

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680051230.4

[43] 公开日 2009 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 101360511A

[22] 申请日 2006.11.16

[21] 申请号 200680051230.4

[30] 优先权

[32] 2005.11.16 [33] US [31] 60/737,331

[86] 国际申请 PCT/IB2006/003944 2006.11.16

[87] 国际公布 WO2007/110698 英 2007.10.4

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.16

[71] 申请人 法里巴·内耶里

地址 瑞典林雪平

共同申请人 塔耶布·内耶里

[72] 发明人 法里巴·内耶里 塔耶布·内耶里

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
代理人 陈文平

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 11 页

[54] 发明名称

用内源 c - met 配体和抑制剂抑制个体中的癌
发生和/或转移的方法

[57] 摘要

本发明提供了抑制个体中的癌发生和/或转移的方法，包括给个体施用有效量的内源 c - met 配体或其片段，如天然的和/或重组的内源抗 c - met 免疫球蛋白、天然的和/或重组的内源生物活性肝细胞生长因子(HGF)、和/或其组合。

1. 一种抑制个体中的癌发生和/或转移的方法，包括给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段。
2. 权利要求1的方法，其中所述内源c-met配体或其片段包括天然的和/或重组的内源抗c-met免疫球蛋白、天然的和/或重组的内源生物活性肝细胞生长因子(HGF)、和/或其组合。
3. 权利要求1的方法，其中所述内源c-met配体或其片段抑制产生自分泌HGF的细胞的生长。
4. 权利要求1的方法，其中所述内源c-met配体或其片段在手术之前、期间和/或之后施用。
5. 权利要求1的方法，其中个体中内分泌产生的内源HGF的效果增强。
6. 权利要求1的方法，其中个体的锻炼进一步抑制了转移和/或癌发生。
7. 一种抑制个体中自分泌产生的内源HGF与c-met受体相互作用的方法，包括给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段。
8. 权利要求7的方法，其中内分泌产生的内源HGF产物的效果和/或生物活性增强。
9. 权利要求8的方法，其中自分泌产生的HGF产物的效果和/或生物活性受到抑制。
10. 权利要求8的方法，其中再生效果增强。
11. 权利要求10的方法，其中受损伤的上皮细胞再生。
12. 权利要求8的方法，其中间充质细胞产生的HGF的促运动效果增强。
13. 一种影响个体中的血管发生、细胞分裂、迁移和/或形态发生的方法，包括给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段、抗-HGF或其片段、或其组合。
14. 一种调节个体中内源c-met配体或其片段的量的方法，包括检

测个体中的内源c-met配体或其片段的水平并且给该个体施用有效量的内源c-met配体或其片段。

15. 一种区别自分泌和内分泌产生的HGF的方法。

用内源 c-met 配体和抑制剂抑制个体中的 癌发生和/或转移的方法

发明领域

本发明基于个体中存在内源天然c-met配体和抑制剂，所述c-met配体和抑制剂抑制由被转化的上皮细胞自分泌产生的肝细胞生长因子(HGF)变体的相互作用和功能。本发明涉及抑制个体中的癌发生和/或转移的方法。该方法包括给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段。

本发明也涉及抑制自分泌产生的内源HGF的相互作用的方法、增强内分泌产生的HGF的效果的方法、抑制自分泌产生的HGF的效果的方法、增强间充质细胞产生的HGF的促运动(motogenic)作用的方法，以及影响个体中的血管发生、细胞分裂、迁移和/或形态发生的方法。本发明进一步涉及调节个体中内源c-met配体或其片段的量的方法以及区别HGF的自分泌和内分泌变体的方法。

发明背景

*met*癌基因最初在化学致癌物(N-甲基-N'-亚硝基胍)处理的人成骨肉瘤细胞系(MNNG-HOS)中鉴定到。从这些细胞中分离出*tpr-met*，*tpr-met*是可以在体外在形态学上转化鼠NIH 3T3成纤维细胞并且在无胸腺裸鼠中诱导它们形成肿瘤的基因。*tpr-met*基因代表两种不同基因座(*tpr*和*met*)的融合。尽管(*tpr*)癌基因产物是一种胞质激酶，(*met*)原癌基因产物是一种跨膜受体样蛋白质。*C-met*是原癌基因产物，即一种由通过二硫键连接的50 kD (α)和145 kD (β)亚单位组成的受体样酪氨酸激酶。在完全加工的*c-met*产物中， α 亚单位位于细胞外，并且是高度糖基化的，而 β 亚单位具有细胞外的、跨膜的和酪氨酸激酶结构域以及酪氨酸磷酸化位点。

直到1990年才知道*c-met*的配体。HGF诱导完整靶细胞中的蛋白质发生快速酪氨酸磷酸化的证据提示酪氨酸激酶受体可能介导其促有丝分裂信号。在完整靶细胞对HGF处理的快速应答中观察到145 kDa酪氨酸（tyrosil）磷酸化，其被鉴定为*c-met*的 β 亚单位。可被抗*c-met*抗体识别的适当大小细胞蛋白质的 ^{125}I -标记的配体确定*c-met*产物为HGF的细胞表面受体。细胞内酪氨酸激酶结构域的存在使HGF受体被归类为细胞表面分子的受体酪氨酸激酶(RTK)家族的一个成员。*c-met*受体暴露于底外侧质膜中，与极化细胞中不溶于去污剂的成分结合。已经对*met*基因作图，其位于染色体7的q21-31，并且编码1408个氨基酸的糖蛋白——该糖蛋白缺乏与任何其它已知生长因子受体的显著同源性。

*c-met*受体与其配体HGF的相互作用通过刺激受体的酪氨酸激酶活性诱导信号，随后磷酸化，并且促进与活化的大量胞内信号蛋白的受体的结合。HGF促进各种细胞的生长和扩散。在某些癌细胞系中观察到HGF和*c-met*受体在同一细胞中共表达，这有助于对细胞侵袭和致肿瘤性的自分泌调节。

发明内容

本发明的实施方案涉及抑制个体中的癌发生和/或转移的方法。该方法包括给个体施用有效量的抗*c-met*免疫球蛋白。在本发明的实施方案中，内源*c-met*配体或其片段包括天然的和/或重组的内源抗*c-met*免疫球蛋白、天然的和/或重组的内源生物活性肝细胞生长因子(HGF)和/或其组合。

本发明的实施方案还涉及抑制个体中自分泌产生的内源HGF与*c-met*受体相互作用的方法。该方法包括给个体施用有效量的内源*c-met*配体或其片段。

本发明的实施方案还涉及影响个体中的血管发生、细胞分裂、迁移和/或形态发生的方法。该方法包括给个体施用有效量的内源*c-met*配体或其片段、抗-HGF或其片段、或其组合。

本发明的实施方案进一步涉及调节个体中内源c-met配体或其片段的量的方法。该方法包括检测个体中的内源c-met配体或其片段的水平并且给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段。

附图说明

以下发明详述可以参照附图更全面地理解，附图包括：

图1：显示c-met固定的流动池中的信号强度的柱状图，其中比较了在添加商品抗c-met抗体之前、之后($p < 0.00001$)以及在添加商品抗HGF抗体之后($p < 0.001$)的血清($n=10$)。添加抗c-met和抗HGF之后的信号减弱存在差异；

图2：来自3名供血者的血清在通过c-met固定的亲和柱纯化之后的SDS-page。将洗脱的样品超滤。分离胶中丙烯酰胺的浓度为11%。高分子量条带属于抗c-met；

图3：血清样品（供血者）在通过c-met固定的亲和柱纯化之后的SDS-page。分离胶中丙烯酰胺的浓度为11%；A- 第一次用c-met柱纯化并超滤的供血者的样品；B- 除去白蛋白和IgG之后的A的样品；C- 第二次用c-met柱纯化并超滤的供血者的样品；D - 除去白蛋白和IgG之后的C的样品；

图4：A：除去白蛋白和IgG之前和之后的人肝炎Hbs免疫球蛋白(Aunativ)的SDS-page分析。两条高分子量条带在除去IgG之后消失。分离胶中丙烯酰胺的浓度为14.67%；B：用c-met固定的SPR流动池的曲线。信号1是注射商品重组c-met之后的信号。信号2属于Aunativ，信号3属于除去白蛋白和IgG之后的Aunativ。每个样品检测两次；C：传感图证明信号强度之间存在差异(1-2-3)；

图5：血清样品（供血者）在通过c-met固定的亲和柱纯化之后的SDS-page。分离胶中丙烯酰胺的浓度为11%。去糖基化后抗c-met (从 >120 kDa降至 100 kDa)和HGF (从 95 kDa降至 75 kDa)的分子量降低；

图6：来自受过良好训练的志愿者的血清在c-met固定的SPR流动池中的信号强度图。延长样品注射时间(1-3-5-7-10分钟)增强了信号

强度;

图7: 显示来自8名受过良好训练的志愿者的血清在c-met固定的表面等离子共振(SPR)流动池中的平均信号强度在所有情况下在运动期间非显著性地增强。1=运动前, 2=运动一半时; 3=最大运动量时, 4=运动后4分钟, 5=运动后10分钟;

图8: 显示来自8名受过良好训练的志愿者的平均血浆HGF浓度在所有情况下在运动期间非显著性地增加。1=运动前, 2=运动一半时; 3=最大运动量时, 4=运动后4分钟, 5=运动后10分钟;

图9: 显示c-met和抗HGF抗体固定的通道中SPR信号强度百分比的柱状图, 分别反映了以下不同组中血液中存在的抗c-met和HGF: IBD (n=48)、感染性胃肠炎(n=9)、健康对照(n=9)和下肢慢性溃疡(n=9)。在下肢慢性溃疡患者中, 对于抗HGF抗体的亲和力存在阴性SPR信号;

图10: 显示在商品c-met和抗c-met固定的流动池中, 反应性关节炎(ReA)患者在疾病急性期(1)和3-6个月后(2)的SPR信号亲和力的柱状图。对c-met流动池(c-met通道)的亲和力反映了血液中存在抗c-met, 对抗c-met流动池(抗c-met通道)的亲和力反映了血液中存在循环c-met。从急性期到恢复期, c-met和抗c-met的水平显著降低($p < 0.01$);

