



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105121464 B

(45) 授权公告日 2021.05.07

(21) 申请号 201480005077.6

CN 101585866 A, 2009.11.25

(22) 申请日 2014.01.16

US 2003/0068313 A1, 2003.04.10

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2004/110487 A1, 2004.12.23

申请公布号 CN 105121464 A

van Rhijn, B.W 等. fibroblast growth

(43) 申请公布日 2015.12.02

factor receptor 3 isoform 2 precursor

(30) 优先权数据

[Homo sapiens].《GenBank》.2012, ACCESSION:

PCT/IB2013/001480 2013.01.16 IB

NP_075254.1.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

张明等.FGFR3突变与软骨发育不全的研究
进展.《中国优生与遗传杂志》.2010, 第18卷(第5期), 摘要.

2015.07.16

J.-P. Salles 等. Approches

(86) PCT国际申请的申请数据

translationnelles chez l'enfant.《La
recherche clinique en pédiatrie》.2009, 第
16卷(第6期), 第664-666页.

PCT/EP2014/050800 2014.01.16

Pavel Krejci 等.NF449 Is a Novel
Inhibitor of Fibroblast Growth Factor
Receptor 3 (FGFR3) Signaling Active in
Chondrocytes and Multiple Myeloma Cells.
《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》
.2010, 第285卷(第27期), 第20644-2065页.

(87) PCT国际申请的公布数据

Min Jin 等. A novel FGFR3-binding
peptide inhibits FGFR3 signaling and
reverses the lethal phenotype of mice
mimicking human thanatophoric dysplasia.
《Human Molecular Genetics》.2012, 第21卷(第
26期), 第5443-5455页.

WO2014/111467 EN 2014.07.24

代理人 周奋进

(73) 专利权人 法国健康和医学研究院

权利要求书1页 说明书26页

地址 法国巴黎

序列表7页 附图4页

专利权人 图卢兹第三大学

(72) 发明人 埃尔维雷·古兹

骨发育不全的可溶性FGFR3。

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51) Int.Cl.

C07K 14/71 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 02/102973 A2, 2002.12.27

CN 102219860 A, 2011.10.19

(54) 发明名称

用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症的可溶性成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3) 多肽

B (57) 摘要

本发明涉及骨骼生长迟缓病症特别是骨骼病的预防或治疗, 所述病症由表现出成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3) 的激活异常增加的患者产生, 特别是由FGFR3的延长激活突变体的表达产生。更特别地, 本发明涉及用于预防或治疗软

CN 105121464 B

1. 分离的可溶性成纤维细胞生长因子受体3 (sFGFR3) 多肽在制备用于在有此需要的对象中预防或治疗软骨发育不全的药物中的用途, 其中所述分离的sFGFR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述软骨发育不全由表现出配体依赖性过度激活的FGFR3变体在所述对象中的表达造成。
3. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述FGFR3变体包含在野生型FGFR3第380位的甘氨酸残基被替换为精氨酸残基 (G380R) 的氨基酸替换。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途, 其中所述对象是人。
5. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途, 其中所述分离的sFGFR3多肽与异源多肽融合, 从而形成sFGFR3免疫粘附素。
6. 根据权利要求5所述的用途, 其中所述sFGFR3免疫粘附素包含Fc区。
7. 根据权利要求6所述的用途, 其中所述Fc区是选自IgG-1、IgG-2和IgG-3之免疫球蛋白的恒定结构域。
8. 药物组合物, 其包含分离的sFGFR3多肽和可药用载体, 所述药物组合物用于预防或治疗FGFR3相关骨骼病, 其中所述分离的sFGFR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
9. 根据权利要求8所述的药物组合物, 其中所述药物组合物配制成用于皮下、表面、经口、鼻内、眼内、静脉内或肌内施用。
10. 根据权利要求9所述的药物组合物, 其中所述药物组合物配制成用于皮下施用。
11. 根据权利要求9所述的药物组合物, 其中所述药物组合物配制成用于静脉内施用。

用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症的可溶性成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3) 多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及骨骼生长迟缓病症 (skeletal growth retardation disorder) 特别是骨骼病和颅缝早闭的预防或治疗,所述病症由表现出成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3) 的激活异常增加的患者产生,特别是由FGFR3 的组成型激活突变体的表达产生。

背景技术

[0002] 人的骨骼发育受多种生长因子调节。

[0003] 其中,成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3) 被描述为软骨内骨化的负调节物。已表明编码FGFR3的基因中的突变是多种骨骼软骨发育异常 (1) 表型的原因,所述骨骼软骨发育异常包括致死性骨发育不良 (TDI 和TDH) (2) 和软骨发育不全 (3),最常见形式为短肢侏儒症 (short limb dwarfism)。患有软骨发育不全 (achondroplasia) 的儿童遭受头盖骨和椎骨变形以及异常长骨发育,造成了身材矮小以及严重的神经学和骨科 (orthopedic) 并发症 (4,5)。现有的治疗仅设计成减缓一些并发症,并且是侵入性且极端的 (6,7)。

[0004] 软骨发育不全是由FGFR3基因 (Fgfr3ach) 中的点突变造成的常染色体显性病症 (8)。在~97%的患病患者中,软骨发育不全由该受体的跨膜结构域中的G380R替换造成 (9、10)。FGFR3中的这种突变导致了功能获得 (11),从而延长了受体的酪氨酸激酶活性的激活 (12,13)。虽然 G380R突变体FGFR3保留了其二聚化和激活所依赖的配体 (12,14),但是突变的存在使配体/受体复合体稳定 (15) 并使受体内在化减慢 (12),从而延长了后续的细胞内 Ras/MAPK途径信号传导 (12)。所产生的 FGFR3信号传导被延长,并且其稳定地抑制生长板中的软骨细胞增殖和分化 (16)。表达突变受体的细胞不成熟并且不被矿化的骨基质替代,削弱了通过软骨内骨化形成的所有骨的延长 (17,18)。这些包括附肢骨骼的长骨,以及椎骨、胸骨、颅底,和头盖骨中在软骨结合 (其是由具有休眠软骨细胞共有区的两个相对生长板组成的软骨结构) 处发生骨生长的一些骨。与长骨中的软骨内生长板一样,软骨结合也被骨代替。

[0005] 尽管越来越多的研究破译了骨生长干扰原因的机制,但是仍然没有可用的治愈。几种治疗策略考虑靶向突变体FGFR3及其下游信号传导 (16)。最近, Jin等在TDI的鼠模型中测试了抑制FGFR3信号传导的新型肽 (19)。该研究表明了TDI小鼠在子宫内治疗之后新生致死率的逆转,并且证明了这样的概念验证 (proof-of-concept) (靶向胞外区室中的FGFR3) 可以是治疗FGFR3相关骨骼发育不良的有效策略。

[0006] 目前的软骨发育不全疗法包括骨科手术 (如腿延长) 以及生长激素疗法。然而,腿延长使患者遭受很大的痛苦,而生长激素疗法因借助从童年时期开始的定期生长激素注射而使体重增加。此外,停止注射时则生长也停止。因此,期望开发新的软骨发育不全疗法,以及其他骨骼生长迟缓病症 (包括FGFR3相关骨骼病) 的疗法。

发明内容

[0007] 在第一个方面中,本发明涉及分离的可溶性成纤维细胞生长因子受体 3 (sFGFR3) 多肽或其功能等同物,其用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症。

[0008] 在第二个方面中,本发明还涉及包含可药用载体和分离的sFGFR3 多肽或其功能等同物的药物组合物。

[0009] 在第三个方面中,本发明还涉及用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症 FGFR3相关骨骼病的药物组合物,其包含可药用载体和分离的sFGFR3 多肽或其功能等同物。

[0010] 在另一个方面中,本发明涉及用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症 FGFR3相关骨骼病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的 sFGFR3多肽或包含所述多肽的药物组合物的步骤。

[0011] 在又一个方面中,本发明还涉及分离的sFGFR3免疫粘附素及其作为药物的用途。

[0012] 发明详述

[0013] 本发明人已经设计了通过恢复骨生长而对于软骨发育不全的有效治疗途径。如本文所示,向Fgfr3^{ach/+}小鼠(表现出与人体病理学基本相同的表型并且具有通过软骨内骨化而形成的所有骨缩短的软骨发育不全鼠模型)产后施用重组可溶性成纤维细胞生长因子受体3 (sFGFR3) 充当诱饵受体 (decoy receptor) 导致了正常的骨骼生长,从而预防软骨发育不全症状和并发症的发生。

[0014] 如本文所公开的,通过在整个生长期中重复皮下注射重组sFGFR3,在转基因 Fgfr3^{ach/+}小鼠中可恢复正常骨骼生长,导致了正常的身长和相关并发症的显著减少。在经处理小鼠的骨中生长板软骨细胞的有效成熟得以恢复,导致了Fgfr3^{ach/+}小鼠中骨骼生长的剂量依赖性增加。这导致了与并发症数目和强度显著减小相关的正常身高,并且没有任何证据表明毒性。这些结果证实了可溶性FGFR3恢复骨生长的用途,并且表明了其作为用于软骨发育不全和相关骨骼病症之有前途疗法的潜在用途。

[0015] 治疗方法和用途:

[0016] 本发明提供了用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症的方法和组合物(例如,药物组合物)。

[0017] 因此,本发明涉及分离的可溶性成纤维细胞生长因子受体3 (sFGFR3) 多肽或其功能等同物,其用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症。

[0018] 在一个实施方案中,骨骼生长迟缓病症是特发性骨骼生长迟缓病症。

[0019] 在另一个实施方案中,骨骼生长迟缓病症是FGFR3相关骨骼病。

[0020] 本文使用的术语“成纤维细胞生长因子受体3”(“FGFR3”)或“FGFR3受体”是指任何天然FGFR3多肽或变体FGFR3多肽。FGFR3 基因位于染色体4的远端短臂上,编码806个氨基酸的蛋白质前体(成纤维细胞生长因子受体3同工型1前体)。FGFR3受体包含胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。天然人FGFR3基因具有如Genbank登录号 NM_000142.4中所示的核苷酸序列,并且天然人FGFR3蛋白具有如 Genbank登录号NP_000133中所示并且由以下 SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列:

[0021] MGAPACALALCVAVAIIVAGASSESLGTEQRVVGRAAEVPGPEPGQQEQLVFGSGDAVELSCPPPGGP
MGPTVWVKDGTGLVPSERVLVGPQRLQVLNASHEDSGAYSCRQLTQRVLCHFSVRVTDAPSSGDEDGEDEAEDT
GVDTGAPYWTRPERMDKLLAVPAANTVRFRCPAAGNPTPSISWLKNGREFRGEHRIGGIKLRHQQWSLVMESVVP

SDRGNYTCVVENKFGSIRQTYTLDVLERSPHRPILQAGLPANQTAVLGSDVEFHCKVYSDAQPHIQWLKHVEVNGSKVGPDGTPYVTVLKTAGANTTDKELEVSLHNVTFEDAGEYTCLAGNSIGFSHHSAWLVLPAAEELVEADEAGSYAGILSYGVGFFLFILVVAAVTLC RLRSPPKGLGSPTVHKISRPLKRQVSLESNASMSSNTPLVRIARLSSGE
GPTLANVS ELELPADPKWELSRARLTGKPLGEGCFGQVVMAEAIGIDKDRAAKPVTAVAKMLK DDATDKDLSDVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQGGPLYVLVEYAAKGNLREFL RARRPPGLDYSFDTCKPPEEQLTFKDLVSCAYQVARGMEYLASQKCIHRDLAARNVL VTEDNVMKIADFGLARDVHNLDYYKKTTNGRLPVKWMPEALFDRVYTHQSDVW SFGVLLWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTHDLYMIMRECWHAAP SQRPTFKQLVEDLDRVLTVTSTDEYLDLSAPFEQYSPGGQDTPSSSSGDDSVFAHDL LPPAPPSSGGSRT

[0022] 本文使用的术语“FGFR3的胞外结构域”或“FGFR3的胞外结构域”是指由SEQ ID NO:3之第1至375位氨基酸序列(上文带下划线的序列)组成的多肽。

[0023] 术语“多肽”在本文中意指没有特定长度的氨基酸聚合物。因此，肽、寡肽和蛋白质均包括在“多肽”的定义中并且这些术语在整个说明书中以及在权利要求书中可互换使用。术语“多肽”不排除翻译后修饰，所述翻译后修饰包括但不限于磷酸化、乙酰化、糖基化等。

[0024] “分离的”多肽意指所述多肽不存在于活生物体内，例如人体内。但是，分离的多肽可以是组合物或试剂盒的一部分。分离的多肽优选是经纯化的。

[0025] 本文使用的术语“可溶性”是指未与细胞膜结合的多肽。通常，在受体的氨基酸序列缺少跨膜结构域时，其为可溶形式。在这种背景下，如果使用本领域技术人员已知的常规测定可在不与膜缔合的级分中(例如，在细胞上清液或血清中)检测到大部分的该形式，则该形式是可溶的。

[0026] “天然序列”多肽是指与来源于自然的多肽具有相同氨基酸序列的多肽。因此，天然序列多肽可具有来自任何哺乳动物(包括人)的天然多肽的氨基酸序列。这样的天然序列多肽可从自然中分离或者可通过重组或合成手段产生。术语“天然序列”多肽具体地涵盖了多肽的天然截短或分泌形式(例如，胞外结构域序列)、多肽的天然变体形式(例如，可变剪接形式)和天然等位基因变体。

[0027] 多肽“变体”是指与天然序列多肽具有至少约80%氨基酸序列同一性的生物活性多肽。这样的变体包括例如其中在多肽的N端或C段添加或缺失一个或更多个氨基酸残基的多肽。通常，变体与天然序列多肽具有至少约80%的氨基酸序列同一性，更优选至少约90%的氨基酸序列同一性，并且甚至更优选至少约95%的氨基酸序列同一性。

[0028] 与本发明的查询(query)氨基酸序列具有至少(例如)95%“同一性”之氨基酸序列的多肽意指，对象多肽的氨基酸序列与查询序列相同，不同之处在于所述对象多肽在所述查询氨基酸序列的每100个氨基酸中可包含至多五个氨基酸改变。换言之，为了获得与查询氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列的多肽，对象序列中至多5% (100个中5个)氨基酸残基可插入、缺失或被另一氨基酸替换。

[0029] 在本申请的范围内，同一性百分比使用总体比对(即，两个序列在其全长上进行比较)来计算。用于比较两个或更多个序列的同一性和同源性的方法在本领域是公知的。例如，可使用“needle”程序，其使用Needleman-Wunsch总体比对算法(Needleman和Wunsch, 1970 J.Mol. Biol. 48:443-453)来寻找两个序列在考虑其全长时的最佳比对(包括空位)。needle程序例如可在ebi.ac.uk万维网网址上获得。根据本发明的同一性百分比优选地使用EMBOSS::needle(总体)程序和Blosum62矩阵来计算，在EMBOSS::needle(总体)程序中

“空位打开”参数等于10.0,“空位延伸”参数等于0.5。

[0030] 与参照序列相比,由与参照序列具有“至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性”的氨基酸序列组成的多肽可包含突变(如缺失、插入和/或替换)。由与参照序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列组成的多肽可相当于参照序列的等位基因变体。与参照序列相比,其可例如仅包含替换。替换优选地对应于如下表中所示的保守替换。

