[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03804744.6

[51] Int. Cl.
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100531796C

[51] Int. Cl. (续)
G01N 33/50 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

[22] 申请日 2003.1.30 [21] 申请号 03804744.6

[30] 优先权

[32] 2002. 1.31 [33] EP [31] 02002358.6

[32] 2002. 1.31 [33] US [31] 60/353,831

[86] 国际申请 PCT/EP2003/000953 2003.1.30

[87] 国际公布 WO2003/063893 英 2003.8.7

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.27

[73] 专利权人 马普科技促进协会

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 J·班格 A·乌尔里希

[56] 参考文献

FR2796073A2 2001.1.12

WO9420125A1 1994.9.15

WO9821237A1 1998.5.22

Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localized indifferent cellular compartments. J. Biol. Chem, Vol. 270 No. 51. 1995

审查员 吴希哲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 赵艳华

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 4 页

[54] 发明名称

FGFR 激动剂

[57] 摘要

本发明涉及成纤维细胞生长因子受体(FGFR)激动剂诊断、预防和/或治疗病理情况的用途，包括但不限于过度增生性病症、骨病和血管疾病。 尤其是，描述了 FGFR－4 激动剂的用途，如抗 FGFR－4 抗体。 此外，本发明涉及包含如上所述的激动剂的药物组合物和筛选方法。

1. 能够刺激成纤维细胞生长因子受体 4 类（FGFR-4）的化合物制备诊断或治疗剂的用途，其中所述化合物选自给予靶细胞或靶生物的和/或在其中过度表达的 FGFR-4 基因、或天然或合成的 FGFR-4 配体或抗 FGFR-4 抗体。

2. 权利要求 1 的用途，用于制备预防和/或治疗与 FGFR-4 功能障碍相关的过度增生性病症、骨病或血管疾病的药剂。

3. 权利要求 2 的用途，用于制备预防和/或治疗与 FGFR-4 功能障碍相关的过度增生性病症的药剂，其中所述过度增生性病症是肿瘤疾病。

4. 权利要求 1 的用途，其中 FGFR-4 是 FGFR-4 G1y388。

5. 权利要求 1 的用途，其中 FGFR-4 具有酪氨酸激酶活性和/或与其它蛋白相互作用的能力。

6. 权利要求 1 的用途，其中所述化合物能结合 FGFR-4 并且能通过与 FGFR-4 结合来刺激 FGFR-4 活性。

7. 权利要求 1 的用途，其中所述诊断或治疗剂用于确定样品中的 FGFR-4 表达。

8. 药物组合物，其含有能够刺激成纤维细胞生长因子受体 4 类（FGFR-4）活性的化合物，其中所述化合物选自给予靶细胞或靶生物的和/或在其中过度表达的 FGFR-4 基因、或天然或合成的 FGFR-4 配体和抗 FGFR-4 抗体。

9. 权利要求 8 的药物组合物，其中所述化合物能结合 FGFR-4 并且能够通过与 FGFR-4 结合刺激 FGFR-4 活性。

10. 权利要求 8 的药物组合物，进一步包含药物可接受载体、稀释剂和/或助剂。

11. 鉴定细胞或生物中与 FGFR-4 功能障碍相关的过度增生性过程的新抑制剂的方法，包括测试化合物结合 FGFR-4 的能力。

12. 权利要求 11 的方法，包括测试化合物通过结合 FGFR-4 来刺

激 FGFR-4 活性的能力。

13. 权利要求 11 的方法，它是高通量试验。

14. 能够表达结合 FGFR-4 并能够增加所述 FGFR-4 受体的酪氨酸磷酸化的抗体的细胞系。

15. 结合 FGFR-4 并能够增加所述 FGFR-4 受体的酪氨酸磷酸化的抗体。

FGFR 激动剂

本发明涉及成纤维细胞生长因子受体(FGFR)激动剂用于诊断、预防和/或治疗病理情况的用途，所述的病理情况包括但不限于过度增生性病症、骨病和血管疾病。尤其是，描述了 FGFR-4 激动剂，如抗 FGFR-4 抗体的用途。此外，本发明涉及包含如上所述的激动剂的药物组合物和筛选方法。

W099/37299 公开了 FGFR 抑制剂治疗和/或预防与 FGFR 功能过度(overfunction)相关的病症的用途，尤其是癌症。

令人惊奇的是，发现在很多情况下，不是 FGFR 抑制剂而是选择性 FGFR 活化剂适合预防和/或治疗过度增生性病症，因为这些激动剂刺激细胞分化过程。

因此，本发明涉及能够刺激 FGFR 类活性的化合物制备治疗或诊断剂的用途，如预防和/或治疗病理情况如过度增生性病症，尤其是肿瘤疾病的试剂。

目前，已知四种结构相关的 FGFR 基因，它们编码四种不同的蛋白，即 FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 和 FGFR-4。FGFR 蛋白具有由三个免疫球蛋白环和酸性部分组成的细胞外结构域、疏水跨膜结构域和具有酪氨酸激酶活性的细胞内结构域。已知 FGFR-1、FGFR-2 和 FGFR-3 的不同同工型，它们可以由如可变剪接产生。存在 FGFR-4 的至少两个等位基因变体，它们在氨基酸位置 388 处不同(cf.W099/37299)，即 FGFR-4Gly388 和 FGFR-4 Arg388。