图11: 从损伤的角质形成细胞培养物获得的培养基的Western印迹分析。使用人角蛋白作为阳性对照, 牛碳酸脱水酶作为阴性对照。

图12: 用c-met固定的亲和柱纯化并超滤和除去白蛋白和IgG后, 对来自受损伤患者的皮肤角质形成细胞的细胞培养基进行的基质辅助的激光解吸/电离(MALDI-TOF)分析。位于大约66和33 kDa处的信号可能属于HGF链;

图13: A: 对来自受损伤患者的皮肤角质形成细胞的细胞培养基进行的斑点印迹分析。斑点印迹分析比较了煮沸样品之前(原始培养基)和之后(煮沸的)细胞培养基的结果; B: 对来自受损伤患者的皮肤角质形成细胞的培养基进行的SDS-Page。分离胶中丙烯酰胺的浓度为14.67%;

图14: 说明了产生HGF的两个途径。间充质细胞响应于身体损伤以内分泌方式产生HGF。这种HGF对上皮细胞具有作用, 可被抗HGF抗体抑制。天然抗c-met诱导对上皮细胞的这种作用。损伤的上皮细胞可以自分泌地产生HGF, 其对相同细胞具有作用, 并且诱导细胞分裂和迁移。天然抗c-met抗体抑制这种作用;

图15: A: 显示对于健康供血者, 在c-met和抗HGF抗体固定的流动池中的SPR信号强度, 在c-met通道中具有较低的信号强度。注射时间从1分钟延长到10分钟。延长注射时间增强了对通道的亲和力(血液被抗c-met和HGF完全负载), B: 显示对于重病老年患者, c-met和抗HGF流动池的SPR信号亲和力。对流动池的最大亲和力远低于健康对照。抗HGF亲和力(循环HGF)没有紧接c-met亲和力; C: 显示49岁下肢慢性溃疡患者对于c-met和抗HGF的SPR信号亲和力, 他在c-met通道中具有与健康供血者相同的信号强度。对c-met和抗HGF流动池的亲和力在注射后7分钟均停止增加; 和

图16: 说明恶性肿瘤含有两种细胞; 表达C-met/HGF受体的细胞和表达c-met受体和HGF mRNA两者的细胞。后一种是高侵袭性的癌细胞, 其产生HGF并且具有HGF的作用(自分泌环路)。产生自分泌HGF的细胞侵入血流中并且引起转移。间充质细胞产生正常HGF(内分泌环路), 其对损伤的正常上皮细胞具有阳性作用。这种HGF可能诱导表达HGF受体的肿瘤细胞的细胞分裂和迁移, 但是这种作用被作为调节机制的体内产生的抗HGF完全抑制。另一方面, 抗HGF不能抑制细胞自分泌产生的HGF的作用。这些细胞可能侵入其它器官并引起转移。在S期添加由间充质细胞产生的HGF(内分泌环路)或抗c-met可以抑制高侵袭性细胞的生长。抗c-met也可以抑制由这些细胞产生的HGF的促运动作用。天然抗c-met不抑制正常HGF的作用(内分泌环路)。

优选实施方案详述

肝细胞生长因子(HGF)是一种在机体损伤期间产生的多功能的细

胞因子。本发明人已经确定在血液感染过程中以及在损伤的器官中HGF的量增加。一旦开始适当的治疗，HGF的量就降低。HGF在血液和体液中非常稳定。HGF与其高亲和力受体c-met的相互作用通过刺激酪氨酸激酶活性诱导信号，导致HGF的促有丝分裂、促运动和促形态发生作用，并且启动细胞中的事件序列，导致细胞和器官在损伤后的再生。

本发明人已经研究了血液中HGF的浓度和稳定性，发现在健康供血者中HGF浓度的平均值和中值大约为0.7ng/mL。本发明人进一步利用表面等离子共振法(SPR)研究了重组HGF和体液中的HGF，证明生物活性HGF对由c-met、单克隆/多克隆抗HGF抗体以及葡聚糖固定化的流动池具有恒定的亲和力。

SPR技术适合研究表面上或靠近表面的生物分子的相互作用。SPR能够在不对样品进行任何标记的条件下快速、实时地检测，并且能够用于浓度测定、动力学研究和表位作图。简要地说，以特定入射角入射到金属表面上的光线可以激发与表面结合的电磁波—表面等离子振子，它沿金属和环境介质之间的界面传播。消逝场与表面等离子振子相结合，探查例如由于生物分子与表面结合而诱导的环境介质折射系数的局部改变。折射系数的改变将改变发生SPR激发处的入射角。通过用Kretschmann装置随时间监测反射光强度最小值的移动来追踪这种角度变化，并将结合事件以传感图显示。SPR装置的传感表面由羧甲基化的葡聚糖基质构成，这种基质是一种水凝胶，提供溶液样环境，在其中发生生物特异性的相互作用。葡聚糖基质中的羧基能够使配体(蛋白质、受体、DNA等)与表面共价偶联。

利用SPR技术，本发明人建立了一种区别感染性腹泻和非感染性腹泻的方法。本发明人还表征了在感染性疾病期间发现的具有生物学活性的HGF和在某些慢性疾病如慢性溃疡期间发现的HGF的不同特性。使用表达HGF受体(c-met)的CCL-53.1细胞，转化的小鼠上皮细胞，本发明人已经建立了一种评价HGF活性的方法。本发明人最近报道了遭受创伤的人皮肤上皮细胞自分泌产生HGF。

在建立检测血样中的HGF的SPR方法的同时, 本发明人还观察到高水平的对c-met固定的流动池的亲合力, 在某些情况下比对于单克隆抗HGF抗体或葡聚糖的亲合力高数倍。本发明人在研究来自不同患者组的几种血样时观察到相同的现象。本发明人发现配对的血清和血浆样品之间没有差异。当重组c-met (R&D Systems)的胞外域与人IgG的羧基末端6X组氨酸标记区通过多肽接头融合时, 怀疑补体蛋白质与IgG的相互作用产生假信号。EDTA对补体激活具有抑制作用。因此, 本发明人向样品中添加了不同浓度的EDTA, 这对流动池中的信号强度没有任何影响。基于本发明人的发现, 研究了可能产生信号的可能的替代途径。

已认为c-met是HGF的细胞表面受体, 同时不希望被理论所限制, 认为没有其他蛋白质共有c-met受体。使用c-met固定的亲和柱纯化血样。洗脱下来的样品在超滤后的SDS-page显示高度糖基化的高分子量条带, 该条带在去除白蛋白和IgG后消失。同时, c-met固定的流动池(c-met通道)的SPR信号减弱。提示血样中的抗c-met免疫球蛋白产生高亲和力信号。进一步的研究表明在向样品中添加抗HGF抗体后SPR信号轻微减弱, 并且这种信号减弱与抗HGF抗体固定的流动池中的亲和力信号成比例(数据未显示)。在分析之前向样品中添加c-met后信号严重减弱, 在添加抗c-met抗体后增强, 这提示对c-met通道的亲和力信号是由于血液中HGF和抗c-met两者的亲和力。向血样中添加人白蛋白后信号的轻微减弱可能依赖于健康者血液中天然生物活性HGF对白蛋白的亲合力和HGF与受体相互作用的抑制。此外, 本发明人发现高度浓缩的人肝炎Hbs免疫球蛋白(Aunativ, Octapharma)和人正常免疫球蛋白(Gammanorm, Octapharma) (以较低的程度)在c-met通道中产生类似的信号, 这种信号在去除白蛋白和IgG后消失, 这与血液中存在抗c-met的提示相符合。本发明人进一步建立了检测血液中内源抗HGF抗体(IgG和IgM)总量的ELISA方法。

为了确定血液中抗c-met的可能的作用, 本发明人研究了健康者以及不同患者组的样品。尽管与患者的年龄没有显著相关性, 但是本发

明人观察到年轻健康者以及定期锻炼的老年人具有抗c-met的高信号水平。四名免疫缺陷患者（总IgG缺陷，数据未显示）和老年重病患者具有极低的或者没有c-met通道信号(图15)。分析了来自8名受过良好训练的消防员的血样，显示注射时间从1分钟延长到10分钟使信号强度增强。在运动试验过程中，在最大运动量后4分钟信号强度增加到最大值，但是由于该研究包括的例数较少，其差异没有达到显著性。浓度(ELISA)和对抗HGF流动池的亲合力(SPR)以相同的方式增加。不希望受理论限制，这可能提示在运动过程中HGF的浓度、活性以及抗c-met增加。

与急性胃肠炎和健康对照相比，IBD患者对c-met通道具有低信号亲合力。尽管下肢慢性溃疡和健康对照的信号亲合力之间的差异没有达到显著性($p < 0.053$)，但是本发明人观察到运动较少和/或经历皮质类固醇治疗的老年患者具有比年轻人和运动较多患者更低的抗c-met水平。显著地，本发明人观察到IBD患者和下肢慢性溃疡患者在抗HGF抗体固定的流动池中的信号亲合力显著低于健康对照。本发明人以前曾经证明无生物活性的HGF对于抗HGF抗体、硫酸类肝素蛋白聚糖(HSPG)和硫酸葡聚糖的亲合力显著降低。不希望受理论限制，这一发现可能提示在IBD和下肢慢性溃疡患者中，血清和肠溃疡局部的HGF的生物学活性降低。

本发明人以前曾经证明HGF浓度在感染期间增加。该研究中的肺炎患者具有高水平的HGF (ELISA)，其在有效的抗生素治疗后降低，但是在治疗失败的情况时继续升高。c-met通道中的SPR信号强度并非如此。患病期间信号显著减弱，这可能指示感染期间抗c-met的消耗。

在ReA患者中，抗c-met通道的信号强度在疾病突发时较高，这可能指示急性炎症期间的细胞死亡和血液中的细胞结合受体c-met(循环c-met)的释放。在恢复期间，血液中的c-met和抗c-met水平显著降低，这提示在体内炎症期间抗c-met的调节作用。最近已经报道了非小细胞肺癌中循环c-met的存在和循环c-met的过量表达和它与早期复发的相关性。

