664	wt	p.Gly12Asp	p.Tyr16LeufsX27	III	I	-
1287	wt	p.Gly13Asp	p.[H123Y(+)Ala126Ser]	III	1	-
1576	wt	p.Gly13Asp	p.Arg130Gln	I	2	+

[0189] 相对于FGFR2蛋白序列NP_075259.2;KRAS蛋白序列NP_203524.1;PTEN蛋白序列NP_000305.3编号

[0190] FGFR2的shRNA击倒诱导子宫内膜癌细胞的细胞死亡,尽管PTEN失活

[0191] 假设在子宫内膜癌中在PTEN失活的背景(context)下出现激活FGFR2突变,以及在促进细胞存活的PI3K/AKT通路的已知作用,我们接下来设法确定在PTEN失活的存在下FGFR2的抑制是否可以诱导细胞死亡。FGFR2表达的shRNA击倒对细胞增殖的影响在AN3CA和MFE296子宫内膜癌细胞中评估,二者都携带激活的FGFR2突变。此外,AN3CA在两个PTEN等位基因中都具有突变并且不表达PTEN(图1E)。此外,AN3CA在两个PTEN等位基

因中都具有突变并且不表达 PTEN。另一方面，MFE296 对于 PTEN 和 PIK3CA 而言是野生型 (The Catalog of SomaticMutations in Cancer，http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)。AN3CA 和 MFE296 细胞用两种独立的靶向 FGFR2 的 shRNA 慢病毒转导。在多个时间点测量细胞增殖和活力。FGFR2 的击倒在 AN3CA 和 MFE296 细胞中都抑制细胞增殖 (图 1A，B)，证明即使在 PTEN 失活的存在下靶向激活的 FGFR2 的有效性。确认 FGFR2 表达的击倒，并且 shRNA 转导 48 小时后通过 Western 印迹检查 ERK1/2 和 AKT 的磷酸化。如图 1C 所示，两个 FGFR2 shRNA 构建体导致大于 90％的 FGFR2 蛋白的击倒。在 AN3CA 细胞中 FGFR2 击倒后看到磷酸 -ERK1/2 水平的降低。当细胞在 0.2％ FBS 中生长时该效果更显著。然而，在丝氨酸 473 处未观察到 AKT 磷酸化的变化 (图 1C)，与该细胞系的 PTEN 突变状况一致。

[0192] 为了确认 FGFR2 击倒后观察到的细胞死亡是由于细胞凋亡的诱导，用针对 FGFR2 的 siRNA 转染 AN3CA 细胞，并用膜联蛋白 V-FITC 标记以通过流式细胞仪检测曝露的磷脂酰丝氨酸。与未沉默的 siRNA 对照相比，用 FGFR2 siRNA 转染 48 小时后膜联蛋白 V-FITC 阳性染色的增加是明显的，表明这些细胞经历细胞凋亡 (图 1D)。FGFR2 击倒后观察到的细胞活力的显著抑制暗示这些细胞可以证明癌基因依赖。因此激活的 FGFR2 在子宫内膜癌中为潜在的治疗目标。

[0193] 表达激活的 FGFR2 的子宫内膜癌细胞对于 PD173074(一种全 -FGFR 抑制剂) 是敏感的

[0194] 六种子宫内膜癌细胞系 (2 种突变体 N550K FGFR2，以及 4 种野生型 FGFR2) 用增加浓度的 PD173074 处理，PD173074 为全 -FGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (pan-FGFR tyrosine kinase inhibitor)。该抑制剂证明针对 FGFR(FGFR1，IC50 ＝～ 25nM) 和 VEGFs(VEGFR2，IC50 ＝～ 100nM) 的高度选择性，并且在骨髓瘤细胞中已经显示诱导细胞凋亡，所述骨髓瘤细胞具有激活 t(4 ;14) 易位和在 FGFR3(10) 中的激活的突变。如图 2A 所示，两种具有突变体 FGFR2 的子宫内膜癌细胞系对于用 PD173074 抑制比具有野生型 FGFR2 的细胞系抑制敏感高出 10-40x。AN3CA 系，在两个 PTEN 等位基因都具有功能损失突变，是最敏感的细胞系。膜联蛋白 V-FITC 标记表明～ 70％的 AN3CA 细胞在药物处理后 96 小时经历细胞凋亡 (图 3A)。此外，细胞周期分析揭示 PD173074 处理诱导 AN3CA 细胞的 G1 阻滞 (图 3B)。如图 2C 所示，在外源性 FGF2 配体的不存在 (-FGF2) 或存在 (+FGF2) 下，组成性活性 FGFR2 激酶结构域突变 N550K 比通过野生型受体 (WT) 诱导导致增殖上的增加。这些数据暗示虽然 N550K 突变是组成性活性的，对于全活性其还需要配体。小鼠白介素依赖性祖 -BBaF3(pro-B BaF3) 细胞系为作为模型系统常规使用以用于评价受体酪氨酸激酶功能。虽然 BaF3 细胞增殖和存活正常依赖于 IL-3，激活的受体酪氨酸激酶信号传导可以代替 IL-3 维持细胞存活和增殖。增殖检验在不存在 IL-3 和存在 1nM FGF2 和 10ug/ml 肝素下进行，根据制造商说明书使用 ViaLight Plus Cell Proliferation/CytotoxicityKit(Lonza Rockland Inc)5 天后评估增殖。

[0195] 全 -FGFR 抑制后的细胞死亡与 ERK 的抑制、AKT 的部分抑制相关，而不是抑制 STAT3 或 p38 的激活。

[0196] 已经报道 ERK1/2，AKT 和 STAT3/5 磷酸化的抑制，加上 p38 的延迟激活为在细胞中与细胞死亡的诱导相关的常见特征，证明癌基因依赖 (17)。为了确定 PD173074 处理是否

导致这些通路类似的抑制，通过 Western 印迹在三种细胞系（对于 PD173074 两个敏感，一个抗性）评估 ERK1/2，AKT，STAT3/5，和 p38 磷酸化水平。在这三种细胞系中通过 Western 印迹未检测到 STAT5 表达（数据未示出）。如图 4 所示，用 PD173074 处理 3 个小时导致在 AN3CA 和 MFE296 细胞中 ERK1/2 磷酸化的浓度依赖性降低。HEC1A 细胞，其表达野生型 FGFR2 并对 PD173074 有抗性，不显示 ERK1/2 磷酸化的降低。这与由于 KRAS2 G12D 突变导致的在该细胞系中 MAPK 通路的下游激活一致 (The Catalog of SomaticMutations in Cancer, http://www.sanger.ac.nk/genetics/CGP/cosmic)。

[0197] PD173074 处理还导致在 AN3CA 和 MFE296 细胞中苏氨酸 308 和丝氨酸 473 处 AKT 磷酸化的中等降低。在 HEC1A 细胞中 AKT 的激活的降低不明显。值得注意地是，PD173074 处理在任何测试的细胞系中对 STAT3 或 p38 磷酸化没有效果（图 4）。我们还检查了 PLCr 的激活，由于 FGFR 已经显示信号传导通过 (signal through) 该通路 (18)，在 PD173074 处理后未观察到 PLC γ 激活的变化（数据未示出）。

[0198] 尽管 PD173074 处理 3 个小时后在 STAT3 或 p38 激活上的变化不明显，癌基因依赖的之前模型已经显示 p38 的激活被延迟，在癌基因抑制后 8-24 小时到达顶峰 {Sharma, 2006#17}。因此，我们在 PD173074 处理后 0 至 72 小时范围的各个时间点评估 ERK1/2，AKT，STAT3 和 p38 激活。与图 4 所示数据一致，PD 173074 处理在 MFE296 和 AN3CA 细胞中导致 ERK1/2 激活的快速降低，但在 HEC1A 细胞中不导致（图 5A）。磷酸化的 ERK1/2 在 PD173074 处理后 24-48 小时开始返回，但在 72 小时内未达到基线激活。在 MFE296 和 AN3CA 细胞中还检测到磷酸化 AKT 的降低，但在苏氨酸 308 位点比在丝氨酸 473 处更明显（图 5A）。与 MAPK 磷酸化的快速抑制相比 AKT 激活的降低被延迟，在 PD 173074 处理后 8 和 24 小时时检测到 AKT 磷酸化的最大降低。