FGFR 激动剂化合物优选刺激选自 FGFR-1、FGFR-2、FGFR-3 和 FGFR-4 的 FGFR 类的活性。更优选，FGFR 类是 FGFR-4。优选，该刺激是选择性的，即，如上所述的 FGFR 类的刺激不引起其它 FGFR 类的明显刺激。在本文中“明显刺激”意思是在生理学相关方面，该激动化合物不能刺激其它 FGFR 分子的生物活性。然而应该注意对于有

些实施方案，可能不需要仅对一种 FGFR 类的特异性，即该激动剂可能刺激两种或甚至多种 FGFR 类，其中对各个类刺激的程度可以大致相同或不同。

在第一个实施方案中，该化合物通过结合 FGFR 类显示出其刺激活性，即它结合选自 FGFR-1、FGFR-2、FGFR-3 和尤其是 FGFR-4 的 FGFR 类或其同工型或等位基因变体，并因此增加 FGFR 活性。特别优选 FGFR-4Gly388 的活性增加。优选该化合物显示出 FGFR 类的选择性刺激。更优选，该化合物不与其它 FGFR 类交叉反应，即它选择性结合给定的 FGFR 类。然而应该注意对于有些实施方案，可能不需要选择性。

结合化合物可以是天然或合成的 FGFR 配体，它具有所需结合选择性。例如 FGF-19 (Xie 等) 具有结合 FGFR-4 的高度选择性。在另一方面，该结合化合物可以是抗 FGFR 抗体，它特异性结合 FGFR 类，如 FGFR-4 并且对其它 FGFR 类没有明显的交叉反应性。实施例类描述了合适的抗体。根据本发明的术语“抗体”包括单克隆抗体和通过已知技术从其衍生的嵌合或人源化抗体、人抗体、重组抗体如单链抗体或抗体片段如 Fab、F (ab) 2、Fab'抗体片段或重组抗体片段如 scFv 片段，只要它们显示选择性和激动性结合如上所述的 FGFR。此外，该结合化合物可以是具有抗体样结合特征的支架蛋白。

通过结合 FGFR 类，该化合物增加受体的生物活性，如酪氨酸激酶活性，与其它蛋白的相互作用能力，如促进细胞－细胞接触和/或与 FGFR“下游靶”如蛋白的其它相互作用。更特别地，FGFR 类的酪氨酸磷酸化增加。可以通过如实施例所述的 FGFR 类的免疫沉淀和随后使用合适的抗磷酸酪氨酸抗体测定来确定酪氨酸激酶活性的增加。

在第二个实施方案中，通过间接相互作用刺激 FGFR 活性。该化合物可以结合“上游靶”或否则与之相互作用，如不同于 FGFR 的蛋白，但它可能刺激 FGFR 活性。

在第三个实施方案中，增加基因剂量刺激 FGFR 活性，如通过给予和/或过度表达靶细胞或靶生物中的 FGFR 基因，尤其是 FGFR-4

基因和更特别是 FGFR-4 Arg388 基因。这个实施方案优选包括基因治疗方法，其中依靠合适载体，如本领域已知的病毒或非病毒基因转移载体将 FGFR 基因导入靶细胞。

Ballinger 等 (Nature Biotech 17 (1999),1199-1204) ; WO 98/21237; FR-A-2796073; 和 WO 00/39311 描述了 FGFR 激动剂的设计和刺激 FGFR 活性的其它方法，此处引入作为参考。然而，这些文件无一提示 FGFR 活化导致致瘤性降低。

本发明基于惊奇的发现，即 FGFR 活性的刺激导致小鼠模型中体内的肿瘤大小减小。所以，FGFR 活性的刺激可以用于预防和/或治疗 FGFR 相关病症如过度增生性病症，如瘤形成病症，如结肠、肾脏、膀胱、胰腺、前列腺、胃、乳房、肺、甲状腺、垂体、肾上腺和卵巢肿瘤或成胶质细胞瘤、白血病，以及甲状腺增生、色素性视网膜炎、青春期早熟(precocious puberty)、肢端肥大症和哮喘。更多实例是骨病如骨质疏松症和血管疾病如 restinosis、artherosclerosis 和高血压。

因此，本发明涉及预防和/或治疗与 FGFR 功能障碍(dysfunction) 相关的病症，尤其是与至少部分缺乏 FGFR 活性相关的病症，包括给需要其的受试者施用刺激 FGFR 活性有效量的化合物。尤其是，本发明也涉及预防和/或治疗与 FGFR 功能障碍相关的病症，尤其是与至少部分缺乏 FGFR 活性相关的病症，包括给需要其的受试者施用选择性结合 FGFR 类和通过与其结合能够刺激 FGFR 活性的有效量的化合物。该受试者优选是哺乳动物和更优选人。对于医学目的，该化合物通常以药物可接受组合物给予，它可以含有合适稀释剂、载体和/或助剂。该化合物也可以含有更多药物活性试剂，如治疗癌症的细胞毒性试剂。

