



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 765**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03702574 .9**

96 Fecha de presentación : **30.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1469878**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2004**

54 Título: **Agonistas de FGFR.**

30 Prioridad: **31.01.2002 EP 02002358**
31.01.2002 US 353831 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2011

73 Titular/es: **Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung
der Wissenschaften e.V.**
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE

72 Inventor/es: **Bange, Johannes y**
Ullrich, Axel

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN**Agonistas de FGFR**

La presente invención se refiere al uso de agonistas del Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR) para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neoplásicas. Particularmente, se describe el uso de agonistas de FGFR-4, por ejemplo anticuerpos anti-FGFR-4.

El documento WO 99/37299 describe el uso de inhibidores de FGFR para el tratamiento y/o prevención de trastornos asociados con la sobrefunción de FGFR, particularmente cáncer.

Sorprendentemente, se encontró que en muchos casos, para la prevención y/o tratamiento de trastornos hiperproliferativos, no son adecuados los inhibidores de FGFR, sino los activadores selectivos de FGFR, puesto que estos agonistas estimulan procesos de diferenciación celular.

La presente invención se define mediante el conjunto anejo de reivindicaciones.

De este modo, la invención se refiere al uso de un compuesto que es capaz de estimular la actividad de tirosina cinasa de una especie de FGFR-4 para la fabricación de un agente terapéutico para la prevención y/o tratamiento de enfermedad neoplásica.

Actualmente se conocen cuatro genes de FGFR estructuralmente relacionados que codifican cuatro proteínas diferentes, a saber, FGFR-1, 2, 3, y 4. Las proteínas de FGFR muestran un dominio extracelular que consiste en tres bucles inmunoglobulínicos y una porción ácida, un dominio transmembránico hidrófobo, y un dominio intracelular que muestra actividad de tirosina cinasa. Se conocen diferentes isoformas para FGFR-1, FGFR-2 y FGFR-3, que pueden resultar, por ejemplo, de cortes y empalmes alternativos. Al menos existen dos variantes alélicas para FGFR-4, que difieren en la posición 388 de los aminoácidos (véase el documento WO 99/37299), es decir, FGFR-4 Gly388 y FGFR-4 Arg388.

El compuesto agonista de FGFR estimula preferiblemente la actividad de una especie de FGFR que es FGFR-4. Preferiblemente, la estimulación es selectiva, es decir, la estimulación de una especie de FGFR como se describe anteriormente no conduce a una estimulación significativa de otras especies de FGFR. En este contexto, "estimulación significativa" significa que el compuesto agonista no es capaz de estimular la actividad biológica de otras moléculas de FGFR en un ámbito fisiológicamente relevante. Sin embargo, se debería de señalar que, para algunas realizaciones, puede que no sea necesaria una selectividad por una sola de las especies de FGFR, es decir, el agonista puede estimular dos o incluso más especies de FGFR, en el que el grado de estimulación puede ser aproximadamente el mismo o diferente para especies individuales.

En una primera realización, el compuesto muestra su actividad estimulante uniéndose a una especie de FGFR-4, particularmente FGFR-4 o isoformas o variantes alélicas de la misma, e incrementa de ese modo la actividad de FGFR. Especialmente preferido, se incrementa la actividad de FGFR-4 Gly388. El compuesto muestra preferiblemente una estimulación selectiva de una especie de FGFR. Más preferiblemente, el compuesto no reacciona de manera cruzada con diferentes especies de FGFR, es decir, se une selectivamente a una especie de FGFR dada. Sin embargo, se debería observar que, para algunas realizaciones, puede no ser necesaria una selectividad.

El compuesto de unión puede ser FGF-19 (Xie et al.), que tiene una selectividad elevada por la unión a FGFR-4. El compuesto de unión puede ser un anticuerpo anti-FGFR, que se une específicamente a FGFR-4 y no tiene reactividad cruzada significativa con otras especies de FGFR. En los ejemplos se describe un anticuerpo adecuado. El término "anticuerpo", según la presente invención, comprende anticuerpos monoclonales y anticuerpos quiméricos o humanizados derivados de ellos mediante técnicas conocidas, anticuerpos humanos, anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos monocatenarios o fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos de anticuerpos Fab, F(ab)₂, Fab', o fragmentos de anticuerpos recombinantes tales como fragmentos scFv, con tal de que muestren una unión selectiva y agonista a una especie de FGFR como se describe anteriormente. Además, el compuesto de unión puede ser una proteína de armazón que tenga características de unión similares a anticuerpos.