[0199] 注意，在整个过程中 AN3CA 和 MFE296 细胞中未检测到 STAT3 或 p38 激活的变化（图 5A）。当细胞在 0.2% FBS 培养基上生长时，用 PD 173074 处理在 AN3CA 和 MFE296 中都导致 MAPK 激活的降低（图 5B），与在完全培养基中所观察的类似。有趣的是，在 0.2% FBS 培养基中的 PD173074 处理导致在 AN3CA 和 MFE296 细胞中的苏氨酸 308 处磷酸 AKT 的中等降低和丝氨酸 473 处的轻微降低。在 0.2% FBS 中的 AN3CA 细胞系的 AKT 的组成性激活可能是由于两个 PTEN 等位基因的失活导致，组成性 AKT 激活的机制在 MFE296 细胞中是未知的，因为它们表达野生型 PTEN 和 PIK3CA。

[0200] 讨论

[0201] 理解肿瘤进展的分子基础已经导致在各种癌症类型中靶向治疗的开发和成功 ({Pickering, 2008#27}。存在日益增加的以下证据：在参与各种信号传导通路的基因中的激活突变可以导致肿瘤对这些通路的“依赖 (addiction)”{Sharma, 2007#31}。此外，这些激活突变不仅用于鉴定潜在的治疗靶点，而且它们的存在还可预期对通路抑制的临床应答 {Lynch, 2004#30}。然而，日益明显对靶向抑制的应答受其中这些突变出现的分子背景的影响。如我们之前已经鉴定出在 FGFR2 中的激活突变占子宫内膜样子宫内膜肿瘤的～ 16%，此处我们设法调查 FGFR2 突变在子宫内膜癌中出现的遗传背景。我们还设法通过调查在拥有 FGFR2 中激活突变的子宫内膜癌细胞中抑制 FGFR2 的生物学结果，来评价靶向激活的 FGFR2 的治疗潜力。

[0202] 在本研究中，我们用已知的 FGFR2 突变状态评价子宫内膜样子宫内膜肿瘤的 KRAS

和 PTEN 突变状态。激活的 KRAS 和 FGFR2 突变不一起出现在同一肿瘤中，与通过 MAPK 通路的 FGFR2 驱使肿瘤形成一致。FGFR2 激活伴随 PTEN 失活出现，暗示至少在子宫内膜细胞中，FGFR2 不通过 PI3K/AKT 介导其生物学作用。这被之前的一个报道支持，该报道中子宫内膜细胞的 FGF7 或 FGF10 刺激导致 ERK1/2 而不是 AKT 激活 (19)。PTEN 和 KRAS 突变出现在同一肿瘤，与之前的报道 (20) 一致。

[0203] 我们还已经指出 FGFR2 信号传导对于 AN3CA 和 MFE296 子宫内膜癌细胞系的存活和增殖是必要的，其高度暗示癌基因依赖。这被 PD173074 IC_{50} 研究支持，其中我们证明具有激活的 FGFR2 的两个细胞系对于全 FGFR 抑制剂，PD173074 是选择性敏感的。值得注意的是，AN3CA 细胞对 PD 173074 最敏感，并且对于 PTEN 是突变体。如果 PTEN 突变在子宫内膜样子宫内膜癌中高发生率，这尤其重要。已经暗示 PTEN 失活可能将细胞的" 癌基因依赖" 从激活的受体通路转移到组成性激活的 PI3K-AKT 信号传导，从而导致对受体抑制剂 (21) 的抗性。实际上，具有 PTEN 降低或缺失的 ErbB2- 过度表达的乳腺肿瘤对于含有曲妥珠单抗 (trastuzumab) 的化疗方案 (22,23) 相对有抗性。值得注意的是，尽管 PTEN 损失，用全 FGFR 抑制剂抑制 FGFR2 诱导 AN3CA 细胞中的细胞死亡和细胞周期阻滞。进而 AN3CA 细胞仍对 FGFR2 的癌基因信号依赖。有趣的是，在 MFE296 细胞中 PD173074 治疗诱导细胞周期阻滞但不导致增强的膜联蛋白 V 染色（数据未示出）。细胞周期阻滞是否单独对 MFE296 细胞中的 PD173074 功效负责，或还是否涉及通过未知的机制诱导膜联蛋白 V 阴性细胞死亡，这仍有待于确定。

[0204] 已经表明由 Src，BCR-ABL 和 EGFR 激活产生的癌基因依赖共有常见的信号级联放大 (signaling cascade)，因为癌基因失活与磷酸化的 ERK，AKT 和 STAT3/5 的快速损失，以及 p38(17) 的延迟激活相关。此处我们报道在完全培养基中 FGFR2 的抑制与磷酸化的 ERK 上的损失和 AKT 的部分抑制相关，但对磷酸化状态的 STAT3 或 p38 没有效果。因此，对在 AN3CA 和 MFE296 细胞中激活的 FGFR2 的潜在依赖性的机制与癌基因依赖的其它模式不同。

[0205] 由使用 PD173074 的全 FGFR 抑制诱导的细胞死亡与补充有 10％ FBS 和 0.2％ FBS 培养基中的 ERK1/2 的完全抑制相关。意想不到的是，如果在 AN3CA 细胞中的突变体 PTEN 状态，PD173074 治疗导致在包含 10％ FBS 培养基中 AKT 磷酸化的部分损失。因此 FGFR2 介导 PTEN 下游的 AKT 磷酸化是可能的。实际上，在鼠角化细胞中，类胰岛素生长因子 -I 已经显示通过涉及蛋白激酶 C- 介导的蛋白磷酸酶调控 (24) 的 PI3K- 非依赖性机制，改变 AKT 磷酸化。负责 PD173074 处理 AN3CA 和 MFE296 细胞后观察到的 AKT 磷酸化降低的机制仍然有待确定。然而，在 AN3CA 细胞中观察到的 PD173074 诱导细胞死亡可能不依赖于 AKT 的该去磷酸化。在 0.2％ FBS 中进行的浓度 - 效应曲线与在 10％ FBS 中产生的曲线产生类似的对于 AN3CA 细胞的 IC_{50}（数据未示出）。由于在 0.2％ FBS 中生长的 AN3CA 细胞不显示显著的 AKT 去磷酸化，这些数据一起暗示，对于在该细胞系中 PD173074 诱导的细胞死亡，AKT 去磷酸化不是必需的。

[0206] 总之，我们已经指出在原发性子宫内膜样子宫内膜癌中，FGFR2 突变与 PTEN 失活同时发生，并且与 KRAS2 突变相互排斥。

[0207] 通过 shRNA 击倒或用全 FGFR 抑制剂，PD173074 处理来阻断 FGFR2 信号传导，导致表达激活的 FGFR2 的子宫内膜癌细胞系的细胞周期阻滞和细胞死亡。细胞通路在 FGFR2 抑制后改变，然而，与已经证明癌基因依赖的其它癌基因的抑制后观察到的那些不同。可能出

现与子宫内膜癌中 FGFR2 激活相关的癌基因依赖的新机制。这些数据一起显示 :组成性活性突变体 FGFR2 的抑制对于子宫内膜癌患者是治疗有益的,尽管在该癌症类型中 PTEN 的频繁失活。

[0208] 本发明不限于本文所述特定实施方式的范围。如本文所述之外的本发明的各种改进对于本领域技术人员从之前的说明和附图中是显而易见的。此类改进旨在落入权利要求的范围。还应该理解所有值是近似的,仅提供以用于描述目的。