适合用于本发明的药物组合物包括其中含达到期望目的，如治疗或诊断目的有效量的活性成分的组合物。治疗有效量剂量是指导致患者症状改善或存活延长的化合物的量。这种化合物的毒性和治疗功效可以在细胞培养或试验动物中通过标准药学方法来确定，如确定 LD50（群体 50％致死剂量）和 ED50（群体 50％治疗有效剂量）。对于本

发明方法中使用的任何化合物，可以从细胞培养试验初步估计治疗有效量。例如，可以配制在动物模型中的剂量达到循环浓度范围，包括细胞培养中确定的 IC50（即达到生长因子受体活性最大值一半抑制的测试化合物的浓度）。这种信息可以用于更精确确定在人中有效的剂量。毒性和治疗效果之间的剂量比率是治疗指数且它可以以 LD50 和 ED50 之间的比率来表达。优选显示出高治疗指数的化合物。精确配方、给药途径和剂量可以由各个医师根据患者的情况选择（见如 Fingl 等, 1975,in"The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1, p. 1）。

可以分别调节剂量和间隔以提供足以维持受体调节作用的活性部分的血浆水平或最低有效浓度（MEC）。对于每个化合物 MEC 将变化，但可以从体外数据来估计，如使用这里所述试验达到受体 50－90％抑制所需的浓度。应该使用 10－90％的时间，优选 30－90％之间和最优选 50－90％之间，维持血浆水平超过 MEC 的方案给予化合物。达到 MEC 所需的剂量将依赖于个体特征和给药途径。在局部给药或选择性摄入的情况下，药物的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。

给予的化合物的真实剂量当然可以依赖正治疗的受试者、受试者的体重、罹患疾病的严重性、给药方式和指定医师的判断。

给药的合适途径可以例如包括口服、直肠、经粘膜或肠道给药；肠胃外传递，包括肌肉内、皮下、髓内，以及鞘内注射、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

可供选择地，可以局部而不是全身方式给予化合物，例如，通过化合物直接注射到实体肿瘤，通常以贮库(depot)或持续释放制剂。

此外，可以以靶向药物传递系统给予药物，例如以肿瘤特异性抗体包裹的脂质体。该脂质体可以靶向肿瘤和被肿瘤选择性吸收。

在一个优选实施方案中，该药物组合物可以是诊断组合物。在优选实施方案中，诊断组合物、包含确定 FGFR 类在靶细胞或靶生物中表达的诊断试剂。可以在蛋白水平确定该表达，如通过使用抗 FGFR 抗体和/或通过确定 FGFR 活性。在另一方面，可以在核酸水平上确定 FGFR 表达，如通过确定 FGFR mRNA，例如通过 RT-PCR 方案或本

领域已知的另一种合适的检测方案。

本发明的另一方面是鉴定病理情况的新抑制剂的方法，如细胞或生物中过度增生过程，尤其是哺乳动物细胞或生物，如人细胞或生物，包括：检测该化合物：（1）结合 FGFR 类和优选（2）通过与其结合刺激 FGFR 活性的能力。

可以用高通量筛选方法实施该方法，它可以是使用 FGFR 表达或过度表达细胞的基于细胞的试验或使用基本上或特别纯化的 FGFR 蛋白的无细胞试验。该试验适合从生物学或合成化合物文库中鉴定具有期望特性的新化合物或化合物类。此外，本发明包括该公开方法鉴定的任何新抑制剂。

可以如实施例所述确定测试显示出期望特性的化合物的能力。

最后，本发明涉及能够产生如上所述激动性抗 FGFR 抗体的细胞系。该细胞系可以是真核或原核细胞系，如哺乳动物细胞系，尤其是淋巴细胞系，如杂交瘤细胞系，或 CHO 细胞系。此外，该细胞可以是昆虫细胞系、植物细胞系、真核单细胞生物，如酵母，或细菌，尤其是革兰氏阴性细菌如大肠杆菌。该细胞系适合制备如上所述的激动性抗 FGFR 抗体。

附图说明

图 1:

在伤口试验(wound test)中，表达人 FGFR-4 Gly388 的 MDA-MB-231 乳癌细胞 (ATCC HTB-26) 显示转移减少。用塑料尖刮擦含载体对照(A, B), FGFR-4 Arg388 (C, D)或 FGFR-4Gly388 cDNA (E, F)的逆转录病毒感染的融合单层细胞并用 0% FCS (A, C, E)或 0.5% FCS (B, D, F)培养。24 小时后，与 FGFR-4 Gly388 相比，很多单个对照和 FGFR-4 Arg388 细胞迁移到伤口(B, D)，FGFR-4 Gly388 显示在伤口（F）中仅少数单个细胞。

图 2:

用 1μg/ml 和 10μg/ml 4FA6D3C10 或相同量对照抗体（α-C）刺激表达人 FGFR-4 的 L6 成肌细胞(ATCC CRL-1458)10 分钟。使用多克隆抗 FGFR-4（α- FGFR-4）抗体使细胞溶解产物进行免疫沉淀（IP）。用单克隆抗磷酸酪氨酸抗体（α-PY）（上板）通过 western 印迹（WB）分析酪氨酸磷酸化水平。用 α- FGFR-4 抗体（下板）通过再次印迹检查等负荷的蛋白。