保守替换	氨基酸类型
[0031] Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Phe、Trp	具有脂肪族疏水侧链的氨基酸
Ser、Tyr、Asn、Gln、Cys	不带电但是具有极性侧链的氨基酸
Asp、Glu	具有酸性侧链的氨基酸
Lys、Arg、His	具有碱性侧链的氨基酸
Gly	中性侧链

[0033] 可溶性FGFR3多肽通过与FGF蛋白结合对这些蛋白的生物学活性表现出抑制作用,从而防止所述它们与靶细胞表面上存在的FGFR3结合。不希望可溶性FGFR3多肽与细胞膜结合。

[0034] 在一个优选实施方案中,可溶性FGFR3多肽缺少对应于其来源之 FGFR3多肽的跨膜结构域和/或胞内结构域的任何氨基酸序列。

[0035] 本文使用的术语“可溶性FGFR3多肽”或“sFGFR3”是指包含FGFR3 受体的胞外区或其变体或片段的多肽,或者指由FGFR3受体的胞外区或其变体或片段组成的多肽。例如,sFGFR3可包含人FGFR3除第三1g样结构域(Ig 111b)后半段之外的所有胞外结构域以及FGFR3的跨膜结构域(即,包含来源于人FGFR3受体的694个氨基酸的序列的多肽,或由其组成的多肽,如以下SEQ ID NO:1所示):

[0036] MGAPACALALCVAVAIVAGASSESLGTEQRVVGRAAEVPGPEPGQQEQLVFG SGDAVELSCPPPGGG PMGPTVWVKDGTGLVPSERVLVGPQRLQVLNASHEDSGAYS CRQRLTQRVLCHFSVRVTDAPSSGDDEDGEDEAE DTGVDTGAPYWTRPERMDKKLL AVPAANTVRFRCPAAGNPTPSISWLKNGREFRGEHRIGGIKLRHQHQWSLVMES VVPS DRGNYTCVVENKFGSIRQTYTLDVLERSPHRPILQAGLPANQTAVLGSDVEFHCKVY SDAQPHIQLWLKHV EVNGSKVGPDGTPYVTVLKVSLESNASMSSNTPLVRIARLSSGE GPTLANVSELELPADPKWELSRARLTGKPL GEGCFGQVVMAEAIGIDKDRAAKPVT VAVKMLKDDATDKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIIINLLGACTQGGPLVY LVEYAA KGNLREFLRARRPPGLDYSFDTCKPPEQLTFKDLVSCAYQVARGMEYLASQKCIHR DLAARNVLVTE DNVMKIADFGLARDVHNLDYYKKTTNGRLPVKWAPEALFDRVY THQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGIPVEE LFKLLKEGHRMDKPANCTHDLYMIMR ECWHAAPSQRPTFKQLVEDLDRVLTVTSTDEYLDLSAPFEQYSPGGQDT PSSSSSGDD SVFAHDLLPPAPPSSGGSRT

[0037] 在一个特定实施方案中,sFGFR3多肽由SEQ ID NO:2(以下)限定的核酸序列编码:

[0038] ATGGGCGCCCTGCCTGCGCCCTCGCGCTCTGCGTGGCCATCGTG GCCGGCGCCTCCTCGG AGTCCTTGGGGACGGAGCAGCGCGTGTGGCGAGCG GCAGAAGTCCCAGGCCCAGAGCCCCGGCCAGCAGGAGC

AGTTGGTCTTCGGCAGC GGGGATGCTGTGGAGCTGAGCTGTCCCCGCCCGGGGTGGTCCCATGGGGCCCA CT GTCTGGGTCAAGGATGGCACAGGGCTGGTCCCCTCGGAGCGTGTCCCTGGTGGG GCCCCAGCGCTGCAGGTGCTG AATGCCTCCCACGAGGACTCCGGGCCTACAGC TGCCGGCAGCGCTCACGCAGCGTACTGTGCCACTCAGT GTGCGGGTACAG ACGCTCCATCCTCGGGAGATGACGAAGACGGGGAGGACGAGGCTGAGGACACAG GTGTGGA CACAGGGGCCCTACTGGACACGGCCGAGCGATGGACAAGAAGC TGCTGGCGTGCCGGCCAACACCGT CCGCTCCGCTGCCAGCCGCTGGCAA CCCCACTCCCTCCATCTCCTGGCTGAAGAACGGCAGGGAGTCCCGCG CGAGCAC CGCATTGGAGGCATCAAGCTGCCGCATCAGCAGTGGAGCCTGGTATGGAAAGC GTGGTGCCTCGG ACCGCAGCAACTACACCTGCGTCGTGGAGAACAAAGTTGGCA GCATCCGGCAGACGTACACGCTGGACGTGCTGG AGCGCTCCCCGACCGGCCAT CCTGCAGGCGGGCTGCCGCCAACAGACGGCGTGCTGGCAGCGACGTGGA GTTCCACTGCAAGGTGTACAGTGACGCACAGCCCCACATCCAGTGGCTCAAGCAC GTGGAGGTGAATGGCAGCAA GGTGGGCCGGACGGCACCCCTACGTTACCGTG CTCAAGGTGTCCCTGGAGTCCAACCGTCCATGAGCTCCAA CACACCACTGGTGC GCATCGCAAGGCTGTCTCAGGGAGGGCCCCACGCTGGCAAATGTCTCCGAGCT CGAGC TGCCTGCCGACCCAAATGGGAGCTGTCTGGGCCGGCTGACCCCTGGC AAGCCCTTGGGG AGGGCTGCTTC GGCCAGGTGGTCATGGCGAGGCCATCGGC ATTGACAAGGACCGGGCGCCAAGCCTGTCAACCGTAGCCGTGAAG ATGCTGAAA GACGATGCCACTGACAAGGACCTGTCGGACCTGGTGTGAGATGGAGATGATG AAGATGATCGG GAAACACAAAAACATCATCACACCTGCTGGCGCCTGCACGCAG GGCGGGCCCCCTGTACGTGCTGGTAGTACGC GGCCAAGGGTAACCTGCGGAG TTTCTGCGGGCGCGGCCGGCTGGACTACTCCTCGACACCTGCAA GC CGCCCGAGGAGCAGCTCACCTCAAGGACCTGGTGTGCTGACCGTGGC CCGGGCATGGAGTACT TGGCCTCCCAGAAGTGCATCCACAGGGACCTGGCTGCC CGCAATGTGCTGGTACCGAGGACAACGTGATGAAGA TCGCAGACTTCGGGCTG GCCCGGGACGTGCACAACCTCGACTACTACAAGAACCAACGCCGGCTG CCC GTGAAGTGGATGGCGCCTGAGGCCTGTTGACCGAGTCTACACTCACCAGA GTGACGTCTGGTCCTTGGGTC CTGCTCTGGAGATCTCACGCTGGGGGCTC CCCGTACCCGGCATCCCTGTGGAGGAGCTTCAAGCTGCTG AAGGAGGCCAC CGCATGGACAAGCCGCCACTGCACACACGACCTGTACATGATCATGCGGAG TGCTGGCA TGCCGCGCCCTCCCAGAGGCCACCTCAAGCAGCTGGTGGAGGACC TGGACCGTGTGCTTACCGTGACGTCCAC CGACGAGTACCTGGACCTGTCGGCGCC TTTCGAGCAGTACTCCCCGGTGGCCAGGACACCCCCAGCTCCAGCTC CTCAGGG GACGACTCCGTGTTGCCACGACCTGCTGCCCGGCCACCCAGCAGTGGGG GCTCGCGGACG

[0039] 对这样的核酸序列进行优化以降低GC含量(编码天然多肽序列时的GC含量)以延长mRNA半衰期并有助于亚克隆。

[0040] “功能等同物”是保留亲本多肽之生物学活性和特异性的分子(例如,重组多肽)。因此,术语“sFGFR3的功能等同物”包括其所涉及多肽(即, sFGFR3多肽)的变体和片段,只要所述功能等同物表现出参照考多肽的至少一种(优选所有)生物学活性即可,例如,保留与FGF蛋白结合的能力。本文使用的“特异性结合”意指生物学活性片段对FGF具有高亲和力而对对照蛋白质没有高亲和力。特异性结合可通过多种技术来测量,例如ELISA、流式细胞术、western印迹或免疫沉淀。优选地,功能等同物在纳摩尔或皮摩尔水平下与FGF特异性结合。

[0041] 因此,根据本发明的多肽涵盖包含FGFR3胞外区的片段或者由其组成的多肽,只要所述片段是生物学活性的即可。在本发明的范围内,生物学活性片段可例如包含FGFR3受体胞外区的至少300、325、350个连续氨基酸。

[0042] FGFR3受体胞外区的功能等同物的“生物学活性”意指(i)与FGF结合的能力;和/

或 (ii) 降低 FGF 胞内信号传导 (例如, 通过 FGFR3 受体与 FGF 结合在 FGFR3 受体激活之后发生 Erk 磷酸化) 的能力; 和/或 (iii) 在体内恢复骨生长的能力 (例如, 在 $Fgfr3^{ach/+}$ 小鼠中)。

[0043] 本领域技术人员可以容易地确定 FGFR3 胞外区的功能等同物是否是生物学活性的。为了检查新产生的多肽是否以与最初表征的多肽 sFGFR3 (由 SEQ ID NO:1 所述序列组成的多肽) 相同的方式与 FGF 结合和/或降低 FGF 胞内信号传导, 可对每种多肽进行结合测定、FGF 活性测定或 ERK 激活测定 (参见实施例)。另外, 在体外或体内进行的时程和剂量响应 (例如, 通过使用如实施例部分中描述的 $Fgfr3^{ach/+}$ 小鼠进行) 将确定对于每种多肽的最佳条件。

[0044] 而且, 还应注意, FGFR3 受体的功能激活可由本领域技术人员按照已知方法容易地评估。实际上, 因为被激活的 FGFR3 受体在位于朝向胞浆结构域的酪氨酸残基 (即, Tyr^{648} 和 Tyr^{647}) 上是磷酸化的, 所以 FGFR3 受体的功能激活可例如通过测量其磷酸化来评估。

[0045] 例如, 可如 Le Corre 等 (Org. Biomol. Chem., 8: 2164-2173, 2010) 所述进行 FGFR3 受体之配体诱导的磷酸化的分析。

[0046] 或者, 细胞中的受体磷酸化可容易地使用特异性识别该修饰的抗体通过免疫细胞化学、免疫组织化学和/或流式细胞术进行检测。例如, FGFR3 在 Tyr^{648} 和 Tyr^{647} 残基上的磷酸化可使用针对磷酸化 Tyr^{648} 和 Tyr^{647} -FGFR3 的单克隆抗体或多克隆抗体通过免疫细胞化学、免疫组织化学和/或流式细胞术来检测。

[0047] 此外, FGFR3 在与其配体结合时通过激活 ERK 和 p38MAP 激酶途径以及 STAT 途径来介导信号传导。因此, 还可通过测定这些特定途径的激活来评估 FGFR3 受体的激活, 如 Horton 等 (Lancet, 370: 162-172, 2007) 所述。

[0048] 在一个实施方案中, 本发明多肽可包含标签。标签是可用于纯化多肽的含表位序列。其通过多种技术 (如亲和色谱) 连接, 用于使用免疫标记技术对细胞或组织样品内的所述肽或多肽进行定位, 通过免疫印迹检测所述多肽等。本领域中通常采用的标签的实例为 GST (谷胱甘肽-S-转移酶) - 标签、FLAGTM-标签、Strep-tagTM、V5 标签、myc 标签、His 标签 (其通常由六个组氨酸残基组成) 等。

[0049] 在另一个实施方案中, 本发明多肽可包含改善其稳定性和/或其生物可用性 (biodisponibility) 的化学修饰。这类化学修饰的目的在于获得增加的使多肽免于在体内酶促降解的保护, 和/或增加穿过膜屏障的能力的多肽, 从而增加其半衰期并维持或提高其生物学活性。本领域已知的任何化学修饰都可根据本发明使用。这类化学修饰包括但不限于:

[0050] - 氨基酸替换为经修饰氨基酸和/或不常见氨基酸, 例如, 氨基酸替换为不常见氨基酸, 如 Nle、Nva 或 Orn; 和/或

[0051] - 肽的 N 端和/或 C 端的修饰, 如 N 端酰化 (优选乙酰化) 或脱氨基作用, 或者 C 端羧基修饰成酰胺或醇基团;

[0052] - 两个氨基酸间之酰胺键处的修饰: 在连接两个氨基酸的酰胺键的氮原子或 α 碳的酰化 (优选乙酰化) 或烷基化 (优选甲基化);

[0053] - 连接两个氨基酸的酰胺键的 α 碳的修饰, 例如, 连接两个氨基酸的酰胺键的 α 碳的酰化 (优选乙酰化) 或烷基化 (优选甲基化);

[0054] - 手性改变, 例如, 一个或更多个天然氨基酸 (L-对映体) 替换为对应的 D-对映体;

[0055] -向后倒位 (retro-inversion) ,其中一个或更多个天然氨基酸 (L-对映体) 被替换为对应的D-对映体,并且氨基酸链发生倒位 (由C端至N 端) ;

[0056] -氮杂肽,其中一个或更多个 α 碳被替换为氮原子;和/或

[0057] - β 肽,其中一个或更多个氨基酸的氨基与 β 碳而不是 α 碳键合。

[0058] 在另一个实施方案中,添加二肽可通过使用内源性转运蛋白增加循环物质在眼中通过血视网膜屏障的渗透。

[0059] 用于提高药物活力 (drug viability) 的另一种策略是使用水溶性聚合物。多种水溶性聚合物已显示出改变生物分布、改善细胞摄入模式、改变通过生理屏障的渗透性以及改变从身体清除的速率。为了实现靶向或持续释放作用,已经合成了这样的水溶性聚合物,其包含药物部分作为末端基团,作为骨架的一部分,或者作为聚合物链的侧基 (pendent group) 。

[0060] 考虑到聚乙二醇 (PEG) 的高度生物相容性和易于修饰,其已被广泛用作药物载体。已表明,与多种药物、蛋白质和脂质体连接增加了滞留时间并降低了毒性。虽然PEG可通过链末端的羟基以及通过其他化学方法与活性剂偶联,但是PEG自身限于每分子连接至多两种活性剂。在一种不同的途径中,采用PEG和氨基酸的共聚物作为新生物材料,其将保留PEG的生物相容性,但是其将具有每分子多个连接点 (提供更大的载药量) 的额外优势,并且可对其进行合成设计以适合于多种应用。