[0209] 本申请引用的所有专利,专利申请、出版物、产品描述和策略在此通过参考将其全文引入以用于所有目的。

序列表

<110>The Translational Genomics Research Institute

<120>诊断、分类和治疗子宫内膜癌和初癌的方法(METHOD OF DIAGNOSING, CLASSIFYING AND TREATING ENDOMETRIAL CANCER AND PRECANCER)

<130>91482.002

<150>60/896,884
<151>2007-03-23

<150>60/982,093
<151>2007-10-23

<160>7

<170>PatentIn version 3.3

<210>1
<211>4647
<212>DNA
<213>智人(Homo sapiens)

<400>1
ggcggcggct ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggg cgggcggcgg gtgcggagcg 60
ggcgagggag cgcgcgcggc cgccacaaag ctcgggcgcc gcggggctgc atgcggcgta 120
cctggcccgg cgcggcgact gctctccggg ctggcggggg ccggccgcga gccccggggg 180
ccccgaggcc gcagcttgcc tgcgcgctct gagccttcgc aactcgcgag caaagtttgg 240
tggaggcaac gccaagcctg agtcctttct tcctctcgtt ccccaaatcc gagggcagcc 300
cgcgggcgtc atgcccgcgc tcctccgcag cctggggtac gcgtgaagcc cgggaggctt 360
ggcgccggcg aagacccaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccccg 420
ggctcgtcgc tttctccatc ccgacccacg cggggcgcgg ggacaacaca ggtcgcggag 480
gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcggttcc tgagcccacc 540
gcaggctgaa ggcattgcgc gtagtccatg cccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
cgtccacatg gagatatgga agaggaccgg ggattggtac cgtaaccatg gtcagctggg 660
gtcgtttcat ctgcctggtc gtggtcacca tggcaacctt gtccctggcc cggccctcct 720
tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaagagcc accaaccaaa taccaaatct 780

ctcaaccaga agtgtacgtg gctgcgccag gggagtcgct agaggtgcgc tgcctgttga 840
aagatgccgc cgtgatcagt tggactaagg atggggtgca cttggggccc aacaatagga 900
cagtgcttat tggggagtac ttgcagataa agggcgccac gcctagagac tccggcctct 960
atgcttgtac tgccagtagg actgtagaca gtgaaacttg gtacttcatg gtgaatgtca 1020
cagatgccat ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tggtgcggaa gattttgtca 1080
gtgagaacag taacaacaag agagcaccat actggaccaa cacagaaaag atggaaaagc 1140
ggctccatgc tgtgcctgcg gccaacactg tcaagtttcg ctgcccagcc ggggggaacc 1200
caatgccaac catgcggtgg ctgaaaaacg ggaaggagtt taagcaggag catcgcattg 1260
gaggctacaa ggtacgaaac cagcactgga gcctcattat ggaaagtgtg gtcccatctg 1320
acaagggaaa ttatacctgt gtagtggaga atgaatacgg gtccatcaat cacacgtacc 1380
acctggatgt tgtggagcga tcgcctcacc ggcccatcct ccaagccgga ctgccggcaa 1440
atgcctccac agtggtcgga ggagacgtag agtttgtctg caaggtttac agtgatgccc 1500
agccccacat ccagtggatc aagcacgtgg aaaagaacgg cagtaaatac gggcccgacg 1560
ggctgcccta cctcaaggtt ctcaagcact cggggataaa tagttccaat gcagaagtgc 1620
tggctctgtt caatgtgacc gaggcggatg ctggggaata tatatgtaag gtctccaatt 1680
atatagggca ggccaaccag tctgcctggc tcactgtcct gccaaaacag caagcgcctg 1740
gaagagaaaa ggagattaca gcttccccag actacctgga gatagccatt tactgcatag 1800
gggtcttctt aatcgcctgt atggtggtaa cagtcatcct gtgccgaatg aagaacacga 1860
ccaagaagcc agacttcagc agccagccgg ctgtgcacaa gctgaccaaa cgtatccccc 1920
tgcggagaca ggtaacagtt tcggctgagt ccagctcctc catgaactcc aacaccccgc 1980
tggtgaggat aacaacacgc ctctcttcaa cggcagacac ccccatgctg gcaggggtct 2040
ccgagtatga acttccagag gacccaaaat gggagtttcc aagagataag ctgacactgg 2100
gcaagcccct gggagaaggt tgctttgggc aagtggtcat ggcggaagca gtgggaattg 2160
acaaagacaa gcccaaggag gcggtcaccg tggccgtgaa gatgttgaaa gatgatgcca 2220
cagagaaaga cctttctgat ctggtgtcag agatggagat gatgaagatg attgggaaac 2280
acaagaatat cataaatctt cttggagcct gcacacagga tgggcctctc tatgtcatag 2340
ttgagtatgc ctctaaaggc aacctccgag aatacctccg agcccggagg ccacccggga 2400
tggagtactc ctatgacatt aaccgtgttc ctgaggagca gatgaccttc aaggacttgg 2460
tgtcatgcac ctaccagctg gccagaggca tggagtactt ggcttcccaa aaatgtattc 2520
atcgagattt agcagccaga aatgttttgg taacagaaaa caatgtgatg aaaatagcag 2580
actttggact cgccagagat atcaacaata tagactatta caaaaagacc accaatgggc 2640
ggcttccagt caagtggatg gctccagaag ccctgtttga tagagtatac actcatcaga 2700
gtgatgtctg gtccttcggg gtgttaatgt gggagatctt cactttaggg ggctcgccct 2760
acccagggat tcccgtggag gaacttttta agctgctgaa ggaaggacac agaatggata 2820
agccagccaa ctgcaccaac gaactgtaca tgatgatgag ggactgttgg catgcagtgc 2880
cctcccagag accaacgttc aagcagttgg tagaagactt ggatcgaatt ctcactctca 2940
caaccaatga ggaatacttg gacctcagcc aacctctcga acagtattca cctagttacc 3000
ctgacacaag aagttcttgt tcttcaggag atgattctgt tttttctcca gaccccatgc 3060
cttacgaacc atgccttcct cagtatccac acataaacgg cagtgttaaa acatgaatga 3120

ctgtgtctgc ctgtccccaa acaggacagc actgggaacc tagctacact gagcagggag 3180
accatgcctc ccagagcttg ttgtctccac ttgtatatat ggatcagagg agtaaataat 3240
tggaaaagta atcagcatat gtgtaaagat ttatacagtt gaaaacttgt aatcttcccc 3300
aggaggagaa gaaggtttct ggagcagtgg actgccacaa gccaccatgt aacccctctc 3360
acctgccgtg cgtactggct gtggaccagt aggactcaag gtggacgtgc gttctgcctt 3420
ccttgttaat tttgtaataa ttggagaaga tttatgtcag cacacactta cagagcacaa 3480
atgcagtata taggtgctgg atgtatgtaa atatattcaa attatgtata aatatatatt 3540
atatatttac aaggagttat tttttgtatt gattttaaat ggatgtccca atgcacctag 3600
aaaattggtc tctctttttt taatagctat ttgctaaatg ctgttcttac acataatttc 3660
ttaattttca ccgagcagag gtggaaaaat acttttgctt tcagggaaaa tggtataacg 3720
ttaatttatt aataaattgg taatatacaa aacaattaat catttatagt ttttttgta 3780
atttaagtgg catttctatg caggcagcac agcagactag ttaatctatt gcttggactt 3840
aactagttat cagatccttt gaaaagagaa tatttacaat atatgactaa tttggggaaa 3900
atgaagtttt gatttatttg tgtttaaatg ctgctgtcag acgattgttc ttagacctcc 3960
taaatgcccc atattaaaag aactcattca taggaaggtg tttcattttg gtgtgcaacc 4020
ctgtcattac gtcaacgcaa cgtctaactg gacttcccaa gataaatggt accagcgtcc 4080
tcttaaaaga tgccttaatc cattccttga ggacagacct tagttgaaat gatagcagaa 4140
tgtgcttctc tctggcagct ggccttctgc ttctgagttg cacattaatc agattagcct 4200
gtattctctt cagtgaattt tgataatggc ttccagactc tttggcgttg gagacgcctg 4260
ttaggatctt caagtcccat catagaaaat tgaaacacag agttgttctg ctgatagttt 4320
tggggatacg tccatctttt taagggattg ctttcatcta attctggcag gacctcacca 4380
aaagatccag cctcatacct acatcagaca aaatatcgcc gttgttcctt ctgtactaaa 4440
gtattgtgtt ttgctttgga aacacccact cactttgcaa tagccgtgca agatgaatgc 4500
agattacact gatcttatgt gttacaaaat tggagaaagt atttaataaa acctgttaat 4560
ttttatactg acaataaaaa tgtttctaca gatattaatg ttaacaagac aaaataaatg 4620
tcacgcaact taaaaaaaaa aaaaaaa 4647