自1990年以来已经报道了癌细胞中的c-met受体的表达增强。Met癌基因编码的c-met受体控制一种被称为“侵袭性生长”的遗传程序，负责几个发展过程，并涉及癌症侵袭和转移。侵袭性生长被定义为一种复杂的生物程序，它向细胞发出分离、迁移、降解周围的基质、增殖以及存活的指令。该过程的各个方面可以由多种细胞因子和生长因子控制。然而，侵袭性生长的协同调节在整体上由HGF具体实现，HGF通过c-met受体发挥作用。最近研究的综述表明，在数种恶性肿瘤如脊索瘤、晚期上皮卵巢癌、膀胱移行细胞癌、恶性黑素瘤、人结肠直肠癌、子宫内膜癌、B细胞淋巴瘤和淋巴结阳性乳腺癌中，证明了c-met的过量表达和它与较低存活率的相关性。上皮细胞中HGF和c-met的过量表达介导了自分泌HGF-met信号发生。已经在SNU-484胃癌细胞系、脑脊膜瘤、恶性纤维组织细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、滑膜肉瘤、骨和软组织肿瘤、激活的单核细胞和HGL4胶质母细胞瘤细胞中研究了HGF的自分泌信号发生和它在癌细胞增殖和迁移中的作用。在体内存在内建的负反馈调节机制，如Notch功能的转录诱导，其又通过c-met的恢复限制了HGF活性。

人角质形成细胞是上皮细胞，推断其不产生HGF。从损伤的患者获得的皮肤细胞是角质形成细胞，因为它们产生角蛋白。细胞以自分泌方式产生HGF。产生的HGF具有通过SPR (提交的文章)确定的生物活性HGF的性质，具有两条如通过MALDI-TOF确定的代表 α 和 β 链的带，并且诱导CCL-53.1细胞的迁移。已经报道了一个类似的发现，即胃成纤维细胞条件培养基具有与HGF类似的对上皮增殖和重建的作用，其活性被抗HGF抗体中和。但是，与健康者产生的HGF或重组HGF不同，损伤的角质形成细胞产生的CCL-53.1细胞的迁移不被抗HGF抗体抑制。添加商品抗c-met或在人免疫球蛋白中发现的天然抗c-met完全抑制这种迁移。间充质细胞产生的HGF和上皮细胞以自分泌方式产生的HGF之间的这种差异的原因尚不清楚。但是，抗c-met不抑制正常活性HGF（血液、体液中的或重组的）对CCL-53.1细胞的作用可能具有价值。本发明人确定添加作为激活物起作用的抗c-met增强了对

CCL-53.1细胞的促运动活性（数据未显示）。

在传代时将天然生物活性HGF和抗c-met加入到正常角质形成细胞和产生自分泌HGF的角质形成细胞中。HGF和抗c-met对正常角质形成细胞都没有作用。但是HGF和抗c-met都导致细胞从孔底脱落以及产生HGF的上皮细胞（自分泌）的细胞死亡。曾报道了关于HGF抑制自分泌产生HGF的肝细胞癌细胞生长的类似的发现。本发明人进一步研究了MDA-MB-157 (HTB-24 ATCC)细胞系，一种自分泌产生HGF的人乳腺癌细胞系，发现在传代时向细胞中加入内源抗c-met导致HTB细胞死亡，这证实了以前的结果。向损伤的CCL-53.1细胞中添加HTB-24细胞的细胞培养基导致细胞向损伤区域迁移。加入内源c-met抑制剂抑制了这种效果。

癌性肿瘤含有两种细胞：表达c-met/HGF受体的细胞和表达c-met受体和HGF mRNA两者的细胞。后一种是高侵袭性的癌细胞，产生HGF并且受其影响（自分泌环路）。产生自分泌HGF的细胞（被转化的上皮细胞）在血流中迁移并且引起转移。间充质细胞产生正常HGF（内分泌环路），这种HGF对于损伤的正常上皮细胞具有再生作用。这种HGF可以诱导表达HGF受体的肿瘤细胞的细胞分裂和迁移，但是这种作用被作为调节机制的体内产生的抗HGF完全抑制。另一方面，抗HGF不能抑制被转化的上皮细胞产生的HGF的作用。这些细胞可能侵入其它器官并且导致转移。两种HGF形式（内分泌或自分泌产生的）可能在转录前或转录后在结构或糖基化方面不同。在S期添加由间充质细胞产生的HGF（内分泌环路）和/或抗c-met抑制了被转化的上皮细胞的生长。抗c-met也可以抑制由这些细胞产生的HGF的促运动作用。

本发明人确定了抑制个体中的癌发生和/或转移的方法，包括给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段。本领域技术人员应当理解，在此可以采用各种给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段的方法。本领域技术人员也应当理解，给个体施用的内源c-met配体包括全长内源c-met配体、内源c-met配体片段或其组合。本文使用的“内源

c-met配体片段”是指具有与全长内源c-met配体具有相同活性的全长内源c-met配体的任何片段，或者是全长内源c-met配体的化学或结构类似物。内源c-met配体的例子包括但不限于天然和/或重组抗c-met免疫球蛋白、天然和/或重组肝细胞生长因子(HGF)或其组合。

本发明人还确定了抑制个体中自分泌产生的内源HGF与c-met受体相互作用的方法。该方法包括给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段。这种对自分泌产生的内源HGF的相互作用的抑制也将增强内分泌产生的内源HGF产物与c-met受体的相互作用。

抗c-met不抑制正常HGF (内分泌环路)的作用(图16)，它的产生可能因为锻炼而增加并且在严重炎症期间被消耗。因此，锻炼可以引发损伤愈合，并且抑制HGF/c-met相互作用介导的癌症侵袭。血管发生、细胞分裂、迁移和形态发生受内源c-met配体如HGF、c-met、天然抗c-met和抗HGF的影响。因此，本发明人已经确定了影响个体的血管发生、细胞分裂、迁移和/或形态发生的方法。该方法包括给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段、抗HGF或其片段、或其组合。

抗c-met与内分泌产生的HGF联合对损伤的上皮细胞的再生作用以及对转化的上皮细胞的凋亡作用可能刺激诱导抗c-met的产生或外源性施用。锻炼和疫苗接种是诱导天然抗c-met产生的例子。在手术之前、期间、之后和/或在切除肿瘤后外源性施用内源c-met配体或其片段可以消除高侵袭性转化上皮细胞并且降低了远端转移的风险。高灵敏性、高特异性的纳米技术可以辨别并且特异性地消除肿瘤中表达HGF mRNA的转化的上皮细胞，以降低侵袭的风险。对于其它细胞因子来说，在正常和转化的细胞上存在具有不同性质的不同种类生长因子的类似现象可能是事实。

本发明人已经确定在健康人的血液中发现了大量的天然抗c-met抗体。该抗体是高度糖基化的免疫球蛋白，它在急性或慢性炎症过程中被消耗，并且可能随着体育锻炼而增多，因此抗体的产生可能因为锻炼而增强并且在炎症过程中被消耗。本发明还涉及确定自身免疫病患者血液中少量抗c-met配体的存在。

本发明人进一步确定了调节个体中的内源c-met配体或其片段的方法。该方法包括检测个体中内源c-met配体或其片段的水平，并且给个体施用有效量的内源c-met配体或其片段。

实施例

实验详述如下：

研究对象

A- 健康志愿者

收集46名健康供血者（22名女性，24名男性；18-57岁，中值为36岁）的血清。

本研究中也包括8名受过良好训练的健康志愿者（6名男性，2名女性；平均年龄36岁，范围25-49岁）。这8名志愿者在电动制动的计算机控制的自行车上进行运动试验。运动之前（仰卧位）、运动大约一半时间时、最大运动量时、运动后4分钟和10分钟时（仰卧位）立即抽取静脉血样。在分析前将样品保存在-70°C。

B- 肺炎患者

在抗生素治疗之前和18-24小时后，采集16名经X射线检查证实为肺炎的患者（10名男性和6名女性；22-90岁，中值为72岁）的血浆，在分析之前保存在-70°C。这些患者曾经作为以前的研究的一部分(接受的文章，Chemotherapy)。

C- 炎性肠病(IBD)和感染性胃肠炎患者

采集48名已知IBD患者(28名女性和20名男性；范围为19-85岁，中值为56岁)的血浆，这些患者在Linköping大学医院胃肠病科（Department of Gastroenterology, University Hospital in Linköping）治疗。

也采集了9名收入传染病科的急性胃肠炎患者（6名女性，3名男性；范围为25-86岁，中值为65岁）的血浆。粪便培养物有2例为空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*）阳性，有2例为艰难梭菌（*Clostridium difficile*）阳性，有2例为沙门氏菌（*Salmonella* DO）阳性，有3例为阴

性。这些患者曾作为以前的研究的一部分。

D- 下肢慢性溃疡患者

采集12名下肢慢性溃疡患者(8名女性, 4名男性; 44-89岁, 中值为76岁)的血液。这些患者曾经作为以前的研究的一部分。

E- 反应性关节炎患者

在疾病急性期和3-6个月后, 采集10名在感染性胃肠炎后发展的反应性关节炎患者(7名女性, 3名男性; 范围为17-78岁, 中值为36岁)的血液,

F- 韦格纳肉芽肿血管炎患者

采集了11名未确诊的已知韦格纳肉芽肿血管炎患者的血液。

方法

用于SPR测定的配体固定方法

SPR测定在装备有4个流动池的全自动Biacore 2000仪器(Biacore AB, Uppsala, 瑞典)中在760 nm下进行。所有实验中的流动池温度为25°C。使用的样品表面是羧甲基化的葡聚糖CM5芯片(Biacore AB, Uppsala, 瑞典)。配体与葡聚糖水凝胶的羧酸基团的偶联通过常规碳二亚胺化学法使用200 mM EDC (N-乙基-N'-(3-二乙基氨基丙基)碳二亚胺)和50 mM NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)进行。活化时间为7分钟, 然后是2-7分钟的配体注射。剩余的活性酯的灭活通过在7分钟内注射pH 8.5的乙醇胺/盐酸盐来进行。在固定期间使用5 μ l/min的流速。将配体在10 mM乙酸盐缓冲液pH 4.5 (即, 低于蛋白质等电点)中稀释, 从而提高葡聚糖基质和配体之间的静电相互作用。重组Met原癌基因受体(100 μ g, R&D Systems)、单克隆抗HGF受体(100 μ g/ml, R&D Systems)和人白蛋白200mg/mL (Octaphanna)以1:5稀释。接触时间为2-7分钟。将样品在HBS缓冲液、PBS (pH 7.4)、MQ水、生理盐水 + EDTA中稀释为不同的浓度和不同的组合, 并且分别检测。为了获得可靠的结果, 一个芯片上最多进行80个试验。使用硼酸盐缓冲液(pH 8.5)和/或5 mM甘氨酸缓冲液pH 2.0和1 M NaCl的组合作为再生缓冲