[0061] 本领域技术人员知道用于有效修饰药物的PEG化 (PEGylation) 技术。例如, VectraMed (Plainsboro, N.J.) 使用了由PEG和三官能单体 (如赖氨酸) 的交替聚合物组成的药物递送聚合物。PEG链 (通常为2000道尔顿或更小) 与赖氨酸的 α -氨基和 ϵ -氨基通过稳定的尿烷 (urethane) 键连接。这样的共聚物保留了PEG的期望性质,同时沿聚合物链以严格控制且预定的间隔提供反应性侧基 (赖氨酸的羧基)。反应性侧基可用于与其他分子衍生化、交联或缀合。通过改变聚合物的分子量、PEG区段的分子量和药物与聚合物之间的可裂解键,这些聚合物可用于产生稳定的长期循环前药。PEG区段的分子量影响药物/连接基团复合体的间隔和每分子量缀合物中药物的量 (越小的PEG区段提供越大的载药量)。一般来说,增加嵌段共聚物缀合物的总分子量将使所述缀合物的循环半衰期增加。然而,缀合物必须是可容易降解的,或者必须具有低于阈值限制性肾小球过滤 (glomerular filtration) 的分子量 (例如,小于60kDa)。

[0062] 此外,因为聚合物骨架在维持循环半衰期和生物分布方面是重要的,所以可使用接头以在治疗剂因特定触发 (通常是靶组织中的酶活性) 而从骨架聚合物释放之前使所述治疗剂维持为前药形式。例如,在需要递送至生物分布的特定位置并且在病理学位置或附近释放治疗剂的情况下,该类型的组织激活药物递送是特别有用的。用于激活药物递送的连接基团文库对于本领域技术人员是已知的并且其可以以酶动力学、活性酶的盛行 (prevalence) 和所选疾病特异性酶的裂解特异性为基础。这样的接头可用于修饰本文所述的蛋白质或蛋白质的片段以用于治疗性递送。

[0063] 在又一个实施方案中,本发明多肽可与异源多肽 (即,来源于无关蛋白质的多肽,例如,来源于免疫球蛋白的多肽) 融合。

[0064] 本文使用的术语“融合 (fused)”和“融合 (fusion)”可互换使用。这些术语是指两个或更多个元件或组分通过任何手段 (包括化学缀合或重组手段) 连接在一起。“框内融合”

是指两个或更多个多核苷酸开放阅读框 (ORF) 以维持原始ORF的正确翻译阅读框的方式连接形成连续的更长的ORF。例如,重组融合蛋白可以是包含两个或更多个对应于原始ORF 编码之多肽的区段(所述区段在自然中通常不如此连接)的单个蛋白质。虽然由此制备的阅读框在整个融合区段中是连续的,但是所述区段也可通过例如框内接头序列被物理或空间隔开。

[0065] 本文使用的术语“sFGFR3融合蛋白”是指包含与异源多肽融合的 FGFR3多肽或其功能等同物的多肽。FGFR3融合蛋白一般具有至少一种与FGFR3多肽一样的生物学性质(如上所述)。

[0066] sFGFR3融合蛋白的一个实例是sFGFR3免疫粘附素。

[0067] 还应注意,本发明的另一个方面涉及分离的sFGFR3免疫粘附素及其作为药物的用途。

[0068] 本文使用的术语“免疫粘附素”是指将异源蛋白(“粘附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能组合起来的抗体样分子。结构上,免疫粘附素包含免疫球蛋白恒定结构域序列与具有不同于抗体之抗原识别和结合位点的期望结合特异性的氨基酸序列(即,其是“异源”的)的融合。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是包含至少配体或受体的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定结构域可获自任意免疫球蛋白,如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亚型,IgA(包括IgA-1 和IgA-2),IgE,IgD或IgM。

[0069] 免疫球蛋白序列优选地但不一定是免疫球蛋白恒定区(Fc区)。免疫粘附素可具有人抗体的多种有价值的化学和生物学性质。因为免疫粘附素可由具有期望特异性的人蛋白质序列与适当的人免疫球蛋白铰链结构域和恒定结构域(Fc)序列连接来构建,所以目的结合特异性可全部使用人组分来实现。这样的免疫粘附素对患者的免疫原性最小,并且对于长期或重复使用是安全的。在一个实施方案中,Fc区是天然序列Fc区。在另一个实施方案中,Fc区是变体Fc区。在又一个实施方案中,Fc区是功能 Fc区。sFGFR3免疫粘附素的sFGFR3部分和免疫球蛋白序列部分可通过最小接头连接。免疫球蛋白序列优选地但不一定是免疫球蛋白恒定区。本发明嵌合体中的免疫球蛋白部分可获自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,IgA,IgE,IgD或IgM,但是优选IgG1或IgG3。

[0070] 本文使用的术语“Fc区”用来限定免疫球蛋白重链的C端区,包括天然序列Fc区和变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链Fc区的边界可变化,但是人IgG重链Fc区通常限定为从位置Cys226或Pro230的氨基酸残基延伸至其羧基端。

[0071] sFGFR3融合蛋白的另一个实例是sFGFR3多肽与根据AlbudAbTM技术平台的人血清白蛋白结合结构域抗体(AlbudAb)的融合,如 Konterman等,2012AlbudAbTMTechnology Platform—Versatile Albumin Binding Domains for the Development of Therapeutics with Tunable Half-Lives所述。

[0072] 本发明多肽可通过对于本领域技术人员将是明显的任何合适手段产生。为了产生足够量的sFGFR3或其功能等同物、或者sFGFR3融合蛋白(如根据本发明使用的sFGFR3免疫粘附素),表达可方便地通过在适当条件下培养包含本发明多肽的重组宿主细胞来实现。优选地,多肽通过重组手段,通过编码核酸分子的表达来产生。用于在多种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是公知的。

[0073] 当以重组形式表达时,多肽优选地通过在宿主细胞中由编码核酸表达来产生。根

据特定系统的独特要求,可使用任意宿主细胞。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、仓鼠崽肾细胞以及多种其他细胞(例如,HE 293细胞)。细菌也是用于产生重组蛋白的优选宿主,因为细菌可容易操作并生长。常见的优选细菌宿主是大肠杆菌(*E. coli*)。

[0074] 而且,应注意,大多数基于蛋白质的生物药品具有某形式的翻译后修饰,这可大大影响蛋白质与其治疗应用有关的性质。蛋白质糖基化代表最常见的修饰(约50%的人蛋白质是糖基化的)。糖基化可通过在组合物内的蛋白质上产生不同的聚糖结构将相当大的异质性引入蛋白质组合物中。这样的聚糖结构随着糖蛋白转运内质网(ER)和高尔基体(糖基化级联)通过糖基化机制的不同酶作用而制造出来。蛋白质聚糖结构的性质对蛋白质折叠、稳定性、寿命、运输、药物动力学、药代动力学和免疫原性都有影响。聚糖结构对蛋白质的初级功能活性具有很大影响。糖基化可影响局部蛋白质结构并且可帮助引导多肽链折叠。一种重要的聚糖结构是所谓的N-聚糖。其通过寡糖与新生多肽链的共有序列NXS/T中天冬酰胺的氨基(N)共价连接产生。N-聚糖还可参与蛋白质至其最终靶标的分选和定向:抗体的N-聚糖例如可与补体组分相互作用。N-聚糖还起稳定糖蛋白的作用,例如,通过增加其溶解性、屏蔽其表面上的疏水片、保护免于蛋白质水解和引导链内稳定相互作用来起作用。糖基化可调节蛋白质半衰期,例如,在人中,在N-聚糖中存在末端唾液酸可增加蛋白质在血流中循环的半衰期。

[0075] 本文使用的术语“糖蛋白”是指具有一个或更多个与其连接的N-聚糖的任何蛋白质。因此,该术语既指本领域中一般认为是糖蛋白的蛋白质,也指进行基因工程以包含一个或更多个N连接糖蛋白位点的蛋白质。本文使用的术语“N-聚糖”和“糖形”可互换使用并且是指N连接寡糖,例如,通过天冬酰胺-N-乙酰葡萄糖胺键与多肽的天冬酰胺残基连接的寡糖。N-连接糖蛋白包含与蛋白质中天冬酰胺残基的酰胺氮连接的N-乙酰葡萄糖胺残基。糖蛋白中发现的主要糖类是葡萄糖、半乳糖、甘露糖、海藻糖、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和唾液酸(例如, N-乙酰神经氨酸(NANA))。糖基团的加工在ER腔中与翻译同时发生并且在N-连接糖蛋白的高尔基体中在翻译后继续。

[0076] 最近正在开发多种酵母,如毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),以利用这些系统的优点并消除关于糖基化的缺点。正在通过遗传开发几种菌株以在蛋白质上产生限定的人样聚糖结构。美国专利No.7,029,872和7,449,308中描述了用于基因工程酵母以产生人样N-聚糖的方法,并且美国公开申请No.20040230042、20050208617、20040171826、20050208617和20060286637中也描述了这样的方法。这些方法已经用于构建可产生治疗性糖蛋白的重组酵母,所述治疗性糖蛋白在其上主要具有人样复合体或杂合N-聚糖,而不是酵母型N-聚糖。如前所述,人样糖基化的特征主要在于包含N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、果糖和/或N-乙酰神经氨酸的“复合”N-聚糖结构。因此,对酵母的几种菌株进行了基因工程以产生包含一种或更多种人样复合体或人样杂合N-聚糖(如GlcNAcMan3GlcNAc2)的糖蛋白。

[0077] 本文使用的术语“骨骼生长迟缓病症”是指特征在于骨变形和/或畸形的骨骼病。

[0078] 这些病症包括但不限于由生长板(骨骺(physeal))骨折造成的骨骼生长迟缓病症、特发性骨骼生长迟缓病症和FGFR3相关骨骼病。

[0079] 本文使用的术语“特发性骨骼生长迟缓病症”是指其原因未知并且其用外源性生长激素(GH)(如重组人GH(rhGH))治疗例如已表明无效的骨骼病。

[0080] 在本发明的上下文中,术语“FGFR3相关骨骼病”旨在意指由FGFR3的激活异常增加,特别是由FGFR3受体的功能获得性突变体表达造成的骨骼病。本文使用的表述“功能获得性FGFR3受体变体”、“FGFR3的功能获得性突变体”或“表现出延长活性的突变FGFR3”可互换使用,并且是指所述受体的以下突变体:其在FGF配体存在下表现出比对应野生型受体的生物学活性(即,触发下游信号传导)更高的生物学活性。

[0081] FGFR3相关骨骼病优选地是FGFR3相关骨骼发育不良和FGFR3相关颅缝早闭。

[0082] 根据本发明的FGFR3相关骨骼发育不良可对应于遗传病或散发病。

[0083] 本文使用的术语“FGFR3相关骨骼发育不良”包括但不限于I型致死性发育不良、II型致死性发育不良、软骨发育不良、软骨发育不全和SADDAN(伴随发育迟缓和黑棘皮症的严重软骨发育不全)。

[0084] 在一个优选实施方案中,FGFR3相关骨骼发育不良由对象中如上所定义的功能获得性FGFR3受体变体的表达造成。

[0085] 在一个优选实施方案中,FGFR3相关骨骼发育不良是由FGFR3受体的G380R功能获得性突变体的表达造成的软骨发育不全。

[0086] 或者,FGFR3相关骨骼发育不良是由FGFR3受体的G375C、G346E或S279C的表达造成的软骨发育不全。

[0087] 还应注意,还涵盖了由将在未来鉴定的FGFR3受体的另一突变体造成的软骨发育不全。

[0088] 在一个优选实施方案中,FGFR3相关骨骼发育不良是由FGFR3受体的功能获得性突变体N540K、K650N、K650Q、S84L、R200C、N262H、G268C、Y278C、V381E的表达造成的软骨发育不良。

[0089] 在一个优选实施方案中,FGFR3相关骨骼发育不良是由FGFR3受体的功能获得性突变体的表达造成的I型致死性发育不良,所述功能获得性突变体选自R248C、S248C、G370C、S371C、Y373C、X807R、X807C、X807G、X807S、X807W和K650M FGFR3受体。

[0090] 在一个优选实施方案中,FGFR3相关骨骼发育不良是由FGFR3受体的K650E功能获得性突变体的表达造成的II型致死性发育不良。

[0091] 在一个优选实施方案中,FGFR3相关骨骼发育不良是由FGFR3受体的K650M功能获得性突变体的表达造成的伴随发育迟缓和黑棘皮症的严重软骨发育不全。

[0092] 本发明还提供了用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的可溶性FGFR3(sFGFR3)多肽的步骤。

[0093] 如以上所述的sFGFR3的“治疗有效量”意指拮抗剂足以预防或治疗FGFR3相关骨骼病(例如,软骨发育不全)的量。但是,应理解,本发明化合物和组合物的总日用量由主治医师在合理的医疗判断范围内来决定。对于任何特定的对象,具体的治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所采用具体化合物的活性;所采用的具体组合物;对象的年龄、体重、总体健康、性别和饮食;所采用具体化合物的施用时间、施用途径和排泄率;治疗的持续时间;与所采用的具体多肽组合或同时使用的药物;以及医学领域中公知的类似因素。例如,本领域技术人员熟知,化合物的开始剂量水平低于实现期望

治疗作用所需的水平并逐渐增加剂量直至实现期望作用。但是，产品的日剂量可在0.01 mg/成人/天至1,000mg/成人/天的宽范围中变化。优选地，组合物包含0.01 mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、1.0mg、2.5mg、5.0mg、10.0mg、15.0 mg、25.0mg、50.0mg、100mg、250mg和500mg的活性成分，用于根据症状调节施用至待治疗对象的剂量。药物通常包含约0.01mg至约500 mg的活性成分，优选1mg至约100mg的活性成分。有效量的药物通常以0.0002mg/kg体重/天至约20mg/kg体重/天，尤其是约0.001mg/kg体重/天至7mg/kg体重/天的剂量水平提供。

[0094] 本文使用的术语“对象”表示人或非人哺乳动物，例如啮齿类动物、猫、犬、马或灵长类动物。优选地，对象是人类，更优选地是儿童(即，正在成长的儿童)。

[0095] 应提醒的是，生长板的软骨基质的密度在新生儿中或在儿童中比在成年人中小。因此，不希望受理论束缚，可预期本发明多肽在新生儿或儿童中将更好地渗透所述软骨基质。

[0096] 在一个实施方案中，对象被诊断为患有FGFR3相关骨骼病。如前所述，FGFR3相关骨骼病由组成型活性的FGFR3受体变体(如G380R组成型活性突变体)在对象中的表达造成。

[0097] 在本发明的上下文中，本文使用术语“治疗”来表示目的在于以下的治疗方法或过程的特征：(1)使得使用该术语的疾病状态或病症的症状的进展、加剧或恶化减慢或停止；(2)缓解或减轻使用该术语的疾病状态或病症的症状；和/或(3)逆转或治愈使用该术语的疾病状态或病症。

[0098] 本文使用的术语“预防”旨在表示目的在于以下的预防性方法或过程的特征：延迟或防止使用该术语的疾病或病症的发作。

[0099] 本发明的药物组合物：

[0100] 如上所述的分离的可溶性FGFR3多肽(sFGFR3)可与可药用赋形剂并任选地与持续释放基材(如可生物降解聚合物)组合，以形成治疗组合物。

[0101] 因此，本发明还涉及药物组合物，其包含可药用载体和根据本发明的分离的sFGFR3多肽。

[0102] 本发明还涉及用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症的药物组合物，其包含可药用载体和根据本发明的sFGFR3。