<210>2
<211>822
<212>PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>2

Met	Val	Ser	Trp	Gly	Arg	Phe	Ile	Cys	Leu	Val	Val	Val	Thr	Met	Ala	
1				5				10					15			
Thr	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	Val	Glu	Asp	Thr	Thr	
			20					25					30			
Leu	Glu	Pro	Glu	Glu	Pro	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gln	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu	
		35					40					45				

Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
50 55 60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
65 70 75 80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
85 90 95
Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
100 105 110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
115 120 125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
130 135 140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145 150 155 160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
165 170 175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
180 185 190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
195 200 205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
210 215 220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225 230 235 240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro
245 250 255
Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
260 265 270
Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
275 280 285
Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
290 295 300
Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser
305 310 315 320
Asn Ala Glu Val Leu Ala Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Asp Ala Gly
325 330 335
Glu Tyr Ile Cys Lys Val Ser Asn Tyr Ile Gly Gln Ala Asn Gln Ser
340 345 350
Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Lys Gln Gln Ala Pro Gly Arg Glu Lys

355 360 365

Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile

370 375 380

Gly Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg

385 390 395 400

Met Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val

405 410 415

His Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser

420 425 430

Ala Glu Ser Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile

435 440 445

Thr Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val

450 455 460

Ser Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp

465 470 475 480

Lys Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val

485 490 495

Val Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala

500 505 510

Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp

515 520 525

Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys

530 535 540

His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro

545 550 555 560

Leu Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr

565 570 575

Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn

580 585 590

Arg Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr

595 600 605

Tyr Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile

610 615 620

His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val

625 630 635 640

Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp

645 650 655

Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala

660 665 670

Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp
675 680 685
Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro
690 695 700
Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly
705 710 715 720
His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met
725 730 735
Met Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys
740 745 750
Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu
755 760 765
Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr
770 775 780
Pro Asp Thr Arg Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser
785 790 795 800
Pro Asp Pro Met Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile
805 810 815
Asn Gly Ser Val Lys Thr
820

<210>3
<211>821
<212>PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>3
Met Val Ser Trp Gly Arg Phe Ile Cys Leu Val Val Val Thr Met Ala
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Ala Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr
20 25 30
Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu
35 40 45
Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu
50 55 60
Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly
65 70 75 80
Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly
85 90 95

Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr
100 105 110
Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile
115 120 125
Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val
130 135 140
Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu
145 150 155 160
Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys
165 170 175
Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu
180 185 190
Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
195 200 205
Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser
210 215 220
Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile
225 230 235 240
Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro
245 250 255
Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly
260 265 270
Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile
275 280 285
Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp
290 295 300
Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr
305 310 315 320
Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp
325 330 335
Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe
340 345 350
His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu
355 360 365
Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Ile Ala Ile Tyr Cys Ile Gly
370 375 380
Val Phe Leu Ile Ala Cys Met Val Val Thr Val Ile Leu Cys Arg Met
385 390 395 400
Lys Asn Thr Thr Lys Lys Pro Asp Phe Ser Ser Gln Pro Ala Val His

405 410 415

Lys Leu Thr Lys Arg Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala
420 425 430

Glu Ser Ser Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr
435 440 445

Thr Arg Leu Ser Ser Thr Ala Asp Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser
450 455 460

Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Lys
465 470 475 480

Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val
485 490 495

Met Ala Glu Ala Val Gly Ile Asp Lys Asp Lys Pro Lys Glu Ala Val
500 505 510

Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu
515 520 525

Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His
530 535 540

Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu
545 550 555 560

Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu
565 570 575

Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Ser Tyr Asp Ile Asn Arg
580 585 590

Val Pro Glu Glu Gln Met Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Thr Tyr
595 600 605

Gln Leu Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His
610 615 620

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asn Asn Val Met
625 630 635 640

Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Asn Asn Ile Asp Tyr
645 650 655

Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro
660 665 670

Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser
675 680 685

Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr
690 695 700

Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His
705 710 715 720

Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met
725 730 735
Arg Asp Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln
740 745 750
Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Leu Thr Thr Asn Glu Glu
755 760 765
Tyr Leu Asp Leu Ser Gln Pro Leu Glu Gln Tyr Ser Pro Ser Tyr Pro
770 775 780
Asp Thr Arg Ser Ser Cys Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ser Pro
785 790 795 800
Asp Pro Met Pro Tyr Glu Pro Cys Leu Pro Gln Tyr Pro His Ile Asn
805 810 815
Gly Ser Val Lys Thr
820

<210>4
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列靶向 FGFR2 的外显子 2 的 shRNA

<400>4
ttagttgagg ataccacatt a 21

<210>5
<211>19
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列靶向 FGFR2 的外显子 15 的 shRNA

<400>5
atgtattcat cgagattta 19

<210>6
<211>21

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列 A non-silencing shRNA

<400>6
aattctccga acgtgtcacg t 21

<210>7
<211>4644
<212>DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>7
ggcggcggct ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggg cgggcggcgg gtgcggagcg 60
ggcgagggag cgcgcgcggc cgccacaaag ctcgggcgcc gcggggctgc atgcggcgta 120
cctggcccgg cgcggcgact gctctccggg ctggcggggg ccggccgcga gccccggggg 180
ccccgaggcc gcagcttgcc tgcgcgctct gagccttcgc aactcgcgag caaagtttgg 240
tggaggcaac gccaagcctg agtcctttct tcctctcgtt ccccaaatcc gagggcagcc 300
cgcgggcgtc atgcccgcgc tcctccgcag cctggggtac gcgtgaagcc cgggaggctt 360
ggcgccggcg aagacccaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccccg 420
ggctcgtcgc tttctccatc ccgacccacg cggggcgcgg ggacaacaca ggtcgcggag 480
gagcgttgcc attcaagtga ctgcagcagc agcggcagcg cctcggttcc tgagcccacc 540
gcaggctgaa ggcattgcgc gtagtccatg cccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
cgtccacatg gagatatgga agaggaccgg ggattggtac cgtaaccatg gtcagctggg 660
gtcgtttcat ctgcctggtc gtggtcacca tggcaacctt gtccctggcc cggccctcct 720
tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaagagcc accaaccaaa taccaaatct 780
ctcaaccaga agtgtacgtg gctgcgccag gggagtcgct agaggtgcgc tgcctgttga 840
aagatgccgc cgtgatcagt tggactaagg atggggtgca cttggggccc aacaatagga 900
cagtgcttat tggggagtac ttgcagataa agggcgccac gcctagagac tccggcctct 960
atgcttgtac tgccagtagg actgtagaca gtgaaacttg gtacttcatg gtgaatgtca 1020
cagatgccat ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tggtgcggaa gattttgtca 1080
gtgagaacag taacaacaag agagcaccat actggaccaa cacagaaaag atggaaaagc 1140
ggctccatgc tgtgcctgcg gccaacactg tcaagtttcg ctgcccagcc ggggggaacc 1200
caatgccaac catgcggtgg ctgaaaaacg ggaaggagtt taagcaggag catcgcattg 1260
gaggctacaa ggtacgaaac cagcactgga gcctcattat ggaaagtgtg gtcccatctg 1320
acaagggaaa ttatacctgt gtagtggaga atgaatacgg gtccatcaat cacacgtacc 1380
acctggatgt tgtggagcga tcgcctcacc ggcccatcct ccaagccgga ctgccggcaa 1440