Mediante la unión a la especie de FGFR-4, el compuesto incrementa la actividad de tirosina cinasa. Más particularmente, se incrementa la fosforilación de tirosina de la especie de FGFR-4. El incremento de la actividad de tirosina cinasa se puede determinar, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación de la especie de FGFR-4 y la determinación subsiguiente usando anticuerpos anti-fosfotirosina adecuados, como se describe en los ejemplos.

En una realización adicional, la actividad de FGFR-4 se estimula incrementando la dosis del gen, por ejemplo administrando y/o sobreexpresando un gen de FGFR-4, y más particularmente el gen de FGFR-4 Gly388, en la célula diana u organismo diana. Esta realización comprende preferiblemente un enfoque terapéutico génico, en el que el gen de FGFR-4 se introduce en la célula diana por medio de un vector adecuado, por ejemplo un vector de

transferencia génica vírico o no vírico, como se conoce en la técnica.

El diseño de agonistas de FGFR y de otros medios para estimular la actividad de FGFR se describe por Ballinger et al. (Nature Biotech 17 (1999), 1199-1204); documentos WO 98/21237; FR-A-2796073; y WO 00/39311. Ninguno de estos documentos, sin embargo, sugiere que la activación de FGFR da como resultado una disminución de la tumorigenicidad.

La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la estimulación de la actividad de FGFR-4 conduce a una disminución in vivo del tamaño tumoral en un modelo de ratón. En consecuencia, la estimulación de la actividad de FGFR-4 se puede usar para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neoplásicas.

De este modo, también se describe un método para prevenir y/o tratar un trastorno asociado con disfunción de FGFR, particularmente asociado con una falta, al menos parcial, de la actividad de FGFR, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un compuesto en una cantidad suficiente que estimule la actividad de FGFR. Particularmente, se describe un método para prevenir y/o tratar un trastorno asociado con disfunción de FGFR, particularmente asociado con una falta, al menos parcial, de actividad de FGFR, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un compuesto de una cantidad suficiente que muestre unión selectiva a una especie de FGFR y sea capaz de estimular la actividad de FGFR mediante la unión a la misma. El sujeto es preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano. Para los fines médicos, el compuesto se administra habitualmente como una composición farmacéuticamente aceptable, que puede contener diluyentes, vehículos y/o adyuvantes adecuados. La composición puede contener también otros agentes farmacéuticamente activos, por ejemplo agentes citotóxicos para el tratamiento del cáncer.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr su fin pretendido, por ejemplo un fin terapéutico o de diagnóstico. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a aquella cantidad del compuesto que da como resultado una mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente. La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos de animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluya la IC50 según se determina en el cultivo celular (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de la actividad del receptor del factor de crecimiento). Tal información se puede usar para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación entre LD50 y ED50. Se prefieren compuestos que muestran índices terapéuticos elevados. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación se pueden escoger por el médico individual a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1, p. 1).

La cantidad e intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que son suficientes para mantener los efectos moduladores del receptor, o concentración efectiva mínima (MEC). La MEC variará para cada compuesto, pero se puede estimar a partir de datos in vitro, por ejemplo la concentración necesaria para lograr una inhibición del 50-90% del receptor usando los ensayos descritos aquí. Los compuestos se deberían de administrar usando un régimen que mantenga niveles plasmáticos por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo, preferiblemente entre 30-90%, y lo más preferible entre 50-90%. Las dosis necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y vía de administración. En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

La cantidad real de composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, del peso del sujeto, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, y del buen juicio del médico prescriptor.

Por ejemplo, las vías adecuadas de administración pueden incluir la administración oral, rectal, transmucosa, o intestinal; el suministro parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, o intraocular.

Como alternativa, el compuesto se puede administrar de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, vía inyección del compuesto directamente en un tumor sólido, a menudo en una formulación de depósito o de liberación sostenida.

Además, el fármaco se puede administrar en un sistema de suministro de fármacos dirigido, por ejemplo en un liposoma revestido con un anticuerpo específico para tumores. Los liposomas serán dirigidos a y captados selectivamente por el tumor.

También se describe una composición de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico para determinar la

expresión de una especie de FGFR en una célula diana u organismo diana. La expresión se puede determinar a nivel proteico, por ejemplo usando anticuerpos anti-FGFR, y/o determinando la actividad de FGFR. Por otro lado, la expresión de FGFR se puede determinar a nivel de ácidos nucleicos, por ejemplo determinando el ARNm de FGFR, por ejemplo mediante un protocolo de RT-PCR u otro protocolo de detección adecuado conocido en la técnica.