图 3:

用 aFGF 和 bFGF 配体处理可降低异位表达人 FGFR-4(MCF7/FGFR4-克隆 1 和-克隆 2)的活力 MCF7 乳癌细胞数量。

图 4:

用 aFGF 和 bFGF 配体处理可降低异位表达人 FGFR-4(BT549/FGFR4-克隆 1 和-克隆 2)的活 BT549 乳癌细胞数量。

实施例 1:

为了研究 FGFR-4 表达在肿瘤细胞迁移中的作用，我们在人乳癌细胞中异位表达人 FGFR-4 Gly388 和 FGFR-4 Arg388。分别从 MDA-MB-453 细胞(ATCC HTB-131) 和 K562 细胞 (ATCC CCL-243)扩增适当的 FGFR-4 cDNA，并根据标准方案（目前方案）亚克隆到 Bluescript I KS 载体 (Stratagene)。两种 DNA 都克隆到 pLXSN 载体 (Stratagene)。使用磷酸钙 DNA 共沉淀法，用这些载体转染产生兼嗜性病毒的包装细胞系 Phoenix A (Prof. Nolan 惠赠, Stanford University)。收集转染的 Phoenix A 细胞上清并通过 0.45μm 过滤器过滤。载体 pLXSN 单独感染的细胞用作对照。

对于人乳癌细胞系 MDA-MB-231 的感染，它不表达可检测量的 FGFR-4，细胞与病毒上清培养 24 小时。48 小时后，用含 400μg/ml G418

的培养基取代培养基并在 G418 下进一步选择 14 天。有限稀释产生了克隆细胞系。用 western 印迹分析确定 FGFR-4 表达。对于每个 FGFR-4 同工型， FGFR- 4 Gly388 和 FGFR-4 Arg388，分别选择显示类似 FGFR-4 表达水平的两个克隆细胞系进行进一步分析。以类似方式，用来自产外生(ectotrophic)病毒的细胞系 GF+E 86 (Markowitz 等，1988)的上清感染小鼠 NIH-3T3 (ATCC CRL-1658)和大鼠 L6 成肌细胞分别产生细胞系 NIH- 3T3/huFGFR-4 和 L6/huFGFR-4。

我们接下来使用刮擦伤口方法(Hutenlochner 等，1998)检测了 MDA-MB-231 乳癌细胞的迁移。在用塑料尖轻轻刮擦伤口后，细胞以融合单层生长并且研究伤口闭合过程中的迁移。除去培养基并用 PBS 洗涤细胞两次。添加不含胎牛血清（FCS）的培养基或含 0.5％FCS 的培养基，并允许细胞分散/迁移到澄清区域 24 小时。惊奇的是，与对照 MDA-MB-231 细胞相比，过度表达 FGFR-4Gly388 的细胞培养物中，伤口闭合率降低（图 1）。相比之下，对照病毒感染的细胞或表达 FGFR-4 Arg388 的细胞以分散模式迁移到伤口。因此表达 FGFR-4Gly388 的 MDA-MB-231 细胞显示细胞迁移抑制。

为了确定 FGFR-4 对体外肿瘤表型的作用是否转变成对致瘤性的体内作用，我们评估了小鼠中 FGFR-4 的表达对肿瘤生长的作用。在 Max- Planck-Institut, Martinsried, 德国的动物厂中饲养的七至十周龄雌性 Balb/c nu/nu 小鼠用于该试验。它们保持在无特殊病原体的条件下。它们的护理和居室是根据德国法律并由被许可的研究员监督。表达 FGFR-4Gly388 或 FGFR-4 Arg388 或对照的新鲜胰蛋白酶作用的半融合 MDA-MB-231 细胞克隆以 2.8×10^7 个细胞/ml 的浓度悬浮于磷酸缓冲盐水（PBS）中。每只小鼠在颈部区域皮下接种四百万个细胞（140μl 细胞悬液+60μl Matrigel ;13 μg/ml）。对于 FGFR-4Gly388 和 FGFR-4 Arg388，选择两个单个克隆细胞系并注射到如上所述的 5-8 只动物组。肿瘤形成监测达六周。其后，或不论何时，杀死肿瘤直径达到 $1cm^3$ 大小的动物。使用测径规每周测定三次肿瘤大小，使用公式长度×宽度 $^2/2$ 来估计肿瘤体积。