液。

通过亲和层析和SDS-PAGE纯化血样

亲和层析柱(Hi-trap Amersham Biosciences)用重组人HGF受体(c-MET)/Fc嵌合体(R&D Systems)固定。来自供血者的血清或血浆样品在PBS (pH 7.4)中重建并且注射到柱中。使用含有1 M NaCl的5 mM甘氨酸缓冲液pH 2.0作为洗脱缓冲液。然后将样品加至500 μ l的离心管(Amicon Ultra, Millipore, S.A.S. Molsheim, 法国)中, 以4000 G离心1小时。按照说明书使用白蛋白和IgG去除试剂盒(Amersham Biosciences)和天然去糖基化试剂盒(Sigma Alrich)。

用纯化、过滤和除去白蛋白和IgG之前和之后的血样进行SDS-PAGE, 采用4%积层胶和11-14.6%丙烯酰胺电泳胶。为进行大小估计, 将预染色的蛋白质标准(Sigma Aldrich)同时进行电泳。

初级角质形成细胞培养物

从一名总体表面积80%烧伤的30岁男性患者的腹股沟区的皮肤活检组织获得细胞, 接种进行组织再生(Karocell AB Stockholm)。将制备的细胞在添加有15%马血清、2.5%胎牛血清(Sigma-Aldrich Stockholm, 瑞典)和抗生素(10%, 青霉素、链霉素、两性霉素B, Sigma Aldrich)的Kaighn改良的Ham F-12K培养基(ATCC)中在5% CO₂和95%空气的气氛下于37°C再培养。使围绕角质形成细胞岛含有皮肤成纤维细胞的单层生长。使用无菌针从角质形成细胞培养物中收集细胞, 在补充的Hani F-12K培养基(如上所述)中再培养。本发明人在几次传代后成功获得纯角质形成细胞单层(产生角蛋白, 正在准备的文章)。每到第5天收集培养基, 以1000 g离心10分钟, 保存在-70 °C。同时用非酶细胞分离溶液(1x) (Sigma-Aldrich)分离汇合的细胞培养物, 并将其悬浮在含15%马血清和2.5%胎牛血清+抗生素的F-12K培养基中。健康供体的皮肤角质形成细胞作为商品获得(Karocell AB Stockholm)。

来源于小鼠皮肤、黑素细胞、黑素瘤的CCL-53.1粘附上皮细胞从美国组织细胞保藏中心(ATCC, Manassas, Virginia, USA)获得, 在添加有15%马血清、2.5%胎牛血清(Sigma-Aldrich)和10%抗生素的Kaighn

改良的Ham F-12K培养基(ATCC)中在5% CO₂和95%空气的气氛下于37°C生长,接种于24孔培养板(Nunc Brand Products, Roskilde, 丹麦)上,在相同条件下培养24小时,直到它们达到汇合。用无菌钢具刮下汇合的单层。脱壁的细胞用PBS洗涤。用显微镜(Olympus)测量每个孔未被细胞覆盖的方形面积(mm²)并记录。然后将收集的培养人角质形成细胞(1 ml)的培养基加入到细胞中,在含有5% CO₂的潮湿气氛中于37°C孵育。使用收集的前一代CCL-53.1细胞的培养基作为阴性对照。使用SPR反应性重组人HGF (提交的文章)和利用肝素亲和柱从健康供血者中纯化的HGF作为阳性对照。24小时后,再次测量并记录未被单层覆盖的面积。使用及不使用抗人HGF抗体(R&D Systems)和抗HGF受体/c-Met抗体(R&D Systems)进行实验。进行6个独立的实验。

统计学

数值为正态分布,因此在将数值转化为它们的自然对数后使用分组方差分析(ANOVA, SPSS 13.1)和线性回归。也利用非参数检验Wilcoxon符号秩检验验证某些结果。 $p < 0.05$ 的概率水平被认为具有统计学显著性。

结果

结果:在重组c-met固定的SPR流动池中发现信号。在分析前向血液中添加c-met后信号显著减弱($p < 0.00001$)。添加抗人HGF单克隆/多克隆抗体或人白蛋白也显著减弱了信号($p < 0.001$)。然而,添加商品抗c-met抗体增强了信号强度($p < 0.01$)。在患者的年龄和性别与信号强度之间没有相关性。在运动期间信号增强,而在患病期间信号减弱。血清和血浆样品之间没有显著差异。通过SDS-Page证实,利用c-met固定的亲和柱纯化血液产生两条超过150 kDa的带。除去白蛋白和IgG导致SDS-Page中的条带和SPR中的信号消失。去糖基化处理使条带降至大约120 kDa。对抗人肝炎HBs免疫球蛋白的分析得到相同的结果。添加抗乙型肝炎HBs抗体以及商品抗c-met抑制了上皮细胞以自分泌方式产生的HGF的促运动作用,但是不抑制健康者血液中产生的HGF的作用。在S期向产生自分泌HGF的皮肤上皮细胞中添加抗c-met或SPR

反应性重组HGF导致细胞死亡，但不影响正常皮肤上皮细胞。

健康供血者和受过良好训练的志愿者

SPR: 在重组人HGF受体/c-met固定的流动池(c-met通道)中检测到信号。在配对的血清和血浆样品的SPR信号之间没有显著性差异($p=0.56$)。当样品在PBS (pH 7.4)中稀释时获得最可靠的结果。样品在生理盐水 + EDTA中稀释不影响结果。在添加单克隆/多克隆抗HGF抗体之后信号轻微地但是显著性地减弱($p<0.001$)。在分析之前向样品中添加重组人HGF受体/c-met之后信号严重减弱($p<0.0001$) (图1)。添加人白蛋白轻微地但是显著地减弱了信号($p<0.01$)。然而，向样品中添加人抗c-met抗体增强了信号强度($p<0.01$)。通过除去白蛋白和IgG处理血样使信号显著减弱($p<0.0001$)。对人肝炎Hbs抗体(Aunative, Octapharma)的分析在c-met通道中得到相同的信号。向样品中添加c-met或除去白蛋白和IgG后信号消失。在除去白蛋白和IgG后向样品中添加白蛋白(Aunativ)未产生任何信号。

SDS-Page: 通过凝胶电泳分析了利用固定有c-met的亲合层析柱纯化的血浆。发现了两条分子量 >120 kDa的线，一条线为大约95 kDa，第三条线为66 kDa。还发现了大约35 kDa的另外第四条线(图2)。

在除去白蛋白和IgG后， >120 和66 kD的线消失，而显示了两条不同的大约55和25 kDa的条带(图3)。Avmativ的SDS-Page得到两条 >120 kDa的条带，其在除去白蛋白和IgG后消失(图4)。利用亲和柱纯化的血样的去糖基化使条带的分子量降至大约100及75 kDa (图5)。

研究对象: 研究对象的年龄和性别与SPR信号之间没有相关性($p=0.44$)。延长注射时间提高了健康供血者中的c-met亲和力(图6)。受过良好训练的志愿者的c-met亲和力信号显示非显著性的趋势，在运动之前的平均值(范围)为726 RU (171-1536)，在运动一半时为762 RU (230-1696)，在最大运动量时为733 RU (295-1558)，在运动后4分钟为924 RU (303-2051)，10分钟后为851 RU (316-1997) (图7)。还通过ELISA测定了血液中的HGF浓度。为了说明血细胞比容的可能的变化，将血清HGF对平均白蛋白浓度进行校正。

校正的HGF显示非显著性的趋势，运动之前的平均值（范围）为0.55 (0.31-0.77)，运动一半时为0.60 (0.36-0.77)，最大运动量时为0.70 (0.32-1.16)，运动后4分钟为0.74 (0.36-1.30)，10分钟后为0.60 (0.31-1.03) (图8)。

肺炎患者

健康对照和肺炎患者的c-met通道的信号强度之间没有显著性差异($n=16$, $p=0.37$)。在所有病例中，治疗期间信号强度显著减弱(Wilcoxon符号秩检验, $p<0.01$)，无论它们是否对治疗具有应答。

IBD/急性胃肠炎患者

尽管在急性胃肠炎患者($n=9$)和健康对照($n=9$ ，同时分析)的c-met通道的信号强度之间没有显著性差异，但是IBD患者($n=48$)的信号水平比急性胃肠炎患者和健康对照显著降低($p=0.005$)。IBD患者的血液对于抗HGF通道的亲和力比正常对照显著降低($p<0.01$)，并且对c-met通道和抗-HGF通道的亲和力之间具有差异。

下肢慢性溃疡患者

尽管某些下肢慢性溃疡患者的c-met通道的信号强度较低，但是这些患者($n=12$)与健康对照($n=19$ ，同时分析)之间的总体差异没有达到显著性($p=0.053$)。慢性溃疡患者的血液对于抗HGF通道的亲和力显著低于正常对照($p<0.0001$) (图9)，并且这些患者对c-met通道和抗-HGF通道的亲和力之间具有差异。

反应性关节炎(ReA)患者

从ReA患者($n=10$)和健康对照($n=10$)获得的c-met通道亲和力没有显著性差异。但是，与对照相比，这些患者在抗c-met固定的流动池中具有高水平的信号($p<0.01$)。从疾病的急性期到3-6个月内的恢复期，c-met和抗c-met固定的流动池中的信号强度显著降低(Wilcoxon符号秩检验, $p<0.01$) (图10)。

韦格纳肉芽肿血管炎患者

尽管对于抗HGF流动池的亲和力与正常健康对照相同，但是本发明人观察到这些患者($n=11$, $p<0.05$)对c-met流动池的亲和力与同一芯

片中检测的健康对照(n=30)相比显著性降低。

对损伤的人角质形成细胞的生物学活性

从严重皮肤损伤者中获得的人角质形成细胞产生角蛋白(图11)和HGF(图12-13)。从细胞获得的培养基在CCL-53.1细胞中诱导促运动活性。在研究来自健康皮肤角质形成细胞的培养基时没有观察到这种效果。损伤的角质形成细胞自分泌产生的HGF的促运动作用不能被单克隆/多克隆抗HGF抗体抑制,而添加多克隆抗c-met抗体以及Aunativ完全抑制了CCL-53.1细胞对损伤区域的促运动活性。但是在用生物活性重组HGF或利用肝素亲和柱从健康供血者中纯化的HGF处理的孔(阳性对照)中,添加抗c-met不能抑制细胞的促运动活性,而抗HGF抗体完全抑制了这种作用(图14)。