- 5 Se describe además un método para identificar nuevos inhibidores de afecciones patológicas, por ejemplo procesos hiperproliferativos en células u organismos, particularmente células u organismos mamíferos, particularmente células u organismos mamíferos, por ejemplo células u organismos humanos, que comprenden:

evaluar la capacidad de un compuesto para

(1) mostrar unión a una especie de FGFR, y preferiblemente

- 10 (2) estimular la actividad de FGFR mediante la unión a la misma.

El método se puede llevar a cabo como un procedimiento de identificación sistemática de alto rendimiento, que puede ser un ensayo a base de células que usa una célula que expresa o que sobreexpresa FGFR, o un ensayo libre de células, que usa proteína de FGFR sustancial o particularmente purificada. El ensayo es adecuado para identificar nuevos compuestos o clases de compuestos que tienen las propiedades deseadas, por ejemplo a partir de librerías de compuestos biológicos o sintéticos.

- 15 La capacidad de los compuestos de ensayo para mostrar las propiedades deseadas se puede determinar como se describe en los ejemplos.

Finalmente, se describe una estirpe celular capaz de producir un anticuerpo agonista anti-FGFR como se describe anteriormente. La estirpe celular puede ser una estirpe celular eucariota o procariota, por ejemplo una estirpe celular de mamífero, particularmente una estirpe celular linfóide, por ejemplo una estirpe celular de hibridoma, o una estirpe celular de CHO. Además, la célula puede ser una estirpe celular de insecto, una estirpe celular vegetal, un organismo unicelular eucariota, por ejemplo una levadura, o una bacteria, particularmente una bacteria gramnegativa tal como *E. coli*. La estirpe celular es adecuada para la fabricación de un anticuerpo agonista anti-FGFR como se describe anteriormente.

- 25 Leyendas de las figuras

Figura 1:

Células de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) que expresan FGFR-4 Gly388 humana mostraron una migración reducida en un ensayo de herida. Monocapas confluentes de células infectadas con retrovirus que contienen los ADNc de un vector de control (A, B), de FGFR-4 Arg388 (C, D) o de FGFR-4 Gly388 (E, F) se rasparon con una punta de plástico, y se incubaron con 0% de FCS (A, C, E) o 0,5% FCS (B, D, F). Después de 24 h, numerosas células de control y de FGFR-4 Arg388 individuales han migrado a la herida (B, D), en contraste con las células de FGFR-4 Gly388, que sólo muestran unas pocas células individuales en la herida (F).

- 30

Figura 2:

Mioblastos L6 (ATCC CRL-1458) que expresan FGFR-4 humana se estimularon con 1 y 10 µg/ml de 4FA6D3C10, o con la misma cantidad de anticuerpo de control (α -C), durante 10 minutos. Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación (IP) usando anticuerpos policlonales anti-FGFR-4 (α -FGFR-4). El nivel de fosforilación de la tirosina se analizó mediante transferencia Western (WB) con anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (α -PY) (panel superior). Se comprobó una carga igual de proteínas volviendo a realizar una transferencia con anticuerpos α -FGFR-4 (panel inferior).

- 35

Figura (para comparación)

El número de células de cáncer de mama MCF7 viables que expresan ectópicamente FGFR-4 humana (clon 1 y clon 2 de MCF7/FGFR4) se puede disminuir mediante tratamiento con ligandos aFGF y bFGF.

Figura 4 (para comparación)

El número de células de cáncer de mama BT549 viables que expresan ectópicamente FGFR-4 humana (clon 1 y clon 2 de BT549/FGFR4) se puede disminuir mediante tratamiento con los ligandos aFGF y bFGF.

- 45

Ejemplo 1 (de la invención)

Para abordar el papel de la expresión de FGFR-4 en la migración de células tumorales, se expresaron ectópicamente las isoformas FGFR-4 Gly388 y FGFR-4 Arg388 humanas en células de cáncer de mama humano. Los ADNc de FGFR-4 apropiados se amplificaron en células MDA-MB-453 (ATCC HTB-131) y células K562 (ATCC

CCL-243), respectivamente, y se subclonaron en el vector Bluescript I KS (Stratagene), según protocolos estándar (Current Protocols). Ambos ADNc se clonaron en el vector pLXSN (Stratagene). La estirpe celular de empaquetamiento Phoenix A (regalo de Prof. Nolan, Stanford University), que produce virus anfitrónicos, se transfectó con estos vectores usando coprecipitación de ADN con fosfato de calcio. El sobrenadante de las células Phoenix A transfectadas se recogió y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. Las células infectadas con el vector pLXSN solo se usaron como controles.