如表 1 总结，注射既不表达 FGFR-4 Gly388 也不表达 FGFR-4 Arg388 受体的对照细胞的小鼠一周内形成的肿瘤和四周后平均肿瘤大小是 $1cm^3$。惊奇的是，注射表达 FGFR-4 Gly388 的细胞的 13 只小鼠中有 12 只没有观察到肿瘤生长，提示 FGFR-4 Gly388 引起肿瘤形成的完全抑制，因此起肿瘤抑制剂的作用。在六周的监测期中没有检测到肿瘤。有趣的是，表达 FGFR-4 Arg388 同工型的细胞使 80%和 62.5％的被注射小鼠产生肿瘤。然而，由这些细胞所形成的肿瘤大小显著小于由 pLXSN 载体单独感染的对照细胞形成的肿瘤大小。此外，注射表达 FGFR-4 Arg388 的克隆产生的肿瘤全部比对照细胞得到的肿瘤生长慢得多。因此，尽管 FGFR-4 Arg388 抑制肿瘤生长的活性低于 FGFR-4 Gly388，但与缺乏 FGFR-4 表达相比，它仍提供了显著的优点。

这些结果证明 FGFR-4 的特殊活性具有阻断和/或抑制肿瘤进展的潜力。因此，我们接下来的研究集中在抗 FGFR-4 细胞外结构域的单克隆抗体的产生及其在 FGFR-4 活化中的用途。为了这点，制备包含 FGFR-4 细胞外结构域(FGFR-4 ex)重组谷胱苷肽-S-转移酶(GST) (Smith & Johnson, 1988)融合蛋白。我们使用克隆载体 pSj26(mod) (Seiffert 等, 1999)，它是为重组融合蛋白的真核表达和分泌而设计的，并且通过在 pCDNA3 的 Xho1 和 Apa1 位点中插入编码日本血吸虫(Schistosoma japonicum)谷胱苷肽-S-转移酶（GST）完全 DNA 序列(Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)，而由 pCDNA3 克隆载体（Invitrogen, Groningen, The Netherlands）得到的。

使用下列引物：有义：AAGAATTCGCCACCATGCGGCTGCTGCTGGCCCTGTTG (SEQ ID NO. 1)，反义: CGAGGCCAGGTATACGGACATCATCCTCGAGTT (SEQ IDNO. 2)PCR 扩增 FGFR-4 的细胞外结构域。用 EcoRI 和 XhoI 消化 PCR 产物并克隆到 pSj26(mod)。所得 pSj26 (mod)-FGFR-4 ex 表达质粒通过磷酸钙 DNA 共沉淀方法转染 293 细胞(ATCC CRL-1573)。细胞在补充了 10%FCS 的 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养

基(DMEM)中生长。用 1mg/ml G418 (Sigma, Deisenhofen, Germany)选择两周后，用抗 GST 抗体通过 western 印迹分析测试存活克隆的融合蛋白的表达和分泌。高表达细胞用于产生 FGFR-4 ex。每隔两天从融合培养物中收集培养基。无菌过滤一升收集的培养基并与 1ml 谷胱苷肽琼脂糖(Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)4℃孵育过夜。分离琼脂糖并用磷酸盐缓冲盐水（PBS）洗涤。用 5 ml 10mmol/l 谷胱苷肽在 20℃实施洗脱。洗脱的融合蛋白在 PBS/10％甘油中以 $1:10^6$(体积/体积)透析。使用 MicroBCA 蛋白确定试剂盒(Pierce, Rockford, IL)确定蛋白浓度。

通过用如前述含 FGFR-4 完整细胞外结构域的纯化重组 FGFR-4-GST 融合蛋白免疫四至八周龄雌性 Balb/c 小鼠来产生单克隆抗体。给小鼠以 14 天间隔肌肉内注射 3 次 1:2 稀释于 ABM-2 佐剂（PanSystems, Aidenbach, Germany）的 50μg 蛋白。最后注射 4 天后取出脾与 SP2/0 骨髓瘤细胞系融合。所得杂交瘤生长在含 10%FCS、抗生素和次黄嘌呤、氨基喋呤、和胸腺嘧啶(HAT) (Sigma)的 RPMI 1640 培养基中。用流式细胞仪对 NIH- 3T3/huFGFR-4 细胞 (见上)筛选细胞上清，有限稀释克隆分泌选择性识别上清的抗体但不是亲代 NIH-3T3 细胞的阳性杂交瘤。在补充 1 % Nutridoma (Roche, Germany)的无血清培养基中培养 FGFR-4-反应性克隆（4FA6D3C10），使用蛋白 G-琼脂糖柱(Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)从上清纯化抗体。

为了评估 4FA6D3C10 对 FGFR-4 活化的功能作用，L6/huFGFR-4 细胞保留不处理或用 10 和 20μg/ml 4FA6D3C10 在 37℃刺激 10 分钟。在冰上裂解缓冲液(50 mM HEPES pH 7.5, 含 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% (v/v) 甘油,1% (v/v) Triton X-100,1 mM 氟化钠, 1 mM 苯甲基磺酰氟, 1 mM 原钒酸钠, 1 mM β–甘油磷酸酯, 10μg/ml 抑酶肽)中裂解细胞。粗裂解产物在 12500g，4℃离心 20 分钟。多克隆 FGFR-4 抗体（Santa Cruz）和 30μl 添加到澄清裂解产物的蛋白 A-琼脂糖(Pharmacia)来免疫沉淀过度表达的 FGFR-4 并在 4℃孵育 3 小时。用