S期的细胞

CCL-53.1细胞:在传代时向细胞中添加SPR-反应性重组HGF、从供血者中纯化的HGF或抗-HGF对细胞没有显著影响。在4/6的实验中,添加抗c-met导致细胞脱落。

正常人角质形成细胞:在传代时添加SPR-反应性HGF或抗c-met对细胞没有影响。

自分泌产生HGF的上皮细胞:在所有实验中,在传代时添加SPR-反应性重组HGF导致细胞的数目和与孔底部的附着显著降低。添加抗c-met导致细胞从底部脱落(14小时),以及细胞死亡(24小时),但是不影响细胞数。

此处描述的具体说明和实施方案在性质上只是示例性的,不是用来限制由权利要求书限定的本发明。基于本说明书,进一步的实施方案和实施例对于本领域普通技术人员是显而易见的,并且属于本发明的范围内。

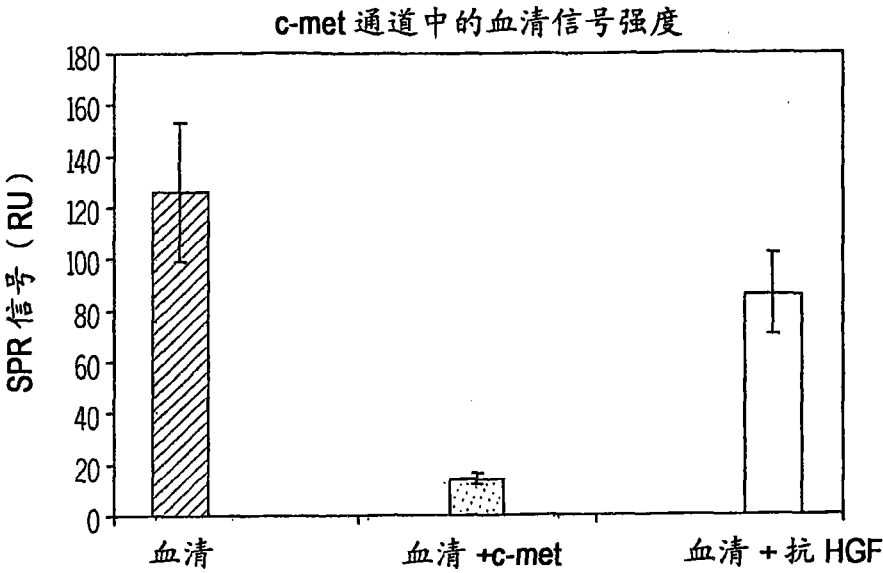


图 1

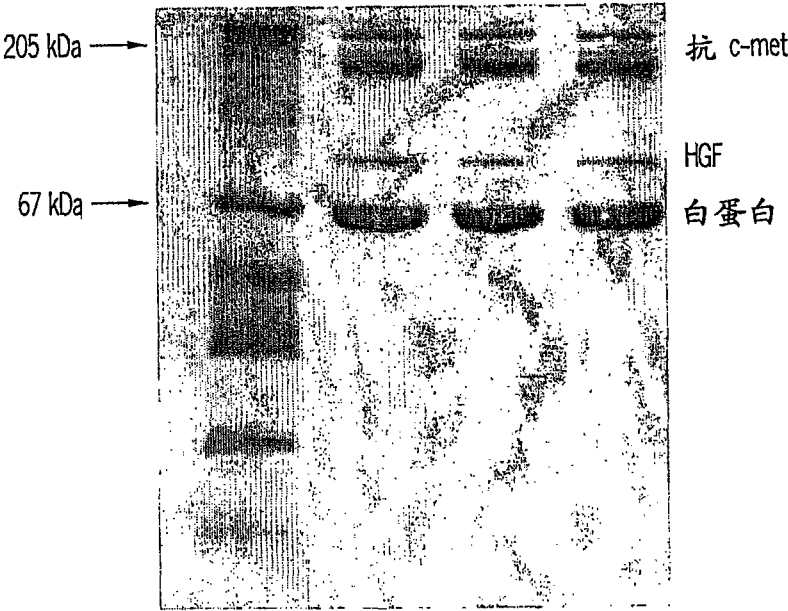


图 2

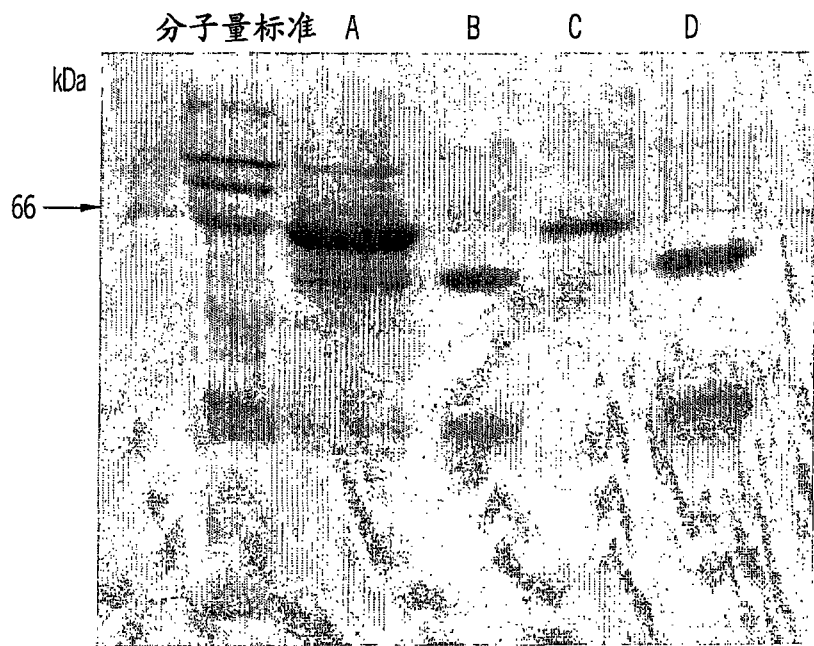


图 3

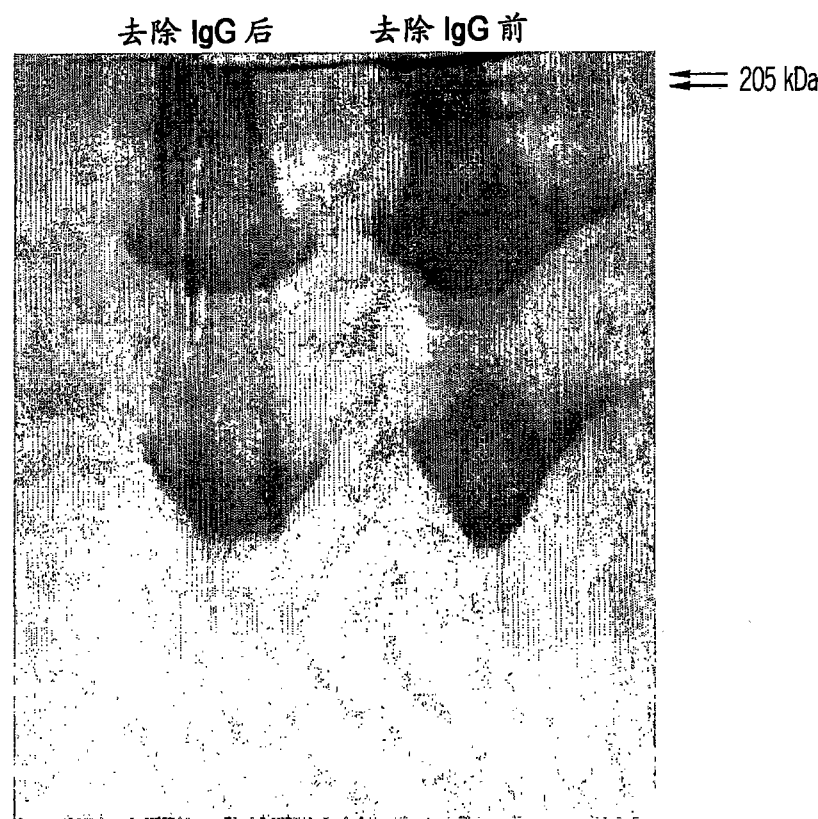


图 4A

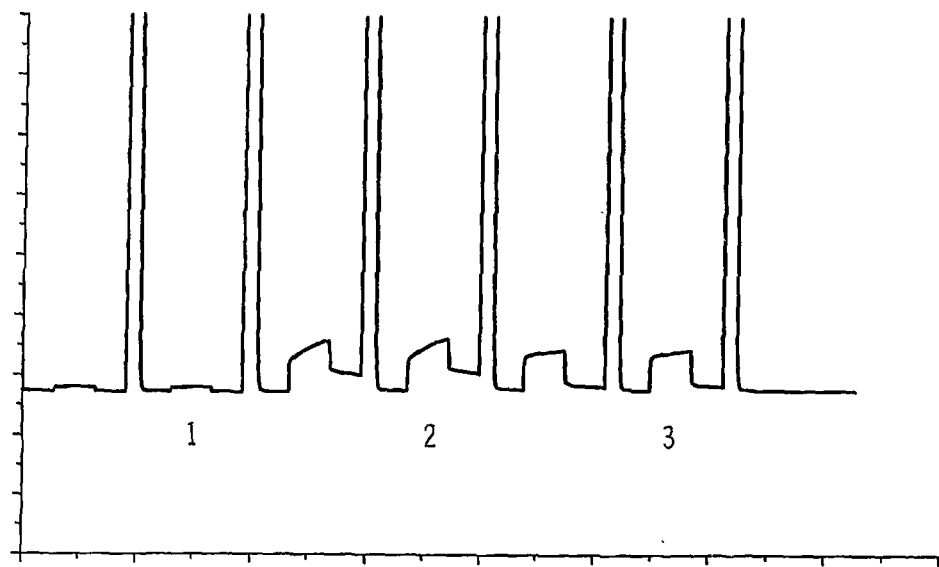


图 4B

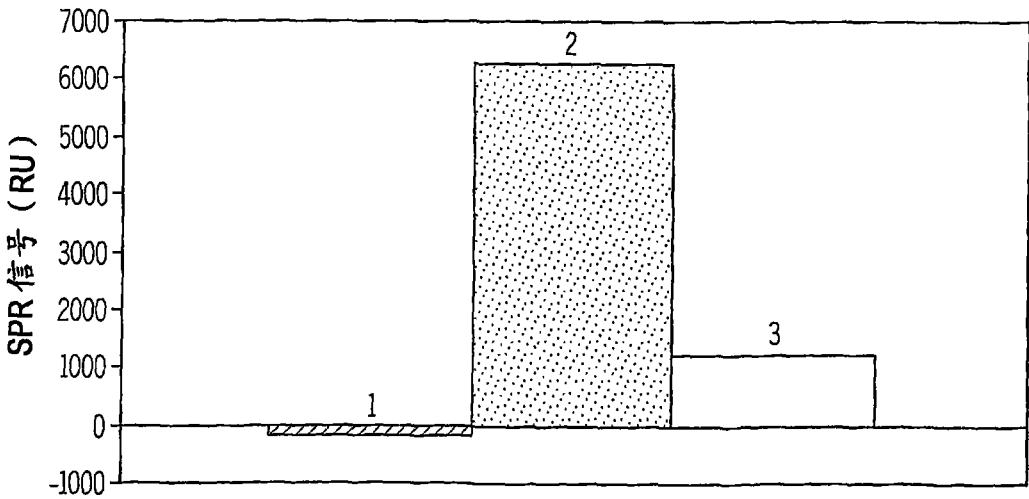


图 4C

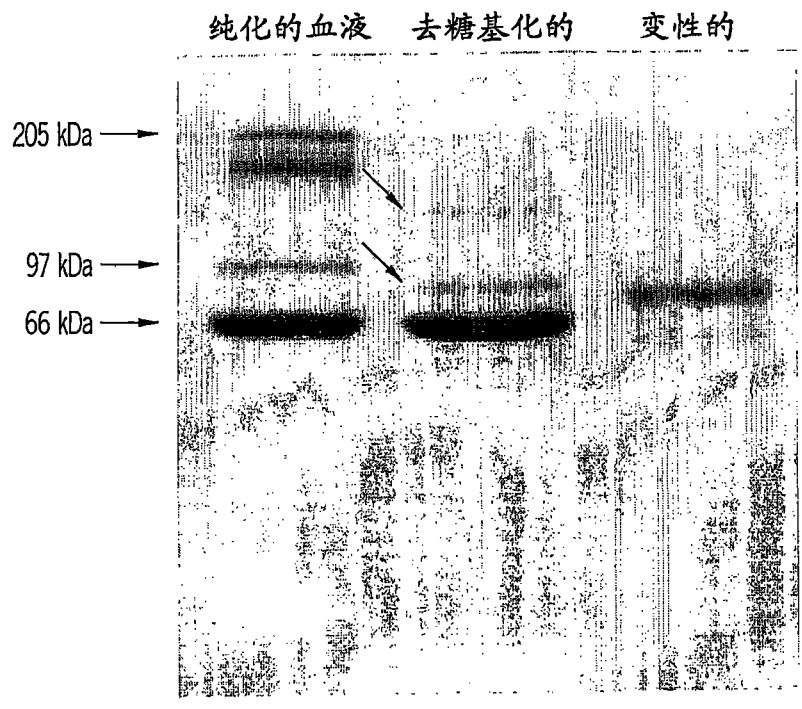