Para la infección de la estirpe celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231, que no expresa cantidades detectables de FGFR-4, se incubaron las células con sobrenadante vírico durante 24 h. Después de 48 h, el medio se sustituyó por medio que contiene 400 µg/ml de G418, y se seleccionó posteriormente bajo G418 durante 14 días. Se generaron estirpes celulares clonales mediante dilución limitada. La expresión de FGFR-4 se determinó mediante análisis de transferencia Western. Para cada isoforma de FGFR-4, FGFR-4 Gly388 y FGFR-4 Arg388, respectivamente, se escogieron para análisis posterior dos estirpes celulares clonales que muestran niveles de expresión de FGFR-4 similares. De manera análoga, se infectaron NIH-3T3 (ATCC CRL-1658) de ratón y mioblastos L6 de rata con los sobrenadantes de una estirpe celular GF + E86 productora de virus ectotróficos (Markowitz et al., 1988), dando como resultado las estirpes celulares NIH-3T3/huFGFR-4 y L6/huFGFR-4, respectivamente.

A continuación se examinó la migración de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 usando un método de medida mediante araño (Hutenlochner et al., 1998). Las células se hicieron crecer en una monocapa confluyente, y se estudió la migración durante el cierre de la herida después de que se raspase suavemente una herida con una punta de plástico. El medio se eliminó, y las células se lavaron dos veces con PBS. Se añadió medio sin suero fetal de ternera (FCS) o medio con 0,5% de FCS, y se dejó que las células se difuminaran/migraran al área aclarada durante 24 h. Sorprendentemente, en comparación con las células MDA-MB-231 de control, la velocidad de cierre de la herida disminuyó en cultivos celulares que sobreexpresan FGFR-4 Gly388 (Fig. 1). Por el contrario, las células infectadas con el virus de control, o las células que expresan la FGFR-4 Arg388, migraron de manera difuminada en la herida. De este modo, las células MDA-MB-231 que expresan FGFR-4 Gly388 muestran inhibición de la migración celular.

Para determinar si los efectos de FGFR-4 sobre el fenotipo tumoral in vitro se traducen en efectos in vivo en la tumorigenicidad, se evaluó el papel de la expresión de FGFR-4 sobre el crecimiento tumoral en ratones. Para los ensayos, se usaron ratones hembra Balb/c nu/nu de siete a diez semanas, criados en las instalaciones de animales del Instituto Max-Planck, Martinsried, Alemania. Se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos. Su cuidado y enjaulado fueron según las leyes alemanas, y se supervisaron por investigadores autorizados. Clones de células MDA-MB-231 semiconfluentes recientemente tripsinizadas, que expresan FGFR-4 Gly388 o FGFR-4 Arg388, o células de control se suspendieron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), a una concentración de $2,8 \times 10^7$ células/ml. A cada ratón se le inoculaban subcutáneamente en la región del cuello cuatro millones de células (140 µl de suspensión celular + 60 µl de Matrigel; 13 µg/ml). Tanto para expresar FGFR-4 Gly388 como para FGFR-4 Arg388, se seleccionaron dos estirpes celulares clonales individuales, y se inyectaron en conjuntos de 5-8 animales como se describe anteriormente. La formación de tumores se monitorizó durante un tiempo de hasta seis semanas. Después, o siempre que el diámetro del tumor alcanzó un tamaño de 1 cm³, los animales fueron sacrificados. Los tamaños de los tumores se midieron tres veces por semana usando calibres, y el volumen tumoral se estimó usando la fórmula longitud x anchura²/2.

Como se resume en la Tabla 1, los ratones inyectados con células de control que no expresaron ni el receptor FGFR-4 Gly388 ni el receptor FGFR-4 Arg388 formaron tumores en una semana, y el tamaño medio del tumor después de cuatro semanas fue 1 cm³. Sorprendentemente, en 12 de 13 ratones inyectados con células que expresan FGFR-4 Gly388, no se observó crecimiento tumoral, sugiriendo que FGFR-4 Gly388 provocó la inhibición completa de la formación tumoral, actuando así como un supresor tumoral. No se detectaron tumores en el período de monitorización de seis semanas. De forma interesante, las células que expresan la isoforma FGFR-4 Arg388 provocaron tumores en 80% y 62,5% de los ratones inyectados. Sin embargo, el tamaño de los tumores formados por estas células fue significativamente más pequeño que el tamaño de los tumores formados por células de control infectadas con el vector pLXSN solo. Además, los tumores que resultan de la inyección con los clones que expresan FGFR-4 Arg388 crecieron todos de forma más lenta que los tumores derivados de células de control. De este modo, aunque FGFR-4 Arg388 es menos activa suprimiendo el crecimiento tumoral que FGFR-4 Gly388, todavía confiere una ventaja significativa en comparación con una falta de expresión de FGFR-4.