[0103] 在一个实施方案中，骨骼生长迟缓病症是特发性生长迟缓病症。

[0104] 在另一个实施方案中，骨骼生长迟缓病症是FGFR3相关骨骼病。

[0105] “药物”或“可药用”是指视情况施用至哺乳动物(尤其是人)时不产生有害反应、变态反应或其他不良反应的分子实体和组合物。可药用载体或赋形剂是指任意类型的无毒固体、半固体或液体填料、稀释剂、封装材料或制剂辅助剂。

[0106] 药物组合物的形式、施用途径、剂量和方案自然取决于待治疗病症，疾病的严重程度，患者的年龄、体重和性别等。本发明的药物组合物可配制成用于表面、经口、鼻内、眼内、静脉内、肌内或皮下施用等。

[0107] 优选地，药物组合物包含对于能够被注射的制剂来说可药用的载剂。这些可特别地为等张的无菌盐水溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或者这些盐的混合物)，或者干燥(尤其是冷冻干燥)的组合物，其在根据情况添加无菌水或生理盐水后能够构成可注射溶液。

[0108] 施用所用的剂量可作为多种因素的函数，特别是作为所使用的施用模式、相关病

理学或可替代地期望的治疗持续时间的函数进行调整。例如,本领域技术人员熟知,化合物的开始剂量水平低于实现期望治疗作用所需的水平并逐渐增加剂量直至实现期望作用。但是,产品的日剂量可在0.01 mg/成人/天至1,000mg/成人/天的宽范围中变化。优选地,组合物包含0.01 mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、1.0mg、2.5mg、5.0mg、10.0mg、15.0 mg、25.0mg、50.0mg、100mg、250mg和500mg的活性成分,用于根据症状调节施用至待治疗对象的剂量。药物通常包含约0.01mg至约500 mg的活性成分,优选1mg至约100mg的活性成分。有效量的药物通常以0.0002mg/kg体重/天至约20mg/kg体重/天,尤其是约0.001mg/kg体重/天至7mg/kg体重/天的剂量水平提供。

[0109] 为了制备药物组合物,可将有效量的根据本发明的多肽溶解或分散于可药用载体或水性介质中。

[0110] 适合于可注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体;包含芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂;以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,所述形式必须是以无菌的并且必须是容易用注射器注射的流动程度存在。其必须在制造和储存条件下是稳定的并且必须对抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。可在与表面活性剂(如羟丙基纤维素)适当混合的水中制备活性化合物如游离碱或可药用盐的溶液。还可在甘油、液体聚乙二醇、其混合物中和在油中制备分散体。在储存和使用的普通条件下,这些制备物包含防腐剂以防止微生物生长。

[0111] 根据本发明的多肽可配制成中性或盐形式的组合物。可药用盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成)并且与无机酸(如盐酸或磷酸),或者有机酸(如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。与游离羧基形成的盐也可来源于无机碱(如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁),以及有机碱(如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0112] 载体也可以是溶剂或者包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),其合适的混合物和植物油的分散介质。例如,通过使用涂层(如卵磷脂),通过在分散情况下维持所需颗粒尺寸以及通过使用表面活性剂可维持适当的流动性。通过多种抗菌剂和抗真菌剂可防止微生物作用,如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒等。在很多情况下,其优选包含等张剂,如糖类或氯化钠。通过在组合物中使用吸收延迟剂(如单硬脂酸铝和明胶)可导致可注射组合物的延长吸收。

[0113] 如下来制备无菌可注射溶液:根据需要,将需要量的活性化合物与以上所列举的其他成分中的几种一起并入适当溶剂中,然后进行过滤灭菌。一般来说,分散体通过将多种无菌活性成分并入无菌制剂中来制备,所述无菌制剂包含基础分散介质和以上所列举的那些中需要的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分加上其之前无菌过滤溶液中的任何额外期望成分的粉末。

[0114] 还考虑了用于直接注射的更多或高度浓缩溶液的制备,其中预期使用 DMSO作为溶剂导致极快速渗透,从而向小肿瘤区域递送了高浓度的活性剂。

[0115] 配制后,溶液将以与剂型相容的方式并以治疗有效的量施用。制剂容易以多种剂型施用,如上述的可注射溶液类型,但是也可采用药物释放胶囊等。

[0116] 对于水溶液的肠胃外施用,例如,可对溶液进行适当缓冲并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等张。这些特定的水溶液尤其适合于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施

用。在这一点上,根据本公开内容,可采用的无菌水性介质对于本领域技术人员是已知的。例如,一剂量可溶解于1 ml等张NaCl溶液中并添加到1000ml皮下灌注流体或者在建议的输注位置处进行注射(参见例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第15版,第1035-1038和1570-1580页)。根据治疗对象的病症,剂量将必然发生一些变化。在任何情况下,负责施用的人都将决定对象的适当剂量。

[0117] 本发明的另一个方面是用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症的药物组合物,其包含可药用载体和根据本发明的分离的sFGFR3多肽或其功能等同物。

[0118] 在一个实施方案中,骨骼生长迟缓病症是特发性生长迟缓病症。

[0119] 在另一个实施方案中,骨骼生长迟缓病症是FGFR3相关骨骼病。

[0120] 本发明还提供了用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症的方法,其包括向有此需要的对象施用药物组合物的步骤,所述药物组合物包含可药用载体和治疗有效量的sFGFR3多肽或其功能等同物。

[0121] 通过以下附图和实施例将进一步阐明本发明。但是,这些实施例和附图不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

附图说明

[0122] 图1:在FLAG-sFGFR3存在下ATDC5细胞中的有效FGF结合和降低的Erk磷酸化。(A)将固定量的人或鼠碱性FGF(100ng)与逐渐增加浓度的FLAG-sFGFR3孵育。2小时后,通过ELISA检测剩余的未结合FGF。线性回归分析显示出两个斜率没有显著差异。hFGF:人FGFb; mFGF:小鼠FGFb。实验一式三份地进行并且重复五次。(B)通过在与逐渐增加剂量的FLAG-sFGFR3孵育后对ATDC5细胞进行免疫印迹来评价Erk磷酸化。该图表示了与未处理细胞中的磷酸化水平相比以百分比计的磷酸化变化。实验重复六次。在正态性验证后,使用单因素ANOVA进行统计学比较。 $^*p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$ 。值表示为平均值 \pm SD。

[0123] 图2:FLAG-sFGFR3处理对总体骨骼生长的作用。(A)说明对骨骼生长的处理作用的X射线放射照片。显示出的骨骼代表接受皮下注射PBS或5ng FLAG-sFGFR3的wt小鼠和Fgfr3^{ach/+}小鼠。生长通过体重(B)、体长和尾长(C)、以及长骨测量(D)来表征。数据符合正态分布;使用学生t检验来比较数据与在未处理小鼠中获得的测量结果。每组的n示于表1中;与未处理wt小鼠相比, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$;与未处理Fgfr3^{ach/+}小鼠相比, $^{##}p < 0.01$, $^{###}p < 0.001$ 。wt:野生型小鼠;ach: Fgfr3^{ach/+}小鼠。

[0124] 图3:FLAG-sFGFR3处理对椎骨成熟的作用。(A)通过右侧卧的小鼠的放射照片来测量脊柱后凸指数(kyphosis index, KI)。如Law等(28)所定义的,线AB是从C7后缘绘至L6后缘的线的长度。线CD是线AB与椎体距该线最远的背缘的距离。临幊上,脊柱后凸的特征在于 $KI < 4$ 。(B)来自未处理wt小鼠、未处理Fgfr3^{ach/+}小鼠和接受5ng FLAG-sFGFR3的转基因小鼠的代表性椎骨的照片。在该表中指示了不同处理组中具有不成熟C7、T11和腰椎的动物百分比。[§]腰部压迫(lumbar compression)的特征在于截瘫或运动缺陷。数据符合正态分布;使用学生t检验来比较数据与在未处理小鼠中获得的测量结果。每组的n示于表1中;与未处理wt相比, $^*p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$;与未处理Fgfr3^{ach/+}小鼠相比, $^{##}p < 0.01$, $^{###}p < 0.001$ 。wt:野生型小鼠;ach:Fgfr3^{ach/+}小鼠。

[0125] 图4:FLAG-sFGFR3处理对头盖骨发育的作用。(A)测量头盖骨长度(L)和宽度(W)并

计算L/W比。在验证正态方差和分布后使用学生t检验进行统计学分析。每组的n示于表1中;与未处理wt相比, $p<0.001$;与未处理Fgfr3^{ach/+}小鼠相比, $^{\#}p<0.05$ 。(B) 来自接受PBS或5ng FLAG-sFGFR3的wt和Fgfr3^{ach/+}小鼠的头盖骨的代表性X射线。其示出通常在Fgfr3^{ach/+}小鼠中观察到的颅软骨结合的提早闭合的处理预防。其由箭头指示。wt:野生型小鼠;ach:Fgfr3^{ach/+}小鼠。

实施例

[0126] 材料&方法

[0127] sFGFR亚克隆和重组蛋白产生:为了促进亚克隆,对编码 FGFR3 Δ TM的全长cDNA序列(2.1kb) (35) (Dr.Kurokawa-Seo,Kyoto Sangyo University,Japan的慷慨赠送) 进行优化以降低编码原始蛋白质序列时的GC含量(**GeneOptimizer®**过程, GeneArt)。使用HindIII和KpnI 克隆位点将所合成片段亚克隆到pFLAG-CMV3_G727 (Sigma Aldrich) 中。从经转化细菌中纯化质粒DNA并通过UV光谱术测定浓度。通过测序验证最终的构建体。所使用的限制位点内的序列同源性为100%。

[0128] 重组FLAG-sFGFR3蛋白通过使用GeneJuice转染试剂(Merck Millipore) 在允许所有必要的翻译后修饰的HEK 293细胞中进行瞬时转染而产生。每次转染都在细胞工厂(High flask T600,Merck Millipore) 中进行,所述细胞工厂在不含酚红并补充有谷氨酰胺2mM (Gibco,Life Technologies) 和1%抗生素(Gibco,Life Technologies) 的100ml DMEM (Gibco,Life Technologies) 中含有80%汇合HEK 293。将600 μ l GeneJuice和240 μ g pFLAG-sFGFR3重悬于30ml OptiMEM (Gibco,Life Technologies) 中,在室温下孵育30分钟,然后在5%CO₂中在37°C下孵育到细胞上4小时。然后将培养基更换为不含酚红,补充有谷氨酰胺2 mM和1%抗生素的120ml DMEM。72小时后,使用0.22 μ m过滤器过滤生产培养基并在Amicon Ultra-1560kDa (Merck Millipore) 上进行浓缩。然后在亲和柱(ANTI-FLAG M2Affinity Gel,Sigma Aldrich) 上按照制造商的说明书纯化重组蛋白。通过特异性ELISA (R&D Systems) 按照制造商的说明书测量FLAG-sFGFR3的量。然后将FLAG-sFGFR3以 0.5 μ g/ml的浓度储存在50%甘油溶液中。

[0129] FLAG-sFGFR3与FGF孵育:在37°C下将固定量的人或鼠FGF(100 pg) (R&D Systems) 与逐渐增加剂量的FLAG-sFGFR3(0至250ng/ml) 在PBS 1%BSA中孵育2小时。使用特定的商业ELISA试剂盒(R&D Systems) 来对剩余的未结合FGF进行定量。所有的实验一式三份地进行并重复五次。

[0130] sFGFR3的半衰期:为了确定sFGFR3的半衰期,使8周龄的WT 小鼠接受静脉内推注50mg/kg的FLAG-sFGFR3。在15分钟、1小时、3 小时、6小时和24小时,使用肝素导管通过眶后穿刺来收获血液(n=4)。通过抗FLAG ELISA (Sigma) 测量FLAG-sFGFR3的浓度。使用以下药代动力学方程计算末期的半衰期: $t_{1/2}=0.693/\lambda_z$,其中0.693是2的自然对数,而 λ_z 是末期的斜率。

[0131] 免疫印迹分析:在ATDC5细胞上孵育几种剂量的FLAG-sFGFR3后进行免疫印迹。为此,将ATDC5细胞以 2×10^6 的密度铺板在6孔板中,并在粘附后在包含1%抗生素的DMEM-F12 (Gibco,Life Technologies) 中在0.5%BSA中培养48小时。然后将细胞与100pg/ml鼠FGF 培养10 分钟,所述鼠FGF与逐渐增加剂量的FLAG-sFGFR3(0、12.5、125、1250、12500pg/ml)

在37°C下预孵育2小时。在孵育期结束时,通过特异性ELISA (R&D Systems) 测量剩余的未结合FGF。然后,在4°C下将细胞在裂解缓冲液 (20mM Tris、pH 7.4, 150mM NaCl、10mM EDTA、150mM NaF、2mM原钒酸钠、10mM焦磷酸盐、蛋白酶抑制剂和1% Triton X-100) 中溶解45分钟。清除裂解物 (14000rpm, 10分钟) 并通过SDS-PAGE分离蛋白质并如前所述地进行免疫印迹 (36)。用抗磷酸 p42/44MAPK (4370S, Cell Signaling)、抗总p42/44MAPK (4696S, Cell Signaling) 和抗hsp60 (sc1722, Santa Cruz Biotechnology) 抗体 (1μg/ml) 探测蛋白质。所有实验都进行六次。

[0132] FLAG-sFGFR3的免疫组织化学:在3日龄的Fgfr3^{ach/+}小鼠及其野生型同窝仔畜 (littermate) 的胫骨上进行FLAG-sFGFR3的免疫组织化学。为此,在将新生小鼠断头后,小心地收获胫骨,并在37°C下在5%CO₂中在5ng FLAG-sFGFR3存在下于24孔板中孵育24小时。然后在PBS 中冲洗胫骨并在10%福尔马林中固定24小时。在EDTA中脱钙24小时之后,用石蜡包埋骨并将5μm切片与5μg/ml抗FLAG M2-FITC单克隆抗体 (Sigma Aldrich) 孵育。用Hoechst溶液对切片进行复染色并在荧光显微术下进行观察。抗IgG抗体用作阴性对照。

[0133] 动物和处理:始终遵守实验动物护理原则 (Principles of Laboratory Animal Care, NIH出版号85-23, 1985年修订; <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>) 和用于保护用于科学目的之动物的欧洲委员会指南 (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm)。所有程序都是实验动物使用制度伦理委员会 (Institutional Ethic Committee for the use of Laboratory Animals) 批准的 (CIEPAL Azur) (批准号NCE-2012-52)。