图 5

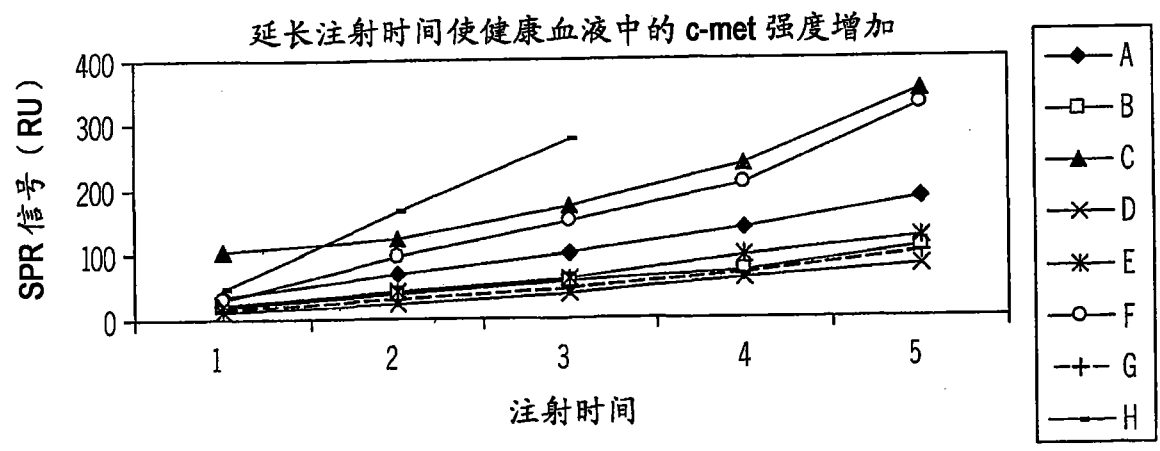


图 6

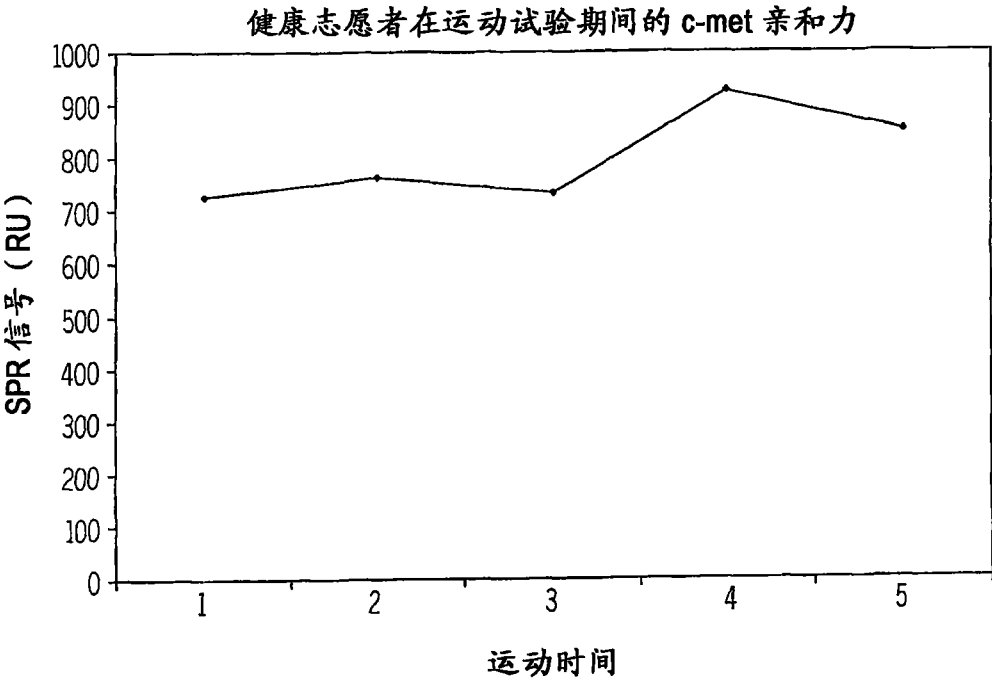


图 7

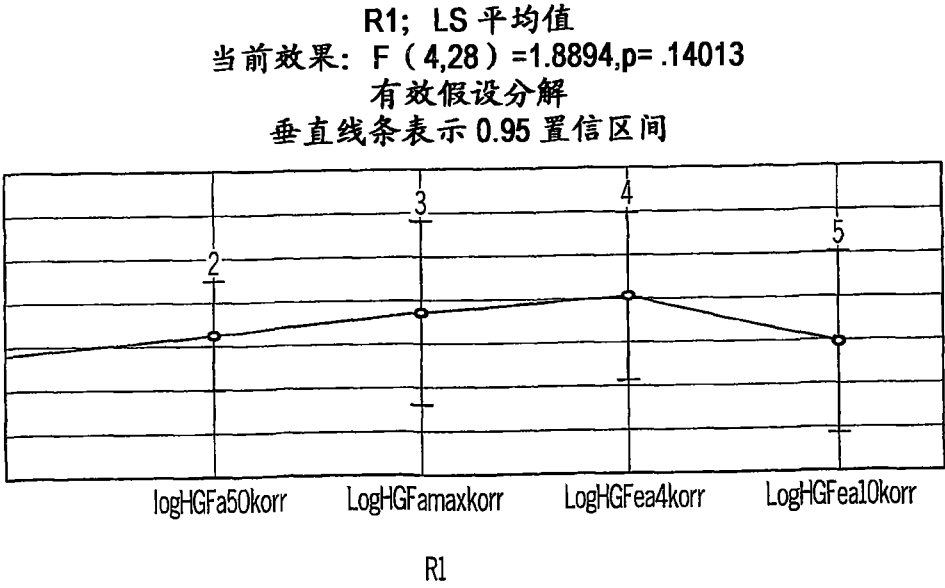


图 8

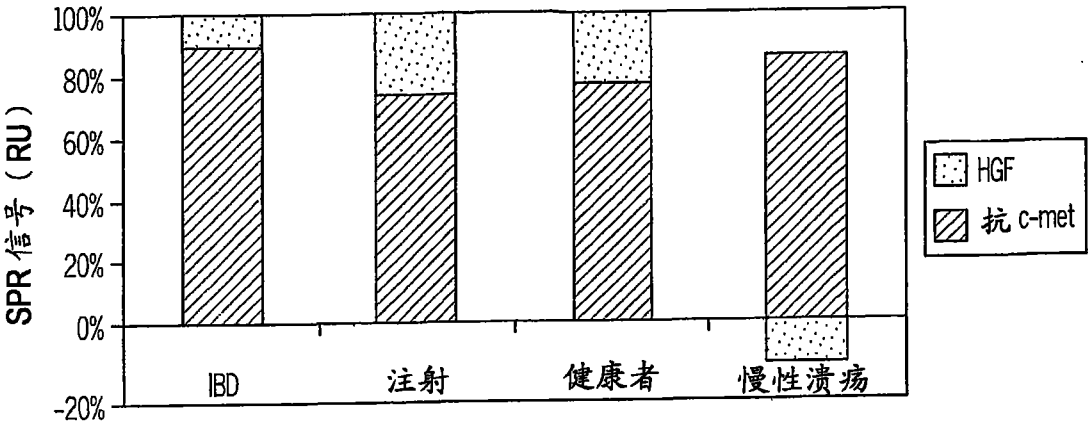


图 9

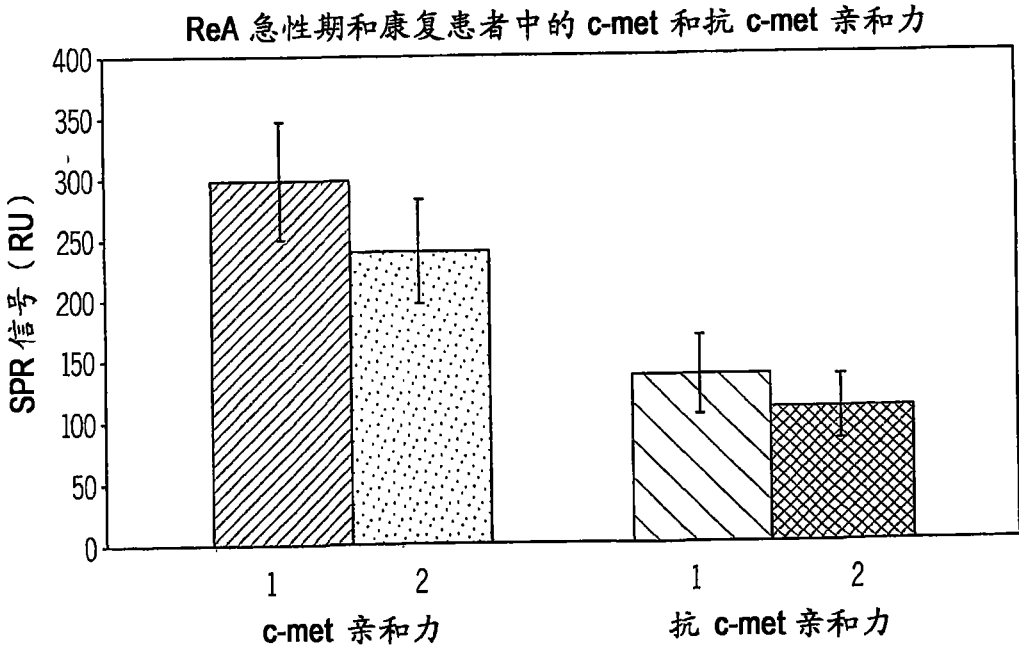


图 10

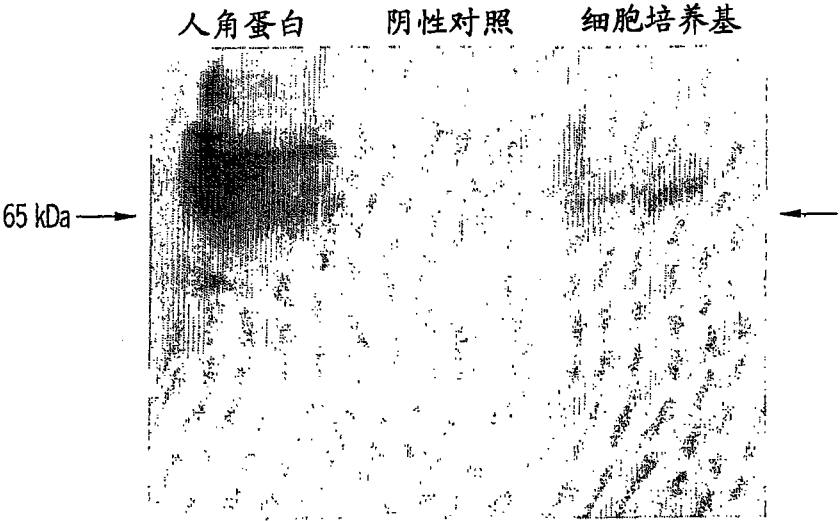


图 11

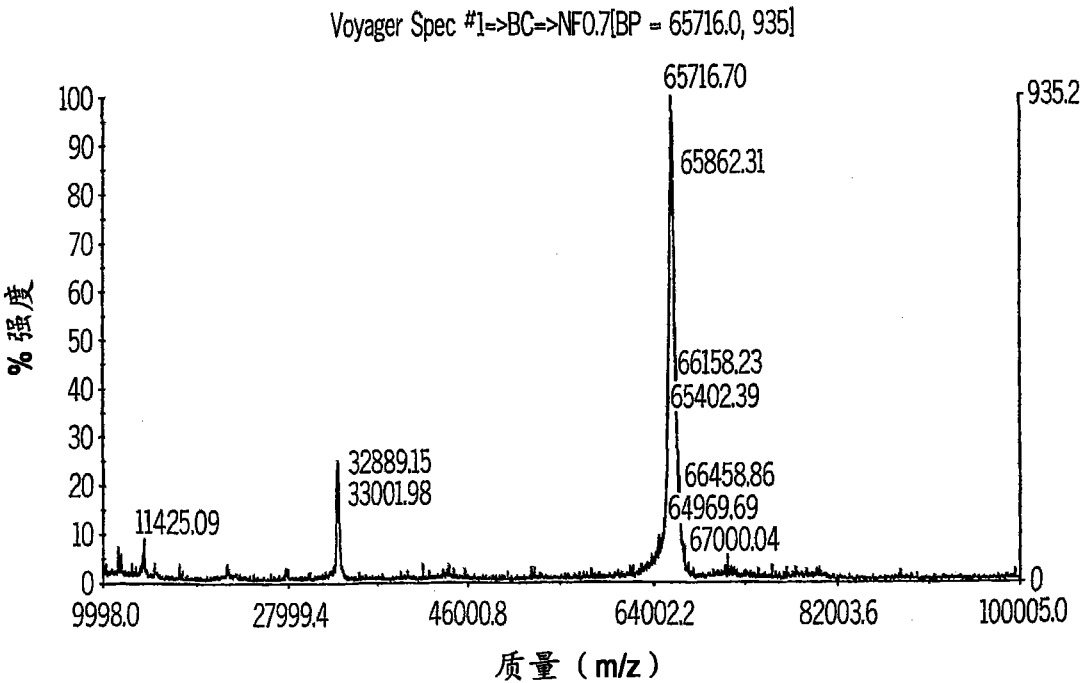