Estos resultados demuestran que la activación específica de la FGFR-4 tiene el potencial de bloquear y/o inhibir la progresión tumoral. Por lo tanto, las siguientes investigaciones se concentraron en la generación de anticuerpos monoclonales frente al dominio extracelular de FGFR-4, y su uso en la activación de FGFR-4. Para este fin, se preparó una proteína de fusión de glutatona-S-transferasa (GST) (Smith & Johnson, 1988), que comprende el dominio extracelular de FGFR-4 (FGFR-4 ex). Se usó el vector de clonación pSj26(mod) (Seiffert et al., 1999), que se diseñó para la expresión y secreción eucariota de proteínas de fusión recombinantes, y que se derivó del vector de clonación pCDNA3 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) insertando la secuencia de ADN completa, que codifica glutatona-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* (Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania), en los sitios

Xho1 y Apa1 de pCDNA3.

El dominio extracelular de FGFR-4 se amplificó mediante PCR usando los siguientes cebadores: sentido: AAGAATTCGCCACCATGCGGCTGCTGCTGGCCCTGTTG (SEC ID NO. 1), antisentido: CGAGGCCAGGTATACGGACATCATCCTCGAGTT (SEC ID NO.2). El producto de la PCR se digirió con EcoR1 y Xho1, y se clonó en pSj26(mod). El plásmido de expresión pSj26(mod)-FGFR-4ex resultante se transfectó en células 293 (ATCC CRL-1573) mediante el método de coprecipitación de ADN con fosfato de calcio. Las células se hicieron crecer en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de FCS. Tras la selección con 1 mg/ml de G418 (Sigma, Deisenhofen, Alemania) durante dos semanas, los clones supervivientes se ensayaron para determinar la expresión y secreción de la proteína de fusión mediante análisis de transferencia Western con anticuerpos frente a GST. Para producir FGFR-4ex, se usaron células de expresión elevada. El medio se recogió cada dos días de cultivos confluentes. Se filtró de forma estéril un litro de medio recogido, y se incubó con 1 ml de glutatión sefrosa (Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania) toda la noche a 4°C. La sefrosa se separó y se lavó con disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se llevó a cabo una elución con 5 ml de glutatión 10 mmoles/l, a 20°C. La proteína de fusión eluida se dializó 1:10⁶ (vol/vol) en PBS/10% de glicerol. La concentración de proteína se determinó usando el kit de determinación de proteína MicroBCA (Pierce, Rockford, IL).

Se provocaron anticuerpos monoclonales mediante inmunización de ratones hembra Balb/c de cuatro a ocho semanas con proteína de fusión FGFR-4-GST recombinante purificada, como se describe anteriormente, que contiene el dominio extracelular completo de FGFR-4. A los ratones se les inyectó intramuscularmente 3 veces en intervalos de 14 días 50 µg de proteína diluida 1:2 en adyuvantes ABM-2 (Pan-Systems, Aidenbach, Alemania). Los bazo se retiraron 4 días después de la última inyección para la fusión con la estirpe celular de mieloma SP2/0. Los hibridomas resultantes se hicieron crecer en medio de cultivo RPMI 1640 que contiene 10% de FCS, antibióticos, e hipoxantina, aminopterina, y timidina (HAT) (Sigma). Los sobrenadantes del cultivo se cribaron mediante citometría de flujo en células NIH-3T3/huFGFR-4 (véase anteriormente), y los hibridomas positivos, que segregan anticuerpos que reconocen selectivamente al transfectante, pero no a las células NIH-3T3 parentales, se clonaron mediante dilución limitante. Se cultivó un clon reactivo a FGFR-4 (4FA6D3C10) en medio libre de suero suplementado con 1% de Nutridoma (Roche, Alemania), y los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes usando columnas de proteína G-sefrosa (Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania).