[0134] 实验在其中突变体FGFR3表达由Col2a1启动子/增强子驱动的转基因Fgfr3^{ach/+}动物上进行 (22)。将小鼠暴露于12小时的光/暗周期并自由摄取标准实验室食物和水。所有的测量和分析都是盲法进行的,并在通过基因组DNA的PCR完成所有分析后对基因型进行分析,所述基因组的 PCR扩增了360bp的FGFR3转基因 (22)。测试了两种剂量的 FLAG-sFGFR3 (10μl含有50%甘油的PBS中0.5ng和5ng)。在第3 天,使来自一窝的所有新生小鼠接受相同剂量。对照窝接受10μl包含50%甘油的PBS。然后,每周两次交替地在背部的左侧和右侧皮下注射,持续三周。每天观察小鼠,并特别地注意运动和排尿变化。在第22天,每组中除两窝之外的所有动物都通过CO₂窒息处死;确定属和基因型。测量体重。通过心脏穿刺收获血液并将其与50μl 0.5M EDTA混合;将一半样品离心以用于使用Beckman AU 2700分析仪进行生物化学评估 (电解质 (Na⁺、K⁺、Cl⁻)、乳酸脱氢酶 (LDH)、胆固醇、肌酸酐、肌酸酐激酶 (CK)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、淀粉酶、总胆红素 (BLT)) ;另一半在不离心的情况下分析血细胞计数 (Hemavet 950FS, Mascot Hematology)。对尸体小心地进行剥皮并取出内脏,使用电子数字卡尺 (Fisher Scientific) 获得骨骼测量结果 (体长和尾长)。总体长从鼻子到最后尾椎骨末端进行测量;尾部从第一尾椎骨开始测量。收获器官 (心脏、肺、肝、肾、脾),称重并储存在10%福尔马林中以使用标准石蜡包埋技术进行进一步的组织学分析。使用Faxitron X射线机器 (Edimex) 取得所有骨骼的X射线。使用已建立的方法 (28),在X射线上测量每只动物的脊柱后凸指数。然后,使用标准方法用阿尔新蓝和茜素红同时对经清洁的骨骼进行染色并在分析前储存在甘油中。将经染色的长骨 (胫骨、股骨、肱骨) 切开并使用电子数字卡尺进行测量;还将椎骨和头盖骨切开并进行分析。

[0135] 设置饲养以理论上产生具有一半野生型小鼠和一半杂合Fgfr3^{ach/+}小鼠的数个窝。

为了避免因表型外显率变化引起的偏差,在来自同一饲养者 (breeder) 的至少2窝(一窝经处理而另一窝为对照) 中进行实验。总共15、9和11窝(总计312只幼畜) 分别用PBS、0.5ng或5ng FLAG-sFGFR3进行处理。每组的n示于表1中。

[0136] FLAG-sFGFR3对经处理动物的生育力的作用:保持来自不用于骨骼测量的窝的动物直至达到生育年龄。在8周龄时,使其与来自Charles River的8周龄FVB/N小鼠交配。对于每只经处理和对照的雄性和雌性小鼠,在出生时对新生小鼠进行计数,并与前一代的生育力统计进行比较。在22周龄时,使后代安乐死并如上所述地评价生长。

[0137] 增殖和分化测定:在ATDC5细胞上测定sFGFR3对增殖的影响。为此,将ATDC5细胞以 5×10^4 的密度铺板在24孔板中并在DMEM-F12 0.5% BSA (Life Technologies) 中培养48小时。然后在0或20ng/ml FLAG-sFGFR3存在下,用100pg/ml的FGF2、FGF9或FGF18攻击细胞72小时。使用MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑) 增殖测定通过测量540nm处的吸光度来评价增殖。

[0138] 为了确定处理对软骨细胞分化的作用,在100pg/ml FGF和0或20 ng/ml FLAG-sFGFR3存在下,将亚汇合 (sub-confluent) ATDC5细胞在 24孔板在软骨细胞分化培养基 (DMEM F12中的37.5 μ g/ml L-抗坏血酸、1mM丙酮酸钠、1%胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠、100nM地塞米松) 中孵育7天。在培养7天后,一半孔用3%乙酸中的阿尔新蓝, pH 2.5染色。在剩余孔中,使用RNeasy Mini Kit (Qiagen) 提取总RNA。使总RNA (1 μ g) 逆转录,并进行实时PCR (ABI PRISM 7500)。TaqMan基因表达测定购自Applied Biosystems: Col10a1 (Mm00487041_ml)、Col2a1 (Mm01309565_ml)、Sox9 (Mm00448840_ml)、Fgfr3 (Mm00433294_ml)、RPLP0 (Ribosomal Phosphoprotein Large P0, Mm00725448_s1)。用管家基因RPLP0的表达值归一化基因表达值,并之前所述基于比较循环阈值 Ct法 ($2^{-\Delta Ct}$) 进行计算。

[0139] 统计学分析:始终通过盲法实验进行所有的实验和数据测量。用GraphPad Prism 6.0软件进行统计学分析。为了确定待使用的统计学检验,验证了必要的假设。为了验证正态性和等方差性,分别进行Agostino 和Pearson综合正态性检验和Brown-Forsythe检验。因为所有的骨骼测量数据集满足正态性和等方差性要求,所以在不同的统计学分析中使用双尾学生t检验来比较两个独立组。处理组和对照组之间死亡率数据的比较通过使用Keuskal-Wallis检验来实现。FLAG-sFGFR3与人和鼠FGF的结合的比较通过线性回归来实现。免疫印迹数据分布符合正态性,并因此使用Holm-Sidak多重比较检验使用单因素ANOVA进行分析。对于器官重量相关性分析,在数据集符合或不符合正态分布时,分别使用Pearson 或Spearman检验。所有的统计学检验在p<0.05的误差水平下被认为是显著的。在所有附图中,p值如下示出: $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ 。数据表示为平均值±SD。

[0140] 结果

[0141] FLAG-sFGFR3在ADTC5细胞中有效结合FGF并降低MAPK信号传导:可溶形式的FGFR3通过瞬时转染编码FGFR3 Δ TM序列的质粒来产生。为了在体内检测重组可溶性FGFR3,本发明人使用标记有FLAG 标签的可溶形式的FGFR3。使用该标签是因为可用试剂对其进行纯化和检测(23、24)。其还已用于体内而不因免疫系统引起经标记蛋白质的过早消除(25、26)。在本实验中,重组FLAG-sFGFR3通过瞬时转染到允许所有必要的翻译后修饰的人胚肾细胞(HEK) 293细胞中产生,使用亲和柱纯化并以0.5 μ g/ml的浓度储存在50%甘油中。在小鼠中,sFGFR3 的半衰期为16小时。

[0142] 为了验证FLAG-sFGFR3有效结合游离FGF,将固定量的人FGF与逐渐增加量的FLAG-sFGFR3孵育。从图1A中看出,FLAG-sFGFR3以剂量依赖方式有效结合hFGF。所使用的FGFR3 Δ TM序列是人来源的,本发明人验证了其也可结合鼠FGF。获得了类似结果,并且 FLAG-sFGFR3能够结合类似量的鼠FGF。因为鼠FGFR3与人FGFR3 之间具有90%序列同源性,所以这是在预期之内的。sFGFR3与内源 FGFR3竞争结合鼠软骨细胞(ATDC5细胞)上的hFGF,证明了诱饵受体机制。

[0143] 然后,本发明人验证了FGF与FLAG-sFGFR3的复合导致了Erk磷酸化的胞内FGF信号传导降低。ATDC5细胞用作研究软骨细胞生物学的鼠软骨细胞系(27)。如可从图1B中看出,看到与FLAG-sFGFR3剂量有关的Erk磷酸化的显著降低。这与条件培养基中游离FGF的降低相关,与图1A中观察到的结果类似。这些结果证明,FLAG-sFGFR3有效结合人和鼠来源的FGF,从而降低FGF胞内信号传导。sFGFR处理还恢复了鼠ATDC5细胞的增殖和分化,并使collagen type 2、collagen type 10和 Sox9基因表达相对于单独的FGF显著提高($P < 0.05$,学生t检验)。在对照蛋白质存在下,没有观察到对增殖、分化或基因表达的作用。

[0144] 还探究了FGF非依赖机制。Stat1在经sFGFR3处理的Fgfr3^{ach/+}软骨细胞中不被磷酸化。而且,在分离自Fgfr3^{ach/+}动物的软骨细胞中通过 sFGFR3处理的fgfr3基因表达与仅FGF的对照相比没有变化。总之,这些数据表明sFGFR3作用仅通过FGF依赖性途径介导。

[0145] 可溶性FGFR3使Fgfr3^{ach/+}小鼠的存活增加并且在Fgfr3^{ach/+}小鼠中有效恢复骨生长:在测试体内FLAG-sFGFR3处理作用之前,本发明人验证了其可渗透生长板的致密软骨基质并到达靶软骨细胞。在5ng FLAG-sFGFR3存在下将从三天大的Fgfr3^{ach/+}小鼠及其野生型(wt)同窝仔畜分离的长骨孵育24小时。从图2看出,在wt小鼠和Fgfr3^{ach/+}小鼠胫骨生长板之软骨细胞附近的基质内检测到重组蛋白,表明所述蛋白有效地渗透生长板的致密软骨基质并到达靶软骨细胞。

[0146] 为了评价FLAG-sFGFR3处理在Fgfr3^{ach/+}小鼠中对骨骼生长的生物学作用,使来自一窝的所有新生小鼠在不知道其表型的情况下接受相同处理。其接受0.5ng或5ng FLAG-sFGFR3皮下注射,或者在对照组中接受PBS皮下注射,在3周中每周进行两次。首次观察到与未处理窝相比,经处理窝中的死亡率显著降低。在处理期结束时,对照组包含约三分之一的转基因动物存活,而在两个处理组中,有约50%的wt小鼠和50%的 Fgfr3^{ach/+}小鼠存活(表1)。而且,在对照窝中,与经0.5ng和5ng FLAG-sFGFR3处理的窝分别为11.8%和6.7%相比,31%的动物在实验结束之前死亡。组大小的这种减小是因为截瘫动物的早逝或安乐死。在可能时,进行验尸并确定因呼吸衰竭造成的死亡,如通过肺中血液的存在所看到的。两只动物死于肠梗阻。如通过基因分型所证实的,所有这些动物均为Fgfr3^{ach/+}。没有野生型动物过早死亡。值得强调的是,在对照组中,大多数的患病Fgfr3^{ach/+}小鼠死于呼吸衰竭,而在5ng FLAG-sFGFR3处理组中,其主要患上截瘫并且仅少数具有呼吸窘迫(表1)。总之,这些数据表明通过处理,较少的动物死亡并且死亡的那些动物具有较不严重的表型。

[0147] 表1:在第3天和第22天不同处理组中幼崽的数目。窝被认为是单个实体并且来自同一笼的所有新生小鼠接受相同处理。每天对死亡动物和存活动物进行计数。验尸表明2只动物因呼吸衰竭和肠梗阻而死亡。在死亡动物组中发现并记录后对截瘫动物进行安乐死。所有死亡动物都是 Fgfr3^{ach/+}。使用Kruskal-Wallis检验进行与对照组的统计学比较。** $p < 0.01$ 。wt:野生型小鼠;ach:Fgfr3^{ach/+}小鼠。

	每组窝数	幼崽数目		第22天前的%动物死亡 (死因)
		第3天	第22天	
[0148]	PBS	15	132	91 (wt: 67; ach: 24)
	0.5 ng sFGFR3	9	76	67 (wt: 31; ach: 36)
	5 ng sFGFR3	11	104	97 (wt: 47; ach: 50)

[0149] 在第22天断奶时,将动物处死并评价其生长。本发明人首次证实了雄性与雌性之间没有统计学差异(表S1),并对其进行重新分组用于后续所有的分析。如图2A所说明的,FLAG-sFGFR3处理对总骨骼生长具有作用。虽然Fgfr3^{ach/+}小鼠比其wt同窝仔畜平均轻20%,但是经 FLAG-sFGFR3处理的动物表现出其体重的剂量依赖性增加,达到未处理转基因小鼠重量的33% (图2B)。在wt动物的重量中也观察到了剂量依赖性处理作用。在图2C中看出,处理诱导Fgfr3^{ach/+}动物和wt动物二者体长和尾长的剂量依赖性增加。经处理转基因小鼠的身高与未处理wt对照的身高没有显著差异,达到在校正转基因小鼠与wt小鼠之间最初差异的高剂量下未处理Fgfr3^{ach/+}动物长度的10%。

[0150] 关于长骨长度获得了类似结果。来自经处理Fgfr3^{ach/+}小鼠的肱骨、股骨和胫骨长于未处理转基因小鼠的那些,并且统计学上与wt骨的长度相同(图2D)。FLAG-sFGFR3还对来自wt小鼠的长骨生长具有剂量依赖性作用。组织学证实了处理对软骨细胞成熟的作用。经处理Fgfr3^{ach/+}小鼠在其生长板中表现出与wt小鼠类似的有组织且肥大的软骨细胞。

[0151] sFGFR3处理还校正了Fgfr3^{ach/+}小鼠中的胸腔发育。总之,这些结果显示出,向初生Fgfr3^{ach/+}小鼠长期皮下施用FLAG-sFGFR3之后,恢复了正常的骨生长,并且其在不引发FGFR3激活突变的动物的骨骼生长方面也是有效的。事实上,在其各自的组中,经sFGFR3处理的Fgfr3^{ach/+}小鼠和WT小鼠显示出比载剂处理的动物更大的胸骨骨化和长度。

[0152] 表S1:不同处理组中雄性与雌性之间身体测量的统计学比较。在处理(PBS、0.5ng或5ng FLAG-sFGFR3)3周之后,在第22日龄将动物处死。测量体重、体长和尾长。确定属和基因型。在每组数据集中验证正态性变化之后,对相同处理和基因型组内的雄性和雌性进行测量结果的比较。数据符合正态分布;使用学生t检验来比较数据与未处理小鼠中获得的测量结果。在任何组中都未发现统计学差异。ns=不显著。wt:野生型小鼠;ach:Fgfr3^{ach/+}小鼠。

			<i>n</i>	体重 (g)	体长 (mm)	尾长 (mm)	雄性相对 于雌性
[0153]	PBS	wt	雄性	41	11.09 ± 1.26	132.43 ± 5.45	70.49 ± 3.65
			雌性	26	10.67 ± 1.99	134.04 ± 6.76	71.76 ± 4.60
	0.5 ng sFGFR3	ach	雄性	13	9.18 ± 1.82	120.56 ± 5.71	64.36 ± 2.52
			雌性	11	8.14 ± 1.55	113.95 ± 8.22	60.03 ± 3.79
[0154]	5 ng sFGFR3	wt	雄性	12	12.31 ± 1.27	134.55 ± 7.98	73.94 ± 6.35
			雌性	19	12.03 ± 1.18	134.59 ± 6.46	72.25 ± 4.51
	ach		雄性	19	10.50 ± 1.19	126.78 ± 9.38	69.48 ± 6.64
			雌性	17	9.34 ± 1.47	121.49 ± 10.01	65.33 ± 7.96
[0155]	FLAG-sFGFR3	wt	雄性	23	13.29 ± 1.48	141.47 ± 6.77	74.76 ± 5.42
			雌性	24	12.13 ± 1.85	138.73 ± 8.21	74.01 ± 6.01
	ach		雄性	13	11.41 ± 3.14	130.43 ± 13.11	69.15 ± 9.07
			雌性	37	10.72 ± 2.19	127.59 ± 11.58	67.43 ± 7.95

[0154] FLAG-sFGFR3处理在Fgfr3^{ach/+}小鼠中降低了与软骨发育不全相关的脊柱和头盖骨变形:在Fgfr3^{ach/+}小鼠中,特别地,通过可通过计算脊柱后凸指数(KI)来表征的脊柱后凸的存在识别脊柱异常。在Laws等建立的该评分系统(28)中,KI<4.0的小鼠表现为脊柱后凸(更具体地,请参见图3的说明)。在本研究中,没有wt动物表现出脊柱变形,而80%的未处理Fgfr3^{ach/+}小鼠表现出平均KI为3.46±0.65的颈椎后凸(图3A)。通过FLAG-sFGFR3处理,在0.5ng和5ng组中,该百分比分别显著降低至17%和6%。