atgcctccac agtggtcgga ggagacgtag agtttgtctg caaggtttac agtgatgccc 1500
agccccacat ccagtggatc aagcacgtgg aaaagaacgg cagtaaatac gggcccgacg 1560
ggctgcccta cctcaaggtt ctcaaggccg ccggtgttaa caccacggac aaagagattg 1620
aggttctcta tattcggaat gtaacttttg aggacgctgg ggaatatacg tgcttggcgg 1680
gtaattctat tgggatatcc tttcactctg catggttgac agttctgcca gcgcctggaa 1740
gagaaaagga gattacagct tccccagact acctggagat agccatttac tgcatagggg 1800
tcttcttaat cgcctgtatg gtggtaacag tcatcctgtg ccgaatgaag aacacgacca 1860
agaagccaga cttcagcagc cagccggctg tgcacaagct gaccaaacgt atccccctgc 1920
ggagacaggt aacagtttcg gctgagtcca gctcctccat gaactccaac accccgctgg 1980
tgaggataac aacacgcctc tcttcaacgg cagacacccc catgctggca ggggtctccg 2040
agtatgaact tccagaggac ccaaaatggg agtttccaag agataagctg acactgggca 2100
agcccctggg agaaggttgc tttgggcaag tggtcatggc ggaagcagtg ggaattgaca 2160
aagacaagcc caaggaggcg gtcaccgtgg ccgtgaagat gttgaaagat gatgccacag 2220
agaaagacct ttctgatctg gtgtcagaga tggagatgat gaagatgatt gggaaacaca 2280
agaatatcat aaatcttctt ggagcctgca cacaggatgg gcctctctat gtcatagttg 2340
agtatgcctc taaaggcaac ctccgagaat acctccgagc ccggaggcca cccgggatgg 2400
agtactccta tgacattaac cgtgttcctg aggagcagat gaccttcaag gacttggtgt 2460
catgcaccta ccagctggcc agaggcatgg agtacttggc ttcccaaaaa tgtattcatc 2520
gagatttagc agccagaaat gttttggtaa cagaaaacaa tgtgatgaaa atagcagact 2580
ttggactcgc cagagatatc aacaatatag actattacaa aaagaccacc aatgggcggc 2640
ttccagtcaa gtggatggct ccagaagccc tgtttgatag agtatacact catcagagtg 2700
atgtctggtc cttcggggtg ttaatgtggg agatcttcac tttaggggggc tcgccctacc 2760
cagggattcc cgtggaggaa ctttttaagc tgctgaagga aggacacaga atggataagc 2820
cagccaactg caccaacgaa ctgtacatga tgatgaggga ctgttggcat gcagtgccct 2880
cccagagacc aacgttcaag cagttggtag aagacttgga tcgaattctc actctcacaa 2940
ccaatgagga atacttggac ctcagccaac ctctcgaaca gtattcacct agttaccctg 3000
acacaagaag ttcttgttct tcaggagatg attctgtttt ttctccagac cccatgcctt 3060
acgaaecatg ccttcctcag tatccacaca taaacggcag tgttaaaaca tgaatgactg 3120
tgtctgcctg tccccaaaca ggacagcact gggaacctag ctacactgag cagggagacc 3180
atgcctccca gagcttgttg tctccacttg tatatatgga tcagaggagt aaataattgg 3240
aaaagtaatc agcatatgtg taaagattta tacagttgaa aacttgtaat cttccccagg 3300
aggagaagaa ggtttctgga gcagtggact gccacaagcc accatgtaac ccctctcacc 3360
tgccgtgcgt actggctgtg gaccagtagg actcaaggtg gacgtgcgtt ctgccttcct 3420
tgttaatttt gtaataattg gagaagattt atgtcagcac acacttacag agcacaaatg 3480
cagtatatag gtgctggatg tatgtaaata tattcaaatt atgtataaat atatattata 3540
tatttacaag gagttatttt ttgtattgat tttaaatgga tgtcccaatg cacctagaaa 3600
attggtctct ctttttttaa tagctatttg ctaaatgctg ttcttacaca taatttctta 3660
attttcaccg agcagaggtg gaaaaatact tttgctttca gggaaaatgg tataacgtta 3720
atttattaat aaattggtaa tatacaaaac aattaatcat ttatagtttt ttttgtaatt 3780

taagtggcat ttctatgcag gcagcacagc agactagtta atctattgct tggacttaac 3840
tagttatcag atcctttgaa aagagaatat ttacaatata tgactaattt ggggaaaatg 3900
aagttttgat ttatttgtgt ttaaatgctg ctgtcagacg attgttctta gacctcctaa 3960
atgccccata ttaaaagaac tcattcatag gaaggtgttt cattttggtg tgcaaccctg 4020
tcattacgtc aacgcaacgt ctaactggac ttcccaagat aaatggtacc agcgtcctct 4080
taaaagatgc cttaatccat tccttgagga cagaccttag ttgaaatgat agcagaatgt 4140
gcttctctct ggcagctggc cttctgcttc tgagttgcac attaatcaga ttagcctgta 4200
ttctcttcag tgaattttga taatggcttc cagactcttt ggcgttggag acgcctgtta 4260
ggatcttcaa gtcccatcat agaaaattga aacacagagt tgttctgctg atagttttgg 4320
ggatacgtcc atcttttaa gggattgctt tcatctaatt ctggcaggac ctcaccaaaa 4380
gatccagcct catacctaca tcagacaaaa tatcgccgtt gttccttctg tactaaagta 4440
ttgtgttttg ctttggaaac acccactcac tttgcaatag ccgtgcaaga tgaatgcaga 4500
ttacactgat cttatgtgtt acaaaattgg agaaagtatt taataaaacc tgttaatttt 4560
tatactgaca ataaaaatgt ttctacagat attaatgtta acaagacaaa ataaatgtca 4620
cgcaacttaa aaaaaaaaaa aaaa 4644