洗涤缓冲液(20 mM HEPES pH 7.5, 含 150 mMNaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 氟化钠 10% (v/v) 甘油,1 % (v/v) TritonX-100)洗涤免疫沉淀物。添加含 SDS 和 2-巯基乙醇的样品缓冲液并在 95℃加热 4 分钟变性该样品。

SDS-PAGE 分离蛋白并转移到硝酸纤维素滤膜上。为了确定 FGFR-4 的酪氨酸磷酸化水平，硝酸纤维素滤膜与磷酸酪氨酸特异性小鼠单克隆抗体 4G10（Upstate Biotechnology）在 4℃孵育。接下来，添加 HRP 偶联的山羊抗小鼠或山羊抗兔第二抗体，随后是增强化学发光（ECL）底物反应(Amersham, Germany)。在 Kodak X-Omat 膜上检测底物反应。为了确保等量免疫沉淀的 FGFR-4 蛋白，根据制造商的方案(Amersham, Germany)剥脱膜，用多克隆 FGFR-4 抗体封闭和再探测。

4FA6D3C10 对 L6/huFGFR-4 细胞的处理导致 FGFR-4 酪氨酸磷酸化显著增加，如图 2 所示。这些数据证明了单克隆抗体和尤其是 4FA6D3C10 可用于 FGFR-4 受体活化。

表 1

细胞	基因型	注射的小鼠/肿瘤的数量
MDA-MB-231 plx	无 FGFR-4 表达	12/13
MDA-MB-231 W T2	Gly/Gly	1/5
MDA-MB-231 WT3	Gly/Gly	0/8
MDA-MB-231 MT6	Arg/Arg	4/5[a]
MDA-MB-231 MT11	Arg/Arg	5/8[a]

表 1

每只小鼠颈部区域皮下接种 4×10^6 个细胞（140μl 细胞悬液+60μl Matrigel ;13μg/ml）。每隔 2-3 天检测肿瘤生长。六周后或无论何时肿瘤直径达到 $1cm^3$ 大小，杀死动物。[a]这些细胞形成的肿瘤大小显著小于 pLXSN 载体单独感染的对照细胞形成的肿瘤大小。plx: 对照细胞，

WT: FGFR-4 Gly388; MT: FGFR-4 Arg388。

实施例 2

尽管 FGFR-4 及其配体在很多人癌细胞系中表达，但是尚未完全研究 FGFR-4 在人肿瘤发展调节中的作用。为了分析 FGFR-4 在人癌细胞的肿瘤生长调节中的作用，我们利用了异位表达人 FGFR-4 的人乳癌细胞系 BT549 和 MCF7。

乳癌细胞 MCF7 细胞一式三份铺在 12 孔板中，以 5000 个细胞/500μl 补充了 10%FCS 的培养基中并孵育 24 小时。用含 10ng/ml aFGF 和 bFGF 或 25ng/mlβ- Heregulin 的 1%FCS 刺激细胞并生长超过 6 天的时间。在乳癌细胞 BT549 的情况下，细胞以一式六份铺在 96 孔皿中，以 1000 个细胞/100μl 正常生长培养基（DMEM,10% FCS; 0,065% 胰岛素 40U/ml）并孵育 24 小时。除去培养基并在无 FCS 和胰岛素的情况下，用 10ng/ml aFGF、bFGF 或 25ng/mlβ- Heregulin 处理 72 小时。使用无放射活性的 AlamarBlue 试验 (Biosource)检测增殖。简言之，添加等于 10%培养基体积的量的 AlmarBlue 并在 37℃孵育 2 小时。在 544nm 激发波长和 580nm 发射波长下测定荧光。为了比较目的，计算值并以对照（未刺激的细胞）的百分比表示。

如图 3 所示，aFGF 或 bFGF 刺激空载体感染的 MCF7 细胞导致活细胞明显增加。此外，用 β- Heregulin 或 β- Heregulin 和 bGFG 同时处理活化细胞增殖。然而异位表达 FGFR-4 的 MCF7 细胞(MCF7 FGFR4-克隆 1,-克隆 2)接触 aFGF 或 bFGF 导致细胞生长降低。此外，当用 aFGF、bFGF 或 β- Heregulin 刺激时，表达 FGFR-4 的乳癌细胞的增殖降低（图 4），而 BT549 对照细胞的细胞增殖不受影响。因此，FGFR-4 起着 MCF7 和 BT549 乳癌细胞抑制剂的作用。

参考文献

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 1987, 1997.

Huttenlochner, A., Lakonishok, M., Kinder, M., Wu, S., Truong, T., Knudsen K.A., Horwitz, A.F., Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity. J. Cell Biol. 1998 Apr 20, 141(2):515-26.

Smith, D.B. and Johnson, K.S., Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase Gene 67(1):31-40 (1988).

Markowitz, D., Goff, S., Bank, A., A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. J. Virol. 1988 Apr; 62(4):1120-4.

Seiffert, M., Cant, C., Chen, Z., Rappold, I., Brugger, W., Kanz, L., Brown, E.J., Ullrich A., Buhring, H.J., Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeoloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. Blood. 1999 Dec 1;94(11):3633-43.