A fin de evaluar el papel funcional de 4FA6D3C10 sobre la activación de FGFR-4, se dejaron sin tratar células L6/huFGFR-4, o se estimularon con 10 y 20 µg/ml de 4FA6D3C10 durante 10 minutos a 37°C. Las células se lisaron en hielo en tampón de lisis (50 mM de HEPES pH 7,5, que contiene 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 10% (v/v) de glicerol, 1% (v/v) de Triton X-100, 1 mM de fluoruro de sodio, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de ortovanadato de sodio, 1 mM de β-glicerolfosfato, 10 µg/ml de aprotinina). Los lisados brutos se centrifugaron a 12500 g durante 20 min. a 4°C. La FGFR-4 sobreexpresada se inmunoprecipitó mediante anticuerpo policlonal anti-FGFR-4 (Santa Cruz) y 30 µl de proteína A-sefrosa (Pharmacia), que se añadieron al lisado aclarado, y se incubó durante 3 h a 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron con un tampón de lavado (20 mM de HEPES pH 7,5, que contiene 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de fluoruro de sodio, 10% (v/v) de glicerol, 1% (v/v) de Triton X-100). Se añadió tampón de muestra, que contiene SDS y 2-mercaptoetanol, y las muestras se desnaturalizaron calentando a 95°C durante 4 min.

Las proteínas se fraccionaron mediante SDS-PAGE, y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Para determinar el nivel de fosforilación de la tirosina de FGFR-4, los filtros de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón específico de fosfotirosina 4G10 (Upstate Biotechnology) a 4°C. Después, se añadió un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra o anti-conejo de cabra, acoplado a HRP, seguido de una reacción del sustrato con quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham, Alemania). La reacción del sustrato se detectó en película Kodak X-Omat. Para asegurar cantidades iguales de proteína FGFR-4 inmunoprecipitada, los filtros se extrajeron según el protocolo del fabricante (Amersham, Alemania), se bloquearon y se volvieron a sondear con anticuerpo policlonal anti-FGFR-4.

El tratamiento de células L6/huFGFR-4 con 4FA6D3C10 condujo a un incremento significativo de la fosforilación de tirosina de FGFR-4, como se muestra en la Figura 2. Estos datos demuestran que se puede usar un anticuerpo monoclonal, y en particular 4FA6D3C10, para la activación del receptor FGFR-4.

Tabla 1

Células	Genotipo	Número de ratones inyectados/tumores
MDA-MB-231 plx	Sin expresión de FGFR-4	12/13
MDA-MB-231 WT2	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

Tabla 1:

Se inocularon 4×10^8 células subcutáneamente en cada ratón en la región del cuello (140 μ l de suspensión celular + 60 μ l de Matrigel; 13 μ g/ml). El crecimiento tumoral se monitorizó cada 2-3 días. Los animales se sacrificaron después de seis semanas, o siempre que el diámetro del tumor alcanzó un tamaño de 1 cm³. El tamaño de los tumores formados por estas células fue significativamente más pequeño que el tamaño de los tumores formados por células de control infectadas con el vector pLXSN solo. plx: células de control, WT: FGFR-4 Gly388; MT: FGFR-4 Arg388.

Ejemplo 2 (para comparación)

Aunque FGFR4 y sus ligandos se expresan en un número de estirpes celulares de cáncer humano, no se ha investigado completamente el papel de FGFR4 en la regulación del desarrollo tumoral humano. Para analizar la función de FGFR4 a la hora de regular el crecimiento tumoral de células de cáncer humano, se utilizaron las estirpes celulares de cáncer de mama humano BT549 y MCF7 que expresan ectópicamente FGFR4 humana.

Células MCF7 de cáncer de mama se colocaron por triplicado en placas de 12 pocillos, a 5000 células/500 μ l de medio suplementado con 10% de FCS, y se incubaron durante 24 h. Las células se estimularon con 10 ng/ml de aFGF y bFGF o 25 ng/ml de beta-heredulina en 1% de FCS, y se hicieron crecer durante un período de 6 días. En el caso de la estirpe celular de cáncer de mama BT549, las células se cultivaron en placas por sextuplicado en cápsulas de 96 pocillos, a 1000 células/100 μ l en medio de crecimiento normal (DMEM, 10% de FCS; 0,065% de insulina 40 U/ml), y se incubaron durante 24 h. El medio se eliminó, y las células se trataron con 10 ng/ml de aFGF, bFGF o 25 ng/ml de beta-heredulina durante 72 h sin FCS ni insulina. Se evaluó la proliferación usando el ensayo no radioactivo AlamarBlue (Biosource). De forma breve, se añadió AlamarBlue en una cantidad igual a 10% del volumen de cultivo, y se incubó durante 2 horas a 37°C. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 544 nm, y una longitud de onda de emisión de 580 nm. Con fines comparativos, los valores se calcularon y se presentan como porcentaje de control (células sin estimular).