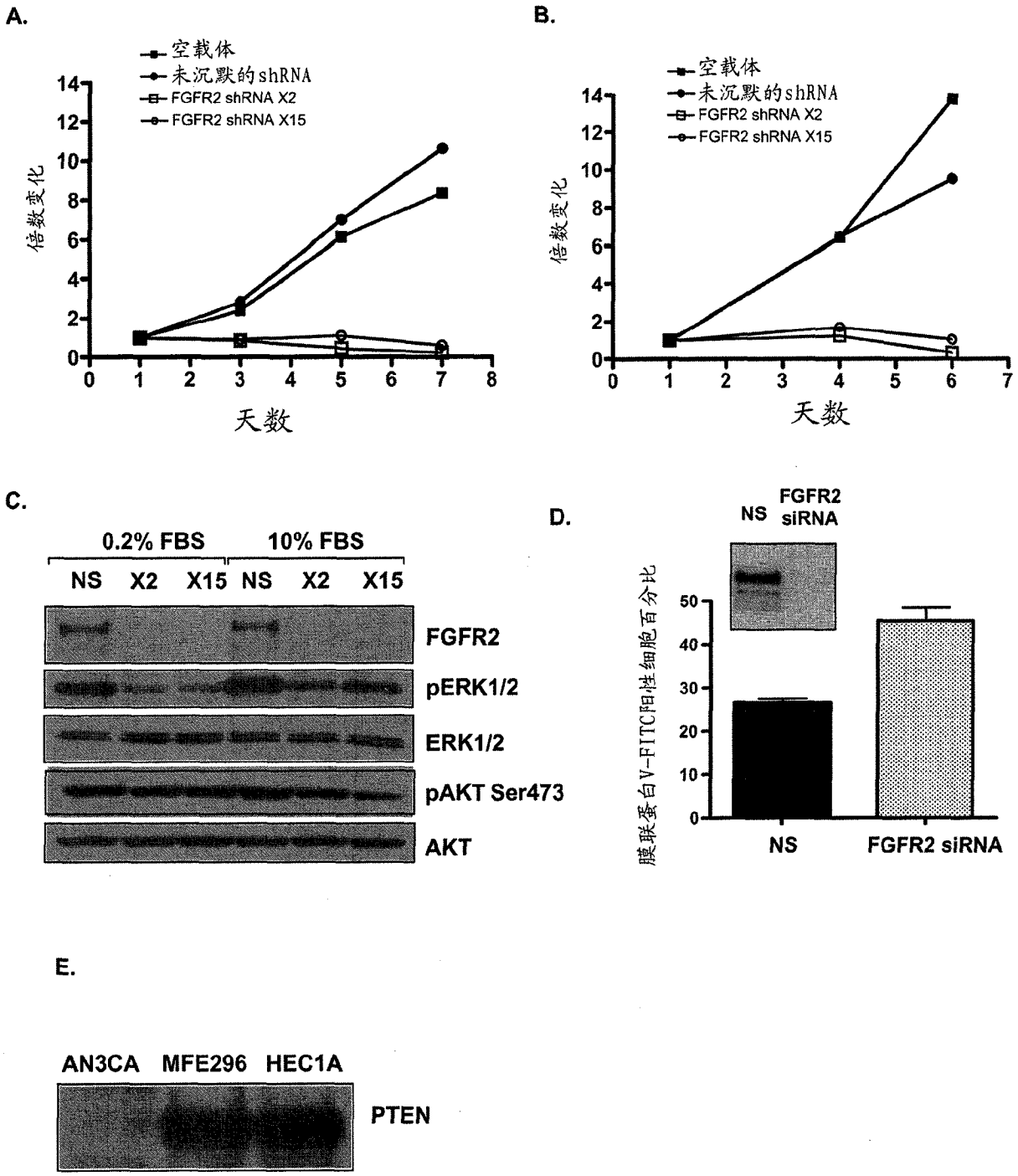
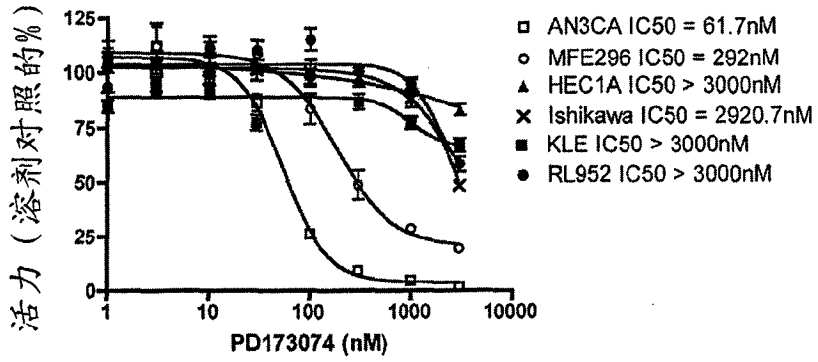
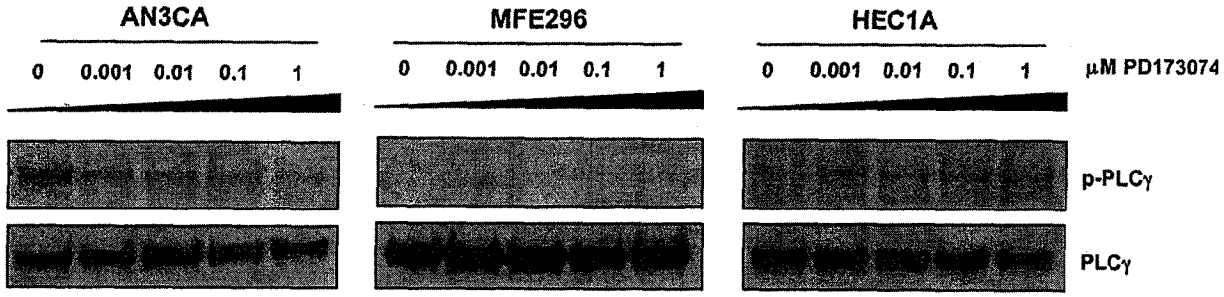

A.
空载体
未沉默的shRNA
FGFR2 shRNA X2
FGFR2 shRNA X15
倍数变化
天数
B.
空载体
未沉默的shRNA
FGFR2 shRNA X2
FGFR2 shRNA X15
倍数变化
天数
C.
0.2% FBS
10% FBS
NS X2 X15 NS X2 X15
FGFR2
pERK1/2
ERK1/2
pAKT Ser473
AKT
D.
NS
FGFR2 siRNA
膜联蛋白V-FITC阳性细胞百分比
NS
FGFR2 siRNA
E.
AN3CA MFE296 HEC1A
PTEN

图 1

A


活力（溶剂对照的%）
125
100
75
50
25
0
1
10
100
1000
10000
PD173074 (nM)
AN3CA IC50 = 61.7nM
MFE296 IC50 = 292nM
HEC1A IC50 > 3000nM
Ishikawa IC50 = 2920.7nM
KLE IC50 > 3000nM
RL952 IC50 > 3000nM

B


AN3CA
MFE296
HEC1A
0 0.001 0.01 0.1 1
μM PD173074
p-PLCγ
PLCγ

C

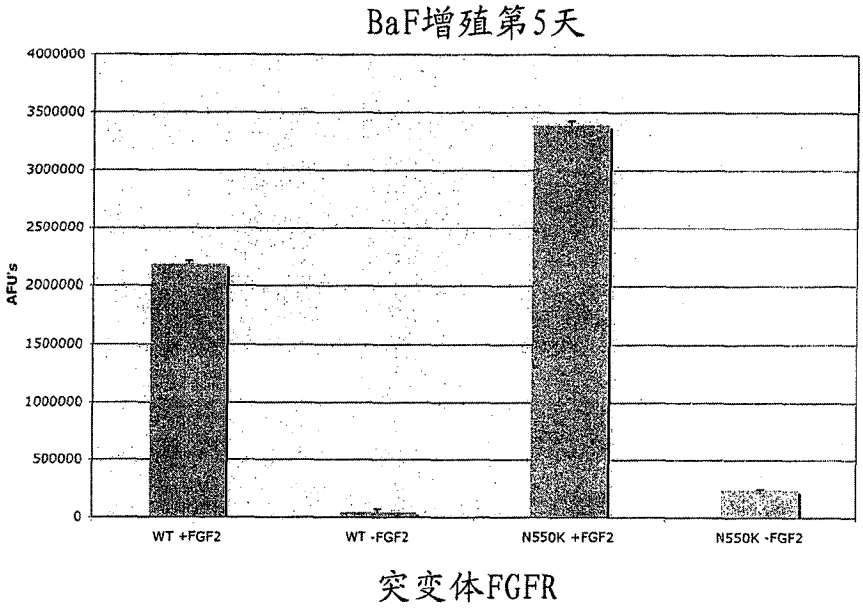

BaF增殖第5天
AFU's
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
WT +FGF2
WT -FGF2
N550K +FGF2
N550K -FGF2
突变体FGFR