Xie, M.H., Holcomb, I., Deuel, B., Dowd, P., Huang, A., Vagts, A., Foster, J., Liang, J., Brush, J., Gu, Q., Hillian K., Goddard, A., Gurney, A.L., FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR-4. Cytokine. 1999 Oct; 11(10):729-35.

序列表

<110> MPI f. Biochemie

<120> FGFR 激动剂

<130> 27320PEP_RI

<140> 02002358.6

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的说明：引物

<400> 1
aagaattcgc caccatgcgg ctgctgctgg ccctgttg 38

<210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的说明：引物

<400> 2
cgaggccagg tatacggaca tcatcctcga gtt 33

图1

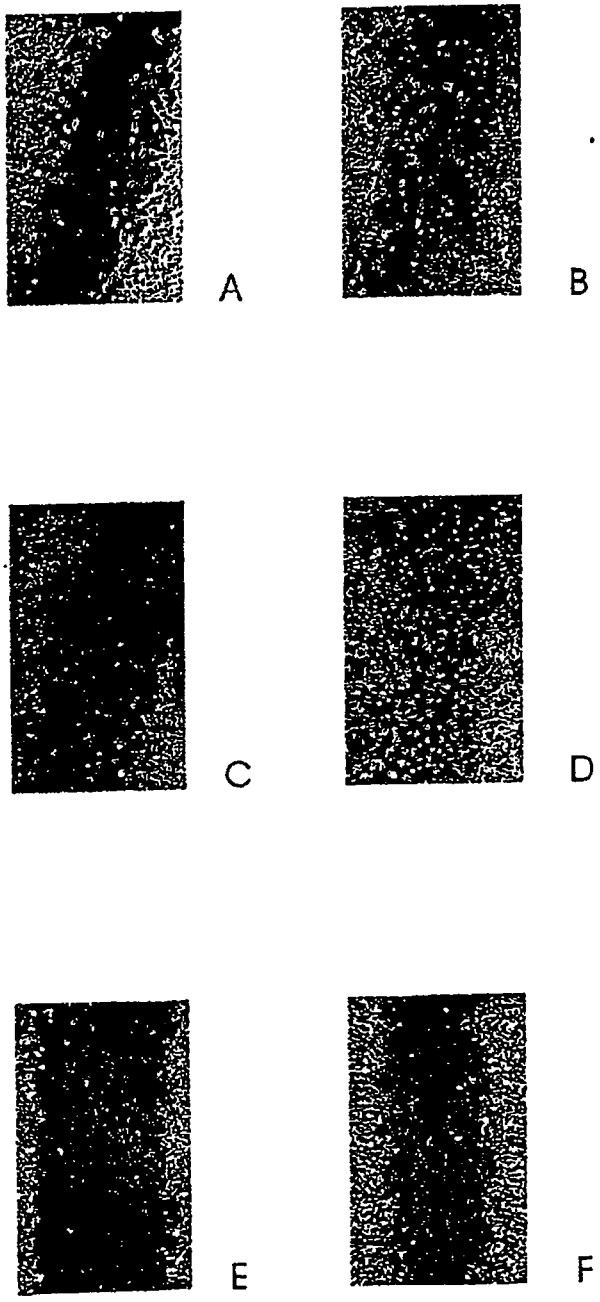


图2

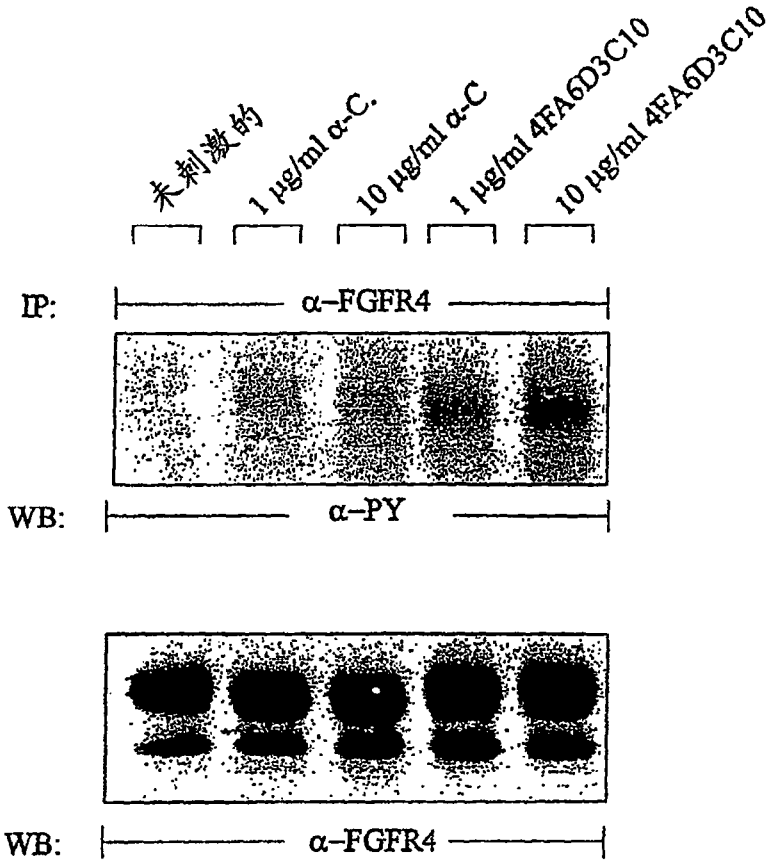

未刺激的
1 μg/ml α-C.
10 μg/ml α-C
1 μg/ml 4FA6D3C10
10 μg/ml 4FA6D3C10
IP:
α-FGFR4
WB:
α-PY
WB:
α-FGFR4