Como se muestra en la Figura 3, la estimulación con aFGF o bFGF de células MCF7 infectadas con vector vacío conduce a un incremento significativo de las células viables. Además, el tratamiento con beta-heredulina o beta-heredulina y bFGF activa simultáneamente la proliferación celular. Sin embargo, la exposición de células MCF7 que expresan ectópicamente FGFR4 (clon 1 y clon 2 de MCF7/FGFR4) a aFGF o bFGF da como resultado un crecimiento celular reducido. Además, la proliferación de células de cáncer de mama BT549 que expresan FGFR4 se reduce cuando se estimulan con aFGF, bFGF o beta-heredulina (Figura 4), mientras que la proliferación celular de las células de control BT549 no se ve afectada. Por lo tanto, FGFR4 funciona como un inhibidor de células de cáncer de mama MCF7 y BT549.

Bibliografía:

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y 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. 20 de abril de 1998, 141(2):515-26.

Smith, D.B. y 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. abril de 1988; 62(4):1120-4.

Seiffert, M., Cant, C., Chen, Z., Rappold, I., Brugger, W., Kanz, L., Brown, E.J., Ullrich A., Buhning, H.J., Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. Blood. Dic. de 1999 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. Oct. de 1999; 11(10):729-35.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> MPI f. Biochemie	
5	<120> Antagonistas de FGFR	
	<130> 27320PEP_RI	
	<140> 02002358.6	
	<160>2	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
10	<210> 1	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador	
	<400> 1	
20	aagaattcgc caccatgcgg ctgctgctgg ccctgttg	38
	<210>2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador	
30	<400> 2	
	cgaggccagg tatacggaca tcatacctga gtt	33

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que es capaz de estimular la actividad de tirosina cinasa de una especie 4 del Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR-4) para la fabricación de un agente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neoplásica, en el que el compuesto es FGF-19, un anticuerpo anti-FGFR-4, o un gen de FGFR-4 que se ha de administrar y/o sobreexpresar en una célula diana u organismo diana.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la FGFR-4 es FGFR-4 Gly388.
3. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-FGFR-4 o un gen de FGFR-4 que estimula la actividad de tirosina cinasa de una especie 4 del Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR-4), que se va a administrar y/o sobreexpresar en una célula diana u organismo diana, opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neoplásica.