图 2

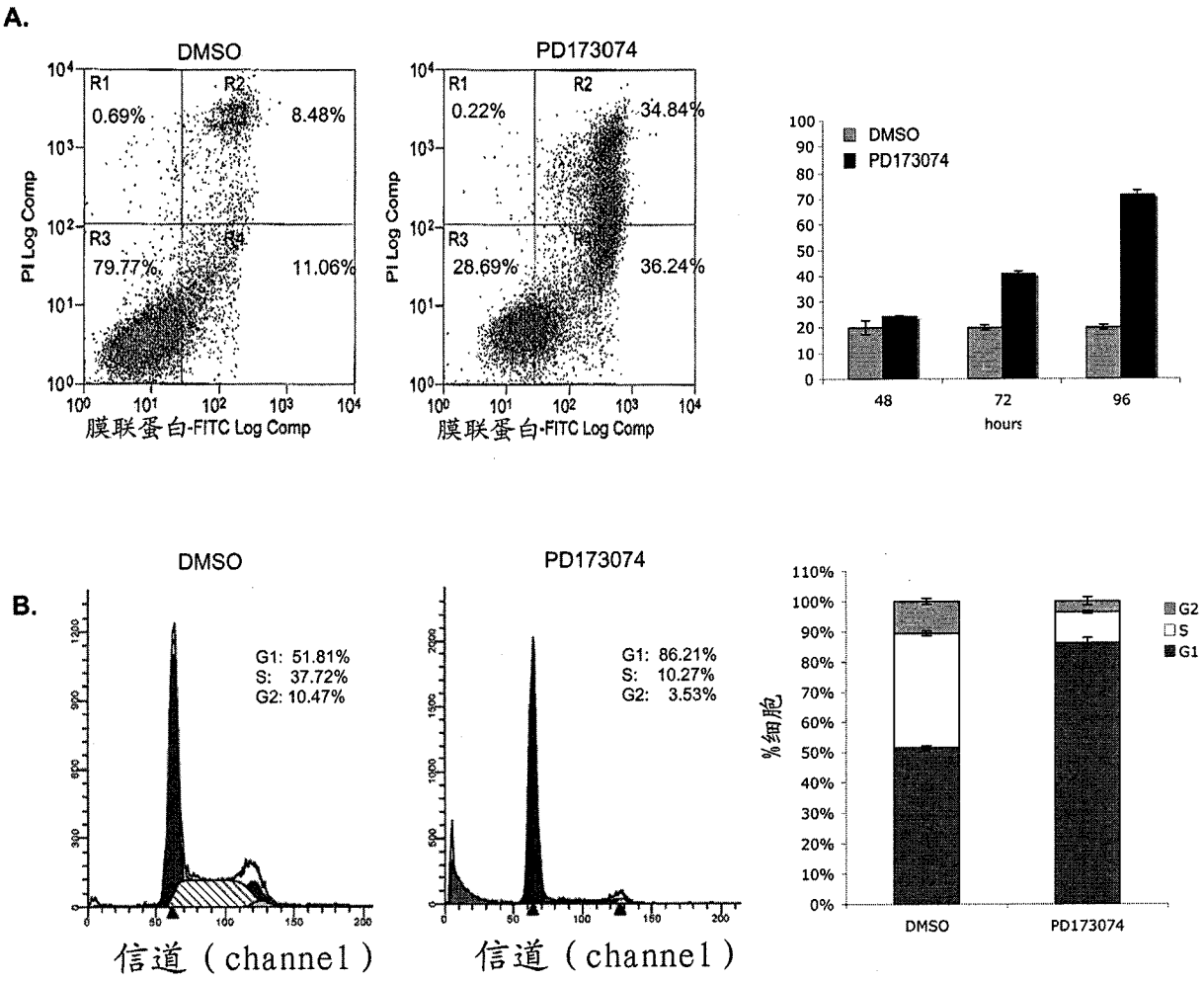

A.
DMSO
PD173074
R1
R2
R3
R4
0.69%
8.48%
79.77%
11.06%
0.22%
34.84%
28.69%
36.24%
PI Log Comp
膜联蛋白-FITC Log Comp
DMSO
PD173074
48
72
96
hours
B.
G1: 51.81%
S: 37.72%
G2: 10.47%
G1: 86.21%
S: 10.27%
G2: 3.53%
信道（channel）
%细胞
G2
S
G1

图 3

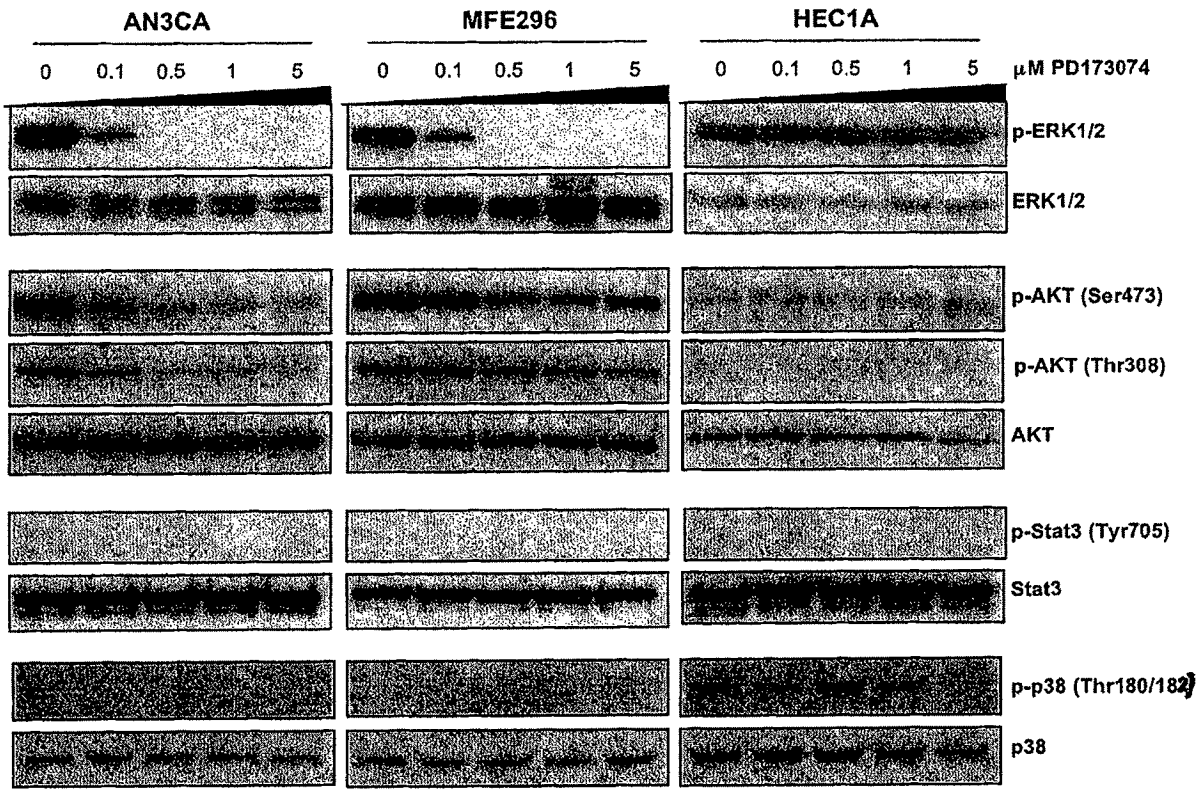

AN3CA
MFE296
HEC1A
0 0.1 0.5 1 5
0 0.1 0.5 1 5
0 0.1 0.5 1 5
μM PD173074
p-ERK1/2
ERK1/2
p-AKT (Ser473)
p-AKT (Thr308)
AKT
p-Stat3 (Tyr705)
Stat3
p-p38 (Thr180/182)
p38