图3

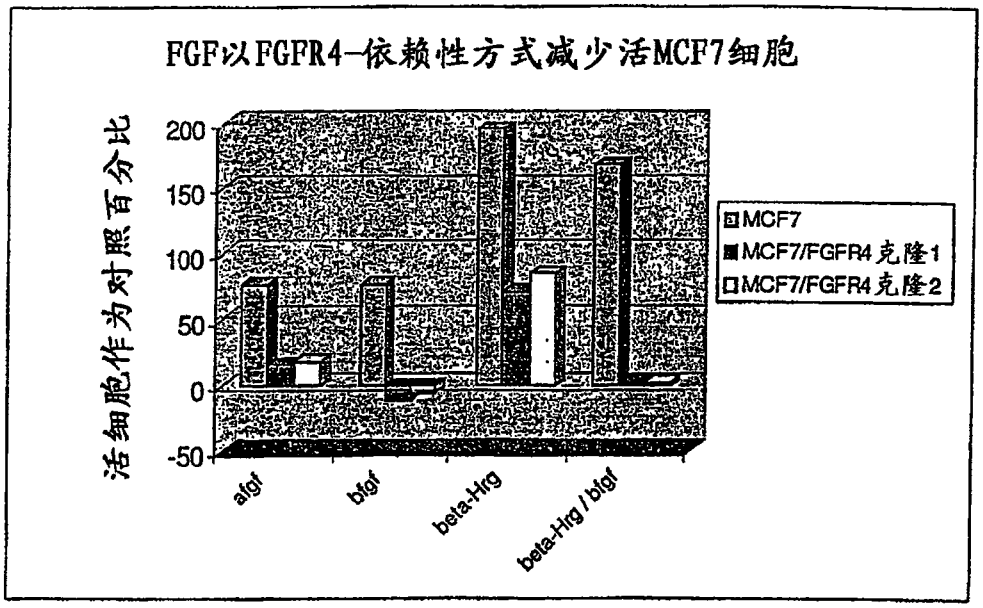
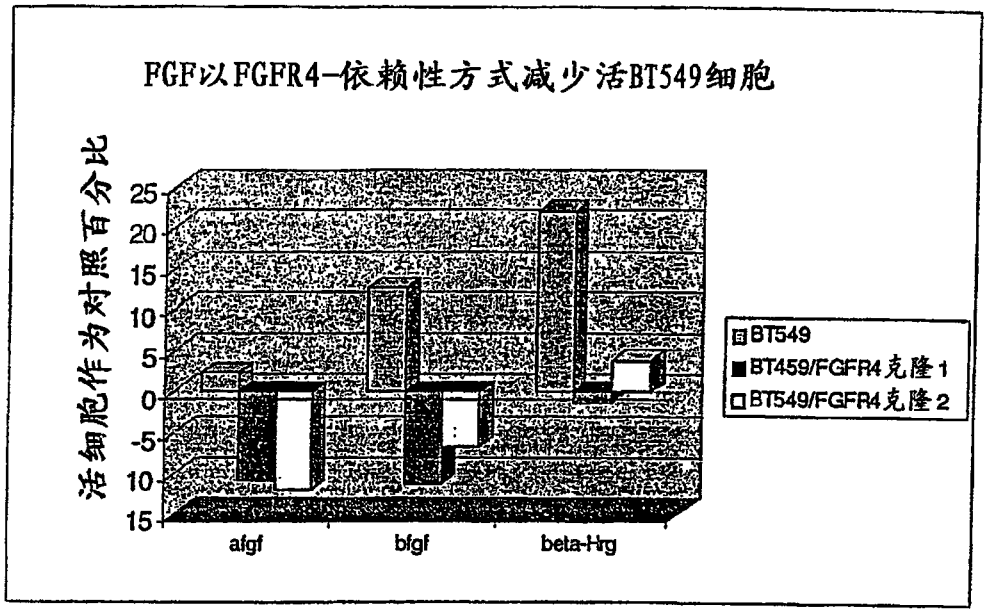

FGF以FGFR4-依赖性方式减少活MCF7细胞
活细胞作为对照百分比
200
150
100
50
0
-50
afgf
bfgf
beta-Hrg
beta-Hrg / bfgf
MCF7
MCF7/FGFR4克隆1
MCF7/FGFR4克隆2

图4


FGF以FGFR4-依赖性方式减少活BT549细胞
活细胞作为对照百分比
25
20
15
10
5
0
-5
10
15
afgf
bfgf
beta-Hrg
BT549
BT459/FGFR4克隆1
BT549/FGFR4克隆2