图 12

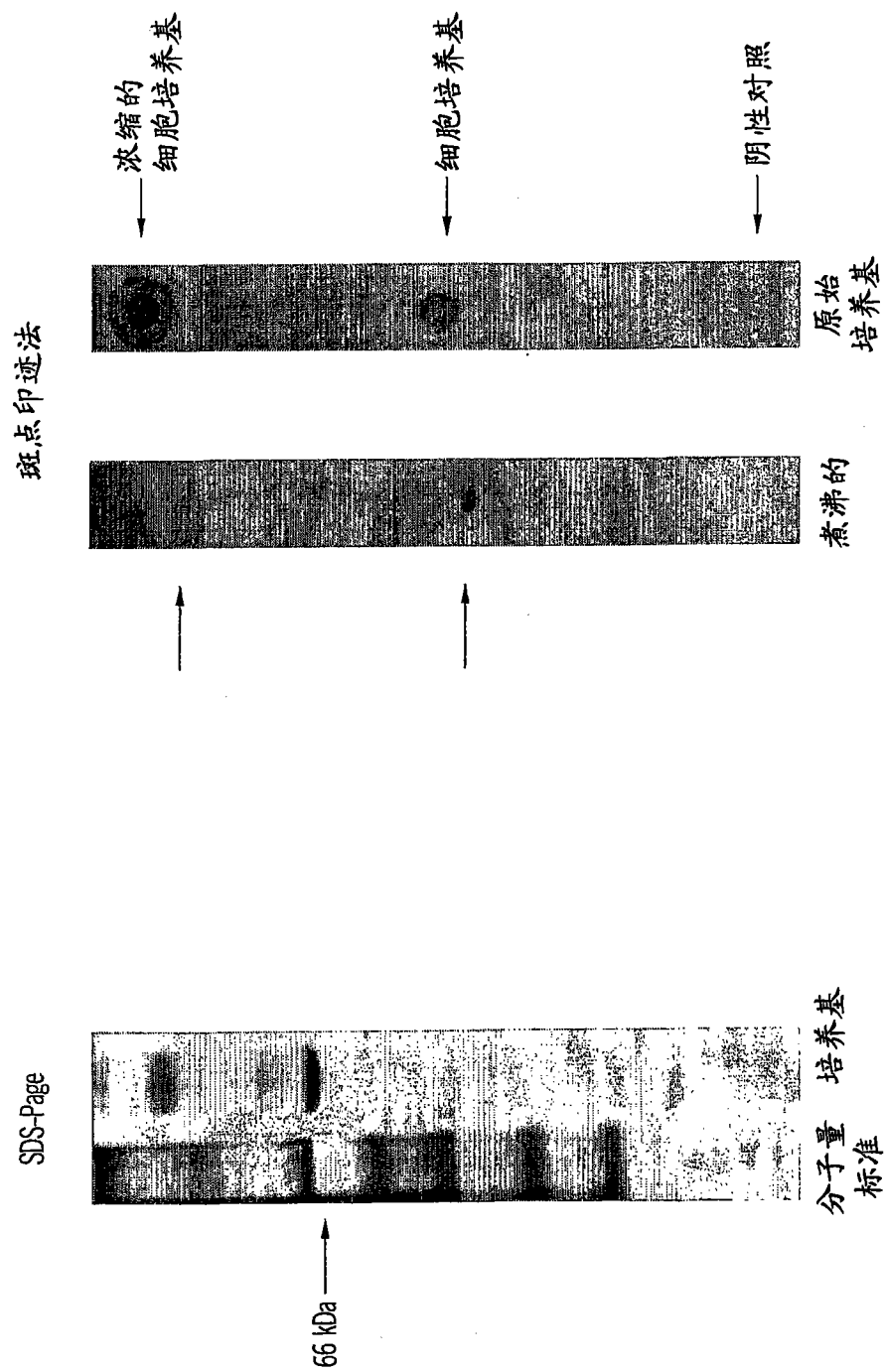


图 13A

图 13B

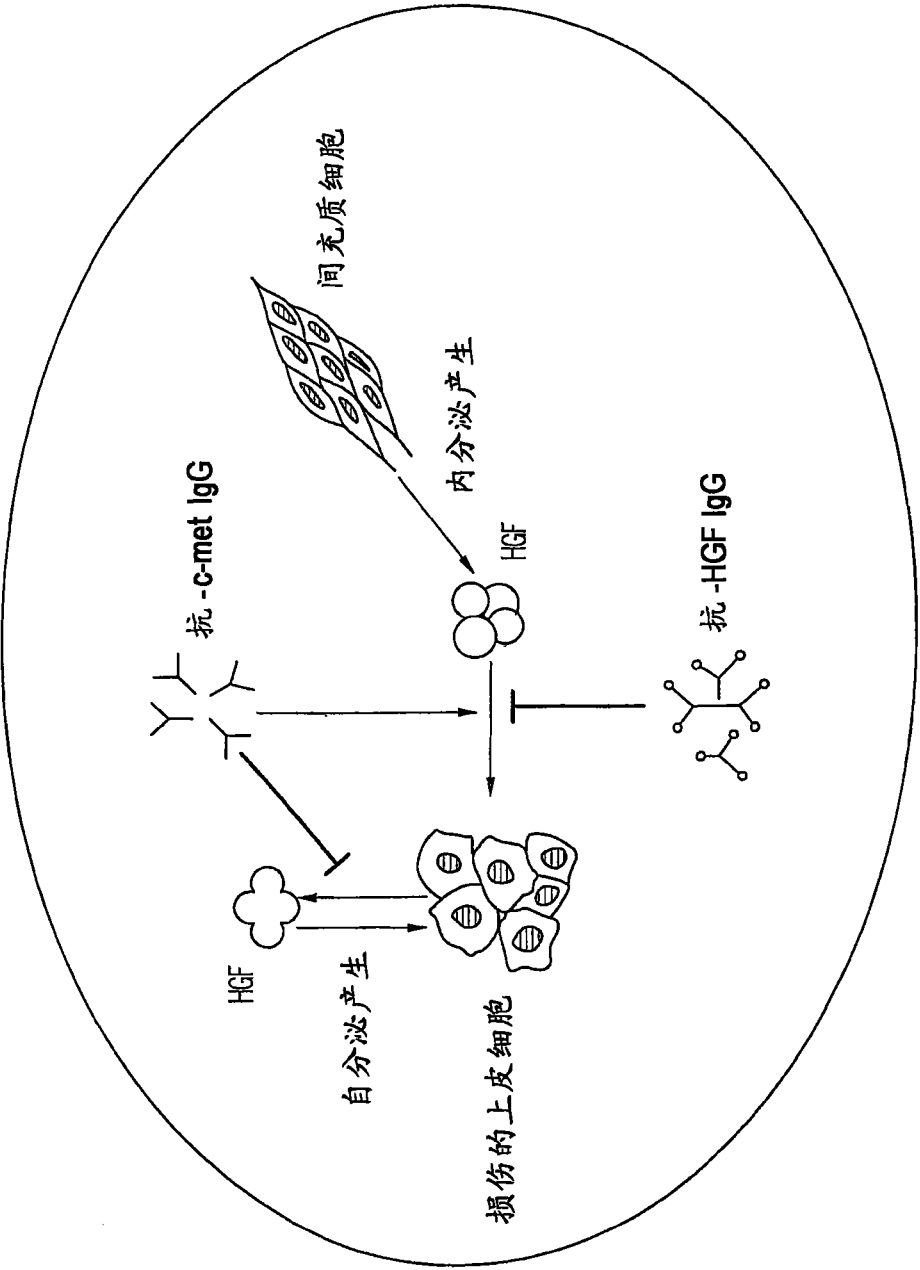


图 14

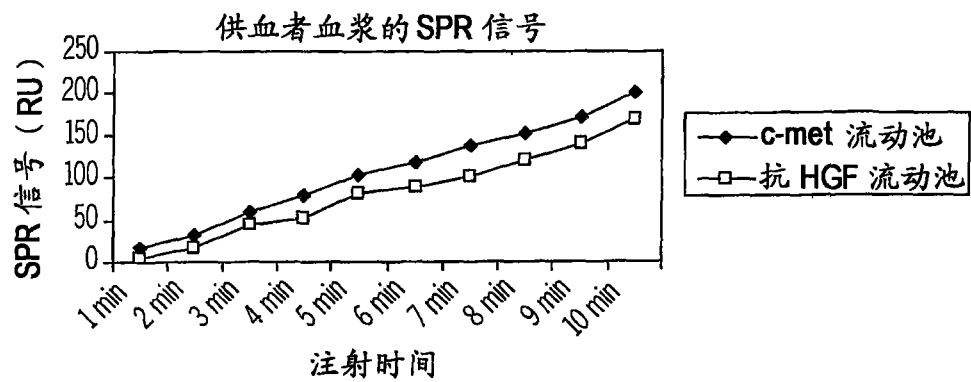


图 15A

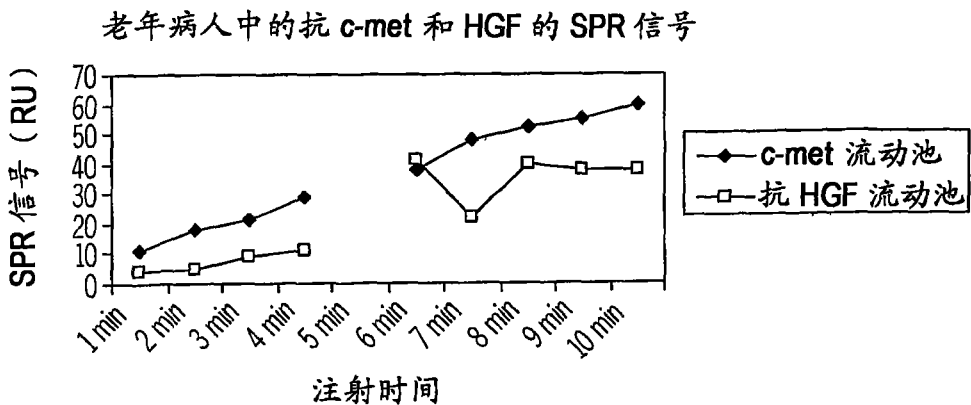


图 15B

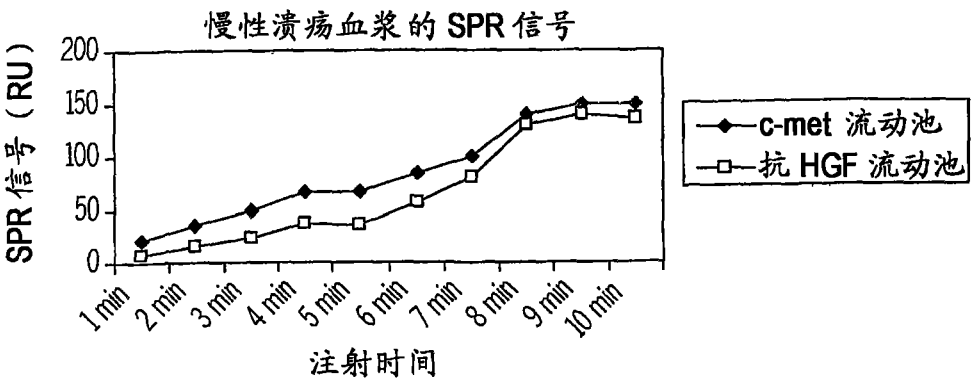


图 15C

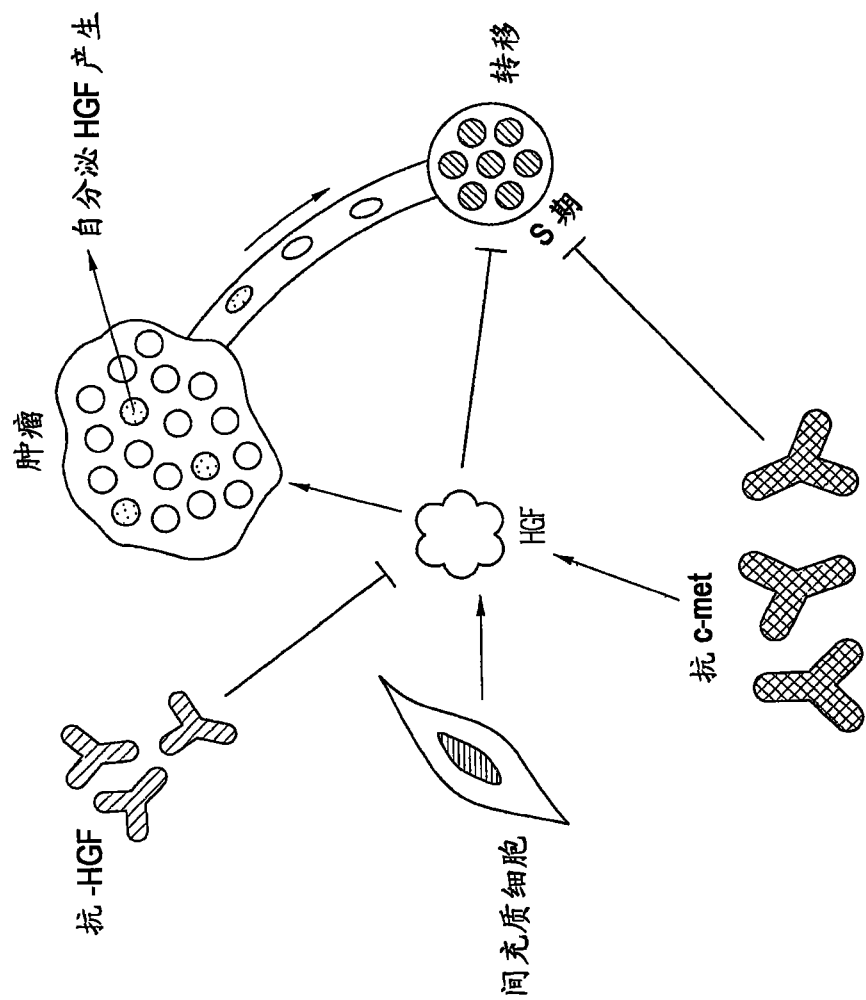


图 16