图 4

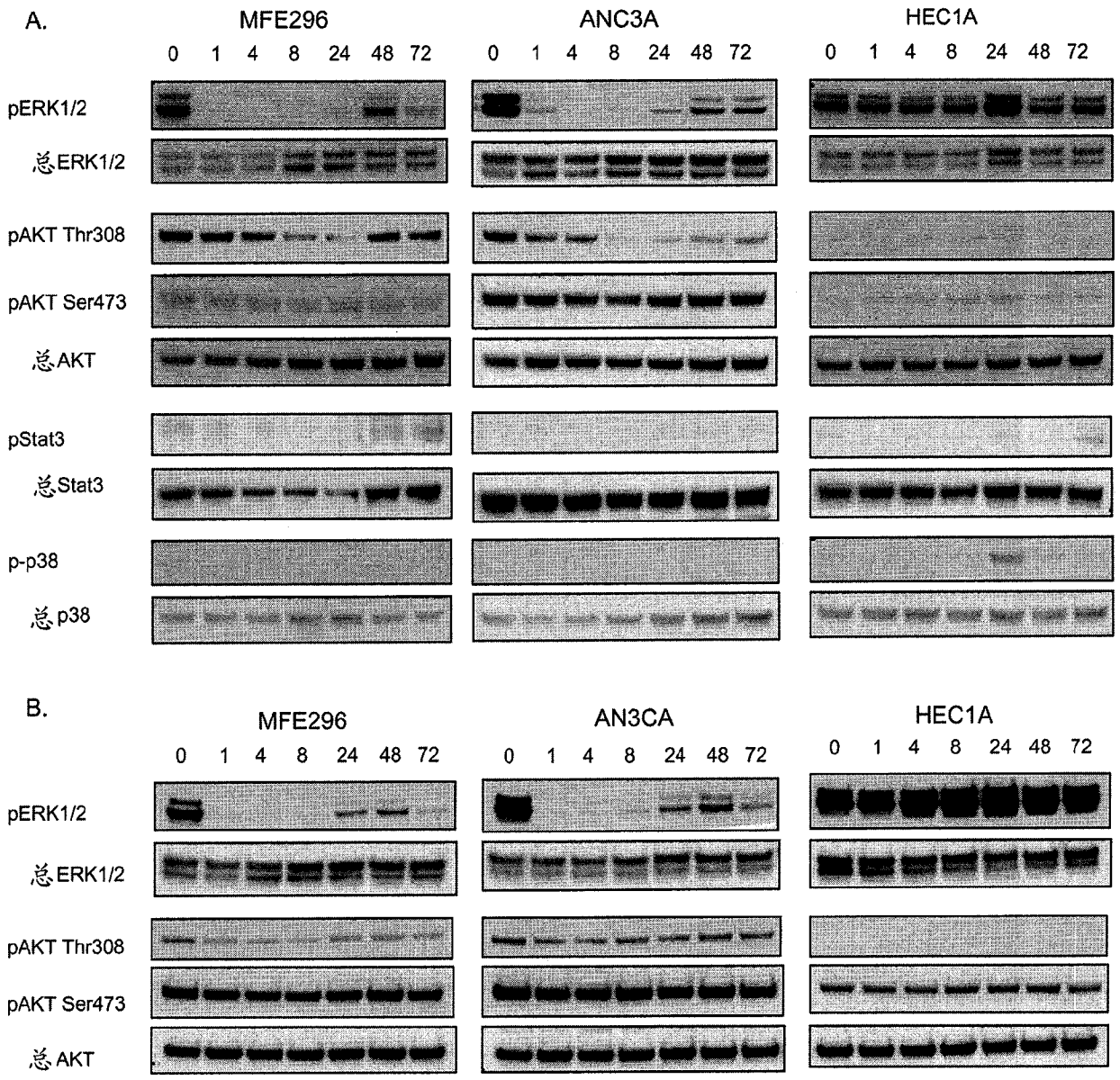

A.
MFE296
ANC3A
HEC1A
0 1 4 8 24 48 72
pERK1/2
总ERK1/2
pAKT Thr308
pAKT Ser473
总AKT
pStat3
总Stat3
p-p38
总p38
B.
MFE296
AN3CA
HEC1A
0 1 4 8 24 48 72
pERK1/2
总ERK1/2
pAKT Thr308
pAKT Ser473
总AKT

图 5

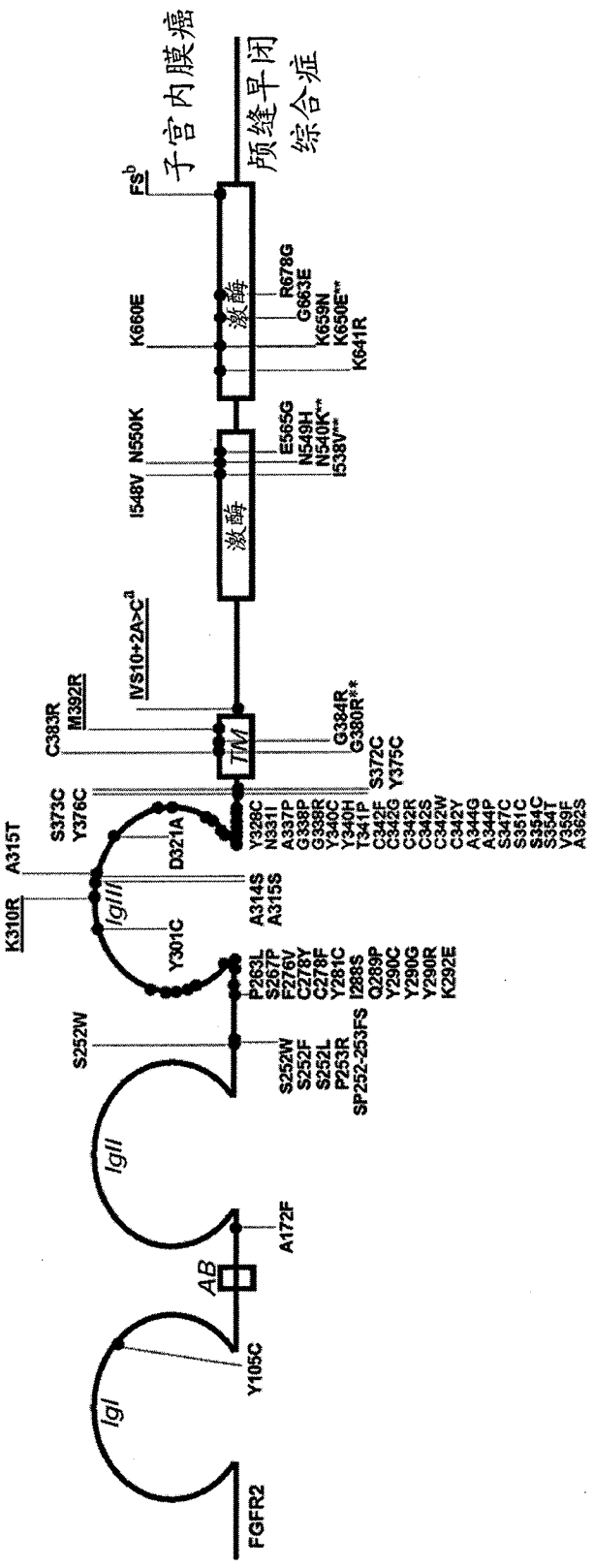

子宫内膜癌
颅缝早闭综合症
FS[b]
K660E
R678G
G663E
K659N
K650E**
K641R
激酶
I548V
N550K
E565G
N549H
N540K**
I538V**
IVS10+2A>C[a]
C383R
M392R
TM
G384R
G380R**
S372C
Y375C
S373C
Y376C
A315T
K310R
D321A
IgIII
Y328C
N331I
A337P
G338P
G338R
Y340C
Y340H
T341P
C342F
C342G
C342R
C342S
C342W
C342Y
A344G
A344P
S347C
S351C
S354C
S354T
V359F
A362S
A314S
A315S
Y301C
P263L
S267P
F276V
C278Y
C278F
Y281C
I288S
Q289P
Y290C
Y290G
Y290R
K292E
S252W
S252W
S252F
S252L
P253R
SP252-253FS
IgII
A172F
AB
Y105C
IgI
FGFR2

图 6