[0155] 为了进一步表征椎骨成熟,本发明人分析了C7和T11的骨化。从图3B中看出,在未处理Fgfr3^{ach/+}小鼠中,分别有88.9%和70.1%的第7颈椎和第11胸椎在中线处不融合。处理后,恢复成熟,如通过不成熟椎骨数目的减少所看到的。在任何组中都没有wt动物表现出不成熟椎骨。

[0156] 与通常具有头部膨大的软骨发育不全患者类似,Fgfr3^{ach/+}小鼠遭受头盖骨变形。虽然颅宽度(W)在转基因小鼠与wt小鼠之间没有统计学差异(分别为10.35±0.28mm与10.17±0.32mm),但是Fgfr3^{ach/+}小鼠中的长度(L)显著更短(分别为18.11±0.75mm与wt小鼠中的20.05±0.51mm)。这导致L/W比在未处理Fgfr3^{ach/+}小鼠中等于1.75±0.77,而在对照wt小鼠中等于1.94±0.05(图4A)。FLAG-sFGFR3处理引发颅长度的剂量依赖性校正,并且在最高剂量的FLAG-sFGFR3下,L/W比与未处理wt的L/W比没有显著差异。

[0157] 从图4B中看出,处理还防止了通常在Fgfr3^{ach/+}小鼠中观察到的颅软骨结合的过早闭合。

[0158] 总之,这些结果表明,FLAG-sFGFR3处理在预防与软骨发育不全相关的骨骼变形发生方面是有效的。

[0159] 在经处理动物中没有检测到毒物学作用:因为本发明人使用全身方法来递送重组可溶性FGFR3,所以他们特别注意可能的不想要的副作用。他们分析了所有255只动物的器官,进行了生物化学和计算血液测试并验证了一些经处理动物(每组中两窝)的生育力,包括其后代的正态性。

[0160] 首先在处死时对于几种器官(肝、肺、心脏、脾、肾)评价了潜在的处理副作用。宏观地观察器官,称重并随机地通过组织学进行微观分析。接受FLAG-sFGFR3或PBS长期皮下注射的255只动物都没有表现出宏观异常。对在所有组中随机选择的器官进行组织学分析并由解剖病理学家对数据进行盲法分析。在任何组织学载玻片上都没有观察到毒性迹象。在所有的对照组中,器官重量与小鼠体重相关(表2)。在处理组中,器官随着骨生长增加而增加。例如,未处理Fgfr3^{ach/+}小鼠的肺为156.0±88.7 mg。其在5ng处理组中增加至172.5±67.5mg,达到未处理wt小鼠中肺的重量(170.5±36.3mg)。对于所有器官都发现了类似结果,并且在所有组中,这种重量增加与体重增加在统计学上相关(表2)。为了评价器官功能,进行了生物化学血液测试,包括电解质滴定,肝、肾和脾酶测定。所有的测试都证明在处理组和对照组中,Fgfr3^{ach/+}动物与wt动物之间是统计学相同的(表S2)。还分析了血液计数并且类似地,在处理组与对照组之间没有观察到血液制剂之间的差异(表S3)。

[0161] 表2:不同处理组中器官重量与体重之间的相关系数(r)。Pearson 或 Spearman 检验用于对每个处理组中的器官重量/体重相关性进行统计学分析。^{*}p<0.05; ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001。wt:野生型小鼠; ach:Fgfr3^{ach/+}小鼠。

处理	肝	心脏	肺	脾	肾
[0162]	PBS	0,892 ***	0,748 ***	0,857 ***	0,655 ***
	0.5ng sFGFR3	0,883 **	0,777 **	0,731 *	0,774 *
	5ng sFGFR3	0,881 ***	0,794 ***	0,720 ***	0,584 **
	PBS	0,941 ***	0,943 ***	0,886 **	0,726 **
	0.5ng sFGFR3	0,921 ***	0,758 *	0,709 **	0,650 *
	5ng sFGFR3	0,957 ***	0,983 ***	0,885 ***	0,883 ***
					0,848 ***
					0,828 ***
					0,850 ***

[0163] 表S2:血液生物化学参数不因FLAG-sFGFR3处理而改变。为了评价处理毒性,在处死时,使用Beckman AU 2700分析仪分析来自PBS和 5ng FLAG-sFGFR3组的血浆。通过测量电解质(Na⁺、K⁺、Cl⁻)、乳酸脱氢酶(LDH) 和胆固醇来评价总体健康。通过肌酸酐和肌酸酐激酶(CK) 测定来评估肾功能。通过天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(BLT) 和淀粉酶来分别评估肝和胰腺功能。使用单因素ANOVA 进行统计学比较。在任何组中都没有发现统计学差异。wt:野生型小鼠; ach:Fgfr3^{ach/+}小鼠。

	处理	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	LDH (UI/L)	胆固醇 (mmol/L)
[0164]	wt	PBS	810.8 ± 80.8	9.26 ± 0.51	75.20 ± 3.81	1672 ± 124
		5ng sFGFR3	818.3 ± 69.4	8.75 ± 0.59	72.83 ± 1.14	2059 ± 478
	ach	PBS	709.7 ± 90.5	8.97 ± 0.98	81.79 ± 3.79	1675 ± 228
		5ng sFGFR3	706.2 ± 57.0	9.20 ± 0.77	76.33 ± 0.88	1738 ± 402

	处理	肌酸酐 ($\mu\text{mol/L}$)	肌酸 (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	淀粉酶 (U/L)	总胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)
[0165]	wt	PBS	9.00 \pm 1.26	1389 \pm 679	155.1 \pm 27	65.5 \pm 16.5	138.1 \pm 4.7
		5ng sFGFR3	10.20 \pm 0.95	655 \pm 180	137.0 \pm 24.6	42.3 \pm 4.2	112.0 \pm 8.0
	ach	PBS	9.18 \pm 1.60	551 \pm 127	140.1 \pm 22.9	48.2 \pm 14.6	129.8 \pm 21.4
		5ng sFGFR3	12.33 \pm 1.43	943 \pm 261	196.4 \pm 51.2	77.7 \pm 14.5	20.3 \pm 0.6

[0166] 表S3: 血细胞计数不因FLAG-sFGFR3处理而改变。在处死时对血浆样品评价FLAG-sFGFR3处理对血液计数的作用。分析包括血红蛋白 (Hb)、血细胞比容 (Ht)、白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC) 和血小板 (PLT) 计数。评价不同白细胞群的百分比 (NE:嗜中性粒细胞; LY: 淋巴细胞; MO: 单核细胞; EO: 嗜酸性粒细胞; BA: 嗜碱性粒细胞)。使用单因素ANOVA进行统计学比较。在任何组中都没有发现统计学差异。wt: 野生型小鼠; ach: Fgfr3^{ach/+}小鼠。

	处理	Hb (g/dL)	Ht (%)	WBC (K/ μl)	RBC (K/ μl)	PLT (K/ μl)
[0167]	wt	PBS	8.11 \pm 0.11	16.82 \pm 1.72	4.31 \pm 0.39	5.63 \pm 0.02
		5ng sFGFR3	8.56 \pm 0.06	23.21 \pm 1.33	5.28 \pm 0.54	5.81 \pm 0.01
	ach	PBS	8.32 \pm 0.26	22.5 \pm 4.74	3.37 \pm 0.49	5.47 \pm 0.18
		5ng sFGFR3	8.25 \pm 0.15	17.44 \pm 1.12	5.86 \pm 0.81	5.67 \pm 0.04

	处理	NE (%)	LY (%)	MO (%)	EO (%)	BA (%)
[0168]	wt	PBS	30.76 \pm 1.86	53.56 \pm 2.49	7.52 \pm 0.59	5.89 \pm 0.44
		5ng sFGFR3	25.54 \pm 2.37	56.90 \pm 3.15	9.78 \pm 0.67	5.75 \pm 0.54
	ach	PBS	24.25 \pm 6.08	60.02 \pm 8.86	6.56 \pm 1.48	6.59 \pm 1.72
		5ng sFGFR3	29.25 \pm 1.47	51.88 \pm 2.39	10.16 \pm 0.82	6.99 \pm 1.20

[0169] 为了评价对繁殖力之不想要的副作用, 在处理三周后, 使动物断奶并在8周龄时与来自Charles River的wt FVB雄性或雌性交配。从表3中看出, 所有的经处理动物是能生育的, 并且其后代为正常大小, 有约50% wt/50% Fgfr3^{ach/+}后代。虽然与wt雌性的大小相比, Fgfr3^{ach/+}雌性通常具有大小略微减小的第一窝, 但是值得注意的是, 初产的经处理转基因雌性具有大小与wt初产雌性相同的窝幼崽, 证实了处理后其骨盆的扩大(表 3)。

[0170] 表3: FLAG-sFGFR3处理不影响经处理小鼠的生育力。在三周处理后使来自每组两窝的幼崽断奶。使其在8周龄时与来自Charles River的 wt动物交配。对于每个初产雌性, 对第一窝幼崽的数目进行计数。在22 天大时, 对动物进行安乐死。如前评价其体重。使用学生t检验来比较数据与由对照亲本产生的未处理wt动物的测量结果。与未处理wt相比, ***p < 0.001。N/A: 不适用。wt: 野生型小鼠; ach: Fgfr3^{ach/+}小鼠。

		每窝仔畜数	在第 22 天 wt 和 ach 的 %	体重 (g)	体长 (mm)
对照亲本	ach ♂ x wt ♀	9.2 ± 0.9	74% wt, 26% ach	wt, 10.88 ± 1.62	wt, 133.24 ± 6.11
	wt ♂ x ach ♀	7.7 ± 0.7 ***		ach, 8.66 ± 1.68 ***	ach, 117.25 ± 6.96 ***
[0171] 经 sFGFR3 处理	经处理 ach ♂ x wt ♀	10.2 ± 1.9	% wt, % ach		
	经处理 wt ♂ x wt ♀	9.7 ± 0.9	N/A		
	wt ♂ x 经处 理 ach ♀	10.6 ± 1.5	% wt, % ach		
	wt ♂ x 经处 理 wt ♀	9.8 ± 1.9	N/A		

[0172] 总之,这些实验既没有在血液制剂、器官功能和发育方面,也没有在经处理动物的生育力方面表现出由FLAG-sFGFR3处理自身引起的任何并发症,表明使用FGFR3的可溶形式可以是临床应用的可行处理途径。

[0173] 讨论:

[0174] 本研究验证了基于使用可溶性形式FGFR3的治疗策略可防止具有软骨发育不全突变之小鼠的异常骨生长的概念证明。通过在整个生长期中向动物皮下注射来施用处理,每周两次。在这三周处理期之后,确保软骨内骨生长导致了正常的协调身高。重要的是,这些作用是剂量依赖性的;0.5 ng FLAG-sFGFR3的剂量足以使得体重和体长与未处理wt小鼠相同,并且在5ng的剂量下,经处理的侏儒小鼠甚至更重,并且比未处理wt动物具有更长的长骨。首先,该结果强调了这样的见解:软骨发育不全突变需要激活配体结合。事实上,已证明,在G380R突变的情况下,FGFR3激活是配体依赖性的(12),但是仍然不清楚与文献(29-31)中的一致,表明不是一种而是多种机制导致延长的胞内信号传导。

[0175] 虽然恢复长骨生长对于有效的处理是必不可少的,但是关键的是还显著影响因骨骼变形引起的并发症发作。对于本发明人,如果想要开发临床治疗,则这是不可或缺的。在经处理Fgfr3^{ach/+}小鼠中,椎骨成熟的恢复和颅软骨结合的正常闭合对这些动物具有很多作用。第一个后果是降低了转基因群体中的死亡率。如结果部分中所述,尸检表明在大多数情况下为呼吸衰竭。基于侏儒小鼠的头盖骨和椎骨的解剖特征,本发明人认为这些是脑干压迫的结果,与可在软骨发育不全患者中观察到的类似。

[0176] 治疗作用的第二个后果是表型外显率的变化。虽然由测量结果看来治疗作用不完全是剂量依赖性的,并且更重要地,不如基于体重可预期的那样有效,但是本发明人认为,在最高剂量下,治疗从脑干压迫和呼吸衰竭中挽救最小的Fgfr3^{ach/+}小鼠。未处理的这些动物经过1或2周将不能存活。在该处理组中,本发明人假设这些动物是虽然具有较不严重并发症但仍然很小的那些动物。

[0177] 尽管研究软骨发育不全和相关骨骼发育不良所基于的机制的报道越来越多,但是仅有三个已经公开的研究表明在患有软骨发育不良的小鼠中测试为有效的治疗策略。Xie 等最近公开了报道,间歇性PTH治疗部分地拯救软骨发育不全小鼠的骨生长(32)。在其研究中,在出生后4周中每天以100 μ g/kg体重/天的剂量皮下施用PTH。虽然PTH影响FGFR3 胞内信号传导的机制还没有明确确定,但是在经处理转基因小鼠中骨生长得到了部分拯救;经PTH处理的转基因小鼠仍然比其wt同窝仔畜小。在该研究中,除部分拯救颅软骨结合之外,仅提到很少关于软骨发育不全并发症的信息。TDII小鼠的致死表型通过对怀孕雌性的长期PTH治疗也得到拯救。另一种FGFR3信号传导的潜在治疗拮抗剂是C-利尿钠肽(CNP) (33)。在该文献中,作者通过在4周龄时开始持续静脉内输注合成CNP 3周来处理患有软骨发育不全的转基因小鼠。认为CNP使生长板的宽度增加,从而促进了生长板活性。用于人的最大障碍是CNP的半衰期非常短,估计在血浆中为2.6分钟(34)。

[0178] 最近公开了这样的研究,其描述了在12只幼畜中观察到了使用新 FGFR3结合肽来在TDII小鼠中拯救致死表型并部分恢复生长板的结构扭曲(19)。在该研究中,对MAPK信号传导和骨生长校正的作用仅是部分的,并且因为所述肽的短半衰期而可能需要每日施用。在这里,sFGFR3 的作用是更高程度的,并且完全恢复了正常身高。本发明人认为,包含 IgG 样结构域的可溶形式FGFR3的半衰期是显著延长的。事实上,在86 只经处理的Fgfr3^{ach/+}小鼠中,仅需要6次注射(在出生与断奶之间)就使骨生长完全恢复。可想象到,仅需要从第一年至青春期期间开始几次注射就可治疗作为门诊患者的软骨发育不全儿童。这将大大影响通常在每日注射方案中发生的注射副作用的发生。使用可溶性重组蛋白还允许在治疗期间如果安全问题出现以及在骨生长停止的青春期时快速终止。必要时,还可在治疗期和休止期之间交替。通过预防并发症,sFGFR3治疗将避免手术干预的必要性,并且还使因住院产生的任何压力降低。此外,我们的研究表明对经处理动物的血液或生育力和后代没有任何毒性作用。继续进行目前的研究以评价三周的sFGFR3处理是否对经处理小鼠的长期健康有作用。截至今天,经处理小鼠为6个月大,没有看到明显的副作用且血液测试是正常的。

[0179] 总之,本研究证明了靶向胞外区室中的FGFR3作为软骨发育不全中恢复生长板成熟并诱导正常骨生长的有效治疗的可行性。不存在不想要的副作用证明其用作用于由FGF 受体中突变激活造成的这种和相关软骨发育不良的有前途的疗法。此外,在本研究中,本发明人还报道了sFGFR3 处理对wt动物生长的积极作用。这在表明其可能对于治疗特发性生长迟缓,或预防其他罕见疾病如低磷酸酯酶症的严重并发症方面具有重要意义。

[0180] 参考文献:

[0181] 贯穿本申请,多个参考文献描述了本发明所涉及的现有技术水平。这些参考文献的公开内容通过引用并入本公开内容中。

[0182] 1.D.M.Ornitz,FGF signaling in the developing endochondral skeleton. Cytokine Growth Factor Rev 16,205 (Apr,2005) .