Figura 1

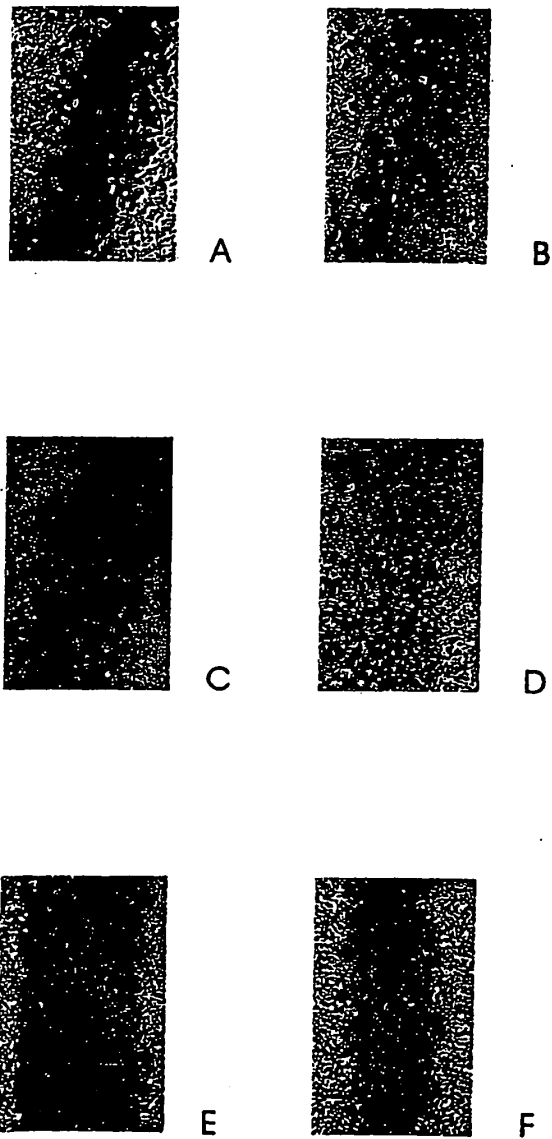


Figura 2

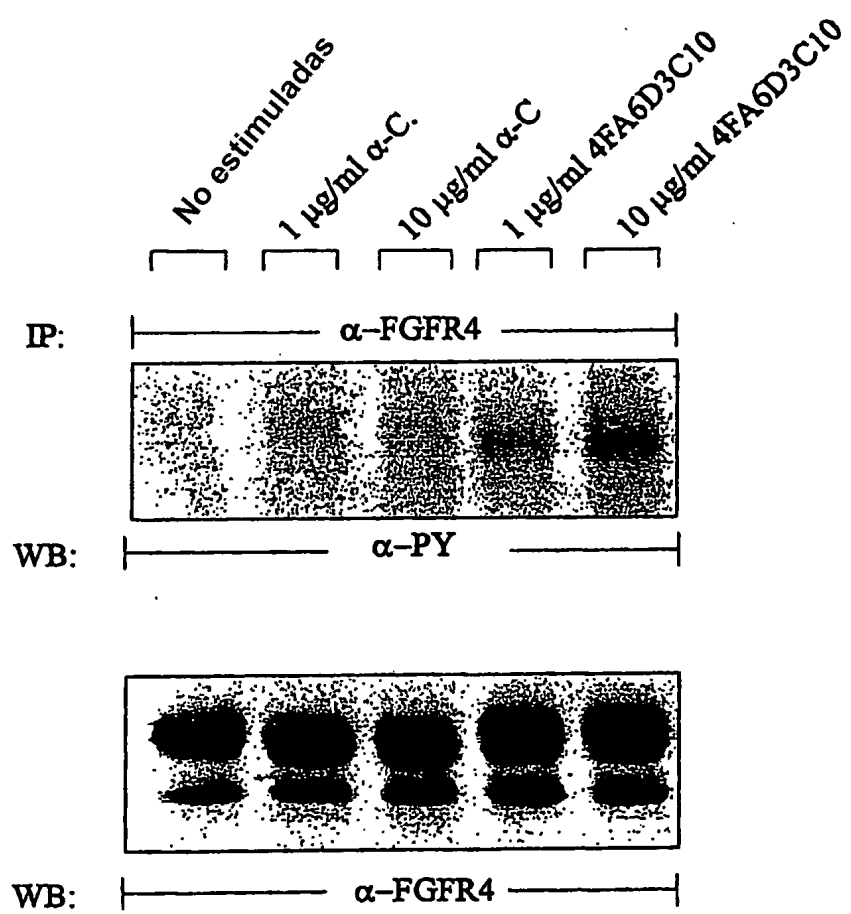


Figura 3

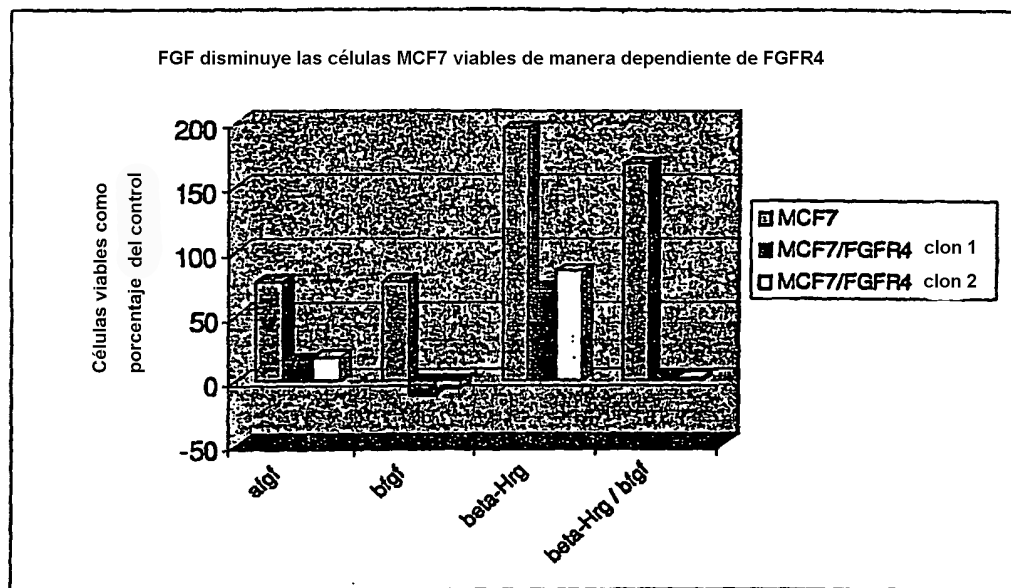


Figura 4