[0183] 2.M.L.Martinez-Frias,C.A.de Frutos,E.Bermejo,M.A.Nieto,Review of the recently defined molecular mechanisms underlying thanatophoric dysplasia and their potential therapeutic implications for achondroplasia.Am J Med Genet A 152A,245 (Jan,2010) .

[0184] 3.W.A.Horton,G.P.Lunstrum,Fibroblast growth factor receptor 3

mutations in achondroplasia and related forms of dwarfism. *Rev Endocr Metab Disord* 3,381 (Dec,2002) .

[0185] 4.M.J.Wright,M.D.Irving,Clinical management of achondroplasia. *Arch Dis Child* 97,129 (Feb,2012) .

[0186] 5.W.A.Horton,J.G.Hall,J.T.Hecht,Achondroplasia. *Lancet* 370,162 (Jul 14, 2007) .

[0187] 6.E.D.Shirley,M.C.Ain,Achondroplasia:manifestations and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 17,231 (Apr,2009) .

[0188] 7.P.Richette,T.Bardin,C.Stheneur,Achondroplasia:from genotype to phenotype. *Joint Bone Spine* 75,125 (Mar,2008) .

[0189] 8.F.Rousseau et al.,Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 371,252 (Sep 15,1994) .

[0190] 9.G.A.Bellus et al.,Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet* 56,368 (Feb,1995) .

[0191] 10.R.Shiang et al.,Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism,achondroplasia. *Cell* 78,335 (Jul 29,1994) .

[0192] 11.F.Rousseau et al.,Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in achondroplasia. *Horm Res* 45,108 (1996) .

[0193] 12.E.Monsonego-Oman,R.Adar,T.Feferman,O.Segev,A.Yayon,The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand- mediated receptor activation from down-regulation. *Mol Cell Biol* 20,516 (Jan,2000) .

[0194] 13.D.Harada et al.,Sustained phosphorylation of mutated FGFR3 is a crucial feature of genetic dwarfism and induces apoptosis in the ATDC5 chondrogenic cell line via PLCgamma-activated STAT 1. *Bone* 41,273 (Aug,2007) .

[0195] 14.E.Monsonego-Ornan,R.Adar,E.Rom,A.Yayon,FGF receptors ubiquitylation:dependence on tyrosine kinase activity and role in downregulation. *FEBS Lett* 528,83 (Sep 25,2002) .

[0196] 15.M.K.Webster,D.J.Donoghue,Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J* 15,520 (Feb 1,1996) .

[0197] 16.M.B.Laederich,W.A.Horton,FGFR3 targeting strategies for achondroplasia. *Expert Rev Mol Med* 14,e11 (2012) .

[0198] 17.C.Deng,A.Wynshaw-Boris,F.Zhou,A.Kuo,P.Leder,Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84,911 (Mar 22, 1996) .

[0199] 18.Z.Vajo,C.A.Francomano,D.J.Wilkin,The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders:the achondroplasia family of

skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev* 21, 23 (Feb, 2000).

[0200] 19. M. Jin et al., A novel FGFR3-binding peptide inhibits FGFR3 signaling and reverses the lethal phenotype of mice mimicking human thanatophoric dysplasia. *Hum Mol Genet*, (Oct 9, 2012).

[0201] 20. S. Garofalo et al., Skeletal dysplasia and defective chondrocyte differentiation by targeted overexpression of fibroblast growth factor 9 in transgenic mice. *J Bone Miner Res* 14, 1909 (Nov, 1999).

[0202] 21. D. Davidson et al., Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J Biol Chem* 280, 20509 (May 27, 2005).

[0203] 22. M. C. Naski, J. S. Colvin, J. D. Coffin, D. M. Ornitz, Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125, 4977 (Dec, 1998).

[0204] 23. T. D. Papakostas et al., Development of an efficiently cleaved, bioactive, highly pure FLAG-tagged recombinant human Mullerian Inhibiting Substance. *Protein Expr Purif* 70, 32 (Mar, 2010).

[0205] 24. K. Terpe, Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 523 (Jan, 2003).

[0206] 25. J. P. Louboutin, B. A. Reyes, L. Agrawal, E. Van Bockstaele, D. S. Strayer, Strategies for CNS-directed gene delivery: in vivo gene transfer to the brain using SV40- derived vectors. *Gene Ther* 14, 939 (Jun, 2007).

[0207] 26. L. R. Rodino-Klapac et al., Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* 18, 109 (Jan, 2010).

[0208] 27. F. M. Altaf, T. M. Hering, N. H. Kazmi, J. U. Yoo, B. Johnstone, Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater* 12, 64 (2006).

[0209] 28. N. Laws, A. Hoey, Progression of kyphosis in *mdx* mice. *J Appl Physiol* 97, 1970 (Nov, 2004).

[0210] 29. J. Placone, K. Hristova, Direct Assessment of the Effect of the Gly380Arg Achondroplasia Mutation on FGFR3 Dimerization Using Quantitative Imaging FRET. *PLoS One* 7, e46678 (2012).

[0211] 30. L. He, W. Horton, K. Hristova, Physical basis behind achondroplasia, the most common form of human dwarfism. *J Biol Chem* 285, 30103 (Sep 24, 2010).

[0212] 31. L. He, N. Shobnam, W. C. Wimley, K. Hristova, FGFR3 heterodimerization in achondroplasia, the most common form of human dwarfism. *J Biol Chem* 286, 13272 (Apr 15, 2011).

[0213] 32. Y. Xie et al., Intermittent PTH(1-34) injection rescues the retarded skeletal development and postnatal lethality of mice mimicking human

achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Hum Mol Genet* 21, 3941 (Sep 15, 2012) .

[0214] 33. A. Yasoda et al., Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology* 150, 3138 (Jul, 2009) .

[0215] 34. P. J. Hunt, A. M. Richards, E. A. Espiner, M. G. Nicholls, T. G. Yandle, Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1428 (Jun, 1994) .

[0216] 35. M. Terada et al., Fibroblast growth factor receptor 3 lacking the Ig IIIb and transmembrane domains secreted from human squamous cell carcinoma DJM-1 binds to FGFs. *Mol Cell Biol Res Commun* 4, 365 (Nov, 2001) .

[0217] 36. A. Bertola et al., Hepatocyte growth factor induces glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes through A Gab1/phosphatidylinositol 3-kinase/Glut4 pathway. *J Biol Chem* 282, 10325 (Apr, 2007) .

序列表

<110> INSERM

<120> 用于预防或治疗骨骼生长迟缓病症的可溶性成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3) 多肽

<130> 12345GOUZE/AS

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 694

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人可溶性FGFR3多肽 (sFGFR3)

<400> 1

Met	Gly	Ala	Pro	Ala	Cys	Ala	Leu	Ala	Leu	Cys	Val	Ala	Val	Ala	Ile
1															

Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Leu	Gly	Thr	Glu	Gln	Arg	Val	Val
20								25				30			

Gly	Arg	Ala	Ala	Glu	Val	Pro	Gly	Pro	Glu	Pro	Gly	Gln	Gln	Glu	Gln
35							40				45				

[0001]	Leu	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Cys	Pro	Pro	Pro
	50				55					60						

Gly	Gly	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Thr	Val	Trp	Val	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly
65						70			75			80			

Leu	Val	Pro	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Val	Gly	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Val
85							90				95				

Leu	Asn	Ala	Ser	His	Glu	Asp	Ser	Gly	Ala	Tyr	Ser	Cys	Arg	Gln	Arg
100								105				110			

Leu	Thr	Gln	Arg	Val	Leu	Cys	His	Phe	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Asp	Ala
115					120					125					

Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Asp	Thr
130					135				140						

Gly	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Arg	Pro	Glu	Arg	Met	Asp
145						150			155			160			

Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Phe	Arg	Cys
165						170					175				

Pro	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly
180						185					190				

Arg	Glu	Phe	Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His
195						200				205					

Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly
 210 215 220

Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr
 225 230 235 240

Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
 245 250 255

Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu
 260 265 270

Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
 275 280 285

Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro
 290 295 300

Tyr Val Thr Val Leu Lys Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Met Ser
 305 310 315 320

Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly
 325 330 335

Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys
 340 345 350

[0002] Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu
 355 360 365

Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys
 370 375 380

Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp
 385 390 395 400

Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met
 405 410 415

Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
 420 425 430

Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys
 435 440 445

Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp
 450 455 460

Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys
 465 470 475 480

Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
 485 490 495

Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
 500 505 510

Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
515 520 525

Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
530 535 540

Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
545 550 555 560

His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
565 570 575

Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe
580 585 590

Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
595 600 605

His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser
610 615 620

Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Val Leu
625 630 635 640

Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro Phe Glu
645 650 655

[0003] Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Gly
660 665 670

Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
675 680 685

Ser Gly Gly Ser Arg Thr
690

<210> 2
<211> 2082
<212> DNA
<213> 人工

<220> 2
<223> 优化以降低GC含量的人可溶性FGFR3 DNA序列

<400> 2			
atgggcgcgc ctgcctgcgc cctcgctc tgcgtggccg tggccatcggt ggcggcgcc	60		
tcctcgaggat ctttggggac ggagcagcgc gtcgtgggc gagcggcaga agtccgggc	120		
ccagagcccg gccagcagga gcagttggc ttcggcagcg gggatctgt ggagctgagc	180		
tgtccccgc cgggggtgg tccatggg cccactgtct gggtaagga tggcacaggg	240		
ctgggtccct cggagcgtgt cctgggtggg cccagcggc tgcagggtct gaatgcctcc	300		
cacgaggact cggggcccta cagtcgcgg cagcggctca cgcagcgtt actgtgccac	360		
ttcagtgtgc gggtgacaga cgctccatcc tcgggagatg acgaagacgg ggaggacgag	420		
gctgaggaca caggtgtgga cacagggcc ctttactgga cacggcccga gggatggac	480		
aagaagctgc tggccgtgcc ggcgcacac accgtccgt tccgctgccc agccgctggc	540		

aaccccactc	cctccatctc	ctggctgaag	aacggcaggg	agtcccgccg	cgagcacccg	600
atggaggca	tcaagctcg	gcatcagcg	tggacctgg	tcatggaaag	cgtggtgc	660
tcggaccgcg	gcaactacac	ctgcgtcgt	gagaacaagt	ttggcagcat	ccggcagacg	720
tacacgctgg	acgtgttgg	gctgtccccc	caccggccca	tcctgcaggc	ggggctgcgg	780
gccaaccaga	cggcggtgt	gggcagcgc	gtggagttcc	actgcaaggt	gtacagtgc	840
gcacagcccc	acatccagt	gctcaagcac	gtggaggtga	atggcagcaa	ggtggcccg	900
gacggcacac	cctacgttac	cgtgctcaag	gtgtccctgg	agtccaaacgc	gtccatgagc	960
tccaacacac	caactggcg	catcgcaagg	ctgtcctcag	gggaggccc	cacgctggcc	1020
aatgtctccg	agctcgagct	gcctgcccac	cccaaatggg	agctgtctcg	ggcccggtg	1080
accctggca	agccccttgg	ggagggtgtc	ttcggccagg	tggcatggc	ggaggccatc	1140
ggcattgaca	aggaccggc	cgccaagcct	gtcaccgtag	ccgtgaagat	gctgaaagac	1200
gatgccactg	acaaggacct	gtcggacactg	gtgtctgaga	tggagatgat	gaagatgatc	1260
ggaaacacaca	aaaacatcat	caacctgt	ggccctgc	cgcaggcgg	gccctgtac	1320
gtgctgggt	agtacgcgc	caaggtaac	ctgcgggagt	ttctgcggc	cgccggccc	1380
ccggccctgg	actactc	cgacacctgc	aagccccc	aggagcagct	cacccatcg	1440
gacctgggt	cctgtecta	ccaggtggc	cgggcatgg	agtaactggc	ctcccagaag	1500
tgcattccaca	gggacctggc	tgcgttgc	ccgaggacaa	cgtgttgc	gatgttgc	1560
atcgagact	tgcgttgc	ccggacgt	cacaacctcg	actactaca	gaagacaacc	1620
aacggccggc	tgccctgaa	gtggatggc	cctgaggcct	tgttgcac	agtctacact	1680
caccagatg	acgtctggc	cgggggtc	ctgtctgg	agatcttac	gctgggggc	1740
tcccggtacc	ccggcatccc	tgtggaggag	ctttcaage	tgctgaagga	ggccacccgc	1800
atggacaagg	ccgccaactg	cacacacgc	ctgtacatga	tcatgcggg	gtgtggcat	1860
gccgcgcct	cccagaggcc	cacccatcg	cagctgg	aggacctgg	ccgtgtcc	1920
accgtgacgt	ccaccgacga	gtacctggc	ctgtcgcc	cttcgagca	gtactccc	1980
ggtggccagg	acacccccc	ctccagctcc	tcagggacg	actccgtt	tgcacacgac	2040
ctgctcccc	cggcccccacc	cagcagtgg	ggctcgccg	cg		2082

<210> 3
 <211> 806
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
 1 5 10 15

Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
 20 25 30

Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln
 35 40 45

Leu Val Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro
 50 55 60

Gly Gly Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly
65 70 75 80

Leu Val Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val
85 90 95

Leu Asn Ala Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg
100 105 110

Leu Thr Gln Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr
130 135 140

Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp
145 150 155 160

Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys
165 170 175

Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly
180 185 190

Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His
195 200 205

[0005] Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly
210 215 220

Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr
225 230 235 240

Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
245 250 255

Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu
260 265 270

Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
275 280 285

Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro
290 295 300

Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu
305 310 315 320

Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu
325 330 335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala
340 345 350

Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu

355	360	365
Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe		
370	375	380
Leu Phe Ile Leu Val Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser		
385	390	395
Pro Pro Lys Lys Gly Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile Ser Arg		
405	410	415
Phe Pro Leu Lys Arg Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Met Ser		
420	425	430
Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly		
435	440	445
Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys		
450	455	460
Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu		
465	470	475
Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys		
485	490	495
Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp		
500	505	510
[0006] Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met		
515	520	525
Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala		
530	535	540
Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys		
545	550	555
Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp		
565	570	575
Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys		
580	585	590
Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu		
595	600	605
Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu		
610	615	620
Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg		
625	630	635
Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu		
645	650	655

Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
660 665 670

His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
675 680 685

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

Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
705 710 715 720

His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser
725 730 735

[0007]

Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Val Leu
740 745 750

Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro Phe Glu
755 760 765

Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Gly
770 775 780

Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
785 790 795 800

Ser Gly Gly Ser Arg Thr
805

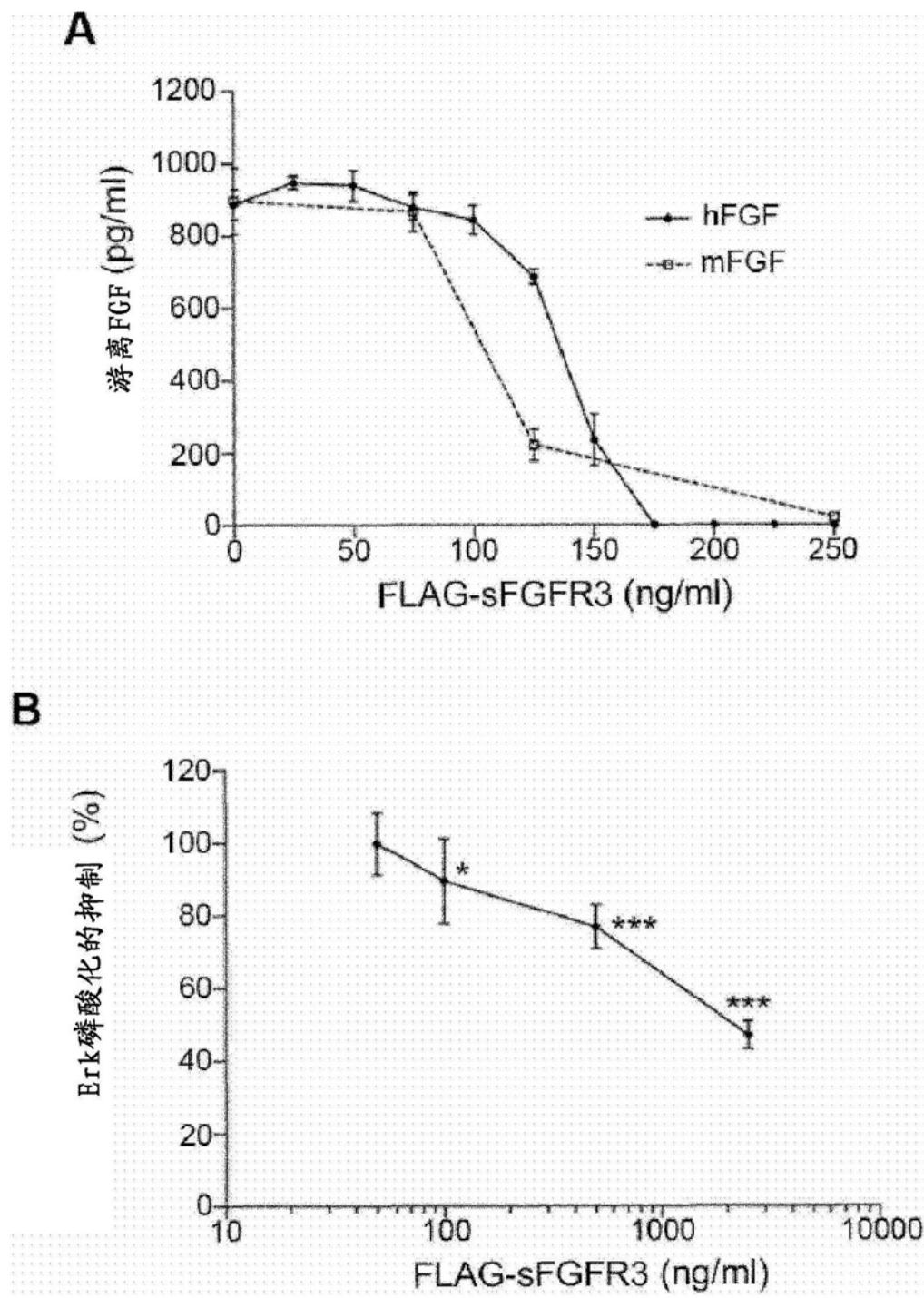


图1

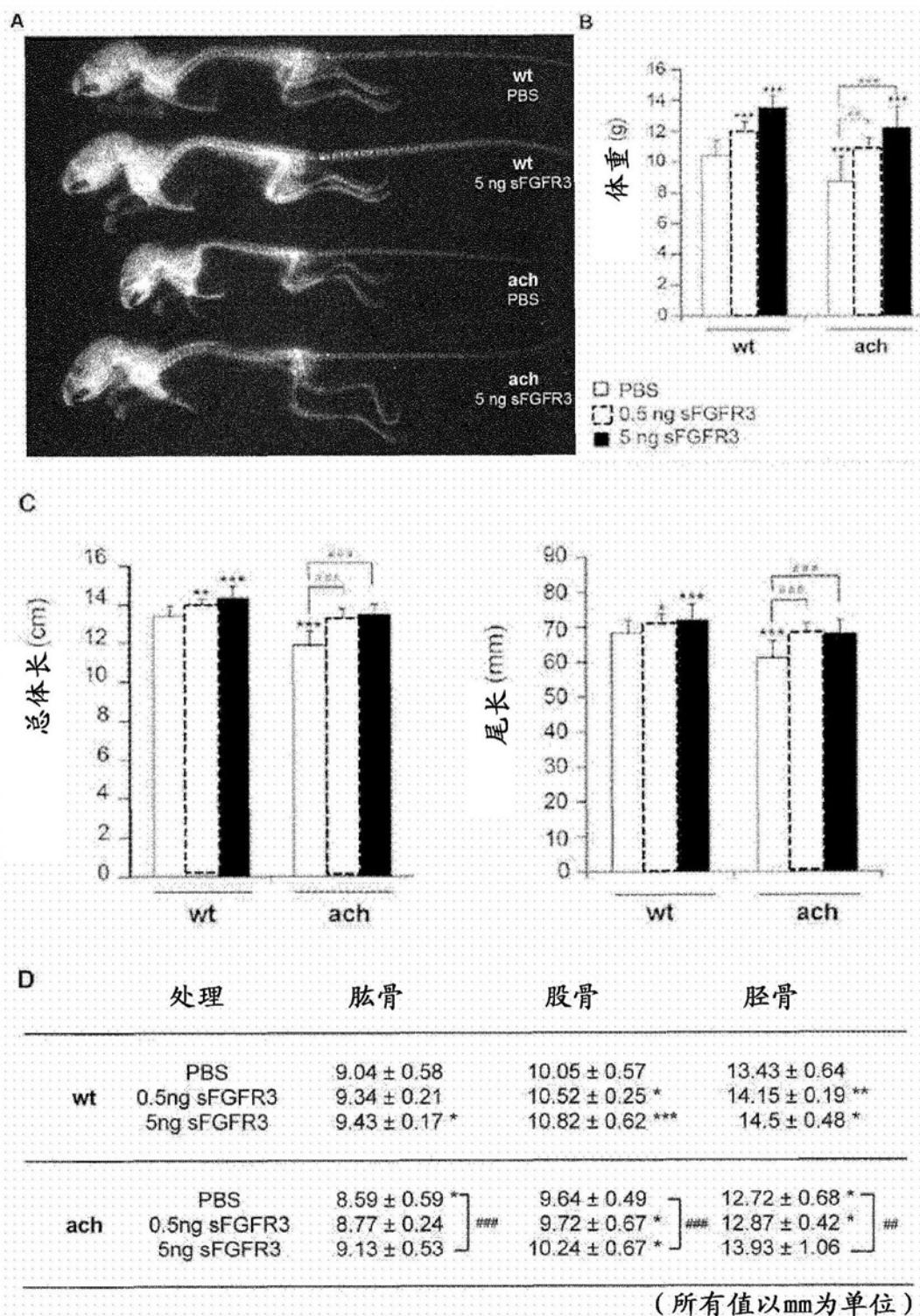


图2

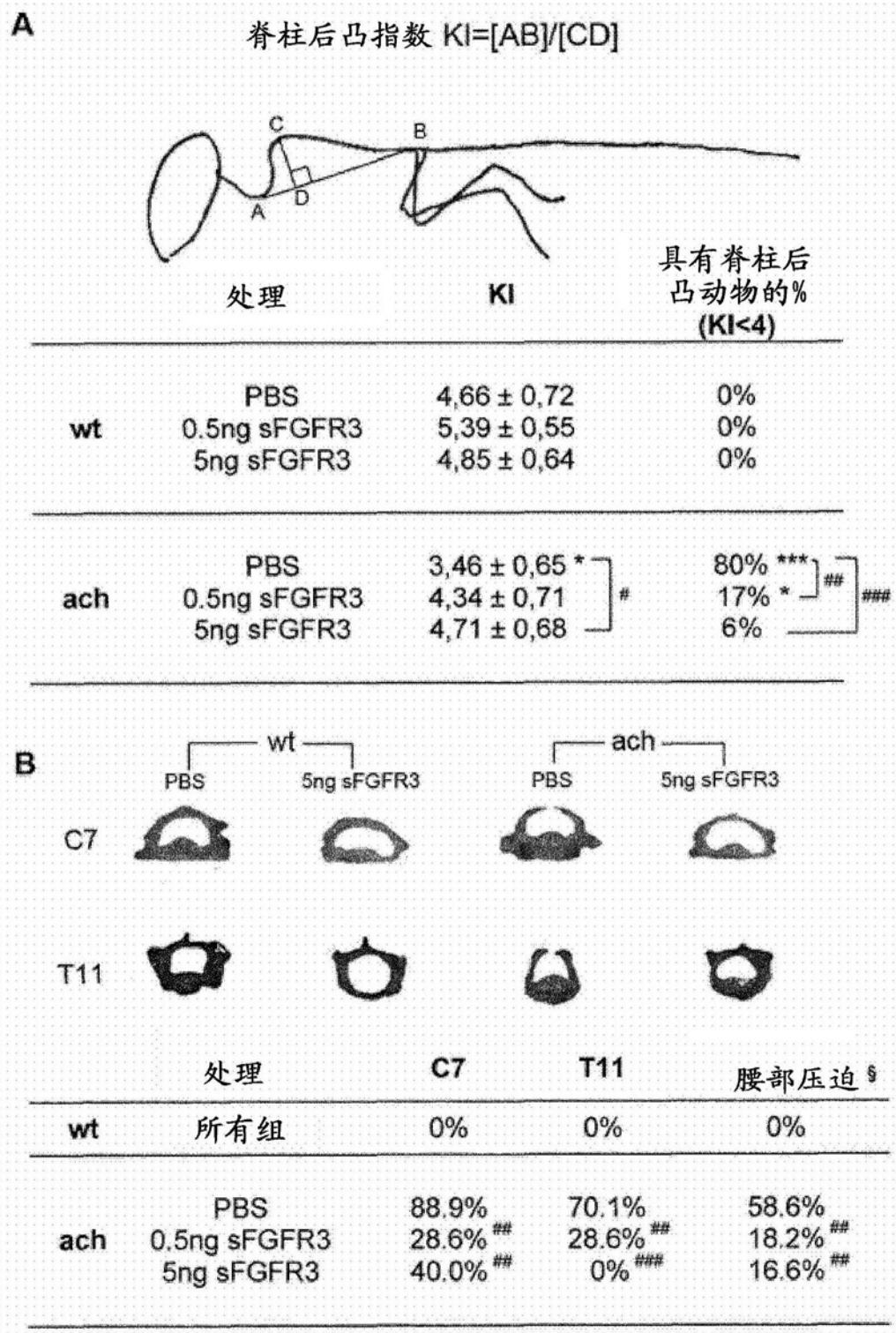


图3

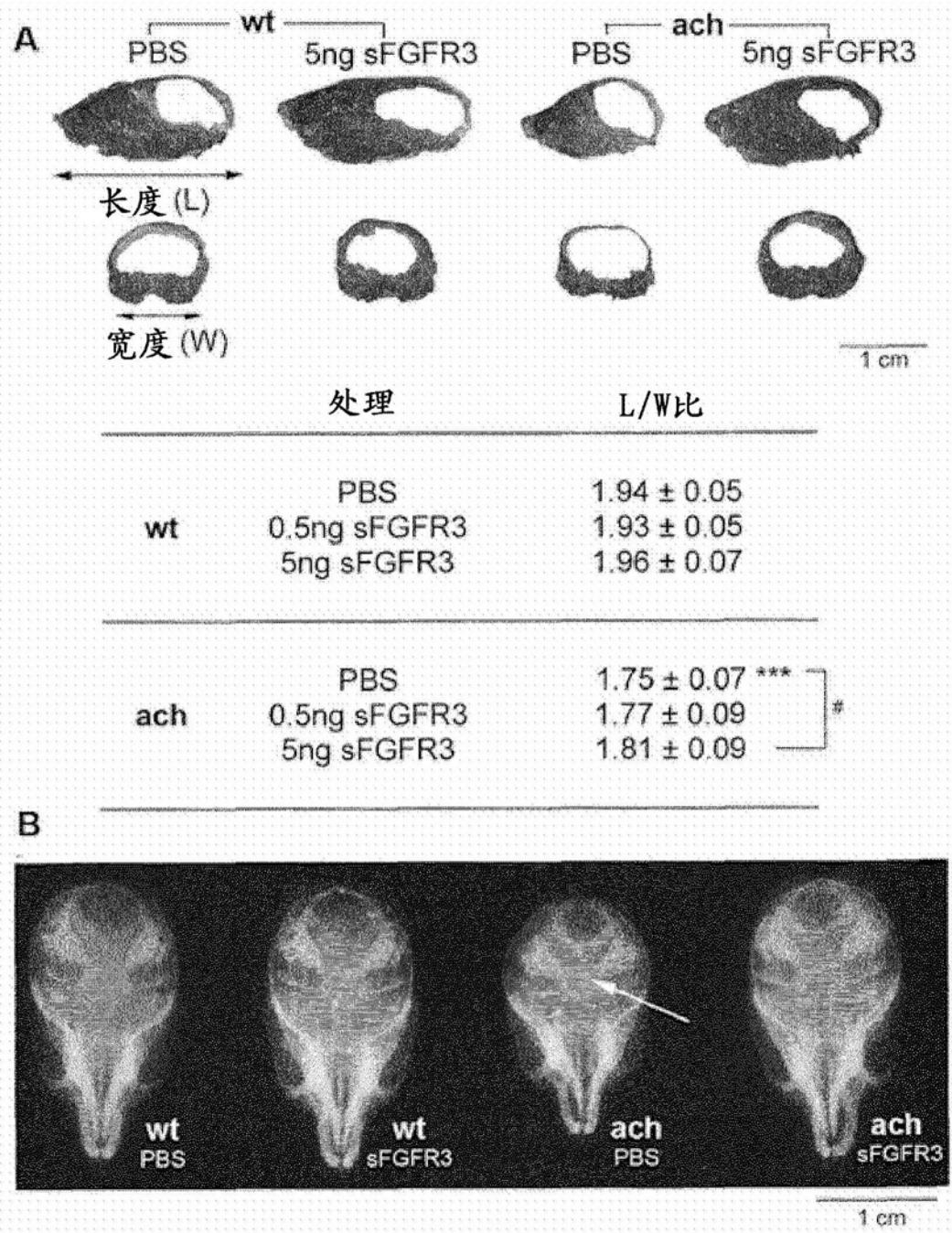


图4